ZEISS LSM 880 Airyscan

Microscópio confocal

STARTUP – SHUTDOWN MANUAL

CAPI

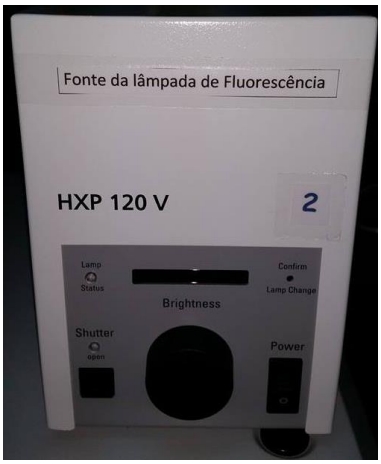
Centro de Aquisição e Processamento de Imagens

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

2015

POP LSM 880

Ligar o microscópio na sequencia indicada: 1-2-3-4-5



Após ligar o computador deve-se aguardar um tempo para que haja a comunicação entre os sistemas (conectados em rede). Pode-se observar isso na tela do computador e posteriormente pode-se abrir o software.

Observações:

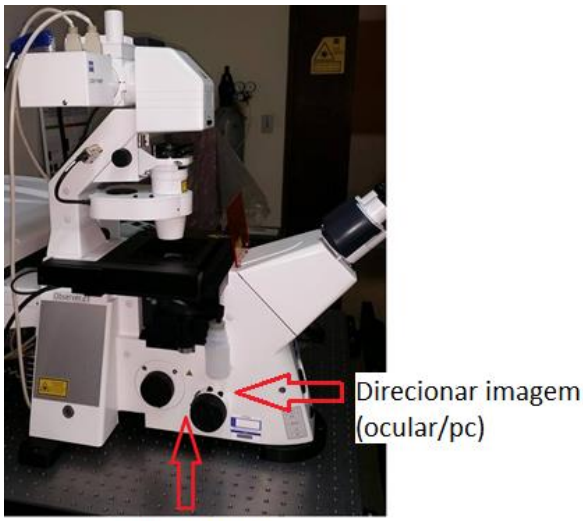
- Caso o sistema trave, deve-se reiniciar o PC mantendo os lasers ligados.

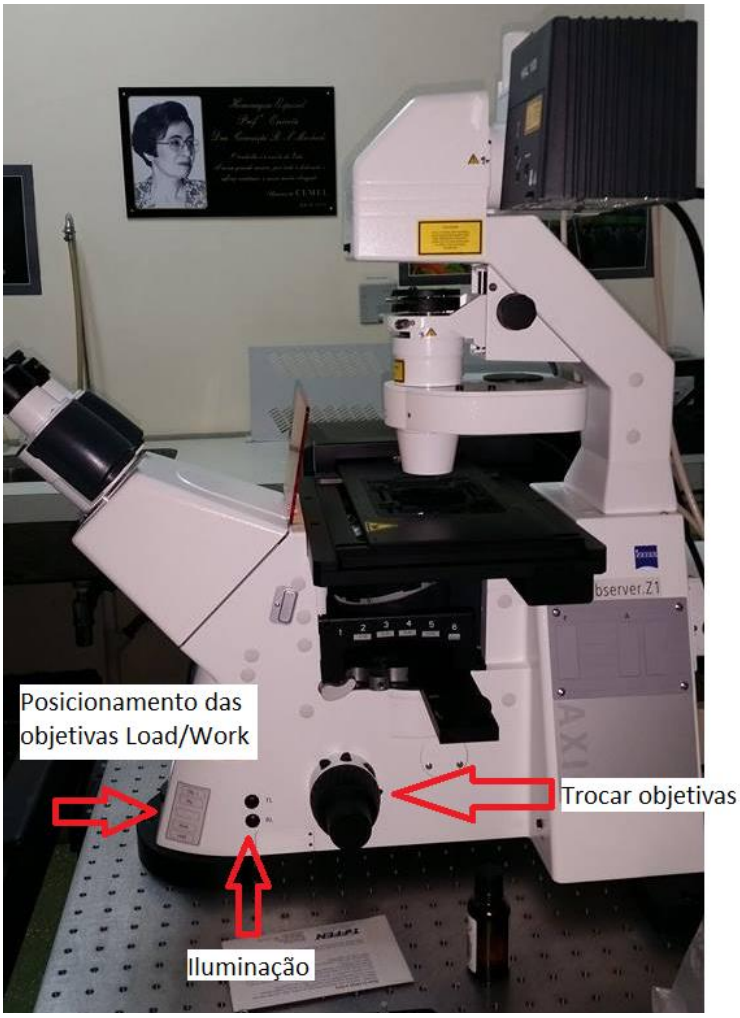
- A lâmpada de fluorescência (2) só deve ser ligada no caso seja utilizada. Pode-se alterar a intensidade da lâmpada.

  Caso a lâmpada de fluorescência não tenha sido ligada irão aparecer algumas

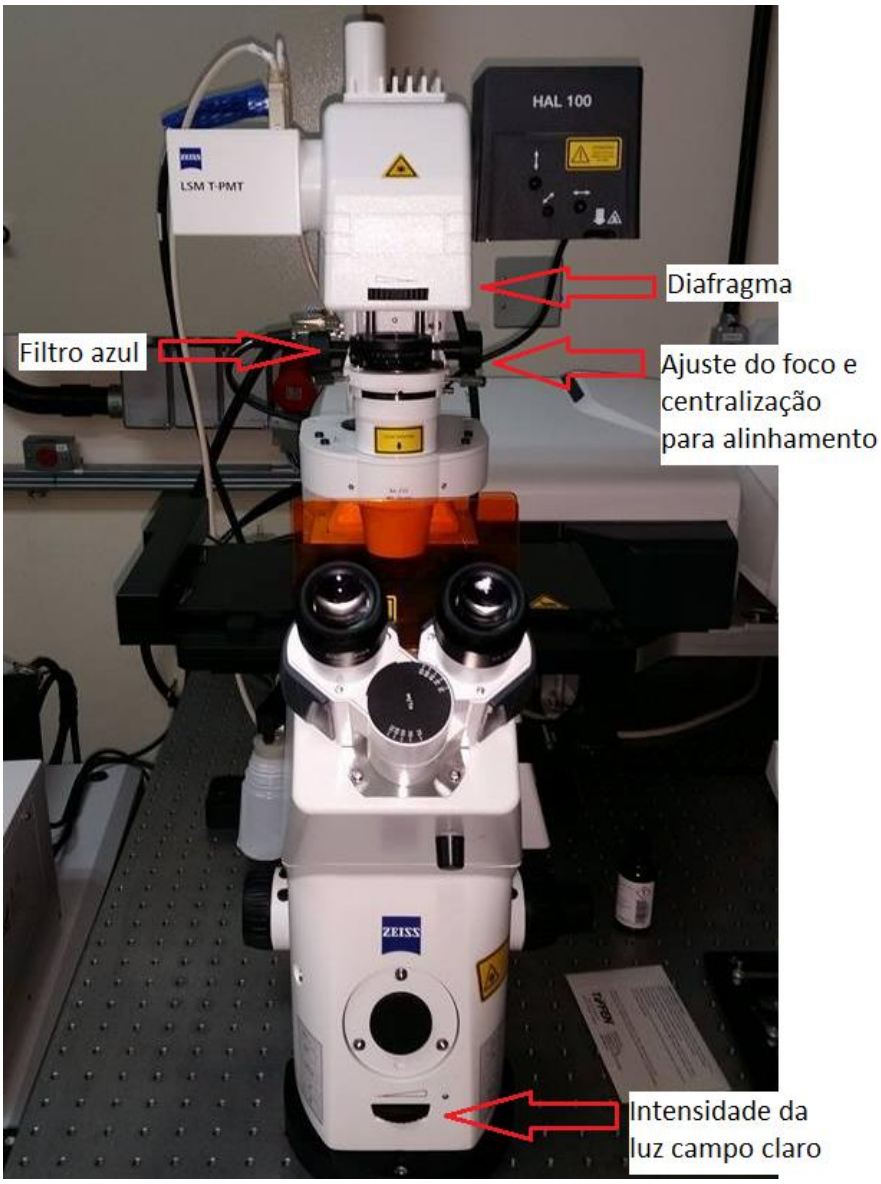
  mensagens de erro ao iniciar o ZEN. Essas mensagens podem ser ignoradas, o ZEN funcionará normalmente.

Para utilizar o computador no modo off-line, apenas para visualização de imagens salvas, basta ligar as chaves 1, 3 e 4.





Load: descer objetiva
Work: retornar para a posição de trabalho
TL: iluminação campo claro
RL: iluminação fluorescente



Filtro azul – deixa luz de halogênio branca

Alinhamento: deve-se começar pela objetiva de 10x. O diafragma deve ser fechado para ajuste do foco e centralização.

Botões do condensador:
BF – campo claro
DIC – dicroico para fluorescência e confocal

Analisador: utilizado para visualizar no DIC fluorescência
Tirar o analisador para visualização no confocal

Prisma abaixo da objetiva: muda relevo da imagem (DIC)

Suporte de amostras: deve ser encaixado ponto vermelho com ponto vermelho.

Lamínula ideal: de 0,17 mm de espessura.

Óleo de Imersão: não balançar, bolhas prejudicam a qualidade do óleo.

Limpeza das objetivas: Após trabalhar utilizando objetivas de imersão em óleo (40x e 63x), limpar a objetiva, mesmo que for utilizá-la novamente, com o papel próprio, disponível na sala, passando o papel na parte metálica da objetiva, ao redor da lente, nunca esfregar a lente.

