



# คณะสัตวแพทยศาสตร์

หน่วยเครื่องมือห้องปฏิบัติการวิจัยกลาง ศูนย์วิจัยและนวัตกรรมทางสัตวแพทย์

ขั้นตอนการปฏิบัติงาน (Work Instruction)  
เรื่อง การใช้งานกล้องจุลทรรศน์คอนโฟคอล  
(Confocal Laser Scanning Microscope: CLSM)  
ยี่ห้อ OLYMPUS รุ่น FLUOVIEW 3000

รหัสเอกสาร                      WI-CTL-15  
เอกสารฉบับ                       ควบคุม       ไม่ควบคุม  
สำเนาฉบับที่                      .....  
วันที่ประกาศใช้                      .....  
ฉบับแก้ไขครั้งที่                      .....

	ผู้จัดทำ/แก้ไข	ผู้ตรวจสอบ	ผู้อนุมัติ
ลายเซ็น			
ชื่อ-นามสกุล	นางสาวเนียรวรรณ มีเจริญ	รศ.น.สพ.ดร.กัญจน์ แก้วมงคล	ผศ.สพ.ญ.ดร.สิริรัตน์ นิยม
ตำแหน่ง	นักวิทยาศาสตร์	ผู้ช่วยคณบดีฝ่ายวิจัย	รองคณบดีฝ่ายวิจัย
วันที่			



# คณะสัตวแพทยศาสตร์

หน่วยเครื่องมือห้องปฏิบัติการวิจัยกลาง ศูนย์วิจัยและนวัตกรรมทางสัตวแพทย์

รหัสเอกสาร WI-CTL-15

แก้ไขครั้งที่ 00

วันที่ประกาศใช้

หน้าที่ 1 จาก 17

ขั้นตอนการปฏิบัติงาน (Work Instruction)

เรื่อง การใช้งานกล้องจุลทรรศน์คอนโฟคอล

(Confocal Laser Scanning Microscope: CLSM)

ยี่ห้อ OLYMPUS รุ่น FLUOVIEW 3000

## บันทึกการแก้ไข

แก้ไขครั้งที่	วันที่แก้ไข	หน้า	รายละเอียดการแก้ไข



## ขั้นตอนการปฏิบัติงาน (Work Instruction)

เรื่อง การใช้งานกล้องจุลทรรศน์คอนโฟคอล

(Confocal Laser Scanning Microscope: CLSM)

ยี่ห้อ OLYMPUS รุ่น FLUOVIEW 3000

### 1. วัตถุประสงค์

เพื่อใช้เป็นแนวมาตรฐานในการใช้งานครุภัณฑ์กล้องจุลทรรศน์คอนโฟคอล (Confocal laser scanning microscope: CLSM) ยี่ห้อ OLYMPUS รุ่น FLUOVIEW 3000 เป็นกล้องที่ใช้วิเคราะห์ภาพของเซลล์และเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตในระดับ 2 และ 3 มิติ โดยใช้ในการแสดงภาพของเซลล์และเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ที่ต้องการความหนาของเนื้อเยื่อหรือเซลล์นั้น เพื่อให้ผู้ใช้งานสามารถปฏิบัติงานได้อย่างถูกต้องเหมาะสมและส่งเสริมให้ได้รับการทดลองวิจัยที่มีประสิทธิภาพ อีกทั้งยังเป็นการบำรุงรักษาอายุการใช้งานครุภัณฑ์ ประเมินความเสี่ยงจากการเกิดอุบัติเหตุขณะปฏิบัติงาน และป้องกันการเกิดอุบัติเหตุขณะปฏิบัติงานร่วมด้วย

### 2. ขอบเขต

คู่มือฉบับนี้ใช้ครอบคลุมตั้งแต่แนะนำกล้องจุลทรรศน์คอนโฟคอล ขั้นตอนการปฏิบัติงาน โดยใช้เป็นแนวทางสำหรับเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ผู้ปฏิบัติงาน และผู้ที่เกี่ยวข้องกับห้องปฏิบัติการวิจัยของหน่วยเครื่องมือห้องปฏิบัติการวิจัยกลาง (Central Lab) ศูนย์วิจัยและนวัตกรรมทางสัตวแพทย์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน

