

# **GUÍA PARA LA CAPTURA DE IMAGEN EN XY Y XYZ EN EL MICROSCOPIO CONFOCAL NIKON A1R<sup>+</sup>**

**Miguel Tapia R.  
Unidad de Microscopía  
Instituto de Investigaciones Biomédicas  
Universidad Nacional Autónoma de México**

**Fecha de elaboración: Octubre de 2017**

Esta guía describe la operación básica de la estación de trabajo del microscopio confocal Nikon A1R<sup>+</sup> para realizar la captura de imagen digital en los ejes X, Y y Z de estructuras biológicas previamente teñidas con tinciones fluorescentes.

Este manual pretende iniciar al usuario en los principios básicos de operación del microscopio confocal Nikon A1R<sup>+</sup>; sin embargo, es altamente recomendable que el usuario posea conocimientos básicos relacionados con dicha metodología. De cualquier manera, 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) (55) 5622-9185

mtapia@biomedicas.unam.mx

Nikon, Eclipse, TiE, NIS Elements son marcas registradas de Nikon Instruments Inc.

AlexaFluor© es marca registrada de Thermo Fisher Scientific Inc.

Microsoft, Windows, el logo de Windows 7 y los elementos GUI del sistema operativo Windows 7 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.**

Historia de Revisiones:

Revisión 1: Noviembre de 2017

## Índice

	Descripción	4
I.	Encendido del equipo	6
II.	El Estativo	12
III.	Inicio de sesión en NIS Elements C	14
IV.	Módulo A1plus Compact GUI	18
V.	Módulo Ti Pad	26
VI.	Colocación de la Muestra en el Microscopio	29
VII.	Captura de Imagen Multicanal en XY	32
	Ventana Live   Frozen   Captured I	35
	Ventana Live   Frozen   Captured II	50
VIII.	Módulo A1plus Scan Area	55
IX.	Módulo ND Acquisition	58
X.	Captura de Imagen Multicanal en XYZ (Z-Stacks)	61
XI.	Opciones de Visualización de Imágenes XYZ	72
XII.	Reutilización de Ajustes de Captura de Imagen	81
XIII.	Apagado del Equipo	88

## **DESCRIPCIÓN**

### **SOFTWARE**

El software NIS Elements C controla, -una vez encendidos los instrumentos-, la visualización de fluorescencia de campo amplio y campo claro en los oculares, el cabezal de escaneo, la unidad de láser, el selector acústico-óptico entonable (AOTF), obturadores internos e interruptores de seguridad de láser (shutters e interlocks), los detectores ópticos y el ajuste de video del framegrabber. De igual manera, NIS Elements C puede controlar el revólver de objetivos, las cajas de control de la platina motorizada (movimiento en X, Y y Z), el carrusel de filtros de fluorescencia, y el sistema de foco perfecto (Perfect Focus System).

El software se puede operar empleando el mouse y el teclado de la computadora y esencialmente se utiliza de la misma manera en la que opera cualquier programa compatible con el ambiente Windows.

### **MICROSCOPIO**

El microscopio Nikon Eclipse TiE posee adaptadores para el montaje de diversas preparaciones biológicas; en resumen el usuario puede visualizar especímenes montados en laminillas, cajas de cultivo de 6 hasta 96 pozos, botellas de cultivo, y cajas Petri de distintos diámetros. Sin embargo, hay que considerar que para la observación a más de 200 aumentos ópticos la preparación forzosamente debe ser observada a través de vidrio con un grosor equivalente a 0.17 mm. Para la visualización de especímenes utiliza diversas fuentes de iluminación; para fluorescencia de campo amplio utiliza una lámpara de mercurio C-LHGFI HG; para campo claro una lámpara de halógeno de 12V/100W y contraste diferencial interferencial (Nomarski); para microscopía confocal y TIRF puede utilizar laser con longitudes de onda de 405, 488, 561 y 647 nm. El microscopio tiene motorizados los ejes XYZ, los cuales se controlan mediante el uso de un joystick; de igual manera, tiene motorizado el cambio de objetivos, así como el de filtros de fluorescencia. Como accesorios, cuenta con un sistema de mantenimiento de plano focal seleccionado (PFS, Perfect Focus System), una incubadora de platina con control de gases y temperatura, un iluminador TIRF motorizado, además de un piezo que permite el movimiento en Z con hasta 100 nm de precisión. Además de lo anterior, el microscopio está equipado para realizar microscopía de super resolución mediante N-STORM (microscopía de reconstrucción óptica estocástica).

#### **Cubos de Fluorescencia:**

##### **1) Filtro C-FL DAPI**

Pase de banda de excitación: 325-75 nm

Espejo Dicroico: 400 nm

Emisión: 435-85 nm, BP

##### **2) Filtro C-FL GFP**

Pase de banda de excitación: 450-490 nm

Espejo Dicroico: 495 nm



Emisión: 500-50 nm, BP

3) Filtro **C-FL DS Red**

Pase de banda de excitación: 530-60 nm

Espejo Dicroico: 570 nm

Emisión: 590-630 nm, BP

4) Filtro **CN STORM Quad Band Set 405/488/561/647**

## I. ENCENDIDO DEL EQUIPO



**Panorámica del sistema**

1. Para comenzar, encender los interruptores principales que se localizan del lado izquierdo del cubículo, cercanos a la puerta de acceso.



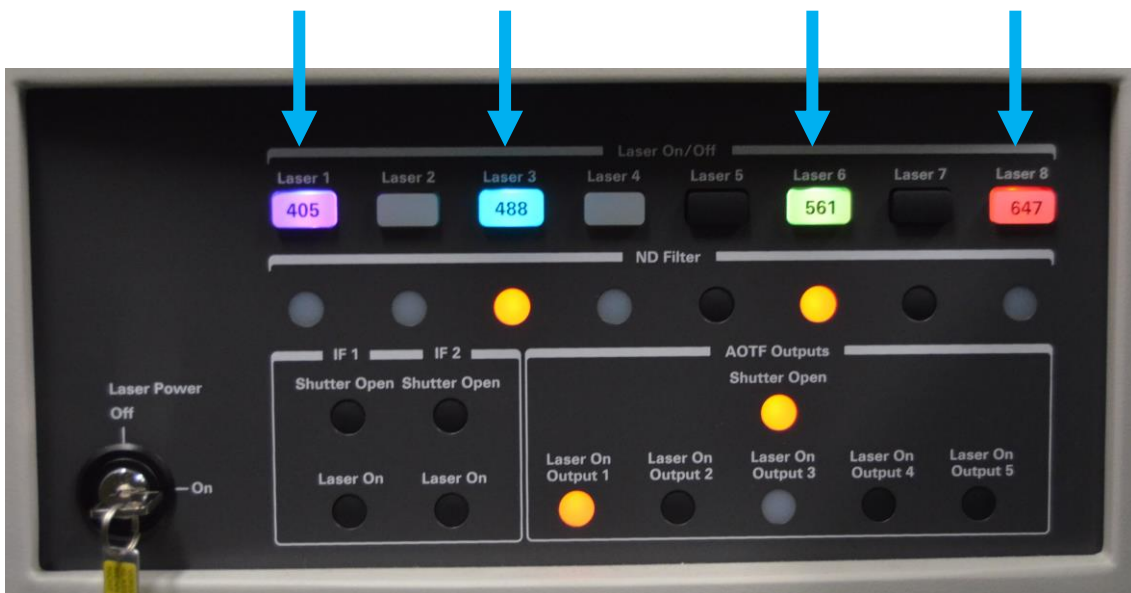
Encendido

Al subir los interruptores, el ventilador de la unidad de laser comenzará a funcionar automáticamente.

2. Encender la unidad de láser LU-NV girando su llave en sentido de las manecillas del reloj hacia posición horizontal

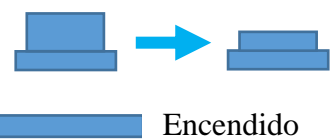


Para continuar, esperar a que se enciendan completamente los indicadores de “405”, “488”, “561” y “647”.

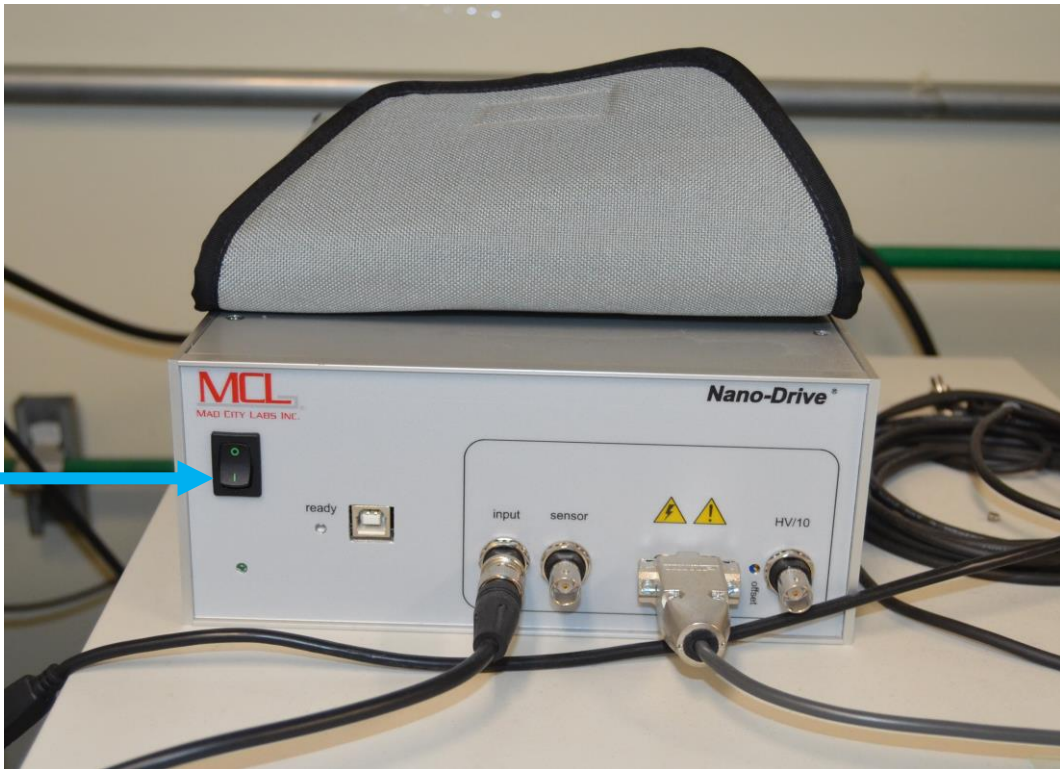




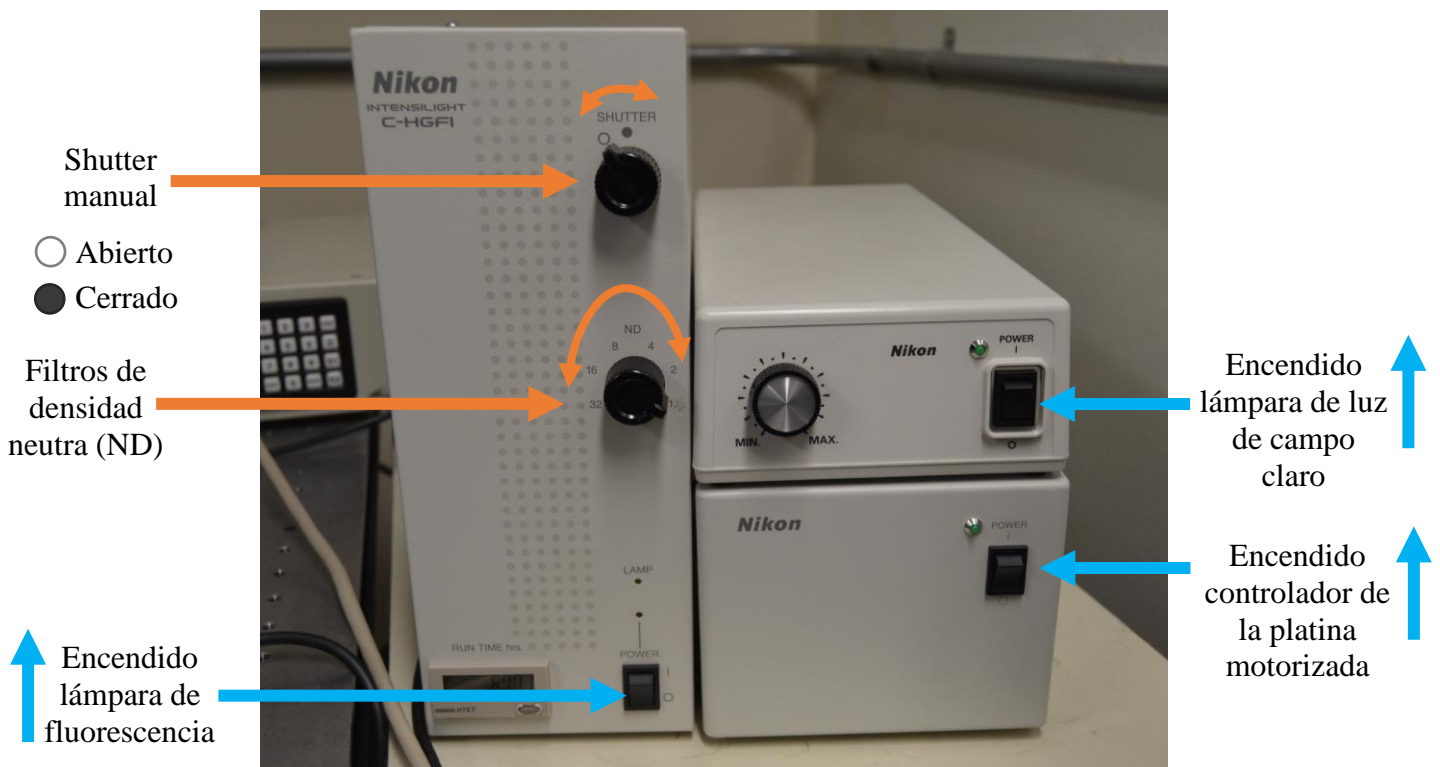
3. Encender la unidad de control del cabezal del confocal y los láseres. Dicha unidad consta de tres módulos apilados uno sobre otro y está situada al lado izquierdo de la unidad LU-NV. El botón de encendido de esta unidad se encuentra en el lado izquierdo superior del módulo inferior, que está etiquetado con la leyenda “Nikon AIR”.



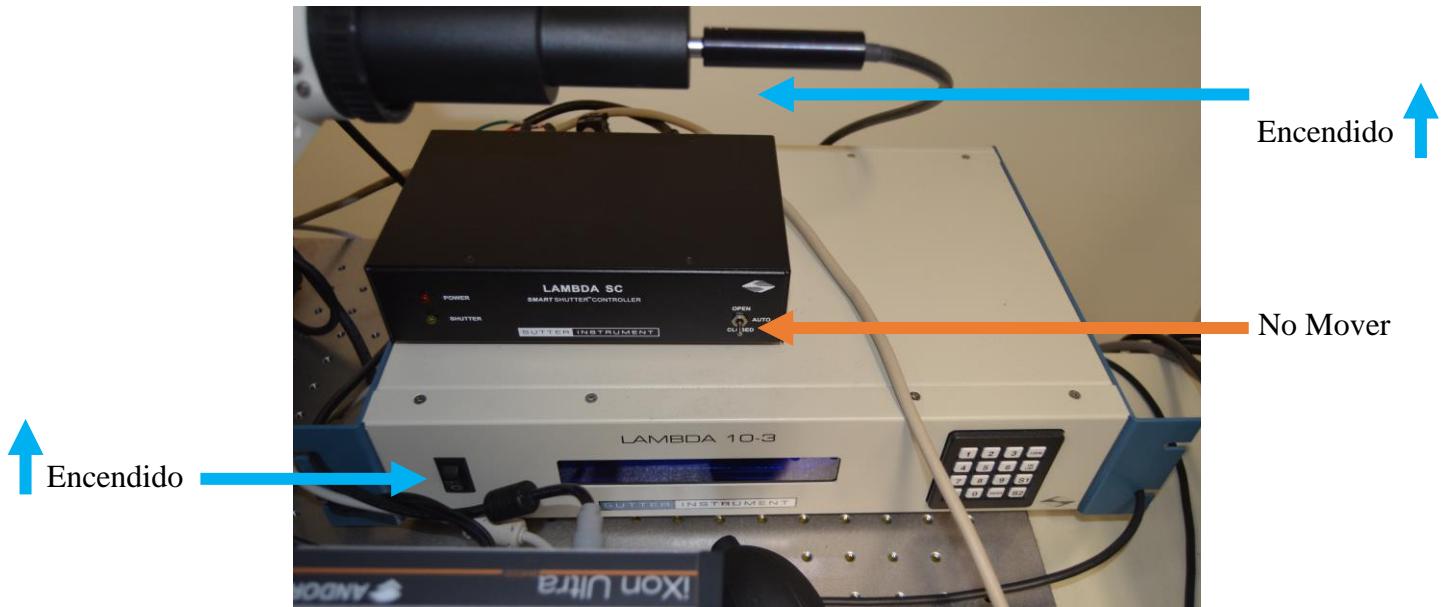
4. Encender el controlador electrónico del piezo, situado encima de la unidad de laser LU-NV.



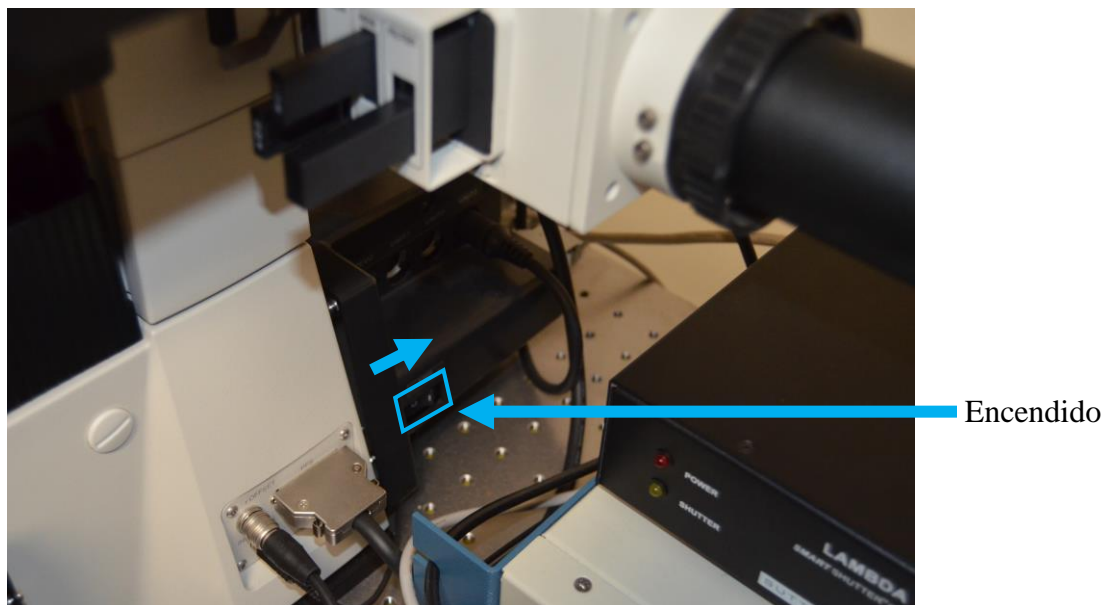
5. Encender los controladores de luz de campo claro y de la platina motorizada así como la fuente de poder de la lámpara de fluorescencia, que se encuentran situados a la extrema derecha del microscopio.



6. Encender los controladores de los obturadores, que se encuentran localizados en la parte trasera de la mesa, entre el microscopio y la fuente de poder de la lámpara de fluorescencia.

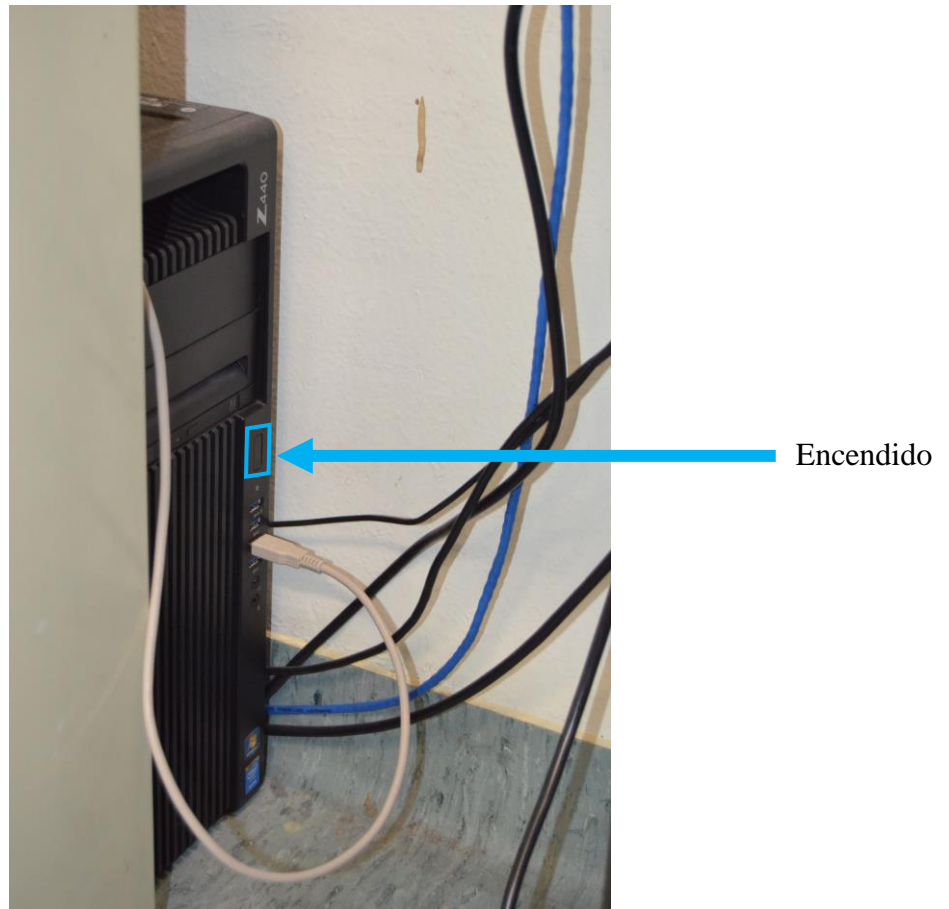


7. Encender el estativo del microscopio mediante el botón localizado en la parte trasera inferior derecha del mismo.

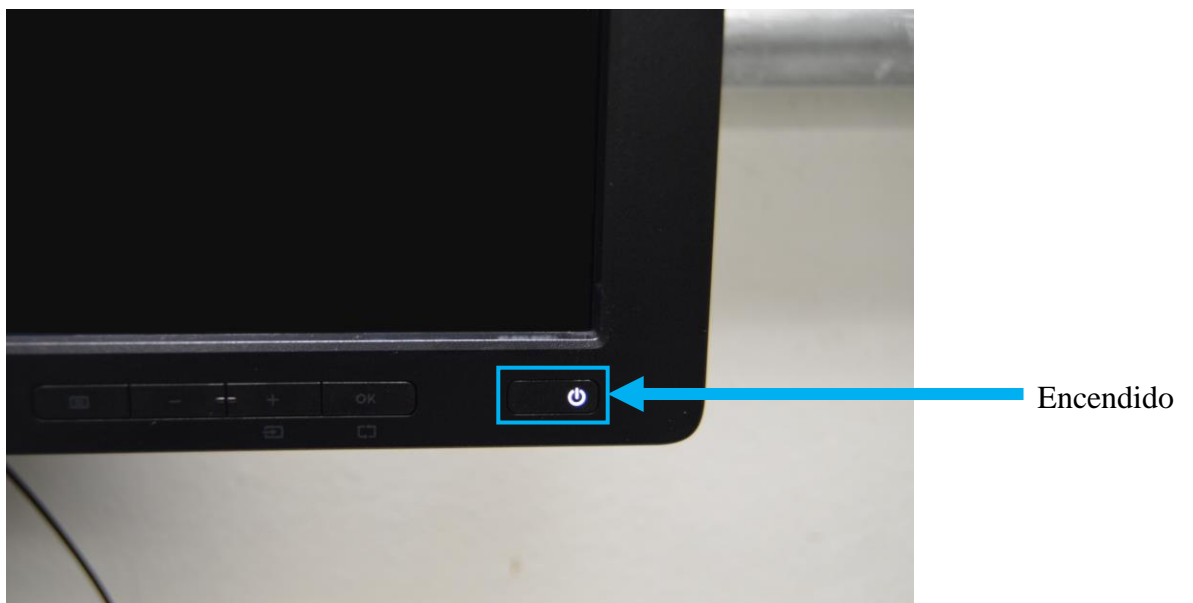




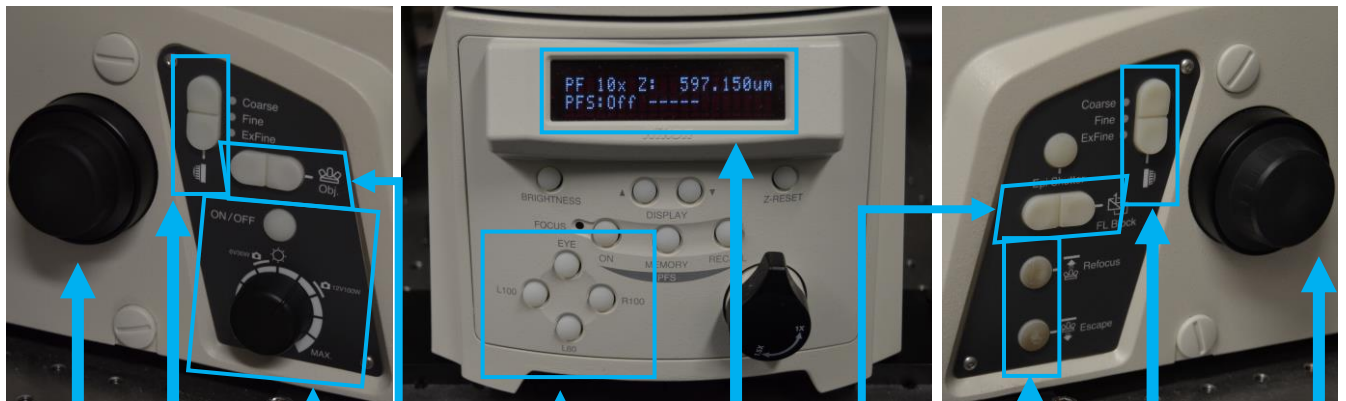
- Finalmente, encender el CPU que está localizado abajo en la extrema derecha, junto a la pared.



El monitor siempre se encuentra en modo suspendido, debe activarse automáticamente al encender el CPU. Si esto no sucede, encenderlo mediante el botón situado en la parte frontal inferior derecha.



## II. EL ESTATIVO



**Movimiento en Z**  
 Velocidad de movimiento en Z (Coarse: rápido, Fine: lento, ExFine: muy lento)

**Cambio de objetivos**  
 (botón izq. hacia mayor aumento, botón der. hacia menor aumento)

**Display**  
 Dirección de la luz:  
 Eye: oculares  
 L100: confocal  
 R100: TIRF/STORM  
 L80: cancelado

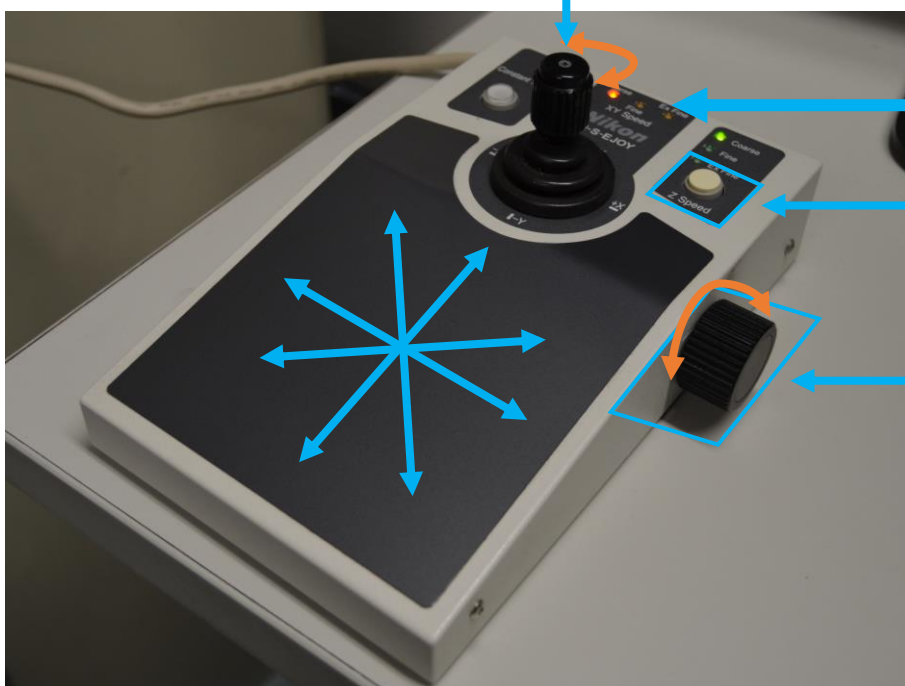
**Cambio de cubos de fluorescencia**  
 (botón izq. hacia rojo, botón der. hacia azul)

**Escape/Refocus**  
 Escape aleja al objetivo del cubreobjetos, Refocus regresa el Z a la posición previa a Escape.

**Movimiento en Z**  
 Velocidad de movimiento en Z (Coarse: rápido, Fine: lento, ExFine: muy lento)

Control de la luz de campo claro:  
 ON/OFF: enciende/apaga la luz transmitida SI "Eye Port" y "EPI" están activos (software). El dimmer modula la intensidad de la luz

El movimiento de la platina está motorizado en los ejes XYZ; para realizarlo se requiere del uso del joystick:



**Movimiento en XY**  
 Velocidad de movimiento en XY (Coarse: rápido, Fine: lento, ExFine: muy lento) (girar parte dentada para cambiar)

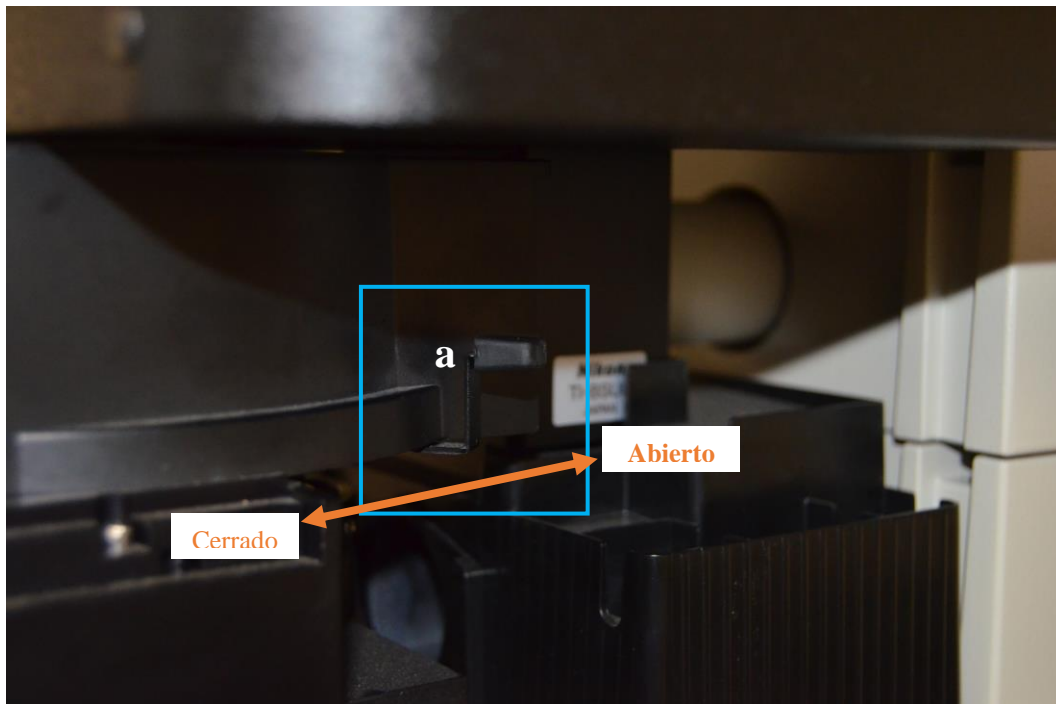
**Movimiento en Z**  
 Velocidad de movimiento en Z (Coarse: rápido, Fine: lento, ExFine: muy lento) (presionar botón blanco para cambiar)

Nota: Los cambios de objetivo, cubos de fluorescencia y Z serán mostrados en el display.

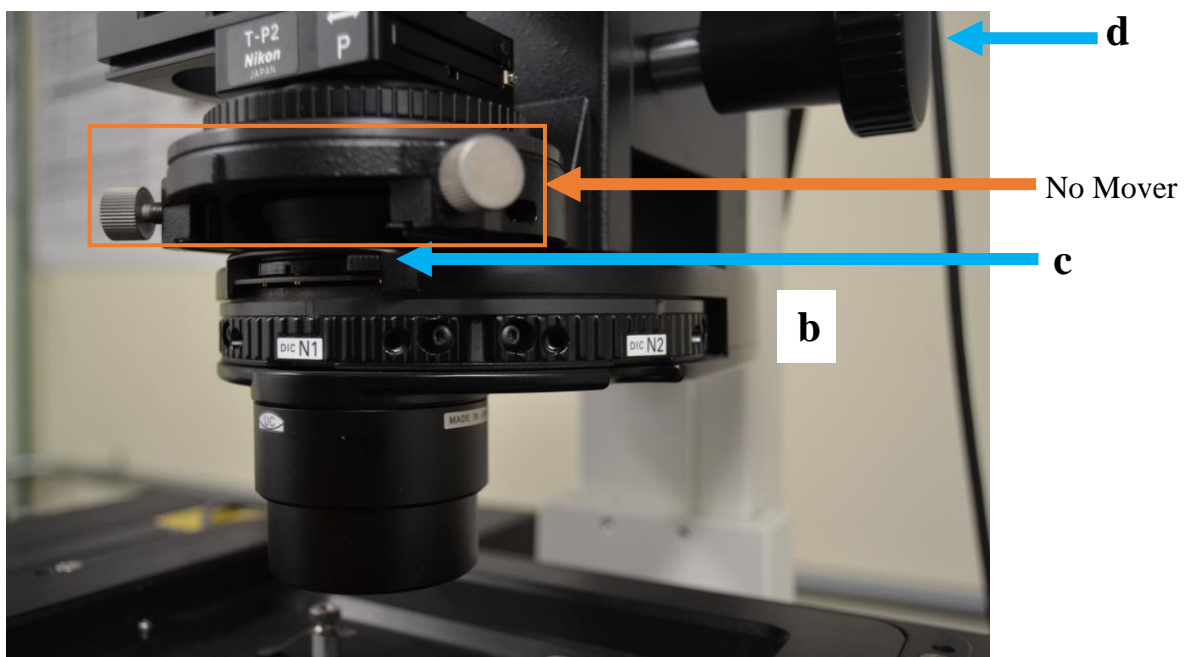


El microscopio Nikon TiE tiene algunas partes cuyo movimiento es manual, las cuales se enlistan a continuación:

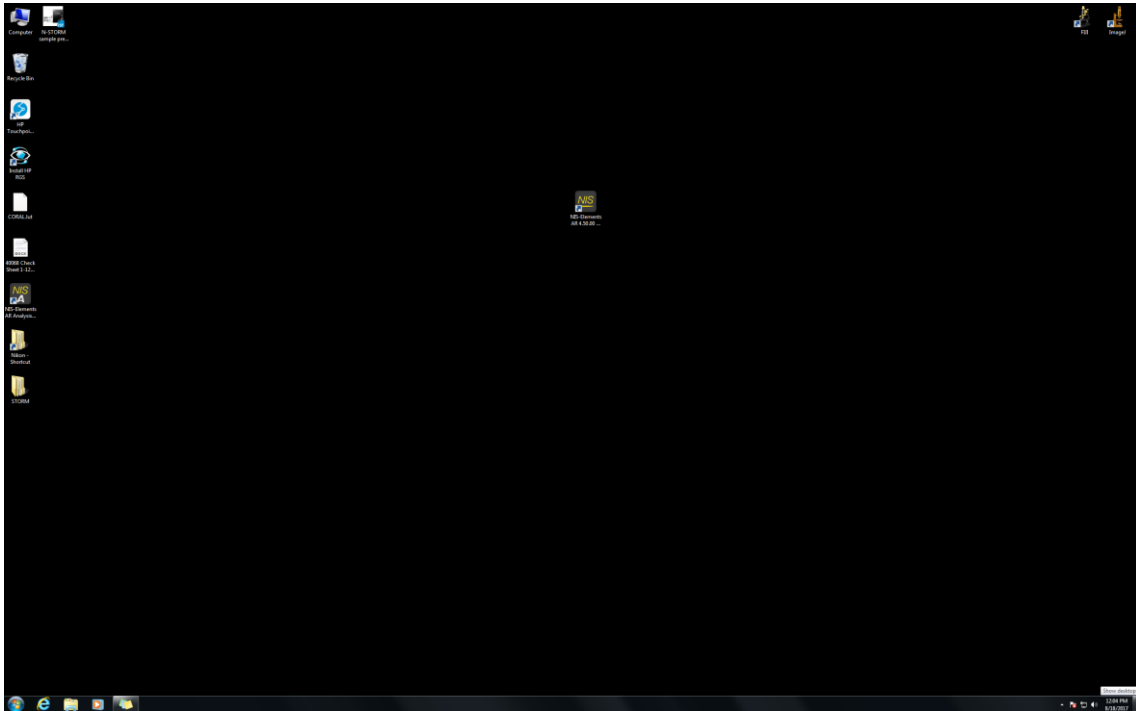
- a. Shutter manual para fluorescencia de campo amplio. Situado debajo de la platina.



- b. Filtros (“cassettes”) para contraste diferencial interferencial (DIC). Si se utilizará el detector de luz transmitida en la captura de imágenes, para objetivos 10x y 20x debe estar DICN1 al frente, para el resto, DICN2.
- c. Diafragma del condensador.
- d. Perilla de enfoque del condensador.

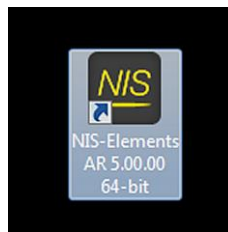


### III. Inicio de sesión en NIS Elements C

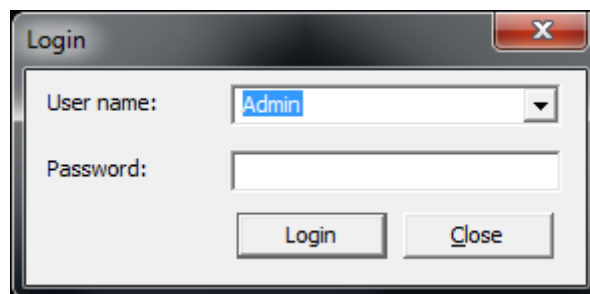


Vista del monitor

9. Una vez que todos los módulos del confocal estén encendidos y el escritorio de Windows esté desplegado en el monitor, abrir el programa NIS Elements, dando doble click en el icono que se encuentra localizado casi a mitad de la pantalla:



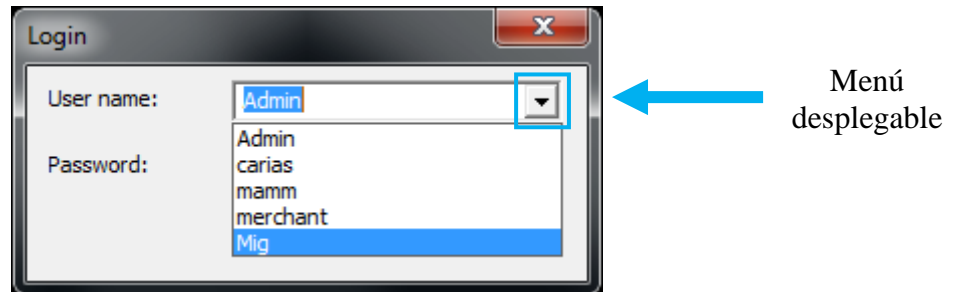
10. Aparecerá la ventana siguiente, mostrando al último usuario que haya iniciado sesión en NIS Elements:



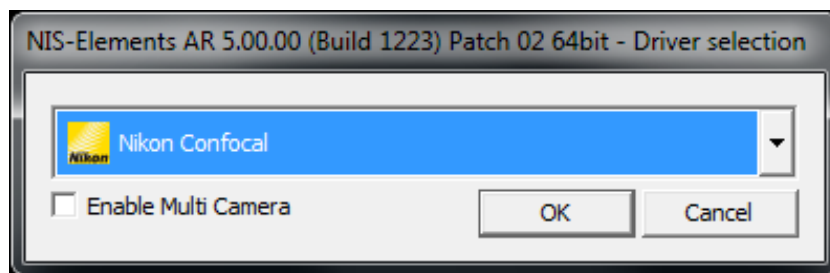
Nis Elements permite la creación de usuarios ilimitados para permitir una personalización de los distintos menús y elementos de trabajo y que estos no afecten las configuraciones

de otros usuarios del equipo. Las sesiones, nombres de usuario y las contraseñas serán generadas por el Responsable de la Unidad.

