



Leica LAS X

Software para el análisis y el procesamiento de imágenes
para microscopios de campo amplio

Manual de instrucciones para **LAS X 1.x**

Leica Microsystems CMS GmbH. 11934078, revisión 1.0, 2014-07-08

Living up to Life

Leica
MICROSYSTEMS

Rev 1.0, editado en julio de 2014 por:

Leica Microsystems CMS GmbH

Ernst-Leitz-Straße 17-37

D-35578 Wetzlar (Germany)

www.leica-microsystems.com

Responsable del contenido:

Marketing CMS



Leica LAS X

Software para el análisis y el procesamiento de imágenes
para microscopios de campo amplio

Manual de instrucciones para **LAS X 1.x**

Leica Microsystems CMS GmbH. 11934078, revisión 1.0, 2014-07-08

Living up to Life

Leica
MICROSYSTEMS

Copyrights

Las indicaciones recogidas en la siguiente documentación reflejan los avances actuales en tecnología. La composición de los textos y las ilustraciones se ha llevado a cabo con el máximo cuidado. Sin embargo, no aceptamos ningún tipo de responsabilidad respecto a la corrección del contenido de este manual. Si desea hacer algún comentario sobre estas instrucciones de servicio o sobre nuestra documentación en general, le agradeceremos nos lo haga llegar. La información incluida en este manual de instrucciones puede modificarse sin previo aviso.

Leica Microsystems CMS GmbH posee todos los derechos sobre esta documentación. La adaptación, traducción y reproducción del texto y de los gráficos (sea total o parcial) mediante impresión, fotocopia, microfilm u otros procedimientos, solo estará permitida tras la autorización expresa por escrito de Leica Microsystems CMS GmbH.

Los programas tales como LAS y LAS X están protegidos por las leyes de propiedad intelectual (Copyright). Reservados todos los derechos. Queda prohibida la reproducción, adaptación o traducción de estos programas sin previa autorización por escrito de Leica Microsystems CMS GmbH.

El término "Windows" puede utilizarse en el siguiente texto sin ninguna otra identificación. Se trata de una marca registrada de Microsoft Corporation. Por lo demás, sin la indicación específica no se sacarán conclusiones respecto al libre uso de nombres de productos. Todos los demás nombres de marcas y nombres de productos de este documento son marcas, marcas de servicios, marcas registradas o marcas registradas inscritas del fabricante correspondiente.

Contenido

1. Indicaciones importantes sobre las instrucciones	6
2. Función	8
3. El Leica LAS X	9
3.1 Descripción	9
3.2 Dongle	9
4. Inicio del Leica LAS X	10
4.1 Apertura del Leica LAS X	10
4.2 Activación de la ayuda online	10
4.3 Búsqueda de texto completo mediante términos de búsqueda con vínculos lógicos	11
4.4 Estructura general de la interfaz de usuario	12
5. Parámetros para la captura de imágenes en varias dimensiones	14
5.1 Configuración ruta óptica	15
5.2 Menú Image	19
5.2.1 Cámara	19
5.2.2 Cámaras EM CCD	21
5.3 Menú z	21
5.3.1 Configuración de lotes de imágenes mediante Wide Focus	22
5.3.2 Configuración del lote de imágenes mediante Fine Focus*	22
5.4 Menú t	22
5.5 Mark and Find	25
5.6 Tile Scan	26
5.6.1 Configuración de la cámara para Tile Scan	26
5.6.2 Captura Tile Scan	27
6. Primer experimento	29
6.1 Configuración	29
6.2 Encendido del sistema e inicio del software	29
6.3 Selección y enfoque de la muestra	30
6.4 Resolución de la cámara	32
6.5 Modo de captura	33
6.5.1 Variante EL6000	33
6.6 Optimización de la imagen	36
6.7 Configuración del color (LUT)	37
6.8 Ajustes para fluorocromos adicionales	38
6.9 Captura del lote de imágenes en 3D	39
7. Índice	42

1. Indicaciones importantes sobre las instrucciones



¡Atención!

Estas instrucciones de manejo son parte esencial del Leica LAS X y deben leerse con detenimiento antes de la puesta en marcha y uso del mismo. Lea también el manual de instrucciones del microscopio, de los componentes y de los accesorios correspondientes. Estas instrucciones son de especial importancia debido a las indicaciones de seguridad, de riguroso cumplimiento a la hora de trabajar con el Leica LAS X.

Por tanto, guarde estas instrucciones de servicio en un lugar seguro.

En estas instrucciones de servicio encontrará los primeros pasos para poner en funcionamiento el sistema, así como una descripción de las funciones básicas del software Leica Application Suite Advanced Fluorescence (LAS X).

Para obtener más información sobre las funciones de software, consulte la ayuda online del LAS X, en la que encontrará las explicaciones más recientes sobre las respectivas funciones del software.

En el capítulo 4 LAS X puede familiarizarse con la estructura y el uso de la ayuda online.

Símbolos de texto, pictogramas y su significado:**(1.2)**

Las cifras entre paréntesis, por ejemplo (1.2), se refieren a figuras, en el ejemplo fig. 1 pos. 2.

→ **Pág.20**

Las cifras precedidas por una flecha, p. ej. →pág. 20, señalan una página determinada de estas instrucciones.

**¡Atención!**

Las indicaciones especiales de seguridad de estas instrucciones se marcan con este símbolo triangular y se enmarcan en un rectángulo gris.



¡Atención! Un manejo incorrecto puede dañar el microscopio o los accesorios.



Indicación explicativa.



Posición no incluida en todas las configuraciones.

2. Función

El software ha sido desarrollado para el uso con microscopios Leica.



¡Atención!

El fabricante declina toda responsabilidad relativa a una utilización no conforme a lo prescrito o fuera de las especificaciones de Leica Microsystems CMS GmbH, así como la relativa a los riesgos que de ellas se pudieran derivar.

3. El Leica LAS X

3.1 Descripción

El Leica LAS X ofrece soluciones para distintos niveles de aplicación.

Todas las soluciones se pueden ampliar y permiten múltiples opciones de combinación con módulos de hardware y software de Leica Microsystems CMS GmbH.

El sistema compuesto aúna las tecnologías de obtención de imágenes más punteras, perfectamente ajustadas entre sí para conseguir de este modo los resultados más rápidos con la mayor calidad.



Nota:

El fabricante declina toda responsabilidad relativa a una utilización no conforme a lo prescrito o fuera de las especificaciones de Leica Microsystems CMS GmbH, así como la relativa a los riesgos que de ellas se pudieran derivar. En tales casos, la declaración de conformidad UE no tendrá validez.



Atención!

Tenga en cuenta siempre las instrucciones de servicio suministradas con el microscopio de Leica.



Atención!

No instale ningún otro hardware ni software en el ordenador de control, ya que en caso contrario se pueden producir daños materiales graves en el sistema o también pérdidas de datos. Si es necesario, póngase en contacto con el servicio técnico de Leica Microsystems CMS GmbH.



Atención!

Para evitar las pérdidas de datos, recomendamos que salve regularmente sus datos e imágenes en un soporte de datos adecuado.

Guarde sus datos siempre antes de cualquier trabajo de servicio técnico o de reparación. Leica Microsystems CMS GmbH no se hace responsable de ninguna pérdida de datos.



Nota:

El software LAS está a cargo de la configuración del microscopio. Encontrará más información en las instrucciones de servicio del microscopio.

3.2 Dongle

Para que el software y el sistema funcionen, se suministra un dongle USB junto con el sistema, que habilita el software. Retire el dongle USB solo si desea que nadie pueda iniciar el software.

4. Inicio del Leica LAS X

4.1 Apertura del Leica LAS X

! Atención!

Inicie el software solo una vez que estén conectados el microscopio y todos los demás componentes.

- Inicie el software haciendo clic en el símbolo LAS X en el escritorio:



Fig. 1: Símbolo LAS X en el escritorio

De este modo, el Leica LAS X está listo para el funcionamiento.

4.2 Activación de la ayuda online

A la ayuda online se puede acceder de tres formas diferentes:

- En función del contexto (sensible al contexto)
- Mediante el menú Help
- Con la combinación de teclas CTRL + F1

En función del contexto (sensible al contexto)

Haga clic en el pequeño interrogante situado en la esquina superior derecha de los cuadros de diálogo.

Se abre la ayuda online con la descripción de las teclas correspondientes.

Mediante el menú Help

Haga clic en la barra de menús del menú Help. El menú se despliega hacia abajo y muestra, entre otras, las siguientes opciones de búsqueda:

Contents Este cuadro de diálogo contiene el índice de contenidos en forma de un árbol de directorios que se puede ampliar o reducir.

