



**Plateau technique d'imagerie
cellulaire INFINITY-Purpan**



Mode d'emploi Microscope Spinning disk/ TIRF/ FRAP



Plateau technique d'imagerie cellulaire INFINITY-Purpan

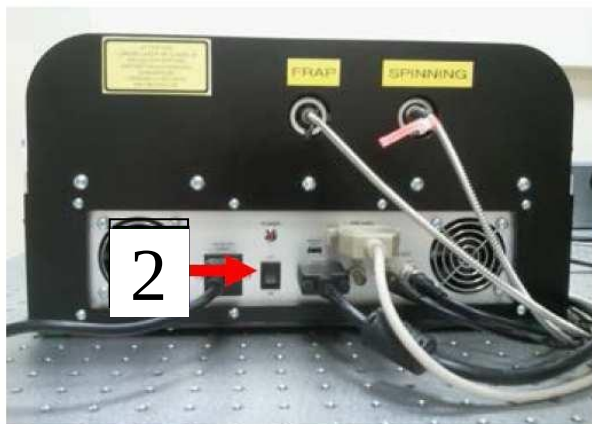
Sophie Allart - sophie.allart@inserm.fr – Simon Lachambre – simon.lachambre@inserm.fr

Tél : 05. 62. 74. 45. 78

05. 31. 54. 79. 01

Démarrage :

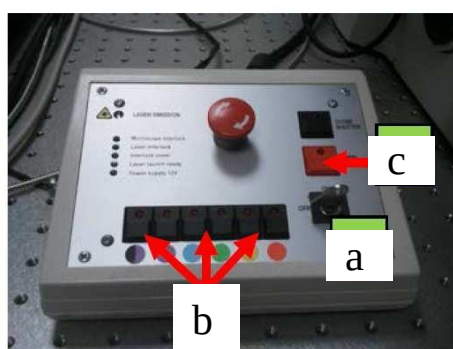
- 1- Allumer la lampe fluo sur la table à gauche du système
- 2- Allumer le banc laser sur la table à gauche du système



- 3- Allumer les 3 contrôleurs sous la table à gauche du système (contrôleur Yokogawa bleu -bouton à l'arrière du contrôleur, contrôleur Ila2, contrôleur Lambda 10-3)



- 4- Allumer le boîtier laser sur la table du système (tourner la clé(a)+ allumer chaque laser (b))



!Attention ! : A chaque fois que vous basculez aux oculaires, la sécurité laser se met en place. Pour la retirer pour pouvoir utiliser la caméra, il faut appuyer sur le bouton rouge (c).

Plateau technique d'imagerie cellulaire INFINITy-Purpan

Sophie Allart - sophie.allart@inserm.fr – Simon Lachambre – simon.lachambre@inserm.fr

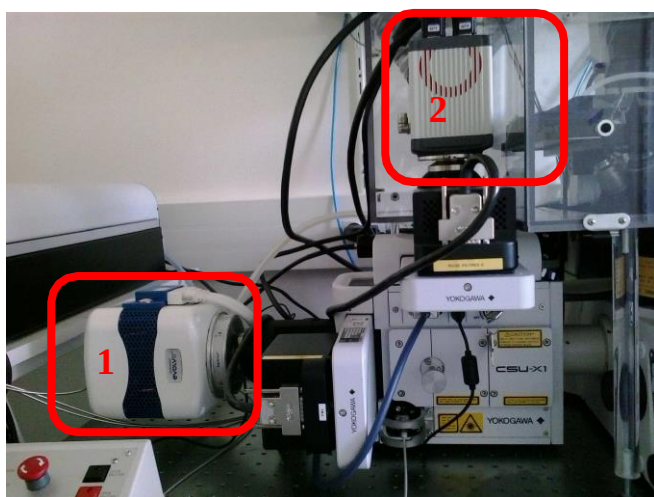
Tél : 05. 62. 74. 45. 78

05. 31. 54. 79. 01

5- Tourner la clé du spinning (entre les caméras, à gauche du statif)



6- Allumer la caméra à utiliser (pour le spinning : l'évolve (1) ou la flash4 (2) à gauche du statif, pour le TIRF : l'évolve (3) à droite du statif)



7- Allumer le statif (derrière le statif, à droite)



Plateau technique d'imagerie cellulaire INFINITy-Purpan

Sophie Allart - sophie.allart@inserm.fr – Simon Lachambre – simon.lachambre@inserm.fr

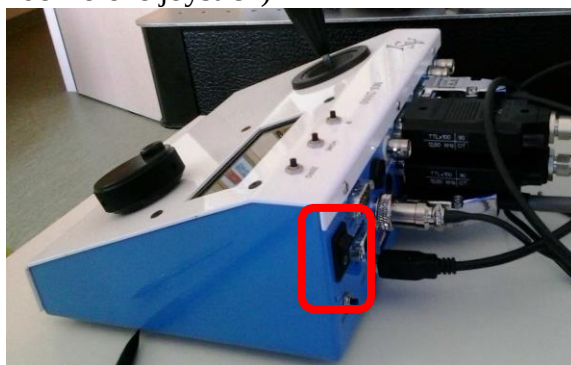
Tél : 05. 62. 74. 45. 78

05. 31. 54. 79. 01

8- Allumer la transmission (brancher le câble au boîtier)



