

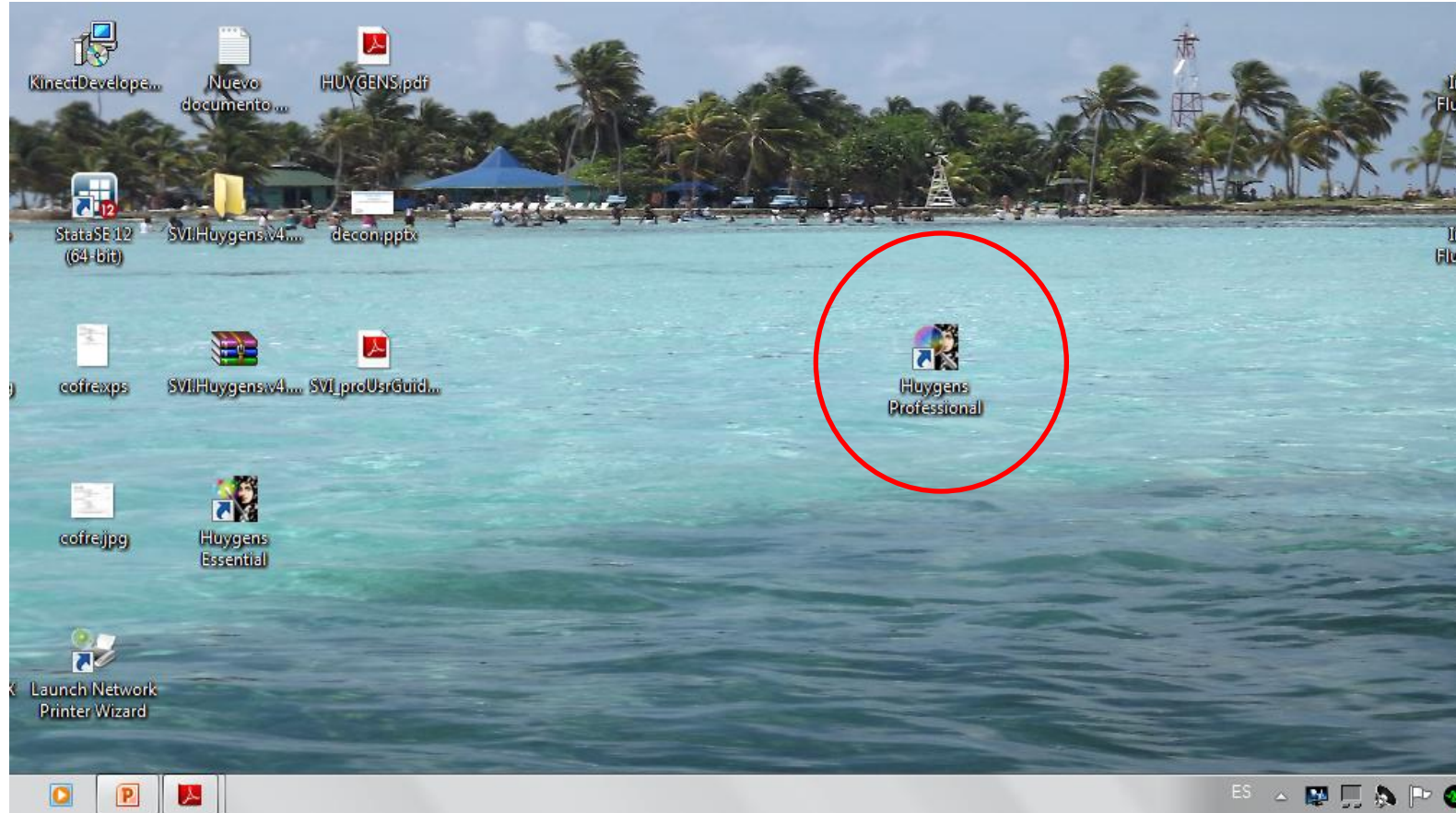
# Pre-paso Práctico

Huygens Professional Guide

Intracellular Fluorescent Probe Concentrations by Confocal Microscopy

- Carlos Núñez.
- Juan José Ortega.
- Solange Rivas.

# Step 1: Iniciar Huygens Pro



# Step 2: Abrir imagen

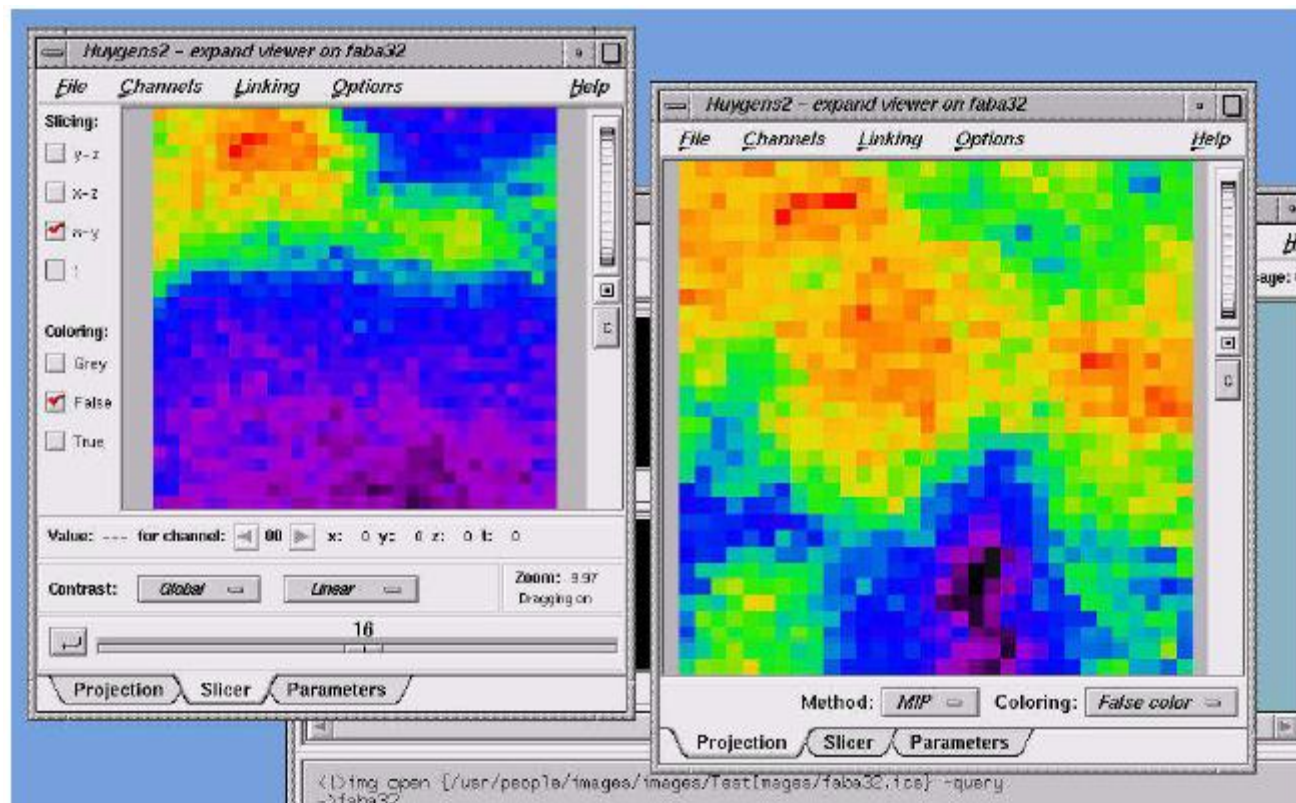
- Select 'Open' from the File menu



Figure 2. The Main Window with empty thumbnail images loaded by default.

