



ZEN - Les bases de l'acquisition confocale

ZEN - Les bases de l'acquisition confocale

La connaissance de ce manuel est requise pour le fonctionnement de l'appareil. Vous devez donc vous familiariser avec son contenu, en accordant une attention particulière aux instructions concernant la manipulation sûre de l'appareil.

Nous nous réservons le droit d'apporter des modifications au produit en fonction des développements techniques.

© Sauf autorisation explicite, la diffusion ou la duplication de ce document et l'exploitation commerciale ou la communication de son contenu ne sont pas autorisées. Les personnes qui contreviendront à ce droit d'auteur seront responsables des dommages.

Tous droits réservés en cas de délivrance de brevets ou d'enregistrement d'un modèle d'utilité.

Tous les noms de sociétés et de produits mentionnés dans ce manuel d'utilisation peuvent être des marques commerciales ou des marques déposées. Les produits de tiers sont cités à titre d'information seulement. Cela ne représente pas l'approbation ou la recommandation de ces produits.

Le groupe ZEISS décline toute responsabilité quant aux performances ou à l'utilisation de ces produits.

Editeur : Carl Zeiss SAS
100 Route de Versailles Aile
gauche
78160, Marly-le-Roi, France

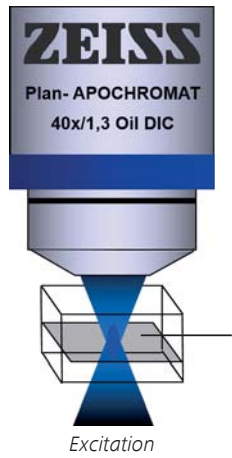
Date de publication : Janvier 2019

Table des matières

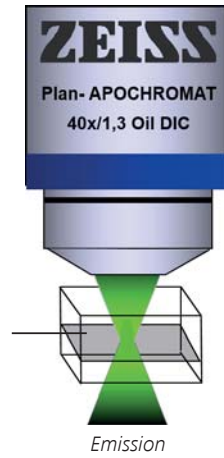
| | | | | | |
|----------|--|-----------|----------|---|-----------|
| 1 | Quelques rappels..... | 1 | | | |
| 1.1 | Microscopie confocale..... | 1 | C.3 | Stratégies d'acquisitions multicolours : 4 couleurs mode séquentiel LINE 2/4..... | 24 |
| 1.2 | De l'échantillon à l'image..... | 3 | C.4 | Stratégies d'acquisitions multicolours : 4 couleurs mode séquentiel LINE 3/4..... | 24 |
| 2 | Les composants du trajet optique..... | 6 | C.5 | Stratégies d'acquisitions multicolours : 4 couleurs mode séquentiel LINE 4/4..... | 25 |
| 3 | Le logiciel ZEN..... | 8 | 7 | Acquisitions de piles en Z..... | 25 |
| 3.1 | Vue générale..... | 8 | 7.1 | Exemple : Réalisation d'une pile Z : "Z stack"..... | 25 |
| 4 | Création d'une configuration..... | 10 | 7.2 | Z 10 µm, Alexa 488 et 561, Obj 63x /1.4..... | 26 |
| 4.1 | Exemple : Imagerie de l'Alexa Fluor 488nm..... | 10 | 7.3 | Mode avancé : Center..... | 28 |
| 4.2 | Imagerie Alexa 488/GFP : ex 488nm; em 500-550nm..... | 11 | 7.4 | Mode avancé : Optimise Step and sectioning..... | 29 |
| 5 | Optimisation d'une image 2D..... | 14 | 7.5 | Mode avancé : Auto Z brightness correction..... | 29 |
| 5.1 | L'imagerie, l'art du compromis..... | 14 | 7.6 | Passage d'un track à l'autre à la fin de la pile Z..... | 31 |
| A | Exercice d'application 1..... | 16 | 8 | Acquisitions de séries temporelles..... | 32 |
| A.1 | Optimisation d'une image 2D..... | 16 | | | |
| 6 | Stratégies d'acquisitions multicolours..... | 16 | | | |
| 6.1 | Exemple : Imagerie Alexa Fluor 488 et 647..... | 16 | | | |
| 6.2 | Exemple : Imagerie Alexa Fluor 488 et 568..... | 17 | | | |
| 6.3 | Stratégies d'acquisitions de l'image..... | 18 | | | |
| 6.4 | Mode line et fast frame..... | 19 | | | |
| B | Exercice d'application 2..... | 20 | | | |
| B.1 | Stratégies d'acquisitions multicolours..... | 20 | | | |
| B.2 | Stratégies d'acquisitions multicolours : 4 couleurs mode séquentiel FRAME 1/4..... | 21 | | | |
| B.3 | Stratégies d'acquisitions multicolours : 4 couleurs mode séquentiel FRAME 2/4..... | 21 | | | |
| B.4 | Stratégies d'acquisitions multicolours : 4 couleurs mode séquentiel FRAME 3/4..... | 22 | | | |
| B.5 | Stratégies d'acquisitions multicolours : 4 couleurs mode séquentiel FRAME 4/4..... | 22 | | | |
| C | Exercice d'application 3..... | 23 | | | |
| C.1 | Stratégies d'acquisitions multicolours..... | 23 | | | |
| C.2 | Stratégies d'acquisitions multicolours : 4 couleurs mode séquentiel LINE 1/4..... | 23 | | | |

1 QUELQUES RAPPELS

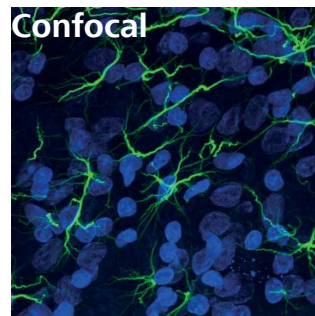
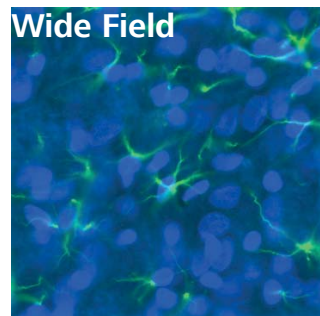
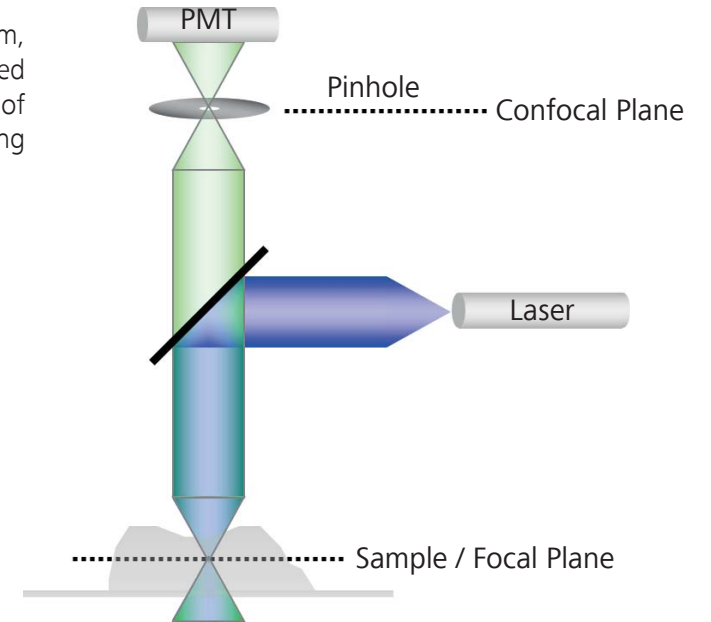
1.1 Microscopie confocale



Focale plane



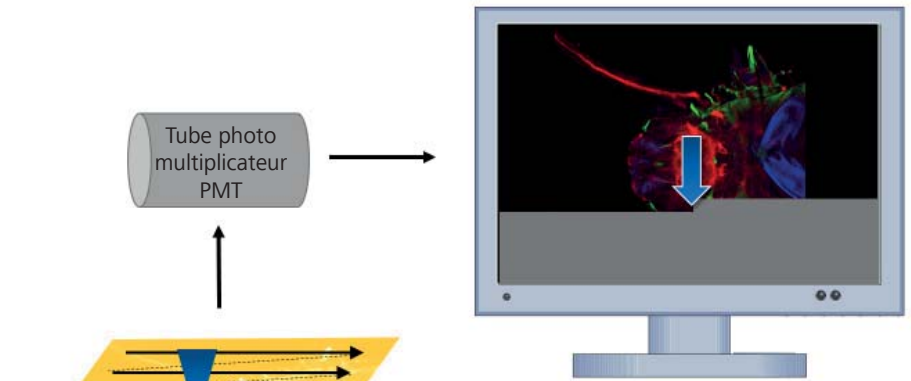
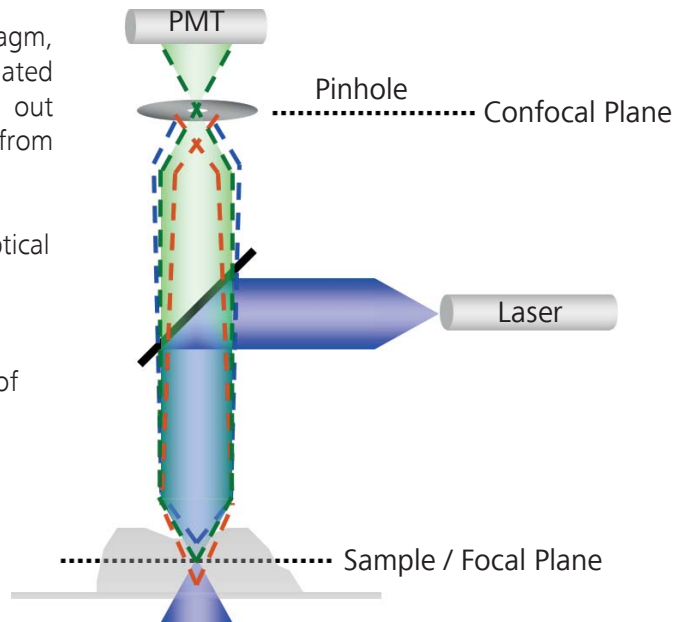
A minute diaphragm, situated in a conjugated focal plane, prevents out of focus light from being detected.



A minute diaphragm, situated in a conjugated focal plane, prevents out of focus light from being detected.

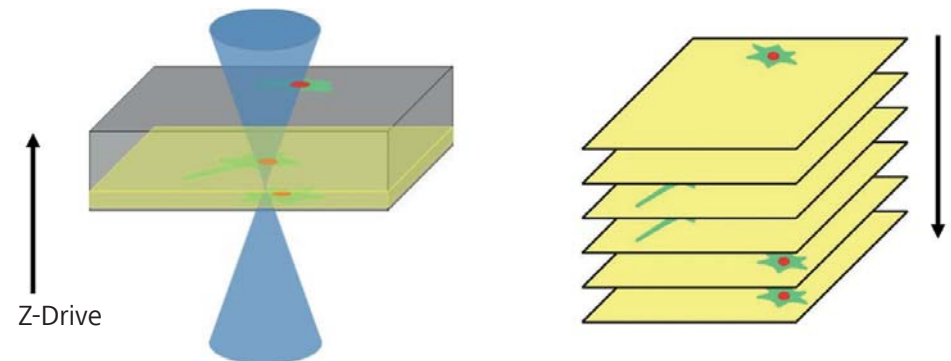
The thickness of an optical section is directly controlled by:

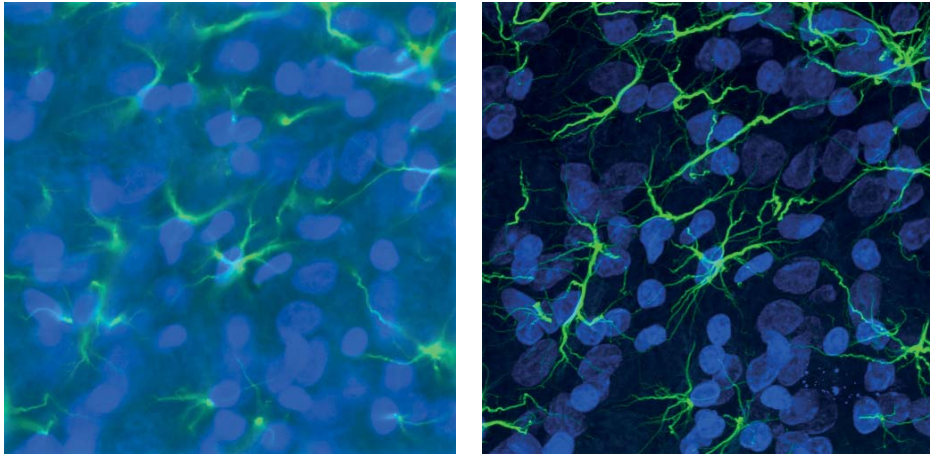
- Numerical aperture of objective lens
- Wavelength
- Pinhole diameter



Confocal à balayage laser
D'un point à une image

From Image to 3-dimensional Information
How is a X/Y/Z Stack produced?



