

1. Anschalten des Mikroskops

1. Hg-Lampe anschalten.
2. Schalter am Frontpanel von links nach rechts aktivieren.
3. Laser-Stromversorgung mit dem Schlüssel anschalten.
4. Rechner hochfahren.

Zwischen Aus- und Anschalten müssen mindestens 30 Minuten vergehen!

Die Schaltzeiten der Hg-Lampe, insbesondere das Ausschalten, wird im Buch protokolliert. Die Benutzerzeit wird vom Server und Mikroskoprechner automatisch erfasst.

Soll quantitativ mikroskopiert werden, müssen die benutzten Laser für eine konstante Lichtleistung mind. 15 Minuten warmgelaufen sein.

2. Software

- **PPMS** <https://ppms.eu/oice-erlangen/login/>
User und Geräte online Managementplattform, Zugriff auf den Kalender, nicht weiter als 2 Wochen im Voraus eintragen.
Bei allen Abweichung von der Norm, vor, während, bei Beenden des Mikroskopierens: Report Incident über die PPMS Plattform!
- **OMERO** <http://www.openmicroscopy.org/site/products/omero>
Client um auf das Serververzeichnis mit den eigenen Daten (\\OMERO-dropbox\\) zuzugreifen.
- **LASAF**
Software zur Ansteuerung des CLSM. Speichern der Aufnahmen unter dem Reiter „Experimente“ im Acquisitonmodus auf dem eigenen Serverlaufwerk (\\OMERO-dropbox\\).

An den Rechnern des OICE sind KEINE USB-Geräte wie Memory-Sticks erlaubt! Zugriff auf nicht direkt von OICE auf dem Desktop verlinkte Websites ist ebenfalls untersagt!

3. Reinigung des Objektivs

Immersionsobjektive müssen nach jeder Benutzung gereinigt werden. Das einzige Papier, das zur Reinigung verwendet werden darf, wird vor Ort bereitgestellt (Kimtech und flusenfreies Papier von Macherey Nagel). Kimtech-Papier wird mit Ethanol getränkt und auf das zu reinigende Objektiv gelegt. Mit sanft kreisenden Bewegungen um die Objektivlinse herum Verschmutzungen / Immersionsmedium entfernen. Nicht mit dem Finger direkt über die Linsenöffnung reiben. Kimtech mit verschmutzter Seite nach innen falten (1/2 Blatt), Vorgang wiederholen, nochmal mit Verschmutzung nach innen (1/4) falten und wiederholen. Zum Abschluss mit Ethanol befeuchtetem flusenfreiem Mikroskopierpapier von über das Objektiv wischen.

Sollte Immersionsflüssigkeit auf ein Objektiv gelangen, welches nicht für die jeweilige Immersion ausgelegt ist, so ist die oben beschriebene Reinigungsprozedur 3 Mal durchzuführen, um letzte emulgierte Reste auf dem Objektiv auszuschließen!

4. Mikroskop initialisieren

Die weiße Kontrolleinheit für das Objektiv (z-Achse/Fokus) bzw. den Objekttisch (x / y – Achse) befindet sich rechts vom Mikroskop. Hinteres Rädchen kontrolliert Z-Achse des Objektivs, vordere Rädchen die X- und Y-Einstellung des Objekttischs. Über die Knöpfe auf der Kontrolleinheit kann zwischen schneller und langsamer Bewegung gewechselt werden.

Bei der Kontrolleinheit handelt es sich um eine elektronische Ansteuerung über Motoren, kein haptisches Feedback, daher Schadenspotential! Im Zweifelsfall die Positionen von Objekttisch und Objektiv am Mikroskop verfolgen!



- LASAF starten, die Option "Activate Resonant Scanner" sollte bei Standardnutzung deaktiviert sein
- "Initialize Stage" durchführen, Objekttisch wird kalibriert

Bei der Kalibrierung wird der Objekttisch von der Software verfahren, das Objektiv muss vor dieser Aktion vollständig heruntergefahren sein um eine Beschädigung durch Kollision zu vermeiden!



