*Merci à tous ceux qui ont contribué à l’écriture de ce protocole v. 180509*

**Protocole microscopie confocale OLYMPUS FV-1000**

*CRC-4847 ; #tel 1-4847*

|  |
| --- |
| *Ceci n’est point un mode d’emploi, mais juste un aide mémoire pour ceux qui ont reçu la formation sur cet appareil.* |

*Veillez noter, que vous pouvez téléchargé du site de la plateforme*

*- les textes de Matériels et Méthodes pour vos articles*

*- les modes d'emplois des appareils*

*- une version gratuite mais limitée de logiciel d’analyse FluoView*

**Avant d’aller au microscope** : nettoyer les lames

**Attention** : Si l’ordinateur est allumé en arrivant : quittez le tout & shut down

30 sc de pause

Démarrer l’ordinateur.

**A) ALLUMAGE DU CONFOCAL**

1. Enlever la housse du microscope
2. Vérifier que la valve de l’air comprimé pour la table du microscope est ouverte (la table flotte)
3. Allumer la lampe au mercure **#1**(à droite du microscope)

*La lampe ne doit pas être chaude au toucher. Laissez la lampe UV fermée au moins 40 min avant de la rallumer. Il est obligatoire de laisser fonctionner la lampe UV au moins 40 min avant de l'éteindre*

1. Allumer la manette de la platine **#2**, à gauche de microscope
2. Allumer le **#3**, de la source d’alimentation du microscope (en dessous de la table) *Ne touchez rien sur le microscope pendant son demarrage. Si vous touchez par accident au focus, fermez Power Supply, attendez 10 sec et le rallumez*
3. Mettre sous tension le bloc du confocal par l’interrupteur **#4** et après la clé juste à côté de l’interrupteur (4A -> 4B).
4. Éventuellement, allumer les écrans d’ordinateur.
5. Démarrer l’ordinateur
6. Connectez-vous *(Log-In)*

User name: **perfect user**

Password: **olympus**

1. Démarrer logiciel FluoView en double cliquant sur le pictogramme **FV-ASW 3.1**

User name: **visiteur**

Password: **visitor1**

1. Choisir l’objectif 60X, ou autre, sur le clavier **#9** à gauche du microscope
2. Enlever le porte-lame et mettez du papier hygiénique autour de l’objectif
3. Dans la fenêtre ***ImageAcquisition*** ***control***cliquer sur le bouton ***TransLamp***(pictogramme en haut à gauche) pour allumer la lampe halogène (visible) *Ceci permet de voir l’objectif et de mieux contrôler la déposition de l’huile sur celui-ci.* Si la lumière n’est pas visible à l’œil nu, vérifiez que l’intensité de la lumière ne soit pas à son minimum (échelle à gauche au pied du microscope (panneau de contrôle du microscope), en dessous des flèches).
4. Descendre l’objectif au maximum (jusqu’au bip !) à l’aide des boutons **#10** ayant des flèches sur le panneau contrôle en avant du microscope
5. Remonter le condensateur à son maximum pour avoir un meilleur accès pour les prochaines étapes.
6. Fixer une lame sur le plateau porte-objet à l’aide du poussoir (*le truc en haut à gauche*)
7. Déplacer la platine vers l’arrière afin d’avoir accès à la lentille de l’objectif.
8. Déposer une demi-goutte d’huile à immersion sur la lentille. Remettre la syringe avec embout vers le haut.

*Seuls les objectifs avec un anneau noir sont les objectifs à l’huile (un 40x et un 63x)*

1. Déplacer la platine pour remettre la lamelle au dessu de l’objectif.
2. Redescendre le condensateur jusqu’au focus.
3. Faire monter l’objectif par petits coups très brefs à l’aide des boutons **#10** jusqu’à ce que l’huile touche la lame. Bien surveiller la montée de l’objectif, sinon il y a risque de briser la lamelle. Donner encore un petit coup lorsque la lame touche l’objectif et vous devriez être quasi au focus
4. Peser sur le bouton DICT (differential interference contrast : lumière polarisée) sur le clavier **#9**
5. Mettre les diaphragmes presque fermés mais légèrement ouverts (ceci permet d’obtenir une image plus définie)
6. Ajuster l’éclairage (*au maximum pour l’objectif 60x*)
7. Faire le focus avec la microvis (à gauche) (toujours avec la lumière visible)
8. Dans ***ImageAcquisition*** ouvrer l’UV en cliquant sur ***EpiLamp*** *(ceci ferme le visible par la même occasion)*
9. Sur le clavier **#9** appuyez sur bouton correspondant au fluorochrome à observer
10. Entrouvrer minimalement l’obturateur **#8** (à droite du microscope)tout enregardant dans les oculaires
11. Ajuster le focus
12. Situer la cellule exactement au centre
13. Allumer la source d’alimentation du laser 488 : (l’interrupteur **#0** à droite des écrans) ; ensuite allumez le laser en tournant **« La clef »**
14. Éventuellement, allumer les lasers 405, 543 et 633 nm. Le laser 405 se trouve en dessous de la table du microscope à gauche complètement. N’ouvrez pas le ou les laser(s) que vous n’avez pas besoin.

