
	CARACTERÍSTIQUES TÈCNIQUES DEL MICROSCOPI CONFOCAL ESPECTRAL LSM980 + AIRYSCAN2	Codi: VHIR-UAT-DOC-017	Revisió: 01
		Data de redacció: 28/04/2021	Pàgina: 1 de 8

APROVACIÓ

REDACTAT PER	REVISAT PER	APROVAT PER
Nom: Marta Valeri Sala Càrrec: Responsable Plataforma Microscòpia UAT Nom: Càrrec:	Nom: Rosa Prieto Càrrec: Cap UAT Nom: Mònica Anglada Càrrec: Cap Qualitat	Nom: Rosa Prieto Càrrec: Cap UAT Nom: Càrrec:
Signatures:		

	CARACTERÍSTIQUES TÈCNIQUES DEL MICROSCOPI CONFOCAL ESPECTRAL LSM980 + AIRYSCAN2	Codi: VHIR-UAT-DOC-017	Revisió: 01
		Data de redacció: 28/04/2021	Pàgina: 2 de 8

L'objectiu d'aquest document és descriure les característiques tècniques del microscopi confocal espectral LSM980 que disposa la UAT, per tal que els usuaris puguin consultar aquesta informació per poder planificar els seus experiments i adaptar-los a les especificacions de l'equipament disponible. Aquest document es relaciona amb l'ITE de l'equip (VHIR-UAT-ITE-017v.01).

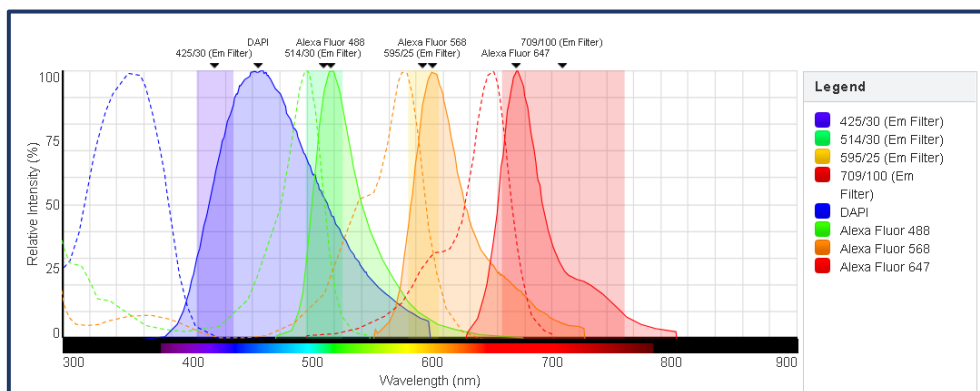
El Microscopi de rastreig Confocal Espectral LSM980 de Zeiss està construït sobre un microscopi invertit totalment motoritzat **Axio Observer 7**, les funcions del qual es poden controlar tant des del propi estatiu, com des de la pantalla TFT adjacent, com des del propi programa d'adquisició de les imatges **Zen Blue**.

- **Microscopi Invertit Axio Observer 7:**

Per poder fer la tria del camp/camps a adquirir, el microscopi consta d'un sistema d'il·luminació per LEDs més els corresponents miralls dicroics, més un filtre quàdruple d'emissió amb les següents característiques:

Observació de les preparacions als oculars	
Il·luminació / excitació Font de llum Colibrí 7 (RGB-UV) LED	LED UV (385) DAPI, Alexa 405, Hoechst
	LED Blau (475 nm) eGFP, Fluo 4, FITC
	LED Verd (555 nm) Cy3, TRITC, DsRed
	LED Roig (630 nm) Cy5, Alexa 631, TOTO-3
Separació excitació/emissió	Mirall dicroic QBS 405 + 493 + 575 + 653
Detecció	Filtres Emissió QBP (quàdruple) en els següents rangs
	<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> -----425/30----- -----514/30----- -----592/25----- -----709/100----- </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; margin-top: 5px;"> DAPI, Alexa 405, Hoechst eGFP, Fluo 4, FITC Cy3, TRITC, DsRed Cy5, Alexa 631, TOTO-3 </div>

Exemple de fluorocroms que es poden visualitzar amb aquests filtres:

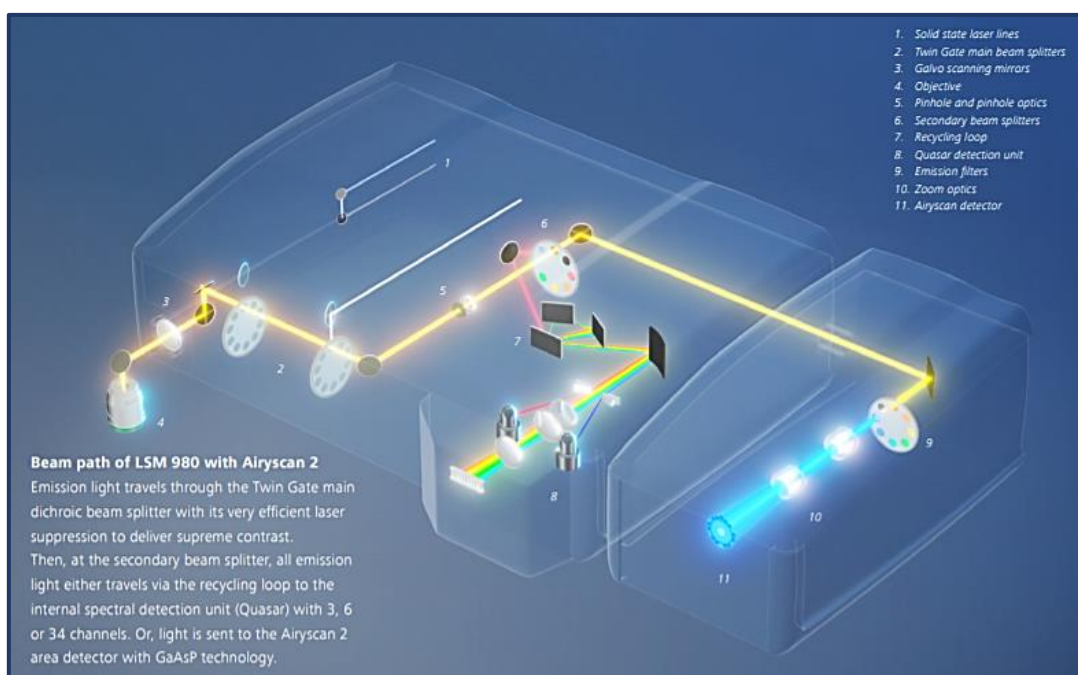


- **Configuració d'objectius:**

Objectius	Distància de treball	Medi Immersió	DICT
Plan-Apochromat 10x/ NA 0,45	2,1mm	Sec	SI
LD LCI Plan-Apochromat 25x / NA 0,8 Imm	0,57mm	Oli, Aigua, Glicerol	SI
Plan-Apochromat 40x/ NA 1,3 Oil	0,2mm	Oli	SI
Plan-Apochromat 63x/ NA 1,4 Oil	0,19mm	Oli	SI
Plan-Apochromat 63x/ NA 1,2 Imm	0,49mm	Aigua, Glicerol	SI
Alpha Plan-Apochromat 100x/ NA 1,46 Oil	0,11mm	Oli	SI

*Els objectius d'immersió en aigua i glicerol són especialment recomanables per les captacions en viu, ja que el seu índex de refracció és més similar al medi de cultiu i a les estructures cel·lulars.

- **Especificacions de l'adquisició en confocalitat:**



- **Il·luminació:** 6 línies de làser que cobreixen tot el rang de l'espectre del visible.

Làser	Línies de làser	Exemples de Fluorocroms
Làser d'estat sòlid 405nm 15mW (30mW)	405	DAPI, Hoescht, Alexa405
Làser d'estat sòlid 445nm 7,5mW (30mW)	445	CFP
Làser d'estat sòlid 488nm 10mW (30mW)	488	FITC, EGFP, Alexa488
Làser d'estat sòlid 514nm 10mW (30mW)	514	YFP, MKO
Làser d'estat sòlid 561nm 10mW (25mW)	561	TRITC, Alexa568, Alexa594, IP
Làser d'estat sòlid 639nm 7,5mW (25mW)	639	Alexa633, Alexa647, DRAQ5, TOPRO-3



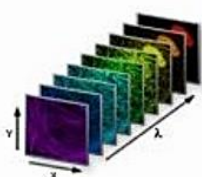
A part d'incloure un sistema d'autoenfocament de la mostra per *software* basat en la diferència de contrast de fluorescència, el sistema també consta d'un sistema d'enfocament més precís anomenat **Definite Focus** que garanteix el manteniment del focus en adquisicions en viu de temps perllongats.