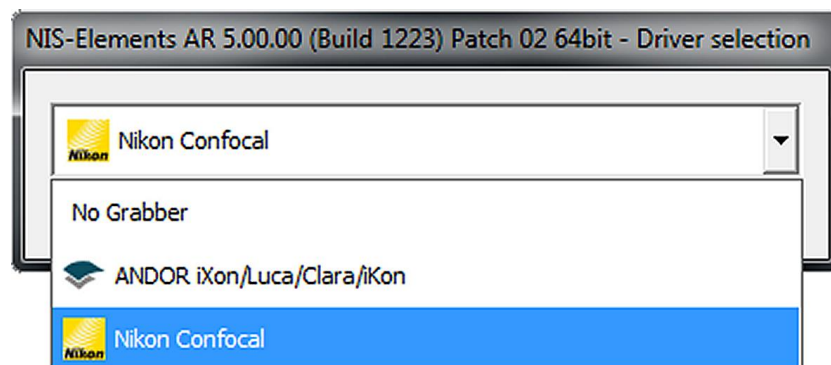
11. En el menú desplegable del lado derecho, seleccionar nombre de usuario e introducir la contraseña respectiva para iniciar sesión.



12. A continuación se mostrará la siguiente ventana:

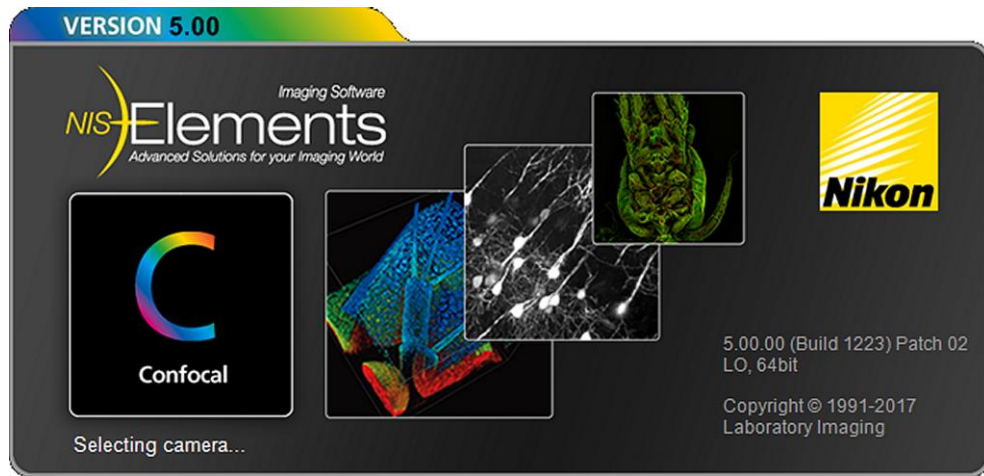


El confocal Nikon AIR<sup>+</sup> tiene tres posible modos de captura (TIRF, súper-resolución y confocal) y trata al cabezal de escaneo del confocal como una “cámara” seleccionable dentro de las opciones siguientes:

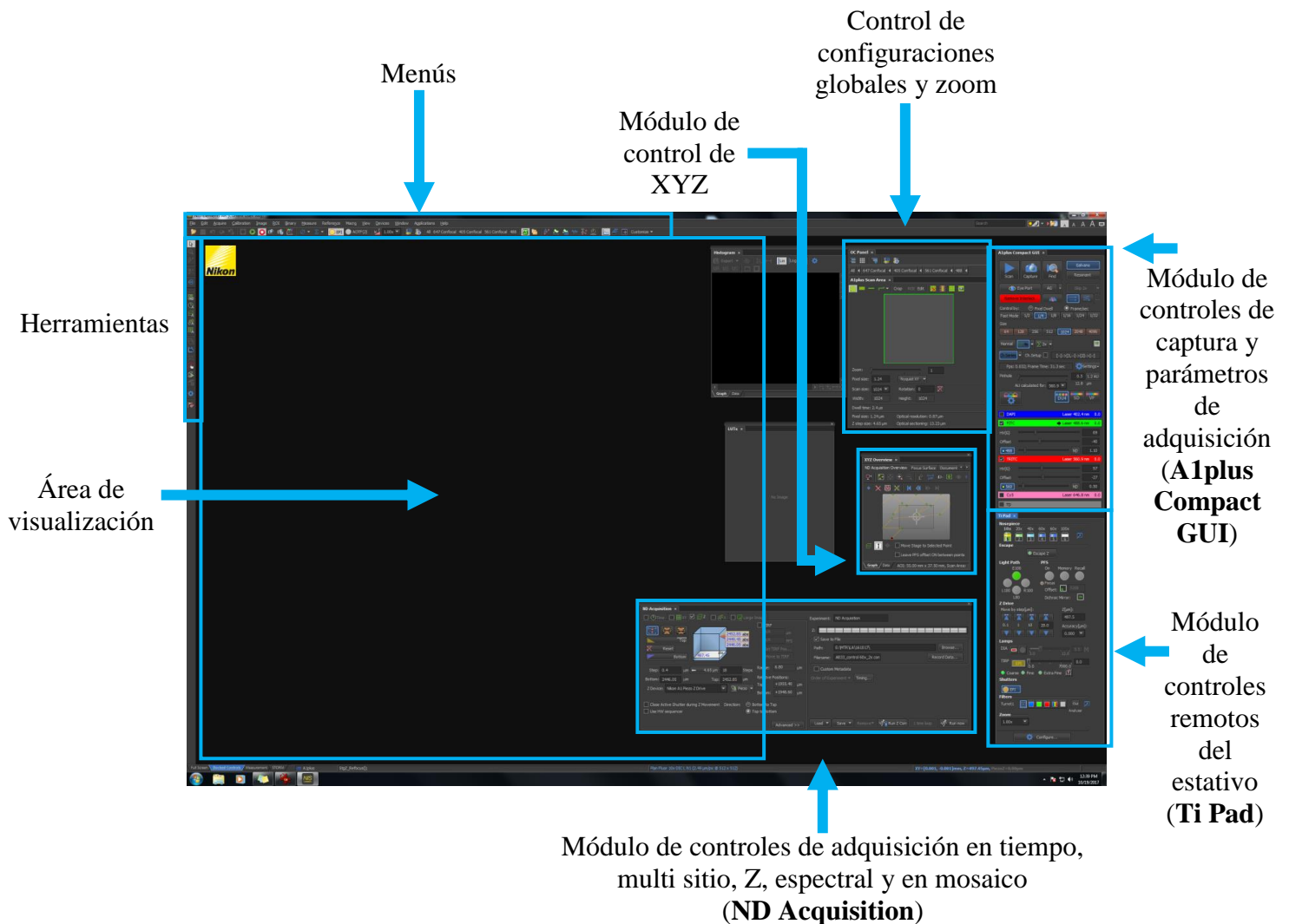


Una vez seleccionado “Nikon Confocal” (sobre fondo azul claro), dar click en “OK”.

Se mostrará la siguiente ventana mientras el software carga todos los controladores y establece todas las comunicaciones con los distintos módulos:



Una vez que esto se haya concluido, se mostrará la interface gráfica de usuario (GUI) del software:

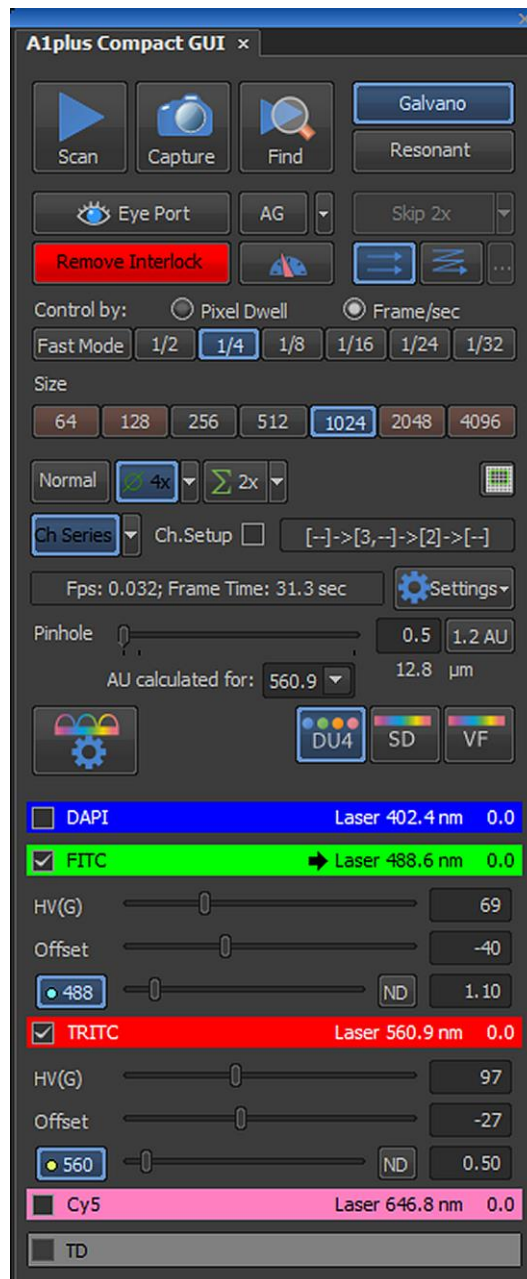


Es posible cambiar tanto el color de fondo como el tamaño de los módulos de la GUI dando click en los iconos correspondientes situados en la esquina superior derecha:



#### IV. Módulo A1plus Compact GUI

Este es el principal módulo que nos permitirá realizar los ajustes necesarios para realizar la captura de imagen en XY y XYZ.



A continuación se describirán brevemente los botones que son relevantes para la mayoría de las capturas en confocal.

## Botones de visualización, búsqueda y captura



**Scan:** Realiza un escaneo continuo con láser de acuerdo a los parámetros establecidos.

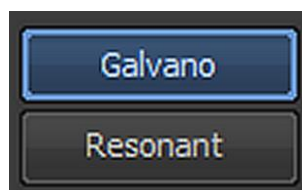
**Capture:** Realiza una sola toma con láser de acuerdo a los parámetros establecidos.

**Find:** Realiza un escaneo continuo con láser a velocidad alta, permitiendo la búsqueda de región y enfoque más rápidamente. Nota: Este botón reduce a un 30% la región de escaneo.

**Eye Port:** Controla el movimiento del espejo interno del estativo que permite el paso de luz hacia los oculares o hacia otra vía óptica.

**AG:** Ganancia automática. Este botón calcula y ajusta los valores de ganancia y umbral de acuerdo con las características de la muestra.

## Tipo de escáner



**Galvano:** Escáner galvanométrico estándar, de alta resolución espacial (hasta 4096x4096 px, hasta 4 fps a 512x512).

**Resonant:** Escáner galvanométrico resonante de alta resolución temporal (hasta 512x512px, hasta 30 fps a 512 x 512).

## Velocidad y tamaño de escaneo



### Control by:

Generalmente se utiliza “**Frame/sec**” y se refiere al tiempo que le tomará al equipo generar un escaneo; valores hacia la derecha generarán una imagen más luminosa pero más lenta. Para la mayoría de las situaciones, se recomienda utilizar los valores “**1/4**” o “**1/8**” (para escáner “**Galvano**”). Cuando se utiliza el escáner “**Resonant**”, este apartado no se muestra en el módulo.

### Size

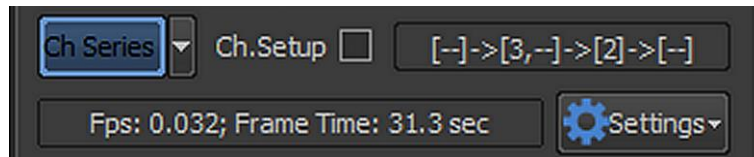
Se refiere al tamaño de la imagen; valores hacia la derecha generan una imagen más grande pero de creación más lenta. Para la mayoría de las situaciones, se recomienda seleccionar los valores “**512**” o “**1024**”. Cuando se utiliza el escáner resonante, este apartado no se muestra en el módulo.

### Tipo de escaneo

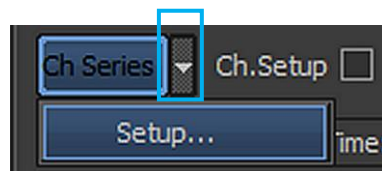
Se refiere a la generación de la imagen, si será una sola pasada, se promediará o se sumará. Para establecer las condiciones de captura, se recomienda trabajar en “**Normal**” y para la captura final, se recomienda promediar para escáner “**Galvano**”, **4x** u “**8x**” y para “**Resonant**”, “**16x**”.



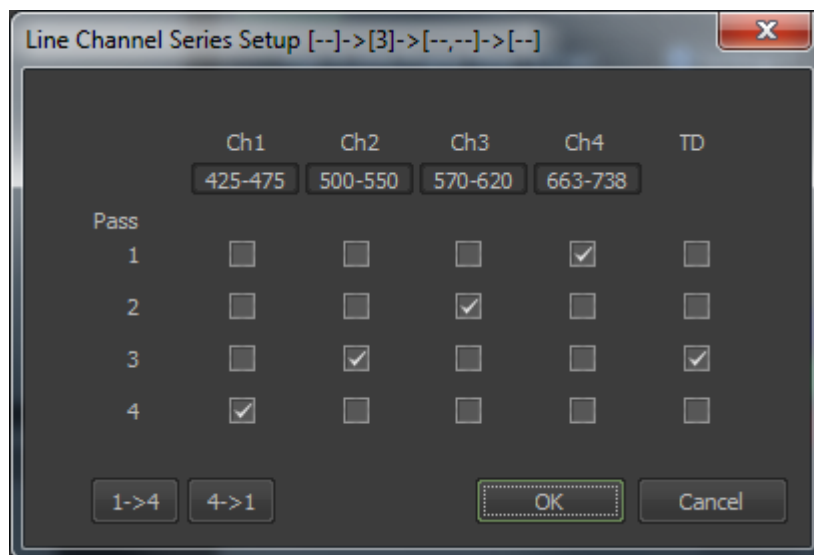
## Orden de captura



**Ch Series:** Al estar activo, el equipo realizará un barrido secuencial si hay dos o más láseres encendidos y activados; si está inactivo, el equipo realizará un barrido con excitación simultánea de los láseres. De igual manera, este módulo permite cambiar el orden de excitación de los láseres así como la activación de la luz transmitida. Para esto, dar click en la pestaña adyacente a “**Ch Series**”, y enseguida aparecerá un menú “**Setup...**”:



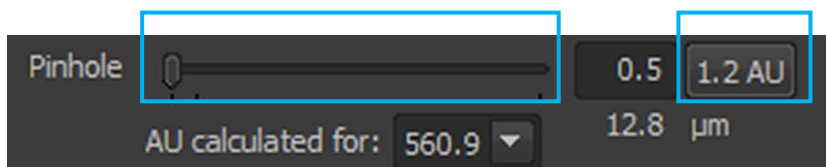
Al dar click en “**Setup...**” aparecerá el siguiente menú (“**Line Channel Series Setup**”):



“**Pass**” se refiere al orden de captura de manera ordinal; seleccionando los distintos filtros se puede generar un orden acorde con las condiciones de la muestra. De igual manera, se puede seleccionar con que canal se desea activar el detector de luz transmitida (**TD**). Si es posible, se recomienda parrear el TD con los canales 2 o 3 (**Ch2** o **Ch3**) que corresponden a la excitación con 488 o 561, respectivamente. Para guardar el orden de captura, dar click en “**OK**”.

Finalmente, debajo de “Ch Series” aparece un tiempo estimado de barrido de acuerdo a todos los parámetros previamente seleccionados.

### Tamaño del pinhole



Mediante esta sección se puede cambiar el tamaño del pinhole del confocal a) moviendo el slider situado al lado derecho de “Pinhole”, b) asignándole directamente un valor numérico en el espacio correspondiente y dando “Enter” o c) seleccionando la apertura basal dando click en “1.x AU”. Las unidades de Airy (AU) son calculadas de manera automática de acuerdo con la(s) longitud(es) de onda de excitación y el objetivo utilizado; valores hacia la derecha generarán una imagen compuesta de un mayor número de planos ópticos (cortes ópticos “más gruesos”).

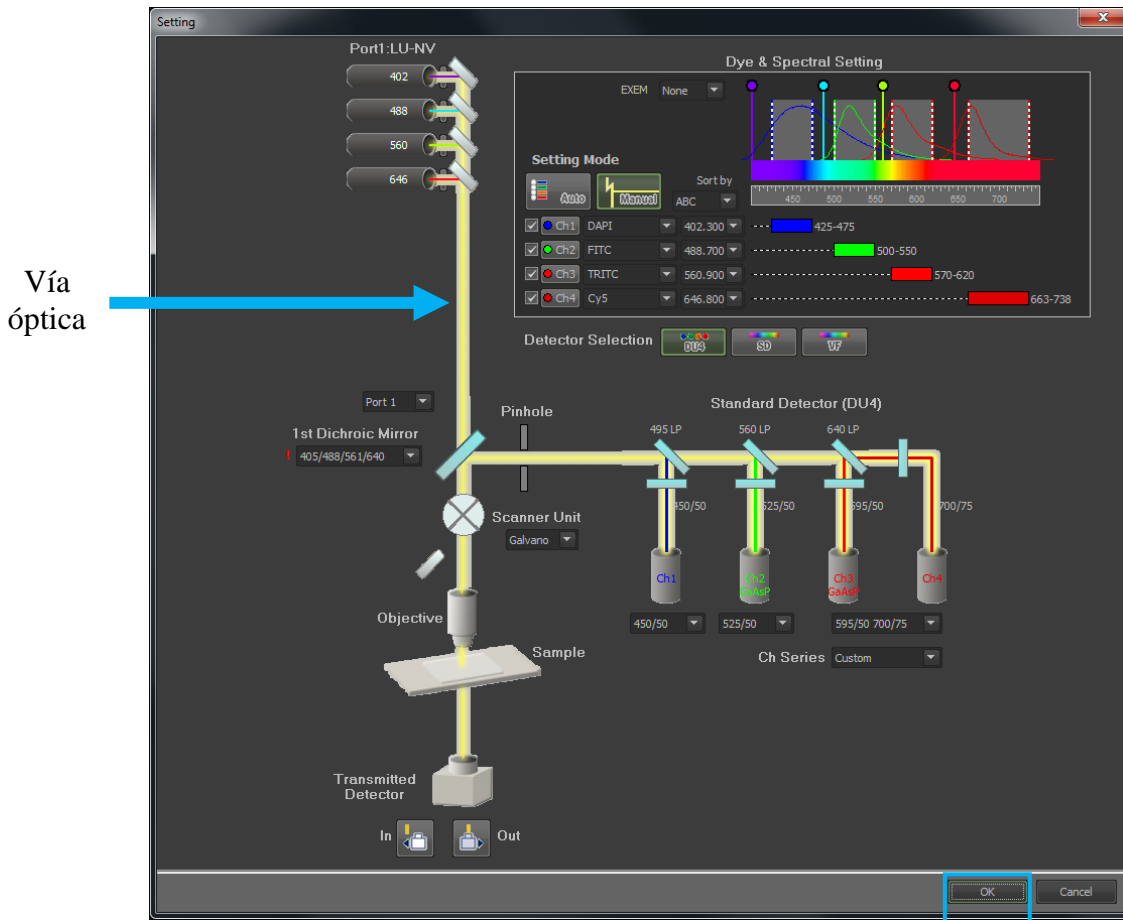
### Detector y configuración de la vía óptica

El equipo tiene tres tipos de detectores de luz: detector estándar basado en filtros (DU4), detector espectral (SD) y detector de filtros virtuales basados en el detector espectral (VF). Para los fines de la presente guía, solo se describirá la captura con el detector DU4. El detector que se encuentre seleccionado, estará resaltado en color verde.

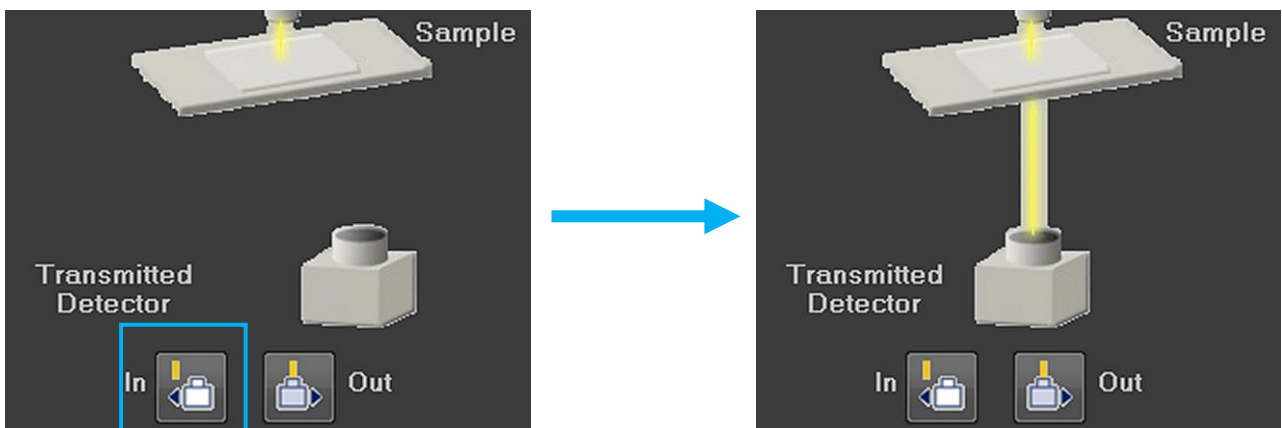


Con la configuración actual del detector estándar no es necesario ingresar a realizar ningún ajuste. Sin embargo, si se desea utilizar el detector de luz transmitida y por alguna razón no se encuentra disponible desde “Line Channel Series Setup” entonces se podrá activar dicho detector desde el menú “Ajustes”.

Para esto, seleccionar “DU4”. Dar click en “Ajustes” y aparecerá el siguiente menú (“Setting”):



Cuando el detector de luz transmitida se encuentra inactivo, el icono correspondiente al mismo estará desfasado de la vía óptica; para activarlo dar click en el icono “In”. Esto activará al detector de luz transmitida. Posteriormente dar click en “OK” y revisar en “Line Channel Series Setup” que el detector se encuentre disponible y parado a alguna línea de láser.



click

## Canales

En esta sección se pueden modificar los niveles de excitación y de detección, y activar o desactivar por separado los distintos láseres y/o canales de captura.

Canal de detección de fluorescencia

Canal de detección de luz transmitida

Ganancia del detector

Potencia del láser

Nivel del umbral de negros

Filtro ND (32)

Ejemplo de la sección “Canales” con todos los láseres y detectores activos.

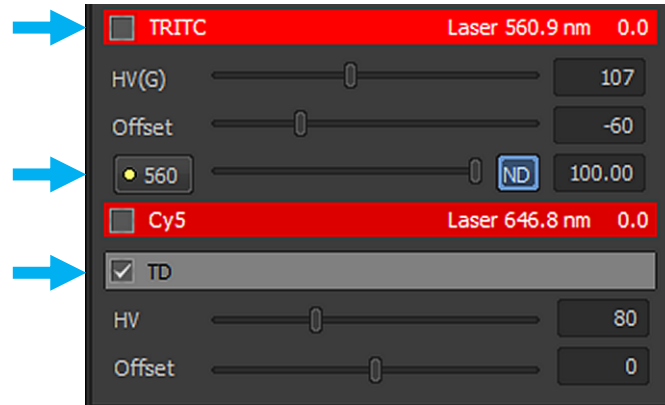
Para que un canal esté completamente activo, tiene que tener la palomita blanca al lado izquierdo del nombre del canal, el indicador de láser resaltado en azul y su potencia en dígitos blancos (ND puede estar activo o inactivo).

Canal activo (FITC)

Un canal inactivo es aquel que no tiene la palomita blanca del lado izquierdo del nombre del canal y oculta los controles de ganancia, offset y potencia de láser:

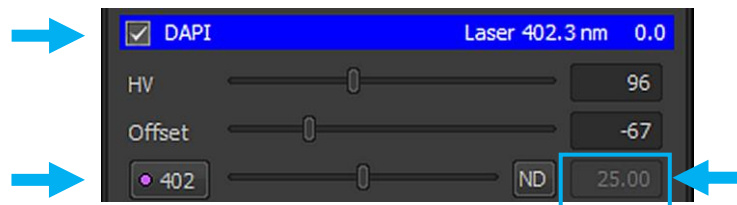
Canal inactivo (Cy5)

Un caso especial de canal inactivo es cuando el canal que se quiere inactivar tiene pareado al detector de luz transmitida (TD); si se intenta inactivar el canal pareado sin inactivar primero al canal TD pasará lo siguiente:



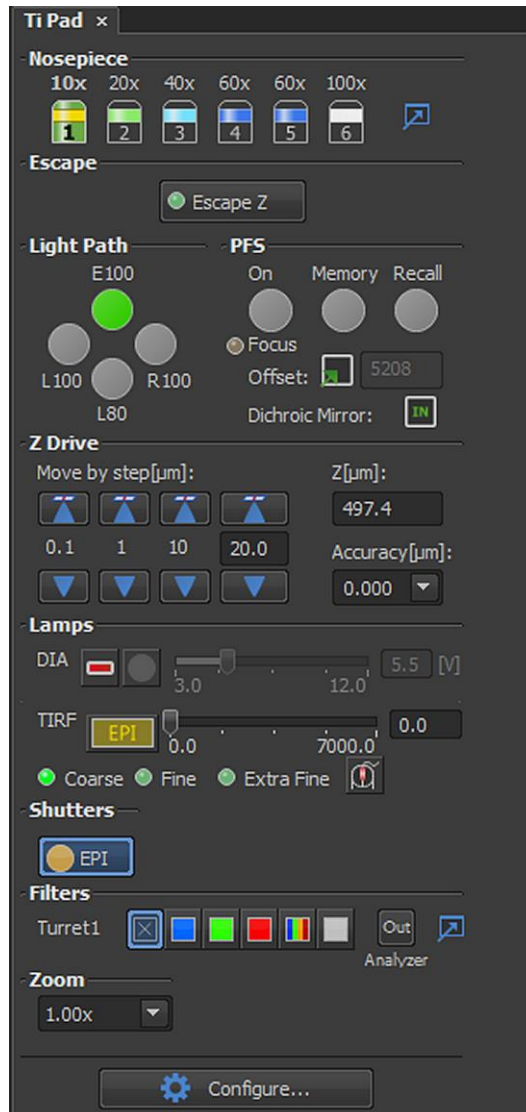
en este caso, el detector se ha inhabilitado pero debido a que se requiere el láser 561 para la generación de la luz transmitida, el canal sigue “activo”, con pestaña en la ventana “Live” aunque no muestre imagen de fluorescencia. Para evitar esto, se recomienda que si se requieren apagar los canales se inactiven de abajo para arriba (primero TD).

Otro caso posible es que el canal esté activo pero el láser de excitación de dicho canal esté inactivo; eso se nota porque aunque está presente la palomita blanca al lado izquierdo del nombre del canal, el indicador de láser no está resaltado en azul y su potencia está en dígitos grises:



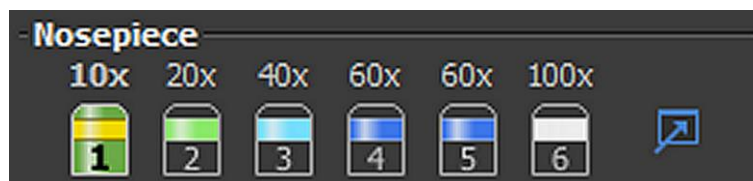
## V. Módulo Ti Pad

Este es el módulo dedicado al control remoto del estativo.



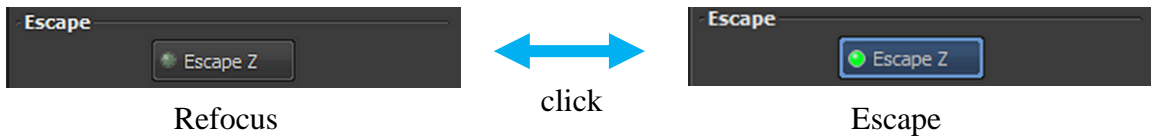
A continuación se describirán brevemente los botones que son relevantes para la mayoría de las capturas en confocal.

### Nosepiece



Esta sección controla al revólver de objetivos. Se puede cambiar de objetivo dando click sobre el ícono respectivo. Cuando un aumento está seleccionado, el ícono estará resaltado en color verde. Como recomendación para el uso de altas magnificaciones (>20x), antes de cambiar de objetivo presionar escape para que el revólver de objetivos baje a un nivel de seguridad (~ 500µm) y evitar que se lastimen dichos objetivos.

## Escape



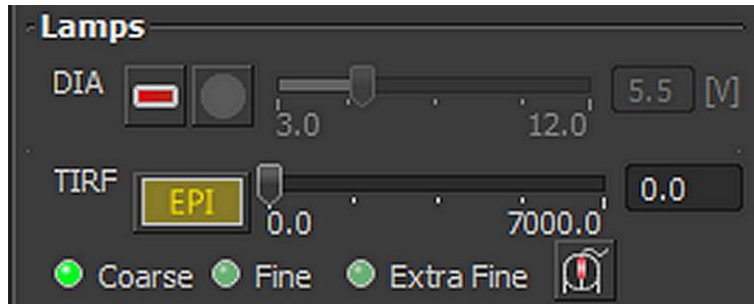
El botón “**Escape Z**” permite desplazar hacia o desde un nivel de seguridad (~ 500µm) al revolver de objetivos. Cuando este botón está resaltado en color azul, impide el movimiento en el eje Z mediante el micrométrico del estativo o desde el digipod. Así, es importante tenerlo presente cuando se active. Cuando se inactiva, el revolver de objetivos regresará a la posición Z presente al momento en que se activó, y el movimiento en Z será permitido otra vez.

## Light Path



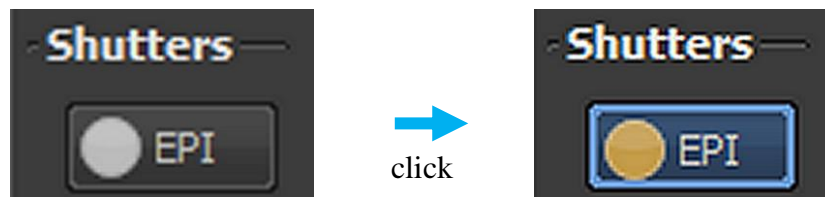
El módulo “Light Path” permite direccionar la luz en el interior del estativo hacia oculares (**E100**), confocal (**L100**) o TIRF/STORM (**R100**); el botón **L80** está inactivo. Para esto, dar click en el círculo correspondiente, el cual será resaltado en color verde. Para observar en el monitor la imagen generada por confocal cerciorarse que cuando se esté escaneando con láser esté seleccionado **L100**.

## Lamps



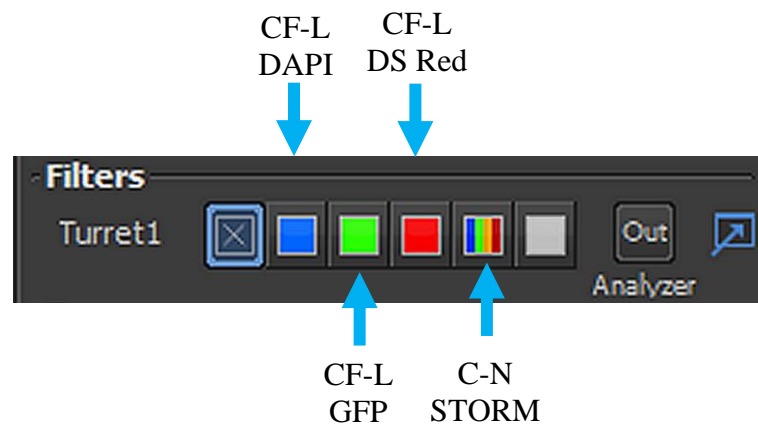
Este módulo se encarga de modificar la inclinación del iluminador TIRF; es relevante para confocal sólo en el caso de utilizar el detector de luz transmitida; en el cual la porción iluminada en amarillo debe ser “EPI”, como en la imagen anterior.

## Shutters



Este botón se encarga de abrir o cerrar el obturador del estativo para que pase la luz hacia el detector de luz transmitida, por lo tanto, debe estar activo para cuando se desee capturar esta imagen. Para esto, el botón debe estar resaltado en color azul y el círculo en amarillo.

## Filters

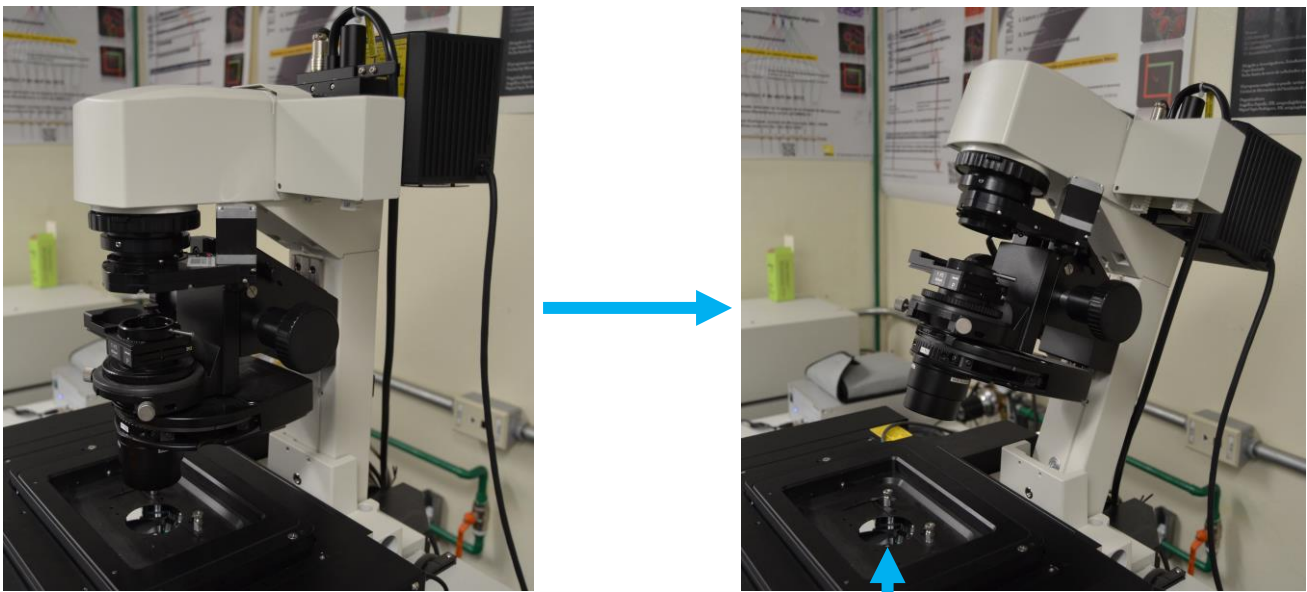


Esta sección permite el cambio de cubos de fluorescencia presentes en el estativo; dando click en el cubo deseado éste será resaltado en azul y será colocado en la vía óptica.



## VI. COLOCACIÓN DE LA MUESTRA EN EL MICROSCOPIO

- Retirar cuidadosamente el brazo móvil del soporte del condensador y la lámpara de halógeno del estativo (“iluminador”) desplazándolo hacia adelante, y colocar la muestra a capturar en el portamuestras de la platina, si es laminilla colocar el **cubreobjetos** hacia los objetivos (**hacia abajo**), si es algún otro soporte, solicitar el adaptador respectivo al Responsable de la Unidad. Una vez colocada, regresarlo a su posición vertical. Al inicio, el objetivo que tiene que estar al frente es 10x.

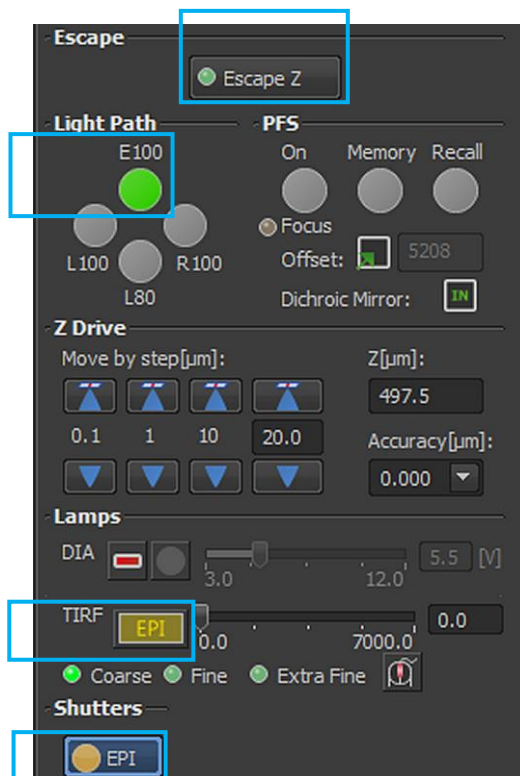


Portamuestras para laminilla

- Por defecto, la configuración del equipo no permite observar ni campo claro ni fluorescencia directamente en el estativo del microscopio si no se ha iniciado NIS Elements. Para poder observar fluorescencia de campo amplio en los oculares, en el módulo **A1plus Compact GUI** dar click en el botón de “**Eye Port**”, el cual se activará y abrirá el obturador interno del microscopio para permitir la observación del espécimen a través de los oculares. Al mismo tiempo, se inactivarán las funciones relacionadas con la captura de imagen de dicho módulo.



Además de lo anterior verificar en el módulo **Ti Pad** que en “**Escape**”, “**Escape Z**” esté desactivado, en “**Light Path**” esté seleccionado “**E100**”, en “**Lamps**” esté seleccionado en amarillo “**EPI**” y que en “**Shutters**” esté activado “**EPI**”. Si no se mostrara la configuración mencionada, realizar los ajustes correspondientes para obtenerla dando click en las secciones respectivas.



**Ajustes necesarios en NIS Elements para observar muestras fluorescentes con los oculares.**

- En el estativo, presionar el botón de cambio de cubos de fluorescencia hasta que aparezca en el display el requerido para la observación de la muestra.

```
PF 10x Z: 597.150um
PFS:Off -----
```

Sin filtro

```
PF 10x Z: 597.150um
PFS:Off DAPI
```

Espectros parecidos a DAPI

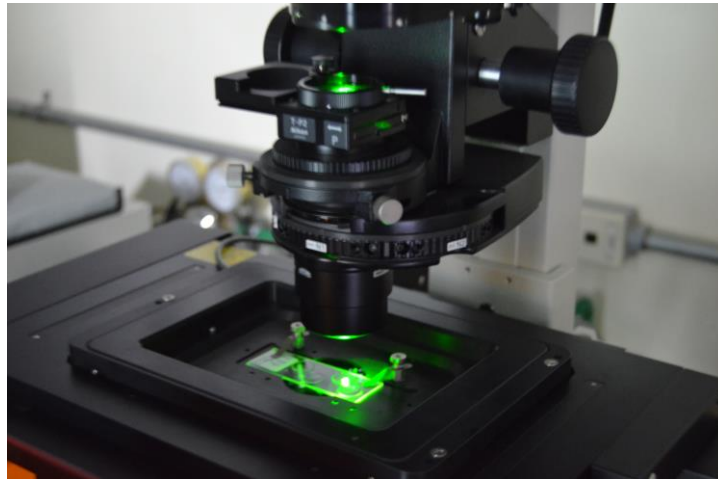
```
PF 10x Z: 597.150um
PFS:Off GFPHQ
```

Espectros parecidos a GFP

```
PF 10x Z: 597.150um
PFS:Off TxRh4
```

Espectros parecidos a Rojo Texas

- La luz de excitación seleccionada debe mostrarse en la platina. Si esto no ocurriera, verificar que el shutter manual de fluorescencia situado en el estativo esté abierto, que el shutter manual de la lámpara de fluorescencia esté hacia la posición abierta, que el filtro seleccionado en la fuente de poder de la lámpara de fluorescencia sea “ND1” y que la configuración en el software sea la correcta.

