

# **GUÍA BÁSICA DE USO DEL MICROSCOPIO CONFOCAL ZEISS LSM 5 PASCAL**

**Dra. Angélica Zepeda R. / Dr. Miguel Tapia R.  
Instituto de Investigaciones Biomédicas  
Universidad Nacional Autónoma de México**

Esta guía describe la operación básica del microscopio confocal Zeiss LSM 5 Pascal para observación de células o cortes histológicos procesados con tinciones fluorescentes con hasta tres fluorocromos distintos (espectros parecidos a GFP/FITC, Rodamina/Cy3 o TOTO-3/Cy5).

Este manual pretende cubrir todos los aspectos básicos de adquisición de imágenes en este equipo. Sin embargo, si se requiere información más precisa que no se incluya en la guía, se podrá solicitar asistencia al Responsable de la Unidad para recibir asesoría individual.

**Contacto:**

**Responsable:**

**Dr. Miguel Tapia Rodríguez**

**Cubículo C003, Planta Baja, Torre C. Sede Circuito Exterior.**

**Tel. +(52) 55562 29185**

**mtapia@biomedicas.unam.mx**

Zeiss, Axioplan 2, “Zeiss LSM Image Browser” y LSM 5 Pascal son marcas registradas de Carl Zeiss AG.

Microsoft, Windows, Access, el logo de Windows NT y los elementos GUI del sistema operativo Windows NT son marcas registradas y/o propiedad de Microsoft Corporation.

**Todas las marcas son utilizadas en la presente guía con fines educativos y sin ningún fin comercial.**

Fecha de elaboración: Enero del 2009. Por Dra. Angélica Zepeda.

**Historia de Revisiones:**

Revisión 1: Abril de 2010. Por LIBB. Miguel Tapia R.

**Revisión 2: Abril-Agosto de 2021. Por Dr. Miguel Tapia R.**

**Como citar:**

Zepeda, Angélica, Tapia-Rodríguez, M. “Guía Básica de uso del Microscopio Confocal Zeiss LSM 5 Pascal”. Unidad de Microscopía, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, 44p. 2021.

## MICROSCOPIO

El microscopio confocal Zeiss LSM 5 Pascal es una estación de trabajo basada en un estativo de microscopio vertical semi automatizado Zeiss Axioplan 2; cuenta con un carrusel de filtros para fluorescencia (con sus controles +/- situados en la parte lateral izquierda del estativo, por detrás de la perilla de macro/micrométrico), el revolver de objetivos (con sus controles +/- situados en la parte lateral derecha del estativo, marcados con puntas de flecha negras, por detrás de la perilla de macro/micrométrico) y el movimiento axial (eje Z) motorizados, y aunque este último es motorizado, el equipo permite su movimiento manual. El movimiento XY de la platina es manual a través de la perilla compuesta XY situada del lado derecho de la misma. Para observación de muestras en campo claro el estativo utiliza una lámpara estándar de halógeno, cuya intensidad puede ser regulada mediante una perilla manual (situada en la porción lateral derecha del estativo) y para la observación de muestras fluorescentes directamente en el estativo (fluorescencia de campo amplio) utiliza una lámpara de mercurio HBO. Para visualización y adquisición de imágenes cuenta con un cabezal de escaneo con láser situado en la porción superior del estativo y tres láseres de iluminación monofotónica (**Ar 458, 488 y 514nm, HeNe 543nm y HeNe 633nm**).

El microscopio cuenta con los siguientes juegos de filtros para observar las muestras directamente en el estativo **empleando la lámpara de mercurio**:

- 1) Filtro **DAPI** (Nota: Las muestras marcadas con DAPI solo se podrán observar al microscopio, **no** pueden ser capturadas con el sistema confocal)

Pase de banda de excitación: 365nm  
Espejo Dicroico: FT 395  
Emisión: LP 397

- 2) Filtro **FITC**

Pase de banda de excitación: 450-490nm  
Espejo Dicroico: FT 510  
Emisión: LP 515

- 3) Filtro **Rodamina**

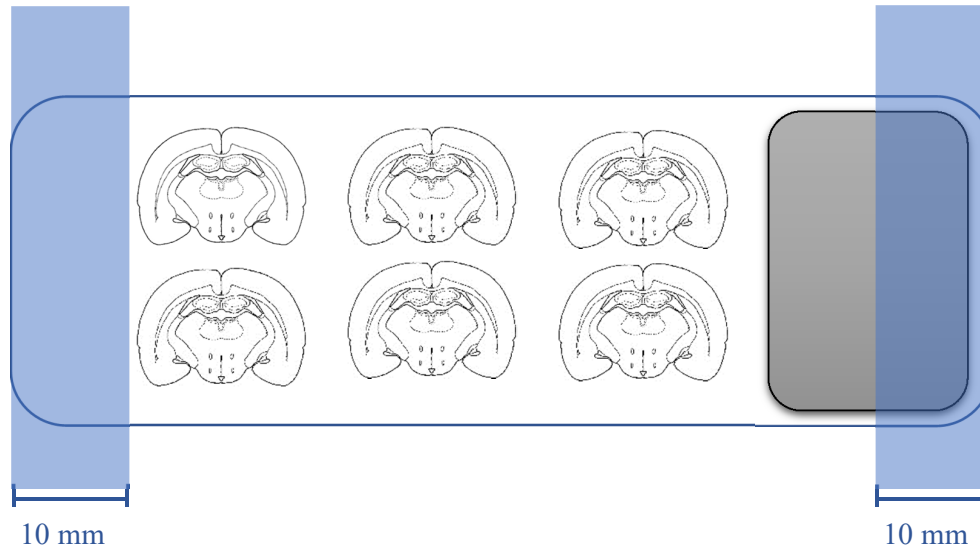
Pase de banda de excitación: 546nm  
Espejo Dicroico: FT 580  
Emisión: LP 590

## SOFTWARE

El software LSM 5 Pascal, versión 2.8, controla –una vez encendidos los instrumentos- el microscopio, los láseres y el cabezal de escaneo del confocal; provee diversos comandos para la adquisición de imágenes a diferentes resoluciones en 2D (XY) y 3D (XYZ), y se puede operar empleando el mouse y el teclado de la computadora de la misma manera en la que opera cualquier programa compatible con el ambiente Windows.

## CARACTERÍSTICAS DE LA MUESTRA

El microscopio puede trabajar únicamente con muestras montadas en el sistema estándar de portaobjetos 75x25x1mm / cubreobjetos de 0.13-0.18 mm de grosor. Debido al diseño del portamuestras, es necesario considerar que deben quedar libres de muestra al menos 10mm por lado desde los bordes largos hacia el centro del portaobjetos, como se muestra en la imagen a continuación:



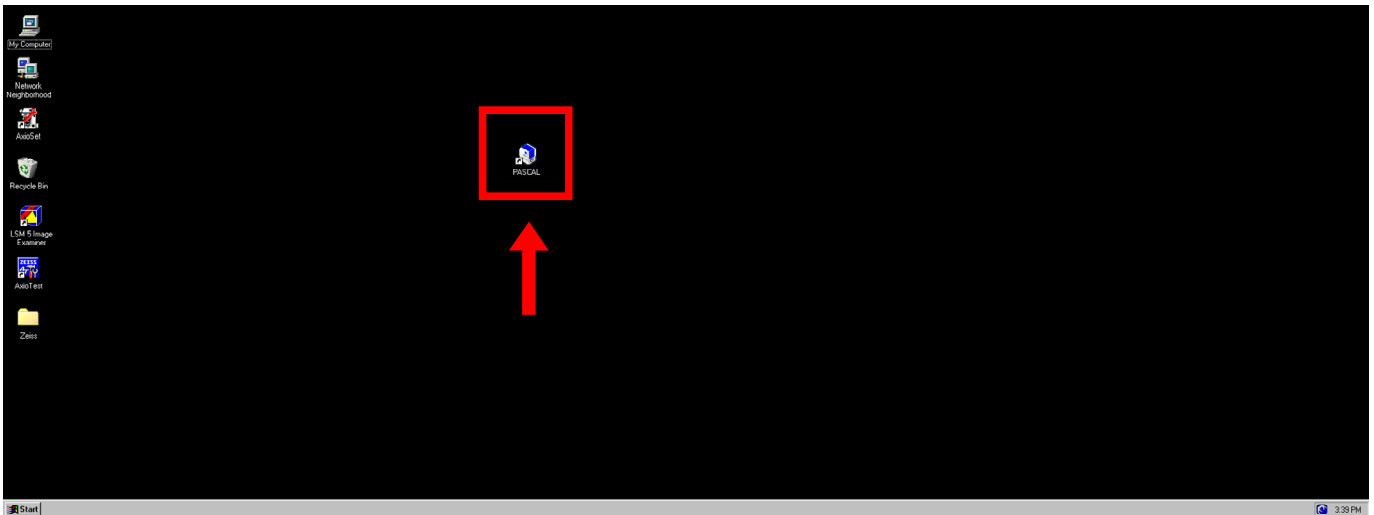
## OBJETIVOS DE INMERSIÓN LÍQUIDA

Los objetivos 40x y 100x son de inmersión en aceite; cuando se requiera su uso el aceite se deberá colocar sobre el cubreobjetos situando una posición vacía (sin objetivo) del revólver sobre la muestra (para poner el revolver de los objetivos en posición “sin objetivo”, presione alguno de los dos botones del movimiento del revólver de objetivos). Coloque una gota pequeña de aceite de inmersión sobre la superficie situada en la región central del condensador. Una vez que la colocó, regrese al objetivo de inmersión en aceite que utilizará presionando alguno de los dos botones del movimiento del revólver asegurándose de no ensuciar el resto de los objetivos con el aceite colocado sobre la muestra.

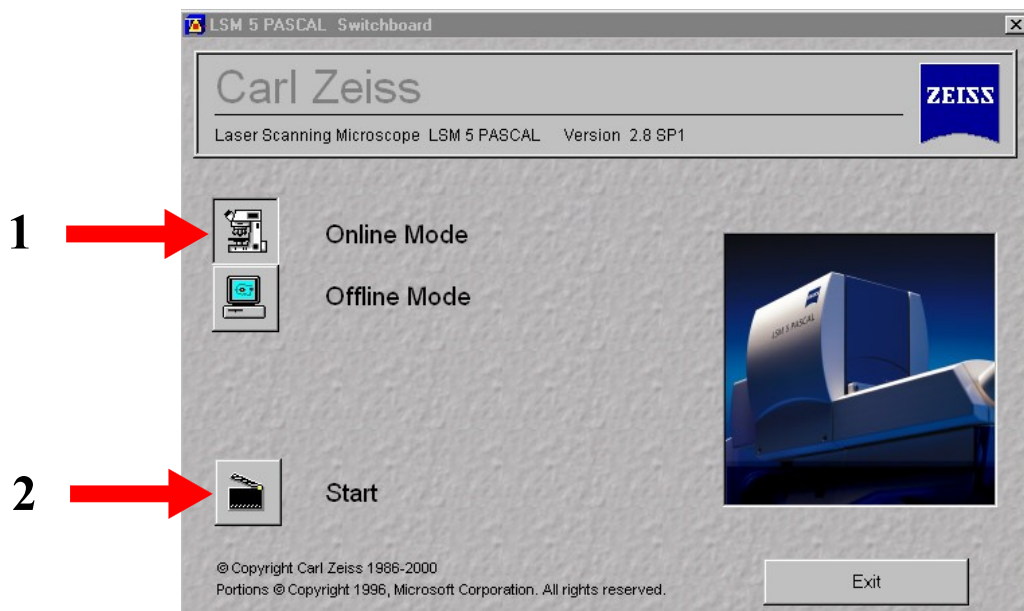
## ENCENDIDO DEL EQUIPO

1. Encender los tres interruptores generales que se encuentran empotrados en la pared entrando a mano izquierda, en la parte superior a la izquierda de la mesa antivibratoria del estativo del microscopio. Todos los interruptores deberán quedar en posición I/ON.
2. Encender los láseres mediante los interruptores correspondientes:
  - a. El encendido del láser **Ar** que **genera luz violeta-azul-cian** de longitudes de onda de 458, 488 y 514 nm (utilizadas para excitar fluoróforos como GFP, FITC, CY2, AlexaFluor 488 y equivalentes), se realiza mediante dos pasos; el primero es colocando el interruptor de su fuente de alimentación (botón con la leyenda “Power Enable”) en la posición “**I**”, esperando unos minutos hasta que se observe una luz naranja directamente en la salida del láser. El segundo paso es girar la llave de seguridad a la posición “**I**” una vez que se note dicha tonalidad. **Cuando la luz en la salida del láser se torne violeta, el láser estará listo para usarse.**
  - b. Encender los láseres He/Ne girando hacia la derecha las llaves correspondientes en sus respectivas fuentes de alimentación. La fuente de alimentación del láser marcada con el No. inventario UNAM 1050375 **genera luz verde de 543 nm** (utilizada para excitar fluoróforos como yoduro de propidio, Rodamina, Texas Red, CY3, AlexaFluor 555 y equivalentes) mientras que la fuente de alimentación del láser marcada el No. inventario UNAM 1050376, **genera luz roja de 633 nm** (para excitar fluoróforos como AlexaFluor 633, CY5, TOTO-3 y equivalentes). El foco rojo en cada caja indicará que el láser está encendido.
3. En caso de que el microscopio esté apagado, encenderlo mediante el botón verde que se encuentra al lado derecho inferior del estativo. Dicho botón se iluminará.
4. Encender el CPU mediante el botón situado en la parte superior frontal derecha del mismo.
5. Una vez encendida la computadora, esperar a que inicie el sistema operativo Windows NT.
  - a. Aparecerá la ventana “**Begin logon**”. Presionar simultáneamente la combinación de teclas Ctrl+Alt+Del.
  - b. Aparecerá la ventana “**Logon information**”. Presionar la tecla “**OK**” cuando se le solicite el username / password (no teclear nada en los campos). El “username” predeterminado es: administrador.
  - c. Aparecerá la ventana de servicios de red, en “Enter network password”, ingresar confocal.123 seguido de la tecla Enter. Con esto se actualizará la red interna del Instituto y podrá guardar los datos adquiridos en la unidad de red W al término de la sesión.

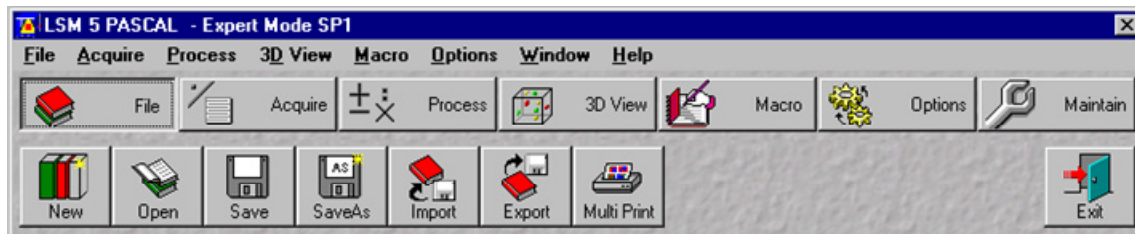
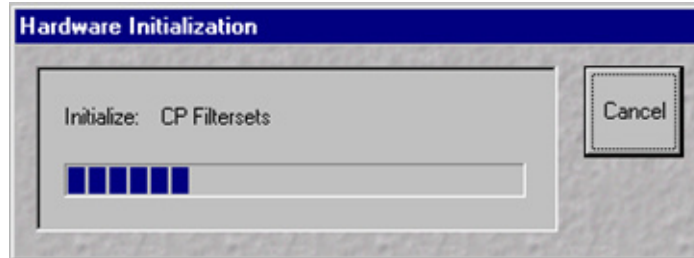
- Una vez iniciado el sistema operativo, haga doble click en el ícono “PASCAL” localizado en el escritorio para iniciar el software que opera el confocal.



- Aparecerá el panel de operación “**LSM 5 Pascal Switchboard**”. Presione el ícono “**Online mode**” (en caso de que no esté seleccionado) y después el botón “**Start**”.  
Nota: Si presiona “**Offline Mode**” o trabaja en esta modalidad, las funciones de captura del sistema confocal no estarán disponibles y no podrá hacer adquisición de imágenes.



8. Se abrirá la ventana “**Hardware initialization**”. Espere a que el programa reconozca todos los componentes del sistema. Una vez que este proceso termine, desaparecerá automáticamente esta ventana y se mostrará la interfaz gráfica de usuario principal del software LSM 5 Pascal.

