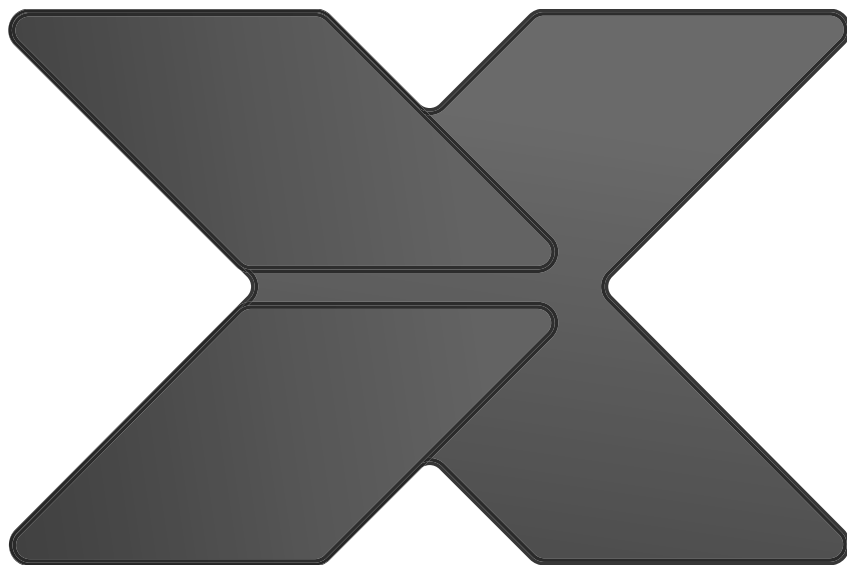


From Eye to Insight



LEICA LAS X

Imaging and Analysis Software for Widefield Microscopes

Imaging und Analyse Software für Weitfeldmikroskope

Logiciel d'imagerie microscopique et d'analyse pour microscopes à champ large

Instructions for use

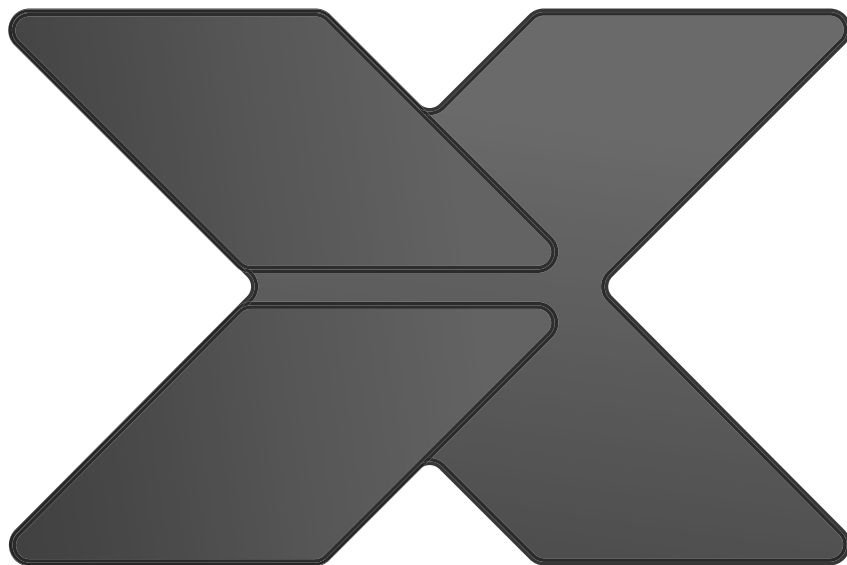
Gebrauchsanweisung

Mode d'emploi pour

Leica Microsystems CMS GmbH. Instructions for use, 11934003, Revision 1.2, 2017-01-05



From Eye to Insight



LEICA LAS X

Imaging and Analysis Software for Widefield Microscopes
Instructions for use

Leica Microsystems CMS GmbH. Instructions for use, 11934003, Revision 1.2, 2017-01-05



COPYRIGHTS

The instructions contained in the following document reflect state-of-the-art technology. We have compiled the texts and illustrations as accurately as possible. Nevertheless, no liability of any kind may be assumed for the accuracy of this manual's contents. If you have any comments on these operating instructions or on any of our other documentation we would be pleased to receive them. The information in this manual is subject to modification at any time and without notification.

All rights to this documentation are held by Leica Microsystems CMS GmbH. Adaptation, translation and reproduction of text or illustrations (in whole or in part) by print, photocopy, microfilm or other method (including electronic systems) is not allowed without express written permission from Leica Microsystems CMS GmbH.

Programs such as LAS and LAS X are protected by copyright laws. All rights reserved. Reproduction, adaptation or translation of these programs is prohibited without prior written permission from Leica Microsystems CMS GmbH.

The term "Windows" may be used in the following text without further identification. It is a registered trademark of the Microsoft Corporation. Otherwise, no inference with regard to the free usability of product names may be drawn from the use of those names. All other brand names and product names in this document are brands, service marks, trademarks or registered trademarks of the respective manufacturers.

Rev 1.2, published 2017-01-05 by:

Leica Microsystems CMS GmbH
Ernst-Leitz-Straße 17-37
D-35578 Wetzlar (Germany)
www.leica-microsystems.com

Responsible for contents:
Marketing CMS

CONTENTS

1. Important Notes about this Manual.....	4	6. First Experiment.....	27
2. Intended Use.....	6	6.1 Configuration.....	27
3. The Leica LAS X.....	7	6.2 Switch on the system	27
3.1 Description	7	and start the software	27
3.2 Dongle	7	6.3 Selecting and focusing specimen section	28
4. Starting up Leica LAS X.....	8	6.4 Camera resolution	30
4.1 Open Leica LAS X	8	6.5 Acquisition mode.....	31
4.2 Calling up the online help.....	8	6.5.1 EL6000 variant	31
4.3 Full-text search	9	6.6 Image optimization	34
with logically connected search terms ..	9	6.7 Setting color (LUT).....	35
4.4 General structure of the user interface	10	6.8 Settings for additional fluorochromes ..	36
5. Parameters for Multidimensional Image Acquisition.....	12	6.9 Capturing 3D image stack.....	37
5.1 Light Path Settings	13	7. Index.....	40
5.2 Image menu.....	17		
5.2.1 Camera	17		
5.2.2 EM CCD cameras.....	19		
5.3 z-menu	19		
5.3.1 Setting the image stack with Wide Focus.....	20		
5.3.2 Setting the image stack with Fine Focus*	20		
5.4 t-menu	20		
5.5 Mark and Find	23		
5.6 Tile Scan.....	24		
5.6.1 Camera adjustment for Tile Scan.....	24		
5.6.2 Tile Scan Acquisition	25		

1. Important Notes about this manual

1. IMPORTANT NOTES ABOUT THIS MANUAL



Attention!

These operating instructions are an essential component of the Leica LAS X and must be read carefully before the system is put into operation or used. Read and comply also with all operating instructions accompanying the individual microscope, components and peripheral devices. The emphasis is on the safety instructions, which must be strictly observed during all work with the Leica LAS X .

Keep these instructions in a convenient, safe place.

These operating instructions present the first steps for activating the system and describe the basic functions of the Leica Application Suite X (LAS X) software.

For further descriptions of the software functions, please refer to the online help of the LAS X, which presents the most up-to-date explanations of the corresponding software functions.

Please read Chapter 4 LAS X to familiarize yourself with the structure and use of the online help.

Text symbols, pictograms and their meanings:

(1.2)

Numbers in parentheses, such as “(1.2)”, correspond to illustrations (in the example, Figure 1, Item 2).

p.20

Numbers with an arrow, e.g. → p.20, refer to a specific page of the manual.



Attention!

Special safety instructions within this manual are indicated with the triangle symbol shown here, and have a gray background.



Attention! The microscope and accessories can be damaged when operated incorrectly.



Explanatory note.



Item not contained in all configurations.

2. Intended Use

2. INTENDED USE

Application

This software has been developed for observing and documenting magnified depictions of samples acquired using Leica microscopes in a variety of routine work and research applications. The product is not considered a medical product or in-vitro diagnostic product.

Do not use this product for any use other than the intended application.



Attention!

The manufacturer assumes no liability for damage caused by, or any risks arising from, using the software for purposes other than those for which they are intended or not using them within the specifications of Leica Microsystems CMS GmbH.

Quality directives

It is expected that a laboratory that uses LAS X software will work in accordance with the directives encompassing the following (and other) areas: User training, assay development and validation and external audits of laboratory test performance.

Application methods must be reviewed before implementation and documented. Standard operating procedures (SOPs) for analysis methods should be introduced.

3. THE LEICA LAS X

3.1 Description

The Leica LAS X (Leica Application Suite X) offers solutions for different application levels. Each solution is upgradable and allows a wide range of possible combinations with hardware and software modules from Leica Microsystems CMS GmbH.

The complete system unifies the latest technology for image acquisition, perfectly coordinated – for fast results in highest quality.

**Note:**

The manufacturer assumes no responsibility or liability for any use outside of the intended use or use outside of the specifications from Leica Microsystems CMS GmbH or any risks resulting from such use. In such cases, the EU Declaration of Conformity shall be invalid.

**Attention!**

Be sure to follow the included operating instructions for the Leica microscope.

**Attention!**

Do not install any other hardware or software on the workstation, as otherwise serious damage to the system or loss of data can result. If such work is required, contact the Technical Service of Leica Microsystems CMS GmbH.

**Attention!**

To prevent loss of data, make regular backups of your data and images on a suitable data carrier.

Also, be sure to back up your data before any service or repair work is performed! Leica Microsystems CMS GmbH shall not be liable for any loss of data.

3.2 Dongle

To enable the function of the software and the system, a USB dongle that unlocks the software is included with the system. Remove the USB dongle only if you want to prevent anyone from starting the software.

4. Starting up Leica LAS X

4. STARTING UP LEICA LAS X

4.1 Open Leica LAS X



Attention!

Do not start the software until the microscope and all other components have been switched on!

- Click the LAS X icon on the desktop to start the software:



Fig. 1: LAS X icon on the desktop

Now the Leica LAS X system is ready for operation.

4.2 Calling up the online help

The online help can be called up in three ways:

- In the respective context (context-sensitive)
- Via the Help menu
- With the key combination CTRL + F1

In the respective context (context-sensitive)

Click on the small question mark located in the top right corner of every dialog window. Online help opens directly to the description for the corresponding function.

Via the Help menu

Click on the Help menu on the menu bar. The menu drops down and reveals, among others, the following search-related options:

Contents This dialog field contains the table of contents in form of a directory tree that can be expanded or collapsed.

Double-click an entry of the table of contents to display the corresponding information.

Index Enter the term to be located. The online help displays the keyword that is the closest match to the specified term.

Select a keyword. View the corresponding content pages by double-clicking the key word or selecting it and then clicking the Display button.

Search Enter the term or expression to be located and click on LIST TOPICS. A hierarchically structured list of topics is displayed.

About Opens the **User Configuration** dialog box, where you can select the language and other items, in which the online help is shown.

4.3 Full-text search with logically connected search terms

Click on the triangle to the right of the input field on the Search tab to view the available logical operators.

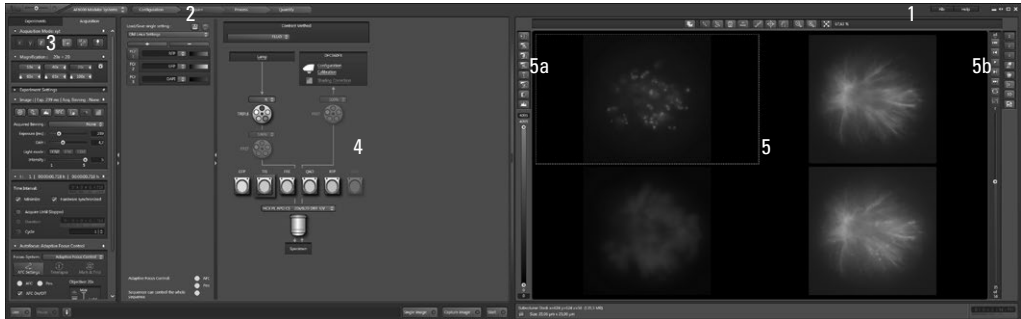
- Select the desired operator.
- Enter the second search term you would like to associate with the first search term behind the operator:

Examples	Result
Pinhole AND sections	This phrase finds help topics containing both the word "pinhole" and the word "sections".
Pinhole OR sections	This phrase finds help topics containing either the word "pinhole" or the word "sections" or both.
Pinhole NEAR sections	This phrase finds help topics containing the word "pinhole" and the word "sections" if they are located within a specific search radius. This method also looks for words that are similar in spelling to the words specified in the phrase.
Pinhole NOT sections	This phrase finds help topics containing the word "pinhole" and not containing the word "sections".

4. Starting up Leica LAS X

4.4 General structure of the user interface

The user interface of the LAS X is divided in five areas:



(1) Menu row and the area for selection of the **Operating Mode/Wizard**:

The various menus for calling up functions are available here.

- File
- Help

and the **Wizard** with:

- Main
- Live Data Mode
- FRET SE
- HCS A (MatrixScreener) for High Content Screening

(2) Arrow symbols: Operating step with the individual functions. These operating steps mirror the typical sequence of image acquisition and subsequent image processing. The functions are arranged appropriately in these operating steps.

- Configuration
- Acquire
- Process
- Quantify

(3) Tab area: Different tabs belong to every operating step (arrow symbol) in which the settings for the experiment can be made or image data can be selected.

Acquire Experiments: Directory tree of the files stored in memory (RAM)

Setup: Hardware settings for the current experiment

Acquisition: Parameter settings for the image acquisition

Process Experiments: Directory tree of the files stored in memory (RAM)

Tools: Directory tree with all the functions available in the respective operating step

Quantify Experiments: Directory tree of the files stored in memory (RAM)

Tools: Tab with the functions available in this operating step

Graphs: Graphical display of values measured in regions of interest (ROI)

Statistics: Display of statistical values that were determined in the drawn in regions of interest (ROI)

(4) Working area: This area under the Acquire operating step provides the Light Path Settings dialog window in which the control elements for setting the recording parameters are located. For image editing, previews are created and displayed in this area.

(5) Viewer window: Displays the recorded images. In the standard setting, the Viewer window consists of the image window in the center and the buttons for image viewing and selection of regions of interest (5a) and channel display (5b).

5. Parameters for Multidimensional Image Acquisition

5. PARAMETERS FOR MULTIDIMENSIONAL IMAGE ACQUISITION

This chapter describes the software menus used for defining the acquisition parameters of the Leica LAS X. The following **acquisition mode** is available when you click the **Acquire** arrow and **Acquisition** in the tab area:

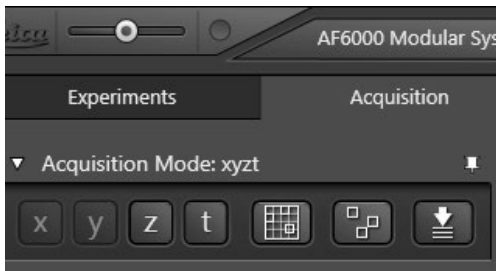


Fig. 2: Acquisition Mode

Buttons **x** and **y** are always active. Both buttons refer to the **Image** menu, which is used for setting camera parameters.



Button **z** activates the **z-menu**, which defines three-dimensional image stacks.



Button **t** activates the **t-menu**, which defines the time series.



The following two buttons, **Tile Scan** and **Mark and Find** refer to the motorized specimen stage:



This button activates the **Tile Scan menu**, which is required for generating composite overview images:



This button activates the **Mark and Find menu**, which is required for defining various stage positions for multiposition experiments:





Note:

A black button means that the function is disabled and is therefore not used for that experiment. The button can be enabled by clicking it with the left mouse button. A red button means that the function is enabled.

5.1 Light Path Settings

The Light Path Settings menu is displayed on the left side of the Leica LAS X user interface. The light channels for the various experiments can be defined in this menu. This menu is important and is therefore always displayed:

Fig. 3: Light Path Settings



5. Parameters for Multidimensional Image Acquisition



Note:

When defining an experiment always start with setting the image channels in the **Light Path Settings** menu.

To define a channel the associated button must be enabled first. Start with channel 1:



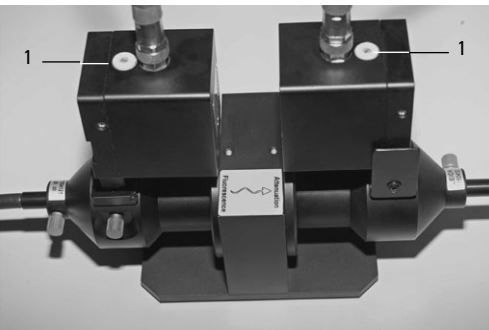
Select the LUT (look-up table) wanted for this channel from the color palette, which can be opened with the following button:



The desired contrast method is selected in the **Contrast Method** window, and the filter cube to be used for this channel is selected in the **Filter Cube** field.

Fig. 4 External adapter coupling with two short filter sliders

1 Cable connection number



Using Leica external filter wheels* :

The Leica LAS X can control up to four external filter wheels, which are operated simultaneously. (see fig 4).

The filter positions are defined in the **Light Path Settings** menu.

If the system is equipped with the external **FFIM**, the transmission is always controlled via the intensity slider in the **Image** menu (in five steps). The internal filter wheel of the microscope is set to 100% transmission in this case.



Fig. 5: Adjusting transmission for FFIM

Steps for FFIM:

100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%

* Requires high-speed control box

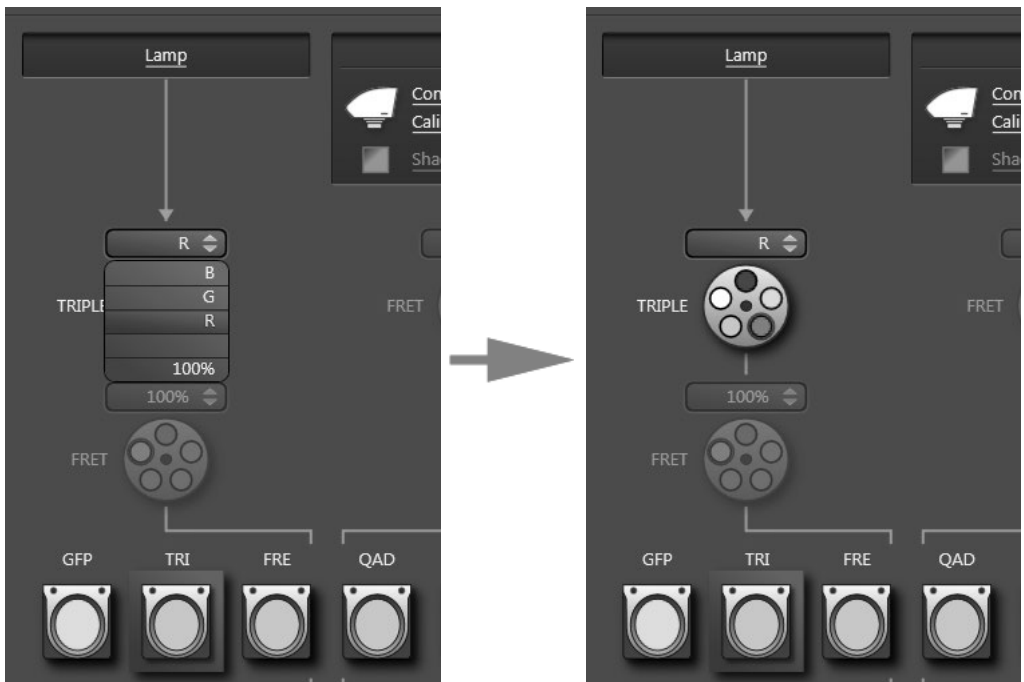
5. Parameters for Multidimensional Image Acquisition

Selecting the filter cube in the LAS X Light Path Settings menu activates the corresponding filter wheel.

Attention: The suitable filter wheel must be positioned in the light path before!

Now select the appropriate emission or excitation filter in the **Emission Filter** field or **Excitation Filter** field. The filter wheels move to a blank position (100% transmission), if no filter wheel is activated.

Fig. 6: Select excitation filter



5. Parameters for Multidimensional Image Acquisition

The external filter wheels can be operated in **high speed mode**. In this case the option **Use sequencer board** is marked (Fig 15). If the whole experiment is controlled by the high speed board, the square in front of **Sequencer can control the whole sequence** turns from red to green.

Another channel can be created by clicking the "+" button. Channels can be deleted with the "-" button. If you wish to change the **sequence of channels**, the position of the channel can be changed by clicking the relevant **FCr button** with the right mouse button (in this example FCr 1).



Note:

You can define a maximum of eight channels.

The channel can be saved by clicking the **FCr button** with the right mouse button. Saved channels can be called in the **list field** (to the right of the **FCr button**).

The combination of all channels including their **acquisition parameters** can be saved in the **Load/Save Settings** field and also opened from there.

Fig. 7: Example for a three fluorescence channel experiment



5.2 Image menu

The **Image** menu is used to set the camera parameters:



Fig. 8: Image menu

The most important parameters are **Binning** and **Exposure**.

Binning Camera pixels can be read out together to improve the signal/noise ratio. For example, in **Binning 2x2** 4 pixels (2 pixels in x-direction and 2 pixels in y-direction) are combined. This reduces the image resolution by a factor of four. **Binning 2** or **None** are typical selections.

Exposure The **Exposure** slide is used to set the integration time separately for each image channel. To be able to carry out image acquisition in fast realtime mode (**high speed**), the integration time and also **Gain** and **Intensity** should be set to the same value for all channels.

Gain Allows the electronic camera gain to be set.

Intensity Allows the light intensity in the illumination beam path to be set. The internal filter wheel of the Leica microscope is used for light reduction.



Press the  button to activate a **live histogram**. The live histogram is used with objectives with a compensation ring as an aid for correcting image errors.

5.2.1 Camera

If the **high-speed control box** is used in the **Leica LAS X**, the camera can be operated in **high speed mode** (trigger-controlled with the aid of the sequencer).

Prerequisite: The camera must be supported by the high-speed control box!

However, note that for all cameras used in high speed mode, gain and binning need to be the same for all channels. The intensity setting may be different when using the Leica external filter wheel FFIM in high speed mode. The option **Use sequencer board** is marked (Fig 9).

5. Parameters for Multidimensional Image Acquisition

If the whole experiment is controlled by the high speed board, the square in front of **Sequencer can control the whole sequence** in the **Light Path Settings** menu turns from red to green.

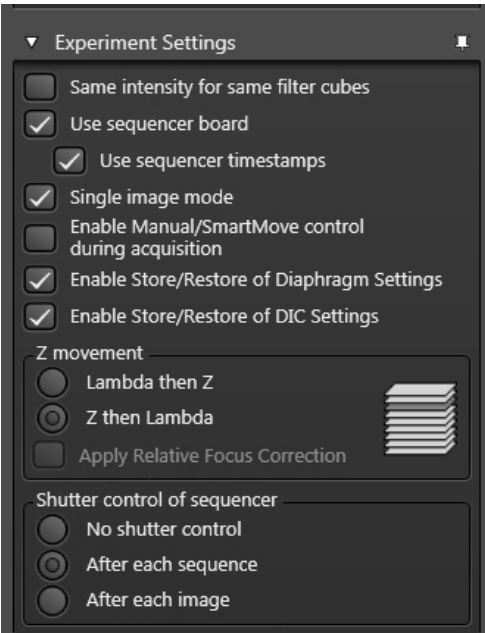


Fig. 9: Experiment Settings

The **Experiment Settings** dialog box is opened with the **Acquire** arrow icon in the **Acquisition** tab.

This is relevant when working with multiple fluorochromes (FCrs). The **Same Exposure for all probes** option is available to prevent accidental use of different exposure times. A change of the exposure time for one fluorochrome is automatically applied to all fluorochromes:



Fig. 10: Same Exposure for all probes

Furthermore **Single image mode** can be activated in the **Experiment Settings** dialog box. In this case the **Single image** button at the bottom of the working area appears. It is used to capture one image of the current channel, whereas the **Capture Image** button takes one image of each defined channel.

For shutter operation mark the appropriate option at **Shutter control of sequencer***.

! **Attention!**

Please follow the included operating instructions for the individual components.

* Requires high-speed control box

5.2.2 EM CCD cameras

To adjust the EM CCD camera use the **Gain** and/or the **EM Gain** slider in the **Image** menu.

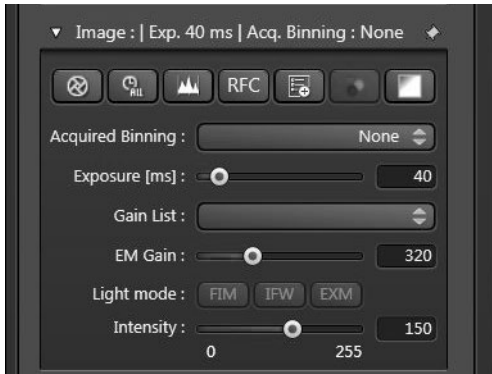


Fig. 11: Image menu for EM CCD cameras

When using the high speed mode (= trigger-controlled with the aid of the sequencer), note that for these cameras gain, EM gain, binning and intensity must be the same for all images of the sequence. Intensity can be different if the Leica external filter wheel FFIM is used for attenuation.

5.3 z-menu



The **z-menu** is enabled with the **Z** button and is used for **defining three-dimensional image stacks**:

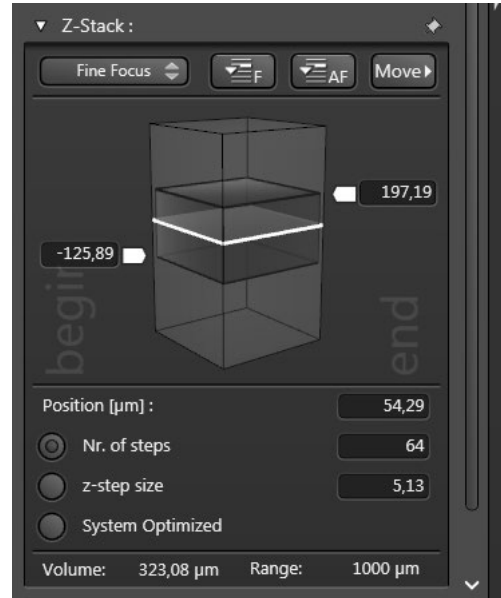


Fig. 12: Definition of the z-Stack

The **z-Position** can be changed with the microscope z-drive.

For a faster and more precise fine focus the Leica LAS X uses either the **Super Z Galvo Focus*** (movement of the specimen in the z-direction independently of the objective) or the **Piezo Focus*** (movement of the objective in the z-direction).

Wide Focus (microscope z-drive) or, if available, **Fine Focus** (SuperZ Galvo Focus or Piezo Focus) can be selected in the dropdown window of the z-menu.

