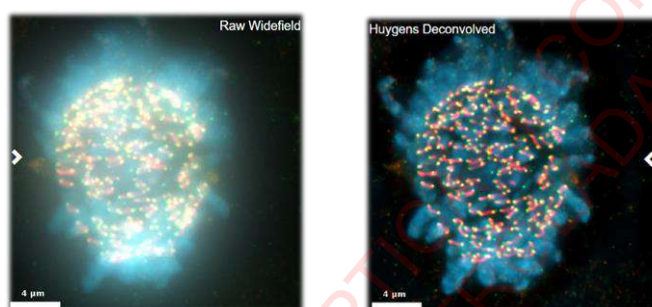


## Guía de Deconvolución con Huygens Profesional

### - ¿Qué es la Deconvolución?

La Deconvolución es una técnica computacional que se aplica en las imágenes para compensar las limitaciones ópticas del sistema empleado en su adquisición al reducir el efecto borroso de fuera de foco. El uso de los diferentes algoritmos de Deconvolución es particularmente efectivo en el procesamiento de datos obtenidos en Microscopía de Campo Ancho (*Widefield*), Microscopía Confocal de barrido por láser (LSM), Microscopía Confocal de Disco rotatorio (*Spinning Disk*) y Microscopía de Súper-resolución ...

*"A Practical Guide to Deconvolution of Fluorescence Microscope Imagery". David S.C. Biggs*



### - Aspectos clave a tener en cuenta en la adquisición de imágenes:

1. El tamaño de pixel debe cumplir el criterio de Nyquist
2. Evitar píxeles saturados
3. Optimizar la relación Señal/Ruido (S/R)
4. Adquirir un mínimo de 3 planos Z

Equipo	Guardar las imágenes en el siguiente formato:
Confocales Zeiss LSM510 y LSM710	<b>Formato .lsm</b>
Confocales Zeiss LSM800 y LSM900	<b>Formato .czi</b>
Confocal NikonA1R <i>in vivo</i>	<b>Formato .nd2</b> ; y guardar el <b>archivo .xml</b> con la información de adquisición
Confocal Olympus SpinSR10	<b>Formato .vsi</b> ; y guardar la <b>carpeta que contiene el fichero ".ets"</b> ( <i>metadatos</i> )
Confocal Leica Stellaris 8 STED+FLIM	<b>Formato .lif</b>
Microscopios <i>Widefield</i> Zeiss (sCMOS y F.R.E.T.)	<b>Formato .stk</b>

### - Para más información:

- Podéis encontrar más información sobre el programa "*Huygens*" de deconvolución en el siguiente enlace:

<https://svi.nl/Huygens-Deconvolution>

- Para más información sobre las posibilidades de este programa podéis visitar el siguiente enlace:

<https://svi.nl/FAQ>

## Cómo calcular el tamaño del pixel de las imágenes para deconvolucionar

A la hora de adquirir imágenes usando un microscopio y guardarlas, lo ideal es alcanzar una densidad de muestreo ("sampling") que satisfaga el criterio de Nyquist.

Para ello, **Huygens (Scientific Volume Imaging)** dispone de una calculadora online:

<https://svi.nl/NyquistCalculator>

### Nyquist rate and PSF calculator

Microscope type: Confocal Tipo de microscopio (Widefield, Confocal, STED...)

Numerical aperture: 1,3 Apertura Numérica del Objetivo (A.N.)

Excitation wavelength: 488 nm Longitudes de onda de Excitación y Emisión

Emission wavelength: 520 nm

Number of excitation photons: 1 Numero de fotones de excitación:  
1 Para los microscopios de campo ancho, confocales de escaneo por láser (LSM) y disco rotatorio (SDCM)  
2 Para Microscopios de 2 fotones (multifotón)

Lens immersion refractive index: Oil 1,515 Índice de refracción del medio de inmersión

☐ Calculate a Point Spread Function

**Calculate**

**Results**

This is the parameter list used in this calculation:

Parameter	Value
Microscope type	Confocal
Numerical aperture	1.3
Excitation wavelength	402
Emission wavelength	450
Number of excitation photons	1
Lens immersion refractive index	1.515

The optical axis lays along z. Your Nyquist sampling is:

x: 38 nm      Tamaño de pixel recomendado (XY)  
y: 38 nm  
z: 136 nm      Tamaño recomendado de step para Z-Stacks

— Set your zooms and scanning steps so that each pixel covers a x-y area of 38 nm x 38 nm (or smaller)  
— Calibrate and set your z-stopper so that it takes steps of 136 nm when acquiring a 3D stack (or smaller)

Dependiendo de los valores obtenidos (X, Y, Z), se deberán ajustar los distintos parámetros (zoom, z-stack step size...) para cumplir estos requisitos.

