

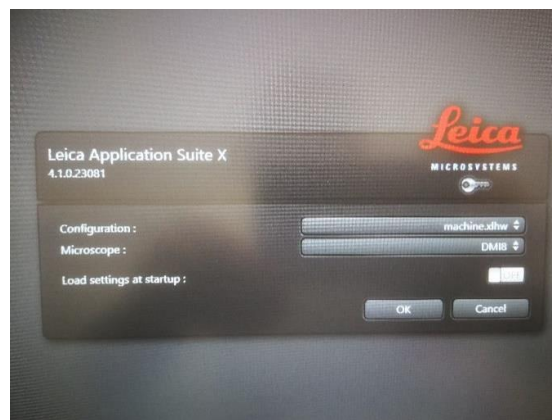
# Aproximación al iniciobásico del Microscopio láser confocal Leica Stellaris

- El primer usuario del día deberá encender el aire acondicionado de la sala y retirar el plástico que cubre el microscopio DMI.
- Para **iniciar TODO el equipo basta con clicar únicamente dos botones** (power y láser) que podéis ver más abajo en la figura y se encenderán la luz halógena, el microscopio DMI8 y el ordenador.



No se deberá accionar ningún otro botón (ni de la lámpara halógena, ni la CPU, etc.), ni girar ninguna llave (de los láseres).

- Todos los usuarios accederán al escritorio del ordenador a través del único perfil: **LASX-User**, siendo su contraseña: **stellaris**.
- **No se debe utilizar NUNCA pendrive**, solo Google drive o el servidor del INCYL.
- Cuando accedemos al escritorio del ordenador el **programa LAS X** que gestiona la adquisición de las imágenes, cliquearemos sobre su icono y se abrirá el cuadro de dialogo que veis en la siguiente figura:



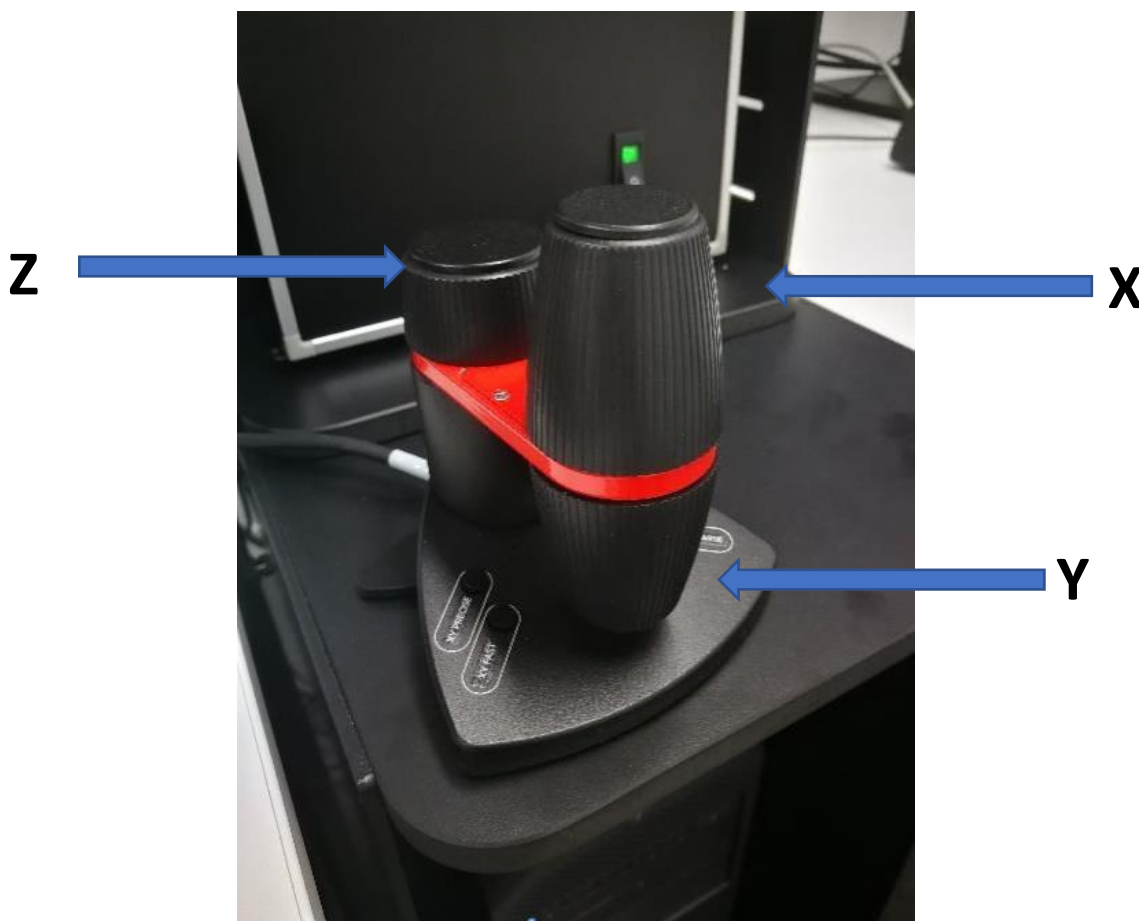
- Una vez que esté abierto el programa podemos **poner nuestra muestra en el microscopio DMI8**.
- Os recuerdo que, al ser un microscopio invertido, es necesario poner el portaobjetos con la muestra boca abajo y **nunca se deberá presionar ni manipular la platina**, es totalmente fija. Asimismo, las muestras de tejido que pongáis en el correspondiente portaobjetos no tienen que estar muy cerca de los bordes del portaobjetos, es necesario dejar al menos 1.5 cm de espacio libre entre el borde del