Haga doble clic en el registro respectivo del índice para visualizar las informaciones correspondientes.

Index Introduzca el término que desea buscar. La ayuda online le muestra la palabra clave más parecida al término especificado.

Seleccione una palabra clave. Para pasar a las páginas con el contenido deseado haga doble clic con el botón del ratón o pulse la tecla Display.

Search Introduzca el término o expresión que desea buscar y haga clic en la tecla de pantalla LIST TOPICS (visualizar temas). Se muestra una lista de los temas organizada de forma jerárquica.

About Abre el cuadro de diálogo **User Configuration**, en el cual puede, entre otros, elegir el idioma de la ayuda online.

4.3 Búsqueda de texto completo mediante términos de búsqueda con vínculos lógicos

En la pestaña Search, si hace clic en el triángulo situado a la derecha del campo de entrada, se mostrarán operadores lógicos.

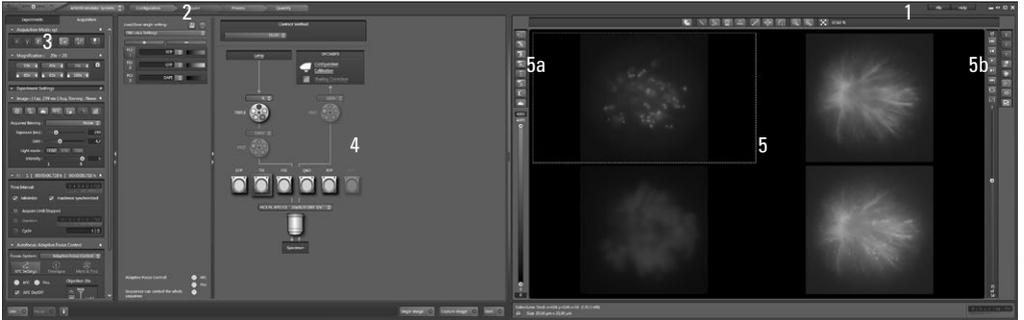
- Seleccione el operador correspondiente.
- Tras el operador, introduzca el segundo término de búsqueda que desea vincular con el primero.

Ejemplos	Resultado
Diafragma AND corte	Esta sentencia busca los temas de ayuda en los que aparecen ambas palabras "diafragma" y "corte".
Diafragma OR corte	Esta sentencia busca los temas de ayuda en los que aparece la palabra "diafragma" o la palabra "corte".
Diafragma NEAR corte	Esta sentencia busca los temas de ayuda en los que la palabra "diafragma" y la palabra "corte" aparecen en un radio de búsqueda determinado. Al mismo tiempo, también se buscan términos con una grafía similar.
Diafragma NO corte	Esta sentencia busca los temas de ayuda en los que aparece la palabra "diafragma" y no la palabra "corte".

4. Inicio del Leica LAS X

4.4 Estructura general de la interfaz de usuario

La interfaz de usuario del LAS X se divide en cinco campos:



(1) Línea de menú y área de selección del modo de funcionamiento/asistente:

Aquí encontrará los diferentes menús para activar las funciones:

- File
- Help

y **Wizard** con:

- Leica AF6000 Modular Systems
- FRET SE Wizard
- Live Data Mode
- HCS A para High Content Screening

(2) Símbolos de flecha: etapas de trabajo con funciones individuales. Este flujo de trabajo refleja el método normal de captura de la imagen y la consiguiente edición de imagen. Las funciones se han agrupado en función de este método:

- Configuration
- Acquire
- Process
- Quantify

(3) Área de pestañas: cada etapa de trabajo (símbolo de flecha) contiene distintas pestañas en las que se pueden encontrar los ajustes para el experimento o se pueden seleccionar datos de la imagen.

Acquire Experiments: árbol de directorios con los archivos guardados en la memoria principal (RAM)

Setup: ajustes de hardware para el experimento actual

Acquisition: ajustes de parámetros para la captura de imágenes

Process Experiments: árbol de directorios con los archivos guardados en la memoria (RAM)

Tools: árbol de directorios con todas las funciones disponibles de la etapa de trabajo actual

Quantify Experiments: árbol de directorios con los archivos guardados en la memoria (RAM)

Tools: pestaña con las funciones disponibles en la fase de trabajo actual

Graphs: representación gráfica de los valores medidos en las zonas de interés (ROI)

Statistics: presentación de los valores estadísticos que se han calculado en las zonas de interés (ROI) establecidas

(4) Área de trabajo: en esta área, en el paso Acquire encontrará el cuadro de diálogo Light Path Settings, en el cual figuran los elementos de control para configurar los parámetros de captura. Durante la edición de la imagen, en esta área se crean y muestran vistas previas.

(5) Visor Viewer: sirve para visualizar las imágenes capturadas. En la configuración estándar, el visor Viewer consta del cuadro de imagen central y las teclas de pantalla para la representación de imágenes y la selección de zonas de interés (ROI) (5a), así como la visualización del canal (5b).

5. Parámetros para la captura de imágenes en varias dimensiones

En este capítulo se describen los menús de software que se utilizan para definir los parámetros de captura del Leica LAS X. El siguiente **modo de captura (Acquisition Mode)** está a su disposición, si pulsa el símbolo de flecha **Acquire** y, a continuación, la pestaña **Acquisition**:

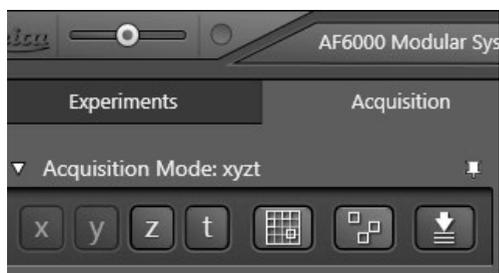


Fig. 2: Modo de captura (Acquisition Mode)

Las teclas de pantalla **x** e **y** siempre están activas. Ambas teclas de pantalla se refieren al menú **Image**, que se utiliza para configurar los parámetros de la cámara.



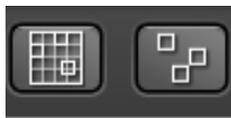
La tecla de pantalla **z** activa el **Menú z**, que define la serie de imágenes tridimensional.



La tecla de pantalla **t** activa el **Menú t**, que define las series temporales.



Las siguientes dos teclas de pantalla **Tile Scan** y **Mark and Find** se refieren a la platina para muestras motorizada:



Esta tecla de pantalla activa el **Menú Tile Scan**, que se requiere para generar visiones de conjunto compuestas:



Esta tecla de pantalla activa el **Menú Mark- and Find**, que se requiere para definir distintas posiciones de la platina para experimentos de varias posiciones:





Nota:

Una tecla de pantalla negra significa que la función correspondiente está desactivada y que de este modo no se utilizará para el experimento. Si hace clic en la tecla de pantalla con el botón izquierdo del ratón, podrá activar las teclas de pantalla. La tecla de pantalla roja significa que la función correspondiente está activada.

5.1 Configuración ruta óptica

En la parte izquierda del Leica LAS X también se encuentran los ajustes de la trayectoria de la luz "Light Path Settings". En este menú puede definir los canales de luz para los experimentos correspondientes. Este menú contiene funciones importantes, por lo que está visible:

Fig. 3: Light Path Settings



5. Parámetros para la captura de imágenes en varias dimensiones



Nota:

Por regla general, debería empezar la definición del experimento especificando los canales de imágenes en el **Menú Configuración ruta óptica**.

Para definir un canal, debe activar primero la tecla de pantalla en cuestión. Empiece por el canal 1:



La LUT (Look up Table) deseada para este canal se selecciona en la paleta de colores a la que puede acceder con la siguiente tecla de pantalla:



En la ventana **Contrast Method** se configura el método de contraste deseado y en el campo **Fil-**

ter Cube se configura el cubo de filtros para este canal.

Utilización de las ruedas de filtro externas de Leica*:

El Leica LAS X se puede controlar con hasta cuatro ruedas de filtro Leica externas.

Las posiciones de filtro se definen en el menú **Configuración ruta óptica**.

Si el sistema está equipado con un **FFIM** externo, la transmisión siempre se configurará mediante la corredera **Intensity** del menú **Image** (en 5 posiciones). La rueda de filtros interna del microscopio se configura en este caso con el 100% de transmisión.

