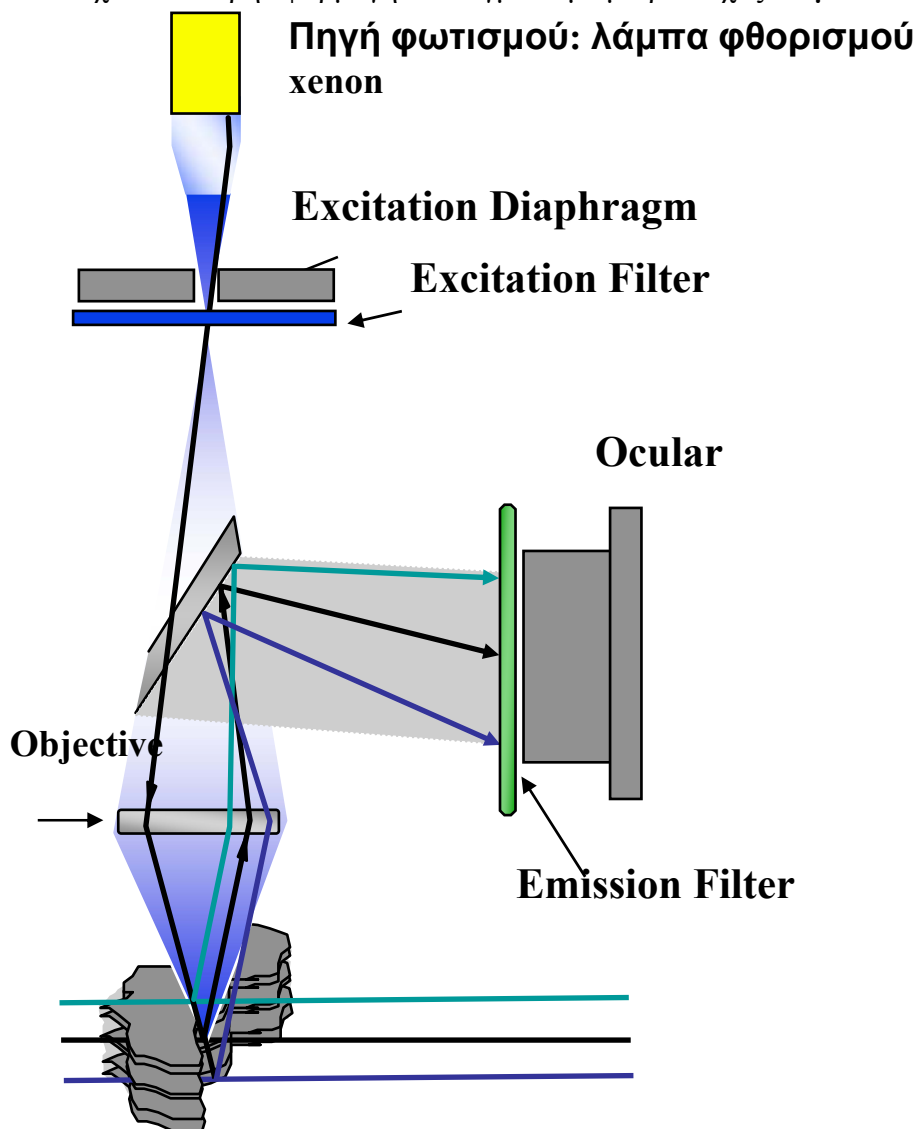


Εκπαίδευση στη χρήση του μικροσκοπίου φθορισμού ευρέως πεδίου OLYMPUS Time lapse Cell R IX-81

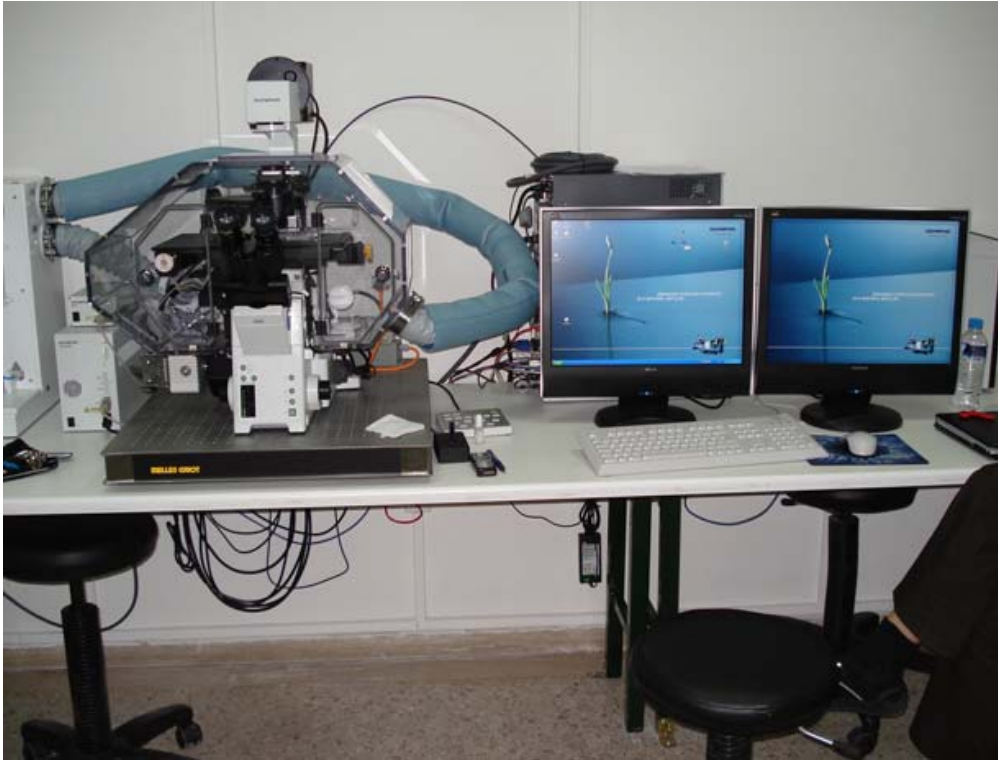
1. Αρχή λειτουργίας του μικροσκοπίου φθορισμού ευρέως πεδίου

Στη μικροσκοπία φθορισμού ευρέως πεδίου, το δείγμα διεγείρεται με φως, που προέρχεται από μία λάμπα φθορισμού. Ο φθορισμός που εκπέμπεται από το δείγμα αφού περάσει μέσα από φίλτρα εκπομπής (εικόνα 1) ανιχνεύεται **άμεσα** από τον παρατηρητή ή έμμεσα από φωτογραφική ή ψηφιακή κάμερα. Ο φθορισμός αυτός προέρχεται από μεγάλο όγκο του δείγματος και με αυτό τον τρόπο ανιχνεύεται και φθορισμός που προέρχεται έξω από το επίπεδο εστίασης (out of focus light). Για το λόγο αυτό, η μικροσκοπία φθορισμού ευρέως πεδίου έχει καλύτερη εφαρμογή σε δείγματα με μικρό πάχος <math><2 \mu\text{m}</math>.



Εικόνα 1. Αρχή λειτουργίας του μικροσκοπίου φθορισμού ευρέως πεδίου.

2. Από τι αποτελείται το μικροσκόπιο φθορισμού ευρέως πεδίου Olympus IX81/Cell R



Εικόνα 2. Olympus Time lapse IX81 Cell-R

- Ανάστροφο μικροσκόπιο φθορισμού, πλήρως μηχανοκίνητο (fully motorized)
- Hamamatsu ORCA κάμερα ασπρόμαυρη και ψυχόμενη (CCD ORCA/AG),
- PC του μικροσκοπίου, οθόνες pc. Futzitsu /450 GB, 160 GB λειτουργικό. Περιέχει όλες τις κάρτες που διαχειρίζονται το Incubator, microscope, Image analysis CELL R.
- Δεύτερος υπολογιστής, ο οποίος χρησιμοποιείται για Back up των δεδομένων, καθώς βλέπει και τραβάει όλα τα δεδομένα από τον υπολογιστή του μικροσκοπίου. Επίσης, το δεύτερο PC έχει εγκατεστημένα τα εξής λογισμικά: Imaris software και Image-pro software και το Adobe Photoshop.
- Περιβαντολογικός θάλαμος σταθερής θερμοκρασίας, υγρασίας και CO₂ που περικλείει το μικροσκόπιο για πειράματα live cell imaging
- Μονάδα air conditioning, η οποία διοχετεύει στον θάλαμο CO₂ και τις κατάλληλες συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας.
- Σύστημα MT20, που περιέχει το excitation filter wheel και τις πηγές φωτισμού του μικροσκοπίου: λάμπα αλογόνου 100W και λάμπα φθορισμού Xenon (δίνει ένα μίγμα μηκών κύματος από το UV έως το κόκκινο).