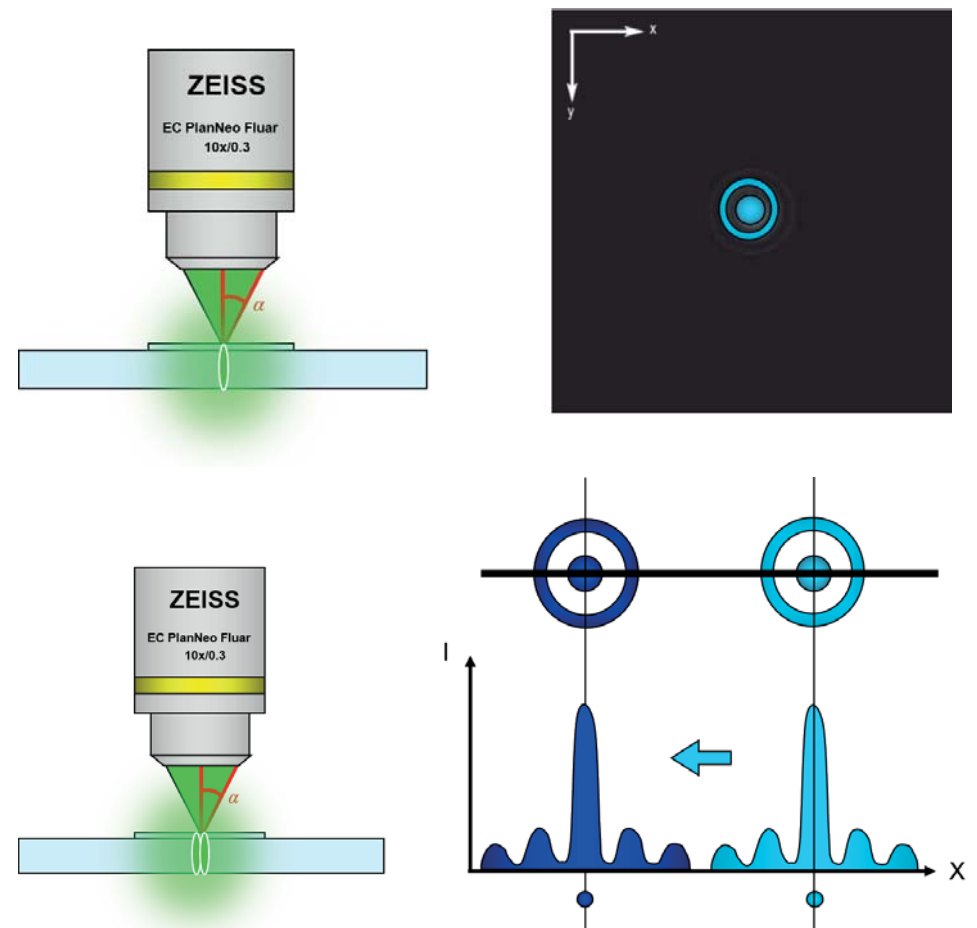


An individual confocal X/Y image does not represent as much information as the corresponding wide field image.

Only the maximum projection off all confocal slices from the 3D image stack shows all details in focus.

1.2 De l'échantillon à l'image

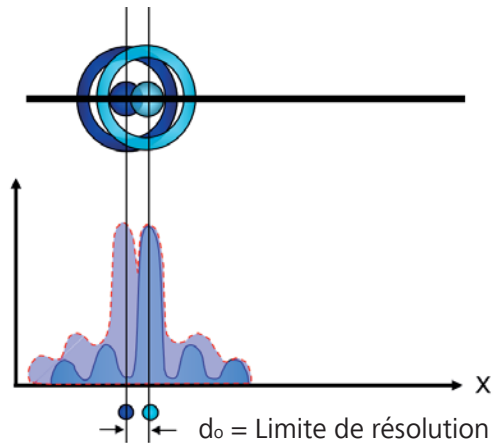
Notion de résolution et d'échantillonnage



Notion de résolution et d'échantillonnage

Définition :

La limite de résolution est atteinte lorsque deux objets ne peuvent être imagés comme deux structures distinctes.
La distance entre ces deux objets est appelée "limite de résolution".



$$FWHM^* = \frac{0.51 * \lambda_{em}}{NA^{**}}$$

FWHM = Résolution latérale [μm]

NA = Ouverture numérique de l'objectif

λ_{em} = Longueur d'onde d'émission [nm]

*Full with height middle

**NA = n Sin (alpha)

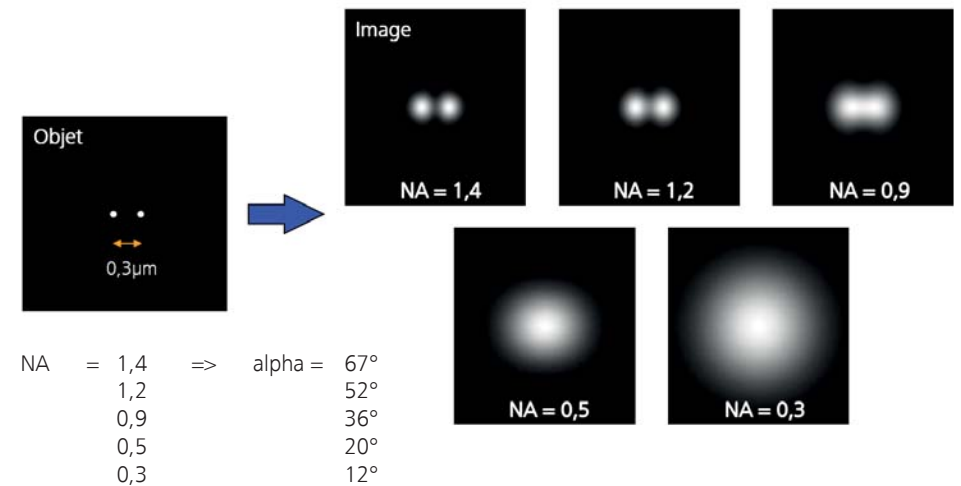
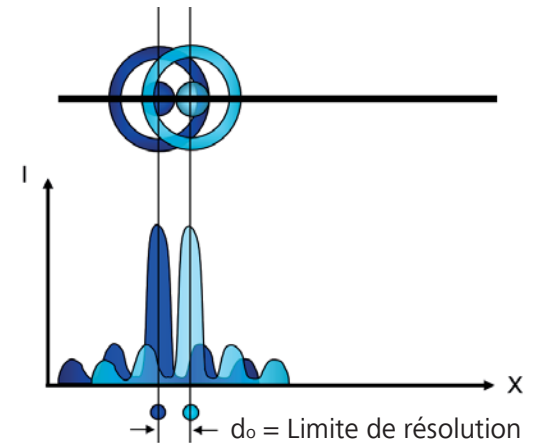
Notion de résolution et d'échantillonnage

$$d = 0.61 \frac{\lambda}{NA}$$

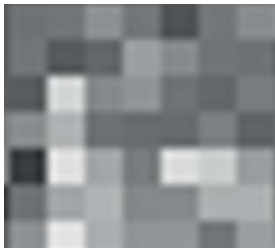
d = Résolution latérale [μm]

NA = Ouverture numérique de l'objectif

λ = Longueur d'onde d'émission [nm]



Notion de résolution et d'échantillonnage



N = ?

En suivant les règles de Nyquist :

$$\text{Taille du pixel} \leq \text{Résolution latérale} / 2$$

Image

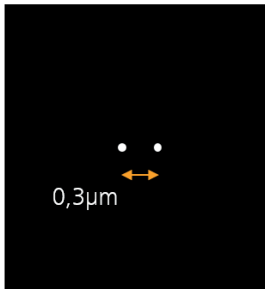
Pixelsize in the object plane is 31nm

Objective

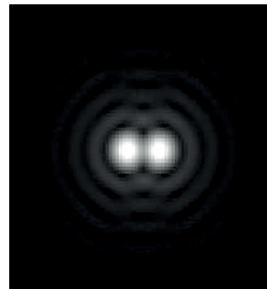
Plan Apochromat
63x/1.4

Resolution d=230nm

Object



Image



Objects are separated,
resolution is sufficient.



Notion de résolution et d'échantillonnage

Image

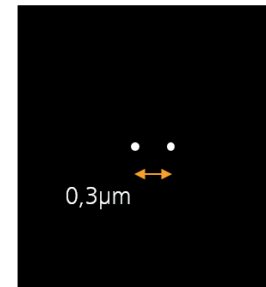
Pixelsize in the object plane is 125nm

Objective

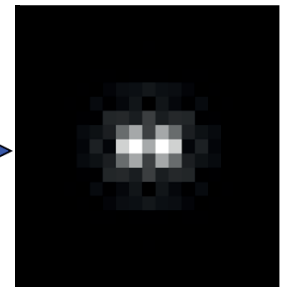
Plan Apochromat
63x/1.4

Resolution d=230nm

Object



Image



Objects are almost merged;
resolution is barely sufficient.



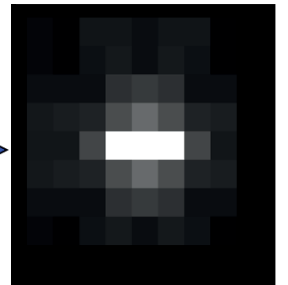
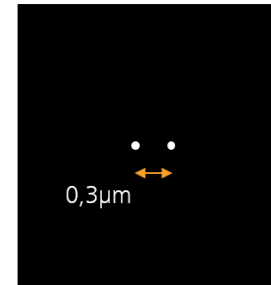
Image

Pixelsize in the object plane is 250nm

Objective

Plan Apochromat
63x/1.4

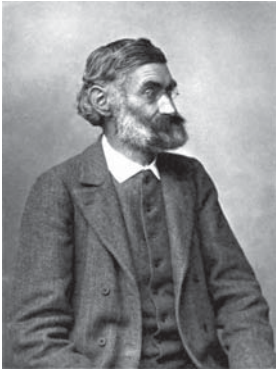
Resolution d=230nm



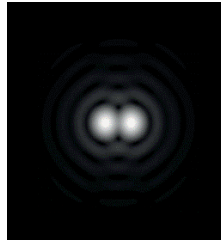
Objects are merged;
resolution is too low.



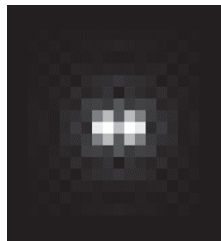
2 LES COMPOSANTS DU TRAJET OPTIQUE



M. Abbe donne la résolution du microscope



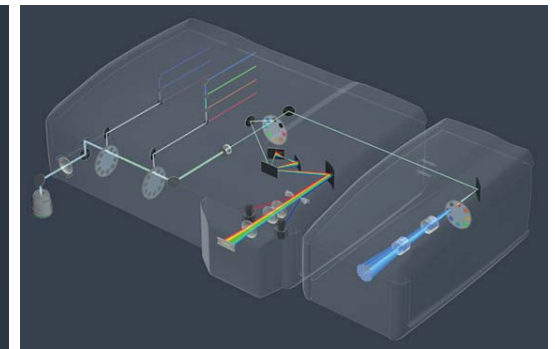
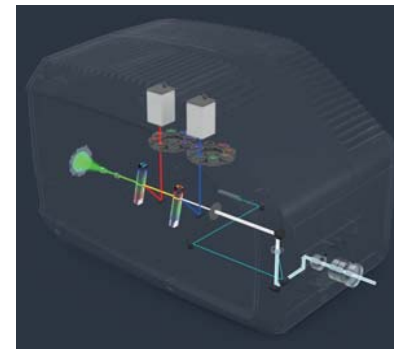
M. Nyquist définit le nombre de pixels nécessaire pour ne pas perdre d'information dans l'image finale



LSM 800

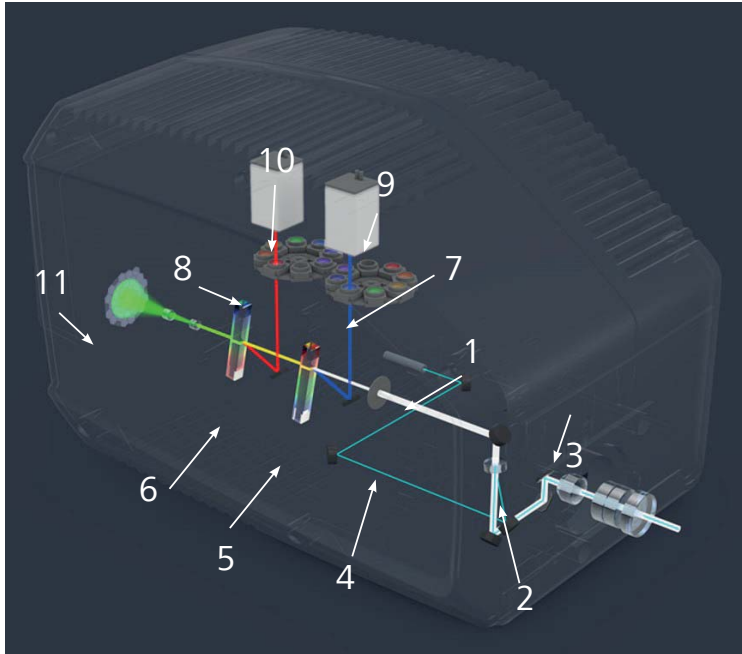


LSM 880



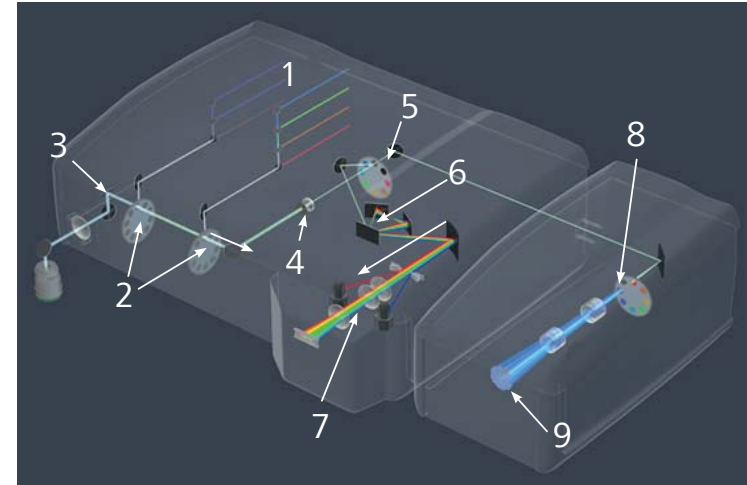
"The impressive capabilities of the confocal microscope can tempt workers to think it can accomplish miracles. However, no amount of optical sectioning or post-processing can reconstruct a perfect picture from bad input."