Observação: Deve-se apagar a luz da sala para eliminar o background. Não tem a ver com gastar fluorescência.

POP Software Zen 2 (LSM 880)

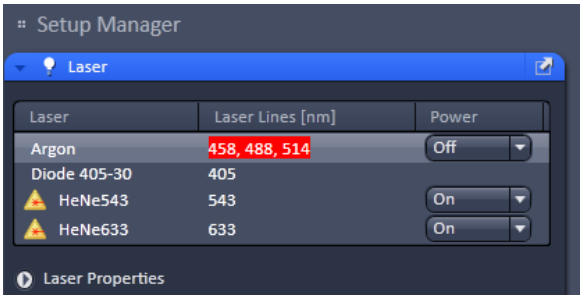
1) Abrir o programa Zen 2
2) Para visualizar imagens antigas, clicar *Image processing*.
3) Para captura de nova imagem, clicar *Start system* e aguardar.

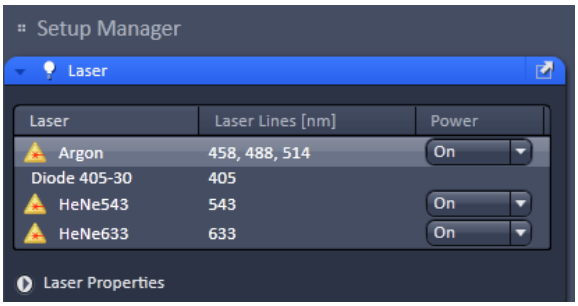
Importante: Conferir conexão de rede com o PC principal

4) As imagens deverão ser salvas no drive D na pasta “Imagens usuários”. Elas podem ser salvas em diferentes formatos e também exportadas.

5) Ligar lasers: Abrir *Acquisition*, na aba *Laser* e clicar ON para todos os lasers que serão utilizados. O laser Argon demanda 30 min para estabilizar antes do uso (*Stand by*).

NÃO DESLIGAR LASER ENTRE USUÁRIOS DURANTE O MESMO DIA!





6) Para visualizar a amostra no microscópio, clicar *Locate* na aba superior esquerda. Ajustar o caminho da luz ou escolher uma das configurações:
   a. BF trans - campo claro
   b. Green FL – filtro fluorescência verde
   c. Orange – filtro fluorescência laranja
   d. Dapi – filtro fluorescência azul

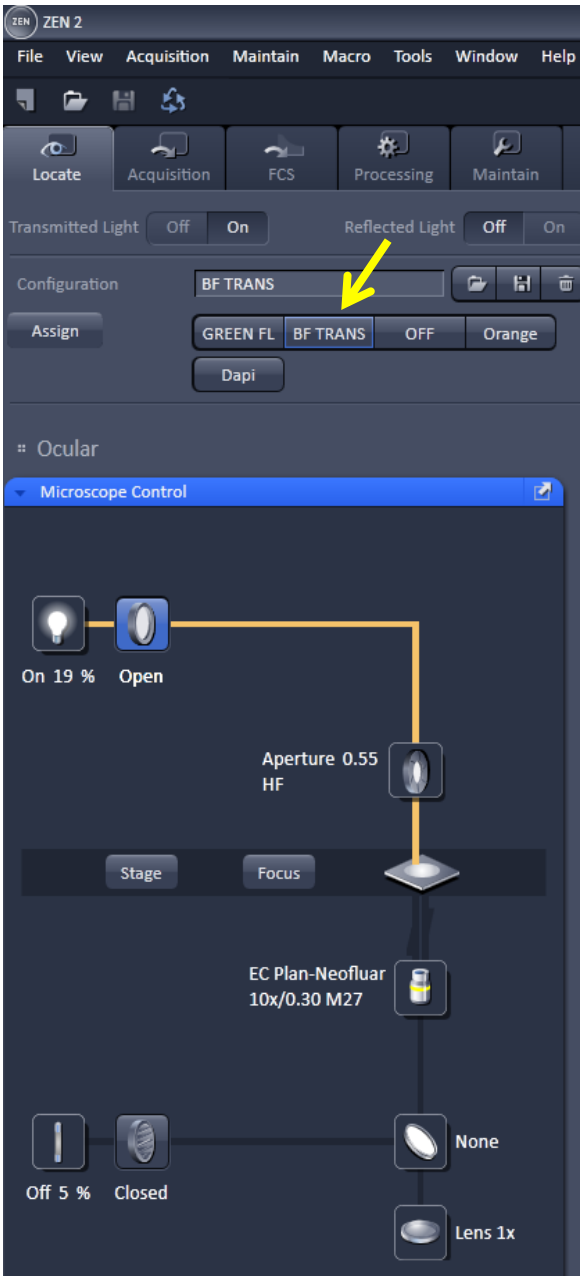
7) Escolher a objetiva e ajustar foco visualizando no microscópio. Para as objetivas 40X e 63X, usar óleo de imersão.

ATENÇÃO: Limpar lâminas sujas de óleo antes de trocar para objetivas 10x ou 20x !!

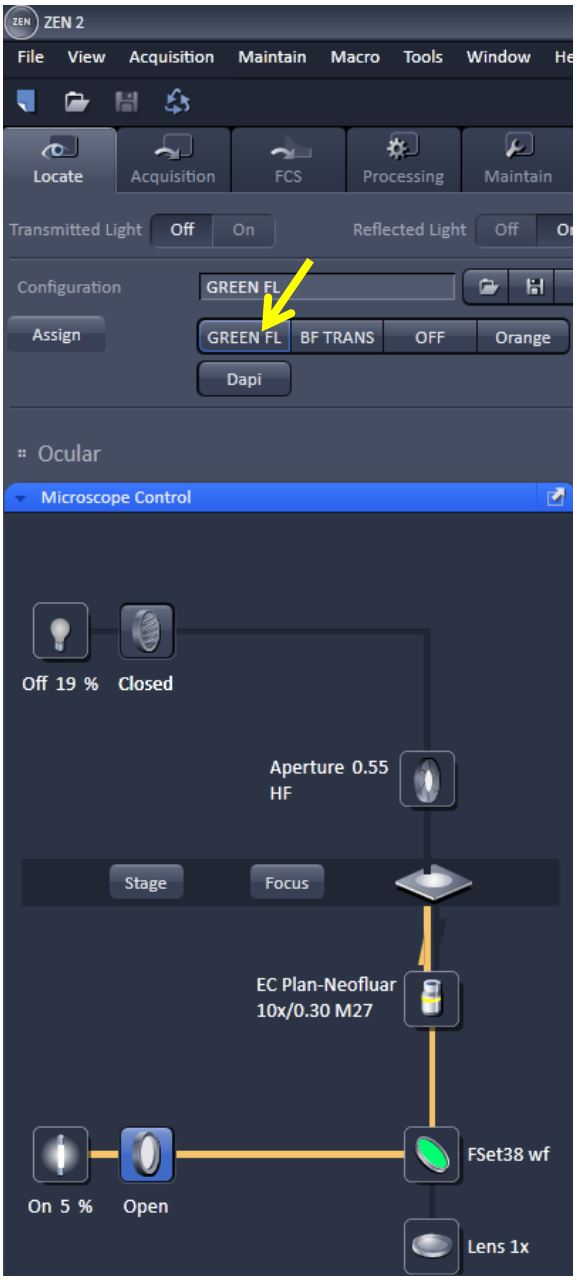
Filtros de Fluorescência (gráficos no anexo1):

- FSet38 **(FITC)-** excitação: BP 470/40; emissão: BP 525/50.
- FSet43 **(Rodamina)-** excitação: BP 545/25; emissão: BP 605/70.
- FSet49 **(DAPI)-** excitação:G 365; emissão: BP 445/50.

