Guía de optimización de la captura de imagen quimioluminiscente con los equipos ChemiDoc XRS+ / ChemiDoc MP y el software Image Lab



Elaboró:

Dr. Jean Alberto Castillo Badillo. Dr. José Luis Maravillas Montero.

Febrero 2015





- 1. Encender primero el equipo Chemidoc MP
- 2. Encender la computadora
- 3. Colocar su muestra, Gel o membrana en la charola.
- 4. Esperar 5 min en lo que se calienta la cámara del equipo.
- 5. Inicie el software Image Lab dando doble click en el ícono.



- 6. En la pantalla de inicio seleccione New Single Channel o New Multichannel, según sea el caso.
- 7. En la pantalla Protocol Setup de click aplicación abrirá un menú con las opciones para leer geles de que contengan ácidos nucleicos proteínas o si es el caso hacer un blot, también permite hacer una captura personalizada mediante el menú custom. Al escoger la opción a analizar nos despliega una lista de opciones de fluoróforos donde podemos elegir según sea nuestro caso.

📲 Protocol5 - ChemiDoc™ XRS+	
Protocol Setup	1. Gel Imaging
Acquisition Settings	Application Nucleic Acid Gels Protein Gels
2. Lane And Band Detection	Blots Chemi
3. Analyze Molecular Weight	Custom Chemi Hi Resolution
Generate Output 4. Specify Output	Imaging Area Colorimetric Qdots 525 Qdots 565
Protocol Summary	Cy2
	Image Exposure Alexa 488 The software will automation for Fluorescein Intense Dands Topic Fluorescein
Position Gel	Manualy set exposure time: 0.500 sec Display Optons
Run Protocol	✓ Highlight saturated pixels Image Color: Gray ▼

Protocol Setup > Select > Blots > Chemi.

8.	Seleccione un	tamaño a	proximado	de la mer	mbrana a	fotodocumentar.
----	---------------	----------	-----------	-----------	----------	-----------------

u Protocol5 - ChemiDoc™ XRS+*	
Protocol Setup	1. Gel Imaging
Acquisition Settings I. Gel Imaging Analyze Image 2. Lane And Band Detection 3. Analyze Molecular Weight	Application Select Chemi Filter: No Filter Place sample on UV Transiluminator Light: No Illumination Binning: 3x3
Generate Output	Imaging Area
4. Specity Output	Select gel type: Bio-Rad Criterion Gel
Protocol Summary	Enter image area: 15.0 x 11.2 cm (WxL)
	Image Exposure
	Signal Accumulation Mode Setup
	Manually set exposure time: In sec
Position Gel	Display Options
Run Protocol	✓ Highlight saturated pixels Image Color: Gray

9. El siguiente paso es determinar el tiempo adecuado para la captura de la imagen. El objetivo es exponer la muestra lo suficiente para visualizar bandas débiles, sin llegar a saturar la imagen de las bandas intensas.

NOTA: La cámara de los sistemas ChemiDoc tiene una capacitad máxima de 65,000 unidades de intensidad de pixeles, el sobrepasar este valor tiene como resultado la saturación de la señal. La saturación impide realizar una cuantificación adecuada de la muestra, por esta razón es muy importante determinar el tiempo de captura óptimo para obtener la mejor imagen sin llegar a la saturación.

- 10. Para obtener el tiempo de captura adecuado se pueden seguir los siguientes pasos:
 - **a.** Tome una imagen con un tiempo corto de exposición, por ejemplo 10s (para tener una intensidad de pixeles inicial)
 - **b.** Determine la intensidad de pixeles relativa de su muestra
 - **c.** Estime el tiempo aproximado de exposición mediante la siguiente fórmula:

Tiempo para llegar a saturación =
$$\left(\frac{65,000}{Intensidad en 10s}\right) \cdot 10s$$

d. Utilice el modo de captura de acumulación de señal (**Signal Accumulation Mode**) para obtener la mejor imagen posible.

11. Para un "tiempo corto de exposición" considere 10 s. Así que seleccione la opción **Manually set exposure time** y teclee 10 (**Paso a**)

.45 Protocol5 - ChemiDoc™ XRS+*	
Protocol Setup	1. Gel Imaging
Acquisition Settings I. Gel Imaging Analyze Image 2. Lane And Band Detection 3. Analyze Molecular Weight	Application Select Chemi Filter: No Filter Place sample on UV Transiluminator Light: No Illumination Binning: 3x3
Generate Output d. Specify Output Protocol Summary	Imaging Area Select gel type: Bio-Rad Criterion Gel Enter image area: 15.0 x 11.2 cm (Wxl.)
Position Gel Run Protocol	Image Exposure Signal Accumulation Mode Setup Image Manually set exposure time: sec Display Options Image Color: Image Might saturated pixels Image Color:

NOTA: Verifique que la casilla **Highlight saturated pixels** se encuentra seleccionada.