ΑΝΤΙΚΕΙΜΕΝΙΚΟΙ ΦΑΚΟΙ ΜΙΚΡΟΣΚΟΠΙΟΥ

Μεγέθυνση	Αριθμητικό άνοιγμα (numerical aperture NA)	Υλικό στο οποίο καταδύεται ο φακός (immersion medium).
10x Ph1 UPlanFLN	0.3	Αέρας
20x Ph2LUCPLanFLN	0.45	Αέρας
40x LUCPLanFLN	0.6	Αέρας
60x PlanApo	1.42	Λάδι
60x UPLSApo	1.2	Νερό
100x UPLSApo	1.4	Λάδι

* Οι φακοί 10X, 20X, 40X είναι distance ενώ οι φακοί 60X και 100X είναι επαφής.

* Το λάδι ή το νερό μπαίνει πάνω στον φακό

Οι ρυθμίσεις για το μικροσκόπιο γίνονται από το ‘**OBS system Configuration**’, που βρίσκεται στην επιφάνεια εργασίας του υπολογιστή..

Πολωτής-αναλυτής για το σύστημα DIC

Ο αναλυτής έχει ενσωματωθεί στο filter wheel, ενώ ο πολωτής βρίσκεται πάνω στο μικροσκόπιο, στο πάνω μέρος του θαλάμου που περικλείει το μικροσκόπιο. Όταν θέλουμε να πάρουμε εικόνα DIC, πρέπει να τοποθετήσουμε τον πολωτή δεξιά.

Φίλτρα διέγερσης/ Φίλτρα εκπομπής

Στη θέση 1, έχουμε έναν κύβο με το τριπλό excitation filterwheel (HC-tripleband DAPI/FITC/TxRed sbx), το οποίο έχει 3 exciters (BrightLine HC 387/11, 494/20 και 575/25), ένα beamsplitter (HC-triple beamsplitter 436/514/604) και έναν τριπλό emitter (HC tripleband emitter 457/530/628).

Στη θέση 2, έχουμε έναν κύβο με το τετραπλό excitation filterwheel, το οποίο έχει 4 exciters (BrightLine HC 387/11, 485/20, 560/25 και 650/13), ένα beamsplitter (HC-quad-beamsplitter 410/504/582/669) και ένα τέσσερις ξεχωριστούς emitters (HC 440/40, 525/30, /607/36, 684/24).

Στη θέση 3, έχουμε ένα κύβο με τους exciters για FRET (CFP και YFP). Οι emitters βρίσκονται στην έξοδο του σήματος ακριβώς πριν την κάμερα.

Στη θέση 4, έχουμε τον Αναλυτή DIC.

Για τα πειράματα live cell imaging έχει μεγάλη σημασία ποιους exciters θα χρησιμοποιήσουμε για να μεσολαβεί ο ελάχιστος χρόνος από τη συλλογή της εικόνας στο ένα και το άλλο φθοριόχρωμα. Για το λόγο αυτό είναι καλύτερο να επιλέξουμε φίλτρα που είναι τοποθετημένα στο ίδιο filter wheel.

Πίνακας με τα φίλτρα φθορισμού του μικροσκοπίου Olympus Time lapse IX81 Cell-R

Live Cell Imaging System: Installed Fluorescence Filter Cubes

Filter Cubes	Fluorochromes	Exciters (xenon lamp)	Emitters (microscope/camera)
			Multi tripleband emitter:
Position 1: Triple Cube	DAPI	377/50	457/25
	FITC	485/20	530/25
	TxRed	575/25	628/25
			Single Emitters:
Position 2: Quad Cube	DAPI	377/50	440/40
	FITC	485/20	525/30
	C3	560/25	607/36
	C5	650/13	684/24
			Single Emitters:
Position 3: Double Cube	CFP	427/10	472/30
	YFP	504/12	542/27
Position 4: DIC Analyser			

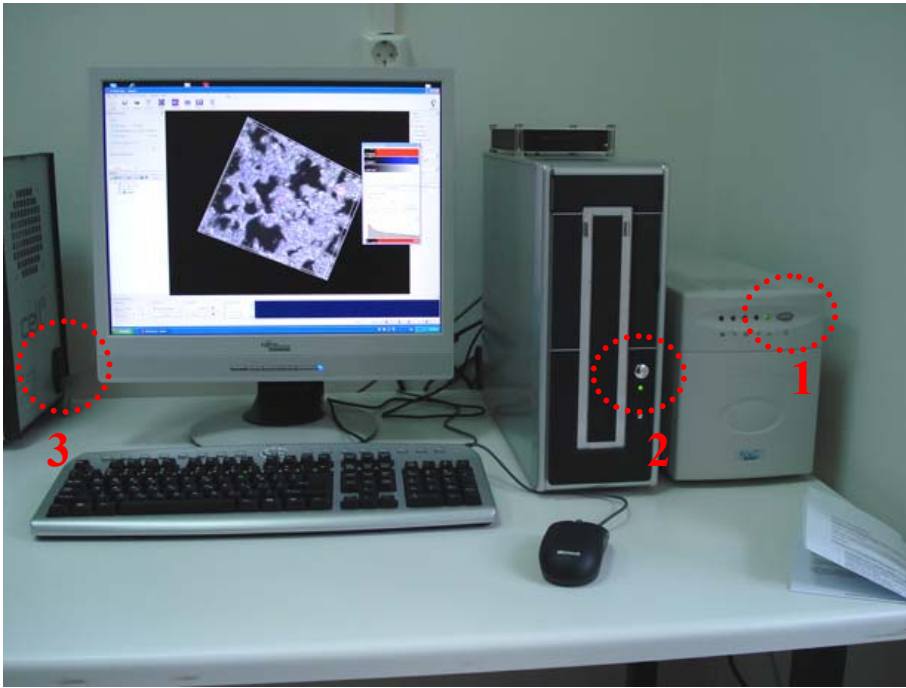
*Ο αριθμός που βρίσκεται μετά το μήκος κύματος κύματος διέγερσης και εκπομπής υποδεικνύει το εύρος μήκους κύματος που επιτρέπει το κάθε φίλτρο να περάσει. π.χ. 494/20, επιτρέπει να περάσει μήκος κύματος από 484-504 nm.

3. Πώς ανοίγουμε το σύστημα

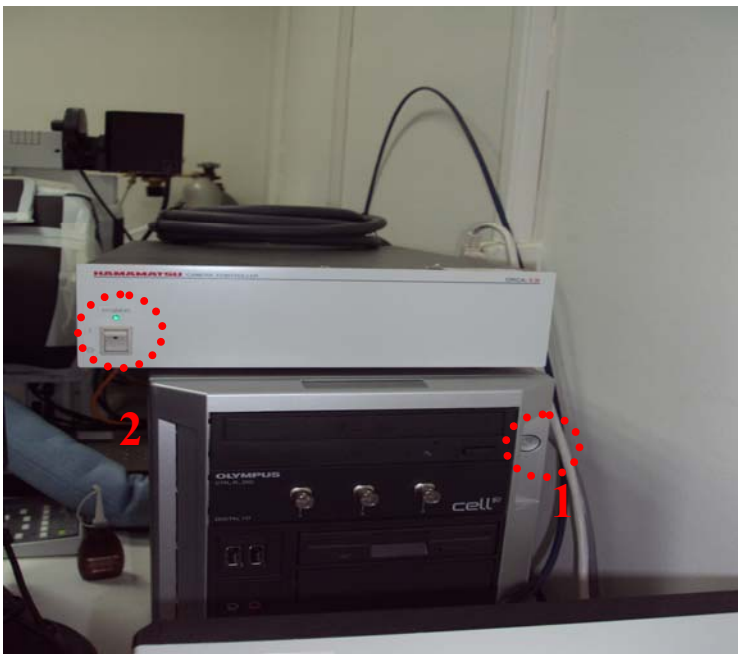
Πρώτα ανοίγουμε το UPS, που βρίσκεται δίπλα στο δεύτερο PC, πρίζοντας συνεχόμενα το κουμπί που υποδεικνύεται στην εικόνα 3. Όλα τα μηχανήματα ανοίγουν από το UPS-διακόπτης 1 (ανοίγει και το ρεύμα).

