

Dvoufotonový mikroskop Bruker Ultima IntraVital

Umístění

Budova Dal / přízemí/ místnost 009 (tel. 2582)

Oddělení Biomatematicy, Fyziologický ústav AV ČR, Areál Krč, Vídeňská 1083, Praha 4

Pravidla provozu

Nahlédněte do dokumentu **General Usage Rules for Confocal Microscopes**

Specifická pravidla provozu

•Chameleon Discovery TPC laser je v neaktivním stavu v tzv. standby módu a nikdy se nevypíná. Ve standby módu je klíček pro zapínání laseru v pozici STADBY a otočením klíčku do pozice LASER ENABLED dojde k zapnutí laseru.

•Zapněte kontrolní stanici přepnutím spínače, který je lokalizován na pravé straně kontrolní stanice.

• Zapněte PC

• Zapněte software Chameleon a zkontrolujte COM porty pro připojení laseru. V softwaru přepněte na externí ovládání laseru, aby software Prairie View mohl přistupovat k ovládání laseru. Důležité: Pokud laser není v COM portech připojen, přestože jste otočili klíčkem do pozice LASER ENABLED, kontaktuje správce systému pro změnu optické cesty a připojení USB z mikroskopu SP8 na mikroskop Bruker Ultima.

•Zapněte Prairie View software.

•Důležité: zkontrolujte pozici páčky pro nastavení optické cesty, pozice BR optická cesta vede do okulárů pro prohlížení vzorku, pozice PMT vede do detektorů pro snímání vzorku. Špatná pozice páčky může vést k poškození detektorů, kontaktujte správce systému pro více informací.

•Po zkontrolování páček a nastavení optické cesty pro Brightfield (BR) můžete nastavit napětí na detektorech.

•Pro současné snímání a fotoaktivaci, kontaktujte správce systému kvůli výměně dichroického zrcátka ve skenovací hlavě

•Otevřete shutter laserového výstupu (laditelný/fixní laser)

•Systém je připraven pro snímání.

Zoohygienická pravidla

Pokud uživatel využívá v experimentu laboratorní zvířata nebo živé buňky je povinen:

1) před transportem zvířat do místnosti 009 Dal:

- a) všechny pracovní plochy otřít běžným saponátem.
 - b) všechny pracovní plochy určené pro manipulaci s laboratorním zvířetem (označeny zeleným proužkem) dále pečlivě povrchově očistit lihem.
 - c) očistit objektiv mikroskopu a přilehlé komponenty diethyletherem.
- 2) Manipulace s laboratorním zvířetem probíhá striktně na pracovních plochách k tomu určených (označené zeleným proužkem).
 - 3) Veškerý spotřební materiál určený na jedno použití (vata, tampony, stříkačky, jehly) je sbírán do určené nádoby (označena zeleným proužkem) a po skončení experimentu je likvidován dle svého charakteru.
 - 4) Nástroje a pomůcky určené pro opakované použití (termostatická podložka apod.) jsou vždy povrchově očištěny a desinfikovány.
 - 5) Po skončení měření tj. po odnesení nebo usmrcení zvířete je uživatel povinen:
 - a) zbavit všechny pracovní plochy a podlahu nečistot a otřít běžným saponátem.
 - b) všechny pracovní plochy určené pro manipulaci s laboratorním zvířetem (označeny zeleným proužkem) pečlivě povrchově očistit desinfekčním vhodným prostředkem s vysokou účinností proti mikroorganismům např. DESAM EFFEKT v doporučené koncentraci 0,5%.
 - c) očistit objektiv mikroskopu a přilehlé komponenty diethyletherem.

Detailní popis dvoufotonového mikroskopu Bruker Ultima IntraVital

1. Mikroskop. Vzpřímený stativ mikroskopu s okuláry, motorizovanou platformou X-Y pro pohyb stativu mikroskopu nad vzorkem (35 x 35 mm skenovací rozsah), motorizovaným stolkem (100 x 50 mm skenovací rozsah, snímání ROI, TileScanů, Mark&Find), motorizovaným ostřením v ose Z, vzdáleným ovládáním X, Y a Z osy jak stolku, tak stativu, piezo posuv v ose Z (rozsah pohybu: 400 μ m), filtry pro epifluorescenci a BR. Mostní platforma s manuálním nastavením roviny ostrosti v krocích o velikosti 6 mm, minimální pozice je 155 mm a maximální pozice je 235 mm. Vyměnitelné vložky mostní platformy pro zvířata, sklíčka a petriho misky.