12. De click en **Position Gel** para verificar que la membrana está centrada y con nivel de zoom adecuado. Una vez verificado lo anterior de click en **Run Protocol**

(Position Gel	
(Run Protocol	

13. Aparecerá la pantalla de avance:

Herotocol5 - ChemiDoc™ XRS+*	
Run Creating Image File: Karina Adames 2013-07-05 17hr 00min	Imaging Detection Detection Report
	Exposure Preview
Exposing(10.000 sec)	
Cancel Run	Application: Chemi

14. Para determinar la intensidad de pixeles relativa de su muestra (**Paso b**), coloque el cursor sobre la banda más intensa de la imagen

File Edit View Window H	elp		
New Protocol Open Save Print	Screenshot Undo Redo	Analysis Table Lane Profile Standard Curve Report Tutorials Start Page	BIO RAD
📢 Analysis Tool Box 🕅	(Karina Adamee 2013-07-05 17br 00min"	
🔦 Auto-Analysis	Protocol5 - ChemiDoc™ X Protocol Setu		
Image Tools	Acquisition Settings		
Lane and Bands	Analyze Image 2. Lane And Band De 3. Analyze Molecular		
	Generate Output 4. Specify Output		
Normalization	Protocol Summary	₽	
Quantity Tools	Position Gel		
Annotation Tools	Run Protocol		
Volume Tools			
		2 ChemiDoc™ XRS+ ▼ X: 260) Y: 491 Value: 3264 Int

15. Observe el valor de intensidad de pixeles que aparece en la parte inferior derecha de su pantalla.

ChemiDoc[™] XRS+ ▼ X: 260 Y: 491 Value: 3264 Int

NOTA: Si la imagen presenta puntos rojos en alguna de las bandas significa que se llegó al nivel de saturación de pixeles de la cámara. En este caso, tome otra imagen con menor tiempo de exposición.

16. En este ejemplo, el valor es 3,264 en 10 segundos. Sustituyendo en la fórmula del paso 6.

Tiempo para llegar a saturación =
$$\left(\frac{65,000}{3,264}\right) \times 10s = 200s$$

- 17. El resultado es 200 s (**Paso c**). Utilice este valor como parámetro de referencia en el **Signal Accumulation Mode**
- 18. Vaya nuevamente a la pantalla **Protocol Setup** y repita los pasos 3 y 4 de esta guía.
- 19. En la opción Image Exposure seleccione Signal Accumulation Mode (Paso d)

20. En este ejemplo, el tiempo aproximado al cual se llega a la saturación de la imagen es 200s, así que se estableció un rango de captura de imagen que incluyera 200s. Se determinó que la primera toma de la imagen fuera a los 150s, y que la última toma de imagen fuera a los 250 s. En ese intervalo se seleccionó que el software tomara 10 imágenes (este valor se ajusta de acuerdo a la necesidad del usuario).

The software will acquire signal.	the images and sum up the
First image time (sec):	150
Last image time (sec):	250
Total number of images:	10
0	1 5 1
2-1	150 Sec. 250 Se

21. De click en OK para aceptar los valores

Protocol5 - ChemiDoc™ XRS+*	
Protocol Setup	1. Gel Imaging
Acquisition Settings I. Gel Imaging Analyze Image 2. Lane And Band Detection 3. Analyze Molecular Weight	Application Select Chemi Filter: No Filter Place sample on UV Transiluminator Light: No Illumination Binning: 3x3
Generate Output 4. Specify Output Protocol Summary	Imaging Area Select gel type: Bio-Rad Criterion Gel Enter image area: 15.0 x 11.2 cm (WxL)
Position Gel	Image Exposure Image Signal Accumulation Mode Setup (First: 150 sec, Last: 250 sec, Images: 10) Manually set exposure time: 10 Image Options Image Color: Gray

22. De click en Run Protocol

NOTA: Verifique que la casilla Highlight saturated pixels se encuentra seleccionada.