- Falls benötigt, Immersionsflüssigkeit direkt auf die Linse geben (Immersionsmedium Glycerol oder VS-Wasser muss selbst bereitgestellt werden, für einmalige Nutzung bei OICE Staff anfragen).
- Objektträger mit dem Deckglas nach unten auf den Objekttisch legen (inverses Mikroskop).

- Bei der Benutzung von Immersionsflüssigkeit das Objektiv unter Zuhilfenahme des Durchlichts bis zum Lichtumschlag langsam hochfahren
 - Durchlicht-Funktion aktivieren mit dem Knopf "TLIL" (Transmitted Light Illuminator) seitlich links am Mikroskop.
 - Vorne am Mikroskop den Filter auswählen (z.B. GFP) und den Shutter für Lichteinlass an- bzw. ausschalten.

Die Probe sollte wegen Fluoreszenzbleiche nicht länger als unbedingt nötig bestrahlt werden. Kann ein grauer Rand erkannt werden, so sollte ein Incident Report zum Köhlern in PPMS hinterlassen und für die aktuelle Aufnahme die Blende erweitert werden, bis kein Rand mehr im Okular zu sehen ist.

Der alternative Objektisch darf vom Nutzer selbsttätig gewechselt werden, dies sollte vor Kalibrierung geschehen. Es ist dringend darauf zu achten, dass keine der Schrauben in das Gerät hineinfallen!

5. Belichtung in LASAF konfigurieren

- Unter dem Tab "Configuration" allgemeine Parameter einstellen:
Laser → Benötigte Laser an- oder ausschalten.
Control Panel → Benutzerspezifische Belegung des Kontrollpanels unter dem Display, häufig genutzte Presets für einen schnellen Einstieg sind verfügbar.
Settings → Bildtiefe der Aufnahme auf mindestens 12bit stellen (Bildtiefe spiegelt bei der Aufnahme die Anzahl der Zustände zwischen minimaler und maximaler Signalstärke wider, entspricht der Intensitäts-Auflösung).
- Unter dem Tab "Acquisition" die Parameter für die Belichtung einstellen und Aufnahmen machen (User-Presets sind verfügbar):
rechts oben: Belichtungsart und -leistung einstellen, Auswahl zwischen 5 Wellenlängen des Argon-Laser und zwei weiteren Spezial-Laser (beim Argon-Laser genügen im Moment 20% der Maximalleistung), Laser mit Klick auf "Visible" aktivieren.
rechts mittig: Auswahl von bis zu 5 Aufnahmekanälen mit spezifischen Wellenlängen-Bandbreiten. Doppelklick auf die Slider unterhalb des Spektrums öffnet ein Fenster mit der oberen und unteren Grenze. Presets für übliche Fluorophore sind verfügbar.

Die selektierten Kanäle sollten einen geringen Mindestabstand zur Anregungswellenlänge aufweisen, da sonst direktes Laserlicht und/oder ein Reflektionsmuster als Hintergrundsignal aufgenommen wird.

<500 nm → $\Delta\lambda \geq 8$ nm

>500 nm → $\Delta\lambda \geq 10$ nm

- Für eine Echtzeit-Aufnahme unten den Button "Live" aktivieren.
- Um eine lokale Aufnahme zu machen, unten auf "Capture Image" klicken. Das Bild wird in OMERO unter "orphanaged images" mit der Bezeichnung "Preview" abgespeichert.
- Für eine vollständige Aufnahme unten auf "Start" klicken. Das Bild wird in OMERO unter "orphanaged images" gespeichert.
- Die erstellte Auflösung kann links eingestellt werden. Hierbei handelt es sich um die Anzahl der aufgenommenen Bildpunkte in X und Y. Eine Überschreitung der physikalisch maximal möglichen Auflösung erhöht den Informationsgehalt nicht.
- Scheibenschnittbilder (Z-Stapel) können links eingestellt werden. Die Auflösung in Z-Richtung unterliegt den gleichen physikalischen Beschränkungen wie die Auflösung

in X und Y. Die unter "System optimized" von der Software vorgeschlagene Anzahl von Schnitten erhöht den Informationsgehalt nicht.