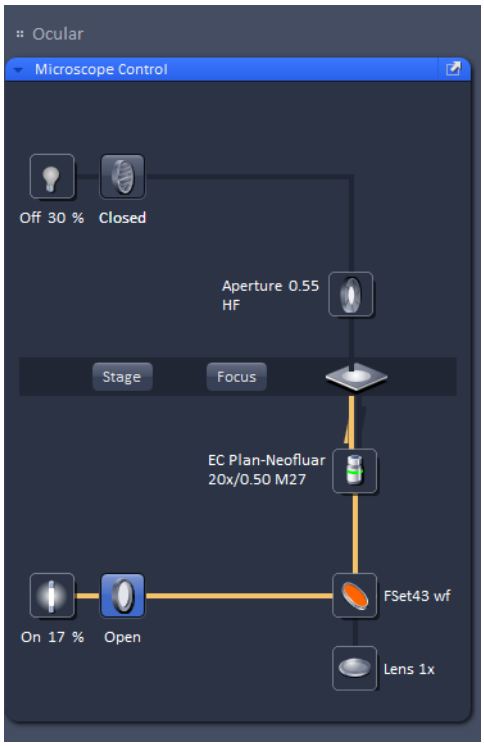
Luz campo claro



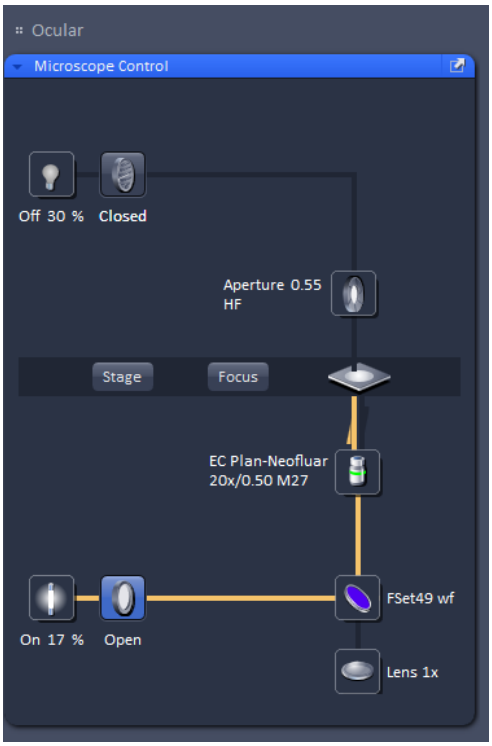
Fluorescência verde



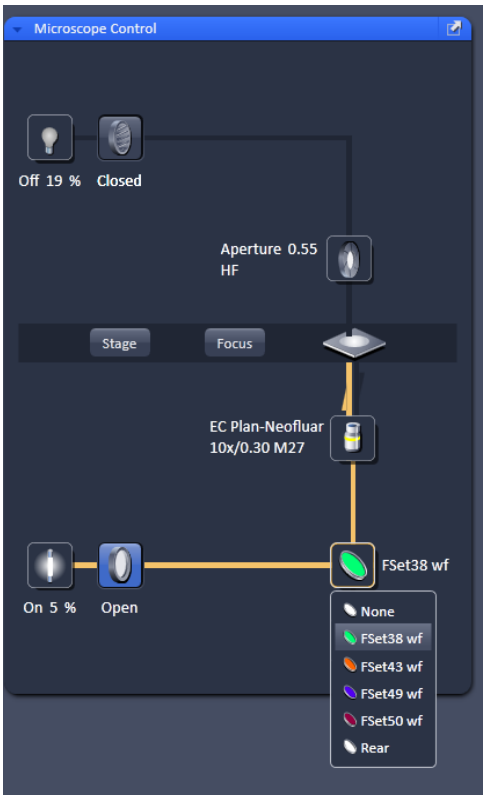
Fluorescência laranja



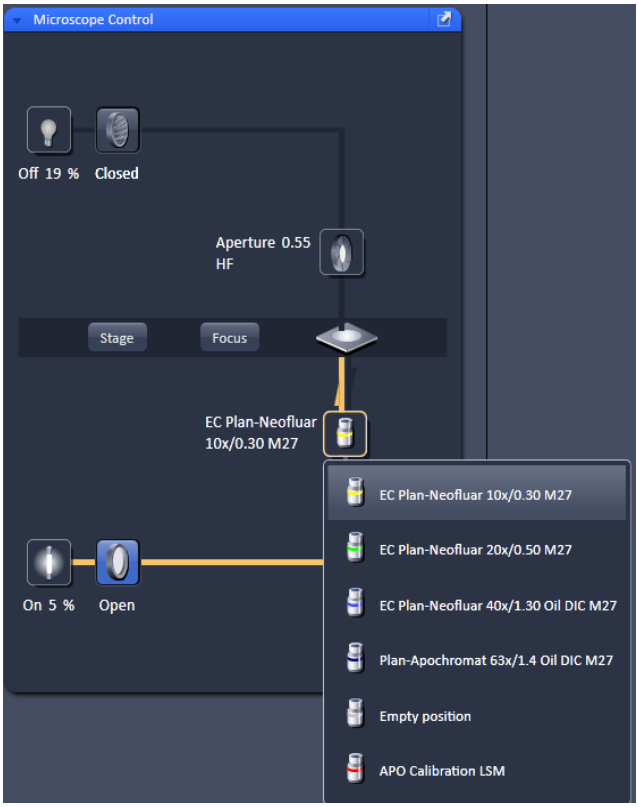
Dapi



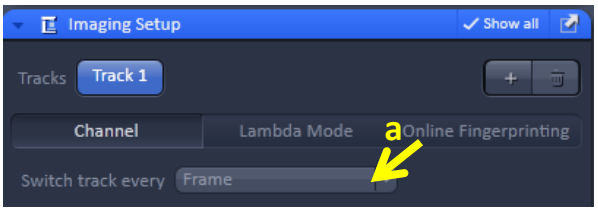
Trocar filtro de fluorescência



Trocar objetiva

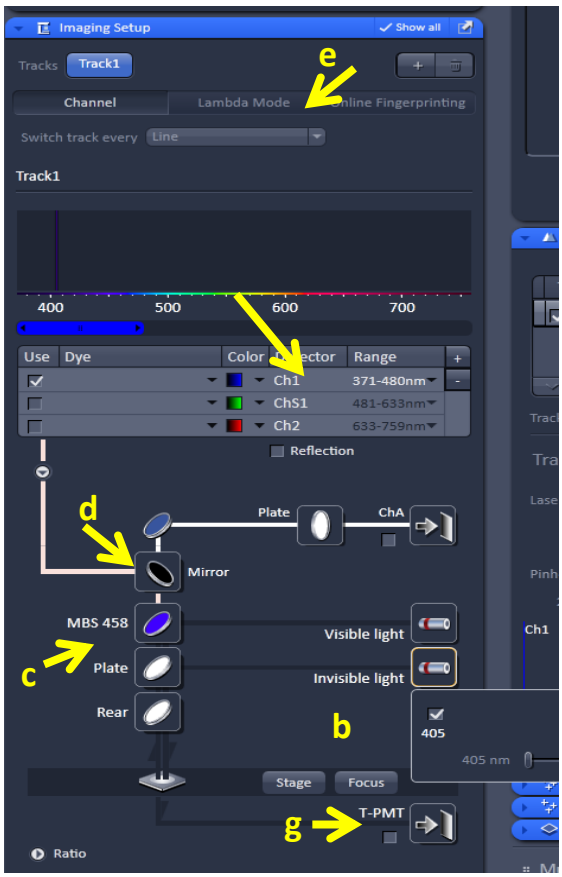


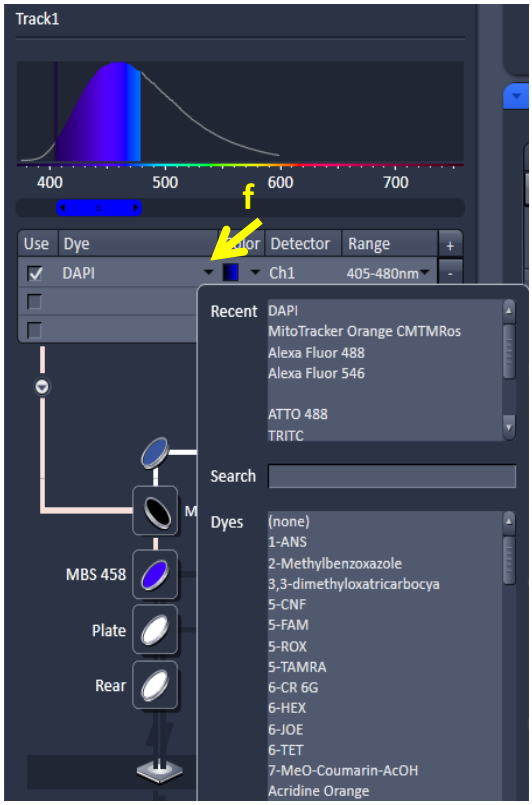
8) **Captura de imagem**: clicar em *Acquisition*, na aba *Imaging setup* e ajustar os canais de detecção e laser (*channels)*.



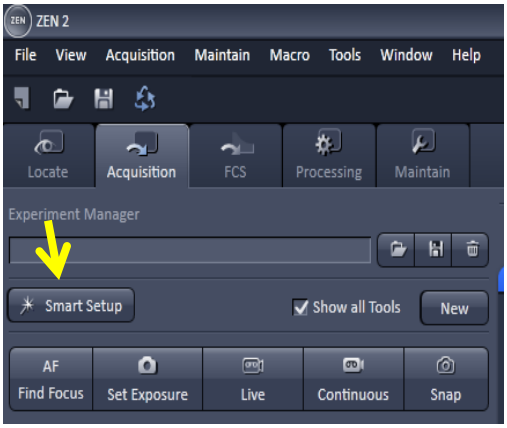
<u>8.1. Ajuste manual</u>

a) *Switch track every*: Frame
b) Marcar laser para excitação (aparecerá linha no gráfico no comprimento de onda).
c) Selecionar disco dicroico de acordo com comprimento de onda (≥ que excitação)
d) *Mirror* para refletir o laser para os detectores Ch1, ChS1 e Ch2
e) Escolher detector (Ch1, ChS1 ou Ch2)
   1= detecta ↓ comp. onda (eficiente para o azul)
   S= Amplo espectro 32 canais
   2= detecta ↑ comp. onda (eficiente para o vermelho)
f) Para amostras marcadas, selecionar *Dye* utilizado e verificar na onda o intervalo de detecção (gráfico).
g) T-PMT é utilizado caso queira usar uma imagem DIC (campo claro com fluorescência).





