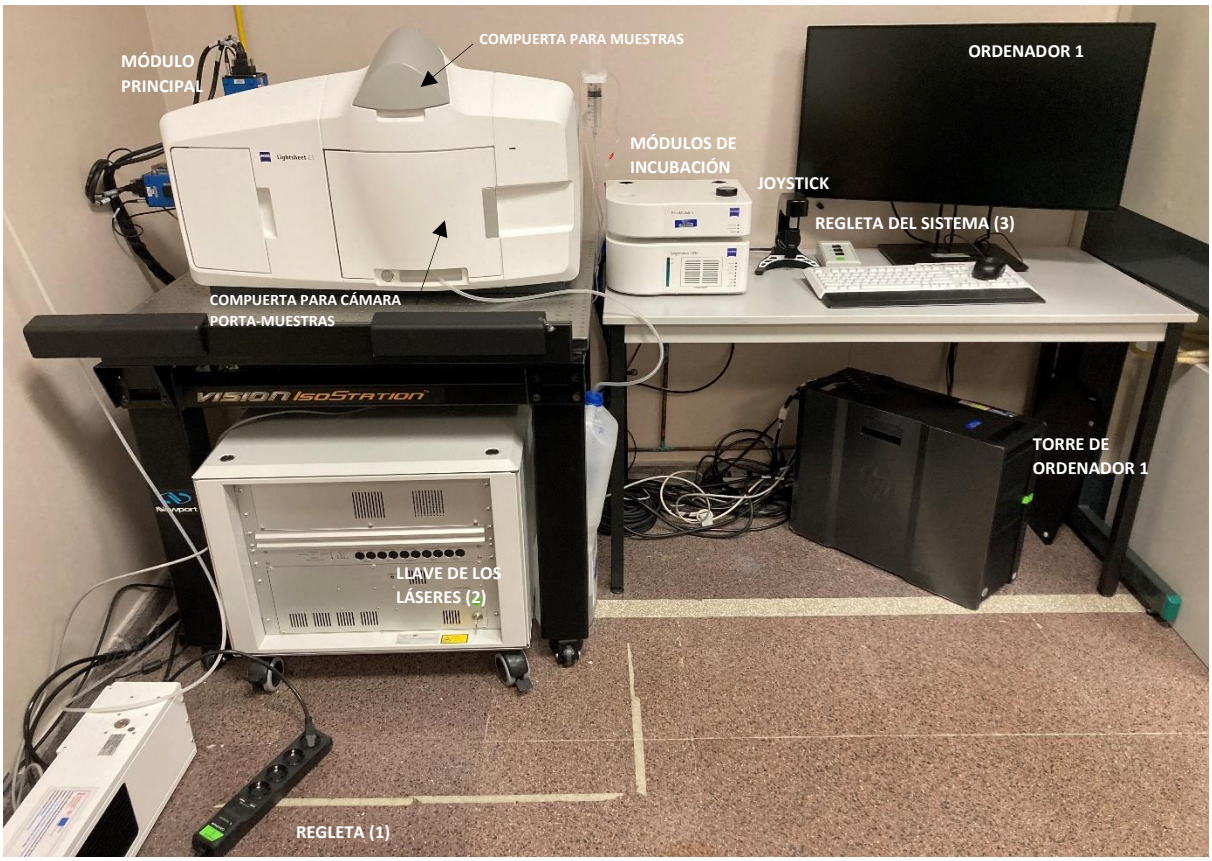
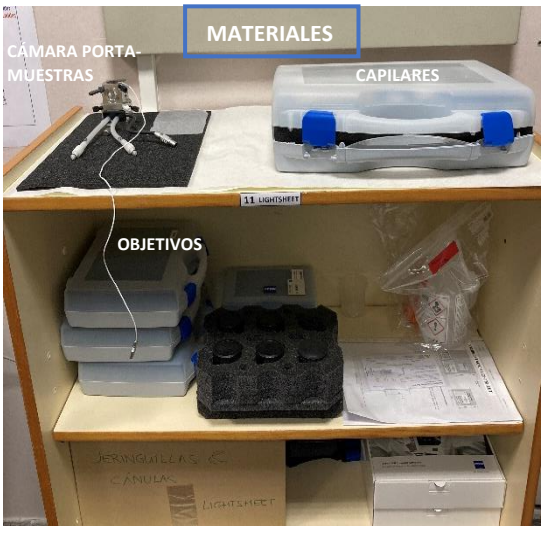
LIGHTSHEET Z.1

COMPONENTES PRINCIPALES DEL MICROSCOPIO LIGHTSHEET Z.1:





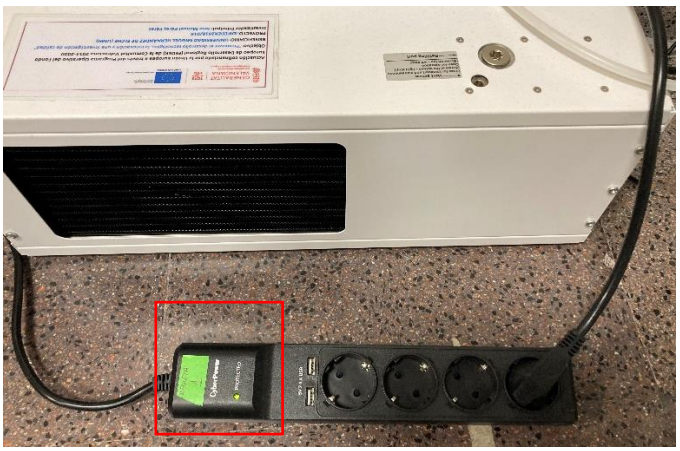
BLOQUE 0: ENCENDIDO Y APAGADO DE LOS EQUIPOS

I) ENCENDIDO Y APAGADO DEL ORDENADOR 1:

HARDWARE

- Para el correcto funcionamiento del hardware, se encenderán los siguientes ítems en el orden señalado:

(1) El interruptor de la **regleta 1** se mantiene encendido. En el caso de no estarlo, **encender.**

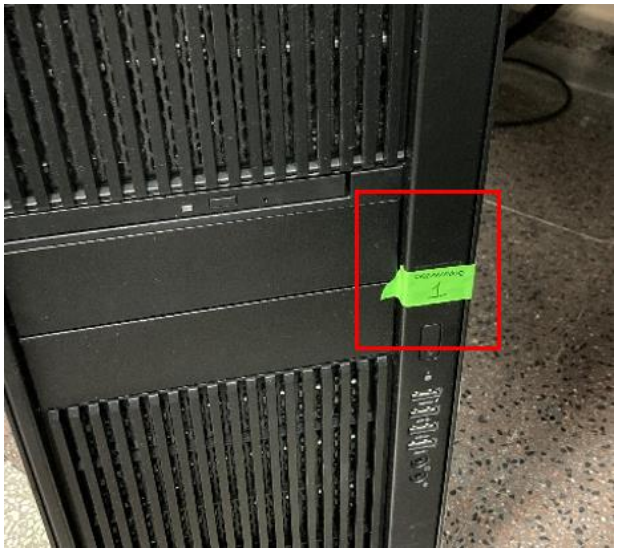


(2) La **Llave de los láseres** se mantiene encendida. En el caso de no estarlo, colocar en **"on"** (puesto en número 1 en posición horizontal).

(3) **Regleta del equipo** en el siguiente orden:

SYSTEM (A) → PC (B) → INCUBATION (C)

(4) Botón de encendido de la **torre del ordenador**.



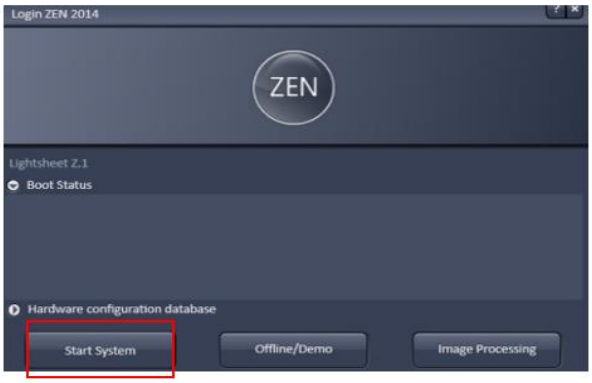
- Para **apagar** el ordenador 1, desde el PC se seleccionará el botón de apagado de forma manual. Posteriormente se desactivarán los botones de la **regleta 3** en el orden inverso de encendido (C → B → A).

