

Konfokální mikroskop Leica TCS SP2 AOBS s příslušenstvím pro Nomarskiho kontrast **podrobné informace**

Umístění

Místnost Dal / příz. / 009 (l. 2774)

oddělení biomatematicky, Fyziologický ústav AV ČR, Krčský areál, Vídeňská 1083, Praha 4

Kontakty

Správce: Alexandr Čerňavský, Ph.D.: oleksandr.chernyavskiy@fgu.cas.cz, tel. 29644 2274, -2582, -2774, -3767 (linky 2274, 2582, 2774, 3767). Administrativní a technické zajištění provozu, konzultace.

Zástupce správce: Mgr. Daniel Hadraba: hadraba.daniel@fgu.cas.cz, tel. 29644 2274, -2582, -2774, -3767 (linky 2274, 2582, 2774, 3767). Administrativní a technické zajištění provozu při nepřítomnosti správce.

Zástupce vedoucího oddělení biomatematicky pro provoz konfokální facility: RNDr. Lucie Kubínová, CSc.: lucie.kubinova@fgu.cas.cz, tel. 29644 2314. Konzultace v oboru stereologie.

Vedoucí odd. biomatematicky: RNDr. Jiří Janáček, Ph.D.: jiri.janacek@fgu.cas.cz, tel. 29644 2768. Konzultace v oboru zpracování a analýzy obrazu.

Pravidla provozu

1. **Rezervace.** K rezervaci přístroje slouží rezervační systém umístěný na <https://biomed.cas.cz/rezervace/>. Přístup do systému mají pouze zaregistrovaní uživatelé, přehled rezervací je dostupný všem po nakliknutí na "Zobrazit plánování". Rezervace přístroje je umožněna všem uživatelům, kteří mají přístup do rezervačního systému. O tento přístup zažádají IT oddělení FGÚ na e-mailové adrese helpdesk@fgu.cas.cz (v kopii správci). Ostatní uživatelé si přístroj mohou rezervovat pouze po dohodě se správcem. Po ověření žádosti (zpravidla během několika hodin) zaměstnanci FGÚ dostanou rezervační práva na všechny laserové skenovací konfokální mikroskopy FGÚ (zaměstnanci jiných akademických institucí a externí uživatelé dostanou rezervační práva jen na požadovaný přístroj), což jim je oznámeno emailem od IT oddělení. Pro nárok na využití přístroje je rozhodující jméno uživatele uvedené v rezervačním systému. Je třeba, aby uživatelé dodržovali zamluvené časy, a v případě, že nebudou moci zamluvený čas využít, rezervaci co nejdříve zrušili (případně upravili rezervovaný čas dle aktuální potřeby). Problémy s rezervačním systémem je třeba hlásit na IT Helpdesk FGÚ (helpdesk@fgu.cas.cz).

Rezervace prostřednictvím www stránky je možná maximálně jeden měsíc předem. Řádné zrušení rezervace je nutné učinit přímo v rezervačním systému co nejdříve, avšak nejpozději 24 hodin před plánovaným začátkem snímání. Pozdější zrušení rezervace, které může vykonat pouze správce, bude řešeno individuálně jako mimořádná situace. Stejná pravidla platí pro úpravu rezervovaného času. Pokud rezervace nebude zrušena v řádném termínu, bude nevyužitý zarezervovaný čas vyúčtován na vrub objednatele uvedeného v rezervačním systému. V případě opakovaného nevyužívání rezervovaného času může být příslušnému uživateli omezen přístup k přístroji. Pravidla pro přidělení přístupových práv do místnosti s laserovými skenovacími konfokálními mikroskopy a potřebný postup jsou uvedeny na str. 2 dokumentu „Záznam o zaškolení“ viz Užitečné odkazy.

2. Školení uživatelů

Po registraci do online rezervačního systému uživatel získá automaticky status běžného (nezaškoleného) uživatele. Pro získání statusu samostatného (zaškoleného) uživatele je nutné absolvovat školení, během kterého se uživatel seznámí s pravidly bezpečnosti a ochrany zdraví při práci, se zásadami šetrného a bezproblémového provozu přístroje, se správným postupem zapínání a vypínání přístroje a s tím, co dělat v případě problémů, popř. havárie. Školení pro práci s přístrojem je třeba dohodnout se správcem. Na závěr školení bude podepsán Záznam o zaškolení.

