



UTILISATION DU SPINNING DISK CSU-X1

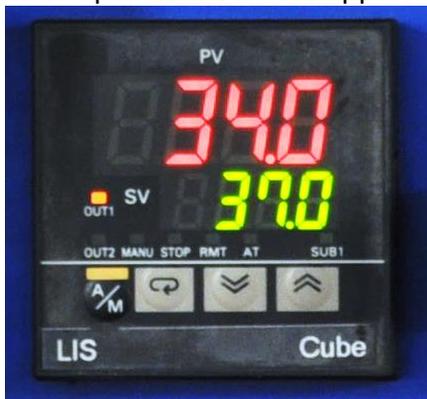
Démarrer le contrôleur de Température	2
Mettre en marche le contrôleur de CO ₂	3
Démarrer le Spinning-Disk	4
Observer l'échantillon à l'oculaire	5
Échantillonnage spatial, Taille de pixel, dynamique des images	6
Acquérir une image	7
Acquérir plusieurs couleurs.....	9
Acquérir une image en Dual Camera	10
Acquérir une série Z	13
Acquérir un timelapse	15
Acquérir plusieurs positions de platine.....	16
Acquérir une mosaïque d'images.....	17
Acquérir une mosaïque d'images avec séries Z	19
Finalisation de la mosaïque.....	22
Utiliser le Definite focus	23
Utiliser le système de FRAP	24
Éteindre le système	27
Éteindre les contrôleurs de CO ₂ et de température	28

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 apparaît 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 CO₂

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



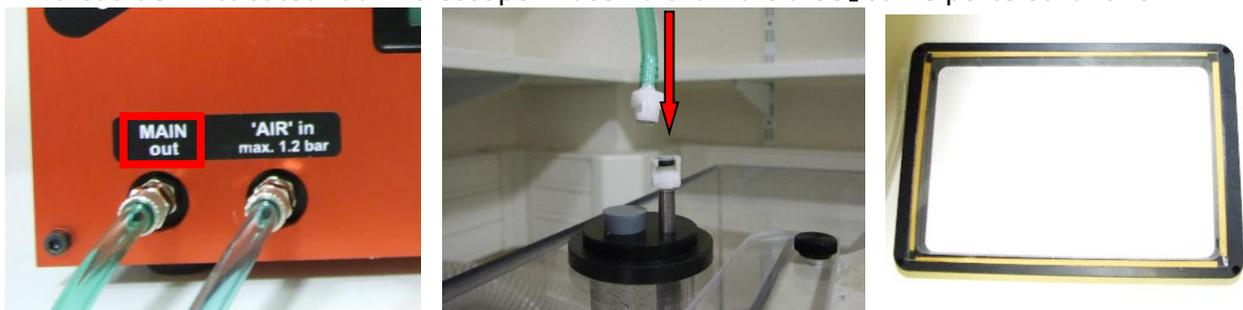
- 2- Allumer le contrôleur de CO₂ (brique rouge) avec l'interrupteur mural.



- 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 CO₂ (MAIN out) sur la réserve d'eau de l'incubateur du microscope. Placer la chambre à CO₂ 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.



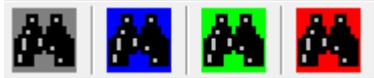
- 4- Attendre que la LED sur la caméra PRIME soit éteinte et attendre que l'écran tactile du microscope soit entièrement démarré.
- 5- Puis allumer le PC.

Observer l'échantillon à l'oculaire

1- Démarrer le logiciel *MetaMorph* avec la caméra choisie.



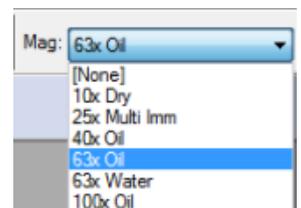
2- Cliquer sur les icônes oculaires pour accéder au Brightfield (en gris) ou à la fluo (en couleur).



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

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

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

Echantillonnage spatial optimum :

Voir le tableau dans la pièce

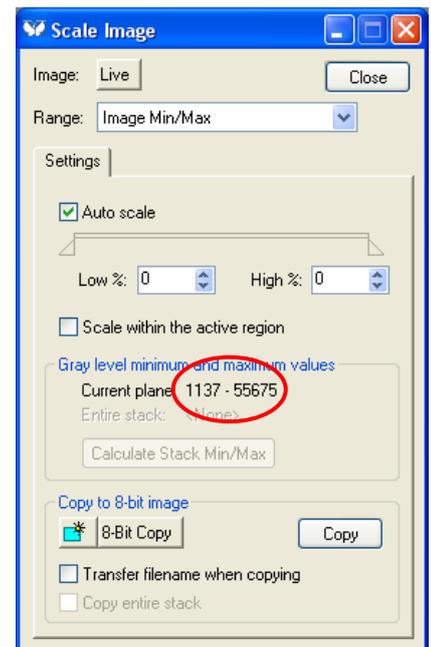
Dynamique de l'image

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.

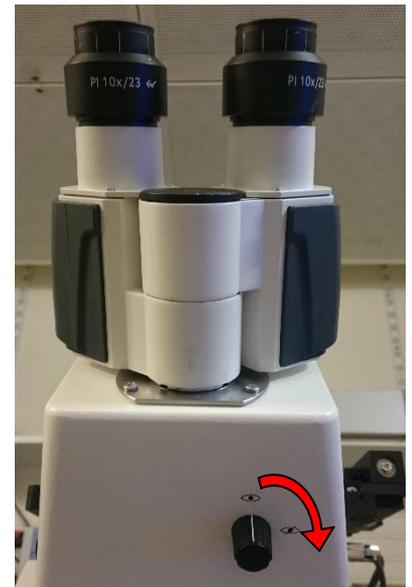


Acquérir une image

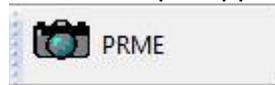
- 1- Démarrer le logiciel *MetaMorph* avec l'icône PRIME.



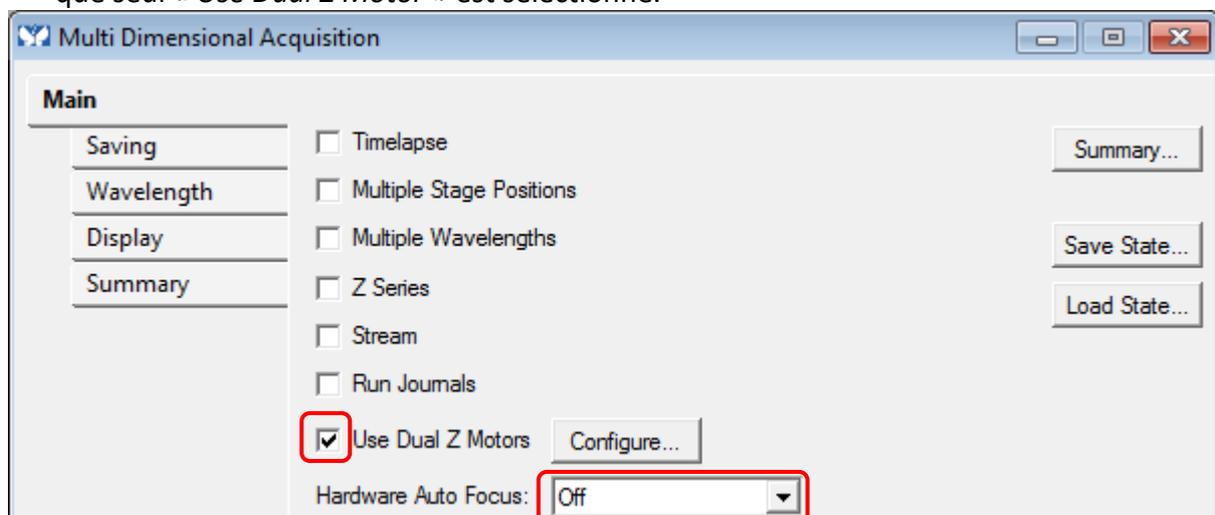
- 2- Sur le microscope, tourner la sécurité pour fermer les oculaires sur le devant du microscope



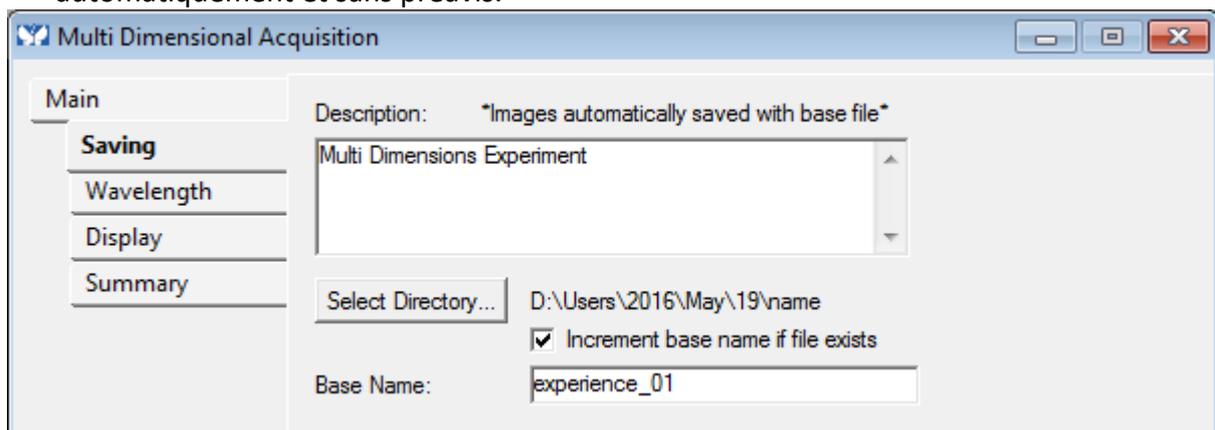
- 3- Dans MetaMorph, cliquer sur l'icône PRIME puis choisir le miroir dichroïque approprié parmi ceux proposés.