Στη συνέχεια, ανοίγουμε τον δεύτερο υπολογιστή- διακόπτης 2 και το MT20 box (διακόπτης 3). Ανοίγουμε τους διακόπτες για τα κινούμενα μέρη του μικροσκοπίου (διακόπτες 3 και 4, εικόνα 5). Ανοίγουμε την κάμερα, που βρίσκεται πίσω από τις οθόνες του PC (διακόπτης 2 της κάμερας Hamamatsu, εικόνα 4). Ανοίγουμε το PC (διακόπτης 1, εικόνα 4)

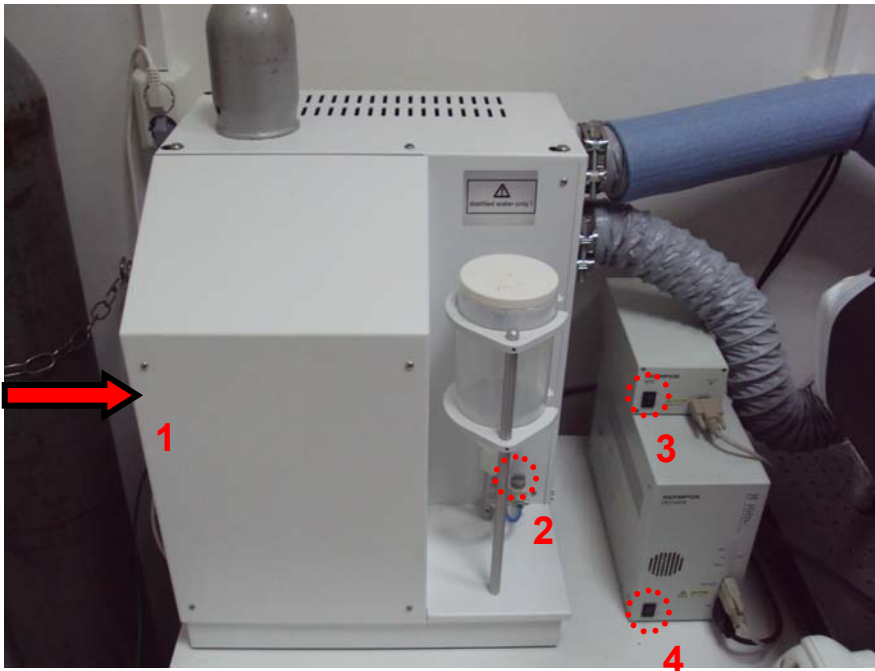
Εάν θέλουμε να κάνουμε πείραμα live cell imaging, πρέπει να έχουμε ανοίξει το σύστημα “air conditioning unit”, (διακόπτες 1 και 2, εικόνα 5) περίπου 3-4 ώρες πριν αρχίσουμε το πείραμα για να αποκτήσει την σωστή θερμοκρασία όλο το σύστημα και το μικροσκόπιο, έτσι ώστε να αποφευχθεί η αποεστίαση κατά τη διάρκεια του πειράματος, εξαιτίας διαστολής των στοιχείων του μικροσκοπίου (thermal drift).



Εικόνα 3. Από δεξιά προς τα αριστερά: UPS (διακόπτης 1), δεύτερος υπολογιστής (διακόπτης 2) και ο διακόπτης 3 για το άνοιγμα του MT20 box.



Εικόνα 4. Διακόπτης 1 του PC του μικροσκοπίου Olympus και διακόπτης 2 της κάμερας Hamamatsu (επάνω).



Εικόνα 5. Air conditioning unit (διακόπτες 1 και 2) και διακόπτες για τα κινούμενα μέρη του μικροσκοπίου (διακόπτες 3 και 4).

4. Πώς εστιάζουμε στο δείγμα

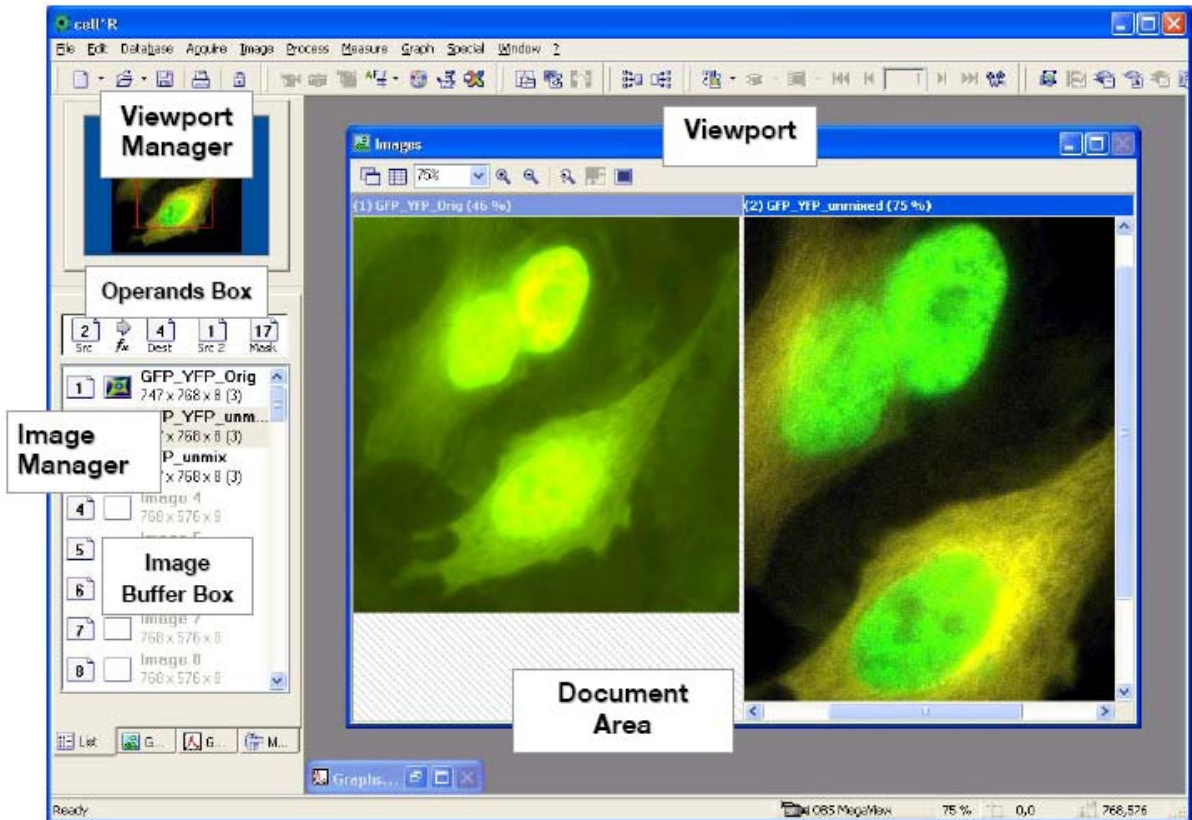
Τοποθετούμε το κατάλληλο στήριγμα του δείγματος στην τράπεζα του μικροσκοπίου.

- Εάν έχουμε φιξαρισμένα δείγματα, προσέχουμε η λαμέλλα να έρχεται σε επαφή με τον φακό του μικροσκοπίου, καθώς το μικροσκόπιο είναι ανάστροφο (**δηλαδή η αντικειμενοφόρος να τοποθετείται ανάποδα**).




- Εάν κάνουμε πείραμα live cell imaging, πρέπει να χρησιμοποιούμε τα ειδικά τρυβλία ή πλάκες κυτταροκαλλιέργειας της MatTEK, που έχουν μία λαμέλλα κολλημένη στον πάτο, καθώς και ειδικό υλικό καλλιέργειας απουσία phenol red).

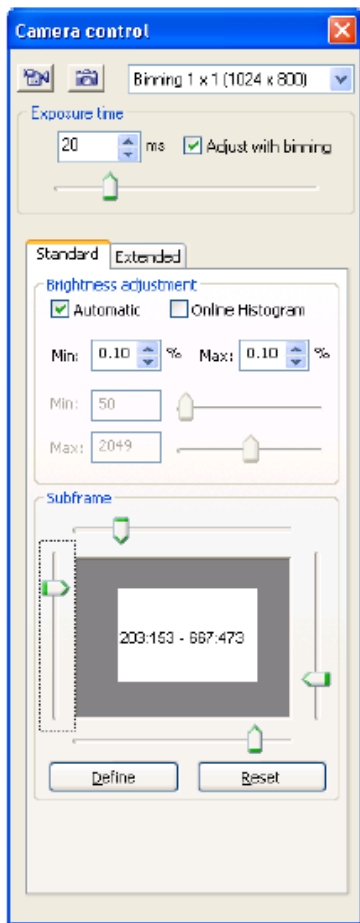
Επίσης, στους φακούς 20x και 40x, υπάρχει ένα δαχτυλίδι στη βάση τους που με περιστροφή αλλάζει την εστίαση σε γυαλί ή πλαστικό.