3. Zásady pro práci s přístrojem

Všechny změny (hardwarové) konfigurace (např. týkající se jednotlivých filtrů, kostek filtrů, výměny dedikovaných externích detektorů za kameru, nastavení a přesné kalibrace komůrky pro měření živých buněk, změny teploty v místnosti) je nutné konzultovat se správcem přístroje (nejlépe s předstihem nebo alespoň bezprostředně před zásahem). Ve zvláštních případech správce může uživateli povolit vlastnoručně měnit konfiguraci, a to pouze po dodatečném zaškolení samostatného uživatele i s praktickým nácvikem.

Rtuťovou výbojku nezapínejte dříve než 5 minut před tím, než budete chtít používat fluorescenční mikroskop. Výbojku nevypínejte, pokud by měla být opět zapnuta dříve než za 20 minut. V každém případě se výbojka nesmí zapínat, pokud je horká (hrozí prasknutí výbojky a zamoření místnosti, tj. přerušování provozu přístroje).

Při používání Ar laseru, je nutné dodržet správný postup pro vypínání laseru a následovně celého systému. Chlazení Ar laseru se nesmí vypínat dříve než 15 minut po vypnutí Ar laseru (jak v LAS X software, tak i otočením klíče na panelu mikroskopu). Nedodržení tohoto pravidla by vedlo k významnému snížení životnosti Ar laseru, případně k poruše laseru.

Není dovoleno sahat na jakékoliv skleněné povrchy (čočka objektivu, čočka kondenzoru, filtrbloky...).

Při změnách nastavení mikroskopu (objektiv, stůl, komůrka, kondenzor), je třeba pracovat opatrně, nastavení neměnit násilím – problémy neprodleně konzultovat se správcem.

Po ukončení práce je uživatel povinen po sobě vše uklidit, vyhodit použitá sklička do k tomu určené nádoby/kontejneru, odstranit šetrně zbytky imerzního oleje z objektivů papírky na čištění objektivu (lens cleaning tissues). Dále uživatel zapíše využití přístroje do provozní knihy s uvedením příjmení, data, času (počátku a konce práce – stanoveno časem příchodu a odchodu), uvedením názvu zaměstnavatele a čísla (nebo jiného označení) laboratoře a vlastnoručním podpisem, stručným popisem měření, případnými poznámkami a v případě interních uživatelů z FGÚ i s číslem zakázky, ze které budou hrazeny poplatky. Jakékoliv komplikace nebo technické problémy je nezbytně nutné neprodleně oznámit správci přístroje a zaevidovat do provozní knihy. Uživatelé, jimž byla předem povolena vlastnoruční změna konfigurace mikroskopu (viz výše), musí uvést přístroj do „defaultní“ konfigurace (pokud nebylo dohodnuto se správcem jinak).

S dotazy spojenými s užíváním přístroje (konzultace pokusu, otázka nestandardních podmínek snímání, popř. práce mimo pracovní dobu apod.) se obraťte na správce přístroje. S otázkami spojenými s rezervačním systémem se obraťte na IT oddělení FGÚ (helpdesk@fgu.cas.cz).

Při publikování výsledků, získaných pomocí mikroskopu, jsou uživatelé povinni uvést využití přístroje v publikaci – přesná forma viz níže, případné nejasnosti je třeba konzultovat se správcem.

Za projekt Czech-BioImaging:

- „Supported by MEYS (LM2015062 Czech-BioImaging)
- “We acknowledge the BioImaging Facility, Institute of Physiology, supported by the Czech-BioImaging large RI project (LM2015062 funded by MEYS CR) for their support with obtaining scientific data presented in this paper“.

4. Poplatky: viz samostatný dokument

Odkaz pro interní uživatelé:

http://intranet.fgu.cas.cz/pristroje_sluzby/PublishingImages/Stranky/Kontakty_a_obecne_info_rmace/Poplatky%20za%20vyuziti%20zobrazovacich%20technik%20FGU%20zapojenych%20do%20projektu%20Czech-BioImaging.pdf

Odkaz pro externí uživatelé:

http://www.fgu.cas.cz/upload/files/Poplatky_zobrazovaci_techiky_FGU_Czech_Bioimaging.pdf

Podrobná specifikace konfokálního mikroskopu Leica TCS SP2 AOBS

Mikroskop: Inverzní mikroskop Leica DM IRE2 HC Fluo TCS 1-B, základní stativ pro procházející světlo a dopadající fluorescence. Motorizovaný hrubý a jemný fokus. 6ti polohový fokusovací revolver pro objektivy M25. Tubusová optika 1x s Bertrandovou čočkou