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



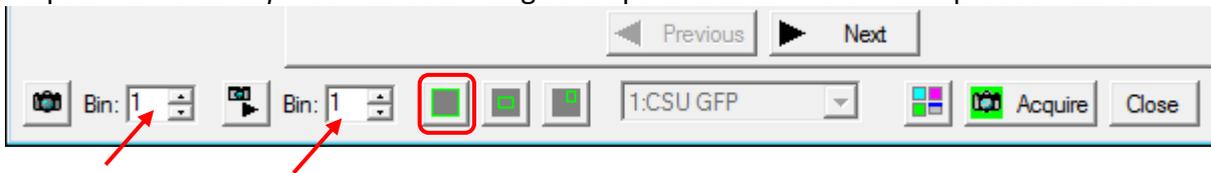
- 5- Dans l'onglet « *Saving* », cliquer sur « *Select Directory...* » et sélectionner le chemin suivant :
D: (Users / année / mois en cours / jour de la manip / dossier à votre nom)
Les images sauveés dans un autre répertoire ou datant de plus de 15 jours sont effacées automatiquement et sans préavis.



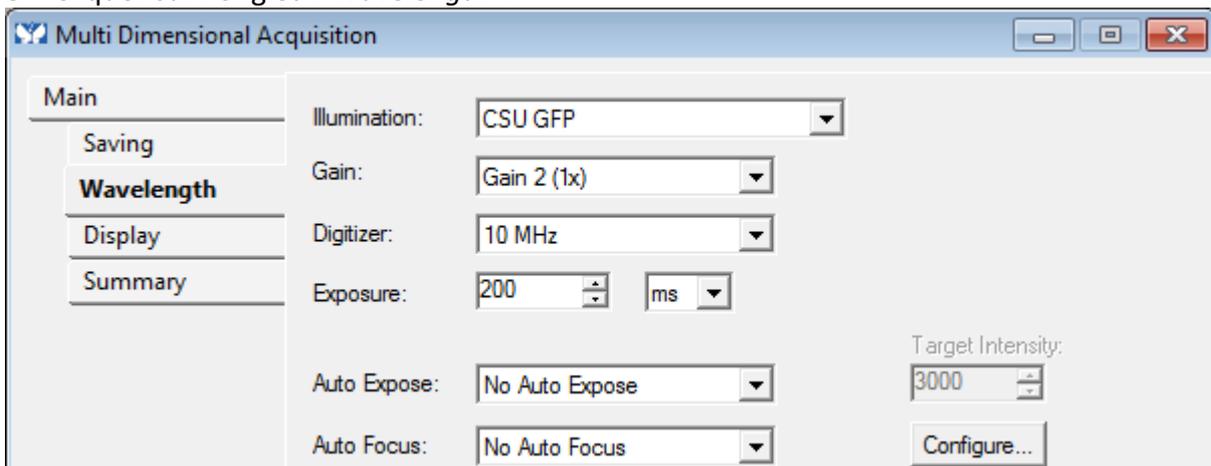
6- Dans la fenêtre « *Base Name* », indiquer le nom de la série d'image suivi de 01 qui sera incrémenté automatiquement. Les images seront sauvegardées automatiquement à la fin de l'acquisition.

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 sur l'onglet « *Wavelength* »



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.

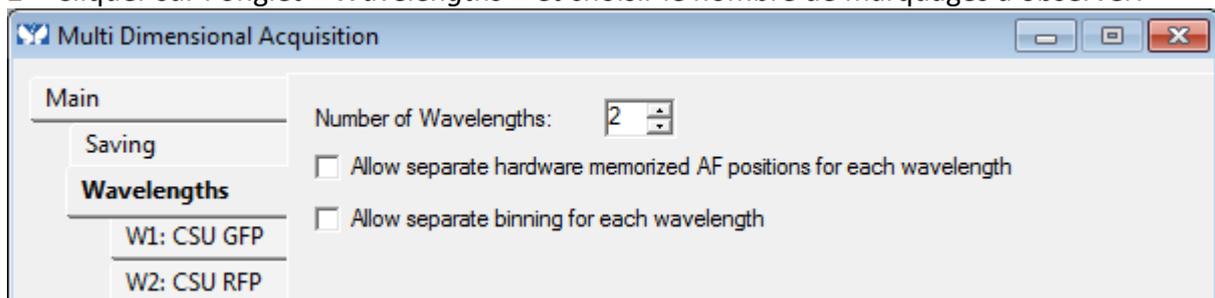
16- Cliquer sur « *Acquire* » pour acquérir l'image.

Acquérir plusieurs couleurs

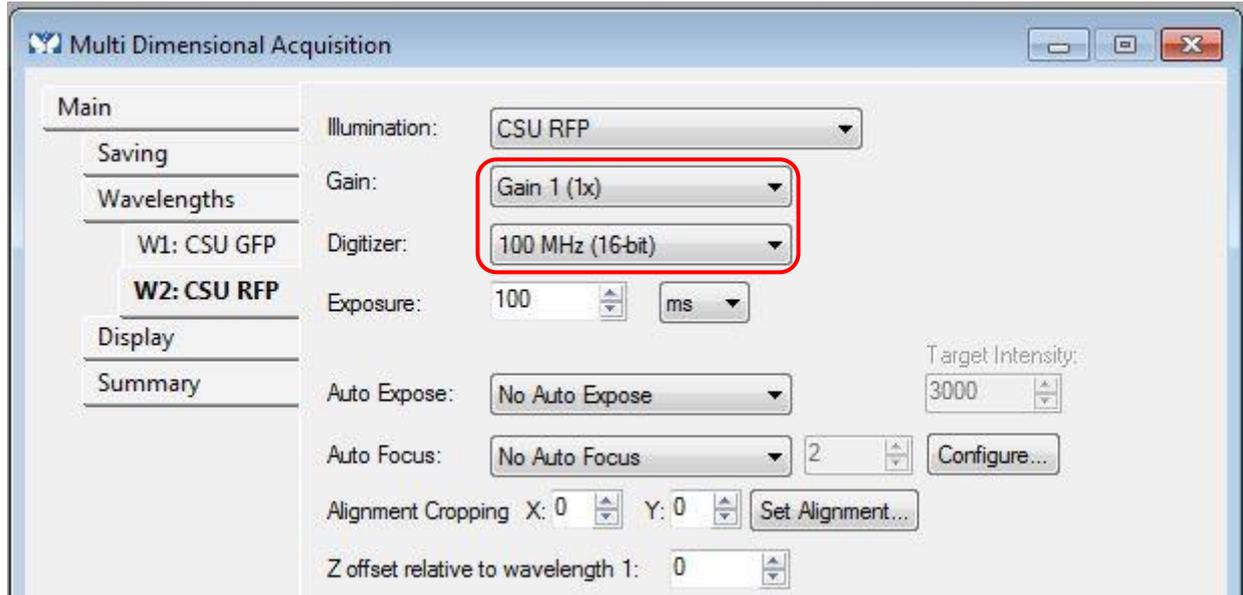
1- Dans l'onglet « *Main* » de la fenêtre « *MDA* » cocher « *Multiple Wavelengths* ».



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



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).



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.

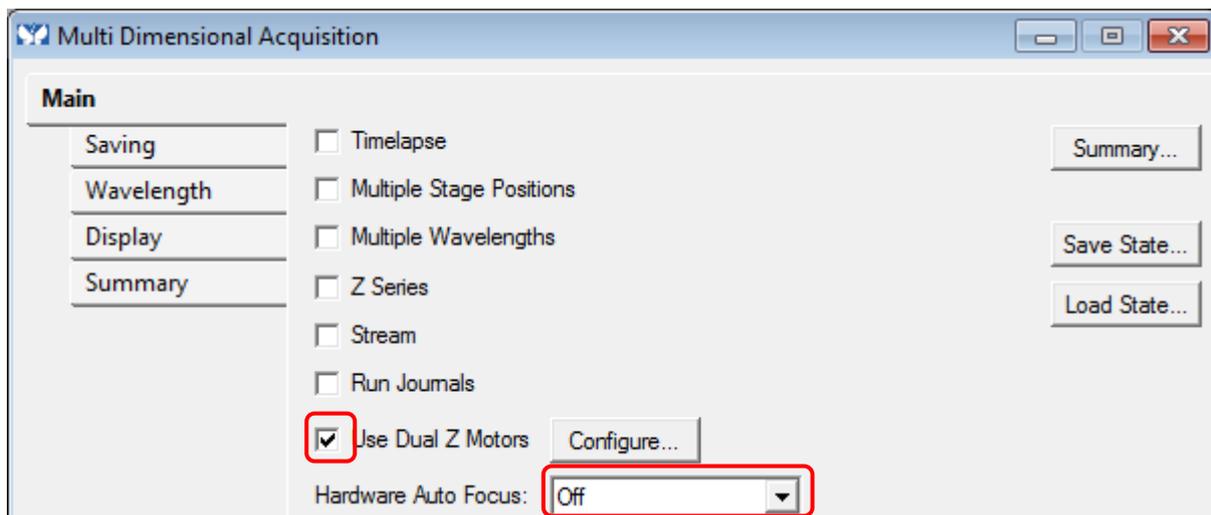


- 2- Sur le Spinning Disk, tirer le miroir pour utiliser les deux caméras.

