

2/11/2015

Instructions LSM 700 20150211.docx

## LSM 700 – מערך הדרכה



כל פרויקט חדש יש להפנות לעדית. אין לבצע הדרכה ללא שיחה מקדימה עם עדית.

חובה בתחילת ההדרכה להבין את השאלה המחקרית של המשתמש, סוג התאים, תכשיר וצביעות, סוגי הצבענים במדויק. המשתמש צריך להביא עמו עקומות עירור ופליטה של הצבענים בהם הוא משתמש. יש בנוסף לוודא כי המשתמש מכין את כל הביקורות הדרושות

ביקורות:

- (1) תכשיר ללא צביעה לאחר כל תהליכי הקיבוע
- (2) תכשיר עם נוגדנים שניוניים בלבד ביחד וכל אחד בנפרד
- (3) בצביעות משולבות יש בתחילת כל ניסוי חדש, לבדוק כל צביעה בנפרד, ביקורת של כל הנוגדנים השניוניים יחד כנגד כל ראשוני.

המערכת מורכבת ממערכת קונפוקלית המחוברת למיקרוסקופ upright פלורסנטי מדגם Axiolmager 7.2 המצויד בשולחן ממונע.

## 1. Electronic Unit – Laser Module

בתוך יחידה זו נמצאים ארבעת הלייזרים, חלקי אלקטרוניקה ומחשב.

### סוגי לייזרים

הספק	אורכי גל	
5mW	633 nm	Solid state laser cassette
10mW	555 nm	Solid state laser cassette
10mW	488 nm	Solid state laser cassette
5mW	405 nm	Solid state laser cassette

הלייזרים אינם זקוקים לאוורור מיוחד או הדלקה מעבר לפעולת בחירתם בתוכנה, אין צורך לכבותם בגמר השימוש. כל לייזר עובר באופן עצמוני למצב Standby לאחר 15 דקות בהן לא נמצא בשימוש. כל לייזר מועבר מיחידת הלייזרים בסיב אופטי נפרד אל יחידת ה-Scanhead.

## 2. Scanhead

חלק זה הינו החלק המרכזי במערכת. הוא כולל בתוכו מראות המכוונות את נתיב הארה, מראה דיכרואית ראשונית, יחידת מראות הגליונומטר, חריר קונפוקלי יחיד, Beamsplitter, גלגלי פילטרים ו- 2 יחידות PMT לדיטקציה סיגל.

## 3. מיקרוסקופ

Zeiss AxioImager 7.2 (upright)

### א. עדשות

(במערכת אין עדשות phase - ניתן להעביר ממערכות Time Lapse)

Immersion	DIC קונדנסור	מרחק עבודה	עובי זכוכית	NA	הגדלה	עדשה
Air	DIC I	5.2 mm	0.17mm	0.3	x10	EC Plan Neofluar
Air	DIC II	0.55 mm	0.17mm	0.8	x20	Plan Apochromat
Oil Glycerin Water	DIC II	0.57 mm	0-0.17 mm	0.8	x25	LD LCI Plan Apochromat
Oil	DIC III	0.21 mm	0.17 mm	1.3	x40	EC Plan Neofluar
Water		2.5 mm	0	1.0	x40	W Plan Apochromat

ניתן להוסיף למערכת

Oil	DIC III	0.19 mm	0.17 mm	1.4	x63	Plan Apochromat
-----	---------	---------	---------	-----	-----	-----------------

ב. תאורה להסתכלות דרך העיניות.  
הלוגן לאור transmitted

ג. גלגל פילטרים להסתכלות דרך העיניות.

עמדה	קוביית פילטר	עירור	מראה דיכרואית	פליטה	דוגמאות לצבענים
 FSet38	Zeiss Filter set 38	BP 470/40	FT 495	BP 525/50	Cy2, GFP, Alexa 488
 FSet43	Zeiss Filter set 43	BP 545/25	FT 570	BP 605/70	Cy3, Rhodamin, Alexa 561
 FSet45	Zeiss Filter set 45	BP 560/40	FT 585	BP 630/75	PI, Cy5
 FSet49	Zeiss Filter set 49	G 365	FT 395	BP 445/50	DAPI, Hoechst
 Analyze	DIC Analyzer				
 None	ריק				



## ד. שולחן ממונע

השולחן (stage) ממונע ע"י ספק כח ונשלט ע"י ג'ויסטיק. בלחיצה על הכפתור עוברים למצב תנועה גסה/עדינה.



## ה. קונדנסור ידני

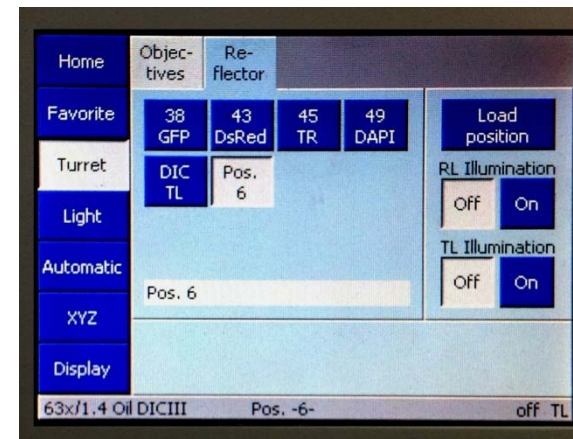
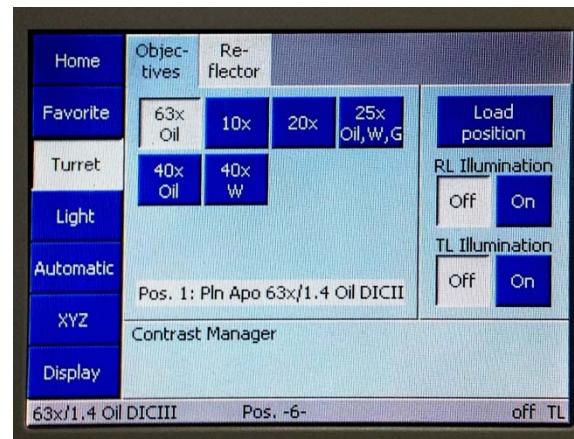
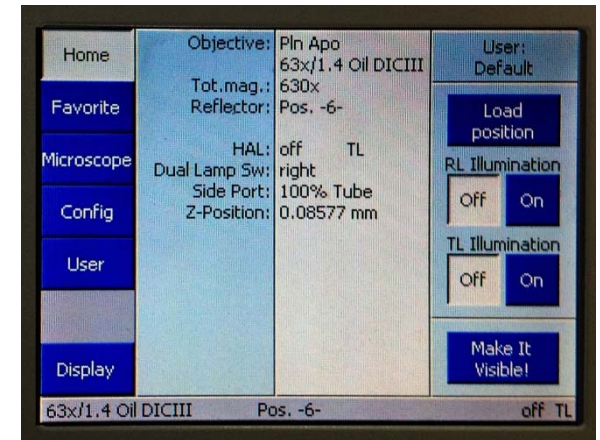
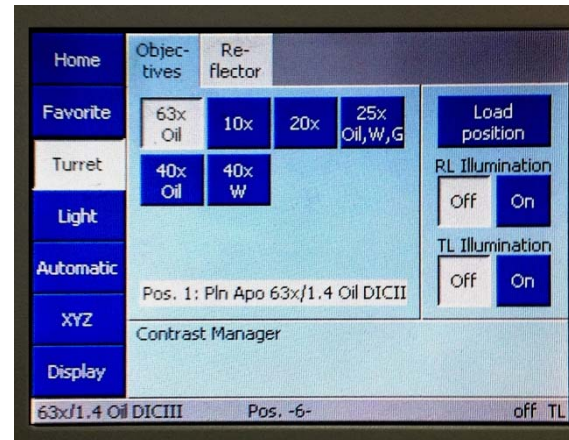
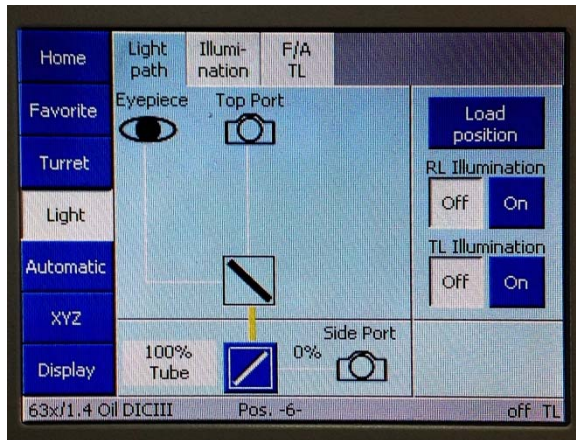
יש להתאים את הקונדנסור לסוג הניגודיות בה אנו רוצים לעבוד באור transmitted.

פילטר קונדנסור	שיטת ניגודיות	עדשה
H	brightfield	כל העדשות
1	phase	x10
I	DIC	x10
2	phase	x20
II	DIC	x20 x25
3	phase	x60, x100
III	DIC	x40, x63, x100
D	darkfield	

# 1. מסך מגע לשליטה במיקרוסקופ

פעולות רבות במיקרוסקופ ניתנות לשליטה ממסך המגע

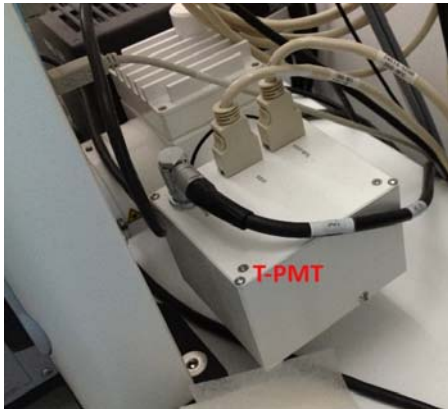
- בחירת עדשות.
- בחירת מיקום בגלגל הפילטרים.
- סגירה ופתיחה של תריסי האור הפלורוסנטי וה-transmitted.