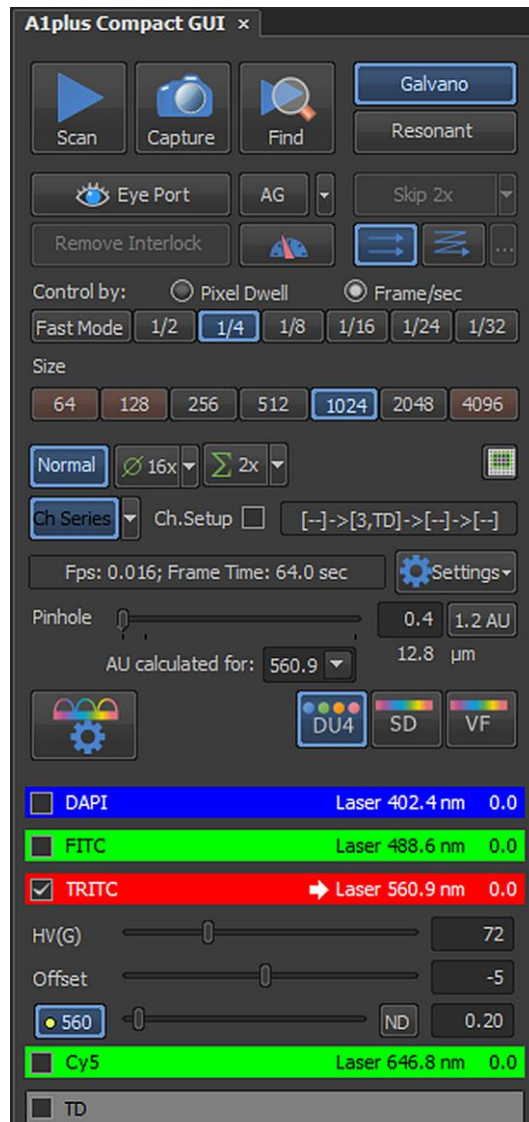


**Vista de la platina con fluorescencia de campo amplio**

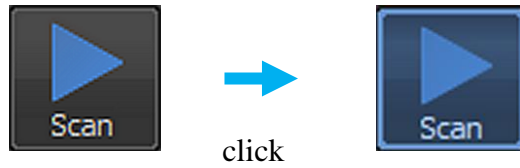
17. Mediante el joystick, encontrar la estructura, región de interés o célula que se quiera capturar y enfocarla. Por defecto, el revólver de objetivos se encuentra situado en una posición axial inferior ( $\sim 500 \mu\text{m}$ ), así que habrá que ascender en Z para enfocar (generalmente entre  $2500\text{-}3200 \mu\text{m}$  se encuentra el punto de enfoque a  $10\times$ ) girando la rueda (digipod) del joystick hacia valores axiales mayores (en  $\mu\text{m}$ ) en el display del estativo. Si en el enfoque la intensidad de la luz es demasiada, se puede atenuar girando la perilla manual de los filtros de densidad neutra situados en la fuente de poder de fluorescencia hacia un valor más apropiado.

## VII. CAPTURA DE IMAGEN MULTICANAL EN XY

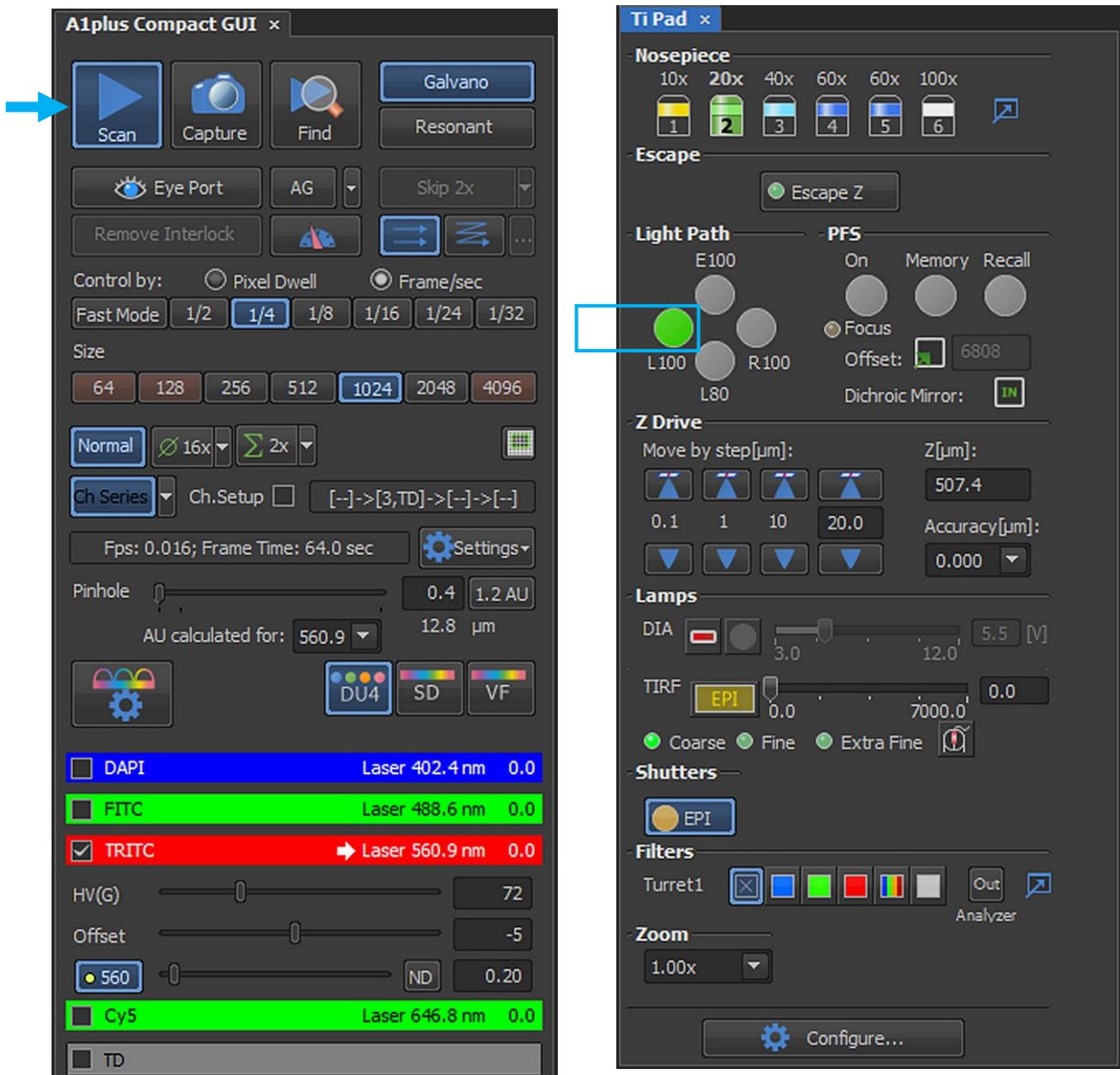
18. Dar click en “Eye Port”. El botón ahora dejará de estar resaltado en azul y las funciones de captura del módulo **A1plus Compact GUI** se reactivarán.



19. Si son varios canales, lo recomendable es que inicialmente se calibren uno por uno. Para la presente guía, se utilizará una muestra que tiene los fluorocromos AlexaFluor<sup>®</sup> 594 y AlexaFluor<sup>®</sup> 647, además se le capturará la luz transmitida por el láser 561 y esto se realizará con el objetivo de 20x en XY. Comenzaremos optimizando el canal para AlexaFluor<sup>®</sup> 594, que en el módulo **A1plus Compact GUI** se llama “**TRITC**”. De los canales existentes, cerciorarse que solo esté activo dicho canal. En el módulo **A1plus Compact GUI**, verificar que los botones “**Normal**” y “**Ch Series**” estén seleccionados (azul) y la velocidad de escaneo sea “**1/4**” Frame/sec. Presionar “**Scan**”



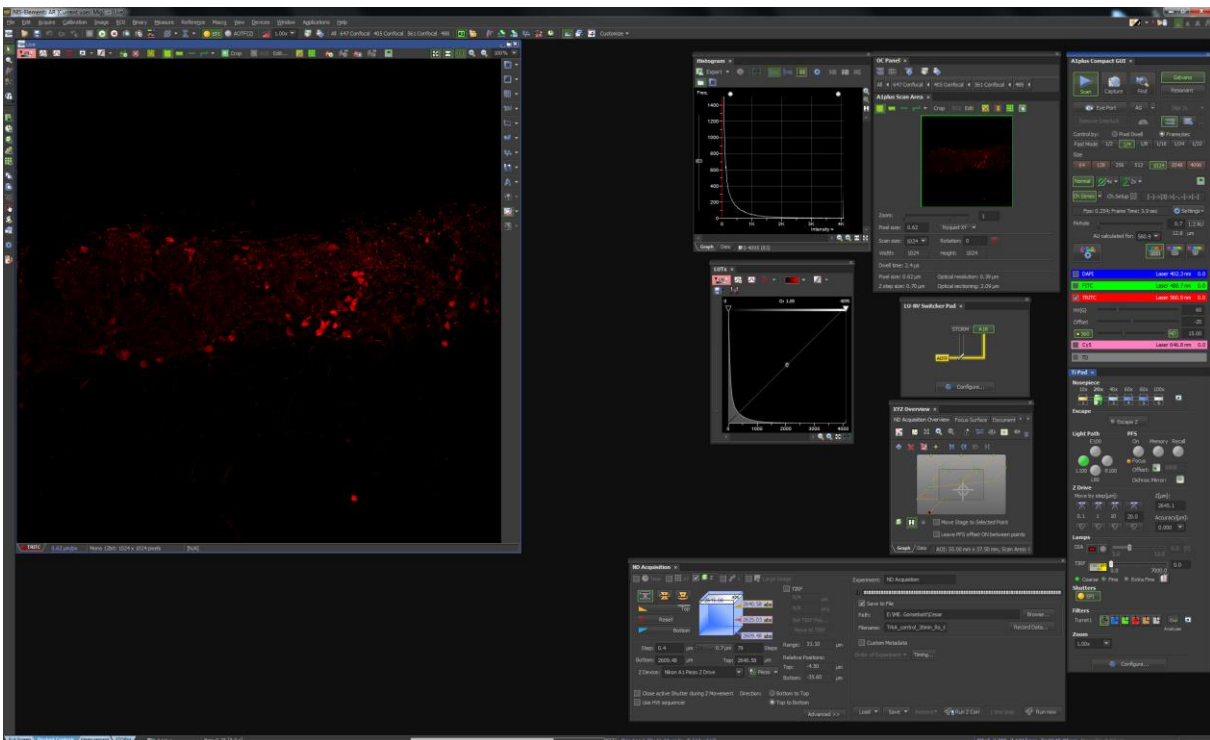
El icono tornará a azul. En el módulo **Ti Pad**, verificar que en “**Light Path**” esté seleccionado “**L100**”. Se abrirá una ventana de título “**Live**” y el equipo comenzará a escanear en modo continuo. Mediante el digipod del joystick, reajustar el enfoque de la muestra.



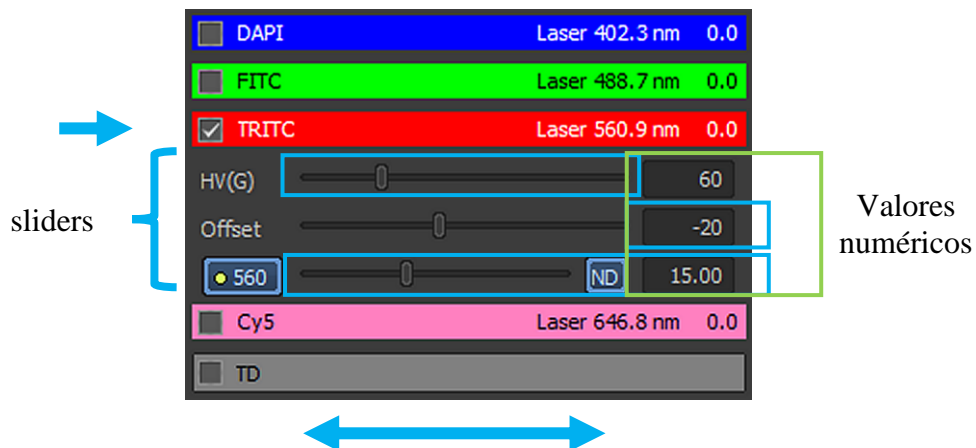
Configuración de escaneo sólo con excitación a 561 nm



Los ajustes de tamaño de pinhole, ganancia, umbral y potencia de láser dependerán de las condiciones de la muestra. Como sugerencia para el usuario, se recomienda comenzar el escaneo con un tamaño de pinhole equivalente a 1 AU, **HV(G)** en 90, **Offset** en -10 y potencia de láser de 75.00 con **ND** activo. A partir de ahí, modificar los valores de acuerdo a la definición de la estructura de interés hasta obtener el escaneo óptimo para este canal. Los valores pueden modificarse de tres formas; a) cambiando el valor numérico directamente en la casilla correspondiente y dando “Enter”; b) moviendo el slider correspondiente a derecha o izquierda con el mouse manteniendo presionado el botón izquierdo del mismo o c) dando un click izquierdo en el valor numérico del slider del valor a modificar, luego posicionándose sobre el slider y ahí girar la rueda del mouse hasta el valor deseado.



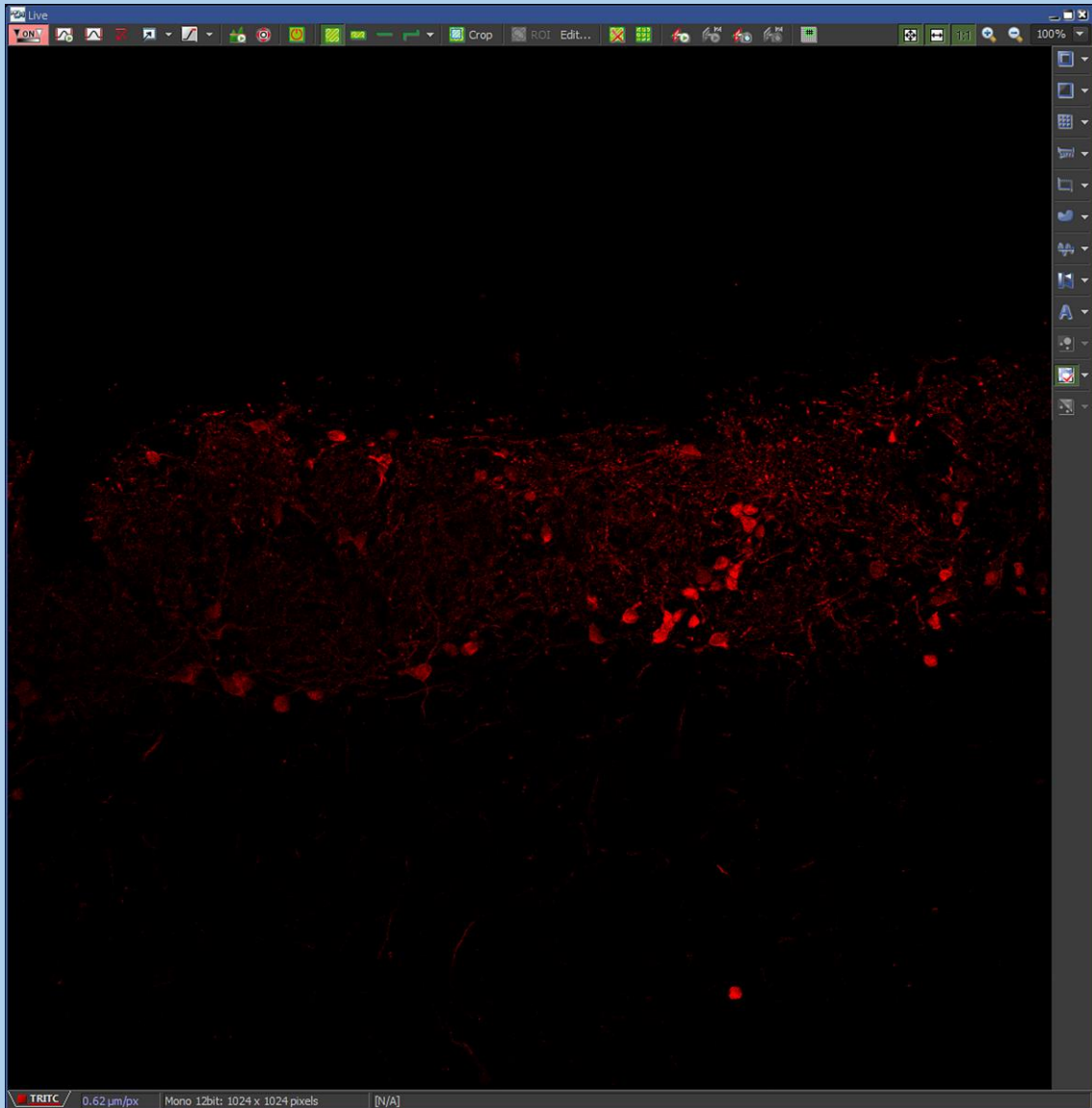
Captura de pantalla durante barrido de muestra de canal “TRITC” con escáner “Galvano”, “Scan”, modo normal, 1024x1024, 1/4 frame/sec y Ch Series activado.



Ajuste de los valores de ganancia [HV(G)] y offset del detector y potencia de láser 561 nm

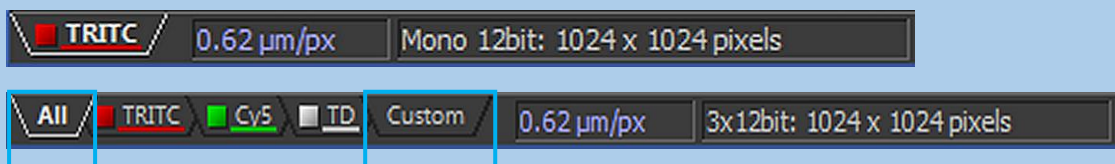
## Ventana Live | Frozen | Captured

La ventana **Live** aparece cuando se presiona el botón de “**Scan**”; es una visualización de los ajustes de escaneo que se realizan en tiempo real. Como se podrá observar, tiene algunos comandos en las partes superior, inferior y derecha de la ventana; a continuación se describirán aquellos que pueden ser de utilidad para la mayoría de las capturas.

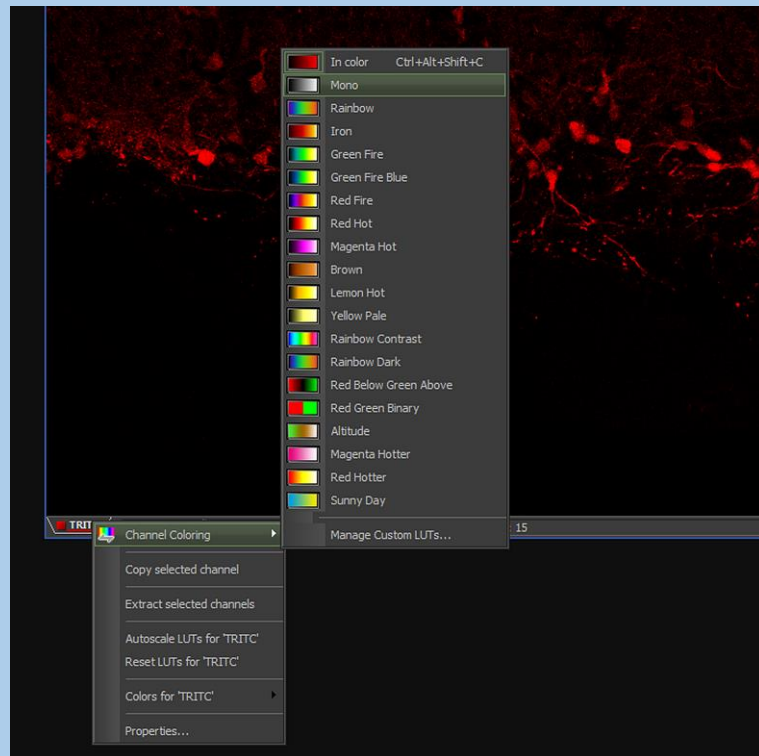


## Pestañas

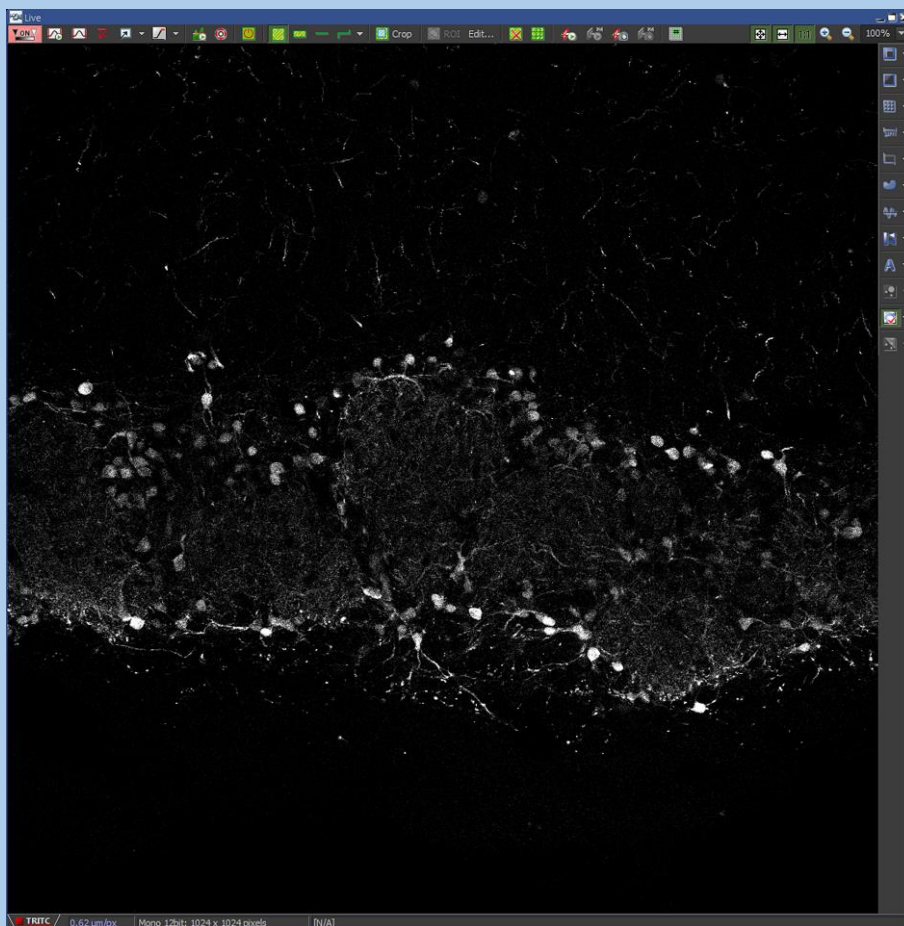
Situadas en la parte inferior de la ventana, permiten el cambio y visualización de los distintos canales presentes durante el escaneo; cuando se tiene al menos dos canales de captura aparecerán dos pestañas extras, “**All**” y “**Custom**”.



Si uno dá click derecho sobre alguna de las pestañas, se desplegará un menú con algunas opciones:



Si en “**Channel Coloring**” se selecciona “**Mono**”, se visualizará el escaneo en escala de grises:

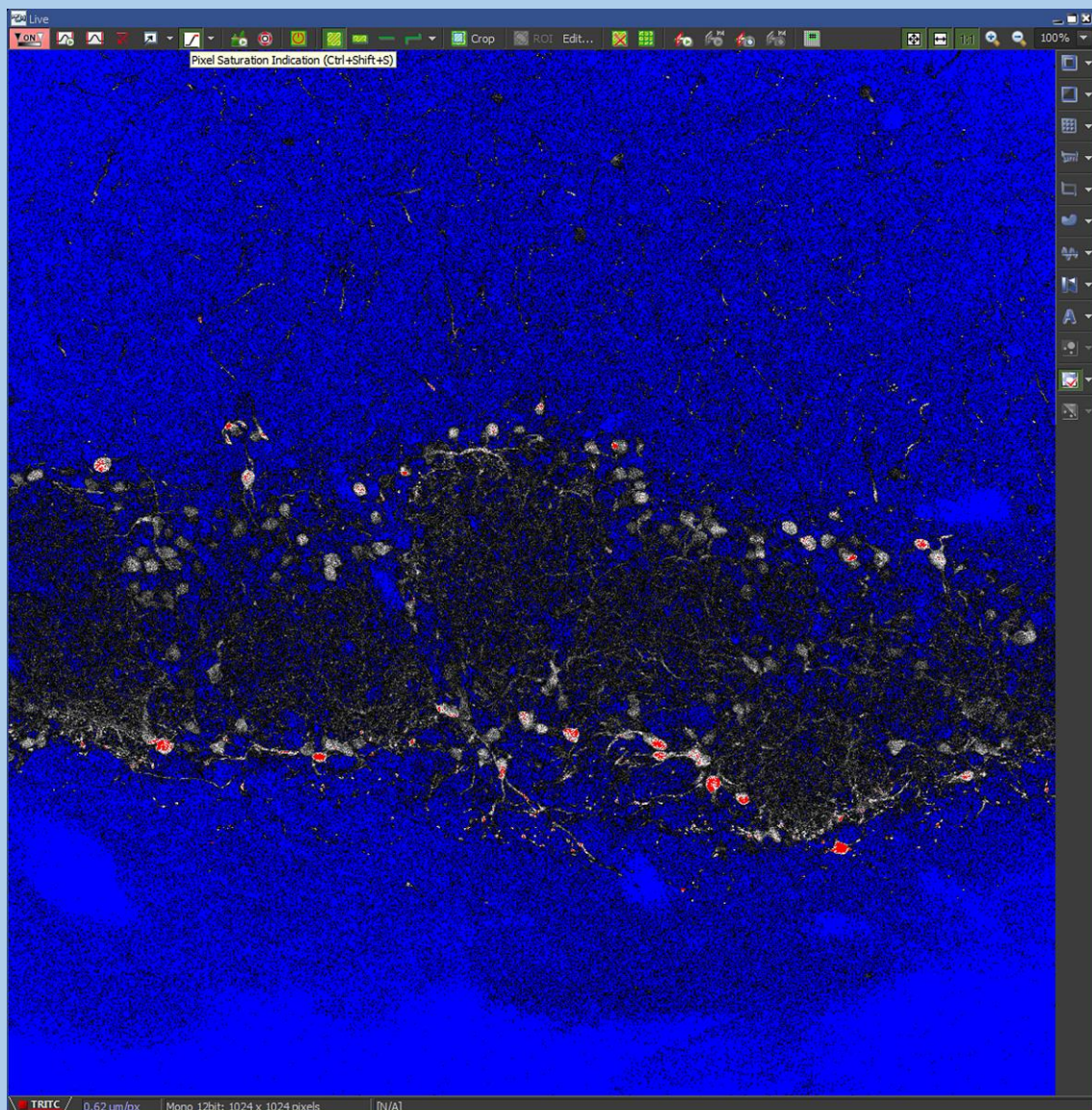




Si además de lo anterior, se escoge “**Pixel Saturation Indication**” del menú superior de la ventana,

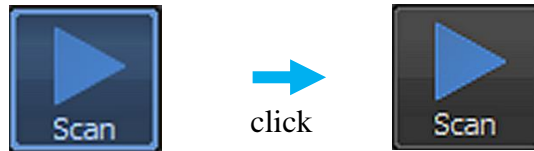


Se podrá observar con un mayor contraste visual las zonas con señal debido a que los píxeles negros (ausencia de señal) se observarán en color azul y los píxeles saturados se marcarán como rojos

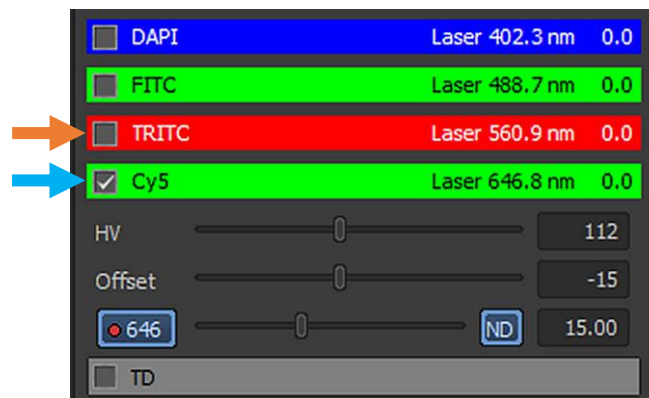


Para revertir estos efectos visuales, volver a dar click en el icono de “**Pixel Saturation Indication**” y en “**Channel Coloring**” seleccionar “**In Color** Ctrl+Alt+Shift-C”.

20. Una vez optimizado el primer canal, dar click otra vez en “Scan”. Esto detendrá el escaneo, y su ícono dejará de estar resaltado en azul. Siempre que se detenga el escaneo actual, el nombre de la pestaña cambiará de “**Scan**” a “**Frozen**”.

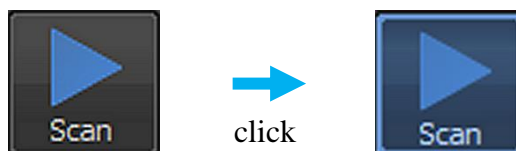


21. Seleccionar el siguiente canal a ajustar. En este ejemplo sería AlexaFluor<sup>®</sup> 647, al cual le corresponde el canal llamado “**Cy5**” en el módulo **A1plus Compact GUI**. No olvidar desactivar el canal “**TRITC**”. De igual manera que en el primer canal, se recomienda comenzar el escaneo con un tamaño de pinhole equivalente a 1 AU, **HV(G)** en 90, **Offset** en -10 y potencia de láser de 75.00 con **ND** activo.

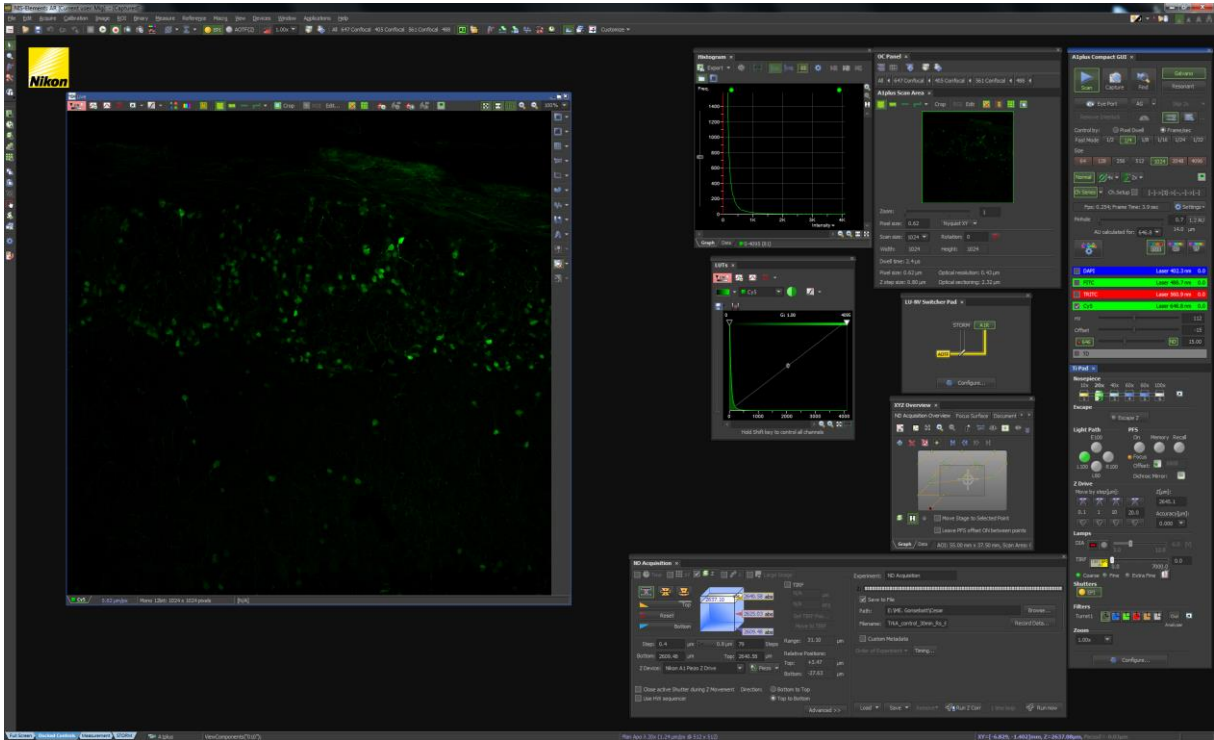


Ajustes aproximados iniciales para escaneo en el canal “Cy5”

22. Dar click en “Scan”.

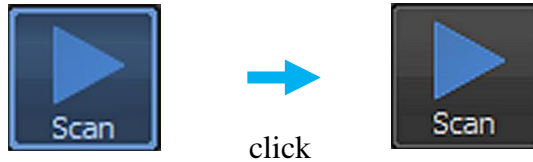


El ícono volverá a resaltarse en azul, la ventana “**Live**” mostrará el escaneo de la región de interés seleccionada A partir de ahí, modificar los valores del canal de acuerdo a la definición de la estructura de interés hasta obtener el escaneo óptimo para este canal.

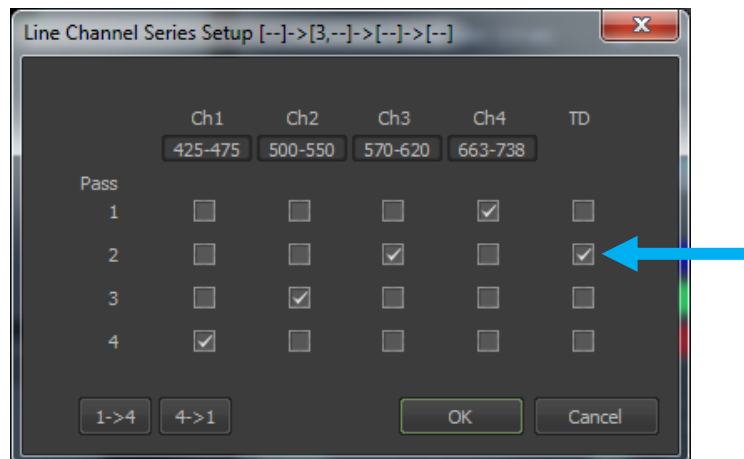


Captura de pantalla durante barrido de muestra de canal “Cy5” con escáner “Galvano”, “Scan”, modo normal, 1024x1024, 1/4 frame/sec y Ch Series activado.

23. Una vez optimizado el siguiente canal, dar click otra vez en “Scan”. Esto detendrá el escaneo, y su ícono dejará de estar resaltado en azul.

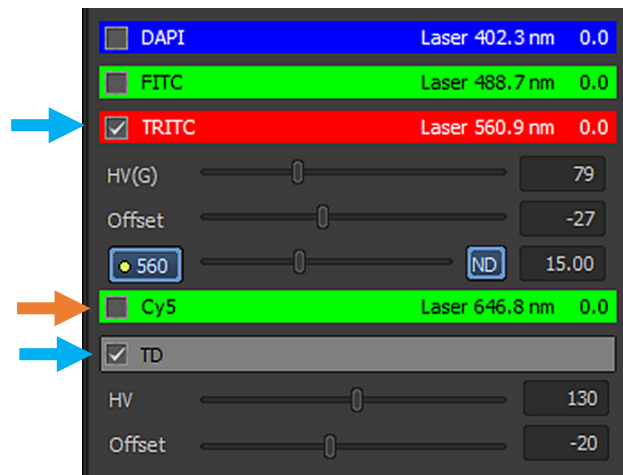


24. A continuación se activará el canal de luz transmitida mediante el láser 561. Para esto, en el módulo **A1plus Compact GUI**, en la sección de “Ch Series” | **Setup...** | “Line Channel Series Setup”, verificar que **TD** esté pareado con **Ch3** (ambas palomas de selección deben estar en la misma fila):

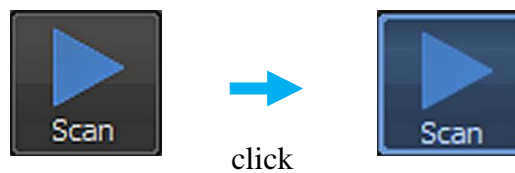




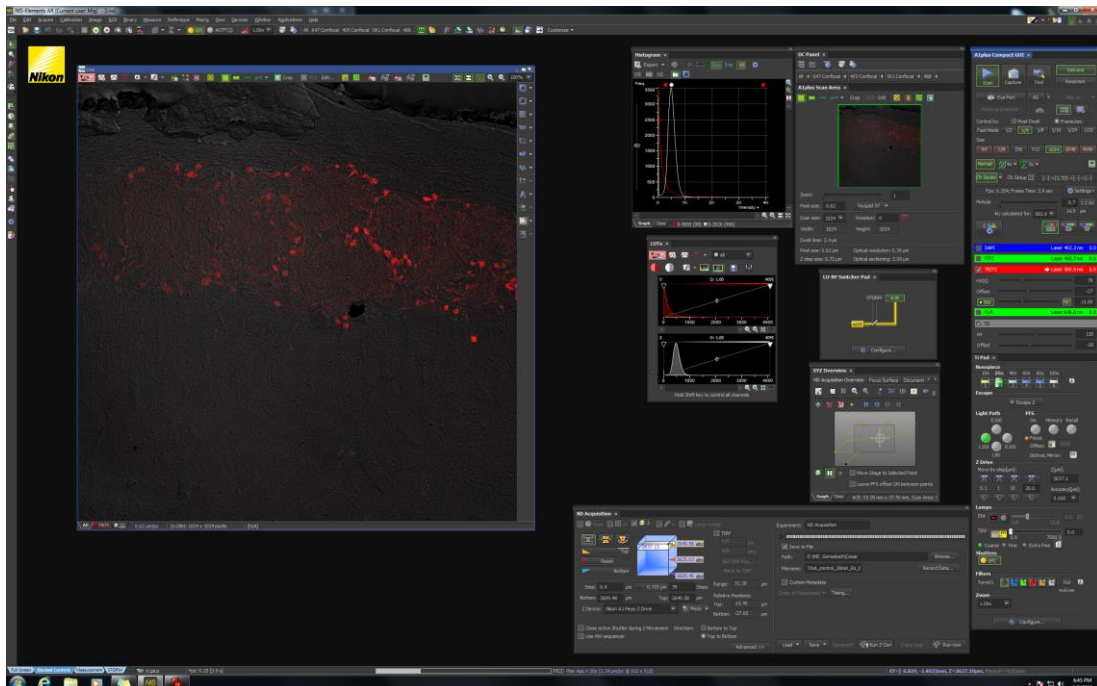
En “Channels”, activar las casillas de “TRITC” y “TD” e inactivar la de “Cy5”:



25. Dar click en “Scan”:

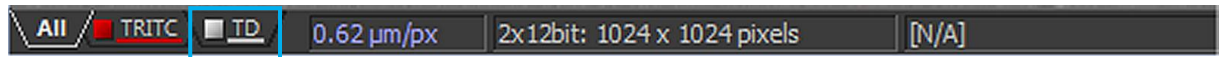


El ícono volverá a resaltarse en azul, la ventana “Live” mostrará el escaneo de la región de interés seleccionada con los canales “TRITC” y “TD” empalmados (pestaña “All”).



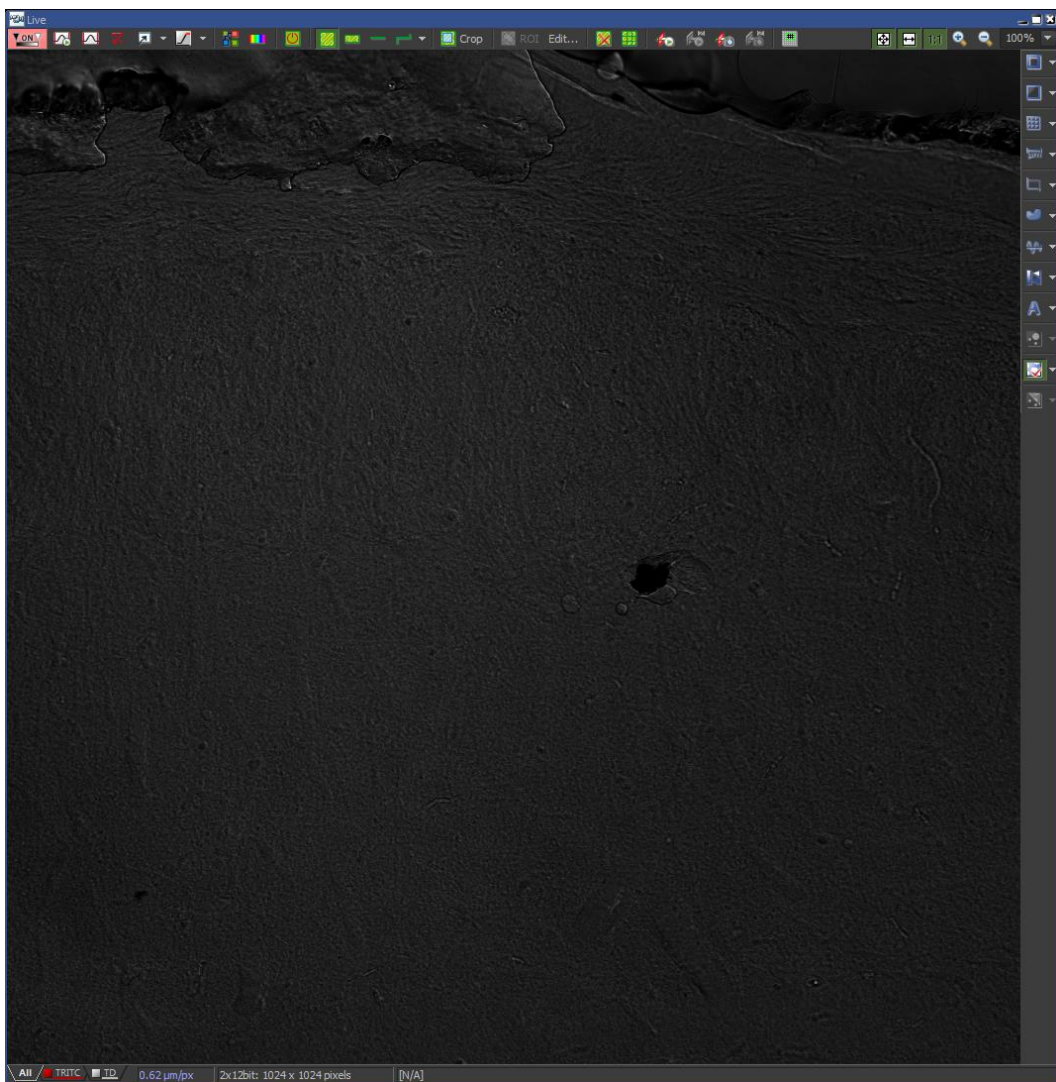
Captura de pantalla durante barrido de muestra de canales con escáner “Galvano”, canal “TRITC” y “TD” con “Scan”, modo normal, 1024x1024, 1/4 frame/sec y Ch Series activado.