### IMPORTANTE

Cuando se adquieren imágenes en microscopios confocales usando un valor de **pinhole de 1 Unidad de Airy (AU)** los **tamaños laterales (XY)** obtenidos en la calculadora, y los que figuran en las siguientes tablas, pueden **incrementarse hasta 1.6 veces** sin perjuicio en la calidad de la Deconvolución.

En los casos en los que se usen valores de **pinhole pequeños (< 0.5 AU)**, estos tamaños pueden **incrementarse hasta 1.3 veces**; y en el caso de usar **pinhole grandes (> 4 AU)**, estos tamaños pueden **incrementarse hasta 2**

## DECONVOLUCIÓN DE IMÁGENES STED

A la hora de adquirir imágenes de Súper-resolución (STED), se usarán los objetivos 86X y/o 100X.

Para realizar una correcta Deconvolución de las imágenes adquiridas, usaremos la calculadora online de SVI Huygens online para obtener los tamaños recomendados de pixel (XY) y Z-step con los que adquiriremos nuestras imágenes.

<https://svi.nl/NyquistCalculator>

### Nyquist rate and PSF calculator

Microscope type	STED	
Numerical aperture	1,3	Apertura numérica del objetivo: <b>1.2</b> (obj. 86X) o <b>1.4</b> (obj. 100X)
Excitation wavelength	488 nm	Longitudes de onda de excitación y del pico de emisión del fluoróforo
Emission wavelength	520 nm	
Number of excitation photons	1	
Lens immersion refractive index	Oil 1,515	Medio de inmersión Agua ( <b>Water</b> ) (86X) o Aceite ( <b>Oil</b> ) (100X)
Backprojected pinhole radius	250 nm	Valor del <i>Backprojected pinhole</i> del objetivo
STED Depletion wavelength	775 nm	Longitud de onda del Láser de depleción ( <b>775 nm</b> )
STED 3x percentage	0	Porcentaje utilizado en depleción z (axial) ( <b>STED 3D</b> )
STED Saturation factor	30,0	Porcentaje de potencia del láser de depleción STED

☐ Calculate a [Point Spread Function](#)

A true Nyquist rate does not exist for STED. Instead, we calculate a sampling rate that is both practical and high enough to capture all information realistically available.

Calculate

### ¿Cómo calcular el valor de Backprojected Pinhole?

Para calcular el *Backprojected Pinhole* usaremos la calculadora online disponible en el siguiente link:

[https://svi.nl/LeicaConfocal\\_TCS\\_SP8](https://svi.nl/LeicaConfocal_TCS_SP8)

#### (1) En caso de ajustar el *Pinhole* en términos de *Airy Units (AU)*

En este caso, hay que tener en cuenta que Leica presenta el valor de Pinhole en referencia a la línea de excitación 580 nm; de tal forma que cuando se ajusten el valor de las AU a nuestro canal de referencia tendremos que ver cuál es el valor para la longitud 580 nm; junto con la apertura numérica del objetivo utilizado.

Number of Airy disks	
Lens numerical aperture	1.3
Calculate	

#### (2) En caso de ajustar el *Pinhole* en términos de micras (µm)

En este caso, seleccionaremos en el programa LAS X visualizar el Pinhole como micras (µm), y apuntaremos ese valor junto al objetivo.