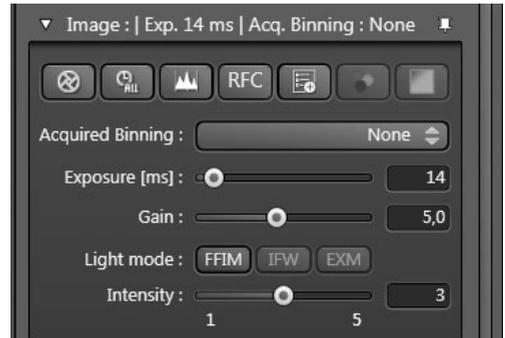
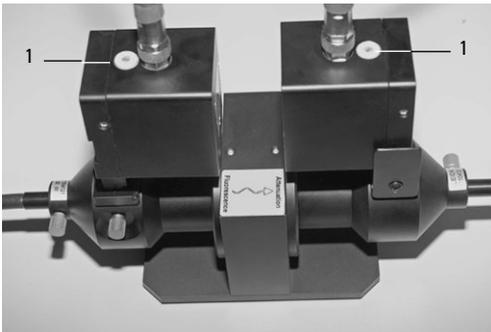


Fig. 5: Configuración de la transmisión para FFIM

Fig. 4 Acoplamiento externo para el adaptador con dos correderas para filtros cortas

1 Número de conexión por cable



Posiciones para FFIM:

100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%

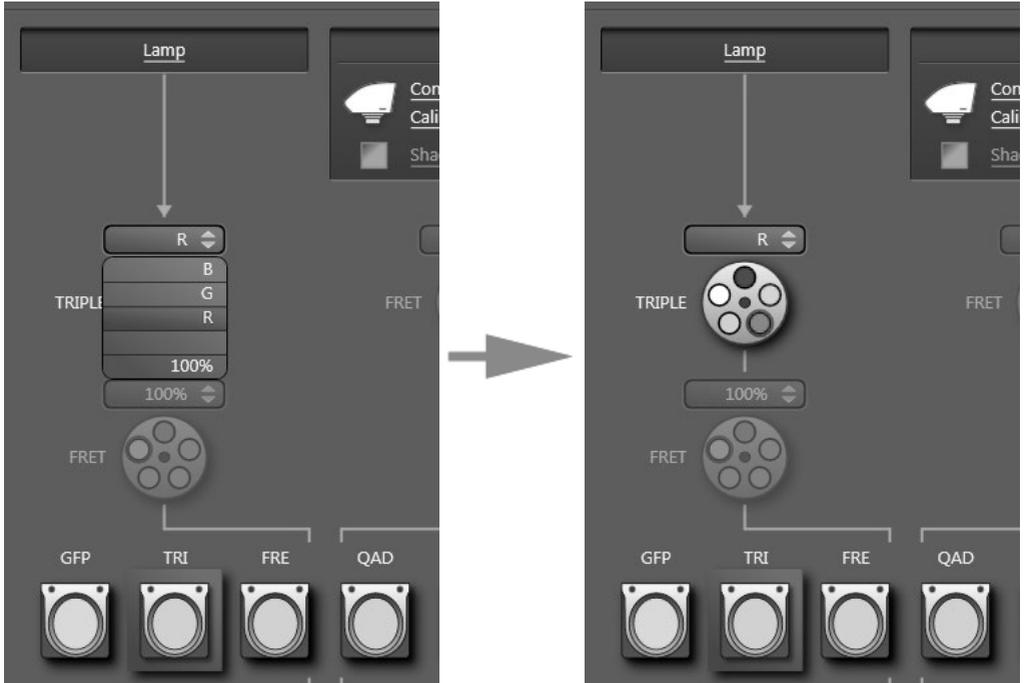
* Requiere la high-speed control box

La selección de un cubo de filtros en el menú LAS X Configuración ruta óptica activa la rueda de filtros correspondiente.

Atención: La rueda de filtros en cuestión debe posicionarse previamente en la trayectoria de rayos!

Seleccione ahora el filtro de emisión o el filtro de excitación adecuado en el campo **Emission Filter** o **Excitation Filter**. Si no se activa ninguna rueda de filtro, se configurará la posición vacía de la rueda del filtro (100% de transmisión).

Fig. 6: Selección del filtro de excitación



5. Parámetros para la captura de imágenes en varias dimensiones

La rueda de filtro externa se puede utilizar con el **modo High Speed**. En este caso, se marcará la opción **Use sequencer board** (figura 15). Si todo el experimento se controla mediante la High Speed Board, el color del cuadrado anterior a **Sequencer can control the whole sequence** pasará de rojo a verde.

Si hace clic en la tecla de pantalla "+" se puede crear un canal adicional. Con la tecla de pantalla "-" se pueden volver a borrar los canales. Si la **Secuencia de los canales** debe modificarse, con un clic del botón derecho del ratón en la **Tecla de pantalla FCr** correspondiente (en este ejemplo, FCr 1) se puede desplazar la posición del canal.



Nota:

Puede definir ocho canales como máximo.

Si hace clic en la **Tecla de pantalla FCr** con el botón derecho del ratón, el canal se podrá guardar. Se puede acceder a los canales guardados desde el **Campo de listas** (a la derecha, junto a la **Tecla de pantalla FCr**).

La combinación de todos los canales, incluyendo los **Parámetros de captura** se puede guardar en el campo **Load/Save Settings** y volver a acceder posteriormente a ella.

Fig. 7: Ejemplo de un experimento con tres canales de fluorescencia



5.2 Menú Image

El menú **Image** se utiliza para configurar los parámetros de la cámara:

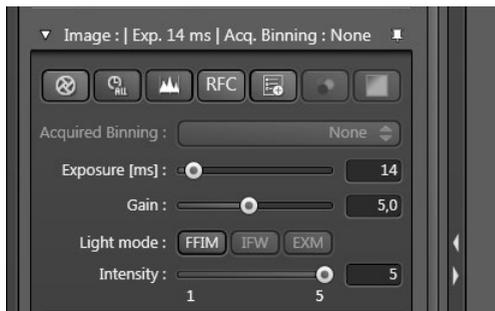


Fig. 8: Menú Image

Los principales parámetros que deben definirse aquí son **Binning** y **Exposure**.

Binning Para mejorar la relación señal/ruido pueden combinarse los píxeles de la cámara. En el caso de **Binning 2x2**, por ejemplo, se agrupan 4 píxeles (2 píxeles en dirección x y 2 píxeles en dirección y). La resolución de la imagen se reduce con el factor 4. Generalmente, aquí se indica **Binning 2** o **Ninguno**.

Exposure Con la corredera **Exposure** se ajusta el tiempo de integración para cada canal de la imagen. Para poder captar la imagen en el modo rápido de tiempo real (**High Speed**) debería intentar ajustar con el mismo valor el tiempo de integración y los valores **Gain** e **Intensity** para todos los canales.

Gain Permite ajustar la amplificación electrónica de la cámara.

Intensity Permite ajustar la intensidad luminosa en la trayectoria de haces de iluminación. En este caso, se desplaza la rueda de filtros interna del microscopio de Leica para atenuar la luz.

Mediante la tecla de pantalla  se puede activar un **Histograma en vivo**. El histograma en vivo se utiliza para objetivos con un anillo de corrección como medio auxiliar para corregir los defectos de las imágenes.

5.2.1 Cámara

Si en el **LAS X** se utiliza la **high-speed control Box**, la cámara se podrá utilizar con el **High Speed Mode** (activación controlada con el secuenciador).

Requisito: la cámara debe ser compatible con la high-speed control box.

No obstante, debe tener en cuenta que en todas las cámaras que se utilizan con el modo High Speed, los valores de Gain y Binning son iguales para todas las capturas de la secuencia. El ajuste del valor Intensity puede ser distinto, si la rueda de filtros externa de Leica FFIM se utiliza con el modo High Speed. Se ha marcado la opción **Use sequencer board** (figura 9).

5. Parámetros para la captura de imágenes en varias dimensiones

Si todo el experimento se controla mediante la High Speed Board, el color del cuadrado anterior a **Sequencer can control the whole sequence** en el menú **Configuración ruta óptica** pasará de rojo a verde.

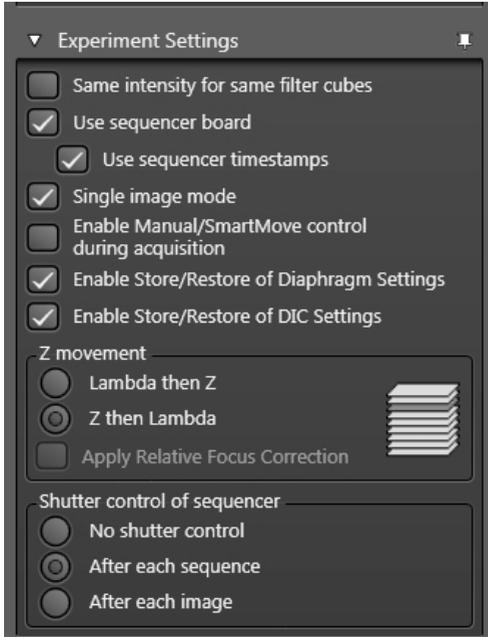


Fig. 9: Experiment Settings

Se accede al cuadro de diálogo **Experiment Settings** mediante el símbolo de flecha **Acquire** en la pestaña **Acquisition**.