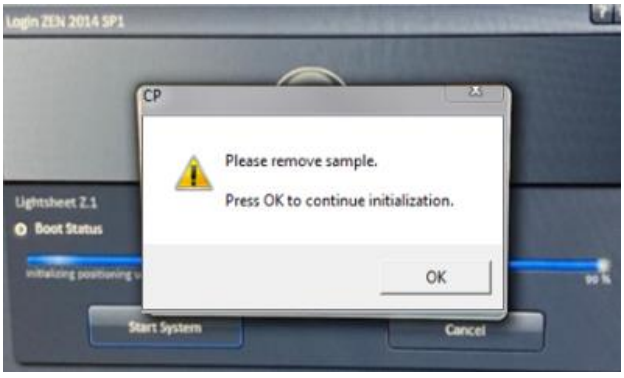
SOFTWARE

- Iniciar sesión en el icono de usuario **zeiss**

***Anterior al inicio del programa ZEN, debe de colocarse la cámara porta-muestras (ver bloque 2).**

- Iniciar programa en el icono de **ZEN** y seleccionar el botón *start system* (cuando salga aviso de "*remove sample*" darle a *ok*, asegurándonos en efecto, de que no hay muestra dentro del microscopio). Esperar hasta que alcance el 100%.





II) ENCENDIDO Y APAGADO DEL ORDENADOR 2: (Se encenderá a la vez y de forma paralela al ordenador 1)

HARDWARE

- **Encender** el interruptor de la **torre del equipo 2**.

SOFTWARE

- Iniciar sesión en el icono de usuario **Lightsheet**

- Iniciar programa en el icono de **arivis Vision4D x64** para el procesamiento y análisis de imágenes.

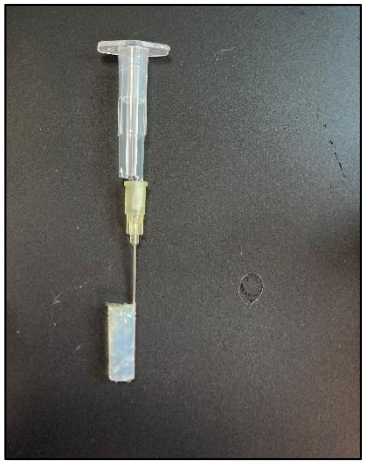
- Las imágenes y series realizadas desde el ordenador 1, se almacenan en la carpeta "USUARIOS" → "SWAP" y pueden visualizarse directamente en el ordenador 2. Nota: si las adquisiciones se borran desde el ordenador 1, no podremos visualizarlas en el ordenador 2.

BLOQUE 1: PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

Según el tipo de muestra o material de partida, necesitaremos un *holder* específico. En nuestro laboratorio hemos optimizado los siguientes *holder*s para nuestras muestras:

A – Capilar 4 mm

B – Jeringuilla 1 ml



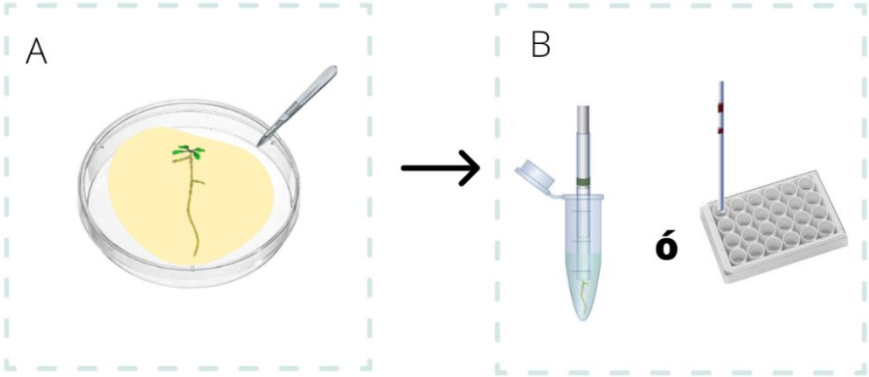
C – Aguja hipodérmica + punta pipeta

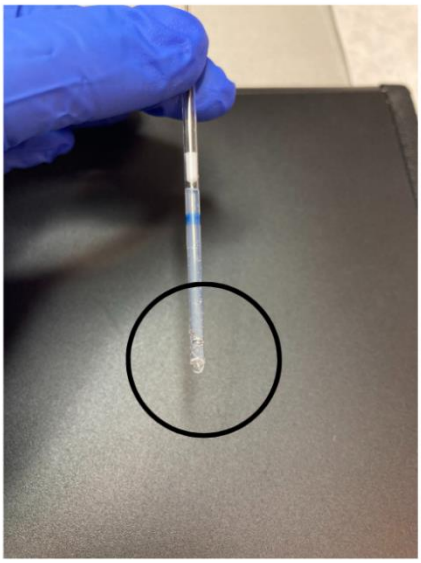
HIPOCOTILO ARABIDOPSIS	**A**
HIPOCOTILO DE TOMATE	**B**
RAÍZ ARABIDOPSIS	**A**
RAÍZ TOMATE	**A**
COTILEDON TOMATE	**C**
COTILEDON ARABIDOPSIS	**C**
MARCHANTIA	**B**

Para el montaje de las muestras en cualquiera de los *holders* anteriores, será necesario la preparación previa de plant agar al 1%.

1A) MONTAJE DE MUESTRA EN CAPILAR DE 4 mm

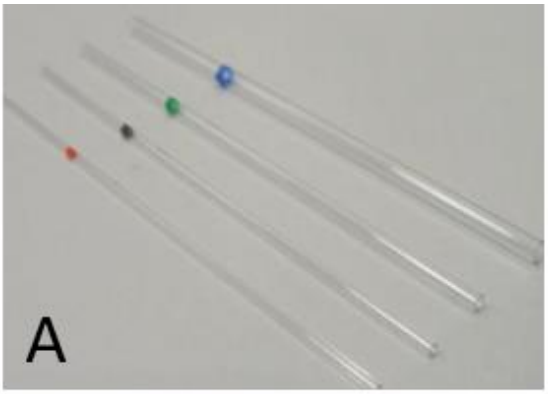
- Calentar el plant agar al microondas para homogeneizar la mezcla y volverla liquida. Nota: mientras se selecciona y prepara la muestra, el plant agar se deja enfriar en la bancada con cuidado de no exceder en tiempo y como consecuencia que la mezcla vuelva a solidificar.
- Para colocar y seccionar la muestra de interés, se puede utilizar una placa Petri vacía donde se añadirá una gota de la mezcla de plant agar o en su defecto agua destilada. A continuación, se traspasa la muestra y se selecciona la parte de interés. (A)
- En un tubo eppendorf o en un pocillo de una placa de 24 pocillos añadir un poco de plant agar. (B)
- Con unas pinzas, colocar la muestra en el interior del tubo eppendorf o de un pocillo con plant agar, intentando posicionarla según interese (por ejemplo, en el caso de la raíz, nos aseguraremos de que la punta quede hacia abajo).
- Meter el capilar en el tubo eppendorf o en el pocillo y tirar hacia arriba del émbolo. Se cogerá un poco de plant agar y posteriormente la muestra, hasta llegar a la marca de color azul del capilar.
- Así se conseguirá un cilindro de plant agar dentro del capilar con la muestra embebida en su interior. (C)

