

# UTILISATION DU SPINNING DISK CSU-X1

Démarrer le contrôleur de Température2
Mettre en marche le contrôleur de CO <sub>2</sub> 3
Démarrer le Spinning-Disk4
Observer l'échantillon à l'oculaire5
Échantillonnage spatial, Taille de pixel, dynamique des images6
Acquérir une image7
Acquérir plusieurs couleurs9
Acquérir une image en Dual Camera10
Acquérir une série Z13
Acquérir un timelapse15
Acquérir plusieurs positions de platine16
Acquérir une mosaïque d'images17
Acquérir une mosaïque d'images avec séries Z19
Finalisation de la mosaïque22
Utiliser le Definite focus
Utiliser le système de FRAP24
Éteindre le système27
Éteindre les contrôleurs de CO <sub>2</sub> et de température28

# Démarrer le contrôleur de Température

1- Démarrer le contrôleur de température avec l'interrupteur mural.





2- Choisir la température à atteindre (affichée en vert) à l'aide des boutons fléchés. La température actuelle apparait en rouge.



3- Mettre en place le porte échantillon à utiliser dans l'enceinte chauffée.

Il est important d'allumer la température au moins une heure avant le début de la séance. Une fois votre échantillon en place sur le microscope et vos positions à acquérir enregistrées, pour éviter une perte de focus importante, il faut attendre 1 heure et refaire le focus de vos positions ou utiliser l'autofocus du microscope.

### Mettre en marche le contrôleur de CO<sub>2</sub>

1- Ouvrir les bouteilles d'air comprimé (détendeur argenté) et de CO2 (détendeur doré) dans le sens inverse des aiguilles d'une montre.



2- Allumer le contrôleur de CO<sub>2</sub> (brique rouge) avec l'interrupteur mural.



3- À l'aide de la molette, ajuster la pression du détendeur à air (détendeur argenté) afin d'obtenir 1 bar en sortie (manomètre de droite).



4- Brancher le tuyau transparent vert relié à la sortie du contrôleur CO<sub>2</sub> (MAIN out) sur la réserve d'eau de l'incubateur du microscope. Placer la chambre à CO<sub>2</sub> sur le porte échantillon.



### Démarrer le Spinning-Disk

1- Si besoin allumer la lampe à fluorescence. Vérifier que le bouton Shutter soit en position « *remote* » (pas enfoncé).



2- Allumer tous les éléments du système avec la prise murale « SPINNING DISK »



3- Allumer le contrôleur de la platine piezo à l'arrière.



- 4- Attendre que la LED sur la caméra PRIME soit éteinte et attendre que l'écran tactile du microscope soit entièrement démarré.
- 5- Puis allumer le PC.

# Observer l'échantillon à l'oculaire

1- Démarrer le logiciel MetaMorph avec la caméra choisie.



2- Cliquer sur les icones oculaires pour accéder au Brightfield (en gris) ou à la fluo (en couleur).



3- Sur le microscope, vérifier que le bouton est tourné vers les oculaires.



4- Baisser l'objectif à l'aide des mollettes sur le microscope. Puis dans le logiciel MetaMorph choisir l'objectif à utiliser. Ne pas changer l'objectif sur l'écran tactile ou sur les boutons du microscope.



- 5- Mettre en place le porte échantillon doucement pour ne pas abimer la platine piezo.
- 6- Placer l'échantillon et faire la mise au point.

# Échantillonnage spatial, Taille de pixel, dynamique des images

Objectif	Taille de pixel image (nm)	Taille du champ (μm)
100x	91	103 x 76
63x	145	164 x 121
40x	229	259 x 191
25x	366	414 x 305
10x	916	1036 x 763

Taille de pixel de l'image et du champ d'observation de la caméra en fonction de l'objectif

Echantillonnage spatial optimum :

Voir le tableau dans la pièce

#### Dynamique de l'image

L'intensité des pixels de l'image ne doit jamais dépasser 65520 niveau de gris avec les caméras PRIME.

La dynamique de l'image est la différence entre l'intensité maximum et l'intensité minimum (dans cet exemple : 55675-1137=54538 niveaux).

Si la dynamique de l'image est trop faible, augmentez le temps d'exposition, ou la puissance du laser.

Attention! Plus on éclaire un échantillon, plus on le photoblanchie. Choisissez le bon compromis entre la qualité du signal et la préservation de l'échantillon.

