

CLSM: Leica SP8

Software: LAS-X 3.5.5

Autor: PD Dr. Johannes Kacza / BioImaging Core Facility / SIKT, Universität Leipzig

Vorbereitungen der Objektträger vor Aufnahme am LSM

Die Gewebeschnitte sollten unbedingt in X- und Y-Orientierung möglichst parallel im Scan-Tisch liegen. Ist das nicht gegeben, z.B. durch schräg im Scan-Tisch liegenden Objektträger, geneigt auf dem Objektträger liegende Schnitte, gekrümmte bzw. gewellte Schnitte oder Kombinationen der genannten Fehlstellungen, entsteht im Übersicht-Scan keine gleichmäßig signalstarke (helle Abbildung und - viel bedeutsamer - beim Photon Counting in den aufgenommenen Scan-Feldern ein Messfehler, der auf der Schnittneigung beruht.

Objektträger, bei denen das Deckglas zu nah an einem der schmalen Ränder des Objektträgers liegt, müssen entsprechend ausgeglichen werden, im Idealfall durch Aufbringen eines gleichhohen Objekts auf der gegenüberliegenden Seite. Dazu könnte z.B. ebenfalls ein Deckglas mit Eindeckmedium aufgesetzt werden. Wichtig ist in jedem Fall, dass die Oberflächen, mit denen der Objektträger (mit dem Deckglas nach unten) auf dem Adapterrahmen aufliegt sauber, eben und absolut frei von Resten von Eindeck- oder Immersionsmedien (Öl, Glycerin) sind.

Falls sich eine oberflächenparallele Lage des Objektträgers im Scan-Tisch nicht erreichen lässt oder die Schnitte selbst geneigt, gewölbt und gewellt sind, müssen später beim Scannen weitere Maßnahmen bzw. Einstellungen ergriffen werden, die Zeit kosten und die an sich vermeidbaren präparatorischen Probleme eventuell trotzdem nicht vollständig ausgleichen können.

Vorbereitungen und Einstellungen des Mikroskopes

LSM und Software (LAS-X) starten, Scan-Tisch initialisieren

Fluoreszenzbeleuchtung einschalten

Gewünschtes Objektiv im Strahlengang fahren

Falls erforderlich Immersionsmedium vorsichtig auf Frontlinse applizieren

Objektivrevolver in tiefste Position fahren

Präparat in Adapterrahmen des Scan-Tisches einlegen und in definierter Position fixieren

Zuvor gekennzeichnete Stelle des Objektträgers mit X- und Y-Trieben nach Sicht seitlich anfahren

Objektivrevolver mit Sicht auf das Objektiv von Hand hochfahren bis Glycerin Deckglas und Linse verbindet

Shutter für Fluoreszenzbeleuchtung öffnen, prüfen ob Licht durch das Objektiv auf das Präparat fällt

Objektiv unter Beobachtung durch Binokular weiter hochfahren bis fluoreszenzmarkierte **Strukturen am Rand des auszuwertenden Schnittes (!!!)**, ggf. DAPI-markierte Kerne, aber nicht die zu quantifizierenden, klar erkennbar sind

Shutter für Fluoreszenzbeleuchtung schließen

Z-Position am Touchscreen des Mikroskopes als Focus Position speichern

Excel-Tabelle o.ä. vorbereiten für Eintrag von X1, X2, Y1, Y2, Z1, Z2 und Berechnung von X_m, Y_m, Z_m z.B. gemäß Formel: $X_m = (X_2 - X_1) / 2 + X_1$. Entsprechende Berechnungen Y_m und Z_m vorbereiten. Erläuterungen:

X1 = linke Schnittkante, X2 = rechte Schnittkante, Y1 = obere Schnittkante, Y2 = untere Schnittkante, Z1 = Fokusebene bei X1, Z2 = Fokusebene bei X2.

Einstellungen unter LAS-X

Zuvor erstellte Konfiguration zum Photon Counting herstellen. Dazu eine Projektdatei und darin ein Dokument (Abbildung) öffnen, die mit den gewünschten Einstellungen erstellt wurde.

Sofern der erforderliche Laser nicht schon eingeschaltet war, die Anfrage zum Anschalten des Lasers mit „Yes“ beantworten.

Argon-Laser einschalten, Energielevel 20.00% eintragen.

Hinweis: Nach Software-Problem, PC-Absturz, etc. und Neustart immer Energielevel des Lasers überprüfen! Der Energielevel wird bei Eintrag „20%“ geräteseitig exakt auf 19,84% gesetzt, dieser Wert muss bei dieser vergleichenden Studie immer eingestellt sein.

