

レーザー共焦点顕微鏡 LSM 510の簡略な使い方

Ver 3.2用 ビジュアル版

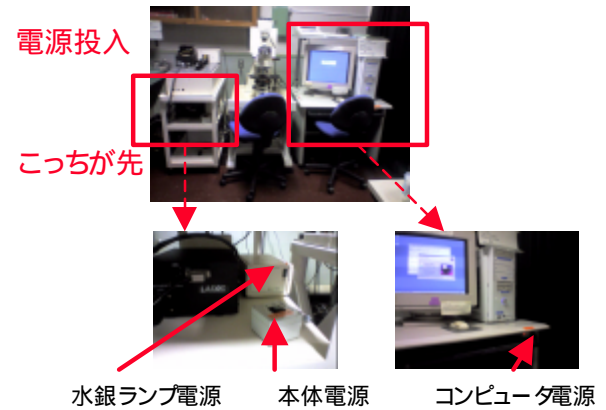
基本操作

【画像取得までの大まかな流れ】
(小文字の操作は一度だけ行います)

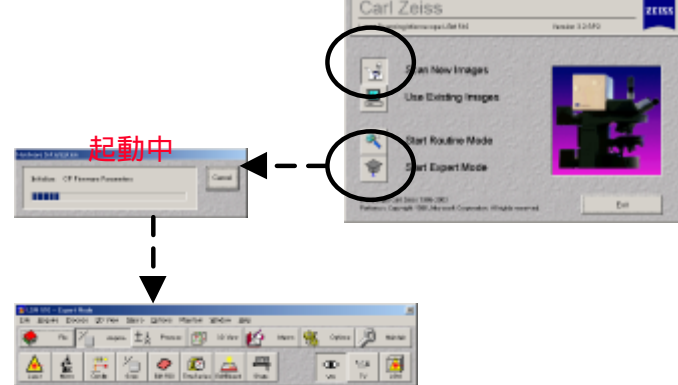
- 電源を入れる
- レーザー点灯
- 顕微鏡観察
- スキャン用フィルター設定
- スキャン (1スキャン、Zスキャン、タイムラプス等)
- 画像の保存
- (から繰り返し)
- シャットダウン

電源を入れる

- ・本体電源ON (レーザーユニット下部、手前側)
 - ・水銀ランプON (レーザーユニット下部、奥側)
 - ・コンピュータ電源 ON (パソコンデスク右下)
 - Windowsが起動するのを待つ... -
 - LSM510ソフトが自動起動する -
- [Scan New Images] と [Start Expert Mode] をクリック
- メインメニュー表示 -



LSM510ソフトが起動するまで待つ



レーザー点灯

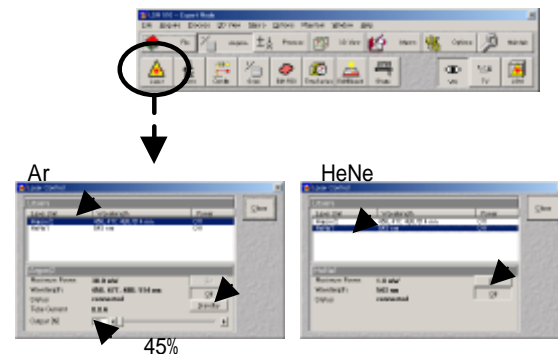
[Acquire] - [Laser] 下記の順にクリックして使用するレーザーを点灯させる (対応色素は下表参照)

- ・Argon/2 - [Standby] - OUTPUT 45%
- HeNe1 - [ON]

設定後 [Close]

使用するレーザー

Argon/2...FITC,Cy2,GFP,Alexa488,Fluo3等 (主に緑の蛍光用)
HeNe1...D-タンニン,Cy3,PE,PI等 (主に赤の蛍光用)



顕微鏡観察

[Acquire] - [Micro]

光路切替レバー (金色) を VIS ポジションへ

- Objective で対物レンズ 選択
(× 10 , × 20 , × 40oil , × 63oil , × 63W , × 40)
- ・下記のボタン(ウィンドウ上部)で蛍光フィルター等を選択
(UV , FITC LP , Rhodamine , FITC BP , FITC/Rhod , Transmission , OFF)
- 視野をさがし ヒントを合わす