# Step 3: Inspeccionar imagen.

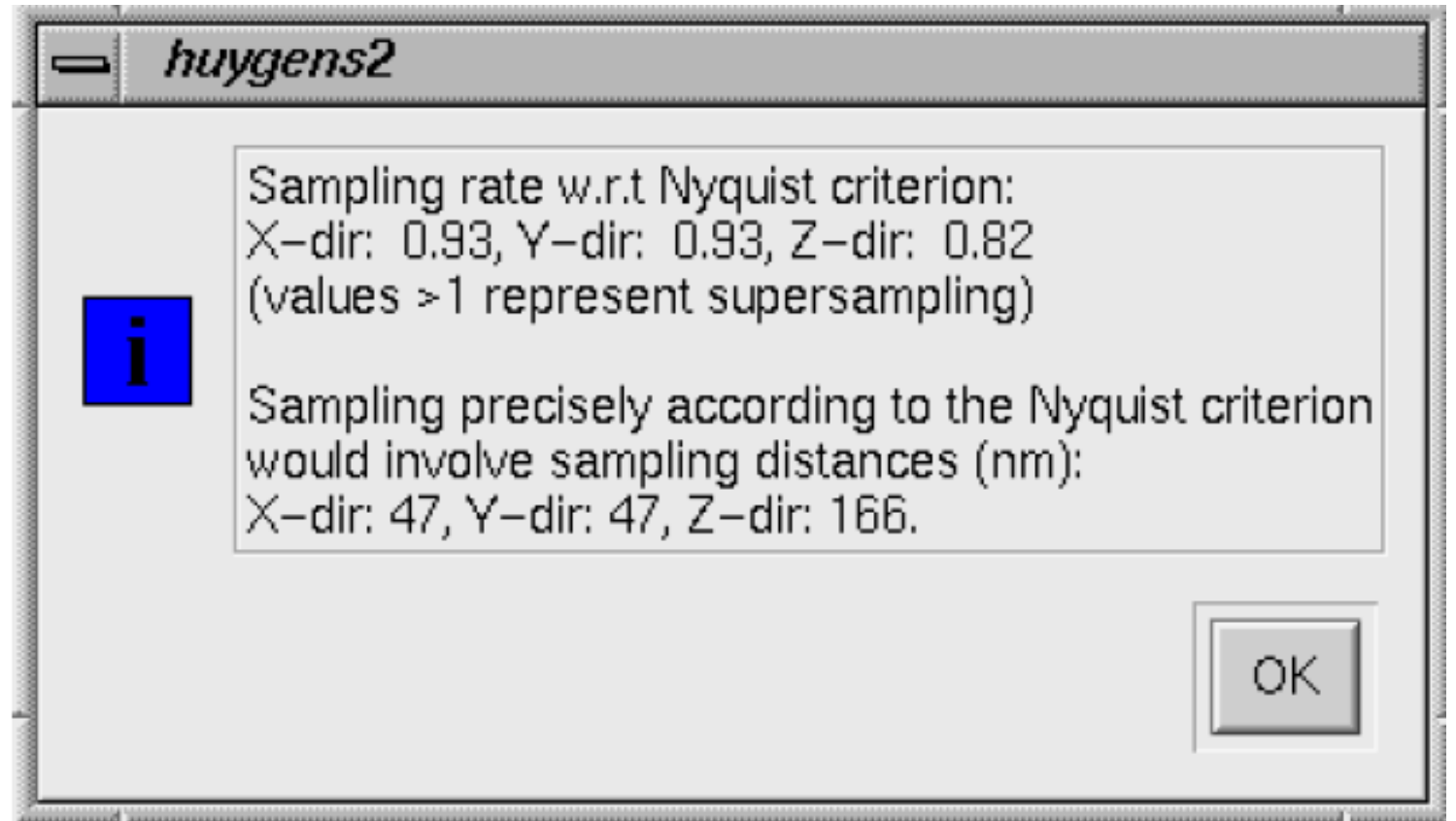
- Use the slicer
- Open the Expand viewer by pressing the Arrow-up button from the thumbnail



**Figure 3. Two Expand Viewers opened from the same image. Left the Slicer Tab is selected, right the Projection Tab.**

## Step 3: Inspeccionar imagen.

- Verificar los parámetros del microscopio.
- Seleccionar la pestaña de parámetros desde la vista expandida.

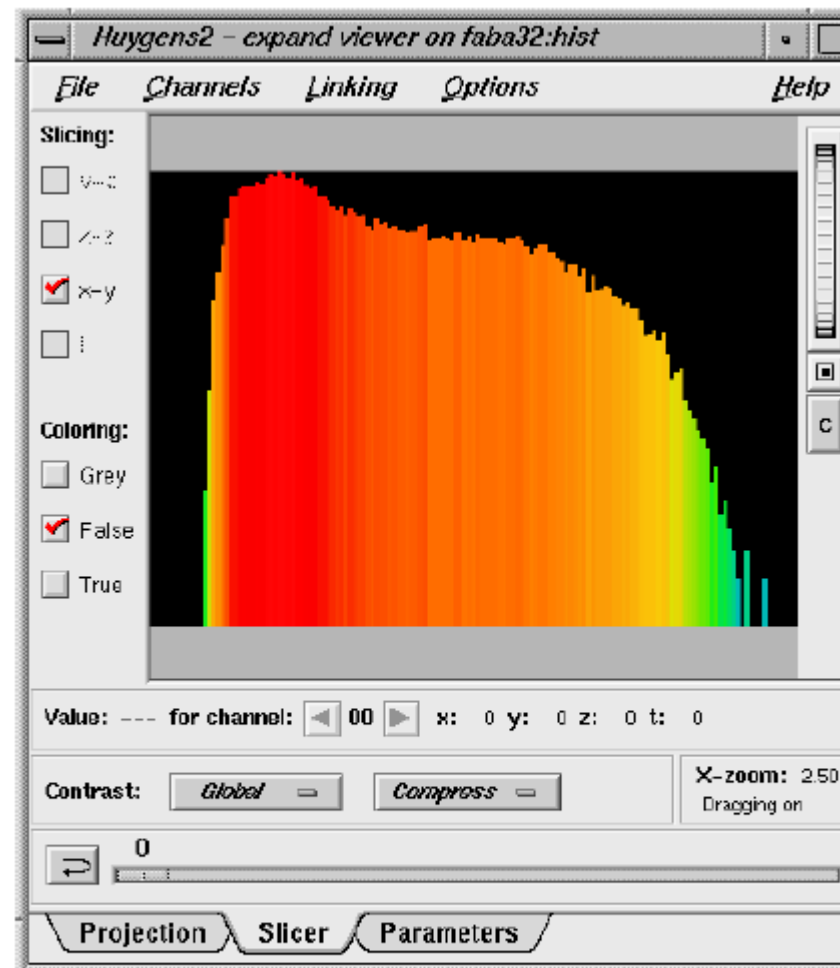


# Step 3: Inspeccionar imagen : Histogram

- Seleccionar la imagen desde la ventana principal y se selecciona histograma desde el menu editar