(Scott Fraser, 1990)



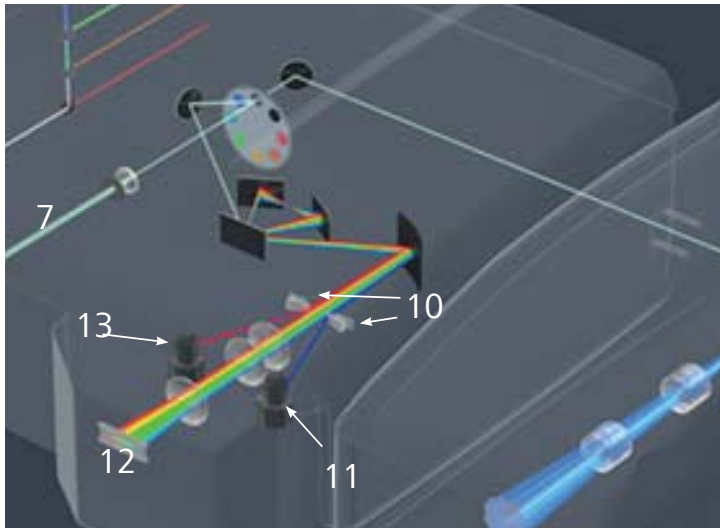
LSM 800

- (1) Lasers
- (2) Main Beam Splitter
- (3) Scanners
- (4) Pinhole
- (5) Variable Secondary Dichroic "VSD" 1 (Passe Haut)
- (6) Variable Secondary Dichroic "VSD" 2 (Passe Bas)
- (7) Filtre emission pour PMT1 (9)
- (8) Filtre emission pour PMT3 (10)
- (11) PMT2 ou Airyscan



LSM 880

- (1) Lasers Visible & Invisible
- (2) 2x Main Beam Splitter VIS & inVis
- (3) Scanners
- (4) Pinhole
- (5) Secondary Dichroic (option)
- (6) Recycling Loop
- (7) Système de détection Quasar 3 ou 34 canaux
- Option:
- (8) Filtre emission pour Airyscan
- (9) Airyscan

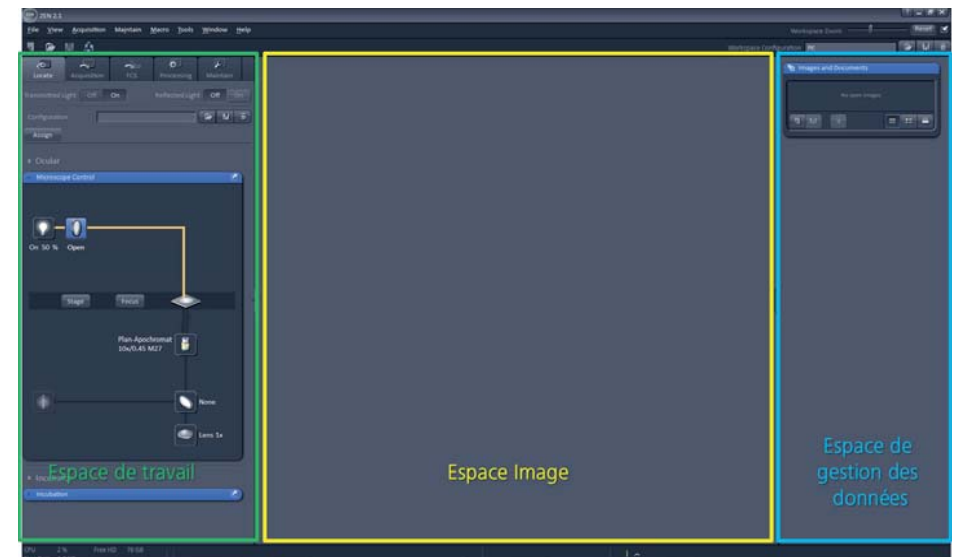


LSM 880 - Quasar

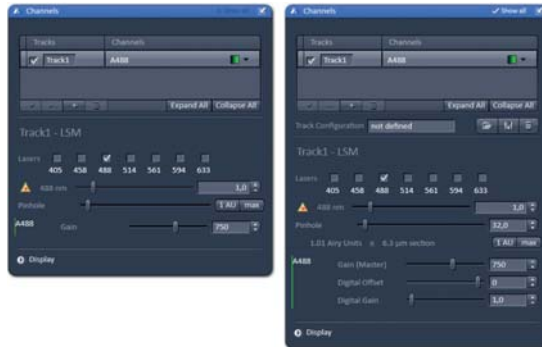
- (7) Système de détection Quasar 3 ou 34 canaux :
- (10) Système de prismes déviateurs et masques
- (11) PMT1 : Multi-Alkali
- (12) PMT2 : 1x GaAsP
ou 32x GaAsP
- (13) PMT3 : Multi-Alkali

3 LE LOGICIEL ZEN

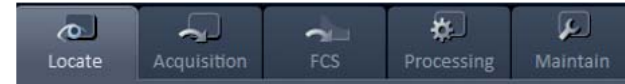
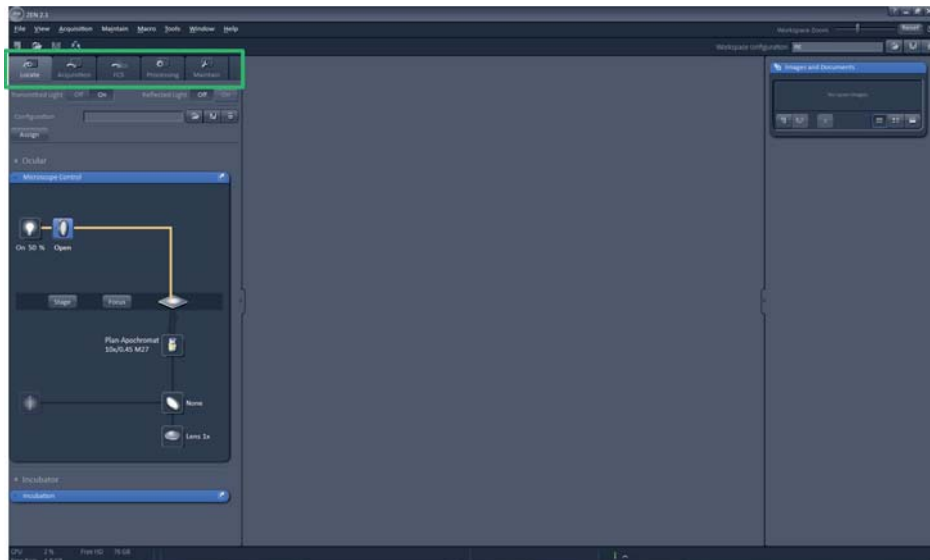
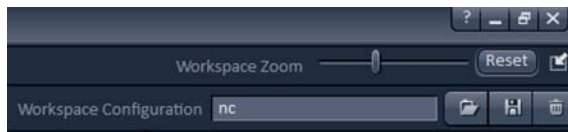
3.1 Vue générale



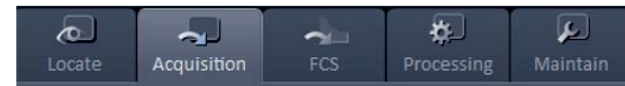
L'interface peut être zoomée, les fenêtre ancrées ou libres, présenter les fonctions essentielles ou toutes les fonctions avancées (show all).



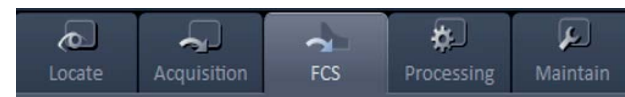
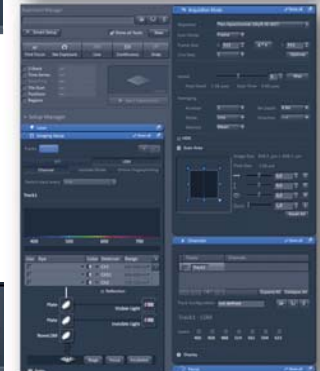
La personnalisation de l'espace de travail peut être enregistrée et rechargée par la suite.



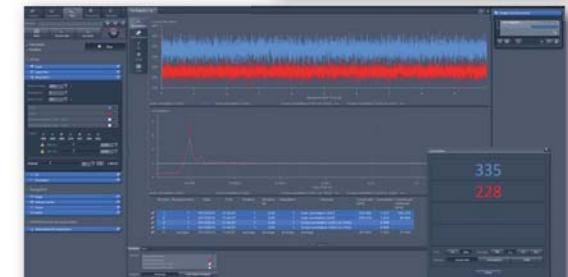
L'onglet Locate permet l'observation aux oculaires et la manipulation des motorisations du microscope



L'onglet Acquisition permet la gestion des acquisitions multi dimensions



L'onglet FCS* permet la gestion des acquisitions FCS



*La FCS est en option



L'onglet Processing regroupe les fonctions de post traitement du logiciel

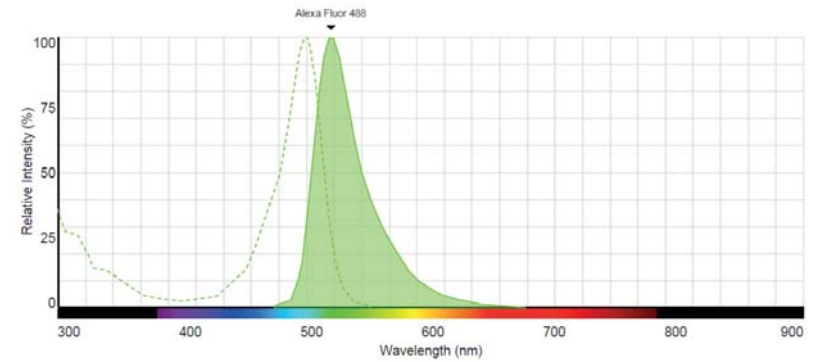


L'onglet Maintenir regroupe les outils de gestion et calibration du microscope

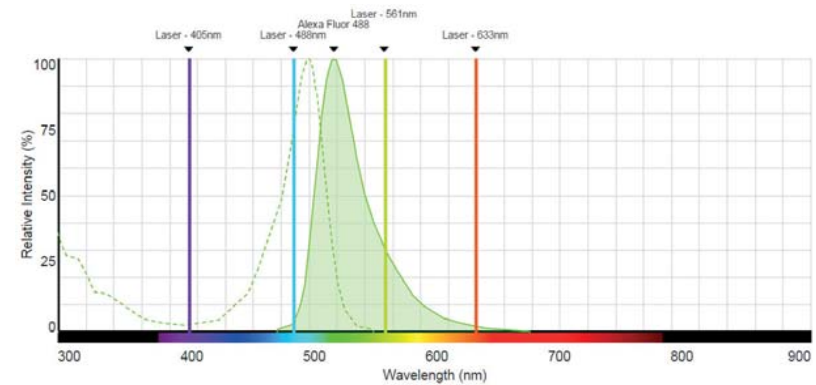


4 CREATION D'UNE CONFIGURATION

4.1 Exemple : Imagerie de l'Alexa Fluor 488nm



Recherche de la raie laser la mieux adaptée parmi celles disponibles

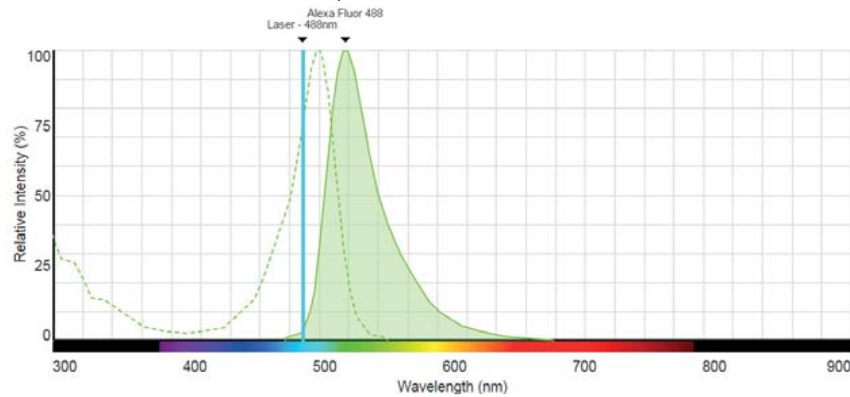


Comparaison de l'efficacité d'excitation des lasers :
L'efficacité sera fonction de la longueur d'onde et de sa possibilité d'exciter l'échantillon mais également de la puissance du laser utilisé

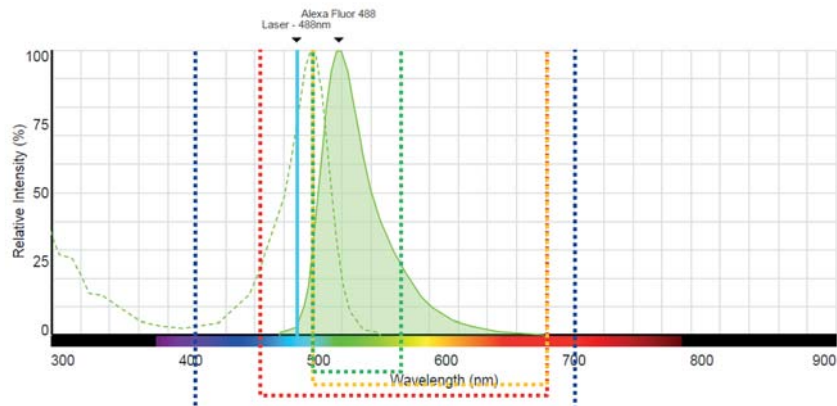
Pointillés : spectre d'absorption de la molécule

Ligne continue : spectre d'émission de la molécule

Le laser 488nm est le mieux adapté dans ce cas là



Collecter le signal : 400 - 700 / 450 - 680 / 500 - 680 / 500 - 550 ?



Comment collecter le signal ?

400-700 : prendre tout ce qui est possible ?

450-680 : prendre tout le spectre y compris le laser ?

500-680 : prendre tout le spectre en dehors du laser ?

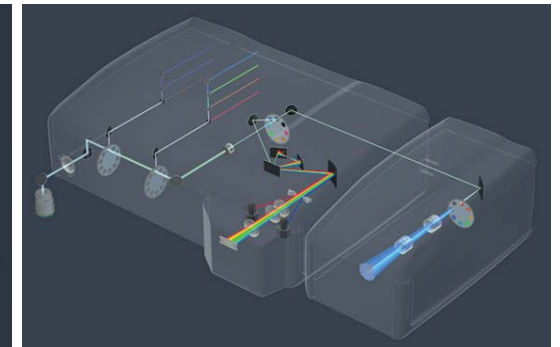
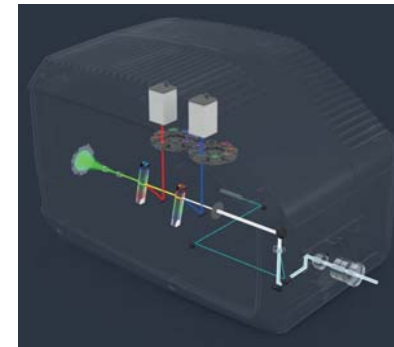
500-550 : prendre tout le spectre où il y a plus de 20% de signal ?

