Dvoufotonový mikroskop Bruker Ultima IntraVital

Umístění

Místnost DaI / příz. / 009 (l. 3767)
Odd. biomatematiky, Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i., 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:
Ing. Mgr. Daniel Hadraba, Ph.D.
hadraba.daniel@fgu.cas.cz, tel. 24106 2314.
Administrativní a technické zajištění provozu při nepřítomnosti správce.

Vedoucí odd. biomatematiky:
RNDr. Jiří Janáček, Ph.D.
jiri.janacek@fgu.cas.cz, tel. 24106 2768.
Konzultace v oboru zpracování a analýzy obrazu.

Poplatky

Informace o poplatcích jsou na https://www.fgu.cas.cz/articles/672-poplatky-czbi.

Obecná pravidla provozu

- Nahlédněte do dokumentu Pravidla provozu mikroskopů.
- Přístroj používají vyškolení uživatelé v souladu se Záznamem o zaškolení. V pracovní době (v pracovní dny od 8:00 do 17:00) je možno práci konzultovat se správcem. Neváhejte správce kdykoliv kontaktovat, např. ke konzultaci designu pokusu, při změně měřícího protokolu, pro použití nestandardní fluorescenční protilátky nebo podmínek snímání, při neodkladném experimentu atd.
- Uživatel je povinen zapsat se do přístrojového deníku umístěného u přístroje. Informace o poplatcích za užívání přístroje jsou uvedeny na webové stránce https://www.fgu.cas.cz/articles/672-poplatky-czbi.
- Při publikování výsledků získaných pomocí mikroskopu jsou uživatelé povinni uvést využití přístroje. Uživatelé otevřeného přístupu jsou dále v poděkování povinni uvést: „Výsledky byly získány v rámci Národní infrastruktury pro

biologické a medicínské zobrazování (Czech-BioImaging LM2018129 financovaný MŠMT ČR).“, anglicky „The results were obtained using the National Infrastructure for Biological and Medical Imaging (Czech-BioImaging LM2018129 funded by MEYS CR).“ Případné nejasnosti je třeba konzultovat se správcem.

Specifická pravidla provozu Bruker Ultima Intravital

- Chameleon Discovery TPC laser je v neaktivním stavu v tzv. stadby módu a nikdy se nevypíná. Ve standby módu je klíček pro zapínání laseru v pozici STADBY a otočením klíčku do pozice LASER ENABLED dojde k zapnutí laseru.
- Zapněte kontrolní stanici přepnutím spínače, který je lokalizován na pravé straně kontrolní stanice.
- Zapněte PC
- Zapněte software Chameleon a zkontrolujte COM porty pro připojení laseru. V softwaru přepněte na externí ovládání laseru, aby software Prairie View mohl přistupovat k ovládání laseru. Důležité: Pokud laser není v COM portech připojen, přestože jste otočili klíčkem do pozice LASER ENABLED, kontaktuje správce systému pro změnu optické cesty a připojení USB z mikroskopu SP8 na mikroskop Bruker Ultima.
- Zapněte Prairie View software.
- Důležité: zkontrolujte pozici páčky pro nastavení optické cesty, pozice BR optická cesta vede do okulárů pro prohlížení vzorku, pozice PMT vede do detektorů pro snímání vzorku. Špatná pozice páčky může vést k poškození detektorů, kontaktujte správce systému pro více informací.
- Po zkontrolování páček a nastavení optické cesty pro Brightfield (BR) můžete nastavit napětí na detektorech.
- Pro současné snímání a fotoaktivaci, kontaktujte správce systému kvůli výměně dichroického zrcátka ve skenovací hlavě.
- Otevřete shutter laserového výstupu (laditelný/fixní laser)
- Systém je připraven pro snímání.

Zoohygienická pravidla

Pokud uživatel využívá v experimentu laboratorní zvířata nebo živé buňky je povinen:

1) před transportem zvířat do místnosti 009 DaI:
   a) všechny pracovní plochy otřít běžným saponátem.
   b) všechny pracovní plochy určené pro manipulaci s laboratorním zvířetem (označeny zeleným proužkem) dále pečlivě povrchově očistit lihem.
   c) očistit objektiv mikroskopu a přilehlé komponenty diethyletherem.

2) Manipulace s laboratorním zvířetem probíhá striktně na pracovních plochách k tomu určeným (označené zeleným proužkem).
3) Veškerý spotřební materiál určený na jedno použití (vata, tampony, stříkačky, jehly) je sbírán do určené nádoby (označena zeleným proužkem) a po skončení experimentu je likvidován dle svého charakteru.
4) Nástroje a pomůcky určené pro opakované použití (termostatická podložka apod.) jsou vždy povrchově očištěny a desinfikovány.
5) Po skončení měření tj. po odnesení nebo usmrcení zvířete je uživatel povinen:
   a) zbavit všechny pracovní plochy a podlahu nečistot a otřít běžným saponátem.
   b) všechny pracovní plochy určené pro manipulaci s laboratorním zvířetem (označeny zeleným proužkem) pečlivě povrchově očistit vhodným desinfekčním prostředkem s vysokou účinností proti mikroorganismům např. DESAM EFFEKT v doporučené koncentraci 0,5%.
   c) očistit objektiv mikroskopu a přilehlé komponenty diethyletherem.