9- Allumer la platine (bouton derrière le joystick)



10- Ouvrir Métamorph

Tirette enfoncée : Evolve
Tirette sortie : Flash 4



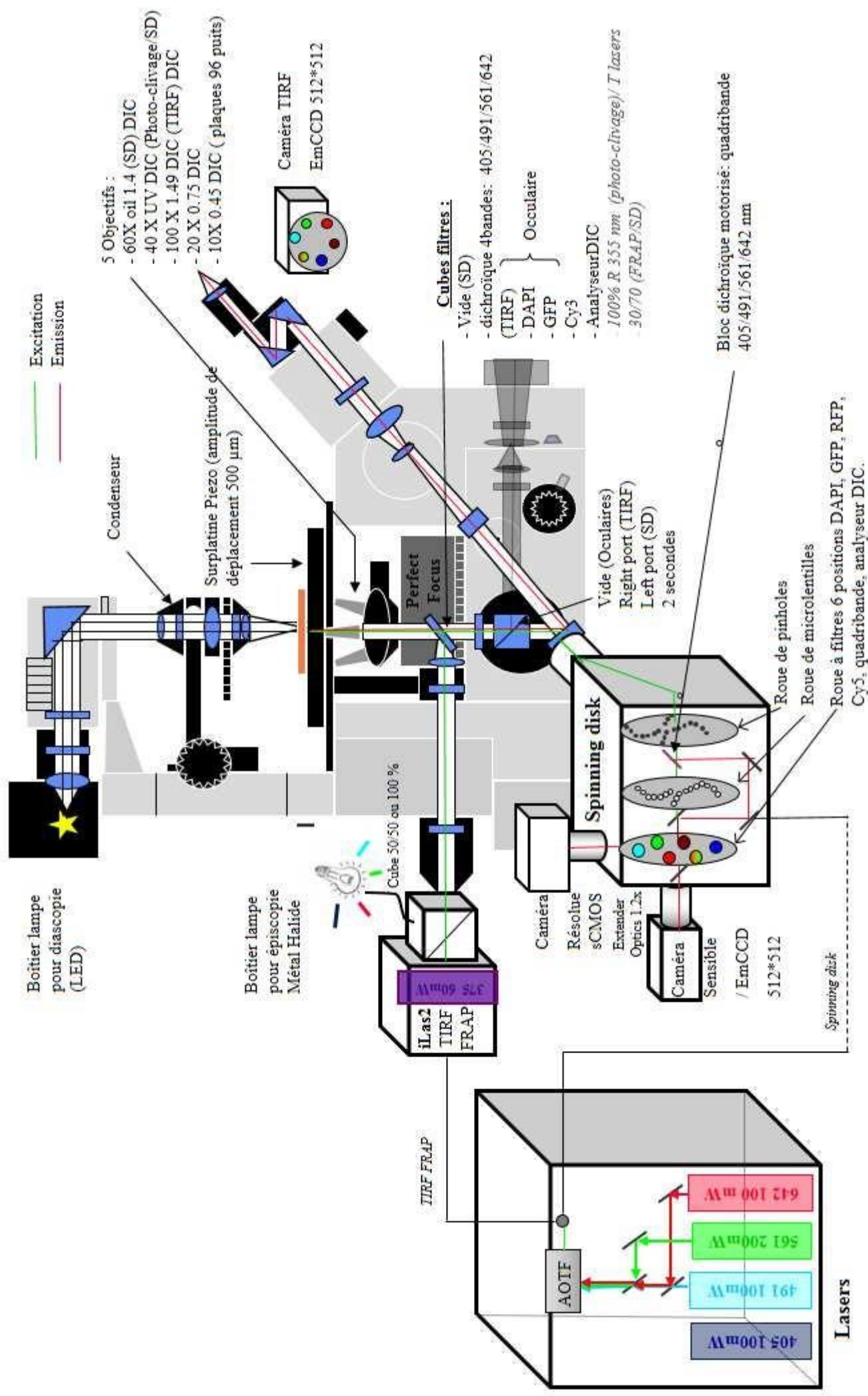
Plateau technique d'imagerie cellulaire INFINITY-Purpan

Sophie Allart - sophie.allart@inserm.fr – Simon Lachambre – simon.lachambre@inserm.fr