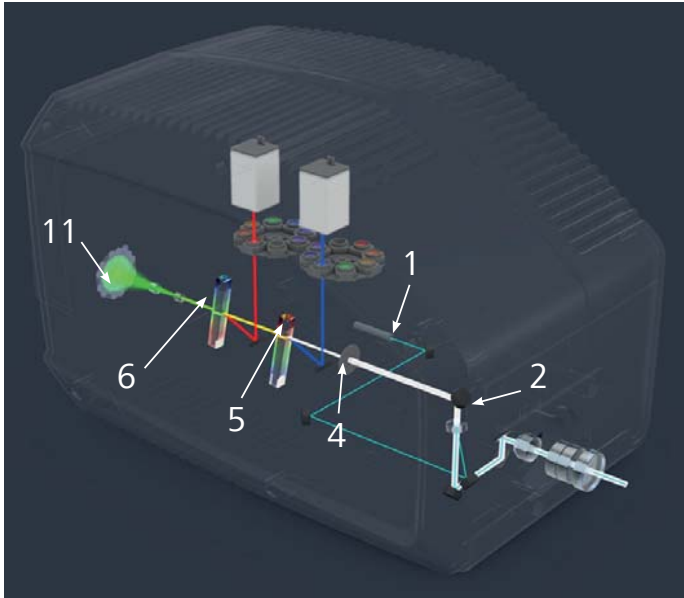
4.2 Imagerie Alexa 488/GFP : ex 488nm; em 500-550nm

LSM 800



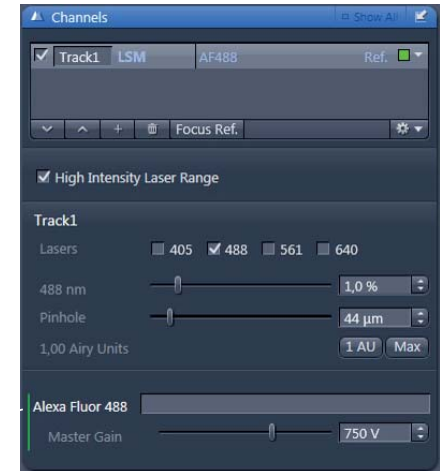
LSM 880

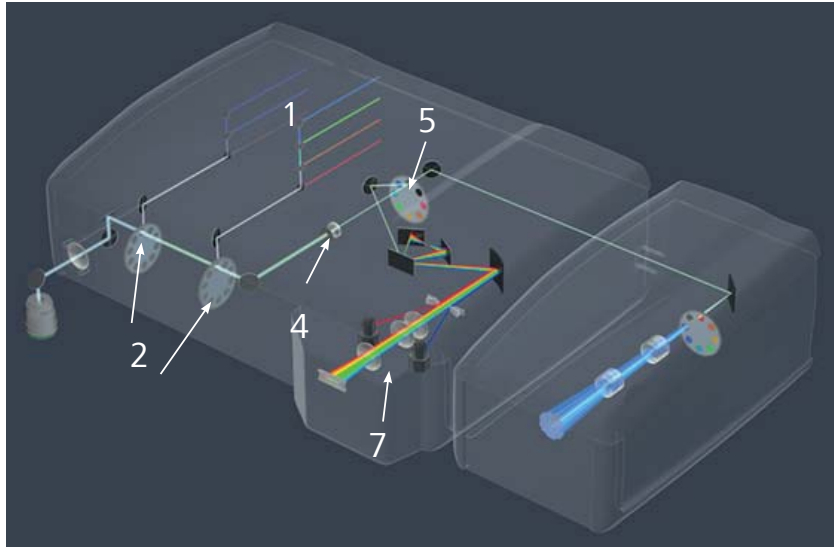




LSM 800

- (1) Lasers : 488nm
- (2) Main Beam Splitter
- (4) Pinhole : 1AU
- (5) Variable Secondary Dichroic "VSD" 1 (500 nm)
- (6) Variable Secondary Dichroic "VSD" 2 (550 nm)
- (11) PMT2 ou Airyscan





LSM 880

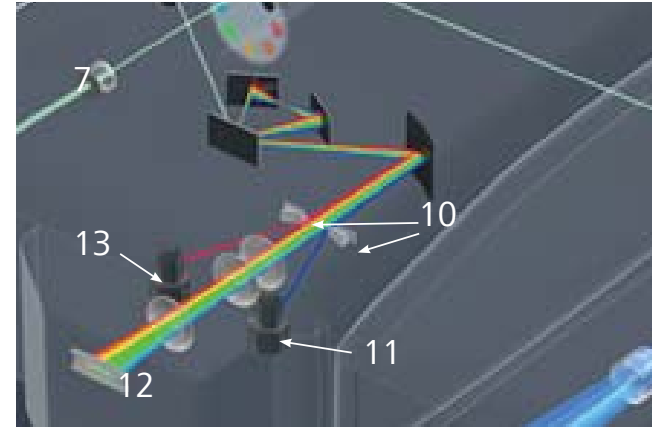
Lasers Visible 488nm

2x Main Beam Splitter VIS 488nm & inVis Plate

(4) Pinhole : 1AU

(5) Secondary Dichroic : Mirror

(7) Système de détection Quasar 3 ou 34 canaux 500 – 550 nm



LSM 880 - Quasar

(7) Système de détection Quasar 3 ou 34 canaux:

(10) Système de prismes déviateurs et masques

(11) PMT1

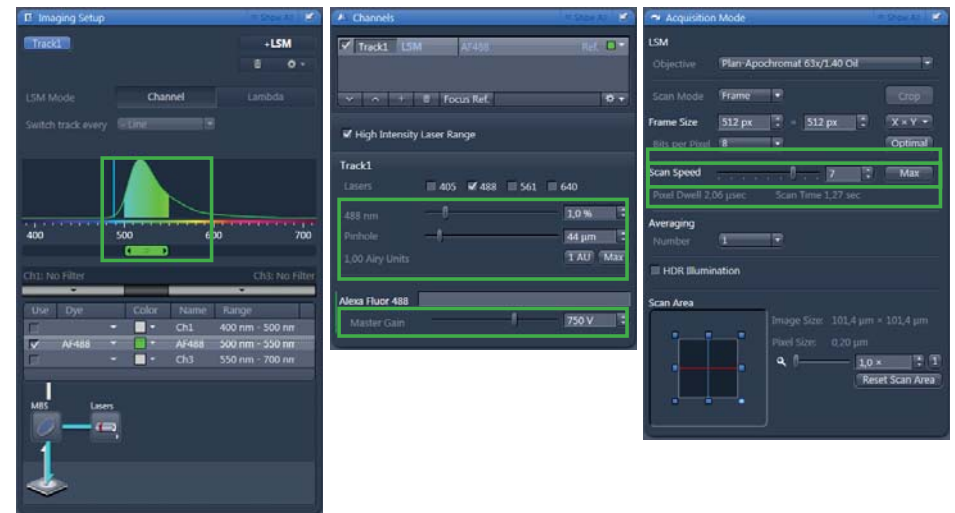
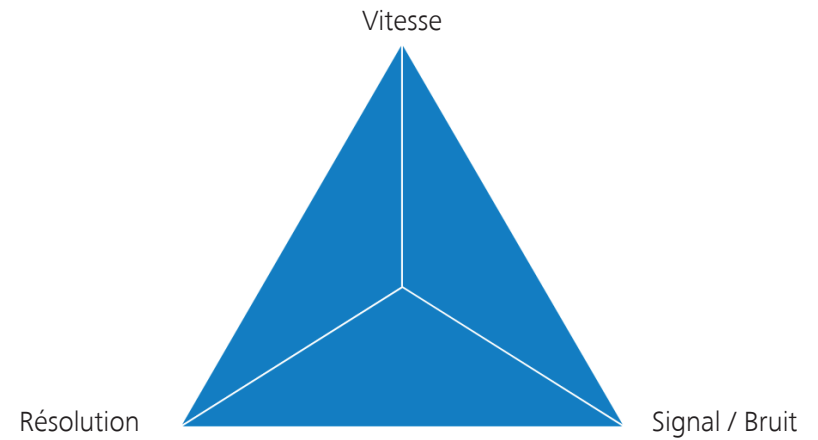
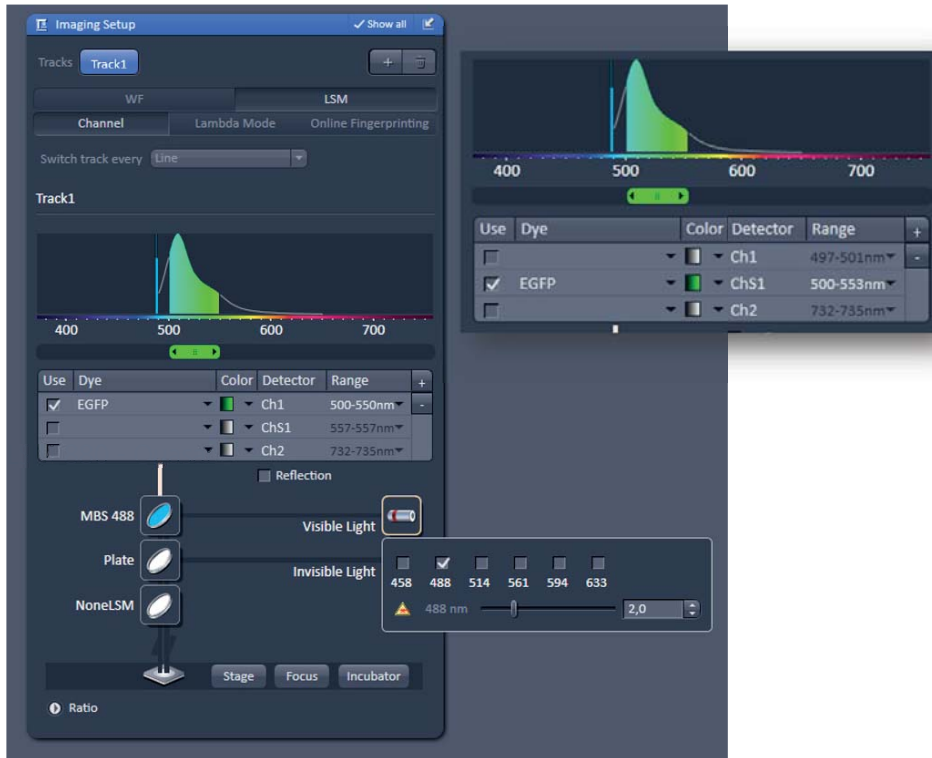
(12) PMT2 : 1x GaAsP
ou 32x GaAsP
lecture 500-550

(13) PMT3



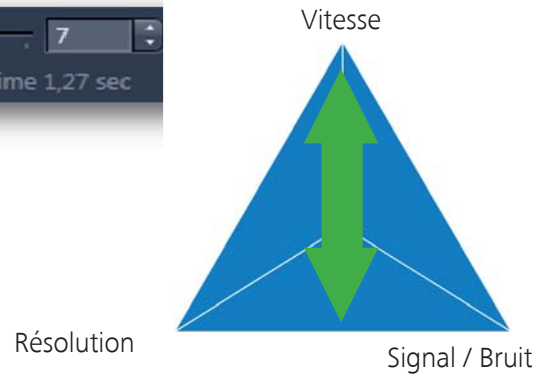
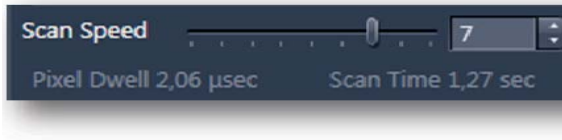
5 OPTIMISATION D'UNE IMAGE 2D

5.1 L'imagerie, l'art du compromis

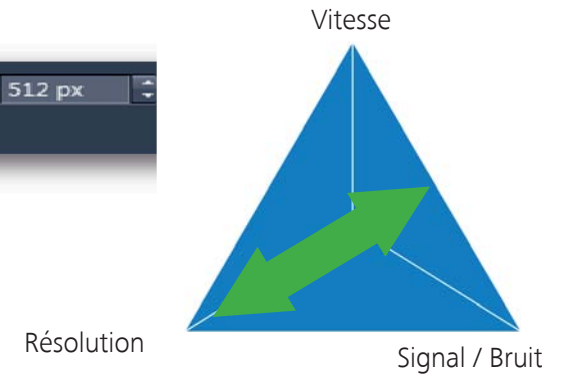


C'est l'application qui dirige la direction de l'optimisation de l'acquisition

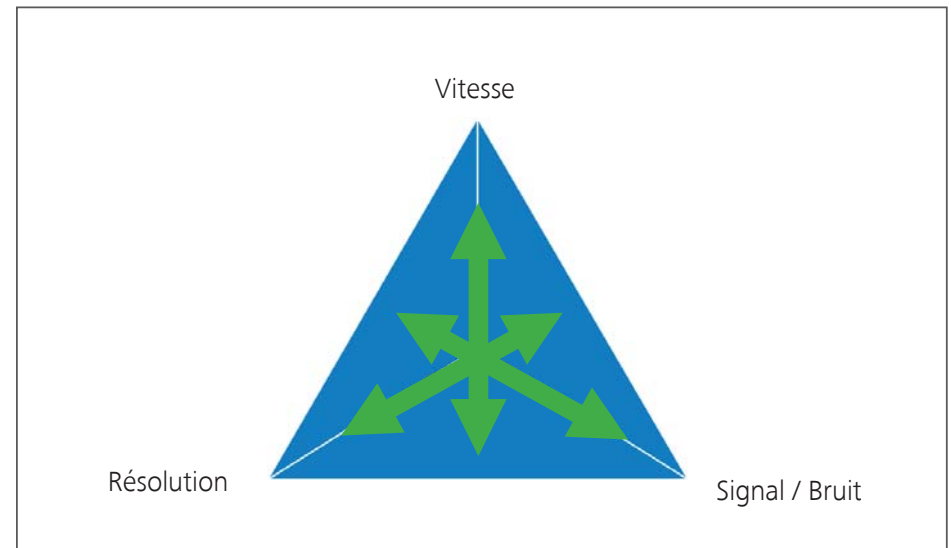
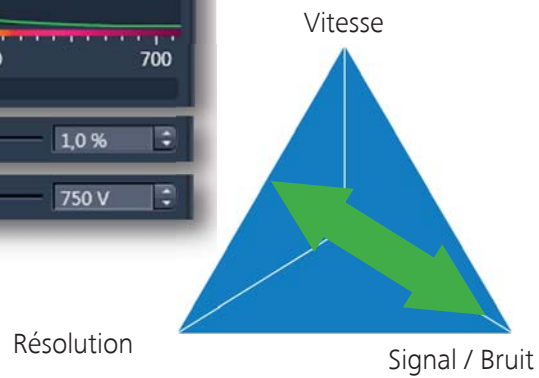
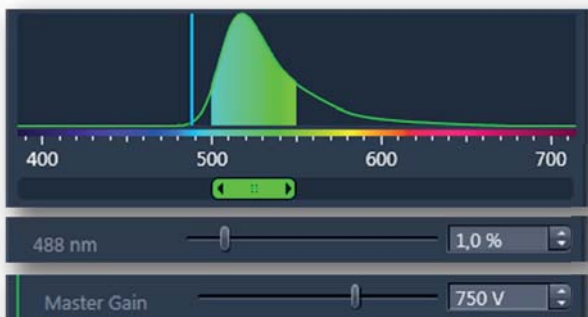
La vitesse 7 est un bon compromis de départ