Optika DM IRE2 HC T22 S1 motorizovaný fluorescentní karusel, trinokulární tubus s fotovýstupem pro kameru Leica DFC480

Manuálně ovladatelný stolek pro vzorky

Okuláry HC Plan 10x/22 Br.M

Zdroj světla pro fluorescence EL6000 vč. 50W výbojky a napájecího vlákna

Kondenzor S1/NA0.90

Kondenzorová hlava S23/0.53

C-mount adapter 0.5x

UV Filter System pro DM IR/DM RXA/RF8

Základní sada objektivů:

HC PL FLUOTAR 5x/0.15 Dry

HC PLAPO 10x/0.40 Dry

HC PLAPO 10x/0.40 Imm CS

HC PLAPO 20x/0.70 Imm Corr CS

HCX PLAPO 40x/1.25-0.75 Oil CS

HCX APO L 40x/0.80 W U-V-I

HCX PLAPO 63x/1.40 Oil CS

HCX PL APO 63x/1.20 W Corr

PL APO 100x/1.40-0.70 Oil.

Po dohodě lze použít i objektivy užívané na jiných mikroskopech firmy Leica Microsystems:

HC PL FLUOTAR (FLUOR) 5x/0.15 NA, WD=10 mm;

HC PL FLUOTAR (FLUOR) 10x/0.30 NA, WD= 11 mm;

multiimerzní objektiv HC PL APO 20x/0.75 NA, IMM CORR CS2, WD=0.67 mm, DIC;

HC PL APO 63x/1.20 NA W CORR CS2, WD=0.30 mm, DIC;

HC PL APO 63x/1.40 NA OIL CS2, WD=0.14 mm, DIC.

Konfokální hlava UV-VIS-IR: TCS SP2 s AOBS a s vysoce citlivým detekčním systémem

Akusticko-optický dělič paprsků (AOBS), 3-kanalový spektrální detektor s laditelným emisním rozsahem 350 nm - 800 nm.

Lasery:

Multi RGBB, AOBS 8 ch AOTF. Laserové zdroje Blue (Ar 458nm/5mW, 476nm/5mW, 488/20mW, 514nm/20mW), Green (HeNe 543nm/1.2mW) a Red (HeNe 633nm/10mW).

Speciální optický stůl (direct inv.) 1200x1800 mm

Z-galvo stolek DMR/IR otáčecí

Detektory:

Detektor procházejícího světla BF TCS 2 DM IR

Detektor pro non-descanned dvoufotonovou mikroskopii

DIC pro 63x a 100x

Digitální kamera Leica DFC480

Interní (konfokální): 2x HyD spektrální detektory vysoce citlivé hybridní detektory s maximální kvantovou účinností 45% (při 500 nm) s rozsahem 400 – 720 nm s nízkým šumem a velkým dynamickým rozsahem, možnosti photon counting módu a gaitingu, možnost nastavovat offset a gain pro každý detektor zvlášť, možnost vybrat libovolné spektrum pro detekci a libovolné detekční okno; šířka okna od 1 nm;

Interní (descanned) detektory: 3x PMT detektory s vysokou citlivostí, rozsah detekce od 400 do 800 nm, možnost nastavovat offset a gain pro každý detektor zvlášť, možnost vybrat libovolné spektrum pro detekci a libovolné detekční okno; šířka okna od 1 nm;

Externí (non-descanned): 2x TLD – detektory pro snímání v procházejícím světle (BF) nebo DIC, použitelné současně s dalšími kanály (konfokálními a externími – non-descanned detektory);

2x RLD citlivé PMT detektory (s rozsahem 400 – 720 nm) s nízkým šumem a s vysokým dynamickým rozsahem.

Komůrka pro snímání živých buněk: Inkubační systém Pecon, kompletní pro živé buňky nebo řezy tkání. Obsahuje miniaturní inkubační komůrku s řízením průtoku vzduchu, řídicí jednotku pro kontrolu teploty a CO₂ a O₂, vyhřívanou vložku pro Petriho misky nebo Bachhoferovu perfúzní komůrku a řídicí jednotku, zavlhčovací jednotku a komůrku s možností perfúze, vložku pro 1x 60 mm nebo 1x 35 mm Petriho misky.

Bachhoferova perfúzní komůrka, sada pro otevřenou a uzavřenou perfúzi, modifikovaná pro TCS z-stolek.