Tél : 05. 62. 74. 45. 78

05. 31. 54. 79. 01

TRAJET OPTIQUE DANS LE MICROSCOPE INVERSE SD – TIRF – FRAP

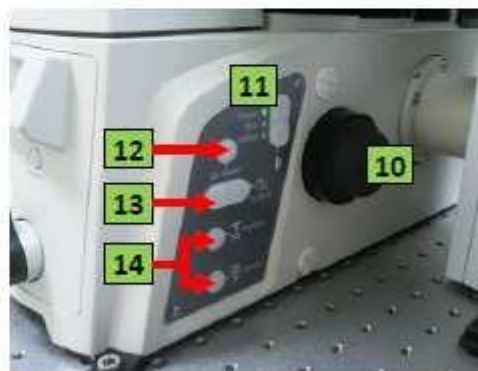


Utilisation du statif Nikon

Microscope vue de face



- [1] Vue d'ensemble de face du microscope
- [2] Ecran de contrôle du microscope (objectif utilisé, position en Z...)
- [3] Choix du chemin optique : envoi de la lumière vers les oculaires
- [4] Choix du chemin optique : envoi de la lumière vers les caméras



- [5], [10] Molette de réglage du focus
- [6], [11] Réglage vitesse de déplacement en Z
- [7] Changement d'objectif
- [8] Shutter de la lumière transmise
- [9] Puissance de la lumière transmise

- [10] Molette de réglage de focus
- [11] Réglage vitesse de déplacement en Z
- [12] Shutter de la lampe fluorescente
- [13] Changement des cubes de filtres
- [14] Position haute et basse de l'objectif

Plateau technique d'imagerie cellulaire INFINITY-Purpan

Sophie Allart - sophie.allart@inserm.fr – Simon Lachambre –
simon.lachambre@inserm.fr

Tél : 05. 62. 74. 45. 78

05. 31. 54. 79. 01

Caractéristiques des caméras

Caméra	Avantages		Matrice	Taille du pixel	Digitalisation	Méthode de transfert
Evolve	peu bruitée	rapide	512 x 512 pixels	16 x 16 µm	16 bits	Frame Transfert
Flash 4		grand champ	2048 x 2048 pixels	6,45x 6,45 µm	16 bits	

	Pinhole (AU) (4)	Section optique (5)	Echantillonnage en Z (6)
40X ON 1,3	2,66	2,15 µm	0,934 µm
60X ON 1,4	1,9	1,37 µm	0,595 µm
100X ON 1,49	1,216	0,81 µm	0,352 µm

Objectifs du microscope avec la caméra Evolve pour le spinning (à 500nm)

	Résolution théorique en µm (1)	Echantillonnage (2)	Taille du Pixel (3)	
			Binning	Optovar 1X Optovar 1,5X
10X ON 0,45	0,664	0,289	1	1,33 0,888
			2	2,66 1,776
			3	3,99 2,664
20X ON 0,75	0,398	0,173	1	0,66 0,44
			2	1,32 0,88
			3	1,98 1,32
40X ON 1,3	0,235	0,12	1	0,33 0,22
			2	0,66 0,44
			3	0,99 0,66
60X ON 1,4	0,214	0,107	1	0,2225 0,148
			2	0,45 0,300
			3	0,675 0,450
100X ON 1,49	0,201	0,1	1	0,13 0,087
			2	0,26 0,173
			3	0,39 0,260

Objectifs du microscope avec la caméra Flash4 pour le spinning (à 500nm)

	Résolution théorique en µm (1)	Echantillonnage (2)	Binning	Taille du Pixel (3)	
				Optovar 1X	Optovar 1,5X
10X ON 0,45	0,664	0,289	1	0,645	0,43
			2	1,29	0,86
			3	1,935	1,29
20X ON 0,75	0,398	0,173	1	0,32	0,213
			2	0,64	0,427
			3	0,96	0,640
40X ON 1,3	0,235	0,12	1	0,161	0,107
			2	0,322	0,215
			3	0,483	0,322
60X ON 1,4	0,214	0,107	1	0,107	0,071
			2	0,214	0,143
			3	0,321	0,214
100X ON 1,49	0,201	0,1	1	0,064	0,043
			2	0,128	0,085
			3	0,192	0,128

(1): $(0.6/ON) * \lambda$

(2): $((0.6/ON) * \lambda / 2.3$

(3): taille du pixel de la caméra* binning/ grossissement
/ Flash 4 : 6,5 μm

Taille du pixel de l'Evolve: 16 μm

(4): $1AU = (1,22 * M * \lambda) / ON$

(5): $[(0,88 \times \lambda_{Em} / (n - (n^2 - NA^2)^{1/2}))^2 + (2^{1/2} \times n \times PH / NA)^2]^{1/2}$

(6): Section optique/2,3

Il y a une lentille x1.2 devant la caméra Evolve du spinning.

Plateau technique d'imagerie cellulaire INFINITY-Purpan

Sophie Allart - sophie.allart@inserm.fr – Simon Lachambre – simon.lachambre@inserm.fr

Tél : 05. 62. 74. 45. 78

05. 31. 54. 79. 01

Les différents réglages du focus

Il est possible de faire le focus de trois manières sur ce système :

- Avec la vis macrométrique du statif



- Avec le système piezo du système. Ce réglage est beaucoup plus fin, précis et rapide que la vis macrométrique mais ne se fait que sur 500µm.