portaobjetos y la muestra. Tenéis también disponible otra platina más específica para placas petri pequeñas, pero si la necesitáis, solicitármela, NUNCA la intentéis cambiar vosotros.

Para poder enfocar la muestra utilizaremos los siguientes settings del microscopio:

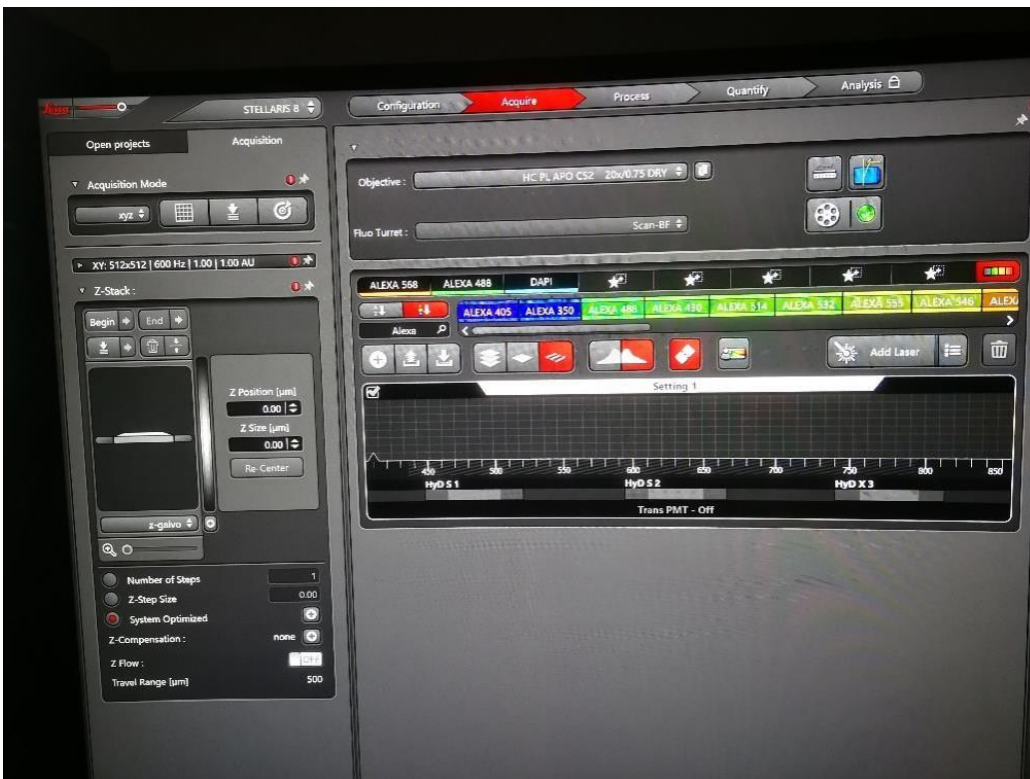


Con la pestaña de los objetivos (imagen izquierda) podemos cambiarlos y con la pestaña de los filtros (imagen de la derecha) podemos clicar las opciones de visualizar las tres opciones de luz transmitida (BF, DIC y POL), ver la luz fluorescente (clicando en las botones de más abajo la opción deseada: DAPI, FITC o RHOD) y la opción "Combi" en la que para verlo después al ordenador se deberá dejar activado la opción CS (Confocal), como se muestra en la imagen. Finalmente, para permitir el paso de luz es necesario activar el obturador "Shutter".



Con el joystick podemos controlar los tres ejes: X, Y, y Z.

Nota: También podemos enfocar la muestra como con cualquier microscopio, con el macro y micro del microscopio.



- Cuando tenemos abierto el **programa LAS X**:

En el primer recuadro de la izquierda hay sólo dos pestañas:

- **Acquisition**, con tres opciones a su vez: (i) Acquisition Mode (formatos xyz, xyzt, etc.) y LAS X Navigator (icono tipo una malla; a través del cual se podrán realizar mosaicos) como más importantes. (ii) XY (format, resolution, speed, zoom factor, zoom in y pinhole, como más importantes) y (iii) Z-Stack.

- **Open projects** (donde se quedarán guardadas nuestras imágenes, series y demás). A este respecto **las imágenes se guardarán exclusivamente en el disco duro E: en la carpeta de usuarios**. Nunca en el disco duro C: ni en el escritorio.