Le bouton « Optimal » donne une référence du nombre maximum de pixels pour collecter la résolution de l'objectif



Un gain de 750 est un bon compromis de départ



A EXERCICE D'APPLICATION 1

A.1 Optimisation d'une image 2D

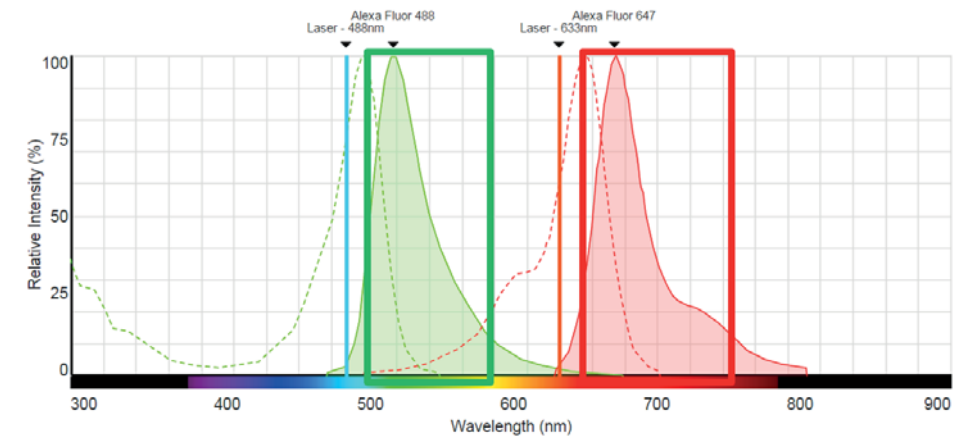
Réalisez une série d'images :

- A : 512x512 en Vmax
- B : 512x512 avec pixel time de 3-4 μ s
- C : Image 2048x2048 en Vmax
- D : Image 512x512 avec un temps équivalent à celui de l'image C
- E : Image 1024x1024 avec un temps équivalent à celui de l'image C

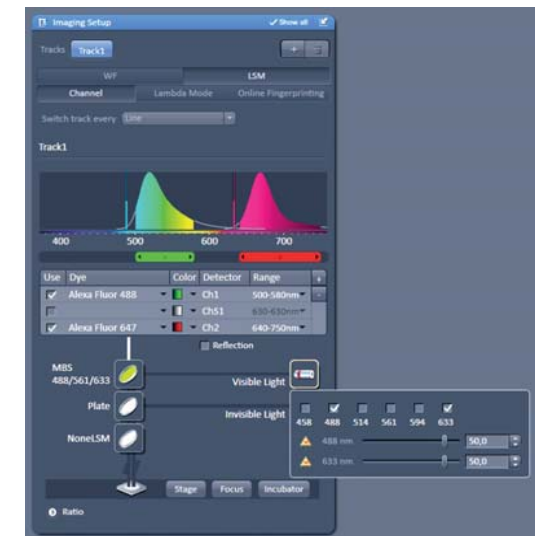
Conclusion ?

6 STRATEGIES D'ACQUISITIONS MULTICOULEURS

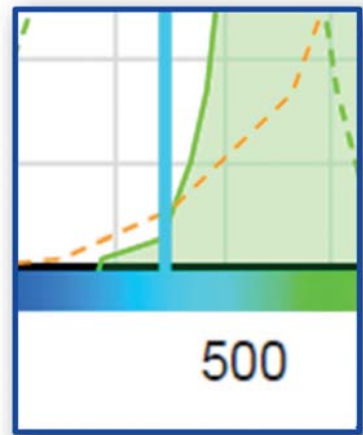
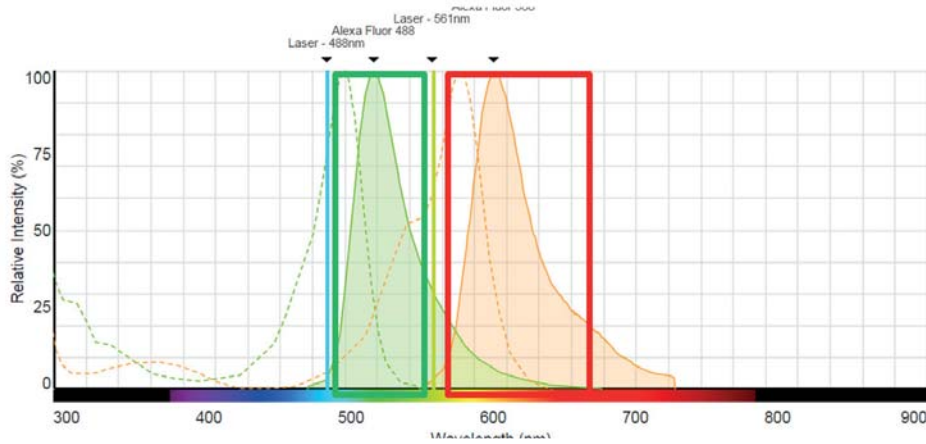
6.1 Exemple : Imagerie Alexa Fluor 488 et 647



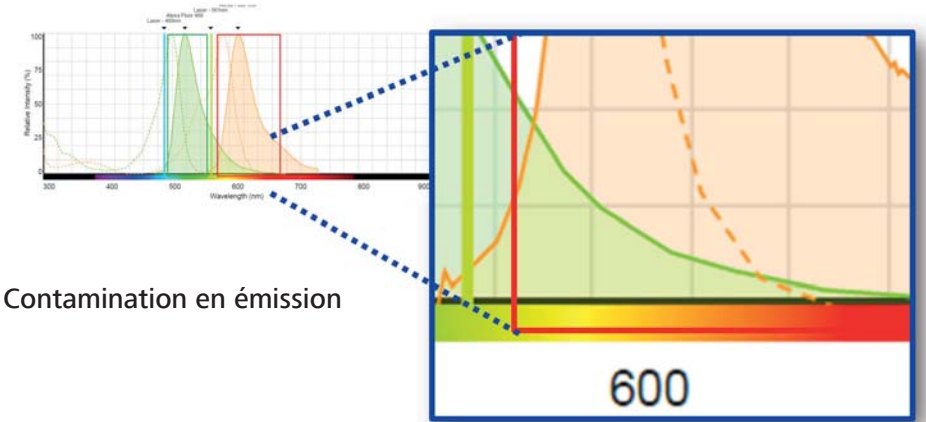
Imagerie simulée
dans le même track



6.2 Exemple : Imagerie Alexa Fluor 488 et 568



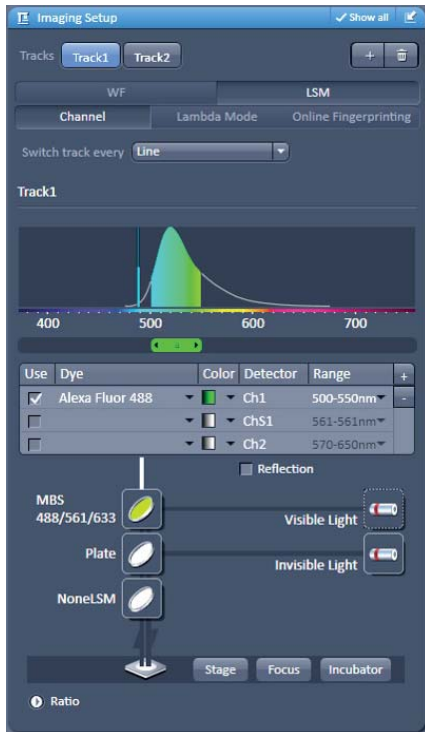
Excitation crosstalk
Contamination par excitation croisée



Contamination en émission

Imagerie simulée dans le même track

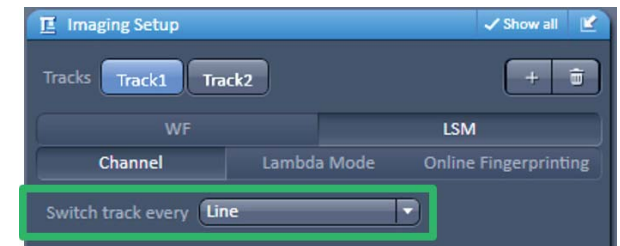




Imagerie séquentielle en 2 tracks



6.3 Stratégies d'acquisition de l'image



“ Switch track every ” :

- Frame

Toute l'image est scannée d'abord selon le track 1 puis selon le track 2. Tous les changements mécaniques sont possibles

(+) : modulable / (-) : switch lent

- Line

L'image est scannée avec une commutation entre le track 1 et 2 à chaque ligne

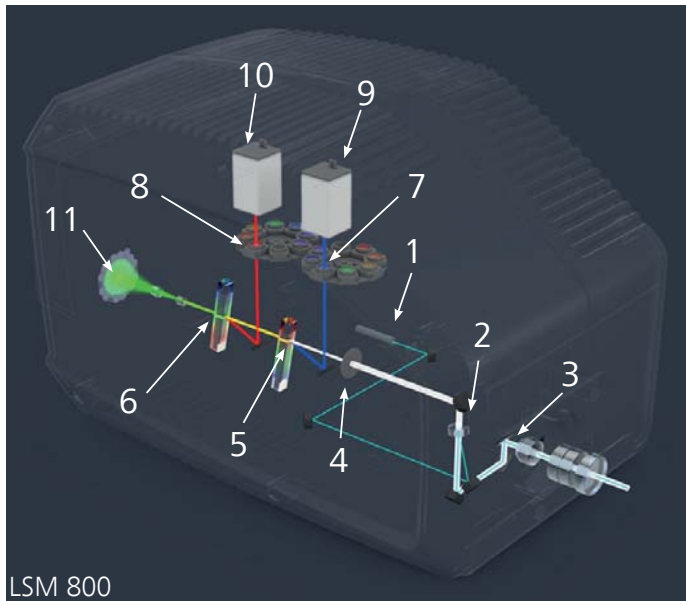
(+) : très rapide / (-) : composants mécaniques fixes

- Fast Frame

Toute l'image est scannée d'abord selon le track 1 puis selon le track 2 mais sans changements mécaniques possibles

(+) : très rapide / (-) : composants mécaniques fixes

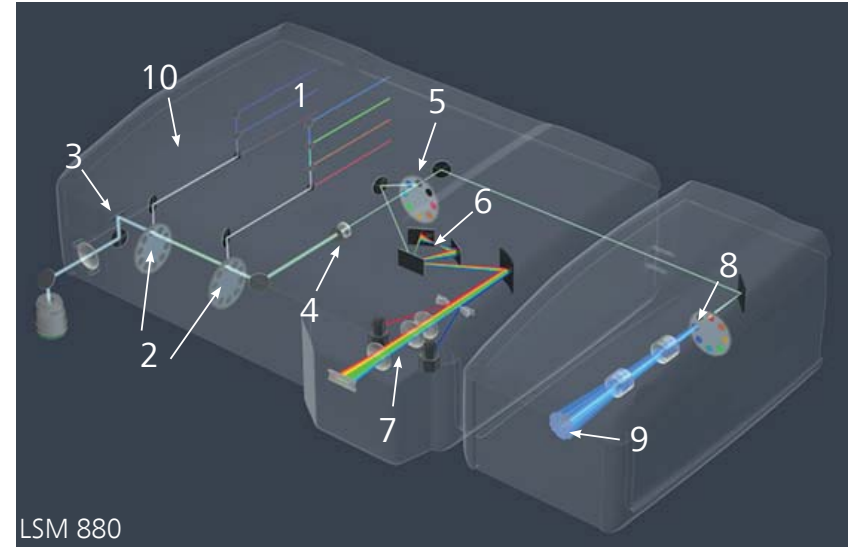
6.4 Mode line et fast frame



LSM 800

- (1) Lasers
- (2) Main Beam Splitter (fixe)
- (3) Scanners
- (4) Pinhole
- (5) Variable Secondary Dichroic "VSD" 1 (Passe Haut)
- (6) Variable Secondary Dichroic "VSD" 2 (Passe Bas)
- (7) Filtre emission pour PMT1 (9)
- (8) Filtre emission pour PMT3 (10)
- (11) PMT2 ou Airyscan :
Sélection / Gain