26. Dado que el canal “TRITC” ha sido calibrado previamente, se optimizará ahora el canal de luz transmitida. En la ventana “Live”, cambiarse a la pestaña “TD”



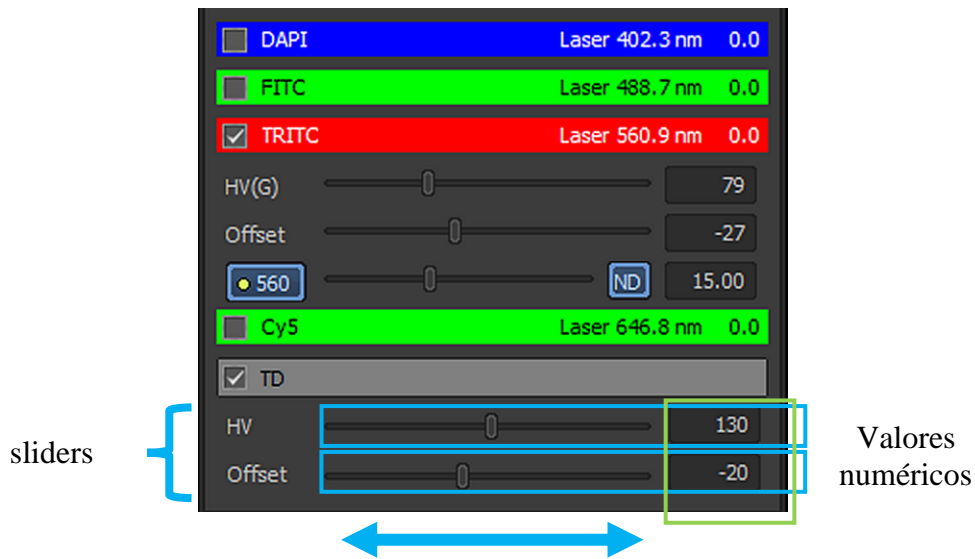
click

Esto nos permitirá visualizar solamente la imagen de luz transmitida:



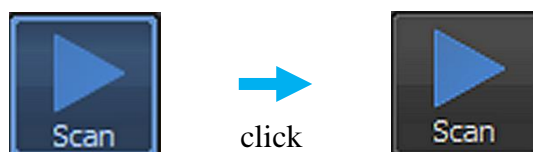
Pestaña “TD”

Dado que depende de una fuente de iluminación “externa”, el canal “TD” solo presenta dos parámetros de ajuste; “HV” y “Offset”. Sin embargo, considerar que el nivel de contraste de la imagen puede ser modificado también tanto por los cassettes (DICN1 y DICN2) como por el prisma polarizador T-P2, localizados en el estativo.

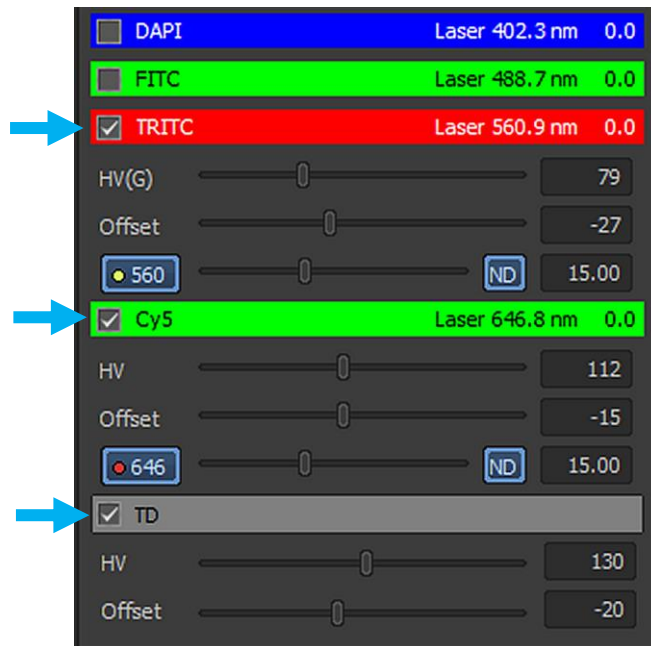


**Ajuste de los valores de ganancia (HV) y offset del detector de luz transmitida**

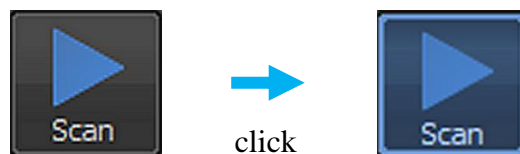
27. Una vez optimizado el canal de luz transmitida, dar click otra vez en “Scan”. Esto detendrá el escaneo, y su ícono dejará de estar resaltado en azul.



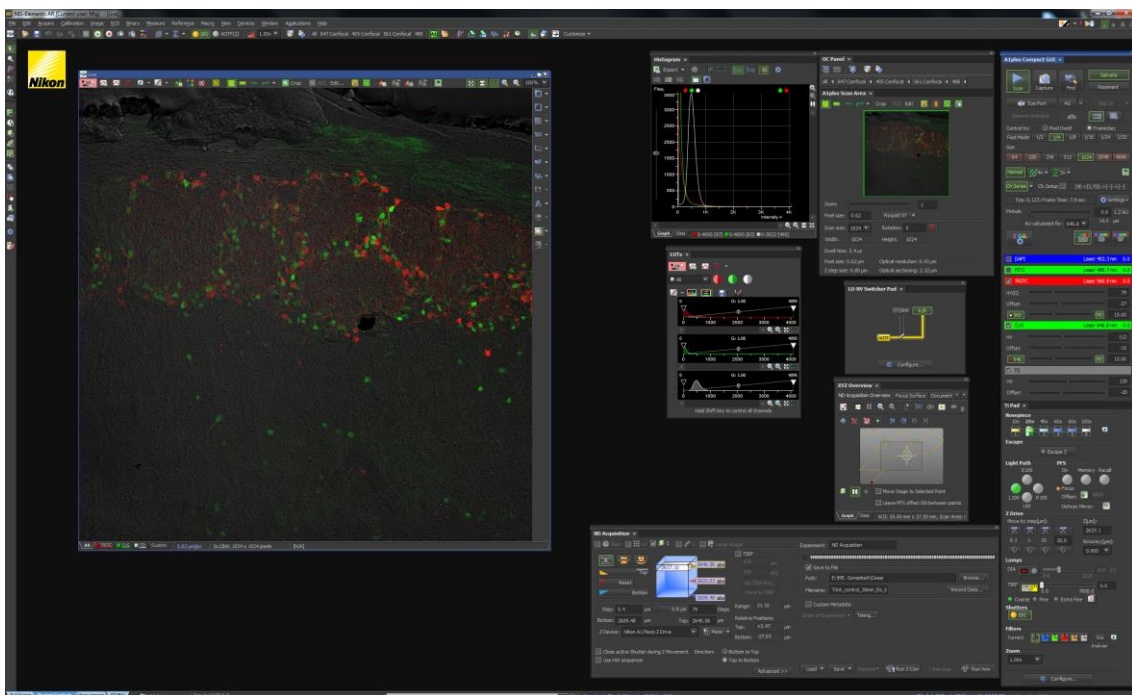
28. Ahora se procederá a visualizar el conjunto de canales simultáneos. Para esto en “Channels” además de “TRITC” y “TD” activar el canal “Cy5”:



29. Dar click en “Scan”:



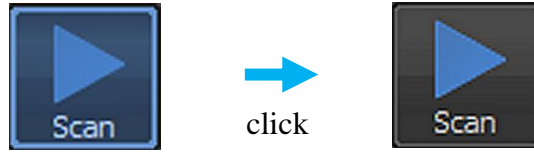
El ícono volverá a resaltarse en azul, la ventana “Live” mostrará el escaneo de la región de interés seleccionada con los canales “TRITC”, “Cy5” y “TD” empalmados (pestaña “All”).



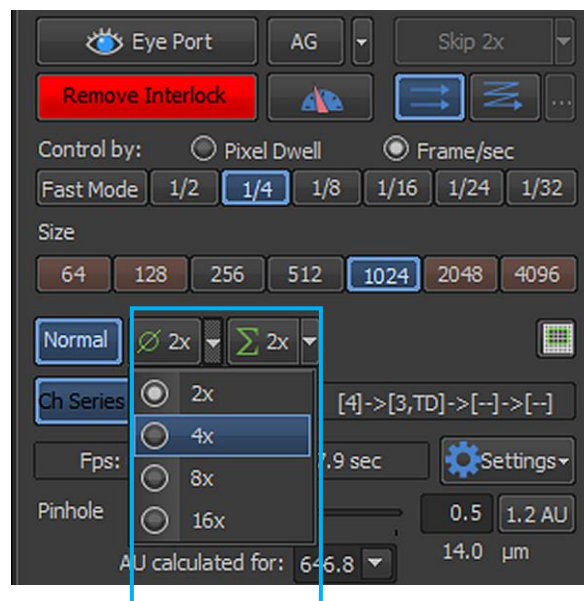
Captura de pantalla durante barrido de muestra de canales “TRITC”, “Cy5” y “TD” con escáner “Galvano”, “Scan”, modo normal, 1024x1024, 1/4 frame/sec y Ch Series activado.



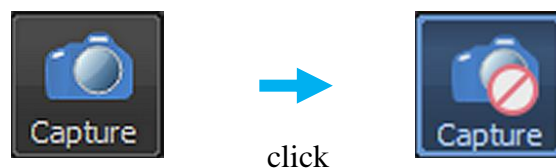
30. Mediante la sección de pestañas, verificar los canales a capturar, tanto individualmente como empalmados, y si fuera necesario, realizar los ajustes correspondientes por cada canal a modificar. Una vez establecidos los parámetros finales, dar click otra vez en “Scan”. Esto detendrá el escaneo, y su ícono dejará de estar resaltado en azul.



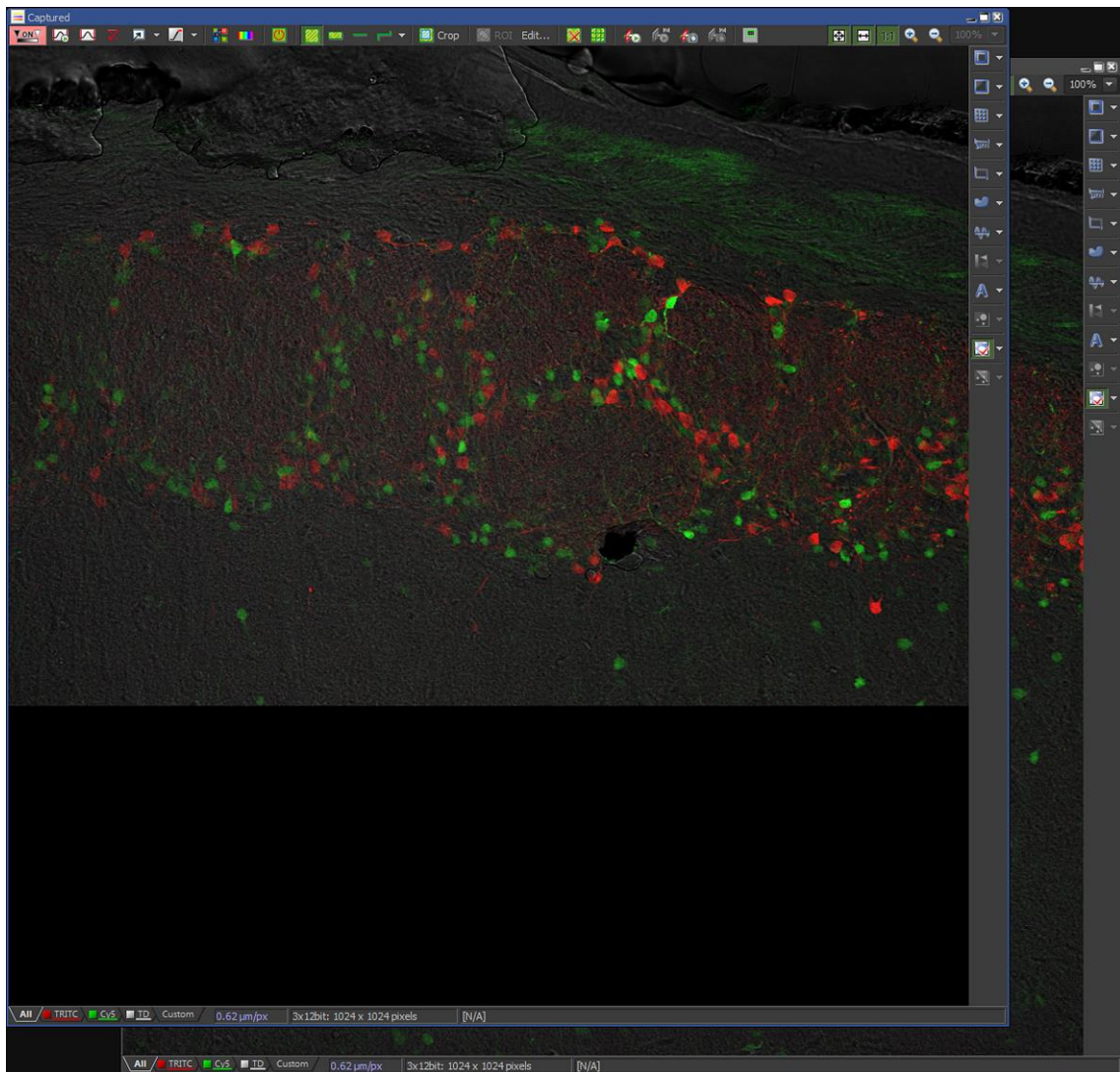
31. En el módulo **A1plus Compact GUI**, en “**Tipo de escaneo**”, realizar el cambio de “**Normal**” a una captura promediada. Para esto, dar click en el triángulo invertido situado al lado de “**ØXx**”, el cual abrirá un menú flotante donde se puede seleccionar el número de promediaciones; el número seleccionado quedará resaltado en verde. Generalmente, se recomienda seleccionar “**4x**”, aunque dependiendo de la calidad de imagen el usuario puede escoger una promediación mayor.



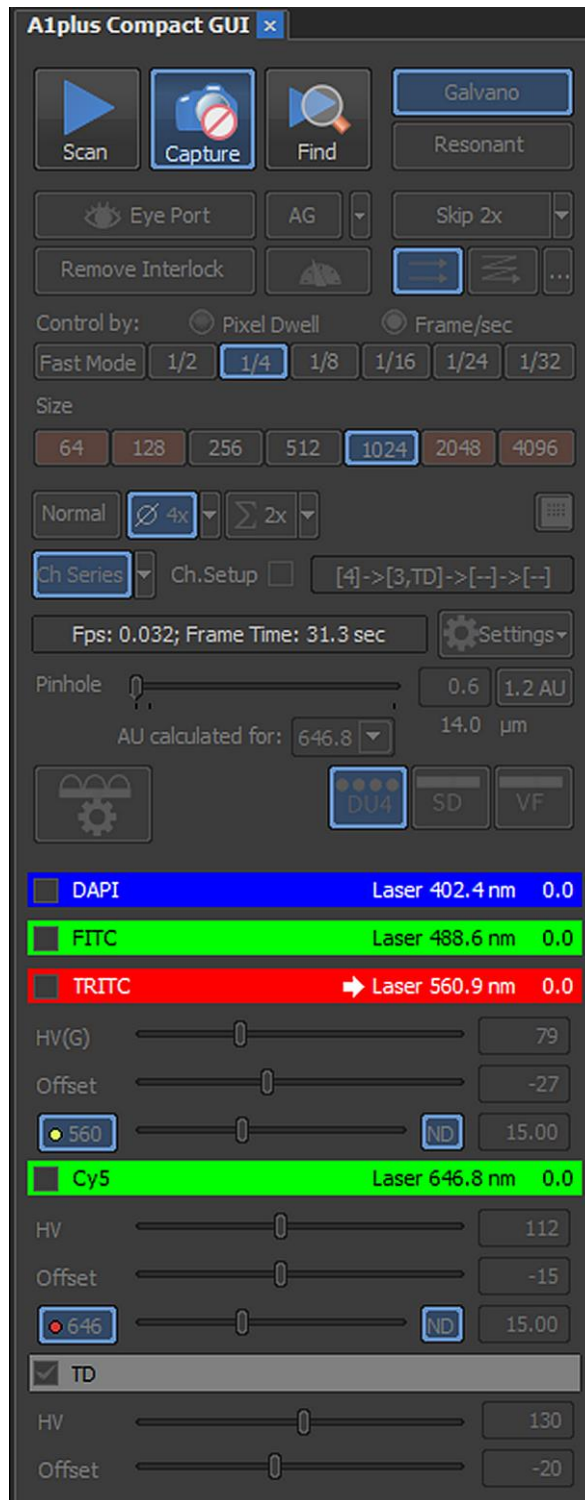
32. Dar click en “**Capture**”:



El ícono se resaltará en azul, además de que le aparecerá un símbolo de “prohibido”. El equipo comenzará a capturar una imagen final, generando una ventana adicional a “Frozen” con el nombre de “Captured”. Por cada ocasión que se presione “Capture”, se generará una nueva ventana “Captured” numerada en orden secuencial. Debe considerarse que una vez que se presione “Capture”, no se podrá modificar ningún valor del módulo **A1plus Compact GUI** hasta que finalice la captura de la imagen:

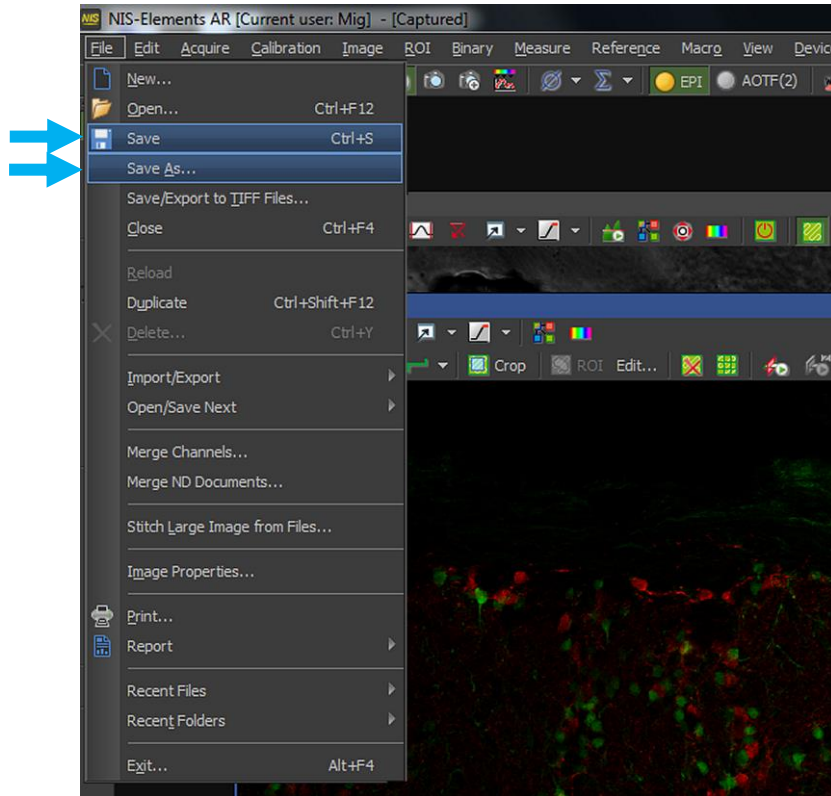


**Captura de pantalla durante barrido de muestra de canales “TRITC”, “Cy5” y “TD” con escáner “Galvano”, “Capture”, modo 4x, 1024x1024, 1/4 frame/sec y Ch Series activado.**

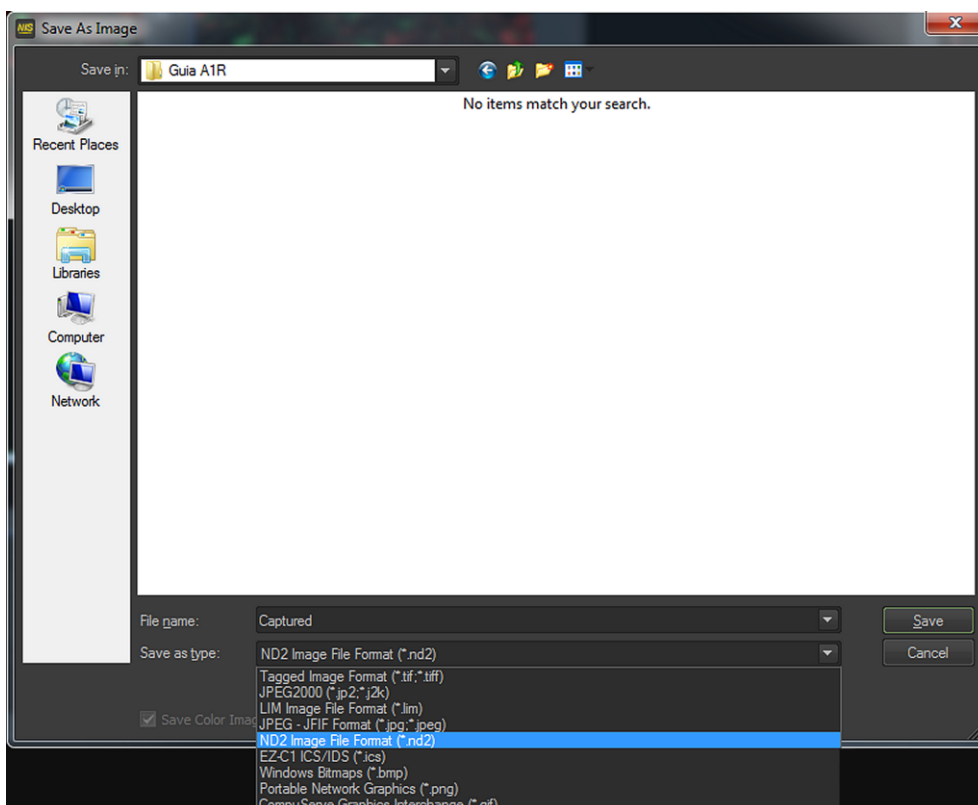


**Módulo A1plus Compact GUI durante barrido de muestra de canales “TRITC”, “Cy5” y “TD” con “Capture”, modo 4x, 1024x1024, 1/4 frame/sec y Ch Series activado.**

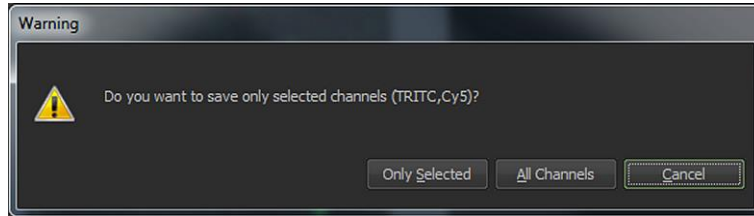
33. La imagen obtenida será almacenada en memoria, lo que significa que aún no estará guardada en el disco duro de la computadora. El usuario puede optar por guardar cada imagen conforme la capture, o comenzar la búsqueda de otro campo de su muestra. Para el caso que decida guardarla, teniendo seleccionada la ventana “**Captured**” correspondiente, ir al Menú “**File**” y seleccionar “**Save**” o “**Save As...**”, o presionar en el teclado **Control** y **S** simultáneamente:



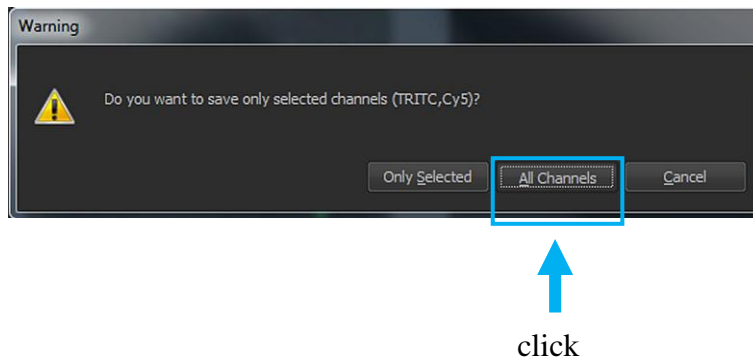
Se abrirá un nuevo Menú:



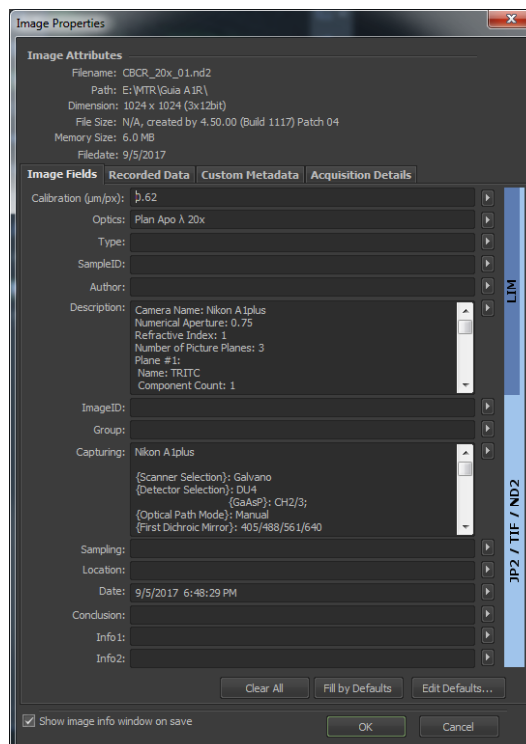
Por cuestiones de metadatos, el formato de archivo recomendado para guardar las imágenes es el formato propietario de Nikon, ND2 Image File Format (.nd2). Las imágenes deben guardarse en la unidad “E”; por cada Jefe de Grupo existe una carpeta en dicha unidad, favor de guardar sus imágenes en la carpeta perteneciente a su Grupo de Investigación. Si al momento de guardar la imagen capturada está visualizada cualquier pestaña que no muestre todos los canales capturados, aparecerá el siguiente mensaje:



Dar click en “All Channels”.

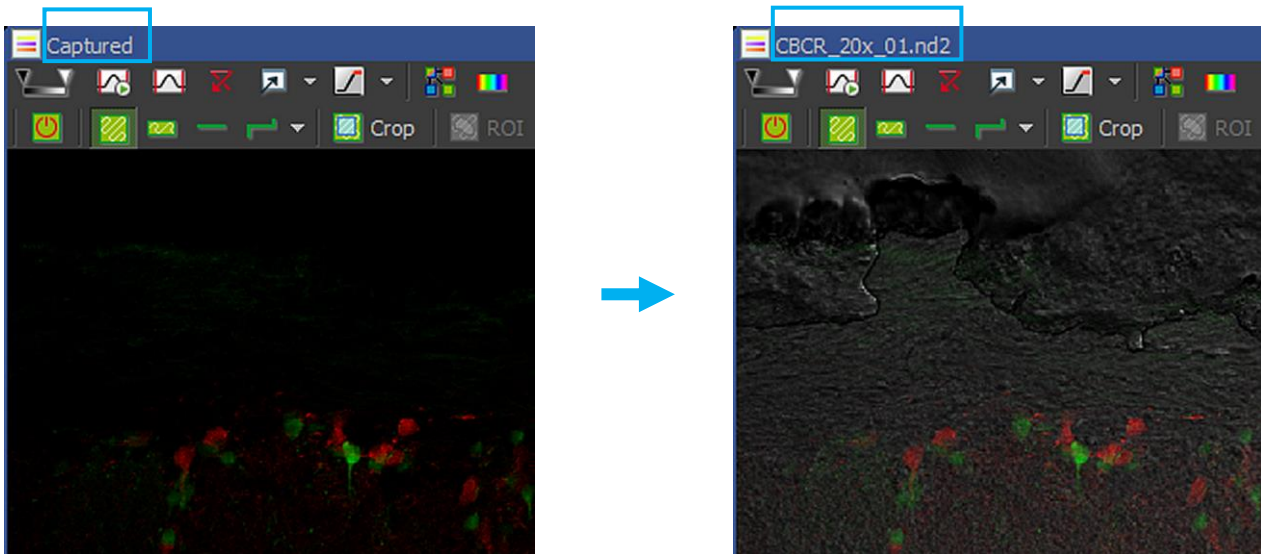


Aparecerá la información de la imagen (**Image Properties**), que son los metadatos de captura:





Para continuar, dar click en “OK”. Esto cerrará “**Image Properties**”, la imagen quedará guardada y desplegará el nombre seleccionado como título de la ventana reemplazando a “**Captured**”.



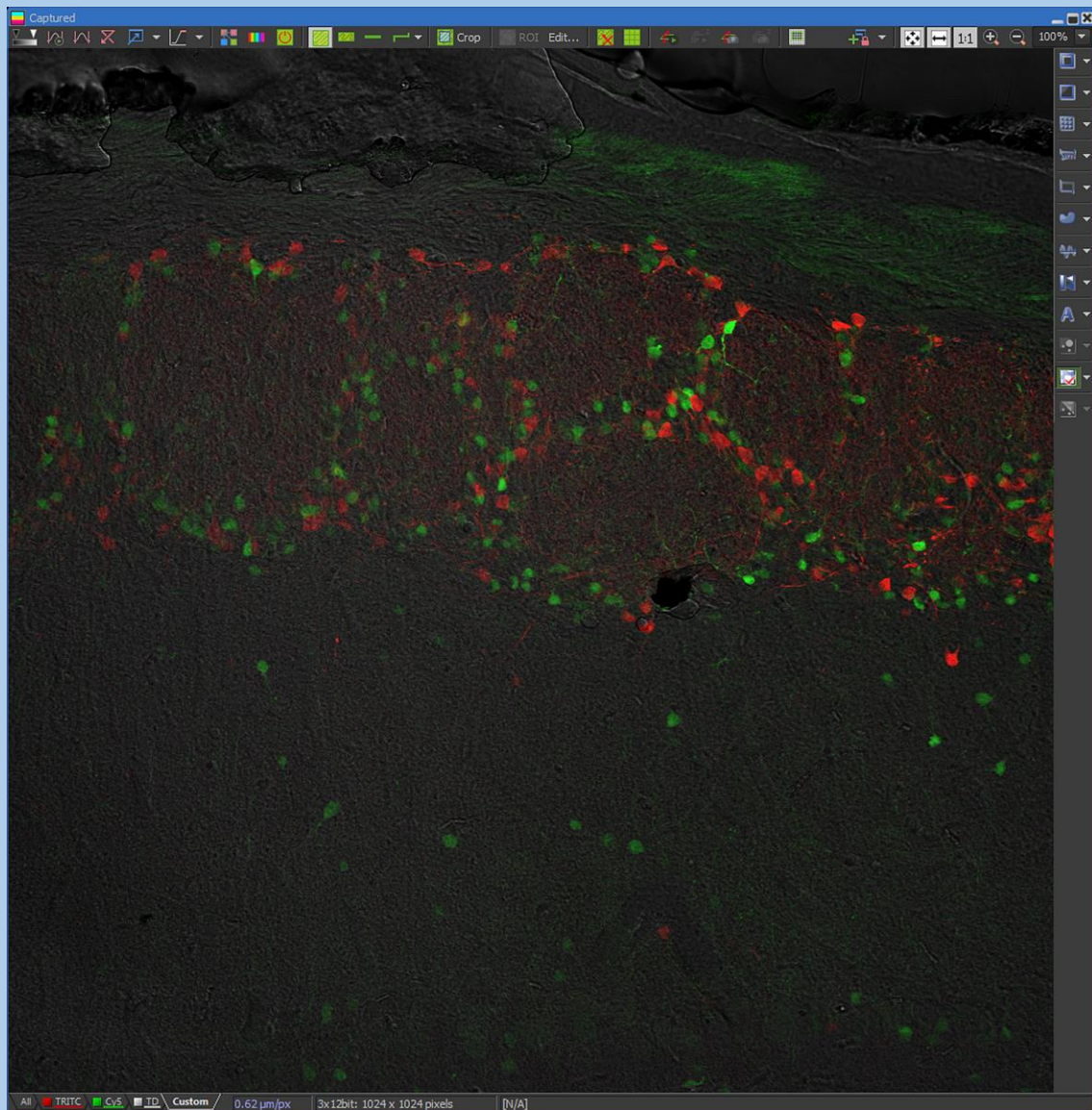
34. Una vez guardada la imagen, se puede proceder a buscar otra región de interés. Para esto, es más rápido hacerlo directamente desde el estativo. Para ello, dar click otra vez en “**Eye Port**”:



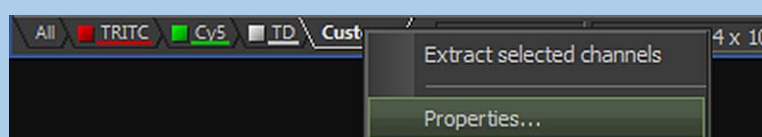
35. Repetir secuencialmente los pasos 17, 18, 19, 30, 31 y 32 por cada imagen que se desee capturar.

## Ventana Live | Frozen | Captured

La ventana **Captured** aparece cuando se presiona el botón de “**Capture**”; y nos despliega una imagen final. A continuación se describirán algunos comandos que pueden ser de utilidad ya sea durante la captura o para las imágenes ya capturadas.

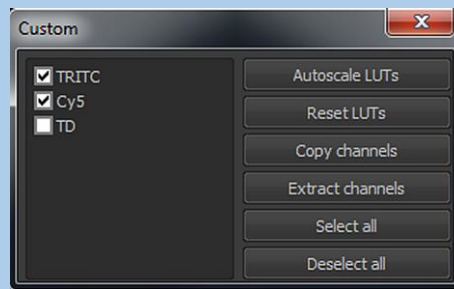


Al dar click derecho sobre la pestaña “**Custom**”, aparecerá el siguiente menú:





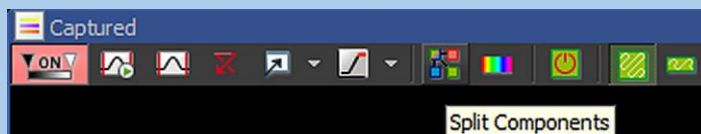
Al seleccionar “**Properties...**” aparecerá el menú “**Custom**”:



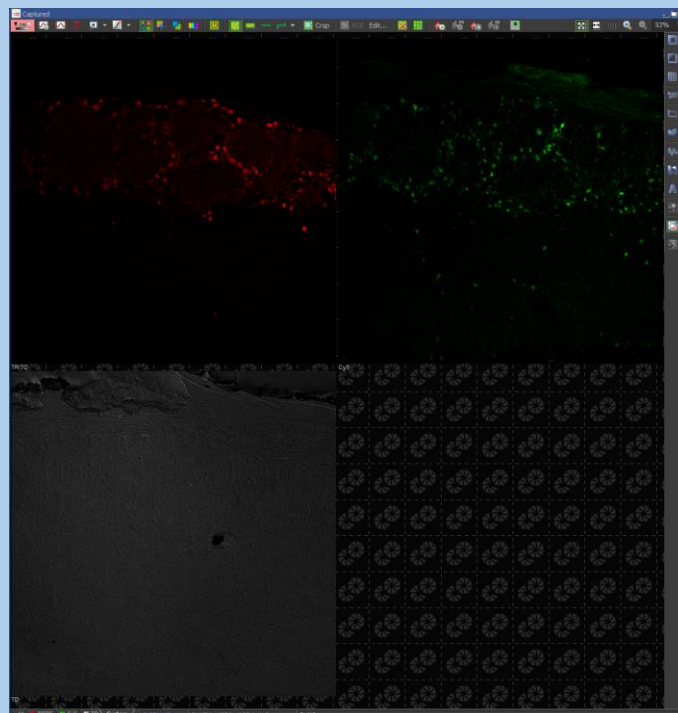
En este menú se pueden seleccionar los canales que únicamente se deseen visualizar en la pestaña “**Custom**”; para inactivar canales simplemente deseleccionarlos y el cambio será inmediato. Para cerrar el menú “**Custom**”, solo dar click en la **X** de la esquina superior derecha.

### **Split Components**

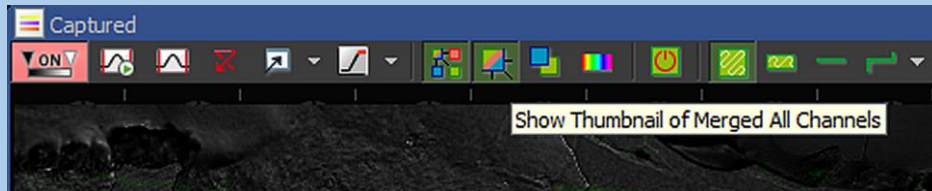
En la parte superior izquierda de la ventana se encuentran íconos para cambiar la visualización de la imagen, un ejemplo es “**Split Components**”:



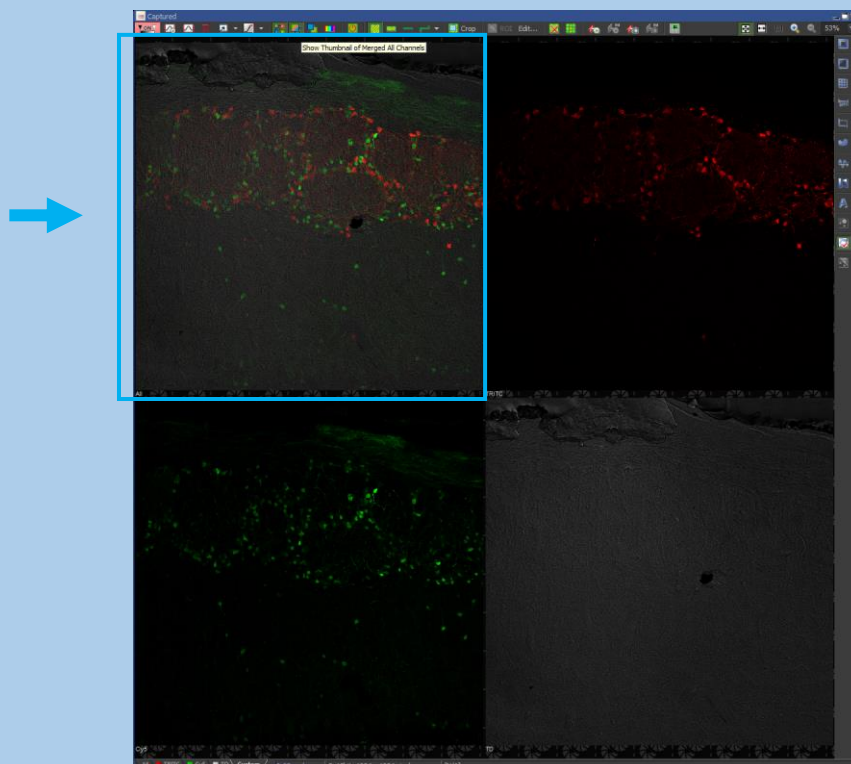
Al dar click en ese ícono, la ventana nos mostrará todos los canales capturados simultáneamente, a un menor tamaño.