### 3. อ้างอิง

-

### 4. นิยาม

กล้องจุลทรรศน์คอนโฟคอล หมายถึง ครุภัณฑ์กล้องจุลทรรศน์คอนโฟคอล (Confocal laser scanning microscope: CLSM) ยี่ห้อ OLYMPUS รุ่น FLUOVIEW 3000 ของหน่วยเครื่องมือห้องปฏิบัติการวิจัยกลาง (Central Lab)

### 5. ขั้นตอนการปฏิบัติงาน

#### 5.1 วิธีการเปิดเครื่อง (ภาพที่ 1)

1. เปิด UPS เปิดระบบสำรองไฟฟ้า รอจนกระแสไฟคงที่ ประมาณ 220V
2. Power Supply ของระบบ Scanner Mละ Detector กดสวิตช์ มาที่ On จากนั้นบิดกุญแจมาที่ On
3. แหล่งกำเนิดแสง Fluorescence กดสวิตช์ด้านหลังตัวเครื่อง จากนั้นกดปุ่ม On ทางด้านหน้าไฟ LED สีฟ้าจะติด สามารถปรับความสว่างด้วยการหมุนปุ่มปรับความสว่างทางด้านหน้า
4. ชุดควบคุมกล้องจุลทรรศน์ระบบอัตโนมัติ กดสวิตช์ด้านหน้าของตัวเครื่องมาที่ On
5. ชุดควบคุมแท่นวางตัวอย่างระบบอัตโนมัติ กดสวิตช์ด้านหน้าของตัวเครื่องมาที่ On
6. Power Supply ของระบบเลเซอร์ กดสวิตช์ มาที่ On จากนั้นบิดกุญแจมาที่ On จากนั้นกดสวิตช์เลเซอร์ที่ต้องการใช้งาน

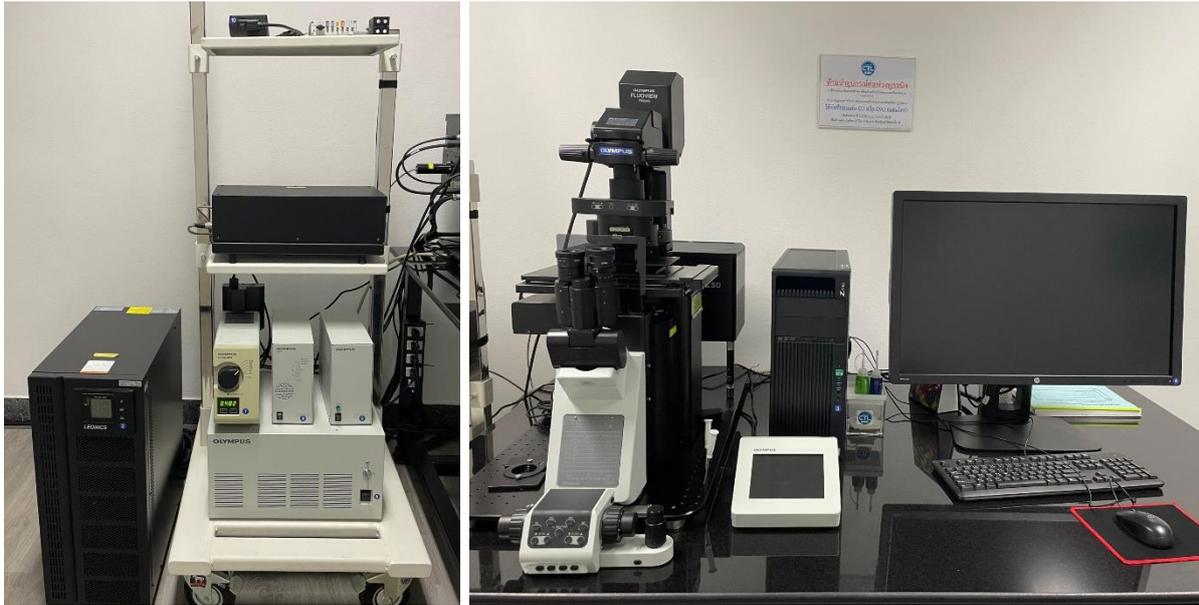
## ขั้นตอนการปฏิบัติงาน (Work Instruction)

เรื่อง การใช้งานกล้องจุลทรรศน์คอนโฟคอล

(Confocal Laser Scanning Microscope: CLSM)

