

Protocole pour utiliser le microscope deux photons de Feng (montage construit pour environ 930 nm) :

1. Allumer la lumière rouge et fermer la ventilation.
2. Mettre l'objectif désiré en le vissant. S'assurer de ne pas toucher au bout de l'objectif pour ne pas l'endommager.
3. Si un filtre doit être changé, dévisser le(les) détecteur(s) PMT et changer délicatement le(les) filtre(s). S'assurer de disposer des filtres inutilisés adéquatement (dans un tissu doux ou dans un papier *KimWipe* pour ne pas briser le filtre).
4. Placer l'échantillon sous l'objectif et y déposer quelques gouttes du milieu recommandé pour l'objectif utilisé sur la lamelle.
5. Placer la hauteur du plateau afin que le bout de l'objectif soit imbibé dans le milieu préalablement déposé sur la lamelle de l'échantillon.
6. Allumer le laser. Si désiré, régler la longueur d'onde dans le visible et utiliser une petite plaquette pour vérifier le trajet optique. Par contre, le diaphragme doit être fermé chaque fois que la longueur d'onde du laser est changée pour ne pas endommager l'échantillon.
7. Ajuster l'intensité et la longueur d'onde du laser selon les besoins. L'intensité du laser peut être modifiée en changeant l'angle de la lame $\lambda/2$ devant le cube séparateur de polarisation. La puissance du laser peut être vérifiée à l'aide d'un puissance-mètre.
8. Allumer la machine *CID 290* (Galvometer power, polygon power et HSYNC generation power).
9. Allumer la machine *ADP deux photons*.
10. Allumer la machine *MPC* pour pouvoir bouger le plateau.
11. Ouvrir le diaphragme.
12. Ouvrir le logiciel *iPhoton* (version RT2.5.4erbel47 pour le Z stack et version RT2.0.6erbel47 pour le vidéo). Ne pas oublier de peser sur *Start* pour faire fonctionner l'acquisition des images.
13. À ce moment, il est possible de placer l'échantillon à l'endroit désiré en observant les rayons réfléchis par l'échantillon. Utiliser les roulettes pour bouger le plateau.
14. Mettre le drap noir par-dessus les PMTs et fermer la lumière.
15. Allumer les PMTs. S'assurer que le gain est à zéro dès qu'ils s'ouvrent.
16. Ajuster le gain pour obtenir une image nette sans saturation. Idéalement, le gain devrait être à 2-2,5. Sinon, réajuster l'intensité du laser pour qu'il en soit ainsi si c'est possible.
17. Après l'expérience, ne pas oublier d'ajuster les gains des PMT à zéro avant de fermer le dispositif. Celui-ci doit être éteint avant d'allumer les lumières.
18. Éteindre toutes les machines et nettoyer l'objectif à l'aide d'un papier *KimWipe* et de l'isopropanol.
19. Éteindre la lumière rouge et allumer la ventilation avant de quitter.