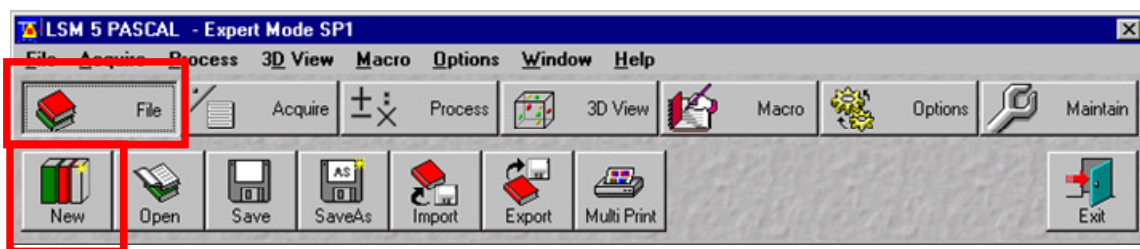


**Interfaz gráfica de usuario principal de LSM 5 Pascal**

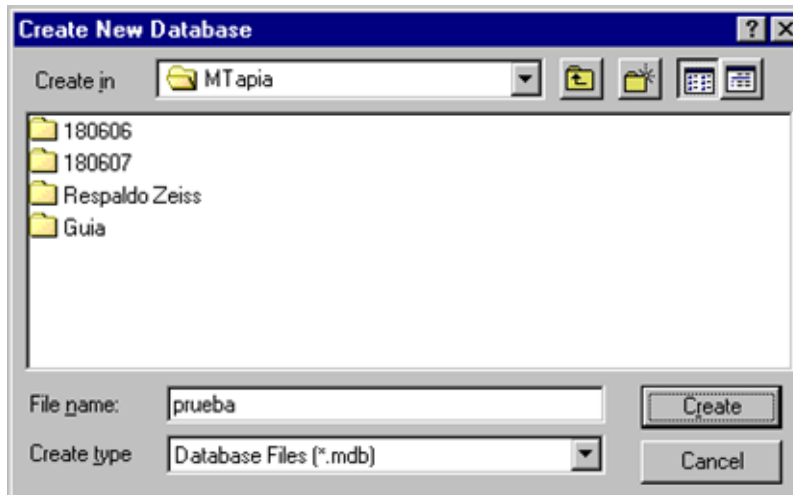
## Almacenamiento de las imágenes obtenidas en el microscopio confocal

La extensión de archivo de las imágenes obtenidas en el microscopio confocal LSM 5 Pascal es “.ism”. De manera habitual, el software LSM 5 Pascal requiere de una base de datos con extensión de archivo “.mdb” (no compatible con Microsoft Access) para almacenar las imágenes adquiridas durante la sesión. De esta manera, para guardar una imagen primero deberá crear una base de datos:

1. De clic en el botón “File” de la interfaz gráfica de usuario principal de LSM 5 Pascal.
2. De clic en el botón “New” del sub menú correspondiente:



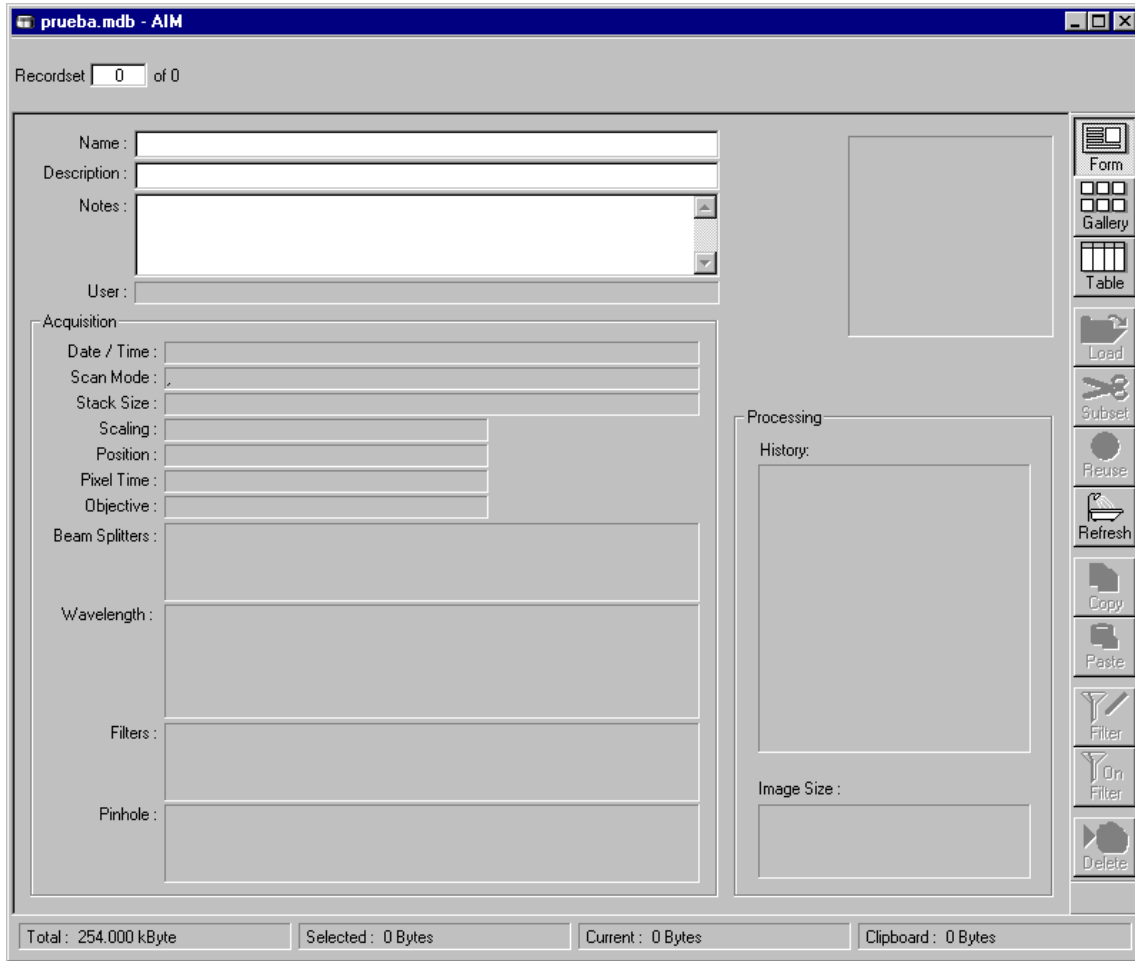
3. Aparecerá la ventana “Create New Database”; busque en la Unidad “D” el nombre de su Jefe de Grupo y cree una subcarpeta con su nombre en dicho directorio. Si no existe una carpeta de su Jefe de Grupo en dicha unidad, cree una nueva, así como la subcarpeta correspondiente.



En el campo “File name”, asigne un nombre adecuado para la base de datos (fecha, número de experimento, condición, etc). De clic en “Create”.



4. Aparecerá una ventana con el nombre asignado y la extensión “.mdb” – AIM. En el campo “Recordset” aparecerá 0 de 0.



5. Cierre esta ventana y proceda a ajustar los parámetros de captura para sus preparaciones biológicas.

## OBSERVACION DE LA MUESTRA AL MICROSCOPIO

Asegúrese de que la perilla larga que se encuentra del lado derecho superior del estativo esté en posición “VIS” (introducida completamente hasta el fondo). Para ubicar el campo de interés a analizar en su muestra, puede emplear ya sea la iluminación de campo claro, contraste diferencial interferencial (DIC o Nomarski) o fluorescencia de campo amplio. Para campo claro, deberá presionar el botón **HAL** ubicado al lado derecho inferior del estativo del microscopio (el foco correspondiente se enciende en color verde); puede regular la cantidad de luz con la perilla que se encuentra al lado del botón de encendido. Para DIC, utilizando la iluminación de campo claro deslice hasta el fondo la corredera situada del lado izquierdo por debajo de los oculares y seleccione el prisma adecuado en la porción inferior del condensador; una vez terminada la observación, deslice completamente la corredera hacia afuera. Para fluorescencia, deberá presionar el botón **FL** ubicado del lado derecho inferior del estativo del microscopio (el foco correspondiente se enciende en color verde); y realizar el cambio de cubo de fluorescencia presionando los botones situados del lado izquierdo inferior del estativo, justo detrás de la perilla de macro/micrométrico. Presione los botones hasta encontrar el cubo de fluorescencia deseado, deberá notar visualmente en la platina el cambio de color de luz cada vez que lo haga.

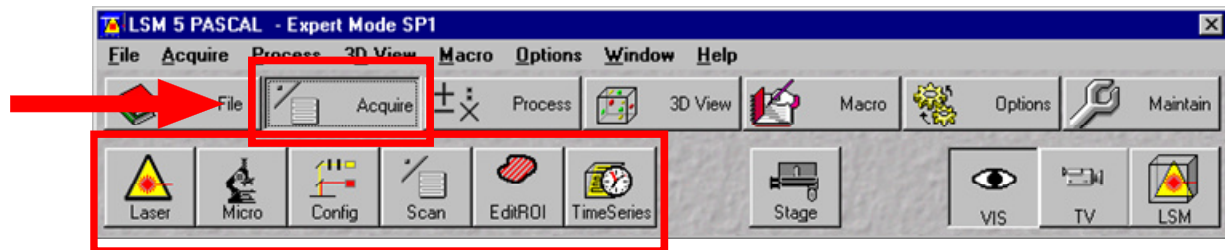
Selección del objetivo: El revolver de los objetivos **NO** se mueve manualmente. Para evaluar su muestra: Coloque la laminilla en la platina con el cubreobjetos hacia arriba y coloque hacia el frente del revólver (hacia usted) el objetivo 10x presionado alguno de los 2 botones en arreglo diagonal marcados con puntas de flecha negras situados del lado derecho inferior del estativo, justo detrás de la perilla de macro/micrométrico. Mueva manualmente la platina mediante la perilla compuesta XY hasta hallar la zona de su preparación y observando a través de los oculares enfoque manualmente utilizando la perilla de macro/micrométrico. Una vez enfocada su región de interés, puede proceder a realizar el cambio de objetivo para captura a mayor magnificación mediante los botones de movimiento del revólver. Si es requerido, recuerde seguir el procedimiento indicado para objetivos de inmersión en aceite en la sección “[Objetivos de inmersión líquida](#)”. Verifique que la región de interés para captura esté enfocada volviendo a observarla a través de los oculares del microscopio.

Nota 1: El estativo Zeiss Axioplan 2 tiene ajuste automático de parfocalidad; de esta manera, el usuario puede enfocar a bajo aumento (10x) y no perder la zona de enfoque en el eje Z a mayores magnificaciones, incluso entre cambios de densidad entre aire y aceite.

Nota 2: Debido a la diferencia de dioptrías entre la calibración de los oculares del estativo y el sistema de detección del confocal, puede presentarse una pequeña diferencia de enfoque entre ambos. Para ello, cuando trabaje en el modo confocal deberá realizar un ajuste fino de enfoque mediante la perilla de macro/micrométrico observando directamente en el monitor.

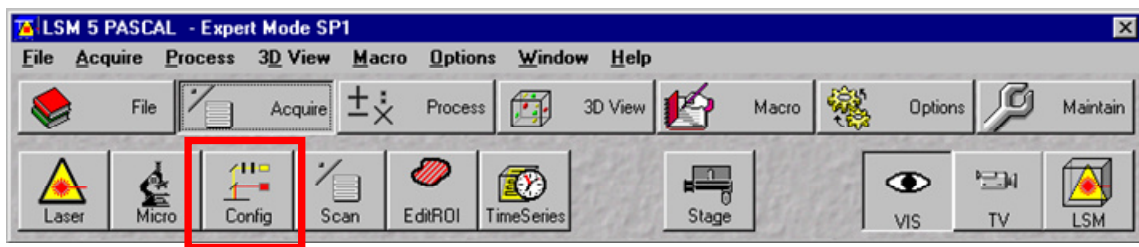
## ADQUISICIÓN DE IMÁGENES

1. Una vez enfocada en los oculares una región de interés, deslice la perilla larga ubicada al lado derecho superior del estativo a la posición “**LSM**” (completamente afuera) y asegúrese de que el obturador (shutter) ubicado del lado derecho en la parte superior del estativo (entre los dos deslizantes ubicados con las letras F A) esté completamente metido.
2. Presione el botón “**Acquire**” de la interfaz gráfica de usuario principal. En la parte inferior aparecerá un nuevo sub menú:



### Sub menú

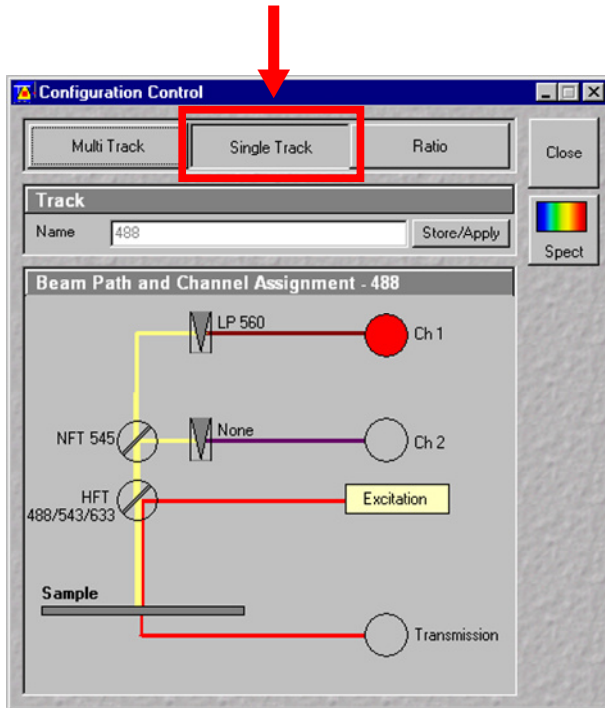
3. Presione el botón “**Config**”.



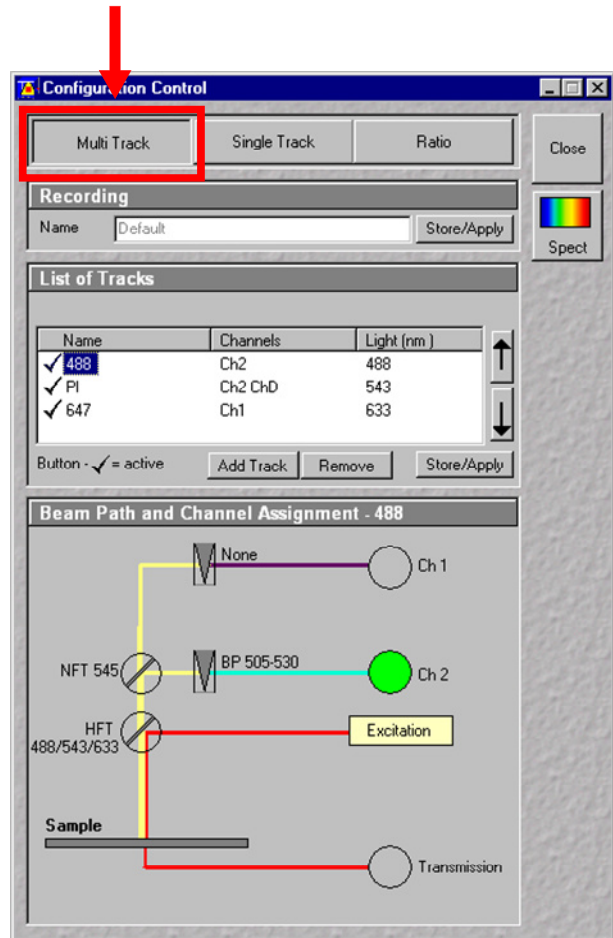
Aparecerá la ventana “**Configuration Control**”.

4. Presione el botón “**Single Track**” si desea evaluar un solo fluorocromo o el botón “**Multi Track**” si desea evaluar dos o más.

Nota: si usa “**Multi Track**” se recomienda configurar un fluorocromo por cada canal y por separado (ver pasos siguientes):



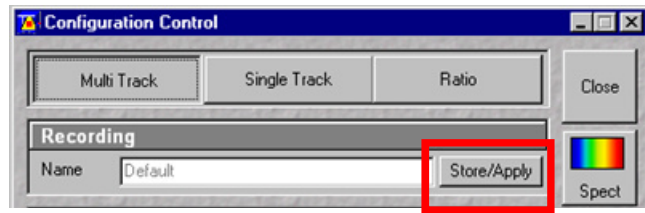
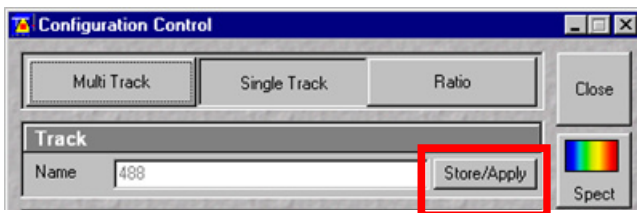
Single Track



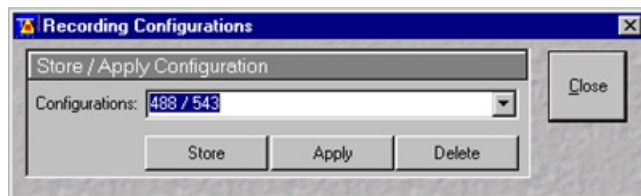
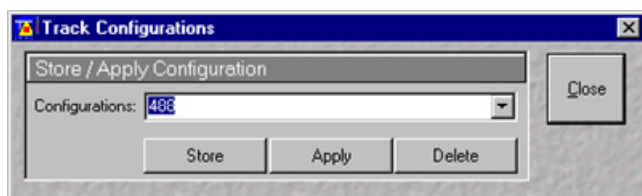
Multi Track

### Configuration Control

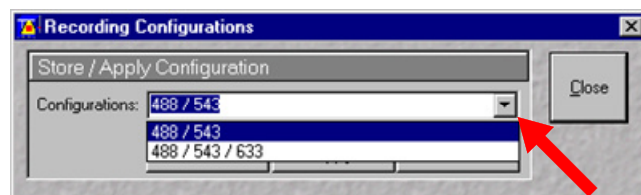
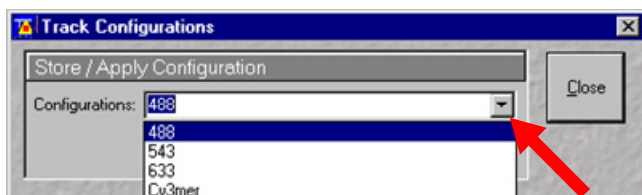
- Presione el botón “Store/Apply” en el panel “Track” de “Single Track” o en el panel “Recording” de “Multi Track”.



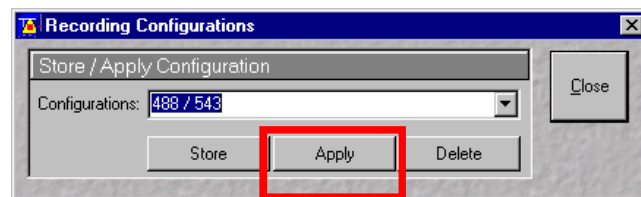
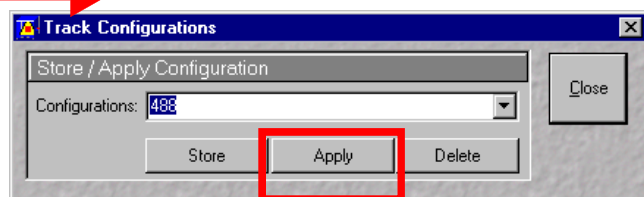
Se abrirá la ventana “Track Configurations” para “Single Track” o “Recording Configurations” para “Multi Track”.