Si se dá click en el ícono “**Show Thumbnail of Merged All Channels**”



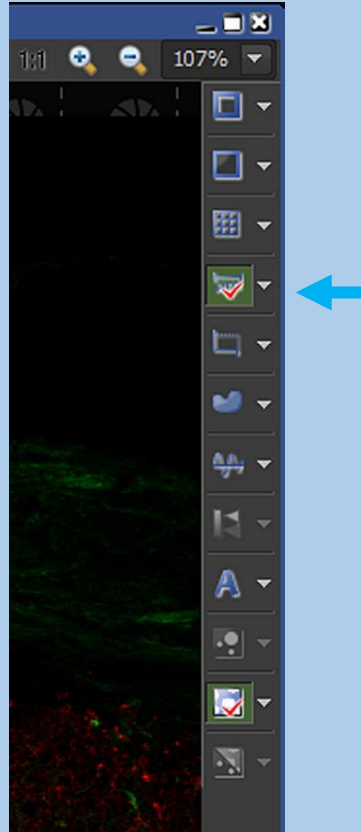
Adicionalmente se mostrará un canal con los canales empalmados:



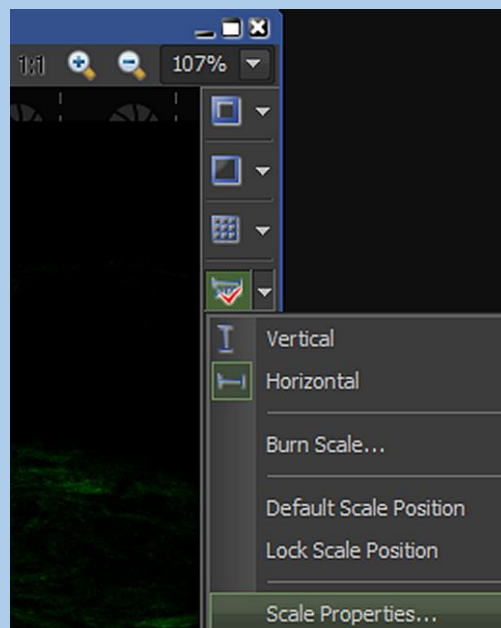
Para volver a la vista normal, dar click otra vez en “**Split Components**”.

## Escala

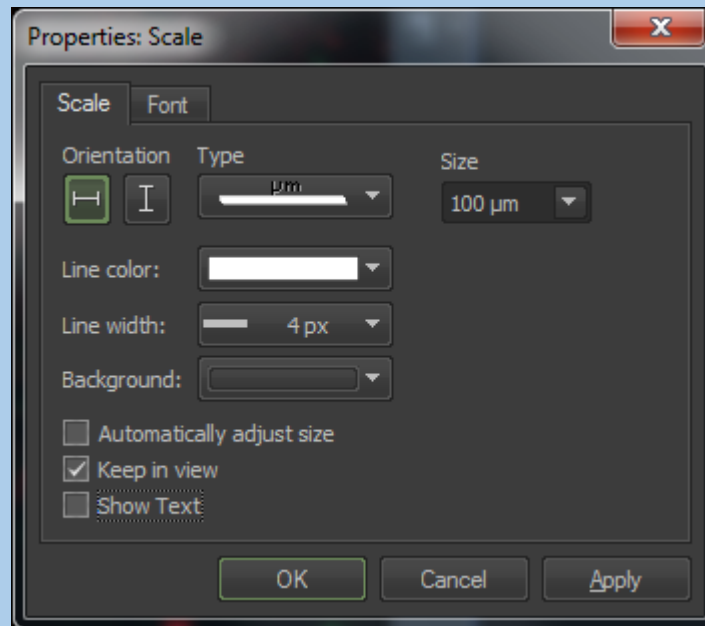
Las imágenes capturadas en el confocal están automáticamente calibradas; para desplegar una barra de escala en la imagen hay que seleccionar el cuarto ícono de la barra lateral derecha de herramientas. El ícono tornará verde y se mostrará en la imagen una escala predeterminada respectiva al aumento mostrado.



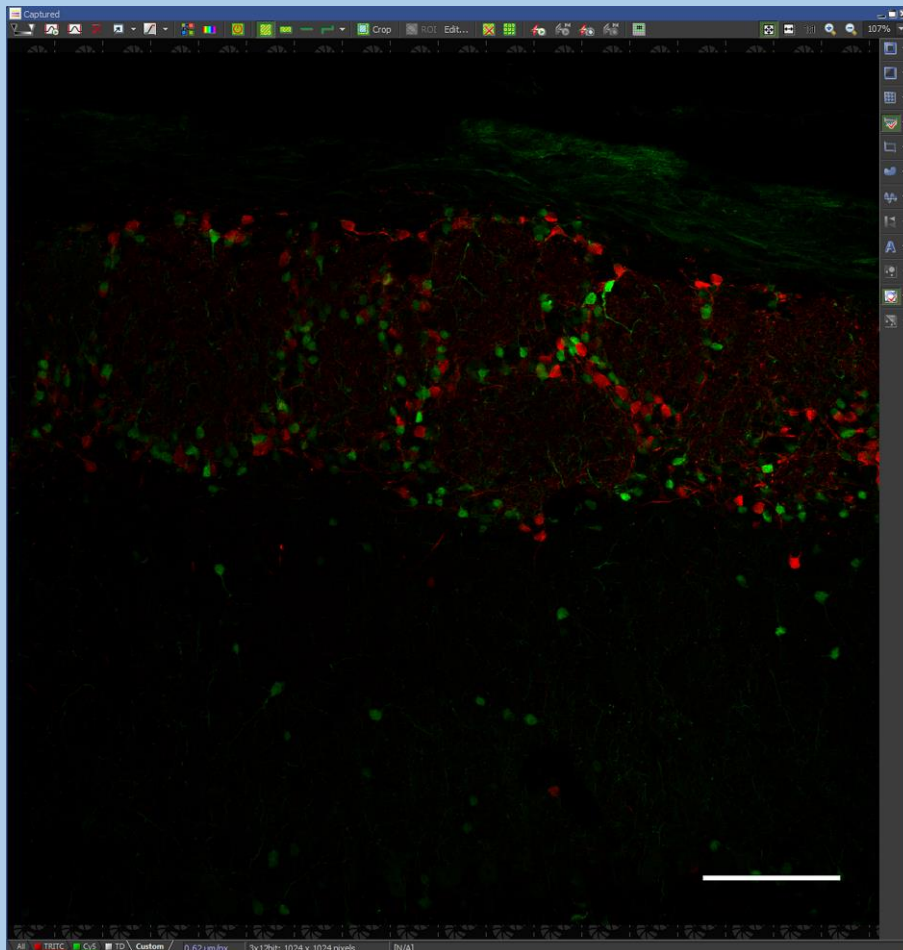
Si se quieren cambiar las características de la escala predeterminada, dar click derecho en el ícono de escala. Aparecerá el siguiente menú:



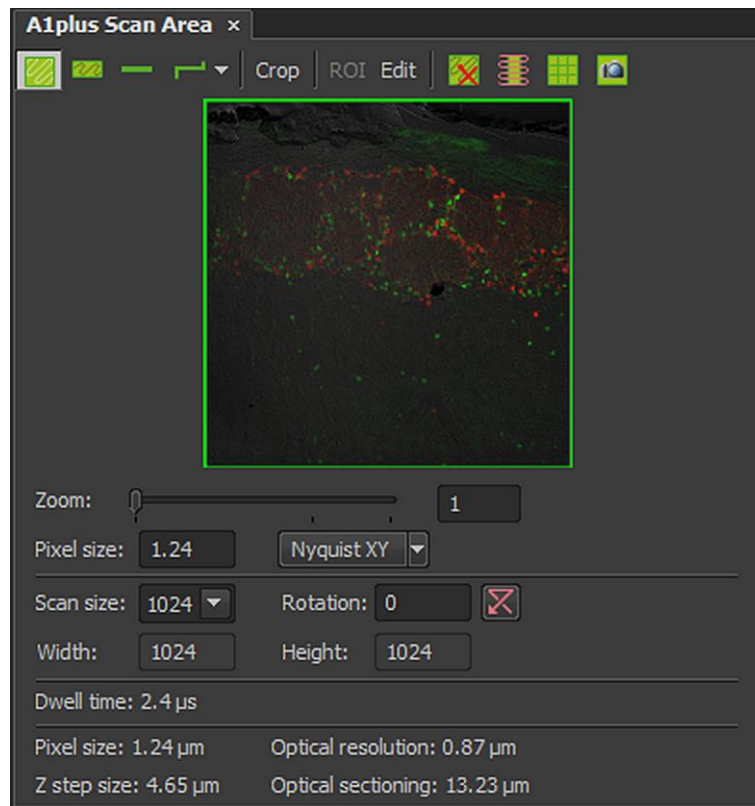
Al dar click en “**Scale Properties...**” aparecerá el siguiente menú:



Una vez seleccionados los cambios deseados, dar click en “**OK**”. La escala será mostrada con las características seleccionadas:



## VIII. Módulo A1plus Scan Area



Este módulo es útil cuando está corriendo el comando “Scan” del módulo **A1plus Compact GUI**; nos permite visualizar y modificar la región de escaneo, aplicar rotación y aumento digital sobre alguna región de interés; también informa sobre las características específicas de la imagen, las cuales variarán con la combinación de longitudes de onda seleccionadas en “Channels”, objetivo a utilizar y del aumento digital.

### ROI

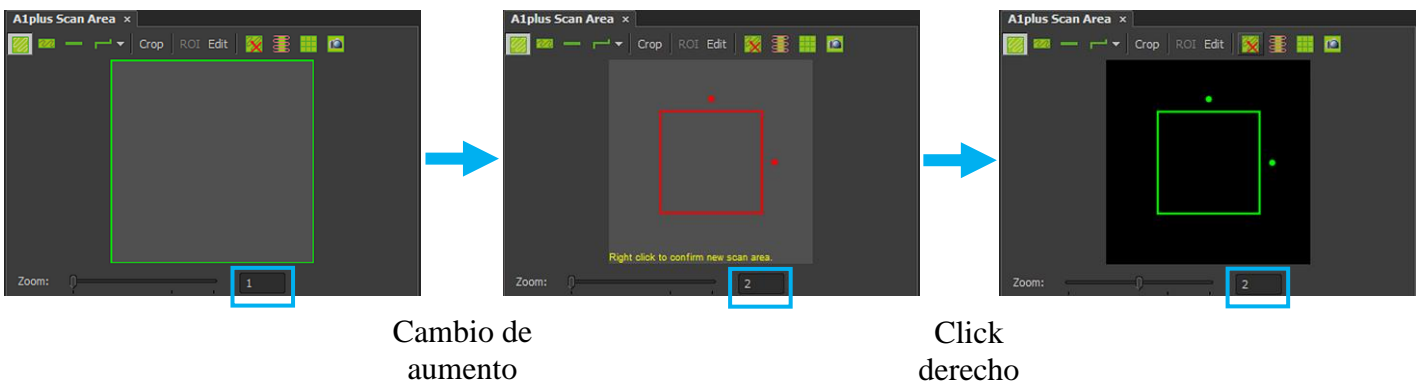


Estos comandos permiten modificar el área de escaneo para que sea en modo completo, rectangular, lineal o poli lineal. De igual manera, se pueden trazar regiones de interés (ROI) personalizadas y ordenar la captura de dichas regiones directamente desde este apartado.

## Zoom

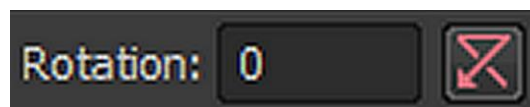


Permite realizar ampliaciones digitales sobre el campo de visión. El valor puede modificarse de tres formas; a) cambiando el valor numérico directamente en la casilla correspondiente y dando “Enter”; b) moviendo el slider correspondiente a derecha o izquierda con el mouse manteniendo presionado el botón izquierdo del mismo o c) dando un click izquierdo en el valor numérico del slider del valor a modificar, luego posicionándose sobre el slider y ahí girar la rueda del mouse hasta el valor deseado. En cualquier caso, la ROI se presentará en color rojo. Si fuera necesario, mediante el mouse puede desplazarse el nuevo ROI a la ubicación deseada y una vez ahí, dar click derecho para confirmar. El ROI cambiará de color rojo a verde.

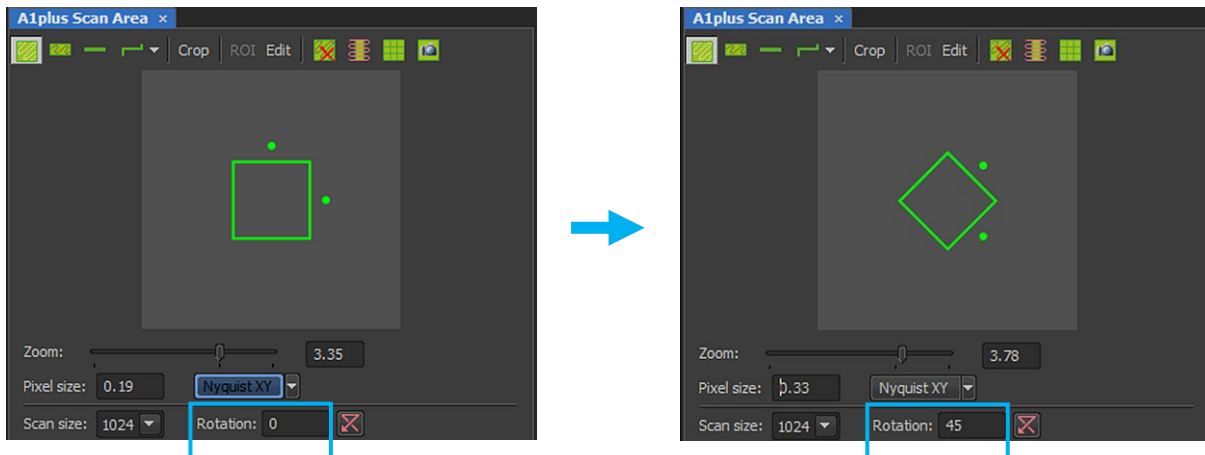


## Rotación

Si el aumento digital es diferente de 1, este comando permite rotar el detector **Galvano** entre valores de 0 a 90 grados

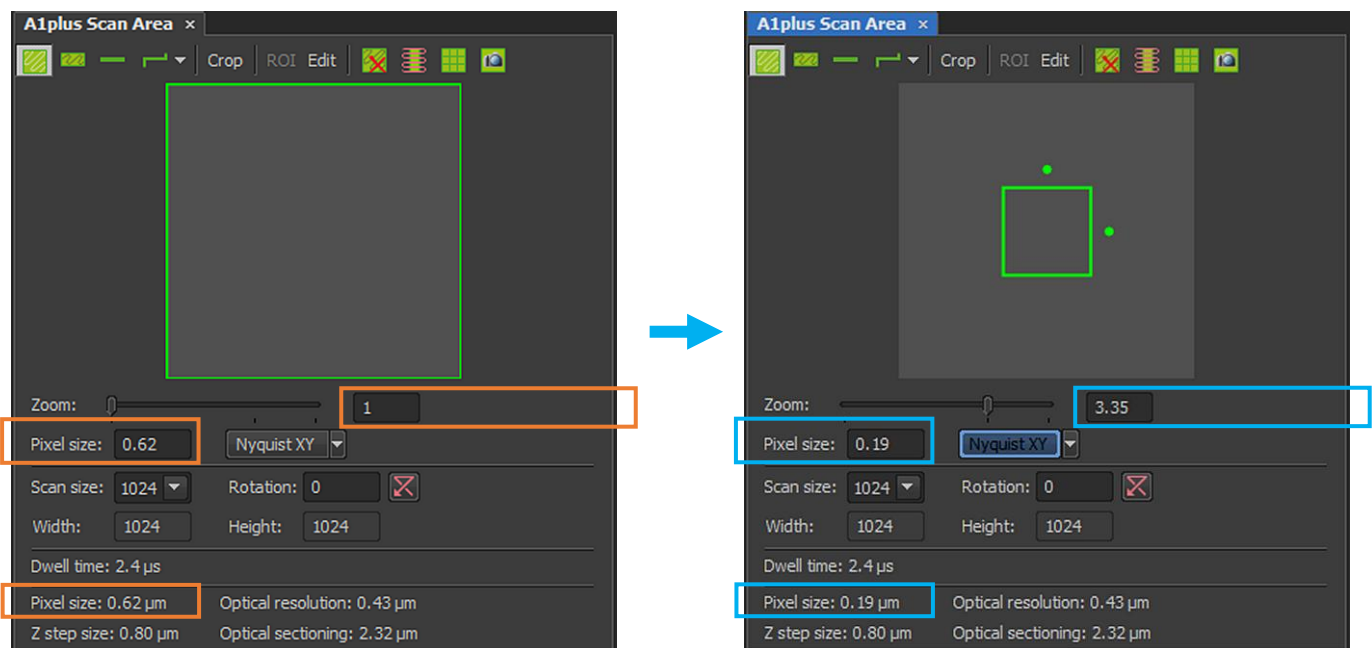
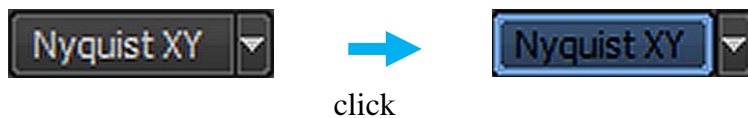


Por defecto, se encuentra en 0. Si se desea cambiar, digítese el valor deseado y teclee enter. El módulo mostrará el cambio de orientación.



### Nyquist XY

Establece el aumento acorde con la Teoría del muestreo para la generación de una imagen óptima en XY. Este aumento dependerá de la combinación de longitudes de onda seleccionadas en “Channels” así como del objetivo a utilizar. Para activarlo, dar click sobre el botón “Nyquist XY”, el cual se resaltará en color azul.

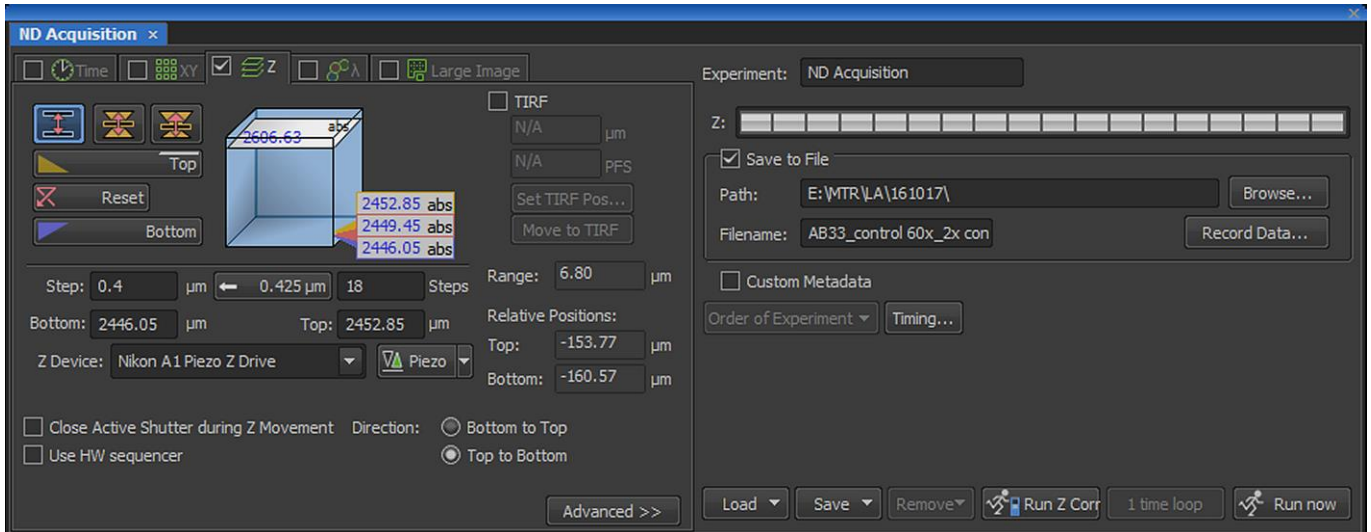


**A1plus Scan Area sin y con Nyquist XY activado. Se resaltan los cambios en la región de escaneo que son producidos al activarlo.**



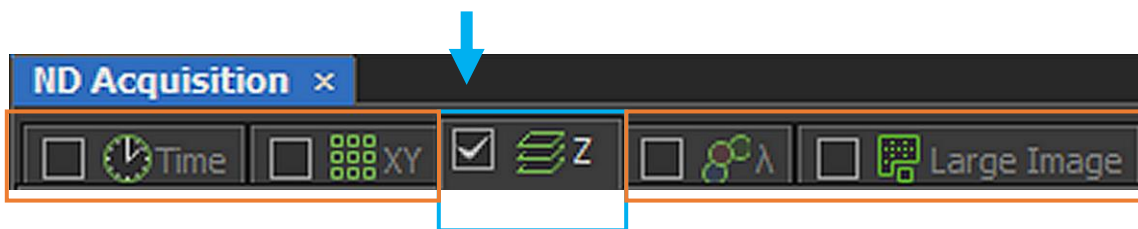
## IX. Módulo ND Acquisition

El módulo **ND Acquisition** permite realizar la captura de imágenes a lo largo del tiempo, secuencial de regiones distantes, en Z, en  $\lambda$ , de imagen en mosaico, o combinadas. Este módulo se utiliza en conjunto con los módulos “**A1plus Compact GUI**” y “**A1plus Scan Area**” para realizar su(s) función(es). Para la presente guía, solo se describirá el apartado de captura en Z.



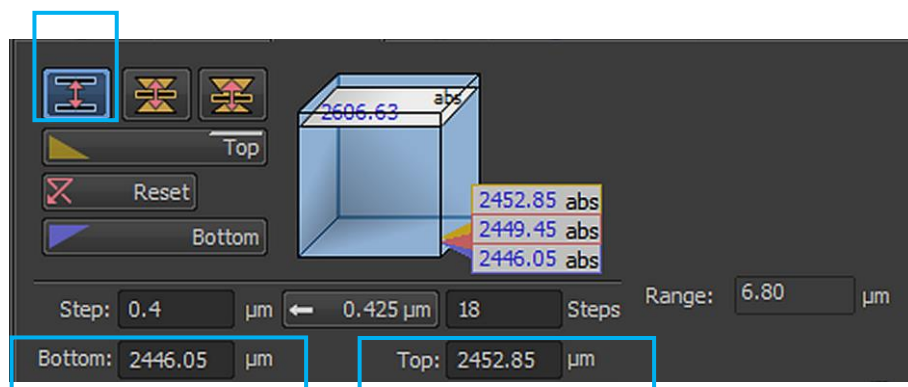
Módulo ND Acquisition

Para esto, verificar que solo el casillero de Z esté seleccionado:



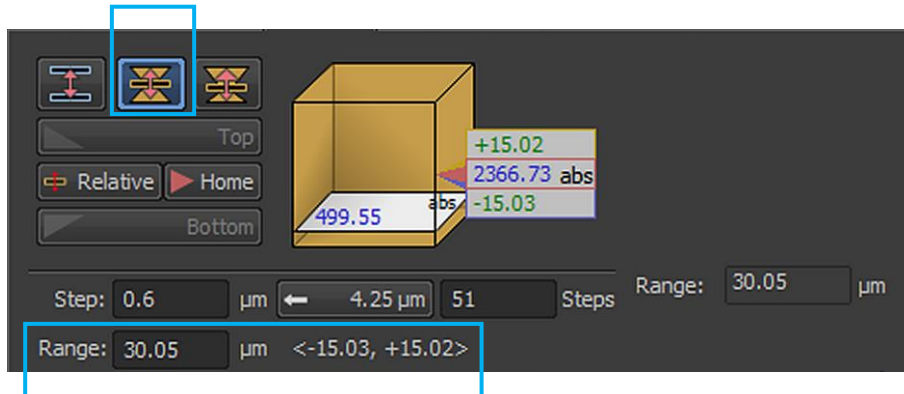
**ND Acquisition** permite establecer la región de captura de Z de tres maneras diferentes:

“**Defined by top bottom**”



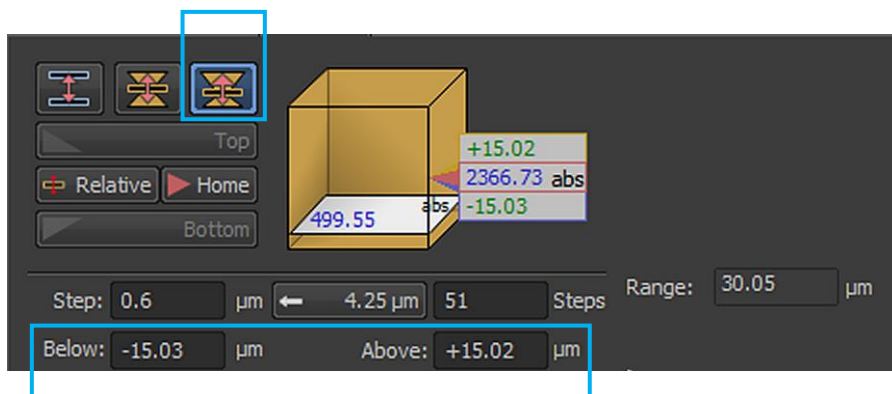
En esta modalidad el usuario define manualmente los límites superior e inferior de la captura.

### “Symmetric mode defined by range”



En esta modalidad el usuario realiza el enfoque de la región de interés y define un rango que será dividido de manera simétrica entre lo que está arriba y abajo del punto fijado.

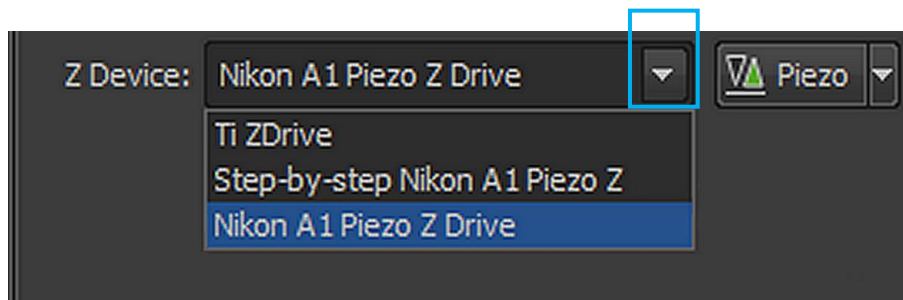
### “Asymmetric mode defined by range”



En esta modalidad el usuario realiza el enfoque de la región de interés y define un rango de cuantas micras hacia arriba y cuantas hacia abajo requiere capturar a partir del punto fijado.

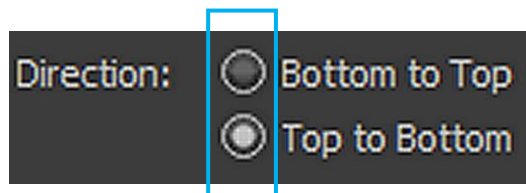
## Movimiento en Z

El estativo cuenta con dos sistemas de movimiento en Z; el propio (**Ti ZDrive**) y un piezo externo (**Nikon A1 Piezo Drive**). La distancia mínima que se puede obtener entre dos imágenes en Z es de 30 nm con el **Ti ZDrive** y de 10 nm con el **Nikon A1 Piezo Drive**. Otra diferencia entre ambos a considerar radica en que el **Nikon A1 Piezo Drive** es más rápido y más preciso que el **Ti ZDrive**, sin embargo el rango del **Nikon A1 Piezo Drive** está restringido a alrededor de 100  $\mu\text{m}$ , mientras que el **Ti ZDrive** no tiene límite en rango.



Para seleccionar cualquiera de ellos, dar click en el triángulo blanco invertido situado en la parte derecha de la sección y seleccionarlo mediante un click izquierdo.

## Dirección de captura en Z

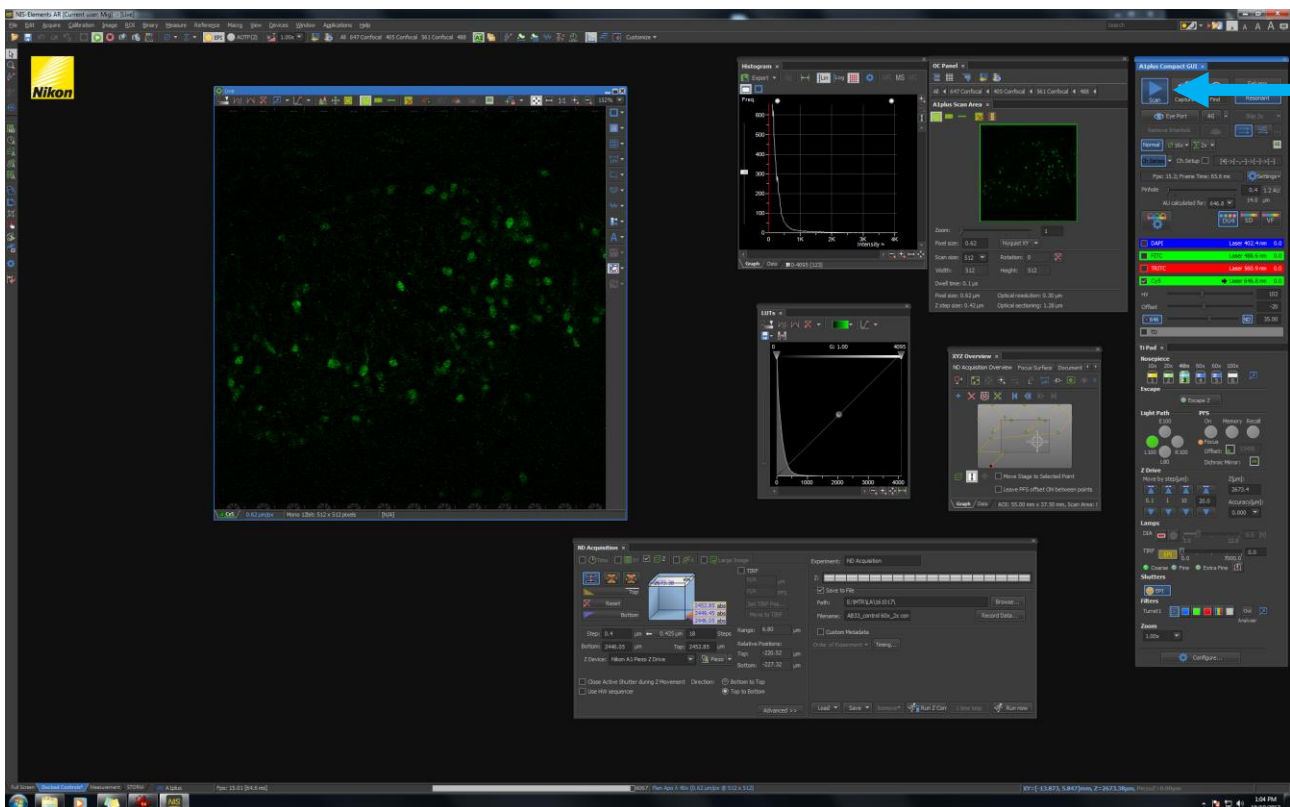


Esta opción permite elegir la dirección de captura, de arriba hacia abajo o viceversa. Para seleccionarlo, dar click en los círculos localizados al lado izquierda de las leyendas respectivas.

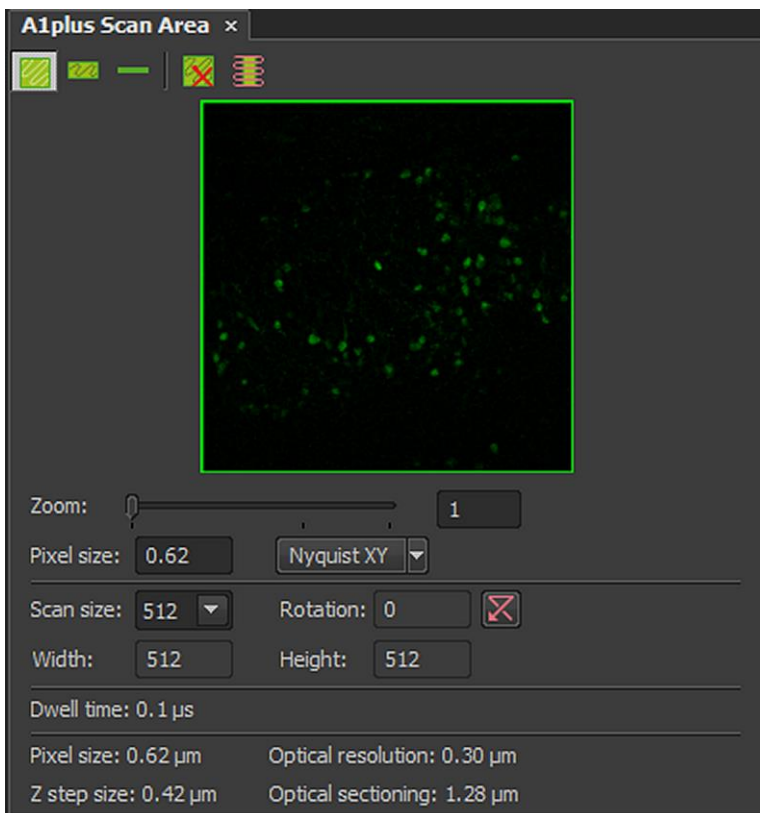
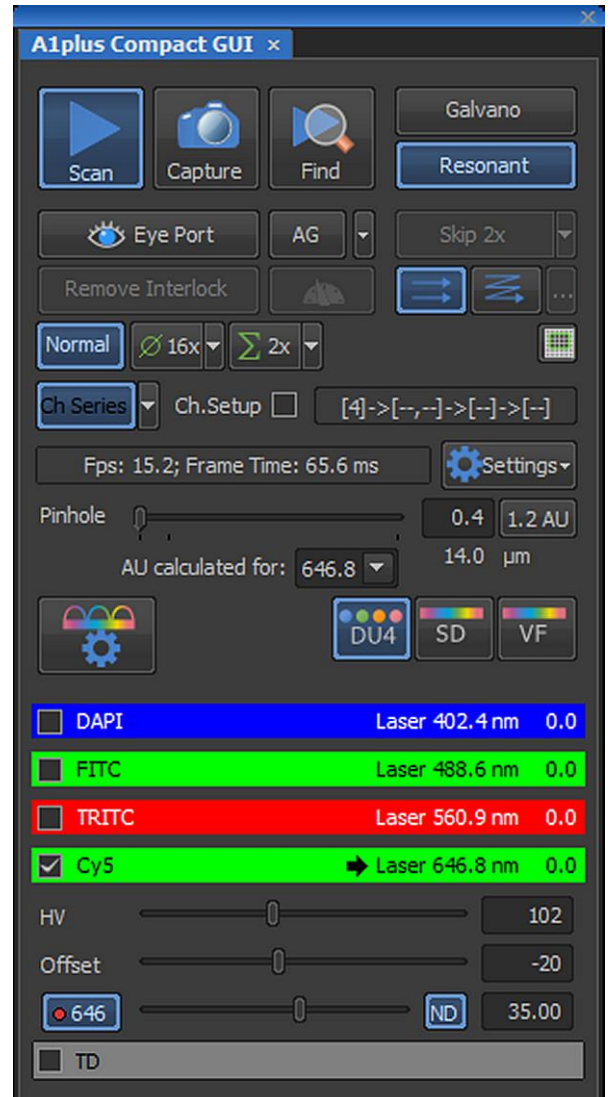
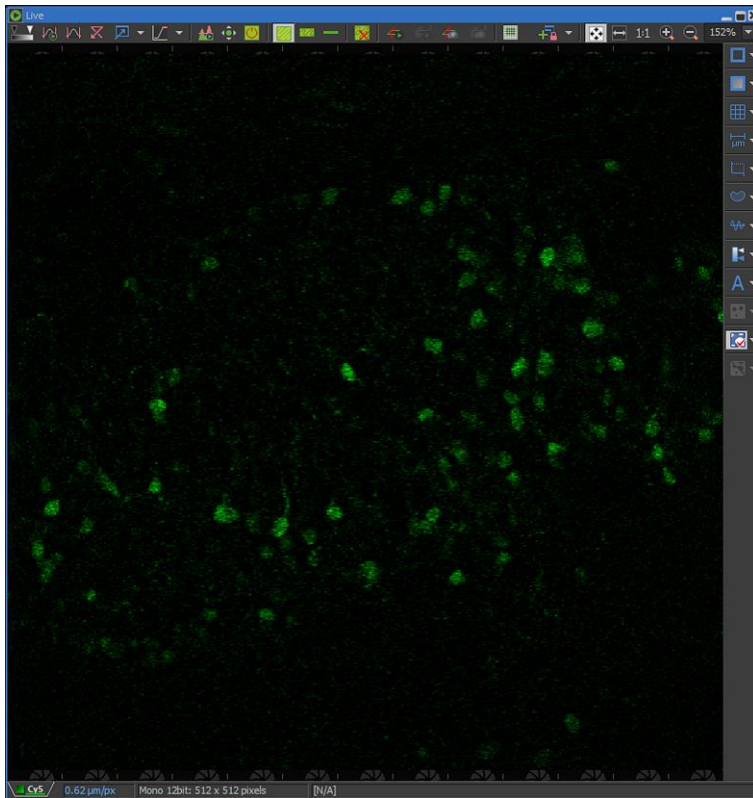
## X. CAPTURA DE IMAGEN MULTICANAL EN XYZ (Z-Stacks)

Para realizar este tipo de captura, la región de interés (ROI) deberá estar definida y los canales a muestrear deberán estar previamente optimizados de acuerdo a lo explicado en los apartados IV a VII de la presente guía. Cualquier duda con relación a la calidad de la imagen, favor de referirse a dichos apartados. La captura en Z puede ser realizada tanto con el escáner galvanométrico estándar (**Galvano**) como con el galvanométrico resonante (**Resonant**). Para este apartado, se utilizará una muestra que tiene los fluorocromos AlexaFluor<sup>®</sup> 594 y AlexaFluor<sup>®</sup> 647, además se le capturará la luz transmitida por el láser 561 y esto se realizará con el objetivo de 40x en XYZ con el escáner resonante y el **Nikon A1 Piezo Drive**. La captura en Z se realizará mediante el módulo “**ND Acquisition**” en el modo “**Defined by top bottom**” y basada en los ajustes de captura establecidos en los módulos “**A1plus Compact GUI**” y “**A1plus Scan Area**”.

36. Una vez detectado el campo a capturar, en el módulo “**A1plus Compact GUI**”, seleccionar parámetros que permitan un escaneo rápido de la muestra; por ejemplo, un solo canal, modo normal, 1024x1024, 1/4 frame/sec y Ch Series activado. Dar click en “**Scan**”. La región deberá observarse en el monitor:



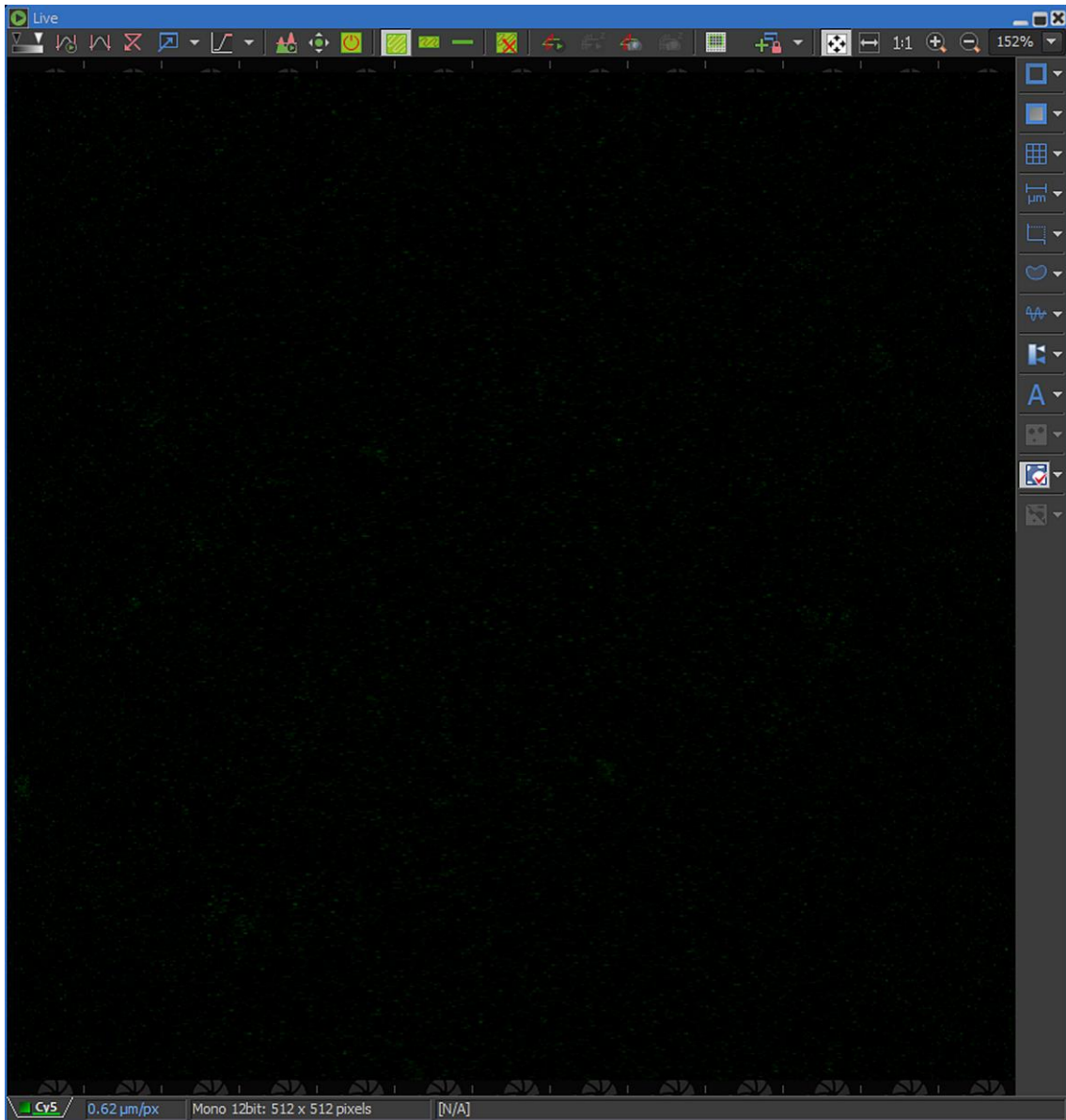
Captura de pantalla durante barrido de muestra de canal “Cy5” con escáner “Resonant”, “Scan”, modo normal, 512x512, Zoom 1x y Ch Series activado.