- Avec la vis du système de maintien de focus (PFS) lorsque celui-ci est allumé



En général, l'échantillon est trouvé grâce à la vis macrométrique du statif. Ensuite, on ajuste le focus avec le piezo. Enfin, si on souhaite l'utiliser, il faut allumer le PFS et régler le focus avec sa vis.

!Attention ! : si le PFS est allumé, toute modification du focus via le statif ou le piezo sera corrigée par le PFS.

Plateau technique d'imagerie cellulaire INFINITY-Purpan

Sophie Allart - sophie.allart@inserm.fr – Simon Lachambre – simon.lachambre@inserm.fr

Tél : 05. 62. 74. 45. 78

05. 31. 54. 79. 01

Utilisation du PFS

Afin de maintenir le focus, il est possible d'utiliser le PFS. Pour cela, il faut l'activer en appuyant sur le bouton encadré de rouge.



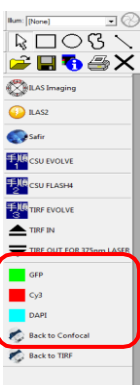
Ensuite, faites la mise au point avec la vis du PFS.



Selon les paramètres d'acquisition choisis (z, multiposition), l'utilisation du PFS ne sera pas la même. Pour cela, se référer aux paragraphes correspondants.

S'il y a seulement plusieurs canaux à acquérir au cours du temps (pas de Zstack ou de multipositions) le PFS fonctionne en continu en parallèle de l'acquisition sans induire de délai. En revanche, lorsqu'il y a un Zstack et/ou plusieurs positions à acquérir, le PFS s'active avant chaque position/ Zstack, corrige le focus et s'inactive ce qui induit un délai et donc une perte de temps.

Observation aux oculaires



Afin de pouvoir observer aux oculaires, dans le logiciel, cliquez sur le bouton correspondant au canal souhaité.

Le système bascule automatiquement en mode oculaire (cf bouton 3 page 4).

! Attention ! Penser à vérifier que le shutter de la lampe fluo est ouvert

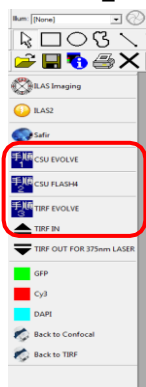
Plateau technique d'imagerie cellulaire INFINITy-Purpan

Sophie Allart - sophie.allart@inserm.fr – Simon Lachambre – simon.lachambre@inserm.fr

Tél : 05. 62. 74. 45. 78

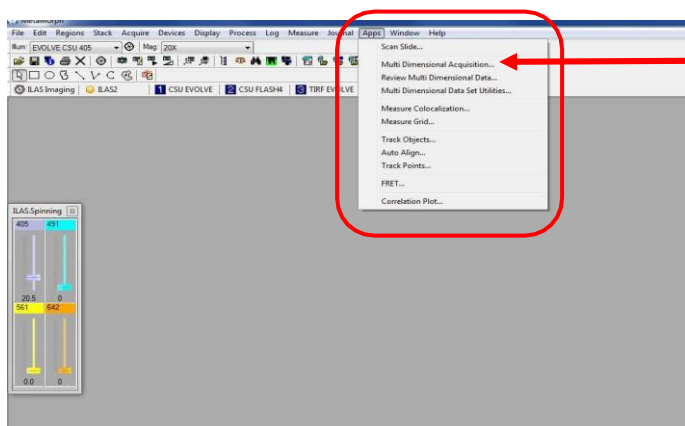
05. 31. 54. 79. 01

Acquisition d'une image



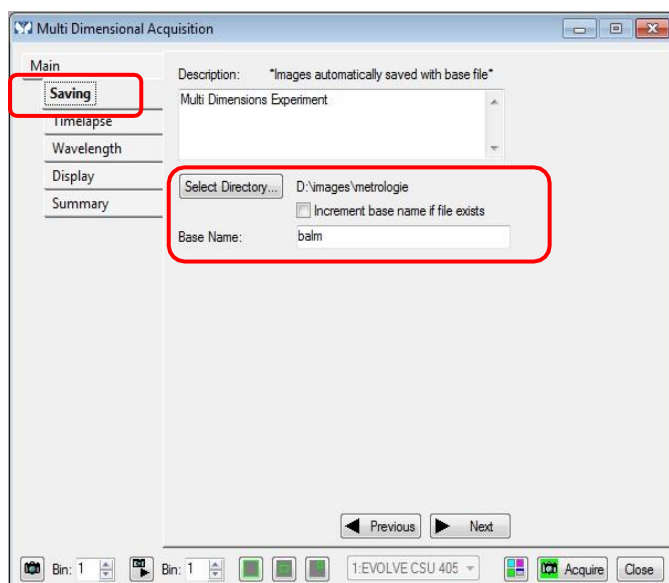
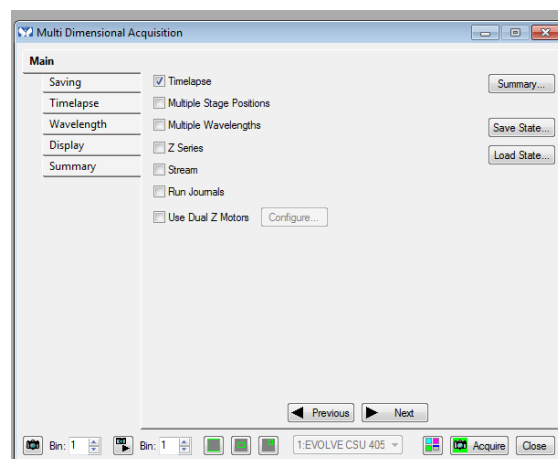
Cliquer sur le bouton CSU Evolve ou CSU Flash4 à gauche dans le logiciel selon la caméra utilisée