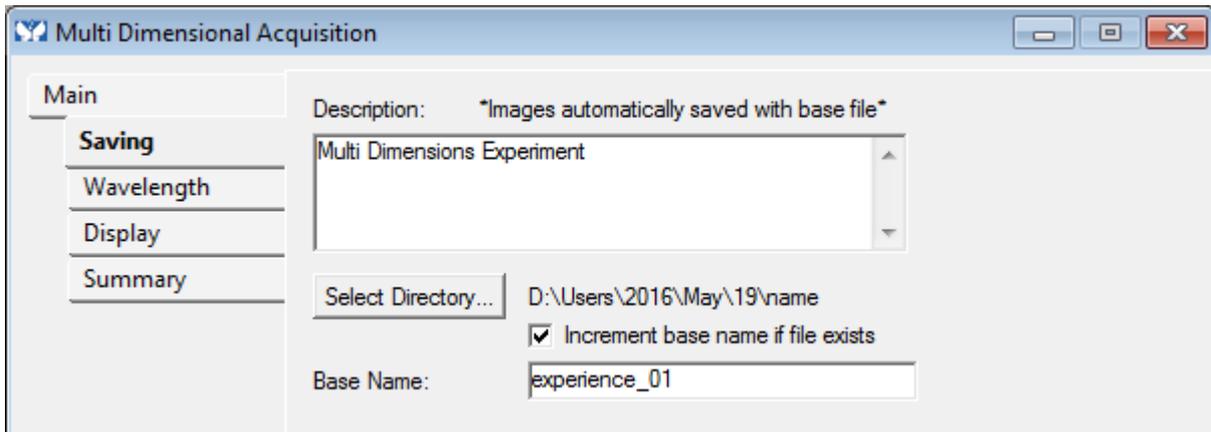
- 3- Dans MetaMorph, cliquer sur l'icône PRIME DUAL puis choisir le miroir dichroïque approprié parmi ceux proposés.



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



- 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.



- 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.

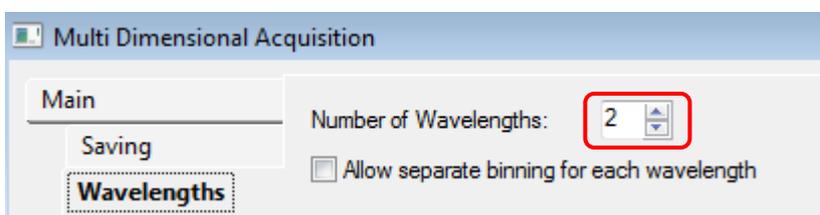
- 7- En bas de la fenêtre, mettre le Binning de la caméra à 1.
 Cliquer sur « *Full chip* » le carré vert de gauche pour utiliser tout le champ de la caméra.



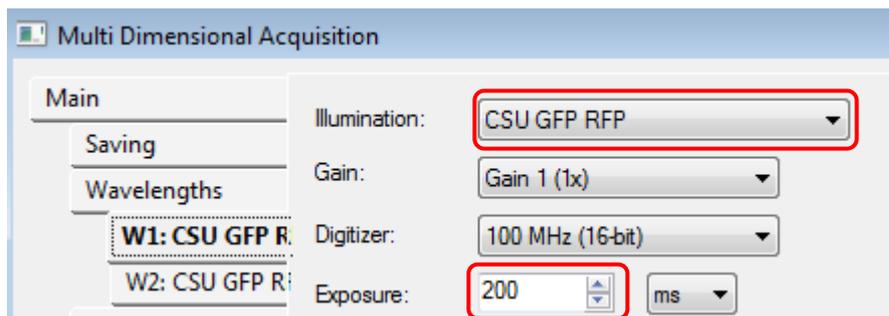
- 8- Cliquer l'onglet « *Main* » de la fenêtre « *MDA* » cocher « *Multiple Wavelengths* ».



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

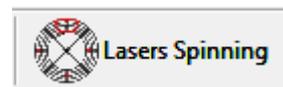


10- Dans chaque onglet (W1 et W2) créé, dans la fenêtre « *Illumination* », choisir le **même** type filtre d'émission pour la fluo (CSU) et le **même** temps d'exposition.



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

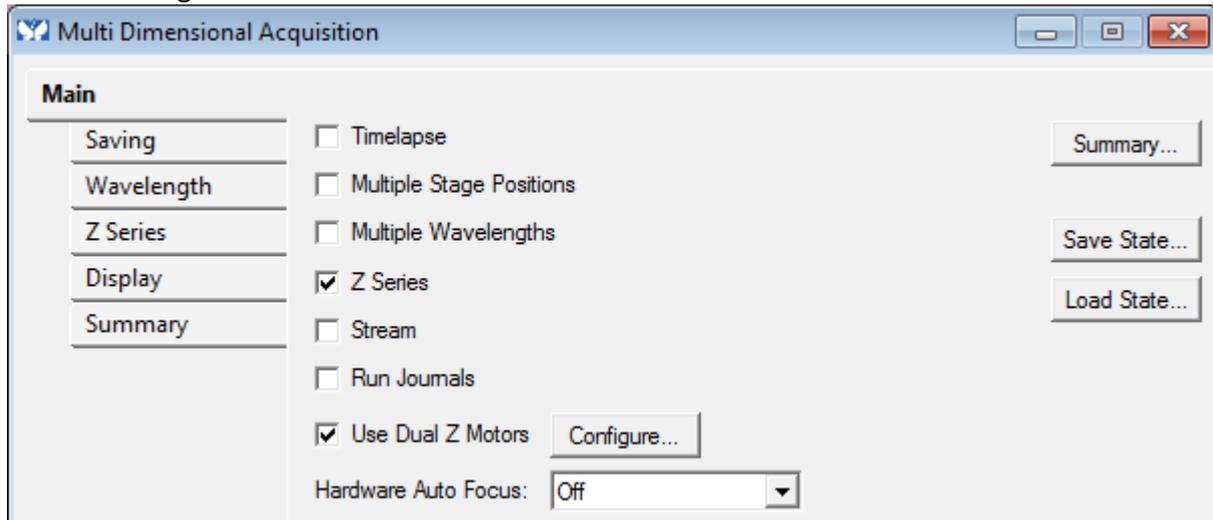


15- Vérifier la dynamique de l'image (Voir chapitre). Ajuster la puissance laser et le temps d'exposition en conséquence.

16- Cliquer sur « *Acquire* » pour acquérir l'image.

Acquérir une série Z

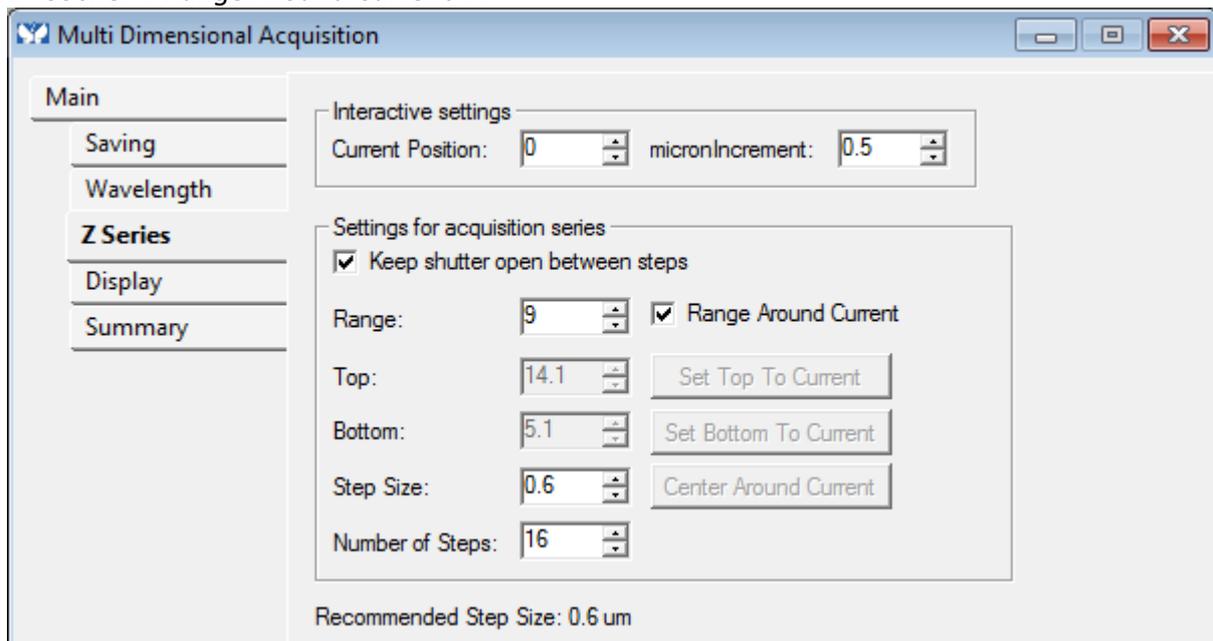
1- Dans l'onglet « *Main* » de la fenêtre « *MDA* » cocher « *Z Series* ».



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* ».