- **Sistema de detecció:**

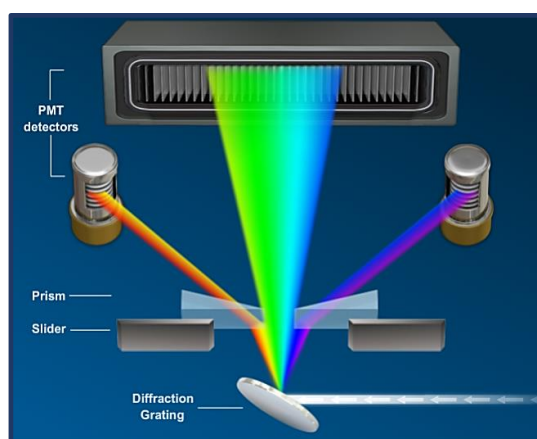
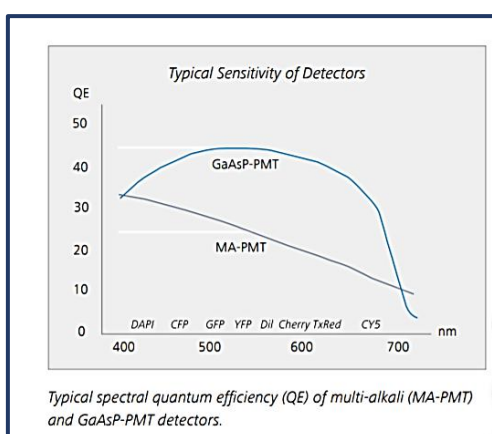
Detectors	Tipus	Aplicacions
Fluorescència		
Sistema de Detecció Espectral (λ 400 a 750nm) Quasar basat en reixeta hologràfica compostat per :	2 PMT-multiàlcali refrigerats (1 millorat pel vermell) + 1 detector GaAsP de 32CH	Captacions Multicolor en mostres fixades i en viu Pohoton Counting
Transmesa	1 detector per mostres de camp clar/DICT en tots els objectius	Imatge de suport no confocal
Detector de Súper Resolució		Aplicacions
Airy Scan (resol.XY Fins a 120nm i Z fins a 360nm)	Detector monocromàtic d'àrea de 32 elements	Col·localització Resolució d'estructures per sota la resol. òptica

El rang dinàmic dels detectors pot ser de **8 o 16 bits**.

Es poden agafar imatges des de **4 x 1** fins a **8192 x 8192 píxels** per múltiples canals simultàniament.




Sistema de Detecció Espectral Quasar: està compostat per 2 detectors **MA-PMT** refrigerats més un **detector GASP de 32 canals** més una **reixeta de difracció de la llum** (fig.dreta). Com es pot veure a la gràfica de baix a l'esquerra, els detectors GASP tenen una eficiència en relació al SNR (senyal vs soroll de fons) molt més gran que els PMTs en tot el rang de l'espectre excepte en les longituds d'ona més llargues. És per això que un dels detectors MA-PMT està millorat pel vermell obtenint així un sistema altament sensible en tot el rang de l'espectre visible.



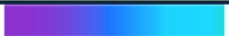
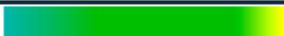
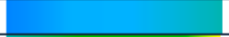









Els **sistema Quasar** ofereix diferents avantatges com:

- Ajustament de les finestres d'adquisició de la mostra, minimitzant així el creuament de canal.

	CARACTERÍSTIQUES TÈCNIQUES DEL MICROSCOPI CONFOCAL ESPECTRAL LSM980 + AIRYSCAN2	Codi: VHIR-UAT-DOC-017	Revisió: 01
		Data de redacció: 28/04/2021	Pàgina: 5 de 8