2. Dostupné objektivy

- Nikon CFI75 25x/1.1 WD=2mm CC – MP1300

3. Skenovací hlava. Dva nezávislé sety X-Y galvanometrických zrcadel v optické dráze. Resonanční skener (8kHz resonanční galvanometr). Rychlost skenování 30 fps při formátu 512x512. Přídavný set X-Y galvanometrů pro možnost současného zobrazení a fotoaktivaci s laserem 1040 nm.

4. Osvětlovací dráha.

- Infra-červený laditelný/fixní pulsní laser Chameleon Discovery TPC (Coherent Inc., CA) s implementovaným akusto-optickým modulátorem (AOM). K dispozici jsou dva výstupy laseru:

- Výstup laditelného laseru – laser je laditelný v rozsahu 680 - 1300 nm (velikost kroku ladění 1 nm), maximální výkon 3.5 W, pulsní frekvence 80 MHz (± 5), šířka pulsu 100 - 120 fs, výkon laseru a intenzita jsou regulovány pomocí AOM.

- Výstup fixního laseru – fixní vlnová délka 1040 nm Fixed output has a wavelength of 1040 nm, maximální výkon 3.5 W, pulsní frekvence 80 MHz (± 5), šířka pulsu 140 fs, výkon laseru a intenzita jsou regulovány pomocí AOM.

- Brightfield a fluorescenční lampa

5. Detekční dráha.

- Dráha v odrazu –dvoukanálový detekční modul se svazky optických vláken, možnost nezávisle nastavit gain a offset.

- 2 vysoce citlivé „gated“ GaAsP detektory s kvantovou výtěžností přes 45% při 550 nm, detekční rozsah 400-750 nm s nízkým šumem a vysokým dynamickým rozsahem.

- Dráha v odrazu –transmisní jednotka

- 1 detektor pro transmisní 2-fotonové světlo, vhodný pro současné snímání s ostatními kanály

- 1 GaAsP detector – vysoce citlivý detektor s kvantovou výtěžností přes 40 % při 550 nm, detekční rozsah 400-750 nm s nízkým šumem a vysokým dynamickým rozsahem.

7. Software. Prairie View pro ovládání stavu mikroskopu/stolku, snímání obrazu (jednotlivé snímky, časoběrné série, z-série, mark and find, tilescany, fotostimulaci, fotoaktivaci and kombinaci zmíněných módů snímání), možnost současného snímání a fotoaktivace. Maximální formát snímání 2048x2048 pixelů.

- Fotostimulace ve 2D módu (line scan, segment scan, spiral scan nebo free hand scan)

- Snímání obrazu s kompenzací intenzity signálu pomocí změny výkonu laseru, nebo napětí na dektorech

- Možnost přístupu k datům pomocí externích softwarů, např.: Matlab

- Software umožňuje snímání FLIM/PLIM

- Spectrální skeny pro detekci odpovědi signálu ze vzorku na různé excitační vlnové délky

Software Coherent pro kontrolu stavu dvoufotonového laseru, laser může být ovládán jak pomocí softwaru Software, tak i pomocí Prairie View.

8. HW moduly a příslušenství. Možnost připojit externí zařízení přes TTL (například pro elektrofyziologii) .

Užitečné odkazy

- [Reservační systém](#) přístrojů FGÚ AV ČR
- [Specifikace optických mikroskopů](#) FGÚ AV ČR
- Informace o přístrojích zahrnutých v projektu [Czech-BioImaging](#)
- [Formulář o zaškolení – interní uživatelé](#) (zahrnuje pravidla pro vstup do místností s laserovými skenovacími mikroskopy FGÚ AV ČR, [templát PDF](#))
- [Formulář o zaškolení – externí uživatelé](#)

- [LAS X Core Offline](#) software pro otevírání souborů Leica formátu
- [Nyquist online calculator](#) pro teoretické kalkulace velikosti pixelu a voxelu

- Fiji (Fiji is Just ImageJ):
Bioformats (former LOCI Tools) [ImageJ](#)
[SLIM Curve](#)
[ImageJ world mailing list](#)

- Interactive dye spectra viewer:
[ThermoFisher](#) (Life Technologies) interactive Spectra Viewer
[Leica FluoScout](#)
[BdBioSciences Spectrum Viewer](#)
[BioLegend SpectraAnalyzer](#)

- [Tables of fluorescent dyes spectra](#)
- Other fluorescence relevant links:
<http://www.leica-microsystems.com/science-lab/fluorescent-dyes/>
<http://works.bepress.com/gmcnamara/9/>