Im Panel „Open projects“ neues Project erstellen und benennen

Einstellungen im „Acquisition Panel“:

Format: 256 x 256 (Pixel)

Speed: 600 Hz

Bidirectional X: ON

Scan Rotation: 90 Grad

Panel „Pinhole“ öffnen

Pinhole: 2 (Größe des Pinhole auf 2.00 AU)

Detektor HyD3: ON

Farbe des Detektorsignals zuweisen

Detektor in Betriebsmodus „Standard“ schalten (sofern Detektor auf „Counting“ steht)

Shutter für Visible Laser: ON

Transmission für Laser-Linie: 1.0 %

Überprüfen, ob die erforderliche Laser-Linie im Spektrum angezeigt wird und Detektionsbereich rechts davon steht

Mit „Show Panel Box Settings“ USB Control Panel öffnen und Zuweisungen der Regler wie folgt ändern:

3. Regler von Scan Rotation auf X Position (Stage) schalten

4. Regler von Airy Unit auf Y Position (Stage) schalten

Empfindlichkeit des 6. Reglers für Z Position auf „10.0 μm per turn“ stellen

Mitte des Schnittes in X und Fokus für Overview Scan einstellen

Voraussetzung: Der zwecks Photon Counting zu scannende Gewebeschnitt wurde auf der Unterseite des Objektträgers möglichst präzise markiert (z.B. durch Rumranden mit Permanentstift) und der Schnitt zur Frontlinse des Objektivs so platziert (s. Einstellungen des Mikroskopes), dass dessen linke Seite beim Anfahren in X-Richtung beim Blick durch das Binokular von rechts erscheint.

Live Scan einschalten

Linke Seite des Schnittes von links kommend anfahren und mit Z-Regler maximale Intensität suchen

Werte X1 und Z1 in vorbereitete Tabelle eingeben

Rechte Seite des Schnittes zügig anfahren und mit Z-Regler maximale Intensität suchen

Werte X2 und Z2 in Tabelle eingeben, *Scan-Tisch bleibt bei Position X2*

Weiter im Scan-Betrieb des LSM: aktuellen Scan-Bereich mit „Live“ abbilden.

Signalsättigung im Modus „Over/Underexposure“ anzeigen.

Gain von Hyd 3 ggf. verändern (Default-Wert = 100%), bis knapp übersättigte (blaue) Pixel entstehen.

WICHTIG: Zur Anpassung der Helligkeit des Overview Scans nicht die Transmission verändern, da der Energieeintrag durch den Laser auch beim Overview Scan bei jedem Schnitt gleich hoch sein muss.

Live Scan beenden

Berechnete Werte X_m und Z_m für X- und Z-Positionen mit X- und Z-Regler am USB Control Panel einstellen

LAS-X Navigator (nachfolgend nur LAS-Navigator)

LAS-Navigator öffnen: nach wenigen Sekunden erscheint das Navigator-Fenster (gesamter Monitorbereich)

Darstellung des aktuellen Scan-Feldes (weißes Quadrat) durch Drehen des Mausekkrades verkleinern (z.B. auf etwa 4 x 4 cm) und ggf. mit gedrückter rechter Maustaste in Monitormitte verschieben.

Spiral Scan mit Taste „Spiral“ starten

Spiral Scan mit „Stop“ beenden, sobald der Overview Scan den Schnitt im gewünschten Umfang abbildet

Overview Scan mit „Save Overview“ (rechts im Navigator-Fenster) sichern

Ggf. Overview Scan als Mosaikbild speichern: Mosaic Merge öffnen > Overview auswählen > Merge

Im LAS-Navigator zurück in „Acquisition“ schalten

Die zu Beginn benannte Projektdatei speichern mit: rechte Maus > Save as. *Projektdatei mit Extension *.lif*

WICHTIG: Falls der Overview Scan keinen gleichmäßig signalstarken Schnitt zeigt (etwa gleich hell in allen Bereichen des Schnittes), ist der Schnitt wahrscheinlich geneigt (s. Vorbereitungen der Objektträger vor ...).

In diesem Fall muss vor dem Scannen zum Photon Counting eine Focus Map erstellt werden (nächsten zwei Kapitel), mit der beim Scannen der jeweils passende Fokus der Scan-Felder automatisch eingestellt wird.