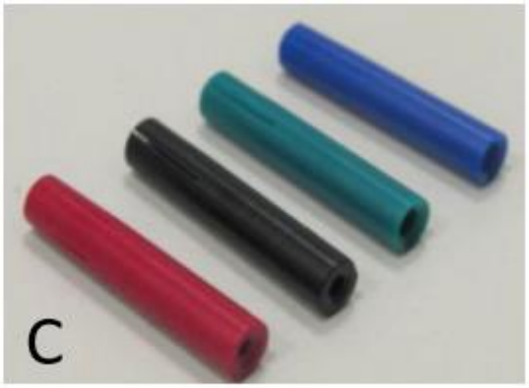


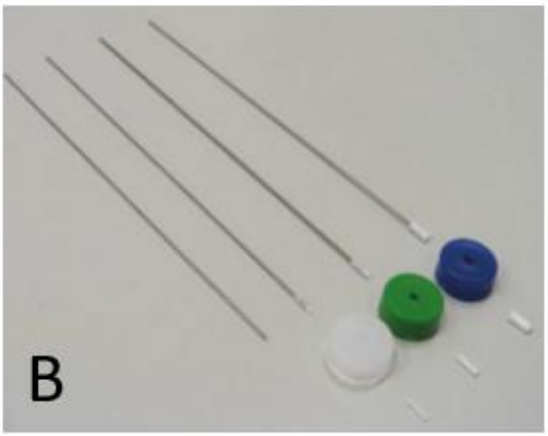


MONTAJE DEL CAPILAR EN EL LIGHTSHEET

- **Materiales necesarios:**



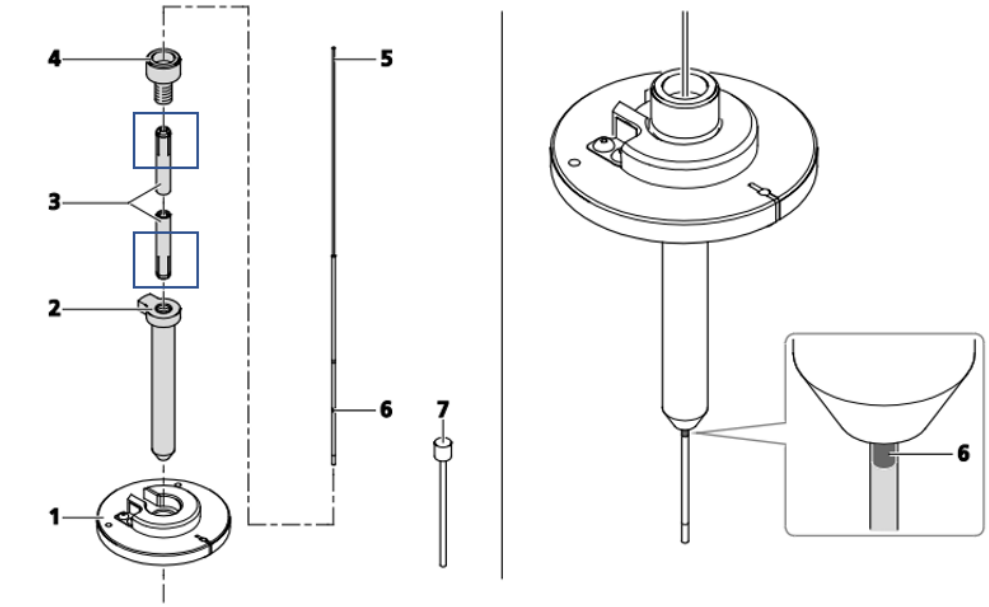




(A) Capilares de diferentes diámetros.
(B) Émbolos específicos para cada capilar.
(C) Adaptadores para capilares (cada uno específico según su color y el color de la banda del capilar).
(D) De derecha a izquierda: *Holder* del capilar, tornillo de retención y émbolo de eyección.
(E) Disco específico para capilares.

- **Montaje:**

- Dentro del *holder* del capilar (D), se añadirán dos adaptadores (C) específicos al color de la banda del capilar que se esté utilizando. Los extremos de los adaptadores se posicionarán tal y como se muestra en la imagen siguiente.
- Colocar dentro del montaje anterior, el capilar (A) de manera que sobresalga la banda de color, con su émbolo correspondiente (B).
- A continuación, acoplarlo todo en el disco específico para capilares (E).
- Por último, colocar el tornillo de retención (D) y apretarlo.

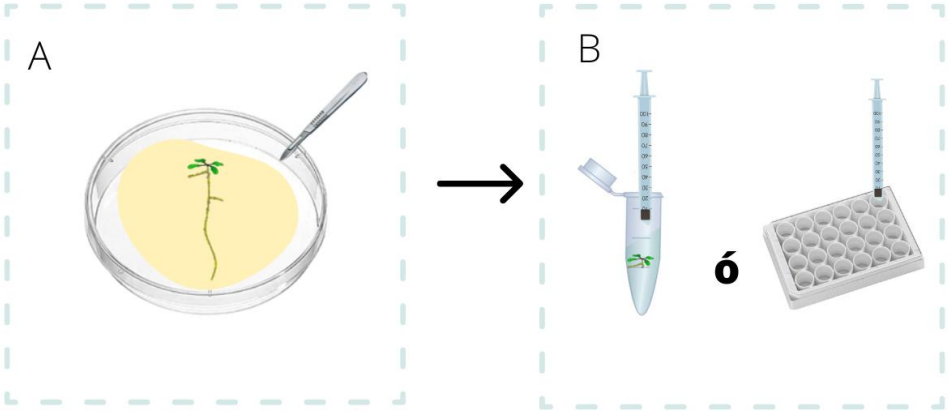


1 Sample holder disc for capillaries
2 Capillary sample holder stem
3 Sleeves (color-coded)
4 Clamp screw
5 Plunger
6 Capillary with color-coded marking
7 Ejection tool

- Meter todo el montaje anterior en el orificio situado al abrir la compuerta específica para los *holders* y las muestras del Lightsheet. Hacer coincidir las marcas blancas del disco con las marcas blancas del orificio.

1B) MONTAJE DE MUESTRA EN JERINGUILLA

- Cortar la punta de la jeringuilla.
- Calentar el plant agar al microondas para homogeneizar la mezcla y volverla liquida. Nota: mientras se selecciona y prepara la muestra, el plant agar se deja enfriar en la bancada con cuidado de no exceder en tiempo y como consecuencia que la mezcla vuelva a solidificar.
- Para colocar y seccionar la muestra de interés, se puede utilizar una placa Petri vacía donde se añadirá una gota de la mezcla de plant agar o en su defecto agua destilada. A continuación, se traspasa la muestra y se selecciona la parte de interés. (A)
- En un tubo eppendorf o en un pocillo de una placa de 24 pocillos añadir un poco de plant agar. (B)
- Con unas pinzas, colocar la muestra en el interior del tubo eppendorf o de un pocillo con plant agar, intentando posicionarla según interese (por ejemplo, en el caso de la raíz, nos aseguraremos de que la punta quede hacia abajo).
- Meter la jeringuilla en el tubo eppendorf o en el pocillo y tirar hacia arriba del émbolo. Se cogerá un poco de plant agar y posteriormente la muestra, hasta llegar a la marca de color azul del capilar.
- Así se conseguirá un cilindro de plant agar dentro del capilar con la muestra embebida en su interior. (C)



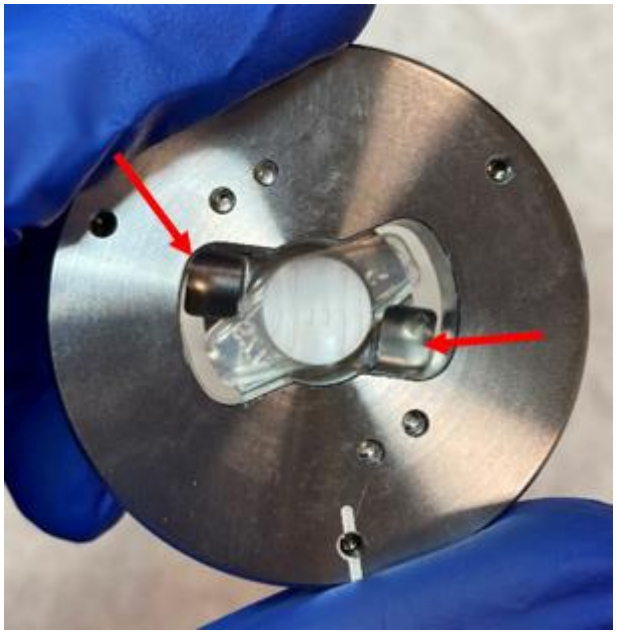
MONTAJE DE LA JERINGUILLA EN EL LIGHTSHEET

- **Materiales necesarios:**

(A) Disco específico para jeringuillas.
(B) Jeringuilla (1 ml).

- **Montaje:**

- Acoplar la jeringuilla en el disco específico (A).
- Asegurarse de que la parte superior de la jeringuilla, queda retenida por los clips metálicos (señalados por flechas rojas en la siguiente figura).
- Meter todo el montaje anterior en el orificio situado al abrir la compuerta específica para los *holders* y las muestras del Lightsheet. Hacer coincidir las marcas blancas del disco con las marcas blancas del orificio.



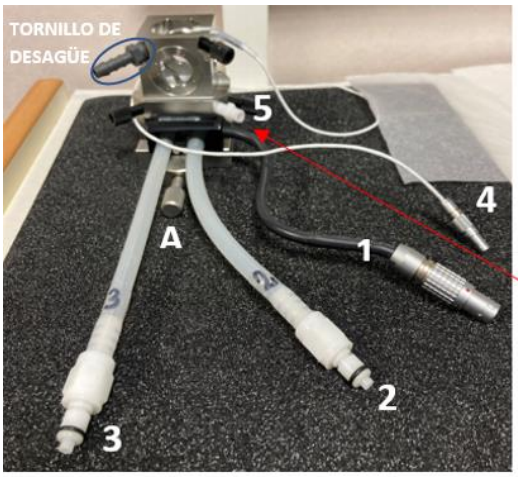
Ver video-tutorial *"1. Preparación de muestras"