* Requires high-speed control box

5. Parameters for Multidimensional Image Acquisition

5.3.1 Setting the image stack with Wide Focus

z-Position is moved by the **z-drive** on the microscope or the **z-drive** of the **SmartMove**. As soon as the lowest image plane appears in the live camera image this **bottom z-plane** can be marked with the **Begin** button. If the bottom z-plane is saved, the **Begin** button is shown in red. The **top z-plane** of the image stack is marked with the **End** button. The **Begin** and **End** buttons can be used for both the top z-plane and the bottom z-plane. The **Focus** button can be used to save a **middle image plane**.



Note:

The image planes are saved as soon as the corresponding button (**Begin**, **End** and **Focus**) are shown in red. The **current z-plane** is shown by the ocher-colored area in the z-menu (see fig.12).

The **overall height of the image stack** is displayed as the **z-Volume** in the bottom half of the z-menu. The preset **System Optimized** button suggests the best **Step in z** in accordance with the scanning theorem depending on the objective in use. The user can also overwrite the **step** or **number of z-planes** by enabling the **no. of steps** button instead of **System Optimized**.

5.3.2 Setting the image stack with Fine Focus*

The image stack is set with **Fine Focus** in the same way as with **Wide Focus** (see chapter 6.3.1). Instead of the microscope z-drive and the SmartMove the **Fine Focus** is adjusted with the **mouse pointer** only. The left mouse button is used to drag the ocher-colored area in the z-menu to the desired position.

The **Go to** button can be used to approach the previously defined focus planes (bottom, top and center).

5.4 t-menu



The **t-menu** is enabled with the button and is used for **defining time series**:

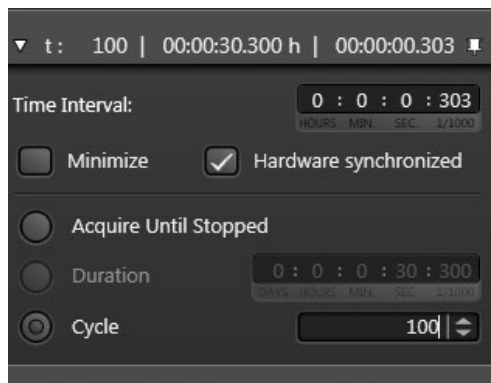


Fig. 13: t-menu

A fixed number of time points can be defined with the **Cycle** button. If **Duration** is selected, the total duration of the experiment can be specified. If **Acquire until Stopped** is selected there is no specific end time for the experiment. The user can stop the experiment at any time.

* optional accessories. Requires either Super Z Galvo or Piezo Focus

5. Parameters for Multidimensional Image Acquisition

The time difference between the time points is defined in the **Time Interval** input field. If the **Minimize** button is activated, the minimum time that is required for acquisition of a time point is selected as the time interval.

If the **High Speed*** button is enabled, the complete time series is run in realtime with the aid of the high-speed control box (fastest possible mode without pauses between the images). The following requirements must be specified:

- All image channels must have the same values for **Gain** and **Intensity**. Intensity can be different if the Leica external filter wheel FFIM is used for attenuation.
- All image channels must use the same filter cube or the same contrast method.
- **Fine Focus**** is enabled in the **z-menu** (if a **z-image stack** is to be acquired).
- **Minimize** must be enabled in the **t-menu**.

If these requirements are met, the **High Speed** field can be enabled. In the **Light Path Settings** menu a green field shows that the **high-speed control box** controls the complete experiment:

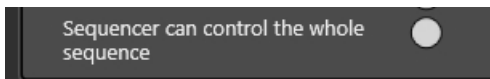


Fig. 14: Display field
"Sequencer can control the whole experiment"

After acquisition of every image the associated image data must be transferred from the camera to the PC memory. This may take 1 to 150 ms (depending on the camera type, binning, resolution, ROI1 size and ROI1 position).

The high-speed control box uses this transfer time to move all actuators to the position required for the next image. In most acquisition situations the camera transfer time is sufficient for reaching the new position(s), in all other cases the next image acquisition is delayed accordingly.

* only available on systems equipped with a high-speed control box.

** optional accessories. Requires either Super Z Galvo or Piezo Focus

5. Parameters for Multidimensional Image Acquisition

The following components can be controlled by the high-speed control box (the typically required setting times are shown in parentheses):

- Leica external filter wheels
(switching time for adjacent filter positions 27 ms)
- SuperZ FineFocus
typical stepsize $1\text{ }\mu\text{m} = 40\text{ ms}$
- Piezo FineFocus
(typical stepsize $1\text{ }\mu\text{m} = 3\text{ ms}$)
- Leica AM TIRF MC
- Leica EL6000 high speed shutter (6 ms)

To enable high speed acquisition, only components that can be controlled by the high-speed control box may be changed in a sequence. Therefore, the following components must remain constant in sequence-controlled series:

- Objective
- Camera type/port
- Post-magnification (MagChanger)
- Contrast method
- Fluorescence cube
- Light intensity
(except if FFIM with an external filter wheel is used)
- Binning and camera gain
- Internal microscope shutter and filter wheels
- Stage position

If different values are defined within the experiment for one of these components, the system automatically switches to the **Normal** mode and thus allows acquisition of any desired sequences.

The green display field (**Light Path Settings** menu) indicates that the defined experiment can be completely controlled by the high speed board (Fig. 14).



Notes:

If the field has a red background, you can click the left mouse button on the red display field to query which settings must be changed to set up an experiment that can be completely controlled by the high-speed control box.

In complex experiments the system automatically divides it into partial series that can be controlled by the high-speed control box.

Example: If an experiment is defined from multiple z-series using different fluorescence cubes, the status field has a red background but the individual z-series are controlled by the high-speed control box, i.e. acquired time-optimized.

5.5 Mark and Find

Mark and Find is enabled with the  button and is used to define different stage positions for **multiposition experiments**.

When a stage position is approached, its **x**, **y** and **z-coordinates** can be saved with the **Mark** button:



If multiple positions are saved, they can be approached again using the dropdown menu. When the experiment is started, a time series of all positions is approached and acquired at every time point.

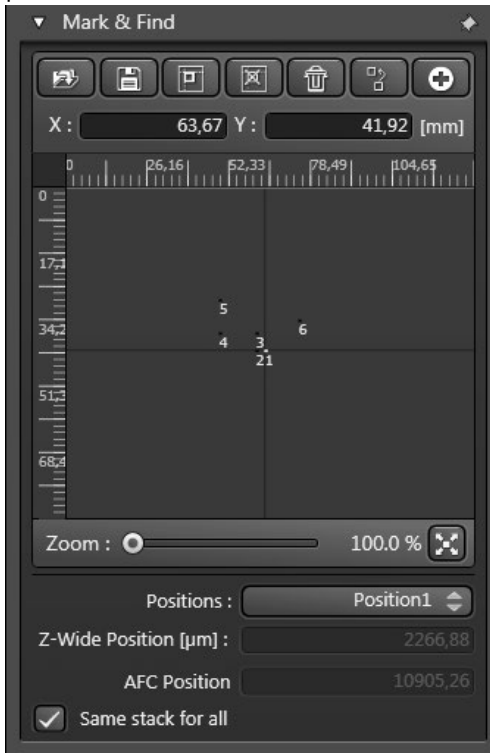


Fig. 15: Mark and Find

5. Parameters for Multidimensional Image Acquisition

5.6 Tile Scan

5.6.1 Camera adjustment for Tile Scan



Note:

A prerequisite for Tile Scan is a correctly calibrated camera!

Depending on the type of camera and the port used, the camera must be mounted in the correct orientation (see following table):

Camera type	Camera orientation on left, right and bottom port eyepiece image = camera image
Andor iXon 897	cable to the back
Hamamatsu 9100-13	black plastic plate in front
Hamamatsu 9100-02	black plastic plate in front
DFC365 FX	cable to the back
DFC450 (C)	cable to the back
DFC310 FX	cable to the back

5. Parameters for Multidimensional Image Acquisition

Aligning the camera

If you find that the edges of the live image do not run parallel to the edges of the image window, you can now fine-adjust the camera. (See chapter 7: "First experiment" for displaying a live image).

Proceed as follows:

- Switch to the objective with the highest magnification.
- Focus the microscope image.
- Select a prominent specimen detail and move it to the top right corner of the image window.
- Move the stage in y direction so that the specimen detail in the image window moves to the bottom.
- Check that the distance to the edge of the image window remains the same.
If this is not the case, the camera must be rotated accordingly.

5.6.2 Tile Scan Acquisition

The **Tile Scan** menu is enabled with the  button and is used to define an area for generation of composite overview images.

The Tile Scan area is specified by two oppositely placed positions which uniquely define the Tile Scan area. This will typically be the top right corner and the bottom left corner of the area that is to be highlighted.

As in the **Mark and Find** menu, the positions are defined with the **Mark** button:



If the Tile Scan area is set, the **Scan Field** shows the number of images that will be required to cover the previously defined scan area. The **Merge Image** button should always be enabled to merge the acquired images to a Tile Scan image:

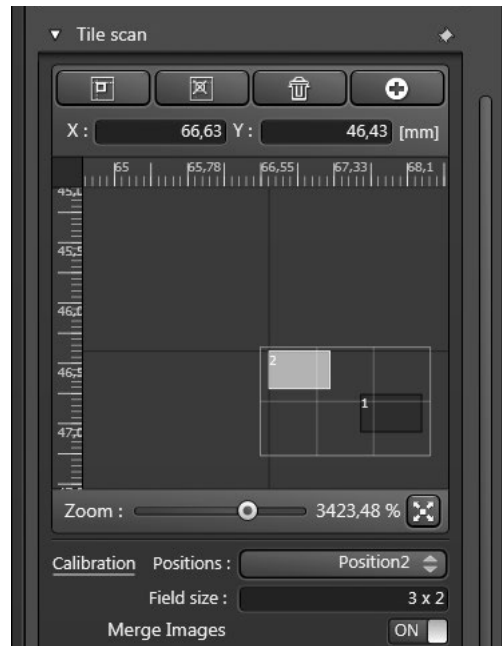


Fig. 16: Tile Scan

5. Parameters for Multidimensional Image Acquisition

If the single images are not merged correctly, it may be necessary to swap the images horizontally or vertically.

To do this click the **Configurations** button.



This opens the **Stage Configuration** menu (fig. 17).

In **Set merge settings** to select the option **Custom** and mark the appropriate option **Swap images horizontal** or **Swap images vertical**.

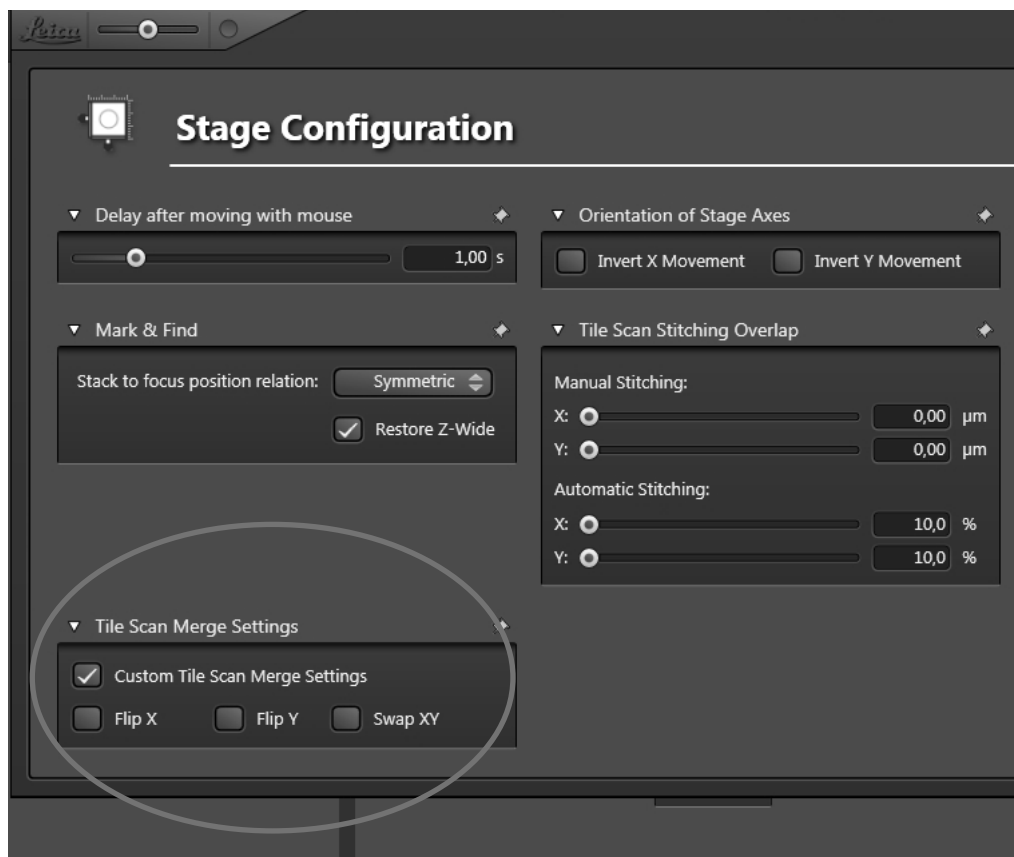


Fig. 17: Stage configuration

6. FIRST EXPERIMENT

The "First Experiment" chapter gives an overview of the power of the Leica LAS X and shows you how fast you can acquire the first image. In the following example the specimen "Convallaria" is used. It is stained with Safranin and Fast Green. We will go through the simplest settings and run a fast xyzλ scan. In the first experiment an image stack is acquired at one stage position for both fluorochromes.

The FineFocus (Piezo or SuperZ)* is used to set the z-Positions. The general procedure for such an experiment is shown below. For a detailed description of the dialog boxes and the software functions see the LAS X online help.



Note:

Note that all settings are reference values. Depending on the specimen the values and settings may vary.

6.1 Configuration

Use a 40x or 63x objective for the experiment. The LiveCell HCX PL APO 63x/1.30 GLYC CORR 37°C objective is the optimum solution. Use the BGR Cube 11600197 filter system B/G/R; HP; size "K" as the filter cube.

6.2 Switch on the system and start the software

- Switch on the system.
Follow the specified power-up sequence (see Chapter 5 Starting up).
- Start the LAS X software by clicking the icon on the desktop or by selecting it in the start menu.



- At the following prompt select **Yes** to initialize the xy-stage:

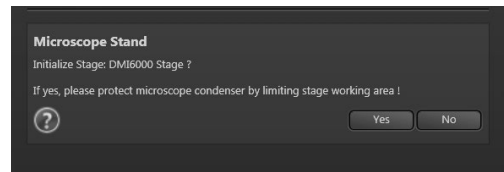


Fig. 18: LAS X stage initialization

* optional accessories. Requires high-speed control box

6. First Experiment

- When you see the following dialog box the software has been started and is ready for use:

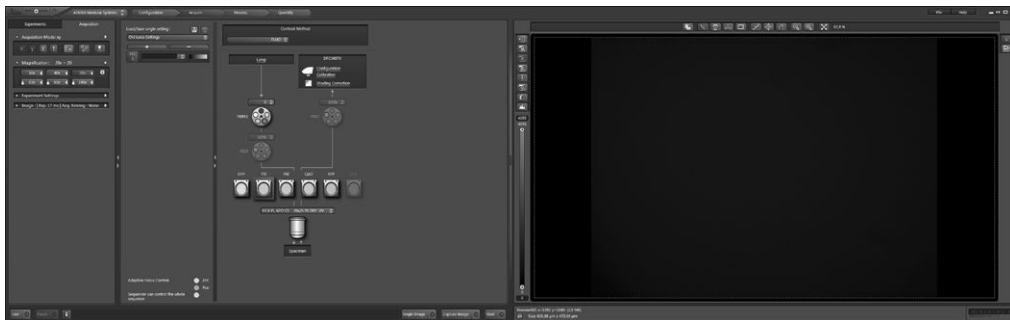


Fig. 19: LAS X user interface

6.3 Selecting and focusing specimen section

- Select TL-BF (bright field) as the contrast method.

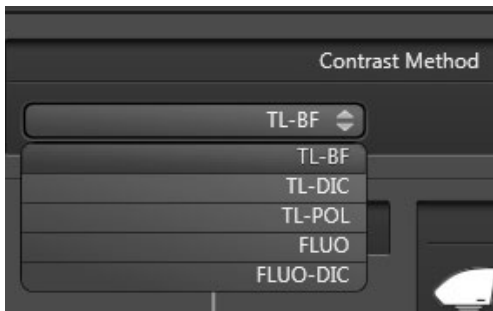


Fig. 20: Contrast method

- Click the **Setup** tab.
- If available the objective **HCX PL APO 63x/1.30 GLYC CORR 37°C** should be selected, otherwise select a 40x or 63x objective:



Fig. 21: Objective selection

- Place the specimen on the xy-stage (use an immersion medium if necessary).
- Switch the light to the eyepieces and adjust the image directly at the microscope.



Note:

To switch the light to the camera, so that an image is directly shown on the monitor, the **Live** button must be clicked.

6. First Experiment

6.4 Camera resolution

- Click on **Configuration** in the **Light Path Settings** dialog box:

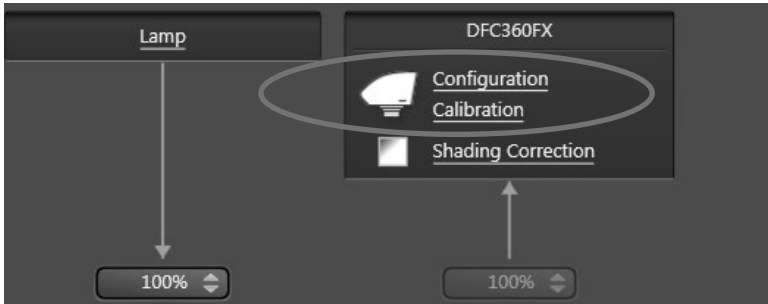


Fig. 22: Camera configuration

- Under **Set Digitization to** (23.1) select the value **12 bits** (when using the cascade camera select 16 bits). Close the window by clicking on the **X**. The settings are automatically applied.

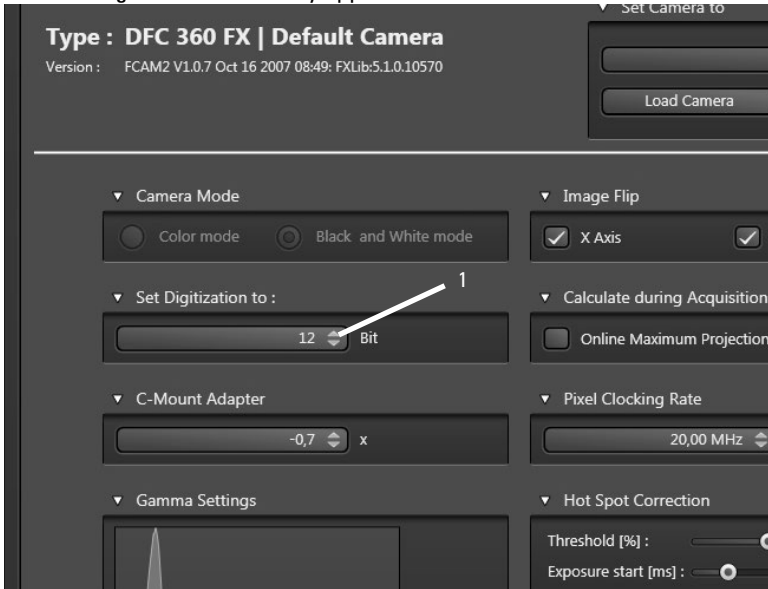


Fig. 23: Camera configuration

6.5 Acquisition mode

- Click the **Acquire** arrow symbol:



Fig. 24: Acquire arrow symbol

- Click the **Acquisition** tab:

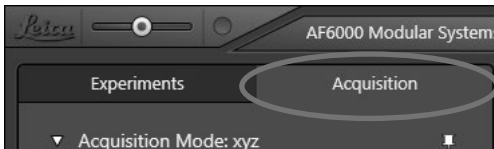


Fig. 25: Acquisition tab

- In **Acquisition Mode** select in addition to **x**, **y** the **z** button. The **x** and **y** acquisition parameters are always enabled.

Selected and therefore active fields are underlined in red in this example. If you click the same button again, it is given a black underline. Black icons are not selected and therefore are not enabled (in this example the **t** button is not enabled).

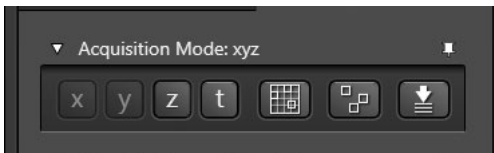


Fig. 26: Acquisition mode xyz

6.5.1 EL6000 variant

When using the EL6000 the wavelength is set with a filter cube, the filter wheel integrated into the microscope (IFW) or with external filter wheels (EFW).

- In the **Light Path Settings** menu in **Contrast Method** select **FLUO** from the list field (27.1).

Filter selection for EFW:

- As **Filter Cube** select **TRI**.
- Selecting the filter cube in the **Light Path Settings** menu (27.4) activates the corresponding filter wheel.
Attention: The suitable filter wheel must be positioned in the light path before!
- Now select the **G** excitation filter in the **Excitation Filter** field (29).

6. First Experiment

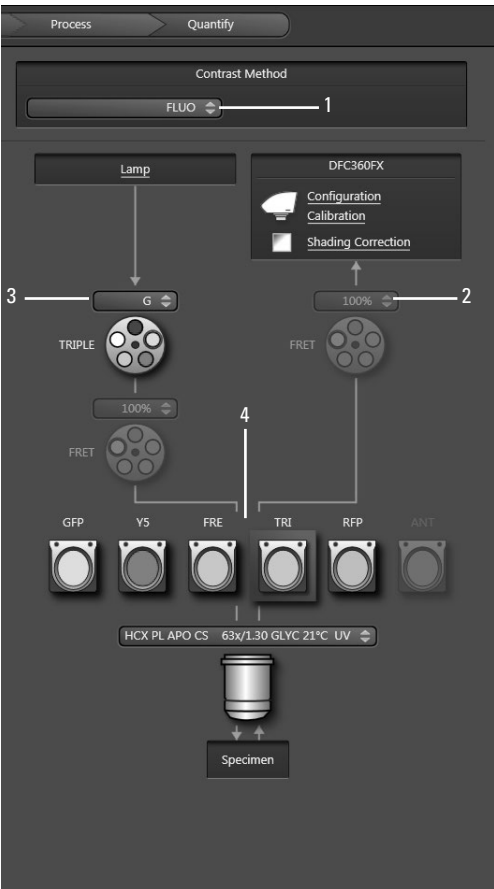


Fig. 27: Light Path Settings menu

Filter selection for IFW:

- Press the **IFW** button to be able to define the filter wheel position:

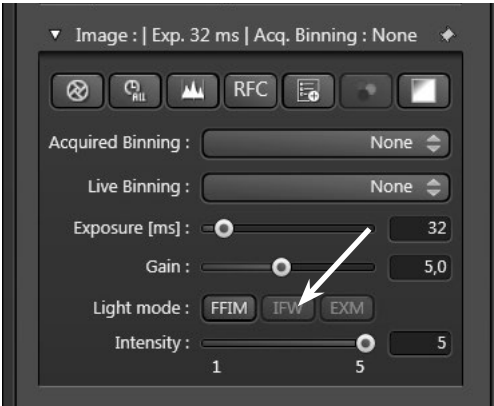


Fig. 28: Image dialog

- As **Filter Cube** select **BGR** and select intensity position **G**:



Fig. 29: Image dialog

If the system is equipped with the external **FFIM**, the transmission is always controlled via the intensity slider in the **Image menu** (in five steps). The internal filter wheel of the microscope is set to 100% transmission in this case.

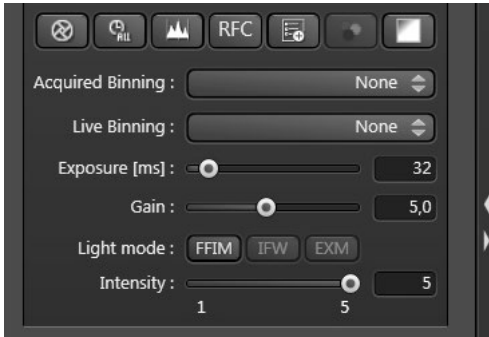


Fig. 30: Adjusting transmission for FFIM

Steps for FFIM:

100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%



Attention!

Set the light intensity of the EL6000 to the lowest level to protect the specimen.

Set the values in the **Image dialog**:

Binning:

Exposure:

Gain:



Fig. 31: Image dialog

- Click **Live** to be able to view the image directly on the monitor:

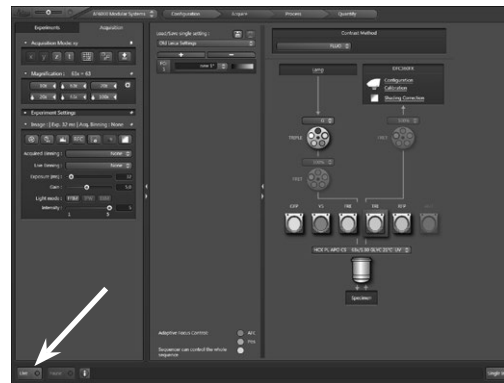


Fig. 32: Live or Stop button

6. First Experiment

- Now you see the live image on your screen in the **Viewer** window (see fig. 33).



Fig. 33: Acquisition view in the viewer



Note:

Move the specimen to the desired position with SmartMove*. For subsequent image processing it is advantageous if you use relatively small cells with many starch granules (bright dots inside the cells). If you cannot find any starch granules, focus a different plane of the specimen and try again.

6.6 Image optimization

- Optimize the image quality by adjusting the exposure time by moving the **Exposure** slider in the **Image** menu slowly left and right. Experience shows that a new Convallaria specimen has exposure values of 100 ms to 200 ms. Observe the changes in the image quality:

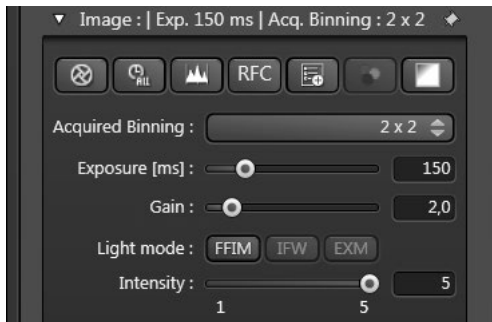


Fig. 34: Image menu



Attention!

Reduce the exposure time to protect your specimen.

- When you have reached the desired image quality click **Stop**:



Fig. 35: Live or Stop button

* optional accessories

6.7 Setting color (LUT)



Note:

The **Convallaria** specimen is stained with two stains (**Safranin/Fast Green**). For this reason two fluorochrome settings (FCr1 and FCr2) are explained in this example.

- In this example in **FCr1** the stain **Green** is selected. You can click the button for the color palette (36.1) to select the desired color (36.2). Confirm your selection with double click on left mouse button.