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

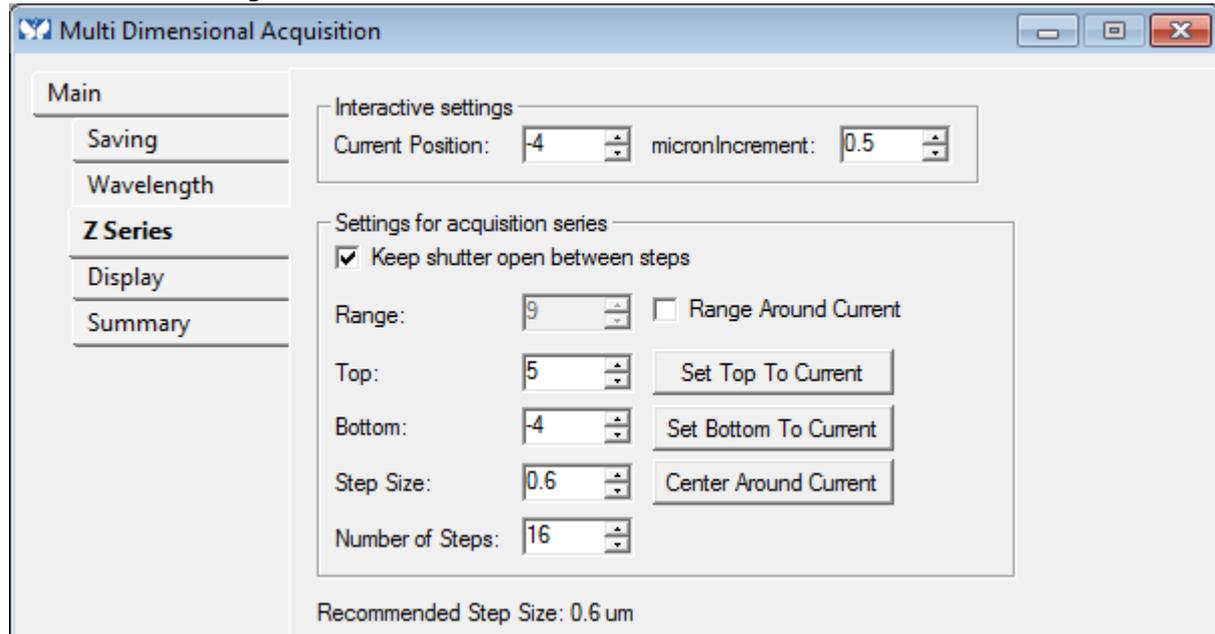
Utiliser les flèches de « *Current Position* » pour déplacer l'objectif jusqu'au plan central.

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

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* ».

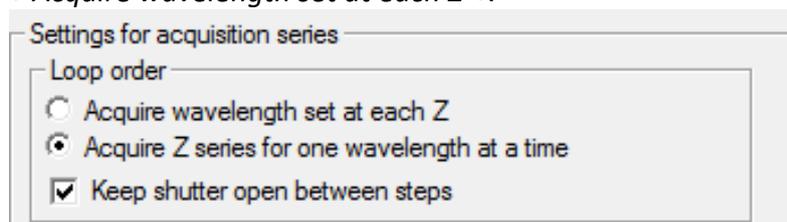
5- Définir la distance entre deux acquisitions en Z « *Step Size* ».

Le nombre de plans est défini automatiquement en cliquant sur la case « *Number of Steps* ».

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

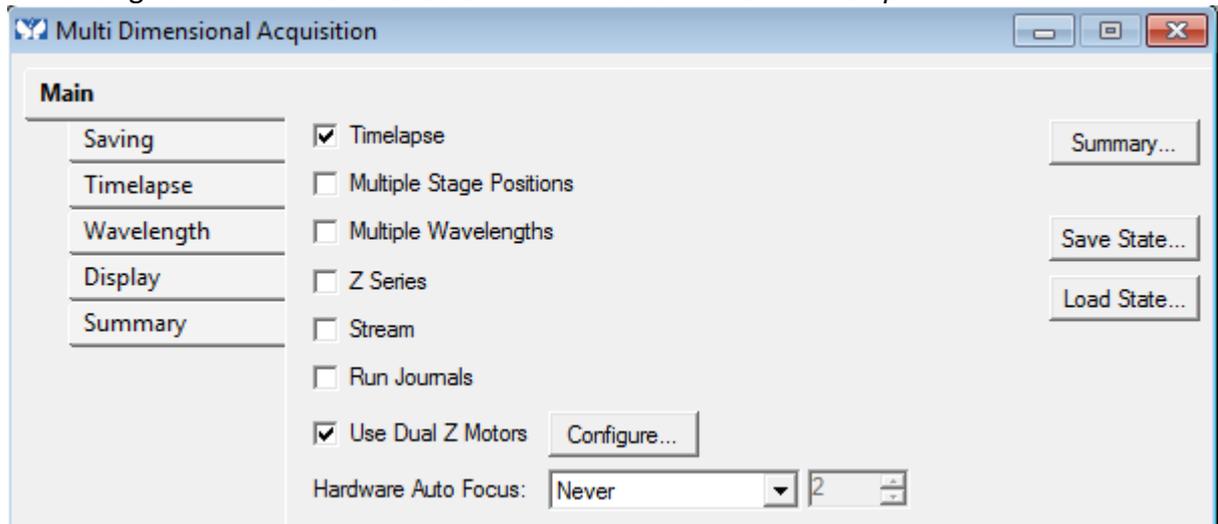
Remarques :

- 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* ».

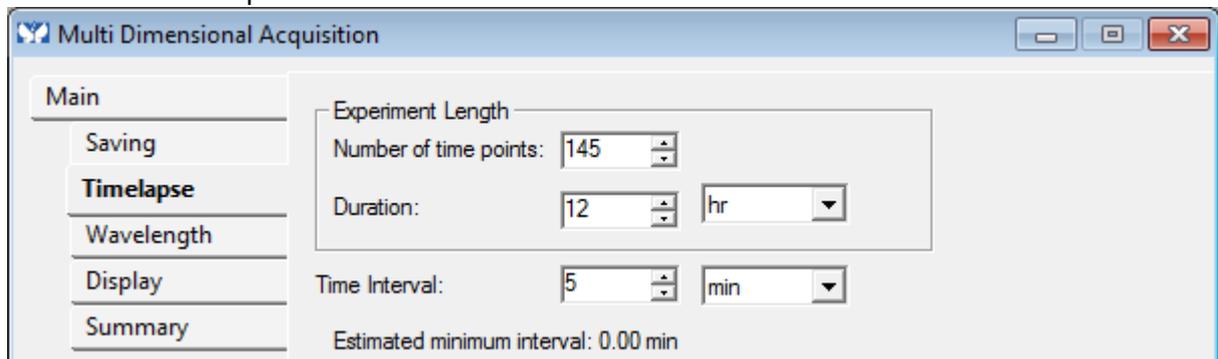


Acquérir un timelapse

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



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



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).

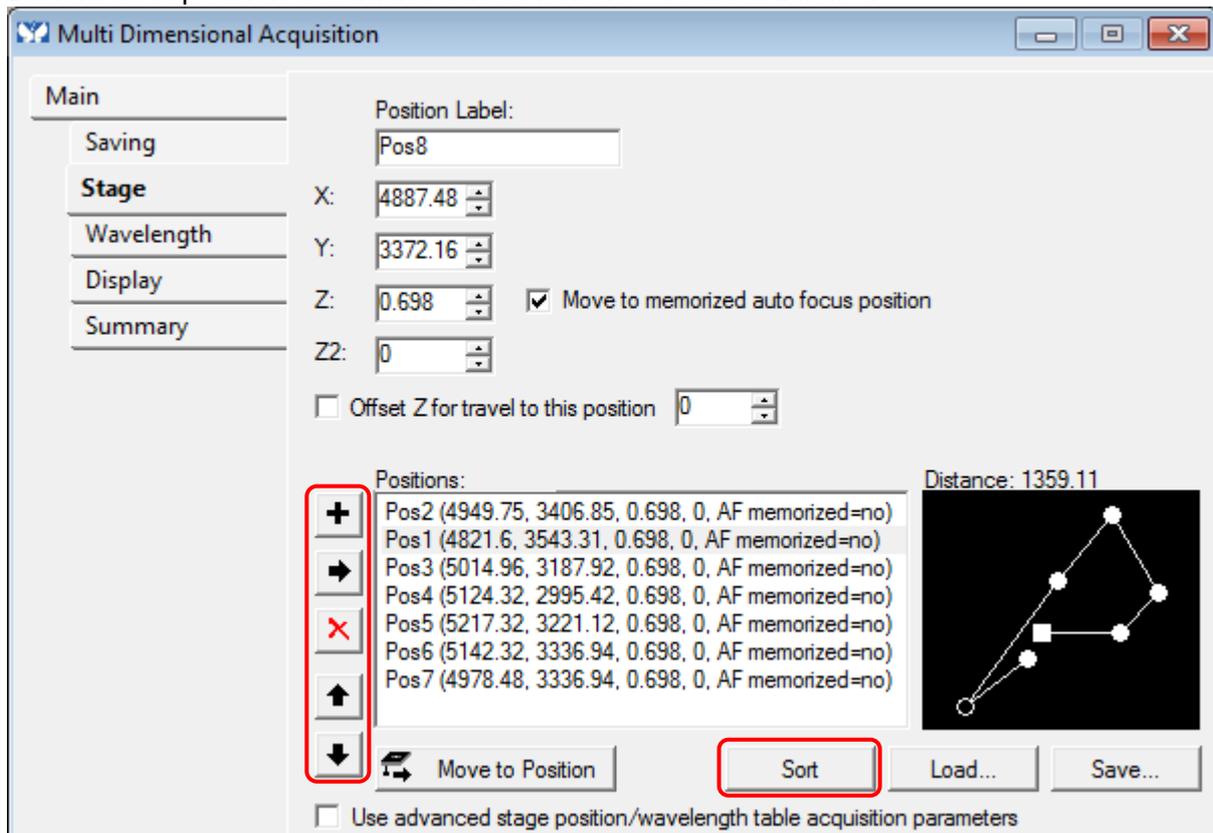
- 3- Cliquer sur « *Acquire* » pour acquérir les images.

Acquérir plusieurs positions de platine

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



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



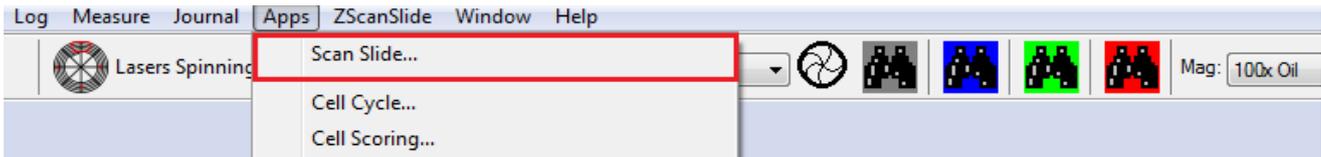
3- Le nom de la position ainsi que ses coordonnées X, Y et Z apparaissent alors dans la fenêtre « Positions ».