Όλες οι κινήσεις γίνονται μέσω του λογισμικού Cell R. Κάνουμε διπλό κλικ στο εικονίδιο Cell R στο desktop και ανοίγει το λογισμικό (εικόνα 6):




Εικόνα 6. CELL R

Ανοίγουμε τα εξής παράθυρα:  camera control ,  illumination system MT20,  microscope settings. Στο παράθυρο camera control (εικόνα 7), μπορούμε να ρυθμίσουμε τις παραμέτρους:



Εικόνα 7. Camera control

Live view  : για να βλέπουμε την εικόνα στην οθόνη του PC μέσω της κάμερας

Snapshot  : το επιλέγουμε για να πάρουμε μία εικόνα

Binning: η παράμετρος αυτή έχει σχέση με τα pixels και το resolution της εικόνας που θέλουμε να πάρουμε. Πιο καλό resolution έχει το binning 1x1. Τα binning 2x2, 3x3 και 4x4 ουσιαστικά συγχωνεύουν τα pixels και μειώνουν το resolution της εικόνας. Βέβαια, αν χρησιμοποιούμε κάποιο φθοριόχρωμα που είναι ευαίσθητο σε bleaching, είναι καλύτερα να βάλουμε binning 3x3 ή 4x4 ή να κάνουμε την εντολή adjust with binning.

1x1 (1344 x 1024) full resolution. It collects more pixels together.

2x2 (672x 512) brighter (faster but you lose resolution)

3x3 (336x 256)

4x4 (168x 128)

Για περισσότερη κατανόηση του Binning κοιτάξτε στο παρακάτω site:

(<http://micro.magnet.fsu.edu/primer/digitalimaging/concepts/binning.html>)

Exposure time: η παράμετρος αυτή καθορίζει τη χρονική διάρκεια κατά την οποία η κάμερα δέχεται φως που έρχεται από το δείγμα. Οι τιμές είναι από 1 έως 1000 ms.

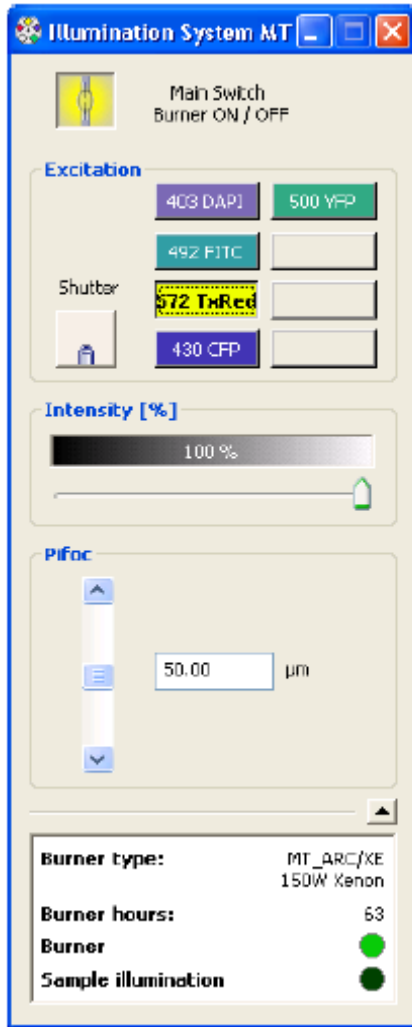
Brightness adjustment: για τη ρύθμιση της φωτεινότητας της εικόνας. Έχει δύο επιλογές: standard και extended.

Στην επιλογή standard → Automatic, φροντίζουμε το min και το max να είναι στο 0%. Εάν δεν είναι επιλεγμένο το 'automatic', μπορούμε να ρυθμίσουμε το min και το max από τις μπάρες.

Στην επιλογή extended φροντίζουμε να έχει γίνει επιλογή του shutter, που σημαίνει ότι η κάμερα ρυθμίζει το φθορισμό. Επίσης, προσέχουμε να είναι το gain και το offset στο 0.

Subframe: με την επιλογή αυτή μπορούμε να καθορίσουμε να «βλέπει» η κάμερα ένα τμήμα της εικόνας αντί για ολόκληρη την εικόνα. Ορίζουμε την περιοχή ενδιαφέροντος με το 'define'.

Στο παράθυρο illumination system MT20 (εικόνα 8), μπορούμε να ρυθμίσουμε τις παραμέτρους:



Εικόνα 8. Illumination system MT20

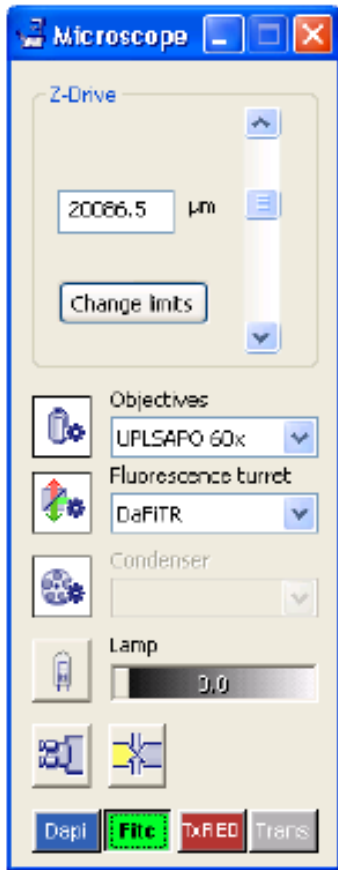
Main switch burner: είναι ο διακόπτης με τον οποίο ανοίγουμε και κλείνουμε τη λάμπα φθορισμού. Όταν τον επιλέγουμε, γίνεται κίτρινος και σημαίνει ότι έχουμε ανοίξει τη λάμπα φθορισμού. Στο κάτω μέρος του παραθύρου, υπάρχει ένα παράθυρο με τα εξής: burner type, burner hours, burner sample illumination. Όταν ανοίξουμε τη λάμπα φθορισμού, το 'burner' γίνεται από σκούρο πράσινο, ανοιχτό πράσινο.

Excitation: υπάρχουν τα φίλτρα διέγερσης [DAPI (377), CFP (427), FITC (485), YFP (504), C3 (560), TxRed (575), C5 (650)]. Τα φίλτρα διέγερσης που θα χρησιμοποιήσουμε

εξαρτώνται από τα φθοριοχρώματα με τα οποία έχουμε σημάνει το δείγμα μας. Επίσης, υπάρχει ο διακόπτης shutter, που όταν τον επιλέγουμε φωτίζουμε το δείγμα με το μήκος κύματος φωτός που επιλέγεται από το συγκεκριμένο φίλτρο διέγερσης (και τότε γίνεται ανοιχτό πράσινο το 'sample illumination').

Intensity %: για να ρυθμίζουμε την ένταση του φθορισμού.

Στο παράθυρο microscope settings (εικόνα 9), μπορούμε να ρυθμίσουμε τις παραμέτρους:



Εικόνα 9. Microscope settings

Z-Drive: για να ρυθμίσουμε από το λογισμικό την εστίαση στον Z-άξονα (Z-Drive).

Objectives: για να ρυθμίσουμε τον φακό που θα χρησιμοποιήσουμε. Επιλέγουμε τον φακό από τη λίστα και αυτός μπαίνει αυτόματα στη θέση στο μικροσκόπιο.

Fluorescent turret: για να επιλέξουμε κάποιο από τα 4 filter cubes (Da-Fi-Tr, Da-Fi-C3-C5, CFP-YFP, DIC)

Condenser: όταν συλλέγουμε εικόνα με την τεχνική του φωτεινού πεδίου (BF) ή με αντίθεση φάσης (PH-1 ή PH-2) ή με Nomarski (DIC-40, DIC-60, DIC-100).

Lamp: ρυθμίζουμε την ένταση της λάμπας φωτισμού

Κουτιά με τα φίλτρα διέγερσης: επιλέγουμε και μπαίνει αυτόματα η επιλογή στο παράθυρο 'illumination system MT20'

Κοιτάζουμε στο μικροσκόπιο και επιλέγουμε ένα πεδίο που μας ενδιαφέρει.

Για να παρατηρήσουμε τη φάση (με τους φακούς 10x και 20x) ή BF-DIC (Nomarsky) (με τους φακούς 40x, 60x ή 100x), επιλέγουμε BF-DIC στο microscope settings, οπότε ανοίγει αυτόματα η λάμπα φωτισμού.

Για να παρατηρήσουμε το φθορισμό, επιλέγουμε ποιο φίλτρο θέλουμε στο microscope settings και μετά επιλέγουμε shutter ώστε να φωτιστεί το δείγμα.

Πώς αλλάζουμε τους φακούς όσο παρατηρούμε το δείγμα?

Ξεκινάμε με τους φακούς που έχουν χαμηλότερη μεγέθυνση και εστιάζουμε στην περιοχή ενδιαφέροντος. Στη συνέχεια, από την επιλογή objective στο παράθυρο **microscope settings**, αλλάζουμε φακό και εστιάζουμε ξανά με τον κοχλία εστίασης. Ο κοχλίας εστίασης, έχει ένα κουμπί στο πλάι, με το οποίο μπορεί να δουλεύει σε 2 ταχύτητες .