Einstellung im „Autofocus Panel“ (nur für Erstellung einer Focus Map erforderlich)

LAS Navigator schließen

Autofocus Panel öffnen (Unter Acquisition Mode der 4. Schalter)

Focus-System: Best Focus

Settings zu Best Focus:

Focusdrive: z-Galvo

Focus modes: First channel only
Optimized for: Intensity based Method
Capture range: 20 microns
Precision: maximal Accuracy

Einstellungen im „Acquisition Panel“:

Transmission für Laser-Linie: 1.0 % (war für Overview Scan mit 2 AU auf 0.5% gestellt)

Einstellung des Pinhole

Pinhole zurück auf 1 **WICHTIG**: entweder Wert 1.00 für Pinhole eintragen oder Schalter „Airy 1“ drücken.

Einstellungen der Focus Map im LAS-Navigator

„Focus Map Point“ (blauer +F-Schalter) aktivieren (untere Werkzeugleiste im Navigator-Fenster)

Über den Helligkeitsgradienten des gesamten Overview Scans verteilt 4 - 6 Scan-Felder mit +F markieren, die nicht in die spätere Quantifizierung einbezogen werden sollen bzw. dürfen.

Falls erforderlich bzw. zur besseren Übersicht die mit +F markierten Bereiche zusätzlich als Scan-Felder kennzeichnen. Dazu „Single Image“ (+ Schalter) aktivieren und exakt auf die Fadenkreuze der +F Markierungen das Zentrum eines Scan-Felder setzen. Diese Scan-Felder dienen allein der Übersicht, an welchen Stellen keine Scan-Felder zwecks Photon Counting platziert werden dürfen. Diese Scan-Felder müssen folglich vor Ausführung des Scans zum Photon Counting vorher deaktiviert bzw. gelöscht werden.

Mit Schalter „Focus Map“ Tabelle der Fokuspositionen anzeigen

Mit Schalter „Find all by Autofocus“ Focus Points an den mit +F markierten Stellen ermitteln.

Entsprechend des Setting „Intensity based Method“ wird die Fokusebene (Z-Wert) dort gesetzt, wo die höchste mittlere Signalintensität vorliegt, also i.d.R. in der Mitte des Schnittes. Die Fokusebenen an Stellen zwischen den Focus Points werden von LAS-X mittels Interpolation berechnet. Um eine repräsentative Focus Map zu erzeugen, sollten die Focus Points nicht in einer Linie, d.h. nicht genau untereinanderliegen.

Die automatisch ermittelten und abgebildeten Focus Points sollten jetzt erkennbar signalstärker (heller) sein, als die sie umgebenden Bereiche des Overview Scans und etwa gleich hell erscheinen (vorausgesetzt, der Schnitt ist insgesamt etwa gleich stark fluoreszenzmarkiert).

Kontrolle der Focus Points: Da der Schnitt nicht oberflächenparallel zum Scan-Tisch liegt, sollten die Z-Werte der erstellten Focus Points verschieden sein.

Setzen der Scan-Felder zum Photon Counting

Scan-Felder zwecks Photon Counting entweder mit „Single Image“ (+ Schalter) setzen, oder die aktuelle Position des Scan-Feldes mit X-/Y-Trieb an die gewünschte Stelle im Overview Scan bewegen und dort jeweils mit „Mark“ setzen. Für die genaue Positionierung des Scan-Feldes ggf. mit Mausexplorer den Overview Scan größer zoomen bzw. Overview Scan mit rechter Maustaste gedrückt entsprechend verschieben.

Points List (rechts im Navigator-Fenster) auf Vollständigkeit der gesetzten Scan-Felder prüfen

Alle Scan-Felder mit Ausnahme der tatsächlich aufzuzeichnenden Positionen deaktivieren.

Aufzeichnen der Scans zum Photon Counting

Autofocus ausschalten !!! (falls zum Erstellen einer Focus Map eingeschaltet. Im LAS Navigator darf zwischen „Z-Stack“ und „Stage“ kein „Autofocus“ Panel stehen, das „Autofocus Panel“ muss aus sein)

Einstellungen unter „Beam Path“:

HyD 3 in Betriebsmodus „Counting“ schalten (Default-Modus: Standard)

Transmission für Laser-Linie auf 1% stellen (so hohe Transmissionswerte nur im Counting-Modus!)

Einstellungen unter „Scanmode“:

Format: 512 x 512 Pixel

Speed: 200 Hz

Bidirectional X: OFF

Einstellen der Signalsättigung im Counting-Modus

Repräsentativen Bereich des Präparates im Overview Scan anfahren, der nicht mit den gespeicherten Scan-Feldern überlappt.

Live Scan einschalten

Fokusebene anhand des maximalen Signals einstellen

Saturation Control einschalten (zweiter Schalter links neben Scan-Fenster)

Signalsättigung vorsichtig durch Änderung der Transmission der gewählten Laser-Linie so anpassen, dass nur noch sehr wenige übersättigte Signale (weiße Pixel) erscheinen.