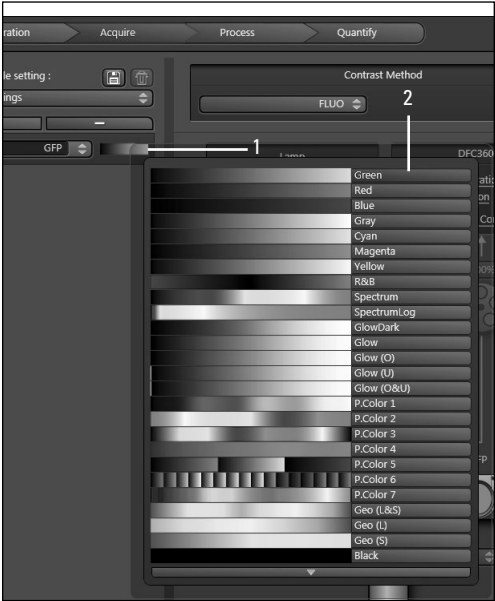


Fig. 36: Color palette

- Click in the text field and assign a name for the **FCr1** (in this example **GFP**):



Fig. 37: Text field



- To save all settings for the **FCr1** click the **right mouse button** on the **FCr1** field (38.1) and then on **Save** (38.2):



Fig. 38: Saving settings

6. First Experiment

- You are prompted to assign a name again. Use the same name as in fig. 37 and confirm it with **OK**:

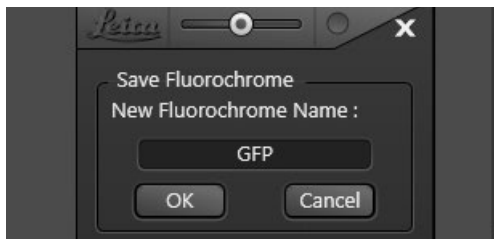


Fig. 39: Confirming name

6.8 Settings for additional fluorochromes

- To specify settings for an additional fluorochrome, click the **+** button. This creates the FCr2:

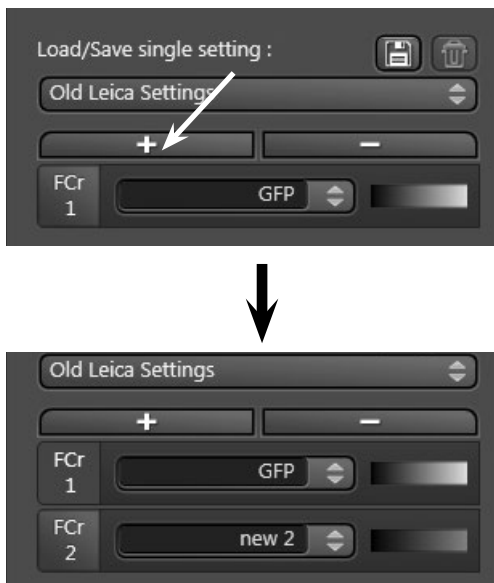


Fig. 40: Adding fluorochromes

Proceed with FCr2 as with FCr1:

- **FLUO** remains selected as the **Contrast Method**.
- If EFW is used, the **Filter Cube TRI** remains selected.
- If IFW is used, **BGR** remains selected as the **Filter Cube**.
- In the **Image** menu select intensity setting **R** (for IFW) or select the filterwheel position **R** (EFW) in the **Light Path Settings** menu.
- Click **Live** to be able to view the image directly on the monitor.
- If you wish to optimize the image quality, proceed as described in the section on 6.6 Image Optimization.
- Select the color for display (red in this example, 41.1) and assign a name for **FCr2** (41.2):

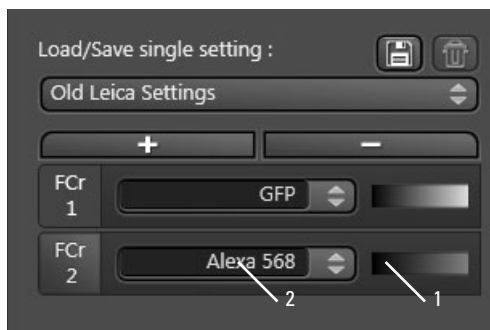


Fig 41: Setting color and name

- Save the settings by clicking the **right mouse button** on **FCr2** (42.1) and then clicking **Save** (42.2):

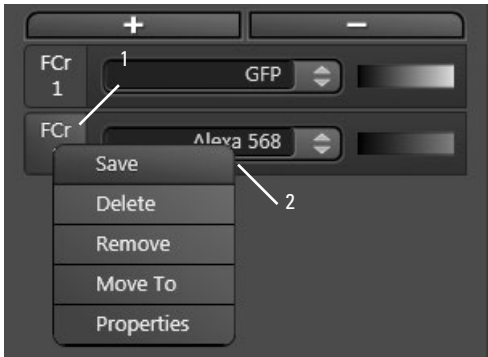


Fig. 42: Saving settings

- Enter a name and confirm with **OK**.
- To start image acquisition click **Capture Image**.

This defines FCr1 and FCr2 and saves the settings for the two fluorochromes. Now you can start the image acquisition.

6.9 Capturing 3D image stack

In the list field of the z-menu you can select either **Wide Focus** (microscope z-drive) or, if available, **Fine Focus** (Super z-Galvo Focus or Piezo Focus)*:

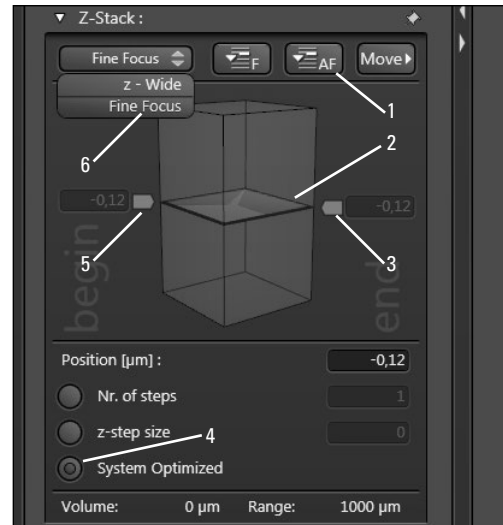


Fig. 43: z-Stack

Example for Fine Focus:

- In the list field select **Fine Focus** (43.6).
- Click **Live** to be able to view the image directly on the monitor.
- Make sure that the image is in focus.
- Click the **Focus** button (43.1) to save the current **z-Position**.
- To define the upper position of your z-stack move the mouse pointer to the ocher-colored area (43.2) and drag it upwards while holding down the left mouse button. The change of the z-position can be followed in the live image.

* optional accessories. Requires high-speed control box

6. First Experiment

- As soon as the desired top image plane appears in the live camera image highlight it by clicking the **Begin** button (43.5).
- Now drag the ocher-colored area (43.2) with the left mouse button held down to the desired bottom position and highlight it by clicking the **End** button (43.3).

Example for z-Wide:

- In the list field select **z-Wide**.
- Click **Live** to be able to view the image directly on the monitor.
- Make sure that the image is in focus.
- Click the **Focus** button (43.1) to save the current **z-Position**.
- To define the upper position of your z-stack move the microscope z-drive to the desired upper limit. The change of the z-position can be followed in the live image.
- As soon as the desired top image plane appears in the live camera image highlight it by clicking the **Begin** button (43.5).
- Now move the microscope z-drive to the desired lower limit and highlight it by clicking the **End** button (43.3).



Note:

When using the 63x objective we recommend 150 to 200 image planes (sections) for definition of the image stack. We recommend 100 to 150 image planes when using a 40x objective.



Fig. 44: z-Stack

- Select the **System Optimized** option (44.1).
- Click the **Start** button to start image acquisition.



Note:

The saved image series can be found under **Acquire** → **Experiments** (fig. 45). The image data created by image processing is also saved here.

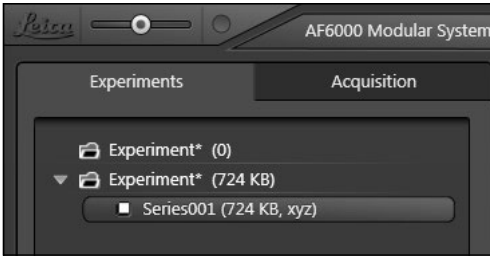


Fig. 45: Experiments



Note:

The acquisition is started by clicking **Start** and ends automatically (if that is set). The acquisition can be stopped at any time by clicking **Stop**.



Note:

Save the captured images directly after acquisition before starting a new acquisition, processing the image data or before shutting down the LAS X. In addition to saving the data on the hard disk, the data should also be backed up regularly on a suitable data medium.



Note:

This means that the image data will not be lost if the software crashes.

7. INDEX

C

Copyrights 2

F

First experiment 27

Acquisition mode 31

Camera resolution 30

Capturing 3D image stack 37

Configuration 27

Image optimization 34

Selecting and focusing specimen section 28

Setting color (LUT) 35

Settings for additional fluorochromes 36

Starting the software 27

Switching on the system 27

I

Intended use 6

L

LAS X 8

Calling up the online help 8

Full-text search 9

Structure of the user interface 10

Leica LAS X 7

M

Multidimensional image acquisition 12

O

Online help 8

Introduction 8

Operating instructions 4

Remarks 4

S

Safety instructions

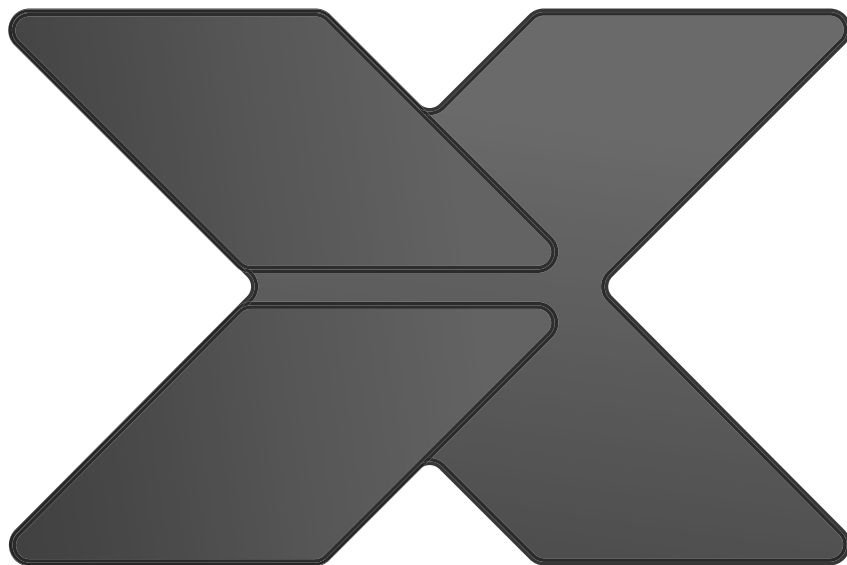
Meaning 5

Starting up 8

System Overview

Dongle 7

From Eye to Insight



LEICA LAS X

Imaging und Analyse Software für Weitfeldmikroskope
Gebrauchsanweisung

Leica Microsystems CMS GmbH. Gebrauchsanweisung, 11934003, Revision 1.2, 2017-01-05



COPYRIGHTS

Die in der folgenden Dokumentation enthaltenen Hinweise stellen den derzeit aktuellen Stand der Technik dar. Die Zusammenstellung von Texten und Abbildungen haben wir mit größter Sorgfalt durchgeführt. Trotzdem kann für die Richtigkeit des Inhaltes dieses Handbuches keine Haftung irgendwelcher Art übernommen werden. Falls Sie Kommentare zu dieser Betriebsanleitung oder zu unserer Dokumentation im Allgemeinen haben, sind wir für Hinweise jederzeit dankbar. Die in diesem Handbuch enthaltenen Informationen können ohne vorherige Ankündigung geändert werden.

Alle Rechte an dieser Dokumentation liegen bei der Leica Microsystems CMS GmbH. Anpassung, Übersetzung und Vervielfältigung von Text und Abbildungen - auch von Teilen daraus - durch Druck, Fotokopie, Mikrofilm oder andere Verfahren, inklusive elektronischer Systeme, ist nur mit ausdrücklicher schriftlicher Genehmigung der Leica Microsystems CMS GmbH gestattet.

LAS X ist durch Urheberrechtsgesetze geschützt (Copyright). Alle Rechte vorbehalten. Reproduktion, Adaptation oder Übersetzung dieser Programme ist ohne vorherige schriftliche Genehmigung durch Leica Microsystems CMS GmbH untersagt.

Der Begriff Windows kann im folgenden Text ohne weitere Kennzeichnung verwendet werden. Hierbei handelt es sich um ein geschütztes Warenzeichen der Firma Microsoft Corporation. Ansonsten kann aus der Verwendung von Warennamen ohne besondere Hinweise kein Rückschluss auf deren freie Verwendbarkeit gezogen werden. Alle weiteren Markennamen und Produktnamen in diesem Dokument sind Marken, Dienstleistungsmarken, Warenzeichen oder eingetragene Warenzeichen der jeweiligen Hersteller.

Rev 1.2, herausgegeben 2017-01-05 von:

Leica Microsystems CMS GmbH
Ernst-Leitz-Straße 17-37
D-35578 Wetzlar (Germany)
www.leica-microsystems.com

Verantwortlich für den Inhalt:
Marketing CMS

CONTENTS

1. Wichtige Hinweise zur Anleitung	4	6. Erstes Experiment.....	27
2. Zweckbestimmung	6	6.1 Konfiguration	27
3. Die Leica LAS X.....	7	6.2 System einschalten	27
3.1 Beschreibung	7	6.3 Probenausschnitt wählen und fokussie-	27
3.2 Dongle	7	ren	28
4. Starten der Leica LAS X	8	6.4 Auflösung der Kamera.....	30
4.1 Öffnen der Leica LAS X.....	8	6.5 Aufnahmemodus.....	31
4.2 Onlinehilfe aufrufen.....	8	6.5.1 EL6000 Variante.....	31
4.3 Volltextsuche mit logisch verknüpften		6.6 Bildoptimierung.....	34
Suchbegriffen.....	9	6.7 Farbe (LUT) festlegen.....	35
4.4 Allgemeiner Aufbau der Benutzerober-		6.8 Einstellungen für weitere	
fläche.....	10	Fluorochrome	36
5. Parameter für die mehrdimensionale Bild-		6.9 3D-Bildstapel aufnehmen.....	37
aufnahme	12	7. Index.....	40
5.1 Light Path Settings	13		
5.2 Image Menü	17		
5.2.1 Kamera	17		
5.2.2 EM CCD Kameras	19		
5.3 z-Menü	19		
5.3.1 Einstellung des Bildstapels über Wide			
Focus.....	20		
5.3.2 Einstellung des Bildstapels über Fine			
Focus*	20		
5.4 t-Menü	20		
5.5 Mark and Find	23		
5.6 Tile Scan.....	24		
5.6.1 Kameraeinstellung für Tile Scan.....	24		
5.6.2 Tile Scan Aufnahme	25		

1. Wichtige Hinweise zur Anleitung

1. WICHTIGE HINWEISE ZUR ANLEITUNG



Achtung!

Diese Betriebsanleitung ist ein wesentlicher Bestandteil der Leica LAS X und muss vor Inbetriebnahme und Gebrauch sorgfältig gelesen werden. Lesen Sie ebenfalls die Gebrauchsanweisung des jeweiligen Mikroskops, der Komponenten und dem Zubehör. Das Hauptaugenmerk richtet sich auf die Sicherheitshinweise, die bei der Arbeit mit der Leica LAS X strikt eingehalten werden müssen.

Bewahren Sie deshalb diese Betriebsanleitung sorgfältig auf.

Diese Betriebsanleitung zeigt Ihnen die ersten Schritte zum Starten des Systems und liefert Ihnen eine Beschreibung der Grundfunktionen der Software Leica Application Suite X (LAS X).

Für weitere Beschreibungen der Softwarefunktionen verweisen wir auf die Onlinehilfe der LAS X, in der Sie die aktuellsten Erklärungen zu den entsprechenden Softwarefunktionen erhalten.

Im Kapitel 5 LAS X können Sie sich mit dem Aufbau und der Bedienung der Onlinehilfe vertraut machen.

Text symbole, Piktogramme und ihre Bedeutung:

(1.2)

Ziffern in Klammern, z.B. (1.2), beziehen sich auf Abbildungen, im Beispiel Abb. 1, Pos.2.

→ S.20

Ziffern mit Hinweispfeil, z.B. → S.20, weisen auf eine bestimmte Seite dieser Anleitung hin.



Achtung!

Besondere Sicherheitshinweise in dieser Anleitung sind durch das nebenstehende Dreieckssymbol gekennzeichnet und grau unterlegt.



Achtung! Bei einer Fehlbedienung können Mikroskop bzw. Zubehörteile beschädigt werden.



Erklärender Hinweis.



Nicht in allen Ausrüstungen enthaltene Position.

2. Zweckbestimmung

2. ZWECKBESTIMMUNG

Verwendungszweck

Diese Software wurde entwickelt um vergrößerte Probenabbildungen zu beobachten und zu dokumentieren, die mit Leica Mikroskopen in verschiedenen Routinearbeiten und Forschungsanwendungen gewonnen werden.

Das Produkt wird nicht als Medizinprodukt oder in-vitro-Diagnoseprodukt betrachtet.

Verwenden Sie dieses Produkt nicht für andere als die vorgesehenen Verwendungszwecke.



Achtung!

Für jegliche nicht-bestimmungsgemäße Verwendung und bei Verwendung außerhalb der Spezifikationen von Leica Microsystems CMS GmbH sowie ggf. daraus entstehenden Risiken übernimmt der Hersteller keine Haftung.

Qualitätsrichtlinien

Es wird erwartet, dass ein Labor, welches die LAS X Software verwendet, nach Richtlinien arbeitet, die folgende Bereiche (und weitere) umfasst: Anwenderschulung, Entwicklung von Untersuchungs- und Prüfprozessen, Validierungen und externen Audits zur Leistung der Labor Untersuchungs – und Prüfprozesse. Diese sind vor der Implementierung zu überprüfen und zu dokumentieren. Es sollten Standardarbeitsanweisungen (SOPs) für Analysemethoden eingeführt werden.

3. DIE LEICA LAS X

3.1 Beschreibung

Die Leica LAS X (Leica Application Suite X) bietet Lösungen für unterschiedliche Anwendungsniveaus.

Jede Lösung ist erweiterbar und erlaubt vielfältige Kombinationsmöglichkeiten mit Hardware- und Software-Modulen von Leica Microsystems CMS GmbH.

Das Gesamtsystem vereint modernste bildgebende Technologien, die perfekt aufeinander abgestimmt sind - für schnelle Ergebnisse in höchster Qualität.



Hinweis:

Für jegliche nicht bestimmungsgemäße Verwendung und bei Verwendung außerhalb der Spezifikationen von Leica Microsystems CMS GmbH, sowie gegebenenfalls daraus entstehender Risiken übernimmt der Hersteller keine Haftung. In solchen Fällen verliert die EU-Konformitätserklärung ihre Gültigkeit.



Achtung!

Beachten Sie unbedingt die mitgelieferte Betriebsanleitung zum Leica Mikroskop.



Achtung!

Installieren Sie keine andere Hard- oder Software auf dem Steuerrechner, da es andernfalls zu schwerem Sachschaden am System oder zu einem Datenverlust kommen kann. Wenden Sie sich gegebenenfalls an den Technischen Service der Leica Microsystems CMS GmbH.



Achtung!

Um Datenverluste zu vermeiden müssen Sie regelmäßig Ihre Daten und Bilder auf einem geeigneten Datenträger sichern.

Sichern Sie ihre Daten ebenfalls unbedingt vor jeder Service- und Reparaturarbeit! Leica Microsystems CMS GmbH haftet nicht für Datenverluste.



Hinweis:

Die Software LAS ist für die Mikroskopkonfiguration zuständig. Weitere Hinweise finden Sie in der Betriebsanleitung zum Mikroskop.

3.2 Dongle

Damit die Software und das System funktionieren, bekommen Sie mit dem System einen USB-Dongle, der die Software frei schaltet. Entfernen Sie den USB-Dongle nur, wenn Sie möchten, dass keiner die Software starten kann.

4. Starten der Leica LAS X

4. STARTEN DER LEICA LAS X

4.1 Öffnen der Leica LAS X



Achtung!

Starten Sie die Software erst, nachdem das Mikroskop und alle anderen Komponenten eingeschaltet wurden!

- Starten Sie die Software indem Sie auf das LAS X Symbol auf dem Desktop klicken:



Abb. 1: LAS X Symbol auf dem Desktop

Damit ist die Leica LAS X betriebsbereit.

4.2 Onlinehilfe aufrufen

Die Onlinehilfe kann auf drei verschiedene Weisen aufgerufen werden:

- Im jeweiligen Kontext (kontextsensitiv)
- Über das Menü Help
- Mit der Tastenkombination CTRL + F1

Im jeweiligen Kontext (kontextsensitiv)

Klicken Sie auf das kleine Fragezeichen, das sich bei jedem Dialogfenster oben rechts in der Ecke befindet.

Die Onlinehilfe wird mit der Beschreibung der entsprechenden Funktion geöffnet.

Über das Menü Help

Klicken Sie in der Menüleiste auf das Menü Help. Das Menü klappt nach unten auf und gibt unter anderem die folgenden suchrelevanten Optionen frei:

Contents Dieses Dialogfeld enthält das Inhaltsverzeichnis in Form eines Verzeichnisbaumes, der expandiert oder reduziert werden kann.

Doppelklicken Sie auf einen Eintrag des Inhaltsverzeichnisses, um die entsprechenden Informationen anzuzeigen.

Index Geben Sie den Begriff ein, nach dem Sie suchen möchten. Die Onlinehilfe zeigt Ihnen das Stichwort an, das dem angegebenen Begriff am ähnlichsten ist.

Wählen Sie ein Stichwort aus. Sie springen zu den entsprechenden Inhaltsseiten durch zweifachen Mausklick oder wenn Sie die Schaltfläche Display drücken.

Search Geben Sie den Begriff oder Ausdruck ein, nach dem Sie suchen möchten, und klicken Sie auf die Schaltfläche LIST TOPICS (Themen anzeigen). Es wird Ihnen nun eine hierarchisch gegliederte Liste der Themen angezeigt.

About Öffnet das Dialogfenster **User Configuration**, in dem Sie u. a. die Sprache auswählen können, in der die Onlinehilfe dargestellt wird.

4.3 Volltextsuche mit logisch verknüpften Suchbegriffen

Wenn Sie im Register Search auf das rechts neben dem Eingabefenster vorhandene Dreieck klicken, werden logische Operatoren angezeigt.

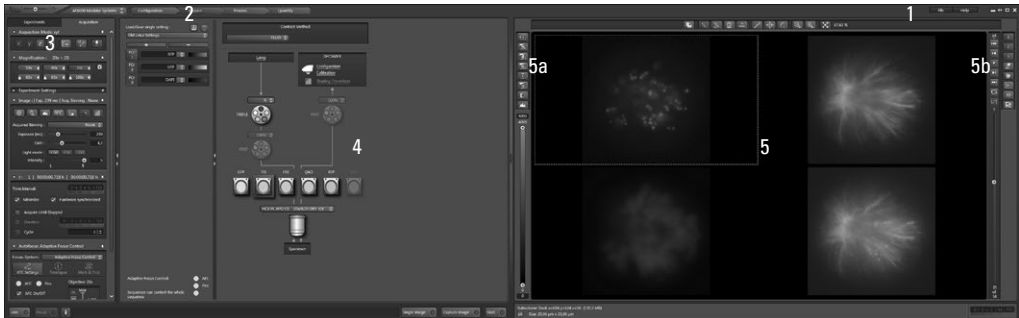
- Wählen Sie den entsprechenden Operator aus.
- Geben Sie nach dem Operator den zweiten Suchbegriff ein, den Sie mit dem ersten Suchbegriff verknüpfen wollen.

Beispiele	Ergebnis
Lochblende AND Schnitte	Dieses Statement sucht Hilfethemen, in denen sowohl das Wort «Lochblende» als auch das Wort «Schnitte» vorkommt.
Lochblende OR Schnitte	Dieses Statement sucht Hilfethemen, in denen entweder das Wort «Lochblende» oder das Wort «Schnitte» oder beide vorkommen.
Lochblende NEAR Schnitte	Dieses Statement sucht Hilfethemen, in denen sich das Wort «Lochblende» und das Wort «Schnitte» in einem bestimmten Suchradius befinden. Darüber hinaus werden auch ähnlich geschriebene Begriffe gesucht.
Lochblende NOT Schnitte	Dieses Statement sucht Hilfethemen, in denen sich das Wort «Lochblende» und nicht das Wort «Schnitte» befinden.

4. Starten der Leica LAS X

4.4 Allgemeiner Aufbau der Benutzeroberfläche

Die Bedienoberfläche der LAS X unterteilt sich in fünf Bereiche:



(1) Menü-Zeile und der Bereich zur Auswahl des **Betriebsmodus/Wizard**:

Hier stehen Ihnen die verschiedenen Menüs zum Aufrufen von Funktionen zur Verfügung:

- File
- Help

und der **Wizard** mit:

- Main
- Live Data Mode
- FRET SE
- HCS A (MatrixScreening) für High Content Screening

(2) Pfeilsymbole: Arbeitsschritte mit den einzelnen Funktionen. Diese Arbeitsschritte spiegeln den typischen Ablauf einer Bildaufnahme und der anschließenden Bildverarbeitung wieder. Die Funktionen wurden entsprechend in diese Arbeitsschritte gruppiert:

- Configuration
- Acquire
- Process
- Quantify

(3) Register-Bereich: zu jedem Arbeitsschritt (Pfeilsymbol) gehören verschiedene Register, in denen die Einstellungen für das Experiment getroffen bzw. Bilddaten selektiert werden können.

Acquire Experiments: Verzeichnisbaum der im Hauptspeicher (RAM) abgelegten Dateien

Setup: Hardwareeinstellungen für das aktuelle Experiment

Acquisition: Parametereinstellungen für die Bildaufnahme

Process Experiments: Verzeichnisbaum der im Speicher (RAM) abgelegten Dateien

Tools: Verzeichnisbaum mit allen im jeweiligen Arbeitsschritt verfügbaren Funktionen

Quantify Experiments: Verzeichnisbaum der im Speicher (RAM) abgelegten Dateien

Tools: Register mit den in diesem Arbeitsschritt verfügbaren Funktionen

Graphs: Graphische Darstellung von in Auswertungsbereichen (ROI) gemessenen Werte

Statistics: Anzeige der statistischen Werte, die in den eingezeichneten Auswertungsbereichen (ROI) ermittelt wurden

(4) Arbeitsbereich: in diesem Bereich steht Ihnen unter dem Arbeitsschritt Acquire das Dialogfenster Light Path Settings zur Verfügung, in dem sich die Kontrollelemente zur Einstellung der Aufnahmeparameter befinden. Bei der Bildbearbeitung werden in diesem Bereich Vorschauen erstellt und angezeigt.

(5) Ansichtsfenster Viewer: dient zur Anzeige der aufgenommenen Bilder. In der Standardeinstellung besteht das Ansichtsfenster Viewer aus dem Bildfenster in der Mitte und den Schaltflächen zur Bilddarstellung und Auswahl von Auswertungsbereichen (ROI) (5a) sowie zur Kanalanzeige (5b).

