

# Konfokální mikroskop s dvoufotonovou excitací Leica SP8 WLL MP - podrobné informace

## Umístění

Místnost DaI / příz. / 010 (l. 2582)

Odd. biomatematiky, Fyziologický ústav AV ČR, v.v.i., Vídeňská 1083, Praha 4

## Kontakty

Správce:

**Mgr. David Vondrášek**

[david.vondrasek@fgu.cas.cz](mailto: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](mailto: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](mailto:jiri.janacek@fgu.cas.cz), tel. 24106 2768.

Konzultace v oboru zpracování a analýzy obrazu.

## Pravidla provozu

Pravidla provozu jsou sepsána v samostatném dokumentu na stránce o přístroji na <https://www.fgu.cas.cz/articles/566-leica-sp8-aobs-wll-mp-confocal>.

## Poplatky

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

## Podrobná specifikace konfokálního mikroskopu Leica SP8 WLL MP

Invertovaný mikroskop Leica DMI8 s binokulárním nástavcem, motorizovaným kondensorem a bočním portem pro připojení kamery na snímání preparátů v procházejícím světle, DIC a fluorescenci; motorizovaný skenovací stolek (rozsah posuvu 127 x 83mm, možnost snímání ROI, TileScan, Mark&Find) s vložkou Super Z Galvo (rozsah z-posuvu 1500 µm).

### Základní sada objektivů:

- 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.
- (po dohodě lze použít i objektivy užívané na jiných mikroskopech firmy Leica Microsystems).

**Konfokální hlava UV-VIS-IR:** akusticko-optický dělič paprsků (AOBS), konvenční (cca. 7 obrázků / sek při 512x512 pixelů) a 8 kHz rezonanční (28 obrázků / sek při 512x512 pixelů) skenery, spektrální detektor s laditelným emisním rozsahem 350 nm - 800 nm.

**Lasery:** DMOD 405nm (50 mW), multičárový Ar laser 458 - 476 - 488 - 496 - 514 nm (65 mW), pulsní superkontinuální "bílý" laser druhé generace WLL2 s rozsahem vlnových délek 470 - 670 nm (cca. 1,5 mW na každou čáru) s možností využití až 8 vlnových délek současně pomocí AOBS (nastavitelné v krocích 1 nm) s nezávislým ovládním výkonu každé vlnové délky pro rychlou modulaci intenzity laseru pomocí 8-kanalového akusticko-optického laditelného filtru (AOTF); pulsní infra-červený laditelný laser Chameleon Ultra I (Coherent Inc., CA) s rozsahem vlnových délek 690 - 1040 nm, maximálním výstupním výkonem 4 W, pulsní frekvencí 80 MHz, šířkou pulsu ~140 fs a s ovládním intenzity laseru pomocí elektro-optického modulátoru (EOM) a atenuátoru.

**Detektory:** 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, možností 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;

2x PMT interní detektor s vysokou citlivostí, QE = 30% (při 500 nm), 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;

TLD - detektor pro snímání v procházejícím světle (BF) nebo DIC, použitelný současně s dalšími kanály (konfokálními a externími - non-descanned detektory);

Externí (non-descanned): 2x vysoce citlivé HyD spektrální detektory (s rozsahem 400 - 720 nm) s nízkým šumem a s vysokým dynamickým rozsahem, možnosti photon counting módu a gaitingu.

**Komůrka pro snímání živých buněk:** systém od firmy Oko-Lab s kontrolou teploty H301-T- UNIT-BL-PLUS (včetně ohřívače objektivů), koncentrace CO<sub>2</sub> (0-20%) a kyslíku O<sub>2</sub> (1-95%, hyperoxické podmínky až po zajištění dodání O<sub>2</sub> do inkubátoru) CO<sub>2</sub>-O<sub>2</sub> Unit-BL [0-20;1-95], zvlhčovací jednotkou a komůrkou H301-K-FRAME s možností perfúze, vložkou GS35-M (pro 1x 25x76 mm podložní sklo a 2x 35 mm Petriho misky) s magnetickými držáky vzorků.

**FLIM modul:** jednokanálový TCSPC systém pro snímání časově korelovaných jednotlivých fotonů v jednom spektrálním kanálu Simple-Tau-150-D1 (Becker & Hickl GmbH, Berlin, Německo). Ultrarychlý systém registrace jednotlivých fotonů na bázi SPC-150 modulu se skládá z PCI-box'u, ovladače detektoru DCC-100 a chlazeného velmi rychlého detektoru PMC-100-1 na bázi fotonásobiče (s rozsahem detekce 300 - 820 nm) a kontrolního notebooku. Na snímání FLIM dat se dají použít i standardní externí hybridní detektory Leica HyD NDDs (2x), umístěné na bočním portu invertovaného mikroskopu Leica DMI8.

**Software:** LAS X pro ovládání stativu mikroskopu, automatizované snímání obrazů a sérií obrazů (z-série, časosběrné série, spektrální  $\lambda$ -série a jejich kombinace) s použitím různých laserů včetně sekvenčního snímání.

SW moduly: Dye Finder, Live Data Mode, 3D Visualisation, Co-Localisation, MicroLab (pro FRAP, FRET, FLIP experimenty i ROI), FRAP Zoomer (pro FRAP na tandemovém skeneru).

## Užitečné odkazy

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.

- [LAS X Core Offline](#) software for opening Leica file formats

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 standardních programů na zpracování obrazových dat, včetně rozsáhlého návodu a dokumentace, popřípadě Image Processing and Analysis in Java (ImageJ) spolu s některými užitečnými pluginy:

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

SLIM Curve: [https://fiji.sc/SLIM\\_Curve](https://fiji.sc/SLIM_Curve), <https://slim-curve.github.io/>;  
ImageJ world mailing list: [ImageJ world mailing list](#).

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: [Nyquist online calculator](#).

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/>