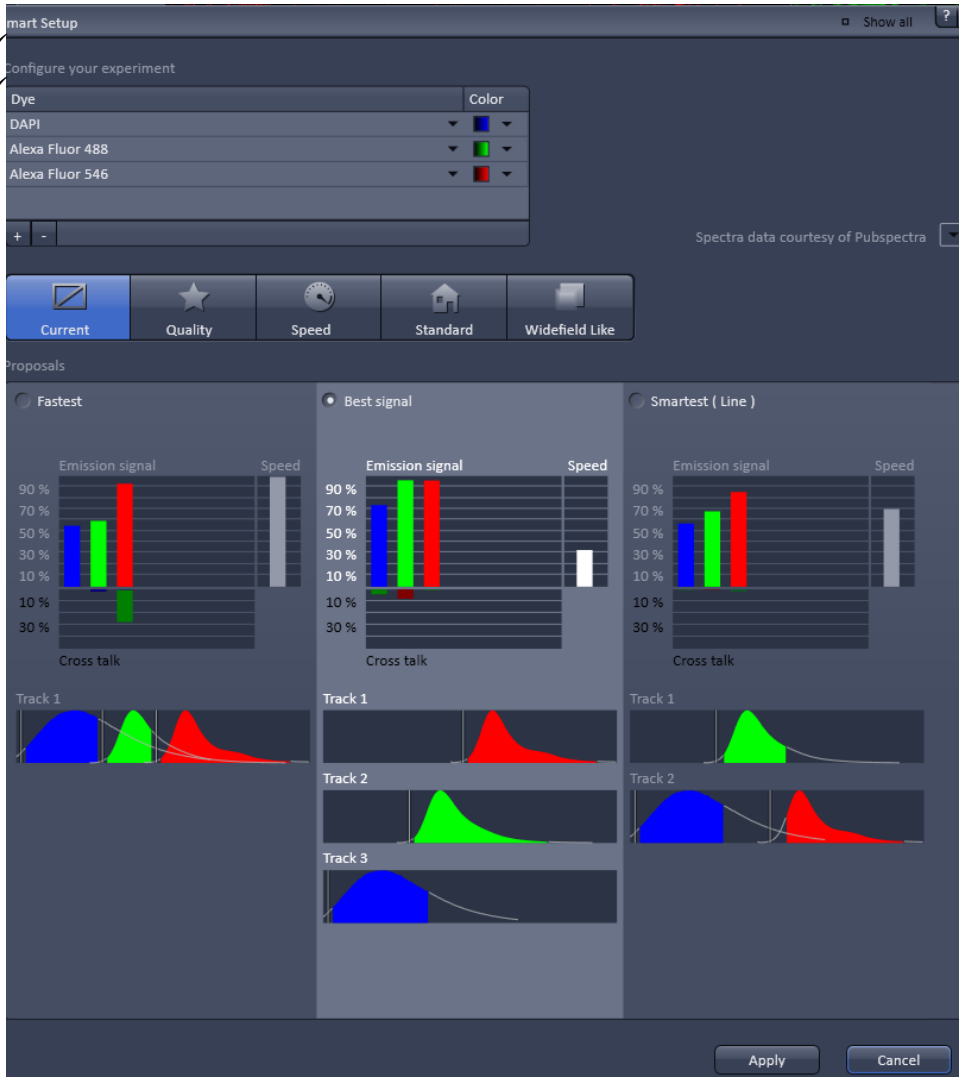
8.2. Ajuste com *Smart setup*



Obs.: mais de um dye deve ter sido selecionado.

a) Acrescentar os *dyes* de interesse.
b) Clicar em *Smart setup*:

c) Selecionar o modo *Fastest*, *Best Signal*, ou *Smartest*:



✓ Quanto maior n^{o} de *Tracks*, mais demorado.
✓ Gráfico mostra interferência de detecção entre as curvas de emissão.
✓ Lembrar de conferir o caminho óptico proposto e fazer os demais ajustes (aquisição, pinhole e potência do laser).

8.3. Ajustar a qualidade da imagem no *Acquisition mode*:

a. Pixels (x,y): clicar *optimal* para determinar a melhor resolução, mas pode-se definir manualmente.

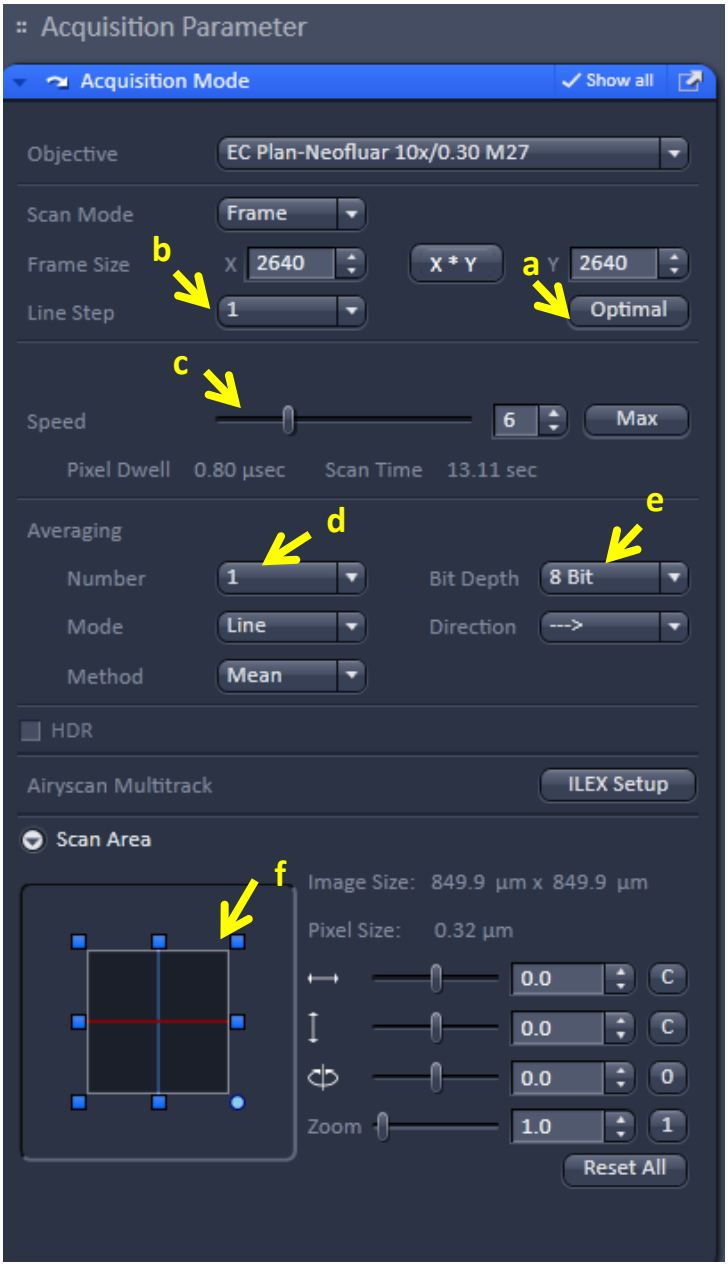
b. *Line step:* distância de escaneamento, em pixel. Quantos pixels são saltados na linha de escaneamento (quanto ↑, menor resolução)

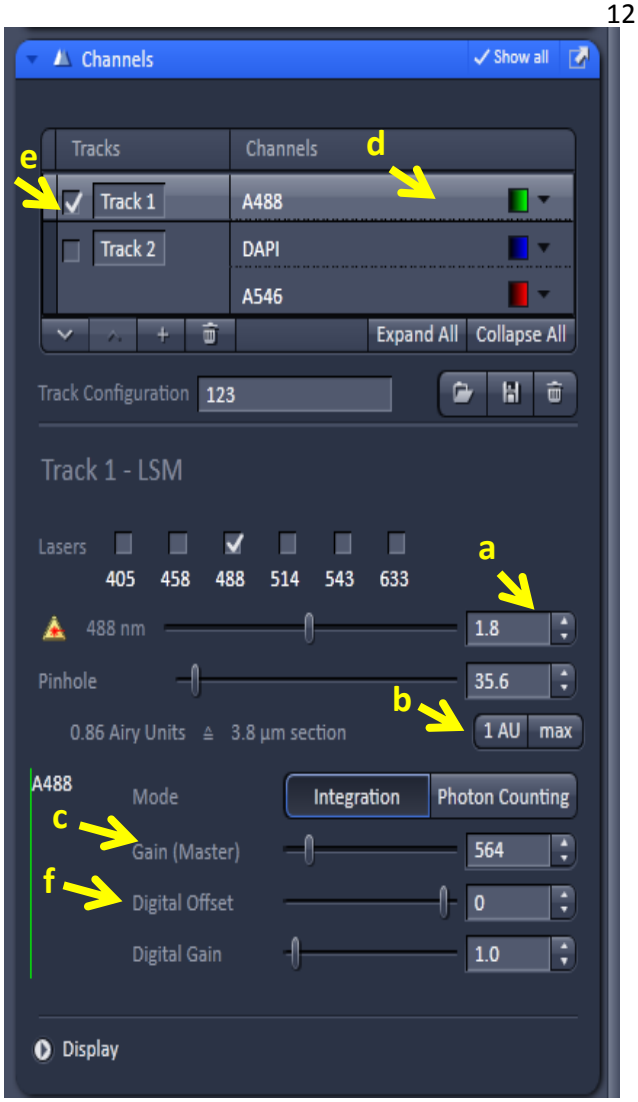
c. *Speed*: Velocidade de escaneamento: quanto maior, pior resolução (ideal até 6)

d. *Averaging:* quanto maior melhor resolução (diminui ruído)

e. *Bit Depth:* escala de cinza (mais tons de cada cor – como em uma caixa de lápis de cor)

f. *Scan area*: permite dar zoom e selecionar área





8.4. Ajustar lasers:

a. Potência do laser: Pode começar no 1,0 para ajustar, ir no máximo até 3,0.

b. Ajustar Pinhole (ideal: 1AU)

c. Ganho do detector: Ajustar antes de mudar a potência do laser (ideal: entre 500 e 800).

d. Quando houver mais de um track, clicando em um deles, a aba ficará cinza claro, e então esse track poderá ser configurado. (Ajustar um canal de cada vez no live).

