

## Guide d'utilisation du microscope bi-photonique 7MP Zeiss

Ce guide décrit comment utiliser le microscope bi photonique Zeiss 7MP.

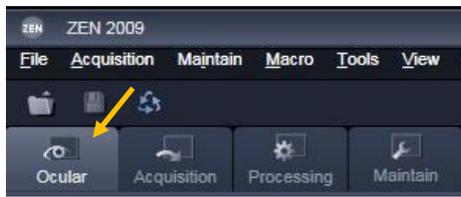
### 1) Allumer le système :

- Tourner la clé de contrôle du laser (sous la table, en face de la porte d'entrée) et la mettre en position « ON ».
- Appuyer sur les 2 boutons du boîtier de contrôle (derrière l'écran du PC) et les mettre sur la position « 1 ». Faire de même avec le plus gros en dernier.
- Attendre que l'écran TFT s'initialise et allumer le PC (bouton en haut à droite du clavier)
- Cliquer sur « LSM user »
- Lancer « Zen 2009 » (logiciel contrôlant le microscope) et cliquer sur « start system »

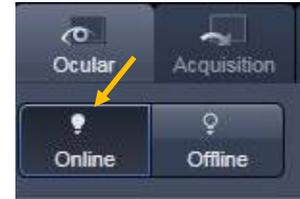


## 2) Observation aux oculaires

Pour réaliser une observation aux oculaires, aller dans « ocular »



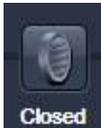
puis cliquer sur « online »



À partir de là, vous pouvez travailler soit via le logiciel soit via l'écran de contrôle TFT.

Concernant le logiciel, aller dans le menu « ocular ». Vous pouvez vous mettre

soit en mode transmission soit en mode fluorescence .

**Transmission**  : cliquer sur  pour ouvrir le shutter de la lampe.

Vous pouvez choisir l'intensité de la luminosité en cliquant sur .

**Fluorescence**  : cliquer sur  pour ouvrir le shutter de la lampe

fluorescente. Choisissez le filtre qui vous convient en cliquant sur .

Choix des filtres : DAPI (UV), GFP (vert), CY3 (rouge).

## 3) Acquisition d'une image

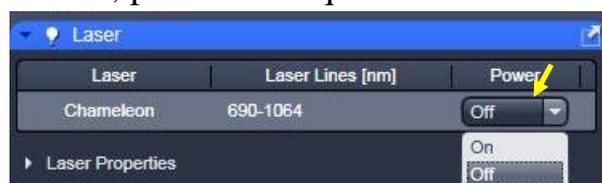
Pour passer du mode « oculaire » au mode « acquisition » :

- cliquer sur « ocular online »

- cliquer sur « acquisition » dans le menu



- Ouvrir le shutter du laser ; pour cela cliquer sur laser => ON



- Choisir les détecteurs : dans le menu « Light Path », 5 détecteurs au choix. Choisir la couleur en cliquant sur l'icône du détecteur

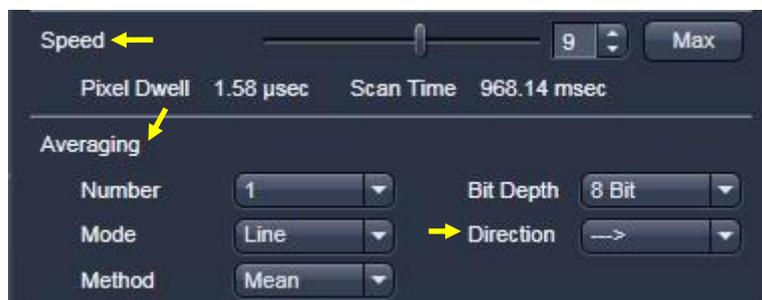


- Dimension de l'image : choisir la dimension de l'image dans le menu « acquisition mode » :



En cliquant sur « optimal », vous échantillonnez au mieux votre image.

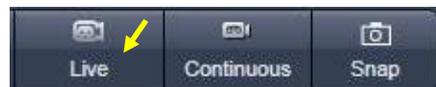
Choisissez la vitesse dans le menu « speed », le moyennage, et le type de balayage (=> monodirectionnel ou ⇔ bidirectionnel).



- Choisir la longueur d'onde, le gain et l'offset dans le menu « channels » : => cocher la case « laser », choisissez la longueur d'onde ainsi que le pourcentage de puissance laser.



Appliquez un gain (« Gain (master) », l'offset (« Digital Offset »). Il est possible d'augmenter le gain de manière numérique avec le « Digital Gain » : le signal ainsi que le bruit de fond est multiplié par la valeur entrée.



- Cliquez sur « Live ». Vous pouvez alors adapter le gain, l'offset et le digital gain. Cliquez sur « continuous », afin de visualiser l'effet du moyennage sur l'image.

Une fois les paramètres ajustés, cliquez sur « snap » afin de prendre une image.

