

DECONVOLUCIÓN / DECONVOLUTION

- Podéis encontrar información completa sobre el programa de deconvolución “Huygens” (S.V.I.) en la siguiente página Web:
(*You can find complete information about the deconvolution program "Huygens" (S.V.I.) on the following website*)

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

- En caso de querer realizar cálculos para otras configuraciones distintas a la de las siguientes tablas, acudir a la siguiente página Web:
(*If you want to perform calculations for configurations other than the one in the following tables, go to the following website*)

<https://svi.nl/OnLineTools>

- Para más detalles sobre las posibilidades de este programa:
(*For more details on the possibilities of this program*)

<https://svi.nl/FAQ>

“Exceptions in practice

While sampling at the Nyquist rate is a very good idea, it is in many practical situations hard to attain. In these cases larger sampling distances may be used and a good job can still be done when [deconvolving](#) these images. For [Confocal Microscope](#) images, sampling distances may be up to 1.7 times the Nyquist ones. When large [pinholes](#) are used, up to 2 times larger even. [Widefield microscopy](#) data is more sensitive to undersampling, so it is better to stay below a factor of 1.5. In case of low [Numerical Apertures](#), like 0.4, we recommend not to undersample in the axial direction.

Hint: If you have a data stack that is dramatically undersampled in Z (not fulfilling the [Nyquist Criterion](#) by a large factor) it is better to interpret the different planes as independent images (i.e. as 2D images) and do 2D deconvolution in the Huygens Software planewise. See [Convert the Data Set](#).

You can use the PSF calculator option in the form to see the expected size of the PSF of your imaging setup and accordingly, of a distilled [Experimental PSF](#) from [bead images](#).”

Puntos clave a tener en cuenta:



Confocal Nikon A1R+ *in vivo*

- ✓ Guardad las imágenes en **formato .nd2** y el **archivo con la información de adquisición de la imagen**.
- ✓ Posteriormente en *Huygens* tendréis que introducir a mano los valores del “**back projected pinhole**” que se calcula a partir de la apertura física (**en micras**) del pinhole, en la siguiente dirección:

https://svi.nl/Nikon_TiE_A1R

Confocal Olympus SpinSR10

- ✓ Guardad las imágenes en **formato .vsi** y guardar también **la carpeta con los metadatos**

Confocales Zeiss LSM510 & LSM710

- ✓ Guardad las imágenes en **formato .lsm**

Confocal Zeiss LSM800

- ✓ Guardad las imágenes en **formato .dzi**
- ✓ Posteriormente en *Huygens* tendréis que introducir el valor de excitación y emisión de cada canal

Microscopios “WideField” Zeiss

- ✓ Guardad las imágenes en **formato .stk**

Key Points to take into account:



Nikon A1R+ in vivo Confocal

- ✓ Save the images in **.nd2 format** and the **file with the image acquisition information**
- ✓ Later in Huygens you will have to enter by hand the values of the "**back projected pinhole**" that is calculated from the physical opening (**in microns**) of the pinhole, in the following web page:

[https://svi.nl/Nikon TiE A1R](https://svi.nl/Nikon_TiE_A1R)

Olympus SpinSR10 Confocal

- ✓ Save the images in **.vsi format** and also **save the metadata folder**

LSM510 & LSM710 Zeiss Confocals

- ✓ Save the images in **.lsm format**

LSM800 Zeiss Confocal

- ✓ Save the images in **.dzi format**
- ✓ Later in Huygens you will have to enter the excitation and emission value of each channel

"WideField" Zeiss Microscopes

- ✓ Save the images in **.stk format**

Nikon A1R+ in vivo (NIKON)

- ✓ Guardad las imágenes en **formato .nd2** y el **archivo con la información de adquisición de la imagen**.
- ✓ Posteriormente en Huygens tendréis que introducir a mano los valores del “back projected pinhole” que se calcula a partir de la apertura física (**en micras**) del pinhole, en la siguiente dirección: https://svi.nl/Nikon_TiE_A1R
- ✓ *Save the images in .nd2 format and the file with the image acquisition information*
- ✓ *Later in Huygens you will have to enter by hand the values of the "back projected pinhole" that is calculated from the physical opening (in microns) of the pinhole, in the following web page: https://svi.nl/Nikon_TiE_A1R*