Inspect the quality of the image visually

No sharp peaks at the extreme sites of the histogram image indicating clipping

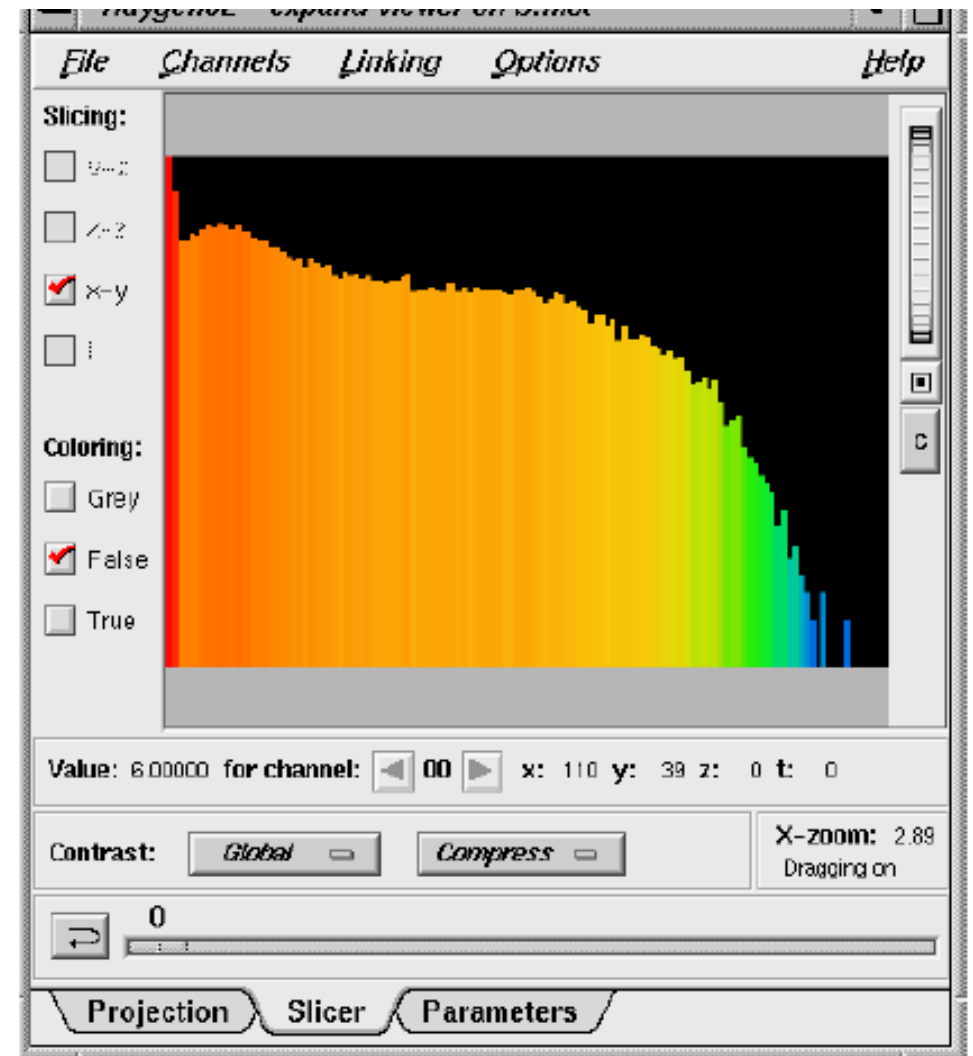


**Figure 4. The image histogram from the example**



# Step 3: Inspeccionar imagen : Histogram

En este caso se observa un peak en el extremo derecho que indica saturación.



**Figure 5.** The image histogram from a clipped image. A spike is seen at the left hand site.

# Step 3: Inspeccionar imagen : Operations window

- En esta ventana aparecen multiples parámetros para el análisis de imágenes, se puede abrir a través del boton O en las imágenes en miniaturas.

Menu bar

Quick access buttons

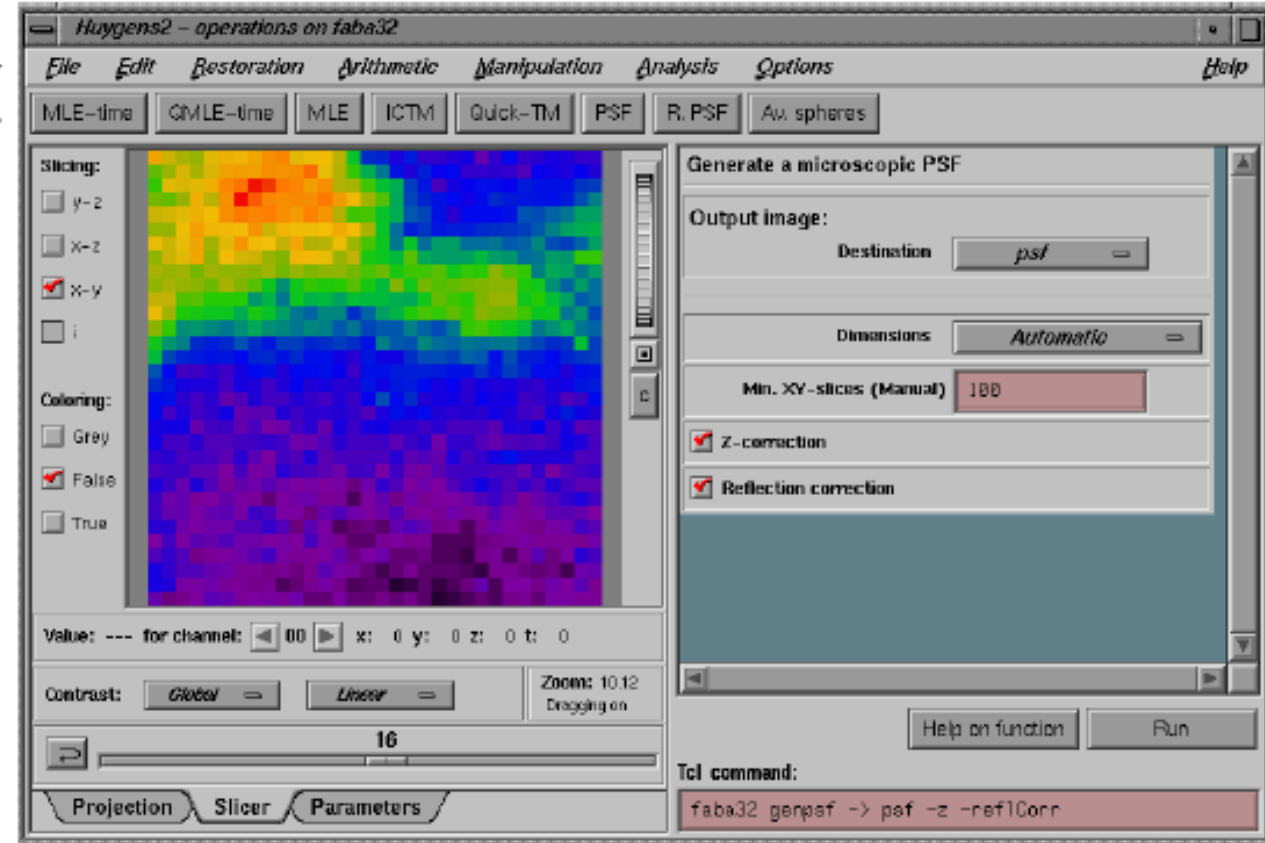
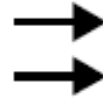
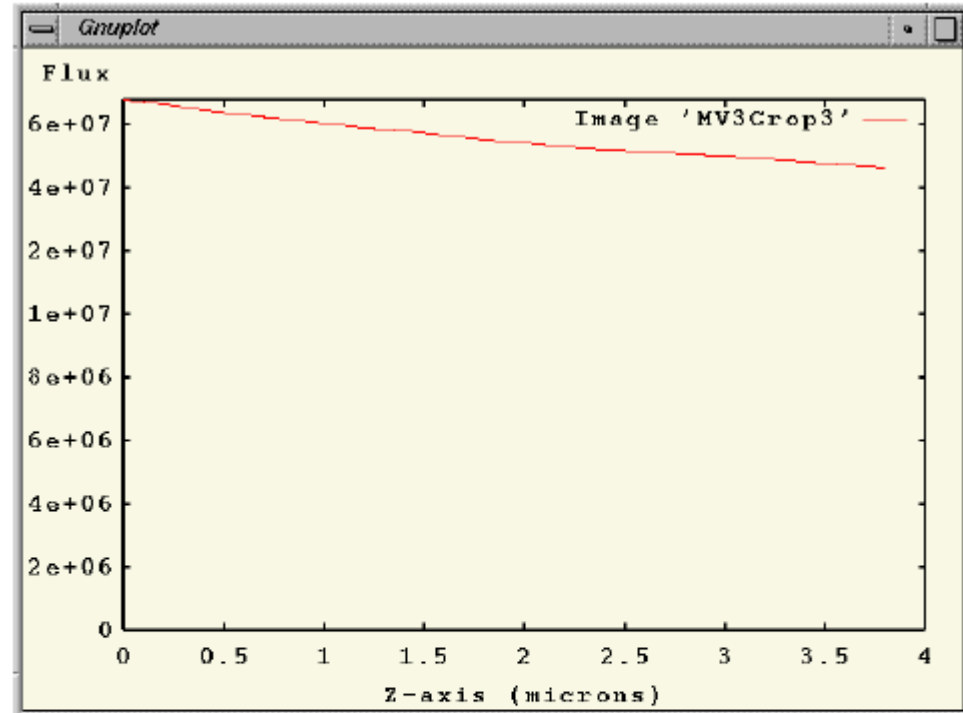


Figure 6. The Operation window with the PSF button pressed.