#### 4) Faire une acquisition en z (z stack) :

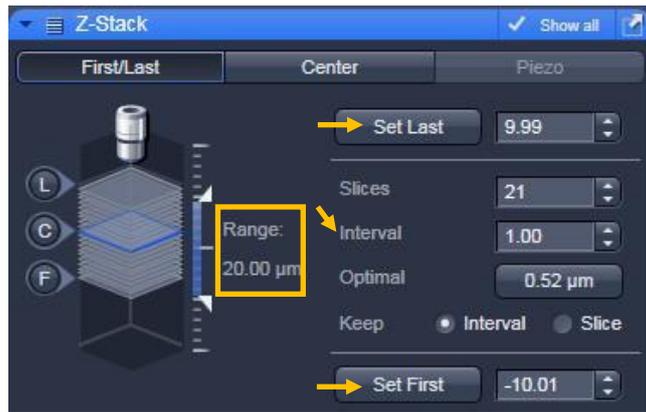
- cocher « Z-Stack » dans le sous menu



- Se mettre en « live » ou « continuous »
- Avec la vis (sur le côté de l'écran TFT), choisir une position supérieure
- Cliquer sur « Z first »
- Définir une position inférieure (avec la vis)
- Cliquer sur « Z last »

Le logiciel indique le « range » c'est-à-dire l'épaisseur de l'acquisition.

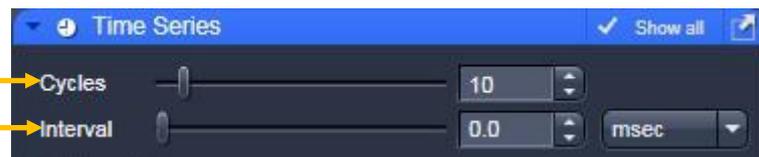
-Choisir l'intervalle de coupe : définir l'espacement entre chaque coupe. En cliquant sur « optimal », le logiciel calculera et appliquera l'intervalle optimal.



- cliquer sur « Start experiments » pour lancer l'acquisition.

### 5) Faire une acquisition dans le temps (time lapse)

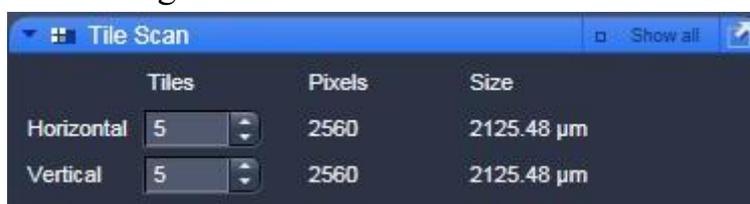
- cocher la case « Time Series » : le sous menu apparait.
- Choisir un intervalle de temps entre chaque acquisition
- Choisir le nombre de cycle, *i.e.* le nombre de fois que le logiciel fera une acquisition.



- cliquer sur start experiment

### 6) Faire une mosaïque

- cocher la case « Tile Scan » : le sous menu apparait
- choisir le nombre d'image dans le sens horizontal et dans le sens vertical.

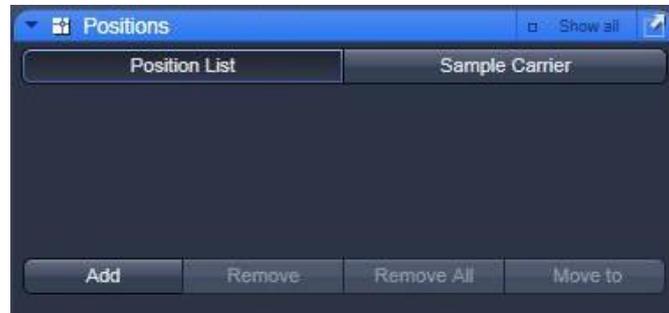


- cliquer sur « start experiment »

### 7) Faire du multi-position

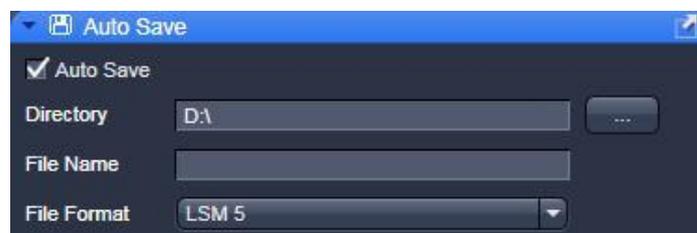
- cocher la case « Position » : le sous menu apparait
- choisir une position et cliquer sur « add »

- cliquer sur « remove » pour retirer une position, « remove all » pour retirer toutes les positions
- sélectionner une position puis cliquer sur « move to » pour rejoindre cette position
- cliquer sur « start experiment ».



### 8) Enregistrer les fichiers

- dans le menu de droite, cliquer droit sur l'image et « save as ». Sélectionner le dossier. ATTENTION : ne jamais enregistrer les images au format JPEG. Choisissez le format « Tiff » ou « LSM 5 ».
- Possibilité de sauvegarder en live avec le menu « auto save » : cocher la case « auto save » ; spécifier le dossier où sera enregistré le fichier, le nom du fichier et le format.



### 9) Extinction du système

Après s'être assuré d'avoir bien enregistré les fichiers :

- mettre le laser à 800 nm (longueur d'onde de repos)
- décocher la case « laser »
- mettre le laser sur « OFF »
- cliquer sur « File » puis « Exit »
- Menu Démarrer → « shut down »
- Quand le PC est éteint, appuyer sur les 3 boutons du boîtier de contrôle : les deux petits puis le gros
- Tourner la clé du laser sur la position « stand by »
- BIEN NETTOYER LES OBJECTIFS