¥ Scale Image 📃 🗖 🗙
Image: Live Close
Range: Image Min/Max
Settings
✓ Auto scale
Low %: 0 📚 High %: 0 📚
Scale within the active region
Gray level minimum and maximum values Current plane 1137 - 55675 Entire stack: Nanes
Calculate Stack Min/Max
Copy to 8-bit image           Image         Copy           Transfer filename when copying         Copy entire stack

#### Acquérir une image

1- Démarrer le logiciel *MetaMorph* avec l'icône PRIME.



- 2- Sur le microscope, tourner la sécurité pour fermer les oculaires sur le devant du microscope
- 3- Dans MetaMorph, cliquer sur l'icône PRIME puis choisir le miroir dichroïque approprié parmi ceux proposés.





4- Ouvrir la fenêtre « *Multi Dimensional Acquisition* », cliquer sur l'onglet « *Main* » et vérifier que seul « *Use Dual Z Motor* » est sélectionné.

SY N	/ulti Dimensional Ac	quisition	
Ma	ain		
_	Saving	Timelapse	Summary
	Wavelength	Multiple Stage Positions	
	Display	Multiple Wavelengths	Save State
	Summary	Z Series	Load State
		C Stream	
		🔲 Run Journals	
		Use Dual Z Motors Configure	
		Hardware Auto Focus: Off	

5- Dans l'onglet « Saving », cliquer sur « Select Directory... » et sélectionner le chemin suivant :
 D: (Users / année / mois en cours / jour de la manip / dossier à votre nom)
 Les images sauvées dans un autre répertoire ou datant de plus de 15 jours sont effacées automatiquement et sans préavis.

Ma Wulti Dimensional Acc	quisition		
Main	Description: *Ima	ages automatically saved with base file	
Saving	Multi Dimensions Exp	periment	*
Wavelength			
Display			Ŧ
Summary	Select Directory	D:\Users\2016\May\19\name Increment base name if file exists experience_01	_

6- Dans la fenêtre « *Base Name* », indiquer le nom de la série d'image suivi de 01 qui sera incrémenté automatiquement. Les images seront sauvegardées automatiquement à la fin de l'acquisition.

7- En bas de la fenêtre, mettre le Binning de la caméra à 1.

Cliquer sur « Full chip » le carré vert de gauche pour utiliser tout le champ de la caméra.

					<b>4</b> P	revious	Next				
🗯 Bin:	1 3	Bir	: <b>1</b>		1:CS	U GFP	<b>–</b>	i 🛱	Acquire	Close	

#### 8- Cliquer sur l'onglet « Wavelength »

Sid N	/lulti Dimensional Ac	quisition		
M	ain Saving <b>Wavelength</b> Display Summary	Illumination: Gain: Digitizer: Exposure:	CSU GFP   Gain 2 (1x)  10 MHz  200  ms	
		Auto Expose: Auto Focus:	No Auto Expose 💽	Target Intensity: 3000 – Configure

- 9- Dans la fenêtre « *Illumination* », choisir le type d'illumination (BF; DIC) ou le filtre d'émission pour la fluo (Dapi, GFP, GFP narrow, RFP, Cy5).
- 10- Dans la fenêtre « *Exposure* », choisir le temps d'exposition.
- 11-Vérifier que les fonctions d' « Auto Focus » et d' « Auto Expose » ne sont pas activées.
- 12- Régler la puissance du laser correspondant au filtre choisi.
- 13- Régler le focus du microscope à l'aide de la molette ou des boutons
- 14- Vous pouvez déplacer la platine à l'aide du joystick ou des boutons
- 15- Vérifier la dynamique de l'image (Voir chapitre). Ajuster la puissance laser et le temps d'exposition en conséquence.
- 16- Cliquer sur « Acquire » pour acquérir l'image.



HLasers Spinning



#### Acquérir plusieurs couleurs

1- Dans l'onglet « Main » de la fenêtre « MDA » cocher « Multiple Wavelengths ».

522 N	/ulti Dimensional Ac	- • •	
Ma	ain		
	Saving	Timelapse	Summary
Wavelengths		Multiple Stage Positions	
	W1: CSU GFP	✓ Multiple Wavelengths	Save State
	W2: CSU RFP	Z Series	Load State
	W3: CSU CY5	Stream	Load State

2- Cliquer sur l'onglet « Wavelengths » et choisir le nombre de marquages à observer.