# Intermezzo: check for bleaching correction Balance de Blancos.

- Select
- 'Plot Flux'  
from the  
'Analysis'  
menu in the  
**Operation**
- **window**



**Figure 7. A typical example of a bleached widefield image. Use the 'Plot Flux' tool from the Analysis menu available in the Operation window.**

# Step 4: Generar un Point Spread Function (PSF)

- EL objetivo del PSF es calcular la medida del “Blurring” en el eje x,y,z
- Un PSF puede ser obtenido mediante:
  - *Recording small beads* with known bead diameter (180 nm beads work fine) and reconstructing a PSF from the bead image
  - Calculando un PSF teórico desde la información de la configuración del microscopio

# Step 4: Generar un Point Spread Function (PSF)

Desde Operation Windows, se realiza click en boton PSF.

Se estima el promedio del fondo (lo que no es imagen), mediante la busqueda de la region con radio  $r$  mas bajo.

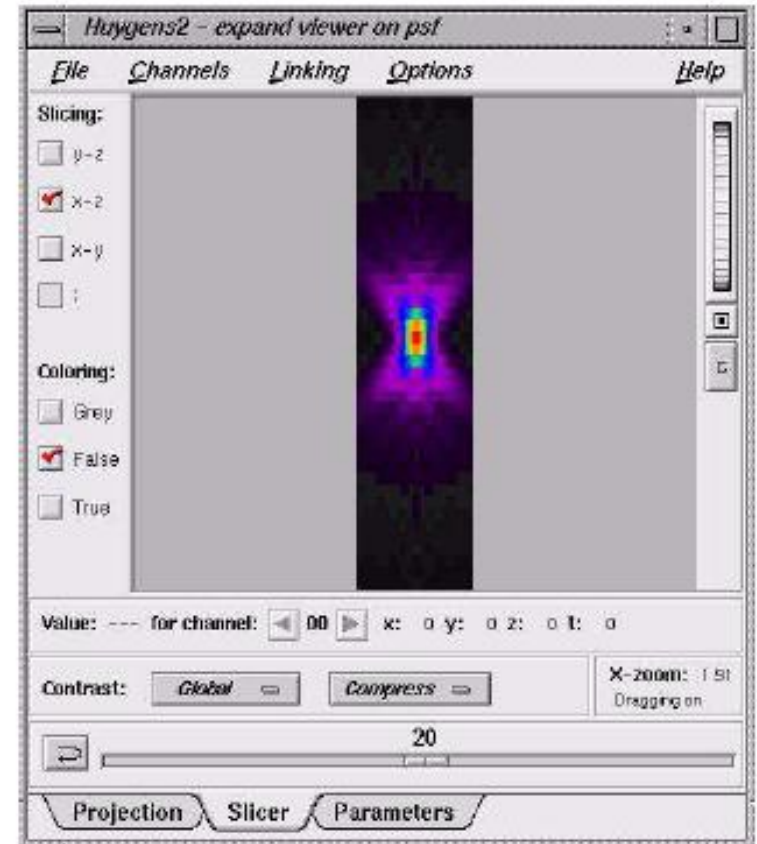


Figure 8. The PSF in x-z view, using 'compress' contrast mode. 'Compressed contrast' highlights the low intensity values showing the typical diabolo shape in lateral view.

## Step 5: Estimar el promedio del fondo en la imagen.

- **Estimate background** from the Analysis menu in the Operation window.
- **LOWEST VALUE (Default):**The image is searched for a 3D region with the lowest average value. The axial size of the region is around 0.3 micron; the lateral size is controlled by the
- *radius* parameter which is set to 0.5 micron by default
- **IN/NEAR OBJECT:** Toma voxel mas alto de zona de menor promedio
- **WIDEFIELD:** background is determined by searching this region for the planar region with radius  $r$  that has
- the lowest value.

## Step 6: Estimate the Signal to Noise ratio (SN ratio)

- Al terminar el proceso anterior, aparece:
- Main window's Task reports

Donde uno puede estimar el Signal to Noise ratio (SN).

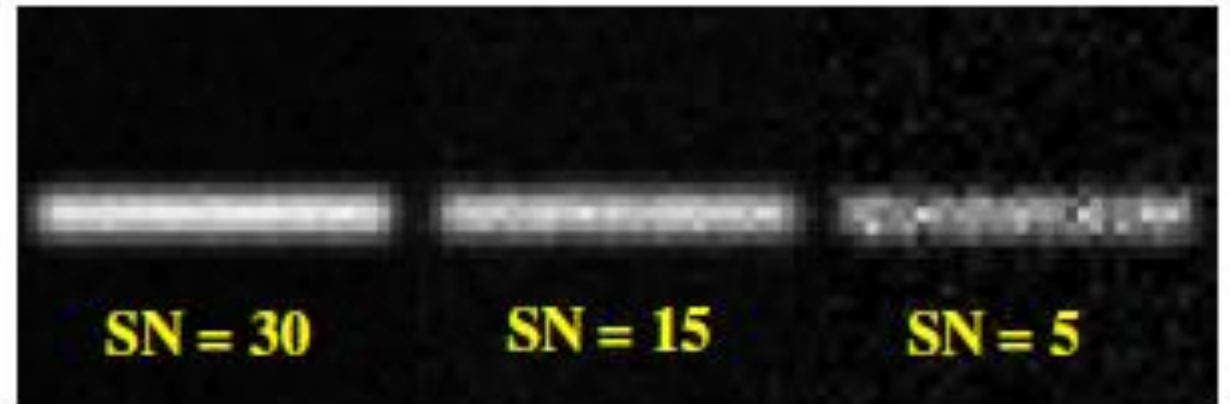
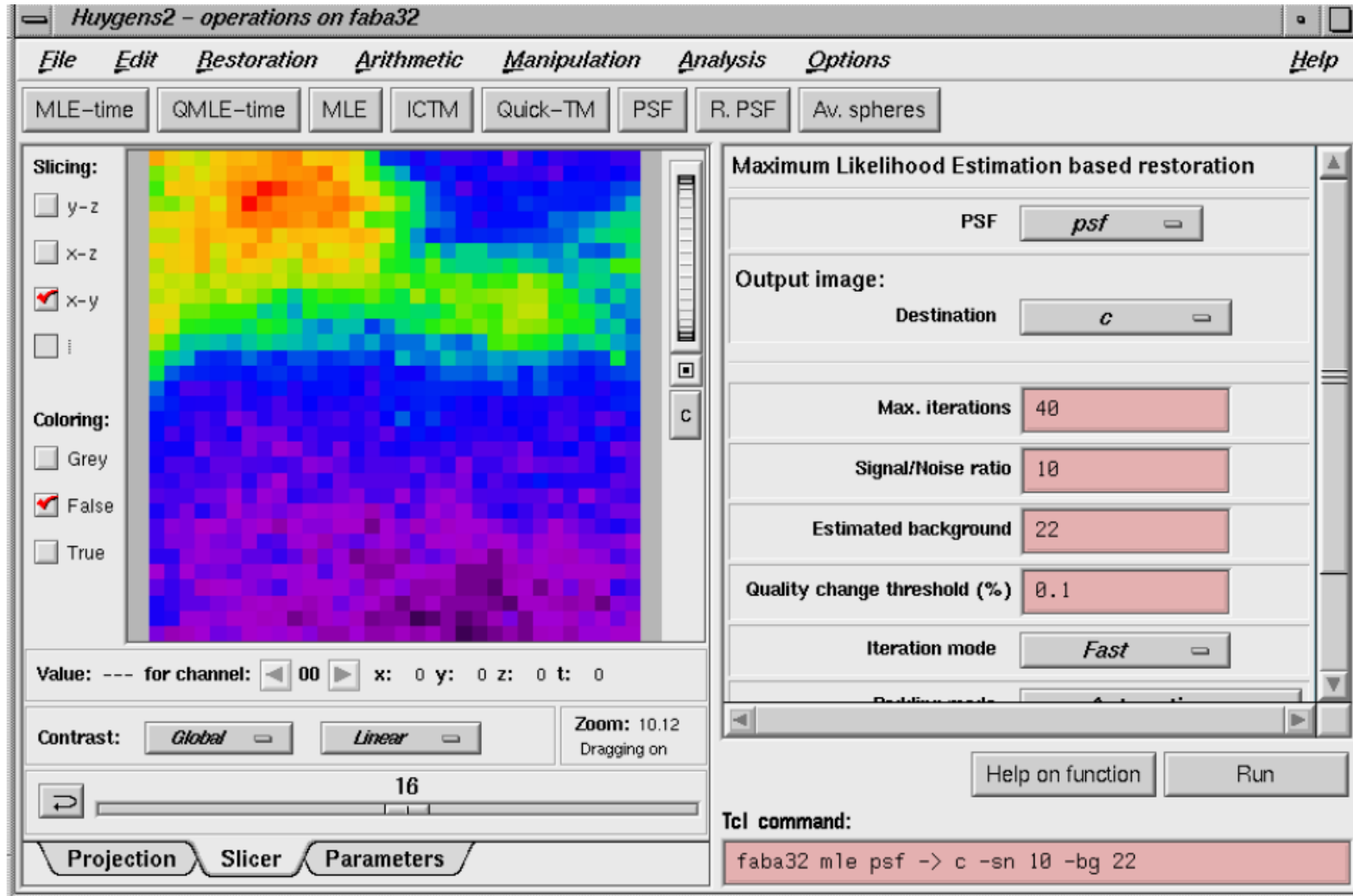