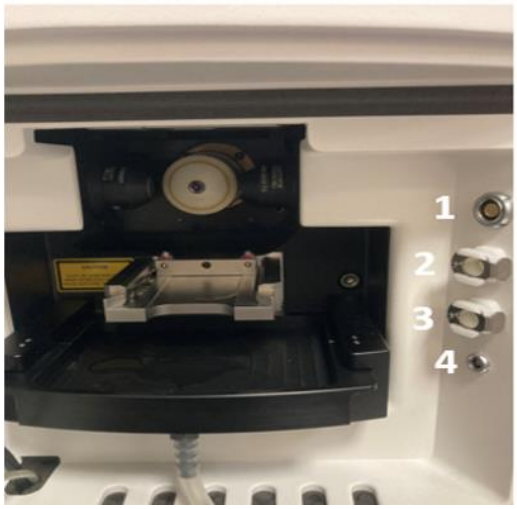
BLOQUE 2: MONTAJE DE LAS MUESTRAS EN EL MICROSCOPIO

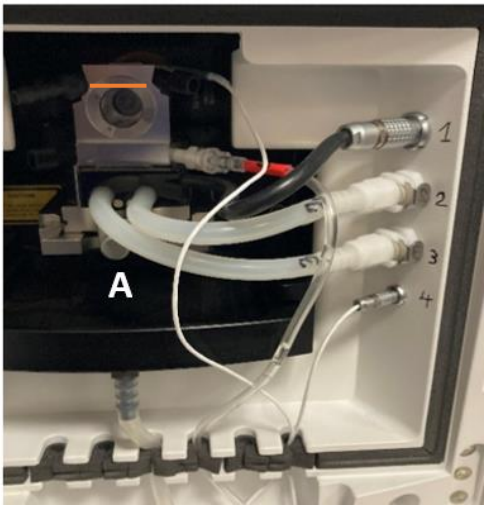
I) MONTAJE DE LA CÁMARA PORTA-MUESTRAS

- Poner la cámara dentro del microscopio ***Anterior al inicio del programa ZEN, debe de colocarse la cámara porta-muestras.**
- Apretar el tornillo metálico de la cámara (A).
- Montar los cables en el siguiente orden y acoplarlos en las almohadillas:

1) Cable controlador del módulo de temperatura Temp10 (cable grueso negro con marca roja que encaja con marca roja del orificio del equipo) (1).
2) Cable regulador líquido (cable blanco grueso, para desencajar, apretar de los laterales) (2).
3) Cable regulador líquido (blanco grueso) (3).
4) Sonda de temperatura (cable fino gris con marca roja que encaja con marca roja del orificio del equipo) (4).
5) Cable blanco agua destilada (5).





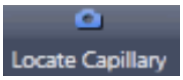


- Con la compuerta todavía abierta, llenar la cámara con la inmersión adecuada (agua destilada, PBS…) según la muestra, inyectándola desde la jeringa situada en el soporte lateral del microscopio. Una buena medida de referencia (si no se van a hacer experimentos de larga duración donde el líquido pueda evaporarse) es hasta que el líquido llegue a la marca señalada en la imagen anterior, teniendo cuidado de que no se formen burbujas y no se salga por el tornillo de desagüe.
- Cerrar la compuerta de la cámara sin dejar cables pillados. Para ello, acoplarlos en las almohadillas.

Ver video-tutorial *"2. Montaje de las muestras en el microscopio"

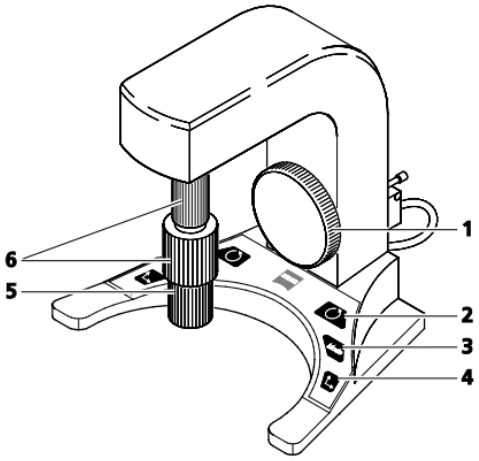
BLOQUE 3: ADQUISIÓN

I) ENFOQUE DE LA MUESTRA

- Para localizar el *holder*, pinchar en el botón *"locate capillary"* 

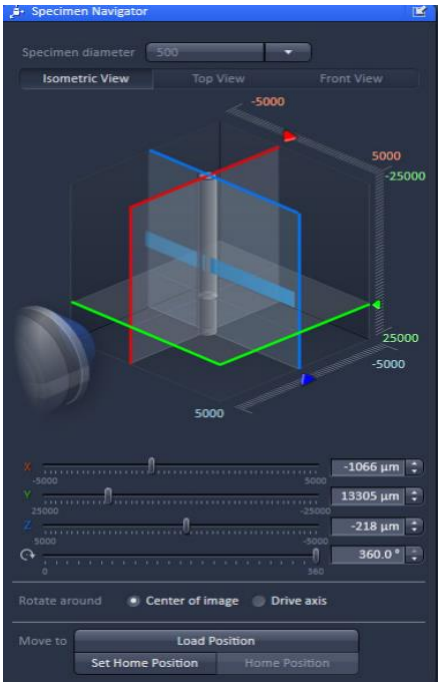
. Para parar la imagen en vivo, pinchar el botón de "*stop*".

- Con la ayuda del joystick moveremos la muestra. La posición será indicada en todo momento en la ventana de *"specimen navigator"* (para volver a la posición inicial, hacer click en *home position*).

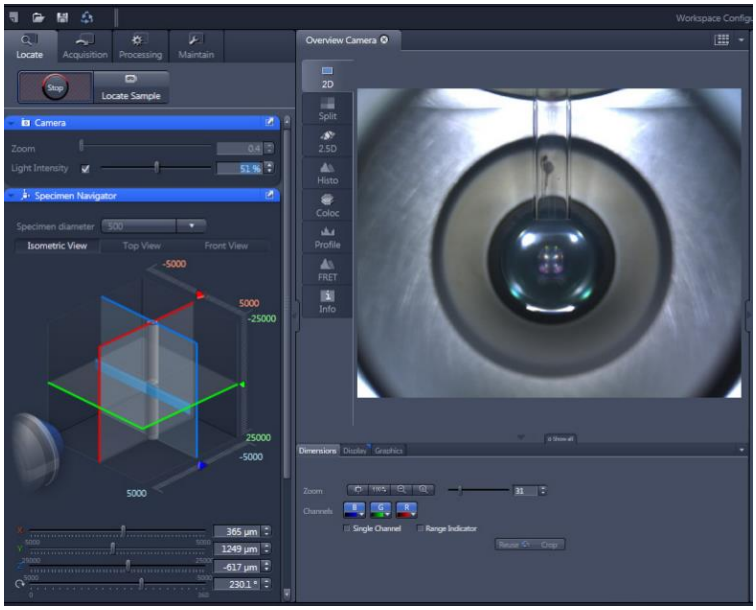


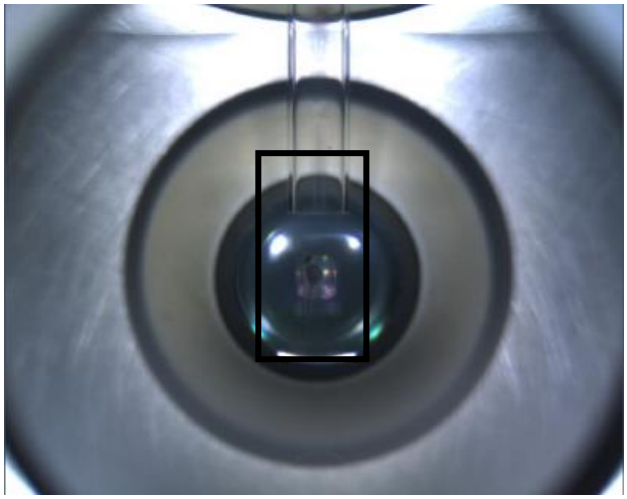
1	Z-axis control
2	Rotation button (switches 6 to rotation drive)
3	Mode button (fine / coarse)
4	Axis button (switches 6 to y-axis drive)
5	X-axis control
6	Y-axis / Rotation control

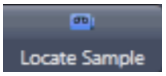
Fig. 1 **ErgoDrive operating panel**



- Ubicar el *holder* hasta que sea visible en la pantalla. En el caso del *holder* A y B, empujar el émbolo hasta liberar la parte del cilindro de plant agar donde se encuentra embebida la muestra y posicionar frente a la lente de la cámara. En el caso del *holder* C, posicionar directamente frente a la lente de la cámara.





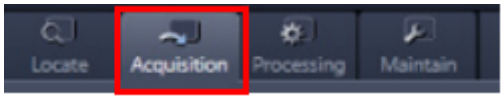
- Enfocar la muestra con el controlador del eje Z localizado en el joystick.
- Pinchar en el botón de *"locate sample"* 

y volver a enfocar con esta nueva función. Será necesario el uso del joystick para reorientar y posicionar la muestra.

Nota: En esta imagen se muestra el enfoque de una raíz de arabidopsis. En el caso de no estar seleccionado el botón de *"auto"* en la ventana *"display",* será necesario activarlo.