#### 4. מחשב + תוכנת ZEN 2010

לתוכנת Zen יש גרסה חינמית כדי לפתוח ולעבד קבצים שנרכשו במערכת:

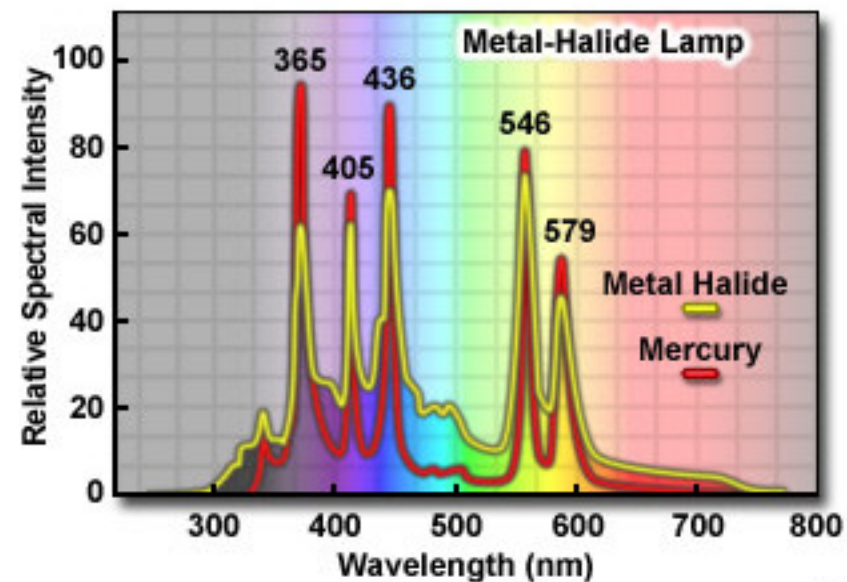
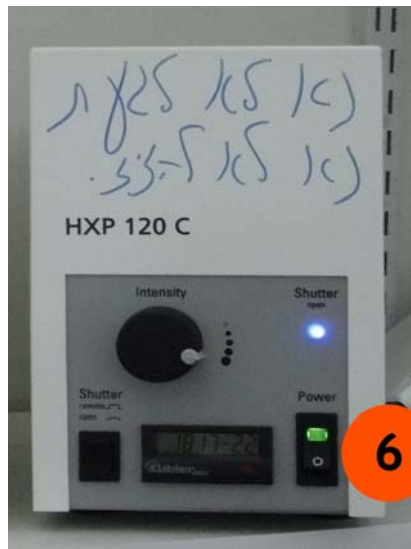
[http://www.zeiss.com/microscopy/en\\_de/products/microscope-software/zen-lite.html](http://www.zeiss.com/microscopy/en_de/products/microscope-software/zen-lite.html)



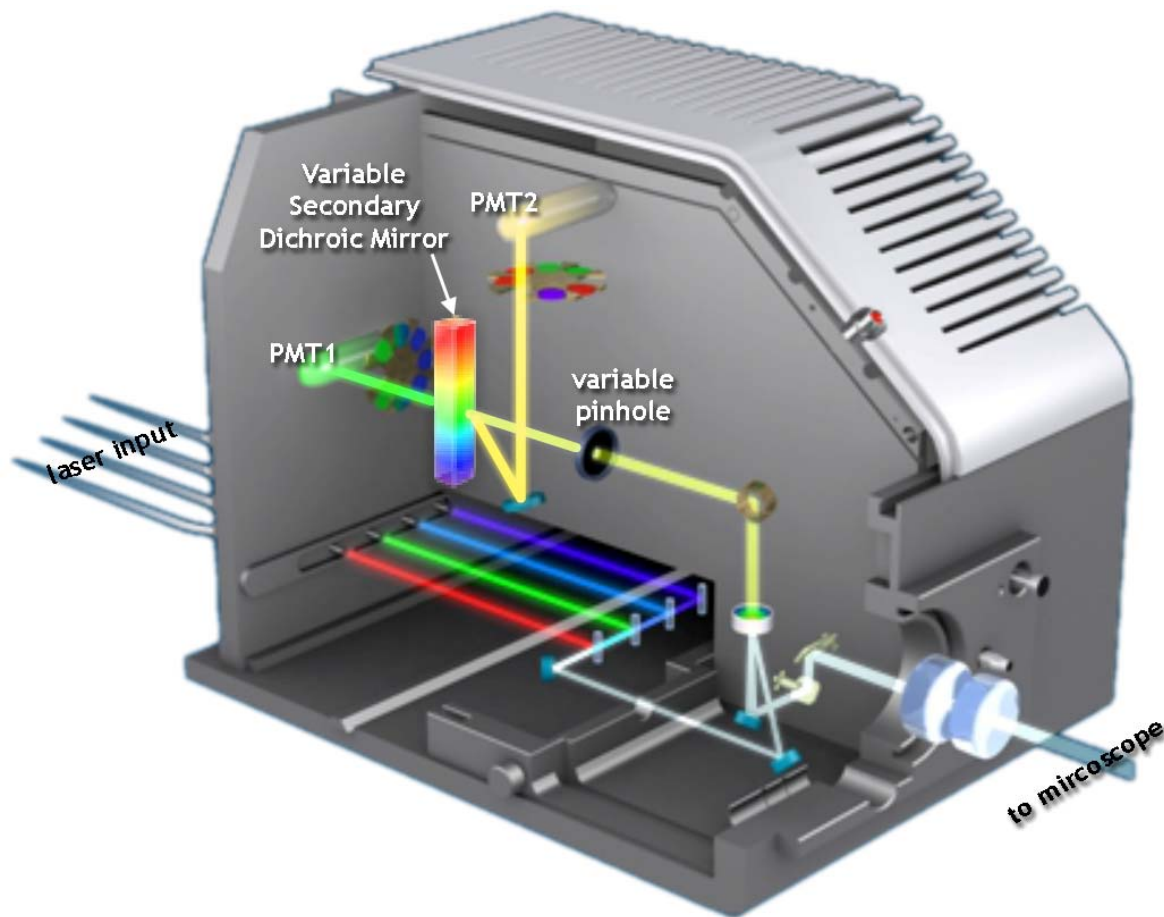
#### 5. Transmitted לאור PMT

#### 6. מערכת EXFO עם נורת מתלהליד ליצירת אור Reflected ב-epifluorescence

בשיטה זו אותה עדשה נמצאת במסלול אור העירור וגם של הפליטה (Reflected). כך המערכת יותר מכוונת וגם רוב העירור עובר את הדוגמא ולא חוזר לכיוון העדשה והדטקטור, כך שהשיטה יעילה יותר לעומת Transmitted



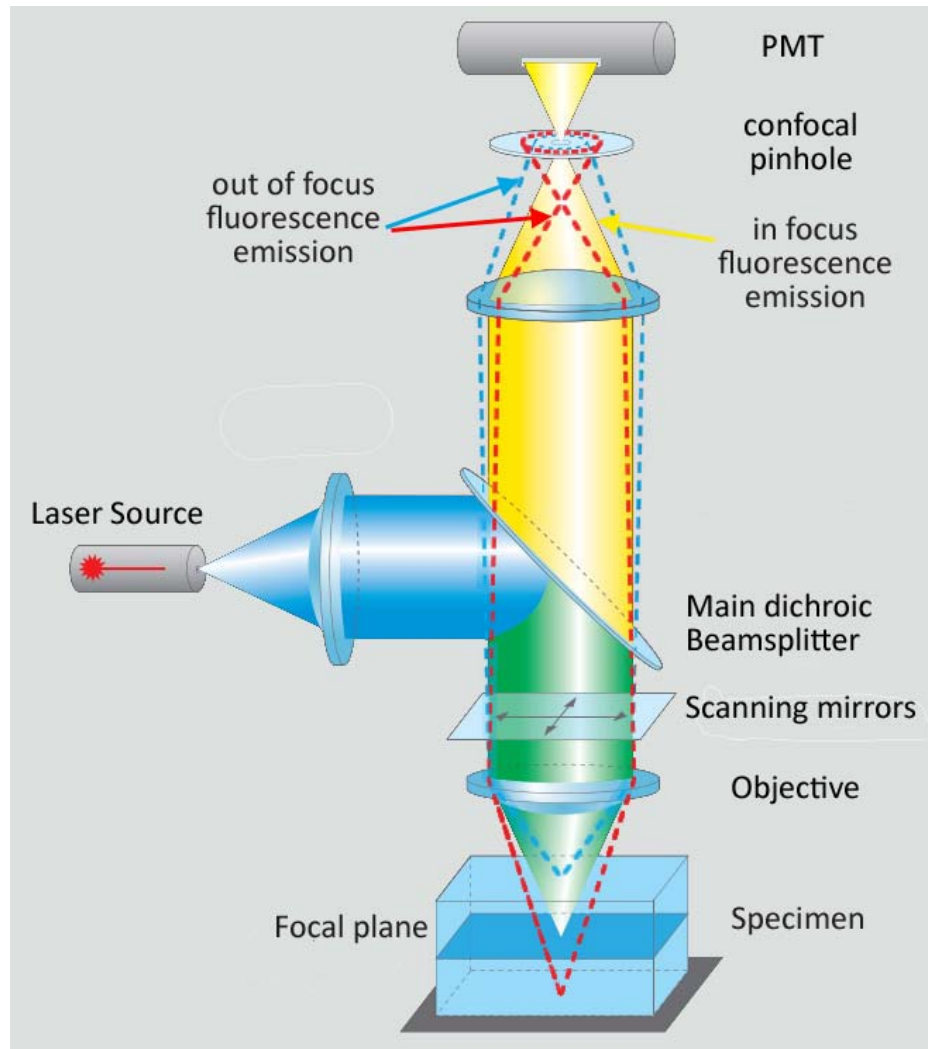
אור המופק ע"י הלייזרים הממוקמים ביחידת הלייזרים עובר בסיבים אופטיים אל יחידת ה-scanhead, האור מועבר ע"י מערכת מראות המכוונות אותו אל מראה דיכרואית ראשונית. קרן הלייזר ממשיכה ועוברת דרך מראות המניעות אותה על הצירים X ו-Y המאפשרות את סריקת התכשיר.