Sé N	/ulti Dimensional Acc	auisition 📃 🗖 🗖 🗮
М	ain Saving Wavelengths W1: CSU GFP W2: CSU RFP	Number of Wavelengths: 2 : Allow separate hardware memorized AF positions for each wavelength Allow separate binning for each wavelength

3- Pour chaque onglet (W1, W2,...) créé, dans la fenêtre « *Illumination* », choisir le type d'illumination (BF; DIC) ou le filtre d'émission pour la fluo (CSU).

1ain	Illumination:	
Saving	-	
Wavelengths	Gain:	Gain 1 (1x)
W1: CSU GFP	Digitizer:	100 MHz (16-bit)
W2: CSU RFP	Exposure:	100 🚖 ms 🗸
Display		Target Intensity
Summary	Auto Expose:	No Auto Expose
	Auto Focus:	No Auto Focus 🔹 2 📩 Configure
	Alignment Crop	ping X: 0 🚖 Y: 0 🖨 Set Alignment)

- 4- Choisir la même valeur de « Gain » et « Digitizer » de la caméra pour tous les canaux.
- 5- Choisir une puissance laser et un temps d'exposition (qui peut être différent) pour chaque canal.
- 6- Cliquer sur « Acquire » pour acquérir les images.

# Acquérir une image en Dual Camera

1- Démarrer le logiciel *MetaMorph* avec l'icône PRIME.



- 2- Sur le Spinning Disk, tirer le miroir pour utiliser les deux caméras.
- 3- Dans MetaMorph, cliquer sur l'icône PRIME DUAL puis choisir le miroir dichroïque approprié parmi ceux proposés.



4- Ouvrir la fenêtre « *Multi Dimensional Acquisition* », cliquer sur l'onglet « *Main* » et vérifier que seul « *Use Dual Z Motor* » est sélectionné.

Si2 N	/lulti Dimensional Ac	quisition	- • •
Ma	ain		
_	Saving	Timelapse	Summary
	Wavelength	Multiple Stage Positions	
	Display	Multiple Wavelengths	Save State
	Summary 🔽 Series		Load State
		T Stream	
		🔲 Run Journals	
		Jse Dual Z Motors Configure	
		Hardware Auto Focus: Off	

5- Dans l'onglet « Saving », cliquer sur « Select Directory... » et sélectionner le chemin suivant :
 D: (Users / année / mois en cours / jour de la manip / dossier à votre nom)
 Les images sauvées dans un autre répertoire ou datant de plus de 15 jours sont effacées automatiquement et sans préavis.

SZ N	/lulti Dimensional Ac	quisition		- • •
Main Saving Wavelength		Description: *Ima Multi Dimensions Exp	ages automatically saved with base file* eriment	
	Summary	Select Directory Base Name:	D:\Users\2016\May\19\name Increment base name if file exists experience_01	

- 6- Dans la fenêtre « *Base Name* », indiquer le nom de la série d'image suivi de 01 qui sera incrémenté automatiquement. Les images seront sauvegardées automatiquement à la fin de l'acquisition.
- 7- En bas de la fenêtre, mettre le Binning de la caméra à 1.

Cliquer sur « Full chip » le carré vert de gauche pour utiliser tout le champ de la caméra.



8- Cliquer l'onglet « Main » de la fenêtre « MDA » cocher « Multiple Wavelengths ».

SYA N	Multi Dimensional Acquisition					
Ma	ain					
_	Saving	Timelapse	Summary			
	Wavelengths	Multiple Stage Positions				
	W1: CSU GFP	✓ Multiple Wavelengths	Save State			
	W2: CSU RFP	Z Series	Load State			
	W3: CSU CY5	Stream				

9- Cliquer sur l'onglet « *Wavelengths* » et choisir 2 marquages à observer.



10- Dans chaque onglet (W1 et W2) créé, dans la fenêtre « *Illumination* », choisir le même type filtre d'émission pour la fluo (CSU) et le même temps d'exposition.