6. Al presionar la cabeza de flecha, usted encontrará algunas configuraciones guardadas para la detección de diferentes fluoróforos.



7. Escoja el fluorocromo o la combinación de fluoróforos de su muestra y presione el botón “Apply”.

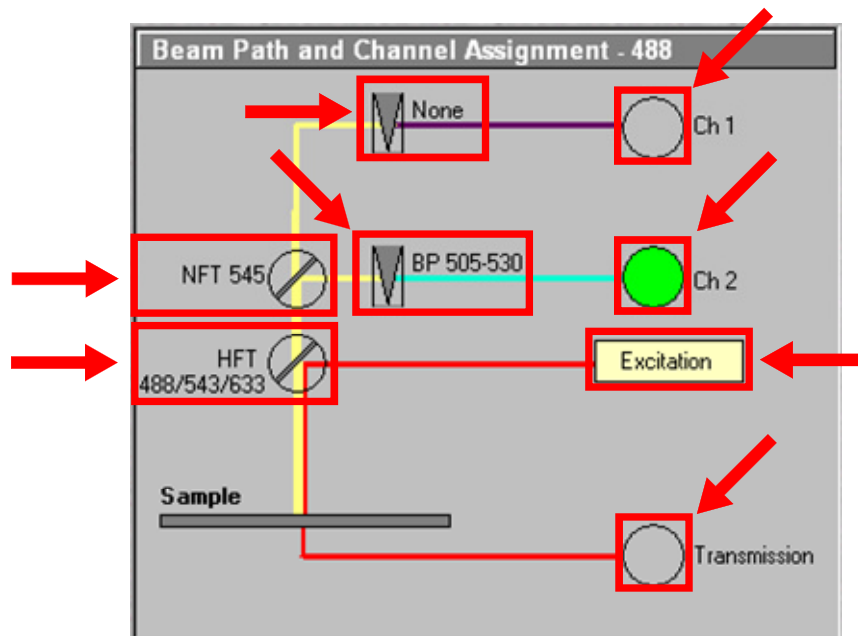


Nota 1: Al dar click en “Apply” es probable que el revolver de objetivos se sitúe en aquel que fue utilizado para guardar dicha configuración. Si requiere definir mejor la región de interés, regrese a un objetivo de bajo aumento mediante los botones de movimiento del revólver del estativo.

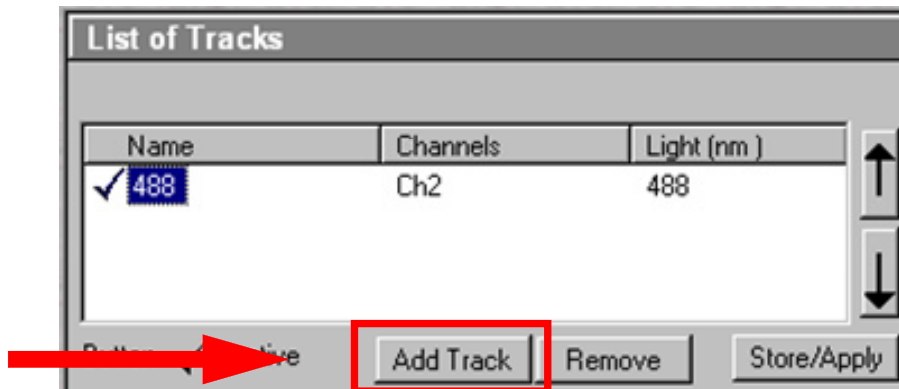
Nota 2: El botón “Store” se usa para guardar configuraciones con parámetros que un usuario en particular ha establecido para sus propios experimentos. Si lo presiona sobre una configuración previamente guardada sin cambiar el nombre, ésta guardará los nuevos parámetros y podría dejar de funcionar óptimamente para el usuario que generó dicha configuración.

Debido a que las configuraciones que aparecen en este menú han sido estructuradas por usuarios independientes para muestras específicas, pueden no aplicar completamente a lo que usted desea evaluar. Si fuera necesario, consulte la “[Tabla de Configuraciones](#)” que se encuentra anexa al final de este manual para configurar o modificar la vía óptica del confocal de acuerdo con los fluorocromos presentes en su muestra.

Cada parámetro de la vía óptica del confocal se puede modificar desde el panel “**Beam Path and Channel Assignment**” dando un click en la figura de los espejos, los filtros, el círculo de color que representa la emisión de su fluoróforo y el rectángulo “**Excitation**”.

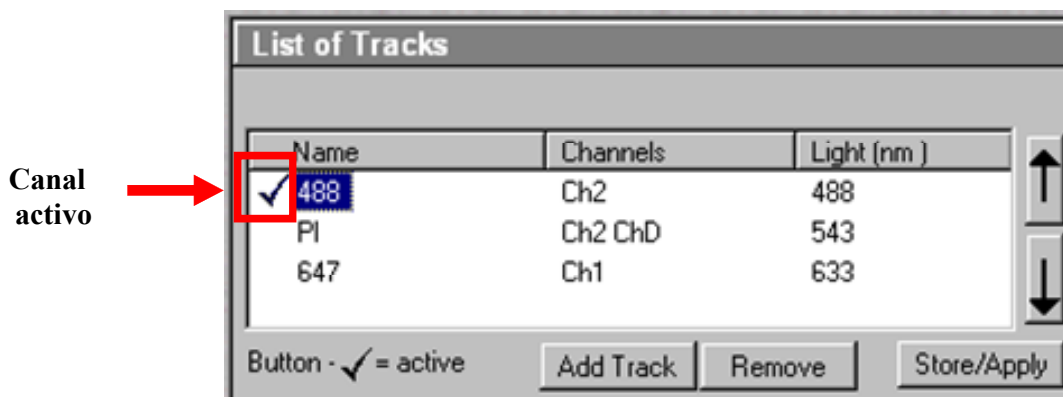


Si se requiere evaluar más de un fluoróforo y no se encuentra la combinación requerida enlistada en las configuraciones guardadas, es posible añadir más canales en una configuración en la opción “**Multi Track**”. Para añadir canales (“**Tracks**”) a una configuración determinada presione el botón “**Add Track**” en el módulo “**List of Tracks**” y configúrelo de acuerdo con los datos proporcionados en la tabla de configuraciones anexa al manual que aplique para su(s) fluorocromo(s). Para nombrar el nuevo “**Track**”, de click sobre él, espere 2 segundos y de otro click, la ventana se activará para que usted escriba. Presione la tecla “**Enter**” para guardar el nuevo nombre.



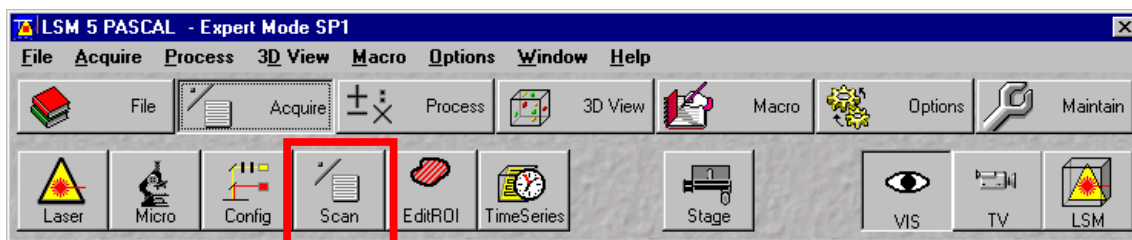
Una vez establecidos los canales correspondientes para los fluorocromos presentes en la muestra a evaluar, se tiene que realizar la configuración de cada uno de ellos para detectar adecuadamente las señales presentes en la muestra. Esto se tiene que realizar para cada canal de manera individual; para simplificar el proceso puede consultar los parámetros sugeridos en la tabla de configuraciones anexa al final de este manual. Seleccione en “**List of Tracks**” el primer canal para configurar, inactivando el resto de los canales.

**Nota:** Cuando un canal está activo, se mostrará una paloma al lado izquierdo del nombre del canal.



Se recomienda dejar abierta la ventana “**Configuration Control**” con el objeto de modificar los parámetros que se requieran a lo largo del experimento.

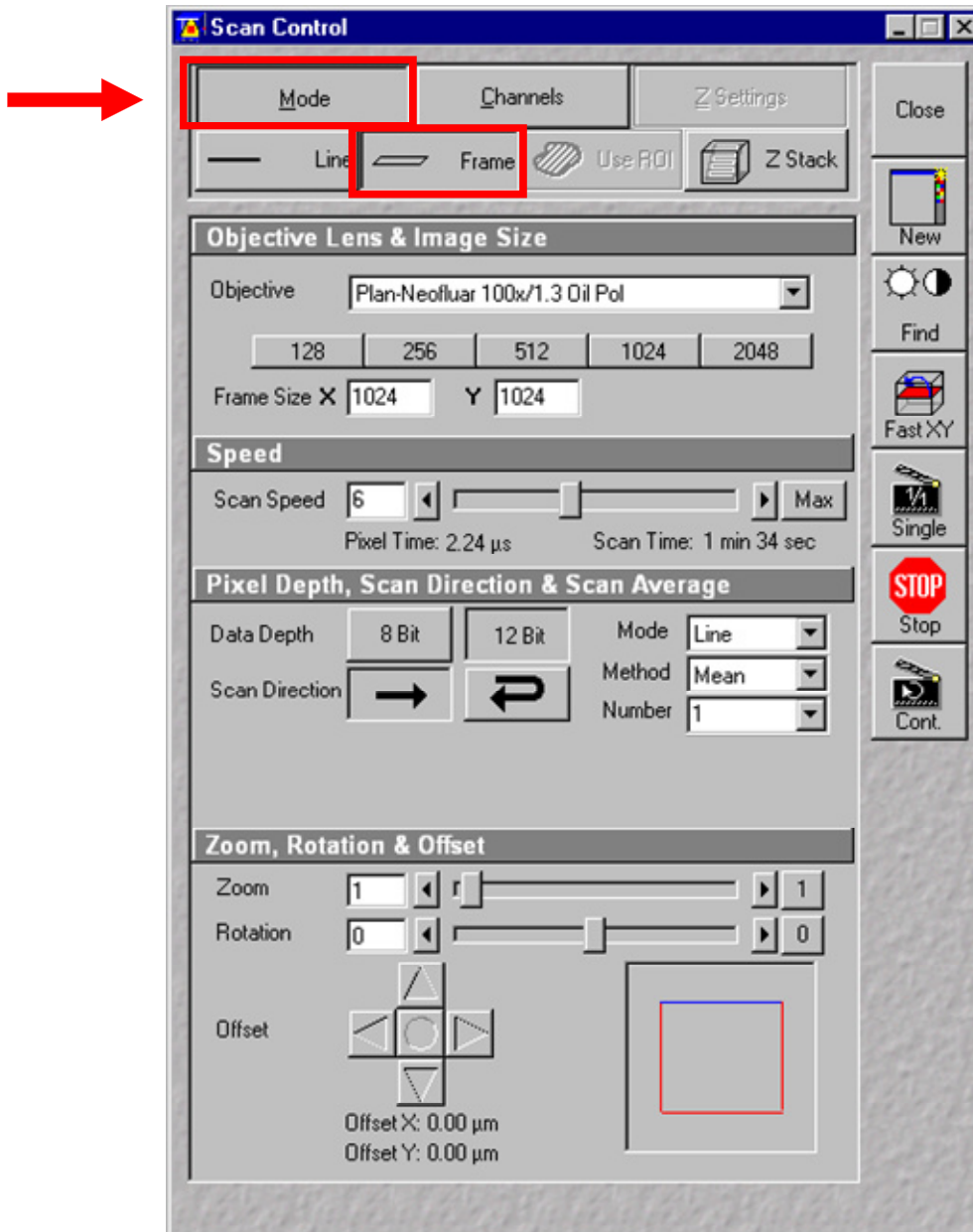
8. Presione el botón “**Scan**” que aparece en el submenú de “**Acquire**” en la ventana “**LSM 5 Pascal**”.



Aparecerá la ventana “**Scan Control**”.



9. Si no está seleccionado, presione el botón “Mode”



Para iniciar a configurar el canal a las condiciones de su muestra se recomienda que,

- a. En el panel “List of Tracks” de la ventana “Configuration Control” únicamente esté seleccionado el canal que va a configurar de manera inicial.
- b. En el menú principal de la ventana “Scan Control”, esté seleccionado el botón “Frame” en vez de “Line”
- c. En el panel “Objective Lens & Image Size” escoja:



**Objective:** El objetivo al que desee capturar la imagen. Si requiere inmersión en aceite, proceda de acuerdo a lo descrito en la sección “**Objetivos de inmersión líquida**”.

**Frame Size: X: 512 Y: 512 o X: 1024 Y: 1024** (a medida que este número aumente, también aumentará la resolución espacial de la imagen adquirida pero el escaneo se hará más lento).

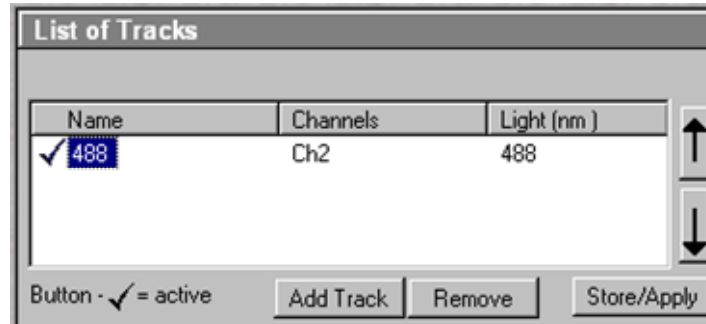
- d. En el panel “**Speed**” escoja “**Scan Speed**”: **6** (velocidad media, mientras mayor sea la velocidad de escaneo menor será la resolución del barrido de la muestra)
- e. En el panel “**Pixel Depth, Scan Direction & Scan Average**” escoja los siguientes parámetros:
  - i **Data Depth: 8 o 12 Bit** de acuerdo a su criterio.
  - ii **Scan direction: Unidireccional (→)**
  - iii **Mode: Line**
  - iv **Method: Mean**
  - v **Number: 1** (número de promedio por línea de escaneo; a medida que este número incrementa, también aumenta la proporción señal/ruido y se obtiene mayor definición, sin embargo, el barrido de la imagen se hará más lento).
- f. En el panel “**Zoom, Rotation & Offset**” escoja: **Zoom 1 y Rotation 0**. (Si aumenta el valor en la opción “Zoom” puede hacer un acercamiento digital de la imagen que está barriendo).  
La opción “**Offset**” le permite mover el campo de visión en XY unos pocos micrómetros sin necesidad de emplear la perilla de **XY** del estativo.

**NOTA:** Estos son los valores recomendados para iniciar la calibración y visualización de la muestra en el sistema confocal. Sin embargo, una vez que inicie la adquisición de la imagen, el usuario tendrá que determinar los parámetros óptimos para disminuir el ruido de fondo y aumentar la definición en su muestra. Es importante recalcar que cada magnificación utilizada deberá ser calibrada de manera individual de acuerdo con la intensidad de señal presente en la muestra a analizar.

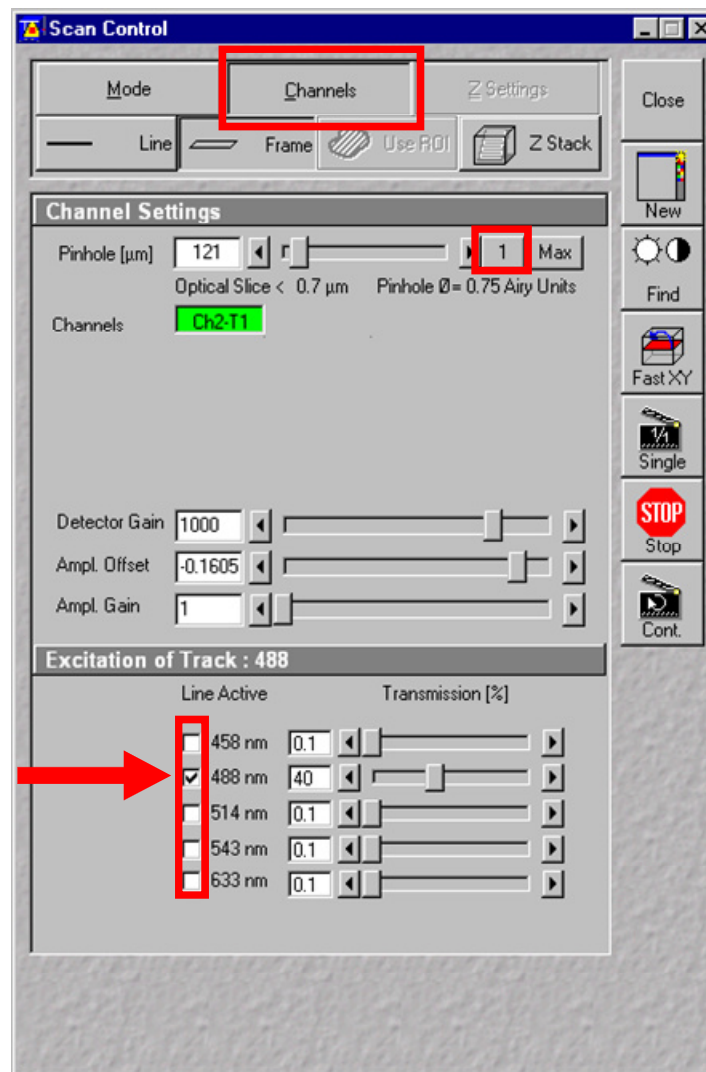
**Se recomienda dejar abierta la ventana “Scan Control” con el objeto de modificar los parámetros que se requieran a lo largo del experimento.**

10. Presione el botón “**Channels**” de la ventana “**Scan Control**” para desplegar los paneles que permitirán establecer los parámetros de los canales a usar (**Channel Settings**) así como determinar las líneas de excitación del/los láseres a usar (**Excitation of Track**).