אור העירור עובר דרך העדשה ומגיע אל התכשיר. כתגובה מתאפשרת פליטה מהתכשיר. הפוטונים הנפלטים כתגובה לעירור עוברים דרך העדשה אל ה-scanhead: דרך המראה הדיכרואית הראשונית (מחזירה את אורכי הגל של קווי הלייזר ומעבירה רק את פליטת הפוטונים מהתכשיר) קרן האור ממשיכה אל חריר קונפוקלי ומשם פוגעת במראת ה-variable secondary dichroic mirror (beamsplitter) – אשר בעלת ציפוי מיוחד המקנה לה יכולת העברה והחזרה של אור בטווח של 420nm- 630nm. המערכת מאפשרת לבחור נקודת פיצול על ה-beamsplitter – כך שאור בעל אורכי גל הנמוכים מנקודת הפיצול יועברו אל גלאי PMT1 (short pass filter) (filter) ובעלי אורכי גל גבוהים מנקודת הפיצול (long pass filter) יועברו ל-PMT2. נקודת הפיצול נקבעת על פי גובה במראה בו פוגעת הקרן. ניתן לשלוט על מיקום הפיצול בתוכנה. לפני כל PMT ישנו גלגל פילטרים הניתנים לבחירה בתוכנה ומאפשרים הצרה נוספת של טווח אורכי הגל המגיעים ל-PMT.

כל פוטון שפוגע ב-PMT פוגע בעצם בפוטוקתודה אשר מפיקה כתוצאה אלקטרון. הזרם החשמלי (אלקטרונים) מוגבר ומועבר לאחר הגברתו אל-analog to digital converter. הזרם נדגם ומועבר למספרים דיגיטליים אותם המחשב והתוכנה יכולים לעבד. התוכנה תבטא את הנתונים כתמונה המורכבת מפיקסלים כאשר כל פיקסל מייצג את כמות הפוטונים שנפלטו באותו איזור בכל יחידת זמן. הנחת העבודה היא שערכו של כל פיקסל פרופורציוני לכמות הפוטונים הפוגעת בגלאי (PMT) ופרופורציונית לעצמת הפליטה מאותו איזור.

## היתרונות/הבדלים בין מיקרוסקופ הקונפוקלי לעומת מיקרוסקופ wide-field



בשתי המערכות מעוררים לכל עובי הדוגמא. ב-wide-field דוגמים סיגנל פלורוסנטי מכל עובי הדוגמא, דבר הגורם לטשטוש בתמונה בשל scattered light משכבות אופטיות שונות בדוגמא.

במערכת קונפוקלית העירור נעשה גם לכל העומק הדוגמא, אך דגימת הפליטה מתקבלת מחתכים אופטיים של הדוגמא. יתרון זה מאפשר קבלת מידע מדויק וייצוג מפורט ונקי של חלקי התא. בנוסף יתרון זה מקנה את קביעת מיקומם המדויק של סיגנלים פלורוסנטיים מעומק התא או הרקמה ולכן ניתן לענות על שאלות ביולוגיות רבות כגון קולוקליזציה/טראנסלוקציה.

עובי החתך הנדגם נקבע על פי קוטר החריר. קוטר החריר קובע את עוצמת הסיגנל ותלוי בשאלה הביולוגית ובאיכות הצביעה.

סוג הארה: לייזר בקונפוקל לעומת מנורת מטל-הליד ב-wide-field. ללייזר יתרונות בולטים: קו עירור קוהרנטי, עם אורך גל מוגדר, עוצמה חזקה, אפשרויות סריקה מגוונות.



## סדר הדלקת המערכת

סדר הדלקה וכיבוי המערכת קבוע וחשוב מאוד לשמר תקשורת בין רכיבי המערכת. הוראות עבודה נמצאות ליד המיקרוסקופ.



- הדלק פס שקעים מס' 1 .
- הדלק פס שקעים מס' 2 .
- הדלק את ספק הכוח של השולחן המנ
- סובב את המפתח של יחידת הלייזרי
- הדלק מחשב (5)
- הדלק את מנורת המתלהליד (6) עוצמ
- הכוח של נורת המתלהליד.
- כניסה למחשב:
  - Multilabs :User
  - 123456 :Password

## תוכנה

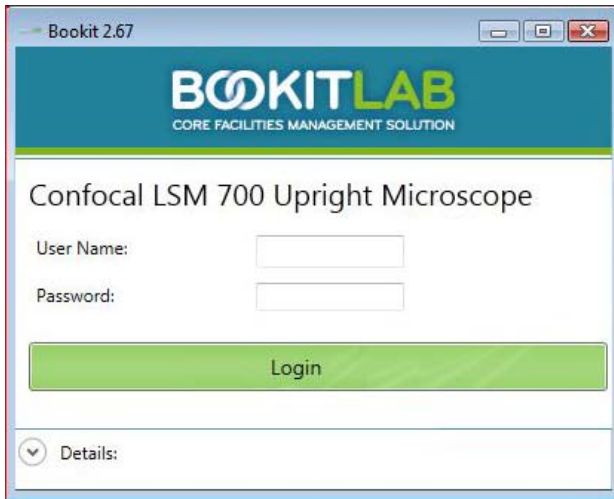
יש לבצע הזמנה בטרם מועד דרך מערך ההזמנות של היחידה  
<https://tech-mbookit.medicine.technion.ac.il>

כדי להפעיל את תכנת Zen 2010 הכנס לחלון BookItLab והפעל את הזמנתך.

בתוכנה קיימים 2 מצבי עבודה:

- עיבוד נתונים קיימים – Image Processing .
- רכישת נתונים חדשים – Start System .

יש לבחור Start System ולחכות להעלאת התוכנה. בשלב זה אין לגעת במערכת עד העלאת התוכנה במלואה.



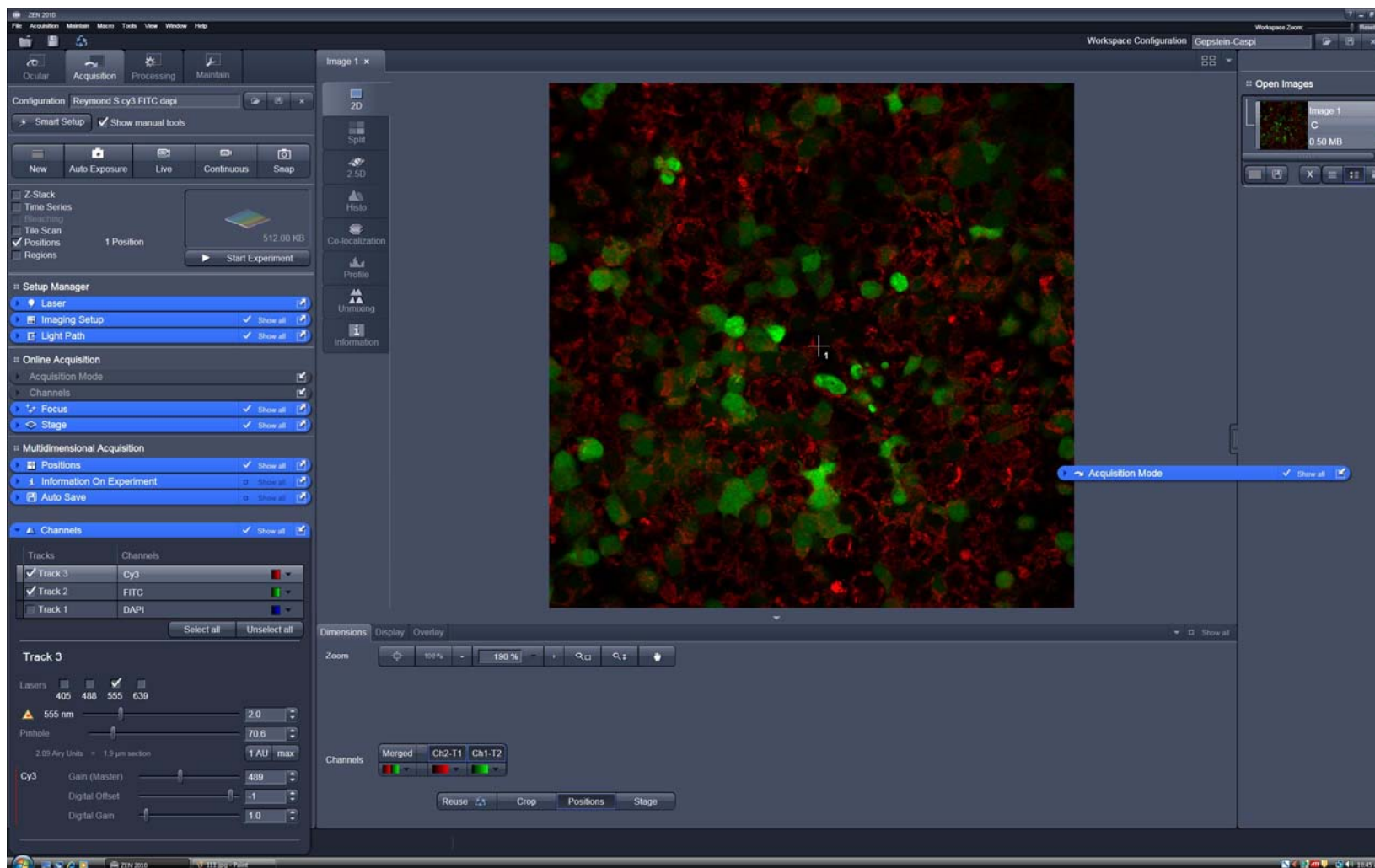
התוכנה מחולקת לשלושה חלקים עיקריים

איזור שמאלי – בקרה,

איזור מרכזי – התמונה,

איזור ימני – ניהול הקבצים.