! Attention ! Vérifier que la tirette est dans la bonne position : enfoncée pour l'Evolve, sortie pour la Flash4



Dans le menu Apps, ouvrir la boîte « Multi Dimensional Acquisition ».

Dans l'onglet "Main" de la boîte "Multi Dimensional Acquisition", choisissez le type d'acquisitions que vous souhaitez réaliser : Time Lapse, Multiple Stage Positions, Multiple Wavelengths ou Z series.

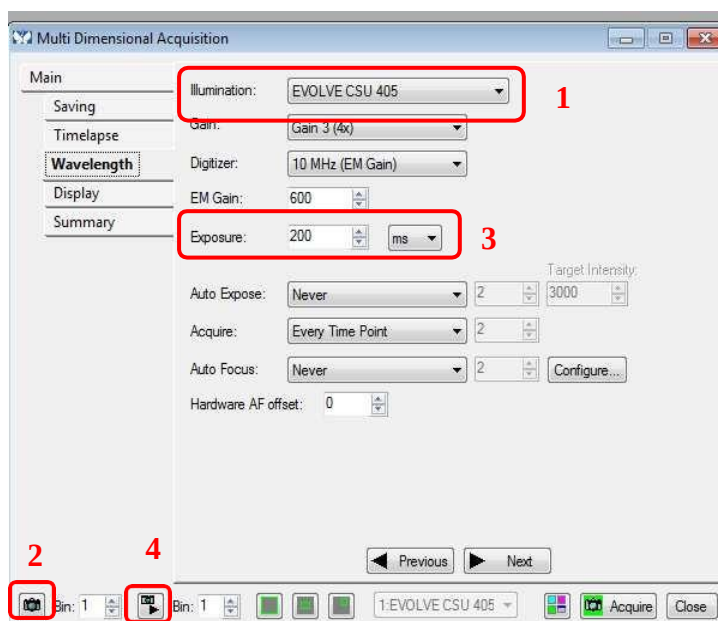


Onglet Saving : Cliquez sur l'onglet "Saving" de la boîte "Multi Dimensional Acquisition". Cliquez sur "Select Directory" et choisissez le dossier dans lequel sauvegarder les images (dans le dossier de votre équipe).

Dans la fenêtre "Base Name", indiquez le nom de la série d'image qui sera incrémenté automatiquement si la case "Increment base name if file exists" est cochée.

Les images sont sauvegardées automatiquement à la fin de leur acquisition.

Onglet Wavelength:



Cliquez sur l'onglet "Wavelengths" de la boîte "Multi Dimensional Acquisition" et choisissez le nombre de marquages à observer dans "Number of Wavelengths".

Pour chaque onglet (W1, W2,...) créé: Dans la fenêtre "Illumination", choisissez l'illumination voulue (1).

Se mettre en Live (2).

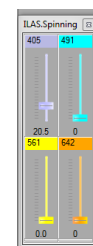
Dans la fenêtre "Exposure", choisissez le temps d'exposition (3) (ne pas toucher à Gain et Digitizer).

Régler la puissance du laser correspondant au filtre choisi.

Cliquez sur "Snap" pour acquérir

l'image (4) (mais l'image acquise

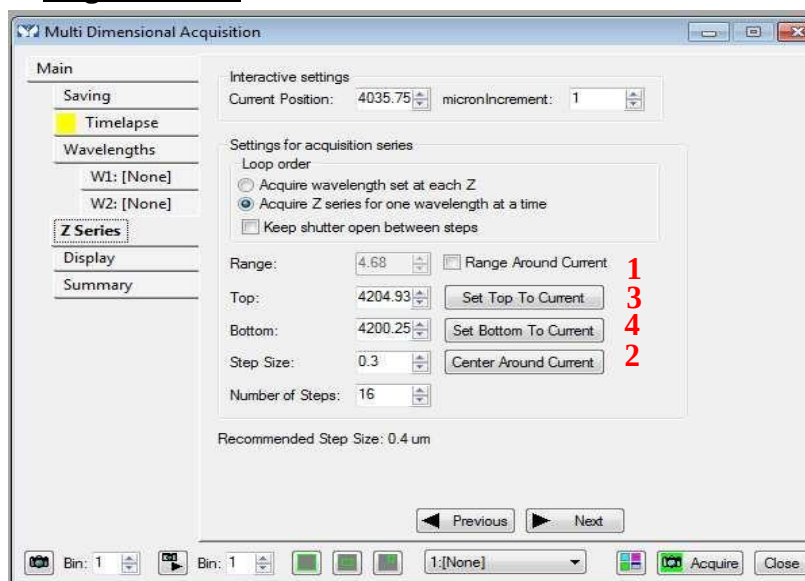
n'a qu'un seul point temps et un seul Z, cela



sert donc juste à vérifier que les réglages sont bons).