Es relevante si se trabaja con varios fluorocromos (FCr). Para que no se utilicen distintos tiempos de exposición involuntariamente, existe la opción **Same Exposure for all probes**. Se aplica automáticamente una modificación del tiempo de exposición de un fluorocromo para todos los fluorocromos:



Fig. 10: Same Exposure for all probes

En el cuadro de diálogo **Experiment Settings** se puede activar además la opción **Single image mode**. La tecla **Single image** aparecerá en el margen inferior del rango de trabajo. De este modo se capta una única imagen para el canal actual. Por el contrario, con la tecla **Capture Image** se capta una imagen para cada canal definido.

Para manejar el obturador, marque la opción deseada en **Shutter control of sequencer***.

! Atención!

Tenga en cuenta las instrucciones de servicio suministradas para los componentes individuales.

* Requiere la high-speed control box

5.2.2 Cámaras EM CCD

Para ajustar la cámara EM CCD, utilice la corredera **Gain** y/o **EM Gain** en el menú **Image**.

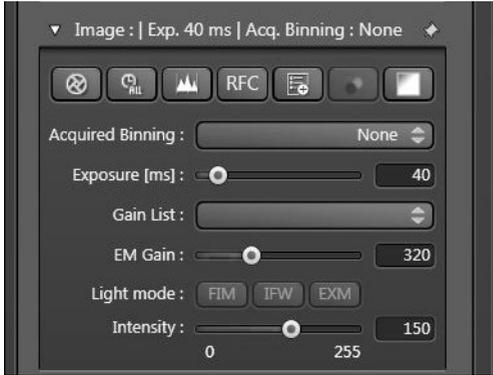


Fig. 11: Menú Image para las cámaras EM CCD

! Atención!

Encontrará especificaciones adicionales y datos sobre las **Cámaras EM CCD** en las instrucciones de servicio de la cámara suministradas.

Para utilizar el modo High Speed (= control de la activación mediante el secuenciador) debe tenerse en cuenta que, en estas cámaras, los valores Gain, EM-Gain, Binning e Intensity deben ser iguales para todas las capturas de la secuencia. La intensidad puede ser distinta, si la rueda de filtros externa de Leica FFIM se utiliza para atenuar la luz.

5.3 Menú z

El **Menú z** se activa mediante la tecla de pantalla **Z** y se utiliza para **definir series de imágenes tridimensionales**:



Fig. 12: Definición de la pila Z

Para un enfoque micrométrico rápido y preciso, en el Leica AF6000 se utilizan el **foco galvo Super Z*** (desplazamiento de la muestra en dirección z independientemente del objetivo) o la **unidad de enfoque piezoeléctrico*** (desplazamiento del objetivo en dirección z).

En el cuadro del menú z se puede elegir entre **Wide Focus** (mecanismo z del microscopio) o, si está disponible, **Fine Focus** (foco galvo SuperZ o piezofoco).

* Requiere la high-speed control box

5.3.1 Configuración de lotes de imágenes mediante Wide Focus

La posición z se desplaza mediante el **mecanismo z** del microscopio o mediante el **mecanismo z** de **SmartMove**. Si en la imagen en vivo de la cámara aparece el nivel de imagen inferior, este **nivel z inferior** se puede marcar con la tecla de pantalla **Begin**. Si se guarda el nivel z inferior, la tecla de pantalla **Begin** aparecerá de color rojo. El **nivel z superior** del lote de imágenes se marca como corresponde con la tecla de pantalla **End**. La tecla de pantalla **Begin** y **End** se puede utilizar tanto para el nivel z superior como para el nivel z inferior. La tecla de pantalla **Focus** se puede utilizar para guardar un **nivel de imagen medio**.



Nota:

Los niveles de imagen se guardan si la tecla de pantalla correspondiente (**Begin**, **End** y **Focus**) aparece de color rojo. El nivel z actual se muestra mediante la superficie de color ocre en el menú z (véase la figura 12).

La **altura total de la serie de imágenes** se muestra como **volumen z** en la mitad inferior del menú z. La tecla de pantalla preconfigurada **system Optimized** propone, en función del objetivo utilizado, el mejor **incremento del paso en z** según el teorema de detección. El usuario puede modificar el **incremento del paso** o también la **cantidad de secciones en z**, si en lugar de la tecla de pantalla **system Optimized** activa la tecla de pantalla **No. of Steps**.

5.3.2 Configuración del lote de imágenes mediante Fine Focus*

La configuración de series de imágenes mediante **Fine Focus** se realiza como en el caso de **Wide Focus** (véase el capítulo 6.3.1). En lugar el mecanismo z del microscopio y de **SmartMove**, el **Fine Focus** solo se regula aquí mediante el **puntero de ratón**. De este modo, con el botón izquierdo del ratón, la superficie de color ocre del menú z se desplaza hasta la posición deseada.

Con la tecla de pantalla **Go to** se pueden desplazar los planos de enfoque definidos previamente (inferior, superior y medio).

5.4 Menú t



El **Menú t** se activa mediante la tecla de pantalla **t** y se utiliza para **definir series temporales**:

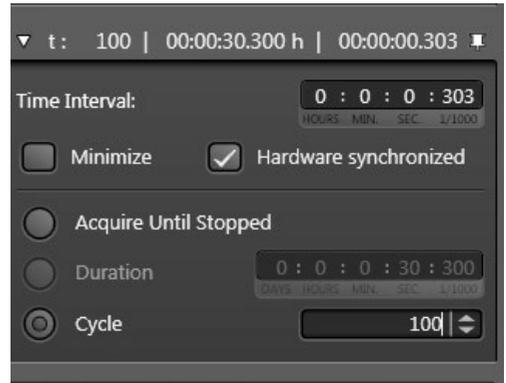


Fig. 13: Menú t

Aquí se puede definir mediante la tecla de pantalla **Cycle** un número fijo de adquisiciones. Si se selecciona **Duration**, se podrá predefinir la duración total del experimento. Si se selecciona **Acquire until Stopped**, no se predefinirá ningún instante final para el experimento. El usuario podrá detener el experimento en cualquier momento.

* accesorio opcional. Requiere foco galvo Super Z o unidad de enfoque piezoeléctrica

En el campo de entrada **Time Interval** se define la diferencia de tiempo entre los instantes. Si la tecla de pantalla **Minimize** se activa, se seleccionará el tiempo mínimo como intervalo de tiempo necesario para capturar un instante.

Si se activa la tecla de pantalla **High Speed***, se realizará toda la serie cronológica mediante la high-speed control box en tiempo real (el modo más rápido posible sin pausas entre las imágenes). Deben garantizarse las siguientes condiciones previas:

- Todos los canales de imágenes deben tener el mismo valor para **Gain e Intensity**. La intensidad puede ser distinta, si la rueda de filtros externa de Leica FFIM se utiliza para atenuar la luz.
- Todos los canales de imágenes deben tener el mismo cubo de filtros o el mismo método de contraste.
- En el **Menú z** está activado **Fine Focus**** (si se debe capturar un **lote de imágenes z**).
- En el **Menú t** debe estar activa la opción **Minimize**.

Si se cumplen estas condiciones previas, el campo **High Speed** se podrá activar. En el menú **Light Path Settings** hay un **campo verde** que indica que la **high-speed control box** está controlando todo el experimento:



Fig. 14: Campo de visualización "Sequencer can control the whole experiment"

Después de capturar cada imagen, deben transferirse los datos de imágenes de la cámara a la memoria del PC. Este proceso puede durar entre 1 y 150 ms (en función del tipo de cámara, binning, resolución, tamaño ROI1 y posición ROI1).

Desde la high-speed control box se utiliza este tiempo de transferencia para desplazar todos los elementos a la posición necesaria para la siguiente imagen. En la mayoría de situaciones de captura, el tiempo de transferencia de la cámara es suficiente para alcanzar las nuevas posiciones. En todos los demás casos, se retrasa la siguiente captura de la imagen como corresponda.