ניתן לשנות את גודלם של החלונות ע"י הזזת מחוון ה- Workspace zoom.



## בקרה - מחולק לארבעה כלים: Ocular, Acquisition, Processing, Maintain



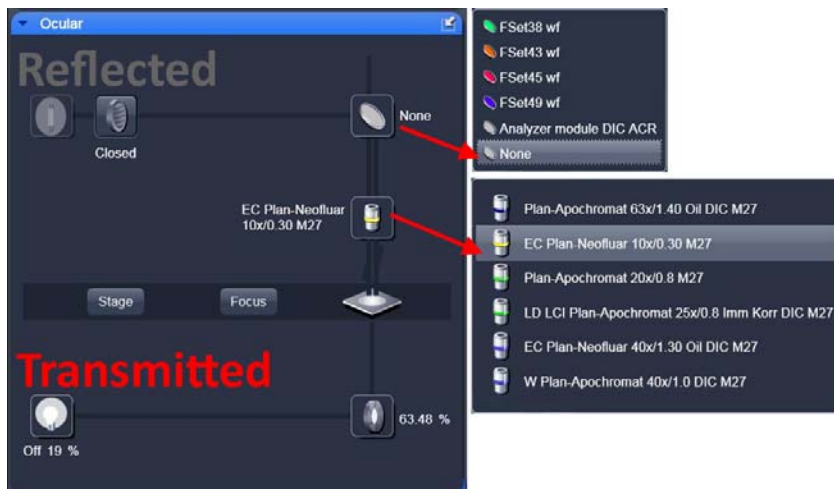
### Ocular – להסתכלות דרך העיניות

שליטה על חלקי המיקרוסקופ השונים.  
יש ללחוץ על Online כדי ששינויים בחלון ה-Ocular יתבצעו בפועל בזמן אמת.  
ב-Offline המערכת במצב רכישת תמונה.  
לפני הסתכלות בדוגמא יש להכניס את בורר העיניים/לייזר בצד ימין של המיקרוסקופ פנימה.



### יצירת אור Transmitted

יש לפתוח את תריס אור העברה (Transmitted) למצב ON ולכוון את עוצמת האור דרך התוכנה או דרך המיקרוסקופ.  
בצריח ה-reflector יש לבחור פילטר None או Analyzer module DIC ACR  
יש לכוון את הקונדנסור (גלגלת מתחת ל-Stage) למיקום הנכון לפי העדשה ולפי שיטת הקונטרסט.



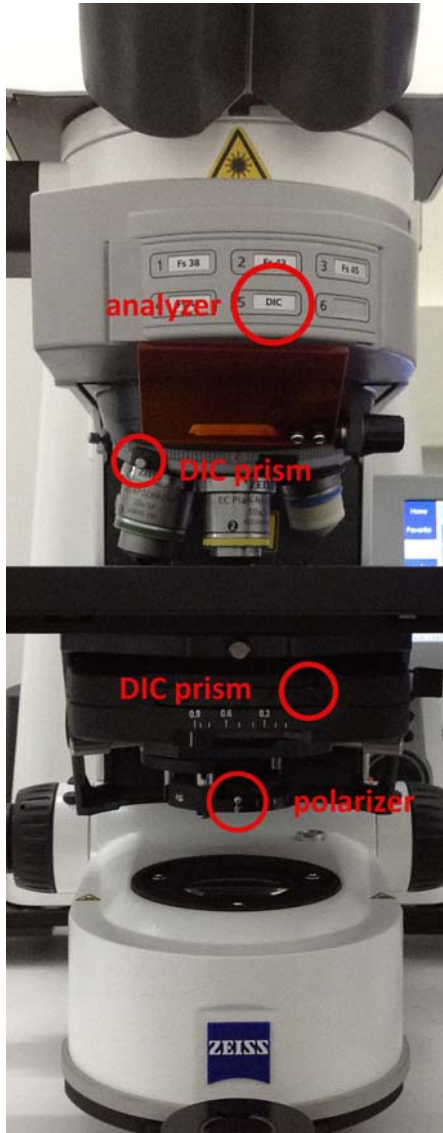
Condensor	Contrast	Objective
H	Brightfield	all objectives
1	Phase	x10
I	DIC	x10
2	Phase	x20
II	DIC	x20 x25
3	Phase	x60, x100
III	DIC	x40, x63, x100
D	Darkfield	

# Differential Interference Contrast - DIC

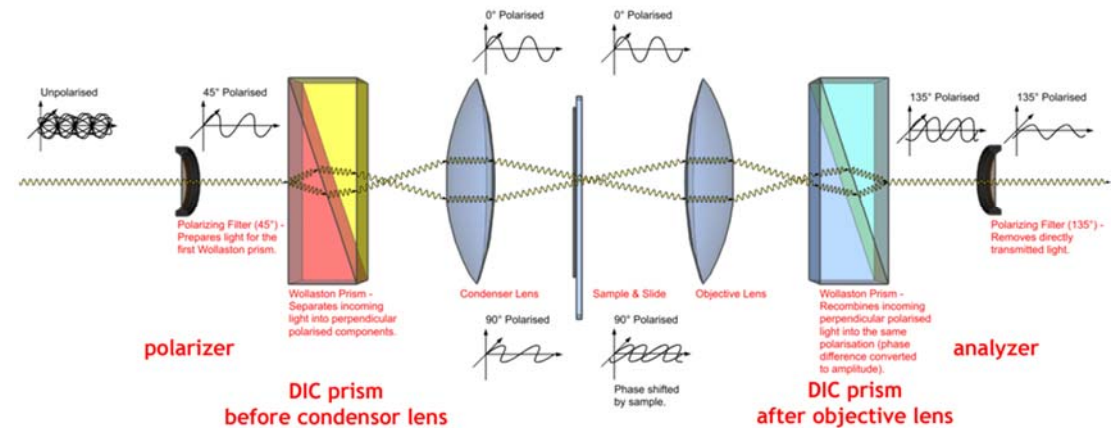
שימוש בקיטוב של האור ליצירת ניגודיות בעזרתו ניתן לראות מבנים תלת ממדיים יותר ותצורה טובה יותר. דרושים 4 רכיבים במסלול האור, 2 לפני הדוגמא ו-2 אחרי הדוגמא:

- polarizer מכוון ל- $0^\circ$
- פריזמת DIC בקונדנסור תלוית numerical aperture
- עדשה בעלת פריזמת DIC
- Analyzer בצריח ה-Reflector (Analyzer module DIC ACR)

יש להשתמש בזכוכית נושא, זכוכית מכסה או כלי אחר עם תחתית מזכוכית



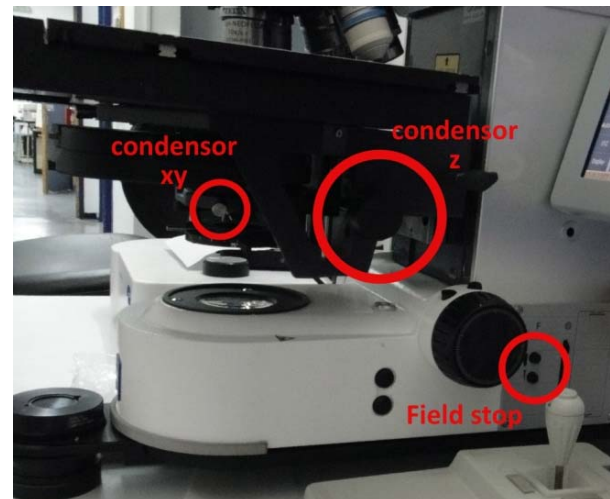
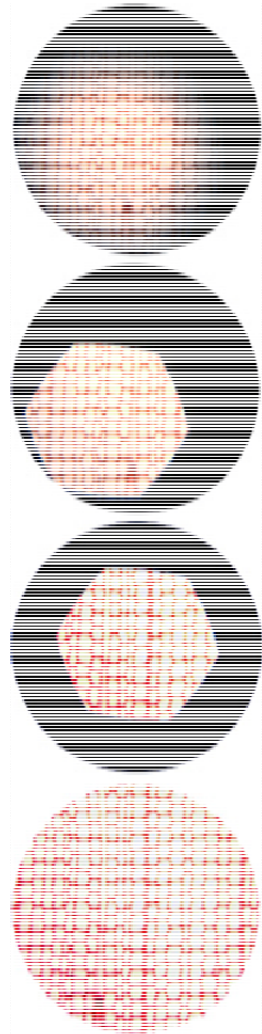
מיקום גלגלת קונדנסור	NA	הגדלה
DIC II	0.8	X25
DIC III	1.3	X40
DIC III	1.4	X63



# תאורת Kohler

יש לבצע תאורת Kohler לכיוון הקונדנסור ותאורה Transmitted אחידה בכל שדה הדוגמא:

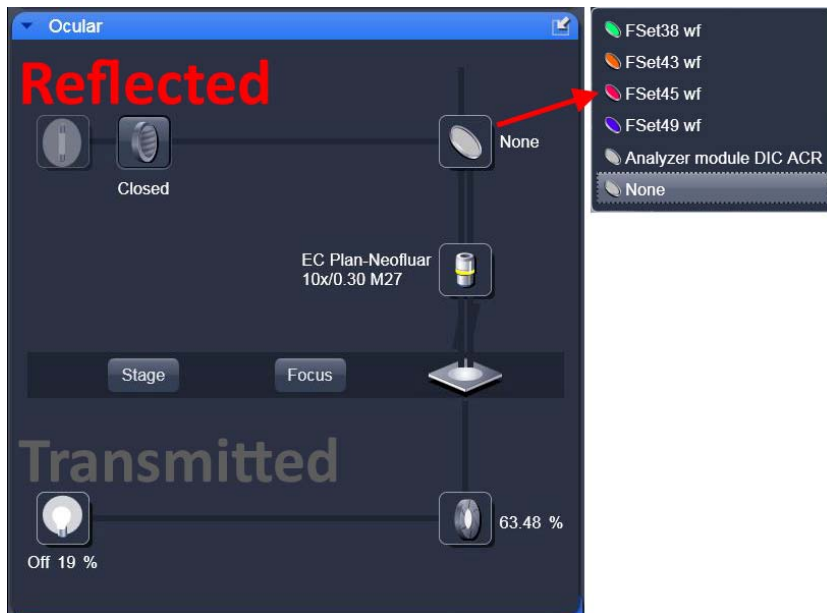
1. העבר גלגל פילטרים של קונדנסור ל-H או ל-DIC המתאים לעדשה
2. פקס על הדוגמא
3. סגור field stop (ממוקם בצד ימין של המיקרוסקופ - F ונשלט ע"י שני כפתורים לפתיחה וסגירה).
4. הרם או הורד את הקונדנסור בעזרת הגלגל כדי לפקס את המצולע
5. מרכז את המצולע בעזרת שני הפינים הכסופים
6. פתח את ה-field stop עד קבלת גבולות המצולע בכל שדה הראיה
7. כוון את ה-field aperture בקונדנסור לשיפור התמונה ( $\approx 70\%$  פתוח).

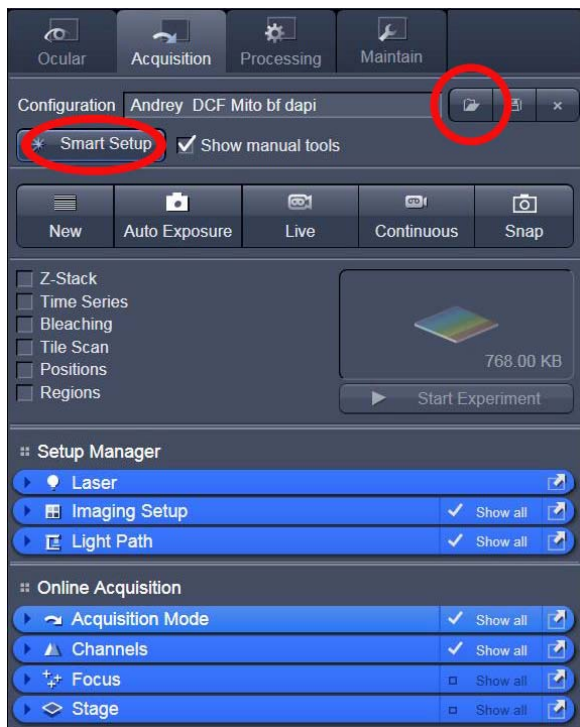


## יצירת אור Reflected

יש לפתוח את תריס התאורה ה-Reflected, יש לבחור פילטר מתאים, ניתן לשלוט על עוצמת התאורה באופן ידני במנורת המתלהליד (העוצמה משתנה בקפיצות של 12%).

עמדה	קובית פילטר	עירור	מראה דיכרואית	פליטה	דוגמאות לצבענים
FSet38	Zeiss Filter set 38	BP 470/40	FT 495	BP 525/50	Cy2, GFP, Alexa 488
FSet43	Zeiss Filter set 43	BP 545/25	FT 570	BP 605/70	Cy3, Rhodamin, Alexa 561
FSet45	Zeiss Filter set 45	BP 560/40	FT 585	BP 630/75	PI, Cy5
FSet49	Zeiss Filter set 49	G 365	FT 395	BP 445/50	DAPI, Hoechst
Analyze	DIC Analyzer				
None	ריק				

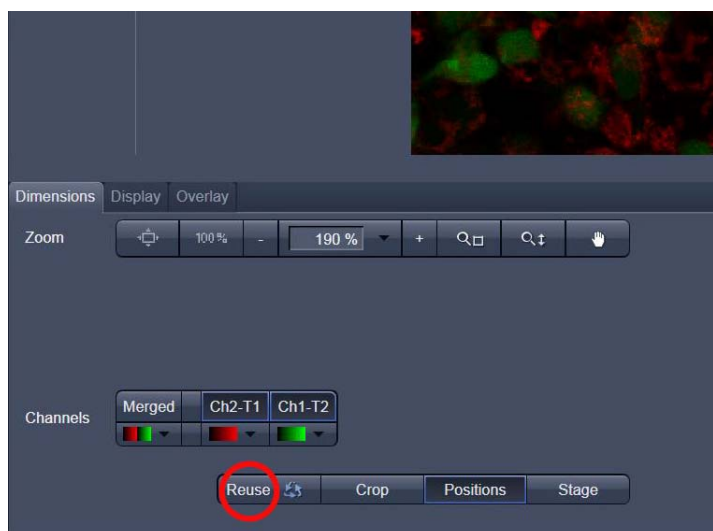




## Acquisition - לרכישת תמונה

העלאת תוכנת עבודה דרך אחת האפשרויות הבאות:

1. **Configuration** – העלאת תוכנת עבודה קיימת מרשימת תוכנות עבודה שמורות.
2. **Reuse** – פתיחת תמונה שנרכשה בעבר ולחיצה על ה- Reuse הממוקם בחלון התמונה למטה בחוץ Dimensions. גורמת לחומרה ולתוכנה להישתנות לפי הגדרות אותה התמונה.
3. **Smart Setup** – יצירת תוכנית עבודה חדשה – בחלון שנפתח בוררים מרשימת הצבענים את הצבענים איתם אנו עובדים המערכת מייצרת 3 אפשרויות עבודה – Fastest, Best Signal, Best compromise בכל אפשרות המערכת מדגימה את בניית הערוצים (סריקה טורית ו/או סימולטנית) המהירות, רמת הביטוי ומידת החפיפה בין עקומות העירור והפליטה של הצבענים השונים. לאחר בחירת האפשרות הרצויה יש לסמנה וללחוץ על Apply.





## יצירת תכנית

יש לסמן את אפשרות Show manual tools בחלק העליון של חוצץ ה-Acquisition. יש לפתוח את החלונות הבאים:

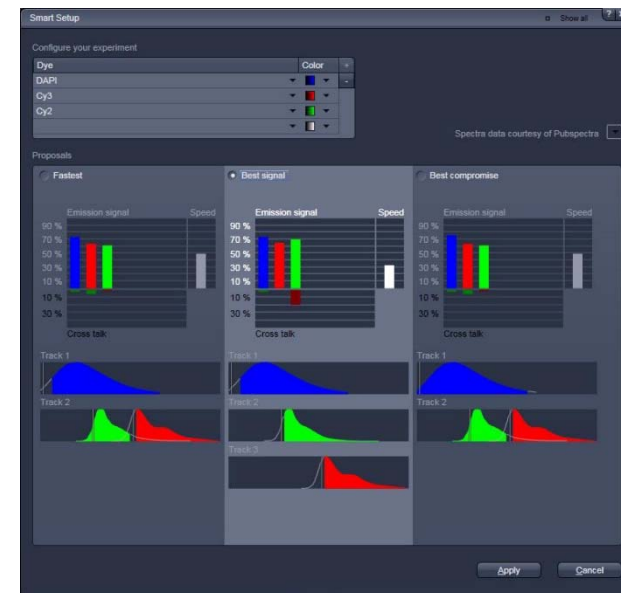
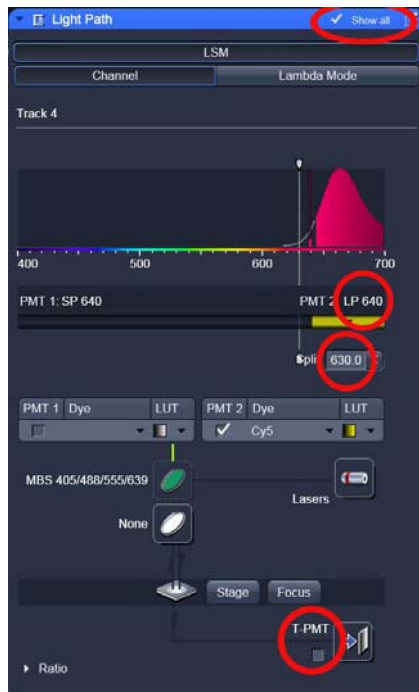
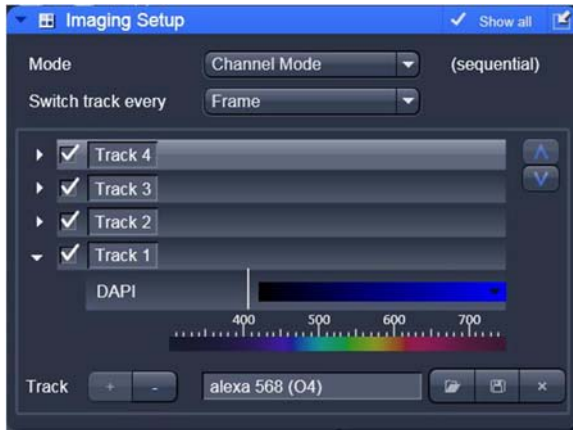
בחוץ Setup manager יש לבחור ב- Imaging setup ו-Light path