ยี่ห้อ OLYMPUS รุ่น FLUOVIEW 3000

7. ชุดควบคุมการทำงานของกล้องจุลทรรศน์แบบสัมผัส (Touch Panel) กดสวิตซ์ด้านหลังตัวเครื่อง รอจนหน้าจอแสดงหน้าต่างพร้อมใช้งาน
8. เปิดคอมพิวเตอร์และหน้าจอแสดงผล



ภาพที่ 1 แสดงอุปกรณ์ต่างๆ ที่ใช้ในการเปิดกล้องจุลทรรศน์คอนโฟคอล

## 5.2 วิธีการเริ่มต้นการใช้งาน

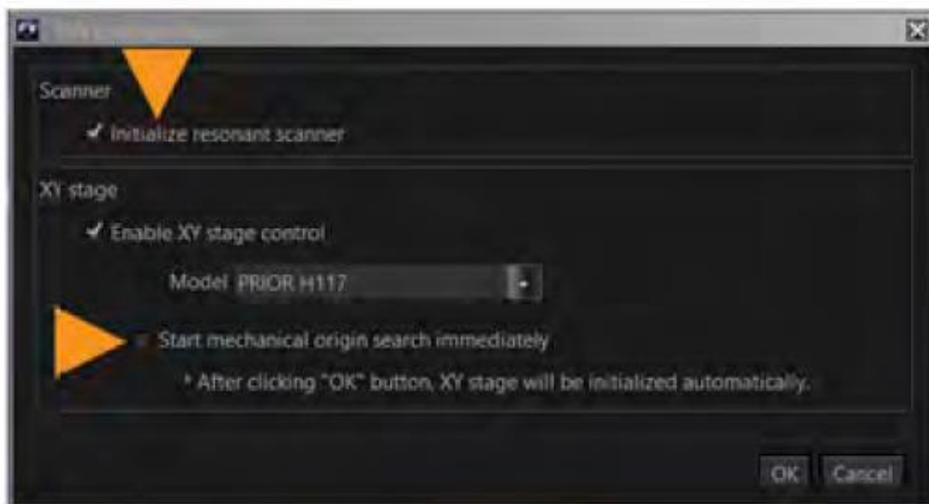
1. คลิกที่ไอคอนของโปรแกรม FV315-SW บนหน้า Desktop (ภาพที่ 2) เพื่อเริ่มต้นการใช้งาน (ชื่อของโปรแกรมจะปรากฏขึ้นตาม Main License ที่ติดตั้ง)

ขั้นตอนการปฏิบัติงาน (Work Instruction)  
เรื่อง การใช้งานกล้องจุลทรรศน์คอนโฟคอล  
(Confocal Laser Scanning Microscope: CLSM)  
ยี่ห้อ OLYMPUS รุ่น FLUOVIEW 3000



ภาพที่ 2 แสดงไอคอนของโปรแกรม FV315-SW บนหน้า Desktop เครื่องคอมพิวเตอร์

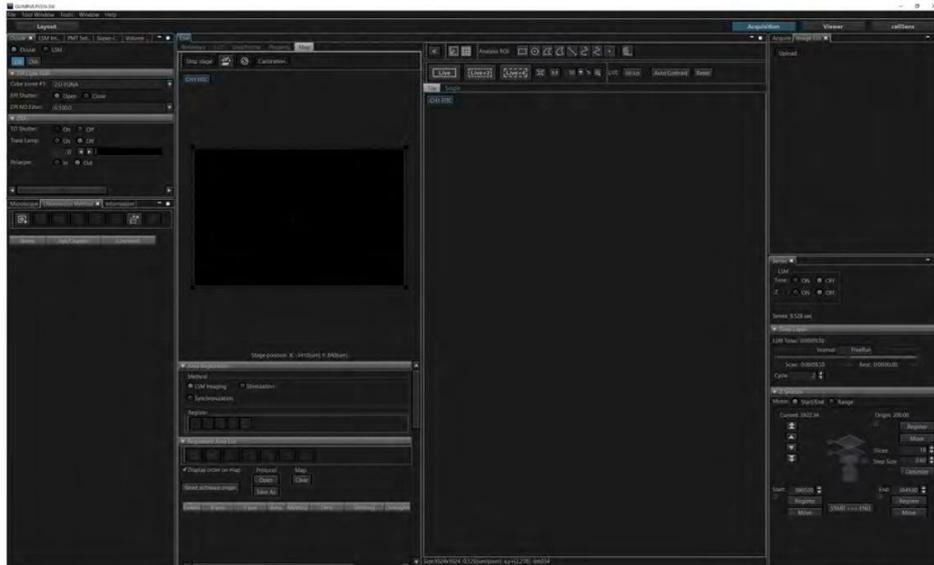
- โปรแกรมจะแสดงหน้าต่างขึ้นมา เลือกแท่นวางตัวอย่างที่ติดตั้งไว้ ให้เลือก Start mechanical origin search immediately โปรแกรมจะทำการตั้งค่าระยะของแท่นวางตัวอย่างอัตโนมัติ กดปุ่ม OK (ในกรณีที่ระบบมีการติดตั้ง Resonant Scanner ให้เลือก Initialize Resonant Scanner เพื่อเริ่มต้นการใช้งาน) (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 แสดงหน้าต่างเพื่อเลือกแท่นวางตัวอย่าง