5. PARAMETER FÜR DIE MEHRDIMENSIONALE BILDAUFNAHME

Im diesem Kapitel werden die Softwaremenüs beschrieben, die für die Definition der Aufnahmeparameter der Leica LAS X genutzt werden. Folgender **Aufnahmemodus (Acquisition Mode)** stehen Ihnen zur Verfügung, wenn Sie das Pfeilsymbol **Acquire** und im Registerbereich **Acquisition** anklicken:

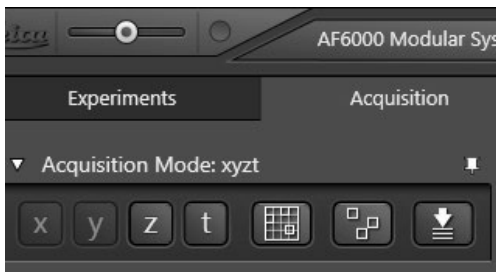


Abb. 2: Aufnahmemodus (Acquisition Mode)

Die Schaltfläche **x** und **y** sind immer aktiv. Beide Schaltflächen beziehen sich auf das Menü **Image**, welches zur Einstellung von Kameraparametern genutzt wird.



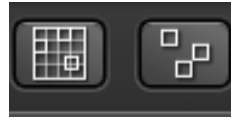
Die Schaltfläche **z** aktiviert das **z-Menü**, welches dreidimensionale Bildstapel definiert.



Die Schaltfläche **t** aktiviert das **t-Menü**, welches die Zeitreihen definiert.



Folgende zwei Schaltflächen **Tile Scan** und **Mark and Find** beziehen sich auf den motorisierten Probenstisch:



Diese Schaltfläche aktiviert das **Tile Scan Menü**, welches zum Generieren von zusammengesetzten Übersichtsbildern benötigt wird:



Diese Schaltfläche aktiviert das **Mark- and Find Menü**, welches zum Definieren von verschiedenen Tischpositionen für Multipositionsexperimente benötigt wird:





Hinweis:

Eine schwarze Schaltfläche bedeutet, dass die jeweilige Funktion deaktiviert ist und somit nicht für das Experiment genutzt wird. Durch Anklicken der Schaltfläche mit der linken Maustaste können die Schaltflächen aktiviert werden. Rote Schaltfläche bedeutet, dass die jeweilige Funktion aktiviert ist.

5.1 Light Path Settings

Auf der linken Seite der Leica LAS X sind ebenfalls die Lichtpfadeinstellungen „Light Path Settings“ angezeigt. In diesem Menü können die Lichtkanäle für die jeweiligen Experimente definiert werden. Dieses Menü hat zentrale Bedeutung und wird deshalb immer angezeigt:

Abb. 3: Light Path Settings



5. Parameter für die mehrdimensionale Bildaufnahme



Hinweis:

Grundsätzlich sollte die Definition eines Experimentes damit beginnen, die Bildkanäle im Menü **Light Path Settings** festzulegen.

Um einen Kanal zu definieren, müssen sie zuerst die dazugehörige Schaltfläche aktivieren. Beginnen Sie mit dem Kanal 1:



Die für diesen Kanal gewünschte LUT (Look up Table) wählen Sie aus der Farbpalette, die Sie mit folgender Schaltfläche aufrufen können:



Im Fenster **Contrast Method** wird die gewünschte Kontrastmethode eingestellt, im Feld **Filter Cube** der zu nutzende Filterwürfel für diesen Kanal.

Verwendung der externen Leica-Filterräder*:

Die Leica LAS X kann mit bis zu vier externen Leica-Filterrad steuern.

Die Filterpositionen werden im Menü **Light Path Settings** definiert.

Ist das System mit externem **FFIM** ausgerüstet, wird die Transmission immer über den Schieber **Intensity** im Menü **Image** eingestellt (in 5 Stufen). Das interne Filterrad des Mikroskops wird in diesem Fall auf 100% Transmission eingestellt.



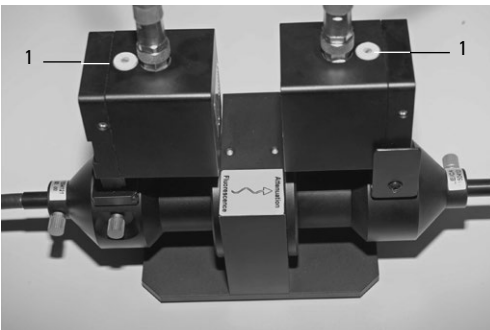
Abb. 5: Einstellung der Transmission für FFIM

Stufen für FFIM:

100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%

Abb. 4 Externe Adapterkupplung mit zwei kurzen Filterschiebern

1 Nummer der Kabelverbindung



* Benötigt high-speed control box

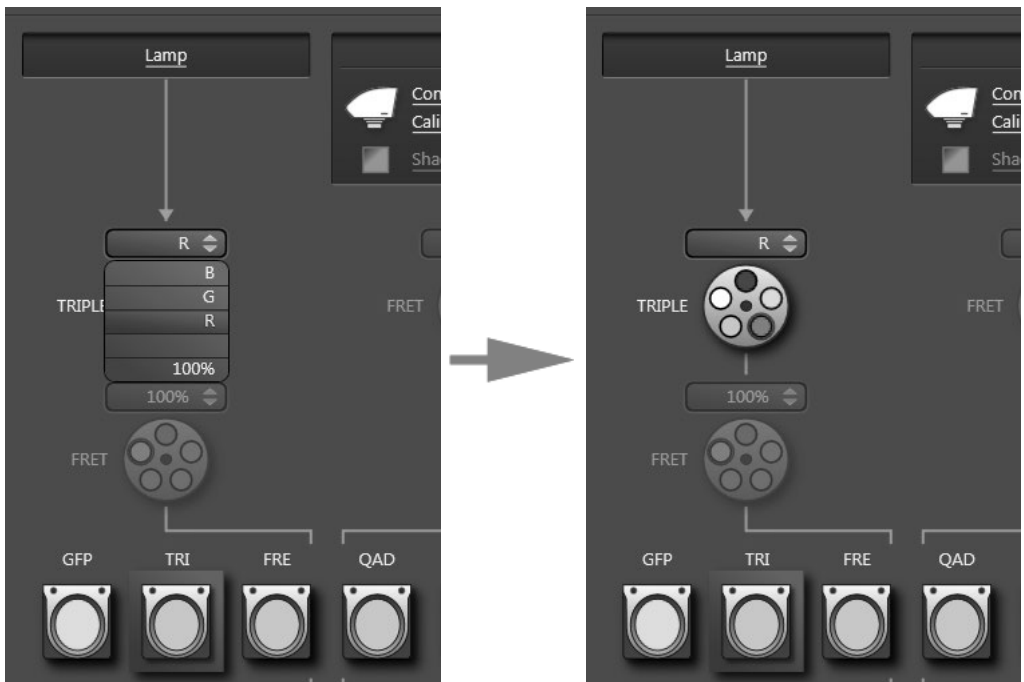
5. Parameter für die mehrdimensionale Bildaufnahme

Die Auswahl eines Filterwürfels im LAS X-Menü Light Path Settings aktiviert das zugehörige Filterrad.

Achtung: Das entsprechende Filterrad muss zuvor im Strahlengang positioniert sein!

Wählen Sie nun das geeignete Emissions- oder Anregungsfilter im Feld **Emission Filter** oder **Excitation Filter**. Ist kein Filterrad aktiviert, wird die Leerposition des Filterrades (100% Transmission) eingestellt.

Abb. 6: Wahl des Anregungsfilters



5. Parameter für die mehrdimensionale Bildaufnahme

Das externe Filtrerrad kann im **High Speed Modus** betrieben werden. In diesem Fall wird die Option **Use sequencer board** markiert (Abb. 15). Wird das ganze Experiment über das High Speed Board gesteuert, wechselt die Farbe des Quadrates vor **Sequencer can control the whole sequence** von rot zu grün.

Durch Anklicken der Schaltfläche „+“ kann ein weiterer Kanal angelegt werden. Mit der Schaltfläche „-“ können Kanäle wieder gelöscht werden. Soll die **Reihenfolge der Kanäle** geändert werden, so kann durch einen Klick mit der rechten Maustaste auf die entsprechende **FCr Schaltfläche** (in diesem Beispiel FCr 1) die Position des Kanals verschoben werden.



Hinweis:

Sie können maximal acht Kanäle definieren.

Durch Anklicken der **FCr Schaltfläche** mit der rechten Maustaste kann der Kanal gespeichert werden. Gespeicherte Kanäle können in dem **Listenfeld** (rechts neben der **FCr Schaltfläche**) aufgerufen werden.

Die Kombination aller Kanäle inklusive deren **Acquisitionsparameter** können im Feld **Load/Save Settings** gespeichert und auch wieder aufgerufen werden.

Abb. 7: Beispiel für ein Experiment mit drei Fluoreszenzkanälen-



5.2 Image Menü

Das Menü **Image** wird zur Einstellung von Kameraparametern genutzt:



Abb. 8: Image Menü

Die wichtigsten zu definierenden Parameter sind hier **Binning** und **Exposure**.

Binning Zur Verbesserung des Signal/Rausch-verhältnisses können Kamerapixel zusammen ausgelesen werden. Bei **Binning 2x2** werden zum Beispiel 4 Pixel (2 Pixel in x-Richtung und 2 Pixel in y-Richtung) zusammengefasst. Die Bildauflösung wird dadurch um den Faktor 4 kleiner. Typischerweise wird hier **Binning 2** oder **None** eingegeben.

Exposure Mit dem Schieber **Exposure** wird die Integrationszeit für jeden Bildkanal separat eingestellt. Um die Bildaufnahme im schnellen Echtzeitmodus (**High Speed**) durchführen zu können, sollte versucht werden, sowohl die Integrationszeit, wie auch **Gain** und **Intensity** für alle Kanäle auf den gleichen Wert eingestellt zu haben.

Gain Ermöglicht die Einstellung der elektronischen Kameraverstärkung.

Intensity Ermöglicht die Einstellung der Lichtintensität im Beleuchtungsstrahlengang. Hierbei wird das interne Filterrad des Leica Mikroskops zur Lichtabschwächung bewegt.

Über die Schaltfläche  kann ein **Live-Histogramm** aktiviert werden. Das Live-Histogramm wird bei Objektiven mit einem Korrekturring als Hilfsmittel für die Korrektur von Bildfehlern genutzt.

5.2.1 Kamera

Wird in der **LAS X** die **high-speed control Box** verwendet, kann die Kamera im **High Speed Mode** (triggergesteuert mit Hilfe des Sequencers) betrieben werden.

Voraussetzung: Die Kamera muss von der high-speed control box unterstützt werden!

Hierbei ist jedoch zu beachten, dass bei allen im High Speed Mode betriebenen Kameras Gain und Binning für alle Aufnahmen der Sequenz gleich ist. Die Intensity-Einstellung kann unterschiedlich sein, falls das externe Leica-Filterrad FFIM im High Speed Modus betrieben wird. Die Option **Use sequencer board** ist markiert (Abb. 9).

5. Parameter für die mehrdimensionale Bildaufnahme

Wird das ganze Experiment über das High Speed Board gesteuert, wechselt die Farbe des Quadrates vor **Sequencer can control the whole sequence** im **Light Path Settings** Menü von rot zu grün.

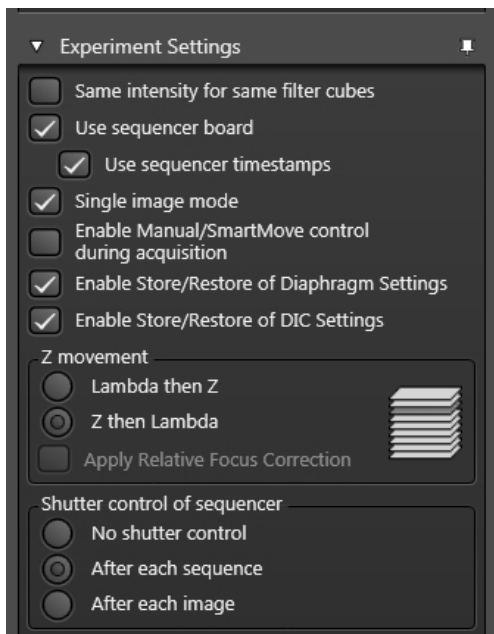


Abb. 9: Experiment Settings

Das Dialogfenster **Experiment Settings** erreichen Sie über das Pfeilsymbol **Acquire** im Register **Acquisition**.

Dies ist dann relevant, wenn mit mehreren Fluorochromen (FCr's) gearbeitet wird. Damit nicht unbeabsichtigt verschiedene Belichtungszeiten verwendet werden, existiert die Option **Same Exposure for all probes**. Eine Änderung der Belichtungszeit für ein Fluorochrom wird automatisch für alle Fluorochrome angewendet:

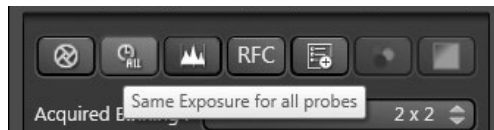


Abb. 10: Same Exposure for all probes

Im Dialogfenster **Experiment Settings** kann außerdem der **Single image mode** aktiviert werden. Die Taste **Single image** erscheint dann am unteren Rand des Arbeitsbereichs. Damit wird ein einzelnes Bild für den aktuellen Kanal aufgenommen. Im Gegensatz dazu wird mit der Taste **Capture Image** ein Bild für jeden definierten Kanal aufgenommen.

Zur Bedienung des Shutters markieren Sie die gewünschte Option bei **Shutter control of sequencer***.

! Achtung!

Beachten Sie die mitgelieferten Betriebsanleitungen zu den einzelnen Komponenten!

* Benötigt high-speed control box

5.2.2 EM CCD Kameras

Zur Einstellung der EM CCD Kamera verwenden Sie die Schieber **Gain** und/oder **EM Gain** im Menü **Image**.

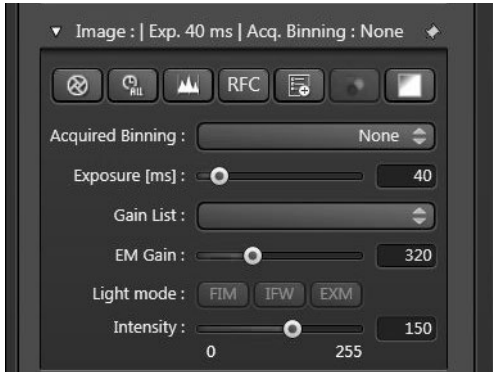


Abb. 11: Menü Image für EM CCD Kameras

! Achtung!

Weitere Spezifikationen und Angaben zu den **EM CCD Kameras** finden Sie in der mitgelieferten Kamera-Betriebsanleitung.

Für die Verwendung des High Speed Mode (= Triggergesteuert mit Hilfe des Sequencers) ist zu beachten, dass bei diesen Kameras Gain, EM-Gain, Binning und Intensity für alle Aufnahmen der Sequenz gleich sein müssen. Intensity kann unterschiedlich sein, wenn das externe Leica-Filterrad FFIM zur Lichtabschwächung verwendet wird.

5.3 z-Menü

Das **z-Menü** wird über die Schaltfläche  aktiviert und dient der **Definition von dreidimensionalen Bildstapeln**:

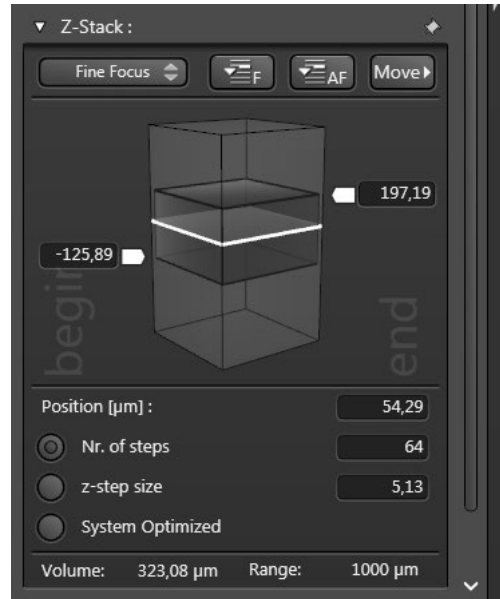


Abb. 12: Definition des z-Stapels

Für einen schnelleren und präziseren Feinfokus werden am Leica AF6000 entweder der **Super Z Galvo Focus*** (objektivunabhängiges Bewegen der Probe in z-Richtung) oder der **Piezofokus*** (bewegen des Objektivs in z-Richtung) genutzt.

Im Aufklappfenster des z-Menüs kann zwischen **Wide Focus** (Mikroskop z-Trieb) oder, falls vorhanden, **Fine Focus** (SuperZ Galvo Focus oder Piezofokus) gewählt werden.

* Benötigt high-speed control box

5. Parameter für die mehrdimensionale Bildaufnahme

5.3.1 Einstellung des Bildstapels über Wide Focus

z-Position wird entweder durch den **z-Trieb** am Mikroskop oder durch den **z-Trieb** des **SmartMove** bewegt. Sobald im Kamera-Livebild die unterste Bildebene erscheint, kann diese **untere z-Ebene** mit der Schaltfläche **Begin** markiert werden. Ist die untere z-Ebene gespeichert, so ist die Schaltfläche **Begin** rot dargestellt. Die **obere z-Ebene** des Bildstapels wird entsprechend mit der Schaltfläche **End** markiert. Die Schaltfläche **Begin** und **End** können sowohl für die obere z-Ebene wie auch für die untere z-Ebene verwendet werden. Die Schaltfläche **Focus** kann zur Speicherung einer **mittleren Bildebene** verwendet werden.



Hinweis:

Die Bildebenen sind gespeichert sobald die entsprechende Schaltfläche (**Begin**, **End** und **Focus**) rot dargestellt sind. Die aktuelle z-Ebene wird durch die ockerfarbene Fläche im z-Menü angezeigt (siehe Abb. 12).

Die **Gesamthöhe des Bildstapels** wird als **z-Volumen** in der unteren Hälfte des z-Menüs angezeigt. Die voreingestellte Schaltfläche **System Optimized** schlägt je nach verwendetem Objektiv die nach dem Abtasttheorem beste **Schrittweite in z** vor. **Schrittweite** oder auch **Anzahl der z-Ebenen** können durch den Anwender überschrieben werden, indem anstatt der Schaltfläche **System Optimized** die Schaltfläche **No. of Steps** aktiviert wird.

* optionales Zubehör. Benötigt Super Z Galvo oder Piezo Focus

5.3.2 Einstellung des Bildstapels über Fine Focus*

Die Einstellung des Bildstapels über **Fine Focus** erfolgt gleich wie bei **Wide Focus** (siehe Kapitel 6.3.1). Anstelle des Mikroskop z-Triebes und des SmartMove wird hier der **Fine Focus** nur über den **Mauszeiger** verstellt. Dabei wird mit der linken Maustaste die ockerfarbene Fläche im z-Menü in die gewünschte Position gebracht.

Mit der Schaltfläche **Go to** können die zuvor definierten Fokusebenen (untere, obere und mittlere) angefahren werden.

5.4 t-Menü



Das **t-Menü** wird über die Schaltfläche aktiviert und dient der **Definition von Zeitreihen**:

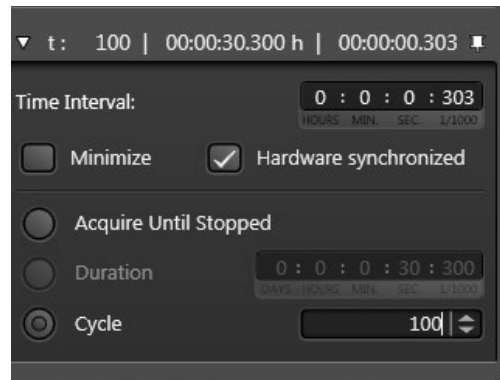


Abb. 13: t-Menü

Hier kann über die Schaltfläche **Cycle** eine feste Anzahl von Zeitpunkten definiert werden. Wird **Duration** ausgewählt, so kann die Gesamtdauer des Experiments vorgegeben werden. Bei der Auswahl von **Acquire until Stopped** wird kein Endzeitpunkt für das Experiment vorgegeben. Der Anwender kann das Experiment zu jedem Zeitpunkt stoppen.

In dem Eingabefeld **Time Interval** wird die Zeitdifferenz zwischen den Zeitpunkten definiert. Ist die Schaltfläche **Minimize** aktiviert, so wird als Zeitintervall die minimale Zeit gewählt, die für die Aufnahme eines Zeitpunkts benötigt wird.

Wird die Schaltfläche **High Speed*** aktiviert, so wird die gesamte Zeitreihe mit Hilfe der high-speed control box in Echtzeit durchgeführt (schnellstmöglicher Mode ohne Pausen zwischen den Bildern). Folgende Voraussetzungen müssen sichergestellt sein:

- Alle Bildkanäle müssen den gleichen Werte für **Gain** und **Intensity** haben. Intensity kann unterschiedlich sein, wenn das externe Leica-Filterrad FFIM zur Lichtabschwächung verwendet wird.
- Alle Bildkanäle müssen den gleichen Filterwürfel bzw. gleiche Kontrastmethode benutzen.
- Im **z-Menü** ist **Fine Focus**** aktiviert (falls ein **z-Bildstapel** aufgenommen werden soll).
- Im **t-Menü** muss **Minimize** aktiviert sein.

Sind diese Voraussetzungen erfüllt, kann das Feld **High Speed** aktiviert werden. Im Menü **Light Path Settings** zeigt ein **grünes Feld** an, dass die **high-speed control box** das gesamte Experiment steuert:

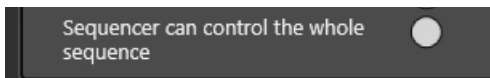


Abb.. 14: Anzeigefeld
"Sequencer can control the whole experiment"

Nach der Aufnahme jedes Bildes müssen die zugehörigen Bilddaten von der Kamera in den Speicher des PC's transferiert werden. Dies kann zwischen 1 und 150ms (abhängig von Kameratyp, Binning, Auflösung, ROI1-Größe und ROI1-Position) dauern.

Von der high-speed control box wird diese Transferzeit genutzt, um alle Aktoren in die für das nächste Bild erforderliche Position zu bewegen. In den meisten Aufnahmesituationen reicht die Kamera-Transferzeit aus, um die neue(n) Positione(n) zu erreichen, in allen anderen Fällen wird die nächste Bildaufnahme entsprechend verzögert.

* nur verfügbar auf Systemen, mit einer high-speed control box

** optionales Zubehör. Benötigt Super Z Galvo oder Piezo Focus

5. Parameter für die mehrdimensionale Bildaufnahme

Folgende Komponenten können von der high-speed control box angesteuert werden (in Klammern die typischerweise erforderlichen Stellzeiten):

- Externe Leica Filterräder
(Umschaltzeit für benachbarte Filterpositionen 27 ms)
- SuperZ FineFocus
(typische Schrittweite $1\text{ }\mu\text{m} = 40\text{ ms}$)
- Piezo FineFocus
(typische Schrittweite $1\text{ }\mu\text{m} = 3\text{ ms}$)
- Leica AM TIRF MC
- Leica EL6000 High Speed Shutter (6 ms)

Um bei der Aufnahme Bildsequenzen nutzen zu können, dürfen in einer Sequenz nur Komponenten verändert werden, die durch die CTR HS high-speed box angesteuert werden können. Folgende Komponenten müssen daher in sequen- cergesteuerten Serien konstant bleiben:

- Objektiv
- Kameratyp/-port
- Nachvergrößerung (MagChanger)
- Kontrast-Methode
- Fluoreszenz-Cube
- Lichtintensität
(außer wenn FFIM mit einem externen Filterrad verwendet wird)
- Binning und Kameragain
- Mikroskopintern Shutter und Filterräder
- Tischposition

Werden für eine dieser Komponenten innerhalb des Experiments unterschiedliche Werte definiert, wechselt das System automatisch in den **Normal** Modus und ermöglicht so die Aufnahme beliebiger Sequenzen.

Das grüne Anzeigefeld (**Light Path Settings** Menü) symbolisiert, dass das definierte Experiment vollständig durch das High Speed Board gesteuert werden kann (Abb. 14).



Hinweise:

Ist dieses Feld rot hinterlegt, können Sie durch linken Mausklick auf das rote Anzeigefeld abfragen, welche Einstellungen geändert werden müssen um zu einem vollständig durch den sequencer gesteuerten Experiment zu kommen.

Bei komplexen Experimenten teilt das System diese bei Eignung selbständig in Teilserien, die dann wieder durch die high-speed box gesteuert ablaufen.

Beispiel: Wird ein Experiment aus mehreren z-Serien unter Verwendung unterschiedlicher Fluoreszenz-Cubes definiert, wird das Statusfeld zwar rot hinterlegt, die einzelnen z-Serien werden dennoch durch die high-speed box gesteuert, also zeitoptimiert aufgenommen.

5.5 Mark and Find

Mark and Find wird über die Schaltfläche  aktiviert und dient der Definition von verschiedenen Tischpositionen für **Multipositionsexperimente**. Sobald eine Tischposition angefahren ist, können deren **x**-, **y**- und **z-Koordinaten** über die Schaltfläche **Mark**



gespeichert werden. Sind mehrere Positionen gespeichert, so können diese über das Aufklappmenü wieder angefahren werden. Sobald das Experiment gestartet wird, werden zu jedem Zeitpunkt einer Zeitreihe alle Positionen angefahren und aufgenommen.



Abb. 15: Mark and Find

5. Parameter für die mehrdimensionale Bildaufnahme

5.6 Tile Scan

5.6.1 Kameraeinstellung für Tile Scan



Hinweis:

Für Tile Scan wird eine korrekt kalibrierte Kamera vorausgesetzt!

Die Kamera muss in Abhängigkeit vom Typ der Kamera und vom verwendeten Port richtig orientiert montiert werden (siehe folgende Tabelle):

Kameratyp	Kameraorientierung am linken, rechten und unteren Port Okularbild = Kamerabild
Andor iXon 897	Kabel nach hinten
Hamamatsu 9100-13	schwarze Kunststoffplatte nach vorne
Hamamatsu 9100-02	schwarze Kunststoffplatte nach vorne
DFC365 FX	Kabel nach hinten
DFC450 (C)	Kabel nach hinten
DFC310 FX	Kabel nach hinten

Ausrichten der Kamera

Sollten Sie feststellen, dass die Ränder des Livebildes nicht parallel zu den Rändern des Bildfensters verlaufen, kann nun eine Feinjustierung der Kamera erfolgen. (Zur Darstellung eines Livebildes siehe Kapitel 7: Erstes Experiment). Gehen Sie dabei folgendermaßen vor:

- Wechseln Sie zum Objektiv mit der höchsten Vergrößerung.
- Fokussieren Sie das mikroskopische Bild.
- Suchen Sie eine markante Objektstelle aus und positionieren Sie diese in der rechten, oberen Ecke des Bildfensters.
- Verfahren Sie den Tisch in X-Richtung, sodass die Objektstelle im Bildfenster nach links verschoben wird.
- Kontrollieren Sie, ob der Abstand zum Rand des Bildfensters gleich bleibt.
Ist dies nicht der Fall, muss die Kamera entsprechend gedreht werden.