Figure 9. Images with different generated noise levels

# Step 7: Perform a deconvolution run, applying the MLE (Maximum Likelihood Estimation) method.

- ICTM (Iterative Constraint Tikhonov-Miller)
- Number of iterations:
- Signal to noise ratio:
- Background:
- Threshold quality:



Press the **Run** button!



# Step 8: Saving your image

- select the Save as ICS

# Deconvolución Rápida y Fácil.

- MLE-time: desde el cálculo de PSF.

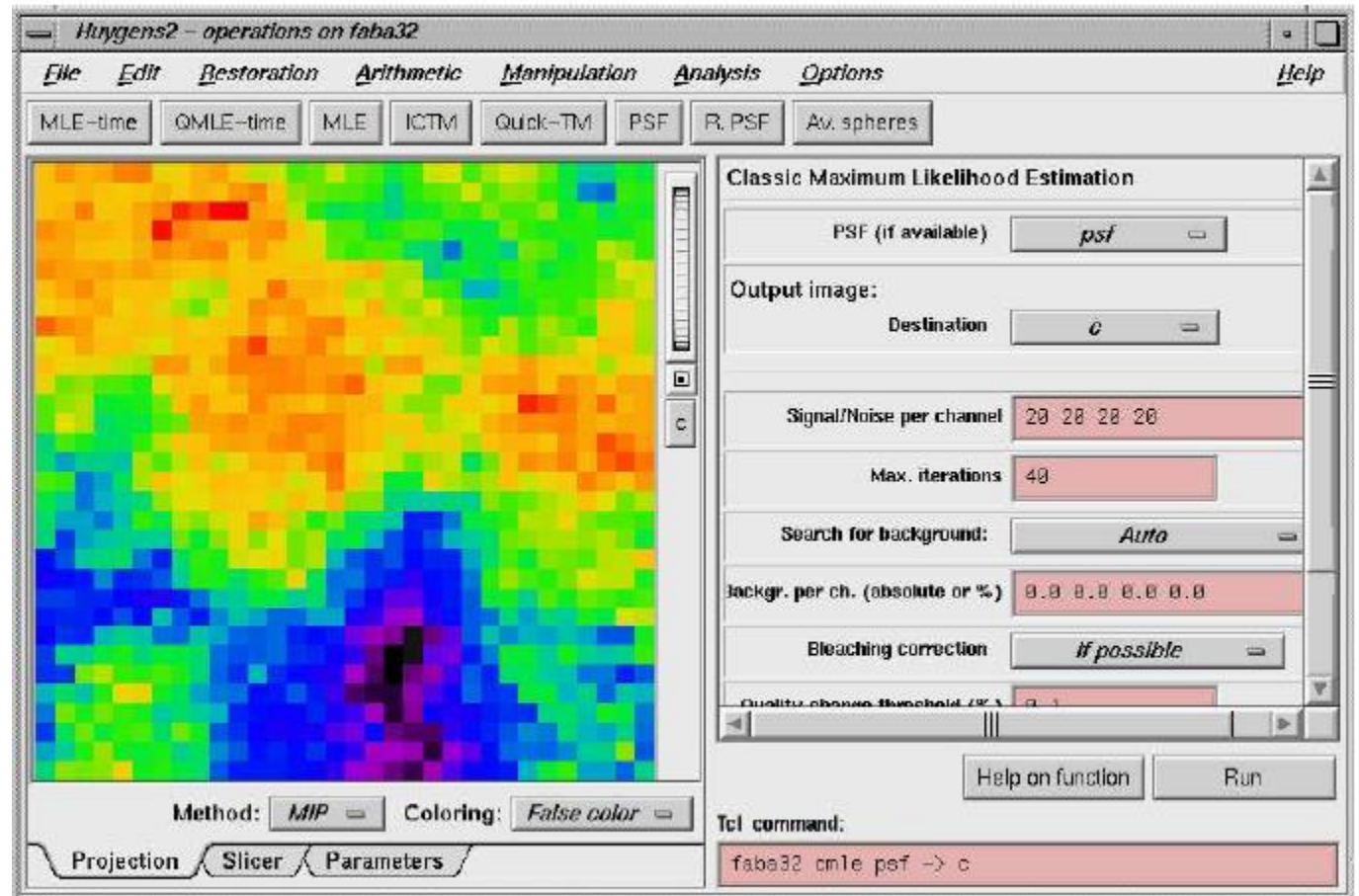


Figure 12. The Operations window with the MLE-time button pressed.

# Parámetros/ Dificultades

Parametro	Descripción	Afecta
SNR	Relacion señal/ruido	Calidad Imagen
Blacklevel	Nivel de Negro	Reduce rango dinamico, no afecta deconv.
Densidad de muestreo	Tasa de digitalización (voxels/dist)	Calidad de resultados tras Deconvolucion

Dificultades de adquisición	Descripción	Genera
Diferencias Indices refractivos	Entre medio inversion y medio muestra	Distorciones, aberraciones.
Recorte	Error digitalización (12 bit 0-4095)	Valores extremos en la imagen
Undersampling	Bajo muestreo (Nyquist)	Falta información en imagen
Bleaching	Fenomeno Inevitable, Blanqueo	Baja calidad de resultados tras Deconvolucion
Inestabilidad Luminica	Propio de algunos equipos	Error deconvolucion
Inestabilidad mecanica	Vibraciones, mov irregular eje z	Error deconvolucion

# Backprojected Pinhole Radius ( $r_b$ )

$$r_b = \frac{r_{phys}}{m_{obj} \cdot m_{system}}$$

$r_{phys}$ : Tamaño pinhole.