Si vous fermez la fenêtre de contrôle des lasers par erreur vous pouvez l'ouvrir en cliquant sur « ILAS Imaging » (à gauche dans le logiciel).

Onglet Z series :



Dans l'onglet "Z Series" Il existe deux moyens de définir votre série Z :

-Par le centre: il faut définir l'image actuelle comme étant le centre du stack. Pour cela, cochez "Range Around Current" (1). En Live, positionnez sur le plan que vous souhaitez être le milieu de votre Z et cliquez sur Center Around Current (2).

-Il est aussi possible de déterminer le stack en définissant le haut (Set Top To Current (3)) et le bas (Set Bottom To Current (4)) après avoir décoché "Range Around Current".

Dans les deux cas, il faut ensuite déterminer le Step Size c'est-à-dire le pas entre deux acquisitions (cf page 8). Le nombre de plans est défini automatiquement dans la case "Number of Steps".

Remarques :

Plateau technique d'imagerie cellulaire INFINITY-Purpan

Sophie Allart - sophie.allart@inserm.fr – Simon Lachambre – simon.lachambre@inserm.fr

Tél : 05. 62. 74. 45. 78

05. 31. 54. 79. 01

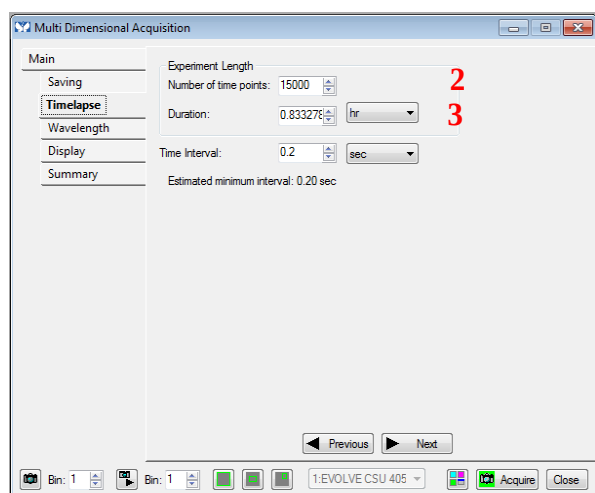
Les réglages de temps d'exposition et de puissance laser doivent être effectués dans le plan le plus intense de l'échantillon.

!Attention !:

Si vous souhaitez faire des Zstacks au cours du temps sur une seule position avec le PFS actif, lors de la détermination du Zstack il faut :

- Régler le focus avec les vis macrométrique du statif et celle du piezo
- Activer le PFS et ajuster le focus avec le PFS
- Désactiver le PFS
- Déterminer le haut et le bas du Zstack avec la vis du piezo (elle est plus rapide et précise que celle du statif) sans toucher au focus du statif et du PSF.
- Réactiver le PFS

Avant chaque Zstack, le PFS s'active, chercher la bonne position en z automatiquement, se désactive et ensuite le Zstack est acquis ce qui induit une perte de temps.



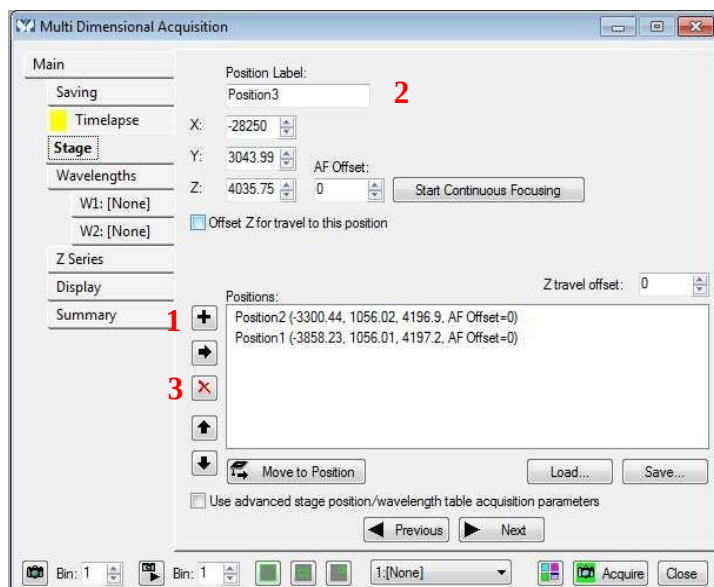
Onglet Timelapse : Dans l'onglet "Timelapse" de la boîte "Multi-Dimensional Acquisition", déterminez l'intervalle de temps entre deux acquisitions (si un carré jaune apparaît, c'est que l'intervalle de temps est inférieur au temps d'acquisition). Sélectionnez le nombre de point de temps à réaliser (1) ou la durée du film (2).