ขั้นตอนการปฏิบัติงาน (Work Instruction)  
เรื่อง การใช้งานกล้องจุลทรรศน์คอนโฟคอล  
(Confocal Laser Scanning Microscope: CLSM)  
ยี่ห้อ OLYMPUS รุ่น FLUOVIEW 3000

3. เมนูแถบ Layout สำหรับการทำงานในรูปแบบต่างๆ (Acquisition, เมนู Viewer, cellSens) (ภาพที่ 4) (หน้าต่างของโปรแกรม FV31S-SW ลักษณะหน้าต่างและความสามารถของโปรแกรมจะแตกต่างกันตาม License และ Solutions ที่ติดตั้ง)



ภาพที่ 4 แสดงหน้าต่างเมนูแถบ Layout สำหรับการทำงานในทุกรูปแบบของโปรแกรม FV31S-SW

### 5.3 การตรวจสอบตัวอย่างด้วยเทคนิค Bright Field และ Fluorescence

1. วางตัวอย่างบนแท่นวางตัวอย่าง เลื่อนตำแหน่งของตัวอย่างด้วยการปรับ Joystick
2. เลือก Layout [Acquisition] ทางมุมขวบนของจอภาพ สำหรับทำการถ่ายภาพ (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 แสดงหน้าต่างเพื่อการตรวจสอบตัวอย่างด้วยเทคนิค Bright Field และ Fluorescence ของกล้องจุลทรรศน์คอนโฟคอล

## ขั้นตอนการปฏิบัติงาน (Work Instruction)

เรื่อง การใช้งานกล้องจุลทรรศน์คอนโฟคอล  
(Confocal Laser Scanning Microscope: CLSM)  
ยี่ห้อ OLYMPUS รุ่น FLUOVIEW 3000

3. เลือกหน้าต่าง Ocular (ภาพที่ 6) จากนั้น กดปุ่ม Ocular เพื่อทำการตรวจสอบตัวอย่างบนกล้องจุลทรรศน์ผ่านเลนส์ตา ระบบจะทำการตัดการทำงานของเลเซอร์ เพื่อให้ผู้ใช้สามารถมองภาพผ่านเลนส์ตาได้
  - สำหรับเทคนิค Fluorescence ผู้ใช้สามารถเลือกชุดแผ่นกรองแสงที่ติดตั้งไว้โดยการเลือกตำแหน่งของ Cube turret ตามต้องการ
  - สำหรับเทคนิค Bright Field ผู้ใช้สามารถปรับความสว่างด้วยการปรับค่า Trans Lamp



ภาพที่ 6 แสดงหน้าต่าง Ocular

4. ทำการปรับภาพชัด ด้วยการปรับปุ่มปรับภาพชัด หรือเปลี่ยนกำลังขยายตามต้องการด้วยการกดปุ่มบน Touch Panel Controller (TPC)
5. เมื่อปรับความชัดได้ตามต้องการ กดตัวเลือก LSM เพื่อใช้งานระบบแสงเลเซอร์ (ภาพที่ 7)



ขั้นตอนการปฏิบัติงาน (Work Instruction)  
เรื่อง การใช้งานกล้องจุลทรรศน์คอนโฟคอล  
(Confocal Laser Scanning Microscope: CLSM)  
ยี่ห้อ OLYMPUS รุ่น FLUOVIEW 3000