- 23. Aparecerá la pantalla de avance en la cual usted puede:
 - Verificar el tiempo de acumulación de señal
 - Observar las imágenes que se obtienen durante el periodo de tiempo establecido
 - Seleccionar alguna de las imágenes y si coloca el cursor sobre una banda, monitorear el valor de intensidad de pixeles
 - Ajustar el contraste de las imágenes. Con click derecho se activa la opción Autotransform
 - Si considera que una imagen es la adecuada, seleccionarla y detener la captura de imágenes.

Protocol5 - ChemiDoc™ XRS+*		
Tiempo de acumulación de señal 07-05 17hr 42min	Imaging	
Signal Accumulation Time	Displaying Image: 194.4 sec	e , e, <u>I</u>
Elapsed: 03:16 Remaining: 00:54	Intensidad de pixeles	
Stop Acquire and Continue with Selected	Selección de una imagen y detiene la	
Image Transform:		
Ajuste de		
Cancel	Imágenes	
Run	150.0 sec 161.1 sec 172.2 sec 183.3 sec 194.4 sec	

NOTA: Todas las opciones anteriores se encuentran activas mientras transcurre el tiempo de acumulación de señal y se capturan las imágenes.

24. Cuando se completa el tiempo establecido para acumulación de señal (en este ejemplo 250s), se muestran todas las imágenes capturadas y se activa el botón **Select Image and Continue**

.≰ Protocol5 - ChemiDoc™ XRS+*		
Run Creating Image File: Karina Adames 2013-07-05 t7hr 36nin	Imaging Imaging	e, e, 12
Select image and click yellow button to continue the protocol run with the selected image. All other images will be deleted. Select Image and Continue		
Image Transform:		
	Select Image:	
Cancel Run	150.0 sec 161.1 sec 172.2 sec 183.3 sec 194.4 sec 205.6 sec 216.7 sec 227.8 sec 238.9	sec 250.0 sec

NOTA: Si presiona Cancel Run, se perderán todas las imágenes capturadas

- 25. En este punto se tienen dos opciones:
 - **a.** Seleccionar una sola imagen, que no presente zonas saturadas (puntos rojos) y presionar **Select Image and Continue**. En este proceso sólo se conservará la imagen seleccionada, el resto se eliminará
 - b. Dar click derecho sobre alguna de las imágenes pequeñas y seleccionar Save para guardar esa imagen o Save All para guardar todas las imágenes tomadas. Las imágenes se guardaran con el tiempo de exposición indicado en el nombre del archivo

NOTA: Con la opción **Save**, puede guardar sólo las imágenes de interés, dando click derecho y guardando cada imagen a la vez.

Help		
t Screenshot Undo Redo Analys	ais Table Lane Profile Standard Curve Report Tutorials Start Page	
Protocol1 - ChemiDoc™ XRS+*		
Run		
Creating Image File:	Imaging C Detection C Analysis C Report	
Karina Adames 2013-07-05 17hr 46min	Displaying Image: 250.0 sec	e, e, 🖽
elect image and click yellow witton to continue the protocol un with the selected image. All other images will be deleted.		
Select Image and Continue		
nage Transform:		
	_	
	Select Image:	
Cancel		
Run	150.0 sec 161.1 sec 172.2 sec 183.3 sec 194.4 sec 205.6 sec 216.7 sec 227.8 sec 238.9	sec 250.0 Save All
		- Save Alla

26. Una vez seleccionada o guardada la imagen, puede comenzar el análisis con las opciones que aparecen a la izquierda de su pantalla.

e .u :	Image Lab 4.1			
File	e Edit View Windo	ow Help		
Ne	Protocol Open Save	Print Screens	hot Undo Redo Analysis Table Lane Profile Standard Curve Report Tutorials Start Page	BIO RAD
	Analysis Tool Box 🎵	Protoce	Karina Adames 2013-07-08 12hr 20min_Exposure_250.0sec	
	Auto-Analysis	F	🖉 🔍 🔍 🖬 🗴 🚍 🧇 🗈	
		Acquisitio		*
	14 ₁₁₁	🖉 1. Ge	A CONTRACT OF A	
1	Image Tools	Analyze Ir		
	FILTERT	2. La		
1	11111	3. An		
	Lane and Bands	Generate		
		4. Sp		
-	Normalization	Dente		
		Proto		
	MW Analysis Tools			
-			the set of an end of a set of	
	Quantity roois			
1	Am			
	Annotation Tools			
				-
	Volume Tools			•

27. Puede guardar el protocolo para utilizarlo en posteriores optimizaciones