**B) AJUSTEMENT DU CONFOCAL**

(Si précédemment vous avez établi les réglages passez à la **section C**)

1. Sur l’écran de droite dans la partie supérieure de fenêtre ***Explorer*** cliquer sur le répertoire ***Image.*** Dans la partie inférieure d’***Explorer*** avec le bouton de droite de la souris cliquer le ficher ***Debut\_optimiste*** *(Si la fenêtre est absente, elle est peut-être cachée par la fenêtre LiveView; il faut alors déplacer cette fenêtre pour trouver la fenêtre Exporer. Sinon, ouvrir la fenêtre Explorer avec le menu Window —> Explorer)*
2. Sélectionner ***Load acquisition parameters***

*(Cliquez sur* **OK** *lorsque la fenêtre* ***MMI*** *apparaît. Si on a cliqué ailleurs par inadvertance, la fenêtre disparaît et vous êtes complètement bloquée. On peut la retrouver dans la barre de tâche au bas de l’écran)*

1. Sur l’écran de gauche dans ***ImageAcquisition*** cliquez sur ***DyeList***, cliquer sur ***All Clear*** (*pour 4 fluorochromes cf en fin de cette section*)
2. Cliquer sur un des fluorochromes ou taper la 1e lettre du nom du fluorochrome désiré
3. Double cliquer sur le nom du fluorochrome désiré
4. Répéter les étapes 2 et 3 pour les autres fluorochromes à sélectionner
5. Lorsque tous les fluorochromes utilisés ont été sélectionnés, cliquez sur ***Apply***
6. Ferme la fenêtre en appuyant sur ***Close***
7. (Optionnel) Clique sur ***VBF*** (Variable Barrier Filter) pour activer la fenêtre d’ajustement de la plage spectrale d’acquisition.
8. Clique sur ***I*** pour activer la fenêtre d’information dans la fenêtre Image Acquisition Control
9. Garder juste un laser allumé et désactiver les autres en enlevant le crochet devant les lasers (fenêtre acquisition setting).
10. Clique sur ***XY Repeat***
11. Agrandir les images dans la fenêtre ***Live View*** (ecran de droite) en appuyant sur *Fit to the window * (*Si vous ne voyez rien à l’écran, regarder si la pointe lumineuse du laser est visible sur la lame. Si elle ne l’est pas -appuyer sur le clavier le premier bouton à gauche de DAPI*.
12. Dans LiveView cliquer sur ***LUT*** (deuxième pictogramme en haut à gauche : Look-Up-Table)
13. Choisir le canal 1 Vérifiez que la droite de couleur soit aux deux extrémités (0 – 4095)
14. Choisir ***HiLo*** *ou faire directement sur le clavier les touches : Clt\_H*

*Rouge = surcharge Bleu = signale « écrasé » afin d’obtenir le « 0 » Tout le reste (gris) = couleur normale*

1. *Au besoin* Répéter les opérations 15 et 16 pour CH 2 et CH 3
2. Ajuste le ZOOM en gardant la cellule complète dans la zone. La résolution doit être la plus proche de résolution optique.
3. À l’aide de microvis trouver la zone de maximum de signal dans l’objet d’intérêt

**(***Assurez-vous que le bouton Focus Handle On est cliqué (dans la fenêtre Acquisition Parameters) sinon il est impossible de faire le focus avec les commandes sur le microscope)*

1. Ajuster la puissance du laser *(éviter de dépasser 7% pour le 488).* Les autres lasers peuvent aller jusqu’à environ 10X la puissance du 488.
2. Réajuster la puissance du laser et la vitesse du scan dans MODE. Dans l’objet d’intérêt il ne doit rester que quelques pixels rouges.
3. Ajuster ***OFFSET***. Dans les zones libres de cellules il doit rester quelques dizaines de pixels bleus.