ภาพที่ 8 แสดงหน้าต่าง LSM Imaging เพื่อกำหนดค่าชุดสแกนภาพ

## 5.5 การตั้งค่าชุดรับแสงและการเลือกสีย้อม

1. เลือกหน้าต่าง PMT Setting เพื่อทำการกำหนดค่าชุดรับแสง (ภาพที่ 9)
2. เลือก Mode เป็น VBF และเลือกค่า Average เป็น none เลือก Sequential Scan เป็น none
3. กดปุ่ม Dye & Detector Select เพื่อทำการตั้งค่าชุดรับแสงให้เหมาะสมกับตัวอย่าง หน้าต่างจะปรากฏขึ้นมา

เลือกสีย้อมจากรายการ Registered Dyes หรือ Recent Dyes รายชื่อสีย้อมที่เลือกจะปรากฏที่รายการทางด้านขวา ระบบจะทำการตั้งค่าชุดรับแสงให้อัตโนมัติตามค่าความยาวคลื่นค่า Spectrum จะแสดง ที่ Assigned Dye Spectrum



ภาพที่ 9 แสดงหน้าต่าง PMT Setting เพื่อกำหนดค่าชุดรับแสง

- ในกรณีที่ Spectrum มีการทับซ้อนกัน ให้เลือก Sequential Scan เป็น Line
- ในกรณีที่สีย้อมไม่มีในรายการ ให้เลือกสีย้อมที่มีค่า Emission ใกล้เคียงกันแทน (ภาพที่ 10)

ขั้นตอนการปฏิบัติงาน (Work Instruction)  
เรื่อง การใช้งานกล้องจุลทรรศน์คอนโฟคอล  
(Confocal Laser Scanning Microscope: CLSM)  
ยี่ห้อ OLYMPUS รุ่น FLUOVIEW 3000



ภาพที่ 10 แสดงหน้าต่างการเลือกค่าสีของตัวอย่าง

โปรแกรมจะทำการเพิ่มชุดรับแสงแบบ Transmitted Light ให้โดยอัตโนมัติ หากไม่ต้องการใช้งาน ให้กดปุ่ม Remove

4. กดปุ่ม OK เพื่อยืนยัน
5. หน้าต่าง PMT Setting จะแสดงค่าของชุดรับแสงแต่ละชุดตามสีที่ยอมรับที่กำหนด (ภาพที่ 11) การตั้งค่าเริ่มต้นการใช้งานของชุดรับแสงแต่ละชุด ดังนี้
  - ตั้งค่ากำลังเลเซอร์ (Laser Power) ประมาณ 0.1 - 0.5%
  - ตั้งค่า HV ประมาณ 500
  - ตั้งค่า Gain ที่ 1x
  - ตั้งค่า Offset ที่ 0%

