

LSM780(もっと)簡易マニュアル

【1】電源の入れ方

順番にスイッチを入れる ①③④⑤⑥
 蛍光光源⑨を入れる
 PCを立ち上げる⑩

(立ち上がるのに3分くらいかかります。)

LSM Userでログインします。
 ZENのアイコンをダブルクリック。
 Start Systemをクリック。

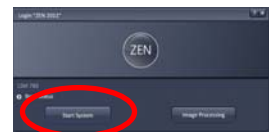
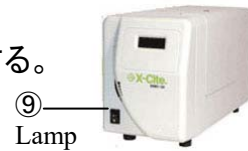
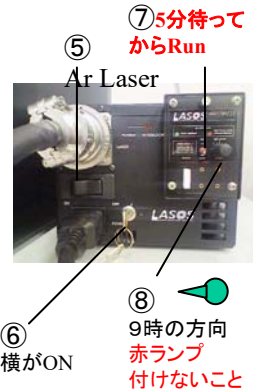
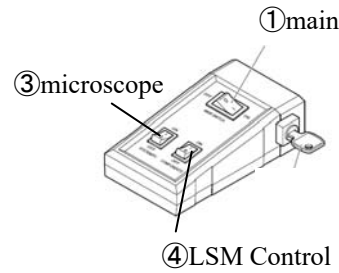
ZENが起動したら

⑥ONから5分待つて⑦Run
 1分待つて⑧を回す

⑦をRun(上)にしたあと⑧を回して9時の方向(←)にする。

(暫くすると緑LEDが点灯する。赤のLEDが付いた場合少しつまみを戻す。)

画面左下にエラーが表示されたり、
 起動処理が進まない場合は、
 何か正常に動いていないので
 ZEN終了、④③スイッチOFF、③④スイッチON、PC再起動を行う。



取り込み用 解析用

【2】レーザーの入れ方...自動で付きます

【3】レーザー顕微鏡の光路設定

コントロール部最上部のAcquisitionをクリック。
 Experiment ManagerかSmart Setupで光路設定を行う。

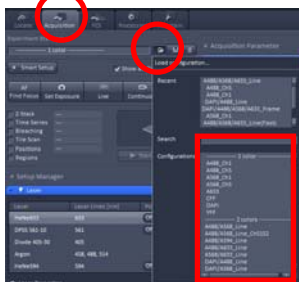
共局在を見る方はSmart Setupを使ってください。
 光学切片厚が違っていい場合は
 Experiment managerが扱いやすいです。

3色まで

Line sequential

<Experiment Managerから設定する場合>

Experiment Managerの横の開くアイコンをクリック。
 リストから希望する組み合わせの設定を選ぶ。



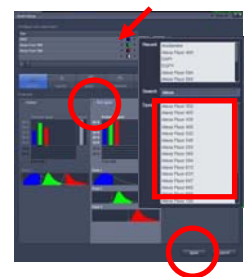
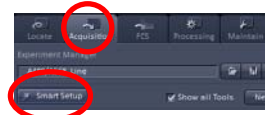
1color~3colorで
 セパレートされています。
 リストにない組み合わせは
 できません。

4色まで

Frame sequential

<SmartSetupから設定する場合>

Experiment Manager下のSmart Setupボタンをクリック。
 Dyeのプルダウンをクリックし、出てきたウィンドウの
 Dyesリストから使用している色素を選ぶ。
 同様の操作でDyeに使用している色素を全て登録する。
 Best Signalを選びApplyをクリック。



これ以上の色数を使用する場合は
 制限がありますので事前にご相談ください。

(微分干渉像を撮りたい場合)

<Experiment Manager, Smart Setup共通>
 Light Pathのバーを開き、適当なTrackを選択。
 (405nm励起以外のトラックを推奨)
 T-PMTのチェックを入れる。