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 ».

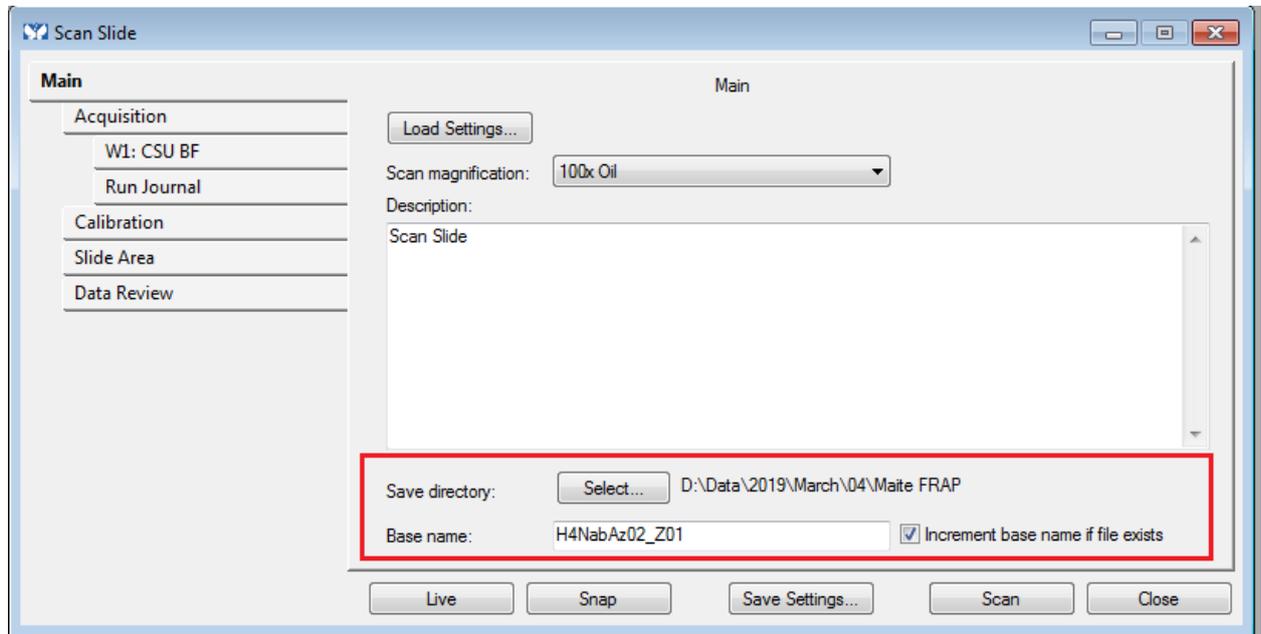
5- Cliquer sur « Acquire » pour acquérir les images.

Acquérir une mosaïque d'images

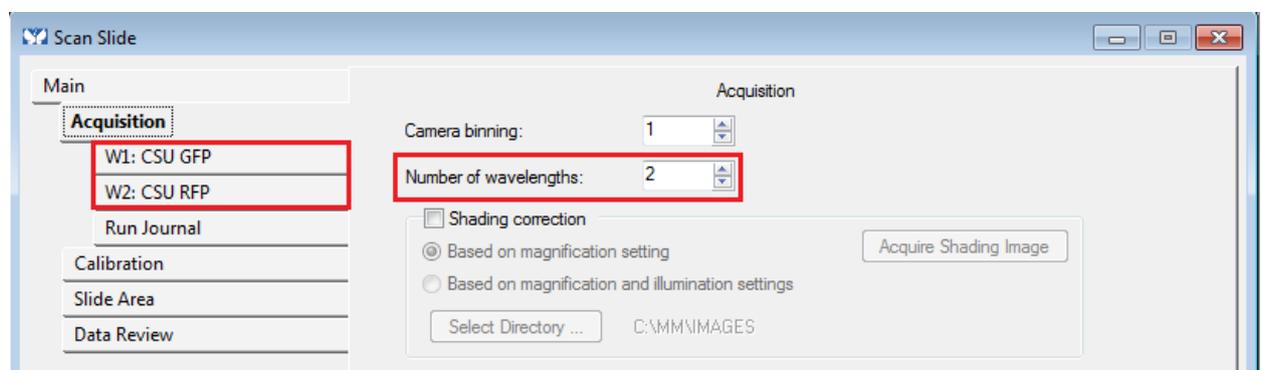
1- Dans le menu « *Apps* », sélectionner « *Scan Slide* »



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

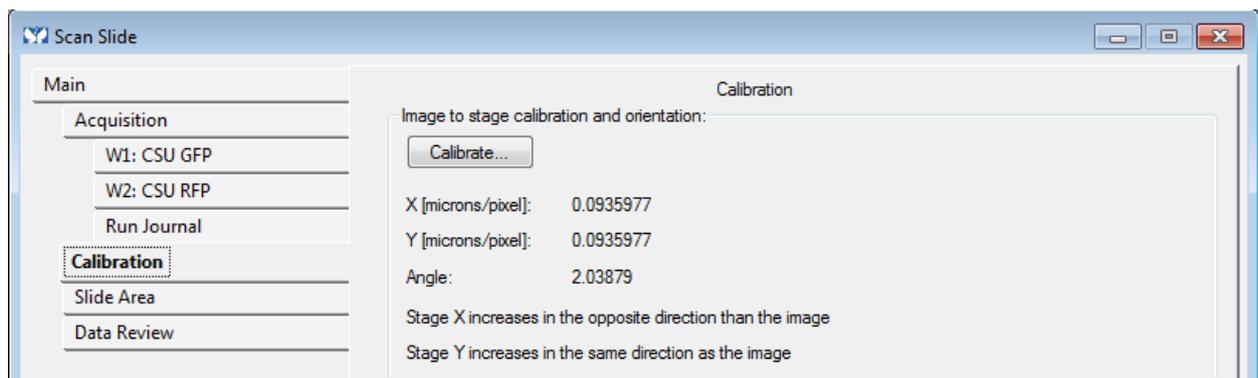


3- Dans la fenêtre Scan slide et l'onglet « *Acquisition* » sélectionner le nombre de longueurs d'onde à imager et faire les réglages pour chacune dans l'onglet qui lui correspond.



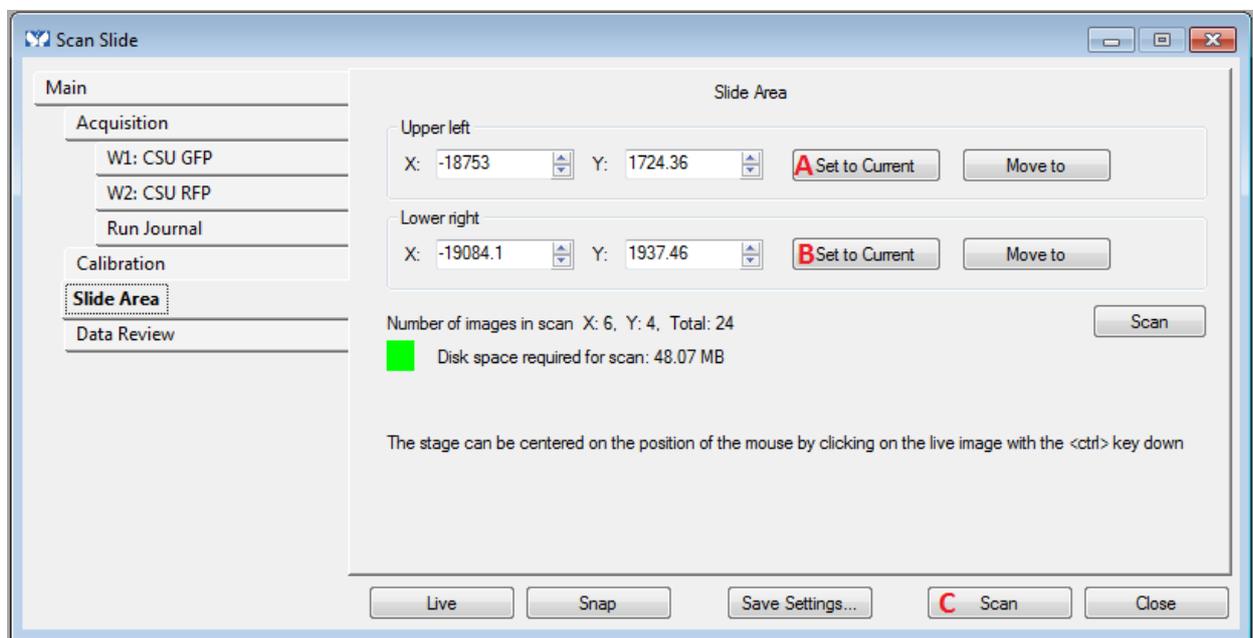
4- Dans l'onglet « *Run Journal* », vérifier qu'aucun journal n'est présent.