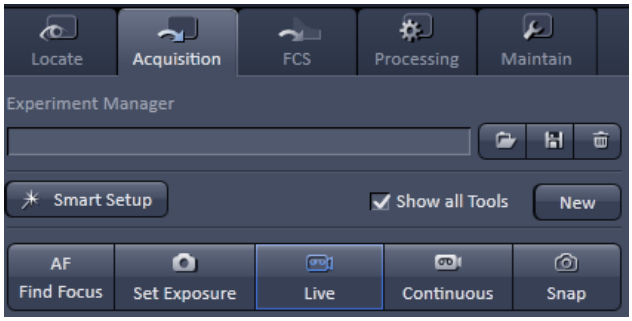
e. Para ser capturado, o track deve ter sido selecionado.

f. Offset tira o ruído (tira níveis de cinza menores que o sinal), melhorando a imagem (valor negativo).

Observação:

- É possível salvar a configuração de cada canal ou experimento.
- Se abrir uma imagem salva e clicar em **REUSE**, aparecem as mesmas configurações da imagem salva.
- Quando for utilizar vários canais, usar primeiro os de maior comprimento de onda (menor energia), DAPI deve ser o último.
- Menores comprimentos de onda apresentam maior resolução (menor fatia óptica – pinhole).

8.5. Selecionar modo de aquisição da imagem:



AF: não é funcional para fluorescência (avalia pelo contraste)

Set Exposure: utiliza parâmetros determinados pelo programa, ganho do detector.

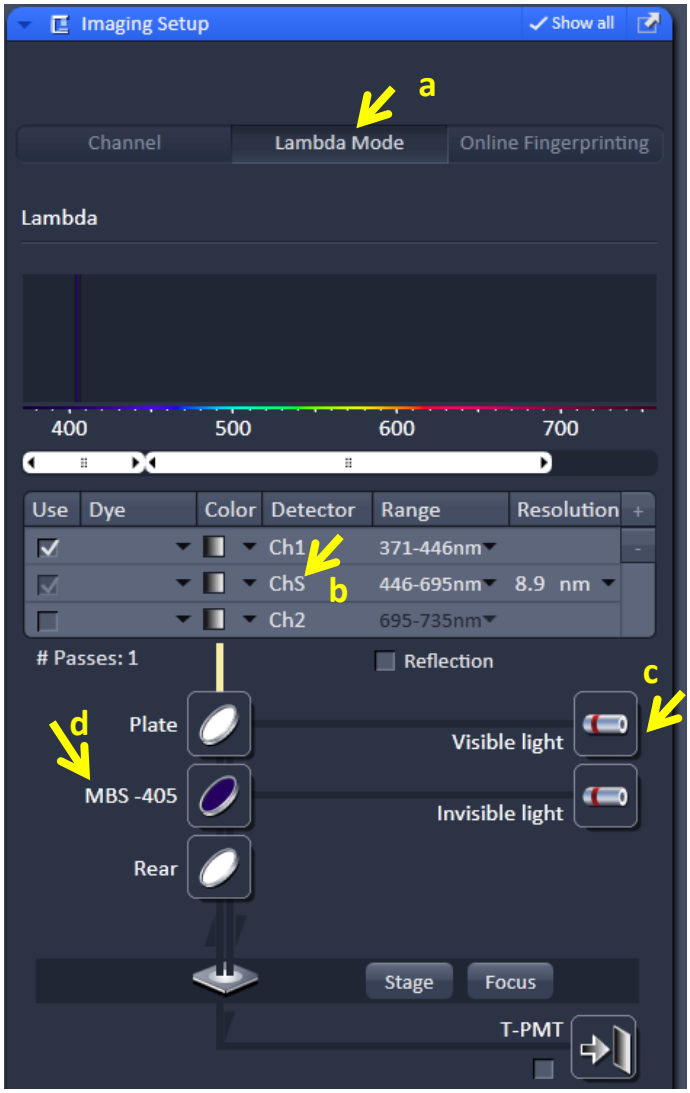
Live: visualizar ao vivo (resolução baixa para rápida visualização, não usa configurações da captura).

Continuo: visualização ao vivo, com as configurações determinadas para a captura.

Snap: tira foto com as configurações determinadas para a captura.

9) Lambda Mode

Função de análise espectral: separa os picos do espectro emitido pela amostra. Usado para distinguir autofluorescência de marcadores ou quando há fluoróforos com picos de emissão muito próximos (ex. FITC e GFP)



a) Em *Imaging Setup*, clicar em *Lambda Mode*

b) Selecionar os detectores (Ch1, ChS, Ch2)

c) Selecionar os lasers

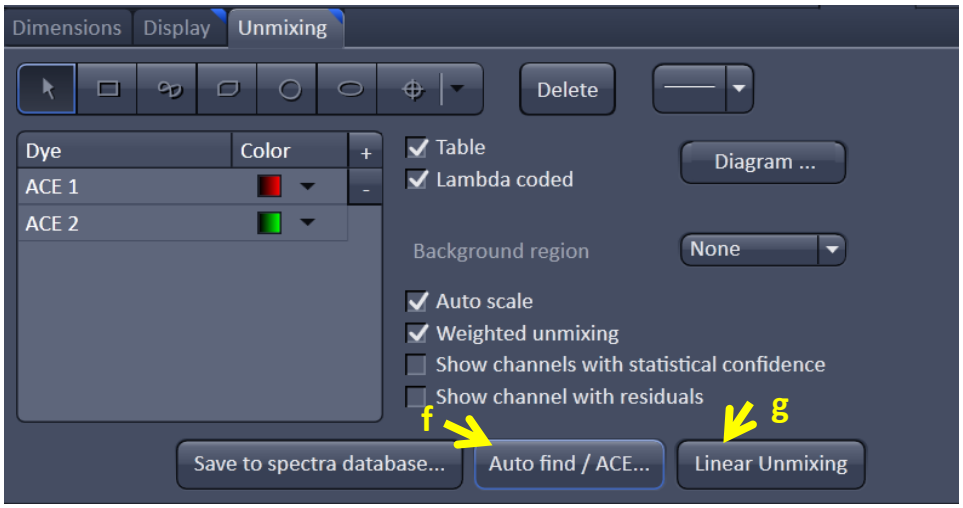
d) Selecionar filtro

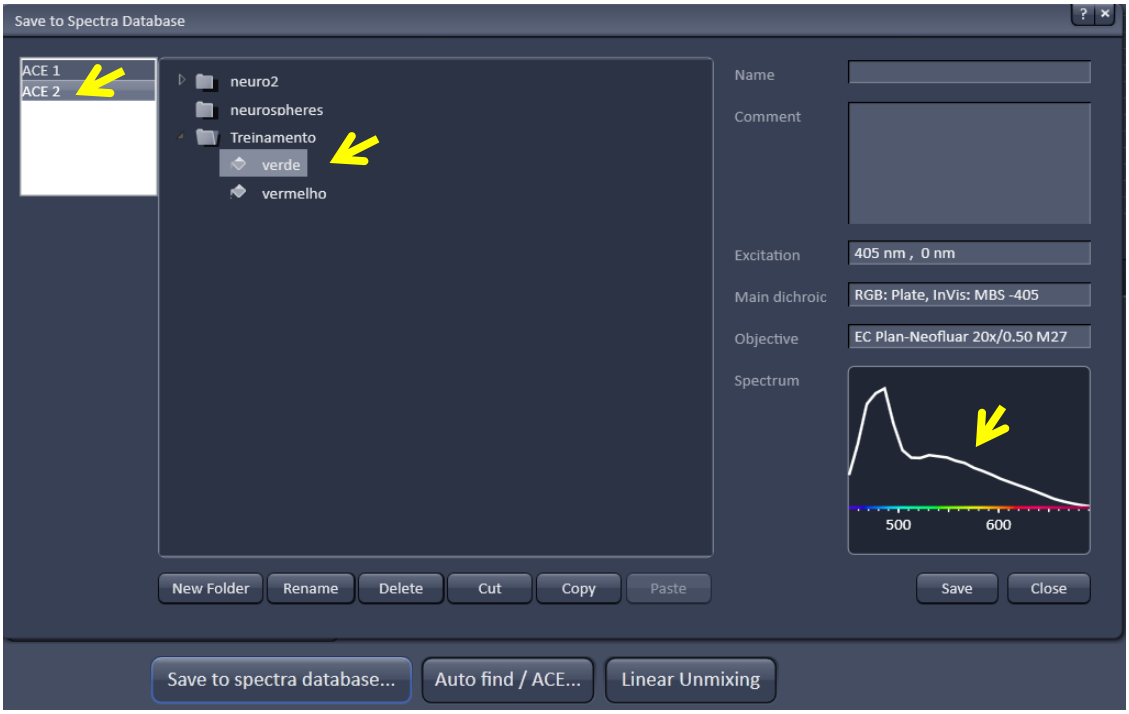
e) Clicar em *Live*, visualizar em *Gallery* cada comprimento de onda e ajustar para que não tenha saturação (*range indicator*). Capturar imagem (*snap*).

f) Abrir aba inferior *Unmixing*, clicar *auto find/ACE* e inserir quantos fluoróforos presentes na amostra. O gráfico mostrará uma curva para cada componente detectado automaticamente.

g) Clicar em *linear unmixing* para visualizar a imagem após separar o espectro de onda.