11. En el panel “**Excitation of Track**” la configuración predeterminada debe mostrar marcada con palomita la línea de láser de excitación de la configuración que usted eligió en el panel “**Beam Path and Channel Assignment**” de la ventana “**Configuration Control**” en el paso 7 de esta sección. De no ser así, seleccione únicamente la línea de láser que utilizará para calibrar un fluoróforo en particular.

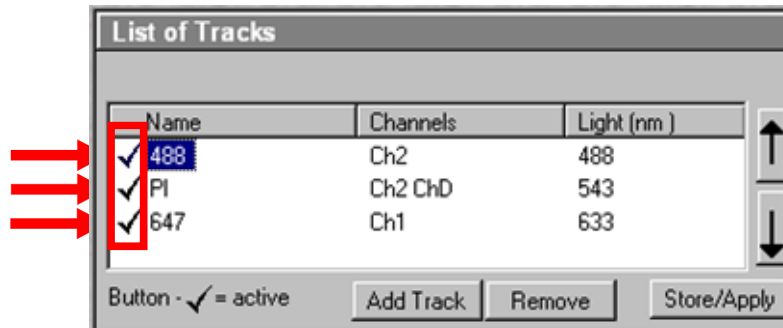


List of Tracks, Configuration Control, Single Track para AlexaFluor 488

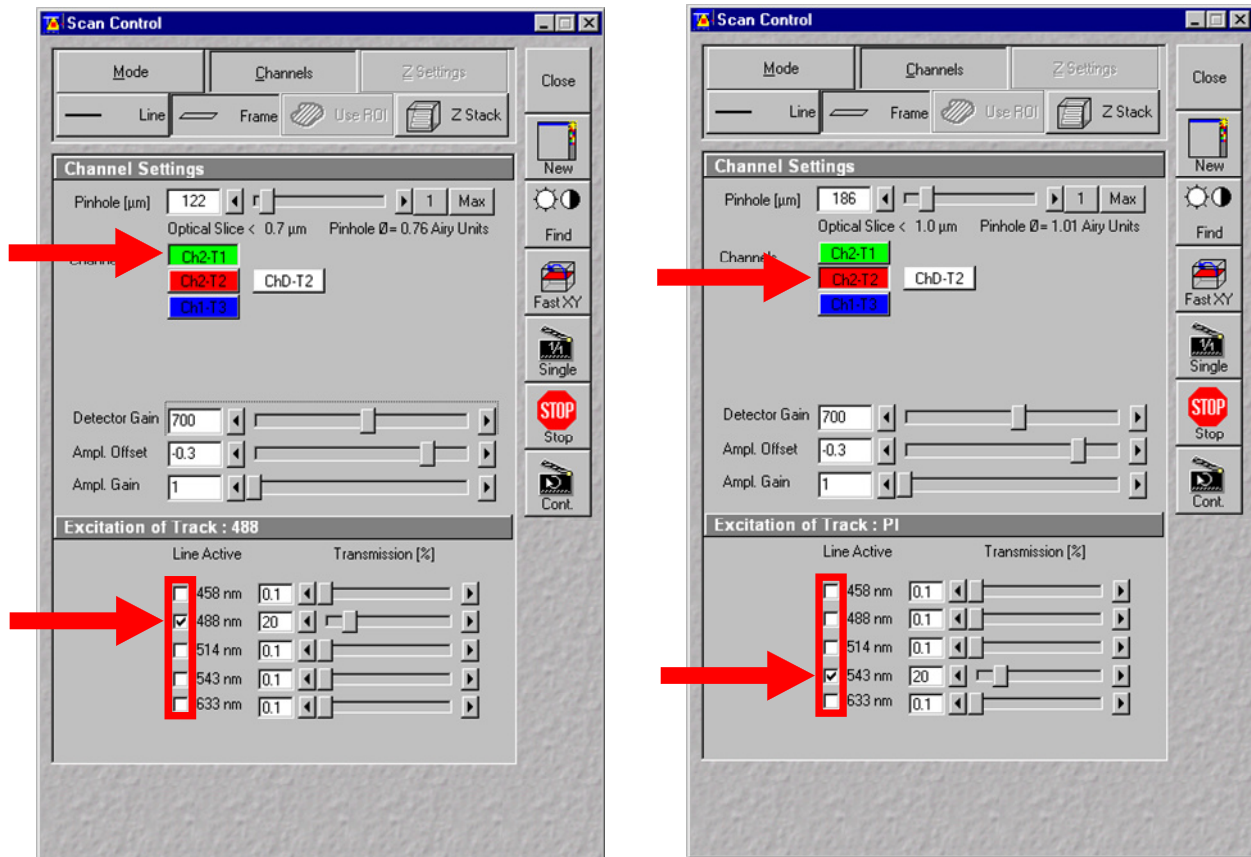


Channels, Scan Control, Single Track para AlexaFluor 488

Nota: Si usted está usando la configuración “Multi Track” active temporalmente todos los canales en el panel “List of Tracks” de la ventana “Configuration Control” dando click sobre el nombre de cada uno de ellos. Luego asegúrese de que en el panel “Excitation of Track” de la ventana “Scan Control” esté palomeada únicamente la línea del láser correspondiente a la excitación de cada canal por separado.

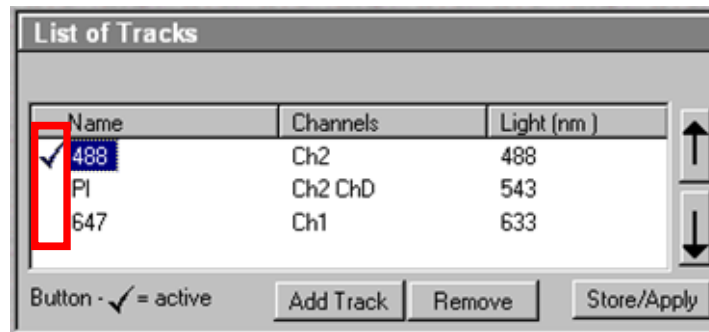


List of Tracks, Configuration Control, Multi Track para AlexaFluor 488, PI, DIC y AlexaFluor 647

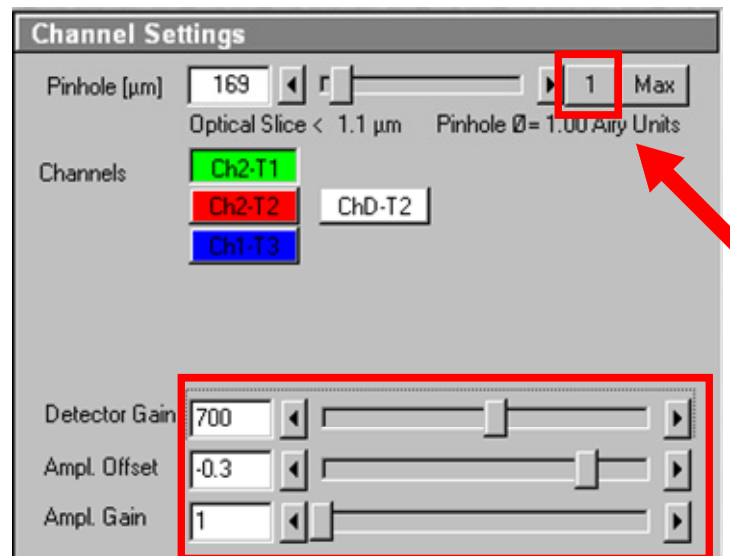


Channels, Scan Control, Multi Track para AlexaFluor 488, PI, DIC y AlexaFluor 647

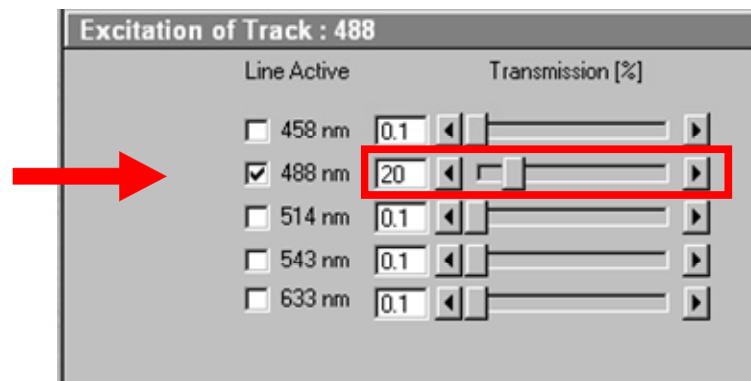
- Una vez verificado lo anterior y si está realizando una configuración para captura multicanal deje activado únicamente un canal (inicie preferentemente con aquel que presente mayor señal de fluorescencia). Para esto, de doble click sobre las palomitas de los canales a inactivar en el panel “List of Tracks” de la ventana “Configuration Control”.



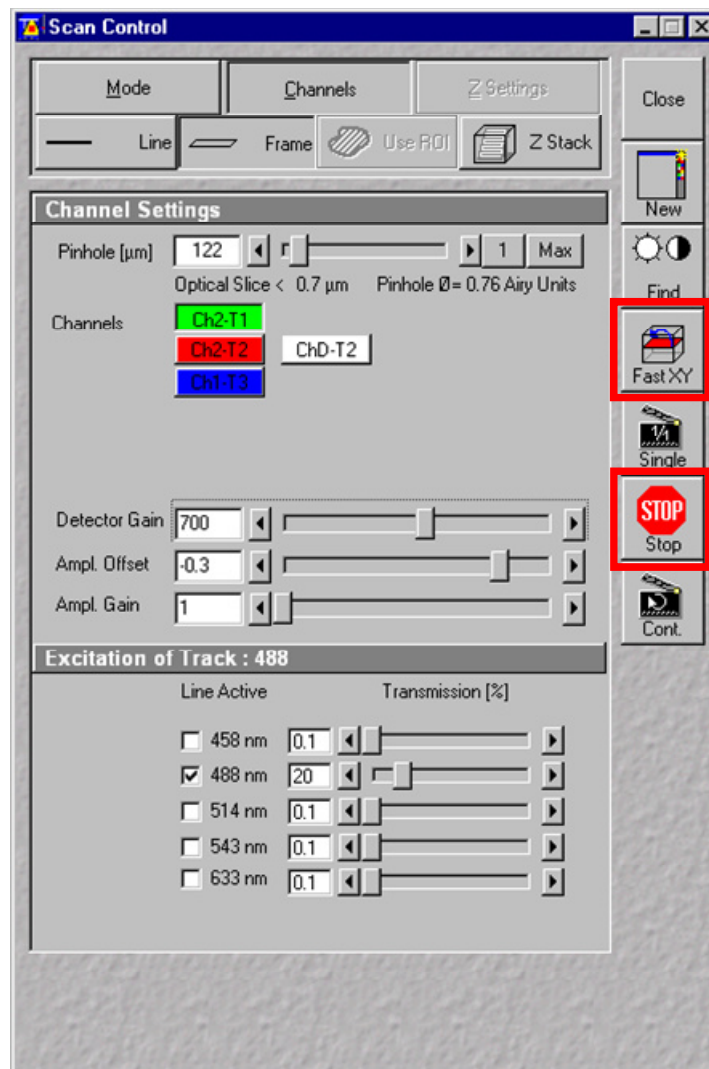
13. Como un punto de partida para la calibración, en el panel “**Channel Settings**” de la ventana “**Scan Control**” posicione la apertura del pinhole en **1 unidad Airy** dando click sobre el botón “**1**”, la variable “**Detector Gain**” a un valor de **700**, “**Ampl. Offset**” en **-0.3** y “**Ampl. Gain**” en **1** (de preferencia, esta última variable debe permanecer inalterada).



14. En el panel “**Excitation of Track**” posicione la barra de desplazamiento del **% de transmisión** del láser al **20%** (igual que en el paso anterior, esta es solo una posición inicial para empezar la calibración).



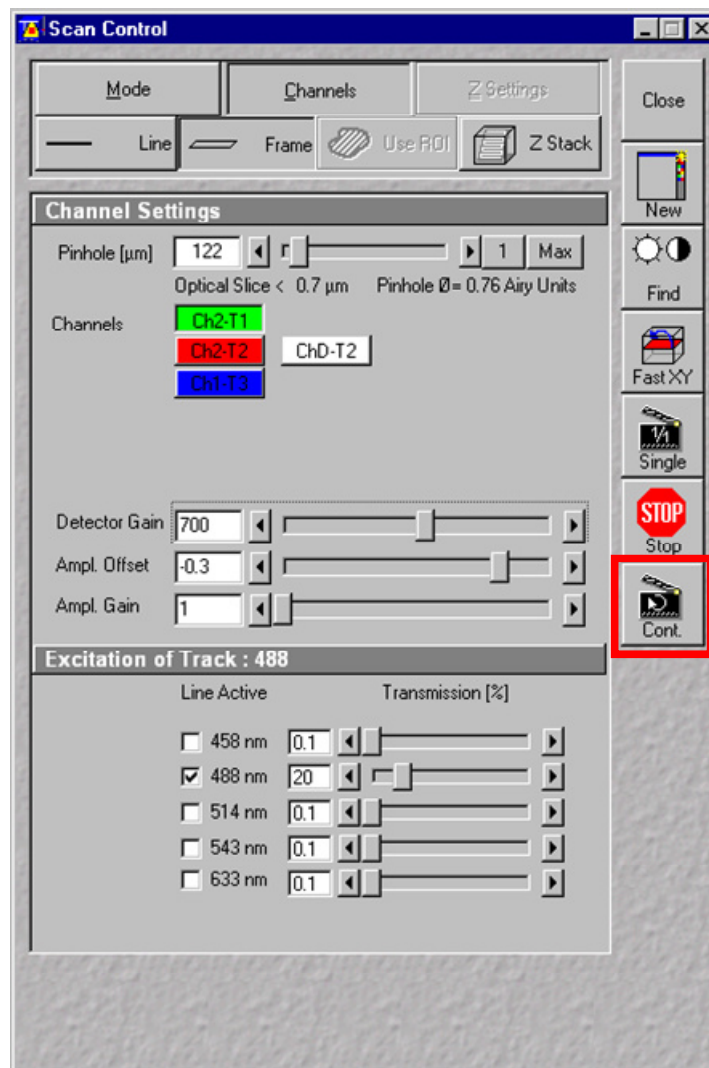
15. Con el fin de encontrar el plano de enfoque correcto para el sistema confocal sin quemar la fluorescencia de la muestra, se recomienda realizar un barrido rápido de baja resolución. Para esto, presione el botón “**Fast XY**” que se encuentra en la columna de íconos en el extremo derecho de la ventana “**Scan Control**”. Aparecerá una ventana desplegando lo que está siendo observado (barrido) por el confocal (puede presionar el botón “**Stop**” para detener el escaneo en cualquier momento). Si en la ventana logra ver una imagen pero ésta está desenfocada, ajuste finamente el foco mediante la perilla del micrométrico del estativo hasta obtener una imagen “enfocada”; generalmente cuando se está cerca del plano de enfoque correcto, el equipo comienza a desplegar mayor señal en el monitor. Una vez conseguido lo anterior, presione el botón de “**Stop**”.



Si no logra ver nada, puede probar lo siguiente:

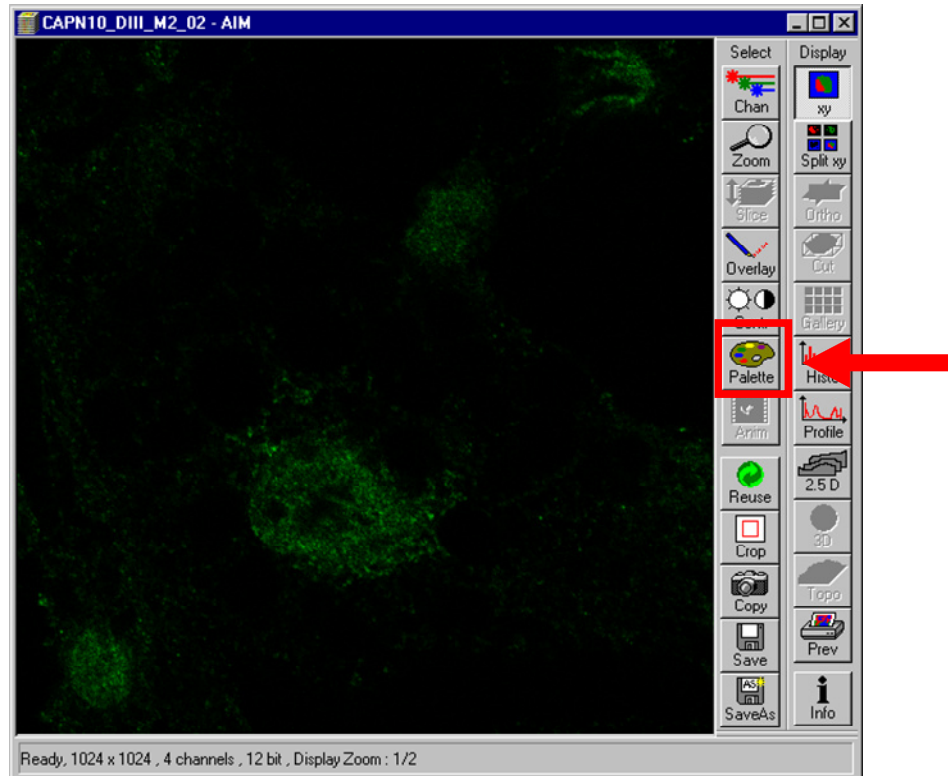
- a. Si está utilizando un objetivo de inmersión en aceite, asegúrese de que no haya burbujas en la gota de aceite. De igual manera, asegúrese de que el cubreobjetos de la preparación esté situado hacia el objetivo.