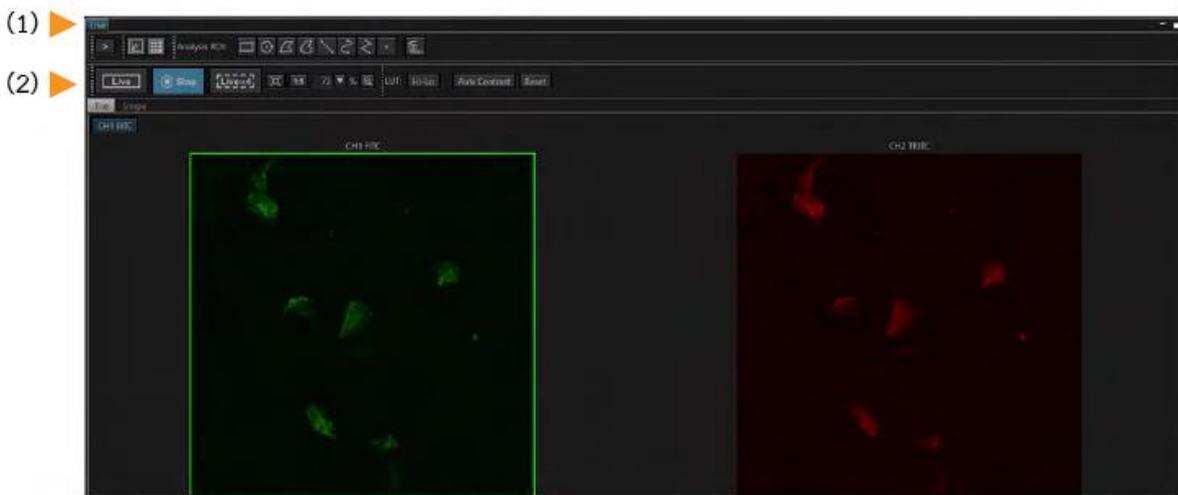
ผู้ใช้สามารถปรับค่าได้ในภายหลัง

ขั้นตอนการปฏิบัติงาน (Work Instruction)  
เรื่อง การใช้งานกล้องจุลทรรศน์คอนโฟคอล  
(Confocal Laser Scanning Microscope: CLSM)  
ยี่ห้อ OLYMPUS รุ่น FLUOVIEW 3000



ภาพที่ 11 แสดงหน้าต่างที่แสดงค่าของชุดรับแสงแต่ละชุดตามสีย้อมที่กำหนด

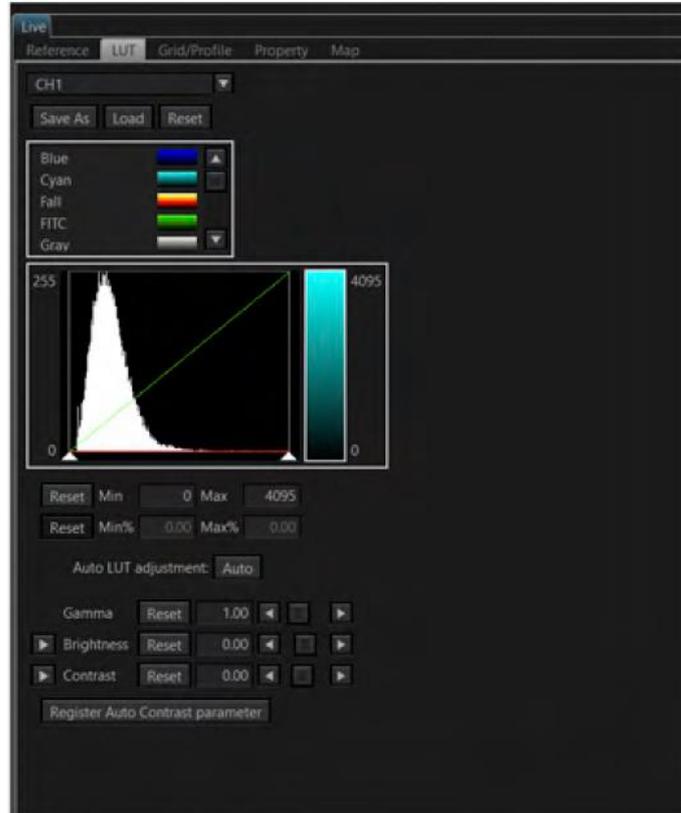
## 5.6 การแสดงภาพสด (Live) (ภาพที่ 12)



ภาพที่ 12 แสดงหน้าต่างของการถ่ายภาพสด (Live)

1. เลือกหน้าต่าง Live เพื่อทำการแสดงภาพสด
2. กดปุ่ม Live เพื่อทำการสแกนภาพ ภาพตัวอย่างจะแสดงขึ้นมาตามสีย้อมที่เลือก เลือก Livex2 หรือ Livex4 เพื่อแสดงภาพให้เร็วขึ้น ผู้ใช้สามารถเลือกการแสดงผลแบบแยก Channel (Tile) หรือแบบรวม Channel (Single) ได้ตามต้องการ รวมทั้งการเลือกแสดงเฉพาะ Channel หรือสีย้อมที่ต้องการได้
3. ทำการปรับภาพชัด ด้วยการปรับปุ่มปรับภาพชัด
4. ผู้ใช้สามารถทำการเปลี่ยนสี Pseudo Color ของแต่ละ Channel ได้โดยการกดปุ่ม < เพื่อแสดงฟังก์ชันการทำงานเพิ่มเติม เลือกหน้าต่าง LUT จากนั้นเลือก Channel ที่ต้องการเปลี่ยนและเลือกสีที่ต้องการ (ภาพที่ 13)

**ขั้นตอนการปฏิบัติงาน (Work Instruction)**  
 เรื่อง การใช้งานกล้องจุลทรรศน์คอนโฟคอล  
 (Confocal Laser Scanning Microscope: CLSM)  
 ยี่ห้อ OLYMPUS รุ่น FLUOVIEW 3000