光路切替レバーを LSM ポジションへ



Reflector一覧

UV(Fset01)...ヘキスト等(観察のみ可能)
FITC LP(Fset09)...FITC等(広帯域,LP520)
Rhodamine(Fset15)...D-タンニン等(LP590)
FITC BP(Fset17)...FITC等(狭帯域,BP515-545)
FITC/Rhodamine Double BP
(Fset23)...FITC&D-タンニン(BP515-530,580-630)
Transmission(None)...透過、微分干渉

モニターの近くにある手元スイッチで
部屋の照明をON/OFF出来ます

微分干渉像が必要な方は後述
「微分干渉像の取り込み」を参考にして下さい。

対物レンズは低倍から徐々に上げていく

スキャン用フィルター設定

[Acquire] - [Config]

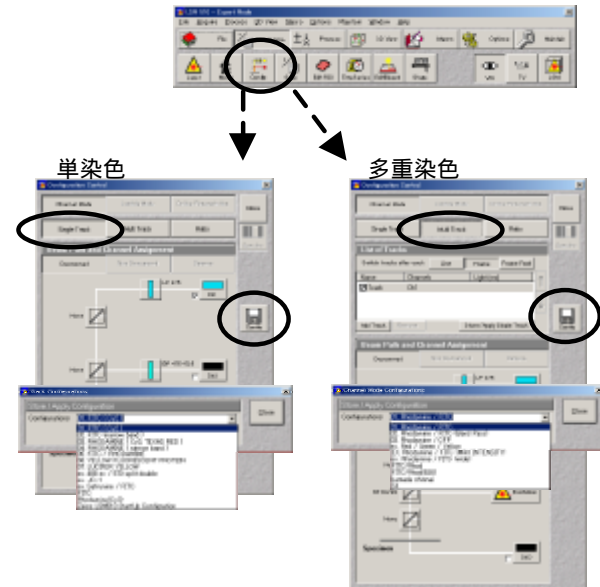
単染色は[Single Track]、多重染色は[Multi Track]を選ぶ

[Config] を押しメニューの中からフィルターセットを選び[Apply]

(Multi TrackはApply後、Ch1のみチェックありで正常です)

Apply後、[Close]

Single Track	
FITC(Cy2)...	広帯域,LP505
FITC(Narrow)...	狭帯域,BP505-550
Rhodamine(Cy3)...	広帯域,LP560
Multi Track	
Rhodamine/FITC...	狭帯域,BP505-530
	広帯域,LP560
通常 Argonレーザーを使うものはFITC Narrow HeNeを使うものはRhodamine Cy3 両方使うものはMulti Track Rhodamine/FITC	



スキャン

[Acquire] - [Scan]

【共通操作】(1切片、連続切片、タイムラプス共通)

[Channels]

- ・[1]ボタンでPinhole =1.00Airy/Unitsに設定
(2チャンネル使用する場合、ch1を1.00Airy/Unitsに設定し
そのときのOptical Sliceと同じになるようにch2の値を調整する)

{Find} で明るさ自動調整スキャンをする

(条件を変えたぐいときはFindしてはいけない)

{Cont}で連続スキャン

フォーカスを合わせた後、以下の項目を動かして明るさを調整する

Detector Gain (検出器の感度を変えて明るさ調整)

Ampl Offset (コントラスト調整)

Ampl Gain (感度調整 ノイズ増えるのであまり使わない方がいい)

調整できたら[STOP]で止める

(さらに拡大したい場合、[Crop]で場所を指定し [Single]で拡大する)

[Mode]