- b. Con **Fast XY** activo, mueva el micrométrico cuidadosamente hacia arriba y hacia abajo hasta que encuentre señal en el plano focal óptimo mientras el sistema esté adquiriendo continuamente la imagen y cuando logre ver la imagen esperada, continúe con el paso siguiente. Nota: al ser un escaneo rápido, la resolución espacial es muy pobre; es probable que sólo se vea una “sombra” de la señal pero eso es suficiente hasta este paso.
- c. Si continúa sin observar nada, presione el botón “Stop” y en el estativo desplace la perilla localizada en la parte superior del mismo hacia la posición “VIS”. Verifique mediante fluorescencia que al centro del campo de visión se encuentre la señal deseada y enfóquela lo mejor posible. Regrese la perilla de la parte superior del estativo hacia la posición “LSM” y vuelva a intentar este paso.
16. Una vez encontrado el plano de enfoque correcto, inicie la configuración de los parámetros para la adquisición de las imágenes. Presione el botón de escaneo continuo (“Cont.”) que se encuentra en la columna de íconos en el extremo derecho de la ventana “Scan Control”. Notará en el monitor que la velocidad de escaneo es más lenta y se generará una imagen más definida que aquella mostrada con “Fast XY”.

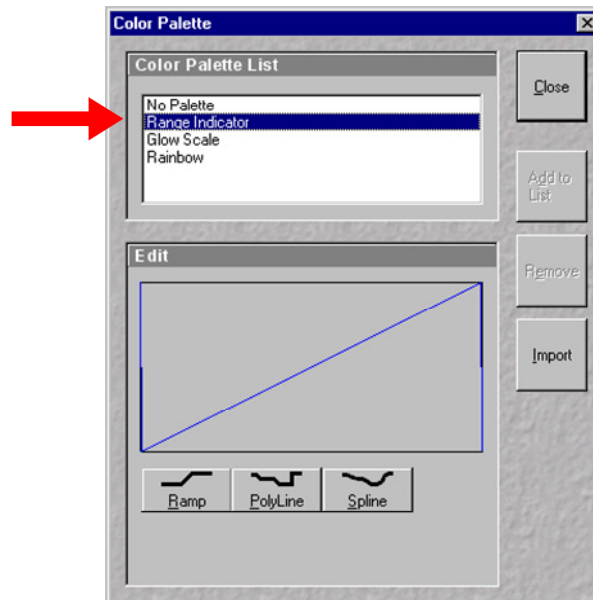


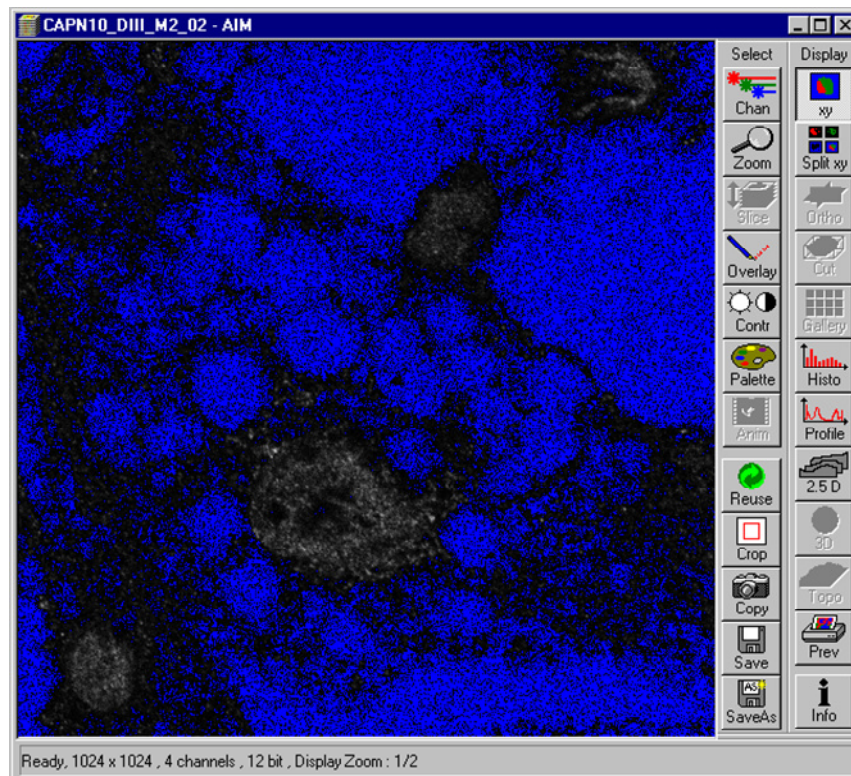


En el panel “**Channel Settings**” ajuste cuidadosamente los valores de “**Detector Gain**” y de “**Ampl. Offset**”; si es necesario, en el panel “**Excitation of Track**” modifique la potencia del láser hasta conseguir una imagen bien definida y con buen contraste.



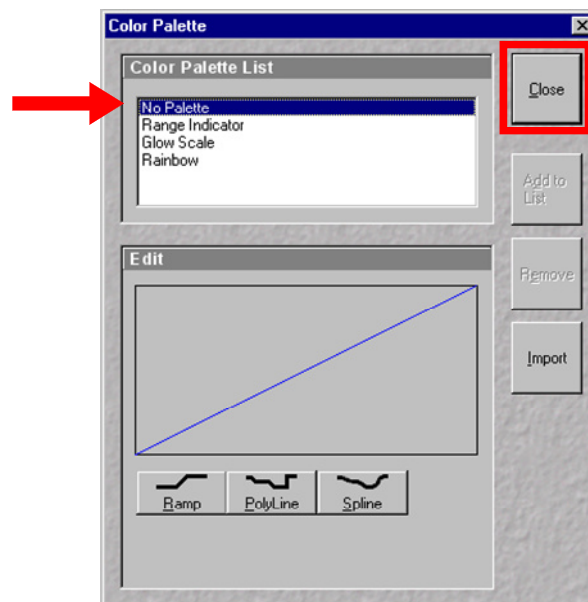
17. Para revisar si la señal de su muestra está en niveles adecuados y no exista una gran saturación o pérdida de intensidad de pixel, presione el ícono “**Palette**” que se encuentra en el menú de la ventana en la que está desplegada la imagen adquirida.  
Aparecerá la ventana “**Color Palette**”. Elija la opción “**Range Indicator**”.





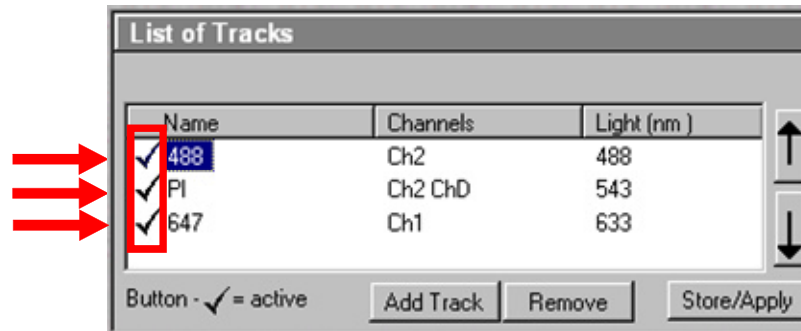
Se recomienda que ajuste la ganancia (“**Detector Gain**”) de forma que haya entre un 5 y 15% de pixeles rojos en la imagen y que ajuste el valor de “**Ampl. Offset**” hasta que todo lo que considere fondo esté desplegado en azul.

Al finalizar el procedimiento de ajuste, seleccione la opción “**No Palette**” en la ventana “**Color Palette**” para desplegar el “color” de su fluorocromo. Ciérrela dando click en el botón de “**Close**”.

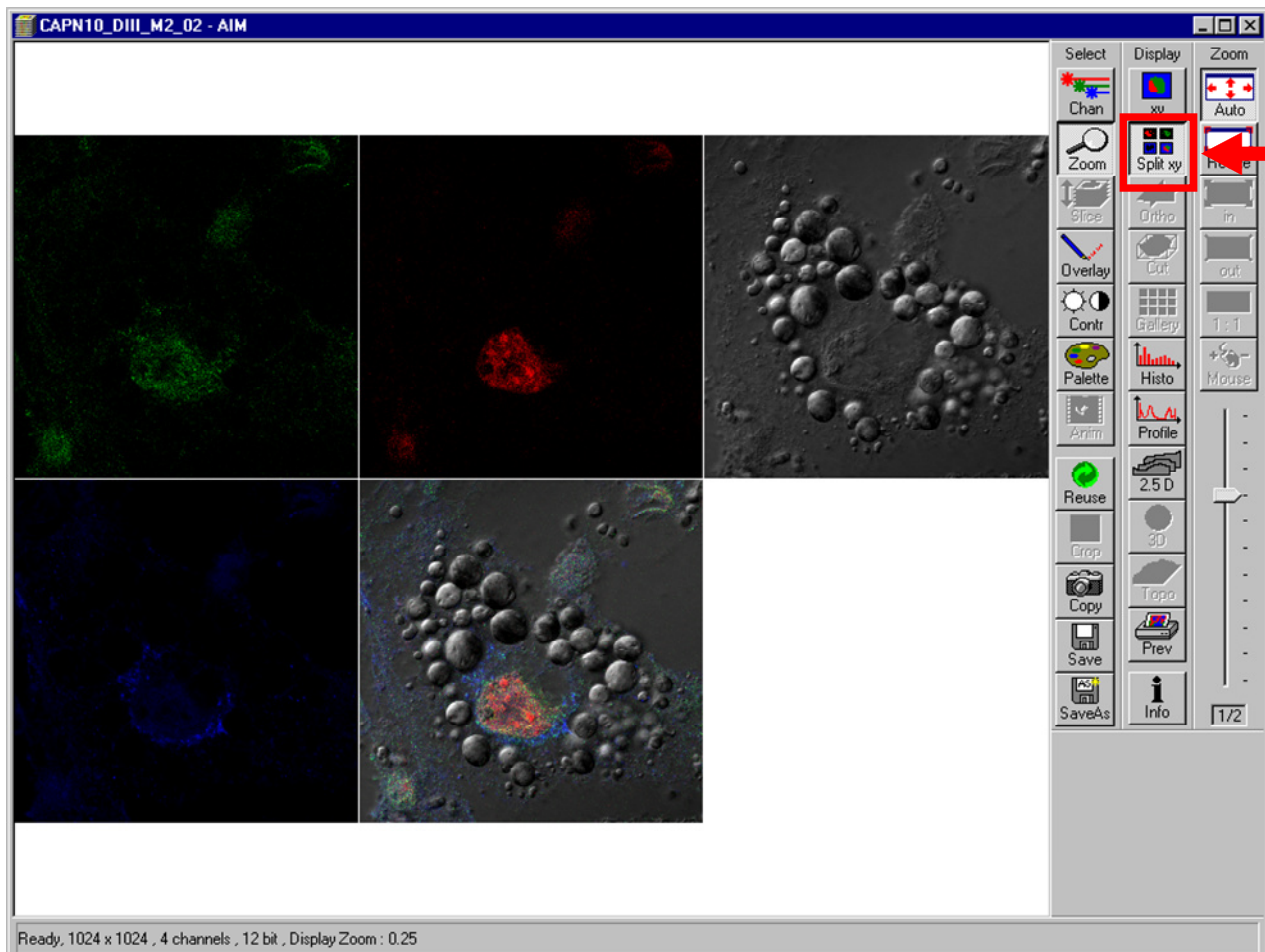




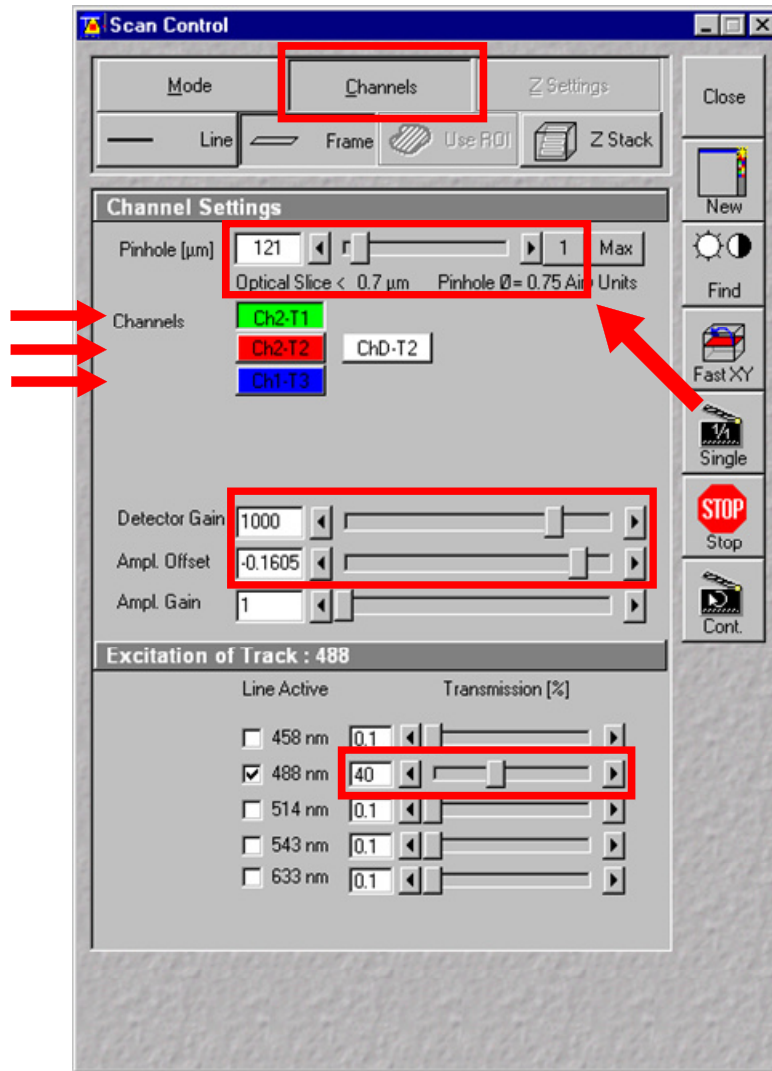
18. Presione el botón “**Stop**” en la ventana “**Scan Control**”. Se detendrá el escaneo de su muestra.
19. Cuando haya optimizado los parámetros de adquisición del primer canal, y si se trata de una captura multicanal, repita los pasos [12 al 18](#) hasta tener calibrados todos los canales. Cuando esto esté hecho, puede visualizarlos lado a lado y en empalme activando todos los canales en el panel “**List of Tracks**” de la ventana “**Configuration Control**”.



20. Presione el botón “**Cont.**” en la ventana “**Scan Control**” para iniciar el escaneo. Luego presione el botón “**Split XY**” en la ventana de escaneo, el cual ahora estará activado y le permitirá la visualización simultánea de los canales que estén activados.

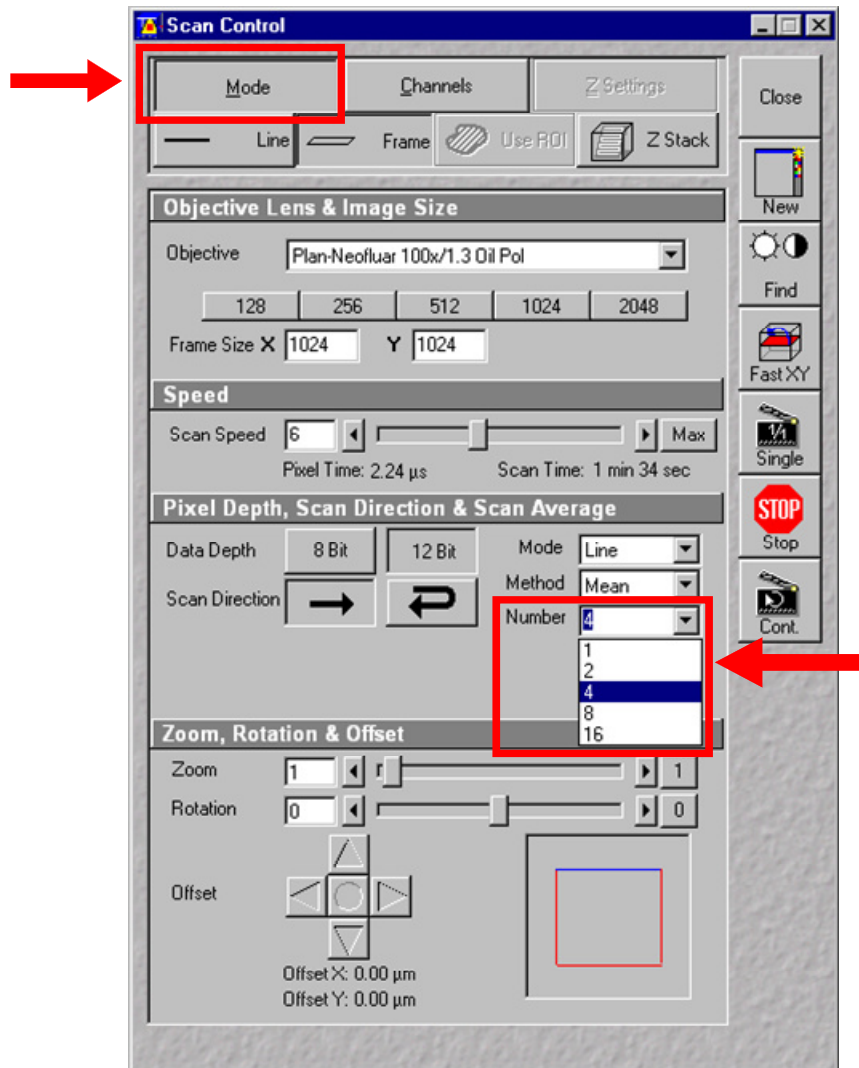


Notará que el escaneo se hará más lento, esto es porque el tiempo de captura se incrementará por cada canal que esté activado. En modo de escaneo continuo puede continuar modificando los parámetros de adquisición si lo considera necesario; para ello seleccione el canal que desee modificar dando click sobre él desde el panel “**Channel Settings**” y modifique los parámetros de adquisición hasta que la imagen le parezca satisfactoria. Otra opción es modificar las condiciones “aislando” el canal de interés, inactivando los demás desde el panel “**List of Tracks**” de la ventana “**Configuration Control**”.