Detailní popis dvoufotonového mikroskopu Bruker Ultima IntraVital

1. Mikroskop. Vzpřímený stativ mikroskopu s okuláry, motorizovanou platformou X-Y pro pohyb stativu mikroskopu nad vzorkem (35 × 35 mm skenovací rozsah), motorizovaným stolkem (100 × 50 mm skenovací rozsah, snímání ROI, TileScanů, Mark&Find), motorizovaným ostřením v ose Z, vzdáleným ovládáním X, Y a Z osy jak stolku, tak stativu, piezo posuv v ose Z (rozsah pohybu: 400 µm), filtry pro epi-fluorescenci a BR. Mostní platforma s manuálním nastavením roviny ostrosti v krocích o velikosti 6 mm, minimální pozice je 155 mm a maximální pozice je 235 mm. Vyměnitelné vložky mostní platformy pro zvířata, sklíčka a petriho misky.

2. Dostupné objektivy
- Nikon CFI75 25x/1.1 WD=2mm CC – MP1300

3. Skenovací hlava. Dva nezávislé sety X-Y galvanometrických zrcadel v optické dráze. Resonanční skener (8kHz resonanční galvanometr). Rychlost skenování 30 fps při formátu 512×512. Přídavný set X-Y galvanometrů pro možnost současného zobrazení a fotoaktivaci s laserem 1040 nm.

4. Osvětlovací dráha.
- Infra-červený laditelný/fixní pulsní laser Chameleon Discovery TPC (Coherent Inc., CA) s implementovaným akusto-optickým modulátorem (AOM). K dispozici jsou dva výstupy laseru:
  - Výstup laditelného laseru – laser je laditelný v rozsahu 680 - 1300 nm (velikost kroku ladění 1 nm), maximální výkon 3,5 W, pulsní frekvence

80 MHz (± 5), šířka pulsu 100 - 120 fs, výkon laseru a intensita jsou regulovány pomocí AOM.
  - Výstup fixního laseru – fixní vlnová délka 1040 nm, maximální výkon 3,5 W, pulsní frekvence 80 MHz (± 5), šířka pulsu 140 fs, výkon laseru a intensita jsou regulovány pomocí AOM.
- Brightfield a fluorescenční lampa

5. Detekční dráha.
- Dráha v odrazu – dvoukanálový detekční modul se svazky optických vláken, možnost nezávisle nastavit gain a offset.
  – 2 vysoce citlivé „gated“ GaAsP detektory s kvantovou výtěžností přes 45 % při 550 nm, detekční rozsah 400-750 nm s nízkým šumem a vysokým dynamickým rozsahem.
- Dráha v transmisi – transmisní jednotka
  – 1 detektor pro transmisní 2-fotonové světlo, vhodný pro současné snímání s ostatními kanály
  – 1 GaAsP detector – vysoce citlivý detektor s kvantovou výtěžností přes 40 % při 550 nm, detekční rozsah 400-750 nm s nízkým šumem a vysokým dynamickým rozsahem.
- Hlavní dichroický a IR filtr:
  Dichroic, t700lpxxr-xxt, 34x26x1mm, w/Vis AR
  Filter, ET680SP-2P, 50mm Dia Unmounted
- Kostka detektoru - Reflected Emission Detector cube:
  Filter, ET525/70m-2P, 50mm, OD
  Filter, ET595/50m-2P, 50mm, OD
  Dichroic, T565LPXR, 73.0 x 51.0 x 1mm, w/ Vis Ar Coat

6. Software. Prairie View pro ovládání stativu mikroskopu/stolku, snímání obrazu (jednotlivé snímky, časosběrné série, z-série, mark and find, tilescany, fotostimulaci, fotoaktivaci and kombinaci zmíněných módů snímání), možnost současného snímání a fotoaktivace. Maximální formát snímání 2048x2048 pixelů.
- Fotostimulace ve 2D módu (line scan, segment scan, spiral scan nebo free hand scan)
- Snímání obrazu s kompenzací intensity signálu pomocí změny výkonu laseru, nebo napětí na dektorech
- Možnost přístupu k datům pomocí externích softwarů, např.: Matlab
- Software umožňuje snímání FLIM/PLIM
- Spectrální skeny pro detekci odpovědi signálu ze vzorku na různé excitační vlnové délky

Software Coherent pro kontrolu stavu dvoufotonového laseru, laser může být ovládán jak pomocí softwaru Software, tak i pomocí Prairie View.

7. HW moduly a příslušenství. Možnost připojit externí zařízení přes TTL (například pro elektrofyziologii).

Užitečné odkazy

- LAS X Core Offline software pro otevírání souborů Leica formátu
- Nyqist online calculator pro teoretické kalkulace velikosti pixelu a voxelu

Fiji (Fiji is Just ImageJ):

- Bioformats (former LOCI Tools) ImageJ
- SLIM Curve
- ImageJ world mailing list

Interaktivní prohlížeče fluorescenčních spekter:

- ThermoFisher (Life Technologies) interactive Spectra Viewer
- Leica FluoScout with short description;
- BdBioSciences Spectrum Viewer
- BioLegend SpectraAnalyzer
- 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 fluoroforů:

- https://www.fluorophores.tugraz.at/substance/
- https://www.leica-microsystems.com/science-lab/fluorescent-dyes/
- https://works.bepress.com/gmcnamara/9/