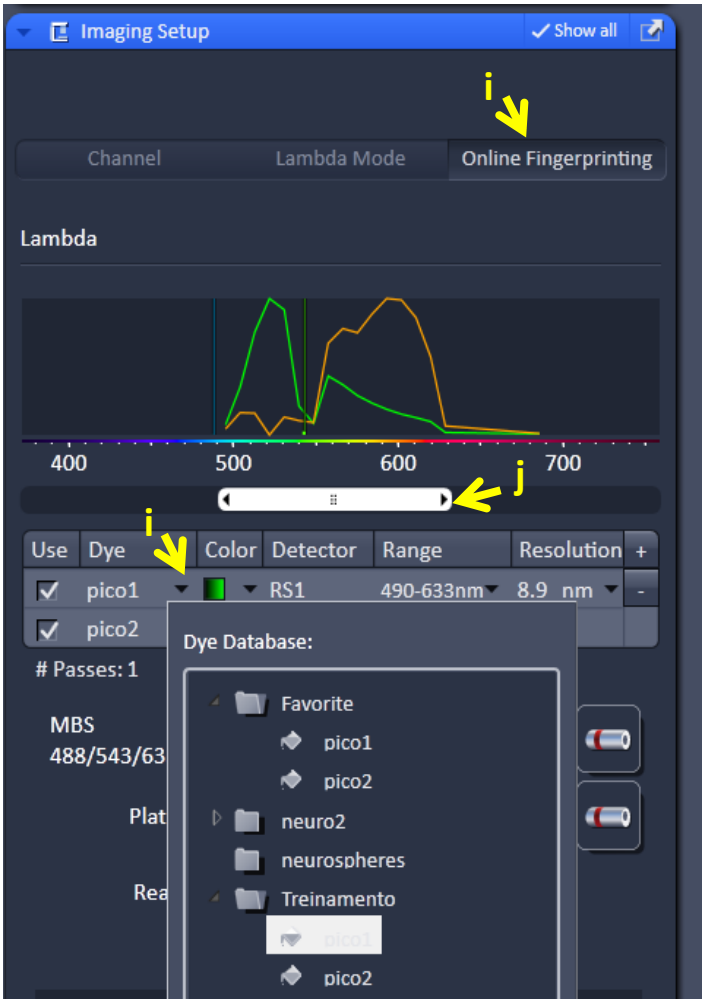
h) Para salvar espectro para outros experimentos, clicar em *save to espectra database*. Salvar cada espectro de acordo com comp. de onda detectado (gráfico).





i) Para usar espectro já salvo no lambda mode, abrir aba *online fingerprinting* e adicionar cada espectro de interesse.

j) Determinar o intervalo para detecção. **Atenção**: não incluir o comp. de onda utilizado para excitação (ex. usando laser 488, detector acima de 500nm)



10) Z -Stack

a. Para formar imagem 3D, marcar opção *Z-stack* e ajustar imagem em *Live.*

b. Definir a imagem inicial, mexendo no foco até alcançar menor intensidade de fluorescência. Clicar se*t first.*

c. Visualizando em *Live,* mexer no foco até outra extremidade da imagem. Clicar *set last.*

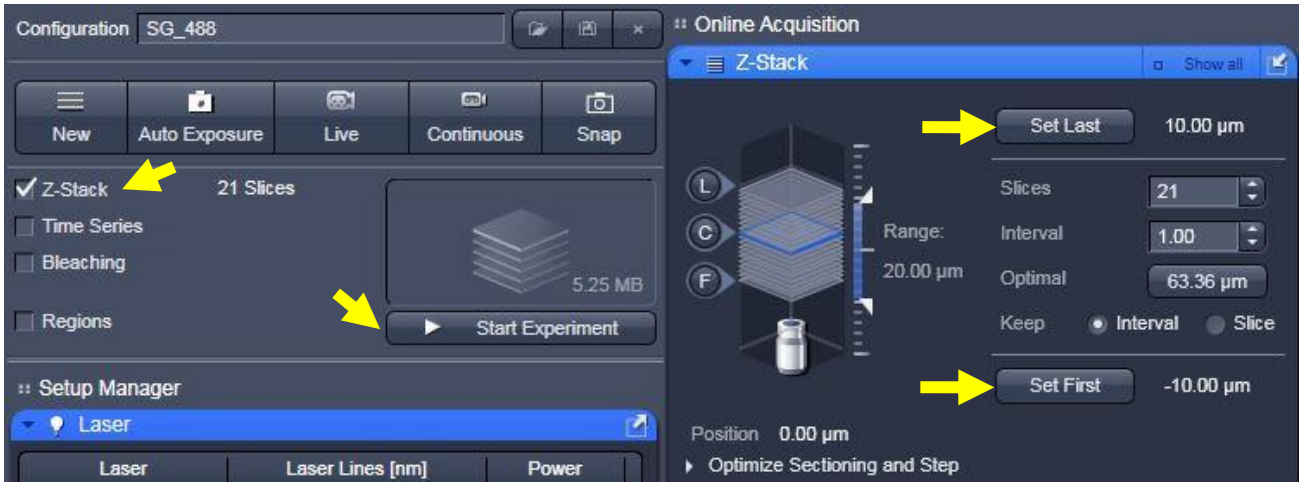
d. Ajustes da imagem:

-*Slices:* definir quantas imagens serão capturadas

-*Interval:* definir o intervalo (um) entre cada imagem

-*Optimal:* define valor para *slices* e *interval* para capturar imagem de melhor qualidade. (porém é demorado e forma imagem pesada)

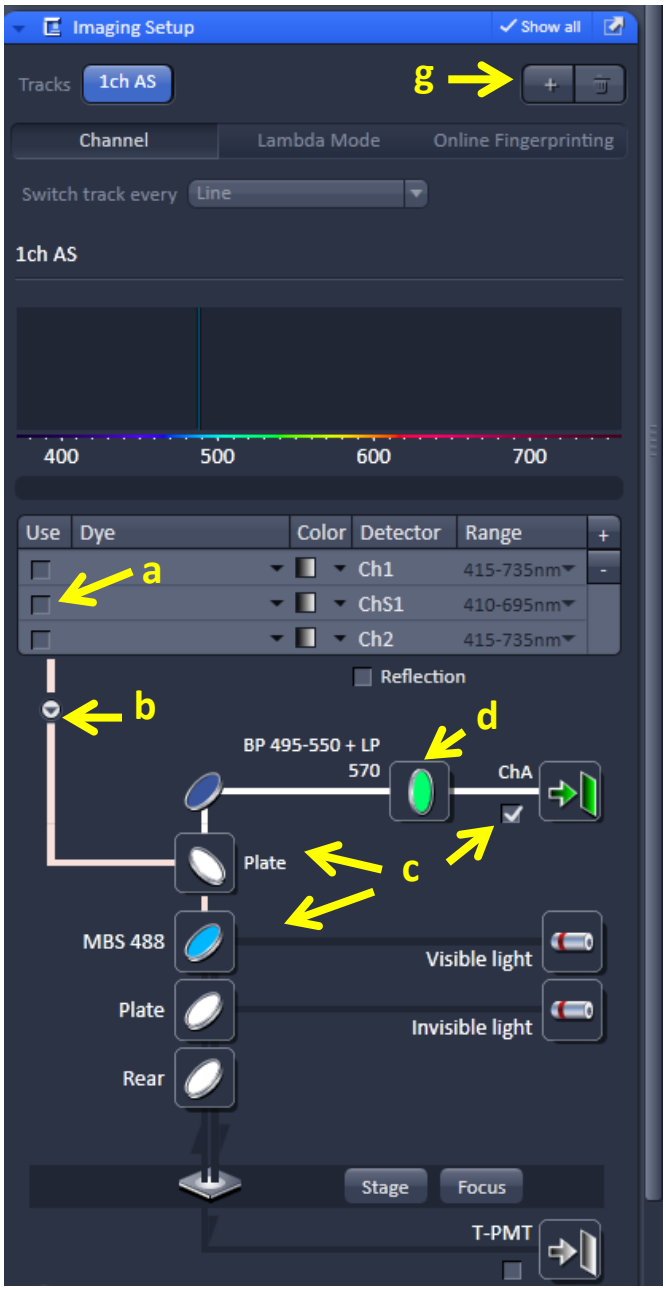
e. Clicar em *Start Experiment*



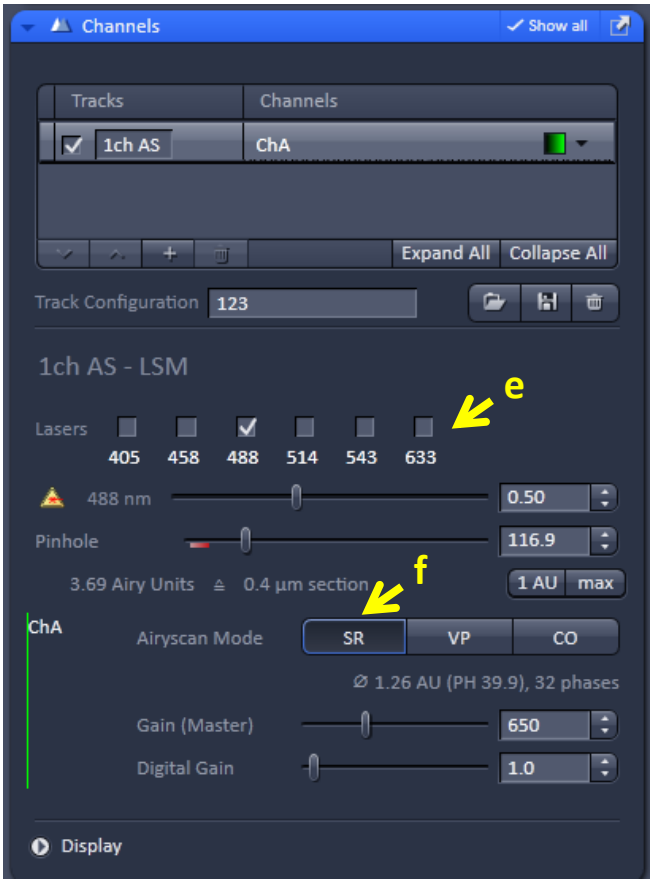
11) Airyscan

11.1 Configurações do programa:

a. Na aba *Imaging Setup*, desativar todos os detectores.
b. Abrir a aba *Airyscan*.
c. Ajustar caminho da luz para o detector ChA do Airyscan. Selecionar o dicroico, trocar o espelho por placa e selecionar ChA.
d. Selecionar filtro de emissão adequado.
e. Selecionar um único laser por *track*.
f. Na aba *Channels*, ativar airyscan mode para super resolution (**SR**). O ajuste do pinhole é automático, não sendo necessário ajustar manualmente.
g. Para utilizar mais de um laser, adicionar novo *track* e ajustar caminho da luz separadamente.