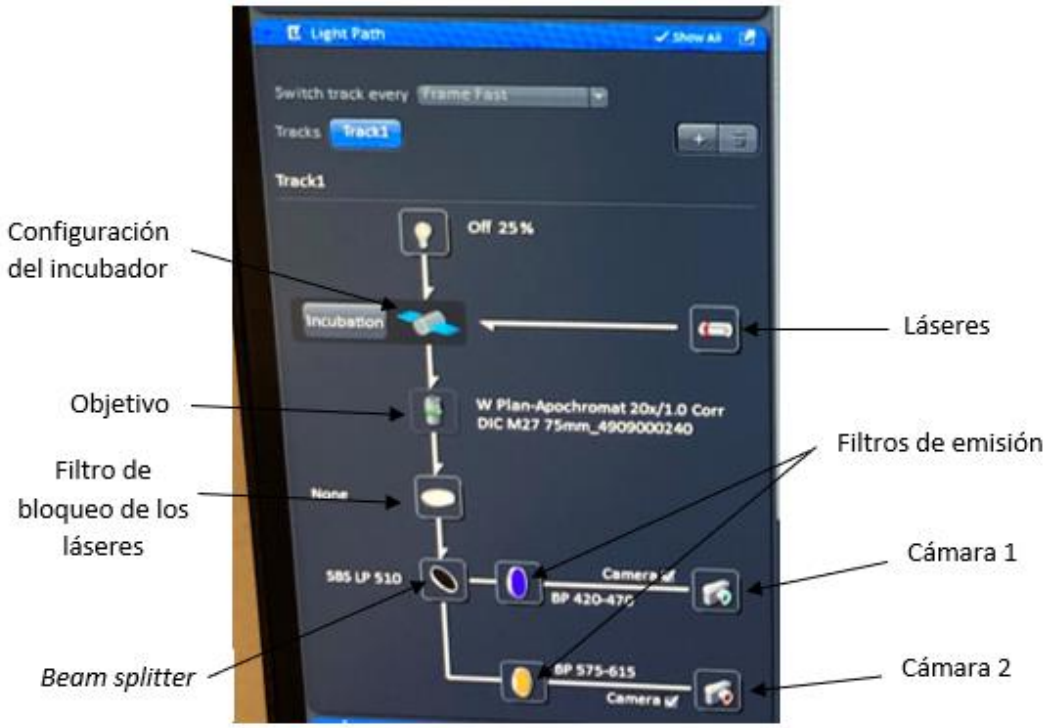
II) CONFIGURACIÓN DEL "*LIGHT PATH*"

- Hacer click en el botón de *acquisition*

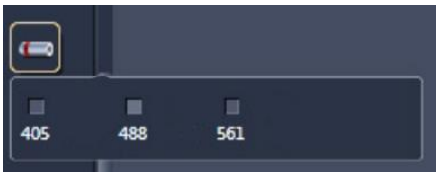


- La primera configuración se realizará sobre la ventana de *laser* donde se activarán los láseres de interés cambiando en la pestaña adjunta "*off*" por "*on*".

- Posteriormente, se configurará la ventana de *light path.* Esto permite crear un nuevo *beam path* acorde a la muestra de interés.



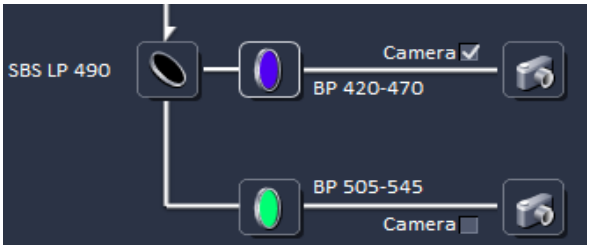
- Láseres: seleccionar los láseres acordes a la muestra.

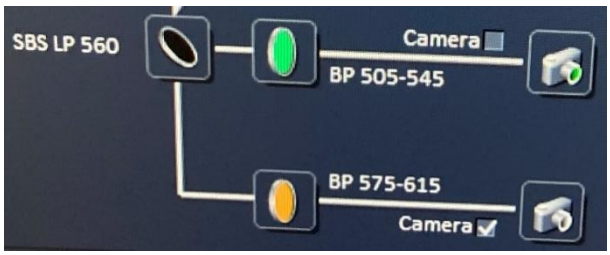


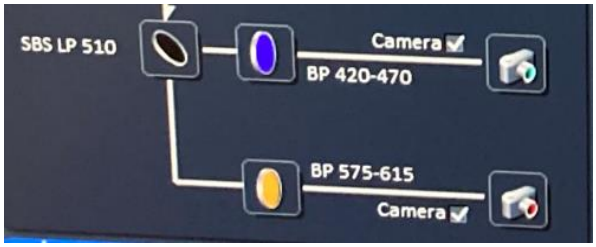
- Objetivo: cambiar manualmente el objetivo según la necesidad (existencia de 10x, 20x y 45x).

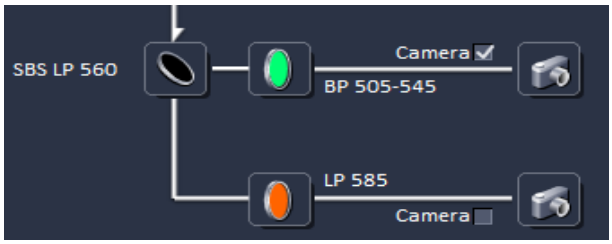
- Filtro de bloqueo de los láseres: activar el filtro que aparece por defecto para los láseres 405/488/561.

- *Beam splitter* y filtros de emisión: dependerá del fluorocromo presente en cada una de las muestras. Se pueden visualizar hasta dos simultáneamente.









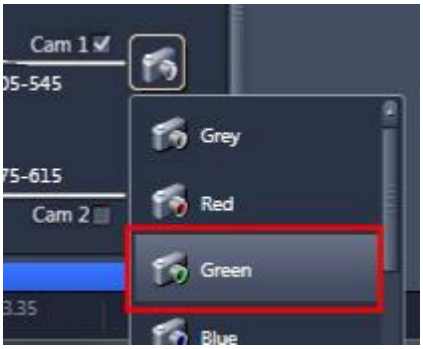
BP 420-470: emite en color azul.

BP 505-545: emite en color verde.

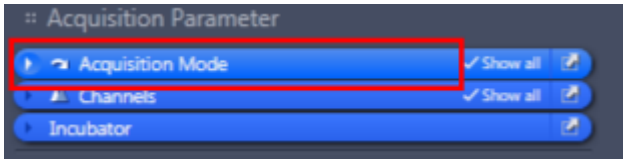
BP 575-615: emite en rojo.

LP: 585: emite en rojo lejano.

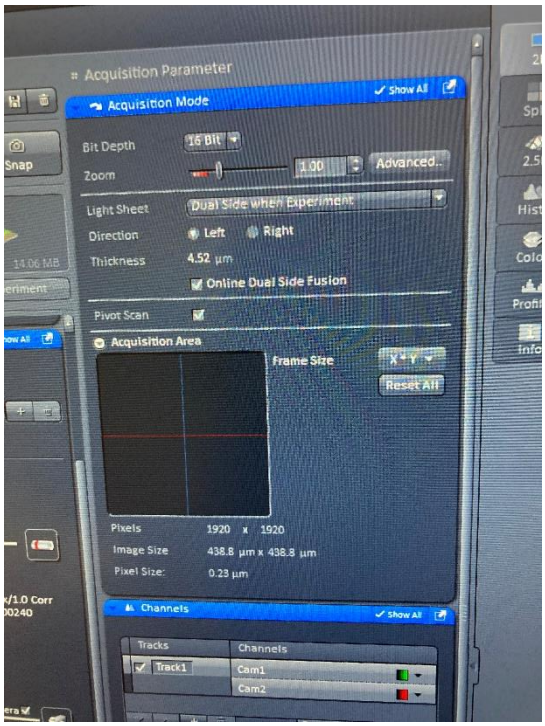
- Cámara 1 y 2: se puede seleccionar el color de visualización para cada cámara en el desplegable adjunto.