El formato. lei guardará todas imágenes en un único Project. Para guardar las imágenes en otros formatos como **.jpeg** y **.tiff** bastará con clicar con el botón derecho de nuestro ratón la imagen que queremos guardar y en "export image" podremos guardarla en el formato deseado junto con parámetros deseados como barra de escala, fecha, etc.

En el segundo recuadro a la derecha hay 4 pestañas: **Configuration**, **Acquire**, **Process**, **Quantify** y **Analysis**.

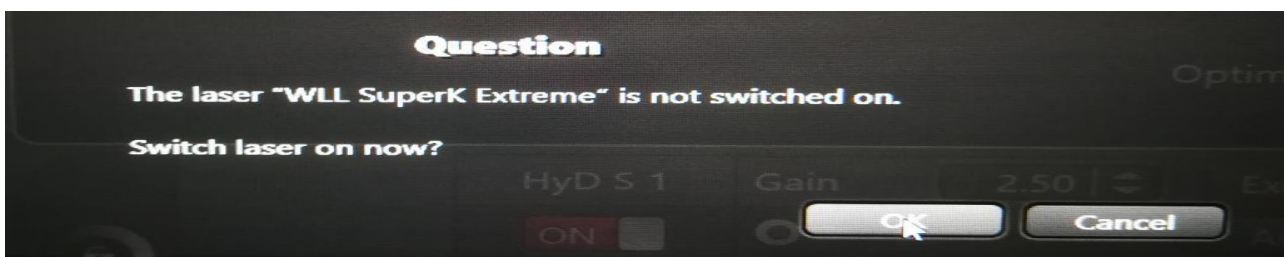
Nos centramos en el **Acquire**, donde ponemos ver de la parte superior a la inferior, la configuración de los **objetivos** y en el recuadro grande de más abajo podemos buscar con la lupa (sino están incluidos como favoritos) cada uno de los **fluorocromos** que queremos utilizar.

Cada icono con su fluorocromo lo arrastraremos al setting 1, concretamente, al HyD deseado según el espectro de excitación/ emisión más próximo (S1, S2 o S3). Como se muestra en la figura de abajo, en el **ejemplo** de incorporar el fluorocromo **DAPI**, en el momento de arrastrarlo al setting 1 HyDS1 nos preguntará si queremos activar el Diodo 405 y contestaremos con un OK.

Si cliqueamos en la misma barra que se muestra la excitación del láser (ej. 405) nos aparecerá la opción de cambiar la **intensidad "Intensity"** del láser (se muestra en porcentaje – en la figura pone 2.00- y SIEMPRE se recomienda encarecidamente que no supere el 40.00 porqué podríamos dañar el láser).