Compatible mode line / fast frame : Oui / Partiel / Non



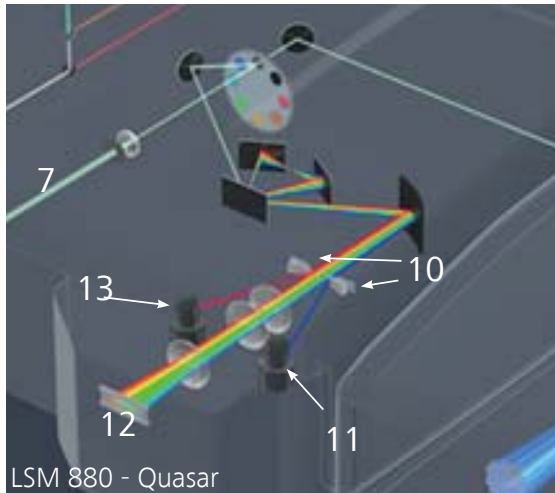
LSM 880

- (1) Lasers Visible & Invisible
- (2) 2x Main Beam Splitter
VIS & inVis
- (3) Scanners
- (4) Pinhole
- (5) Secondary Dichroic (option)
- (6) Recycling Loop
- (7) Système de détection Quasar 3 ou 34 canaux

Options :

- (8) Filtre émission pour Airyscan
- (9) AiryScan : Sélection / Gain

Compatible mode line / fast frame : Oui / Partiel / Non



- (7) Système de détection Quasar 3 ou 34 canaux :
- (10) Système de prismes déviateurs et masques
- (11) PMT1 : Multi-Alkali
- (12) PMT2 : 1x GaAsP
ou 32x GaAsP
- (13) PMT3 : Multi-Alkali

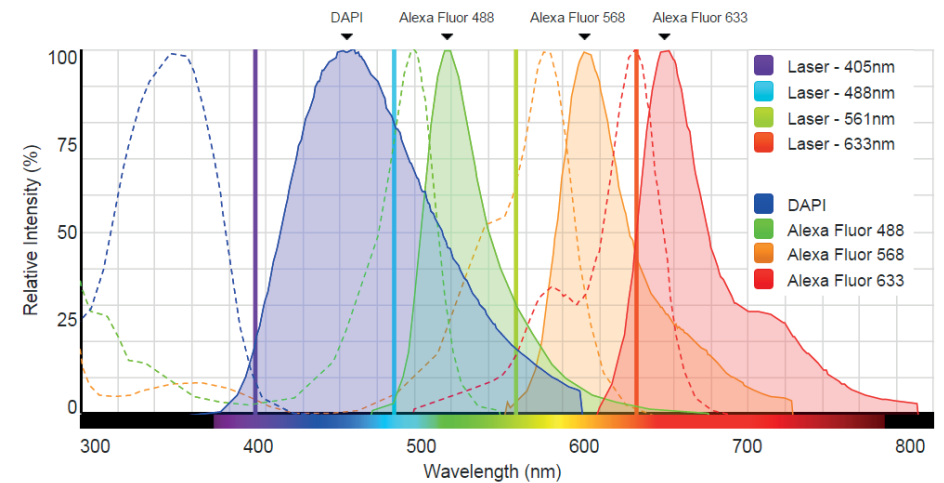
Pour tout détecteur :
Sélection / Gain

Compatible mode line / fast frame : Oui / Partiel / Non

B EXERCICE D'APPLICATION 2

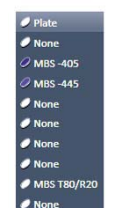
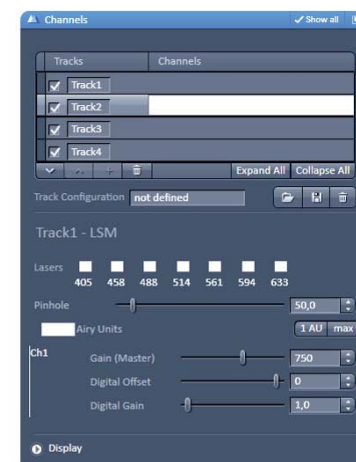
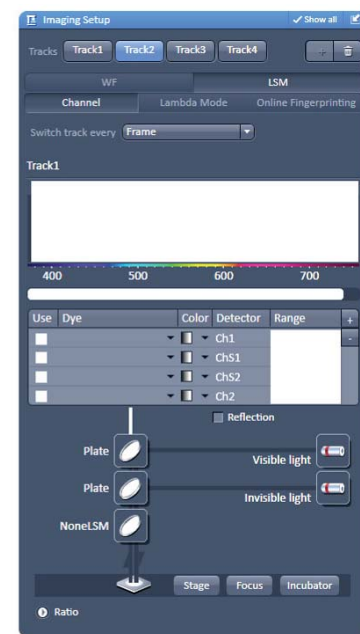
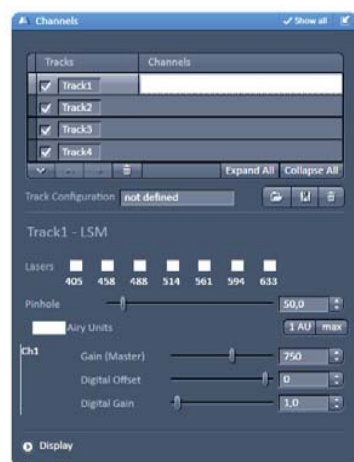
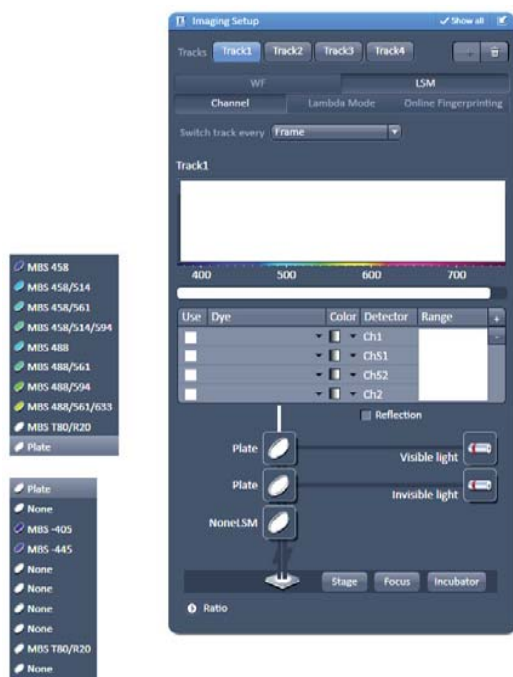
B.1 Stratégies d'acquisition multicoleurs

Réalisez une expérience séquentielle (1 couleur par passage) permettant l'acquisition de ces 4 fluorochromes en mode FRAME :



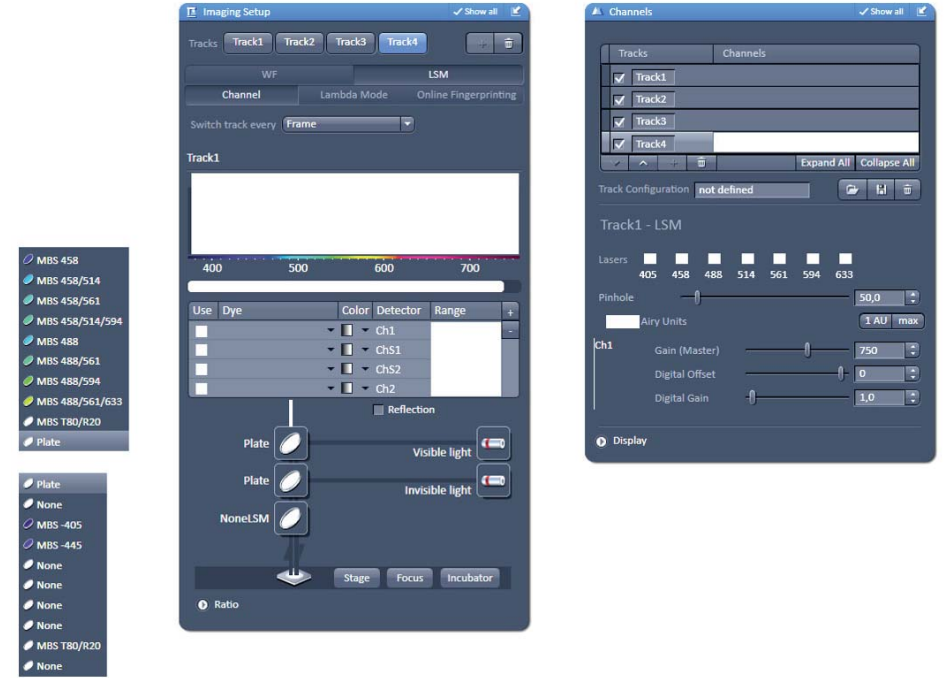
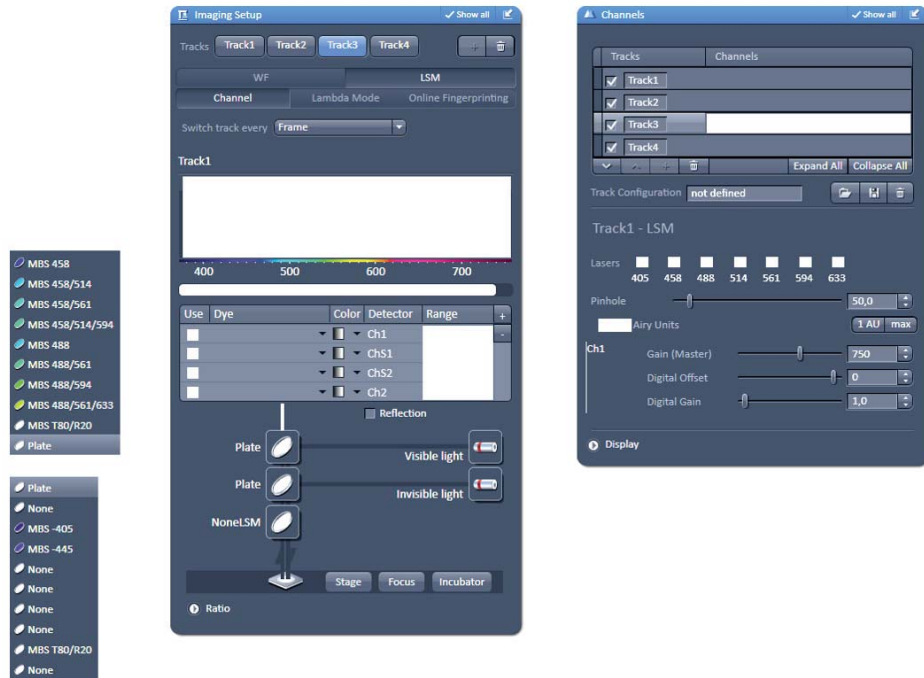
B.2 Stratégies d'acquisition multicolore : 4 couleurs mode séquentiel FRAME 1/4

B.3 Stratégies d'acquisition multicolore : 4 couleurs mode séquentiel FRAME 2/4



B.4 Stratégies d'acquisition multicolore : 4 couleurs mode séquentiel FRAME 3/4

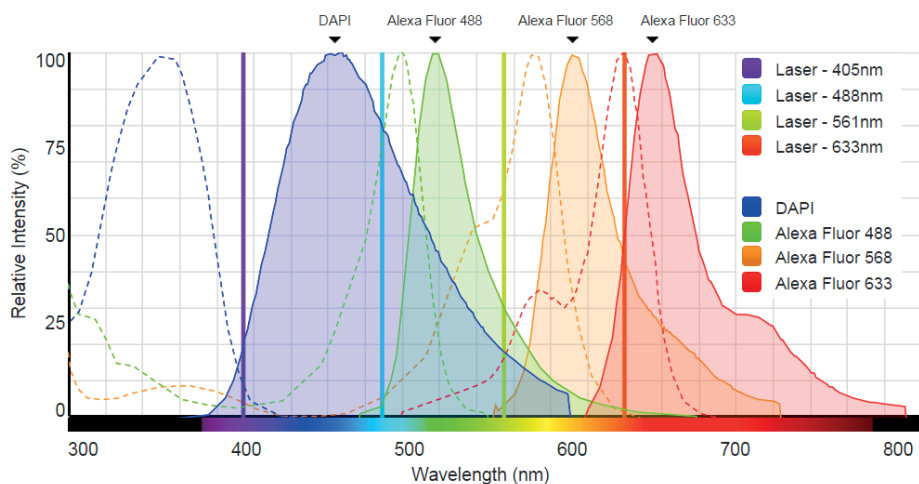
B.5 Stratégies d'acquisition multicolore : 4 couleurs mode séquentiel FRAME 4/4



C EXERCICE D'APPLICATION 3

C.1 Stratégies d'acquisition multicoloreurs

Réalisez une expérience séquentielle (1 couleur par passage) permettant l'acquisition de ces 4 fluorochromes en mode LINE :



C.2 Stratégies d'acquisition multicoloreurs : 4 couleurs mode séquentiel LINE 1/4