Obs: um *track* para Airyscan pode ser utilizado junto com outros *tracks* configurados para os detectores comuns (Ch1, ChS, Ch2).



11.2 Capturando imagem Airyscan:

a. Clicar em *Live* e ajustar cada *track*

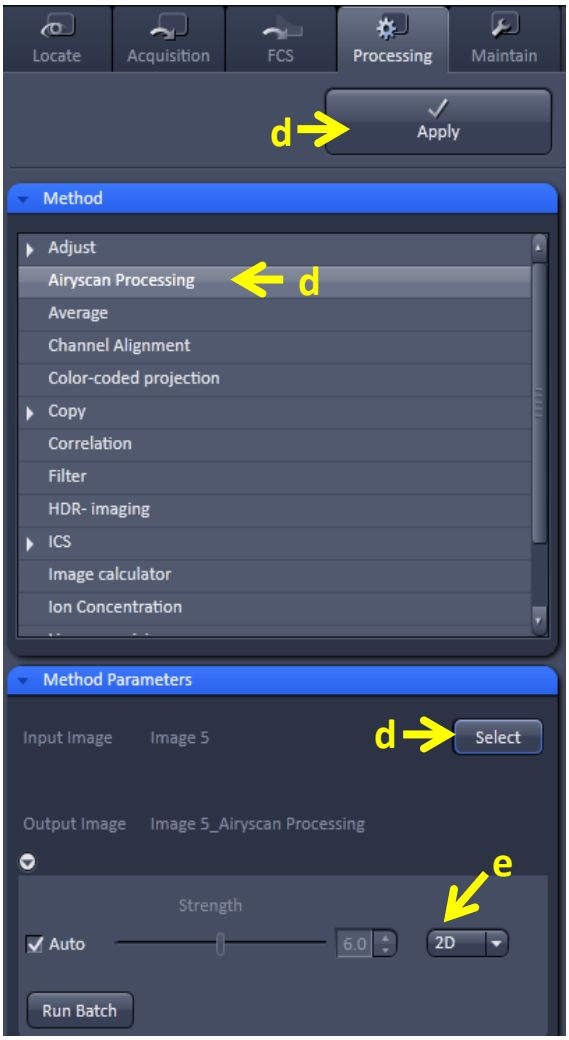
b. Capturar imagem (*Snap*) e abrir a aba *Airyscan* à esquerda da imagem. Serão capturadas 32 imagens

c. Na aba *Dimensions*, selecionar **SR image** para visualizar a imagem não processada e a processada com Airyscan.

d. Para salvar as informações em uma única imagem, abrir aba à esquerda ***Processing***. Clicar em *Airyscan processing*, escolher a imagem e clicar em *select*. Clicar em ***Apply***

e. Quando selecionar previamente o modo Z-stack, há opção de salvar a imagem processada em 2D ou 3D.

f. Para comparar as duas imagens, clicar View → 2 container. Com o zoom, permitirá verificar a nitidez da imagem.



12)Salvando a imagem:

Após escanear, salve imagem (clicar no link do disquete) ou exporte suas imagens (File > Export).

Obs: O HD do computador foi dividido, salve suas imagens sempre no **D** (possui maior capacidade de armazenagem), em hipótese alguma salve suas imagens em C, pois serão apagadas sem aviso.

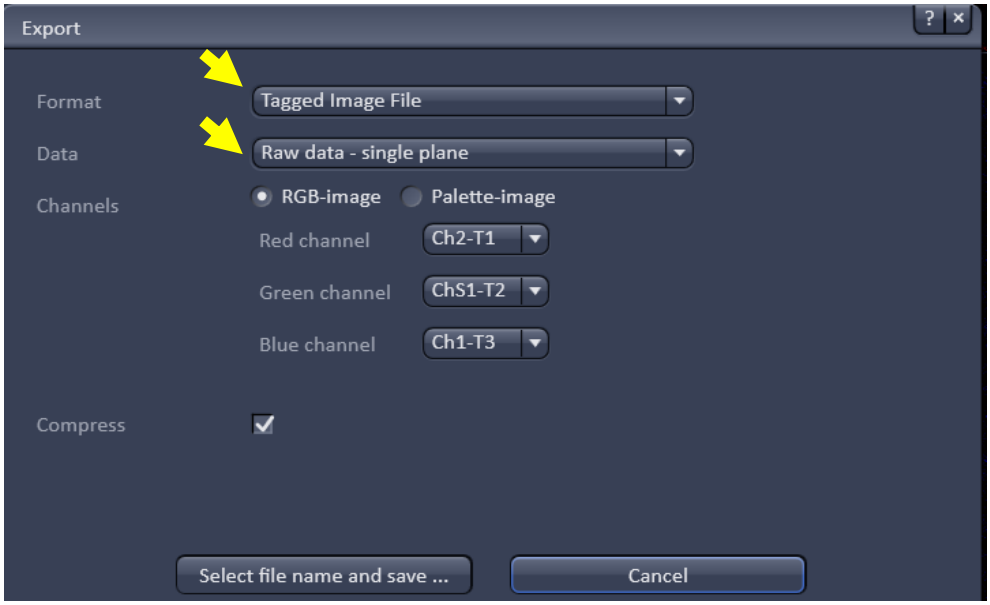
Em D: crie uma pasta com o nome do chefe do laboratório para o qual você trabalhe, e dentro da pasta dele, crie sua própria pasta.

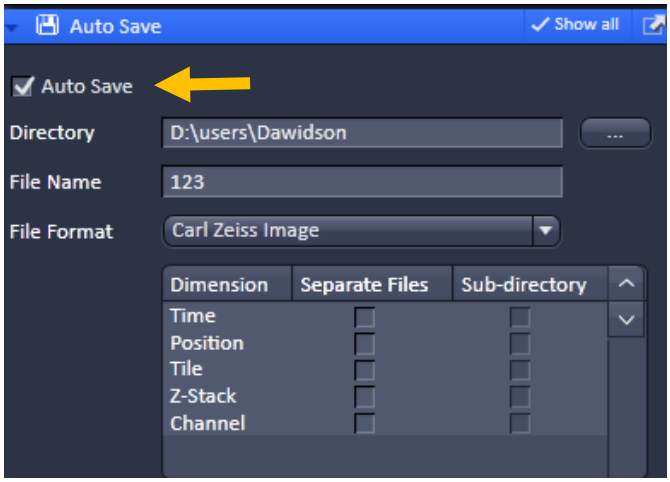
Faça o backup das suas imagens em um CD.

- Escolher formato da imagem (tiff, jpeg, etc) ou **czi** para abrir no Zen2.

- Exportar como *full resolution* ou *window content* para salvar imagem editada, como visualizada na tela.

-Exportar como *raw data* para salvar dados brutos.





Atenção: verificar se **Auto-save** não está acionado, para que não salve todas as imagens capturadas em outras pastas.

13) Desligar o sistema

A. Ao final do dia, ou quando não tiver mais reserva, desligar todos os lasers (*off*) no programa Zen.
B. Aguardar um tempo até a ventoinha parar (caixa preta). ***Deixar resfriar antes de desligar!!***
C. No microscópio, limpar óleo da objetiva, trocar para 10X e descer objetiva (*load*), para o próximo usuário.
D. Desligar as chaves na ordem decrescente (5, 4, 3, 2, 1).
E. Colocar capa sobre microscópio e computador.

Para analisar imagens no formato .czi, fazer download do programa Zen Lite:

Zeiss LSM Zen Lite http://www.zeiss.com/microscopy/en_de/products/microscope-software/zen-lite.html#downloads