ภาพที่ 13 แสดงการเปลี่ยนสี Psuedo Color ของแต่ละ Channel

5. กดปุ่ม Live อีกครั้ง เพื่อทำการหยุดการแสดงผลภาพ

### 5.7 การปรับภาพ (ภาพที่ 14)

1. กดปุ่ม Live เพื่อทำการแสดงผลภาพ ผู้ใช้สามารถลดค่าความละเอียดของการแสดงผลภาพเพื่อให้การแสดงผลภาพรวดเร็วขึ้น โดยการปรับค่า Scan Size ที่หน้าต่าง LSM Imaging ในกรณีที่ปรับค่าน้อยเกินไป ภาพที่แสดงออกมาจะมีคุณภาพลดลง
2. ผู้ใช้สามารถปรับค่าต่าง ๆ ได้ดังนี้
  - ทำการปรับค่า HV เพื่อเพิ่มหรือลดความสว่างของภาพ ค่า HV ไม่ควรเกิน 700 V
  - หากต้องการเพิ่มความสว่างมากขึ้น ให้เพิ่มกำลังเลเซอร์ ระวังการรบกวนการใช้กำลังเลเซอร์ที่มากเกินไป อาจทำให้ตัวอย่างเสียหายได้



ภาพที่ 14 แสดงหน้าต่างเพื่อปรับภาพตามความต้องการของผู้ใช้งาน

- หมายเหตุ: - ผู้ใช้สามารถกดปุ่ม Ctrl-H เพื่อตรวจสอบ Saturation ของภาพได้ โดยภาพจะแสดงในรูปแบบ เกรดสีเทา หรือ Grayscale
- ในบริเวณที่มีความสว่างมากเกินไป จะแสดงเป็นสีแดง ซึ่งเกิดจากการปรับกำลังเลเซอร์หรือ HV มากเกินไป
  - ในบริเวณที่มีความมืดเกินไป จะแสดงเป็นสีน้ำเงิน ซึ่งเกิดจากการปรับค่า Offset มากเกินไป

## ขั้นตอนการปฏิบัติงาน (Work Instruction)

เรื่อง การใช้งานกล้องจุลทรรศน์คอนโฟคอล

(Confocal Laser Scanning Microscope: CLSM)

ยี่ห้อ OLYMPUS รุ่น FLUOVIEW 3000

- ในกรณีที่ตัวอย่างเรืองแสงน้อย ผู้ใช้สามารถปรับค่า Gain เพิ่มขึ้น โดยสังเกตภาพที่แสดงขึ้นมา หากมีสัญญาณรบกวน (Noise) ให้ทำการลดค่า Gain ลง จากนั้นทำการปรับค่า Offset เพื่อลด Background หรือ Noise ลง ไม่ควรปรับค่า Offset มากเกินไป จนทำให้ภาพของตัวอย่างที่มีความสว่างน้อยหายไป

### 5.8 การถ่ายภาพและบันทึกภาพ

1. เลือกหน้าต่าง Acquire จากนั้นเลือกแถบ Normal (ภาพที่ 15)
2. เลือก Folder ที่ต้องการบันทึกภาพ จากนั้นตั้งชื่อแฟ้มที่ต้องการบันทึกภาพ (ในกรณีที่ไม่มี การเปลี่ยนชื่อแฟ้ม โปรแกรมจะทำการบันทึกภาพในชื่อเดิมและมีเลขต่อท้ายชื่อโดยอัตโนมัติ)
3. กดปุ่ม LSM Start เพื่อเริ่มต้นการถ่ายภาพ หลังจากเสร็จสิ้นการถ่ายภาพ โปรแกรมจะบันทึกภาพไปที่ Folder ที่กำหนดไว้โดยอัตโนมัติ