Εάν χρησιμοποιούμε ελαιοκαταδυτικό φακό, μετακινούμε τον κοχλία μέχρι να ακουμπήσει ο φακός στο λάδι και στη συνέχεια εστιάζουμε βλέποντας μέσα από το μικροσκόπιο.

ΟΤΑΝ ΔΙΕΓΕΙΡΟΥΜΕ ΤΟ ΔΕΙΓΜΑ ΜΕ ΤΑ ΦΙΑΤΡΑ CFP ΚΑΙ ΥΦΡ ΔΕΝ ΜΠΟΡΟΥΜΕ ΝΑ ΔΟΥΜΕ ΤΟ ΦΘΟΡΙΣΜΟ ΜΕ ΤΑ ΜΑΤΙΑ ΑΠΟ ΤΟΥΣ ΠΡΟΣΦΘΑΛΜΙΟΥΣ ΦΑΚΟΥΣ, ΓΙΑΤΙ ΤΑ ΦΙΑΤΡΑ ΕΚΠΟΜΠΗΣ ΕΙΝΑΙ ΜΠΡΟΣΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΚΑΜΕΡΑ. ΑΠΟ ΤΟΥΣ ΠΡΟΣΦΘΑΛΜΙΟΥΣ ΦΑΚΟΥΣ ΒΛΕΠΟΥΜΕ ΤΟ ΑΝΑΚΛΩΜΕΝΟ ΦΩΣ ΤΗΣ ΔΙΕΓΕΡΣΗΣ ΚΑΙ ΟΧΙ ΑΥΤΟ ΠΟΥ ΕΚΠΕΜΠΕΤΑΙ. Για το λόγο αυτό σε αυτή την περίπτωση εστιάζουμε με τη φάση.

Σε κάθε περίπτωση, εστιάζουμε και μετά στέλνουμε την εικόνα στην κάμερα ως εξής: Πατάμε το κουμπί του μικροσκοπίου που δείχνει την **κάμερα** ή επιλέγουμε στο 'microscope settings' την επιλογή της κάμερας.

Μετά επιλέγουμε το **live view** στο παράθυρο 'camera control', οπότε βλέπουμε στο viewport την εικόνα που δίνει η κάμερα. Εάν η εικόνα δεν φαίνεται καλά εστιασμένη, μπορούμε να την εστιάσουμε, είτε με το Z-Drive στο 'microscope settings', είτε manually με τον κοχλία εστίασης (μπορούμε να επιλέξουμε την αργή ταχύτητα, πιέζοντας το πλήκτρο δίπλα στον κοχλία εστίασης).

Εάν έχουμε μόνο φάση, πρέπει να ρυθμίσουμε το 'time exposure' και την ένταση της λάμπας φθορισμού '**Lamp**'.

Εάν έχουμε φθορισμό πρέπει να ρυθμίσουμε το 'intensity' ή /και το 'time exposure', ώστε να πάρουμε μία εικόνα που να έχει μαύρο background και το σήμα να μην είναι κορεσμένο.

Κάθε χρήστης μπορεί όταν έρχεται στο μηχάνημα να καθορίζει τα δικά του settings, μέσω του : File → workspace → open.

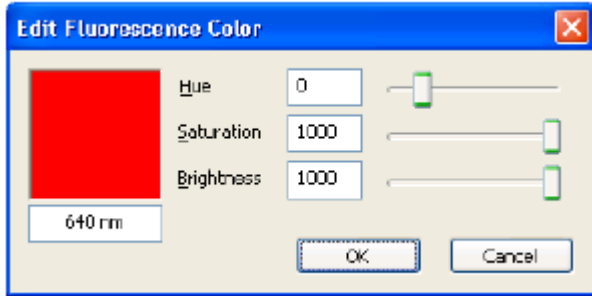
4. Συλλογή Εικόνας (Image acquisition)

- **Εάν θέλουμε να πάρουμε snapshot**

Αφού έχουμε ρυθμίσει τις παραμέτρους, επιλέγουμε 'snapshot' στο παράθυρο 'camera control'. Η εικόνα που παίρνει η κάμερα τοποθετείται στο image buffer box, αλλά


χρειάζεται να σωθεί πριν κλείσουμε το λογισμικό. Επίσης, οι εικόνες από τα snapshot είναι ασπρόμαυρες (γιατί η κάμερα είναι ασπρόμαυρη).

Εάν θέλουμε να τις σώσουμε με κάποιο **ψευδόχρωμα**, κάνουμε ως εξής: μεταφέρουμε την εικόνα στο viewport και από το menu bar επιλέγουμε **image** → **image display** → **edit fluorescence color**. Συνήθως βάζουμε το Saturation στο 1000 και ρυθμίζουμε το **hue**, ώστε να βλέπουμε όλα τα ψευδοχρώματα.



Εικόνα 10. Το παράθυρο edit fluorescence color.

Μπορούμε να κάνουμε overlay των snapshots, μέσω του: image → combine. Στη συνέχεια, σώζουμε τις εικόνες σαν tiff ή jpg και μπορούμε να τις δουλέψουμε στο Photoshop.

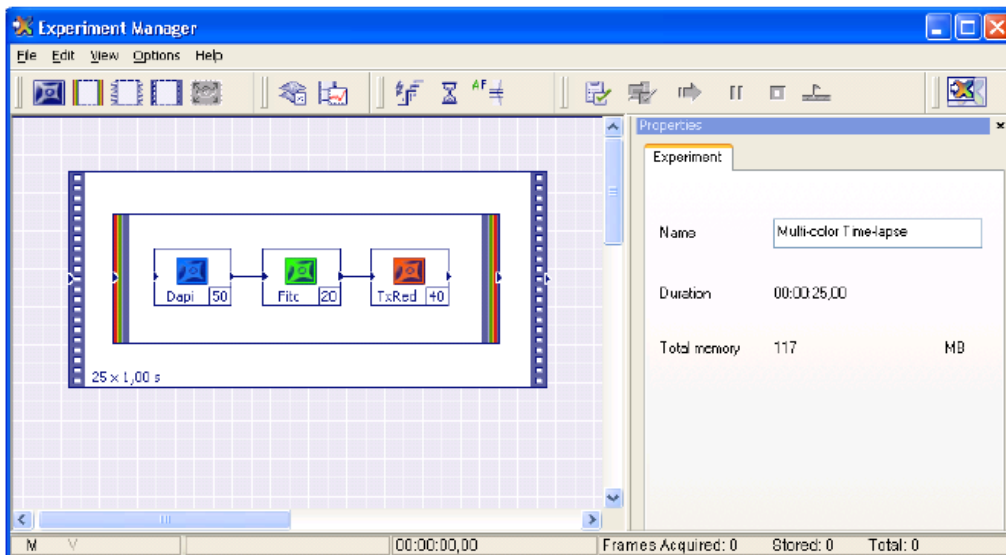
- Εάν θέλουμε να πάρουμε εικόνες μέσω του **experiment manager** 

Από το tool bar επιλέγουμε το εικονίδιο **experiment manager** και το μεταφέρουμε στη δεξιά οθόνη του υπολογιστή (εικόνα 11). Επιλέγουμε το εικονίδιο 'image acquisition'



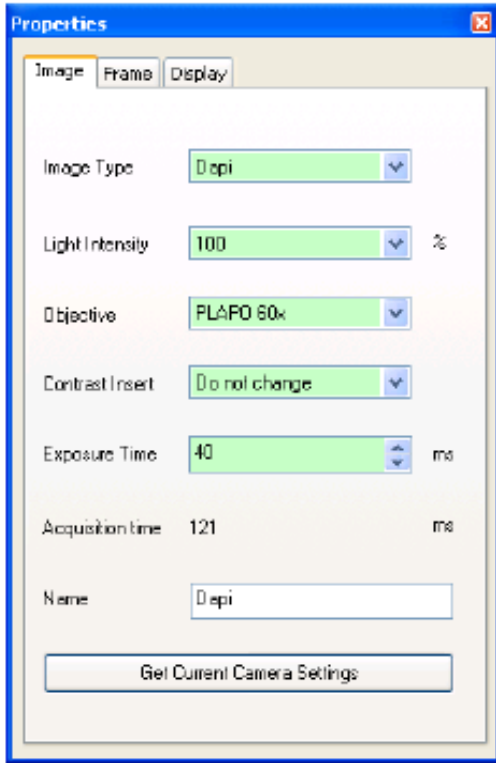
και κάνουμε Drag and drop στον χώρο που έχει στο experiment manager.