**Au besoin : Ajustez CH 4 (le visible).** *Lorsque des stries sont présentes dans le visible:*

*1. fermer complètement le diaphragme de la source de lumière;*

*2. regarder dans les objectifs et ouvrir le diaphragme jusqu'à ce qu'il disparaisse du champ de vision;*

*3. ajuster alors la hauteur du filtre polarisateur de manière à ce que l'intensité lumineuse soit maximale;*

*4. ajuster la polarisation afin d'obtenir le contraste souhaité.*

1. Arrêter la prévisualisation et changez la cellule. (Elle est déjà brûlée et ne convient donc pas pour une acquisition)

*Quatre fluorochromes*

1. Cocher Virtual channel scan en haut de la fenêtre et cocher 2 pour Number of phase used.
2. Cliquer sur un des fluorochromes puis taper la 1e lettre du nom du fluorochrome désiré
3. Double cliquer sur le nom du fluorochrome désiré
4. Répéter les étapes 2 et 3 pour les autres fluorochromes à sélectionner et les ajouter dans *Phase 1*
5. Dans Phase 2 cliquer (et garder le bouton gauche de la souris enfoncé) et déplacer le 4ième fluorochrome utilisé jusque dans l’encadrer appelé Phase 2.
6. Lorsque tous les fluorochromes utilisés ont été sélectionnés, cliquer sur ***Apply***

**\***Les réglages des deux canaux ne peuvent être différents

**Contrôle d’absence de chevAUchement des SPECTRES :**

*Absolument nécessaire lors de l’acquisition simultanée et fortement recommandée pour l’acquisition séquentielle*

1. Sélectionner le plan Z ayant l’expression la plus forte et fait une acquisition
2. Dans les menus Processing choisir Colocalization
3. Assurez-vous d’obtenir sur la fluorogramme des distributions horizontaux et verticaux sans une « inclinaison », c’est-à-dire le dépassement de vert dans le rouge et vice-versa.

****

**PHOTOBLANCHISSEMENT (*BLEACHING*) DU SIGNAL**

*Nécessaire si vous obtenez une colocalisation parfaite*

1. Une fois la cellule centrée, appuyer sur XYrepeat afin d’avoir l’image de la cellule dans LiveView. Appuyez sur stop.
2. Ouvrir la fenêtre Stimulus Setting, et sélectionnez Clip Rect.
3. Dans l’écran LiveView, choisire la zone de bleaching.
4. Dans la fenêtre Stimulus Setting, choisire le laser correspondant au fluorochrome et définissez un nombre de frames.
5. Mettre le size (pixels) au plus bas, enlever sequential et kalman et appuyez sur Bleach.
6. Une fois le bleaching terminé, ramenez les setting comme avant (pixels, sequential, kalman) et faites une acquisition.

**C) Utilisation de paramètrEs ÉTABLIS LORS DES** **EXPÉRIENCES ANTÉRIEURS POUR PRENDRE DES NOUVELLES PHOTOS**

1. Dans la partie supérieure de fenêtre ***Explorer*** (l'écran de droite) sélectionner le dossier contenant la photo dont on veut se servir comme source de paramètres de bases. (*Si la fenêtre est absente, elle est peut-être cachée par la fenêtre* ***LiveView****; il faut alors déplacer cette fenêtre pour trouver la fenêtre* ***Exporer****. Sinon, ouvrir la fenêtre* ***Explorer*** *avec le menu Window* ***—>*** *Explorer)*
2. Dans la partie inférieure de fenêtre ***Explorer*** avec le bouton de droite de la souris sélectionnez la photo
3. Sélectionner ***Load acquisition parameters***

*(Cliquez sur* **OK** *lorsque la fenêtre* ***MMI*** *apparaît. Si on a cliqué ailleurs par inadvertance, la fenêtre disparaît et vous êtes complètement bloquée. On peut la retrouver dans la barre de tâche au bas de l’écran)*

Assurez-vous que les données PanX,Y, et rotation soient à 0 et que le Zoom soit à 1

**D) ACQUISITION**

1. Choisisser et centrer la nouvelle cellule
2. Fermer l’obturateur **(#8)**
3. Fermer ***Epi lamp*** (pas obligatoire puisque se ferme lorsqu’on appuie sur X-Y repeat)
4. Ouvrir la fenêtre information (bouton i dans la fenêtre image acquisition control).
5. Aspect ratio au minimum (256 ou 128) dans la fenêtre acquisition setting.
6. Désactivez le Kalman et le Sequential
7. Sélectionnez un laser à la fois dans la fenêtre « Acquisition Setting »
8. Appuyer sur le X-Y Repeat
9. Dans la fenêtre ***LiveView***, appyer sur *Fit to the window .* Passer en affichage ***Hi-lo*** (ctrl-H)
10. Ajuster le focus (microvis)
11. Recentrer la cellule de préférence manuellement ou dans la fenêtre Area
12. Au besoin réajuster le Laser, HV et***OFFSET*** (pour chaque canal)
13. Trouver le niveau le plus bas de la cellule avec la microvis
14. Faire le SET 0 et SET START
15. Trouver le niveau le plus haut de la cellule et SET END
16. Cliquez sur Stop
17. Aspect ratio à la normale. Vérifier dans la fenêtre information, que vous avez ouvert précédemment, que les PizelSize sont optimal pour votre expérience vs OpticalResolution.
18. Sélectionner tous les lasers à utiliser
19. Au besoin activer le Kalman (meilleur avec l’option FRAME si le temps est OK)
20. Activer DEPTH
21. Cliquer sur XYZ (En canaux virtuels, cliquer sur Start à droite)
22. A la fin de l’acquisition cliquez sur SERIES DONE.