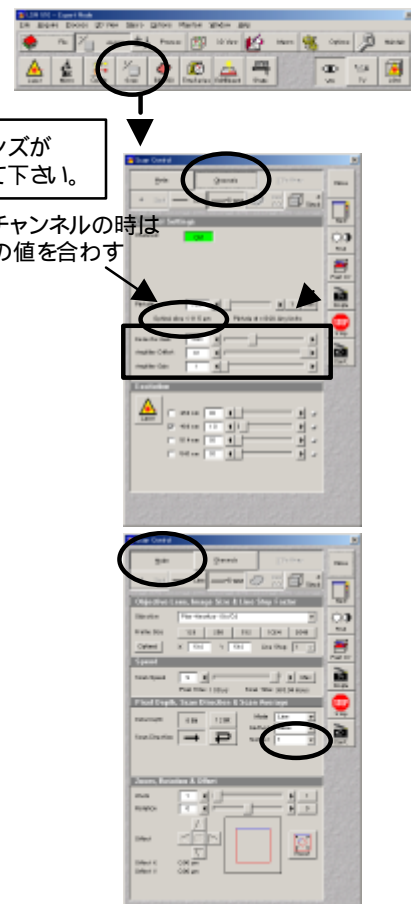
Average Number(mean)を4回に設定し[Single]

(画像のざらつきが気になる場合はAverageを8又は16にする)

< 1スキャン画像の場合はここで画像の保存を行う>

ピンホール設定はレンズが
変わるたびに確認して下さい。

2チャンネルの時は
この値を合わせる



【Zスキャン操作】(連続切片の方のみ)

Average Number(mean)を1回に戻す

[Z Stack]

{Mark First/Last}

{XY cont} でスキャンさせ、

フォーカスノブを手前に回しスタート地点で [Mark First]

フォーカスノブを奥側に回し終了地点で [Mark Last]

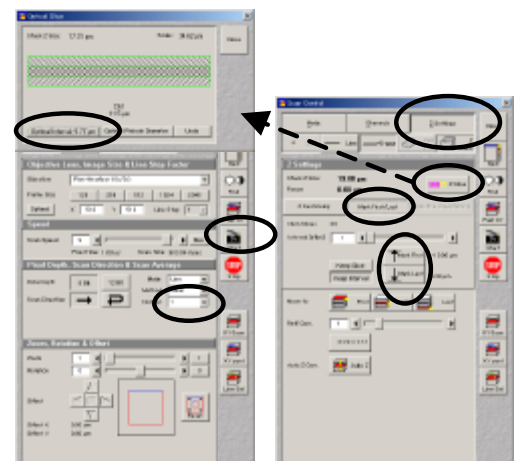
{Stop}

{Z Slice} - [Optimal Interval]-[Close]

(ピンホールで設定された半値幅で枚数が自動設定される)

ModeのAverageを設定して [Start] でセクション開始

< Zスキャン画像の場合はここで画像の保存を行う>



【タイムラプス操作】

Average Number(mean)を1回に戻す

[Acquire] - [Time Series]

- Number (取り込み枚数)とTime (取り込み間隔)を入力する
(1スキャンの時間 < 取り込み間隔にしなければいけない)
- ModeのAverageを設定して [Start T] で取り込み開始

< タイムラプス画像の場合はここで画像の保存を行う >

画像の保存

記録メディアをセットする

(MOはWindows用の128MB ~ 640MBのものでM:になります。USBメモリはF:になります。)

CD-R/RW/DVD-R/RWを使用する場合は一度ハードディスクに保存し

シャットダウン前に後記「CD-R(RW)への保存方法」に従って保存して下さい。

・イメージウィンドウの[Save As]

最初のデータの時のみ [New MDB]

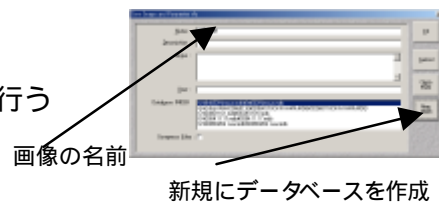
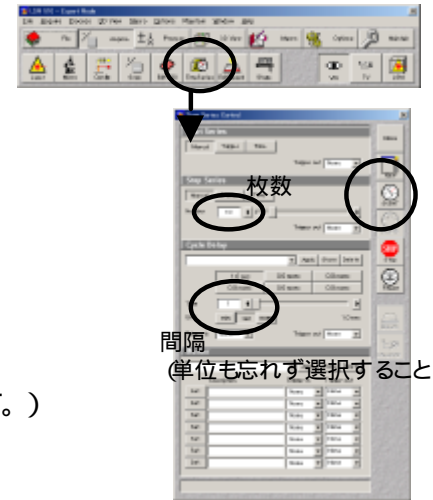
Removable Disk X: を選び (Xはメディアにより変わる) Database Name を入力 (記号はダメ)