III Multi Dimensional Acc	Multi Dimensional Acquisition							
Main	Illumination:	CSU GFP RFP 👻						
Wavelengths	Gain:	Gain 1 (1x)						
W1: CSU GFP R	Digitizer:	100 MHz (16-bit)						
W2: CSU GFP R	Exposure:	200 💌 ms 🔻						

- 11-Vérifier que les fonctions d' « Auto Focus » et d' « Auto Expose » ne sont pas activées.
- 12- Régler la puissance du laser correspondant au filtre choisi.
- 13- Régler le focus du microscope à l'aide de la molette ou des boutons
- 14- Vous pouvez déplacer la platine à l'aide du joystick ou des boutons
- 15- Vérifier la dynamique de l'image (Voir chapitre). Ajuster la puissance laser et le temps d'exposition en conséquence.
- 16- Cliquer sur « Acquire » pour acquérir l'image.

ter la puissance laser et le temps





X: 5321.40 Y: 3543.31

#### Acquérir une série Z

1- Dans l'onglet « Main » de la fenêtre « MDA » cocher « Z Series ».

S22 N	Multi Dimensional Acquisition						
Ma	ain						
_	Saving	Timelapse	Summary				
	Wavelength	Multiple Stage Positions					
	Z Series	Multiple Wavelengths	Save State				
	Display	V Z Series	Load State				
	Summary	Stream					
		🔽 Run Journals					
		Use Dual Z Motors Configure					
		Hardware Auto Focus: Off					

Dans l'onglet « *Z Series* » Il existe deux moyens de définir votre série Z. Soit en définissant l'image actuelle comme étant le centre du stack, soit en choisissant le haut et le bas de votre stack.

#### Pour définir l'image actuelle comme étant le centre du stack.

2-	Cocher	« Range	Around	Current ».
----	--------	---------	--------	------------

Mata Dimensional A	equisition				
lain Saving	Interactive setting Current Position:	)s  0	÷	micronIncrement: 0.5	
Wavelength					
Z Series	- Settings for acqui	sition serie	s —	etane	
Display	j♥ Neep shutter	open betw		aleps	
Summary	Range:	9	÷	Range Around Current	
	Top:	14.1	- A-	Set Top To Current	
	Bottom:	5.1	* *	Set Bottom To Current	
	Step Size:	0.6	÷	Center Around Current	
	Number of Steps:	16	÷		
	Recommended Ste	p Size: 0.6	um		

3- Attention ! Vérifier que la valeur de « *Current Position* » est à 0 µm et choisir un incrément de déplacement en live « *microIncrement* ».

Utiliser les flèches de « Current Position » pour déplacer l'objectif jusqu'au plan central.

- 4- Définir la distance entre deux acquisitions en Z « Step Size ».
- 5- Choisir le nombre de coupes à acquérir « Number of Steps ».

#### Pour définir les extrémités haute et basse du stack

🔛 Multi Dir	mensional Acq	uisition			- • •
Main Saving Wavelength		Interactive settings Current Position:	4 -	micronIncrement: 0.5	
Z Seri	es	Settings for acquis	ition series — pen between	steps	
Sumn	nary	Range:	9 _	Range Around Current	
		Top:	5 ÷	Set Top To Current	
		Bottom:	4	Set Bottom To Current	
		Step Size:	0.6 ÷	Center Around Current	
		Number of Steps:	16 ÷		
		Recommended Step	Size: 0.6 um		

2- Décocher « Range Around Current ».

3- En utilisant les flèches de « *Current Position* » déplacer l'objectif jusqu'à la limite supérieure de la région de l'échantillon à imager et cliquer sur « *Set Top to Current* ».

4- En utilisant les flèches de « *Current Position* » déplacer l'objectif jusqu'à la limite inférieure de la région de l'échantillon à imager et cliquer sur « *Set Bottom to Current* ».

5- Définir la distance entre deux acquisitions en Z « *Step Size* ». Le nombre de plans est défini automatiquement en cliquant sur la case « *Number of Steps* ».

6- Lancez l'acquisition en cliquant sur "Acquire"

#### Remarques :

- Les réglages de temps d'exposition et de puissance laser doivent être effectués dans le plan le plus intense de l'échantillon.

- En cas d'acquisition de séries Z multi-couleurs sur des échantillons fixés, cocher les cases

« Acquire Z series for one wavelength at a time » et « Keep shutter open between steps ».

- En cas d'acquisition rapide de séries Z multi-couleurs sur des échantillons vivants, cocher la case « Acquire wavelength set at each Z ».

