

Tutorial de medición de constantes de transporte nuclear por FRAP

1. Confocal

Configuración del microscopio:

- 128 x 128 pixels de resolución
- 500 nm de pinhole aperture
- Zoom 12-20 x
- Para YFP: láser 515, dicroico 458-515, 4 usec/ pixel de escaneo, 1% láser, HV ajustado para que no saturate (lo miro con High-low)
- Para CFP y Cherry se pueden modificar según convenga. Yo uso láser 5% y 200 usec/pixel

FRAP:

Photobleaching con herramienta "Stimulus setting". Poner en main, elegir la opción de photobleachear en forma de huracán (es más rápida), láser 515 en 80-100%, dibujar un círculo de ~0.5 μ m de diámetro en el centro del núcleo, seleccionar "activation in series", 5 frames de preactivación y uno de activación. El número de frames para ver la recuperación es el que figure como total del time course menos los de preactivación. Para hacer el experimento hay que usar XY acquisition, seleccionando el tiempo.

Para cada levadura hay que seleccionar el area, poner "activation in series" y sacar las fotos.

Al finalizar cada par, guardar las fotos/ stacks una por una. Los nombres de los stacks de los FRAPs deben ser lev??_f?. Los de las fotos de referencia de CFP lev??_r?.

2. CMD

- Copiar todos los tifs de las carpetas .oif.files a img/

desde la carpeta del experimento:

mkdir img

```
cp *.iof.files/*.tif img
```

```
rm -r *.oif.files
```

```
mkdir oif
```

```
mv *.oif oif
```

- abrir el archivo tif2stk.sh.txt y cambiar los nombres de las levaduras a las de el experimento en particular
- crear stacks para cada posicion del canal de YFP usando script tif2stk.sh.txt, ejecutado desde CMD, desde img/

```
sh tif2stk.sh.txt
```

con el promedio de las fotos de CFP.

- generar una carpeta para el análisis

```
mkdir FRAPdb
```

```
mv *.stk.tif FRAPdb
```

```
mv *-tif-fname.txt FRAPdb
```

- generar los archivos con los tiempos de los FRAPs

en la carpeta oif pegar y ejecutar los archivos

oif2txt.bat y selectLineFromOif.bat en ese orden.

Llevar el archivo salida (OIF-date.txt) a la carpeta FRAPdb

3. ImageJ

Usar el plugin de ImageJ, Time Series Analyzer V2.

Salvo el caso en el que el núcleo se mueva mucho (que es raro y más difícil de resolver), NO clicar Recenter Parameters -> recenter for measuring mean.

Marcar regiones ovaladas que corresponden a nucleo hija, citosol hija, nucleo madre, citosol madre en ese orden. En ROI Manager, poner Add[t] despues de marcar cada region. Ejecutar GetAverage en la ventana Time Series. Guardar la tabla generada en lev??-time-trace.xls.

Despues de guardar la tabla (lev??-time-trace.xls), ir a roi Manager > More > Draw, y despues en imageJ > File > Save as > jpg para tener una imagen de referencia de donde maque las regiones.

Crear el archivo levData.txt, donde pongo el detalle de cada levadura [lev, cepa, citokinesis, pb, fname.ab, (pairs)]. Todos separados por tabs. Pb es el orden en el que se fotobleacheó cada par y puede ser hija madre o madre hija.