- A continuación, se configurarán los parámetros de adquisición

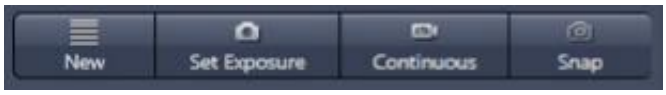


- En la ventana *acquisition mode*, se modificarán los parámetros según convenga. Una configuración propuesta y eficiente es la que se muestra en la imagen siguiente:

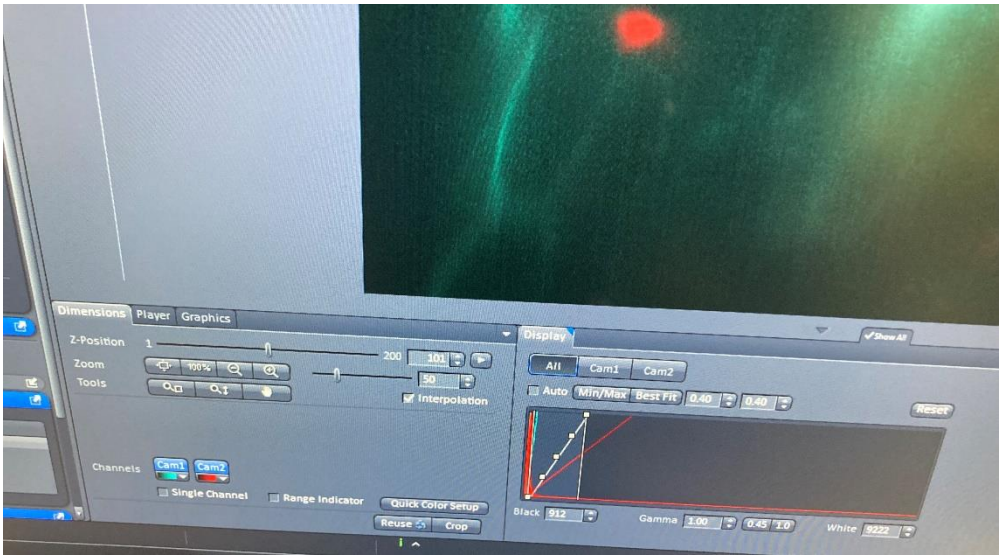


- En la ventana *channels* se modificarán los parámetros según convenga. Una configuración propuesta y eficiente es la que se muestra en la imagen siguiente:
    - Asegurar que las cámaras 1 y 2 están activas y con el mismo color seleccionado que en el *light path.*
    - Asegurar que están seleccionados los mismos láseres que en la ventana de *laser* y *light path.*
    - La potencia de los láseres y el tiempo de exposición se deberán modificar hasta encontrar un compromiso entre ambos parámetros, sin exceder en uno u otro para no quemar la muestra.

- Para empezar a visualizar la imagen en vivo, seleccionar el botón *continuous* (para parar, *stop*). El botón *snap*, permite realizar una captura o fotografía de lo que se muestra en la pantalla.



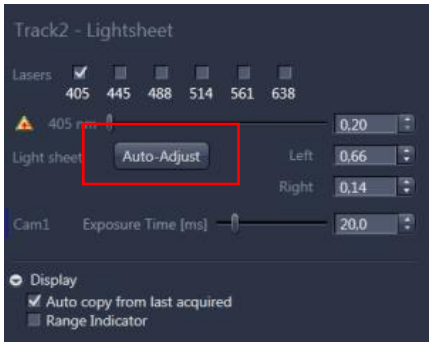
- Para mejorar la calidad de la visualización de la fluorescencia, en la ventana *display*, probar con las opciones de auto, Min/Max o Best Fit.



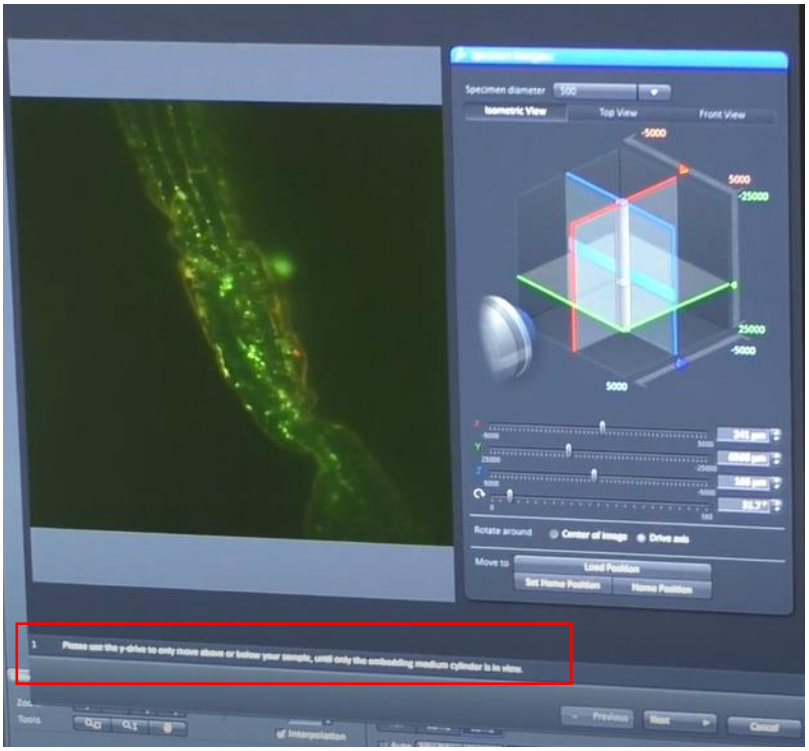
Ver video-tutorial *"3. Adquisición".

BLOQUE 4: AUTO-AJUSTE DEL ALINEAMIENTO DEL LIGHTSHEET

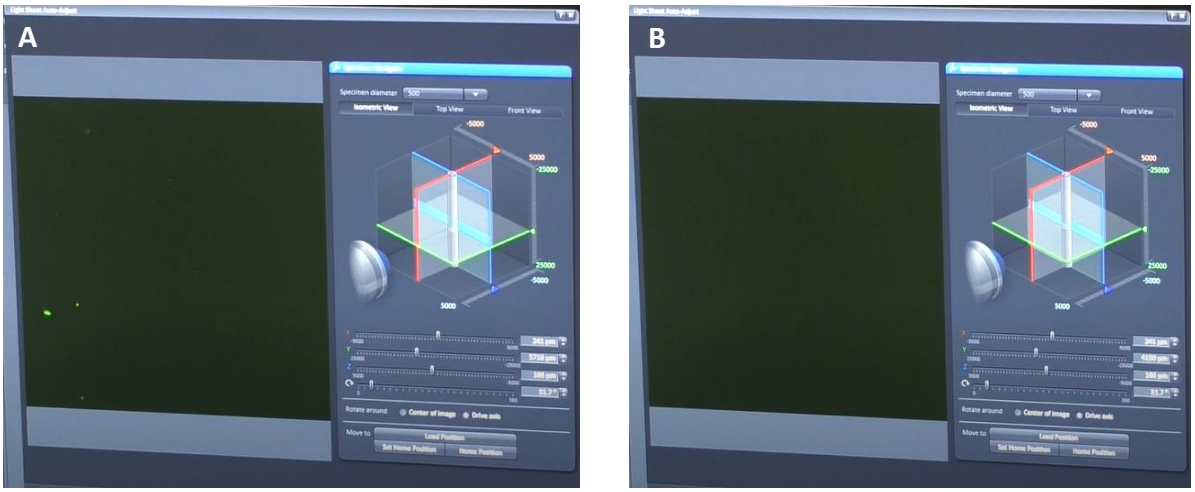
- Seleccionar el botón para realizar el auto-ajuste del alineamiento del lightsheet, localizado en la pestaña de *channels*.



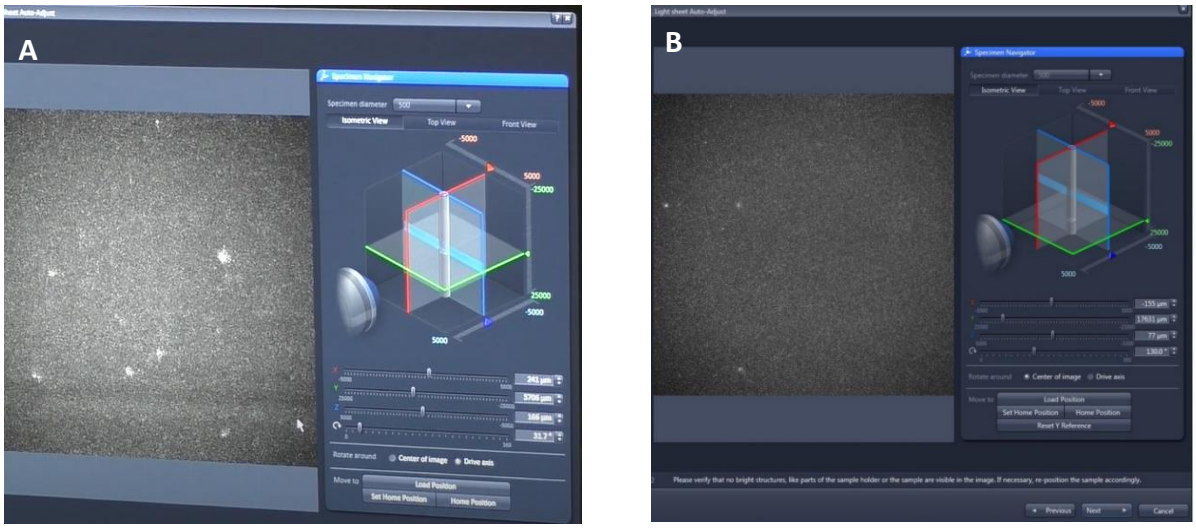
- El asistente del ajuste abre una ventana donde se ve nuestra muestra enfocada y proporciona una serie de instrucciones al pie de la ventana que hay que seguir en todo momento.