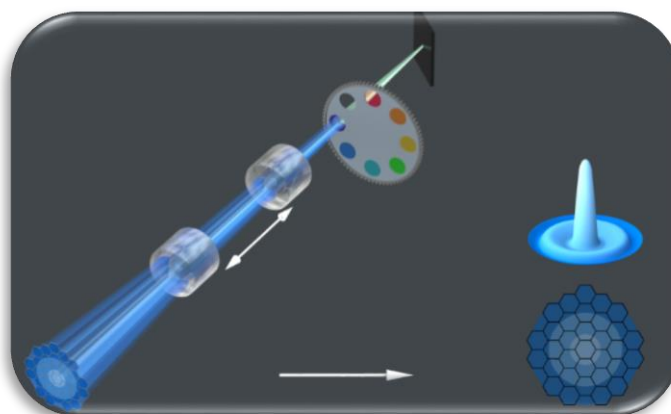
- Captació simultània de diverses fluorescències (tant en mostra fixada com en viu) en un sol rastreig d'aquesta (lambda scan) aplicant a posteriori els algorismes de separació espectral per assignar cada fluorescència al seu fluorocrom. Amb el detector de 32 canals es poden dur a terme assajos en viu multicolor que d'altra manera seria molt complicat o impossible.
- Captació de mostres marcades molt dèbilment mitjançant el comptatge de fotons.

Detector de súper resolució Airyscan 2: Es tracta d'un detector d'àrea de 32 canals que permet disminuir el límit de resolució tant lateral com axial per sota de la resolució òptica, i per tant, tenir informació més acurada d'aquesta i resoldre millor les estructures de mida més petita. Aquest detector no és espectral i per discriminar les diferents emissions dels fluorocroms està equipat amb una rodeta de filtres d'emissió amb les següents característiques:

Filtres Airy Scan (mode confocal i super resolució)				
Emission filter BP 420-480 + BP 495-550	B		G	
Emission filter BP 465-505 + BP 525-585	Cyanina		G/Y	
Emission filter BP 495-550 + BP 570-630	G		Y/R	
Emission filter BP 495-560 - LP 660	G		FR	
BP 570-620 + LP 660 Airyscan	Y/G		FR	
BP 420-480 + BP 570-630 Airyscan	B		Y/R	

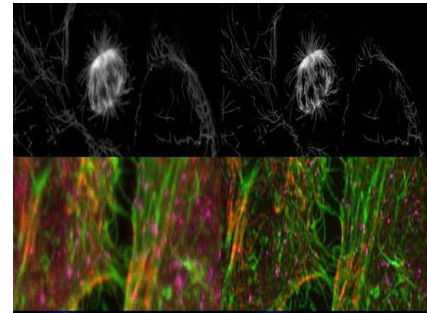
Els microscopis confocals clàssics il·luminen i detecten la mostra punt per punt de manera seqüencial. Un punt d'una mostra, degut al fenomen de difracció de la llum, es visualitza al microscopi com un patró d'anells concèntrics (airy discs), la petjada dels quals s'anomena **Point spread function** (PSF), que empitjora considerablement la resolució d'aquest punt. En un microscopi confocal, el que es fa per incrementar tant la resolució XY com Z, és posar davant del detector una obertura anomenada *pinhole* que només deixa passar la llum provinent del primer airy disc. Això fa que es resolguin millor les estructures però disminueix el contrast, ja que es recull molta menys llum.

L'Airyscan, mitjançant la seva disposició en àrea, reproduïx la **PSF** de cada punt de la mostra reassignant la fluorescència provinent dels altres discs airy al primer augmentant així la relació **SNR** i la resolució per un factor de **2X**.



Avantatges:

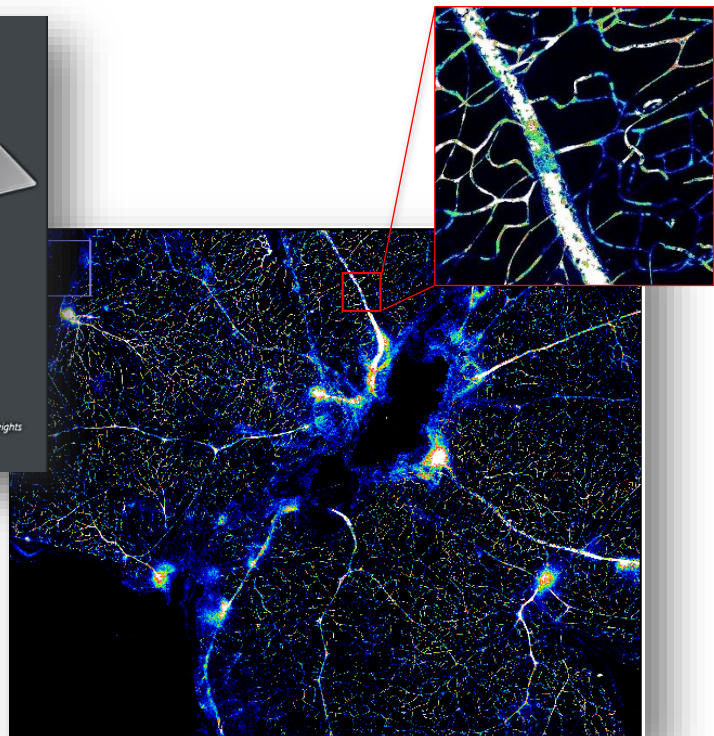
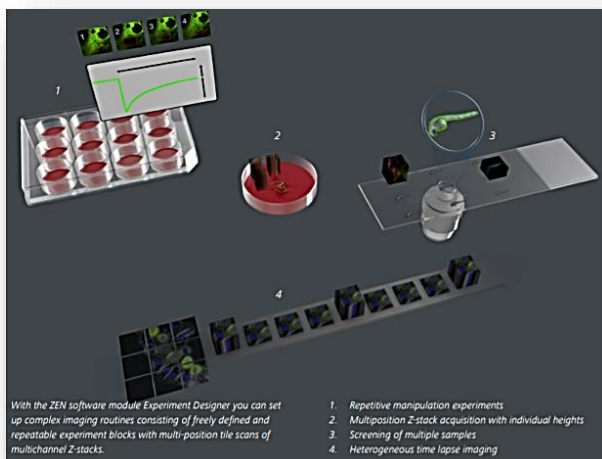
- Increment **2X** de la resolució òptica (120nm XY i 350nm Z).
- Increment de la relació SNR de **4X-8X**.
- Temps de processament (1024X, 1024Y, 150Z): 17 segons.




- **Platina i control eix Z:**

Platina	
Motoritzada	Formació de mosaics (fins a 1000 tiles) Tria de diferents camps aleatoris Tria diferents ROIs dins d'un camp
Interval de desplaçament	130mm x 100mm
Velocitat max. de desplaçament	25mm/s
Resolució	0,1µm
Reproducibilitat	<1µm

Control eix Z	
Control eix Z del microscopi	Pas de 10nm
Insert Piezo de més precisió i velocitat	
Rang Z	500nm
Velocitat	5mm/s
Resolució	1nm
Reproducibilitat	més menys 5nm



Dra. Patrícia Bogdanov, Lab. Diabetes i Metabolisme

	CARACTERÍSTIQUES TÈCNIQUES DEL MICROSCOPI CONFOCAL ESPECTRAL LSM980 + AIRYSCAN2	Codi: VHIR-UAT-DOC-017	Revisió: 01
		Data de redacció: 28/04/2021	Pàgina: 7 de 8

- **Experiments en viu:** El sistema d'incubació és totalment tancat per donar la major estabilitat ambiental. A més, consta d'un sistema d'humidificació de l'aire per evitar l'evaporació de la mostra i de l'opció **Definite focus** per evitar les possibles variacions de l'enfocament en experiments de llarga durada.

En viu	Suports	Color i marca
Sistema d'incubació totalment tancat de control de Temperatura, O2, CO2 i humitat	Plaques 35mm Ø	Transparent / PECON
	Plaques 60mm Ø	
	Portaobjectes compartimentats glass bottom (0,17mm gruix)	
	Plaques multi pouet Glassbottom (0,17mm gruix)	