*Si vous faites des acquisitions sans l’option DEPTH, vous ne verrez pas le bouton SERIES DONE à la fin de l’acquisition. Enregistrer votre image.*

1. Enregistrer votre image (Save as) de la manière suivante : date de l’expérience\_n°lamelle n°cellule\_

**E) CHANGEMENT DE LAME**

**1.** Allumer la lumière visible

**2.** Baisser l’objectif (jusqu’au bip)

**3.** Metter 1/4 de goutte d’huile à immersion

**4.** Placer la nouvelle lame

**5.** Relever l’objectif et faites la mise au point

**E) ÉTUDE DANS LE TEMPS**

1. Même procédure de mise au point des paramètres que pour l’acquisition d’image précédemment expliquée.
2. Suite à la mise au point des paramètres optiques, effectuer les étapes suivantes dans le menu **TIME SCAN** :
3. Indiquer dans la case **INTERVAL** le temps en secondes de l’intervalle désiré entre chaque début de cycle de photos.
4. Indiquer dans la case **NUM** le nombre de fois que vous désirez effectuer la routine de prise d’images.
5. Par la suite, cliquer sur le signe de l’horloge avec un « i » afin de voir les paramètres de la routine produite — Important : le temps total de la routine indiqué n’est pas exact. Effectuez vous-même la multiplication du temps d’un intervalle par le nombre de cycles désirés. Normalement, si le temps calculé par l’ordinateur pour le **Rest timE** est supérieur à 0,2 seconde, le temps total de la routine que vous aurez calculé sera exact.
6. Lorsque vos paramètres sont exacts, cliquer sur **TIME** (en dessous de **STOP**) pour ajouter le paramètre du temps et démarrer l’expérience en appuyant sur **XYZt**.
7. À la fin de la routine, appuyer sur **APPEND NEXT** pour effectuer une deuxième lecture ou sur **Series Done** pour terminer l’expérimentation.
8. **Toujours enregistrer votre expérience avant de la visionner.**
9. À ce moment, vous pouvez visualiser votre expérience temporelle à l’aide de la fonction **Z** pour les différentes hauteurs ou **T** pour les différents temps étudiés. **Z** et **T** se retrouvent dans la barre de menu de la fenêtre **2D view**.

### Pour une étude dans le temps en multipoints assurez-vous que *l’objectif soit descendu au maximum* avant d’ouvrir le Multi area time

### F) FERMETURE DU SYSTÈME

**Important**:

Vérifier sur le site s’il y a quelqu’un qui va utiliser le microscope après vous,

— si oui, fermez l’ordinateur seulement (sf. p. 2),

— sinon, fermez tout.

1. Fermez les lasers 488, 543 et 633 sous la table de microscope en tournant uniquement les clefs. (ne touchez pas à l’interrupteur **#0** du laser 488).
2. Quittez le programme FLUOVIEW et fermez l’ordinateur **#6**
3. Descendre l’objectif à son minimum.
4. Enlever et nettoyer vôtre lame.
5. Essuyer le pourtour de l’objectif avec un KimWipe. NE TOUCHER PAS À LA LENTILLE !
6. Essuyer délicatement la lentille avec un LensPaper.
7. Nettoier le support de lamelle avec de l’éthanol (bouteille rouge).
8. Placer la clé **#4** à OFF, puis fermez l’interrupteur **#4** (à droite de l’ordinateur).
9. Fermer l’interrupteur **#3** (à droite de l’ordinateur).
10. Fermer la lampe **#1** après une période minimale d’utilisation de 40 minutes.
11. Fermer la manette de la platine **#2**.
12. Mettre la housse sur le microscope
13. Fermer le ventilateur des lasers en fermant l’interrupteur **#0**.
14. Dite à haute vois : «Au revoir!» au microscope, il adore les signes de politesse.