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



- 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 »

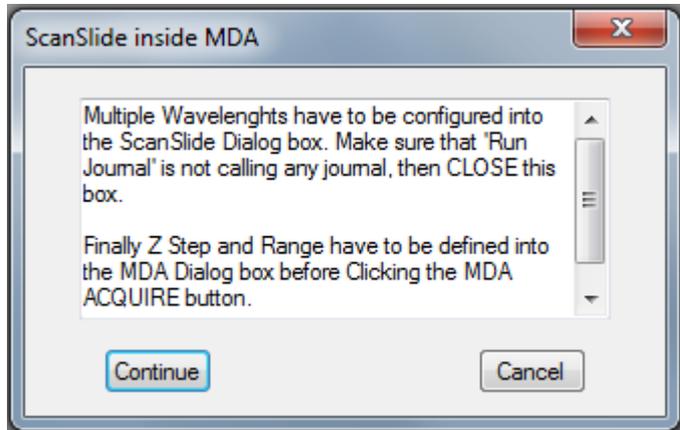


Acquérir une mosaïque d'images avec séries Z

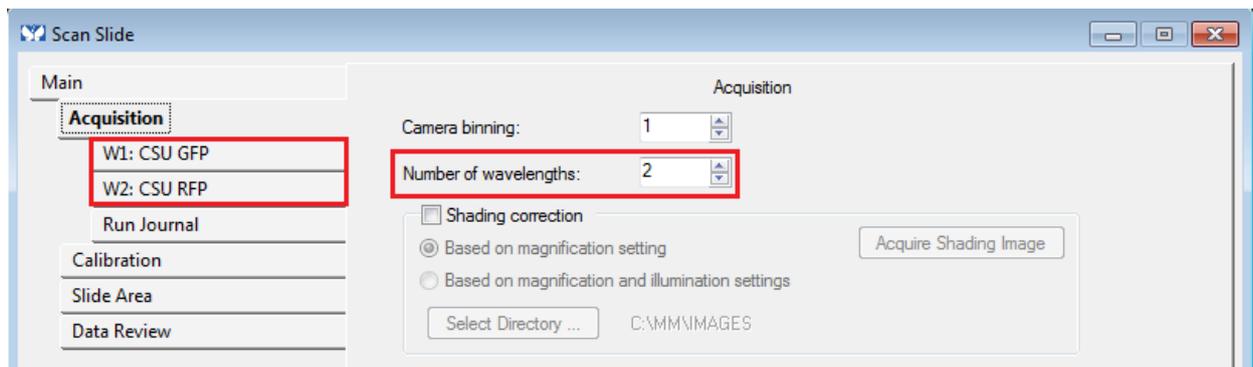
1- Sélectionner dans le menu « ZScanSlide » l'option « Setup ZScanslide in MDA »



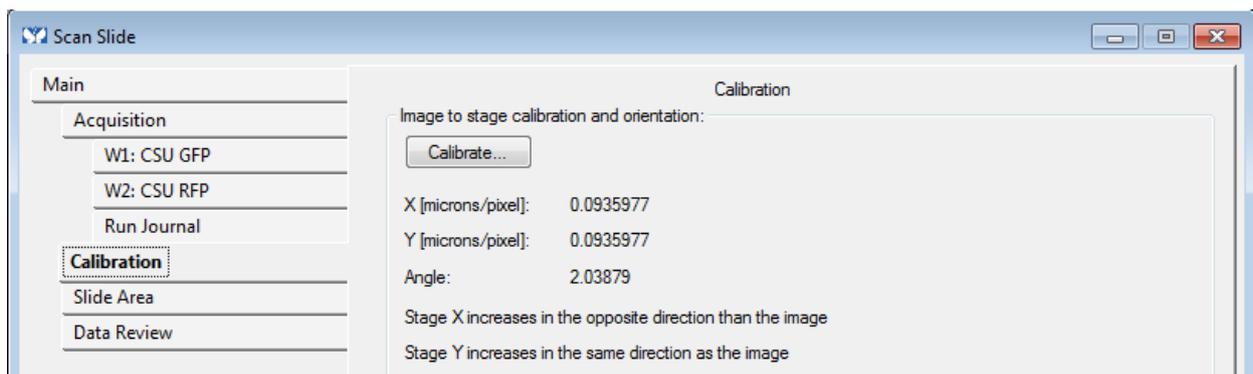
2- Une fenêtre d'instruction s'ouvre. Cliquez sur « Continue »



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.

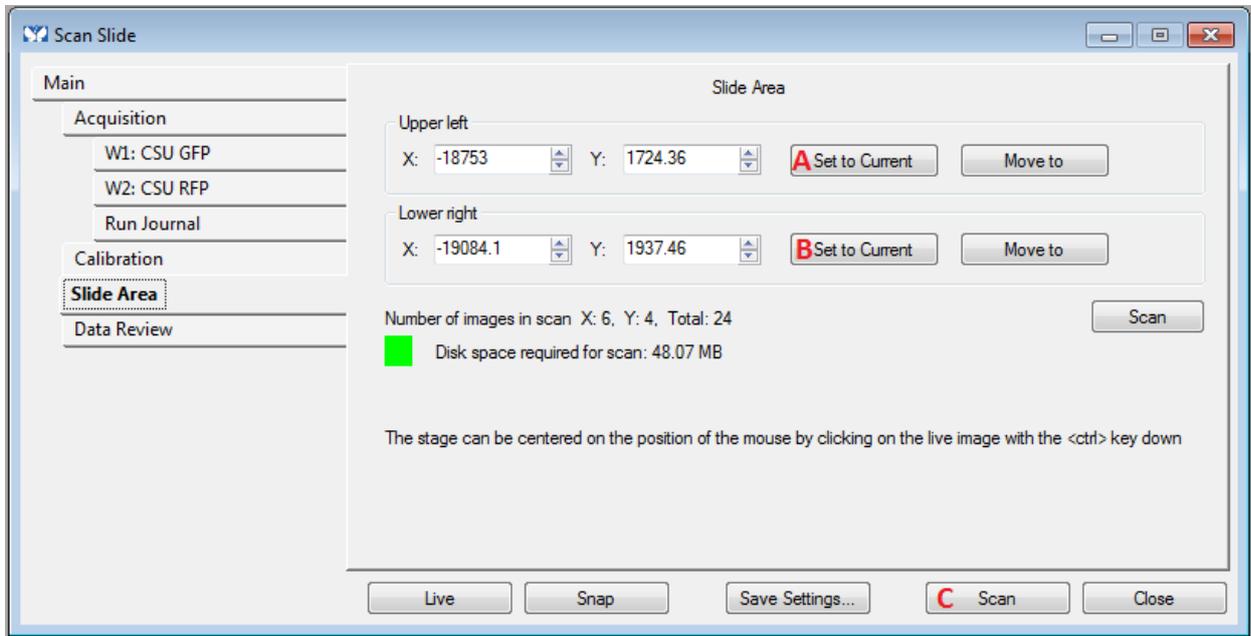


4- Dans l'onglet « Calibration », vérifier qu'une calibration est bien présente sinon la faire de nouveau en suivant les instructions à l'écran.

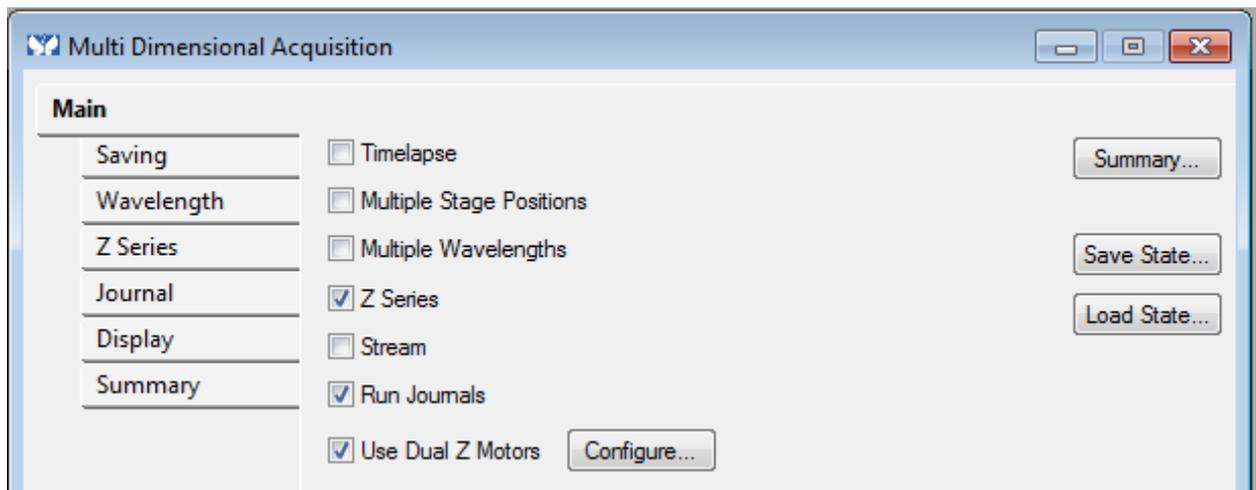


5- Dans l'onglet « *Slide Area* » :

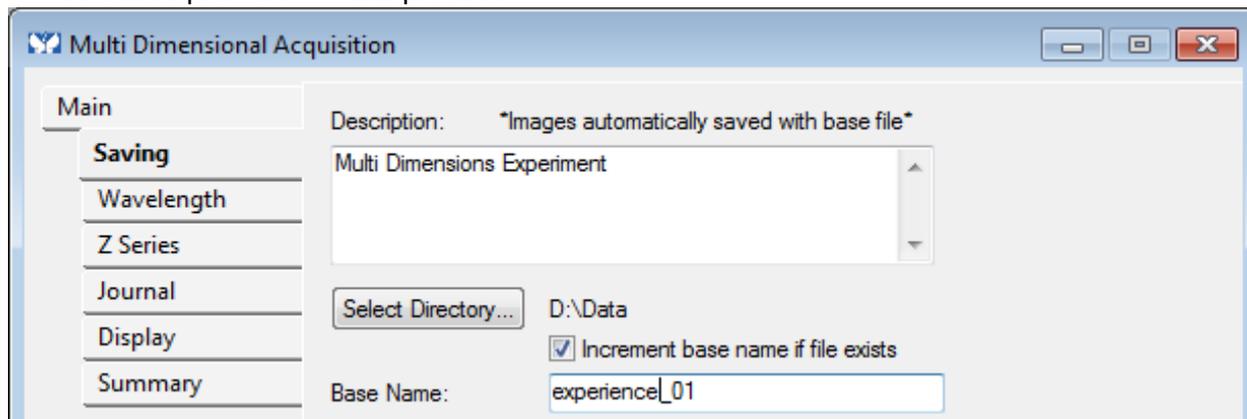
- A- Se mettre en « *live* » et déplacer l'échantillon jusqu'au bord en haut à gauche de votre champ d'intérêt. Cliquer sur « *Set to Current* »
- B- Déplacer ensuite l'échantillon jusqu'au bord en bas à droite de votre champ d'intérêt. Cliquer sur « *Set to Current* ».
- C- Cliquer sur « *Scan* »