ולסמן בחלונות שנפתחו את אופציית Show all

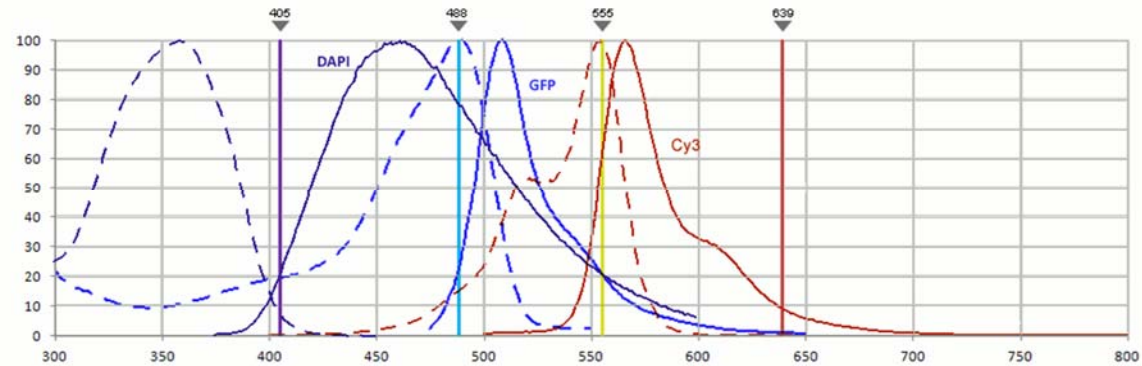
Imaging setup - בחלון זה ניתן לראות ולשנות את סדר סריקת הערוצים, להוסיף ולהוריד ערוצים.

Light path - בחלון זה מוצג מערך האור של כל ערוץ סריקה ודיאגרמת הפליטה של הצבען הכוללת את קו הלייזר (קו אנכי) ונקודת ה-Split ע"י Beamsplitter, אחוז הלייזר, המראה הדיכרואית הראשונית, PMT שנבחר, ופילטריי פליטה - כל רכיב, חוץ מהמראה הדיכרואית הראשונית, ניתן לשינוי.

במידה ורוצים ליצור גם תמונת Transmitted ב-T-PMT יש לבחור ב-T-PMT באחד הערוצים רצוי בעל אורך הגל הארוך ביותר.



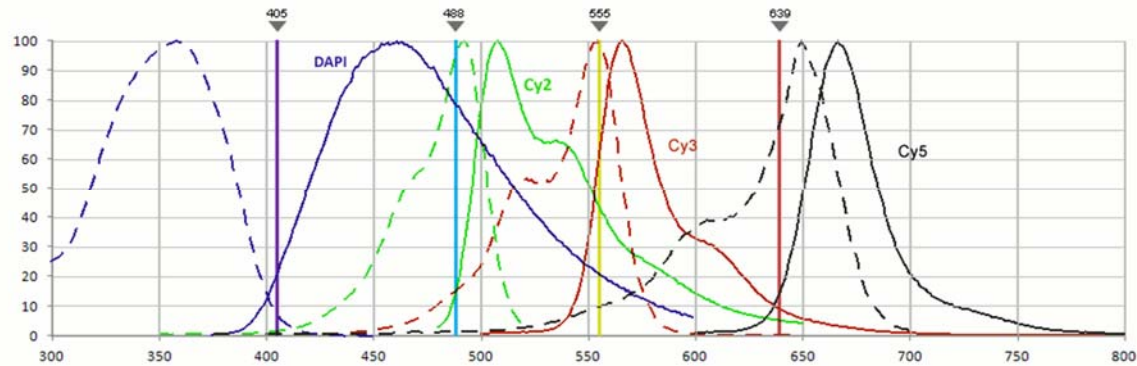
## דוגמא של תכניות רכישה בסיסית לצבענים כגון Cy3, GFP, DAPI



The image shows three panels of microscope software configuration, each for a different channel (Track 2, Track 2, and Track 1). Each panel is divided into 'Imaging Setup' and 'Light Path' sections.

- Imaging Setup:**
  - Mode: Channel Mode (simultaneous)
  - Switch track every: Frame
  - Track 3: TOP3 (disabled)
  - Track 2: Cy3 (enabled)
  - Track 1: Cy2 (disabled)
- Light Path:**
  - LSM Channel: Lambda Mode
  - Track 3: Emission spectrum plot (400-700 nm)
  - PMT 1: SP 640; PMT 2: LP 640; Split: 630.0
  - PMT 1 Dye: TOP3; PMT 2 Dye: Cy3
  - MBS: 405/488/555/639; Lasers: None
  - Stage and Focus controls
  - T-PMT and Ratio controls

## דוגמא של תכניות רכישה בסיסית לצבענים כגון Cy5, Cy3, Cy2, DAPI

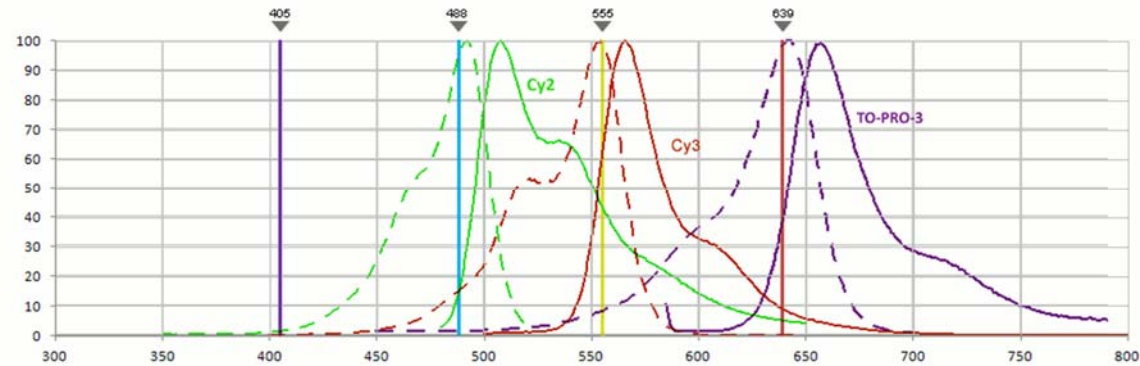


The image shows four panels of microscope software configuration, each for a different track (Track 1 to Track 4). Each panel is divided into 'Imaging Setup' and 'Light Path' sections.

- Track 4:** Imaging Setup shows Cy5 on Track 4. Light Path shows PMT 1: SP 490, PMT 2: LP 640, and a Split of 630.0.
- Track 3:** Imaging Setup shows Cy3 on Track 3. Light Path shows PMT 1: SP 640, PMT 2: LP 490, and a Split of 625.0.
- Track 2:** Imaging Setup shows Cy2 on Track 2. Light Path shows PMT 1: SP 555, PMT 2: LP 490, and a Split of 540.0.
- Track 1:** Imaging Setup shows DAPI on Track 1. Light Path shows PMT 1: SP 490, PMT 2: None, and a Split of 420.0.

Each panel also includes settings for PMT Dye, LUT, MBS (405/488/555/639), Lasers, Stage, Focus, and T-PMT.

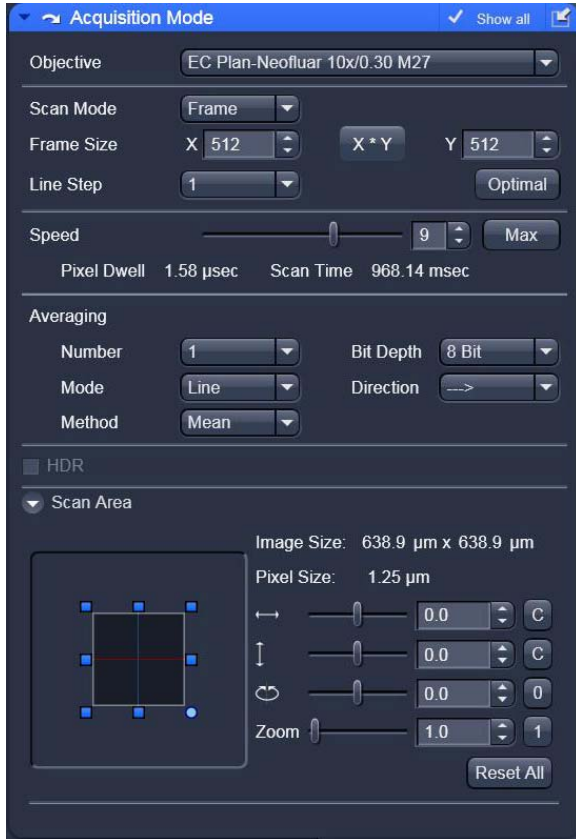
## דוגמא של תכניות רכישה בסיסית לצבענים כגון Cy3, Cy2, TOPRO3



The image shows three panels of microscope software configuration for imaging Cy2, Cy3, and TO-PRO-3. Each panel includes 'Imaging Setup', 'Light Path', and 'Laser' settings.

- Imaging Setup:**
  - Mode: Channel Mode (simultaneous)
  - Switch track every: Frame
  - Track 3: TOP3
  - Track 2: Cy3
  - Track 1: Cy2
- Light Path:**
  - LSM: Channel / Lambda Mode
  - Track 3: PMT 1: SP 640, PMT 2: LP 640, Split: 630.0
  - Track 2: PMT 1: SP 640, PMT 2: LP 640, Split: 630.0
  - Track 1: PMT 1: SP 640, PMT 2: LP 490, Split: 492.0
- Laser:**
  - MBS 405/488/555/639
  - Lasers: None
  - Stage, Focus, T-PMT

## רכישת תמונה



בחוצץ **Online acquisition** יש לבחור ב- **Channels** + **Acquisition mode**.