Objetivo (Apertura Numérica) Objective (Numerical Aperture)	Fluoróforo / Fluorophore	λ Ex (nm)	λ Em (nm)	Pinhole (AU)	Pixel XY (nm)	Step Z (nm)
20X (0.75) (Aire / Air)	DAPI	402	450	1	67	296
	CFP	442	482	1	73	326
	GFP/ Alexa 488	488	525	1	81	330
	YFP	514	540	1	85	379
	Alexa 546/555/594	561	595	1	93	414
	To-Pro3/ Cy5/ Alexa647	640	700	1	106	472
20X (0.75) (Aceite / Oil)	DAPI	402	450	1	67	505
	CFP	442	482	1	73	556
	GFP/ Alexa 488	488	525	1	81	614
	YFP	514	540	1	85	646
	Alexa 546/555/594	561	595	1	93	705
	To-Pro3/ Cy5/ Alexa647	640	700	1	106	805

Nikon A1R+ in vivo (NIKON)

Objetivo (Apertura Numérica) <i>Objective (Numerical Aperture)</i>	Fluoróforo / Fluorophore	λ Ex (nm)	λ Em (nm)	Pinhole (AU)	Pixel XY (nm)	Step Z (nm)
40X (1.3) <i>(Aceite / Oil)</i>	DAPI	402	450	1	38	136
	CFP	442	482	1	42	149
	GFP/ Alexa 488	488	525	1	46	135
	YFP	514	540	1	49	174
	Alexa 546/555/594	561	595	1	53	190
	To-Pro3/ Cy5/ Alexa647	640	700	1	61	217
60X (1.4) <i>(Aceite / Oil)</i>	DAPI	402	450	1	35	107
	CFP	442	482	1	39	118
	GFP/ Alexa 488	488	525	1	43	130
	YFP	514	540	1	45	137
	Alexa 546/555/594	561	595	1	50	149
	To-Pro3/ Cy5/ Alexa647	640	700	1	57	170
60X (1.2) <i>(Agua / Water)</i>	DAPI	402	450	1	41	134
	CFP	442	482	1	46	148
	GFP/ Alexa 488	488	525	1	52	163
	YFP	514	540	1	53	172
	Alexa 546/555/594	561	595	1	58	187
	To-Pro3/ Cy5/ Alexa647	640	700	1	66	214

Olympus SpinSR10 (OLYMPUS)

✓ Guardad las imágenes en **formato .vsi** y guardar también **la carpeta de con los metadatos**

✓ *Save the images in .vsi format and also save the metadata folder*

Objetivo (Apertura Numérica) Objective (Numerical Aperture)	Fluoróforo / Fluorophore	λ Ex (nm)	λ Em (nm)	Pinhole (AU)	Pixel XY (nm)
30X (1.05) (Silicona / Silicone)	DAPI	405	447	48	214
	GFP/ Alexa 488	488	525	58	259
	Alexa 555/Alexa594/ Rodamina/Texas-Red	561	617	66	297
	To-Pro3/Cy5/Alexa647	640	685	76	339
40X (1.25) (Silicona / Silicone)	DAPI	405	447	40	132
	GFP/ Alexa 488	488	525	48	160
	Alexa 555/Alexa594/ Rodamina/Texas-Red	561	617	56	183
	To-Pro3/Cy5/Alexa647	640	685	64	209
60X (1.3) (Silicona / Silicone)	DAPI	405	447	38	116
	GFP/ Alexa 488	488	525	46	140
	Alexa 555/Alexa594/ Rodamina/Texas-Red	561	617	53	161
	To-Pro3/Cy5/Alexa647	640	685	61	183
100X (1.45) (Aceite / Oil)	DAPI	405	447	34	94
	GFP/ Alexa 488	488	525	42	114
	Alexa 555/Alexa594/ Rodamina/Texas-Red	561	617	48	131
	To-Pro3/Cy5/Alexa647	640	685	55	149

LSM510 Vertical / Upright (ZEISS)

✓ Guardad las imágenes en **formato .lsm** / Save the images in **.lsm format**

Objetivo (Apertura Numérica) <i>Objective (Numerical Aperture)</i>	Fluoróforo / <i>Fluorophore</i>	λ Ex (nm)	λ Em (nm)	Pinhole (AU)	Pixel XY (nm)	Step Z (nm)
25X (0.8) <i>(Aceite / Oil)</i>	CFP	458	480	0,8	71	501
	GFP/ Alexa 488	488	525	0,8	76	534
	YFP	514	535	0,8	80	562
	Alexa 555/Alexa594/ Rodamina/Texas-Red	543	580	0,8	84	594
	To-Pro3/ Cy5/ Alexa647	633	660	0,8	98	692
40X (1.3) <i>(Aceite / Oil)</i>	CFP	458	480	0,8	44	155
	GFP/ Alexa 488	488	525	0,8	46	165
	YFP	514	535	0,8	49	174
	Alexa 555/Alexa594/ Rodamina/Texas-Red	543	580	0,8	52	184
	To-Pro3/ Cy5/ Alexa647	633	660	0,8	60	214
63X (1,4) <i>(Oil)</i>	CFP	458	480	0,8	40	122
	GFP/ Alexa 488	488	525	0,8	43	130
	YFP	514	535	0,8	45	137
	Alexa 555/Alexa594/ Rodamina/Texas-Red	543	580	0,8	48	145
	To-Pro3/ Cy5/ Alexa647	633	660	0,8	56	169
100X (1,3) <i>(Oil)</i>	CFP	458	480	0,8	44	155
	GFP/ Alexa 488	488	525	0,8	46	165
	YFP	514	535	0,8	49	174
	Alexa 555/Alexa594/ Rodamina/Texas-Red	543	580	0,8	52	184