A continuación, otros fluorocromos también los arrastraremos al setting 1, si estos fluorocromos emiten en el rango del espectro del visible e IR, también nos preguntará si queremos activar el láser "blanco" (ver imagen de abajo).



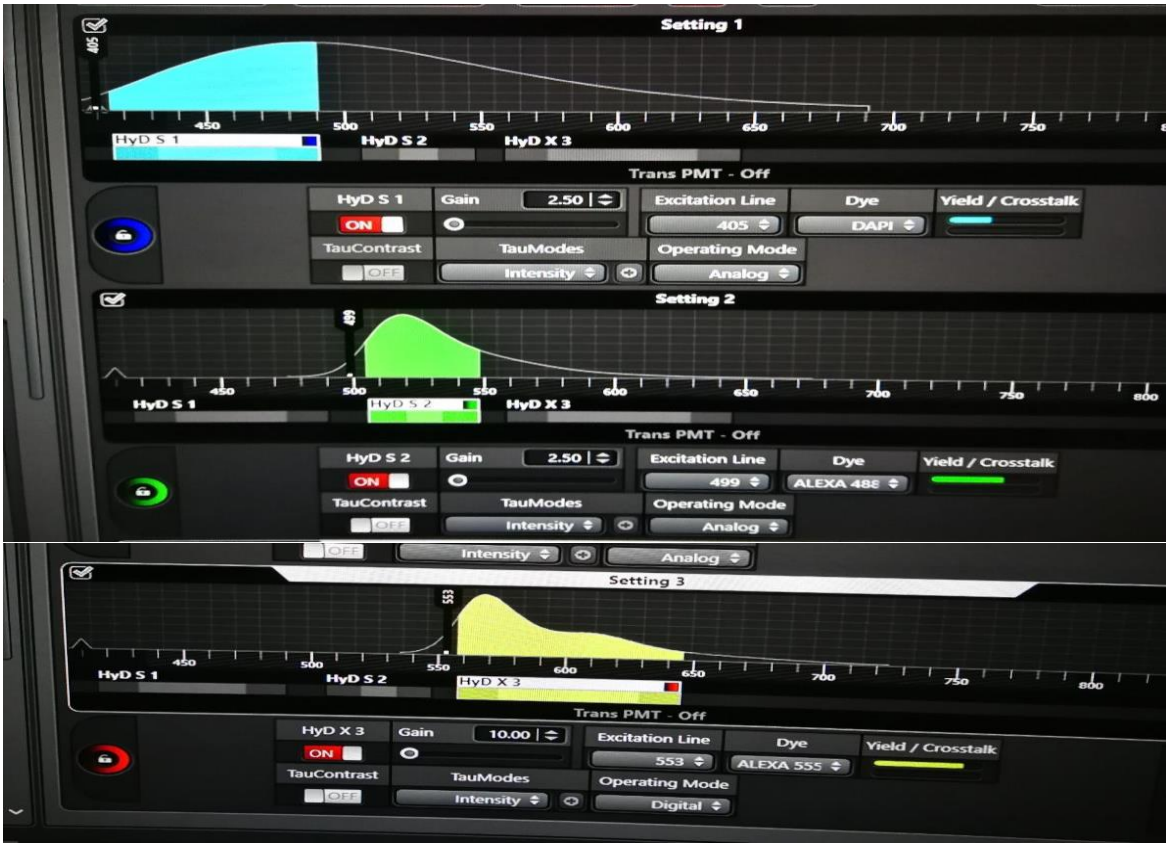
Como se muestra en la figura de más abajo, en el **ejemplo** se han incorporado los fluorocromos **DAPI**, **Alexa 488** y **Alexa 568** en el setting 1 HyDS1, HyDS2 y HyDX3, respectivamente.

Si cliqueamos en la misma barra que se muestra HyDS1, HyDS2 o HyDX3 (cada uno de los fotomultiplicadores donde se recoge la fluorescencia de emisión) nos aparecerá la opción de cambiar la **ganancia "Gain"** (se muestra también en porcentaje – en la figura pone 10.00-).