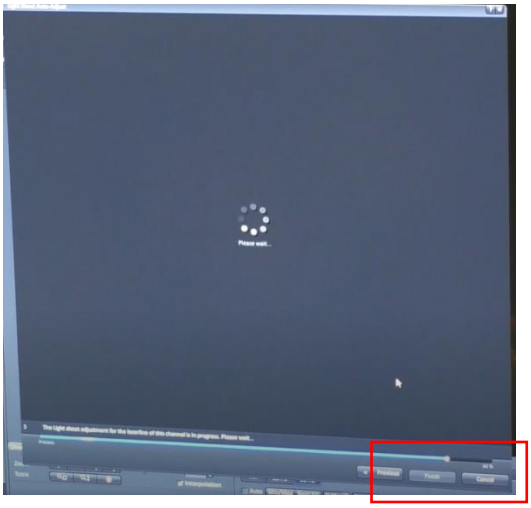
- En este primer paso se debe enfocar (solo moviendo el eje Y) nuestra pantalla a una zona sin muestra, donde la disolución de inmersión se vea clara y sin partículas brillantes. La imagen (A) es un ejemplo de cómo **NO** se debe de enfocar la imagen puesto que se ve suciedad y partículas brillantes. La imagen (B) es un ejemplo de cómo **SÍ** se debe de enfocar.



- Terminado el enfoque, pulsar el botón *Next* y continuar con la siguiente ventana. En este paso se deberá de volver a enfocar la muestra en una zona donde no se visualicen partículas brillantes. La imagen (A) es un ejemplo de cómo **NO** se debe de enfocar la imagen puesto que se ve suciedad y partículas brillantes. La imagen (B) es un ejemplo de cómo **SÍ** se debe de enfocar.



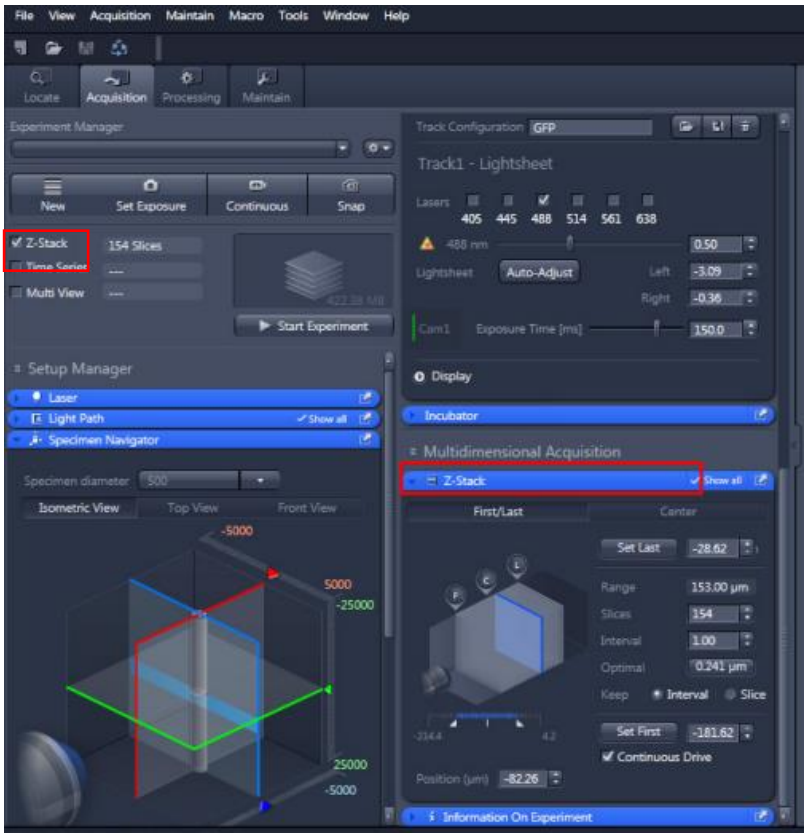
- Terminado el enfoque, pulsar el botón *Next* y continuar con la siguiente ventana. En este paso se deberá de esperar hasta que la barra de progreso alcance el 100% y posteriormente seleccionar el botón *finish*.



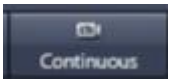
Ver video-tutorial *"4. Auto-ajuste del alineamiento del lightsheet".

BLOQUE 5: Z-STACK

- Seleccionar la opción de *Z-Stack*. Solamente cuando esta opción se encuentre marcada, aparecerá una pestaña específica para configurar la adquisición de *Z-Stack.*

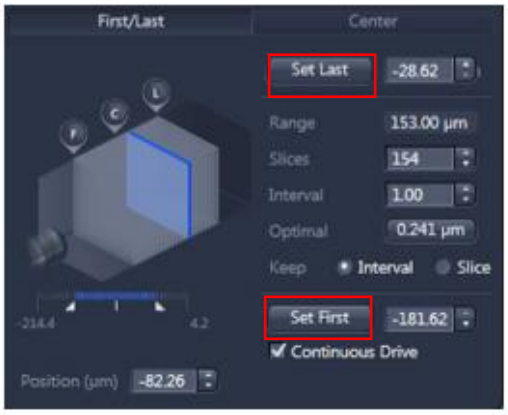


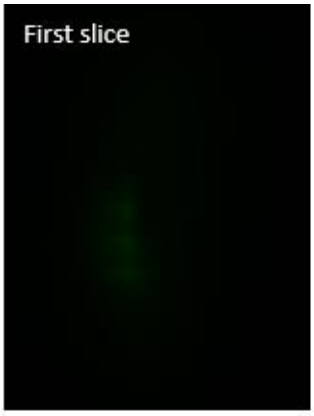
- *Z-Stack* puede configurarse de dos maneras distintas:

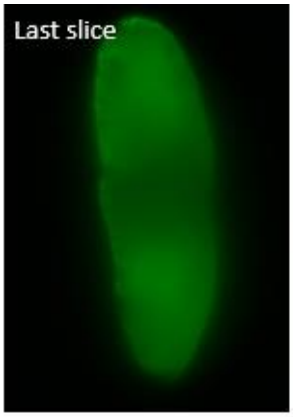
→ **First/last:** Hacer click en 

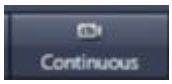
para obtener una adquisición en vivo de la imagen y definir nuestra posición inicial y final mediante la manipulación del eje Z.

Una vez localizada la posición inicial o *first slice,* hacer click en *set first*. Se hará lo mismo con la posición final o *last slice*, seleccionando *set last*.



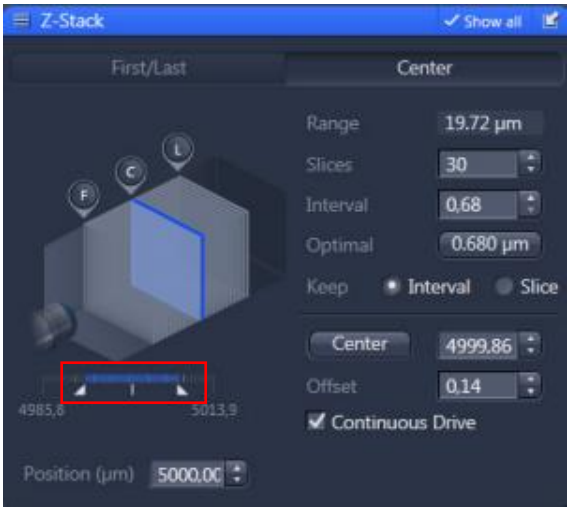




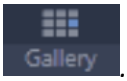
→ **Center:** Hacer click en 

para obtener una adquisición en vivo de la imagen y definir nuestra posición central representada como *offset*, mediante la manipulación del eje Z.

La posición central de enfoque se representa como C, la primera posición como F y la última como L. Una vez localizada la posición central, se escaneará por delante y por detrás según cómo se definan las posiciones F y L mediante las flechas señaladas en rojo.