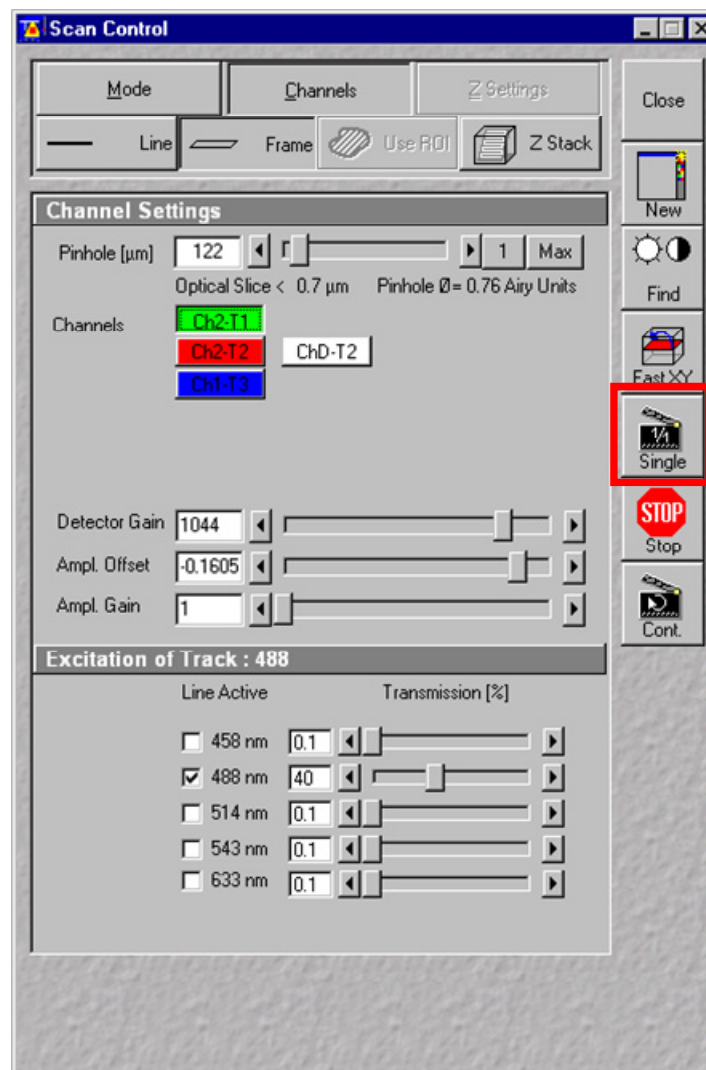
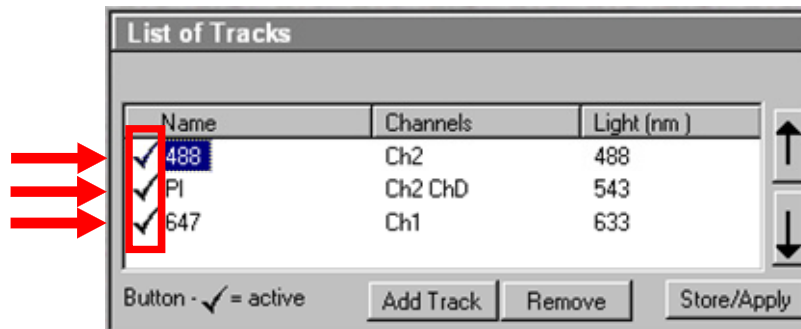


21. Una vez que esté de acuerdo con la imagen desplegada, presione el botón “**Stop**” de la ventana “**Scan Control**”. El escaneo se detendrá.

22. Para capturar una imagen de alta calidad, se recomienda promediar los escaneos; para esto regrese a la pestaña “Mode” y en el panel “Pixel Depth, Scan Direction & Scan Average” seleccione en “Number” un valor de 4 u 8, según considere. Esto incrementará la resolución espacial de la imagen, aunque también incrementará el tiempo de generación de la imagen.

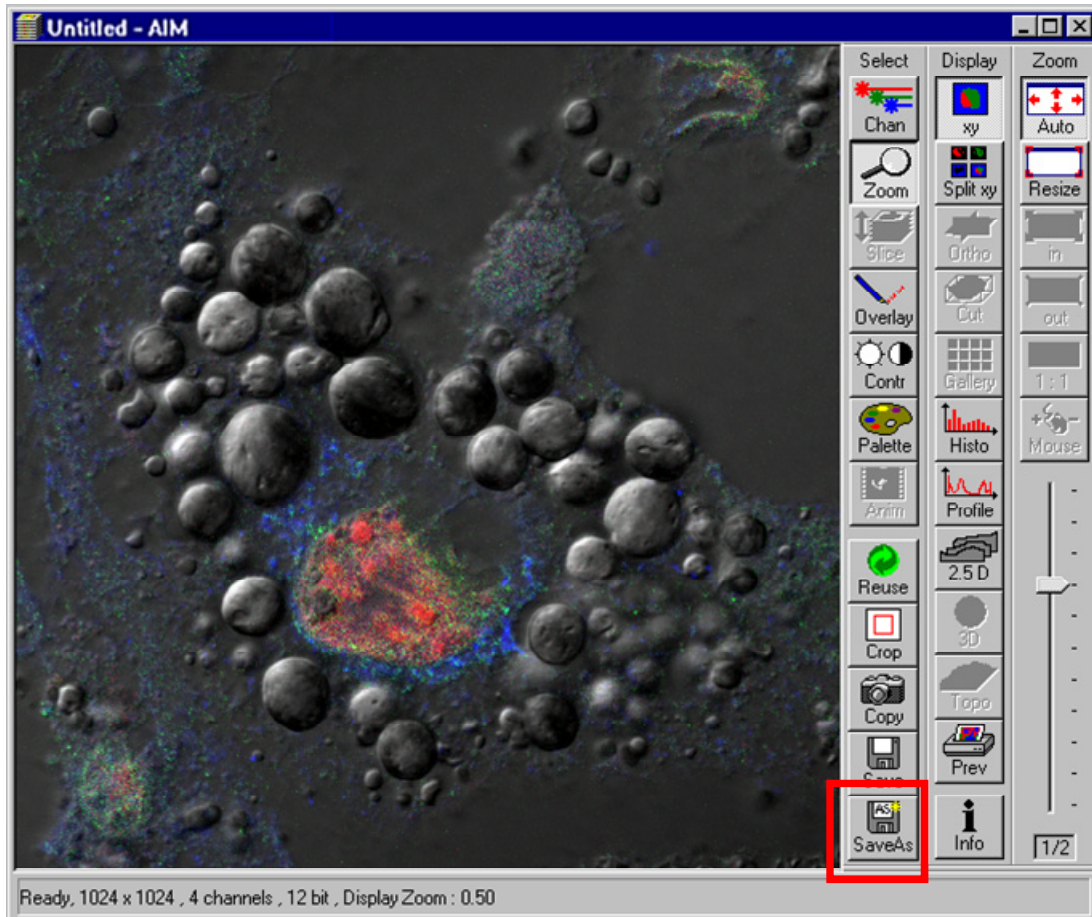


23. Para capturar la imagen, revise que tiene todos los canales requeridos activados en el panel “List of Tracks” de la ventana “Configuration Control”. Presione el botón “Single” de la ventana “Scan Control”.

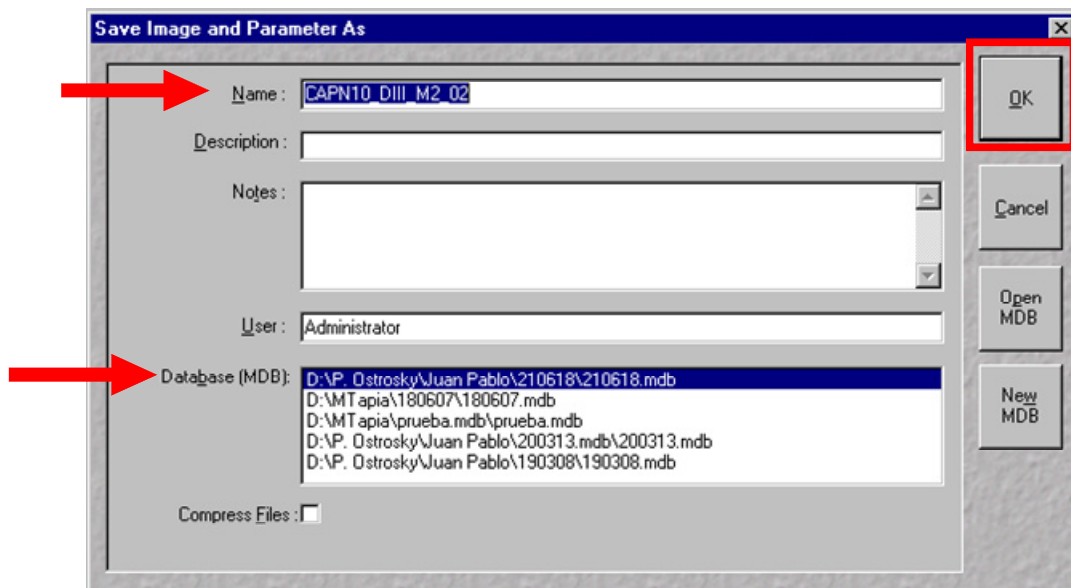


El equipo adquirirá una imagen con los parámetros configurados y al terminar detendrá el escaneo.

24. Para guardar la imagen, de clic en el botón “SaveAs” de la ventana de visualización.

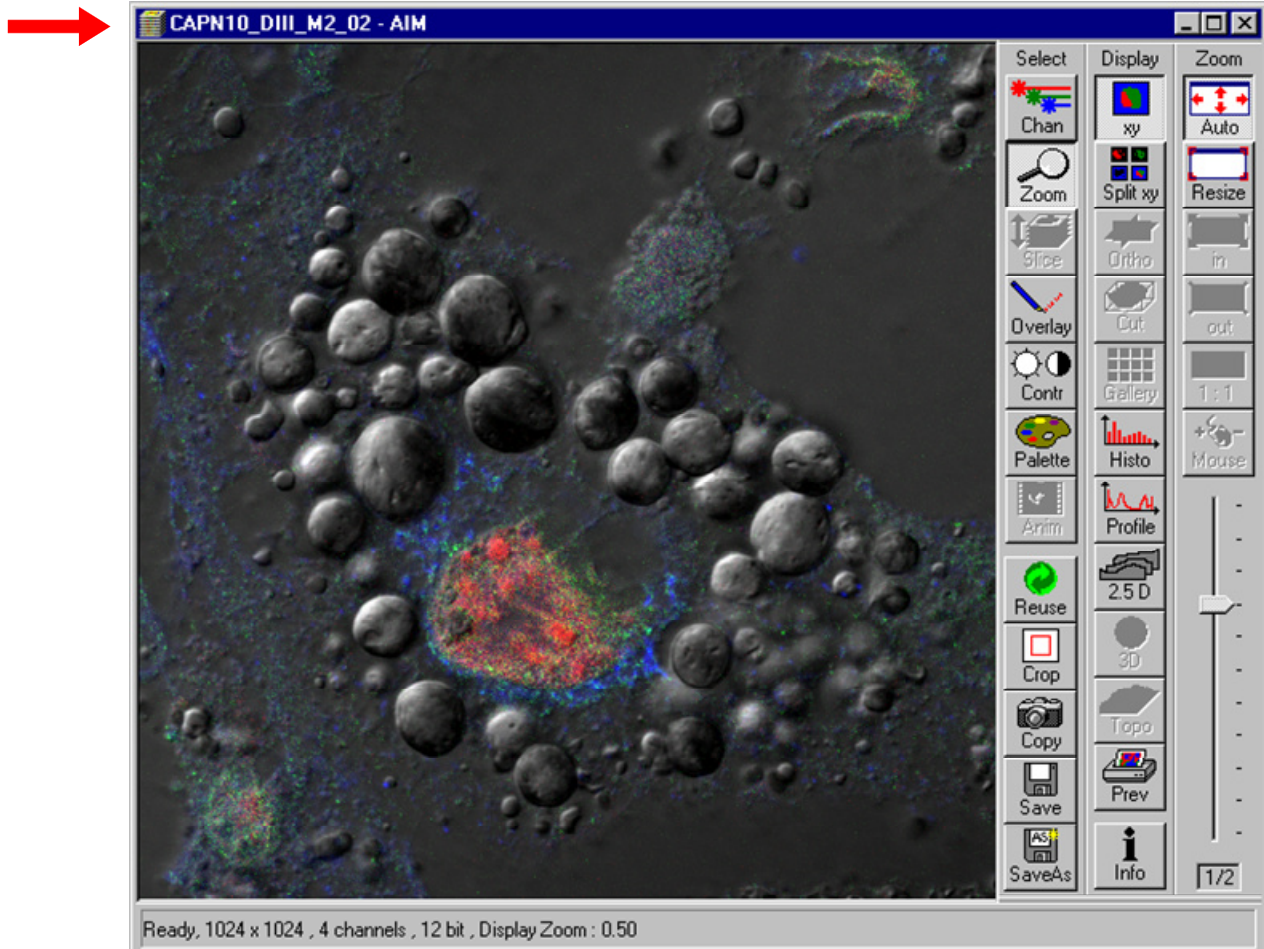


25. Aparecerá la ventana “Save Image and Parameter As”. Asegúrese de que en la parte inferior de la ventana se encuentre resaltada en azul la base de datos (carpeta) donde guardará su imagen. Si no es así, seleccione la base de datos correcta.





26. En la parte superior de la ventana aparecerá la variable “Name”. Borre el contenido de esa variable e introduzca un nombre para su imagen. Presione el botón OK.
27. Su imagen habrá quedado guardada y lo podrá verificar observando el nombre asignado en la barra superior azul que enmarca a su imagen.



**Nota importante: Si no guarda su imagen y comienza un nuevo escaneo, la imagen será reemplazada por el nuevo escaneo. No olvide guardar sus imágenes.**

**Algunas formas de mejorar la calidad de imagen obtenida:**

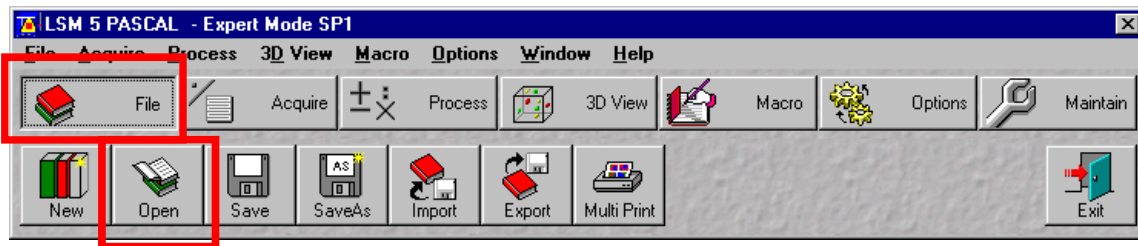
- a. Aumentar la resolución de la imagen presionando el **botón 1024** o **2048** en la opción “**Frame Size**” del submenú “**Mode**” en la ventana “**Scan Control**”
- b. **Disminuir la velocidad de barrido** en la opción “**Scan Speed**” del submenú “**Mode**” en la ventana “**Scan Control**”
- c. **Aumentar el número de promedio de barridos de la muestra** en la opción “**Number**” de la pestaña “**Mode**” en la ventana “**Scan Control**”

## Reutilización de parámetros de captura de una imagen previamente adquirida

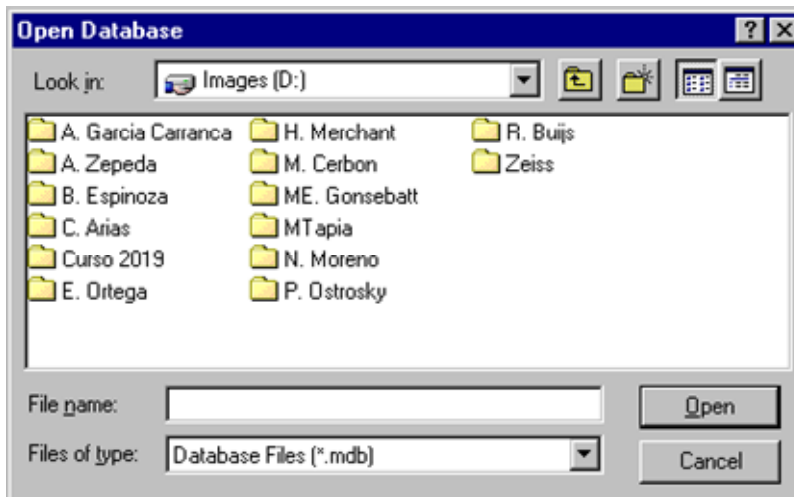
Cuando tenga que realizar capturas en varias sesiones o de distintas condiciones experimentales con condiciones idénticas de captura, se pueden reutilizar los parámetros de una imagen previamente adquirida incluso desde el inicio de una sesión.