Si on souhaite réaliser un time lapse avec un seul plan Z et une seule position, avec le PFS actif, il faut d'abord régler le focus avec les vis macrométrique du statif et celle du piezo. Ensuite, il faut activer le PFS et ajuster le focus avec le PFS. Le PFS cherchera et corrigera en continu le focus sans que cela ait un impact sur

l'intervalle de temps entre deux points temps.

!Attention !:

Pour calculer le temps minimum entre deux acquisitions, le logiciel tient uniquement compte du temps d'exposition de chaque canal et du nombre de Z à réaliser. Il ne calcule pas le temps nécessaire au déplacement en z, x et y ou le temps nécessaire au PFS. Le temps minimum entre deux acquisitions est donc sous-estimé.



Onglet Stage : Afin d'imager différentes positions, déterminez en Live la position choisie et cliquez sur le bouton + (1). Pour plus de facilités, la position peut être nommée avant de l'enregistrer en changeant son nom dans Position Label (2). Le nom de la position ainsi que ses coordonnées X, Y et Z apparaissent alors dans la fenêtre "Positions".

! Attention ! si une précédente position est sélectionnée (surlignée en bleu), celle-ci sera écrasée par la nouvelle position enregistrée.

L'acquisition est réalisée en fonction de leur ordre dans la liste. Pour modifier l'ordre d'acquisition des positions, utiliser les flèches.

Pour supprimer une position, la sélectionner et cliquer sur la croix rouge (3).

Il est possible de sauvegarder les positions (il est conseillé de le faire avant de lancer l'acquisition pour pouvoir rapidement les retrouver si le logiciel cesse de fonctionner). Pour cela, cliquer sur Save. Pour les importer, cliquer sur Load.

Si vous souhaitez faire des Zstacks au cours du temps en plus du multiposition, il faut faire un Zstack pour lequel l'on détermine un point comme centre du stack. Pour cela, la position sauvegardée sera le centre du stack et dans l'onglet Z series, il faut sélectionner Range Around Current.

Si vous souhaitez utiliser le PFS pour faire du multiposition, il faut lors de la détermination des différentes positions :

- Régler le focus avec les vis macrométrique du statif et celle du piezo
- Activer le PFS et ajuster le focus avec le PFS
- Désactiver le PFS
- Déterminer chaque point avec la vis du piezo (elle est plus rapide et précise que celle du statif) sans toucher au focus du statif et du PSF.
- Réactiver le PFS

Avant chaque position, le PFS s'active, chercher la bonne position en z automatiquement, se désactive et ensuite le Zstack est acquis ce qui induit une perte de temps.

Onglet Stream : Dans le mode Stream, les images sont acquises en continue le plus vite possible.

Il est possible de streamer :

- Les canaux : c'est-à-dire qu'ils vont être acquis pour un point temps rapidement puis transférer. Pour cela, il faut les mêmes réglages de la caméra (gain et temps d'exposition) pour tous les canaux.
- Le Z stack : tous les z vont être acquis d'un coup. Pour streamer le Z, il faut que les canaux soient aussi streamer.
- Le temps : tous les points temps vont être acquis à la suite sans délai entre. Pour cela, il faut que les z (s'il y en a) et les canaux soient aussi streamer. Attention, pour streamer le temps, la RAM va être le facteur limitant.

Afin de ne pas perdre de temps entre l'acquisition de deux canaux du fait de la rotation de la roue de filtres, il est possible d'utiliser le filtre quadribande. Pour cela, utiliser une configuration dans l'onglet Wavelength contenant Fast.

Ce filtre quadribande peut s'utiliser pour les fluorochromes similaires au Dapi, GFP, Cy3 et Cy5.

Il est toutefois nécessaire de vérifier qu'il n'y a pas de crosstalk (passage de fluorescence provenant d'un canal dans un autre canal). Pour cela, réaliser des échantillons simple marquage pour chacune des couleurs et vérifier que le signal présent est bien présent dans le bon canal mais pas dans les autres.

Utilisation du PFS lors d'un stream :

S'il n'y a pas de z ou de multipositions, le PFS fonctionne en continu en parallèle de l'acquisition sans induire de délai. En revanche, lorsqu'il y a un Zstack et/ou plusieurs positions à acquérir, le PFS s'active avant chaque position/ Zstack, corrige le focus et s'inactive ce qui induit un délai et donc une perte de temps non compatible avec le streaming.