後述の顕微鏡での観察時に
 微分干渉のコントラスト調整をしてください。



【4】顕微鏡での目視観察

コントロール部最上部のLocateをクリック。

観察したい蛍光または微分干渉のボタンをクリック。

- DAPI...青蛍光バンドパス
- GFP...緑蛍光バンドパス
- DsRed...赤蛍光バンドパス
- AF488...緑蛍光ロングパス(赤蛍光付近も入る)
- Transmit...明視野
- DIC...微分干渉(対物に合ったコンデンサを選択し、DICスライダのつまみを回しコントラスト調整する)

対物レンズのアイコンをクリックするとレンズを変更できます。
撮影したい場所を中心に移動させピントを合わせます。



【5】画像の取得

コントロール部最上部のAcquisitionをクリック。



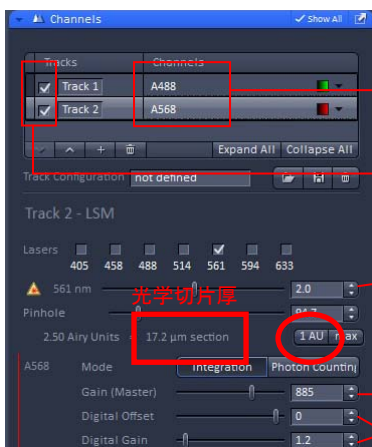
<Experiment Manager用調整方法>

Channels(右列下)のバーを開く。
長波長側の1AUのボタンをクリック。

明るさを自動調整する場合は、
上部のSet Exposureをクリック。

Liveで連続スキャンをし、フォーカスを合わせ
Gain(Master)で明るさをDigital Offsetで
コントラストを調整する。
多色の場合、Channelsの名前をクリックして
表示を切り替えGain、Offsetを調整する。

全ての調整が終わったらStopする。



<Smart Setup用調整方法>

Channels(右列下)のバーを開く。
長波長側の1AUのボタンをクリック。
光学切片厚を確認し、他Channelの厚さを合わせる。

明るさを自動調整する場合は、
上部のSet Exposureをクリック。

Tracksのチェックをどれか1つにし、
一色ずつ微調整します。

Liveで連続スキャンをし、フォーカスを合わせ
Gain(Master)で明るさをDigital Offsetで
コントラストを調整する。
調整が終わったらStopする。

Tracksのチェックを別の物にし、Liveで微調整する。
(Channelsの名前をクリックして設定表示を切り替える)
全てのTrackで調整できたら
Tracksのチェックを全て入れる。

594nm,633nmLaserはパワーが弱いため
感度が出ない場合は5~10%程度まで上げてください

<ここから共通操作>

以下の設定で仕上げのスキャンをする。
Acquisition Mode(右列上)バーを開く。
AveragingのNumberを4程度にし、
(ノイズ多めの場合は8 or 16) Snapをクリック。

Frame sizeは1024x1024がお奨め



【6】画像の保存

メニューのFile-Save as
保存場所と名前を指定し、czi形式で保存する。
【4】に戻り、次の視野を探す。

目安	Average
Gain	
800~	4
900~	8
1000~	16

【7】 その他の機能について (比較的よく使う機能)

イメージウィンドウの説明

2D... マージした表示 (初期表示)

Split... 多重染色を分離して表示

Info... 条件の表示

Dimensions... 色の変更や非表示

Ch部分... 表示のON/OFF

カラー部分プルダウン... 疑似カラー変更

Single Channel... 単色/多色切替

Range Indicator... サチュレーション確認用

Reuse... 機械の設定を画像を取得した時の設定に戻す

Display... Brightness, Contrastの調整 (画像処理)

Graphics... 注釈やスケールの書き込み、計測

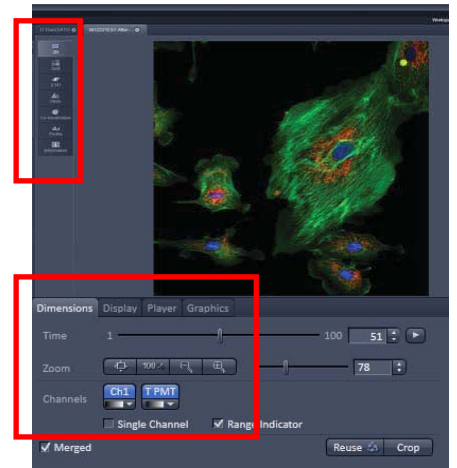
スケール

スケールを入れる→ものさしアイコンで画像内をドラッグ

長さ、面積表示→図形ツールで図形を書き込み後、

リスト内のMIにチェック

一部切り抜き→図形ツールで図形を書き込み後、Cut Region



Crop (部分拡大)