Ventana “Live” y módulos A1plus Compact GUI” y “A1plus Scan Area” durante barrido de muestra de canal “Cy5” con escáner “Resonant”, “Scan”, modo normal, 512x512, Zoom 1x y Ch Series activado.

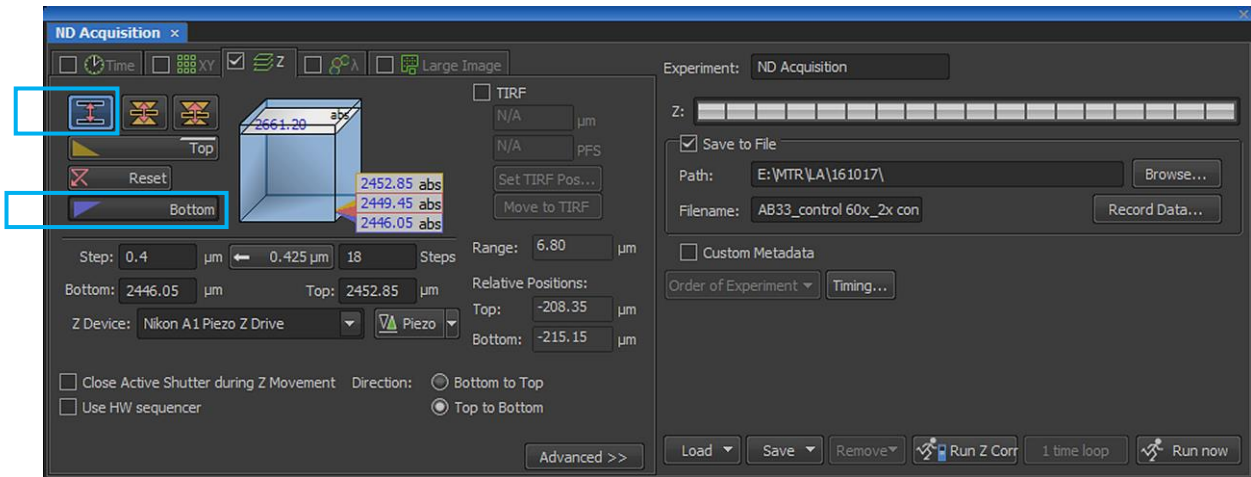


Cerciorarse que “**Z Speed**” del joystick esté en “**Ex Fine**” y que el modo de **Z** seleccionado sea “**Defined by top bottom**”. Mientras está activo “**Scan**”, desplazarse hacia uno de los extremos (ya sea superior o inferior) de **Z** de la ROI mediante la perilla de macro/micrométrico del estativo, el digipod o la rueda del mouse posicionada sobre la ventana “**Live**”. La imagen en “live” deberá cambiar hasta que casi desaparezca la región **Z** de interés. Como auxiliar de la dirección de profundidad a la que se está dirigiendo, puede fijarse en el cubo del módulo “**ND Acquisition**” y observar si va descendiendo o ascendiendo. Para la presente guía, se comenzará por marcar la parte inferior. Una vez ahí, dar click en “**Bottom**”.

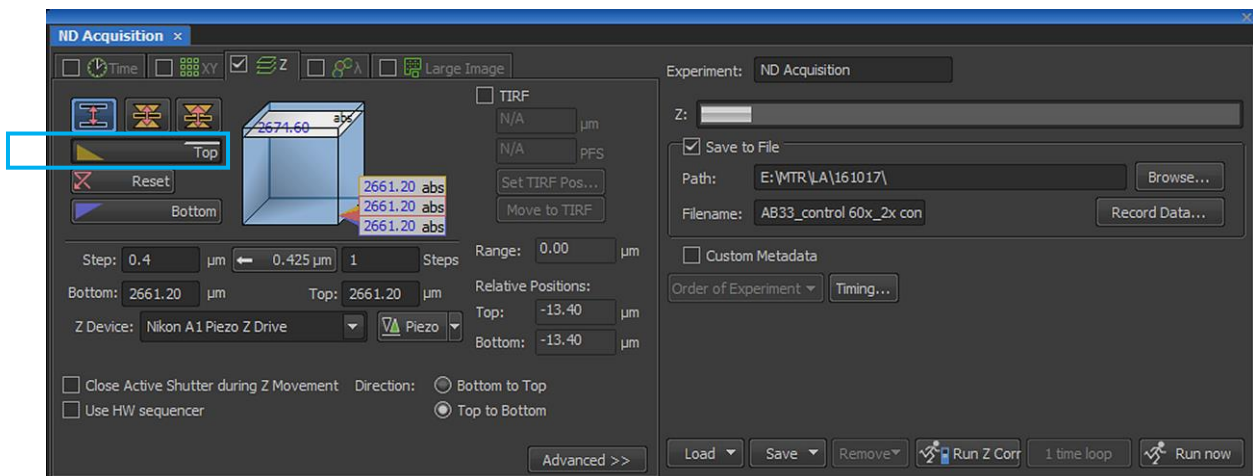


Ventana “Live” durante barrido de muestra de canal “Cy5” mostrando la porción inferior de la muestra en **Z**.

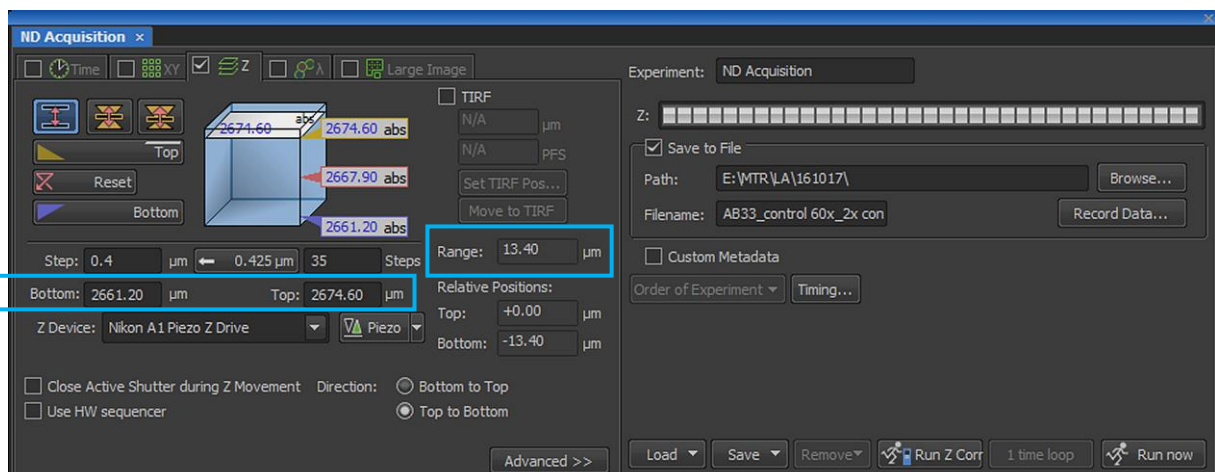




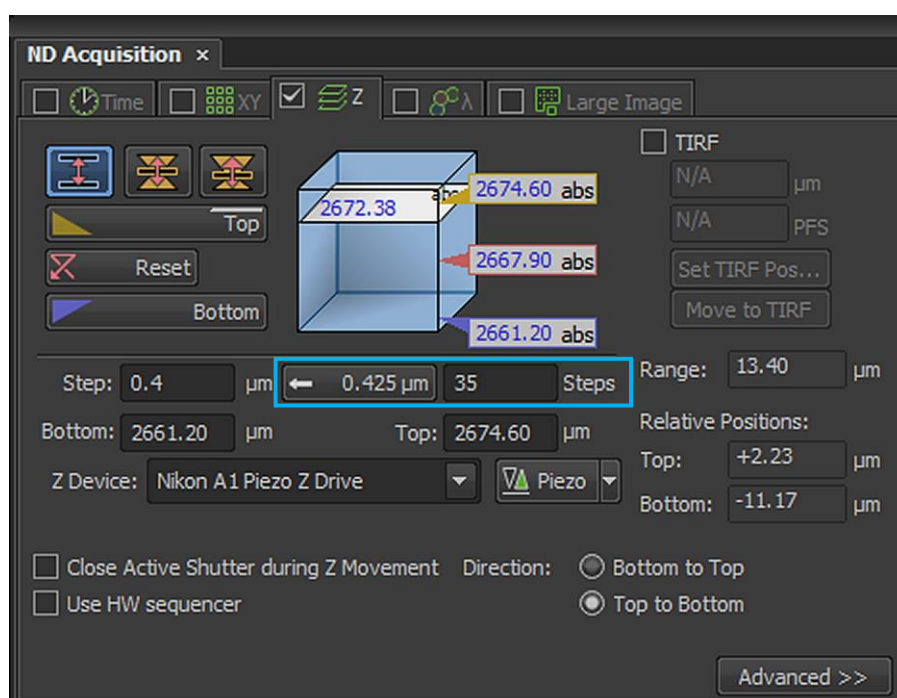
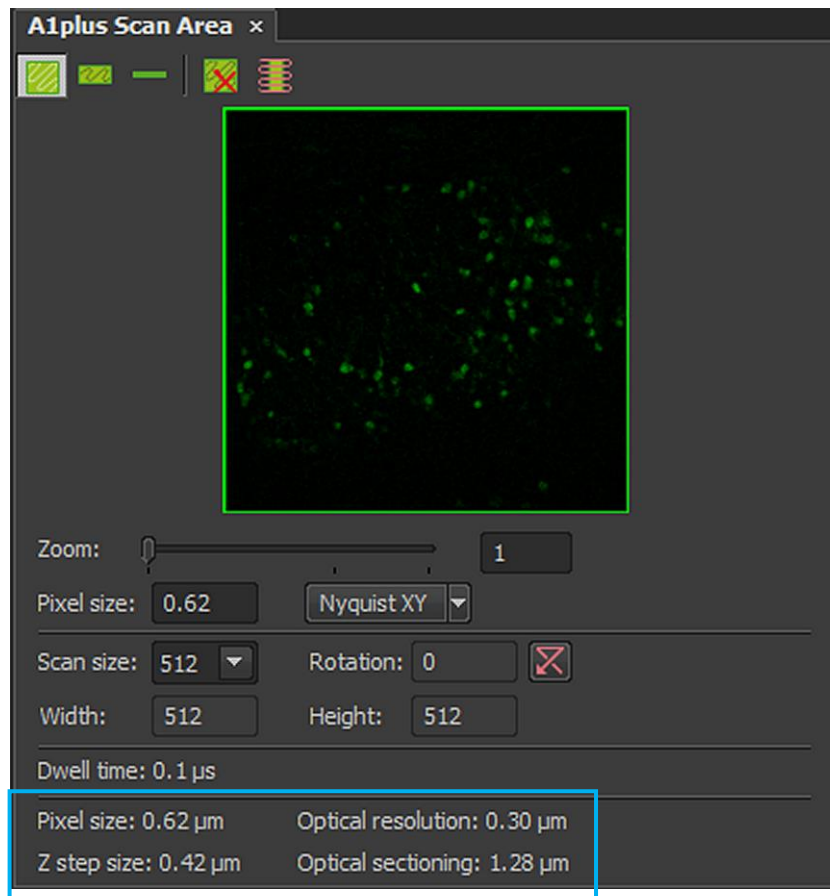
37. Una vez marcada la porción inferior, desplazarse hacia el extremo de la porción superior y una vez ahí, dar click en “**Top**”. A continuación, dar click en “**Scan**”. Esto detendrá momentáneamente el escaneo de la muestra.



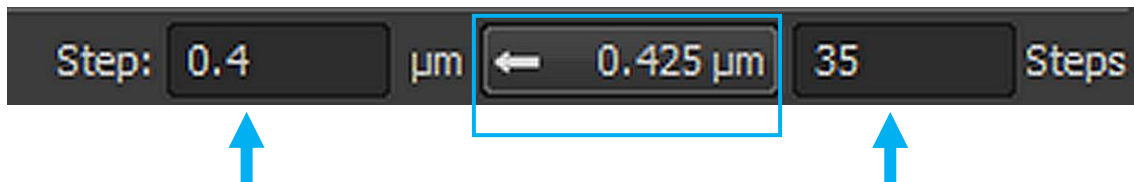
Una vez definido el “Arriba” y el “Abajo”, tendremos el grosor de la región a capturar (**Range**):



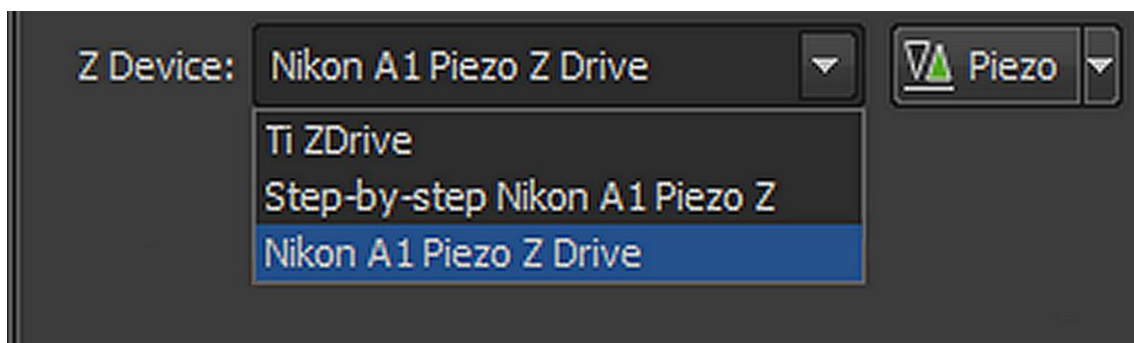
Basado en la Teoría del muestreo para la generación de una imagen óptima, el módulo “**ND Acquisition**” sugerirá el intervalo ideal para una apropiada reconstrucción en Z de la región a escanear; esto se demuestra dando un vistazo al módulo “**A1plus Scan Area**”:



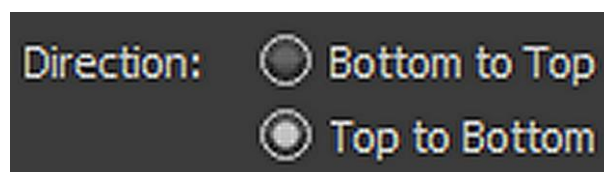
38. Puede aceptar el intervalo propuesto por el módulo “**ND Acquisition**” dando click sobre el botón con el valor que sugiere, puede introducir el valor de espaciamiento en Z que usted desee en la casilla “**Step**”, o puede introducir el número de cortes que desee en “**Steps**”



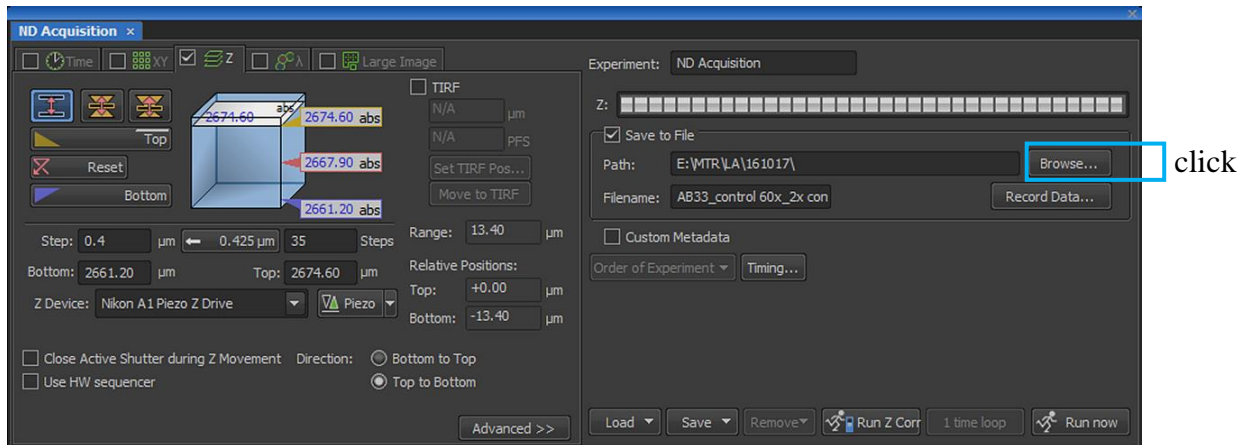
39. Si es un intervalo de captura menor a 100 µm, escoger el dispositivo de movimiento en Z “**Nikon A1 Piezo Drive**”, si es mayor a 100 µm escoger “**Ti ZDrive**”:



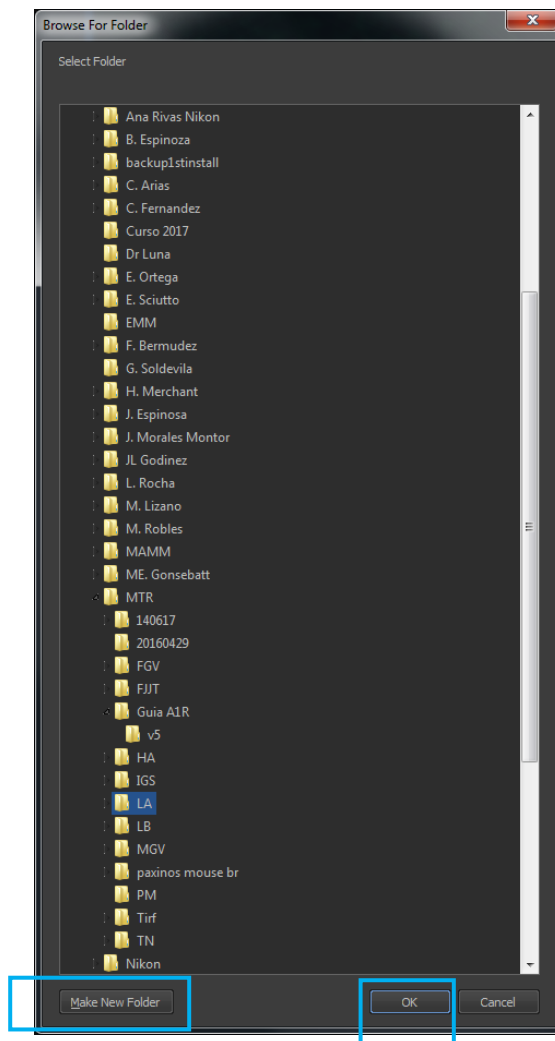
40. Para optimizar la velocidad de captura se recomienda asignar la dirección de escaneo de la última posición que se haya marcado (arriba o abajo) hacia la dirección contraria; la dirección seleccionada se mostrará en color blanco:



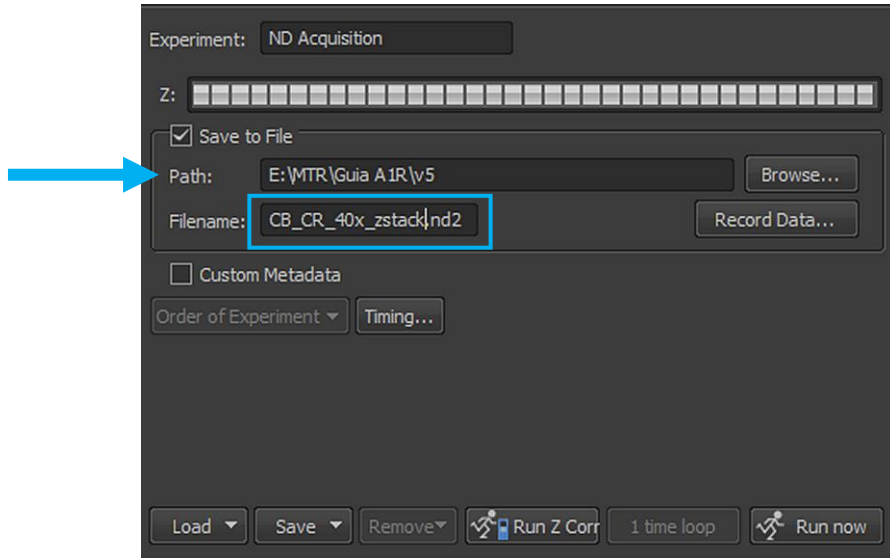
41. Una vez delimitados los parámetros de captura, es preferible guardar inmediatamente el archivo capturado. Para esto, hay que seleccionar el directorio donde será guardado el archivo. Del lado derecho del módulo “ND Acquisition”, dar click en “Browse...”:



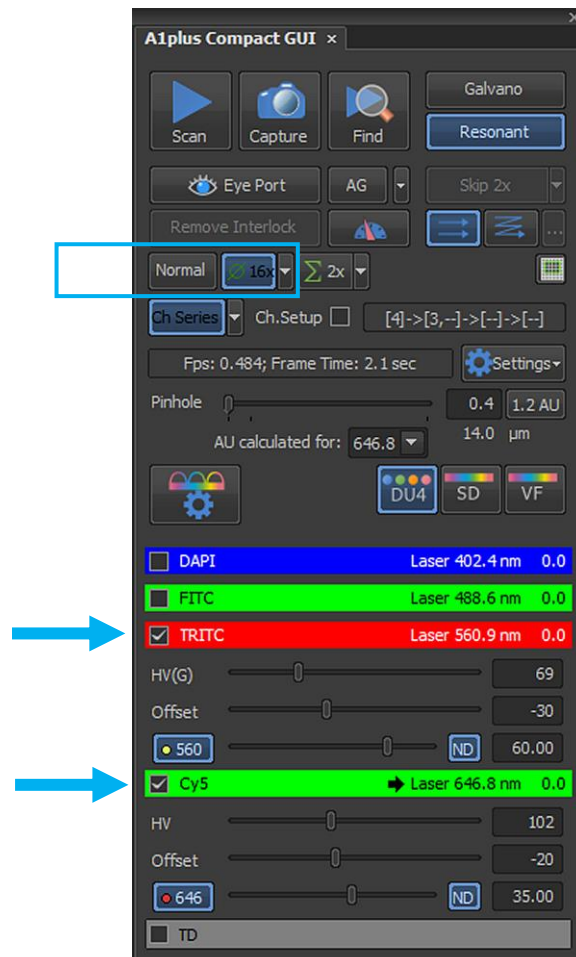
Esto abrirá un cuadro de dialogo que nos permitirá seleccionar el directorio para guardar la imagen (no olvidar que solo se permite guardar las imágenes en el disco duro “E”). También dará la opción de crear una carpeta nueva (“**M**ake **N**ew **F**older”) si así se desea. Una vez en el directorio escogido, dar click en “**O**K”.



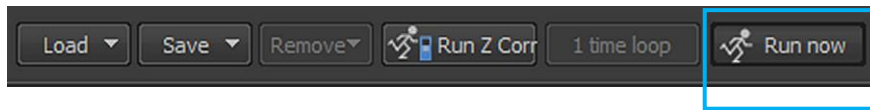
42. La ruta del directorio seleccionado se mostrará en “**Path:**”. Ahora, en “**Filename:**”, asignar nombre a la imagen a guardar respetando la extensión “.nd2”



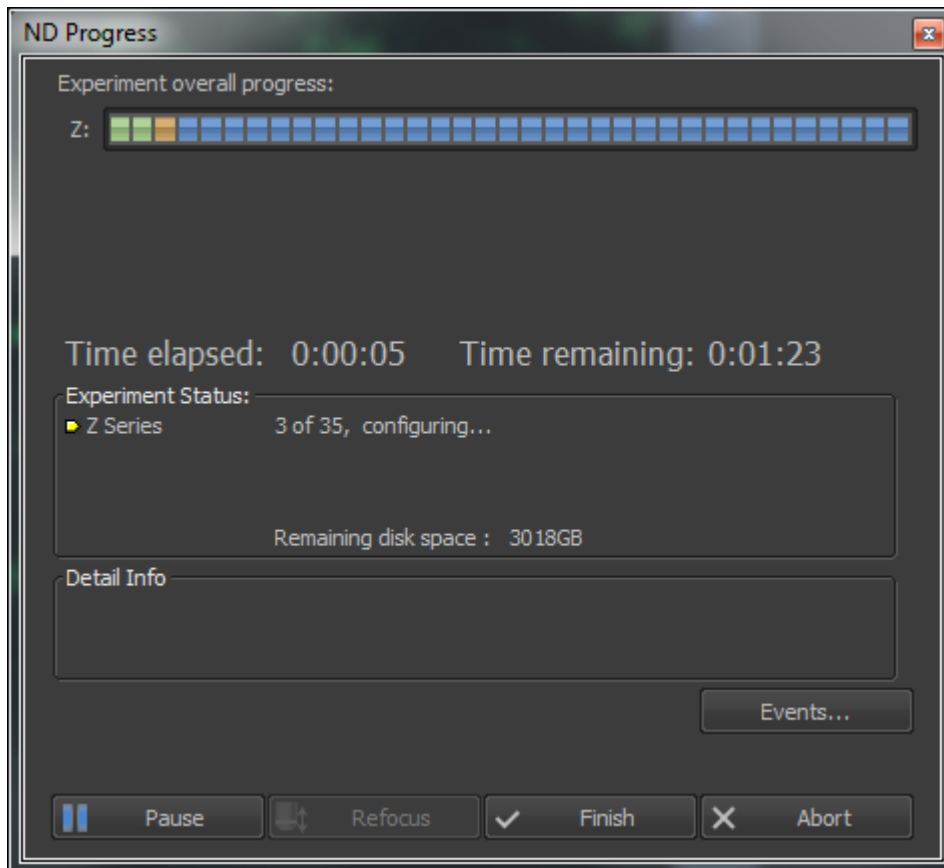
43. En el módulo “**A1plus Compact GUI**”, activar los canales a capturar, así como las promediaciones de imagen respectivas (para el caso del **Resonant** se recomienda **16x**).



44. En el módulo “**ND Acquisition**”, dar click en “**Run Now**”



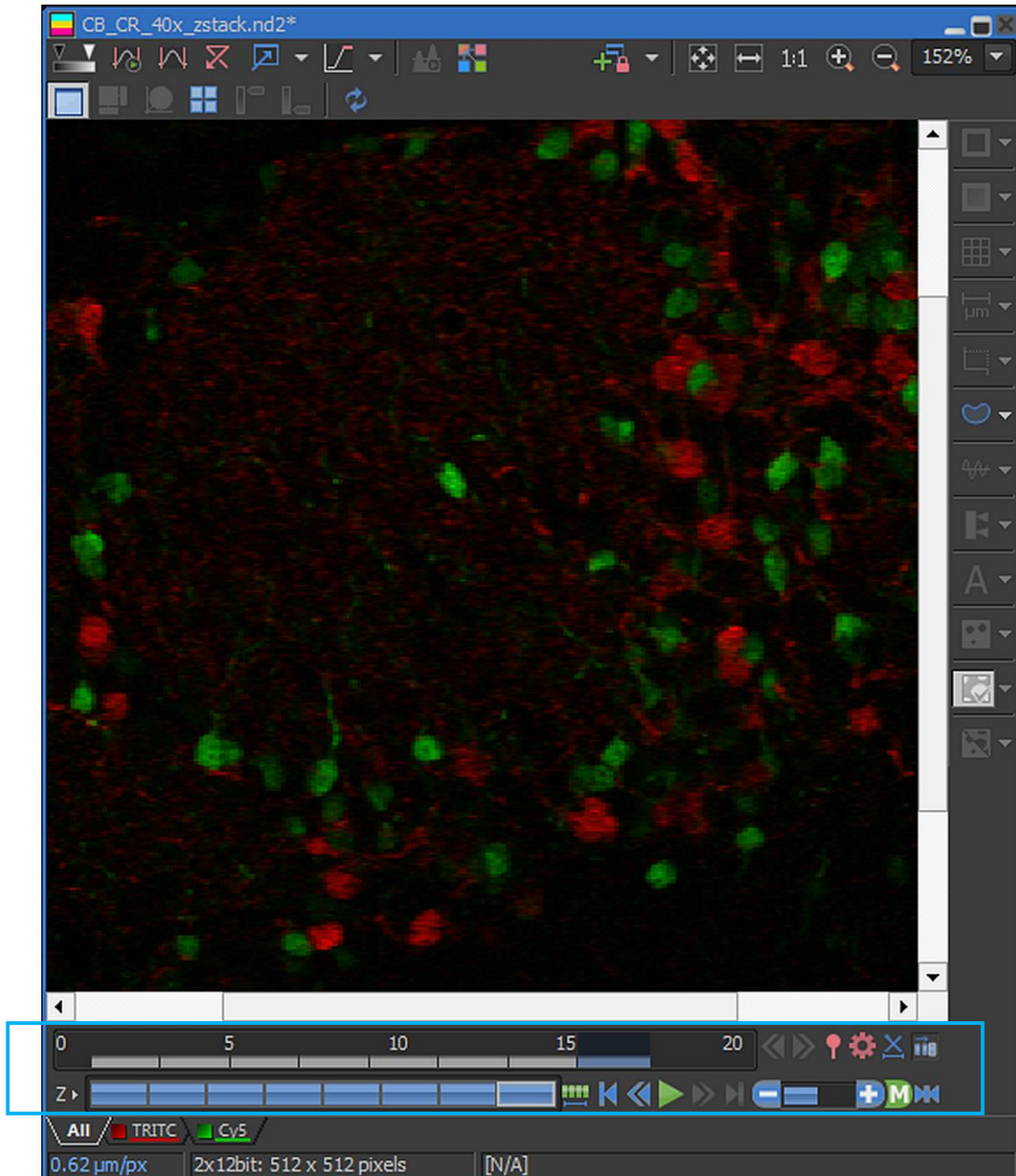
Aparecerá la ventana “**ND Progress**” mostrando el avance de la captura:



En la parte inferior de “**ND Progress**” se muestran algunos comandos; si por alguna razón se quiere terminar la captura antes de que termine en el rango indicado, se puede optar por terminar la captura guardando lo capturado hasta ese momento dando click en “**Finish**” o si se quiere reiniciar la captura antes de que termine dar click en “**Abort**”. Al finalizar la captura, “**ND Progress**” se cerrará automáticamente.

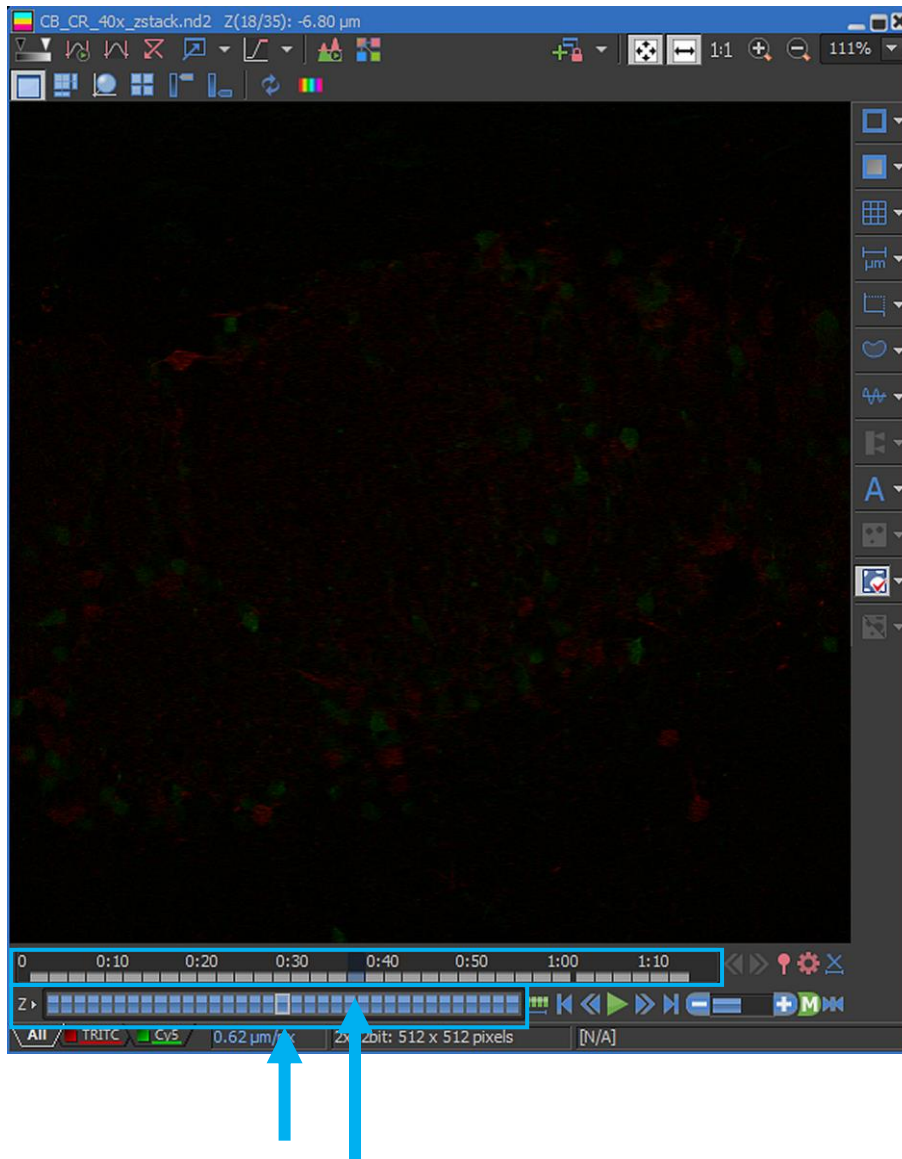


Además de “**ND Progress**”, aparecerá una ventana de captura con el nombre del archivo a guardar con un asterisco al final, que irá mostrando las imágenes que se van capturando. A diferencia de las ventanas “**Captured**” esta ventana tiene dos sliders en la parte inferior, uno de tiempo de captura y otro de profundidad; y controles de reproducción de la serie de imágenes. Además, esta ventana de captura permite la interacción con los elementos de canal y de Z mientras está ocurriendo la adquisición.



Ventana de captura en Z de muestra con canales “TRITC” y “Cy5” con escáner “Resonant”, “Scan”, modo 16x, 512x512, Zoom 1x y Ch Series activado.

45. Una vez concluida, la ventana de captura mostrará la imagen central de la misma:



46. Ahora se puede proceder a buscar otra región de interés. Para esto, es más rápido hacerlo directamente desde el estativo. Para ello, dar click otra vez en “**Eye Port**”:



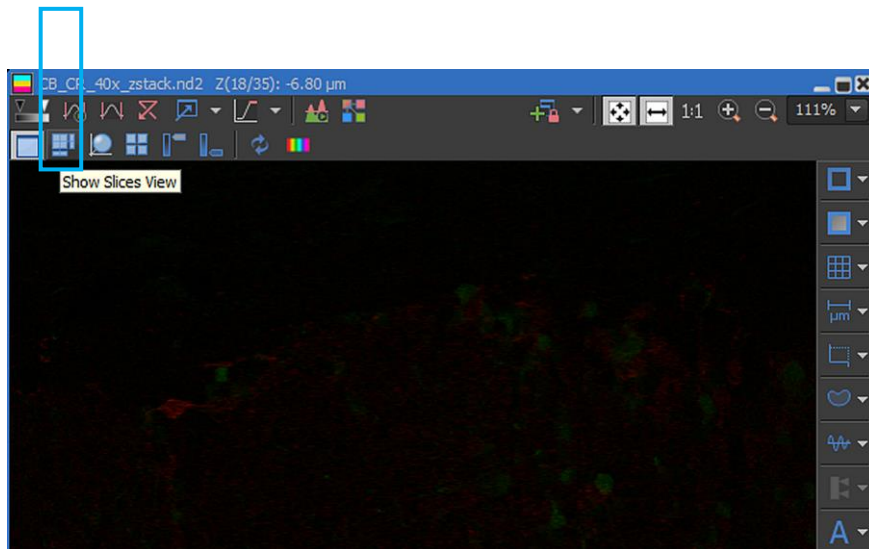
47. Repetir secuencialmente los pasos 17, 18, 19, 30, 31 y 32 por cada imagen XY que se desee capturar, y adicionalmente los pasos 36 a 44 por cada imagen XYZ.

