

Invertovaný fluorescenční mikroskop Nikon Ti-E s konfokálním skenerem na bázi Nipkowova rotujícího disku Crest CARV II

Umístění

Místnost D / příz. / 048 (l. 2472)

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

Kontakty

Správce: Mgr. David Vondrášek: David.Vondrasek@fgu.cas.cz , tel. 24106 2274, -2472, -2582. Administrativní a technické zajištění provozu, konzultace.

Zástupce správce: Mgr. Daniel Hadraba: Daniel.Hadraba@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, PhD.: 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 kliknutí na “Plánování a vytvoření rezervací” a následně na modrý trojúhelníček vedle nápisu “Přehled rezervací”. 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 nabízené 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 objednatel u 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 mikroskopy a potřebné postupy jsou uvedeny na str. 2 Záznamu o školení, viz samostatný dokument.

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 a následně bude vystaven „Záznamem o zaškolení“ (viz samostatný dokument) s podpisem školitele i uživatele.

3. Zásady pro práci s přístrojem.

Uživatel je povinen zapsat se do přístrojového deníku umístěného u přístroje.

Všechny změny (hardwarové) konfigurace (např. týkající se jednotlivých filtrů) 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. přerušení provozu přístroje). Není dovoleno sahat na jakékoliv skleněné povrchy (čočka objektivu, čočka kondenzoru, filtry atd.).

Při změnách nastavení mikroskopu (objektiv, stolek, 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 sklíčka do k tomu určené nádoby/kontejneru, odstranit zbytky imerze z objektivů - šetrně 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 původního nastavení (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 obračejte na správce přístroje.

S otázkami spojenými s rezervačním systémem se obračejte na IT oddělení FGÚ (helpdesk@fgu.cas.cz).

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

Za projekt Czech-BioImaging:

- ✚ „Supported by MEYS (LM2015062 Czech-BioImaging)” nebo
- ✚ *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*

Za projekt OPPK Mikroskopický systém možné varianty:

- ✚ V poděkování bude uvedeno v českém jazyce „Podpořeno z ERDF, OPPK Mikroskopický systém CZ.2.16/3.1.00/28034 nebo v anglickém jazyce „Supported by project OPPK Mikroskopický systém CZ.2.16/3.1.00/28034“.
- ✚ Název projektu bude uveden v údajích o zdroji použitých zvířat: *"Experiments were performed in male Wistar albino rats (Institute of Physiology of the Czech Academy of Science, OPPK Mikroskopický systém CZ.2.16/3.1.00/28034)"*.
- ✚ Bude uvedeno v metodice či supplementary materials u použitého přístroje: *"Na analýzu vzorků mozkové tkáně byl použit Fluorescenční konfokální mikroskop, Nikon, OPPK Mikroskopický systém CZ.2.16/3.1.00/28034"*.

Poplatky: viz samostatný dokument:

Interní uživatelé:

http://www.fgu.cas.cz/upload/files/Poplatky_zobrazovací_techiky_FGÚ_Czech_Bioimaging_2017.pdf

Externí uživatelé:

http://www.fgu.cas.cz/upload/files/Poplatky_zobrazovací_techiky_FGÚ_Czech_Bioimaging_2017.pdf

Podrobná specifikace konfokálního mikroskopu Nikon Ti-E / Crest CARV II

1. **Mikroskop.** Invertovaný fluorescenční mikroskop Nikon Ti-E s motorizovaným stolkem Prior Proscan III, který umožní snímání více ROI, TileScan a Mark&Find. K mikroskopu je připojena jednotka Crest CARV II, která umožňuje automatické konfokální snímání za pomoci rotujícího Nipkowova disku nebo provádění FRAP měření. Celá měřicí sestava je uložena na aktivním pneumatickém antivibračním stole STable© Supertech.

2. Základní sada objektivů.

Nikon CFI Plan Fluor 10X, DIC, 10x/0.3 NA, WD = 16 mm;

Nikon CFI ADL 10X, Ph, 10x/0.25, WD = 6.2 mm;

Nikon CFI Plan Fluor 20X, DIC, 20x/0.5 NA, WD = 2.1 mm;

Nikon CFI S Fluor 40X Oil, DIC, 40x/1.3 NA, WD = 0.22 mm;

Nikon CFI Plan Apo Lambda 60X Oil, DIC, 60x/1.4 NA, WD = 0.13 mm;

Nikon CFI Plan Apo VC 100X Oil, DIC, 100x/1.4 NA, WD = 0.13 mm;

For more information, please visit:

https://www.nikoninstruments.com/en_EU/Product-Selectors/Objective-Selector

3. **Osvětlovací soustava.** K dispozici je jak osvětlení pomocí halogenové lampy v transmisním módu, tak rtuťová výbojka X-Cite® 120PC Q s rozsahem spektra od 300 nm do 700 nm v epifluorescenčním módu. Excitační část je vybavena sadou filtrů a dichroických zrcátek, které umožňují práci s následujícími fluorofory (DAPI, GFP, Cy3, Texas Red, Cy5).

4. **Detekční soustava.** V emisní cestě jsou umístěny bariérové filtry pro výše uvedené fluorofory. Obraz je detekován pomocí monochromatické 16bit CCD kamery Hamamatsu

Orca-R² s rozlišením 1344 (V) x +1024 (Š), velikostí pixelu 6,45 μm x 6,45 μm, rychlostí snímání 16.2 fps a kvantovou účinností přes 70 %.

5. Inkubační komora. Systém Okolab UNO-COMBINED-CONTROLLER o rozměrech 85,5 x 127,7 x 25,0 umožňuje kontrolu teploty (teplota okolí – 50° C), CO₂ (0 – 15 %) a relativní vlhkosti prostředí (75 % při 37° C).

6. Software. Celý systém je ovládán přes NIS-Elements AR, který umožňuje plnění komplexních snímacích úloh pomocí modulu Jobs.

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-equipment>
- ✚ Podrobné informace o přístroji a jeho provozu viz samostatný dokument:
Odkaz pro interní uživatele:
http://intranet.fgu.cas.cz/pristroje_sluzby/Stranky/Kontakty_a_obecne_informace.aspx
Odkaz pro externí uživatele:
<http://www.fgu.cas.cz/research/167-pristroje>
- ✚ 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>

Následná práce s obrazovými soubory pomocí programu NIS-Elements Viewer
https://www.nikoninstruments.com/en_EU/Products/Software/NIS-Elements-Advanced-Research/NIS-Elements-Viewer
nebo

open source program Fiji (Fiji is Just ImageJ) – programu 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 (byvale 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>.

Interaktivní prohlížeče fluorescenčních spekter:

ThermoFisher (Life Technologies) interactive Spectra Viewer.

<http://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cell-analysis/labeling-chemistry/fluorescence-spectraviewer.html.html>

Tabulky fluorescenčních spekter fluoroforů:

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