Para reutilizar los parámetros de adquisición de una imagen previa:

1. Si no lo ha hecho, realice los procedimientos de “[Encendido del Equipo](#)” y “[Observación de la Muestra al Microscopio](#)”.
2. De clic en el botón “**File**” de la interfaz gráfica de usuario principal de LSM 5 Pascal.
3. De clic en el botón “**Open**” del sub menú correspondiente:

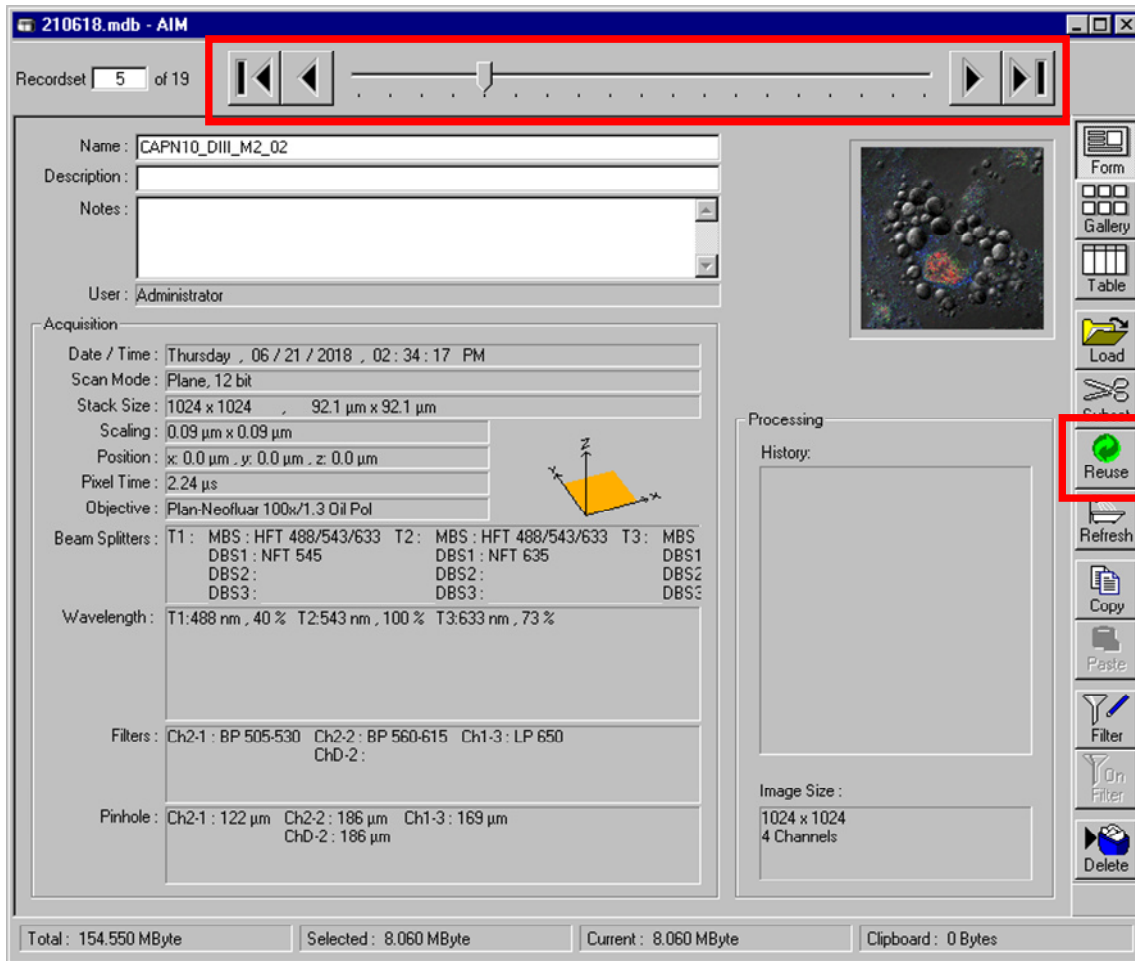


4. Aparecerá la ventana “**Open Database**”; busque en la Unidad “**D**” el nombre de la base de datos (archivo **.mdb**) en la se encuentre enlistada la imagen de la cual quiera reutilizar los parámetros de captura.



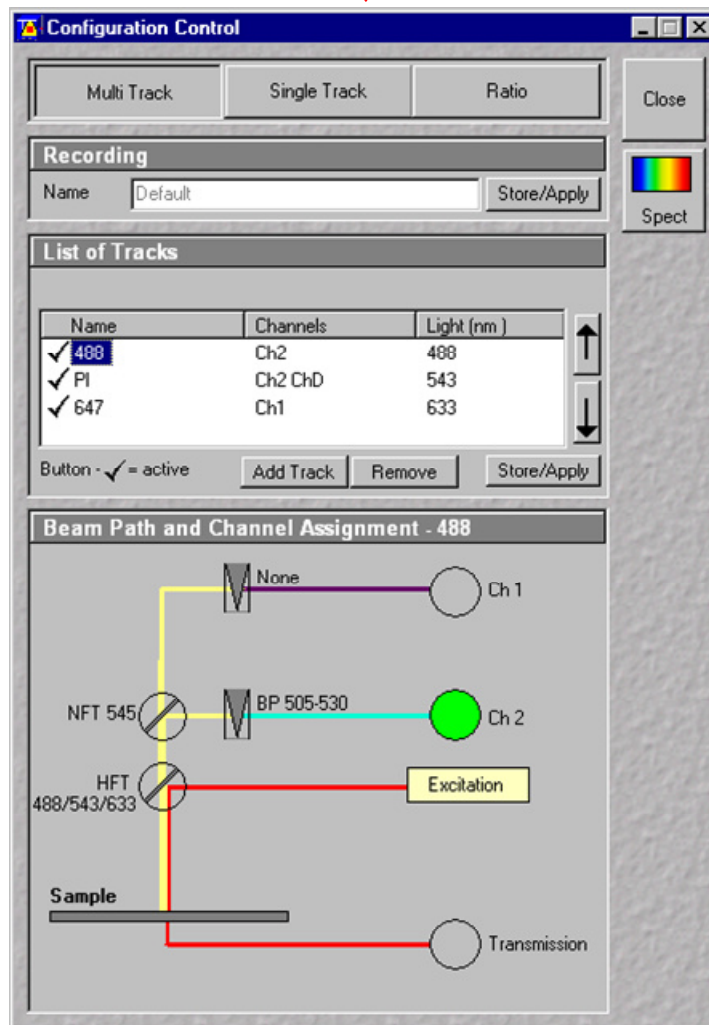
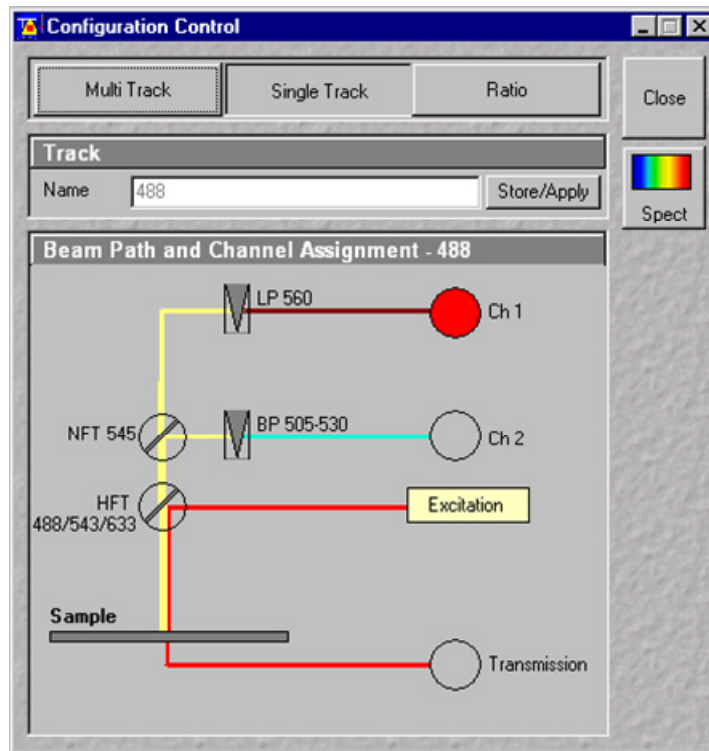
Una vez que lo haya encontrado, de doble click en él o haga click en el botón “Open”.

5. Aparecerá la ventana principal de la base de datos con la lista de las imágenes contenidas dentro de ella (**Recordset**). Mediante los botones de flechas localizados en la parte superior de la ventana, localice la imagen de la cual quiere reutilizar los parámetros de captura.



6. Una vez hallada la imagen, presione el icono “Reuse” localizado en la parte lateral derecha de la ventana principal. El software configurará el sistema de captura con los parámetros de la imagen adquirida, incluido el objetivo en el que se realizó la captura.
7. Al realizar este procedimiento, el software continuará guardando las imágenes que adquiera en la base de datos de la cual reutilizó los parámetros. Si requiere generar una nueva base de datos, realice el procedimiento indicado en la sección [“Almacenamiento de las imágenes adquiridas en el microscopio confocal”](#).





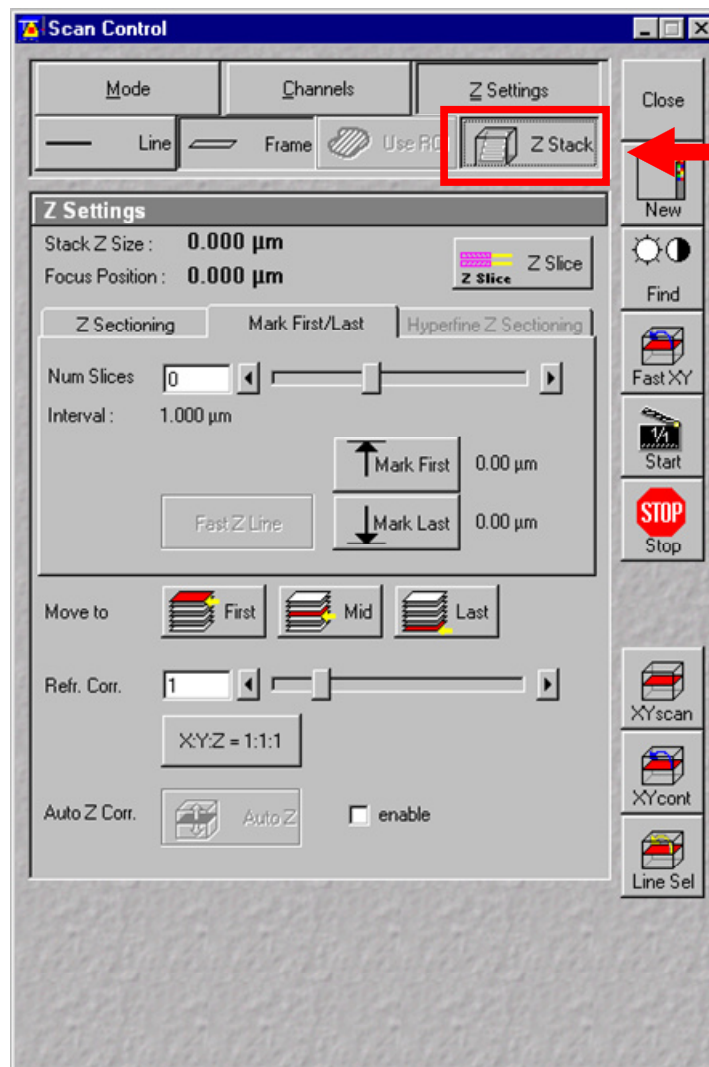
Cambio en la ventana "Configuration Control", después de utilizar el comando "Reuse"

## Captura de imágenes en XYZ (Z-stack)

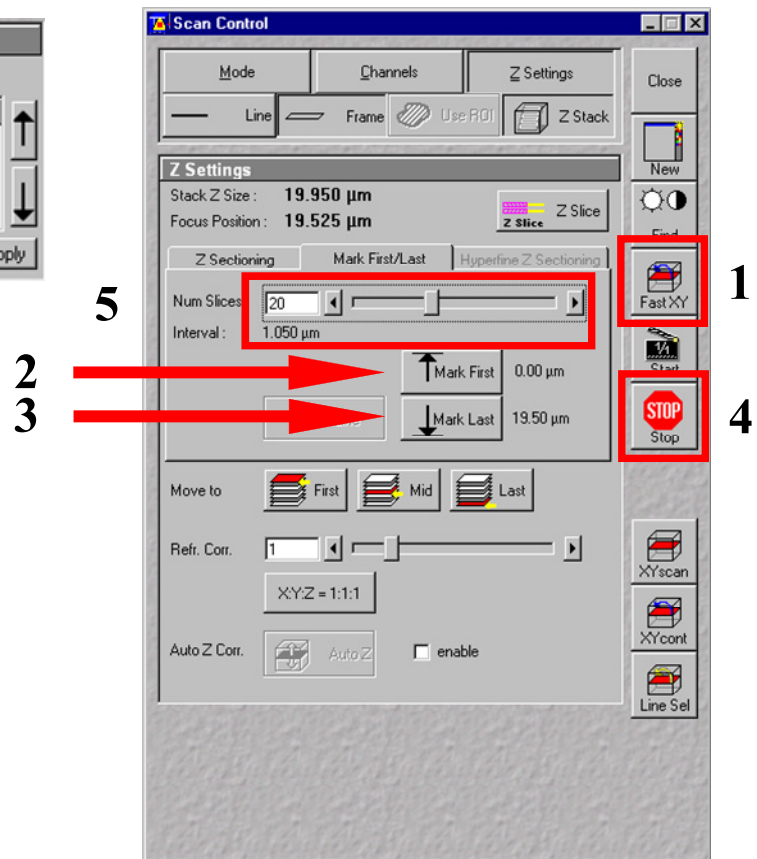
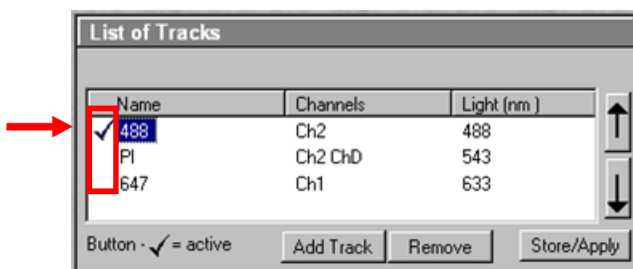
Este procedimiento permite generar un archivo de apilado de imágenes **XY** seriadas, equidistantes en el plano **Z** (secciones ópticas, imagen **XYZ**). Debe considerar que el procedimiento de adquisición es lento, por lo que dependiendo del número de imágenes a adquirir así como de la calidad del marcaje de la muestra ésta puede sufrir diferentes grados de fotoblanqueo durante la adquisición, incluyendo la pérdida total de fluorescencia en el sitio de captura.

Para generar un apilado de imágenes en **XYZ**:

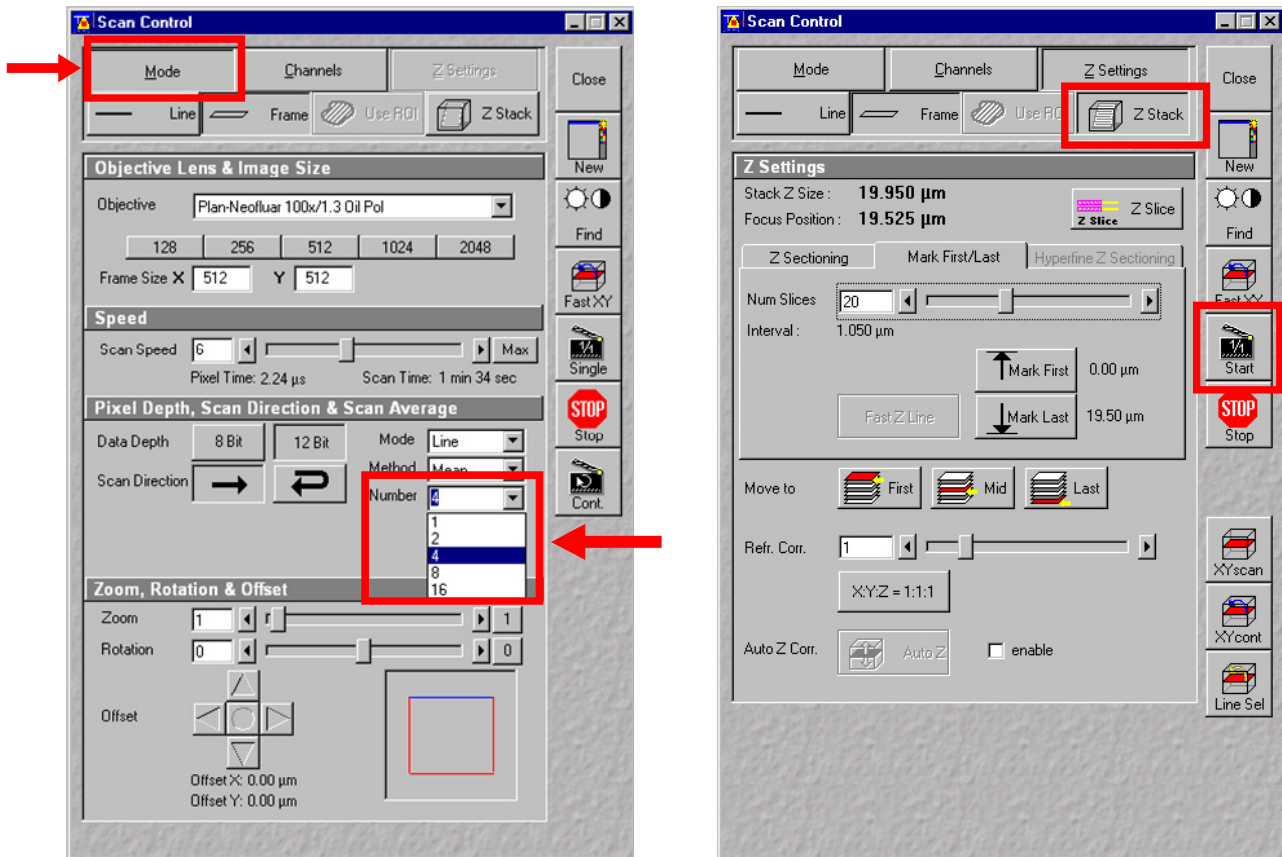
1. Los parámetros de captura deben estar calibrados de manera óptima y de acuerdo con la intensidad de la señal fluorescente presente en la muestra. De igual manera, se recomienda que durante el procedimiento de marcar los límites del apilado sólo esté activo uno de los canales a capturar en el panel “**List of Tracks**” de la ventana “**Configuration Control**”.
2. Presione el botón “**Z stack**” que se encuentra en el menú principal de la ventana “**Scan Control**”. Automáticamente se activará el botón “**Z Settings**” en la misma ventana.



3. Presione sobre la pestaña “**Mark First/Last**” del panel “**Z Settings**”.
4. Debe determinarse el tamaño óptimo del apilado mientras se esté haciendo un barrido continuo de la muestra. Para ello, presione el botón “**Fast XY**” de la ventana “**Scan Control**” y mediante la perilla del micrométrico encuentre el plano de mayor enfoque.
5. Luego desplace el tornillo micrométrico para enfocar uno de los límites del apilado, éstos los notará porque a partir del plano de mayor enfoque la intensidad irá disminuyendo hasta desaparecer.
6. Una vez que se encuentre en el límite, presione el botón “**Mark First**” en la pestaña “**Mark First/Last**” del panel “**Z Settings**”. El valor de profundidad adyacente -mostrado en micrómetros- cambiará a la profundidad marcada.
7. Ahora gire el tornillo micrométrico en la dirección contraria para enfocar el otro límite del apilado.
8. Una vez que se encuentre en el otro límite, presione el botón “**Mark Last**”. El valor de profundidad adyacente -mostrado en micrómetros- cambiará a la profundidad marcada.
9. Presione el botón “**Stop**”.