5.6.2 Tile Scan Aufnahme

Das Menü **Tile Scan** wird über die Schaltfläche



aktiviert und dient zur Abgrenzung eines Bereiches zum Generieren von zusammengesetzten Übersichtsbildern.

Der Tile Scan Bereich wird durch zwei gegenüberliegende Positionen festgelegt, die den Tile Scan Bereich eindeutig festlegen.

Typischerweise könnte dies der obere rechte Eckpunkt und der untere linke Eckpunkt des zu markierenden Bereiches sein.

Wie im **Mark and Find** Menü werden die Positionen mit Hilfe der Schaltfläche **Mark** definiert:



Ist der Tile Scan Bereich festgelegt, so erscheint im Feld **Scan Field** die Anzahl der Bilder, die benötigt werden, um den zuvor definierten Scanbereich abzudecken. Die Schaltfläche **Merge Image** sollte immer aktiviert sein, um die aufgenommenen einzelnen Bilder zu einem Tile Scan Bild zu verknüpfen:

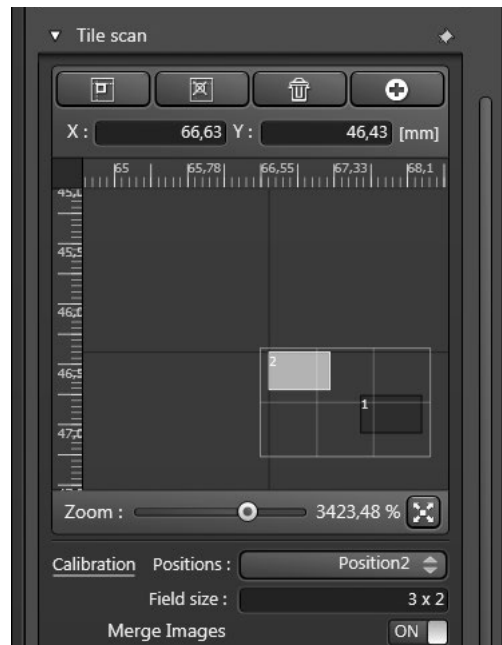


Abb. 16: Tile Scan

5. Parameter für die mehrdimensionale Bildaufnahme

Falls die einzelnen Bilder nicht richtig zusammengefügt sind, kann es notwendig sein, die Bilder horizontal oder vertikal zu vertauschen.

Dazu klicken Sie auf die Schaltfläche **Configurations**:



Das Menü **Stage Configuration** wird nun geöffnet (Abb. 17).

Wählen Sie die Option **Custom** unter **Set merge settings to** und markieren Sie die passende Option **Swap images horizontal** or **Swap images vertical**.

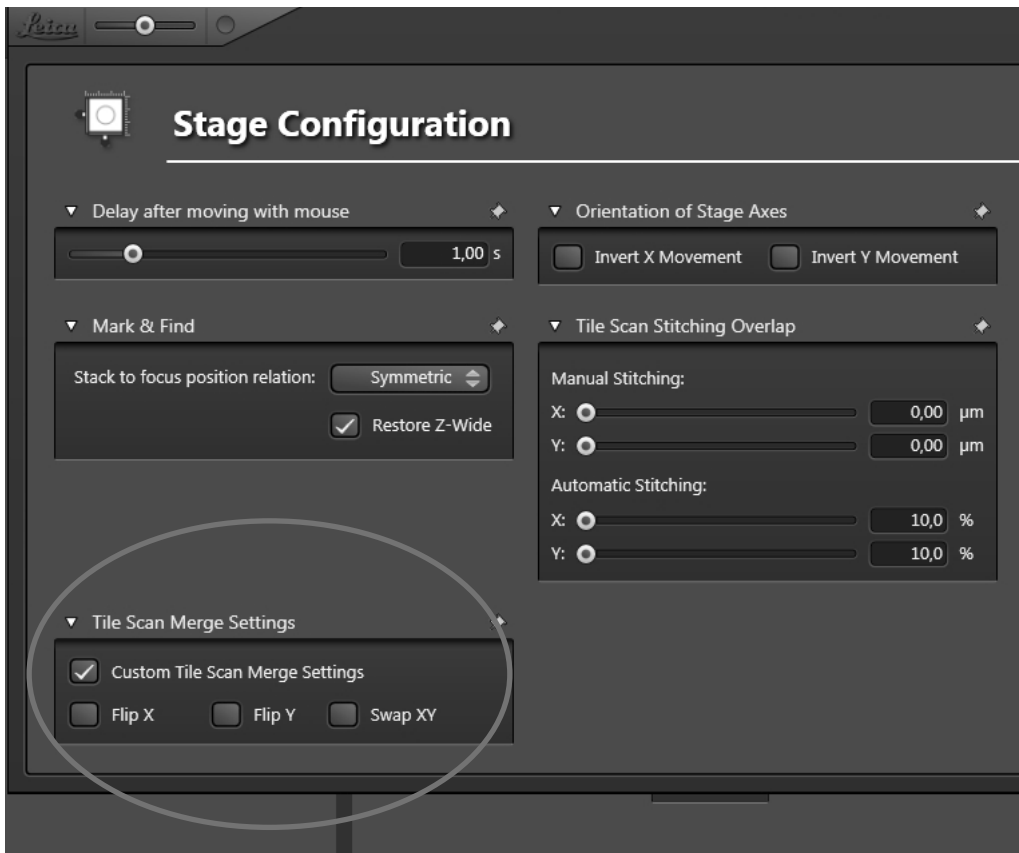


Abb. 17: Stage configuration

6. ERSTES EXPERIMENT

Das Kapitel „Erstes Experiment“ soll Ihnen einen Überblick über die Leistungsfähigkeit der Leica LAS X verschaffen und Ihnen zeigen, wie Sie schnell die ersten Bilder aufnehmen können. Im folgenden Beispiel wird die Probe „Convallaria“ verwendet, welche mit den zwei Farbstoffen Saffranin und Fast Green eingefärbt ist. Dabei gehen wir die einfachsten Einstellungen durch und führen einen schnellen xyzλ-Scan aus. Beim Ersten Experiment werden an einer Tischposition für beide Fluorochrome Bilderstapel aufgenommen. Für die Einstellung der z-Positionen wird der FineFocus (Piezo* oder SuperZ*) verwendet. Im Folgenden wird der allgemeine Arbeitsablauf für solch ein Experiment aufgezeigt. Eine ausführliche Beschreibung der abgebildeten Dialogfenster und der Softwarefunktionen finden Sie in der Onlinehilfe der LAS X.



Hinweis:

Beachten Sie, dass alle Angaben Richtwerte sind. Abhängig von der Probe können die Werte und Einstellungen abweichen.

6.1 Konfiguration

Für das Experiment sollte ein 40x oder 63x Objektiv verwendet werden. Optimal geeignet ist das LiveCell-Objektiv HCX PL APO 63x/1.30 GLYC CORR 37°C. Als Filtercube ist der BGR Cube 11600197 „Filtersystem B/G/R; HP; size“K““ zu verwenden.

6.2 System einschalten und Software starten

- Schalten Sie das System ein.
Beachten Sie dabei die vorgeschriebene Einschaltreihenfolge (siehe Kapitel 5 Starten der Leica LAS X).
- Starten Sie die Software LAS X durch Anklicken des entsprechenden Symbols auf dem Desktop oder durch Auswahl im Startmenü.



- Um den xy-Tisch zu initialisieren wählen Sie bei folgender Meldung **Yes** aus:

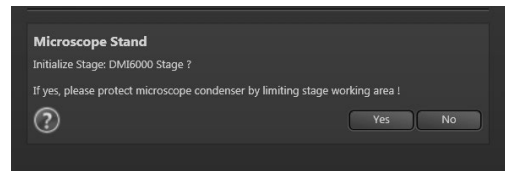


Abb. 18: LAS X Stage-Initialisierung

* optionales Zubehör. Benötigt high-speed control box

6. Erstes Experiment

- Wenn Sie das folgende Dialogfenster sehen, ist die Software gestartet und einsatzbereit:

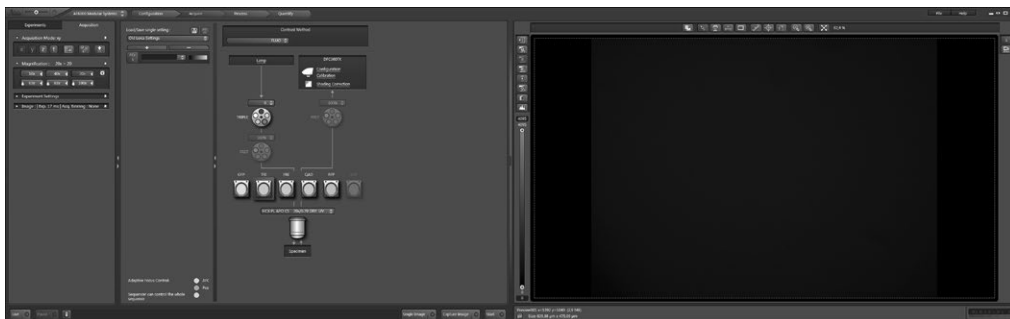


Abb. 19: Benutzeroberfläche LAS X

6.3 Probenausschnitt wählen und fokussieren

- Wählen Sie als Kontrastverfahren TL-BF (Hellfeld) aus.

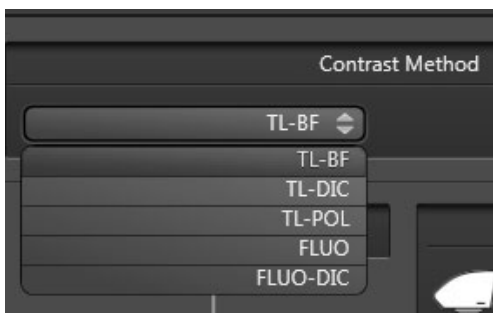


Abb. 20: Kontrastverfahren

- Klicken Sie auf das Register **Setup**.
- Wenn vorhanden sollte das Objektiv **HCX PL APO 63x/1.30 GLYC CORR 37°C** ausgewählt werden, andernfalls ein 40x oder 63x Objektiv:



Abb. 21: Objektivauswahl

- Legen Sie die Probe auf den xy-Tisch (gegebenenfalls unter Verwendung von einem Immersionsmedium).
- Schalten Sie das Licht auf die Okulare und stellen Sie das Bild direkt am Mikroskop ein.



Hinweis:

Um das Licht auf die Kamera umzuschalten, klicken Sie auf die Schaltfläche **Live**, so dass ein Bild direkt auf dem Monitor zu sehen ist.

6. Erstes Experiment

6.4 Auflösung der Kamera

- Klicken Sie im Dialogfenster **Light Path Settings** auf **Configuration**:

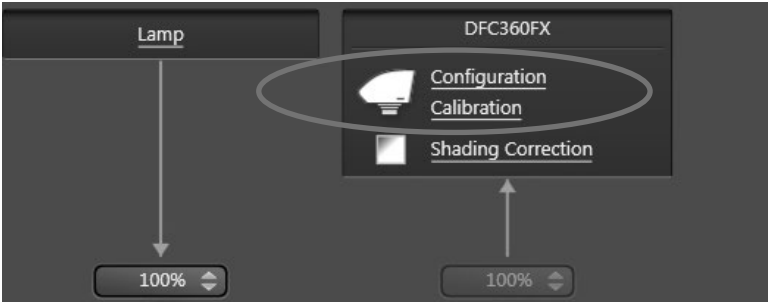


Abb. 22: Kamerakonfiguration

- Wählen Sie unter **Set Digitization to** (23.1) den Wert **12 Bit** (bei Verwendung der Cascade Kamera wählen Sie 16 Bit) aus. Schließen Sie das Fenster indem Sie auf das **X** klicken. Die Einstellungen werden automatisch übernommen.

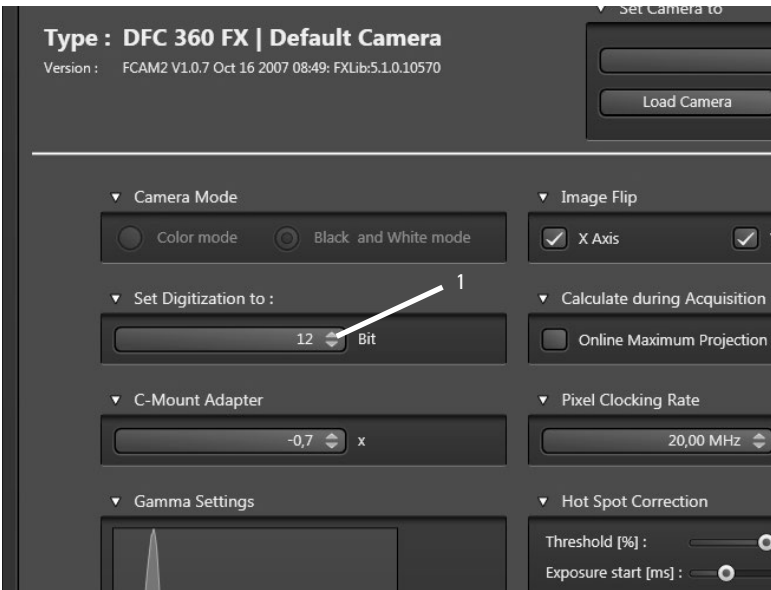


Abb. 23: Kamerakonfiguration

6.5 Aufnahmemodus

- Klicken Sie auf das Pfeilsymbol **Acquire**:



Abb. 24: Pfeilsymbol Acquire

- Klicken Sie auf das Register **Acquisition**:

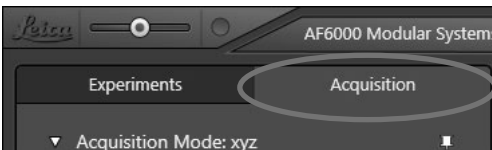


Abb. 25: Register Acquisition

- Unter **Acquisition Mode** wählen Sie zusätzlich zu **x**, **y** die Schaltfläche **z** aus. Die Akquisitionsparameter **x** und **y** sind immer aktiv.

Ausgewählte und damit aktive Felder sind wie in diesem Beispiel rot unterlegt. Wenn Sie erneut auf die gleiche Schaltfläche klicken, wird dieses wieder schwarz unterlegt. Schwarze Symbole sind nicht ausgewählt und damit auch nicht aktiv (in diesem Beispiel ist die Schaltfläche **t** nicht aktiv).

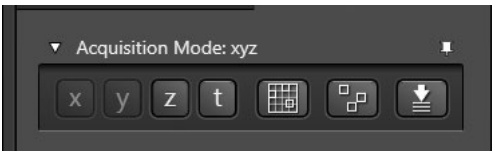


Abb. 26: Acquisition Mode xyz

6.5.1 EL6000 Variante

Bei Verwendung der EL6000 wird die Wellenlänge über einen Filter Cube, über das im Mikroskop integrierte Filterrad (IFW) oder über externe Filterräder (EFW) eingestellt.

- Wählen Sie aus der Liste (27.1) im Menü **Light Path Settings** unter **Contrast Method** die Option **FLUO**.

Filterwahl für EFW:

- Wählen Sie **TRI** als **Filter Cube**.
- Die Wahl des Filter Cubes im Menü **Light Path Settings** (27.4) aktiviert das zugehörige Filterrad.
Achtung: Das passende Filterrad muss zuvor in den Beleuchtungsstrahlengang eingeschwenkt sein!

- Wählen Sie nun das Anregungsfilter **G** im Feld **Excitation Filter** (29).



-

- Wählen Sie **BGR** als **Filter Cube** und die Intensity Stellung **G**:



Ist das System mit externem **FFIM** ausgerüstet, wird die Transmission immer über den Intensitätsschieber im **Menü Image** gesteuert (in 5 Stufen). Das interne Filterrad des Mikroskops wird in diesem Fall auf 100% Transmission eingestellt.

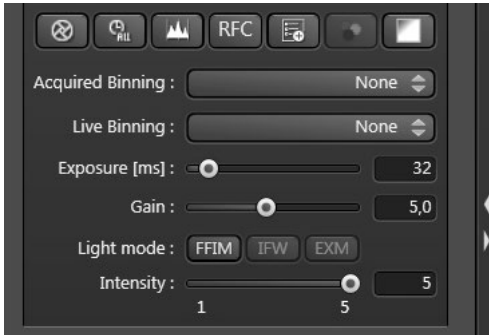


Abb. 30: Transmissionseinstellung für FFIM

Stufen für FFIM:

100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%



Achtung!

Um Ihre Probe zu schonen, sollten Sie die Lichtintensität der EL6000 auf die kleinste Stufe einstellen.

- Stellen Sie im **Image-Dialog** die Werte ein:
Binning:
Exposure:
Gain:



Abb. 31: Image-Dialog

- Um das Bild direkt auf dem Monitor betrachten zu können, klicken Sie auf **Live**:

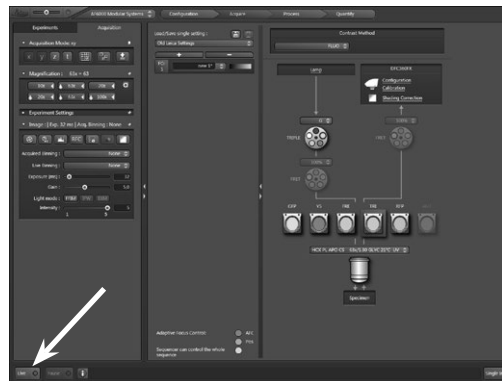


Abb. 32: Schaltfläche Live bzw. Stop

6. Erstes Experiment

- Nun sehen Sie im Ansichtsfenster **Viewer** das Live-Bild auf Ihrem Bildschirm (siehe Abb. 33).

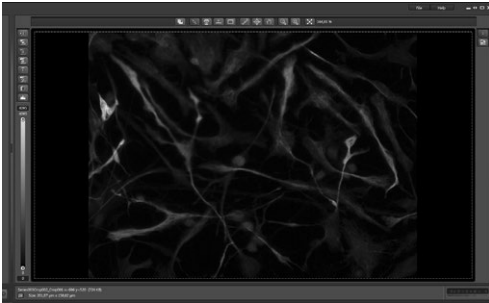


Abb. 33: Aufnahmeabbildung im Ansichtsfenster



Hinweis:

Bewegen Sie die Probe mit SmartMove* in die gewünschte Position. Für die spätere Bildbearbeitung ist es vorteilhaft, wenn Sie relativ kleine Zellen mit vielen Stärkekörnern (helle Punkte innerhalb der Zellen) verwenden. Sollten Sie keine Stärkekörner finden, fokussieren Sie eine andere Ebene der Probe und versuchen Sie es erneut.

6.6 Bildoptimierung

- Optimieren Sie die Bildqualität durch Einstellung der Belichtungszeit, indem Sie den **Exposure**-Schieber im Menü **Image** langsam nach links und rechts verschieben. Für eine neue Convallaria-Probe ergeben sich erfahrungsgemäß Belichtungswerte von 100 ms bis 200 ms. Beobachten Sie dabei die Veränderungen in der Bildqualität:

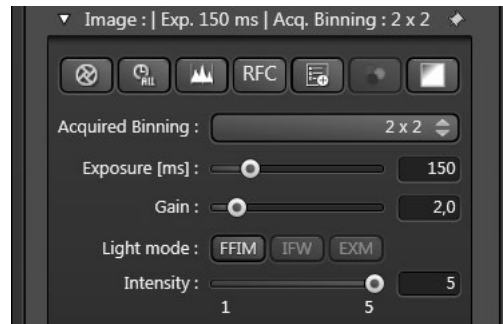


Abb. 34: Menü Image



Achtung!

Um Ihre Probe zu schonen, sollten Sie die Belichtungszeit reduzieren.

- Wenn Sie die gewünschte Bildqualität erreicht haben, klicken Sie auf **Stop**:



Abb. 35: Live oder Stop Button

* optionales Zubehör

6.7 Farbe (LUT) festlegen



Hinweis:

Die Probe **Convallaria** ist mit zwei Farbstoffen (**Safranin/Fast Green**) eingefärbt. Deshalb erläutern wir in diesem Beispiel zwei Fluorochromeinstellungen (FCr1 und FCr2).

- In diesem Beispiel ist unter **FCr1** die Farbe **Grün** ausgewählt. Durch das Anklicken der Schaltfläche für die Farbpalette (36.1) können Sie die gewünschte Farbe (36.2) auswählen. Bestätigen Sie die Auswahl mit Doppelklick der linken Maustaste:

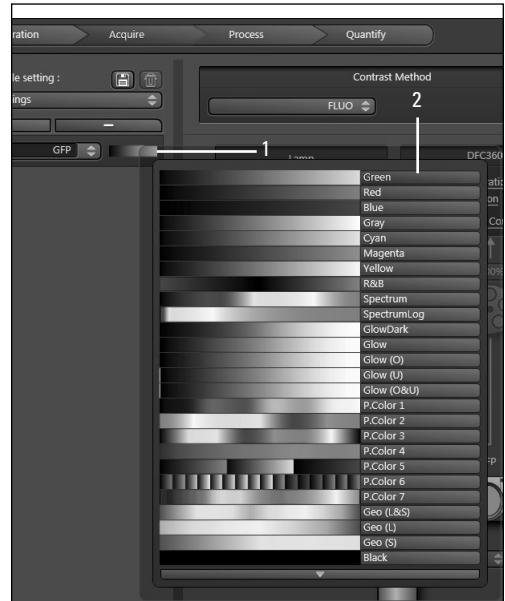


Abb. 36: Farbpalette

- Klicken Sie nun in das Textfeld und vergeben Sie einen Namen für das **FCr1** (in diesem Beispiel **GFP**):



Abb. 37: Textfeld



- Um alle Einstellungen zum **FCr1** zu speichern klicken Sie mit der **rechten Maustaste** auf das **FCr1** Feld (38.1) und dann auf **Save** (38.2):



Abb. 38: Einstellungen sichern

6. Erstes Experiment

- Sie werden erneut aufgefordert einen Namen zu vergeben. Verwenden Sie den gleichen Namen wie in Abb. 37 und bestätigen Sie mit **OK**:

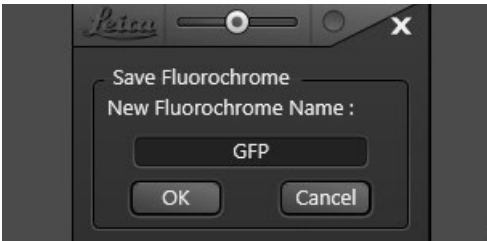


Abb. 39: Benennung bestätigen

6.8 Einstellungen für weitere Fluorochrome

- Um Einstellungen für ein weiteres Fluorochrom festzulegen, klicken Sie auf das Symbol **+**. Dadurch wird das FCr2 erzeugt:



Abb. 40: Fluorochrome hinzufügen

Gehen Sie bei der Konfiguration von FCr2 wie bei FCr1 vor:

- Als **Contrast Method** bleibt **FLUO** ausgewählt.
- Bei Verwendung des EFW, bleibt der **Filter Cube TRI** ausgewählt.
- Bei Verwendung des IFW, bleibt **BGR** als **Filter Cube** ausgewählt.
- Im Menü **Image** wird als Intensity-Einstellung **R** (für IFW) gewählt oder es wird die Filterradposition **R** (EFW) im Menü **Light Path Settings** ausgewählt.
- Um das Bild direkt auf dem Monitor betrachten zu können, klicken Sie auf die Schaltfläche **Live**.
- Falls Sie die Bildqualität optimieren möchten, gehen Sie wie im Kapitel 6.6 Bildoptimierung vor.
- Wählen Sie die darzustellende Farbe aus (hier im Beispiel rot, 41.1) und vergeben Sie für **FCr2** einen Namen (41.2):

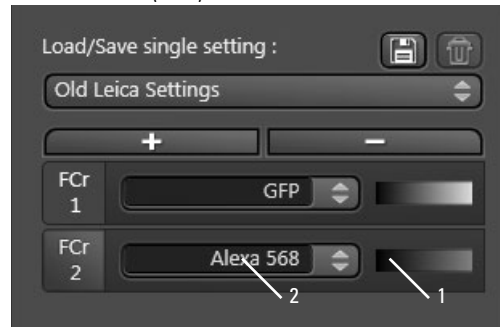


Abb. 41: Farb- und Namenvergabe

- Speichern Sie die Einstellungen, indem Sie mit der **rechten Maustaste** auf **FCr2** (42.1) klicken und dann **Save** (42.2) anklicken:

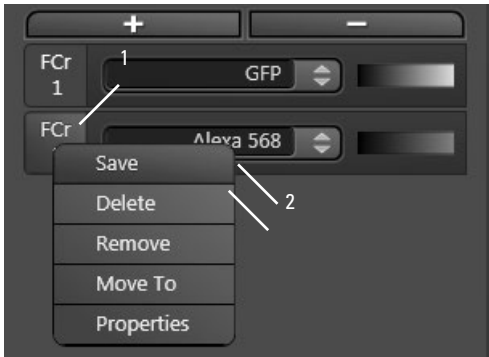


Abb. 42: Einstellungen sichern

- Geben Sie einen Namen ein und bestätigen Sie mit **OK**.
- Um die Bildaufnahme zu starten, klicken Sie auf **Capture Image**.

Damit haben Sie FCr1 und FCr2 definiert und die Einstellungen für diese zwei Fluorochrome gesichert. Nun können Sie mit der Bildaufnahme fortfahren.

6.9 3D-Bildstapel aufnehmen

Sie können im Listenfeld des z-Menüs zwischen **Wide Focus** (Mikroskop z-Trieb) oder falls vorhanden **Fine Focus** (SuperZ-Galvo* Focus oder Piezofokus*) wählen:

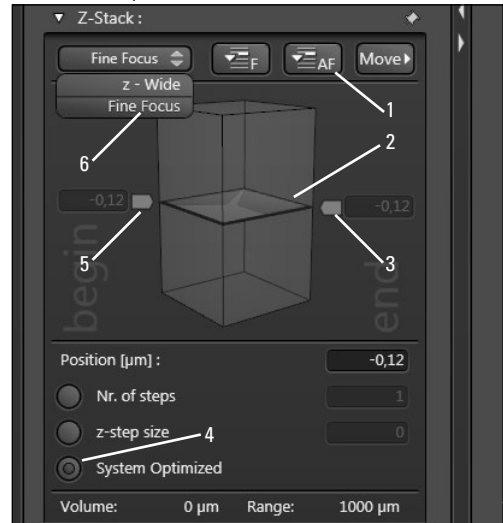


Abb. 43: z-Stack

Beispiel für Feinfokus:

- Wählen Sie im Listenfeld **Fine Focus** (43.6) aus.
- Klicken Sie auf **Live** um das Bild direkt auf dem Monitor betrachten zu können.
- Stellen Sie sicher, dass das Bild scharf gestellt ist.
- Durch das Anklicken der Schaltfläche **Focus** (43.1) wird die aktuelle **z-Position** gespeichert.
- Zur Definition der oberen Position des Z-Stapels führen Sie den Mauszeiger zur ockerfarbenen Fläche (43.2) und ziehen diese mit gedrückter linker Maustaste nach oben. Die Veränderung der z-Position lässt sich im Live-Bild direkt verfolgen.