6. Höchstmögliche Auflösung

Sowohl Hard- als auch Software bieten eine Reihe von Einstellungen, über die das erzeugte Bild optimiert werden kann. Die physikalisch maximal erreichbare Auflösung ist hierbei allerdings lediglich abhängig von wenigen Faktoren (Rayleigh-Kriterium):

$$d_{\min} = 0,37 \cdot \frac{n \cdot \lambda_{\text{ext}}}{\text{NA}}$$

$d_{\min}$ = Minimal auflösbare Strukturbreite

n = Brechungsindex der Immersionsflüssigkeit

λ_{ext} = Anregungswellenlänge

NA = Numerische Apertur

0,37 = Rayleigh-Kriterium für doppelten Lichtdurchtritt durch das Objektiv

Unter Berücksichtigung des Nyquist-Shannon-Abtasttheorems kann die Abtastfrequenz unter Informationsgewinn verdreifacht werden, was einer Pixelbreite von 1/3 des Rayleigh-Kriteriums entspricht. Eine weitere Erhöhung der abgetasteten Auflösung (Oversampling) erhöht lediglich die Datenmenge.

Eine Berechnung des bestmöglichen Samplings anhand der Geräteeinstellungen kann auf der folgenden Website durchgeführt werden. Die berechnete Auflösung ist die um den Sampling-Faktor korrigierte physikalische Auflösung.

<http://www.svi.nl/NyquistCalculator>

7. Ausschalten des Mikroskops

1. Sämtliche Laser in LASAF unter Configuration → Laser abschalten
2. Rechner herunterfahren
3. Laser-Stromversorgung mit dem Schlüssel ausschalten
4. Nachdem die Lüfter sich selbstständig abgestellt haben, die Schalter am Frontpanel von rechts nach links ausschalten
5. UV-Lampe ausschalten

**Vor dem Abschalten der Lüfter-Stromversorgung (4) warten bis der Lüfter sich selbstständig ausgeschaltet hat!
Zwischen An- und Ausschalten müssen mindestens 30 Minuten vergehen! Ebenso zwischen dem Aus- und Anschalten!**



Das Mikroskop wird nur ausgeschaltet, wenn bis zur nächsten Nutzung mindestens 60 Minuten vergehen! Hierfür den Kalender in PPMS beachten.