10. En la variable “**Num Slices**” de la pestaña “**Mark First/Last**” del panel “**Z Settings**”, determine el número de imágenes que desea capturar. Conforme modifique el valor de la variable y de acuerdo con el valor de grosor obtenido del sitio de captura, el valor de intervalo (desplegado debajo de “**Num. Slices**”, en micrómetros) se modificará también. De acuerdo con las capacidades de este equipo, así como de la calidad de la muestra, se recomienda capturar entre 4 y 8 imágenes por apilado.
11. Presione el botón “**Mode**” de la ventana “**Scan Control**”. Como recomendación inicial para captura XYZ en este equipo, se recomienda capturar a un tamaño de imagen de 512x512 a una velocidad de escaneo de 6 y un promedio de 2 o 4.
12. Presione otra vez el botón “**Z stack**” de la ventana “**Scan Control**”. Luego presione el botón “**Start**” para iniciar la captura de las secciones ópticas que componen su apilado XYZ. El avance de la misma se mostrará por la aparición gradual de una barra negra ubicada en la parte inferior de la ventana de captura.



13. Una vez que termine el escaneo, guarde su imagen como en los pasos 26 a 28 de la sección anterior de este manual.
14. Si requiere ver el conjunto de imágenes que componen el apilado capturado, presione el ícono “**Gallery**” que aparece en el menú de la derecha de su imagen.
15. Para volver a la función de captura en un solo plano focal, presione el botón “**Z Stack**” de la ventana “**Scan Control**”. El botón “**Z Settings**” se inactivará.

## **Visualización de las imágenes capturadas en el confocal Zeiss LSM 5 Pascal**

Se recomienda que las imágenes obtenidas en la estación de trabajo del microscopio confocal sean visualizadas/analizadas con programas de análisis de imágenes como **FIJI** o **ImageJ**, entre otros, y en otro equipo de cómputo de mayor capacidad. Usted encontrará software de uso libre en el apartado de **Análisis de Imágenes** de la página de la Unidad de Microscopía:

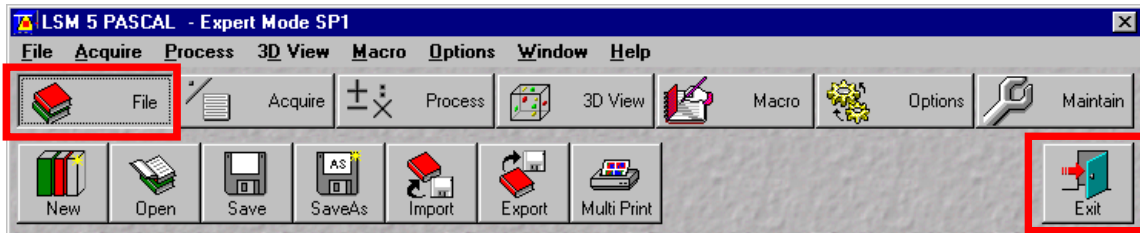
<https://www.biomedicas.unam.mx/servicios/unidad-de-microscopia/>

Si lo prefiere, puede solicitar al Responsable de la Unidad el visor Zeiss “**LSM Image Browser**”, aunque considere que dicho software no posee funciones de análisis.

## Apagado del equipo

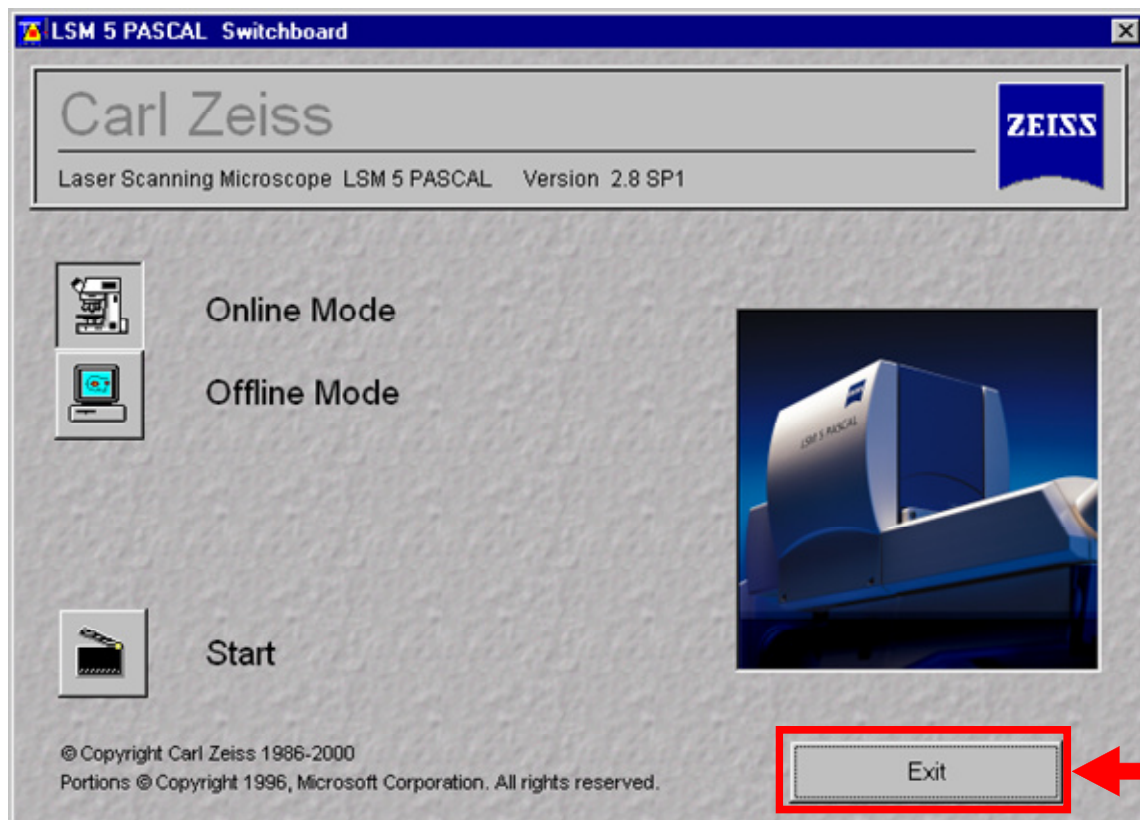
1. Para finalizar el programa, cierre todas las ventanas excepto la ventana principal “LSM 5 Pascal”. Oprima el botón “File” y después el botón “Exit”.

1



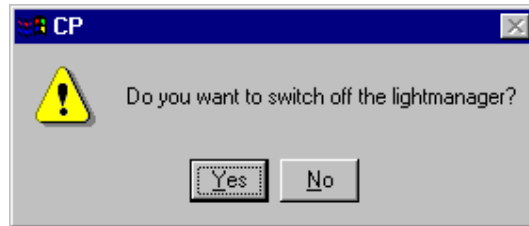
2

2. Aparecerá el panel de operación “LSM 5 Pascal Switchboard”. Presione el ícono “Exit”.

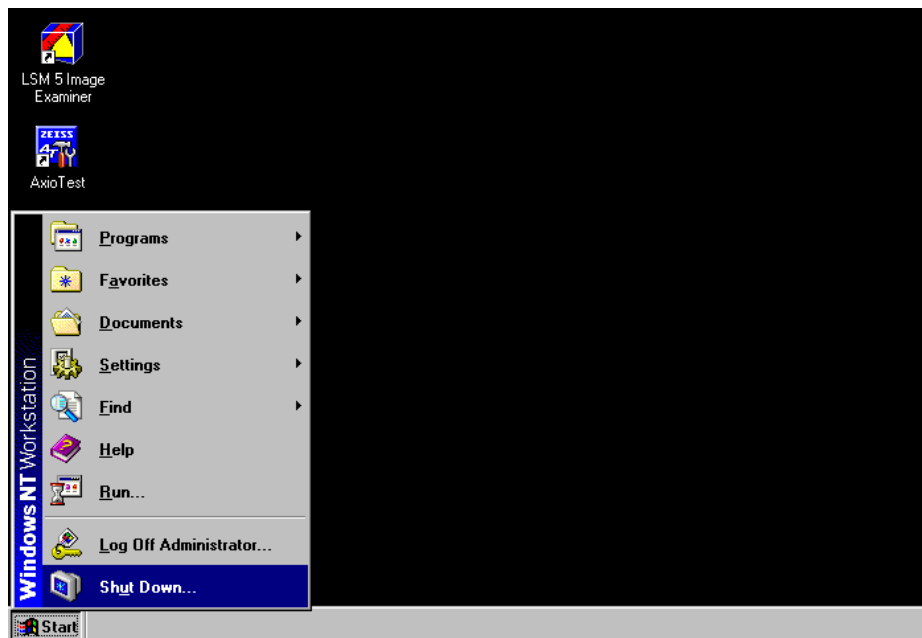




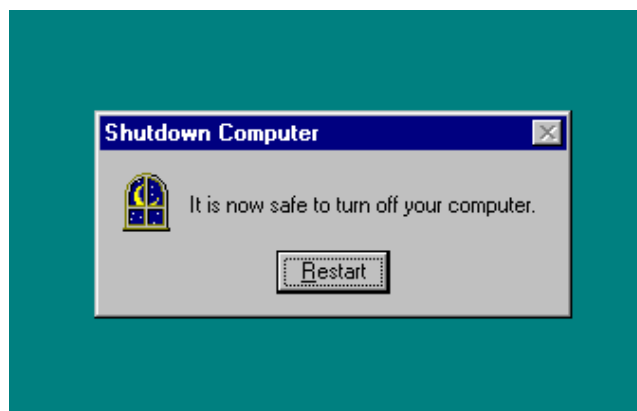
3. Aparecerá la ventana “Switch Off Light Manager”, presione “No”.



4. Desde el Explorador de Windows, transfiera sus imágenes a la unidad de red del Instituto, respetando el formato jerárquico de carpeta: Nombre del Jefe de Grupo | Usuario.
5. Una vez transferidas las imágenes, apague el sistema operativo (Start | Shut Down...).



6. Cuando aparezca la ventana de “Shutdown Computer”, presione el botón de encendido/apagado del CPU (**no** de click en Restart).





7. Si la encendió, apague la fuente de poder de la lámpara de fluorescencia.
8. Apague los láseres mediante los interruptores correspondientes:
  - a. El apagado del láser **Ar** se realiza mediante dos pasos; el primero es girar la llave de seguridad a la posición “**O**”; inmediatamente la luz en la salida del láser tornará de violeta a naranja. Después de unos minutos, la luz naranja se extinguirá. Una vez que esto ocurra, coloque el interruptor (botón con la leyenda “**Power Enable**”) en la posición “**O**”.
  - b. Apague los láseres **He/Ne** girando hacia la izquierda la llave correspondiente.
9. Mediante los botones situados por detrás de la perilla de micro/macrométrico del lado derecho, posicione el revolver del microscopio en una posición vacía hacia el frente. Retire su preparación y limpie cuidadosamente los objetivos utilizados mediante papel seda humedecido con 70% alcohol.
10. Apague los tres interruptores generales que se encuentran empotrados en la pared en la parte superior a la izquierda de la mesa antivibratoria del estativo del microscopio. Todos los interruptores deberán quedar en posición O/OFF.

## SOLUCION DE PROBLEMAS COMUNES

De manera práctica, siempre observe su preparación biológica directamente en los oculares del estativo del microscopio utilizando la lámpara de fluorescencia (considere que las muestras marcadas con fluorocromos que emitan en el rango del rojo lejano no las podrá observar). Se recomienda que antes de ingresar su muestra al microscopio confocal, haya estandarizado sus preparaciones y las haya observado previamente en un microscopio de fluorescencia de campo amplio, cerciorándose de que exista señal detectable y con una buena relación señal/ruido. A continuación se enlistan algunos posibles problemas relacionados con la captura de imagen en microscopio confocal.

### 1) No logro observar la muestra en el monitor en ningún modo de escaneo. Posibles soluciones:

- Asegúrese de que los láseres estén encendidos. Observe si las llaves de las fuentes de poder están en posición horizontal, y si a la salida de los tubos de los láseres se observa luz visible.
- Compruebe que la perilla ubicada en la porción superior derecha del estativo del microscopio se encuentre en la posición “**LSM**” (completamente hacia afuera). Si no es el caso, desplácela hasta escuchar un clic.
- Compruebe que la corredera del contraste diferencial interferencial (DIC) situada del lado izquierdo por detrás de los oculares del estativo esté completamente afuera. Si no es el caso, desplácela hasta escuchar un clic.
- Posicione los pasos de luz marcados con F A en la posición más superior.
- Revise el plano focal de su preparación biológica en el estativo metiendo la perilla ubicada en la porción superior derecha del estativo del microscopio en la posición “**VIS**” (completamente hacia dentro). Una vez verificado el plano focal, vuelva a sacar la perilla a posición “**LSM**”. Con un escaneo “**Fast XY**” y activando el “**Range Indicator**” de la “**Color Palette**”, cambie el plano focal girando lentamente el tornillo micrométrico mientras observa el monitor. Deberá notar cambios en la intensidad de la imagen desplegada de una manera más evidente.
- Compruebe si entró a la sesión en modo “en línea”. Para esto, presione el botón “**File**” de la interfaz gráfica de usuario y después el botón “**Exit**” del submenú correspondiente. Aparecerá el panel de operación “**LSM 5 Pascal Switchboard**”. Revise que el ícono “**Online mode**” esté seleccionado (presiónelo en caso de que no esté seleccionado) y después presione el botón “**Start**”. El sistema verificará que todos los componentes estén conectados y se iniciará. Active las ventanas “**Configuration Control**” y “**Scan Control**”, seleccione una configuración adecuada para su fluorocromo e inicie un escaneo rápido XY. La luz láser deberá observarse a través del objetivo y deberá notar señal en el monitor.

- Asegúrese de que la configuración que escogió tenga seleccionadas (con palomita) las líneas de láser de interés y que se observe en la platina el color de la luz láser correspondiente cuando esté en modo escaneo “**Fast XY**”, “**Cont**”, “**XYscan**”, “**XYcont**”, “**Single**” o “**Start**”.
- Asegúrese que el valor de apertura del Pinhole sea al menos “1”.
- Asegúrese de que el botón indicador de ganancia “**Detector Gain**” del panel “**Channel Settings**” de la ventana “**Scan Control**” esté posicionado como mínimo a la mitad de la barra.

**2) Veo mi muestra con el objetivo de 20X al microscopio, pero no veo nada en el monitor. Posibles soluciones:**

- Incremente los valores de ganancia y offset en el panel “**Channel Settings**” de la ventana “**Scan Control**”.
- Con un escaneo “**Fast XY**” y el “**Range Indicator**” de la “**Color Palette**” activados, cambie el plano focal girando lentamente el tornillo micrométrico mientras observa el monitor. Deberá notar cambios en la intensidad de la imagen desplegada de una manera más sensible.
- Cambie al objetivo de 40X o 100X, recuerde que requiere inmersión en aceite para estos dos objetivos.

**3) La imagen adquirida se ve muy “pixelada”. Posibles soluciones:**

- Asegúrese de estar adquiriendo con los modos “**Cont**”, “**XYcont**”, “**Single**” o “**Start**”, no con “**Fast XY**”
- Aumente la resolución espacial de la imagen en la pestaña “**Mode**” de la ventana “**Scan Control**”; en el panel “**Objective Lens & Image Size**” escoja un valor de “**Frame Size:**” mayor al que escogió previamente.
- Aumente el número de escaneos en la opción “**Number**” del panel “**Pixel Depth, Scan Direction & Scan Average**” de la pestaña “**Mode**” de la ventana “**Scan Control**”, seleccione un valor mayor al que escogió previamente.

**4) Muy baja señal aun con los valores de ganancia de detección y de amplificación altos**

**Posible solución:**

- Aumentar el tamaño del pinhole, aunque con ello la imagen se formará por más planos ópticos, incluyendo más luz fuera de foco.

## ANEXO: TABLA DE CONFIGURACIONES

	Láser	Excitación (nm)	HFT	NFT	Ch1	Ch2
<b>Un solo fotomultiplicador</b>						
FITC (CY2, AlexaFluor 488)	Argón	488	488	None	LP505	
Enhaced GFP (EGFP)	Argón	488	488	None	LP505	
Enhaced Cyan FP (ECFP)	Argón	458	458	None	LP475	
Enhanced Yellow FP (EYFP)	Argón	514	514	None	LP 530	
Lucifer Yellow	Argón	458	458	None	LP 475	
TRITC (Cy3, Rhodamine, AlexaFluor 555, Texas Red)	He-Neón Verde	543	543	None	LP560	
PI AlexaFluor 594, DS Red	He-Neón Verde	543	543	None	LP560	
Cy5, AlexaFluor 647, TOTO-3	He-Neón Rojo	633	488 / 543 / 633	None	LP650	
<b>Dos fotomultiplicadores</b>						
FITC / Cy3	Argón+He-Ne Verde	488 / 543	488 / 543 / 633	545	LP560	BP 505-530
FITC / Cy5	Argón+He-Ne Rojo	488 / 633	488 / 543 / 633	545	LP650	BP 505-530
CY3 / Cy5	He-Ne Verde + Rojo	543 / 633	488 / 543 / 633	635	LP650	BP 560-615
Enhaced GFP (EGFP)	Argón	488	488	plate	LP505	
Enhaced Cyan FP (ECFP)	Argón	458	458	plate	LP475	
Enhanced Yellow FP (EYFP)	Argón	514	514	plate	LP 530	
Lucifer Yellow	Argón	458	458	plate	LP 475	
DS Red	He-Neón Verde	543	543	plate	LP560	

## EJEMPLOS DE CONFIGURACIONES