Βάζουμε τόσα εικονίδια 'image acquisition', όσα είναι τα φθοριοχρώματα που έχουμε σημάνει στο δείγμα μας και θέλουμε να απεικονίσουμε



Εικόνα 11. Experiment manager

Ρυθμίζουμε στο κάθε ένα image acquisition icon τις παραμέτρους, επιλέγοντας το με το ποντίκι, και στη συνέχεια, στη δεξιά πλευρά, στο παράθυρο properties (εικόνα 12):



Εικόνα 12. Παράθυρο properties



Στο παράθυρο properties, μπορούμε να επιλέξουμε τα εξής:

- **image type** (ανάλογα με το φθοριόχρωμα που έχουμε σημάνει το δείγμα μας)
- **intensity** (την ένταση του φθορισμού-πρέπει κάθε φορά να το επιλέγουμε manually, γιατί δεν μπαίνει αυτόματα),
- **objective**
- **exposure time** (μπαίνει αυτόματα)
- **name**: να δώσουμε ένα όνομα στο πείραμα
- και στο τέλος επιλέγουμε **'get current camera settings'**

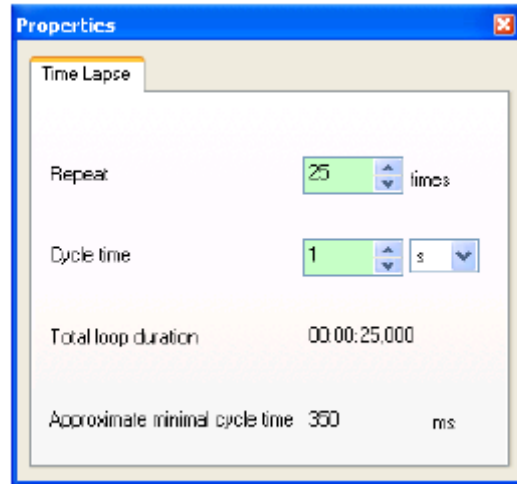
Ρυθμίζουμε σε κάθε ένα image acquisition icon τις παραμέτρους και στο τέλος επιλέγουμε για κάθε μια: 'get current camera settings'.

Ενώνουμε τα εικονίδια 'image acquisition' μεταξύ τους με μία γραμμή.

Επίσης, μπορούμε να τα βάλουμε μέσα σε ένα frame π.χ. multicolor frame, time-lapse frame, Z-stack frame. **Frames:**


- **multicolor frame**  : χρησιμοποιώντας αυτή την επιλογή, στο database σώζεται μία εικόνα, που περιέχει όλα τα **image type**.
- **time-lapse frame**  : χρησιμοποιούμε αυτή την επιλογή όταν θέλουμε να κάνουμε πείραμα live cell imaging σε διαφορετικούς χρόνους. Εκεί ρυθμίζουμε το repeat και το cycle time. Το **repeat** καθορίζει πόσες φορές η κάμερα θα συλλέξει

εικόνα και το cycle time το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί ανάμεσα σε δύο



διαδοχικές λήψεις της κάθε εικόνας.

Εικόνα 13. Time-lapse frame

- **Z-stack frame** : το χρησιμοποιούμε για να παίρνουμε εικόνες σε διαφορετικά επίπεδα στον Z-άξονα. Μετακινώντας τον κοχλία εστίασης, μετακινούμαστε στον Z άξονα πάνω και κάτω από το σημείο εστίασης και έτσι βρίσκουμε το top και το bottom του δείγματος, δηλαδή το πάχος (height) του δείγματος. Μετά, ρυθμίζουμε τον αριθμό οπτικών τομών (layers) και το πάχος κάθε βήματος στον Z-άξονα (step size). Στη συνέχεια, παίρνουμε τομές που είναι + 1/2 του πάχους του δείγματος από το πάνω άκρο και + 1/2 του πάχους του δείγματος από το κάτω άκρο. Δηλαδή, πρακτικά, εάν το δείγμα μας βρούμε ότι έχει πάχος 20 μm, τότε για το Z-stacking θα πάρουμε + 10 μm από το πάνω άκρο του δείγματος και + 10 μm από το κάτω άκρο του δείγματος. Συνολικά δηλαδή θα κάνουμε Z-stacking σε 40 μm.

Z-STACK CALCULATOR

Στο Cell R, υπάρχει η επιλογή **Z-stack calculator**, για να υπολογίζουμε το πάχος των τομών που πρέπει να παίρνουμε στο Z-stacking. Επιλέγουμε **Z-stack calculator**, οπότε ανοίγει το παράθυρο “**Z-increment and number of frames**”. Εκεί υπάρχουν οι εξής επιλογές:

-Z-distance (μm): συμπληρώνουμε με το height του δείγματος

-emission wavelength (nm): συμπληρώνουμε με το μήκος κύματος εκπομπής του φθοριοχρώματος που χρησιμοποιούμε

- refractive index of immersion medium: π.χ. στην περίπτωση που χρησιμοποιούμε oil, είναι 1.514

- numerical aperture: συμπληρώνουμε με το αριθμητικό άνοιγμα φακού

Στη συνέχεια, επιλέγουμε “**calculate count/Z-increment (μm)**”, το οποίο μας υπολογίζει αυτόματα το πάχος των τομών.

Η επιλογή για το βέλτιστο πάχος κάθε βήματος στον Z-άξονα γίνεται:

- 1) Με βάση το πάχος του οργανιδίου/σφαιριδίου/κυτταρικής δομής. Για παράδειγμα, εάν το πάχος των σφαιριδίων που χρησιμοποιούμε είναι 500 nm, θα πρέπει το βήμα στον Z-άξονα να είναι 250 nm.
- 2) Λαμβάνουμε υπ' όψιν την φωτοεξασθένιση (photobleaching).
- 3) Λαμβάνουμε υπ' όψιν την ανάλυση στον Z-άξονα του αντικειμενικού φακού. Τα όρια της ανάλυσης διαφέρουν για κάθε αντικειμενικό φακό. Το πάχος κάθε βήματος στον Z-άξονα πρέπει να είναι το $\frac{1}{2}$ της ανάλυσης του αντικειμενικού φακού, που εξαρτάται από:
 - a. Το αριθμητικό άνοιγμα του φακού Numerical aperture (NA)
 - b. Το δείκτη διάθλασης του υλικού στο οποίο καταδύεται ο φακός (immersion medium) (n)
 - c. Το μήκος κύματος διέγερσης και εκπομπής (λ) του φθοριοχρώματος που χρησιμοποιούμε
 - d. Ο Nyquist calculator (<http://support.svi.nl/wiki/NyquistCalculator>) μπορεί να φανεί χρήσιμος .

Η ανάλυση των αντικειμενικών φακών (που μας βοηθά να υπολογίσουμε το βέλτιστο step size για κάθε αντικειμενικό φακό)

Για τη μικροσκοπία φθορισμού ευρέως πεδίου :

Κατά μήκος του Z-άξονα (xz plane) R (resolution) = $2\lambda n/NA^2$

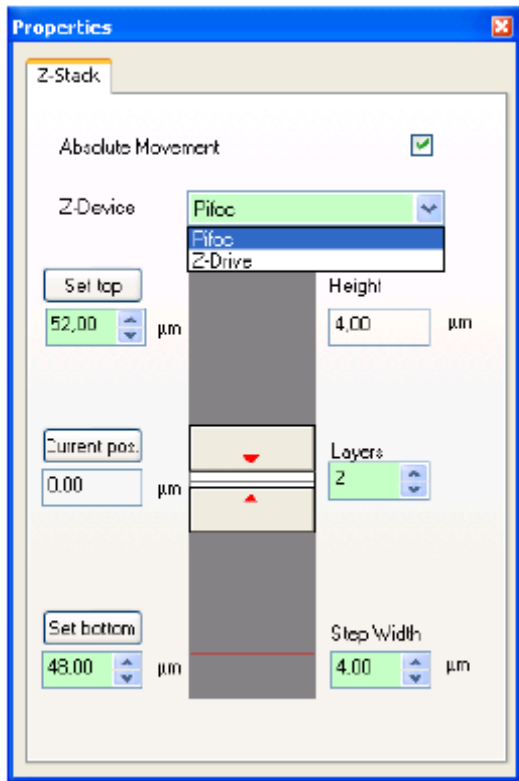
Κατά μήκος του y άξονα (xy plane) R (resolution) = $0,61\lambda/NA$

όπου NA είναι το αριθμητικό άνοιγμα του φακού

Δεν μπορούμε να διακρίνουμε αντικείμενα που είναι πιο κοντά από τις τιμές που αναφέρονται παραπάνω.

IMAGING DEPTH

Για να βελτιώσουμε το imaging depth, μπορούμε να χρησιμοποιούμε φακούς που καταδύονται σε νερό ή λάδι. Με τους φακούς που δεν καταδύονται δεν μπορούμε να δούμε σε μεγάλο βάθος.



Εικόνα 14. Z-stack frame

Επειδή στη μικροσκοπία ευρέως πεδίου είναι αναπόφευκτο να ανιχνεύουμε και φθορισμό εκτός επιπέδου εστίασης, καλό είναι να χρησιμοποιούμε μετά τη λήψη των εικόνων τα λογισμικά 3-D deconvolution. Πρόκειται για λογισμικά στο Cell R, που χρησιμεύουν για να αφαιρείται το out-of-focus light από τις εικόνες και για να γίνονται ευκρινή- ευδιάκριτα (sharp) τα περιγράμματα των εικόνων.