* solo disponible en sistemas con una high-speed control box

** accesorio opcional. Requiere foco galvo Super Z o unidad de enfoque piezoeléctrica

5. Parámetros para la captura de imágenes en varias dimensiones

Los siguientes componentes se pueden controlar desde la high-speed control box (entre paréntesis, los tiempos necesarios más habituales):

- Ruedas de filtros externas Leica (tiempo de conmutación para posiciones de filtro contiguas 27 ms)
- SuperZ FineFocus (incremento del paso habitual $1 \mu\text{m} = 40 \text{ ms}$)
- Piezo FineFocus (incremento del paso habitual $1 \mu\text{m} = 3 \text{ ms}$)
- Leica AM TIRF MC
- Leica EL6000 Obturador de alta velocidad (6 ms)

Para poder utilizar secuencias de imágenes durante la captura, en una secuencia solo se deben modificar los componentes que se puedan controlar mediante la CTR HS high-speed box. Por consiguiente, estos componentes deben permanecer constantes en series controladas por secuenciadores:

- Objetivo
- Tipo/salida de cámara
- Aumento posterior (MagChanger)
- Método de contraste
- Cubo de fluorescencia
- Intensidad luminosa (excepto si FFIM se utiliza con una rueda de filtros externa)
- Binning y Gain de cámara
- Ruedas de filtro y obturadores internos del microscopio
- Posición de platina

Si para uno de estos componentes se definen valores distintos dentro del experimento, el sistema pasará automáticamente al modo **Normal** y de este modo podrá capturar secuencias opcionales.

El campo de visualización de color verde (menú **Configuración ruta óptica**) simboliza que el experimento definido se puede controlar totalmente mediante la High Speed Board (Fig. 14).



Notas:

Si este campo se almacena de color rojo, con el botón izquierdo del ratón puede consultar en el campo de visualización de color rojo, qué ajustes deben modificarse para conseguir un experimento totalmente controlado por el secuenciador.

En el caso de experimentos complejos, el sistema los divide en series parciales que se vuelven a desarrollar controladas por la high-speed box.

Ejemplo: si un experimento de varias series z se define con la utilización de distintos cubos de fluorescencia, el campo de estado se pondrá en rojo, aunque las series z individuales se controlarán mediante la high-speed box y de este modo se capturarán con un tiempo óptimo.

5.5 Mark and Find

Mark and Find se activa con la tecla de pantalla  y se utiliza para definir distintas posiciones de la platina para **Experimentos de varias posiciones**. Si se desplaza una posición de platina, se pueden almacenar sus coordenadas **X, Y** y **Z** con la tecla de pantalla **Mark**.



Si se almacenan varias posiciones, estas se pueden volver a desplazar con el menú desplegable. Si se inicia el experimento, en cada instante de una serie temporal se desplazarán y capturarán todas las posiciones.

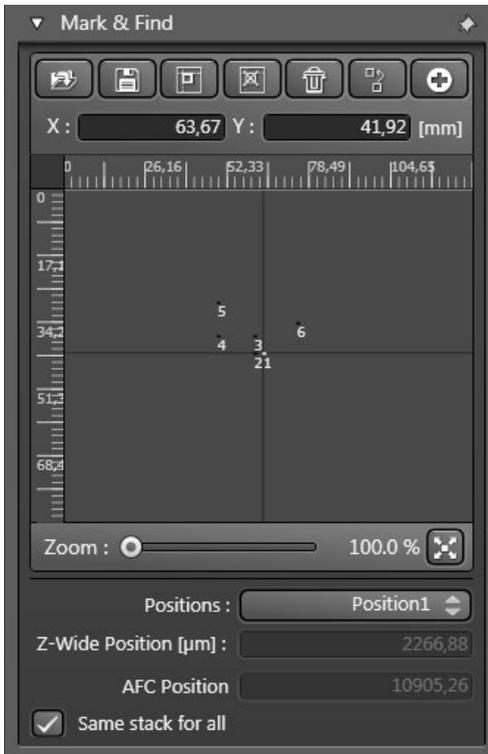


Fig. 15: Mark and Find

5.6 Tile Scan

5.6.1 Configuración de la cámara para Tile Scan



Nota:

Para Tile Scan se presupone que se dispone de una cámara correctamente calibrada.

La cámara debe montarse correctamente en función del tipo de cámara y de la salida utilizada (véase la tabla siguiente):

Tipo de cámara	Orientación de la cámara en la salida izquierda, derecha e inferior Imagen del ocular = imagen de la cámara
Andor iXon 897	Cable hacia atrás
Hamamatsu 9100-13	Placa de plástico negra hacia adelante
Hamamatsu 9100-02	Placa de plástico negra hacia adelante
DFC365 FX	Cable hacia atrás
DFC450 (C)	Cable hacia atrás
DFC310 FX	Cable hacia atrás

Alineación de la cámara

Si se determinara que los bordes de la imagen en vivo no discurren paralelos a los bordes de la ventana de imagen, ahora se puede realizar un ajuste de afinación de la cámara. (Para representar una imagen en vivo, véase el capítulo 7: Primer experimento).

Seguir para ello las siguientes indicaciones:

- Pase al objetivo con el máximo aumento.
 - Enfoque la imagen microscópica.
 - Busque una posición destacable del objeto y sitúela en la esquina superior derecha del cuadro de imagen.
 - Desplace la platina en la dirección X de forma que la posición del objeto se mueva hacia la izquierda en el cuadro de imagen.
 - Compruebe que la distancia hasta el borde del cuadro de imagen siga igual.
- Si esto no fuera así, habrá que girar la cámara adecuadamente.

5.6.2 Captura Tile Scan

El menú **Tile Scan** se activa mediante la tecla de pantalla



y se utiliza para limitar un área para generar visiones de conjunto compuestas.

El área Tile Scan está especificada por dos posiciones enfrentadas que determinan el área Tile Scan de un modo único.

Generalmente, estas posiciones pueden ser el punto de la esquina superior derecho y el punto de la esquina inferior izquierdo del área que debe marcarse.

Como en el menú **Mark and Find**, las posiciones se definen con la tecla de pantalla **Mark** :



Si se especifica el área Tile Scan, en el campo **Scan Field** aparecerá el número de imágenes necesarias para cubrir el área de escaneo definida previamente. La tecla de pantalla **Merge Image** debería estar siempre activa para enlazar las imágenes individuales capturadas en una imagen de Tile Scan:

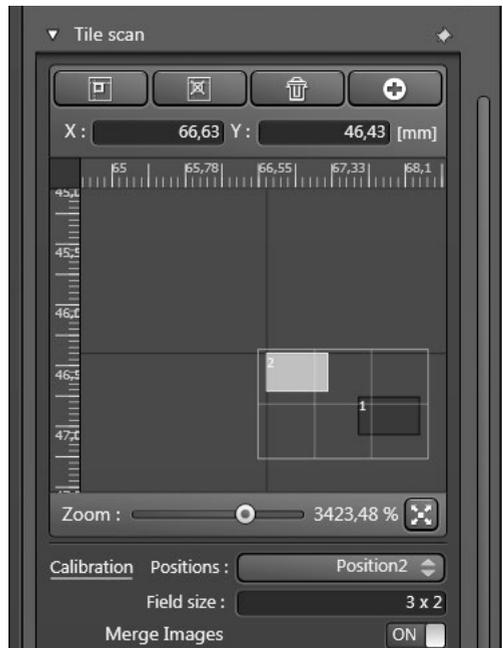


Fig. 16: Tile Scan

5. Parámetros para la captura de imágenes en varias dimensiones

Si las imágenes individuales no se ensamblan correctamente, puede ser necesario cambiar la posición horizontal o vertical de las imágenes.

Para ello, haga clic en la tecla de pantalla **Configurations**:



Se abrirá el menú **Stage Configuration** (Fig. 17). Seleccione la opción **Custom** en **Set merge settings to** y marque la opción adecuada **Swap images horizontal** o **Swap images vertical**.