Settings for acquisition series Loop order O Acquire wavelength set at each Z O Acquire Z series for one wavelength at a time V Keep shutter open between steps

### Acquérir un timelapse

1- Dans l'onglet « Main » de la fenêtre « MDA » sélectionner « Timelapse ».

Multi Dimensional A	cquisition	
lain		
Saving	✓ Timelapse	Summary.
Timelapse	Multiple Stage Positions	
Wavelength	Multiple Wavelengths	Save State
Display	Z Series	Load State
Summary	T Stream	Load State
	🔲 Run Journals	
	✓ Use Dual Z Motors Configure	
	Hardware Auto Focus: Never 🗨 2 🚊	

2- Dans l'onglet « *Timelapse* » sélectionner le nombre de point de temps à réaliser ainsi que l'intervalle de temps souhaité.

SZ N	Iulti Dimensional Acc	quisition					×
M	ain Saving <b>Timelapse</b> Wavelength	Experiment Length Number of time points Duration:	145	] ] hr	•		
	Display Summary	Time Interval: Estimated minimum int	5 ;	min n	•		

Attention : Vérifier que l'intervalle de temps choisi est suffisant pour faire l'acquisition (temps d'exposition + temps de lecture + temps de sauvegarde de l'image).

3- Cliquer sur « Acquire » pour acquérir les images.

#### Acquérir plusieurs positions de platine

1- Dans l'onglet « Main » de la boite « MDA » sélectionner « Multiple Stage Positions ».

Multi Dimensional Acc	- • •	
Main Saving	☐ Timelapse ☑ Multiple Stage Positions	Summary

2- Dans l'onglet « *Stage* » de la boîte « *Multi Dimensional Acquisition* »: Le nom de la position est affiché dans la fenêtre « *Position Label* ».

SI N	/lulti Dimensional Ac	quisition	- • •
м	ain	Position Label:	
	Saving	Pos8	
	Stage	X: 4887.48 🛨	
	Wavelength	Y: 3372.16 -	
	Display	7 0.698 V Move to memorized auto focus positi	ion
	Summary	2) 0 •	
		Offset Z for travel to this position 0	
		Positions:	Distance: 1359.11
		Pos2 (4949.75, 3406.85, 0.698, 0, AF memorized=no) Pos1 (4921.6, 2542.21, 0.698, 0, AF memorized=no)	•
		<ul> <li>Pos3 (5014.96, 3187.92, 0.698, 0, AF memorized=no)</li> </ul>	
		Pos4 (5124.32, 2995.42, 0.698, 0, AF memorized=no) Pos5 (5217.32, 3221.12, 0.698, 0, AF memorized=no)	
		Pos6 (5142.32, 3336.94, 0.698, 0, AF memorized=no)	/•
		▲ 1 057 (4570.40, 5550.54, 0.050, 0, Ar memorized=no)	o'
		Move to Position Sort	Load Save
		Use advanced stage position/wavelength table acquisition	parameters

- 3- Le nom de la position ainsi que ses coordonnées X, Y et Z apparaissent alors dans la fenêtre « *Positions* ».
- 4- Les boutons sur la gauche de la fenêtre permettent d'ajouter, déplacer et supprimer des positions. Vous pouvez trier les positions pour choisir le chemin le plus court les reliant en cliquant sur le bouton « *Sort* ».
- 5- Cliquer sur « Acquire » pour acquérir les images.

### Acquérir une mosaïque d'images

1- Dans le menu « Apps », sélectionner « Scan Slide »

Log Measure Journal	Apps ZScanSlide Window Help	
Lasers Spinning	Scan Slide	- 🔗 👪 👪 👫 👫 Mag: 100x Oil
	Cell Cycle Cell Scoring	

2- Dans l'onglet « Main », Choisir le dossier de destination et le nom du fichier.

😭 Scan Slide	
Main Acquisition W1: CSU BF Run Journal Calibration Slide Area Data Review	Main   Load Settings   Scan magnification:   100x Oil   Description:   Scan Slide
-	Save directory:       Select       D:\Data\2019\March\04\Maite FRAP         Base name:       H4NabAz02_Z01       Increment base name if file exists         Live       Snap       Save Settings       Scan       Close

3- Dans la fenêtre Scan slide et l'onglet « *Acquisition* » sélectionner le nombre de longueurs d'onde à imager et faire les réglages pour chacune dans l'onglet qui lui correspond.