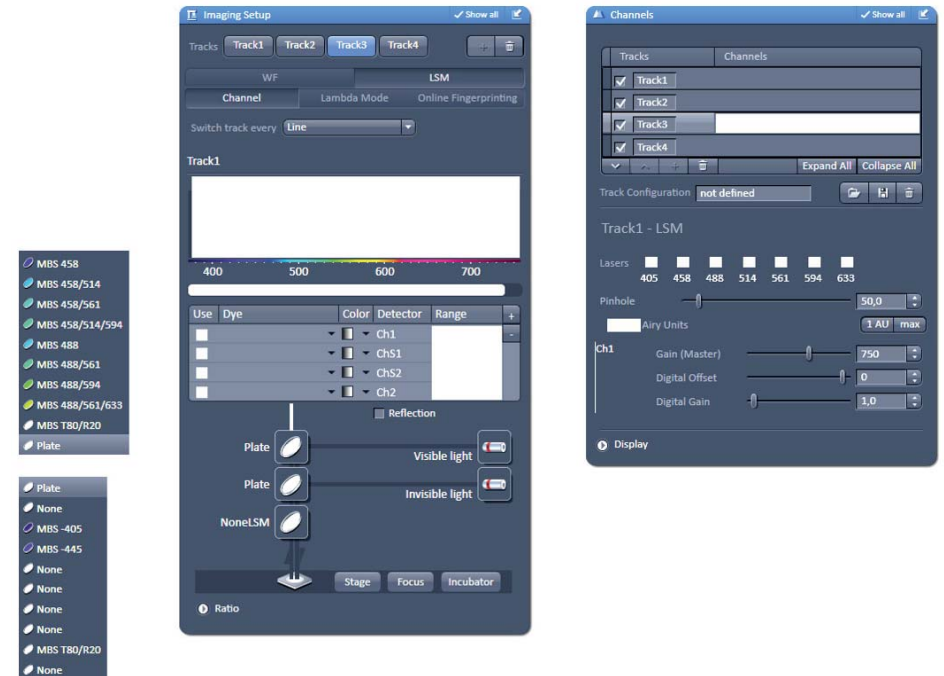
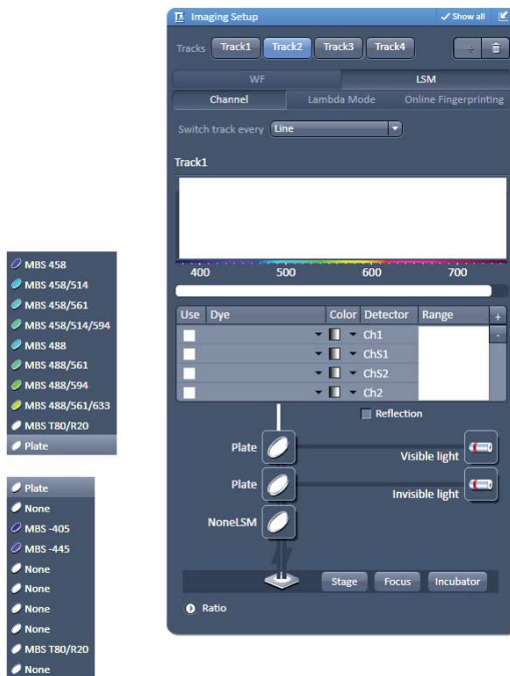
The Imaging Setup window shows the configuration for Track1. The 'Switch track every' is set to 'Line'. The 'Track1 - LSM' section includes a table for dye and detector settings:

| Use | Dye | Color | Detector | Range |
|--------------------------|-----|-------|----------|-------|
| <input type="checkbox"/> | | | Ch1 | |
| <input type="checkbox"/> | | | ChS1 | |
| <input type="checkbox"/> | | | ChS2 | |
| <input type="checkbox"/> | | | Ch2 | |

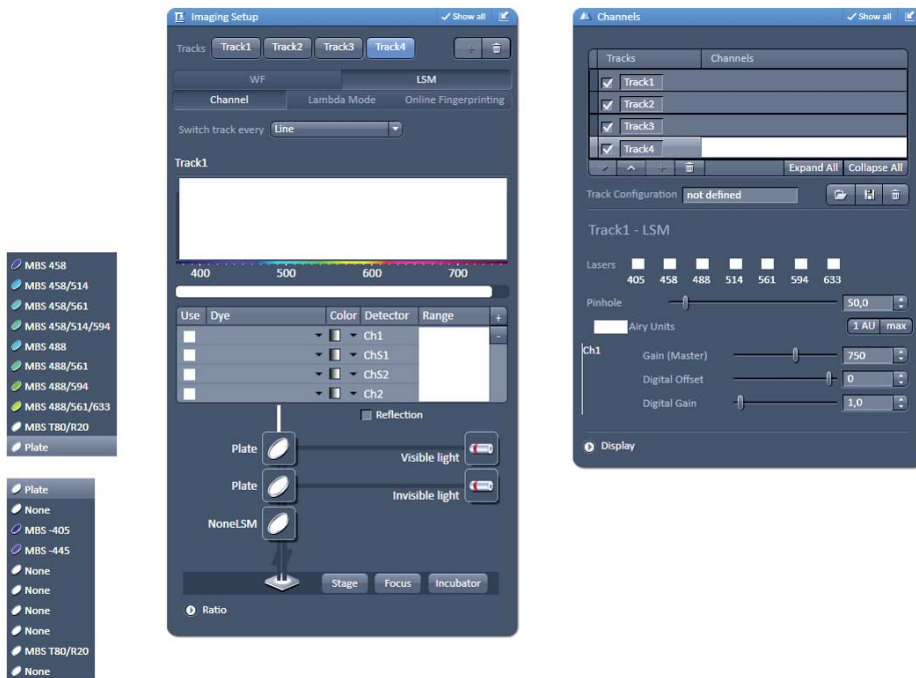
The Channels window shows the configuration for Track1 - LSM, including laser settings (405, 458, 488, 514, 561, 594, 633), pinhole (50.0), airy units (1 AU), and gain settings (Gain Master: 750, Digital Offset: 0, Digital Gain: 1.0).

C.3 Stratégies d'acquisition multicolores : 4 couleurs mode séquentiel LINE 2/4

C.4 Stratégies d'acquisition multicolores : 4 couleurs mode séquentiel LINE 3/4

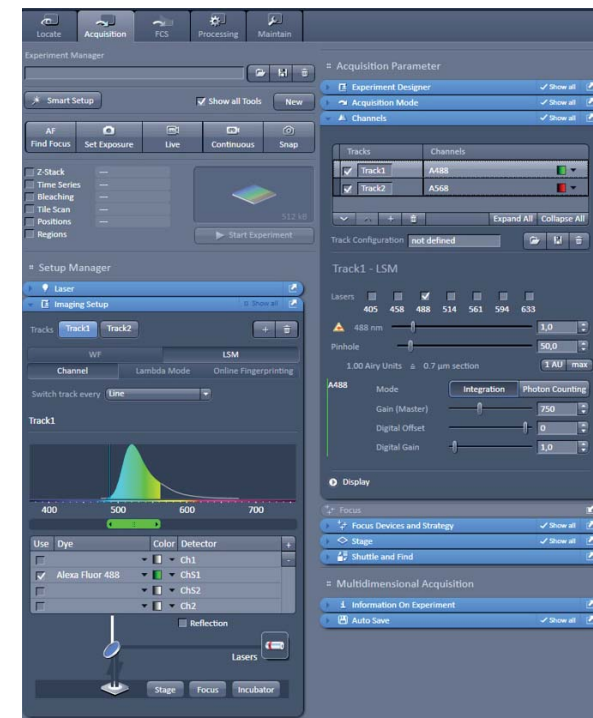


C.5 Stratégies d'acquisition multicolore : 4 couleurs mode séquentiel LINE 4/4



7 ACQUISITIONS DE PILES EN Z

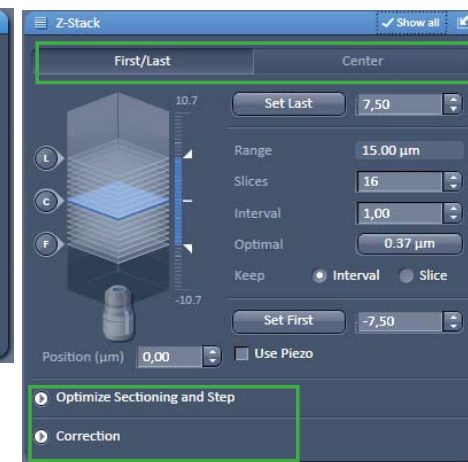
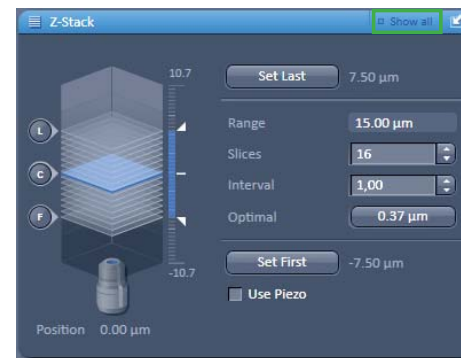
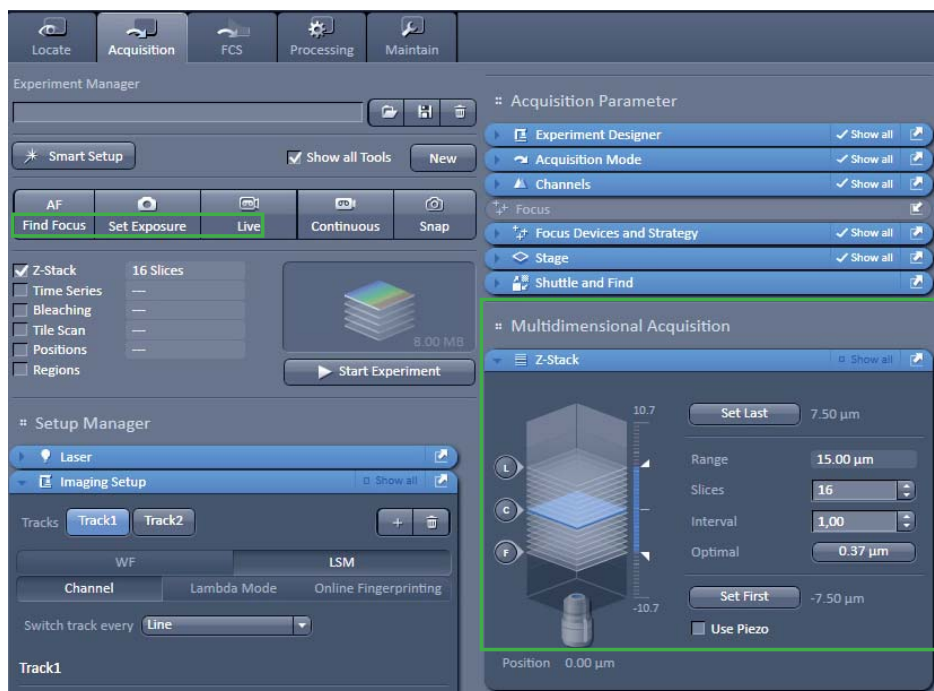
7.1 Exemple : Réalisation d'une pile Z : "Z stack"



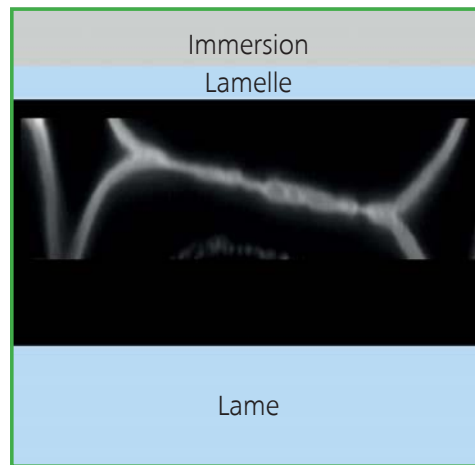
- 10 μm d'épaisseur
- Objectif Plan Apochromat 63x / 1,4
- 2 canaux :
Alexa 488 et
Alexa 561

7.2 Z 10µm, Alexa 488 et 561, Obj 63x /1.4

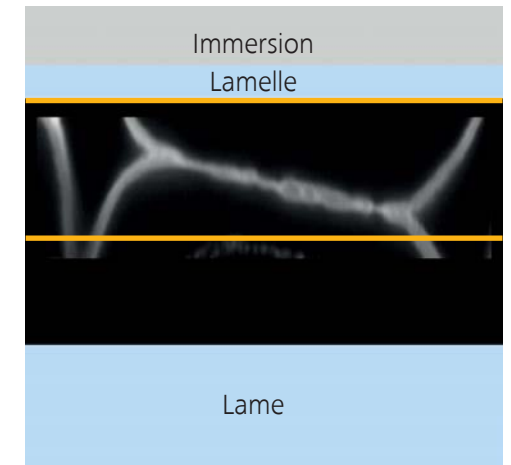
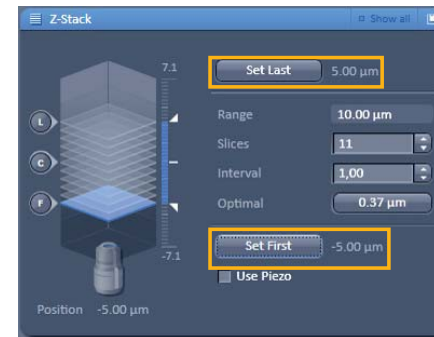
Interface du module Z stack :



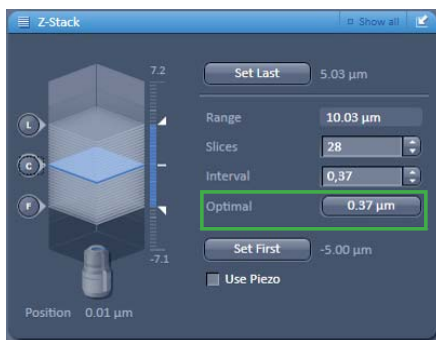
Définition d'une pile Z :



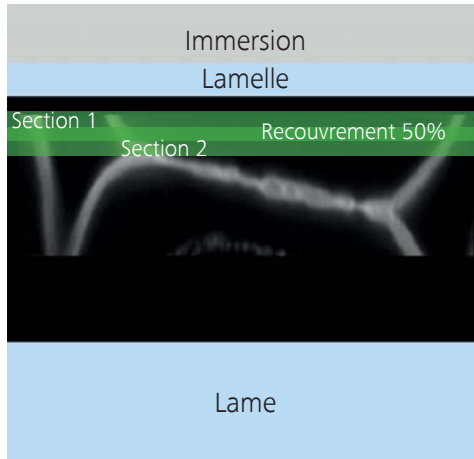
Définition d'une pile Z :



Définition d'une pile Z :

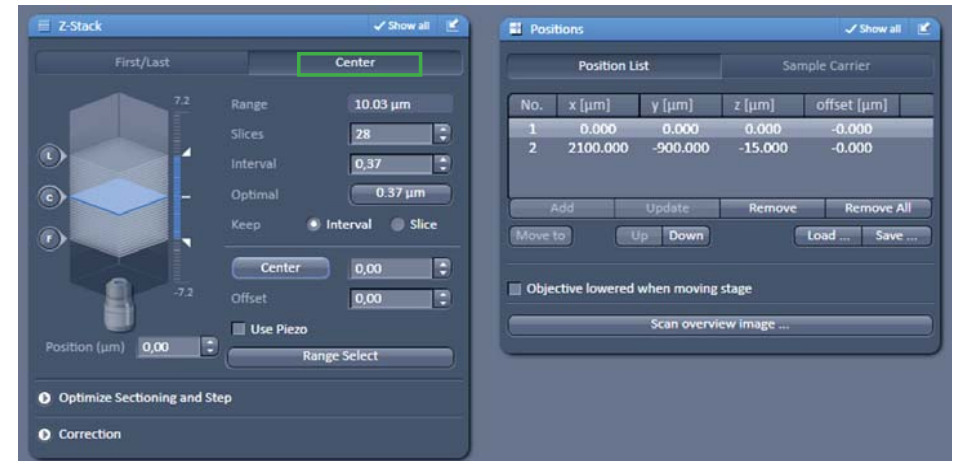


50% de recouvrement entre les
coupes optiques



7.3 Mode avancé : Center

Le mode **Center** permet de combiner des piles Z à différentes positions (xyz) de la lame.