Οι αλγόριθμοι για το 3-D deconvolution που έχει το Cell R είναι οι εξής:

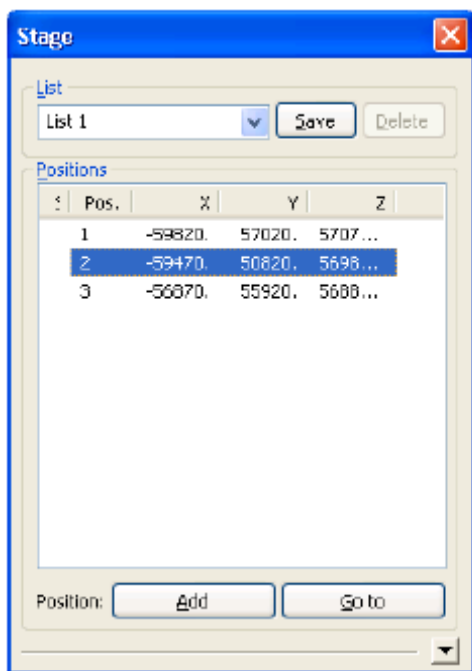
1. NO NEIGHBOR
2. NEAREST NEIGHBORS
3. INVERSE FILTER
4. 3-D BLIND DECONVOLUTION

Στο website υπάρχει αναλυτικά η ρουτίνα για το 3-D deconvolution.

Σε κάθε περίπτωση, επιλέγουμε Verify → Prepare- οπότε ανοίγει μία βάση δεδομένων (database) για να σωθούν οι εικόνες → start...

Motorized stage

Στην περίπτωση που θέλουμε να απεικονίσουμε περισσότερα από ένα πεδία σε μία καλυπτρίδα, και η τράπεζα να πηγαίνει αυτόματα σε αυτές τις θέσεις, μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε την επιλογή **Motorized stage** στον experiment manager (εικόνα 15).



Εικόνα 15. Motorized stage

Στην επιλογή 'list' επιλέγω 'new list' και βάζω ένα καινούριο όνομα στη λίστα → save. Στη συνέχεια, βάζουμε θέσεις στη λίστα με το add. Μετακινούμαστε με το joystick στο δείγμα, ενώ παρακολουθούμε από το live view. Προσέχουμε να εστιάζουμε καλά σε κάθε θέση και κάνουμε add. Στη συνέχεια, επιλέγουμε 'go to', οπότε η τράπεζα μετακινείται αυτόματα στην πρώτη θέση που ορίσαμε.

Στην ακολουθία που έχουμε ορίσει στον experiment manager, βάζουμε την επιλογή stage και επιλέγουμε το όνομα της λίστας που σώσαμε.

Autofocus

Χρησιμοποιείται για να κάνει αυτόματη εστίαση το μικροσκόπιο, ειδικά σε πειράματα time-lapse, που καθώς περνάει ο χρόνος παρατηρείται μία μετατόπιση στον Z-άξονα. Βάζουμε το εικονίδιο του autofocus μέσα στο **multi-color frame**, πριν πάρουμε μια ακολουθία στον experiment manager. Στην περίπτωση που έχουμε Z-stack, δεν μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε την επιλογή Autofocus. Επίσης, υπάρχει η επιλογή ZDC, με την οποία χρησιμοποιείται ένα **InfraRed laser**. Το laser αυτό λειτουργεί μετακινώντας στο οπ ένα μοχλό, που βρίσκεται κάτω από την τράπεζα του μικροσκοπίου.

- **Εάν θέλουμε να κάνουμε live cell imaging → πρέπει αρχικά να ανοίξουμε το air conditioning unit και στη συνέχεια, στον υπολογιστή να ανοίξουμε το Climatisation control (με διπλό κλικ στο εικονίδιο του desktop).**

Η διαδικασία αυτή πρέπει να γίνει περίπου 2- 2,5 ώρες πριν το πείραμα live cell imaging. Ρυθμίζουμε πρώτα την θερμοκρασία (37°C → set) και το CO₂ (5% → set). Σταδιακά, και ενώ έχει αρχίσει να αυξάνεται η θερμοκρασία, αρχίζουμε να αυξάνουμε την υγρασία (ξεκινάμε από 50%, 60% έως 70%. Το σύστημα επιτρέπει μέχρι 85% αλλά καλό είναι να μην χρησιμοποιείται τόσο υψηλή υγρασία. Όταν τελειώσουμε με το πείραμα μας, πρέπει να βάλουμε το σύστημα στο **dry mode** και να αφήσουμε τις πόρτες του θαλάμου ανοιχτές ενώ

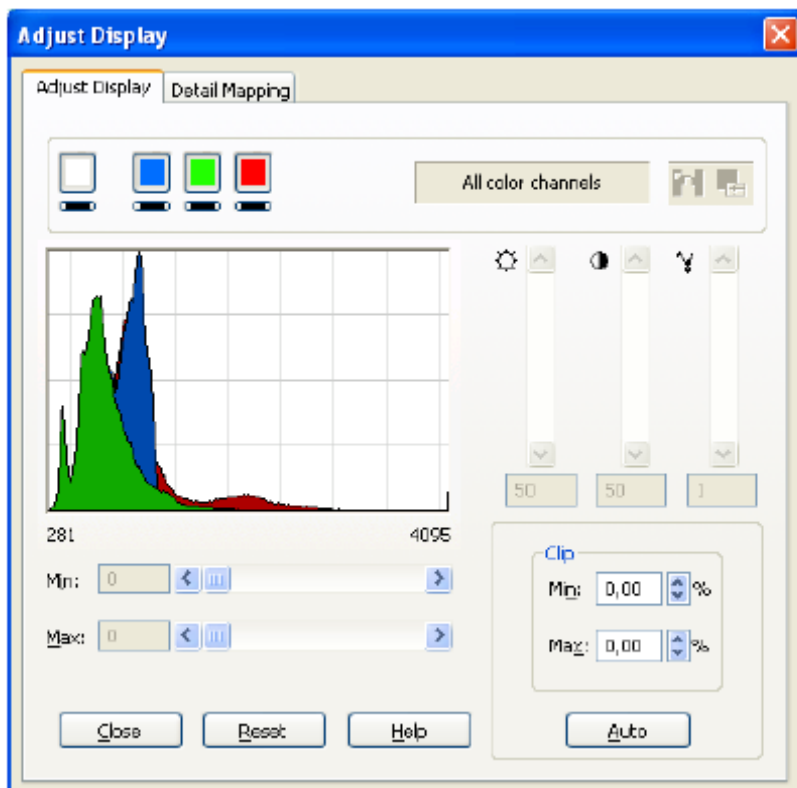
έχουμε τη θερμοκρασία στους 37°C έως ότου πέσει η ένδειξη για την υγρασία. Τέλος κλείνουμε και την θέρμανση του θαλάμου.

Μερικές φορές ειδικά για τα πειράματα time-lapse, μακράς διάρκειας που δημιουργούν δεδομένα πολλών Gigabytes, το λογισμικό έχει περιορισμούς στον όγκο δεδομένων που μπορεί να διαχειρισθεί και να αποθηκεύσει. Στην περίπτωση αυτή, μπορούμε να «σπάσουμε» το πείραμα σε μικρότερα πειράματα και να ενώσουμε τα μικρότερα πειράματα στον experiment manager. Έτσι ώστε όταν τελειώνει το ένα να ξεκινά το άλλο επιτυχάνοντας έτσι την επιθυμητή διάρκεια του πειράματος.

5. Επεξεργασία εικόνας

Η επεξεργασία της εικόνας γίνεται με το λογισμικό Cell R.

- **Image (menu bar) → image display → adjust display**



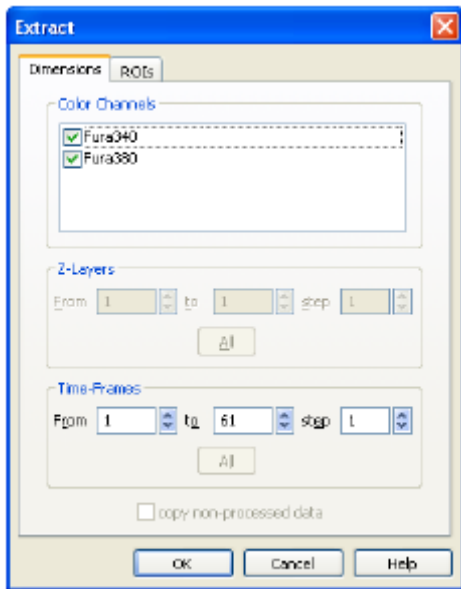
Εικόνα 16. Adjust display

- **Image → Separate → color channels/ Z-layers/ time**

Μπορούμε να διαχωρίσουμε ένα σύνολο multi-dimensional data σε ανεξάρτητα υποσύνολα μιας διάστασης (independent subsets within one dimension) (time, Z ή color).