😭 Scan Slide		- • ×
Main Acquisition	Acquisition	
W1: CSU GFP W2: CSU RFP	Number of wavelengths: 2	
Run Journal Calibration	Shading correction     Acquire Shading Image     Acquire Shading Image	3
Slide Area Data Review	Based on magnification and illumination settings     Select Directory     C:\MM\IMAGES	

4- Dans l'onglet « Run Journal », vérifier qu'aucun journal n'est présent.

5- Dans l'onglet « Calibration », vérifier qu'une calibration est bien présente. Sinon la faire de nouveau en cliquant sur « *Calibrate* ».

Scan Slide		3
Main Acquisition W1: CSU GFP W2: CSU RFP Run Journal Calibration Slide Area Data Review	Calibration Image to stage calibration and orientation: Calibrate X [microns/pixel]: 0.0935977 Y [microns/pixel]: 0.0935977 Angle: 2.03879 Stage X increases in the opposite direction than the image	
	Stage Y increases in the same direction as the image	

- 6- Dans l'onglet « Slide Area » :
  - A- Se mettre en « *live* » et déplacer l'échantillon jusqu'au bord en haut à gauche de votre champ d'intérêt. Cliquer sur « *Set to Current* »
  - B- Déplacer ensuite l'échantillon jusqu'au bord en bas à droite de votre champ d'intérêt. Cliquer sur « *Set to Current* ».
  - C- Cliquer sur « Scan »

in	Slide Area
Acquisition	Upper left
W1: CSU GFP	X: -18753 🐥 Y: 1724.36 🚔 🗛 Set to Current Move to
W2: CSU RFP	
Run Journal	Lower right
Calibration	X: -19084.1 Y: 1937.46 Set to Current Move to
Slide Area	
Data Review	Number of images in scan X: 6, Y: 4, Total: 24
	Disk space required for scan: 48.07 MB
	The stage can be centered on the position of the mouse by clicking on the live image with the <ctrl> key down</ctrl>

#### Acquérir une mosaïque d'images avec séries Z

1- Sélectionner dans le menu « ZScanSlide » l'option « Setup ZScanslide in MDA »



2- Une fenêtre d'instruction s'ouvre. Cliquez sur « Continue »



3- Dans la fenêtre « *Scan slide* » et l'onglet « *Acquisition* » sélectionner le nombre de longueurs d'onde à imager et faire les réglages pour chacune dans l'onglet qui lui correspond.

Stan Scan	Slide		- • •
Main Ac	quisition W1: CSU GFP W2: CSU RFP	Acquisition Camera binning: 1	
Ca Sli Da	Run Journal Ilibration de Area ıta Review	Shading correction     Sased on magnification setting     Based on magnification and illumination settings     Select Directory     C:\MM\IMAGES	

4- Dans l'onglet « *Calibration* », vérifier qu'une calibration est bien présente sinon la faire de nouveau en suivant les instructions à l'écran.

😭 Scan Slide			
Main Acquisition W1: CSU GFP W2: CSU RFP Run Journal Calibration Slide Area Data Review	Image to stage calibri Calibrate X [microns/pixel]: Y [microns/pixel]: Angle: Stage X increases in Stage Y increases in	Calibration ration and orientation: 0.0935977 0.0935977 2.03879 In the opposite direction than the image In the same direction as the image	

- 5- Dans l'onglet « *Slide Area* » :
  - A- Se mettre en « *live* » et déplacer l'échantillon jusqu'au bord en haut à gauche de votre champ d'intérêt. Cliquer sur « *Set to Current* »
  - B- Déplacer ensuite l'échantillon jusqu'au bord en bas à droite de votre champ d'intérêt. Cliquer sur « *Set to Current* ».