8. Für eine optimale Bildeinstellung:

- Zunächst überprüfen, ob Cross-Excitation oder Cross-Emission stattfindet (besonders kritisch bei quantitativen Aufnahmen). Hierzu die aktiven Laser einzeln aktivieren und in einem einzelnen aufgenommenen Kanal vergleichen, ob die exakt gleichen Strukturen fluoreszieren (Cross-Excitation). Anschließend die ausgewählten Kanäle darauf überprüfen, ob bei separater Belichtung mit den genutzten Laser auf mehreren Kanälen identische Strukturen detektiert werden (Cross-Emission). Laserleistung reduzieren und/oder Sensitivität der Detektoren vermindern und/oder Detektionskanal-Breite optimieren. Cross-Excitation und Emission werden auch verallgemeinert Cross-Talk genannt.
- Sollte Cross-Talk nicht vermeidbar sein, so muss eine sequenzielle Aufnahme mit separaten Konfigurationen für die gewünschten Kanäle durchgeführt werden.
- Die Dynamik der Aufnahme sollte die gesamte Dynamik des Objekts widerspiegeln, jedoch so gering wie möglich gehalten werden für eine größtmögliche Auflösung der Intensität.
 1. Im Fenster der aufgenommenen Kanäle links oben bis zur Falschfarben-Darstellung durchklicken. Farben codieren für drei Intensitätsbereiche:
Grün = 0%
Blau = 100%
Gelb-Rot = 1%-99%
 2. Smart-Gain reduzieren bis KEINE blauen Pixel zu erkennen sind.
 3. Offset erhöhen bis maximal nur noch einzelne grüne Pixel < 10 -20 pro Bild zu erkennen sind.
 4. Für alle benutzten Kanäle wiederholen.
- Die Bildqualität kann verbessert werden, indem mehrere Aufnahmen durchgeführt und die gemessenen Bildpunkte gemittelt werden. Die Funktion steht in LASAF unter der Bezeichnung Averaging in zwei Ausgaben zur Verfügung: Line-Averaging und Frame-Averaging. Während Line-Averaging jede Zeile aus jedem Kanal direkt hintereinander ausliest und sich so durch die gesamte Aufnahme arbeitet, wird bei Frame-Averaging zunächst die gesamte Aufnahme erstellt und erst im Anschluss ein weiteres Mal. Frame-Averaging ist schonender zu Fluorophoren (besonders bei hochauflösenden Bildern und hohen Licht-Intensitäten), jedoch ungeeignet bei bewegten Objekten und Live-Aufnahmen.
Ein Line-Averaging von 2 wird für die meisten Aufnahmen empfohlen.
- Um eine bessere Auflösung von Strukturen zu erreichen, kann der Durchmesser des Pinhole verringert werden. Dies verbessert die Auflösung in der Tiefe, verringert jedoch die im Detektor einfallende Lichtleistung und führt zu einem dunkleren Bild.

- Die Tiefen-Auflösung ist begrenzt und entspricht dem 2,5-fachen der Pixelbreite (Wert von X bzw. Y).
- Sollte die Aufnahme zu dunkel geraten, so können mehrere Aufnahmen durchgeführt und überlagert werden. Dies erhöht sowohl Signalintensität als auch den Hintergrund. Die Funktion steht in LASAF unter der Bezeichnung Accumulation zur Verfügung und ist ebenfalls als Line-Accumulation und Frame-Accumulation verfügbar. Accumulation ist mit Averaging kompatibel.
- Eine 3D-Aufnahme im Scheibenschnitt-Verfahren (Z-Stapel) ist zur Vermessung der räumlichen Struktur des Objekts nützlich, allerdings auch zur Identifikation nahe übereinanderliegender Signale und damit für deren korrekte Interpretation.
- Am CLSM stehen zwei verschiedene Detektor-Typen für die Aufnahme zur Verfügung, Photo-Multiplier-Tubes (PMT) und das Leica HyD.
PMT: Besitzt eine sehr gute Dynamik und eine mittelmäßige Signal-to-Noise Ratio, ist somit ein Allzweck-Detektor.
HyD: Besitzt eine geringere Dynamik, jedoch eine gute Signal-to-Noise Ratio, ideal für die Detektion von nur schwach fluoreszierenden Strukturen und bei Verwendung der Accumulation-Funktion. Falls ein HyD – Detektor sich wegen zu hoher Lichtintensität abschaltet, reicht es aus, diesen in der Software einmal abzuschalten (Box entmarkieren), 3 Sekunden zu warten und den Detektor wieder anzuschalten. Darauf achten, dass der HyD nicht im Photon counting Mode läuft. Dann kriegt man nur ein schwarzes Bild.

9. Glossar

Numerische Apertur

Die Numerische Apertur spiegelt beim Mikroskop den Sinus des Einfallswinkel des Lichts in das Objektiv wider. Je höher die Apertur, desto mehr Licht gelangt in das Objektiv. Die Apertur ist beim CLSM der maßgebliche Faktor für den optischen Zoom und die physikalisch maximale Auflösung.