[Create]

Sample Name を入力し [OK] (2回目以降はこの操作だけでいい)

画像を変換(TIFF等)する必要のある方は後記「画像フォーマットの変更」を行う

保存済み画像は閉じる



次の視野へ

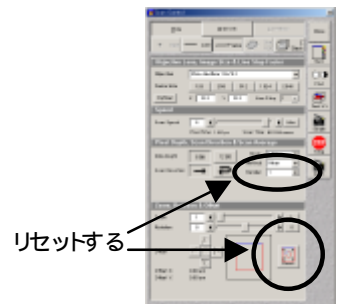
・[Mode] Resetを押し Average Numberを1回にする

・ から繰り返す

通常は、光路切替(VIS) - 場所探し - 光路切替(LSM)

ピンホール確認 - [cont] - ピント調整 - Average4 - [single] - 保存

を繰り返せばいい



シャットダウン

{Acquire} - [Laser]

使っているレーザーを [OFF]

{Acquire} - [Micro]

対物レンズを×10にする

(油浸、水浸レンズを使用の場合、レンズをクリーニングする)

{File} - [Exit]

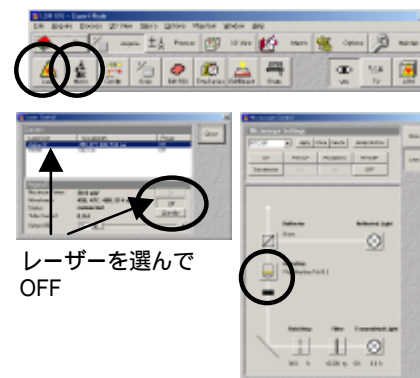
LSM510起動画面で [Exit]

・メディアの取り出し

USBメモリ...画面右下のハードウェアの取り外しからF:を停止にする

MO...全てのウィンドウを閉じ デスクトップのMOアイコンを右クリック - 取り出し

(どうしても出ないときは終了操作の続きをする)



クリック - F:を停止します



右クリック - 取り出し

コンピューターの終了操作 (自動で電源が切れないので注意)

START - Shut Down

- しばらく待つ... -

・電源を切る準備ができました」のメッセージが表示されたら、電源OFF (机の下)

(MOが出なかったときは電源OFF直前にボタンを押して取り出す)

・水銀ランプOFF

・アルゴンレーザーの上のファンが止まっているのを確認して本体電源 OFF

使用ノートに記帳する

部屋全体の照明スイッチは
廊下にあります。

その他の操作

微分干渉像の取り込み (明視野、非共焦点像)

<顕微鏡観察>

- 重要
- 光路切替レバーをVISにし [Acquire] - [Micro] で Transmissionを押す
 - ・アナライザーを入れる
 - ・コンデンサーを設定 (× 10 ~ 40 ... II、× 40oil以上 ... IIIにセット)
 - ・ポラライザーを入れる(通常入ったままになっている)
 - ・絞りを少しだけ絞る (絞りすぎるとゴミが映りやすくなります)
 - ・DICスライダーのねじを回してコントラストを付ける

<レーザースキャン>

光路切替レバーをLSMにし アナライザーだけ抜く(他のものはさわらないこと)

{Acquire] - [Config]

光路図のChDのチェックを入れる、色は白色を選択

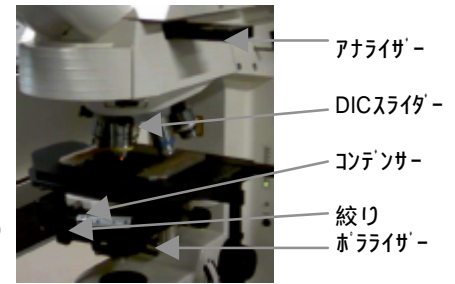
(Multi Trackで使用している場合、FITC側のChDをつけた方が綺麗)