🕎 Scan Slide	
Main	Slide Area
Acquisition	Upper left
W1: CSU GFP	X: -18753 👻 Y: 1724.36 🖨 🗛 Set to Current Move to
W2: CSU RFP	
Run Journal	Lower right
Calibration	X: -19084.1 Y: 1937.46 🖨 BSet to Current Move to
Slide Area Data Review	Number of images in scan X: 6, Y: 4, Total: 24 Scan Disk space required for scan: 48.07 MB The stage can be centered on the position of the mouse by clicking on the live image with the <ctrl> key down</ctrl>
	Live Snap Save Settings C Scan Close

C- Cliquer sur « Scan »

6- Dans la fenêtre MDA, décocher tout sauf « Z-Series », « Run Journals », « Use Dual Z Motors »

Multi Dimensional Ac	quisition	- • •
Main		
Saving	Timelapse	Summary
Wavelength	Multiple Stage Positions	
Z Series	Multiple Wavelengths	Save State
Journal	✓ Z Series	Load State
Display	Stream	Lood State
Summary	🕼 Run Journals	
	Use Dual Z Motors Configure	

7- Dans l'onglet « Saving », cliquer sur « Select Directory... » et sélectionner le chemin suivant :
 D: (Users /année / mois en cours / jour de la manip / dossier à votre nom)

Les images sauvées dans un autre répertoire ou datant de plus de 15 jours sont effacées automatiquement et sans préavis.

Multi Dimensional A	cquisition	
Main	Description: *Images automatically saved with base	e file*
Saving	Multi Dimensions Experiment	A
Wavelength		
Z Series		Ψ
Journal	Select Directory D:\Data	
Display	■ Directory D. Data Increment base name if file exists	ists
Summary	Base Name: experience_01	

- 8- Dans l'onglet « *Z Series* », définir votre z-stack (cf p12)
- 9- Vérifier que deux journaux sont bien présents dans l'onglet « Journal »

Multi Dimensional Ac	quisition	
Main	Journal	Tupe Initial Point Interval
Saving	MDA scan Special	💌 Before each imag 💌
Wavelength	setup for scan slide in MDA Special	✓ Start of acquisitior
Z Series		
Journal	×	
Display		

10- Cliquer sur « Acquire »

# Finalisation de la mosaïque

- 1- Dans la fenêtre « Scan Slide » :
  - A- Sélectionner « File »
  - B- Ouvrir la mosaïque à finaliser
  - C- Sélectionner les longueurs d'ondes à afficher
  - D- Cliquer sur « Show image »

### Utiliser le Definite focus

1- Faire la mise au point sur l'échantillon puis choisir dans l'onglet « *Main* » la fréquence du definite focus.

🔜 Multi Dimensional Ac	quisition	- • •
Multi Dimensional Ac Main Saving Timelapse Stage Wavelength Display	Image: Comparison of the state of the s	Summary Save State Load State
Summary	<ul> <li>Run Journals</li> <li>Use Dual Z Motors</li> <li>Hardware Auto Focus:</li> <li>Every Time Point</li> <li>Every Time Point</li> <li>First Time Point</li> <li>Never</li> <li>Every Nth TimePoint</li> </ul>	

2- Si vous utilisez plusieurs positions, cocher « *Move to memorized auto focus position* » puis ajouter les différentes positions. Vérifiez que l'autofocus est activé sur chacune des positions « *AF memorized=yes* ».

Multi Dimensional Act	quisition
Main Saving Timelapse Stage Wavelength Display Summary	Position Label:         Pos4         X:       -5095.49 ◆         Y:       2702.52 ◆         Z:       5198.14 ◆         ♥ Move to memorized auto focus position         Z2:       0         ♥ Offset Z for travel to this position       0
	Positions:       Distance: 6295.75         Pos2 (1199.42, 2806.51, 5167.7, 0, AF memorized=yes)       Pos3 (-5095.47, 2702.52, 5198.14, 0, AF memorized)         Pos3 (-5095.47, 2702.52, 5198.14, 0, AF memorized)       Pos3 (-5095.47, 2702.52, 5198.14, 0, AF memorized)         Note       Pos3 (-5095.47, 2702.52, 5198.14, 0, AF memorized)       Distance: 6295.75         Move to Position       Sot       Load       Save         Use advanced stage position/wavelength table acquisition parameters

### Utiliser le système de FRAP

#### Démarrer le système FRAP :

1- Dans « *MetaMorph* », sélectionner la caméra de votre choix avec le FRAP.



PRIME + FRAP

2- Démarrer « *ILAS*<sup>2</sup> » en cliquant sur l'icône dans les menus de « *MetaMorph* ».



3- Dans l'onglet « *ILAS*<sup>2</sup> », cocher « *MDA* » et « *FRAP* ».