## XI. Opciones de Visualización de Imágenes XYZ

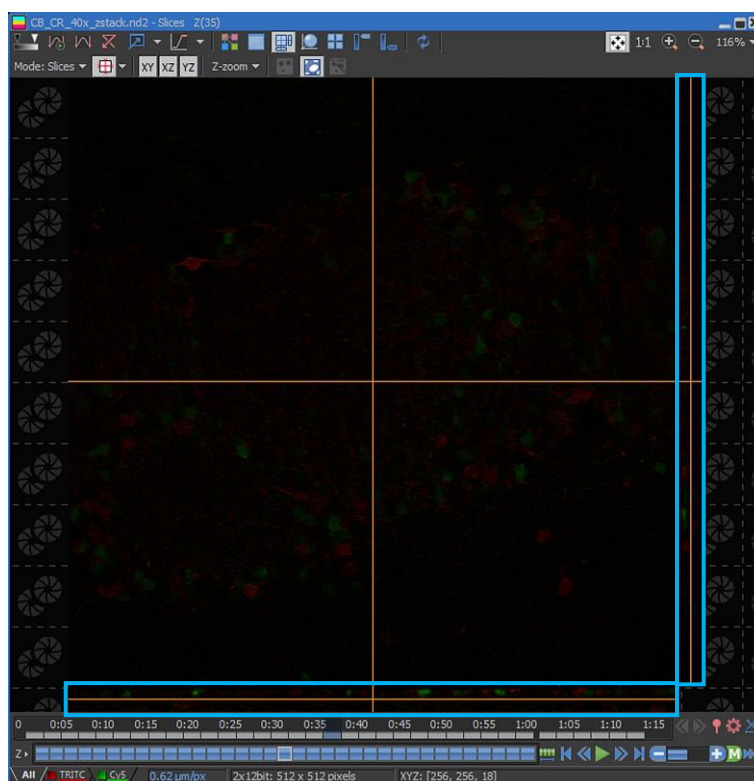
En la porción superior izquierda de la imagen capturada en Z, aparecerán una serie de íconos con funciones de visualización:



### Slices View

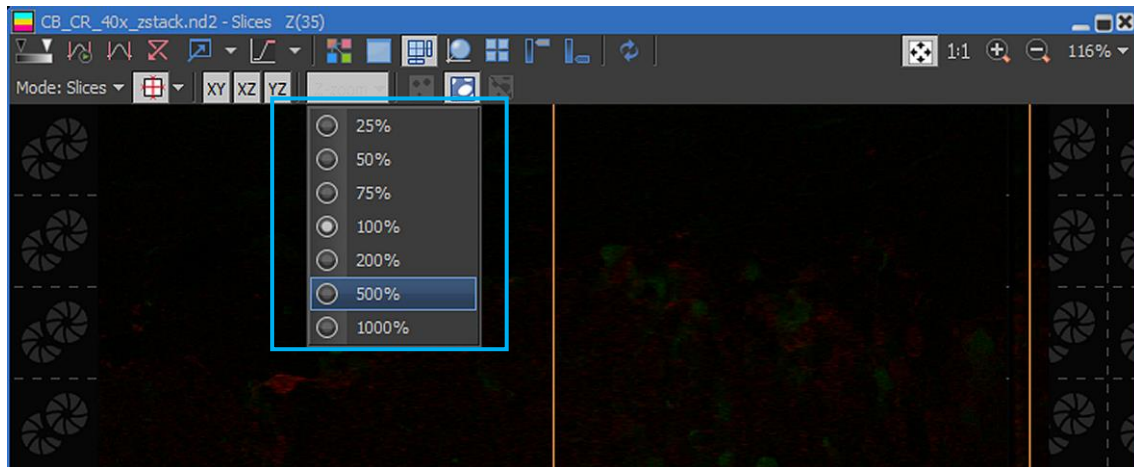


Al presionar este ícono, se abrirá una ventana nueva que mostrará la vista ortogonal de la captura XYZ:

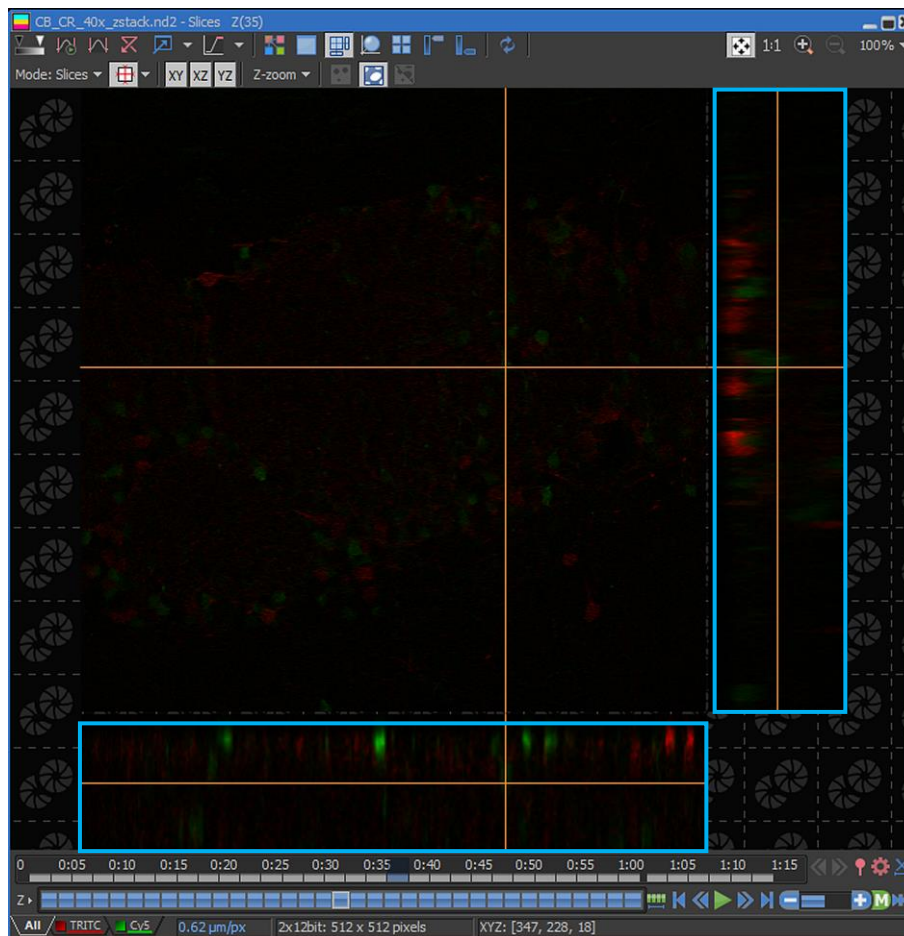




Si se da click en “Z-zoom” aparecerá el siguiente menú desplegable:

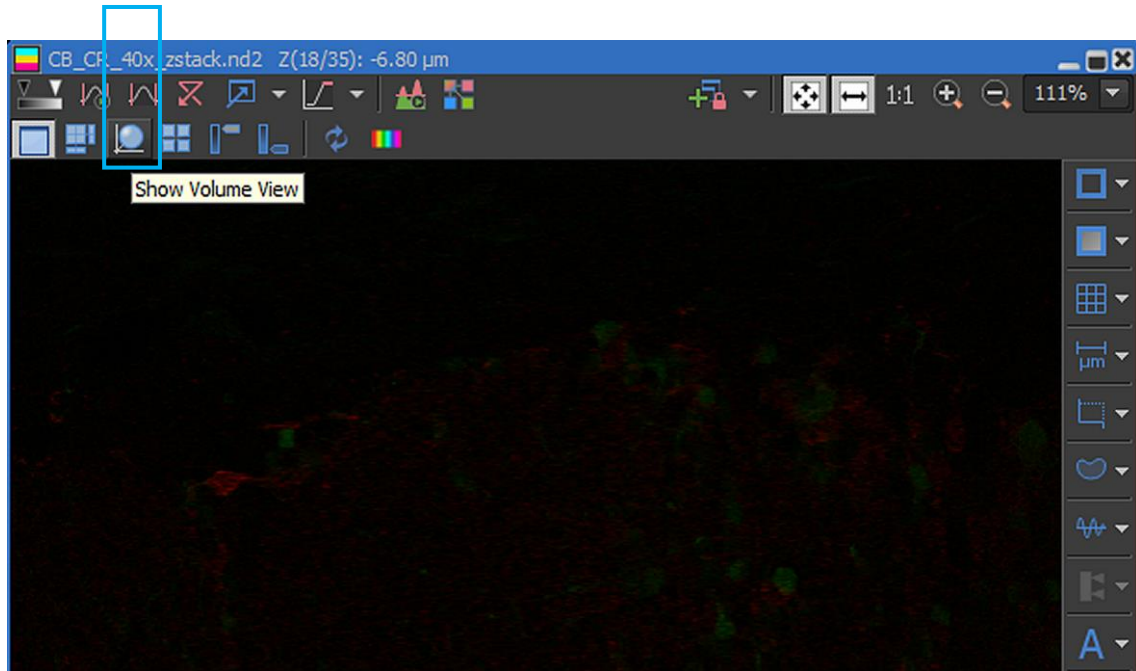


Se puede seleccionar una amplificación mayor para XZ y YZ, por ejemplo, **500%**:

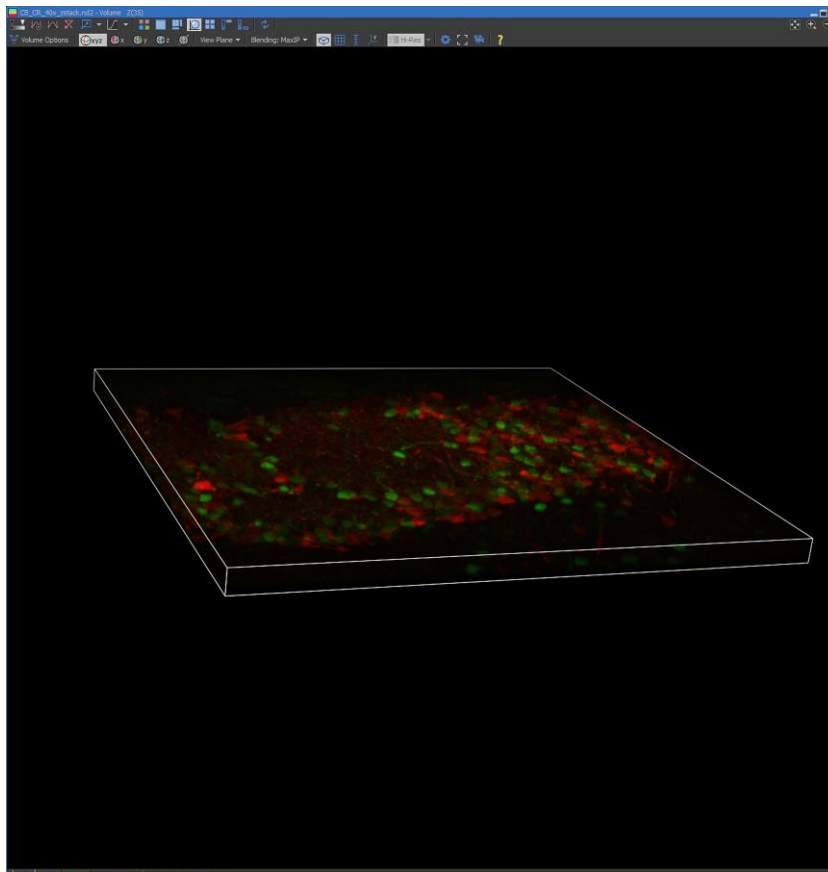


Para desplazarse por la imagen a algún punto de interés, dar click izquierdo sobre él para que se despliegue el XZ y el YZ de las regiones localizadas sobre las líneas naranja.

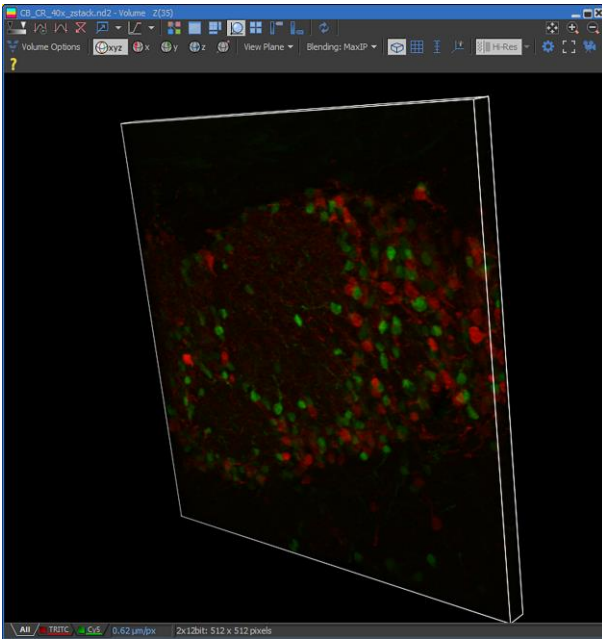
## Volume View



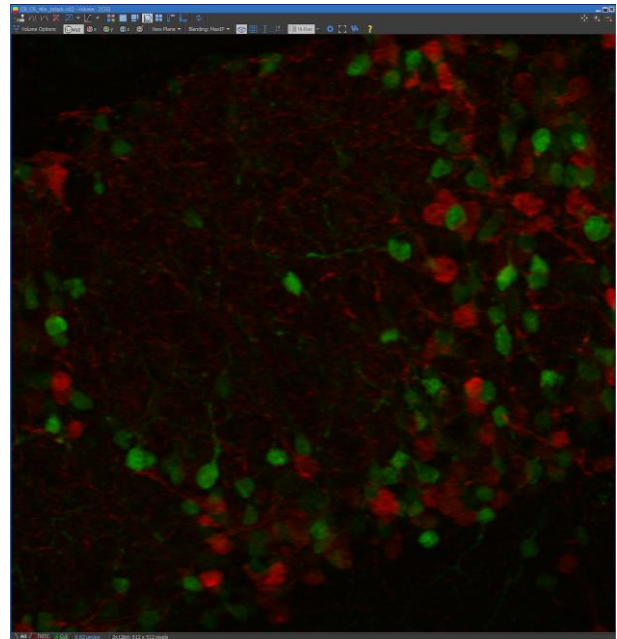
Al presionar este ícono, se abrirá una ventana nueva que mostrará la vista volumétrica de la captura XYZ:



Seleccionando dicha ventana, posicionando el mouse sobre la imagen y manteniendo presionado el click izquierdo se puede rotar en cualquier dirección que se desee; también se puede girar la rueda del mouse hacia un lado o hacia el otro para acercar o alejar la imagen:

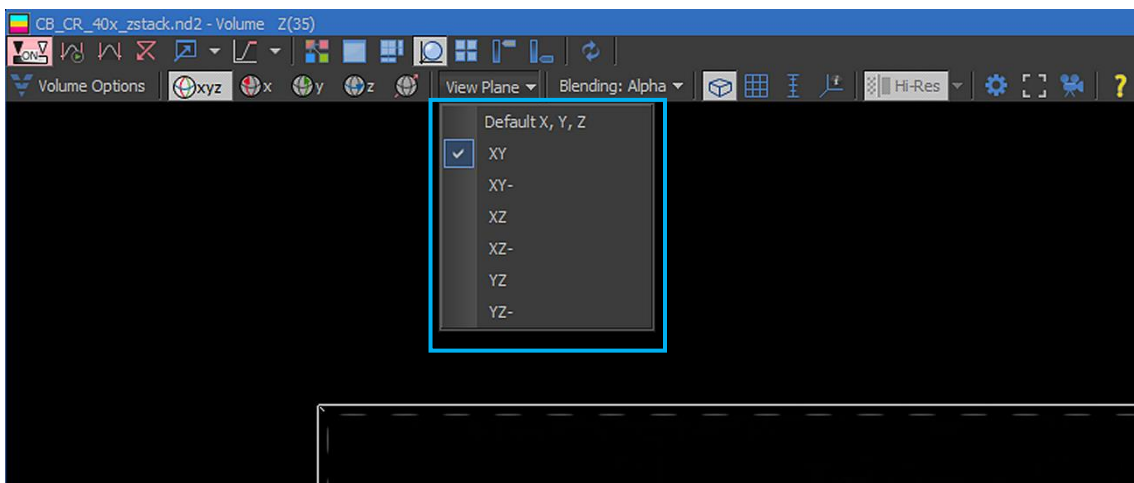


Rotación  
(mantener presionado botón izquierdo del mouse y mover)



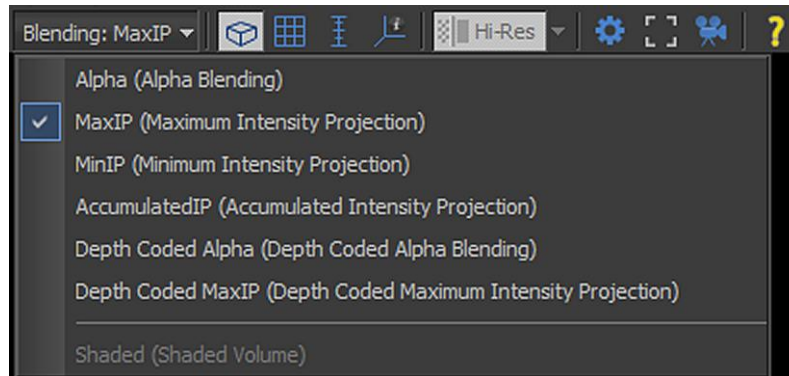
Acercamiento  
(girar la rueda del mouse hacia una u otra dirección)

Si desea ver posiciones arbitrarias, dar click en el comando “**View Plane**”. Aparecerá un menú desplegable con las opciones de visualización, donde puede seleccionar aquella que desee visualizar:

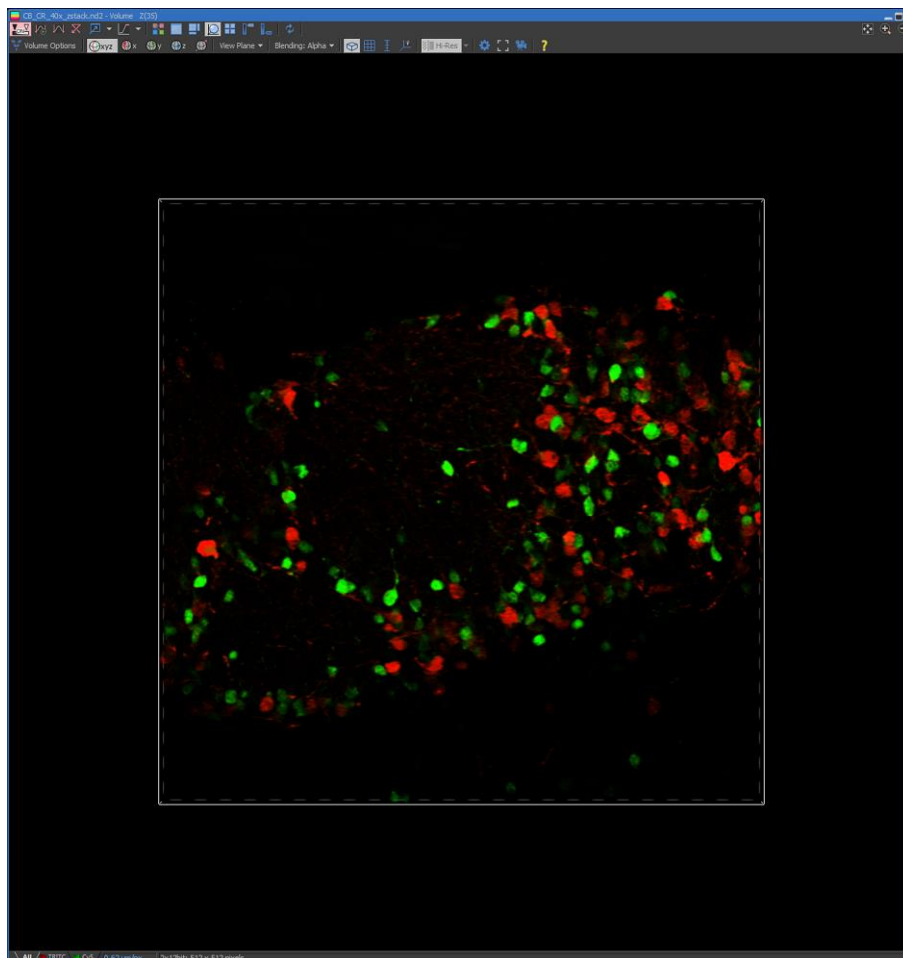




El programa utiliza un algoritmo para generar la vista volúmetrica que por defecto la genera utilizando la proyección de intensidad máxima; si se desea cambiar el modo dar click en “**Blending: MaxIP**” y dar click izquierdo sobre el modo que se desee:

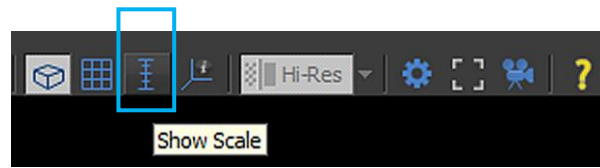


Al seleccionar el nuevo modo automáticamente se desplegará la nueva vista:

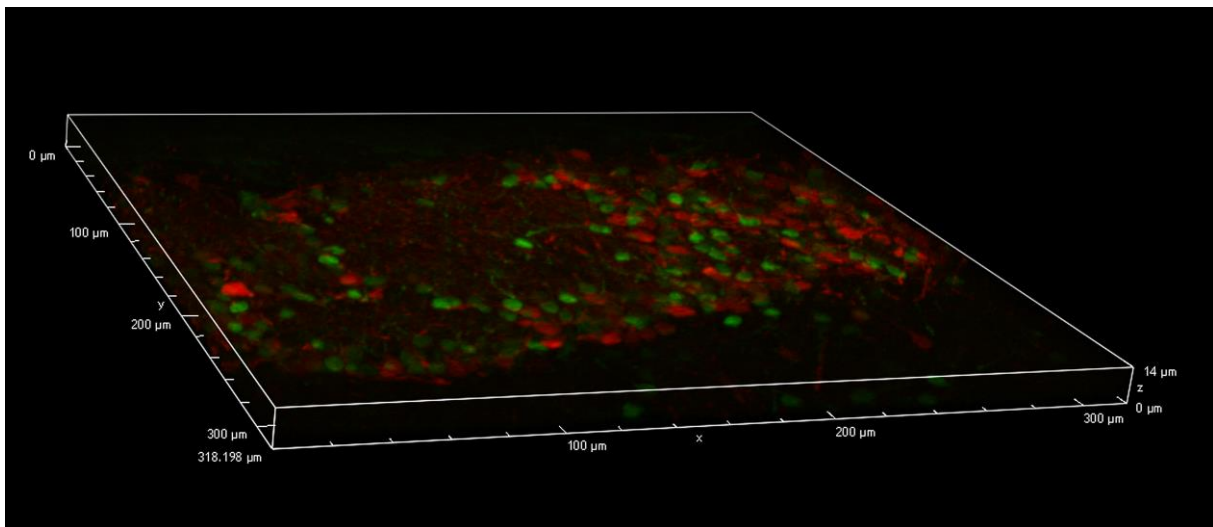


**Visualización Alpha Blending**

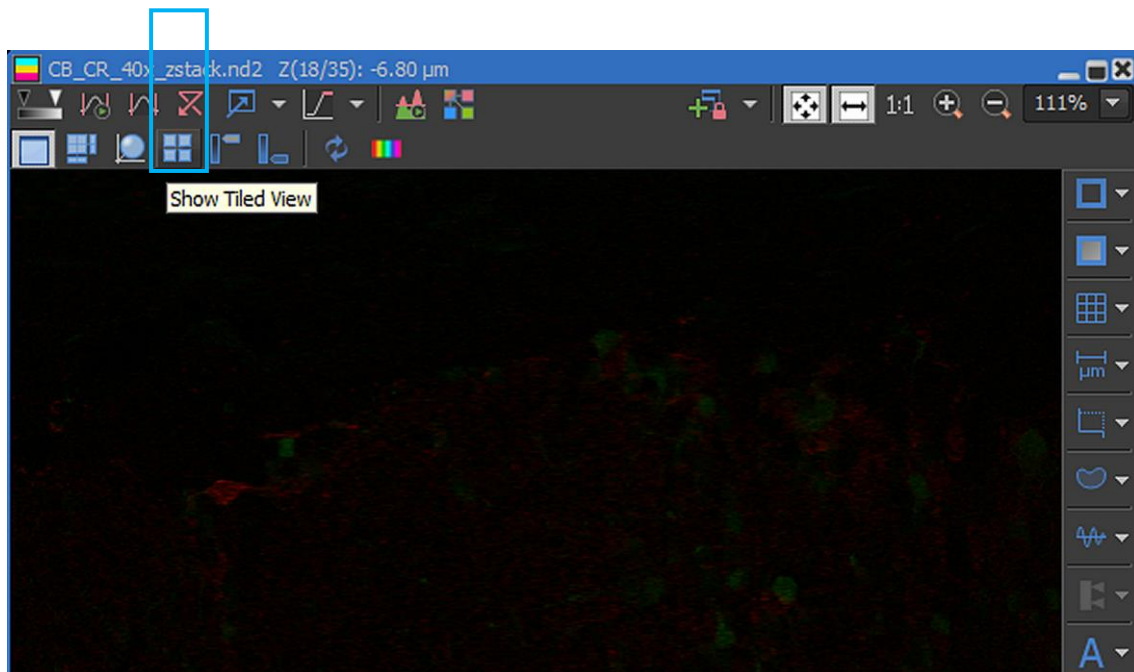
Es posible colocar escalas en la imagen, para esto se utiliza el comando “**Show Scale**”:



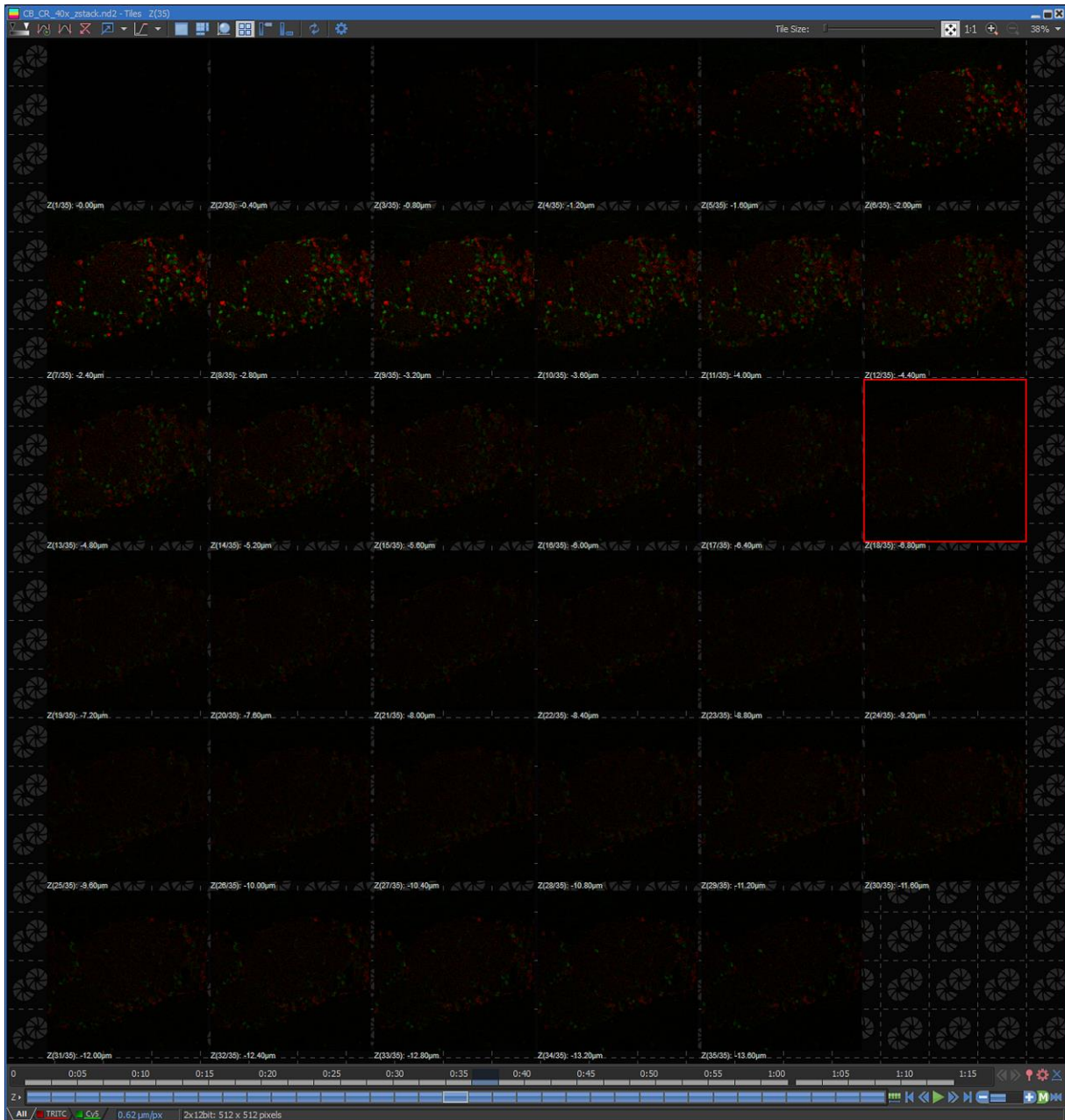
Para mostrarlas, dar click izquierdo sobre su ícono. Las escalas aparecerán en la imagen:



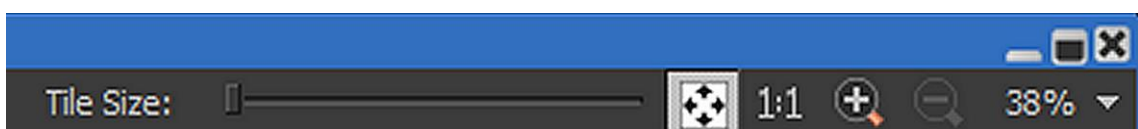
## Tiled View



Al presionar este ícono, se abrirá una ventana nueva que mostrará todas las imágenes XY de la captura XYZ, con su número de imagen y su profundidad relativa:

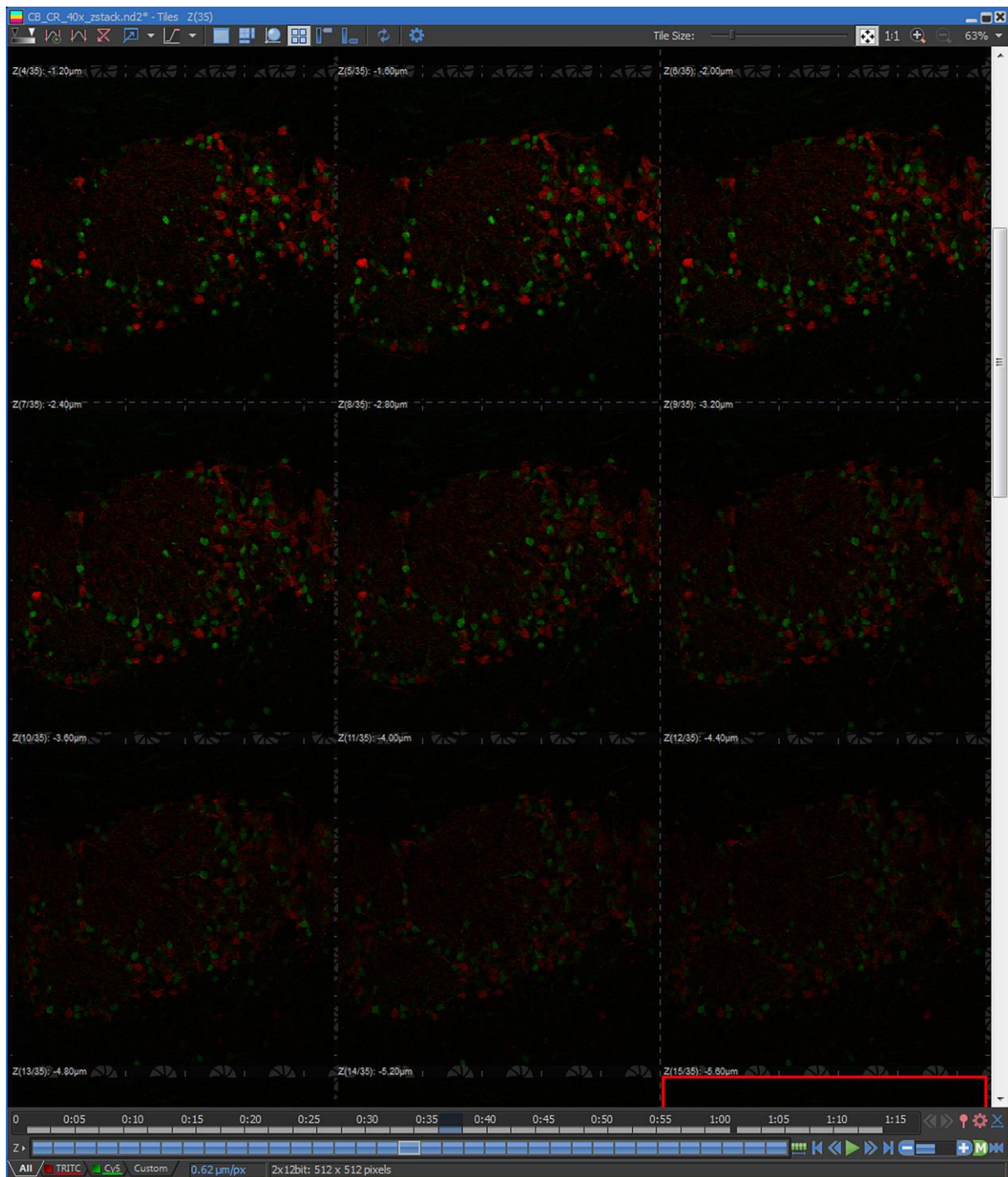


Del lado superior derecho de la vista en mosaico, existe un slider que permite realizar acercamiento:

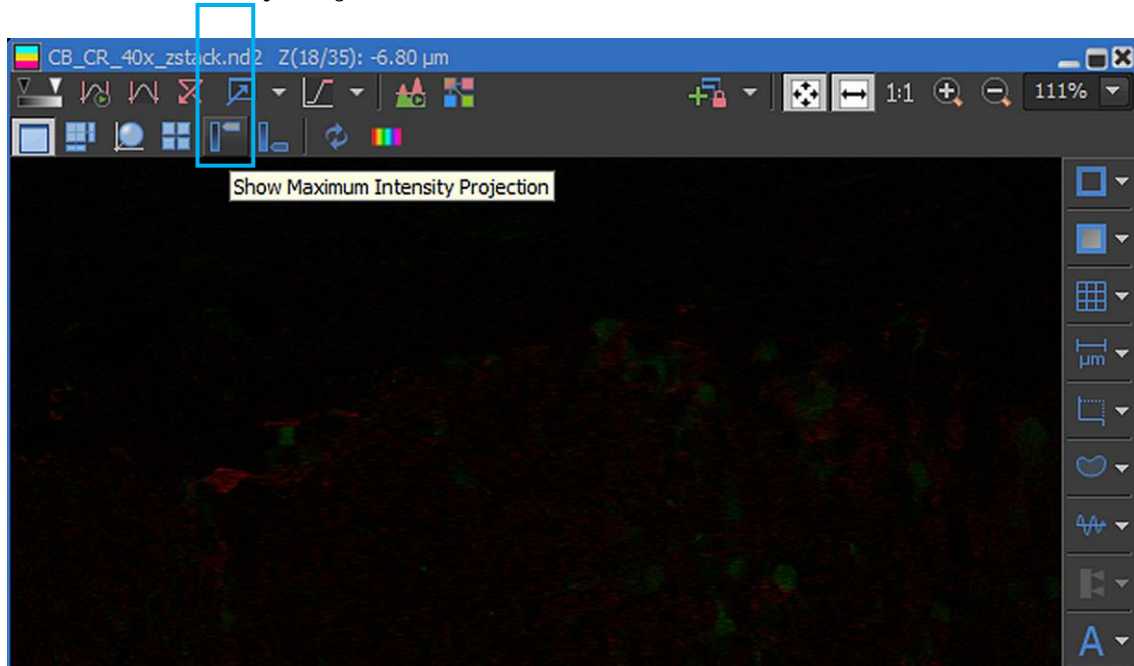




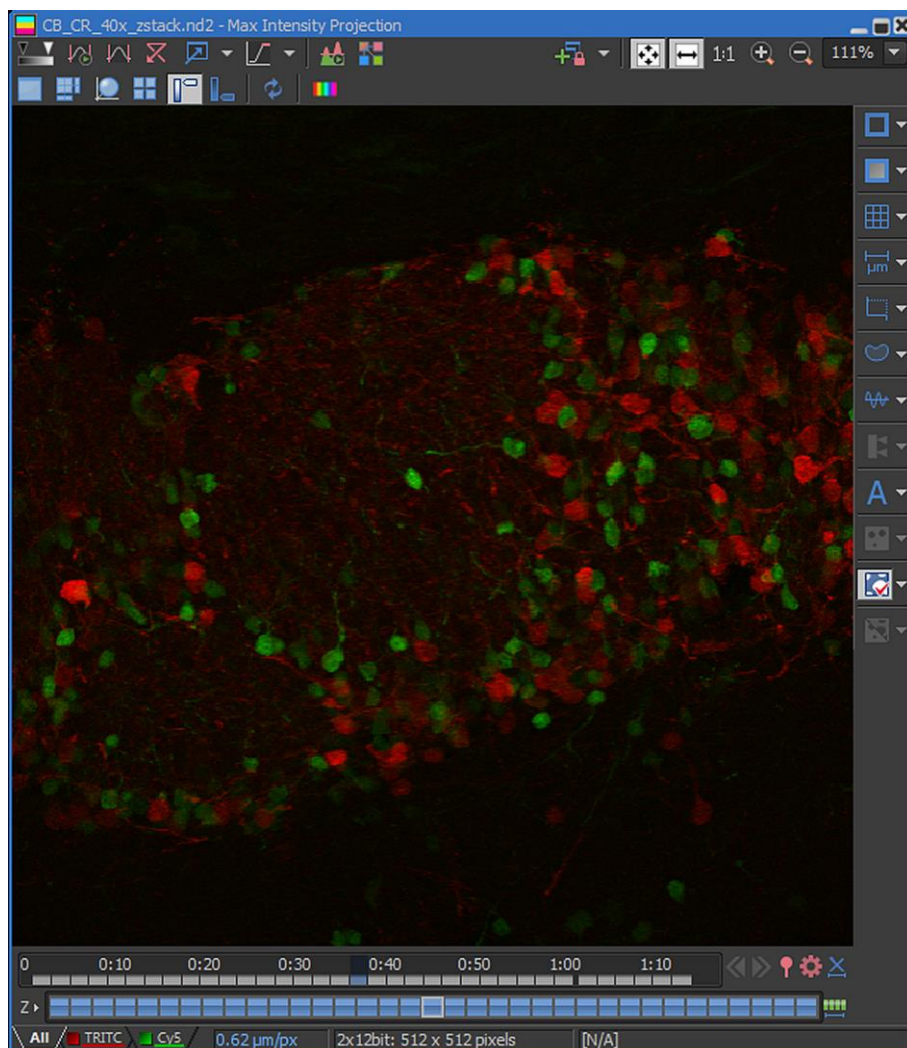
Al momento de seleccionar un nuevo valor de acercamiento, el cambio será mostrado automáticamente:



## Maximum Intensity Projection



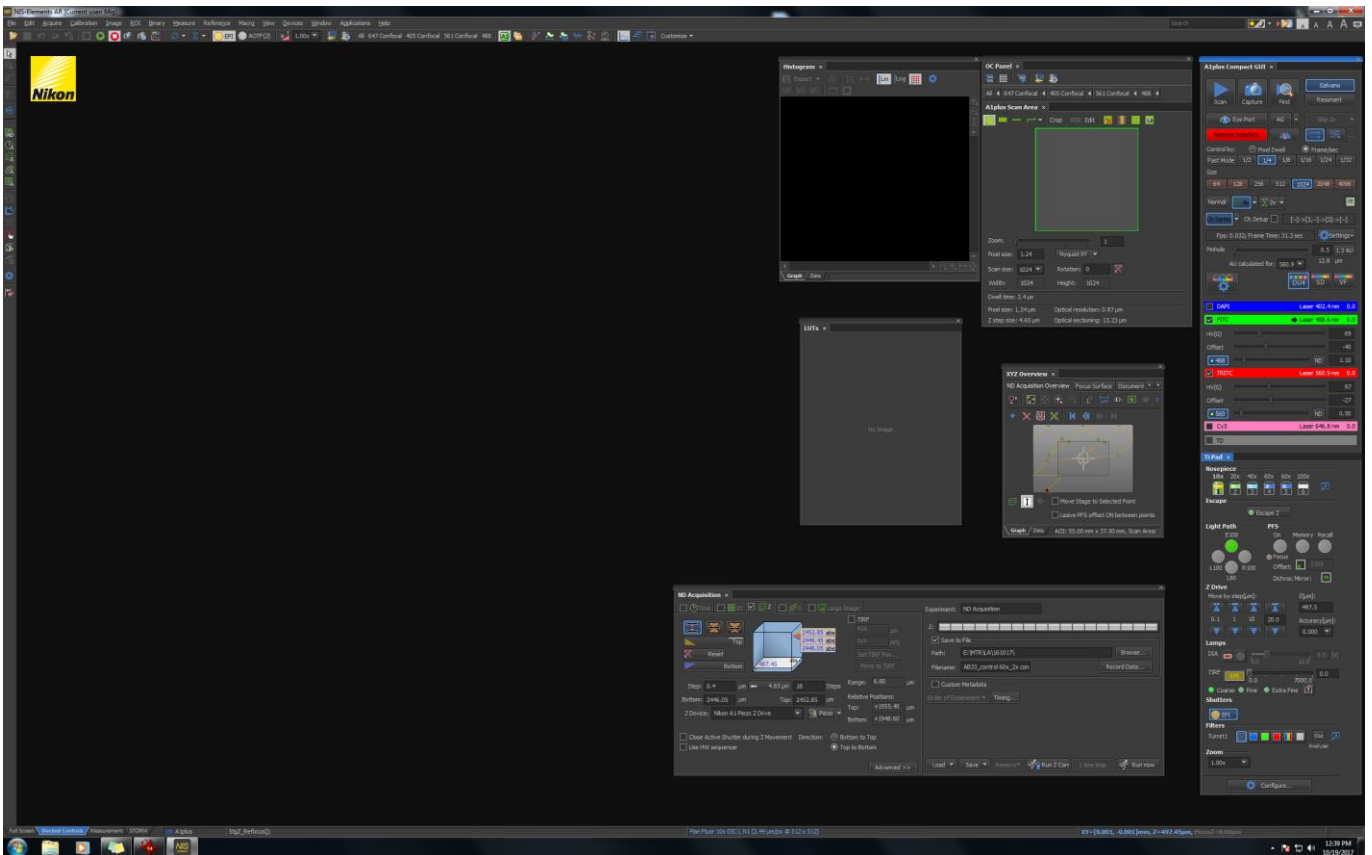
Al presionar este ícono, se abrirá una ventana nueva que mostrará la proyección de máxima intensidad:



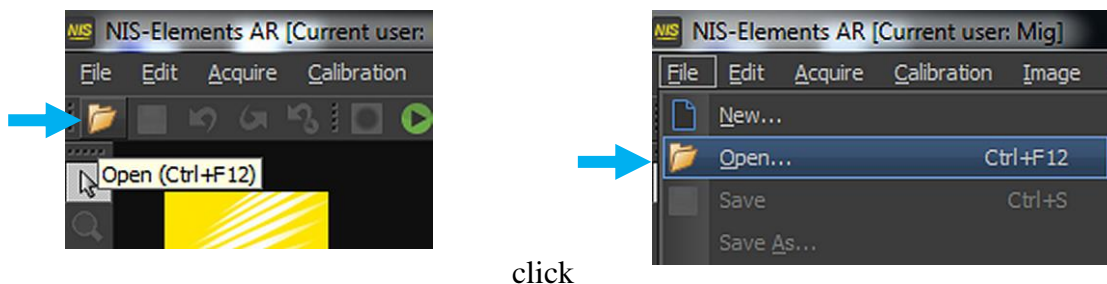
## XII. Reutilización de Ajustes de Captura de Imagen.

Como se comentaba en secciones atrás, las imágenes en formato.nd2 guardan una gran cantidad de metadatos; entre ellos se encuentran los ajustes de captura de la imagen, los cuales son útiles para reutilizar los ajustes de captura en el software, evitando la calibración de los mismos cada vez que se inicie una nueva sesión.