LSM710 Invertido / Inverted (ZEISS)

✓ Guardad las imágenes en **formato .lsm** / *Save the images in .lsm format*

Objetivo (Apertura Numérica) <i>Objective (Numerical Aperture)</i>	Fluoróforo / <i>Fluorophore</i>	λ Ex (nm)	λ Em (nm)	Pinhole (AU)	Pixel XY (nm)	Step Z (nm)
25X (0.8) <i>(Aceite / Oil)</i>	DAPI	405	461	0,8	61	443
	CFP	458	480	0,8	71	501
	GFP/ Alexa 488	488	525	0,8	76	534
	YFP	514	535	0,8	80	562
	Alexa 555/Alexa594/ Rodamina/Texas-Red	561	580	0,8	87	613
	To-Pro3/ Cy5/ Alexa647	633	660	0,8	98	692
40X (1.3) <i>(Aceite / Oil)</i>	DAPI	405	461	0,8	38	137
	CFP	458	480	0,8	44	155
	GFP/ Alexa 488	488	525	0,8	46	165
	YFP	514	535	0,8	49	174
	Alexa 555/Alexa594/ Rodamina/Texas-Red	561	580	0,8	53	190
	To-Pro3/ Cy5/ Alexa647	633	660	0,8	60	214
63X (1.2) <i>(Agua / Water)</i>	DAPI	405	461	0,8	42	135
	CFP	458	480	0,8	47	153
	GFP/ Alexa 488	488	525	0,8	50	163
	YFP	514	535	0,8	53	172
	Alexa 555/Alexa594/ Rodamina/Texas-Red	561	580	0,8	58	187
	To-Pro3/ Cy5/ Alexa647	637	660	0,8	66	213

LSM710 Invertido / Inverted (ZEISS)

Objetivo (Apertura Numérica) <i>Objective (Numerical Aperture)</i>	Fluoróforo / <i>Fluorophore</i>	λ Ex (nm)	λ Em (nm)	Pinhole (AU)	Pixel XY (nm)	Step Z (nm)
63X (1.4) <i>(Aceite / Oil)</i>	DAPI	405	461	0,8	36	108
	CFP	458	480	0,8	40	122
	GFP/Alexa 488	488	525	0,8	43	130
	YFP	514	535	0,8	45	137
	Alexa 555/Alexa594/ Rodamina/Texas-Red	561	580	0,8	50	149
	To-Pro3/Cy5/Alexa647	633	660	0,8	56	169
100X (1.4) <i>(Aceite / Oil)</i>	DAPI	405	461	0,8	36	108
	CFP	458	480	0,8	40	122
	GFP/Alexa 488	488	525	0,8	43	130
	YFP	514	535	0,8	45	137
	Alexa 555/Alexa594/ Rodamina/Texas-Red	561	580	0,8	50	149
	To-Pro3/Cy5/Alexa647	637	660	0,8	56	169

LSM710 Vertical / Upright (ZEISS)

- ✓ Guardad las imágenes en **formato .lsm**
- ✓ Save the images in **.lsm format**

Objetivo (Apertura Numérica) <i>Objective (Numerical Aperture)</i>	Fluoróforo / <i>Fluorophore</i>	λ Ex (nm)	λ Em (nm)	Pinhole (AU)	Pixel XY (nm)	Step Z (nm)
25X (0.8) <i>(Aceite / Oil)</i>	DAPI	405	461	0,8	61	443
	CFP	458	480	0,8	71	501
	GFP/ Alexa 488	488	525	0,8	76	534
	YFP	514	535	0,8	80	562
	Alexa 555/Alexa594/ Rodamina/Texas-Red	543	580	0,8	84	594
	To-Pro3/ Cy5/ Alexa647	633	660	0,8	98	692
40X (1.3) <i>(Aceite / Oil)</i>	DAPI	405	461	0,8	38	137
	CFP	458	480	0,8	44	155
	GFP/ Alexa 488	488	525	0,8	46	165
	YFP	514	535	0,8	49	174
	Alexa 555/Alexa594/ Rodamina/Texas-Red	543	580	0,8	52	184
	To-Pro3/ Cy5/ Alexa647	633	660	0,8	61	214