$m_{obj}$ : Factor de magnificación del objetivo.

$m_{system}$ : Magnificación Interna.

NA: Apertura Numérica.

$$r_b = \frac{0.61 \lambda_{ex} N_{Airydisks}}{NA}$$

# INTRACELLULAR FLUORESCENT PROBE CONCENTRATIONS BY CONFOCAL MICROSCOPY

*Biophysical Journal Volume 75  
October 1998 1648–1658*

---

*Charles Fink, Frank Morgan, and Leslie M. Loew*

*Department of Physiology and Center for Biomedical Imaging  
Technology,*

*University of Connecticut Health Center, Farmington, Connecticut  
06030 USA*

# Abstract

- Este trabajo describe el seccionamiento de imágenes por microscopía confocal para cuantificar las concentraciones de moléculas fluorescentes dentro de compartimentos pequeños dentro de una célula, ya que en estos casos la fluorescencia tiende a difundirse fuera de la estructura.
- En estos casos, la cuantificación puede llevarse a cabo calibrando la distribución de la intensidad de la fluorescencia, con un modelo computacional para células u organelos que han sido enmascarados por convolución con PSF.



- Este estudio desarrolló un método para medir el potencial de membrana, basado en el principio utilizado por el microscopio confocal para medir las concentraciones del colorante o fluorescencia emitida por ciertas moléculas dentro de una célula.
- La idea es dejar la membrana permeable para que cationes fluorescentes se equilibren a través de la membrana celular.
- El equilibrio es regido por la ecuación de Nernst para que la proporción de la concentración del colorante entre el citosol y el EEC pueda ser usado para calcular el potencial de membrana

# Materiales y métodos



- Cultivo celular:

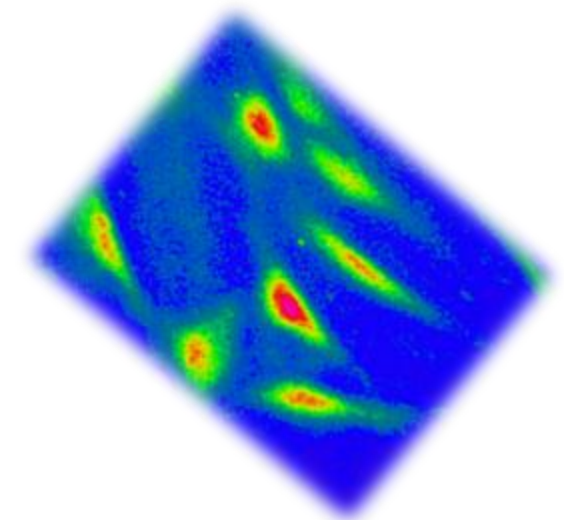
- **Células NIE 115** (*DMEM - 10% de SBF - 1% de antimicóticos a 37°C con 5% de CO2*).
- La diferenciación fue inducida disminuyendo los niveles de SBF y agregando 1% de DMSO.
- **Células NIH 3T3** (*DMEM - 10% de SCF y se redujo la concentración de suero 48h antes de microscopia*).

- *Inmunolocalización:*

- Fijación, permeabilización , bloqueo
- Ac 1°: Anti receptor de bradiquinina B2 (r), Anti receptor InsP3 (r)
- Ac 2°: anti rabbit Rodamina (568nm- 630nm)
- El análisis de los cortes generados en 3D se llevó a cabo con el software VoxelView

- *Imagen con Fura 2:*

- Células NIE 115: 5uM de fura-2 y 0,025% de pluronic F127 y 10 uM de ionomicina
- (364nm – 515 a 560nm)
- Se utilizaron varias concentraciones de fura 2 para calibrar las muestras.



- Imagen con TMRE:
  - Se incubaron las células 3T3 TMRE (para medir el potencial de membrana)
- Generación de la función de dispersión del punto (PSF):
  - Tras una serie de enfoques se obtuvo la región de interés y se calculó la PSF luego de ajustar todos los parámetros necesarios para Fura-2, Anti InsP3, Anti BK2.
- Convolución del modelo con PSF:
  - Cada punto en el resultado de la convolución es el producto de la PSF normalizada.
  - Los datos del modelo se rellenan con valores cero alrededor de todos los bordes (x, y, z) para visualizar el efecto del PSF en los datos "fuera de foco".

# Estimación de las concentraciones de fura-2 en una célula viva

a.