* optionales Zubehör. Benötigt high-speed control box i

6. Erstes Experiment

- Sobald im Kamera Livebild die gewünschte obere Bildebene erscheint, markieren Sie diese durch Anklicken der Schaltfläche **Begin** (43.5).
- Ziehen Sie nun die ockerfarbene Fläche (43.2) mit gedrückter linker Maustaste bis zur gewünschten Position nach unten und markieren Sie diese durch Anklicken der Schaltfläche **End** (43.3).

Beispiel für z-Wide:

- Wählen Sie im Listenfeld **z-Wide** (53.6) aus.
- Klicken Sie auf **Live** um das Bild direkt auf dem Monitor betrachten zu können.
- Stellen Sie sicher, dass das Bild scharf gestellt ist.
- Durch das Anklicken der Schaltfläche **Focus** (43.1) wird die aktuelle **z-Position** gespeichert.
- Zur Definition der oberen Position des Z-Stapels betätigen Sie den Mikroskop-Z-Trieb bis die gewünschte obere Grenze erreicht ist. Die Veränderung der z-Position lässt sich im Live-Bild direkt verfolgen.
- Sobald im Kamera Livebild die gewünschte obere Bildebene erscheint, markieren Sie diese durch Anklicken der Schaltfläche **Begin** (43.5).
- Betätigen Sie nun den Mikroskop-Z-Trieb bis die gewünschte untere Grenze erreicht ist und markieren Sie diese durch Anklicken der Schaltfläche **End** (43.3).



Hinweis:

Zur Definition des Bildstapels empfehlen wir bei der Verwendung des 63er Objektivs ca. 100 bis 200 Bildebenen (Schnitte) zu verwenden. Bei einem 40er Objektiv empfehlen wir 100 bis 150 Bildebenen.

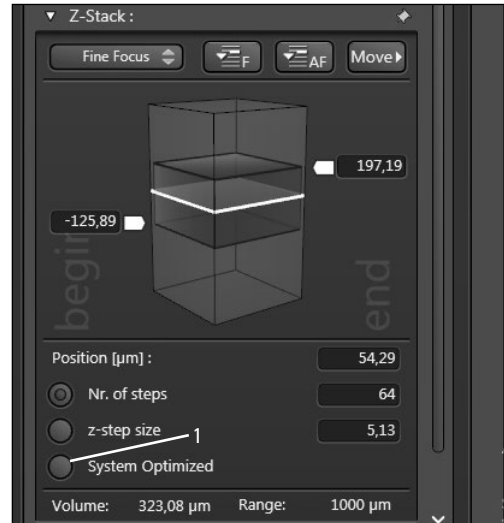


Abb. 44: z-Stack

- Wählen Sie die Option **System Optimized** (44.1).
- Zum Starten der Bildakquise klicken Sie auf die Schaltfläche **Start**.



Hinweis:

Die gespeicherte Bildserie finden Sie unter **Acquire** → **Experiments** (Abb. 45). Hier werden ebenfalls die durch Bildbearbeitung erstellten Bilddaten abgelegt.



Abb. 45: Experiments



Hinweis:

Die Aufnahmen werden durch das Anklicken von **Start** gestartet und enden (falls so vorgegeben) automatisch. Sie können die Aufnahmen jederzeit durch das Anklicken von **Stop** anhalten.



Hinweis:

Sichern Sie die aufgenommenen Bilder direkt nach der Aufnahme, bevor Sie eine neue Aufnahme starten, die Bilddaten weiter prozessieren bzw. bevor sie die LAS X verlassen. Neben dem Speichern der Daten auf die Festplatte sollten Sie in regelmäßigen Abständen die Daten zusätzlich auf einem geeigneten Datenträger sichern/archivieren.



Hinweis:

Bei einem Softwareabsturz gehen die Bilddaten nicht verloren.

7. INDEX

B

Betriebsanleitung 4
Hinweise 4

C

Copyrights 2

E

Einschalten 8
Erstes Experiment
 3D-Bildstapel aufnehmen 37
 Auflösung der Kamera 30
 Aufnahmemodus 31
 Bildoptimierung 34
 Einstellungen für weitere
 Fluorochrome 36
 Farbe (LUT) festlegen 35
 Konfiguration 27
 Probenausschnitt wählen
 und fokussieren 28
 Software starten 27
 System einschalten 27

L

LAS X
 Aufbau der Benutzeroberfläche 10
 Onlinehilfe aufrufen 8
 Volltextsuche 9
Leica LAS X 7

M

Mehrdimensionale Bildaufnahme 12

O

Onlinehilfe 8
 Einführung 8

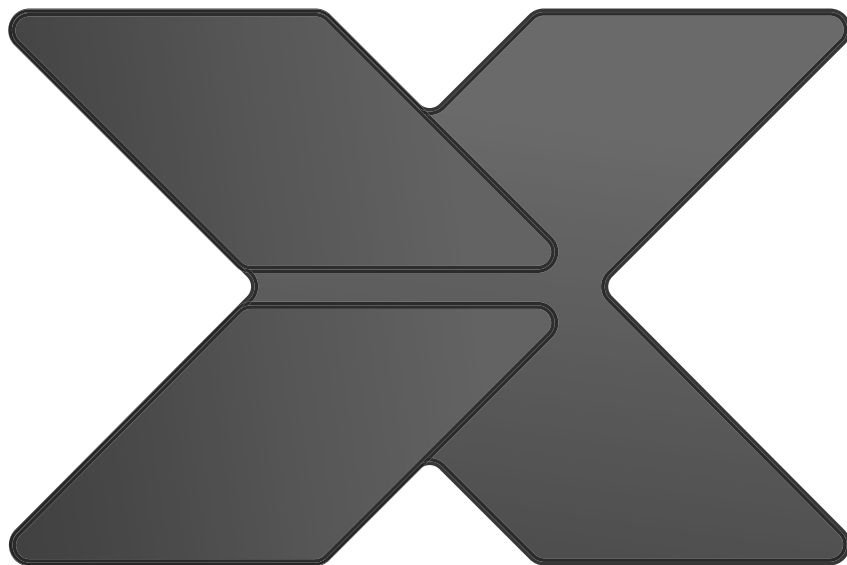
S

Sicherheitshinweise
 Bedeutung 5
Systemüberblick
 Dongle 7

Z

Zweckbestimmung 6

From Eye to Insight



LEICA LAS X

Logiciel d'imagerie microscopique et d'analyse pour micros-
copes à champ large
Mode d'emploi pour

Leica Microsystems CMS GmbH. Mode d'emploi pour, 11934003, édition révisée 1.2, 2017-01-05



DROITS D'AUTEUR

Les consignes figurant dans la présente documentation reposent sur l'état actuel de la technique. Nous avons rédigé les textes et élaboré les illustrations avec le plus grand soin. Toutefois, nous n'assumons aucune responsabilité, quelle qu'elle soit, pour l'exactitude du contenu de ce manuel. Si vous souhaitez faire des commentaires sur ce manuel d'utilisation ou sur notre documentation en général, nous recevrons vos suggestions avec plaisir. Les informations contenues dans le présent mode d'emploi sont susceptibles d'être modifiées à tout moment sans préavis.

Leica Microsystems CMS GmbH est détenteur de tous les droits d'auteur de cette documentation. L'adaptation, la traduction et la reproduction du texte et des figures – même partielle – par impression, photocopie, microfilm ou autres procédures, dont celles impliquant des systèmes électroniques, ne sont permises qu'avec l'autorisation expresse et écrite de Leica Microsystems CMS GmbH.

Les programmes tels que LAS et LAS X sont protégés par des lois sur les droits d'auteur (Copyright). Tous droits réservés. Toute reproduction, adaptation ou traduction de ces programmes est interdite sans autorisation écrite préalable de Leica Microsystems CMS GmbH.

Le terme Windows peut figurer dans ce document, sans indication spécifique. Il s'agit d'une marque déposée de Microsoft Corporation. Sinon, même si des noms de marques sont utilisés sans mention particulière, l'on ne peut en déduire pour autant que leur utilisation est libre. Tous les autres noms de marque et noms de produit mentionnés dans ce document sont des marques, marques de prestation de services, marques de fabrique ou marques déposées des fabricants respectifs.

Rév. 1.2, publiée en 2017-01-05 par :

Leica Microsystems CMS GmbH
Ernst-Leitz-Straße 17-37
D-35578 Wetzlar (Allemagne)
www.leica-microsystems.com

Responsable du contenu rédactionnel :
Marketing CMS

TABLE DES MATIÈRES

1. Remarques importantes concernant ce mode d'emploi	4	6. Première expérience	27
2. Champ d'application	6	6.1 Configuration	27
3. Le logiciel Leica LAS X	7	6.2 Mise en marche du système et démarrage du logiciel	27
3.1 Description	7	6.3 Choix du détail de l'échantillon et mise au point	28
3.2 Dongle	7	6.4 Résolution de la caméra	30
4. Démarrage du logiciel Leica LAS X	8	6.5 Mode d'acquisition	31
4.1 Ouverture de Leica LAS X	8	6.5.1 Variante EL6000	31
4.2 Appel de l'aide en ligne	8	6.6 Optimisation de l'image	34
4.3 Recherche en texte intégral par mot-clés avec liens logiques	9	6.7 Détermination de la couleur (LUT)	35
4.4 Organisation générale de l'interface utilisateur	10	6.8 Réglages pour d'autres fluorochromes	36
5. Paramétrage pour l'acquisition d'image pluri-dimensionnelle	12	6.9 Acquisition de la pile d'images 3D	37
5.1 Light Path Settings	13	7. Index	40
5.2 Menu Image	17		
5.2.1 Caméra numérique	17		
5.2.2 Caméras EM-CCD	19		
5.3 Menu z	19		
5.3.1 Réglage de la pile d'images avec Wide Focus	20		
5.3.2 Réglage de la pile d'images avec Fine Focus*	20		
5.4 Menu t	20		
5.5 Mark and Find	23		
5.6 Tile Scan	24		
5.6.1 Réglage de la caméra pour Tile Scan	24		
5.6.2 Acquisition Tile Scan	25		

1. Remarques importantes concernant ce mode d'emploi

1. REMARQUES IMPORTANTES CONCERNANT CE MODE D'EMPLOI



Attention !

Ce mode d'emploi est un élément essentiel du logiciel Leica LAS X et il convient de le lire attentivement avant la mise en service et l'utilisation. Lisez également le mode d'emploi du microscope respectif, des composants et accessoires.

Une attention particulière est portée aux consignes de sécurité qui doivent être strictement observées lors du travail avec le logiciel Leica LAS X.

Pour cette raison, conservez soigneusement ce mode d'emploi.

Le présent mode d'emploi vous montre les premiers pas pour le démarrage du système et vous fournit une description des fonctions de base du logiciel Leica Application Suite X (LAS X).

Pour les descriptions complémentaires des fonctions logicielles, nous renvoyons à l'aide en ligne du logiciel LAS X dans laquelle vous trouverez les explications les plus récentes sur les fonctions logicielles correspondantes.

Le chapitre 5 de LAS X vous aidera à vous initier à la structure et à l'utilisation de l'aide en ligne.

1. Remarques importantes concernant ce mode d'emploi

Symboles utilisés dans le texte, pictogrammes et leur utilisation :

(1.2)

Les chiffres entre parenthèses, p. ex. (1.2), se réfèrent aux figures, dans l'exemple cité : fig. 1, pos. 2.

→ p. 20

Les chiffres avec balise, par exemple →p. 20, indiquent une page précise de ce mode d'emploi.



Attention !

Les consignes de sécurité spécifiques sont sur fond gris ; elles sont identifiées par le triangle adjacent.



Attention ! Une fausse manœuvre peut endommager le microscope ou ses accessoires.



Explication.



Cette position ne fait pas partie de tous les équipements.

2. Champ d'application

2. CHAMP D'APPLICATION

Fonction

Ce logiciel a été développé pour observer et documenter des représentations d'échantillons agrandies qui ont été acquises avec des microscopes Leica lors de divers travaux de routine et applications de recherche.

Ce produit n'est pas considéré comme un dispositif médical ou un dispositif de diagnostic in vitro.

N'utilisez pas ce produit pour d'autres fonctions que les fonctions prévues.

Ce logiciel est destiné à être utilisé avec les microscopes Leica.



Attention !

Le fabricant décline toute responsabilité pour toute utilisation non conforme et toute utilisation hors des spécifications de Leica Microsystems CMS GmbH, ainsi que pour les risques éventuels qui peuvent en résulter.

Critères de qualité

L'on attend d'un laboratoire utilisant le logiciel LAS X qu'il travaille conformément aux directives couvrant (entre autres) les domaines suivants : formation des utilisateurs, développement et validation des essais, et audits externes des tests menés par le laboratoire.

Les méthodes d'application doivent être contrôlées et documentées avant l'implémentation du logiciel. Il convient d'introduire des procédures normalisées de fonctionnement (PNF) pour les méthodes d'analyse.

3. LE LOGICIEL LEICA LAS X

3.1 Description

Le logiciel Leica LAS X offre des solutions pour divers niveaux d'application.

Chaque solution est extensible et permet de combiner de multiples façons les modules matériels et logiciels de Leica Microsystems CMS GmbH.

Le système global intègre les technologies d'imagerie les plus modernes, qui sont parfaitement harmonisées pour l'obtention de résultats rapides de très haute qualité.



Remarque :

Le fabricant décline toute responsabilité pour toute utilisation non conforme et toute utilisation hors des spécifications de Leica Microsystems CMS GmbH, ainsi que pour les éventuels risques qui peuvent en résulter. En pareil cas, la déclaration de conformité UE perd sa validité.



Attention !

Observez impérativement le mode d'emploi fourni avec le microscope Leica.



Attention !

N'installez aucun autre matériel ou logiciel sur l'ordinateur de contrôle, car cela pourrait causer au système un grave dommage matériel ou provoquer une perte de données. Adressez-vous le cas échéant au service technique de Leica Microsystems CMS GmbH.



Attention !

Pour éviter de perdre des données, sauvegardez régulièrement vos données et vos images sur un support de données approprié.

De même, sauvegardez impérativement vos données avant chaque intervention de service après-vente et chaque réparation ! Leica Microsystems CMS GmbH n'est pas responsable en cas de pertes de données.



Remarque :

Le logiciel LAS permet de configurer le microscope. Vous trouverez d'autres instructions dans le mode d'emploi du microscope.

3.2 Dongle

Pour que le logiciel et le système puissent fonctionner, nous vous livrons avec le système une clé USB de protection (dongle) qui permet d'activer le logiciel. Ne retirez la clé USB de protection que si vous souhaitez empêcher le démarrage du logiciel.

4. Démarrage du logiciel Leica LAS X

4. DÉMARRAGE DU LOGICIEL LEICA LAS X

4.1 Ouverture de Leica LAS X



Attention !

Ne lancez le logiciel qu'après avoir allumé le microscope et tous les autres composants !

- Démarrez le logiciel en cliquant sur l'icône LAS X du bureau :



Fig. 1 : icône LAS X du bureau

Le logiciel Leica LAS X est prêt à fonctionner.

4.2 Appel de l'aide en ligne

L'appel de l'aide en ligne peut s'effectuer de trois façons différentes :

- Dans le contexte respectif (contextuel)
- Au moyen du menu Help
- Avec la combinaison de touches CTRL + F1

Dans le contexte respectif (contextuel)

Cliquez sur le petit point d'interrogation situé dans l'angle supérieur droit de chaque boîte de dialogue.

L'aide en ligne s'ouvre avec la description de la fonction correspondante.

Au moyen du menu Help

Cliquez dans la barre de menus sur la commande Help. Le menu s'ouvre vers le bas et présente différentes options de recherche, dont :

Contents Cette boîte de dialogue contient le répertoire sous une forme arborescente qui peut être développée ou réduite.

Double-cliquez sur une entrée du répertoire afin d'afficher les informations correspondantes.

Index Entrez le terme que vous voulez chercher. L'aide en ligne vous indique le mot-vedette qui se rapproche le plus du terme indiqué.

Sélectionnez un mot-vedette. Faites un double clic pour accéder aux pages d'aide correspondantes ou appuyez sur le bouton Display.

Search Entrez le terme ou l'expression à rechercher et cliquez sur le bouton LIST TOPICS (afficher les sujets). À présent, une liste de sujets à structure hiérarchique s'affiche.

About Ouvre la boîte de dialogue **User Configuration**, dans laquelle vous pouvez notamment sélectionner la langue d'affichage de l'aide en ligne.

4.3 Recherche en texte intégral par mot-clés avec liens logiques

En cliquant dans l'onglet Search sur le triangle situé à droite de la fenêtre de saisie, vous faites s'afficher les opérateurs logiques.

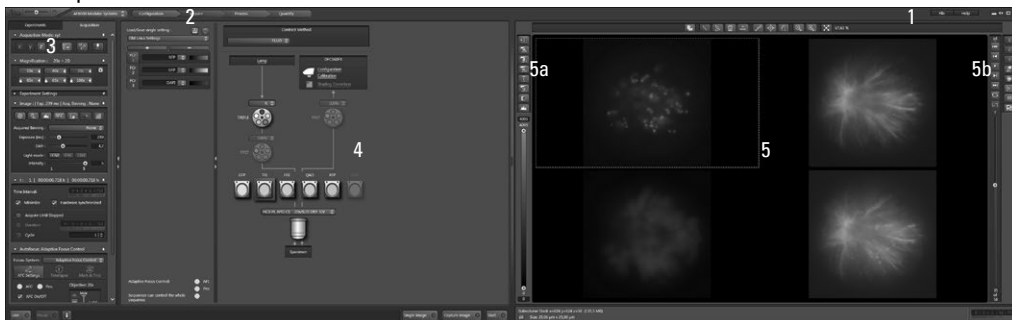
- Sélectionnez l'opérateur correspondant.
- À la suite de l'opérateur, entrez le deuxième mot-clé que vous voulez associer au premier mot-clé.

Exemples	Résultat
Diaphragme à trou AND coupes	Cette expression recherche les rubriques d'aide contenant à la fois le terme « diaphragme à trou » et le terme « coupes ».
Diaphragme à trou OR coupes	Cette expression recherche les rubriques d'aide contenant soit le terme « diaphragme à trou », soit le terme « coupes », ou les deux.
Diaphragme à trou NEAR coupes	Cette expression recherche les rubriques d'aide dans lesquelles le terme « diaphragme à trou » et le terme « coupes » se situent dans un rayon de recherche déterminé. En outre, la fonction recherche aussi les termes ayant une orthographe similaire.
Diaphragme à trou NOT coupes	Cette expression recherche les rubriques d'aide contenant le terme « diaphragme à trou », mais pas le terme « coupes ».

4. Démarrage du logiciel Leica LAS X

4.4 Organisation générale de l'interface utilisateur

L'interface utilisateur du logiciel LAS X se divise en cinq zones :



(1) Ligne de menu et zone de sélection du mode de service/assistant :

Vous disposez ici des divers menus permettant l'appel de fonctions :

- File
- Help

et le **Wizard** avec :

- Main
- Live Data Mode
- FRET SE
- HCS A (MatrixScreener) pour High Content Screening

(2) Icônes en forme de flèche : étapes de travail avec les fonctions individuelles. Ces étapes de travail reflètent le déroulement typique d'une acquisition d'image et du traitement d'image consécutif. Les fonctions ont été regroupées en fonction de ces étapes de travail.

- Configuration
- Acquire
- Process
- Quantify

(3) Barre d'onglets : à chaque étape de travail (icône en forme de flèche) correspondent différents onglets dans lesquels il est possible d'effectuer les réglages pour l'expérience ou de sélectionner des données d'images.

Acquire Experiments : arborescence des fichiers contenus dans la mémoire principale (RAM)

Setup : réglages matériels pour l'expérience actuelle

Acquisition : paramètres pour l'acquisition d'image

Process Experiments : arborescence des fichiers contenus en mémoire (RAM)

Tools : arborescence avec toutes les fonctions disponibles à l'étape de travail respective

Quantify Experiments : arborescence des fichiers contenus en mémoire (RAM)

Tools : onglet avec les fonctions disponibles à cette étape de travail

Graphs : représentation graphique de valeurs mesurées dans les régions d'intérêt (ROI)

Statistics : affichage des valeurs statistiques, qui ont été déterminées dans les régions d'intérêt (ROI) figurées

(4) Zone de travail : vous disposez dans cette zone, sous l'étape de travail Acquire, de la boîte de dialogue Beam Path Settings qui contient les éléments de contrôle pour le réglage des paramètres d'acquisition. Le module de traitement d'images crée et affiche des aperçus dans cette zone.

(5) Fenêtre d'affichage Viewer : affiche les images prises. Dans le paramétrage standard, la fenêtre d'affichage Viewer se compose de la fenêtre d'image au milieu, des boutons de représentation de l'image et de sélection des régions d'intérêt (ROI) (5a), ainsi que de l'affichage du canal (5b).

5. Paramétrage pour l'acquisition d'image pluridimensionnelle

5. PARAMÉTRAGE POUR L'ACQUISITION D'IMAGE PLURIDIMENSIONNELLE

Ce chapitre décrit les menus logiciels utilisés pour définir les paramètres d'acquisition de Leica LAS X. Le **mode d'acquisition (Acquisition Mode)** suivant est disponible, quand vous cliquez sur l'icône en forme de flèche **Acquire** et sur l'onglet **Acquisition** :

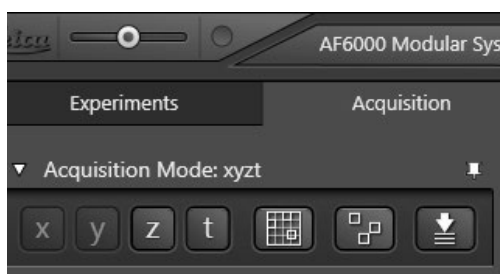


Fig. 2 : mode d'acquisition (Acquisition Mode)

Les boutons **x** et **y** sont toujours actifs. Les deux boutons se réfèrent au menu **Image**, qui sert à régler les paramètres de la caméra.



Le bouton **z** active le **menu z**, qui définit la pile d'images tridimensionnelle.



Le bouton **t** active le **menu t**, qui définit les séries chronologiques.



Les deux boutons suivants **Tile Scan** et **Mark and Find** se réfèrent à la platine motorisée :



Ce bouton active le **menu Tile Scan**, qui est requis pour générer des vues assemblées :



Ce bouton active le **menu Mark- and Find**, qui est requis pour définir les diverses positions de platine pour les expériences à positions multiples :





Remarque :

Un bouton noir signifie que la fonction respective est désactivée et donc inutilisée pour l'expérience. Un clic sur le bouton effectué avec le bouton gauche de la souris permet d'activer le bouton. Un bouton rouge signifie que la fonction respective est activée.

5.1 Light Path Settings

Du côté gauche de Leica LAS X sont également affichés les réglages du trajet lumineux, "Light Path Settings". Ce menu permet de définir les canaux lumineux pour les expériences respectives. Ce menu a une importance essentielle et il est donc toujours affiché :

Fig. 3 : Light Path Settings



5. Paramétrage pour l'acquisition d'image pluridimensionnelle



Remarque :

En principe la définition d'une expérience devrait commencer par la détermination des canaux d'image dans le **menu Light Path Settings**.

Pour définir un canal, vous devez d'abord activer le bouton associé. Commencez par le canal 1 :



Sélectionnez la table de correspondance (LUT, Look up Table) souhaitée pour ce canal, dans la palette de couleurs que vous pouvez appeler avec le bouton suivant :



Dans la fenêtre **Contrast Method**, réglez la méthode de contraste souhaitée ; dans le champ

Filter Cube, le cube de filtres à utiliser pour ce canal.

Utilisation des roues à filtres* Leica externes :

Le Leica LAS X peut commander jusqu'à quatre roues à filtres Leica externes.

Les positions des filtres sont définies dans le menu **Light Path Settings**.

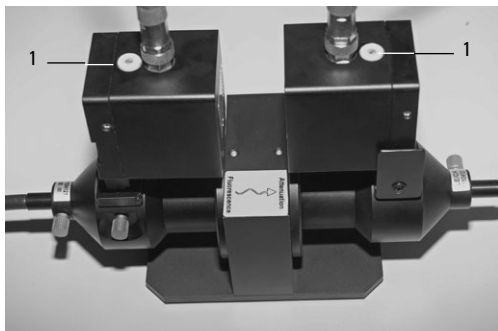
Si le système est équipé d'une roue à filtres **FFIM** externe, le réglage de la transmission s'effectue toujours avec le coulisseau **Intensity** dans le menu **Image** (en 5 niveaux). La roue à filtres interne du microscope se règle dans ce cas sur une transmission à 100 %.



Fig. 5 : réglage de la transmission pour FFIM

Fig. 4 Coupleur-adaptateur externe avec deux coulisseaux à filtres courts

1 Numéro de la jonction de câbles



Niveaux pour FFIM :

100 %, 50 %, 25 %, 12,5 %, 6,25 %

* Nécessite un boîtier de contrôle haute vitesse

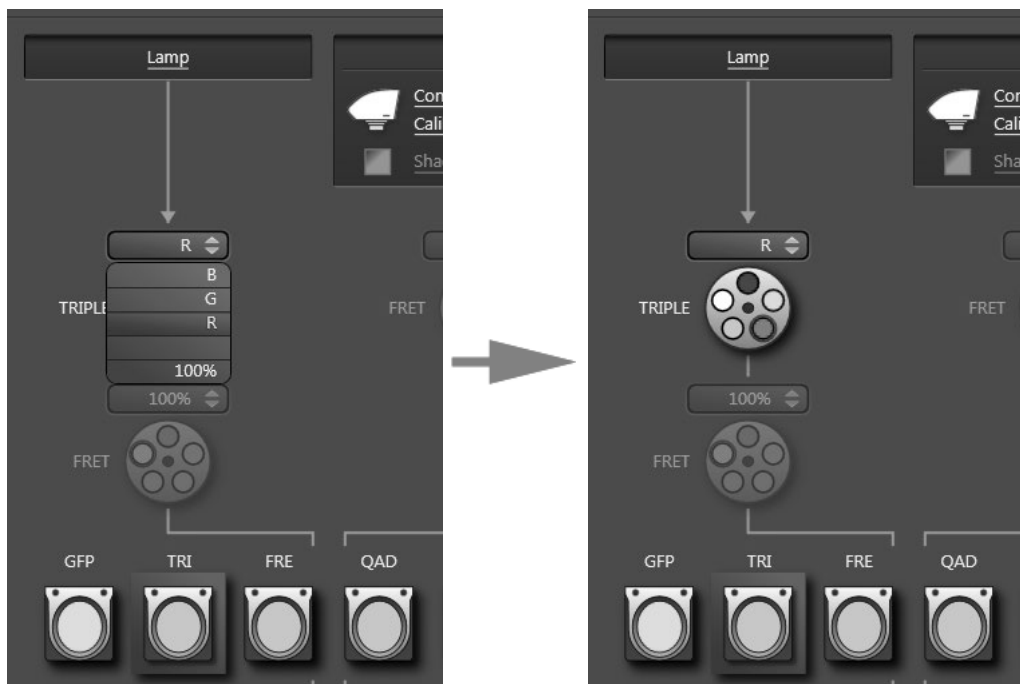
5. Paramétrage pour l'acquisition d'image pluridimensionnelle

La sélection d'un cube de filtres dans le menu LAS X Light Path Settings active la roue à filtres associée.