Live Scan ausschalten

WICHTIG: Bevor der Scan gestartet wird prüfen, ob HyD 3 tatsächlich im Modus „Counting“ und Pinhole auf 1 AU eingestellt ist !!!

Scan der ausgewählten Scan-Felder starten mit „Start“

Nach dem Scan sollten in „Open projects“ unter „TileScan 1“ entsprechend viele Scans „Position 1 bis n“ stehen. Zu Beginn benanntes Projekt erneut speichern: rechte Maustaste > Save as.

WICHTIG: Bevor die Projektdatei geschlossen wird, unbedingt kontrollieren, ob die Datei-Extension *.lif ist. Falls diese noch *.xlef lautet, liegt kein gespeichertes Projekt vor. Nach Schließen des Projekts wären dann alle zuvor erhobenen Daten verloren.

Im LAS-Navigator alle Einträge unter „Images“ und in der Task List löschen

Falls Scans an weiteren Schnitten erfolgen sollen:

Im Panel „Open projects“ gespeichertes Projekt schließen und neues Project erstellen und benennen

Nachfolgende Routine wiederholen

Quantifizierung des Photon Counting

Die Auswertung des Photon Counting erfolgt nicht am LSM-Rechner, sondern an externen PCs. Dazu kann die kostenlose und frei verfügbare Version LAS-X 3.4.2 genutzt werden.

WICHTIG: Nachfolgend wird nur die allgemeine Vorgehensweise zur Quantifizierung des Photon Counting beschrieben, nicht jedoch spezifische Parameter wie Größe, Form und Anzahl der Region of Interest (ROI) und auch nicht deren konkrete Platzierung in den aufgezeichneten Scan-Feldern (LSM-Aufnahmen).

LAS-X starten

Panel „Quantify“ öffnen

In „Open projects“ gewünschte Projektdatei (*.lif) laden

Auszuwertende LSM-Aufnahme auswählen

In „Tools“ Option „Histogram“ wählen (3. Schalter von links)

Das Panel „Annotations“ in der rechten Werkzeugleiste (über LSM-Aufnahme) muss ausgeschaltet sein, um ROIs für die Quantifizierung laden zu können.

Mit rechter Maustaste in LSM-Aufnahme (im rechten Fenster) klicken und „Load ROIs“ auswählen

Die vorbereitete ROI-Datei öffnen

Die vorbereiteten ROIs werden in der zuletzt gegebenen Verteilung auf die LSM-Aufnahme projiziert.

Zum Bewegen von ROIs „Select single ROI“ (schräger Pfeil, 1. Taste neben „Annotations“) anschalten

ROI mit linker Maustaste auswählen und mit Cursor im „Hand-Modus“ an gewünschte Stelle verschieben.

WICHTIG: Zeigt der Cursor nicht das Handsymbol, sondern einen Doppelpfeil führt die Cursor-Bewegung nicht zum Verschieben des ROI, sondern zur Form- bzw. Größenänderungen des ROI.

Falls Größe bzw. Form eines ROI irrtümlich verändert wurden, die ursprünglichen Eigenschaften unter „Properties“ (s.u.) wieder herstellen. Nach der Messung in der Tabelle zur Statistik Größe / Fläche der ROIs auf gleiche Werte überprüfen.

Hinweise zu ROIs

ROIs einer Messgruppe müssen immer gleich gefärbt sein und sollten mit entsprechenden kurzen Indizes benannt werden (z.B. E1, E2, E3, ... etc. für Epithel oder C1, C2, C3, ... etc. für Kontrolle, usw.). Farbe, Bezeichnung, Form und Größe der ROIs können unter „Properties“ eingestellt werden. Dazu ROI markieren (Anzeige als Vektorgrafik-Objekt mit weißen Stützpunkten), mit rechter Maustaste im Menü „Properties“ auswählen.

Als Form der ROIs bieten sich i.d.R. Kreise an, da diese unabhängig vom Verlauf einer Strukturkante platziert werden können (Rechtecke oder Ellipsen müssten ggf. jeweils passend ausgerichtet werden).

Die Größe der ROIs sollte so gewählt werden, dass diese möglichst nicht größer sind als die zumessenden Flächen. Bei Aufnahmen von Geweben mit 63x Objektiv sind oft Durchmesser von 2 bis 5 µm passend. Die konkrete Größe der ROIs muss aber anhand der aufgenommenen Bilder gewählt werden. *Ist die Größe und Form der ROIs einmal festgelegt, darf diese für die gesamte Studie nicht mehr geändert werden.*