**Acquisition mode** – חלון זה מכיל את נתוני הסריקה:

**Objective** – ניתן לברור עדשות גם מחלון זה.

**Scan mode**

Line – סריקת קו בודד בצירים XY.

Frame – סריקת כל הדוגמא.

Frame size – יש ללחוץ על איקון X\*Y ולבחור את גודל התמונה הרצוי.

Speed – מהירות סריקה איטית יותר אך חשיפה של הדוגמא ללייזר פוגעת בה.

Averaging – חזרות על הסריקה (מיצוע) מפחיתות רעש אלקטרוני אקראי

Number – מספר חזרות

Mode – Frame מתאים לדוגמאות מקובעות, גורם לפחות bleaching

Line מתאים לדוגמאות חיות.

Method – בחירת מיצוע או סכימה של החזרות על אותה סריקה

Bit Depth – 8 bit –  $2^8 = 256$  – 12 bit –  $2^{12} = 4096$  גווני אפור. 12 bit מתאים לקולוקוליזציה ואנליזה כמותית. הקבצים

משמעותית גדולים יותר.

Direction – כיוון סריקה – בכיוון אחד או הלוך חזור

הלוך חזור מתאים לסריקות מהירות (תאים חיים או דוגמאות שעוברות bleaching מהיר) ועלול לגרום להטיה בציר שיש לתקן

אחר כך.

Scan Area

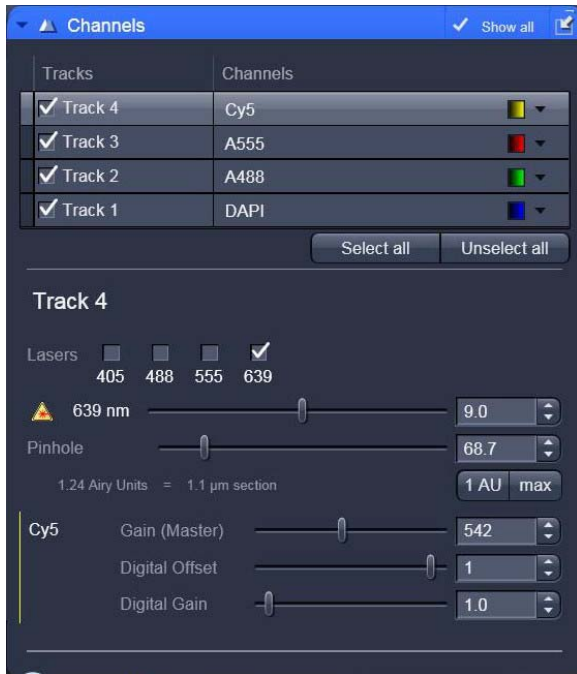
Zoom – מדובר בזום אופטי שהופך בהגדלות גדולות לדיגיטלי. בעדשה של 60 – סדר גודל של זום 3 כבר דיגיטלי,

בעדשה-25 סדר גודל של זום 4

ניתן לשנות את זווית הסריקה וע"י כך להטות את האובייקט לכיוון הרצוי

## תנאי סריקה מומלצים

סריקה ע"י	מספר פיקסלים	מספר חזרות	מהירות סריקה	סריקה מקדימה
Continuous	512x512	1	8	סריקה מקדימה
Snap	1024x1024	2-4	6	תמונה בדידה
Start Experiment	1024x1024	2	7	Z-stack



**Channels** – מכיל את נתוני כל הערוצים ומאפשר שינויים.

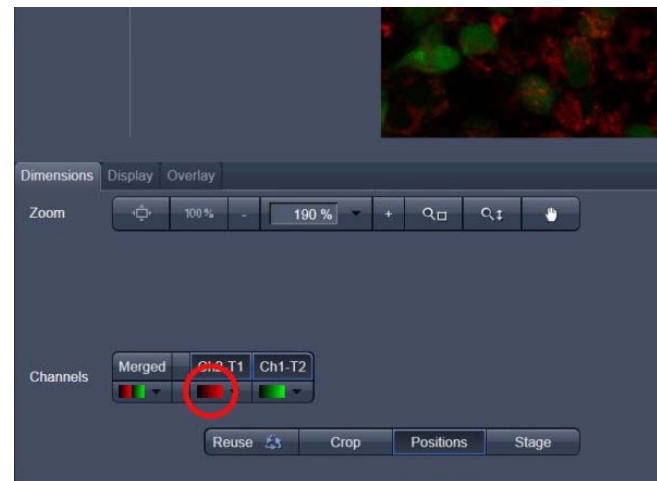
יש לקבוע תנאי דגימה אופטימליים לכל ערוץ בנפרד. את הערכים יש לקבוע במהלך סריקה מקדימה על דוגמא חיובית (positive control) לאחר קביעה זו יש לבדוק את הבקורות השליליות באותם תנאים.

ב-**Channels** מבטלים סימון כל הערוצים פרט לאחד, אותו צריך לסמן ע"י לחיצה נוספת לקבלת צבע בהיר יותר. בחלון התמונה יש ללחוץ על צבע הערוץ בתחתית התמונה כדי לשנות את הצגת הנתונים לגוויי אפור כאשר פיקסלים ברוויה ייוצגו באדום לעומת פיקסלים שחורים בכחול.

קביעת אחוז הלייזר. יש להשתדל לעבוד באחוז לייזר נמוך ככל שאפשר למניעת פגיעה בדוגמא. Pinhole - גודלו קובע את גודל ה-optical slice. תלוי בשאלה הביולוגית ובאילו מבנים רוצים להבחין בדוגמא.

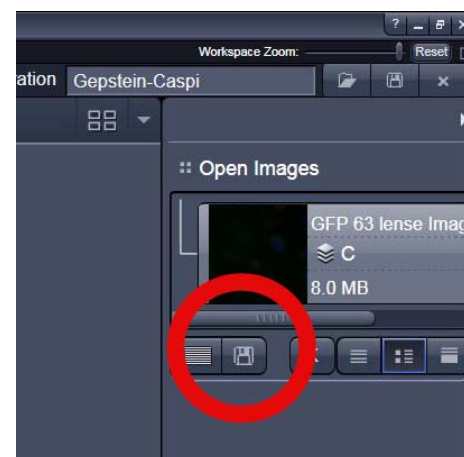
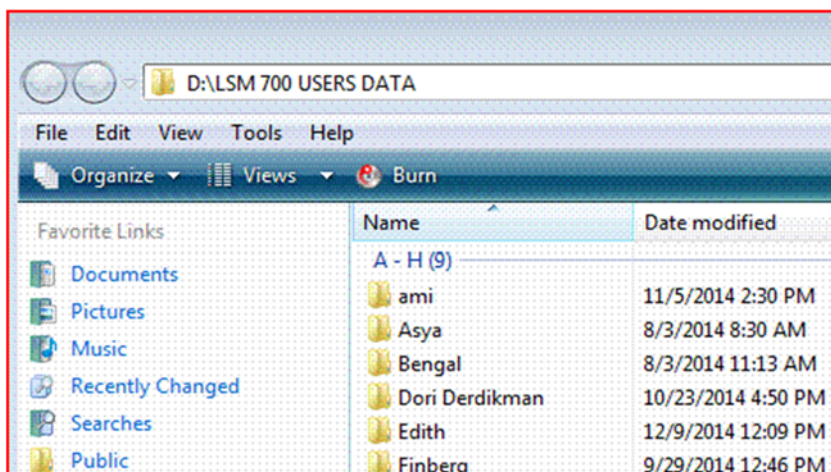
Optical slice (μm section) צריך להיות זהה בכל הערוצים. Gain (Master) – הגברת סיגנל ע"י PMT. אין לעבור את 600.

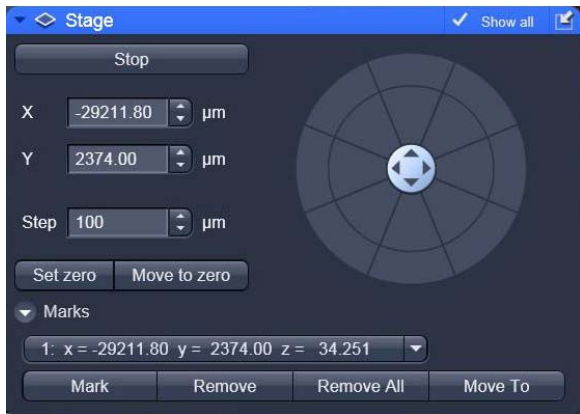
Digital Offset – סף דיטקציה, מתחת לערך הדדיטקציה המצוין ערך הפיקסל אפס (שחור) ומעל לערך מקסימאלי הסיגנל ברוויה. ערכי ה-offset תלויים בערך ה-gain. Digital Gain – הוספת הגברה לתמונה לאחר רכישה. בדרך כלל אין צורך להשתמש.



## שמירת קבצים

לאחר רכישת תמונה יש לשמור אותה בתיקיה אישית בתוך תיקיה ע"ש מנהל המעבדה (PI).  
הנתונים שמורים ב- D:\LSM 700 USERS DATA ע"פ שם PI, שם משתמש, תאריך.