Attention : la roue à filtres correspondante doit être préalablement positionnée dans le trajet optique !

Sélectionnez alors le filtre d'émission ou d'excitation approprié dans le champ **Emission Filter** ou **Excitation Filter**. Si aucune roue à filtres n'est activée, la position vide de la roue à filtres (100% Transmission) est réglée.

Fig. 6 : choix du filtre d'excitation



5. Paramétrage pour l'acquisition d'image pluridimensionnelle

La roue à filtres externe peut fonctionner en **High Speed Modus**. Dans ce cas, l'option **Use sequencer board** est sélectionnée (fig. 15). Si toute l'expérience est commandée avec le High Speed Board, la couleur du carré qui précède **Sequencer can control the whole sequence** passe du rouge au vert.

Un clic sur le bouton "+" permet d'appliquer un autre canal. Le bouton "-" permet de supprimer à nouveau les canaux. S'il est nécessaire de changer l'**ordre des canaux**, un clic droit sur le **bouton FCr** correspondant (dans cet exemple FCr 1) permet de décaler la position du canal.



Remarque :

Vous pouvez définir huit canaux au maximum.

Un clic droit sur le **bouton FCr** permet d'enregistrer le canal. Les canaux enregistrés peuvent être appelés dans la **zone de liste** (à droite près du **bouton FCr**).

L'enregistrement et l'appel de la combinaison de tous les canaux, **Acquisitionparameter** inclus, s'effectuent dans le champ **Load/Save Settings**.

Fig. 7 : exemple pour une expérience menée avec trois canaux de fluorescence



5.2 Menu Image

Le menu **Image** s'utilise pour régler les paramètres de la caméra :

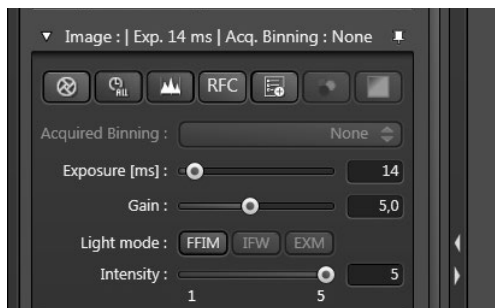


Fig. 8 : menu Image

Les principaux paramètres à définir sont ici **Binning** et **Exposure**.

Binning Pour améliorer le rapport signal-bruit, il est possible de joindre des pixels de la caméra. Avec un **Binning 2x2** par exemple, 4 pixels (2 pixels en direction x et 2 pixels en direction y) sont combinés. Cela a pour effet de diminuer la résolution d'un facteur 4. Typiquement, l'on entre ici **Binning 2** ou **None**.

Exposure Le coulisseau **Exposure** permet de régler le temps d'intégration séparément pour chaque canal d'image. Pour pouvoir réaliser l'acquisition d'image en mode Temps réel rapide (**High Speed**), il faut essayer de régler le temps d'intégration, mais aussi **Gain** et **Intensity**, sur les mêmes valeurs pour tous les canaux.

Gain Permet de régler l'amplification électronique de la caméra.

Intensity Permet de régler l'intensité lumineuse dans le trajet optique d'éclairage. La roue à filtres interne du microscope Leica est déplacée afin d'atténuer la lumière.



Le bouton permet d'activer un **Live-Histogramm**. L'histogramme Live s'utilise avec les objectifs équipés d'une bague de correction, pour aider à corriger les erreurs d'image.

5.2.1 Caméra numérique

Si dans **LAS X** le **high-speed control Box** est utilisé, la caméra numérique peut fonctionner en **High Speed Mode** (commande par déclenchement avec l'aide du séquenceur).

Condition préalable : la caméra numérique doit être prise en charge par le boîtier de contrôle haute vitesse !

Il faut toutefois veiller à ce que pour toutes les caméras numériques fonctionnant en High Speed Mode, le Gain et le Binning soient identiques pour toutes les prises de vues de la séquence. Le réglage de l'Intensity peut être différent si la roue à filtres externe Leica FFIM est utilisée en mode High Speed. L'option **Use sequencer board** est sélectionnée (fig. 9).

5. Paramétrage pour l'acquisition d'image pluridimensionnelle

Si toute l'expérience est commandée avec le High Speed Board, la couleur du carré qui précède **Sequencer can control the whole sequence** dans le menu **Light Path Settings** passe du rouge au vert.

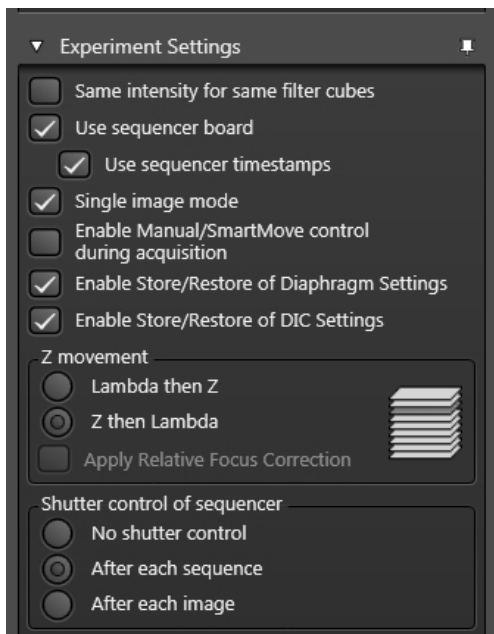


Fig. 9 : Experiment Settings

L'accès à la boîte de dialogue **Experiment Settings** s'effectue avec l'icône en forme de flèche **Acquire** de l'onglet **Acquisition**.

Cette option est pertinente en cas d'utilisation de plusieurs fluorochromes (FCr). L'option **Same Exposure for all probes** permet d'éviter l'utilisation fortuite de temps de pose différents. Un changement du temps de pose pour un fluorochrome s'applique automatiquement à tous les fluorochromes :

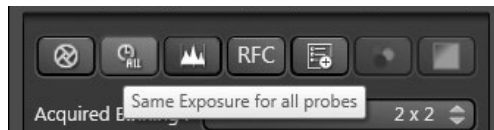


Fig. 10 : Same Exposure for all probes

Dans la boîte de dialogue **Experiment Settings**, l'on peut en outre activer le **Single image mode**. La touche **Single image** apparaît alors au bord inférieur de la zone de travail. Une image isolée est ainsi prise pour le canal actuel. Par contre, la touche **Capture Image** permet de prendre une image pour chaque canal défini.

Pour utiliser l'obturateur, sélectionnez l'option souhaitée dans **Shutter control of sequencer***.

! **Attention !**

Observez les modes d'emploi fournis avec les composants individuels !

* Nécessite un boîtier de contrôle haute vitesse

5.2.2 Caméras EM-CCD

Pour régler la caméra EM-CCD, utilisez le curseur **Gain** et/ou **EM Gain** dans le menu **Image**.

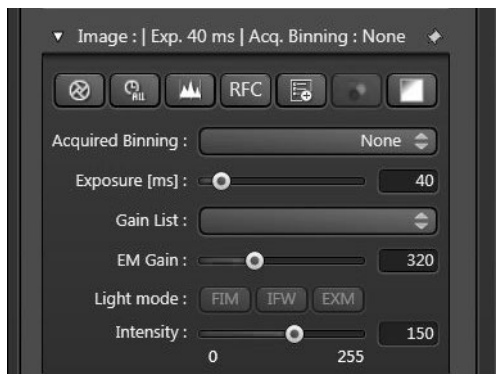


Fig. 11 : menu Image pour caméras EM-CCD

! Attention !

Vous trouverez dans le mode d'emploi livré avec la caméra d'autres spécifications et indications concernant les **caméras EM-CCD**.

Pour l'utilisation du High Speed Mode (= commande par déclenchement avec l'aide du séquenceur), il faut veiller à ce que pour toutes ces caméras les valeurs Gain, EM-Gain, Binning et Intensity soient identiques pour toutes les acquisitions de la séquence. L'Intensity peut être différente si la roue à filtres externe Leica FFIM est utilisée pour atténuer la lumière.

5.3 Menu z

Le **menu z**, dont l'activation s'effectue avec le bouton



, sert à **définir des piles d'images tridimensionnelles** :

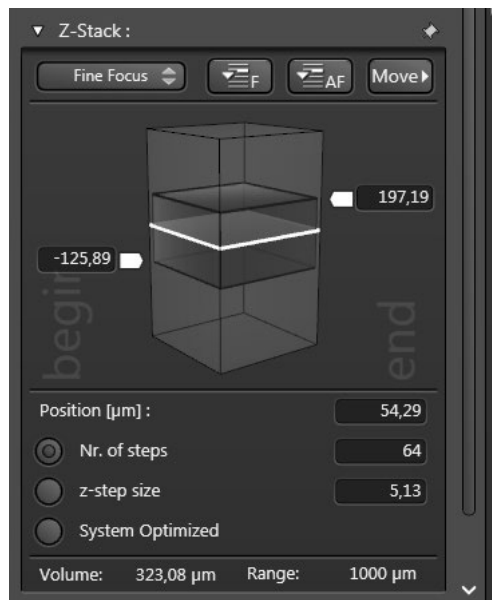


Fig. 12 : définition de la pile z

Pour une mise au point fine plus rapide et plus précise, l'on utilise sur le Leica AF6000 soit l'option **Super Z Galvo Focus*** (déplacement de l'échantillon en direction z, indépendamment de l'objectif), soit l'option **Mise au point piézo-électrique*** (déplacement de l'objectif en direction z).

Dans la fenêtre déroulante du menu z, l'on peut choisir entre **Wide Focus** (commande z du microscope) ou, si elle est présente, **Fine Focus** (SuperZ Galvo Focus ou Mise au point piézo-électrique).

* Nécessite un boîtier de contrôle haute vitesse

5. Paramétrage pour l'acquisition d'image pluridimensionnelle

5.3.1 Réglage de la pile d'images avec Wide Focus

Le déplacement jusqu'à la position z s'effectue soit avec la **commande z** du microscope, soit avec la **commande z** de l'élément de commande **SmartMove**. Dès que dans l'image en direct de la caméra numérique le plan de l'image le plus bas apparaît, ce **plan z inférieur** est sélectionnable avec le bouton **Begin**. Si le plan z inférieur est enregistré, le bouton **Begin** est rouge. Le **plan z supérieur** de la pile d'images est sélectionné en conséquence avec le bouton **End**. Les boutons **Begin** et **End** sont utilisables aussi bien pour le plan z supérieur que pour le plan z inférieur. Le bouton **Focus** peut être utilisé pour enregistrer un **plan moyen de l'image**.



Remarque :

Les plans de l'image sont enregistrés dès que les boutons correspondants (**Begin**, **End** et **Focus**) deviennent rouges. Le plan z actuel est représenté dans le menu z par une surface de couleur ocre (voir la fig. 12).

La **hauteur totale de la pile d'images** est affichée en tant que **volume z** dans la moitié inférieure du menu z . Le bouton préconfiguré **System Optimized** propose en fonction de l'objectif utilisé le meilleur **incrément en z** selon le théorème d'échantillonnage. L'utilisateur peut écraser les valeurs **Incrément** ou **Nombre de plans z** , si au lieu du bouton **System Optimized**, le bouton **No. of Steps** est activé.

* Accessoire en option. Nécessite Super Z Galvo ou Piezo Focus

5.3.2 Réglage de la pile d'images avec Fine Focus*

Le réglage de la pile d'images avec **Fine Focus** s'effectue comme avec **Wide Focus** (voir le chapitre 6.3.1). Au lieu de la commande z du microscope et de SmartMove, le réglage de **Fine Focus** s'effectue ici seulement avec le **pointeur de la souris**. La surface ocre dans le menu z est amenée à la position souhaitée avec le bouton gauche de la souris.

Le bouton **Go to** permet de se rendre aux plans focaux (inférieur, supérieur et moyen) définis précédemment.

5.4 Menu t



Le **menu t** , dont l'activation s'effectue avec le bouton, sert à **définir des séries chronologiques** :

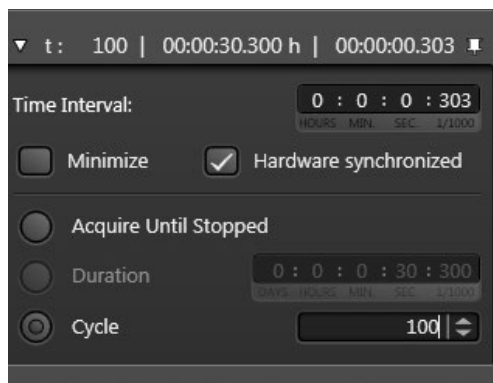


Fig. 13 : menu t

L'on peut ici définir avec le bouton **Cycle** un nombre fixe d'instants. Si **Duration** est sélectionné, la durée totale de l'expérience peut être fixée. Si **Acquire until Stopped** est sélectionné, aucun instant final n'est fixé pour l'expérience. L'utilisateur peut arrêter l'expérience à tout instant.

5. Paramétrage pour l'acquisition d'image pluridimensionnelle

Le champ de saisie **Time Interval** permet de définir la différence temporelle entre les instants. Si le bouton **Minimize** est activé, l'intervalle temporel choisi est le temps minimal requis pour l'acquisition d'un instant.

Si le bouton **High Speed*** est activé, toute la série chronologique est réalisée en temps réel à l'aide du boîtier de contrôle haute vitesse (mode le plus rapide possible sans pauses entre les images). Les conditions préalables suivantes doivent être remplies :

- Tous les canaux d'image doivent avoir les mêmes valeurs de **Gain** et **Intensity**. L'**Intensity** peut être différente si la roue à filtres externe Leica FFIM est utilisée pour atténuer la lumière.
- Tous les canaux d'image doivent utiliser le même cube de filtres resp. la même méthode de contraste.
- Dans le **menu z** l'option **Fine Focus**** est activée (si une **pile d'images z** doit être prise).
- Dans le **menu t**, **Minimize** doit être activé.

Si ces conditions préalables sont remplies, le champ **High Speed** peut être activé. Dans le menu **Light Path Settings** un **champ vert** indique que le **high-speed control box** commande l'intégralité de l'expérience :

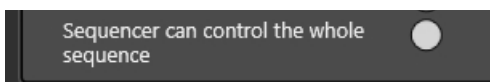


Fig. 14 : afficheur
"Sequencer can control the whole experiment"

Après la prise de chaque image, les données d'images associées doivent être transférées de la caméra numérique à la mémoire du PC. Cela peut durer entre 1 et 150 ms (en fonction du type de caméra, du binning, de la résolution, de la taille de ROI1 et de la position de ROI1).

Ce temps de transfert est utilisé par le boîtier de contrôle haute vitesse pour mettre tous les actionneurs à la position requise pour la prochaine image. Dans la plupart des situations d'acquisition, le temps de transfert de la caméra numérique suffit pour atteindre la ou les nouvelle(s) position(s) ; dans tous les autres cas, la prochaine acquisition d'image est retardée d'autant.

* Seulement disponible sur les systèmes équipés d'un boîtier de contrôle haute vitesse

** Accessoire en option. Nécessite Super Z Galvo ou Piezo Focus

5. Paramétrage pour l'acquisition d'image pluridimensionnelle

Les composants suivants peuvent être commandés par le boîtier de contrôle haute vitesse (entre parenthèses, les temps d'ajustage typiquement requis) :

- Roues à filtres Leica externes
(temps de commutation pour positions de filtre adjacentes 27 ms)
- SuperZ FineFocus
(incrément typique $1\text{ }\mu\text{m} = 40\text{ ms}$)
- Piezo FineFocus
(incrément typique $1\text{ }\mu\text{m} = 3\text{ ms}$)
- Leica AM TIRF MC
- Leica EL6000 High Speed Shutter (6 ms)

Pour pouvoir utiliser des séquences d'image lors d'une acquisition, l'on ne peut modifier dans une séquence que des composants qui sont activables avec le CTR HS high-speed box. Les composants suivants doivent donc rester constants dans les séries commandées par le séquenceur :

- objectif
- type/port de caméra
- grossissement ultérieur (MagChanger)
- méthode de contraste
- cube de fluorescence
- intensité lumineuse
(sauf en cas d'utilisation de FFIM avec une roue à filtres externe)
- binning et gain de la caméra
- obturateur et roues à filtres internes au microscope
- position de platine

Si des valeurs différentes sont définies pour l'un de ces composants dans le cadre de l'expérience, le système passe automatiquement en mode **Normal** et permet ainsi d'acquérir les séquences à sa guise.

L'afficheur vert (menu **Light Path Settings**) symbolise qu'il est possible de commander intégralement l'expérience définie avec le High Speed Board (fig. 14).



Remarques :

Si ce champ est surligné en rouge, vous pouvez demander en faisant un clic gauche sur l'afficheur rouge, quels réglages doivent être modifiés pour parvenir à une expérience totalement commandée par le séquenceur.

Dans le cas d'expériences complexes, le système les divise de lui-même si c'est possible en séries partielles, qui sont ensuite commandées par le boîtier de contrôle haute vitesse.

Exemple : si une expérience issue de plusieurs séries z est définie en utilisant des cubes de fluorescence différents, le champ d'état est certes surligné en rouge, mais les séries z individuelles sont toutefois commandées par le boîtier de contrôle haute vitesse, donc acquises avec une optimisation temporelle.

5.5 Mark and Find



Mark and Find, dont l'activation s'effectue avec le bouton , sert à définir diverses positions de platine pour les **expériences à positions multiples**. Dès qu'une position de platine est activée, ses coordonnées **x**, **y** et **z** sont enregistrables avec le bouton **Mark**.



Si plusieurs positions sont enregistrées, le menu déroulant permet à nouveau de s'y rendre. Dès que l'expérience démarre, à chaque instant d'une série chronologique toutes les positions sont activées et acquises.

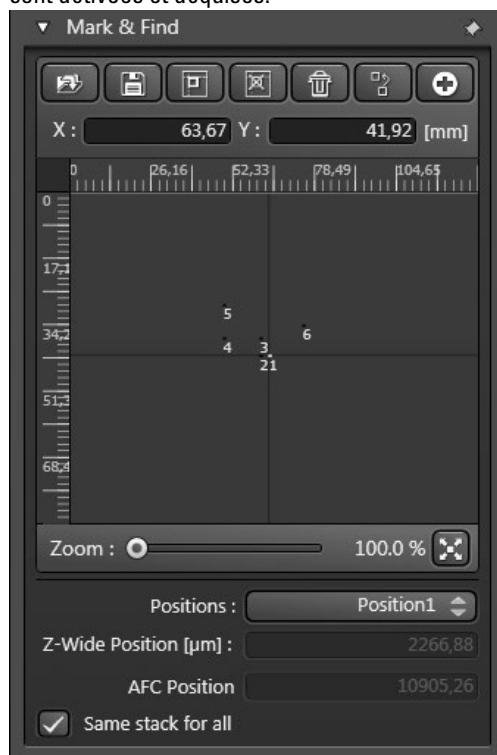


Fig. 15 : Mark and Find

5. Paramétrage pour l'acquisition d'image pluridimensionnelle

5.6 Tile Scan

5.6.1 Réglage de la caméra pour Tile Scan



Remarque :

Tile Scan requiert que la caméra numérique soit correctement calibrée !

Lors du montage, la caméra numérique doit être orientée correctement, en fonction du type de caméra et du port utilisé (voir le tableau suivant) :

Type de caméra numérique	Orientation de la caméra au port gauche, droit, inférieur Image dans l'oculaire = image de caméra
Andor iXon 897	câble vers l'arrière
Hamamatsu 9100-13	plaque en plastique noir vers l'avant
Hamamatsu 9100-02	plaque en plastique noir vers l'avant
DFC365 FX	câble vers l'arrière
DFC450 (C)	câble vers l'arrière
DFC310 FX	câble vers l'arrière

Orientation de la caméra

Si vous constatez que les bords de l'image en direct ne sont pas parallèles aux bords de la fenêtre d'image, faites un ajustage fin de la caméra. (Pour la représentation d'une image en direct, voir le chapitre 7 : Première expérience).

Procédez ainsi :

- Passez à l'objectif d'un grossissement immédiatement supérieur.
- Faites une mise au point de l'image microscopique.
- Cherchez une position d'objet marquante et positionnez-la au coin supérieur droit de la fenêtre d'image.
- Déplacez la platine sur l'axe des X de façon à décaler la portion d'objet vers la gauche dans la fenêtre d'image.
- Contrôlez que la distance par rapport au bord de la fenêtre d'image reste identique. Sinon, il faut tourner la caméra en conséquence.

5.6.2 Acquisition Tile Scan

Le menu **Tile Scan** est activé avec le bouton



et sert à délimiter une zone d'affichage de vues assemblées.

La zone Tile Scan est déterminée clairement par deux positions en vis-à-vis.

Typiquement, il peut s'agir de l'angle supérieur droit et de l'angle inférieur gauche de la zone à sélectionner.

Comme dans le menu **Mark and Find**, les positions sont définies à l'aide du bouton **Mark** :



Quand la zone Tile Scan est déterminée, le nombre d'images requises pour couvrir la zone de balayage définie au préalable apparaît dans le champ **Scan Field**. Le bouton **Merge Image** doit toujours être activé pour associer les images individuelles acquises à une image Tile Scan :

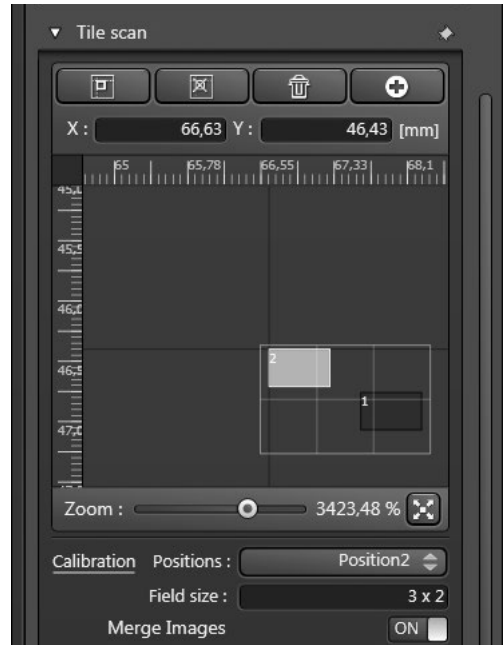


Fig. 16 : Tile Scan

5. Paramétrage pour l'acquisition d'image pluridimensionnelle

Si les images individuelles ne sont pas correctement assemblées, il peut être nécessaire de permuter les images horizontalement ou verticalement.

Cliquez à cet effet sur le bouton **Configurations** :



Le menu **Stage Configuration** s'ouvre alors (fig. 17).

Sélectionnez l'option **Custom** sous **Set merge settings to** et sélectionnez l'option adéquate **Swap images horizontal** ou **Swap images vertical**.

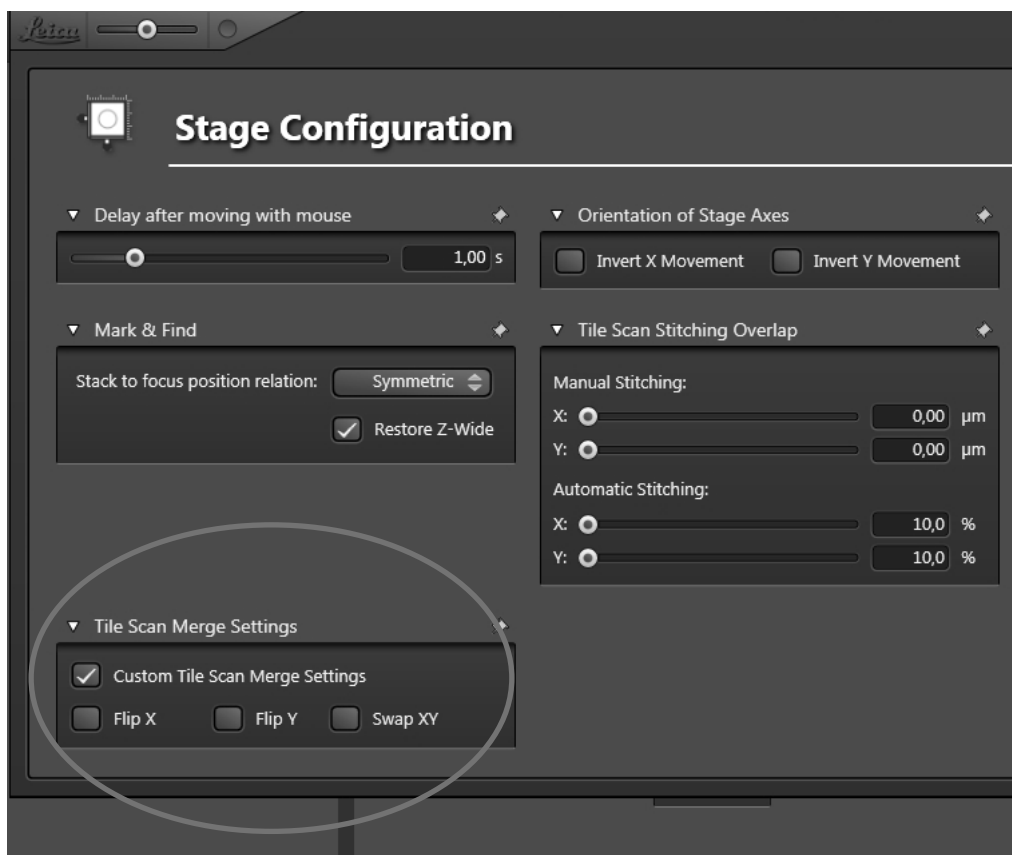


Fig. 17 : Stage configuration

6. PREMIÈRE EXPÉRIENCE

Le chapitre « Première expérience » a pour but de vous donner un aperçu des performances de Leica LAS X et vous montrer comment prendre rapidement les premières images. L'exemple suivant utilise l'échantillon « Convallaria », coloré avec deux colorants, safranine et Fast Green. Nous faisons ici les réglages élémentaires et réalisons un balayage xyzλ rapide. Lors de la première expérience, des piles d'images sont prises pour les deux fluorochromes à une position de platine.

Le FineFocus (Piezo* ou SuperZ*) est utilisé pour le réglage des positions z. La procédure générale pour cette expérience est présentée ci-après. Vous trouverez une description détaillée des boîtes de dialogue représentées et des fonctions logicielles dans l'aide en ligne de LAS X.



Remarque :

Veuillez noter que toutes les valeurs indiquées sont des valeurs de référence. Les valeurs et réglages peuvent varier en fonction de l'échantillon.

6.1 Configuration

Utilisez pour cette expérience un objectif 40x ou 63x. L'objectif LiveCell HCX PL APO 63x/1.30 GLYC CORR 37°C est optimal pour cette usage. Utiliser comme cube de filtres le BGR Cube 11600197 « système de filtres B/G/R; HP ; taille K ».