イメージ下部のCropをクリック。

枠が現れるので撮りたい場所を指定。

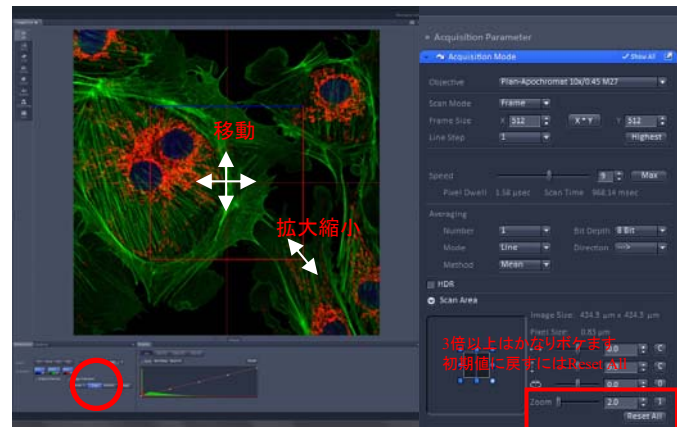
(中央部をドラッグして移動、

角をドラッグして範囲を絞る)

Liveスキャンすると指定場所が拡大される。

(必要ならAverageを入れSnapで画像保存する)

元に戻すときはScan AreaのReset All。



Stage (任意の場所にステージを移動)

イメージ下部のStageをクリック。

画像内でセンターにしたい場所をクリック。(ステージが移動する)

バグがあるので過信しないように

Range Indicator (サチュレーションの確認)

Split表示にする。

Liveスキャンを開始し、Range Indicatorをチェック。

サチュレーション部分が赤色、輝度値0が青色に表示される。

バックグラウンド部分が青くなるようOffsetを調整すると綺麗に見える。

画像を定量に使う場合は赤い部分と青い部分が出ない様に注意する。

Range Indicatorのチェックを外すと元に戻る。



Export (汎用形式での画像保存)

メニューのFile-Export

Formatでファイル形式選択 (通常TIFF)

Dataで保存形式を選択 (通常Contents of image window single plane)

Select file name and saveで保存場所を指定して保存する。



Raw Data=解析用

Contents of image window=画面表示のまま保存 (Snapshot)

(綺麗に保存できるかは画面解像度に依存)

Full resolution image window=元解像度を保持して保存

(フォントサイズが変わる場合あり)

single planeは表示しているPlaneのみ

seriesは全Stack画像を出力する。

【8】電源の切り方

⑧を左に回して**最小**の状態にする。

⑦を**Idle**(下)にする。

⑥を回して**縦**にする。

(冷却が始まります。続きの操作をしますが、**ファンが止まるまで⑤は切らないこと。**)

ZENを閉じる。

蛍光光源⑨を切る。

データをUSBに保存する。

Windowsを**シャットダウン**する。

対物**レンズのクリーニング**をする。

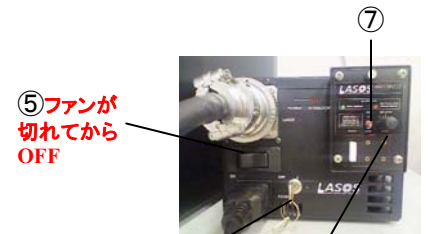
対物を回すときはタッチパネルの
Microscope-Control-Objectiveで選ぶ。