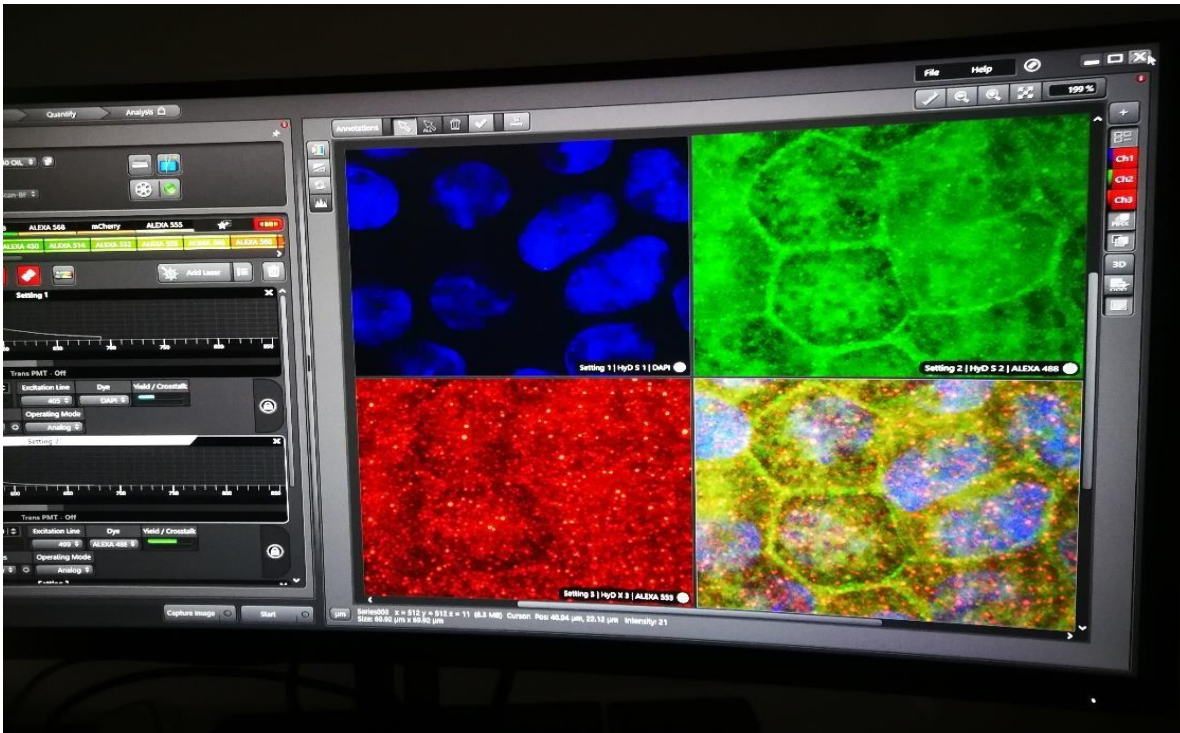


En esta configuración (el tener los tres fluorocromos en un solo setting) únicamente se podría realizar la adquisición de las imágenes si los tres fluorocromos no comparten los mismos rangos de excitación y emisión.

Por lo tanto, recomendamos que en la mayoría de las ocasiones la combinación de fluorocromos a utilizar (este equipo permite un máximo de 8) se reparta entre varios settings; tal y como se muestra en la figura de abajo (setting 1, 2 y 3). Este modo es el denominado secuencial y, de esta forma, evitaremos los falsos positivos de colocalizaciones.



Finalmente, para adquirir una imagen (como la que se muestra más abajo), cliquearemos “Live” y para cada uno de los fluorocromos determinaremos la combinación de **intensity** y **gain**.



### Durante la sesión:

- La intensidad de los láseres no debe superar el valor de 40
- Si el equipo da algún error, activar “error report” y avisar a Javier Herrero o a Luis de Castro ([mjaviht@usal.es](mailto:mjaviht@usal.es); [luisdecastro@usal.es](mailto:luisdecastro@usal.es))
- No permitir actualizaciones cuando el software esté abierto. Avisar a Javier Herrero o a Luis de Castro ([mjaviht@usal.es](mailto:mjaviht@usal.es); [luisdecastro@usal.es](mailto:luisdecastro@usal.es))
- Ante cualquier problema recurrir a Javier Herrero o a Luis de Castro ([mjaviht@usal.es](mailto:mjaviht@usal.es); [luisdecastro@usal.es](mailto:luisdecastro@usal.es)).