6.2 Mise en marche du système et démarrage du logiciel

- Mettez le système en marche.

Respectez ce faisant l'ordre de mise en marche prescrit (voir le chapitre 5 Démarrage du Leica LAS X).

- Démarrez le logiciel LAS X en cliquant sur l'icône correspondante du bureau ou en sélectionnant le programme dans le menu Démarrage.



- Pour initialiser la platine xy, sélectionnez **Yes** dans le message suivant :

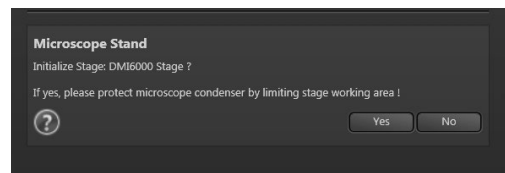


Fig. 18 : initialisation de platine LAS X

* Accessoire en option. Nécessite un boîtier de contrôle haute vitesse

6. Première expérience

- Quand vous voyez la boîte de dialogue suivante, le logiciel démarre et il est prêt à fonctionner :

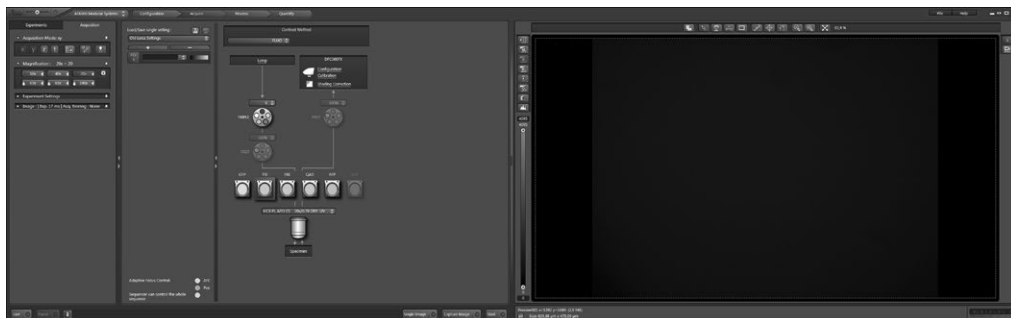


Fig. 19 : interface utilisateur de LAS X

6.3 Choix du détail de l'échantillon et mise au point

- Sélectionnez comme méthode de contraste TL-BF (fond clair).

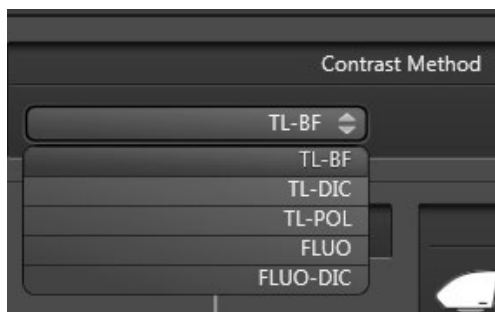


Fig. 20 : méthode de contraste

- Cliquez sur l'onglet **Setup**.
- S'il est présent, sélectionnez l'objectif **HCX PL APO 63x/1.30 GLYC CORR 37°C** ; sinon sélectionnez un objectif 40x ou 63x :



Fig. 21 : sélection de l'objectif

- Posez l'échantillon sur la platine xy (le cas échéant en utilisant un milieu d'immersion).
- Faites passer la lumière dans les oculaires et réglez l'image directement au microscope.



Remarque :

Pour commuter la lumière sur la caméra, cliquez sur le bouton **Live**, de sorte qu'une image soit directement visible sur le moniteur.

6. Première expérience

6.4 Résolution de la caméra

- Cliquez dans la boîte de dialogue **Light Path Settings** sur **Configuration** :

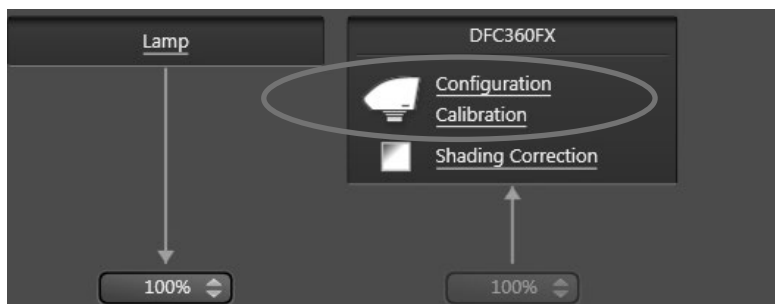


Fig. 22 : configuration de la caméra

- Sélectionnez sous **Set Digitization to** (23.1) la valeur **12 Bit** (en cas d'utilisation de la caméra Cascade, sélectionnez 16 Bit). Fermez la fenêtre en cliquant sur **X**. Les réglages sont automatiquement repris.

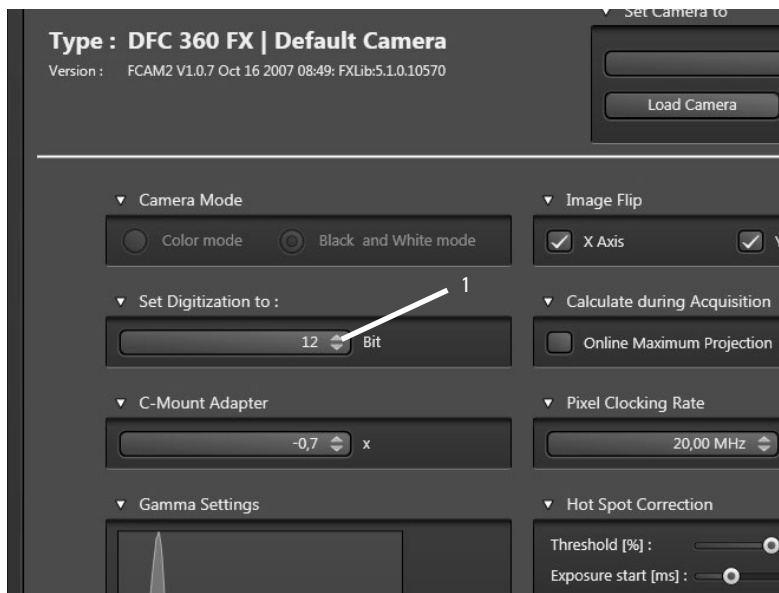


Fig. 23 : configuration de la caméra

6.5 Mode d'acquisition

- Cliquez sur l'icône en forme de flèche **Acquiere** :



Fig. 24 : icône en forme de flèche Acquiere

- Cliquez sur l'onglet **Acquisition** :

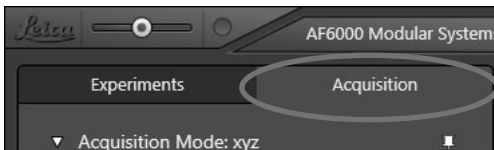


Fig. 25 : onglet Acquisition

- Sous **Acquisition Mode** sélectionnez en plus de **x**, **y** le bouton **z**. Les paramètres d'acquisition **x** et **y** sont toujours actifs.

Les champs sélectionnés et donc actifs sont surlignés en rouge, comme dans cet exemple. Si vous cliquez à nouveau sur le même bouton, il est alors surligné en noir. Les icônes noires ne sont pas sélectionnées et sont donc inactives (dans cet exemple, le bouton **t** est inactif).

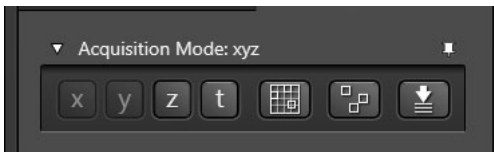


Fig. 26 : Acquisition Mode xyz

6.5.1 Variante EL6000

En cas d'utilisation de la source de lumière compacte EL6000, la longueur d'onde se règle par l'intermédiaire d'un cube de filtres, de la roue à filtres (IFW) intégrée au microscope ou de roues à filtres (EFW) externes.

- Sélectionnez dans la liste (27.1) dans le menu **Light Path Settings** sous **Contrast Method** l'option **FLUO**.

Choix des filtres pour EFW :

- Sélectionnez **TRI** comme **Filter Cube**.
- Le choix du cube de filtres dans le menu **Light Path Settings** (27.4) active la roue à filtres associée.
- **Attention : la roue à filtres adéquate doit être préalablement pivotée vers l'intérieur dans le trajet optique d'éclairage !**
- Sélectionnez maintenant le filtre d'excitation **G** dans le champ **Excitation Filter** (29).

6. Première expérience

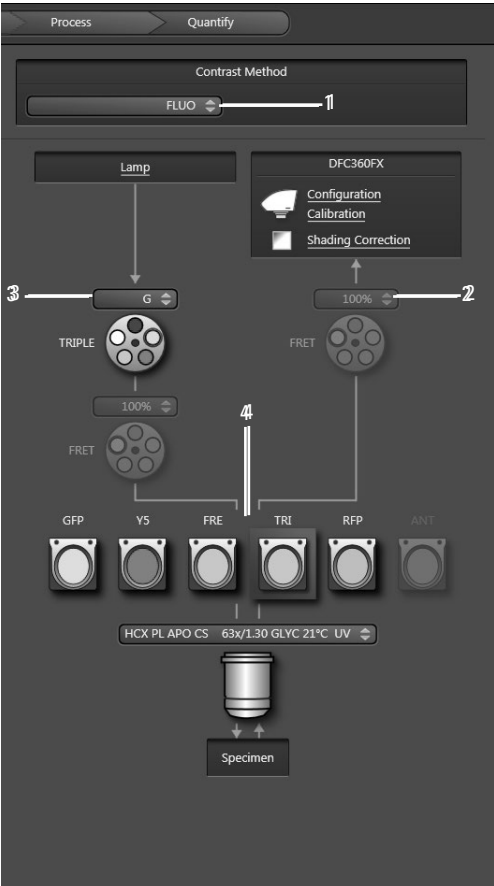


Fig. 27 : menu Light Path Settings

Choix des filtres pour IFW :

- Pour définir la position de la roue à filtres, appuyez sur le bouton **IFW** :

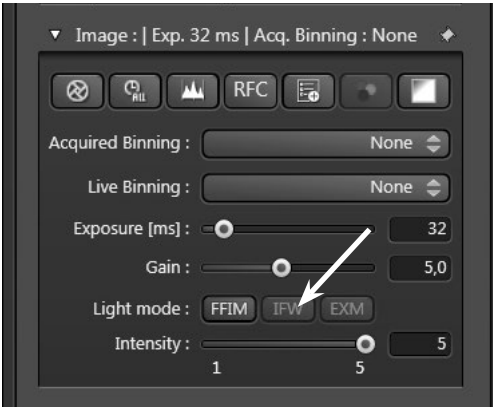


Fig. 28 : boîte de dialogue Image

- Sélectionnez **BGR** comme **Filter Cube** et la position d'Intensity **G** :

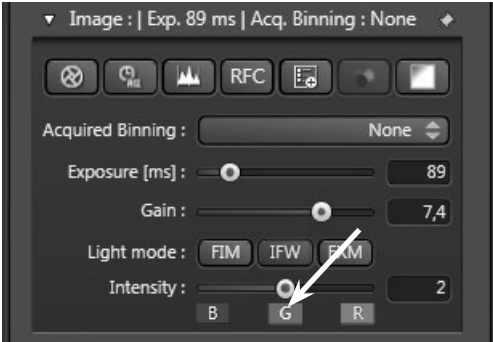


Fig. 29 : boîte de dialogue Image

Si le système est équipé d'une roue à filtres **FFIM** externe, la commande de la transmission s'effectue toujours avec le coulisseau Intensity dans le **menu Image** (en 5 niveaux). La roue à filtres interne du microscope se règle dans ce cas sur une transmission à 100 %.

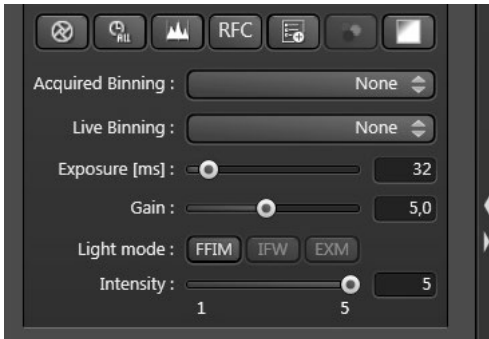


Fig. 30 : réglage de la transmission pour FFIM

Niveaux pour FFIM :

100 %, 50 %, 25 %, 12,5 %, 6,25 %



Attention !

Pour ménager l'échantillon, réglez l'intensité lumineuse de la source de lumière EL6000 au niveau le plus bas.

- Réglez dans la **boîte de dialogue Image** les valeurs :

Binning :

Exposure :

Gain :



Fig. 31 : boîte de dialogue Image

- Pour pouvoir regarder l'image directement sur le moniteur, cliquez sur **Live** :

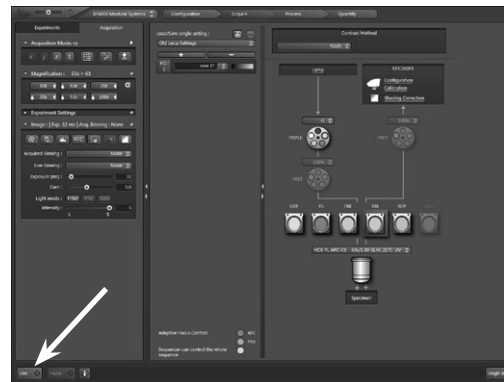


Fig. 32 : bouton Live ou Stop

6. Première expérience

- Vous voyez maintenant dans la fenêtre d'affichage **Viewer** l'image en direct sur votre écran (voir la fig. 33).



Fig. 33 : vue de l'image prise dans la fenêtre d'affichage



Remarque :

En utilisant SmartMove*, amenez l'échantillon à la position souhaitée. Pour le traitement d'images ultérieur, il est préférable d'utiliser des cellules relativement petites avec de nombreux granules d'amidon (points clairs à l'intérieur des cellules). Si vous ne trouvez pas de granule d'amidon, faites une mise au point sur un autre plan de l'échantillon et réessayez.

6.6 Optimisation de l'image

- Optimisez la qualité de l'image grâce au réglage du temps de pose, en déplaçant lentement vers la gauche ou la droite le coulisseau **Exposure** dans le menu . Pour un échantillon frais de *Convallaria*, l'expérience a montré que des temps de pose de 100 à 200 ms conviennent. Observez ce faisant les modifications de la qualité d'image :

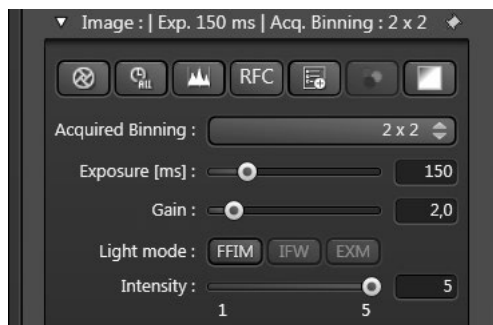


Fig. 34 : menu Image



Attention !

Pour ménager l'échantillon, réduisez le temps de pose.

- Si la qualité d'image souhaitée est atteinte, cliquez sur **Stop** :



Fig. 35 : bouton Live ou Stop

* Accessoire en option

6.7 Détermination de la couleur (LUT)

**Remarque :**

L'échantillon **Convallaria** est coloré avec deux colorants (**safranine/Fast Green**). C'est pourquoi nous expliquons dans cet exemple deux réglages de fluorochromes (FCr1 et FCr2).

- Dans cet exemple, sous **FCr1** la couleur **Vert** est sélectionnée. Un clic sur le bouton de la palette de couleurs (36.1) permet de sélectionner la couleur souhaitée (36.2). Confirmez la sélection en cliquant deux fois avec le bouton gauche de la souris :

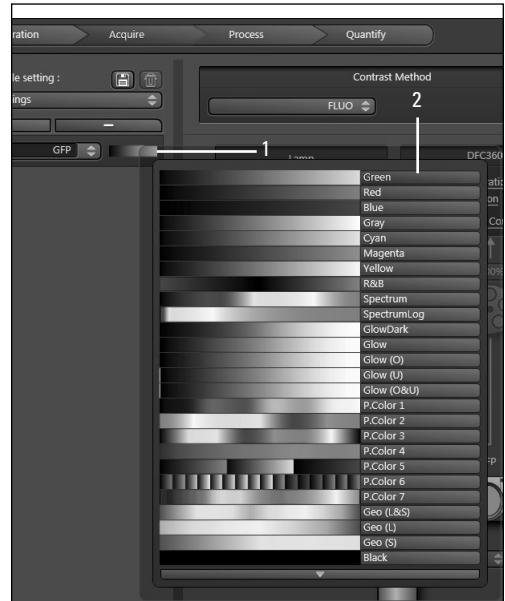


Fig. 36 : palette de couleurs

- Cliquez maintenant dans le champ textuel et donnez un nom au **FCr1** (dans cet exemple **GFP**) :



Fig. 37 : champ textuel



- Pour enregistrer tous les réglages de **FCr1**, cliquez avec le **bouton droit de la souris** sur le champ **FCr1** (38.1) puis sur **Save** (38.2) :



Fig. 38 : sauvegarder les réglages

6. Première expérience

- Le système vous redemande de donner un nom. Utilisez le même nom que dans la fig. 37 et confirmez par **OK** :

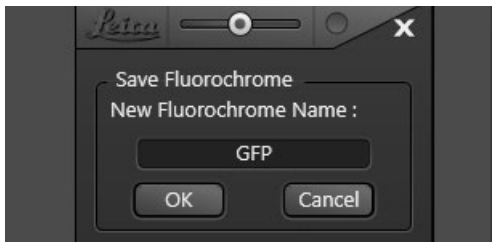


Fig. 39 : confirmer le nom donné

6.8 Réglages pour d'autres fluorochromes

- Pour déterminer les réglages pour un autre fluorochrome, cliquez sur le symbole **+**. Le FCr2 est ainsi créé :

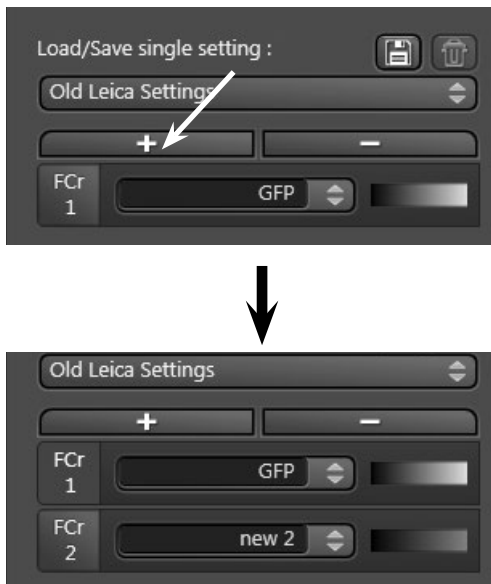


Fig. 40 : ajouter un fluorochrome

Procédez pour la configuration de FCr2 comme pour celle de FCr1 :

- La **Contrast Method FLUO** reste sélectionnée.
- En cas d'utilisation de la roue à filtres EFW, l'option **Filter Cube TRI** reste sélectionnée.
- En cas d'utilisation de la roue à filtres IFW, l'option **BGR** du **Filter Cube** reste sélectionnée.
- Dans le menu **Image**, le réglage d'Intensity **R** (pour IFW) est choisi, ou la position de la roue à filtres **R** (EFW) est sélectionnée dans le menu **Light Path Settings**.
- Pour pouvoir regarder l'image directement sur le moniteur, cliquez sur le bouton **Live**.
- Si vous souhaitez optimiser la qualité d'image, procédez comme au chapitre 6.6 Optimisation de l'image.
- Sélectionnez la couleur à représenter (dans cet exemple, rouge, 41.1) et donnez un nom à **FCr2** (41.2) :

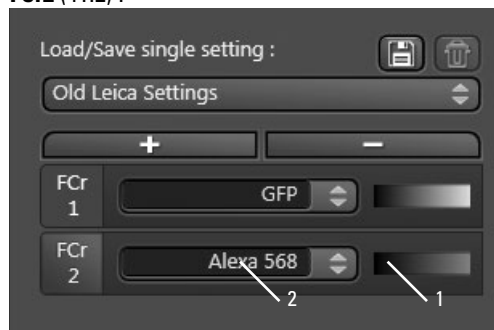


Fig. 41 : indiquer la couleur et donner un nom

- Enregistrez les réglages en faisant un **clic droit** sur **FCr2** (42.1) et cliquez ensuite sur **Save** (42.2) :

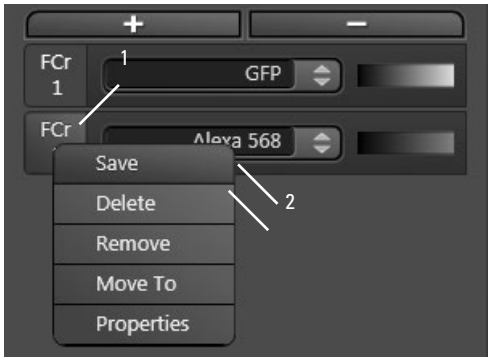


Fig. 42 : sauvegarder les réglages

- Entrez un nom et confirmez par **OK**.
- Pour démarrer l'acquisition d'image, cliquez sur **Capture Image**.

Vous avez ainsi défini FCr1 et FCr2 et sauvegardé les réglages pour ces deux fluorochromes. Vous pouvez maintenant continuer par l'acquisition de l'image.

6.9 Acquisition de la pile d'images 3D

Dans la zone de liste du menu z, vous pouvez choisir **Wide Focus** (commande z du microscope) ou, si elle est présente, **Fine Focus** (SuperZ-Galvo* Focus ou Mise au point piézo-électrique*) :

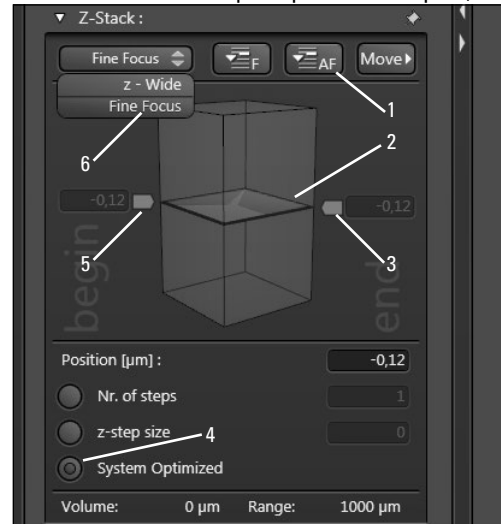


Fig. 43 : z-Stack

Exemple de mise au point fine :

- Sélectionnez **Fine Focus** (43.6) dans la zone de liste.
- Cliquez sur **Live** pour pouvoir regarder l'image directement sur le moniteur.
- Vérifiez que l'image est nette.
- Un clic sur le bouton **Focus** (43.1) permet d'enregistrer la **position z** actuelle.
- Pour définir la position supérieure de la pile z, positionnez le pointeur de la souris sur la surface de couleur ocre (43.2) et faites-la glisser vers le haut en maintenant enfoncé le bouton gauche de la souris. Vous pouvez suivre le changement de position z directement dans l'image en direct.

* Accessoire en option. Nécessite un boîtier de contrôle haute vitesse

6. Première expérience

- Dès que le plan d'image supérieur souhaité apparaît sur l'image en direct de la caméra, sélectionnez-le en cliquant sur le bouton **Begin** (43.5).

- En maintenant enfoncé le bouton gauche de la souris, faites maintenant glisser la surface ocre (43.2) vers le bas jusqu'à la position souhaitée et sélectionnez-la en cliquant sur le bouton **End** (43.3).

Exemple pour z-Wide :

- Sélectionnez **z-Wide** (53.6) dans la zone de liste.

- Cliquez sur **Live** pour pouvoir regarder l'image directement sur le moniteur.

- Vérifiez que l'image est nette.

- Un clic sur le bouton **Focus** (43.1) permet d'enregistrer la **position z** actuelle.

- Pour définir la position supérieure de la pile z, actionnez la commande Z du microscope jusqu'à ce que la limite supérieure souhaitée soit atteinte. Vous pouvez suivre le changement de position z directement dans l'image en direct.

- Dès que le plan d'image supérieur souhaité apparaît sur l'image en direct de la caméra, sélectionnez-le en cliquant sur le bouton **Begin** (43.5).

- Actionnez maintenant la commande Z du microscope jusqu'à ce que la limite inférieure souhaitée soit atteinte et sélectionnez-la en cliquant sur le bouton **End** (43.3).



Remarque :

Pour la définition de la pile d'images, nous recommandons en cas d'utilisation de l'objectif 63x d'utiliser env. 100 à 200 plans d'image (coupes). Avec un objectif 40x, nous recommandons 100 à 150 plans d'image.



Fig. 44 : z-Stack

- Sélectionnez l'option **System Optimized** (44.1).

- Pour démarrer l'acquisition d'image, cliquez sur le bouton **Start**.



Remarque :

Vous trouverez la série d'images enregistrée sous **Acquire** → **Experiments** (fig. 45). C'est ici que sont également enregistrées les données d'images générées par le module de traitement d'images.



Fig. 45 : Experiments



Remarque :

Les acquisitions démarrent par un clic sur **Start** et se terminent (si cela est prédéfini) automatiquement. Vous pouvez arrêter les acquisitions à tout moment en cliquant sur **Stop**.



Remarque :

Sauvegardez les images prises directement après l'acquisition, avant de démarrer une nouvelle acquisition, de traiter les données d'images ou de quitter LAS X. Outre l'enregistrement des données sur le disque dur, procédez régulièrement à la sauvegarde/à l'archivage des données sur un support de données approprié.



Remarque :

Ainsi, un plantage du système n'entraîne pas la perte des données d'images.

7. INDEX

A

Acquisition d'image pluridi-
mensionnelle 12

Aide en ligne 8
Introduction 8

C

Champ d'application 6
Consignes de sécurité
Signification 5

D

Droits d'auteur 2

L

LAS X
Appel de l'aide en ligne 8
Organisation de l'interface
utilisateur 10
Recherche en texte intégral
9
Leica LAS X 7

M

Mise en marche 8
Mode d'emploi 4
Remarques 4

P

Première expérience
Acquisition de la pile
d'images 3D 37
Choix du détail de
l'échantillon et mise au
point 28
Configuration 27
Démarrage du logiciel 27
Détermination de la couleur
(LUT) 35
Mise en marche du système
27
Mode d'acquisition 31
Optimisation de l'image 34
Réglages pour d'autres fluo-
rochromes 36
Résolution de la caméra 30

V

Vue d'ensemble du système
Dongle 7

www.leica-microsystems.com



Copyright © Leica Microsystems CMS GmbH • Ernst-Leitz-Straße • 35578 Wetzlar • Germany 2016 • Tel. (06441)29-0 • Fax (06441)29-2599
LEICA and the Leica logos are registered trademarks of Leica IR GmbH.

English/German/French 934 003 • Spanish 934 078 • Italian 934 079 Printed on chlorine-free bleached paper.

Revision 1.2, issued 2017-01-05. Subject to modifications