Las <sup>2</sup>	Targeted Laser On Fly MDA	<ul> <li>✓ Always on top</li> <li>□ Help</li> <li>✓ Hardware</li> </ul>
Calibration	FRAP	
FRAP	© FLIP	
	Photo-Activation	Load All Parameters
	TIRF	Save All Parameters
		Screenshots

#### Calibrer le laser :

- 4- Utiliser la lame de calibration, avec l'objectif choisi, se mettre en live et se placer au focus.
- 5- Dans l'onglet « *Calibration* » mettre l'intensité du laser de FRAP a 1% et activer le laser avec le bouton (A).
- 6- À l'aide de la croix en rouge déplacer le faisceau à l'extrémité en haut à gauche puis cliquer sur l'icône en forme de flèche (B). Refaire de même pour l'extrémité en bas à droite (C).
- 7- Lancer la calibration (D).

Calibration FRAP	+++++ +++ +++++ ++++++++++++++++++++++	Calibration Active Calibration 63x oil.12 Calibration 63x oil.12 Calibration
Region #1 added		v1.2.0

Choisir les régions d'intérêts à photoblanchir:

8- Sur votre échantillon faire un « *SNAP* » et sélectionner les régions de votre échantillon à photoblanchir avec l'outil ROI. La dernière icône permet de définir une taille fixe de région.



9- Dans l'onglet « *Targeted Laser* » ajouter toutes les zones que vous avez tracées sur l'image en cliquant sur la flèche à côté du bouton vert (E). Choisir la puissance laser à utiliser et le nombre de répétitions (F).



CSU-X1\_V9 08/2021

#### Paramétrer l'expérience de FRAP:

10- Dans l'onglet « *FRAP* » rentrer une valeur de durée et d'intervalle entre chaque image pour la séquence avant le FRAP et après le FRAP. Choisir l'unité de temps de ces valeurs.

iLas <sup>2</sup>	24 ms	/		#1	Pre Sequence Time Points Pre Post Sequence Time Points 1 Cycle 1
TIMP	MDA Time Settings		Duration	Interval	Time Unit seconds
	Perturbation Post Sequence	<ul><li>✓ #1</li><li>✓ #2</li></ul>	0.0240 360.00 ÷	0.50 +	
		<b>□</b> #3	1.00 ÷	1.00 ÷	Setup MDA

11- Cliquer sur « Setup MDA » en bas à droite pour activer votre expérience dans l'onglet « journal » de « MetaMorph ».

6403		Journal	111	Tupe		Initial Point Inter-
Saving		ILAS_StartOfTimePoint		Special	-	Start of time point
Timelapse	<u> </u>	ILAS_EndOfTimePoint		Special		End of time point
Wavelength						
Journal	×					
Display						
22 02 72						

Vérifier que l'onglet « *Journal* » dans la fenêtre « *Multi Dimensional Acquisition* » du logiciel « *MetaMorph* » est activé et ne contient que deux lignes.

12- Démarrer votre expérience de FRAP en cliquant sur le bouton « *Acquire* » en bas de la fenêtre « *Multi Dimensional Acquisition* ».

# Éteindre le système

Regarder sur le planning si le système est utilisé après votre session.

Si le système est utilisé :

- 1- Baisser les objectifs et Vérifier que tous les objectifs soient bien nettoyés (lentille + côtés) ainsi que la platine et le porte objet.
- 2- Fermer MetaMorph.
- 3- Transférer les données.

#### Si le système n'est pas utilisé :

- 1- Baisser les objectifs et Vérifier que tous les objectifs soient bien nettoyés (lentille + côtés) ainsi que la platine et le porte objet.
- 2- Fermer MetaMorph.
- 3- Transférer les données et éteindre le PC
- 4- Eteindre le controleur de la platine
- 5- Éteindre le système avec l'interrupteur mural.



6- Éteindre la lampe à fluorescence

# Éteindre les contrôleurs de CO<sub>2</sub> et de température

1- Enlever la chambre à CO<sub>2</sub> du porte échantillon et la poser sur la table anti-vibration pour éviter de casser la vitre.



2- Débrancher le tuyau cristal vert relié à la sortie du contrôleur CO<sub>2</sub> (MAIN out) sur la réserve d'eau de l'incubateur du microscope.



3- Éteindre le contrôleur de CO<sub>2</sub> et de température en appuyant sur le bouton mural.



4- Fermer les bouteilles d'air comprimé (détendeur argenté) et de CO2 (détendeur doré) dans le sens des aiguilles d'une montre.