ภาพที่ 15 แสดงหน้าต่างเพื่อถ่ายภาพและบันทึกภาพ

## ขั้นตอนการปฏิบัติงาน (Work Instruction)

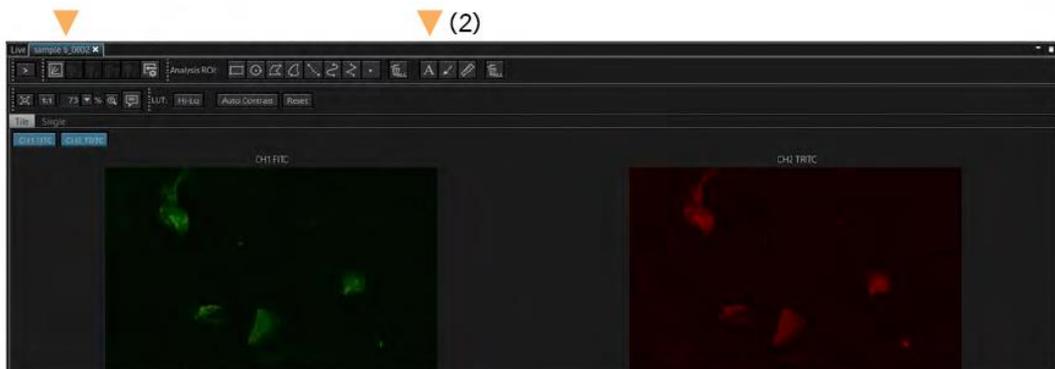
เรื่อง การใช้งานกล้องจุลทรรศน์คอนโฟคอล

(Confocal Laser Scanning Microscope: CLSM)

ยี่ห้อ OLYMPUS รุ่น FLUOVIEW 3000

### 5.9 การดูภาพที่บันทึกไว้แล้ว (View)

1. เลือกเพิ่มรูปภาพที่ต้องการดู โปรแกรมจะแสดงหน้าต่างและภาพที่บันทึกไว้
2. ผู้ใช้สามารถใส่ข้อความ ลูกศร หรือสเกลบาร์ในภาพ ได้โดยการกดปุ่ม (2) (ภาพที่ 16)



ภาพที่ 16 แสดงหน้าต่างการเรียกดูภาพที่บันทึกไว้

### 5.10 การถ่ายภาพแบบ Series

1. เลือกหน้าต่าง Series (ภาพที่ 17)

ขั้นตอนการปฏิบัติงาน (Work Instruction)  
เรื่อง การใช้งานกล้องจุลทรรศน์คอนโฟคอล  
(Confocal Laser Scanning Microscope: CLSM)  
ยี่ห้อ OLYMPUS รุ่น FLUOVIEW 3000



ภาพที่ 17 แสดงหน้าต่าง Series เพื่อการถ่ายภาพแบบ Series

2. การถ่ายภาพแบบ Time Lapse โดยการกำหนดค่า Interval หรือระยะห่างระหว่างภาพ ที่ต้องการ (ในกรณีที่ต้องการให้เวลาเร็วที่สุดที่เป็นไปได้) กำหนดเป็น FreeRun จากนั้น กำหนด Cycle หรือจำนวนรอบของการถ่าย กดเลือกตัวเลือก Time เป็น ON จากนั้นกดปุ่ม LSM Start
3. การถ่ายภาพแบบ Z Section เลือก Motor เป็น Start/End ทำการปรับภาพชัดบริเวณ ด้านบนของตัวอย่าง จากนั้นกดปุ่ม Register ที่ Start ทำการปรับภาพชัดบริเวณด้านล่าง ของตัวอย่าง จากนั้นกดปุ่ม Register ที่ End โปรแกรมจะแสดงค่า Slices และ Step Size ให้โดยอัตโนมัติตามขนาดของเลนส์วัตถุ ผู้ใช้สามารถกำหนดค่าได้ตามต้องการ (ในกรณีที่ผู้ใช้ ต้องการค่าความละเอียดที่ดีที่สุด สามารถกดปุ่ม Optimize กดเลือกตัวเลือก Z เป็น ON



## ขั้นตอนการปฏิบัติงาน (Work Instruction)

เรื่อง การใช้งานกล้องจุลทรรศน์คอนโฟคอล

(Confocal Laser Scanning Microscope: CLSM)

ยี่ห้อ OLYMPUS รุ่น FLUOVIEW 3000

จากนั้นกดปุ่ม LSM Start) ซึ่งผู้ใช้สามารถใช้งานการถ่ายภาพแบบ Time Lapse และ Z Section พร้อมกันได้

4. ในกรณีที่ต้องการถ่ายในรูปแบบปกติ ให้กดตัวเลือก Time และ Z เป็น OFF

## 6. แบบฟอร์มที่เกี่ยวข้อง

-

## 7. การจัดเก็บเอกสาร

-

## 8. ภาคผนวก

-