クリーニング後は**10x**にすること。

ステージを**センター付近**に戻す。

レーザーの**ファンが止まったら⑤をOFF**

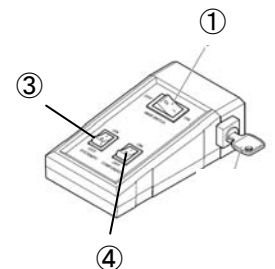
集中電源を切る④→③→①



⑤**ファンが切れてからOFF**

⑥**縦がOFF 5分待つ**

⑧ **7時の方向**



最後に使用簿の記入をお願いします。 お疲れさまでした。

ビューワーをお持ち帰りの方へ

共同実験室では2012x64をお奨めします。ネットでは手に入りませんので必要な方はお申し出ください。

Zen2009...32bit,64bit共用旧バージョン、**CZI形式非対応**

Zen2012x64...64bit用、システム付属と使用感が同じ、**推奨バージョン**

Zen3.0 Black SR...最新バージョン(Zen2012がインストールできない方はこちらを使用してください)

比較的新しいPCではZen2012がインストールできないことがあります。
その場合Zen3.0を使用しますが、サイズが約4GBあります。大きめのUSBメモリをご用意ください。

その他の特殊な機能の紹介

使い方については割愛

Z-Stack...連続切片像を撮り、立体像を構築できます。

Time Series...一定間隔でスキャンし、経時変化をとります。

Bleaching...高出力レーザーを照射し、部分的に退色をさせます。

Tile Scan...複数枚の平面像を撮り、繋ぎ合わせて解像度の良い広範囲の像を作ります。

Positions...予め座標を覚えさせることにより、場所の移動をスムーズにしたり、多点自動測定をさせたりします。

Regions...特定領域を作り、その部分だけスキャンしたりブリーチしたりします。

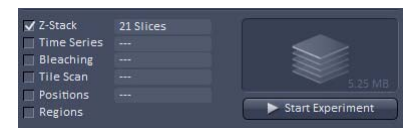
Lambda scan...分光の機能を使い、フィルターでは分離できないような蛍光や自家蛍光を分離します。

HDR...蛍光の強い部分と弱い部分を1つの視野に収まるように画像取得します。

これらの機能は複数チェックをすることにより複合で機能します。

例) Z+Time=4D Imaging, Time+Positions=多点タイムラプス, Time+Bleach+Regions=FRAP測定等

また、FCS(蛍光相関分光法)ができます。こちらについては詳細不明なため使用時はZeissにご相談下さい。



LSM780(もっと)簡易マニュアル[Z-Stack]

基本操作は2D編をご覧ください。

以下は画像調整が終わって画像取得ができる状態からの説明です。

Z-Stackはフォーカスを変えながら連続切片像を取得する機能です。

<Z-Stackの設定>

スキャンボタン下側のZ-Stackのチェックを入れる。

Z Stackの設定が追加されるのでZ-Stackのバー(右列下)を開く。



Liveボタンをクリックし、連続スキャンにする。

フォーカスを手前に回し下端でSet First、

フォーカスを奥に回し上端でSet Lastをクリック。

Stopをクリックしてスキャンを止める。

Z-StackのバーのOptimalの横の数字ボタンをクリック。

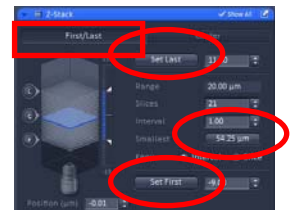
(光学切片厚の半分のステップでScan枚数が自動設定されます)

AveragingのNumberを設定しスキャンボタン下側の

Start Experimentでスキャン開始。



見えている側を奥に回すと上がる(Last)



カバーガラス側がFirst

スキャンが終わったら画像をczi形式で保存して下さい。

Zスタック画像に対して追加、変更される項目

ウィンドウ左側

Gallery...スタック画像の一覧表示

Ortho...直交の断面表示

3D...立体像を構築します。パラメータの詳細は後述。

画像をドラッグすると自由にアングルを変えられます。家のアイコンで初期位置に戻ります。

ウィンドウ下部

Dimensions...Z-Positionのバーが表示され連続切片像を移動させられます。

ウィンドウ下部右側(3Dパラメータ)