Software: TCS Electronic a multitasking high performance Windows XP workstation, 2x18 LCD-plus. Obsahuje řídicí panel se 7 dig. potenciometry pro online nastavení scan. parametrů,

LCS software. 3D Software License LCS, prostorové rekonstrukce, 3D animace, 3D filtr, stereo obrázky a animace, projekce, atd.

Aplikace: FRAP, FLIP, FRET, physiology (kinetika v živých systémech)

Physiology Software License LCS, imaging živých buněk, časová smyčka, trigger handling, spot-bleach feature, měření ion-concentration

Multicolor Software License LCS, kolokalizace záznamů 2 a 3 kanálů, 2D a 3D cytofluorogramy, histogram – segmentace a maskování.

Macro Developer Software License LCS, task automation based on MS VBA technology, includes VBA IDE

SP2 manuál (anglicky)

Užitečné odkazy

- Rezervační systém přístrojů FGÚ AV ČR: <https://www.biomed.cas.cz/rezervace/>

- Stránka s popisem a specifikacemi optických mikroskopů FGÚ:

<http://fgu.cas.cz/research/167-shared-equipments>

- Stránka s kompletními informacemi zapojených zobrazovacích přístrojů do projektu Czech-BioImaging:

<http://www.fgu.cas.cz/articles/529-czech-bioimaging-2016-2019>

- Záznam o zaškolení – odkaz pro interní uživatele:

(http://intranet.fgu.cas.cz/pristroje_sluzby/Stranky/Kontakty_a_obecne_informace.aspx)

včetně pravidel přístupu do místnosti s laserovými skenovacími konfokálními mikroskopy FGÚ AV ČR, postup a vzor pro vyplnění

(http://intranet.fgu.cas.cz/pristroje_sluzby/PublishingImages/Stranky/Kontakty_a_obecne_informace/Z%c3%a1znam%20o%20za%c5%a1kolen%c3%ad%20formul%c3%a1%c5%99%20Czech-BioImaging%20VZOR.pdf)

- Záznam o zaškolení – odkaz pro externí uživatele: <http://www.fgu.cas.cz/articles/529-czech-bioimaging-2016-2019>

- <http://www.leica-microsystems.com/website/lms.nsf> informace o mikroskopu

- <http://www.microscopy.fsu.edu/primer/> výukové texty nejen o konfokální a 2-fotonové mikroskopii

Prohlížeč souborů ve formátu LIF a LEI (t.j. specifických formátech firmy Leica Microsystems GmbH) [LAS AF Lite](#) (verze LAS-AF-Lite 2.6.0 build 7266) – vhodný pro prohlížení nasnímaných dat z mikroskopu Leica SP2, SPE, SP5, SP8.

- Open source program [Fiji](#) (Fiji is Just ImageJ) – program ImageJ s předinstalovanými pluginy (včetně Bioformats, býv. LOCI Tools) a uznávaný mezinárodní vědeckou komunitou jako jeden ze standartních programů na zpracování obrazových dat, včetně rozsáhlého návodu a dokumentace, popřípadě Image Processing and Analysis in Java ([ImageJ](#)) spolu s některými užitečnými pluginy:

- Bioformats (bývalé LOCI Tools): <http://imagej.nih.gov/ij/>;

- SLIM Curve: http://fiji.sc/SLIM_Curve, <https://slim-curve.github.io/>;

- ImageJ world mailing list: <http://imagej.nih.gov/ij/list.html>.

[Online Nyquistova kalkulačka](#) (pro teoretický výpočet velikosti voxelů na základě údajů o optickém systému - NA objektivu, excitační a emisní vlnové délky atd.) – také je k dispozici aplikace pro Android 4.0 a vyšší.

- Interaktivní prohlížeče fluorescenčních spekter:

ThermoFisher (Life Technologies) interactive [Spectra Viewer](#).

[Leica FluoScout](#) with short [description](#);

BdBioScience [Spectrum Viewer](#);

[BioLegend Fluorescence Spectra Analyzer](#);

[list of interactive spectra viewers](#) by George McNamara, Ph.D. (The University of Texas MD Anderson Cancer Center) and his comments on above mentioned resources.

- Tabulky fluorescenčních spekter fluorofórů:

<http://www.fluorophores.tugraz.at/substance/>

<http://www.leica-microsystems.com/science-lab/fluorescent-dyes/>

<http://works.bepress.com/gmcnamara/9/>