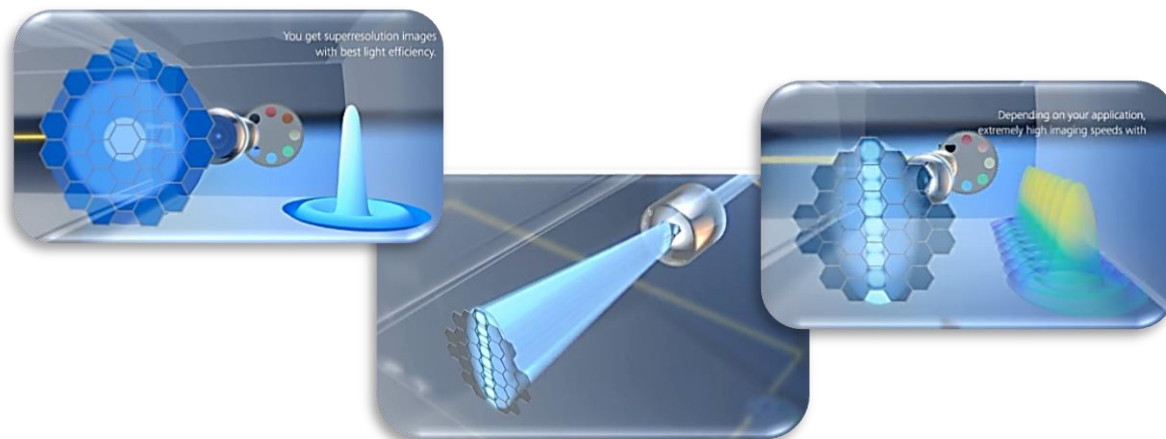
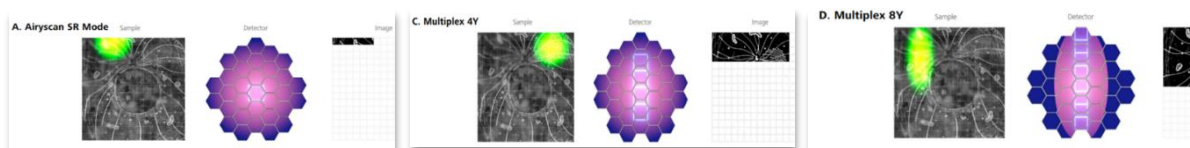
- **Velocitats i modes de rastreig:**

Velocitats					
LSM980	Confocal	AiryScan SR	Multiplex SR-4Y	Multiplex SR-8Y	Multiplex CO-8Y
Parallelization	1	1	4	8	8
Max. Resol. X/Y nm		120/120	140/140	120/160	180/220
Max. Resol. Z nm		350	450	450	550
Max. Fps at 512 x 512	6,1	4,7	25	47,5	34,4
Max. Fps at max. FOV (mm)	0,4 (zoom 0,6 / SF20)	0,2 (Zoom 1,7 / SF7)	1,0 (Zoom 1 / SF12)	2,0 (Zoom 1 / SF12)	9,6 (Zoom 1 / SF12)
processing 1k x 1k / 150slices		<30s	<30s	<30s	<30s
SNR vs convent confocal		4-8x	4-8x + speed	4x + speed	
Antibody labelling, fine structures		*****	****	***	**
Antibody labelling, tiling		**	****	****	***
Live cell imaging		**	***	****	*****

A part de la manera de rastreig convencional, el microscopi també té un sistema de rastreig anomenat **Multiplex** que està associat al detector de súper resolució **AiryScan**.

Aquesta ràpida manera de captació de les imatges sorgeix de la necessitat de fer seguiment tant en models tradicionals com són els cultius cel·lulars com en nous models 3D d'organoids, esferoids i organismes sencers a temps real i a alta resolució (xex: dinàmiques estructurals, senyalització cel·lular, assajos de tràfic i difusió de molècules...)

El rastreig multiplex es basa en modificar la forma del feix lumínic del làser per poder il·luminar 4 o 8 línies simultàniament. Com l'*airyscan* és un detector d'àrea, podem recollir totes les deteccions alhora a un cost molt baix des del punt de vista de la resolució.



- Programes:

El software **Zen Blue** és el programa a través del qual es poden controlar totes les accions del microscopi, des del control de les tècniques d'il·luminació, tant fluorescència convencional com llum transmesa, el control de l'exploració, la visualització i l'adquisició de sèries multidimensionals, com els processats bidimensionals i quantificacions de la imatge.

Altres mòduls que inclou són:

- . Mòdul **Tiles** per la creació de mosaics.
- . Mòdul de **Quantificació i anàlisi**.
- . **Experiment Designer** per la programació d'experiments complexes amb un component temporal.
- . **Mòdul 3D**.
- . **Mòdul d'anàlisi de Col-localització**.
- . **Blanqueig i Time series**. Sèries temporals
- . El programa inclou varis mòduls de **Deconvolució** de la senyal.
- . **Separació espectral**.

A la sala d'anàlisi que es troba a la UAT (laboratori 038-09), hi ha una estació d'anàlisi "off-line" (estació 2) amb el mateix programa del microscopi i tots els mòduls complementaris per poder modificar i analitzar els arxius.