{Acquire] - [Scan] - [Channels]

・Ch.D(白)が追加されるのでGainを調整しながら通常通りスキャンする

イメージウインドウの[Split XY]で画像を確認し 必要であれば保存する

途中で対物レンズを変えた場合、顕微鏡観察から調整をやり直す必要があるので注意
微分干渉像が不要になったら[Acquire] - [Config] , ChDのチェックをはずす



微分干渉像や多重染色像の分離、重ね合わせ

イメージウインドウの[Split XY]を押すと分離します。[XY]で元に戻ります。

[XY]表示の時、[Chan]で必要ない色を[OFF]にすることで任意の重ね合わせ像にできます。

戻すときは[OFF] 元の色にします。



三次元画像取り込み (本体のみ)

通常操作で画像の明るさを調整しておく

(像が明るすぎると三次元構築時に綺麗にできません)

{Acquire] - [Scan] - [Z Stack]

{Mark First/Last]

{XY cont] でスキャンさせ、

フォーカスノブを手前に回しスタート地点で [Mark First]

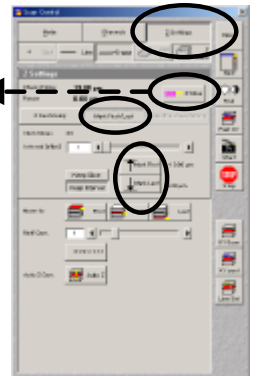
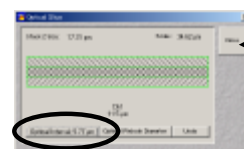
フォーカスノブを奥側に回し終了地点で [Mark Last]

{Stop]

{Z Slice] - [Optimal Interval] を押すとピンホールで設定された
半値幅で枚数が自動設定される

{Start] でセクショニング開始 (Mode-Average設定するとノイズ減る)

スキャンが終了したら画像を保存する



三次元構築 (本体、イメージブラウザ v4.0以降)

[3D View] - [Projection]

・Fast Angle 0

・Number Projections (回転画像の枚数、1回転するときは32くらい)

・Difference Angle (画像間の角度、[Panorama]で1回転する角度に設定してくれる)

・Transparency (別タブ) Maximunを確認

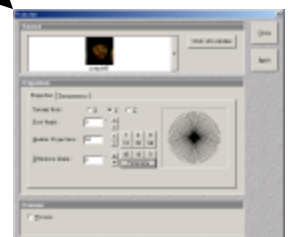
[Apply]

イメージウインドウの[Slice]または[Anim] で画像回転させて見る

必要であれば画像を保存する

(その他の三次元構築として立体視の赤 / 緑方式 (色眼鏡) と

左 / 右方式 (立体視) があります)



前回使用条件の読み出し (本体のみ)

以下の方法で使用したい条件を持つイメージを開く

[File] - [Open Database] でデータベースを開く

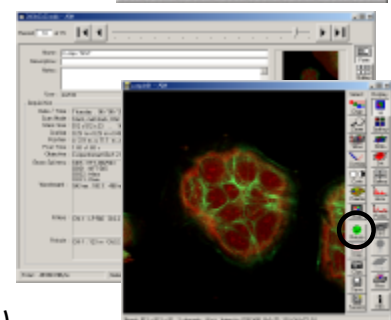
▶▶ で使用したい条件を持つイメージ選択

イメージをダブルクリックして画像を開く

[Reuse] を押すとその画像を取得した条件と同じ設定が適用される

(設定適用後はAverage回数やRotationも適用されているので注意して下さい。)

対物レンズは手動で変えて下さい。)



LSM Image Browser のインストール (Winのみ, Mac不可)

1. LSM Image Browserのセットアップファイルを手に入れる。
ツァイスのホームページから入手できます。共同実験室にも置いてあります。
Windows2000以前のOSを使っている方は旧バージョンを共同実験室から入手して下さい。
ダウンロードはこちらから。 <http://www.zeiss.de/en>
(検索キーワードに“image browser” と入力してsearchして下さい。)
2. ダウンロードしたInst_ib.exeをダブルクリック。
3. Nextでインストールを進めていき、Destination Folderが C:\AIM になっているのを確認。
(MS DAO V3.5は必ず一緒に入れて下さい。)
4. 後の項目は気にせずNextで進める。インストールが完了するとデスクトップとスタートメニューにショートカットが作られる。
* データベースを開いたとき表示が乱になりますがこれは仕様です。(本当はumです)