Pinhole size (microns)	
Objective magnification	100
Calculate	

## Objetivos y Aperturas Numéricas (A.N.) disponibles en el SMOC

### - CONFOCALES ZEISS

LSM510 vertical & LSM710 (Invertido y Vertical)

Objetivo (Medio de Inmersión)	Apertura Numérica (A.N.)
25X (Aceite)	0.8
40X (Aceite)	1.3
63X (Aceite)	1.4
100X (Aceite)	1.4
63X (Agua) <i>Exclusivo LSM710 Invertido</i>	1.2
100X (Aceite) <i>Exclusivo LSM510 vertical</i>	1.3

LSM800 Invertido y LSM900 Vertical

Objetivo (Medio de Inmersión)	Apertura Numérica (A.N.)
20X (Aire)	0.8
25X (Aceite)	0.8
40X (Aceite)	1.3
63X (Aceite)	1.4
100X (Aceite)	1.4
63X (Agua) <i>Exclusivo LSM800 Invertido</i>	1.2

### - OLYMPUS SPINSR10 CONFOCAL

Objetivo (Medio de Inmersión)	Apertura Numérica (A.N.)
10X (Aire)	0.4
20X (Aire)	0.8
30X (Silicona)	1.05
40X (Aire)	0.95
40X (Silicona)	1.25
60X (Silicona)	1.3
100X (Aceite)	1.45

Objetivo	Disco 50 µm + Lente 1X		Disco SoRa + Lente 1X		Disco SoRa + Lente 3.2X	
	<i>Backprojected Pinhole (nm)</i>	<i>Pinhole Spacing (µm)</i>	<i>Backprojected Pinhole (nm)</i>	<i>Pinhole Spacing (µm)</i>	<i>Backprojected Pinhole (nm)</i>	<i>Pinhole Spacing (µm)</i>
10X	2500	25.3	1250	12.7	390.63	3.95
20X	1250	12.7	625	6.4	195.31	1.98
40X	625	6.33	313	3.17	97.66	0.99
60X	416.7	4.22	208.4	2.11	65.11	0.66
100X	250	2.53	125	1.27	39.06	0.40

#### **IMPORTANTE A LA HORA DE DECONVOLUCIONAR IMAGENES ADQUIRIDAS CON EL SPINNING DISK**

Al deconvolucionar imágenes del Spinning Disk, deberemos tener en cuenta qué combinación de **disco (50 µm o SoRa)** y **lente de aumento (1X o 3,2X)** se usó para adquirir las imágenes, ya que los valores de *Backprojected Pinhole* y de *Pinhole Spacing* varían según la combinación seleccionada.

Asimismo, deberemos comprobar si las longitudes de onda de excitación coinciden con los canales que queremos deconvolucionar (**405: BFP, DAPI, Hoechst**; **488: Alexa 488, FITC, GFP**; **561: Alexa 555, Alexa 594, Rodamina, TexasRed, TRITC**; **640: Alexa647, Cy5, To-Pro3**)

En la ventana "Microscopic Parameters" comprobaremos si los valores mostrados concuerdan con la combinación que se utilizó en la adquisición de la imagen.

- **CONFOCAL NIKON A1R IN VIVO**

Objetivo (Medio de Inmersión)	Apertura Numérica (A.N)
20X (Aire)	0.75
20X (Aceite)	0.75
40X (Aceite)	1.3
60X (Aceite)	1.4
60X (Agua)	1.2

- **CONFOCAL LEICA STELLARIS 8 STED+FLIM**

Objetivo (Medio de Inmersión)	Apertura Numérica (A.N)
20X (Aire)	0.75
40X (Aceite)	1.3
63X (Aceite)	1.4
86X (Agua)	1.2
100X (Aceite)	1.4

- **MICROSCOPIOS DE CAMPO ANCHO (WIDEFIELD): F.R.E.T. y sCMOS (ZEISS)**

FRET		sCMOS	
Objetivo (Medio de Inmersión)	Apertura Numérica (A.N.)	Objetivo (Medio de Inmersión)	Apertura Numérica (A.N.)
10X (Aire)	0.45	10X (Aire)	0.3
20X (Aire)	0.8	20X (Aceite)	0.5
25X (Aceite)	0.8	25X (Aceite)	0.8
40X (Aceite)	1.3	40X (Aceite)	1.3
63X (Aceite)	1.4	63X (Aceite)	1.4
100X (Aceite)	1.3	100X (Aceite)	1.3
40X LD (Aire)	0.6	40X LD (Aire)	0.6