1  $\mu\text{m}$   
above coverslip



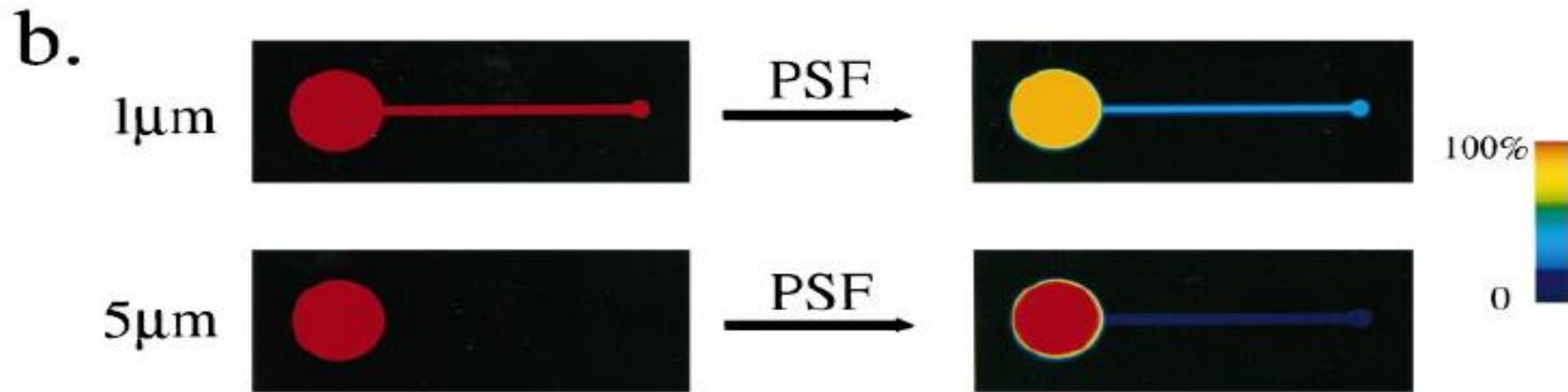
5  $\mu\text{m}$   
above coverslip



10  $\mu\text{m}$   
above coverslip

— 45  $\mu\text{m}$

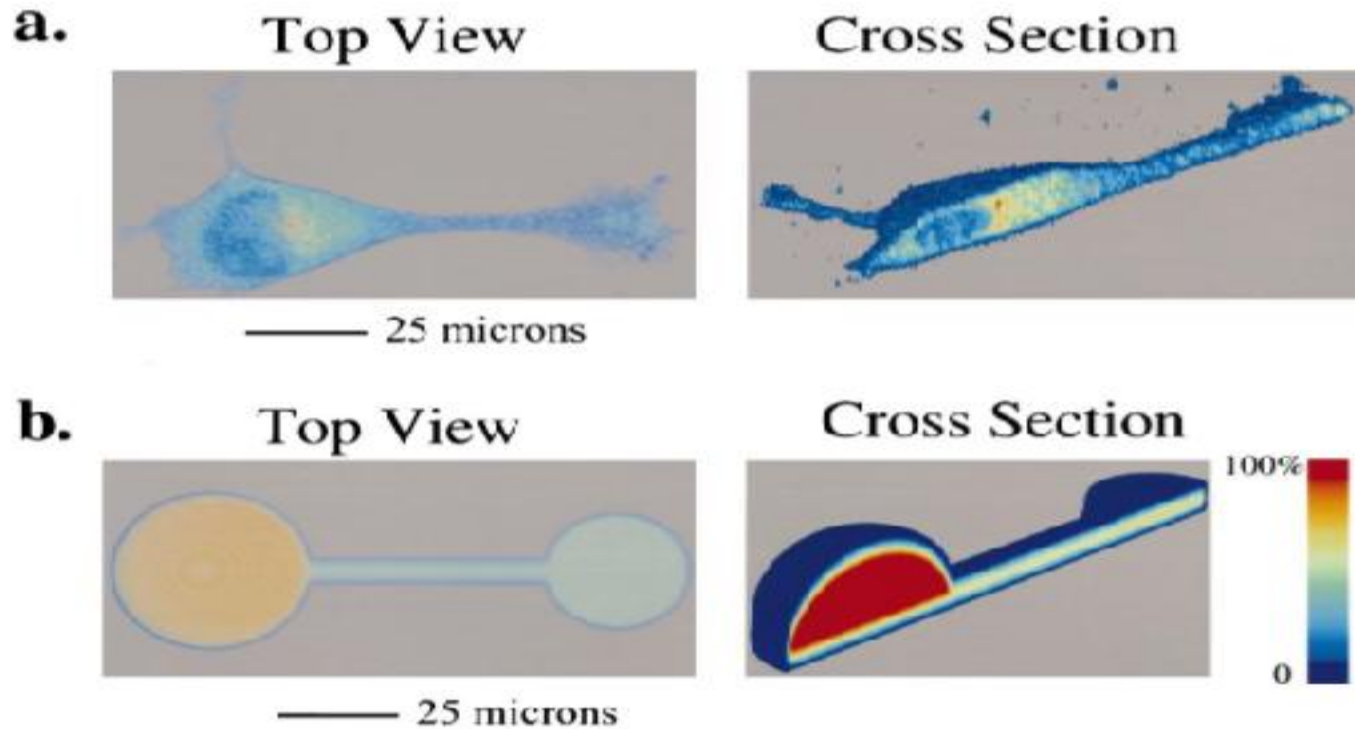
- Aplicación de microscopía confocal: Medición de la concentración de Fura-2 en una célula neuronal.
- Las células NIE 115 fueron cargadas con fura-2 y se realizaron una serie de cortes en z.



- Como el soma neuronal es de mayor grosor, no sufre ningún efecto de dispersión.
- Forma hemisférica: representa el soma
- Forma cilíndrica: representa la neurita o axón
- Forma de disco: Representa el cono de crecimiento
- Las dimensiones fueron determinadas dentro del plano xy y luego fue convolucionado con un PSF sobre las mismas condiciones ópticas utilizadas en la imagen anterior



# Distribución de una proteína asociada al retículo endoplásmico en una célula neuronal



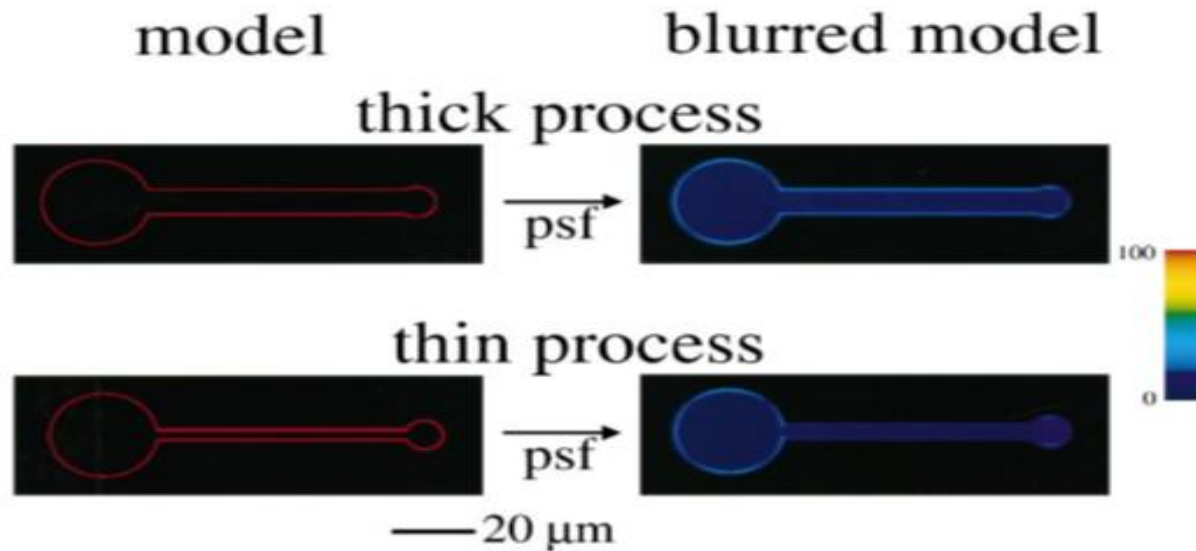
- a) células de neuroblastoma teñidas con anti receptor de *InsP3*.
- Una serie de z fueron tomados con el objetivo 60x y fueron analizados con el software voxelview.

*Se construyó un modelo representativo en base a las dimensiones de la célula en A. En b los resultados de una convolución con PSF.*

*muestra el volumen de un modelo celular, donde hay una menor intensidad de fluorescencia en las neuritas en comparación al soma.*

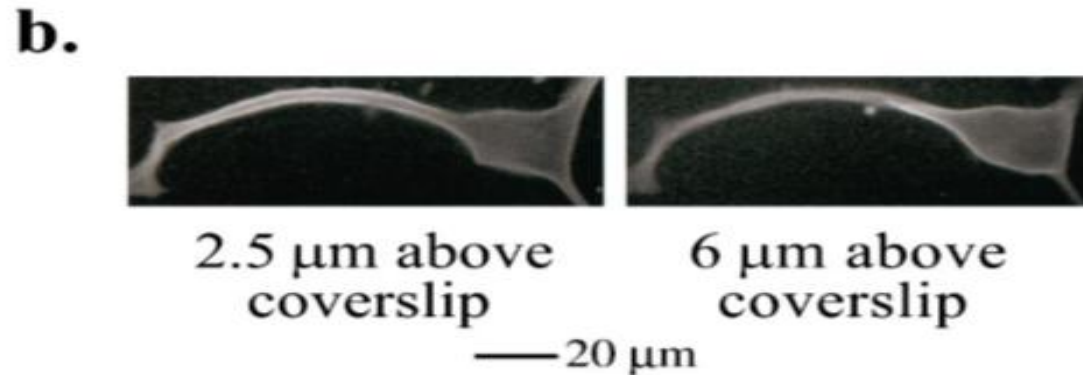
# Patrones de fluorescencia para una molécula de la superficie celular

a.



- Los modelos representan las características geométricas esenciales de una célula neuronal.
- En ambos casos, la fluorescencia de la membrana está considerablemente disminuida por la convolución.
- Lo importante es ver si la fluorescencia permanece proporcional en las 3 regiones de la célula

## Secciones ópticas de una célula marcada con un anticuerpo contra el receptor de bradiquinina



- El modelo anterior se basó en las características generales geométricas de esta célula, y la PSF utilizada para suavizar el modelo se obtuvo con la misma configuración óptica utilizada para las imágenes en esta figura. La interpretación más simple es que en promedio hay una mayor densidad de receptores de la bradiquinina sobre la superficie de la neurita en comparación con el soma.

# Potencial de membrana de una mitocondria dentro de una célula viva



A partir de una mitocondria se generó una “voxelized version” de un cilindro en la resolución de la PSF.

La PSF es una imagen fluorescente en 3D añadida al mismo cubreobjetos que sostiene las Células NIH 3T3.