輝度表示の為の設定変更

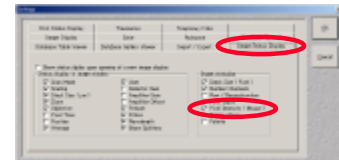
Image Browserを起動する。

メインメニューの Options ? Options。

[Image Status Display] タブのPixel Intensity のチェックをオン。

OK を押し、画像上にマウスを動かすとウインドウの下部にIntensityが表示される。

(ただし、Contrで明るさ等を変えているときはIntensityも変わっているので注意。)



スケールの入れ方

[File] - [Open] でデータベースを開く

データベースからスケールを入りたい画像を選んでダブルクリックで開く

イメージウインドウの[Overlay]をクリックしてスケールのアイコンをクリック

画像内でドラッグすると長さを計算しながらスケールバーを引いてくれる

(位置の修正、色の変更が可能)

(他のボタンを使うと字を入れたり、図形を書いて長さを表示させたりできます)



画像のフォーマットの変更(TIFF)

[File] - [Open] でデータベースを開く

データベースから変換したい画像を選んでダブルクリックで開く

[Chan]で必要な色を表示させておく

[File] - [Export] で以下を確認

Image type ... Contents of image window(画面表示のまま保存)

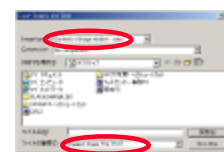
Single Image With raw data (生データを保存)

Save in ... MO等の保存場所

Save as type ... TIF - Tagged Image File(*.tif)

・ファイル名 (記号、ピリオド不可) を付けて[Save]

Image typeのキーワード
Raw...画像取得時のまま出力 (白黒)
Contents...画面上の変更全てを含めて出力
Full Resolution...画像取得時の解像度で出力
Single...現在表示されているスライスのみ出力
Series...全てのスライスを一括出力
Split XYやGallery表示でも保存できます



Exportするファイル名によってはダブルクリックで開かない場合があります。
この場合は、手動で.tif等のファイル形式を表す拡張子を名前の後ろに付けて下さい。
(通常は自動で付きます)

CD-R(RW)への保存方法

・直接保存はできないのでデータベースをハードディスク内の適当な場所に保存しておく (なるべくC:以外に保存して下さい)

・ライティングソフト B's Recorder Gold を起動する
(デスクトップ又はスタートメニューにあります)

・マイコンピュータから自分の書き込むデータを探し、書き込みたいフォルダごとB's Recorderの右下の枠にドロップする

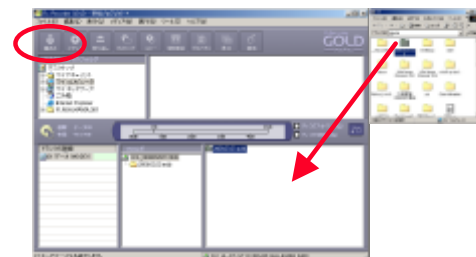
・メディアをセットし、[書き込み]ボタンを押す

書き込み条件をセットし、[OK]を押すと書き込みを開始します

(重要なデータはコンペアチェック(書き込み確認)をする事をお奨めします)

書き込みが終了したらB's Recorderを終了し、CDの確認をして下さい

正常に書けている場合はハードディスクのデータを削除しておいて下さい



動画フォーマットへの変更(AVI) (イメージブラウザ ver3.5以降)

[File] - [Open] でデータベースを開く

変換したい画像 (スタック画像) を選んでダブルクリックで開く

[File] - [Export] で以下を確認

Image type ... Contents of image window series(画面表示のまま保存)

動きをなめらかにするときにはFrames/secの数値を大きくして下さい

ファイルの種類 ... Video for Windows(*.avi)

・ファイル名 (記号、ピリオド不可) を付けて[保存]