Auflösung

Die Auflösung beschreibt die kleinste identifizierbare Struktur, die in der Aufnahme identifiziert werden kann. Beim CLSM ist die Auflösung bestimmt durch die Apertur-Zahl (der optische Zoom) und die Anzahl der vom CLSM erzeugten Aufnahmepunkte. Die physikalisch höchstmögliche informationstragende Auflösung wird in Abschnitt 6 beschrieben. Die erzeugte Auflösung wird nicht durch den digitalen Zoom in LASAF beeinflusst.

Bittiefe

Die Bittiefe, auch Farbtiefe oder Samplingtiefe genannt, gibt Auskunft über die Anzahl der unterschiedenen Intensitätsstufen, die zur digitalen Repräsentation eines analogen Signals genutzt werden. Je höher die Bittiefe ist, desto exakter wird das Original wiedergegeben. Die Bittiefe wird üblicherweise in Bit angegeben, die dekadische Zahl kann durch 2^{Bittiefe} berechnet werden. So entsprechen 8bit beispielsweise 256 Stufen, 12bit entsprechen 4096 Stufen und 16bit entsprechen 65536 Stufen.

Digitaler Zoom

Entspricht der Zoom-Funktion des Front-Panels. Der digitale Zoom ist eine Technologie, um die vorliegende Auflösung der Bildschirmauflösung anzupassen. Entspricht jedes dargestellte Pixel einem aufgenommenen Bildpunkt, so handelt es sich um einen 100% Zoom. Da das Mikroskop Bilder in einer weitaus höheren Auflösung aufnehmen kann, als es der Bildschirm wiedergeben kann, werden die erstellten Bilder mit einem Zoom unter 100% dargestellt, die gemessenen Bildpunkte werden für die Ausgabe über den Bildschirm unter Informationsverlust interpoliert. Ein Zoom über 100% erzeugt keinen Informationsgewinn.

Dynamik

Die Dynamik wird bestimmt durch den höchsten und geringsten Intensitätswert, der in der Aufnahme vorliegt. Der Dynamikumfang wird unterteilt in die von der Bittiefe festgelegten Intensitätsstufen, daher ist eine möglichst geringe Dynamik notwendig für eine aussagekräftige Auflösung der gemessenen Intensitäten.

Optischer Zoom

Der optische Zoom ist maßgeblich abhängig von der Numerischen Apertur des Objektivs und ist verlustfrei. Er kann nur durch Wechsel des Objektivs verändert werden.

OMERO

Das Kürzel steht für Open Microscopy Environment und ist ein Bilddatenbankdienst, der

die aufgenommenen Rohdaten der Mikroskopie-Bilder zentralisiert speichert und bei vorliegender Berechtigung online via Login verfügbar macht. Der OMERO-Server ist im Netzwerk integriert und erlaubt einen direkten Upload der Daten (automatisch) auf das Verzeichnis \OMERO-dropbox\, das lediglich vom Nutzer bzw. Admins einsehbar ist. Der OMERO-Client ist für jeden Nutzer frei zugänglich.

Pinhole

Das Pinhole ist eine einstellbare Lochblende, die im Brennpunkt des Strahlengangs sowohl bei der Anregung und Abregung sitzt. Das Pinhole verringert Streulicht aus tiefer- oder höherliegenden Schichten (Z-Richtung) und verbessert die Z-korrelierte Auflösung, verringert jedoch gleichzeitig die im Detektor ankommende Lichtmenge.

Pixel

Ein Pixel ist ein quadratischer Bildpunkt definierter Länge und Breite, beeinflusst von der aufgenommenen Auflösung in X und Y. Beim CLSM entspricht jedes Pixel einer separaten Punktaufnahme.

Voxel

Ein Voxel ist ein volumetrisches Pixel. Beim CLSM ist die Tiefe des Voxels abhängig von der Auflösung in X und Y, die Tiefe des Voxels ist hier das etwa 2,5-fache der höchsten gewählten Auflösung für X bzw. Y.