### Para acabar la sesión:

1. Guardar las imágenes adquiridas en Google drive o en el servidor del INCyL, **nunca en Pen Drive ni en el equipo** para evitar saturar la memoria del ordenador. Se eliminarán de forma sistemática al final de la semana.
2. . **Limpiar el aceite de inmersión** con alcohol y papel de lentes en los objetivos de 40x y 63x, después de su uso.
3. . Dejar puesto el **objetivo 4x** para evitar que el ajuste del microscopio dañe los objetivos o el inserto.
4. Apagar el ordenador.
5. . Apagar los botones laser y power.
6. Colocar la funda de plástico para evitar que entre polvo en el equipo.
7. . El último usuario del día debe apagar el aire acondicionado para no dejarlo encendido toda la noche y que la temperatura este muy baja por la mañana. El equipo debe estar a  $22\pm 1$  °C
8. Cerrar la puerta y devolver la tarjeta a la conserjería.

## Precauciones de uso de este equipo

- En la configuración de los canales, si tenemos sólo tres fluorocromos lo recomendable es realizarlo con la opción de Escaneo Secuencial “Between Lines” y lo recomendable es utilizar un Setting por cada fluorocromo).
- **NUNCA se deberá presionar ni manipular la platina**, es totalmente fija y si se presiona de alguna forma puede dañarse y doblarse el inserto modificándose la calibración de la planitud de dicho inserto configurada por el técnico de Leica.
- Las muestras de tejido que pongáis **en el portaobjetos** no deben estar **cerca de los bordes** del portaobjetos (**dejar al menos 1.5 cm de espacio libre entre el borde del portaobjetos y la/s muestra/s**) ya que al utilizarse un microscopio invertido podría dañarse la platina (y el galvo) al chocar el objetivo, quedando rozado este último.
- 
- Al terminar la sesión, es **OBLIGATORIO** limpiar el aceite de inmersión, dejar el objetivo de 4x puesto en el microscopio y apagar todo el equipo, así como el aire acondicionado (al final del día), para lograr las óptimas condiciones del equipo.

Vídeo sobre algunas recomendaciones y precauciones para trabajar con la de microscopía invertida <https://www.youtube.com/watch?v=YAnRHle2rdY>

El canal de Youtube es de Jennifer Waters, que es la directora del Nikon Imaging Center del Harvard Medical School. Este mismo canal está muy bien para otros tipos de consejos de microscopía.

### No olvidar los principales riesgos y normas a seguir:

- Es recomendable depositar el aceite de inmersión (la mínima cantidad indispensable) en el portaobjetos que contiene la muestra que en el objetivo para no dañarlo. Cuando se termine su uso, es **OBLIGATORIA la limpieza del aceite de inmersión con alcohol y papel de lentes:** quitando primero el exceso de aceite con el papel de lente seco, a continuación utilizad etanol 70% y, por último, con el papel de lente seco quitar el exceso de etanol para que quede completamente seco.
- NUNCA presionar ni manipular **la platina**, es fija. Hay otra platina, si la necesitáis, solicitar a los responsables. Se pide encarecidamente el uso de muestras de tejido que no estén muy cerca de los **bordes del portaobjetos** ya que al utilizarse un microscopio invertido podría dañarse la platina y los objetivos si se "apura" el espacio de los bordes del portaobjetos.
- Guardar las imágenes adquiridas en Google drive o en el servidor del INCyL, **nunca en Pen Drive ni en el equipo** para evitar saturar la memoria del ordenador.
- Colocar la **funda de plástico** al finalizar para evitar que entre polvo en el equipo.
- **Apagar** el equipo cuando se acabe de usar, cerrar la puerta y devolver la **tarjeta** a la conserjería.
- **Apagar el aire acondicionado** el último usuario del día que tenga reservado para no dejarlo encendido toda la noche.

