

DECONVOLUCIÓN

- Podéis encontrar información completa sobre el programa de deconvolución “Huygens” (S.V.I.) en la página Web: <https://svi.nl/Huygens-Deconvolution>
- En caso de querer realizar cálculos para otras configuraciones distintas a la de las siguientes tablas, acudir a la página Web: <https://svi.nl/OnLineTools>
- Para más detalles sobre las posibilidades de este programa: <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](#).”

<https://svi.nl/NyquistCalculator>

Confocal 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

Confocal Olympus SpinSR10

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

Confocales Zeiss LSM510 & LSM710

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

Confocal Zeiss LSM800

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

Microscopios “ WideField ” Zeiss

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

Confocal 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

Objetivo (Numerical Aperture)	Fluoróforo	Ex (nm)	Em (nm)	Pinhole (AU)	Píxel XY (nm)	Step Z (nm)
20X (0,75) (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) (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
40X (1,3) (Oil)	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

Confocal 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

Objetivo (Numerical Aperture)	Fluoróforo	Ex (nm)	Em (nm)	Pinhole (AU)	Píxel XY (nm)	Step Z (nm)
60X (1,4) (Oil)	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) (Water)	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

Confocal SpinSR10 (OLYMPUS)

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

Objetivo (Numerical Aperture)	Fluoróforo	Ex (nm)	Em (nm)	Píxel XY (nm)	Step Z (nm)
30X (1,05) (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) (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) (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) (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

Confocal LSM510 INVERTIDO O VERTICAL (ZEISS)

✓ Guardad las imágenes en **formato .ism**

Objetivo (Numerical Aperture)	Fluoróforo	Ex (nm)	Em (nm)	Pinhole (AU)	Píxel XY (nm)	Step Z (nm)
25X (0,8) (Oil)	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) (Oil)	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

Confocal LSM510 INVERTIDO O VERTICAL (ZEISS)

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

Objetivo (Numerical Aperture)	Fluoróforo	Ex (nm)	Em (nm)	Pinhole (AU)	Píxel XY (nm)	Step Z (nm)
63X (1,4) (Oil)	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) (Oil)	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

Confocal LSM710 INVERTIDO (ZEISS)

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

Objetivo (Numerical Aperture)	Fluoróforo	Ex (nm)	Em (nm)	Pinhole (AU)	Píxel XY (nm)	Step Z (nm)
25X (0,8) (Oil)	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) (Oil)	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) (Water)	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

Confocal LSM710 INVERTIDO (ZEISS)

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

Objetivo (Numerical Aperture)	Fluoróforo	Ex (nm)	Em (nm)	Pinhole (AU)	Píxel XY (nm)	Step Z (nm)
63X (1,4) (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	561	580	0,8	50	149
	To-Pro3/ Cy5/ Alexa647	633	660	0,8	56	169
100X (1,4) (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	561	580	0,8	50	149
	To-Pro3/ Cy5/ Alexa647	637	660	0,8	56	169

Confocal LSM710 VERTICAL (ZEISS)

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

Objetivo (Numerical Aperture)	Fluoróforo	Ex (nm)	Em (nm)	Pinhole (AU)	Píxel XY (nm)	Step Z (nm)
25X (0,8) (Oil)	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) (Oil)	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

Confocal LSM710 VERTICAL (ZEISS)

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

Objetivo (Numerical Aperture)	Fluoróforo	Ex (nm)	Em (nm)	Pinhole (AU)	Píxel XY (nm)	Step Z (nm)
63X (1,4) (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) (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

Confocal LSM800 INVERTIDO (ZEISS)

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

Objetivo (Numerical Aperture)	Fluoróforo	Ex (nm)	Em (nm)	Pinhole (AU)	Píxel 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 (ZEISS)

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

Objetivo (Numerical Aperture)	Fluoróforo	Ex (nm)	Em (nm)	Píxel 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