## Stage – הזזת ה-Stage ב-XY באמצעות התוכנה.

## Focus – הזזת ה-Stage בציר ה-Z באמצעות התוכנה.

סימון קאורדינטות בתכשיר למשל תוך עבודה עם עדשה בעלת הגדלה קטנה, אשר ניתן לחזור אליהן במעבר לעדשה בעלת הגדלה גדולה יותר. מגיעים למקום הרצוי ולוחצים על Mark

בחירת המיקום מתוך הרשימה שנוצרה ולחיצה על MoveTo מביא את Stage למיקום הרצוי כפי שנקבע





## רכישת תמונות בציר ה-Z (Z-stack)

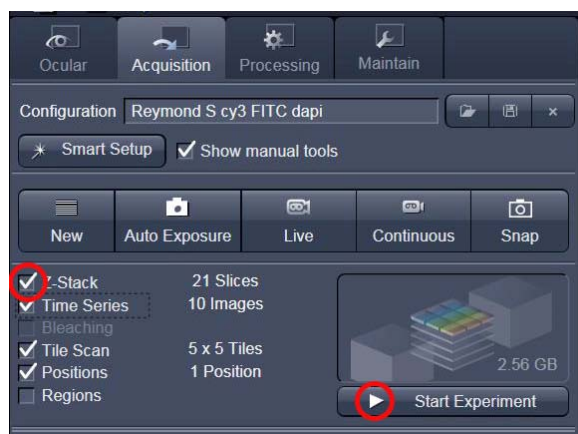
יש לסמן את אפשרות Z Stack לקבלת חלון ה-Z-stack בחוצץ Multidimensional Acquisition



יש לסרוק בערוץ אחד, במהירות גבוהה ללא מיצוע תוך שינוי הפוקוס עד מציאת גבול עליון של הדוגמא וללחוץ על Set First וגבול תחתון של הדוגמא וללחוץ על Set Last. יש לקבוע את האינטרוואל. ניתן להשתמש בהמלצת המערכת ב-Optimal. לחיצה על קביעה זו תייבא את האינטרוואל האופטימלי שהוא חצי מעובי ה-optical slice שנקבעת ע"פ גודל החריר הקונפוקלי.

ניתן בחלון זה ללחוץ על חוצץ Optimize sectioning and step וע"י לחיצה על איקון Match pinhole ליצור התאמה של עובי החתך בכל הערוצים ואח"כ קביעת אינטרוואל אופטימלי לכולם.

לרכישת החתכים בחר במהירות 7 או 6, הוסף מיצוע וגודל frame ולחוץ על Start Experiment.

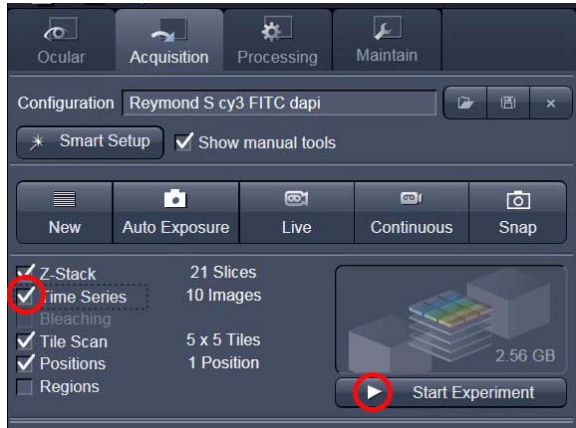


# Time Series

יצירת סדרת דגימות לאורך זמן ע"י קביעת אינטרוול וכמות המחזורים.

יש לסמן את אפשרות Time Series לקבלת חלון ה-**Time Series** בחוצץ **Multidimensional Acquisition**.

לאחר קביעת הפרמטרים יש ללחוץ על **Start Experiment**.

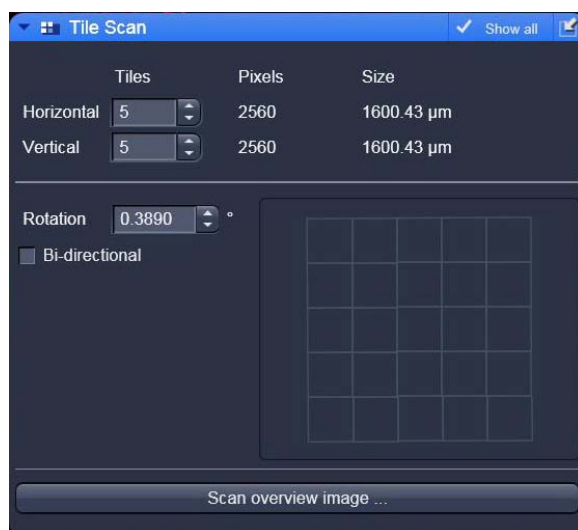
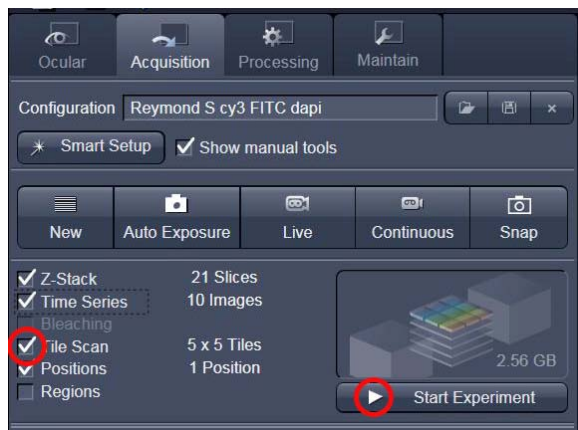


# Tile scan

סריקת מספר שדות צמודים וחיבורם לקבלת תמונה נרחבת של התכשיר ברזולוציה גבוהה.

יש לסמן את אפשרות Tile Scan לקבלת חלון ה-**Tile Scan** בחוצץ **Multidimensional Acquisition**.

יש להביא את דוגמא למרכז האזור ולקבוע מספר שדות לצירים X ו-Y



# Positions

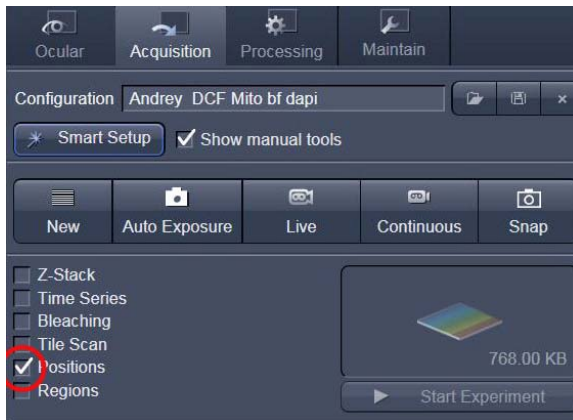
ניתן לסמן מיקומים שונים בתכשיר לחזרה אליהם או לסריקה של כמה שדות בו זמנית.

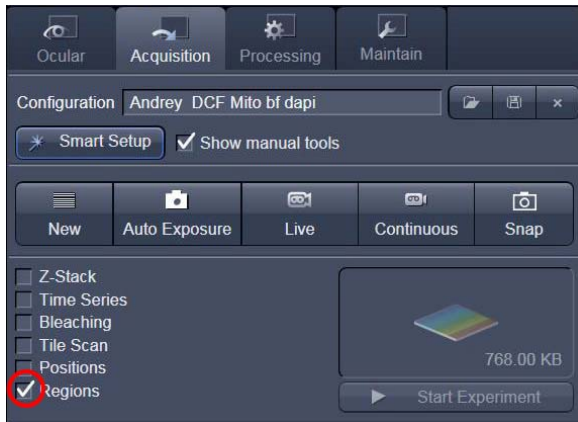
יש לסמן את אפשרות Positions לקבלת חלון ה-**Positions** בחוצץ **Multidimensional Acquisition**.

לחיצת Add מסיף את מרכז השדה הנוכחי לרשימת Positions. ניתן לחזור למיקום מוגדר ע"י Move to.

ניתן לקבוע Position גם ע"י Mark בחלון ה-**Stage**.

בלחיצת Positions בחוצץ Dimensions מקבלים צלב על התמונה הנוכחית, הזזה ולחיצה על הצלב ימרכז את ה-Stage למרכז הצלב.





## Regions of Interest - ROI

יש לסמן את אפשרות Regions לקבלת חלון ה-Regions בחוצץ **Multidimensional Acquisition**.

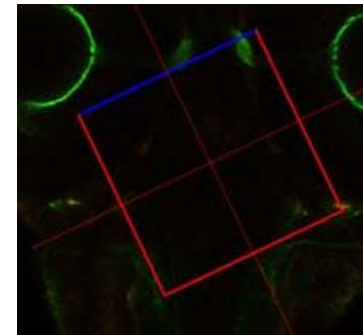
ניתן לסמן חלקים מהשדה ולבצע רכישת תמונה רק עבור מכלול שדות אלו.

אם מסומנים ROI, כל רכישת תמונה (בדידה, Z section, Time Series) תחול על כל ה-ROIs.

הסריקה מתבצעת על כל ציר ה-X ומוגבלת בציר ה-Y לפי השדות המסומנים. לסריקה אך ורק האיזורים המסומנים כ-ROI יש לסמן Fit frame size to bounding rectangle of regions.

קביעת ROI חוסך זמן סריקה ומשמש לסריקת תהליכים פיזיולוגיים, להגנה של אזורים מחוץ לסימון משהייה של לייזר, ל-photobleaching, uncaging, FRAP, וסוגי אנליזה.

ניתן גם לקבוע zoom ו-rotation של השדה הנסרק ע"י לחיצה על Crop בחוצץ Dimensions. על התמונה בסריקה מופיע ריבוע אותו אפשר להזיז, לשנות גודלו וזווית.



## גיבוי נתונים

אין להשתמש ב-disk on key

גיבוי אוטומטי אל שרת היחידה מתבצע כל לילה.

יחידת הצב"מ אינה אחראית על גיבוי הנתונים. את הקבצים יש להעתיק בהקדם משרת היחידה למחשב המעבדה.  
**חשוב – השרת/המחשבים במרכז תשתיות בירפואי אינם מהווים גיבוי.**

## סגירת המערכת

- נא לצאת מהתוכנה.
- לא לשכוח לבצע OFF להזמנה בחלון **BookItLab**.
- נא לבדוק אם המשתמש הבא מגיע בשעה הקרובה. במידה ולא ניתן להמשיך בכיבוי.
- הכיבוי נעשה בסדר הפוך מההדלקה