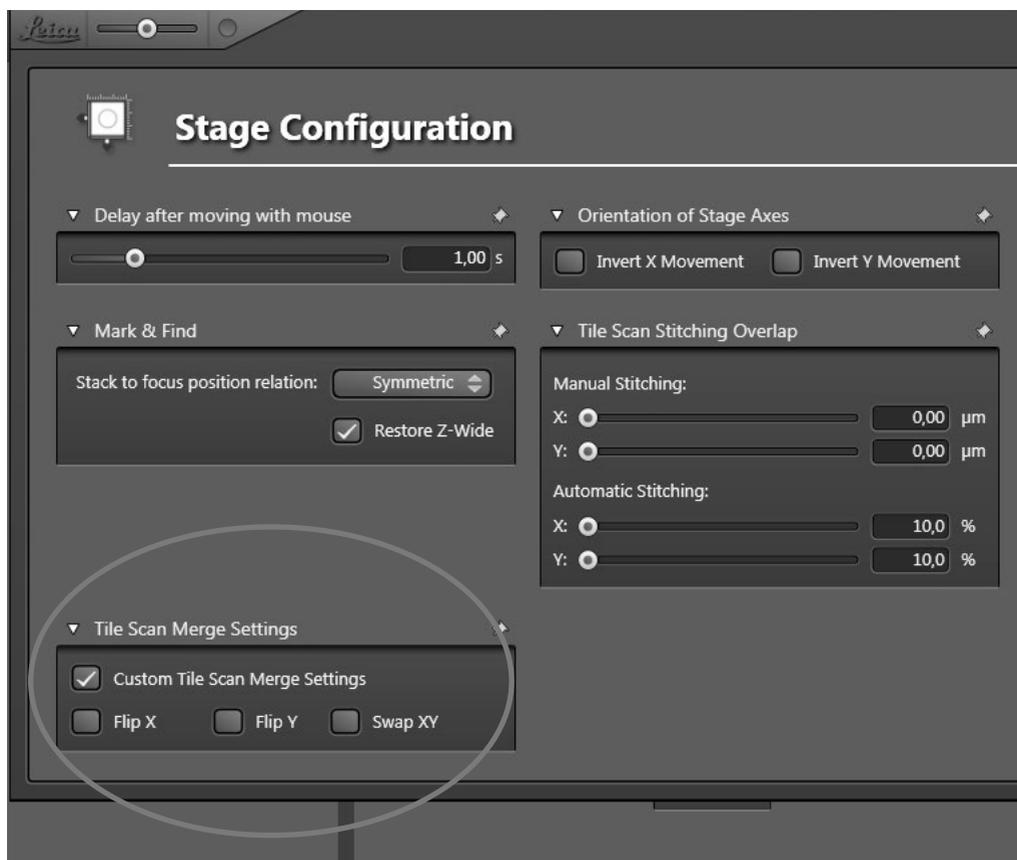


Fig. 17: Stage configuration

6. Primer experimento

El capítulo "Primer experimento" le ofrece una visión general de las prestaciones del Leica LAS X y le muestra cómo puede capturar rápidamente las primeras imágenes. En el siguiente ejemplo se utiliza la muestra "Convallaria", que se ha teñido con los dos colorantes safranina y Fast Green. Se describen los ajustes más sencillos y se realiza un escaneado rápido xyzλ. En el primer experimento, en una posición de platina para ambos fluorocromos se capturan lotes de imágenes. Para la configuración de las posiciones z se utiliza el FineFocus (Piezo* o SuperZ*). A continuación se describe el procedimiento de trabajo general para un experimento de este tipo. Encontrará una descripción detallada de los cuadros de diálogo y de las funciones de software en la ayuda online de LAS X.



Nota:

Tenga en cuenta que todas las especificaciones son valores tipo. En función de la muestra, los valores y los ajustes pueden ser distintos.

6.1 Configuración

Para el experimento debería utilizarse un objetivo de 40x o 63x. Resulta óptimo el objetivo para células vivas HCX PL APO 63x/1.30 GLYC CORR 37 °C. Como cubo de filtros, debe utilizarse el cubo BGR 11600197 "Sistema de filtros B/G/R; HP; tamaño "K".

6.2 Encendido del sistema e inicio del software

- Active el sistema.

Tenga en cuenta la secuencia de encendido correspondiente (véase el capítulo 5 Inicio del Leica LAS X).

- Inicie el software LAS X haciendo clic en el símbolo correspondiente del escritorio o mediante la selección en el menú inicial.



- Para inicializar la platina xy, seleccione el siguiente mensaje **Yes (Si)**:

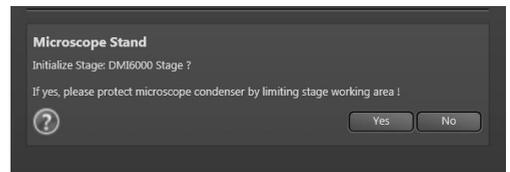


Fig. 18: Inicialización de la platina LAS X

* accesorio opcional. Requiere high-speed control box

6. Primer experimento

- Cuando visualice el siguiente cuadro de diálogo, el software se habrá iniciado y estará listo para el uso:



Fig. 19: Interfaz de usuario LAS X

6.3 Selección y enfoque de la muestra

- Seleccione como método de contraste TL-BF (campo claro).

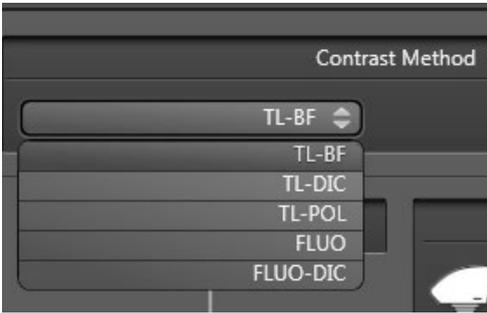


Fig. 20: Método de contraste

- Haga clic en el registro **Setup**.
- Si está disponible, debería seleccionarse el objetivo **HCX PL APO 63x/1.30 GLYC CORR 37 °C**, en caso contrario, el objetivo de 40x o 63x:



Fig. 21: Selección de objetivo

- Coloque la muestra sobre la platina xy (si es necesario, utilizando un medio de inmersión).
- Seleccione la imagen en los oculares y configure la imagen directamente en el microscopio.



Nota:

Para conmutar la luz en la cámara, haga clic en la tecla de pantalla **Live** para que se muestre la imagen directamente en el monitor.

6. Primer experimento

6.4 Resolución de la cámara

- Haga clic en el cuadro de diálogo **Configuración ruta óptica**, en **Configuration**:

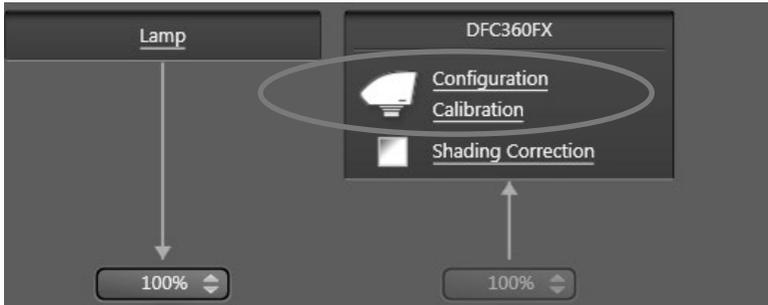


Fig. 22: Configuración de la cámara

- Seleccione en **Set Digitization to (23.1)** el valor **12 Bit** (si utiliza la cámara Cascade, seleccione 16 Bit). Cierre el cuadro haciendo clic en **X**. Los ajustes se transfieren automáticamente.



Fig. 23: Configuración de la cámara

6.5 Modo de captura

- Haga clic en el símbolo de flecha **Acquire**:



Fig. 24: Símbolo de flecha Acquire

- Haga clic en el registro **Acquisition**:



Fig. 25: Pestaña Acquisition

- En **Acquisition Mode**, seleccione además de **x**, **y** la tecla de pantalla **z**. Los parámetros de captura **x** e **y** siempre están activos.

Los campos seleccionados y de este modo activos son de color rojo, como en el ejemplo. Si vuelve a hacer clic en la misma tecla de pantalla, está se volverá de color negro. Los símbolos de color negro no están seleccionados y de este modo no están activos (en este ejemplo, la tecla de pantalla **t** no está activa).



Fig. 26: Acquisition Mode xyz

6.5.1 Variante EL6000

Si utiliza la variante EL6000, la longitud de onda se ajustará mediante un cubo de filtros, mediante la rueda de filtros integrada en el microscopio (IFW) o mediante las ruedas de filtros externas (EFW).

- Seleccione en la lista (27.1) del menú **Configuración ruta óptica**, en **Contrast Method**, la opción **FLUO**.

Selección de filtros para EFW:

- Seleccione **TRI** como **Cubo de filtros**.

- La selección del cubo de filtros en el menú **Configuración ruta óptica** (27.4) activa la rueda de filtros correspondiente.

Atención: La rueda de filtros adecuada debe orientarse previamente hacia la trayectoria de haces de iluminación.

- Seleccione ahora el filtro de excitación **G** en el campo **Excitation Filter** (29).