- **Image → Extract  → color channels/ Z-layers/ time-frames**

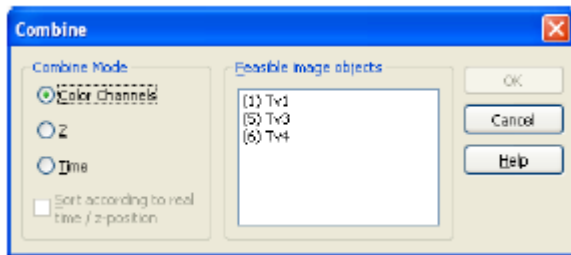
Μπορούμε να αφαιρέσουμε ένα υποσύνολο δεδομένων (subset of data) από πολυδιάστατη ομάδα αποτελεσμάτων (multidimensional data set) (εικόνα 17).



Εικόνα 17. Extract

- **Combine** 

Με την εντολή αυτή, μπορούμε να συνδυάσουμε/ενώσουμε ξεχωριστά data sets στις διαστάσεις color, time και z, ώστε να δημιουργήσουμε μεγαλύτερα data sets.



Εικόνα 19. Combine

BACKGROUND SUBTRACTION

Πολλές φορές η αφαίρεση του background μιας εικόνας που συλλέγουμε είναι επιθυμητή για τη βελτίωση της ποιότητάς της. Στην περίπτωση αυτή κάνουμε ως εξής:

Αρχικά, πηγαίνουμε στην εικόνα που θέλουμε να κάνουμε background subtraction και επιλέγουμε μια ROI (region of interest). Ορίζουμε μία περιοχή στην εικόνα που είναι το background. Στη συνέχεια, επιλέγουμε το εικονίδιο background subtraction, οπότε ανοίγει το παράθυρο και εκεί στην επιλογή: «select ROIs from image» βάζουμε την εικόνα που θέλουμε, select ROI, βάζω το ROI που είχα δημιουργήσει με το define ROIs → ok.

Μετά, στην καινούρια εικόνα που εμφανίζεται στο image buffer box, επιλέγουμε Image → auto adjust display.

Επίσης, πριν το Deconvolution, καλό είναι να κάνουμε background correction.

Πώς φτιάχνουμε καινούργια database?

Administration → new database

Πώς μεταφέρουμε αρχεία από μία database σε άλλη?

Ανοίγουμε την αρχική μας database και μεταφέρουμε τις εικόνες που θέλουμε αρχικά στο **image buffer box**. Μετά, τις σέρνουμε με το ποντίκι από το **image buffer box** στην άλλη database που θέλουμε. Τότε, εμφανίζεται ένα παράθυρο, στο οποίο επιλέγουμε 'insert'. Επίσης, μπορούμε να έχουμε ανοίξει ταυτόχρονα και τις δύο database και να μεταφέρουμε τα αρχεία με το ποντίκι (**drag and drop**).

Πώς μπορούμε να προσθέτουμε τα scale bar, όταν σώζουμε τις εικόνες ως jpeg ή tif?

Αυτό γίνεται, εάν επιλέξουμε **image** → **scale bar** → **show in viewport**.

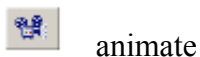
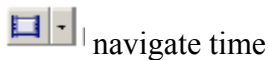
6. Image navigation

Πολλές φορές οι εικόνες που συλλέγουμε είναι πολλών διαστάσεων, π.χ. αποτελούνται από πολλά διαφορετικά color channels, time sequences or z-stacks. Με το Navigation toolbar, μπορούμε να επιλέξουμε single images από μία ακολουθία εικόνων.

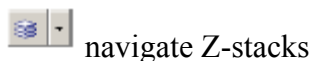


Εικόνα 20. Image navigator

Στην περίπτωση που έχουμε Time-lapse sequences:



Στην περίπτωση που έχουμε Z-stacks:



7. Επεξεργασία εικόνων για video

- Πώς βάζουμε σε ένα video τον χρόνο και scale bar?

Αυτό γίνεται, εάν επιλέξουμε **image** → **scale bar** → **show in viewport**

- Πώς μπορούμε να επεξεργαστούμε ένα αρχείο που περιέχει πολλά color channels, Z-layers και Time frames?

Ανοίγουμε το αρχείο με Z-stack και time-lapse, μπορούμε επίσης να επιλέξουμε μόνο κάποια color channels ή κάποιες τομές ή κάποιες χρονικές στιγμές και να φτιάξουμε ένα καινούριο video που να περιέχει μόνο αυτές.

-Image → **extract** → **Dimensions** →

- color channels: επιλέγουμε τα color channels που θέλουμε να υπάρχουν στο τελικό video
- Z-layers: επιλέγουμε από ποιο έως ποιο Z-layer θέλουμε ή βάζουμε να επιλέξει αυτόματα ανά κάποια step.

- Time frames: επιλέγουμε από ποιο έως ποιο Time frame θέλω βάζουμε να επιλέξει αυτόματα ανά κάποια step.

➤ **Πώς μπορούμε να πάρουμε μία περιοχή από ένα video (avi)?**

Ανοίγουμε το αρχείο και επιλέγουμε **Define ROI**. Με τα σχήματα, καθορίζουμε την περιοχή ενδιαφέροντος→**close**

-Image→**extract** →**ROIs** → **επιλέγουμε το ROI που θέλουμε** → **ok**

Στη συνέχεια, στο image buffer box, εμφανίζεται το καινούριο αρχείο, που περιέχει μόνο την περιοχή ενδιαφέροντος.

➤ **Πως σώζουμε μία εικόνα από το video (θέλουμε να σώσει το scale bar και τη χρονική στιγμή)?**

Ανοίγουμε το αρχείο → βρίσκουμε την εικόνα που θέλουμε και πάμε στο: file→save as→ folder →

Σώζουμε την εικόνα σαν Tiff split file sequence format→save→time→ok.

Μετά, επιλέγουμε: image→auto adjust display

8. Αποθήκευση εικόνας

Στην περίπτωση που η εικόνα που συλλέξαμε είναι snapshot, θα είναι απρόμαυρη, γιατί και η κάμερα είναι ασπρόμαυρη. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, τα snapshot δεν σώζονται αυτόματα στην database, για το λόγο αυτό πρέπει να τα σώζουμε **πριν κλείσουμε το λογισμικό**.

Στην περίπτωση που η εικόνα που συλλέξαμε είναι μέσω του **experiment manager**, **σώζεται αυτόματα στην database** που έχουμε ανοίξει. Μεταφέρουμε την εικόνα στο image buffer box και πηγαίνουμε file → save as. Εκεί υπάρχουν πολλές επιλογές, π.χ. να την σώσουμε σαν:

- jpg , οπότε σώζεται με τα ψευδοχρώματα για τον φθορισμό
- tagged image format (tif) , οπότε η εικόνα σώζεται ασπρόμαυρη
- split file sequence format (TIFF) → define split mode, οπότε τις σώζει ασπρόμαυρες μία μία με βάση το split mode που ζητήσαμε.
- video: file → export to avi

Ο κάθε χρήστης μπορεί να φτιάξει ένα folder στο desktop, στο my documents και να σώζει εκεί τις εικόνες του.

9. Κλείσιμο του συστήματος

Όταν τελειώσουμε, παίρνουμε τα αρχεία μας σε USB stick, από τον δεύτερο υπολογιστή που βρίσκεται δεξιά του μικροσκοπίου. Στο desktop → δίσκοι δικτύου → IAS-CELL R (L:) →

Στη συνέχεια, κλείνουμε το σύστημα ως εξής:

- Σε περίπτωση που έχουμε κάνει πείραμα live cell imaging, βάζουμε το σύστημα σε dry mode και κλείνουμε τους διακόπτες στην μονάδα air conditioning unit.
- Κλείνουμε το Cell R software (switch off the burner) και καταγράφουμε στο log book τις ώρες που έχει καταγράψει η λάμπα φθορισμού
- Κλείνουμε τον υπολογιστή.
- Κλείνουμε τη λάμπα φθορισμού 30 λεπτά τουλάχιστον μετά το άνοιγμα (2 διακόπτες)

- Κλείνουμε το διακόπτη της κάμερας
- Κλείνουμε τον διακόπτη στο κουτί excitation MT20.
- Καθαρίζουμε τους φακούς του μικροσκοπίου και την τράπεζα
- Κλείνουμε το UPS δίπλα στον δεύτερο υπολογιστή, πιέζοντας συνεχόμενα.