7.4 Mode avancé : Optimise Step and sectioning

1 AU vert \neq 1 AU Rouge
 $0,7\mu\text{m} \neq 0,8\mu\text{m}$
 $0,1\mu\text{m} \text{ vs } 0,74\mu\text{m}$?

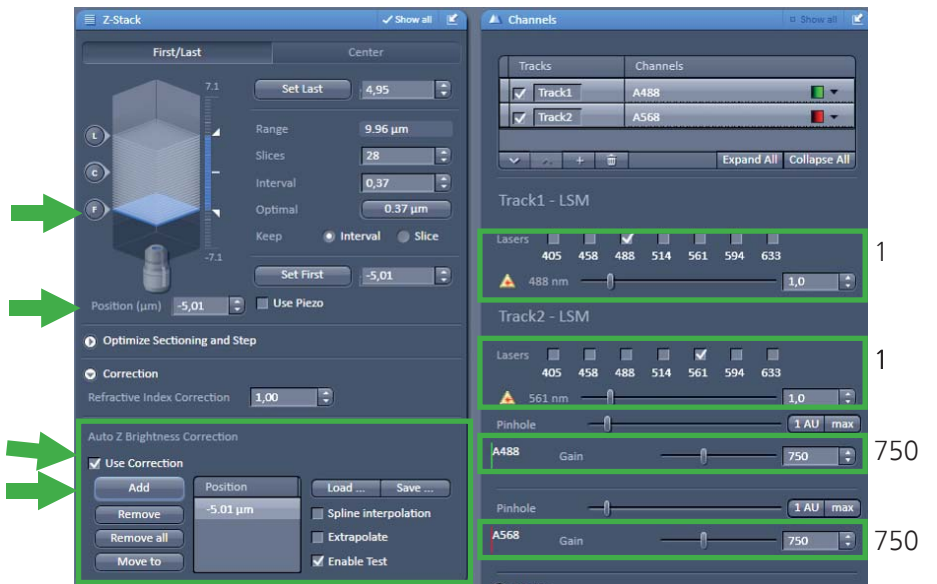


L'outil « Match pinhole » permet de changer la taille du pinhole entre les couleurs afin de réaliser des coupes optiques équivalentes pour chaque couleur.



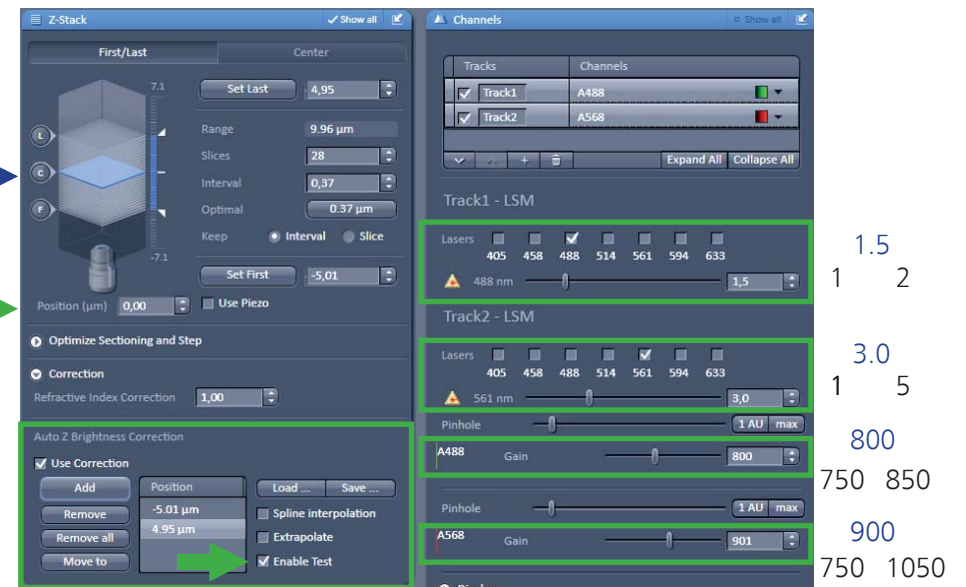
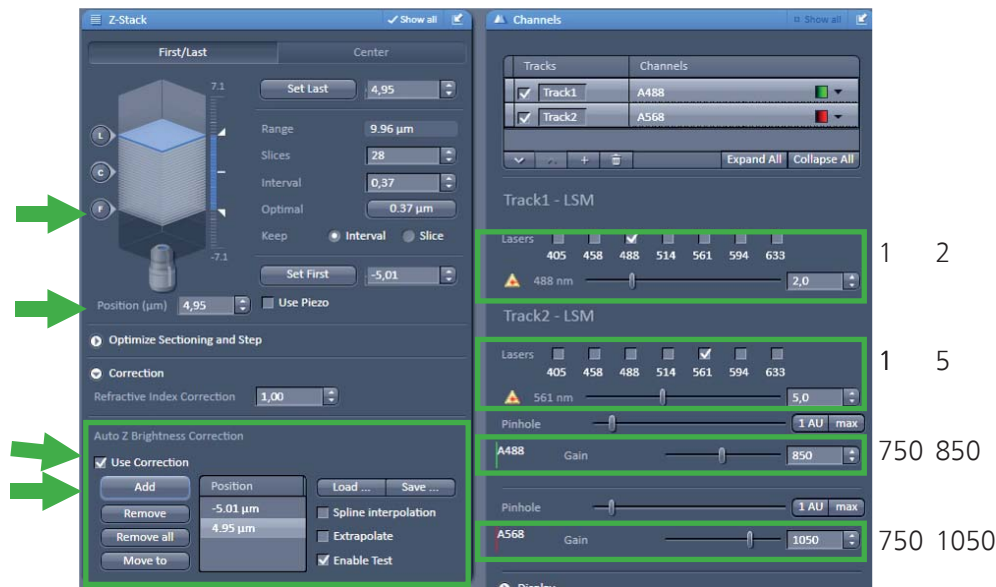
7.5 Mode avancé : Auto Z brightness correction

L'outil « Auto Z brightness correction » permet d'augmenter l'intensité laser et/ou le gain du/des détecteurs au fur et à mesure de la progression Z lors de l'acquisition d'une pile d'image Z.



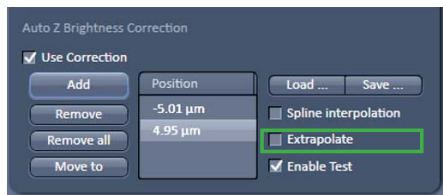
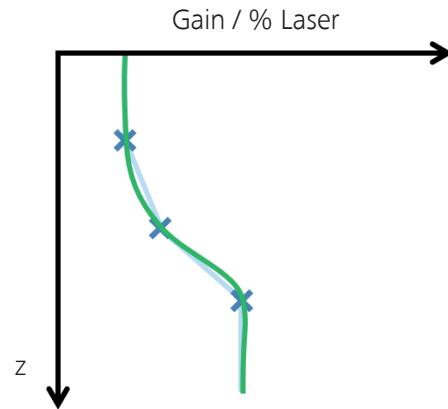
L'outil « Auto Z brightness correction » permet d'enregistrer des références à différents niveaux Z etc. au minimum aux extrémités de la pile.

L'option « Enable test » de l'outil « Auto Z brightness correction » permet d'appliquer en live la courbe de correction.

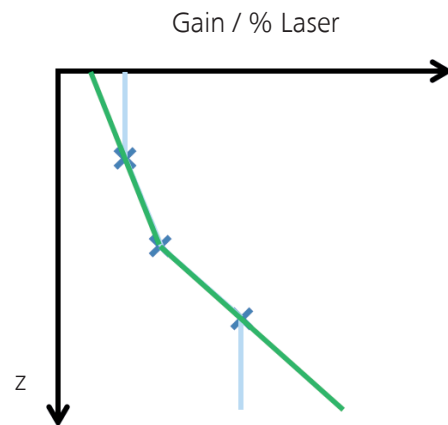




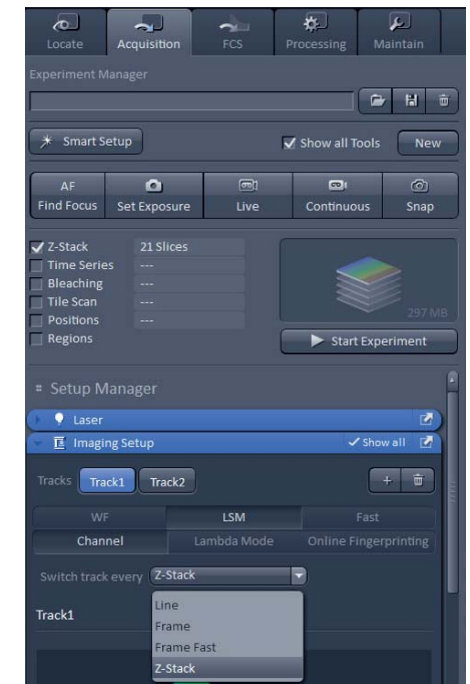
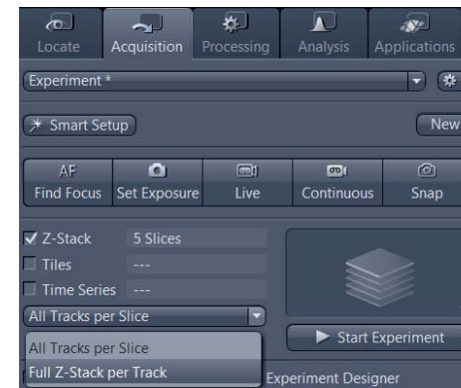
L'option « spline interpolation » permet de lisser les variations pour ne pas avoir de variation brutale du changement de l'intensité.



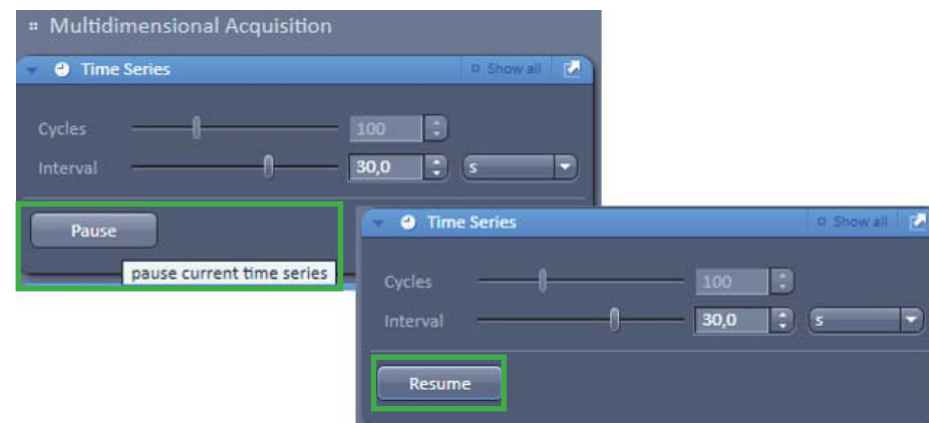
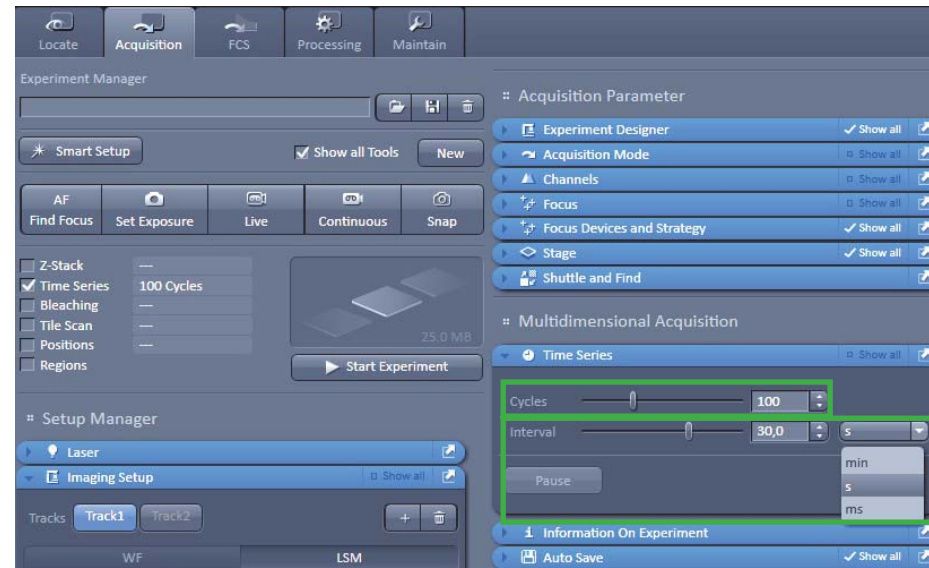
L'option « extrapolate » permet d'extrapoler la courbe de correction au-delà des références prédéfinies dans la liste.



7.6 Passage d'un track à l'autre à la fin de la pile Z



8 ACQUISITIONS DE SERIES TEMPORELLES





Carl Zeiss Microscopy GmbH
07745 Jena, Allemagne
microscopy@zeiss.com
www.zeiss.fr/microscopie/



Non destiné à une thérapie, un traitement ou un certificat de diagnostic médical. Tous les produits ne sont pas disponibles dans tous les pays. Contactez votre représentant ZEISS local pour plus d'informations.
FR_41_011_126 | CZ 11-2017 | La conception, la livraison et les progrès techniques peuvent faire l'objet de modifications sans préavis. | © Carl Zeiss Microscopy GmbH