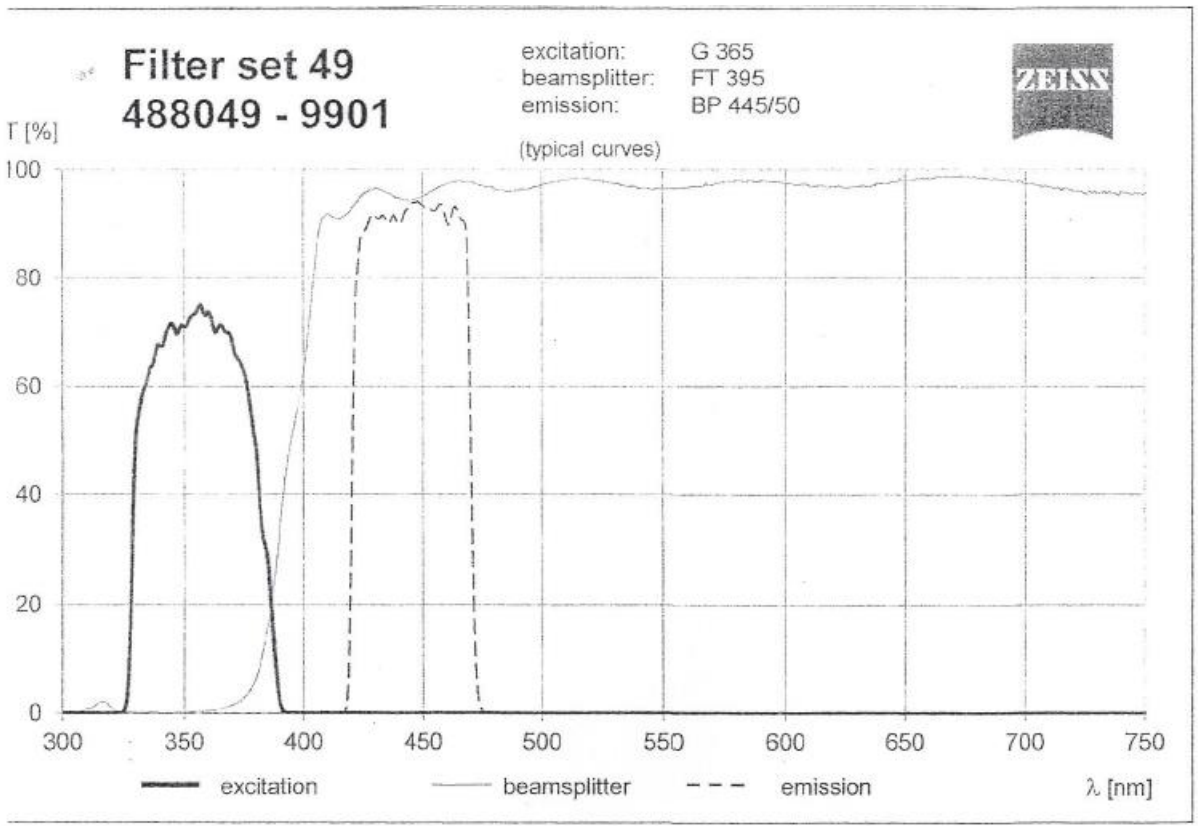
---

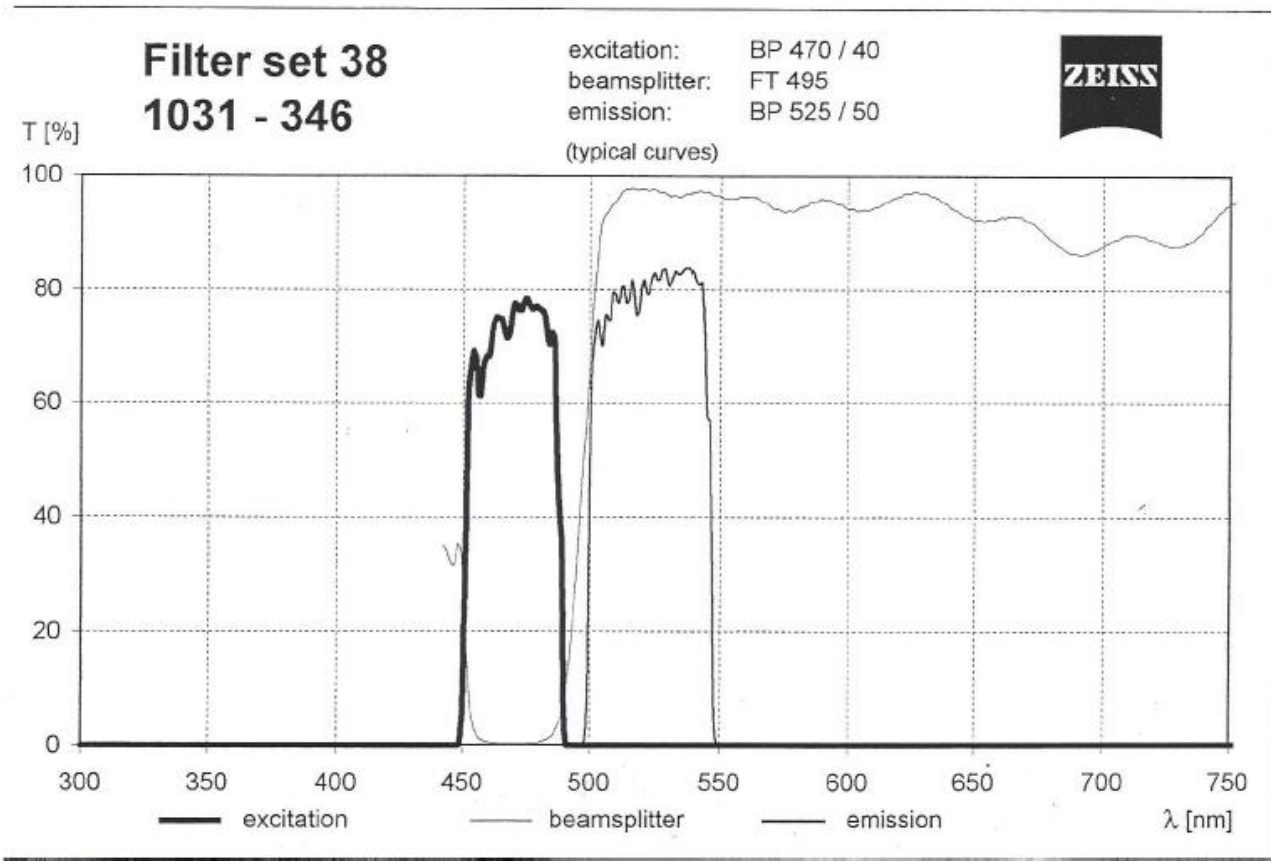
As informações contidas nesse manual foram desenvolvidas pelas técnicas do CAPI (capi@icb.ufmg.br):

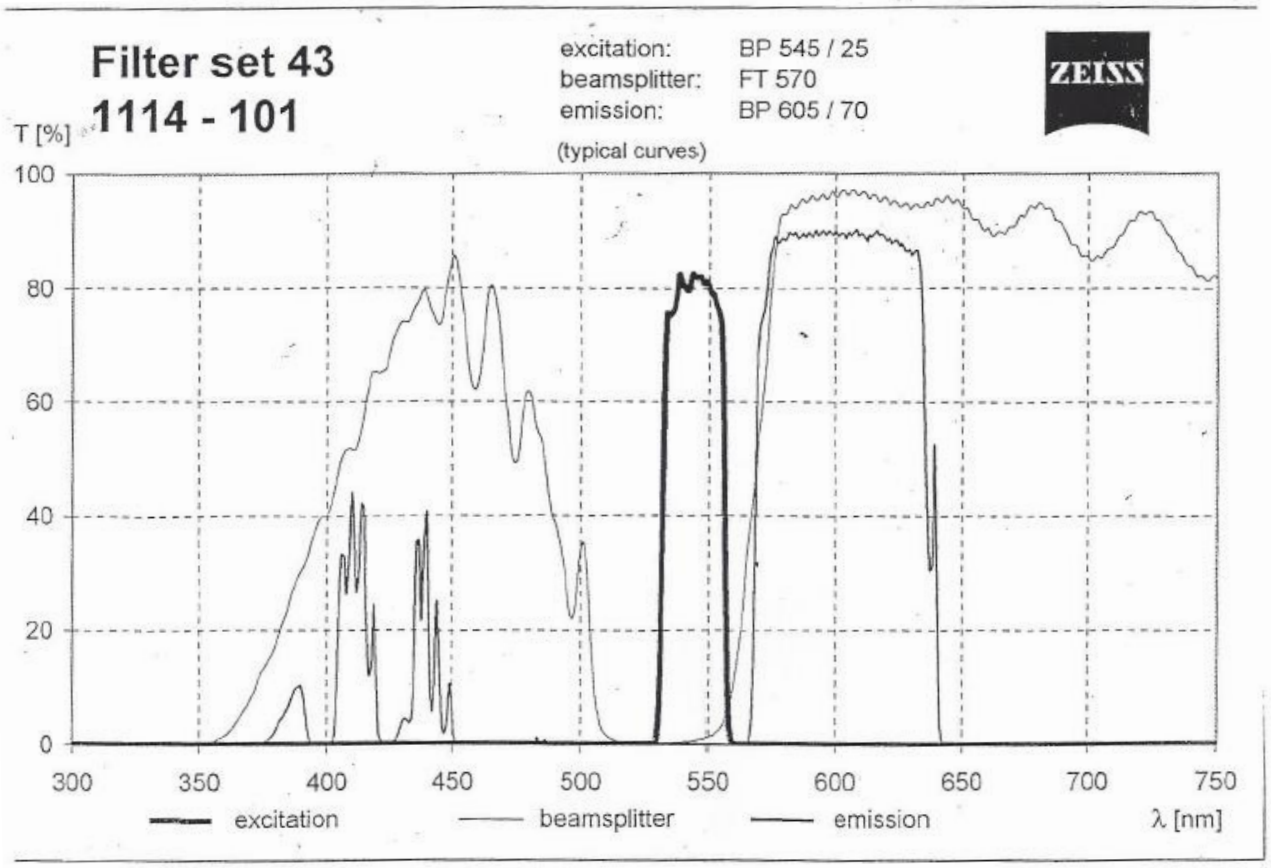
Gabriella Borges
Nayara Moreira
Teane Silva

(Manual Zeiss LSM 880- Airyscan – versão 2015.doc)

Anexo 1: Filtros de fluorescência






Filter set 43
1114 - 101
excitation: BP 545 / 25
beamsplitter: FT 570
emission: BP 605 / 70
(typical curves)
ZEISS
T [%]
100
80
60
40
20
0
300
350
400
450
500
550
600
650
700
750
excitation
beamsplitter
emission
λ [nm]