LSM710 Vertical / Upright (ZEISS)

Objetivo (Apertura Numérica) Objective (Numerical Aperture)	Fluoróforo / Fluorophore	λ Ex (nm)	λ Em (nm)	Pinhole (AU)	Pixel XY (nm)	Step Z (nm)
63X (1.4) (Aceite / Oil)	DAPI	405	461	0,8	36	108
	CFP	458	480	0,8	40	122
	GFP/ Alexa 488	488	525	0,8	43	130
	YFP	514	535	0,8	45	137
	Alexa 555/Alexa594/ Rodamina/Texas-Red	543	580	0,8	48	145
	To-Pro3/ Cy5/ Alexa647	633	660	0,8	56	169
100X (1.4) (Aceite / Oil)	DAPI	405	461	0,8	36	108
	CFP	458	480	0,8	40	122
	GFP/ Alexa 488	488	525	0,8	43	130
	YFP	514	535	0,8	45	137
	Alexa 555/Alexa594/ Rodamina/Texas-Red	543	580	0,8	48	145
	To-Pro3/ Cy5/ Alexa647	637	660	0,8	56	169

SERVICIO DE MICROSCOPÍA Y CONTROLADA Y CONFOCAL (SMOC)

LSM800 Invertido / Inverted (ZEISS)

- ✓ Guardad las imágenes en **formato .dzi**
- ✓ Posteriormente en Huygens tendréis que introducir el valor de excitación y emisión de cada canal.
- ✓ Save the images in **.dzi format**
- ✓ Later in Huygens you will have to enter the excitation and emission value of each channel

Objetivo (Apertura Numérica) <i>Objetive (Numerical Aperture)</i>	Fluoróforo / Fluorophore	λ Ex (nm)	λ Em (nm)	Pinhole (AU)	Pixel XY (nm)	Step Z (nm)
20X (0,8) (Air)	Dapi	405	461	0,8	63	253
	GFP/ Alexa 488	488	525	0,8	76	305
	Alexa 555/Alexa594/ Rodamina/Texas-Red	561	620	0,8	87	350
	To-Pro3/ Cy5/ Alexa647	640	660	0,8	100	400
25X (0,8) (Oil)	Dapi	405	461	0,8	63	443
	GFP/ Alexa 488	488	525	0,8	76	534
	Alexa 555/Alexa594/ Rodamina/Texas-Red	561	620	0,8	87	613
	To-Pro3/ Cy5/ Alexa647	640	660	0,8	100	700
40X (1,3) (Oil)	Dapi	405	461	0,8	38	137
	GFP/ Alexa 488	488	525	0,8	46	165
	Alexa 555/Alexa594/ Rodamina/Texas-Red	561	620	0,8	53	190
	To-Pro3/ Cy5/ Alexa647	640	660	0,8	61	217
63X (1,4) (Oil)	Dapi	405	461	0,8	36	108
	GFP/ Alexa 488	488	525	0,8	43	130
	Alexa 555/Alexa594/ Rodamina/Texas-Red	561	620	0,8	48	145
	To-Pro3/ Cy5/ Alexa647	633	660	0,8	56	169

F.R.E.T. y sCMOS-monocroma /monochrome (ZEISS)

- ✓ Guardad las imágenes en **formato .stk**
- ✓ *Save the images in .stk format*

Objetivo (Apertura Numérica) <i>Objective (Numerical Aperture)</i>	Fluoróforo / <i>Fluorophore</i>	λ Ex (nm)	λ Em (nm)	Pixel XY (nm)	Step Z (nm)
40X (1,3) (Oil)	Dapi	405	445	85	301
	CFP	436	480	92	325
	GFP/ Alexa 488	490	525	100	356
	YFP	500	535	102	362
	Rodamina/ DsRed/ Alexa 46/555/594	540	580	111	393
	To-Pro3/ Cy5/ Alexa647	633	660	126	447
63X (1,4) (Oil)	Dapi	405	445	76	206
	CFP	436	480	85	256
	GFP/ Alexa 488	490	525	92	277
	YFP	500	535	95	285
	Rodamina/ DsRed/ Alexa 46/555/594	540	580	103	309
	To-Pro3/ Cy5/ Alexa647	633	660	117	352
100X (1,4) 100X (1,45) (Oil)	Dapi	405	445	76	206
	CFP	436	480	82	223
	GFP/ Alexa 488	490	525	90	243
	YFP	500	535	92	248
	Rodamina/ DsRed/ Alexa 46/555/594	540	580	100	269
	To-Pro3/ Cy5/ Alexa647	633	660	113	306