### CONDICIONES DE RESERVA DEL EQUIPO CONFOCAL Y ANÁLISIS DE IMAGEN

Al igual que sucede con el microscopio de célula viva de Zeiss, cualquier usuario que quiera utilizarlo por primera vez tendrá que escribir a Javier Herrero y Luis de Castro (luisdecastro@usal.es; mjaviht@usal.es) (NO vale que le enseñe un compañero de laboratorio) para que le pueda acompañar y enseñar su manejo. Cuando

el usuario haya adquirido las capacidades necesarias para el manejo del equipo de forma autónoma, será autorizado para acceder a la sala donde está disponible el equipo ("Patología 1"). Se seguirá el sistema de reservas de la página web del INCYL. Habrá una tarjeta disponible en conserjería para el acceso que será devuelta al acabar la sesión. Su utilización solo se podrá realizar en el horario que permanezca abierto el centro. No en fines de semana ni vacaciones.

Los usuarios externos y los estudiantes de TFG y TFM no utilizarán el equipo autónomamente. El técnico de microscopía del INCYL procesará sus muestras siguiendo sus indicaciones.

Una vez adquiridas las imágenes, se pueden visualizar y procesar en el ordenador situado en la sala de Microscopía que dispone del software LAS X. Esto evitará saturar el uso del ordenador del equipo. La utilización del ordenador de la sala de microscopía se llevará a cabo mediante el sistema de reservas de la página web del INCYL: <https://institutoneurociencias.org/servicios/reserva-de-espacios/>.

En el siguiente enlace también puedes bajarte el software de Leica, eso sí, sólo vale para PC: <https://www.leica-microsystems.com/es/productos/software-de-microscopia/detalles/product/show/Products/leica-las-x-ls/>. En este sentido, hay un manual de instrucciones completo sobre el uso de las diferentes aplicaciones del equipo en help (esquina derecha arriba de la pantalla principal del software LAS X). Es muy conveniente usarlo para buscar cómo realizar una aplicación concreta antes de ir al confocal.

Debido a la alta demanda de uso de este equipo, hay un **sistema de reservas que hay que cumplir estrictamente:**

Las reservas se realizarán la semana antes de su uso. Concretamente, desde el lunes a las 8:00 hasta el martes a las 20:00h de la semana anterior. Cada usuario reservará como máximo una franja de mañana o tarde (de 8:00 de la mañana a 14:00, o hasta la hora deseada, o desde las 14:00 a 21:00, o hasta la hora deseada) siempre empezando las reservas desde las 8:00 o desde las 14:00 para evitar cruces en estas reservas. En el caso de que no se deseen utilizar algunas de las primeras horas seleccionadas, por ejemplo de 8 a 10 a.m., poco después de realizar esta reserva se cancelarán las horas no deseadas, se enviará un e-mail a Luis, y únicamente para estos franjas horarias libres se abrirá otro turno de reserva al día siguiente, el martes, a las 8 de la mañana.

Posteriormente, las franjas de horarios que quedarán libres tras este primer periodo de reserva (lunes 8 h a martes 20 h), se podrán reservar desde el miércoles a las 8:00 hasta el jueves a las 20:00h. De nuevo, cada usuario reservará como máximo una franja de mañana o tarde (de 8:00 de la mañana a 14:00 o de 14:00 a 21:00). Por último, después de la finalización este segundo turno de reservas y si aún quedara espacio disponible, éstos se podrán reservar ya de forma total libre hasta completar todas las franjas horarias (de 8 a 21 h).

Dada la alta ocupación del equipo, es imprescindible que, si alguien no puede usar el equipo en el horario reservado, retire su reserva a la mayor brevedad posible y se lo comunique al resto de usuarios. Para ello, se ha creado una lista de distribución de email denominada confocal\_incy@listas.usal.es para comunicar la cancelación de las reservas o cualquier cambio que se produzca por parte de todos los usuarios.

En ningún caso se podrá reservar para el uso por otro usuario y el equipo únicamente podrá ser utilizado por quién lo reserve. Cualquier mal uso del equipo se penalizará sin poder reservar la semana siguiente.

**Cualquier incumplimiento de ALGUNA de las normas de uso supondrá la retirada del permiso de acceso para el usuario y si conlleva una avería, el coste de reparación del mismo será asumido por el IP correspondiente. El equipo puede dañarse por varios motivos y debemos ser extremadamente cuidadosos.**