6. Primer experimento

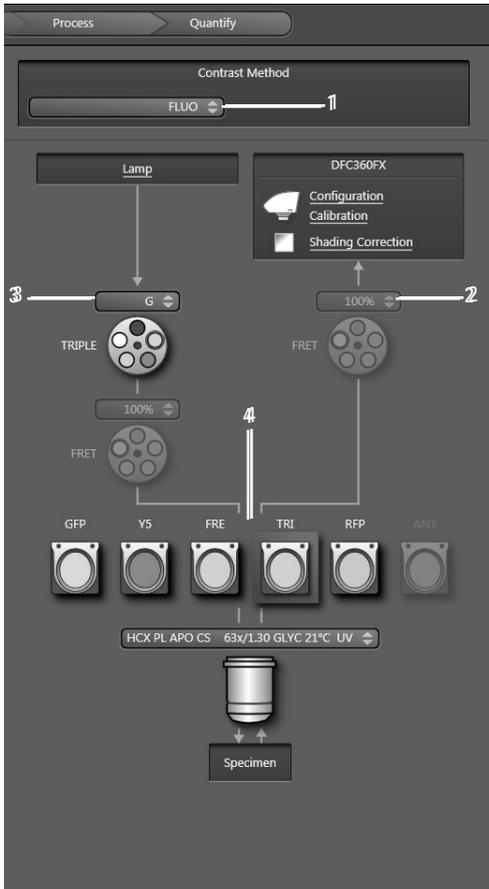


Fig. 27: Menú Light Path Settings

Selección de filtros para IFW:

- Para poder definir la posición de la rueda de filtros, pulse el botón **IFW**:

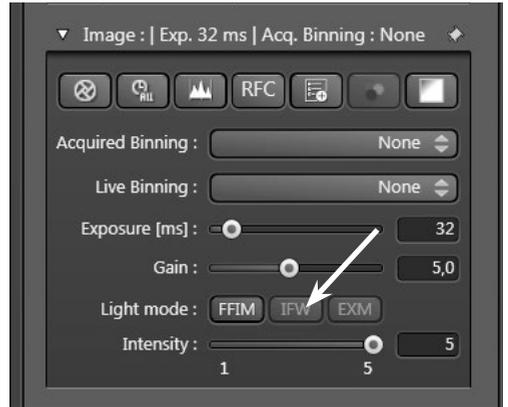


Fig. 28: Diálogo Image

- Seleccione **BGR** como **Filter Cube** y la posición de la intensidad **G**:



Fig. 29: Diálogo Image

Si el sistema está equipado con un **FFIM** externo, la transmisión siempre se configurará mediante la corredera de intensidad del **menú Image** (en 5 posiciones). La rueda de filtros interna del microscopio se configura en este caso con el 100% de transmisión.

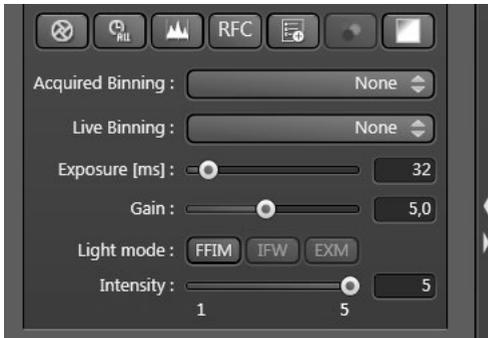


Fig. 30: Configuración de la transmisión para FFIM

Posiciones para FFIM:

100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%

! Atención!

Situar el cursor de intensidad en la posición menor posible para proteger la muestra.

- En el **diálogo Image**, ajuste los siguientes valores:
Binning:
Exposure:
Gain:



Fig. 31: Diálogo Image

- Para poder observar la imagen directamente en el monitor, haga clic en **Live**:

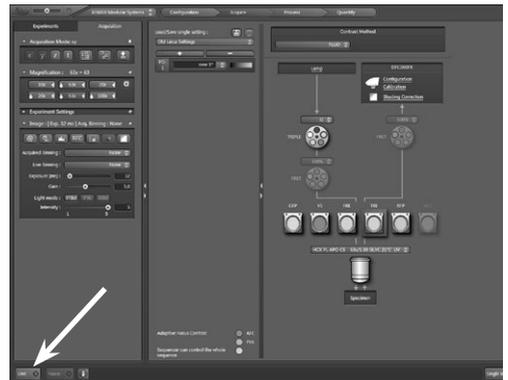


Fig. 32: Tecla de pantalla Live o Stop

6. Primer experimento

- Ahora podrá observar en el visor **Viewer** de su pantalla la imagen en vivo (véase la fig. 33).

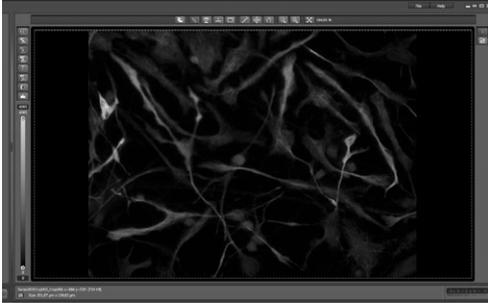


Fig. 33: Representación de la captura en el visor



Nota:

Desplace la muestra con SmartMove* hasta la posición deseada. Para la posterior edición de la imagen se recomienda utilizar células relativamente pequeñas con muchos granos de almidón (puntos claros dentro de las células). Si no encuentra granos de almidón, enfoque otro nivel de la muestra y vuelva a intentarlo.

6.6 Optimización de la imagen

- Optimice la calidad de la imagen mediante el ajuste del tiempo de exposición, desplazando la corredera de **Exposure** del menú **Image** lentamente hacia la izquierda y hacia la derecha. Para una muestra nueva de Convallaria se obtienen valores de exposición de 100 ms a 200 ms. En este caso, observe las modificaciones de la calidad de la imagen:

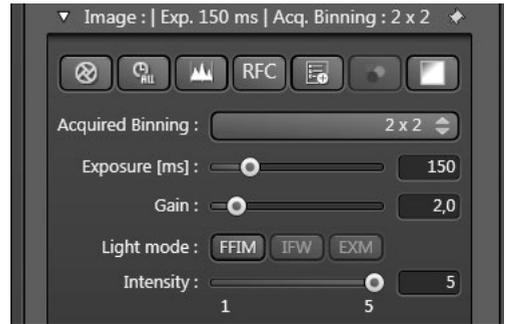


Fig. 34: Menú Image



Atención!

Para proteger la muestra, debe reducir el tiempo de exposición.

- Si ha alcanzado la calidad deseada de la imagen, haga clic en **Detener**:



Fig. 35: Botón Live o Stop

* Accesorios opcionales

6.7 Configuración del color (LUT)



Nota:

La muestra **Convallaria** se ha teñido con dos colorantes (**safranina/Fast Green**). Por consiguiente, en este ejemplo describimos dos configuraciones de fluorocromo (FCr1 y FCr2).

- En este ejemplo, para el **FCr1** se ha seleccionado el color **Verde**. Si hace clic en la tecla de pantalla para mostrar la paleta de colores (36.1), podrá seleccionar el color deseado (36.2). Confirme la selección haciendo doble clic con el botón izquierdo del ratón:

- Haga clic en el campo de texto y asigne un nombre para el **FCr1** (en este ejemplo, **GFP**):

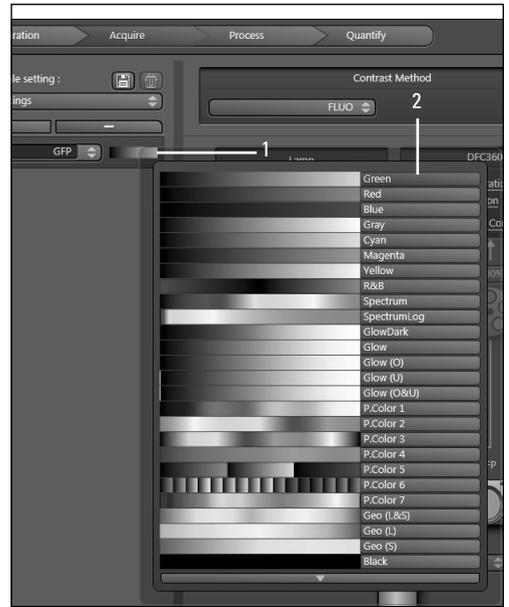


Fig. 36: Paleta de colores



Fig. 37: Campo de texto



- Para guardar todos los ajustes del **FCr1**, haga clic con el **botón derecho del ratón** en el campo **FCr1** (38.1) y, a continuación, en **Save** (38.2):



Fig. 38: Guardar ajustes



6. Primer experimento

• Se le volverá a solicitar que asigne un nombre. Utilice el mismo nombre que el de la fig. 37 y confírmelo con **OK**:



Fig. 39: Confirmar nombre

6.8 Ajustes para fluorocromos adicionales

• Para definir los ajustes de un fluorocromo adicional, haga clic en el símbolo **+**. De este modo se crea el FCr2:

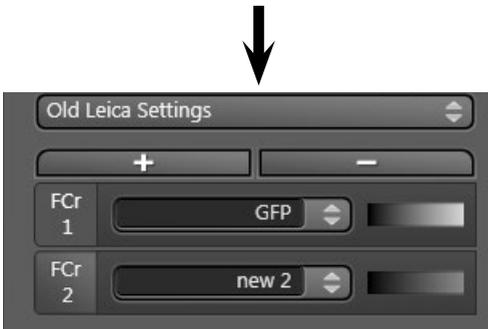
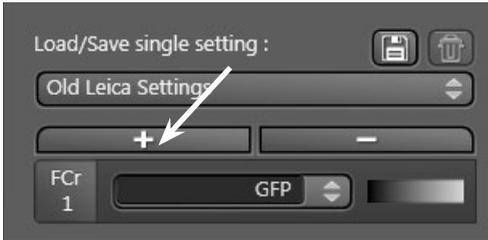


Fig. 40: Añadir fluorocromo

Para configurar el FCr2, proceda del mismo modo que para el FCr1:

- Como **Contrast Method** se selecciona **FLUO**.
- Si utiliza EFW, seguirá seleccionado el **Filter Cube TRI**.
- Si utiliza IFW, seguirá seleccionado **BGR** como **Filter Cube**.
- En el menú **Image** se selecciona **R** (para IFW) como ajuste de intensidad o la posición de la rueda de filtros **R** (EFW) en el menú **Configuración ruta óptica**.

• Para poder observar la imagen directamente en el monitor, haga clic en la tecla de pantalla **Live**.

• Si desea optimizar la calidad de la imagen, proceda igual que en el capítulo 6.6 Optimización de la imagen.

• Seleccione el color que debe representarse (en el ejemplo, el rojo, 41.1) y asigne un nombre al **FCr2** (41.2):

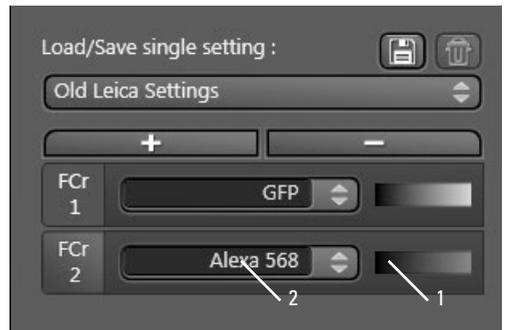


Fig. 41: Asignación de color y nombre

- Guarde los ajustes, haciendo clic con el **botón derecho del ratón** en **FCr2** (42.1) y, a continuación, haciendo clic en **Save** (42.2):



Fig. 42: Guardar ajustes

- Indique un nombre y confírmelo con **OK**.
- Para iniciar la captura de la imagen, haga clic en **Capture Image**.

De este modo, ha definido el FCr1 y el FCr2 y ha guardado los ajustes para estos dos fluorocromos. Ahora puede continuar con la captura de la imagen.

6.9 Captura del lote de imágenes en 3D

En el cuadro del menú z se puede elegir entre **Wide Focus** (mecanismo z del microscopio) o, si está disponible, **Fine Focus** (foco galvo SuperZ* o unidad de enfoque piezoeléctrico*):

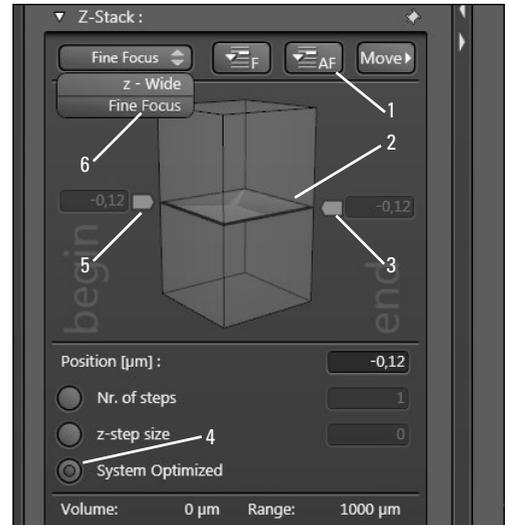


Fig. 43: z-Stack

Ejemplo de enfoque fino:

- En el campo de lista, seleccione **Fine Focus** (43.6).
- Haga clic en **Live** para poder observar la imagen directamente en el monitor.
- Asegúrese de que la imagen se observa con nitidez.
- Haciendo clic en la tecla de pantalla **Focus** (43.1), se guardará la **Posición z** actual.
- Para definir la posición superior de la serie Z, desplace el puntero del ratón hasta la superficie de color ocre (43.2) y desplácelo con el botón izquierdo del ratón pulsado hacia arriba. La modi-

* accesorio opcional. Requiere high-speed control box i

6. Primer experimento

ficación de la posición z se puede ir siguiendo en la imagen en vivo.

- Cuando en la imagen en vivo de la cámara aparece el nivel de la imagen superior deseado, márkelo haciendo clic en la tecla de pantalla **Begin** (43.5).

- Desplace la superficie de color ocre (43.2) con el botón izquierdo del ratón pulsado hacia abajo hasta la posición deseada y márkela haciendo clic en la tecla de pantalla **End** (43.3).

Ejemplo para z-Wide:

- En el campo de lista, seleccione **z-Wide** (53.6).

- Haga clic en **Live** para poder observar la imagen directamente en el monitor.

- Asegúrese de que la imagen se observa con nitidez.

- Haciendo clic en la tecla de pantalla **Focus** (43.1), se guardará la **Posición z** actual.

- Para definir la posición superior de la pila Z, accione el mecanismo Z del microscopio hasta alcanzar el límite superior deseado. La modificación de la posición z se puede ir siguiendo en la imagen en vivo.

- Cuando en la imagen en vivo de la cámara aparece el nivel de la imagen superior deseado, márkelo haciendo clic en la tecla de pantalla **Begin** (43.5).

- Accione ahora el mecanismo Z del microscopio hasta el límite inferior deseado y márkelo haciendo clic en la tecla de pantalla **End** (43.3).



Nota:

Para definir el lote de imágenes, si utiliza el objetivo 63 le recomendamos emplear de 100 a 200 niveles de imagen (cortes). Para el objetivo 40, le recomendamos de 100 a 150 niveles de imagen.



Fig. 44: z-Stack

- Seleccione la opción **System Optimized** (44.1).

- Para iniciar la captura de imágenes, haga clic en la tecla de pantalla **Start**.



Nota:

Encontrará la serie de imágenes almacenada en **Acquire** → **Experiments** (fig. 45). Aquí también se archivan los datos de imágenes generados mediante la edición de imágenes.

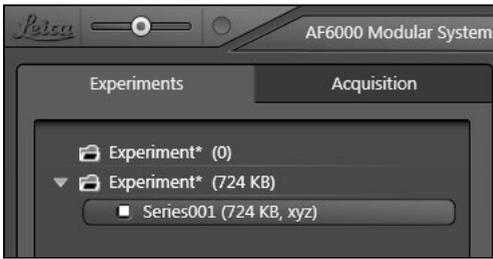


Fig. 45: Experiments



Nota:

Las capturas se inician haciendo clic en **Start** y finalizan automáticamente (si se ha predefinido). En cualquier momento puede detener las capturas haciendo clic en **Stop**.



Nota:

Guarde las imágenes capturadas inmediatamente después de la captura y antes de iniciar una captura nueva, de seguir procesando los datos de las imágenes o antes de abandonar LAS X. Además de guardar los datos en el disco duro, debería guardar/archivar los datos en un soporte de datos adecuado en intervalos regulares.



Nota:

Los datos de imágenes no se pierden cuando se cae el software.

7. Índice

- A**
 - Ayuda online 10
 - Introducción 10
- C**
 - Captura de la imagen en varias dimensiones 14
 - Copyrights 4
- E**
 - Encendido 10
- F**
 - Función 8
- I**
 - Indicaciones de seguridad
 - Significado 7
 - Instrucciones de servicio 6
 - Indicaciones 6
- L**
 - LAS X
 - Activación de la ayuda online 10
 - Búsqueda de texto completo 11
 - Estructura de la interfaz de usuario 12
 - Leica LAS X 9
- P**
 - Primer experimento
 - Ajustes para fluorocromos adicionales 40
 - Captura del lote de imágenes en 3D 41
 - Configuración 30
 - Configuración del color (LUT) 39
 - Encendido del sistema 31
 - Inicio del software 31
 - Modo de captura 34
 - Optimización de la imagen 39
 - Resolución de la cámara 33
 - Selección y enfoque de la sección de la muestra 32
- V**
 - Visión general del sistema
 - Dongle 9