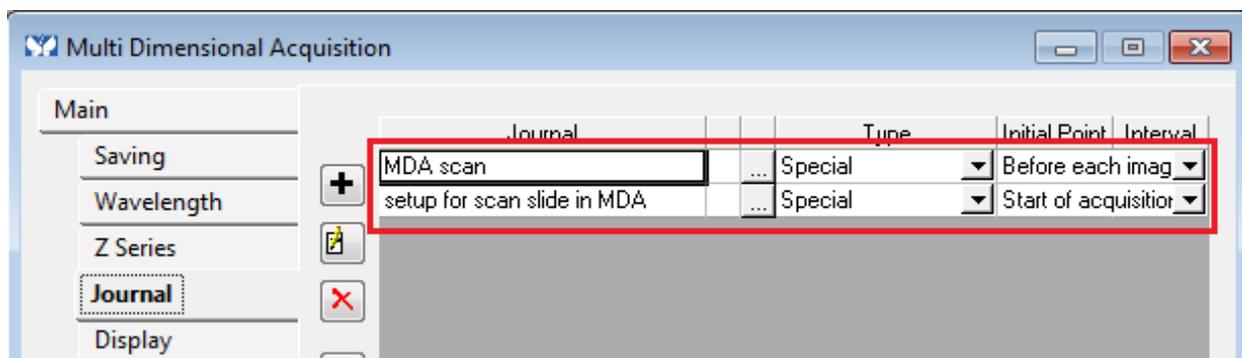
6- Dans la fenêtre MDA, décocher tout sauf « *Z-Series* », « *Run Journals* », « *Use Dual Z Motors* »



- 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.



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



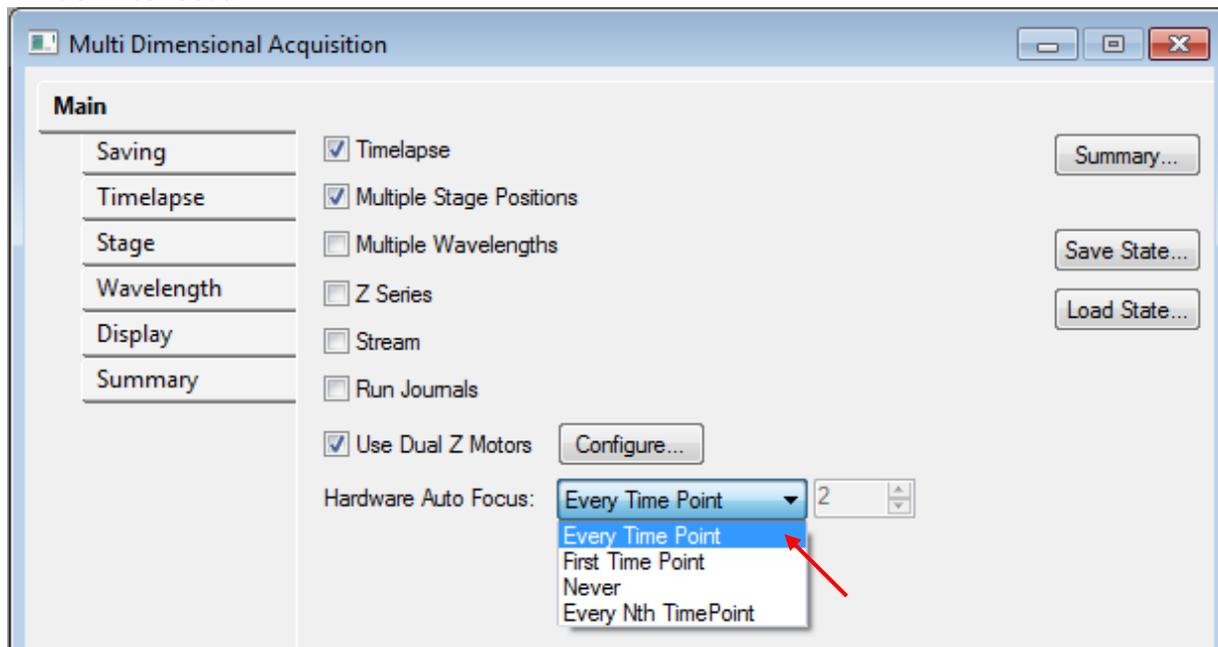
- 10- Cliquer sur « Acquire »

Finalisation de la mosaïque

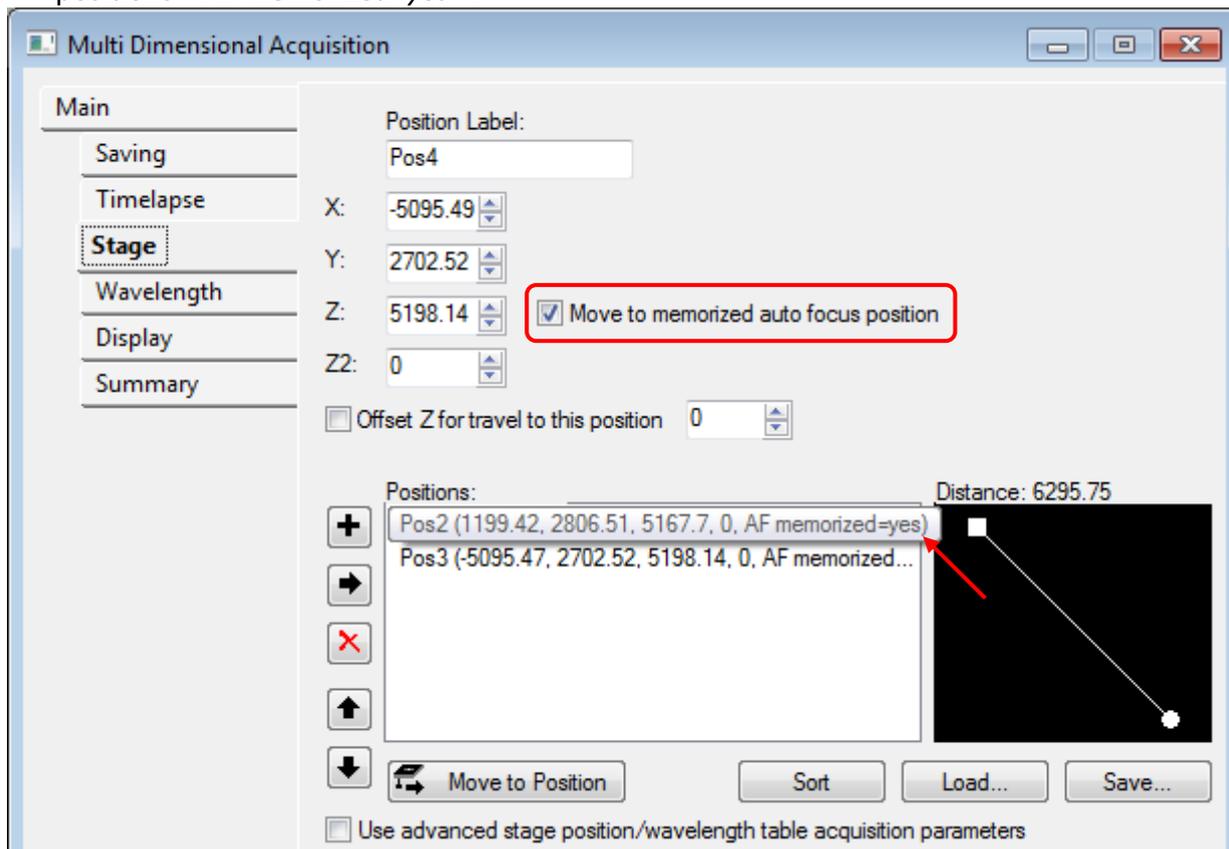
- 1- Dans la fenêtre « *Scan Slide* » :
 - A- Sélectionner « *File* »
 - B- Ouvrir la mosaïque à finaliser
 - C- Sélectionner les longueurs d'ondes à afficher
 - D- Cliquer sur « *Show image* »

Utiliser le Definite focus

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



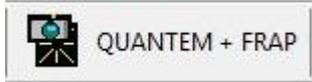
- 2- Si vous utilisez plusieurs positions, cocher « Move to memorized auto focus position » puis ajouter les différentes positions. Vérifiez que l'autofocus est activé sur chacune des positions « AF memorized=yes ».



Utiliser le système de FRAP

Démarrer le système FRAP :

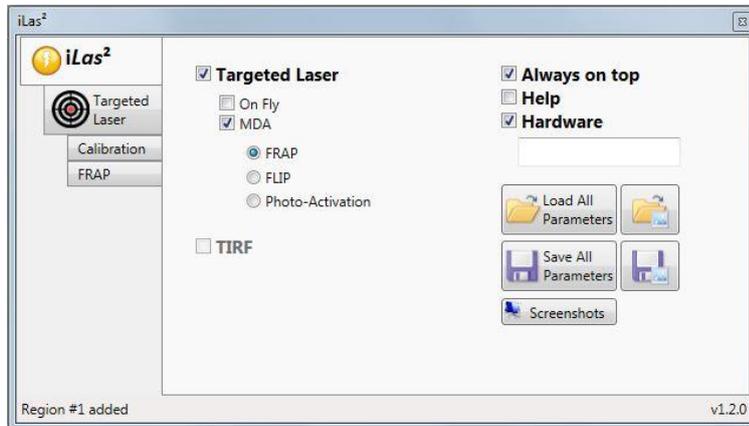
- 1- Dans « *MetaMorph* », sélectionner la caméra de votre choix avec le FRAP.