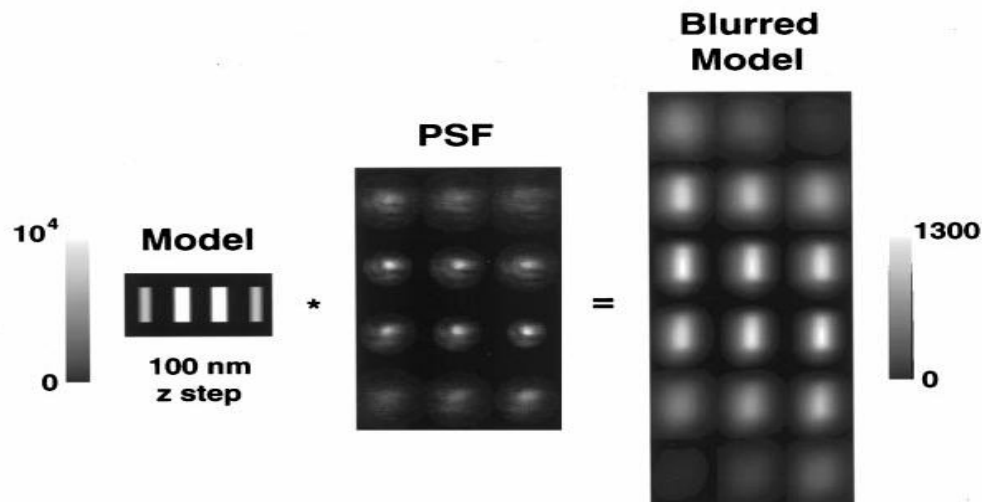
La intensidad en el modelo original posee arbitrariamente 10.000 unidades.

Después de la convolución con el PSF, se muestra el modelo borroso, poco nítido con una intensidad máxima de 1300 unidades.

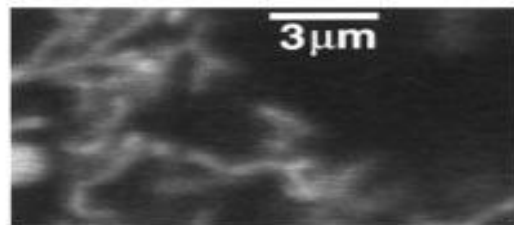
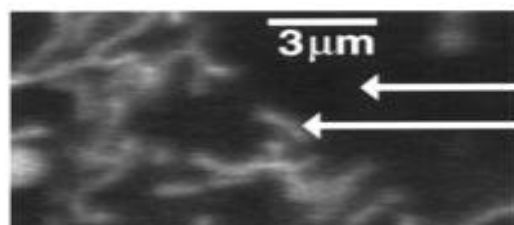
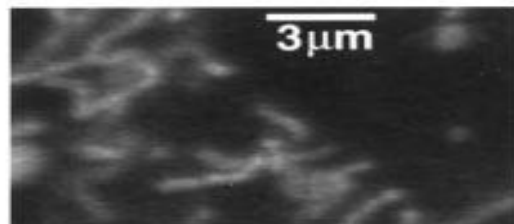
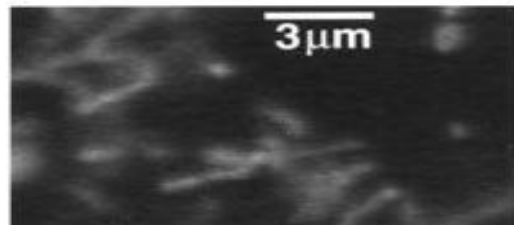
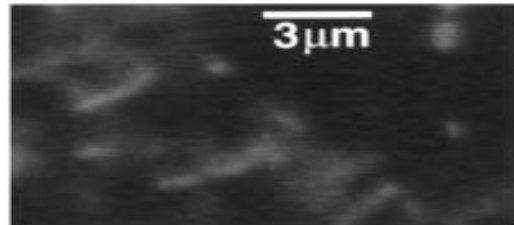
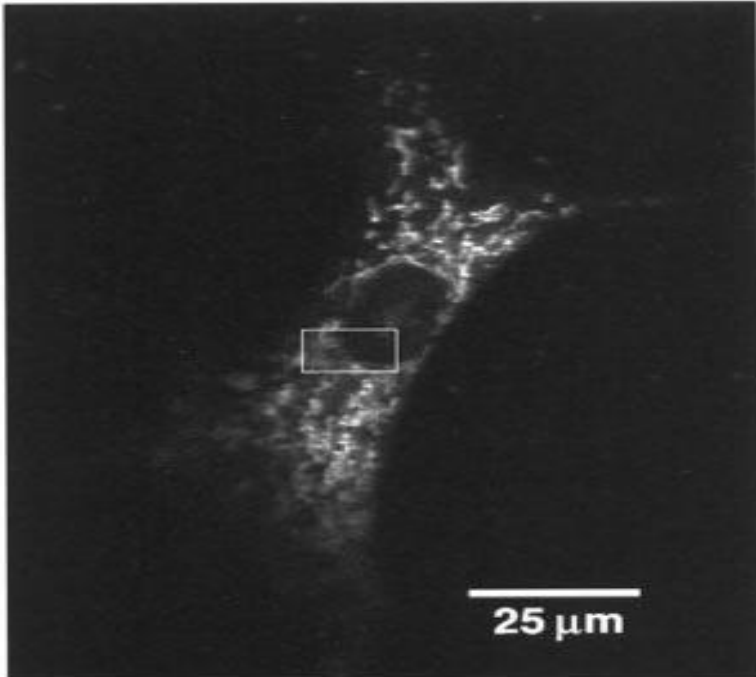
La relación de la intensidad original con el máximo de la intensidad borrosa, proporciona un factor de 7,6 que se utiliza para corregir la intensidad mitocondrial.

b.

**NIH 3T3 Cell  
Model Mitochondrion**



# Membrane Potential of Mitochondria in NIH 3T3 Cell



↓ 0.3 μm steps

5 = F<sub>cyt</sub>  
155 = F<sub>mit</sub>

- Es importante determinar con precisión la intensidad máxima dentro de la mitocondria en tres dimensiones, por lo que se debe tomar un buen número de planos para asegurarse de que la mitocondria está correctamente entre corchetes dentro del volumen.
- Se muestra un cálculo del potencial de membrana de una mitocondria típica, usando el factor de calibración generado a partir del modelo de la figura borrosa.

$$V_{mit} = -60 \log \left( \frac{7.6 * 155}{5} \right) = -143 \text{ mV}$$

- Es importante determinar con precisión la intensidad máxima dentro de la mitocondria en tres dimensiones, por lo que se debe tomar un número de planos para asegurarse de que la mitocondria está correctamente entre corchetes dentro del volumen.



# Discusión

- En este estudio, el modelo de mitocondria en 3D, primero fue borroso con el PSF del microscopio de amplio espectro.
- Este modelo se agregó a la imagen real y fue artificialmente insertado en el centro de la neurita y así tuvo el efecto de la introducción de características de ruido.
- Esta imagen sintética, luego fue restaurada por deconvolución contra el PSF experimental y la intensidad de la fluorescencia resultante se relaciona con un modelo sin fondo para generar una calibración.

- Sin embargo, los potenciales de membrana son cercanos a los obtenidos en las células de neuroblastoma
- Sobre esta base, se podría esperar que tales correcciones se puedan aplicar directamente a imágenes de amplio espectro sin la necesidad de recurrir a la deconvolución o la microscopía confocal.

- Una extensión más cuantitativa de la técnica general podría realizarse mediante el desarrollo de un algoritmo para generar modelos precisos uniformemente rellenos basados directamente en las imágenes experimentales de células u orgánulos subcelulares. Esto haría posible la generación de imágenes de proporción de una imagen y el modelo experimental borrosa correspondiente para determinar cuantitativamente la distribución espacial del marcador fluorescente.

- Gracias...