48. Realizar los pasos del 1 al 12 de la presente guía, para tener listo el programa “NIS Elements C” en modo confocal:

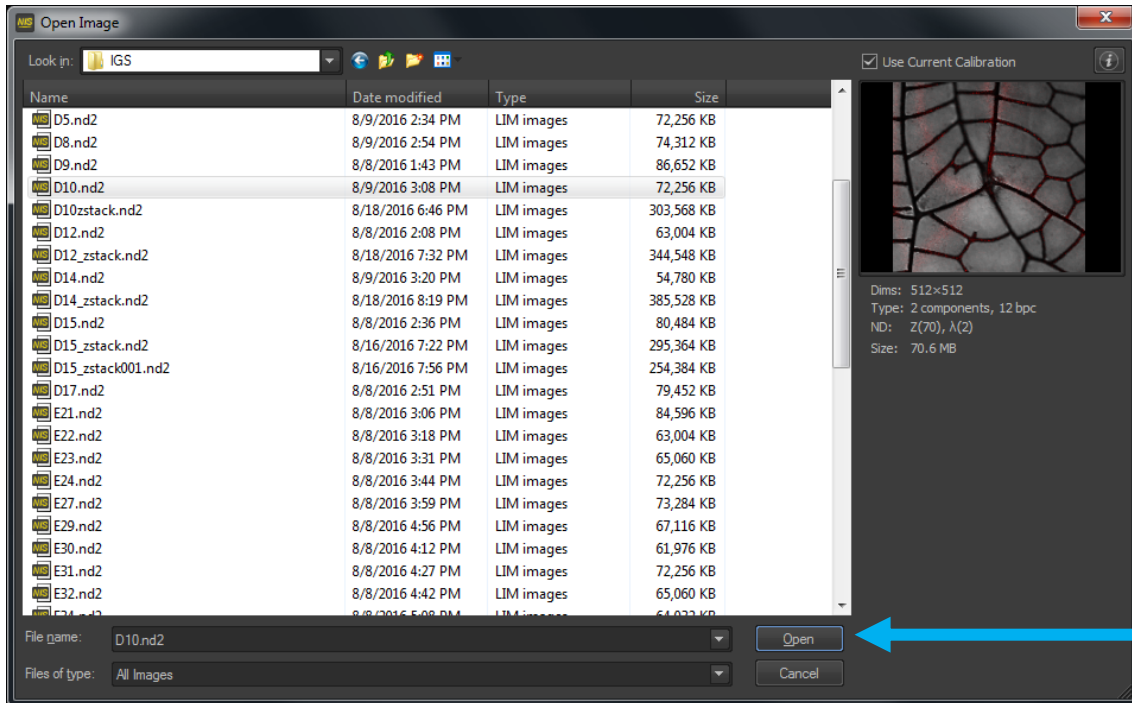


49. Dar click en el icono de “Open” o en “File | Open...”

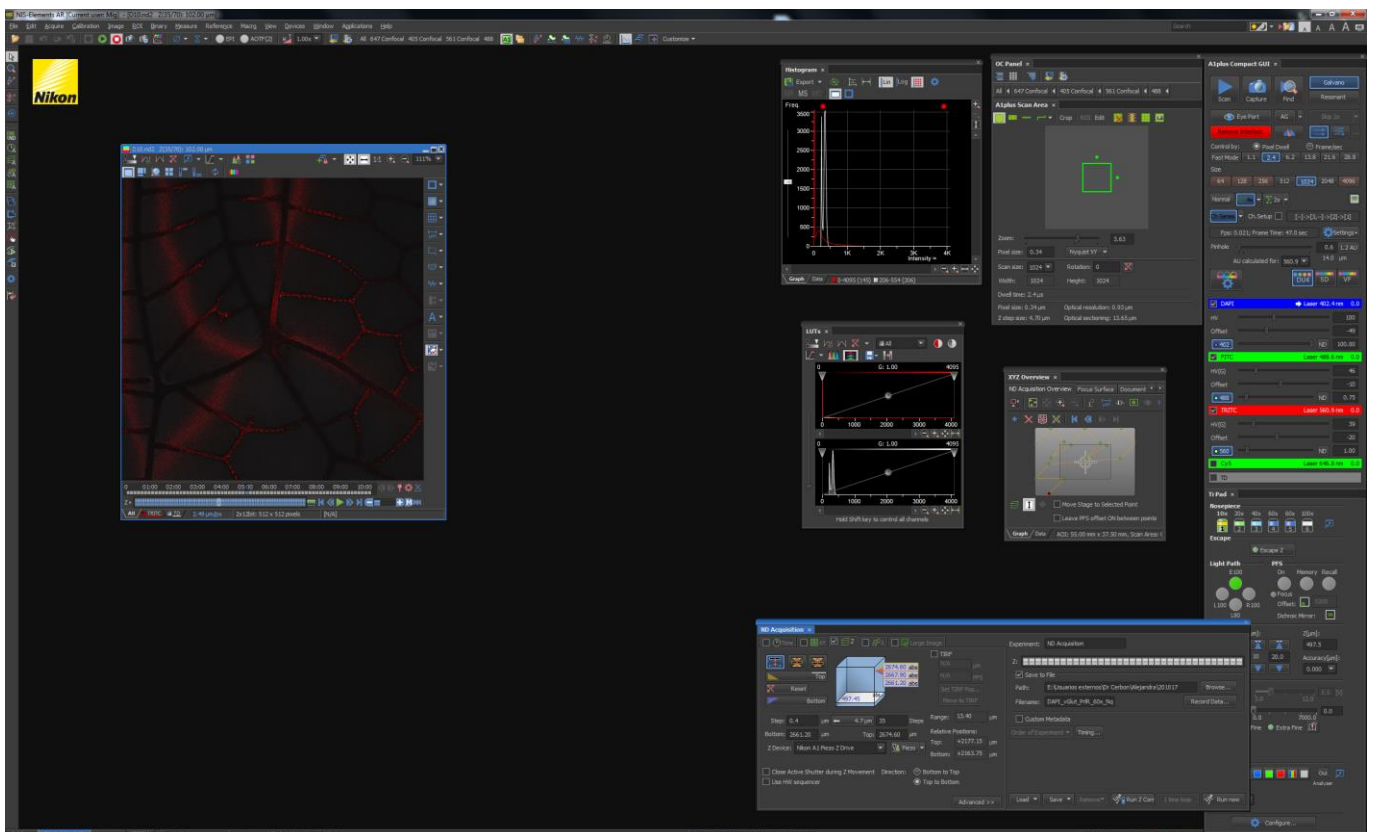




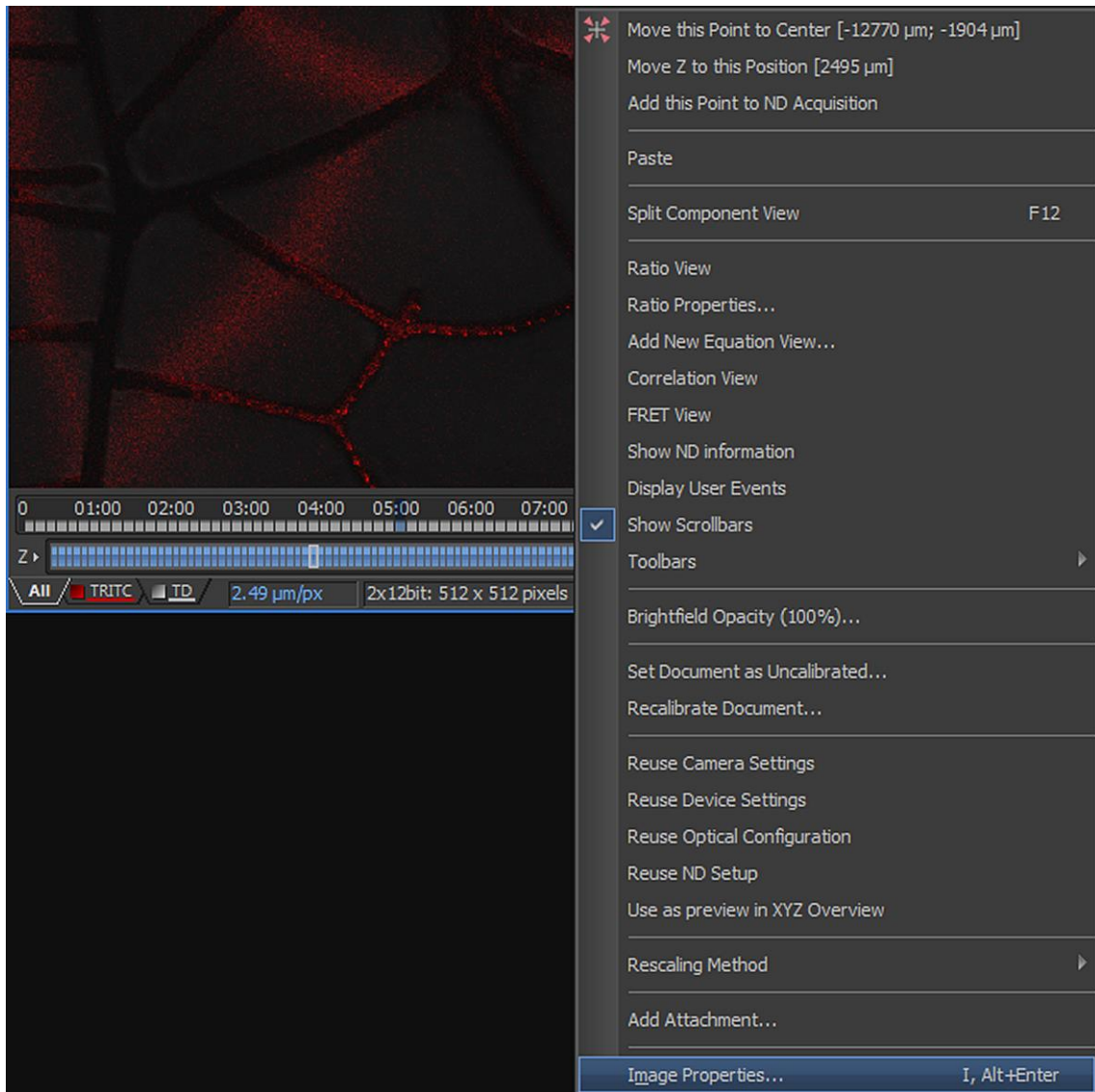
Se abrirá una ventana “**Open Image**” que permitirá seleccionar el directorio y dentro de él la imagen cuyos ajustes de captura se desea reutilizar. Una vez seleccionada, dar doble click o click en “**Open**”



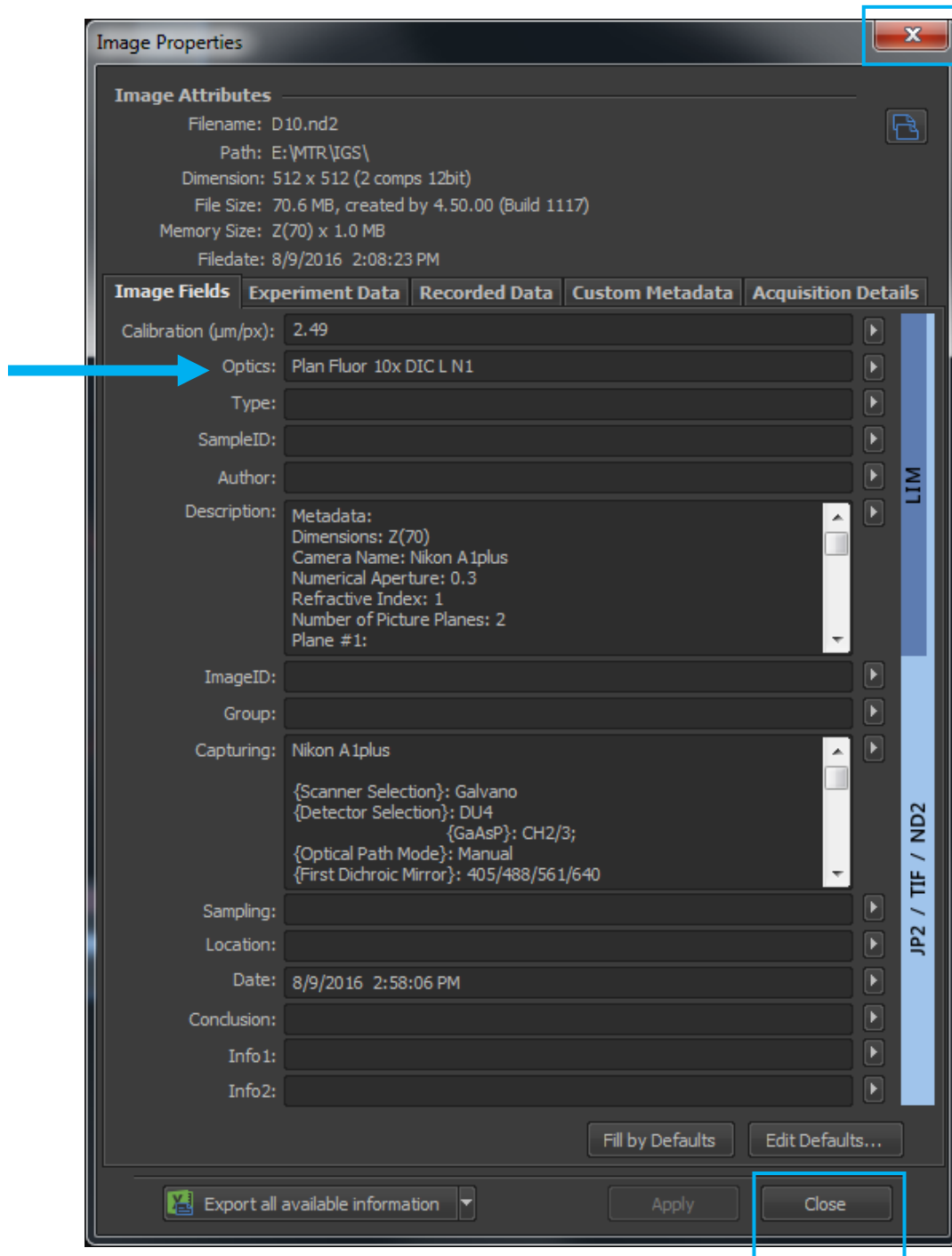
La imagen será desplegada en el programa:



50. Los ajustes de captura dependen en gran medida del objetivo utilizado para generar la imagen; se debe tener en cuenta que en el software **NIS Elements C** la reutilización de los ajustes **NO** cambia al objetivo utilizado, este se debe colocar independientemente. Si se desea revisar el objetivo utilizado para realizar la captura, sobre la imagen abierta dar click derecho, y se abrirá un menú emergente:

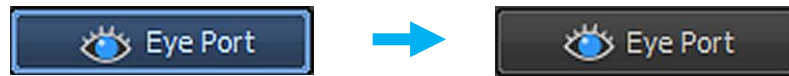


En este, seleccionar “**Image Properties...**”. Se abrirá una nueva ventana:

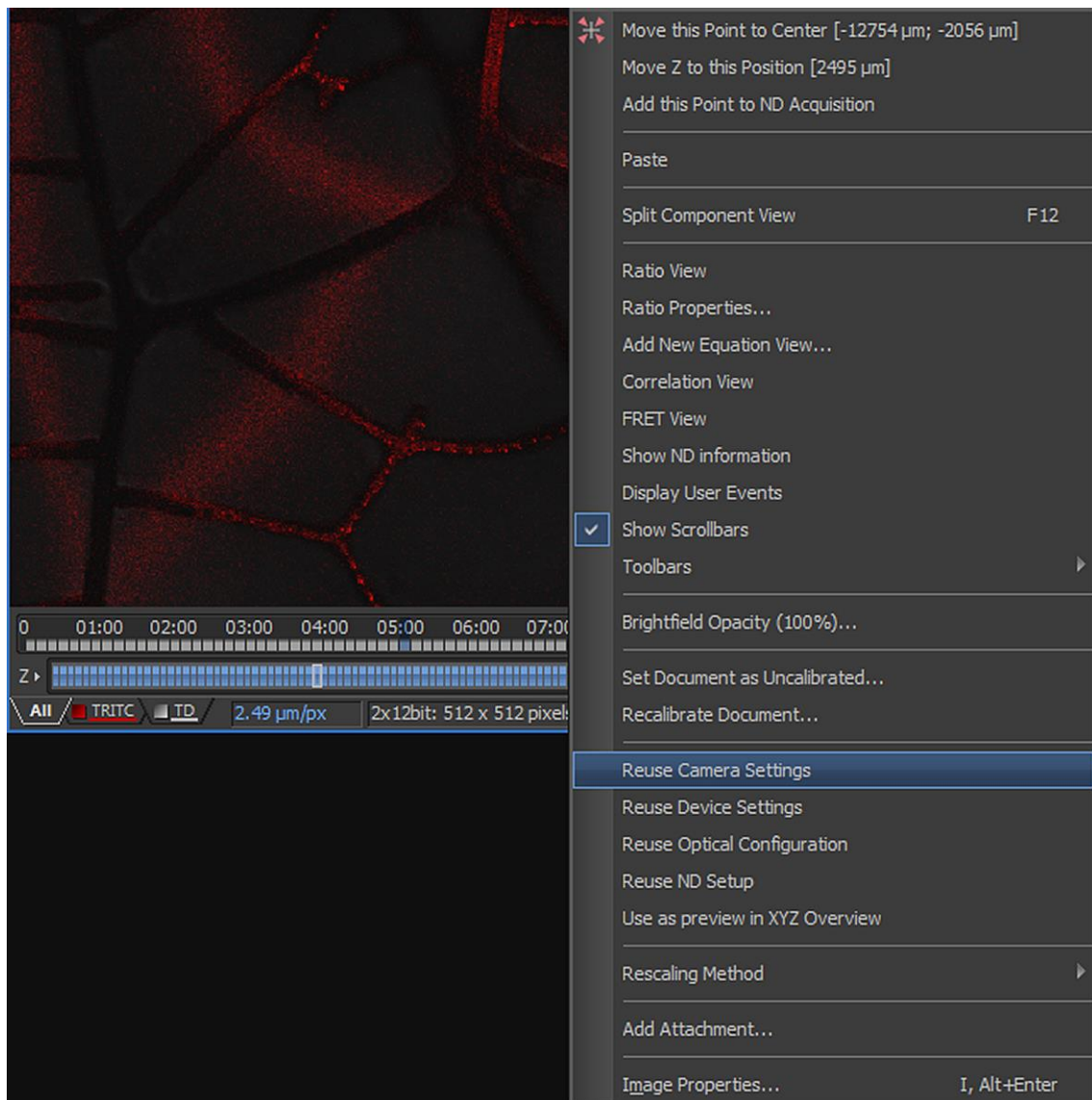


En la pestaña “**Image Fields**” en el renglón de “**Optics**” nos desplegará el objetivo utilizado para la captura de esa imagen. Una vez obtenido el dato del objetivo, se puede cerrar la ventana “**Image Properties**” dando click en el botón “**Close**” o en la “**X**” de la esquina superior derecha.

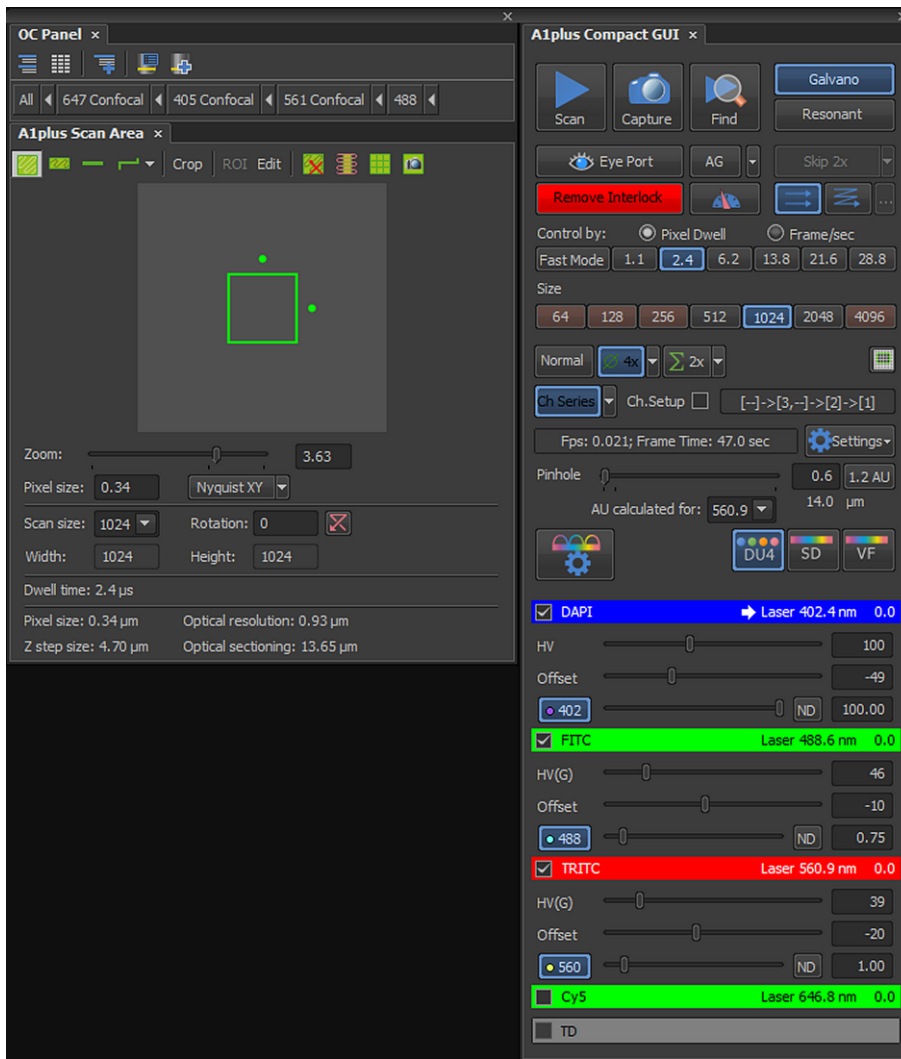
51. En el estativo, seleccionar la región de interés y enfocarla con el objetivo adecuado. Una vez seleccionada, pasarse a modo confocal cerciorándose que “Eye Port” esté inactivo.



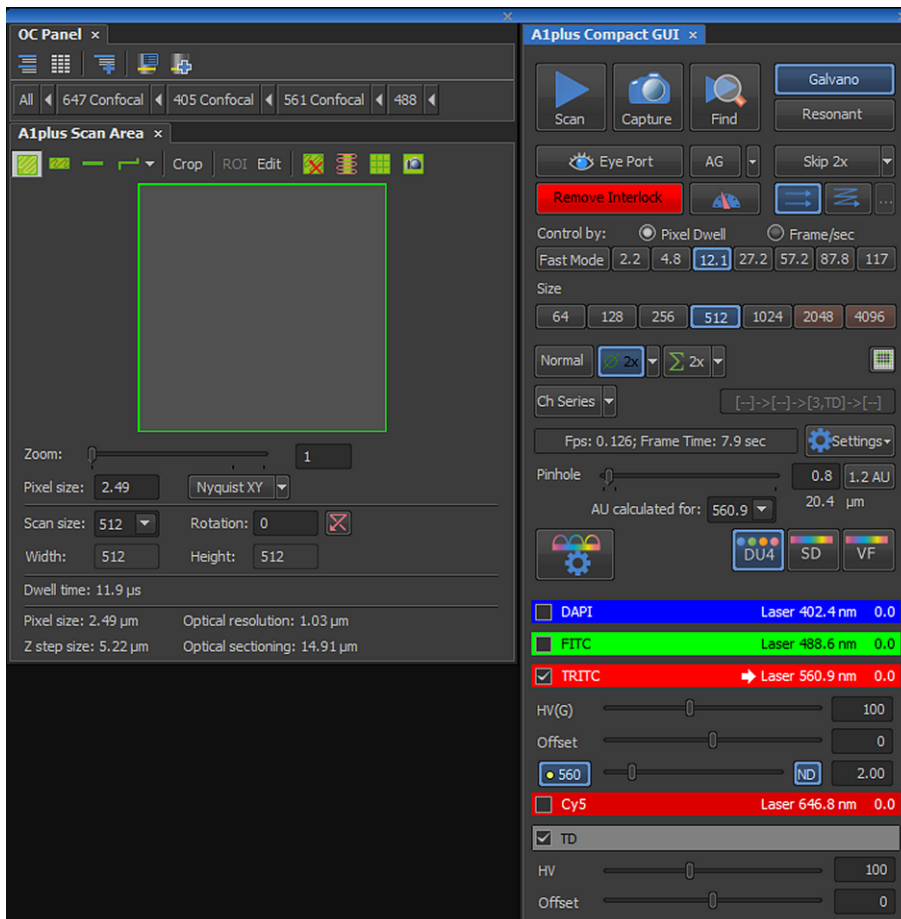
52. En la imagen abierta, dar click derecho. Se abrirá el menú emergente:



Seleccionar “Reuse Camera Settings”. Los diferentes valores desplegados en los módulos **A1plus Compact GUI** y **A1plus Scan Area** serán ajustados a aquellos contenidos en la imagen reutilizada:



↓ Reuse Camera Settings

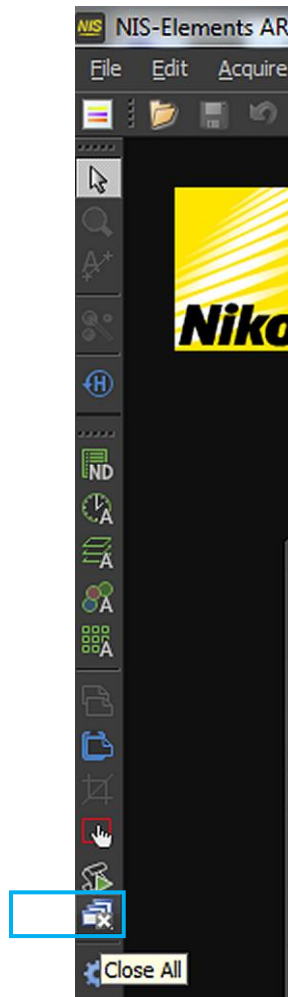




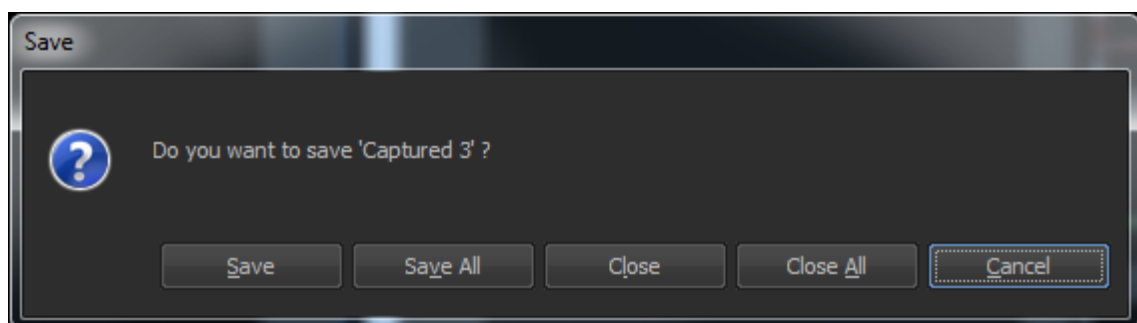
53. Repetir secuencialmente los pasos 17, 18, 19, 30, 31 y 32 por cada imagen XY que se desee capturar, y adicionalmente los pasos 36 a 44 por cada imagen XYZ.

### XIII. Apagado del Equipo.

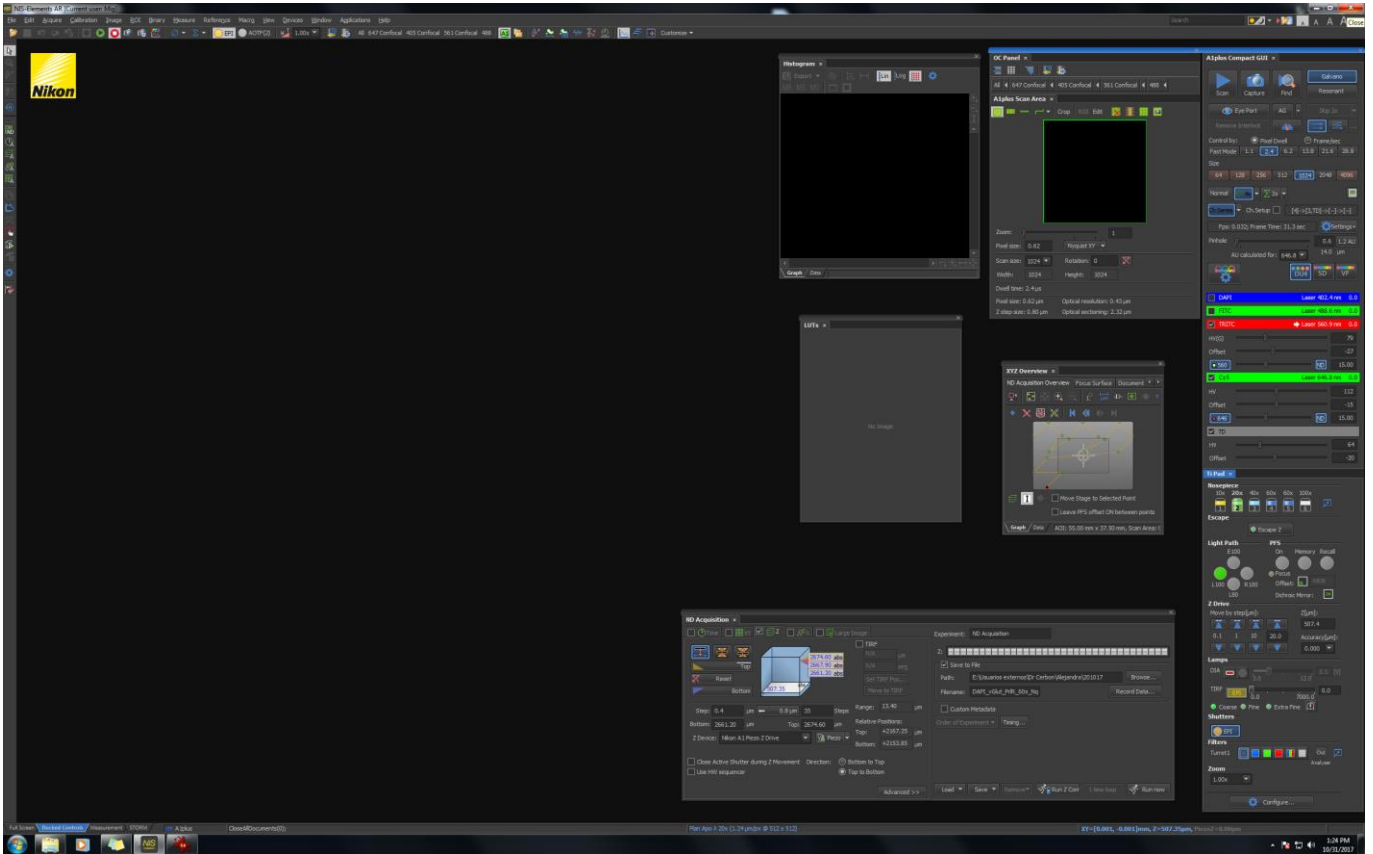
54. Si se han realizado varias capturas, se puede utilizar el botón “Close All” de la barra lateral izquierda para cerrar las ventanas.



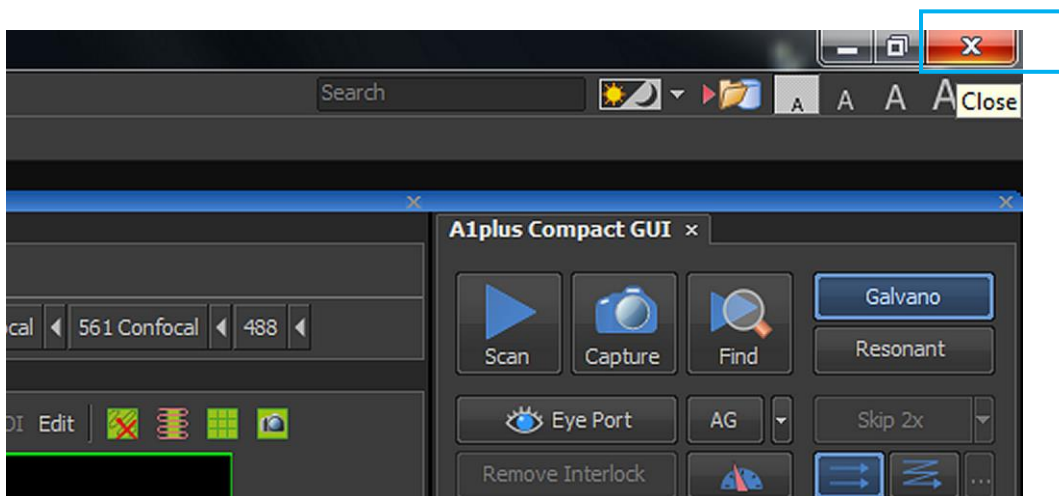
Si hay alguna(s) captura(s) no guardada(s), aparecerá el siguiente cuadro emergente:



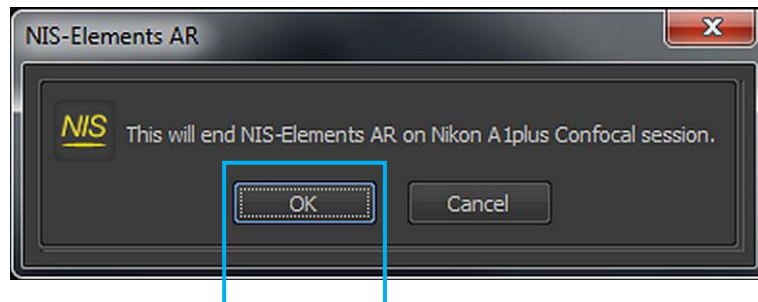
Se puede elegir guardar una por una dando click en “**S**ave”, o secuencialmente con “**S**ave **A**ll”. Si se desean descartar, dar click en “**C**lose” o “**C**lose **A**ll”. Una vez guardadas o descartadas todas las imágenes, quedará la interface del programa:



55. Para cerrar el programa, dar click en el “X” de la esquina superior derecha:

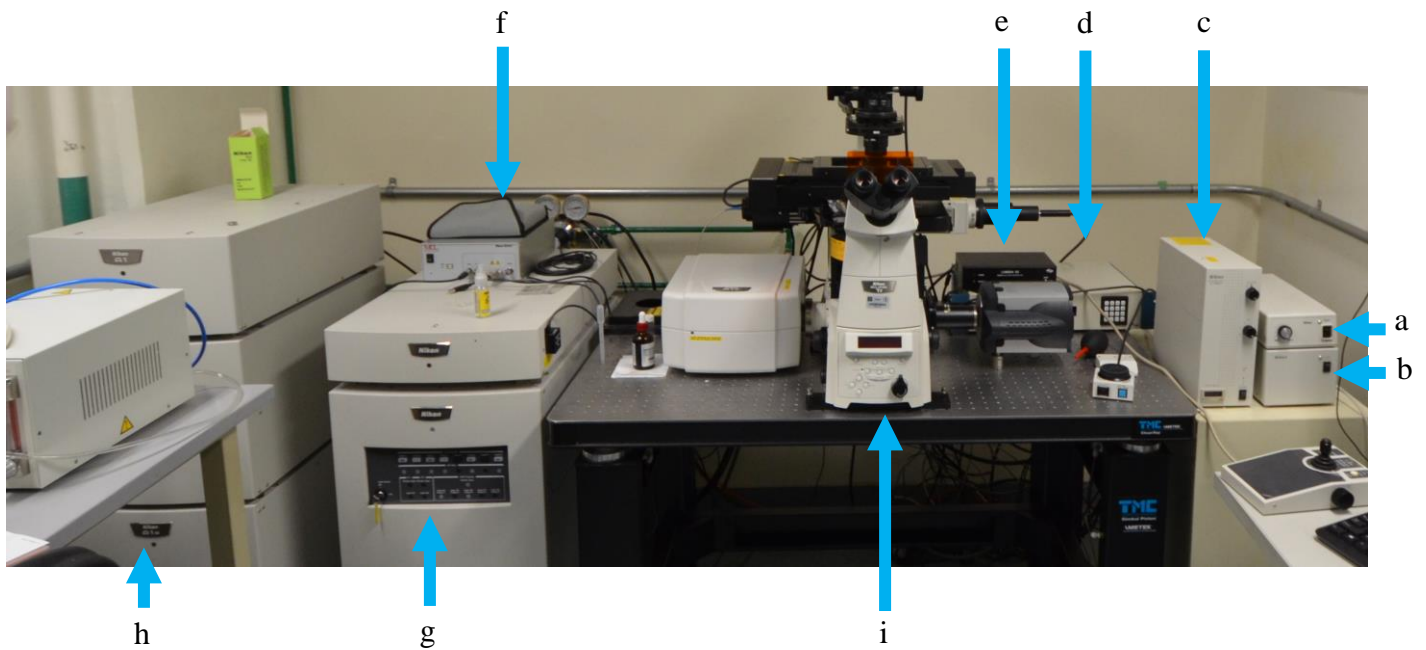


Aparecerá el siguiente cuadro emergente:



Dar click en “OK”. Automáticamente se cerrará el software “NIS Elements”.

56. Enseguida, apagar los módulos del equipo en el siguiente orden:



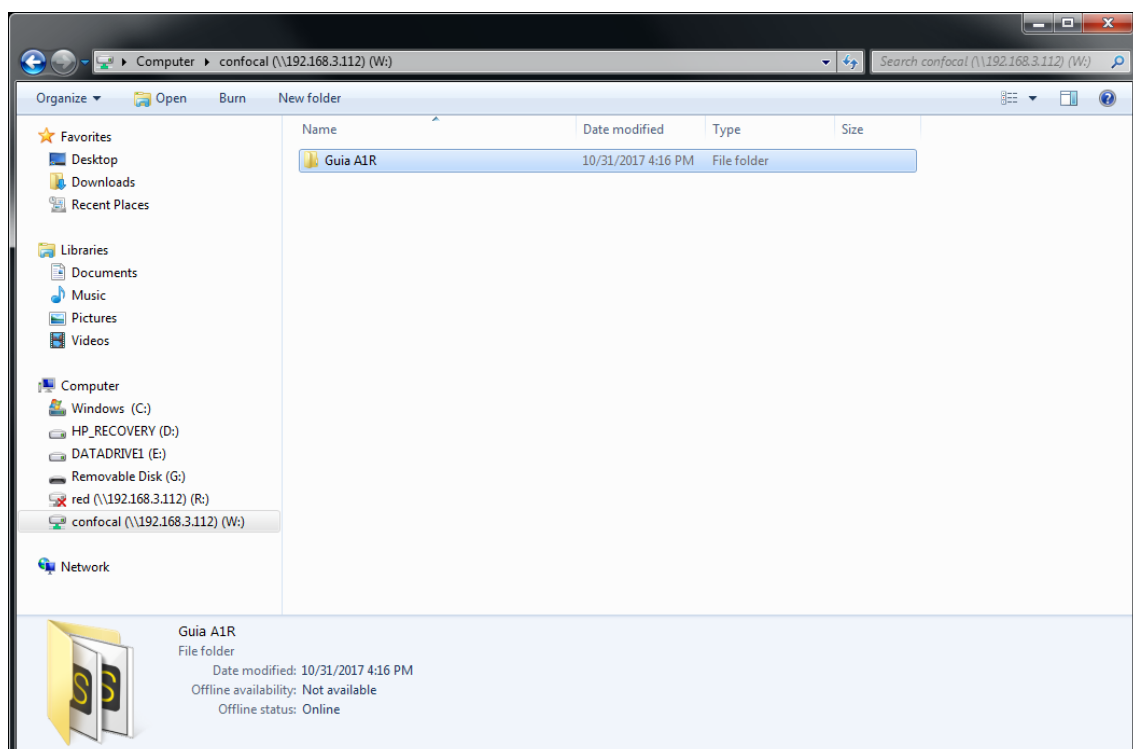
- a). Fuente de la lámpara de luz de campo claro.
- b). Controlador de la platina motorizada.
- c). Fuente de la lámpara de fluorescencia.
- d) Controlador de obturadores (crema).
- e) Controlador de obturadores (negro).
- f) Piezo.
- g) Unidad de láseres LU-NV.
- h) Unidad de control del cabezal y los láseres.
- i) Estativo del microscopio.

57. Apagar los interruptores principales que se localizan del lado izquierdo del cubículo, cercanos a la puerta de acceso.



Apagado

58. Transferir las imágenes capturadas a la unidad de red “W”, para su posterior manejo.





59. Para visualizar las imágenes fuera del equipo, solicitar el programa de instalación del NIS Elements Viewer al Responsable de la Unidad, e/o instalar el programa FIJI disponible en <http://fiji.sc/>