- 2- Démarrer « *ILAS²* » en cliquant sur l'icône dans les menus de « *MetaMorph* ».

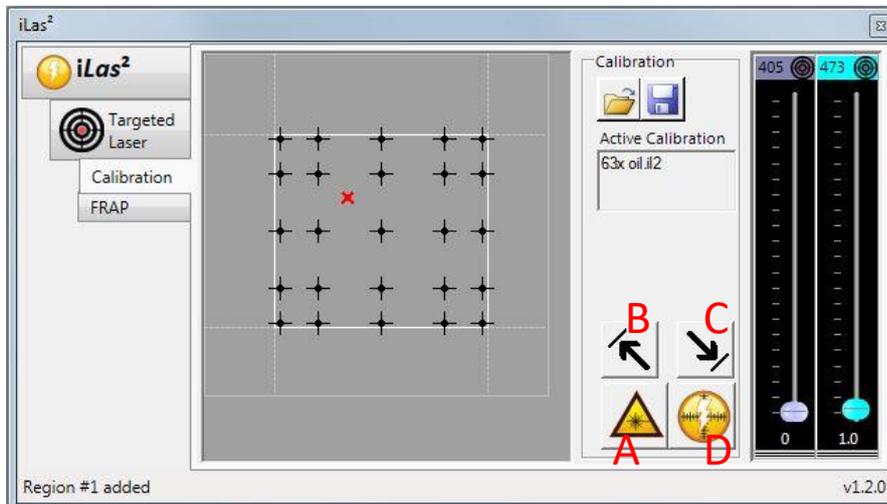


- 3- Dans l'onglet « *ILAS²* », cocher « *MDA* » et « *FRAP* ».



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).

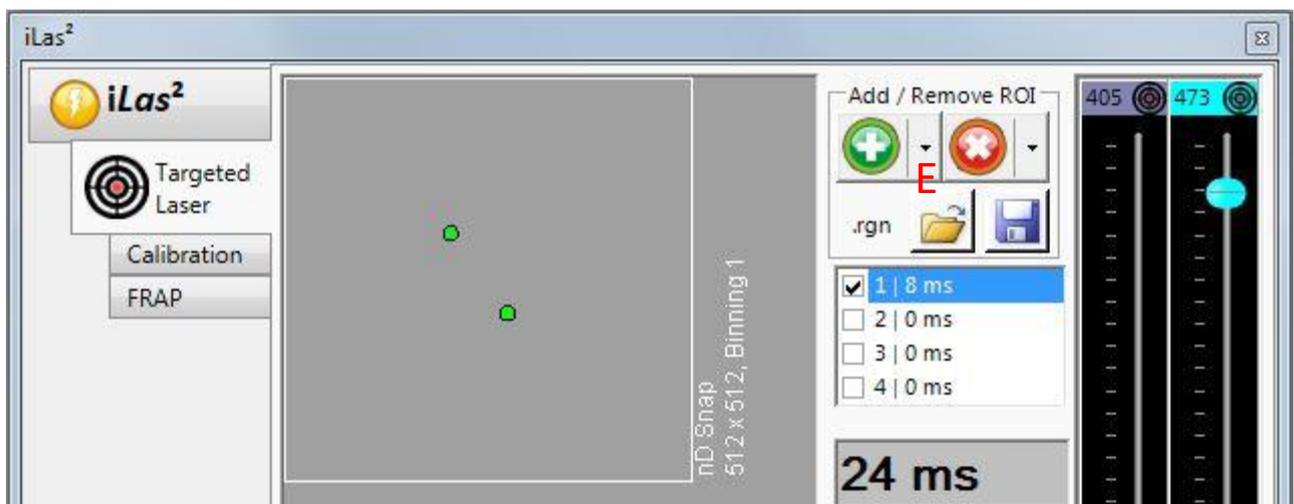


Choisir les régions d'intérêts à photoblanchir:

- 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.

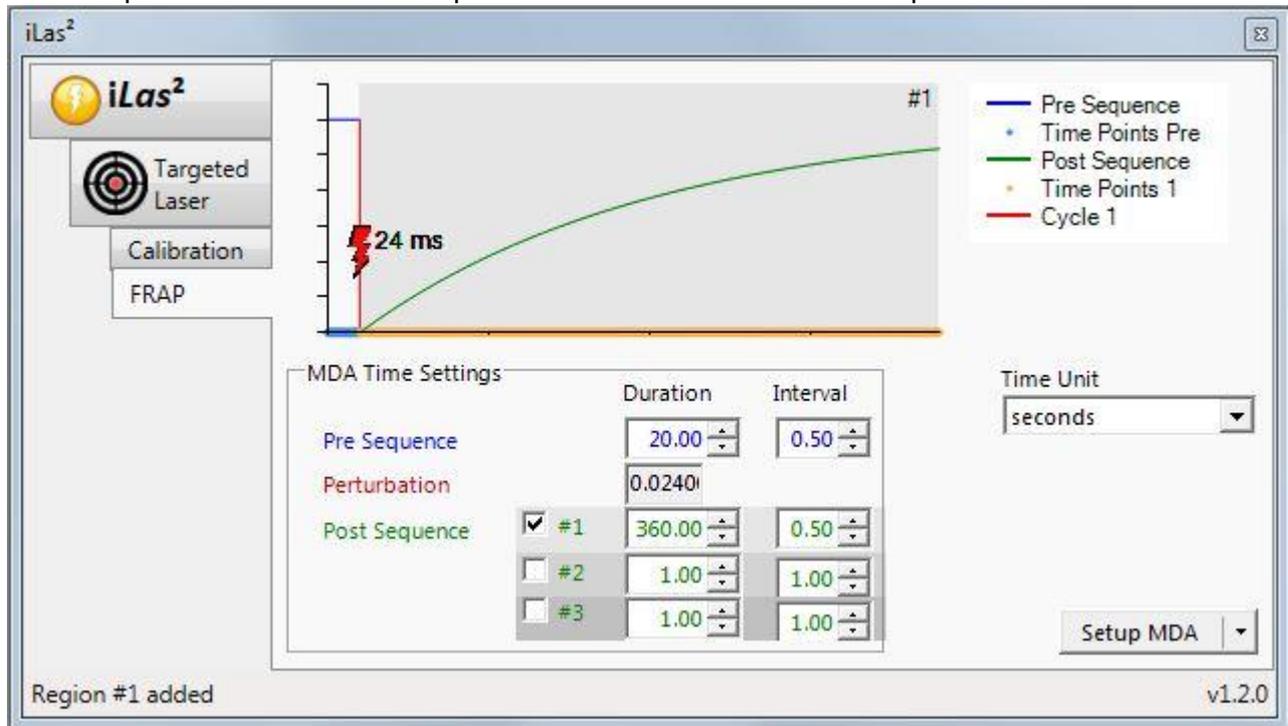


- 9- Dans l'onglet « *Targeted Laser* » ajouter toutes les zones que vous avez tracées sur l'image en cliquant sur la flèche à côté du bouton vert (E). Choisir la puissance laser à utiliser et le nombre de répétitions (F).

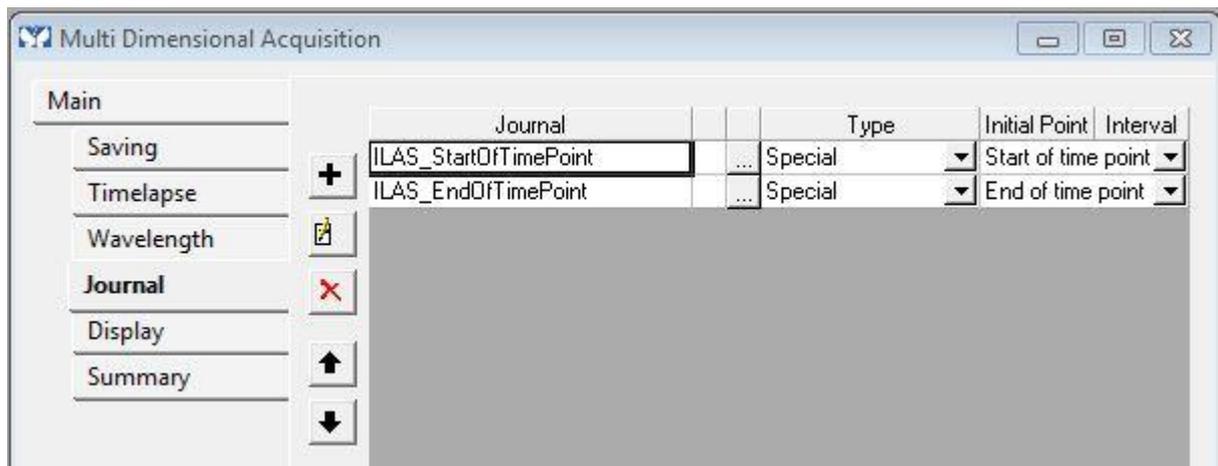


Paramétrer l'expérience de FRAP:

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.



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



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.



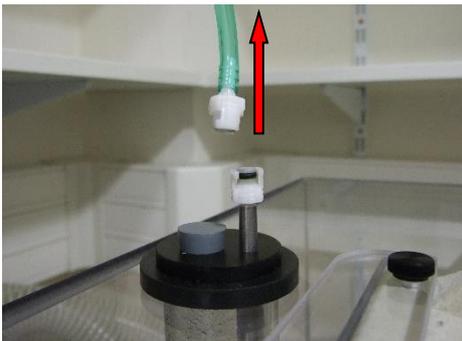
- 6- Éteindre la lampe à fluorescence

Éteindre les contrôleurs de CO₂ et de température

- 1- Enlever la chambre à CO₂ 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 CO₂ (MAIN out) sur la réserve d'eau de l'incubateur du microscope.



- 3- Éteindre le contrôleur de CO₂ 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.