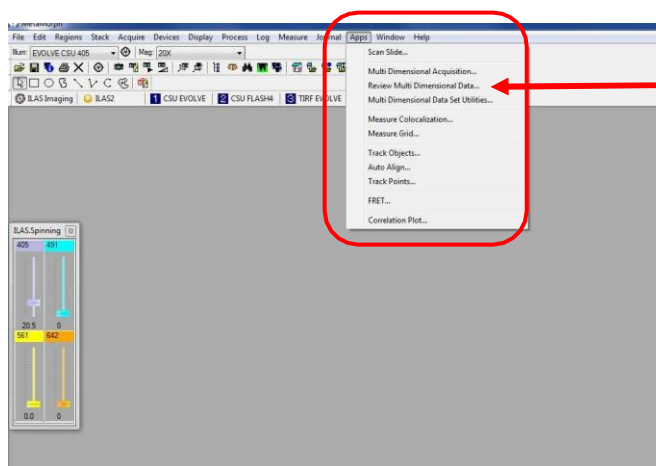
Plateau technique d'imagerie cellulaire INFINITY-Purpan

Sophie Allart - sophie.allart@inserm.fr – Simon Lachambre – simon.lachambre@inserm.fr

Tél : 05. 62. 74. 45. 78

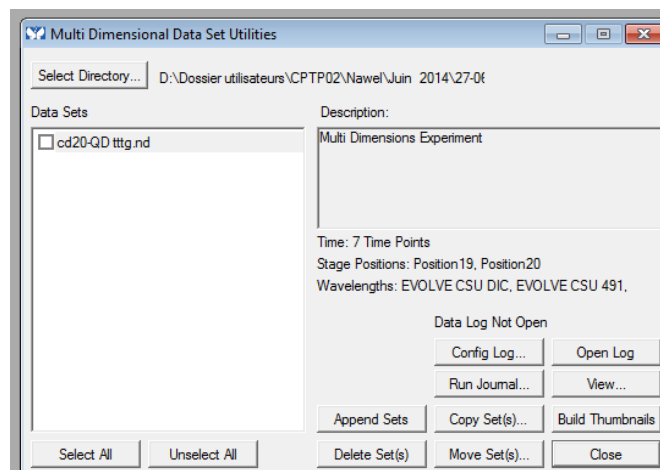
05. 31. 54. 79. 01

Monter un film acquis



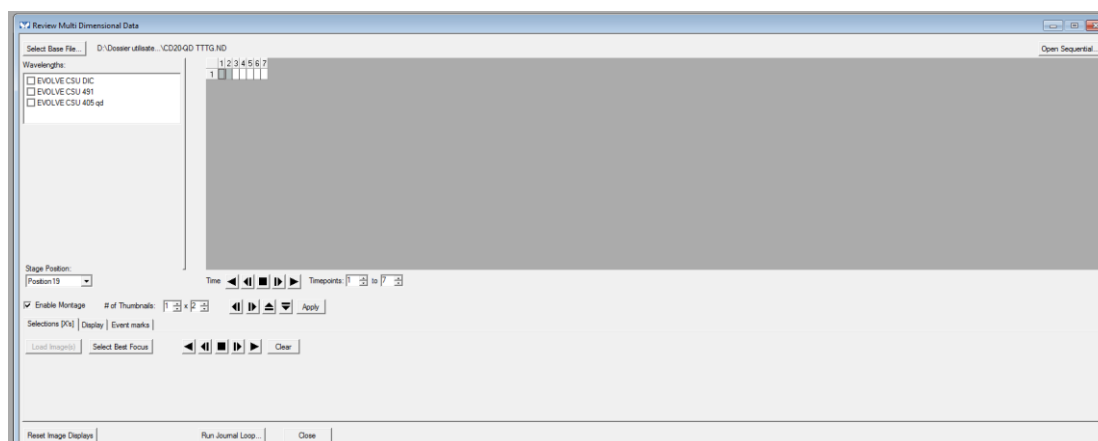
Pour monter un film, dans le menu Apps, ouvrir la boîte « Review Multi Dimensional Data ».

Une nouvelle fenêtre « Review Multi Dimensional Data » s'ouvre. Cliquer sur le bouton Select Base File (1). Dans la nouvelle fenêtre Multi Dimensional Data Set Utilities, Choisir le dossier où se trouvent les fichiers dans Select Directory (2) puis dans Data Set, le fichier à monter (3). Enfin, cliquer sur View (4).



Dans la fenêtre Review Multi Dimensional Data :

- S'il n'y a qu'un seul Z : sélectionner les points temps à monter (clic droit au début de la ligne pour tous les sélectionner)
- S'il y a plusieurs Z : Le bouton Select Best focus permet de sélectionner automatiquement le meilleur focus. Si vous souhaitez avoir une projection des intensités maximales, allez dans l'onglet Z projection et cocher la case Z projection. Ensuite, sélectionner les points temps à monter.



Plateau technique d'imagerie cellulaire INFINITY-Purpan

Sophie Allart - sophie.allart@inserm.fr – Simon Lachambre – simon.lachambre@inserm.fr

Tél : 05. 62. 74. 45. 78

05. 31. 54. 79. 01