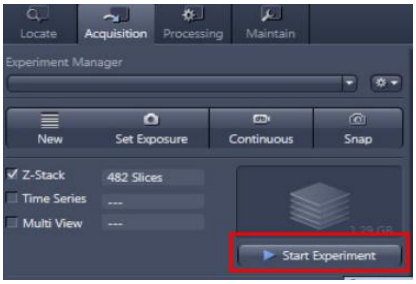


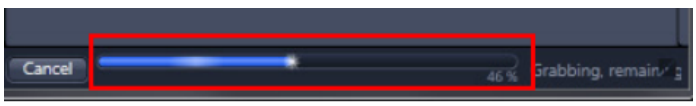
- Ajustes de los parámetros de *Z-Stack* en ambos modos de configuración:

  - La función ***range*** define la profundidad en micrómetros del escáner realizado sobre la muestra.
  - ***Slices*** define el número cortes que se realizan durante el escáner y que se pueden visualizar por separado en la pestaña de *Gallery* 

.
  - ***Interval*** es una función que determina los micrómetros existentes entre un *slice* y el siguiente. Es recomendable el uso del botón ***optimal,*** que establece el intervalo más adecuado según la función *range* y el número de *slices* que se ha predeterminado anteriormente.
  - ***Continuous Drive*** acelera la velocidad del escáner al mover de forma automática el eje Z.

- Para comenzar la adquisición del *Z-Stack,* hacer click en *start experiment*. Puede seguirse la duración del escáner mediante la barra de progreso.

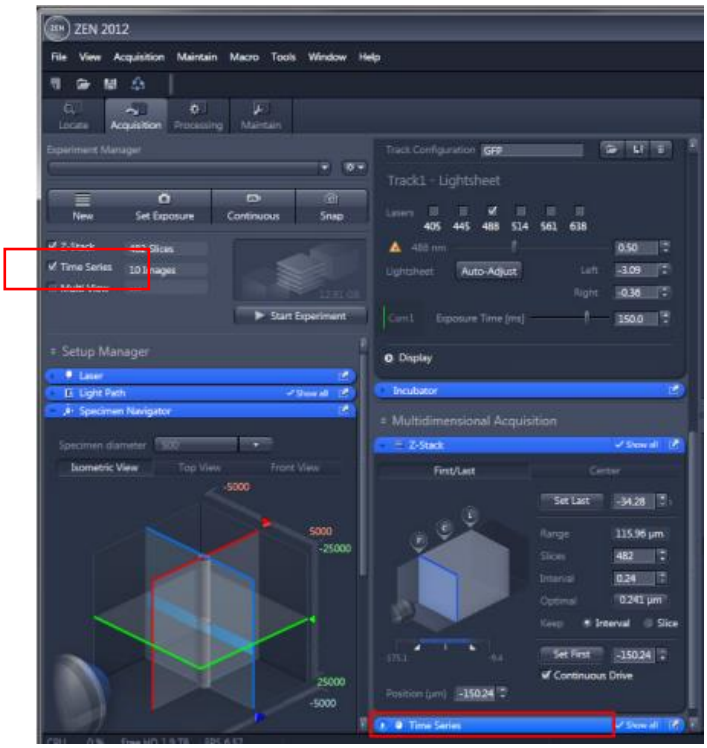




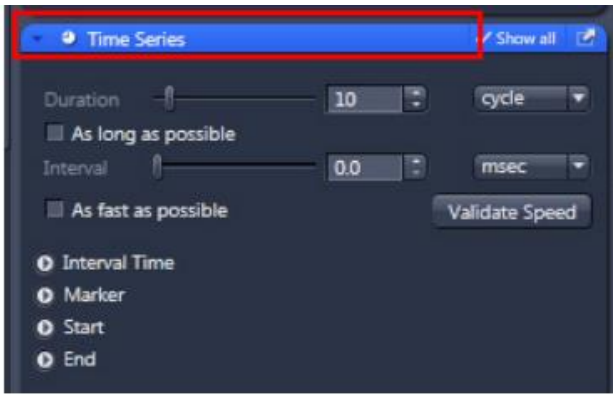
Ver video-tutorial *"5. Adquisición multidimensional Z-stack".

BLOQUE 6: ADQUISICIÓN TIME SERIES

- Seleccionar la opción de *time series*. Solamente cuando esta opción se encuentre marcada, aparecerá una pestaña específica para configurar la adquisición de *time series.*



- Los parámetros a configurar en esta pestaña son los siguientes:

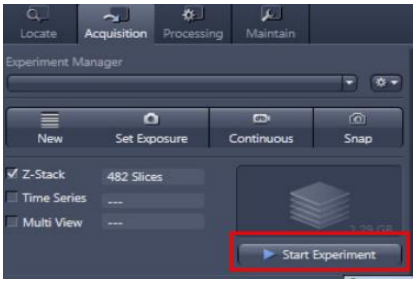


- *Duration:* indica la duración del experimento en ciclos. La opción *As long as possible* permite que el experimento dure hasta que el equipo se quede sin espacio para almacenar más adquisiciones.

- *Interval*: indica la unidad de tiempo a la que se van a reproducir los ciclos definidos (milisegundos, segundos, horas, días…). La opción *as fast as possible permite que con los parámetros de adquisición* (tiempo de exposición, potencia de láseres…) definidos, se reproduzcan los ciclos lo más rápido posible.

- *Validate speed*: calcula el tiempo que el programa va a tardar en realizar un ciclo con los parámetros de duración e intervalos definidos.

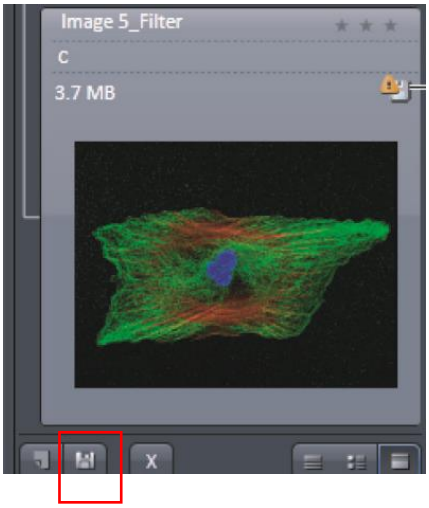
- Para comenzar la adquisición del *time series,* hacer click en *start experiment*.

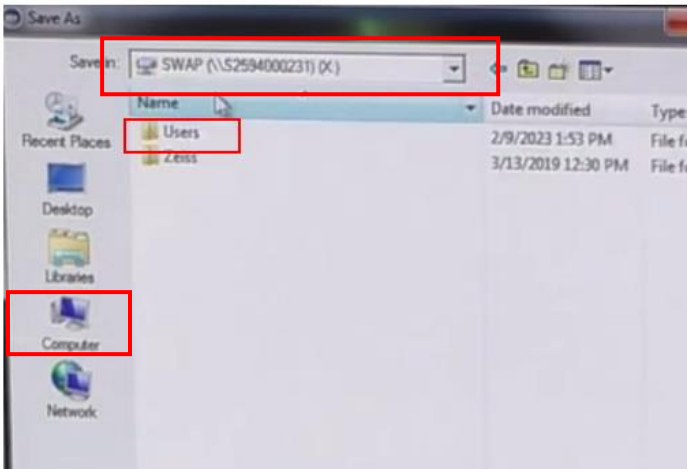


Ver video-tutorial *"6. Adquisición Time series".

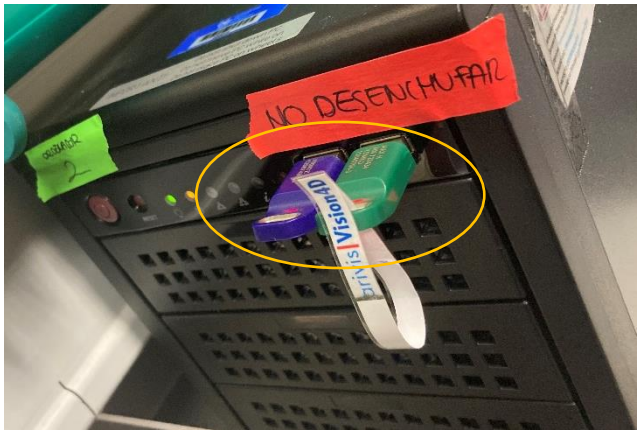
BLOQUE 7: SALVADO DE IMÁGENES

- El estado de salvado de las imágenes realizadas puede comprobarse gracias al icono, que indica que no se han guardado en el equipo.
- Para guardar las imágenes, seleccionar el botón
- Las imágenes guardadas en el ordenador 1, lo harán también en el ordenador 2 de forma paralela. Se pueden encontrar en computer → SWAP → Users.





- IMPORTANTE: NO TOCAR LOS PENDRIVES SITUADOS EN LA PARTE DELANTERA DE LA TORRE DEL ORDENADOR 2 NI ENCHUFAR OTRO USB A ESOS PUERTOS. Si se necesita conectar un USB externo para recolectar los datos, enchufarlo en los puertos disponibles en la parte de atrás de la torre del ordenador 2.



Ver video-tutorial *"7. Salvado de imágenes".