3D...立体像を構築するときの表現方法

Transparent...透過性を考慮して表示(内部構造等が見えにくい)

Maximum...通常が表示(手前と奥の概念がない、内部構造等が見える)

Appearance...3Dタブに対するパラメータ(3Dの項目毎に変わります)

Transparency...透過性の設定(透明にすると中が見えて外が見にくくなります)

Threshold...輝度の低い部分をカット

Ramp...コントラスト

Maximum...上限輝度

Background...背景色の設定(Transparentはグレー、Maximumは黒が見やすい)

Light...表面の明るさ設定

Series...立体構築像のアニメーション設定(現在表示されている位置が回転開始位置になります)

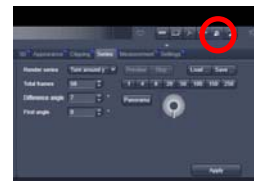
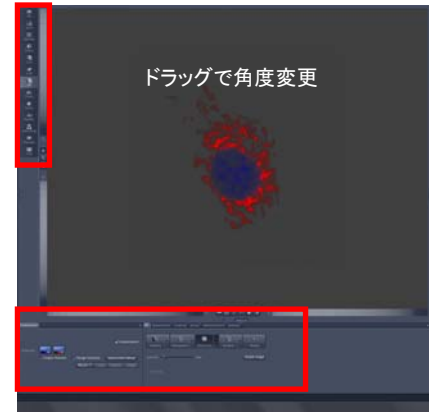
Render series...回転軸の設定(X=縦回転,Y=横回転)

Total frames...アニメーションのコマ数

Difference angle...間隔の角度差(Panoramaクリックで指定コマ数で1回転する設定に)

First angle...1枚目の角度(0°が今表示している位置)

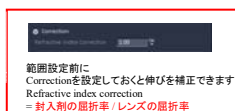
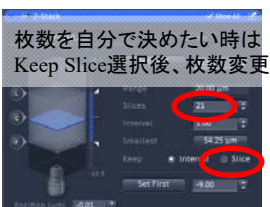
Applyをクリックすると回転像(アニメーション元画像)を作成。



Appearanceは前のパラメータが残っているので注意

Stack画像やアニメーション画像に対してはExportでAVI等の動画ファイルが選択できるようになります。

- memo -



一般的なの立体蛍光像の設定
3Dのモード...Maximum
AppearanceのTransparent内設定
Threshold...0
Background color...黒
Light...1
アニメーション設定例
Turn around Y
Total frames 100
First angle 0
panorama

LSM780(もっと)簡易マニュアル[Tile Scan]

基本操作は2D編をご覧ください。

以下は画像調整が終わって画像取得ができる状態からの説明です。

Tile Scanは複数箇所を撮影し、繋ぎ合わせて1つの大きな画像を作る機能です。

<Tile Scanの設定>

ツールエリアのTile Scanにチェック。

Tile Scanバーを開く。

Bounding gridを選択。Overlapを10%に設定。

Online stitchingにチェックを入れ、Thresholdを0.7にする。

Liveをクリックし、画像を表示させる。

取り込みたい範囲の端点になる部分に移動させる。

Z-Stackを併用する場合は
Online stitchingを使用しないでください

Tile ScanウィンドウのAddをクリック。

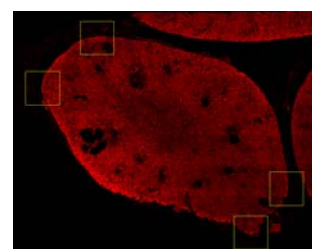
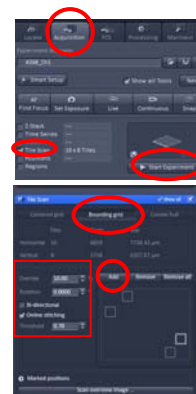
操作を繰り返し、取り込みたい範囲が囲まれた状態にする。

Liveスキャンを停止し、Average等の設定をする。

ツールエリアのStart Experimentでタイリングを開始します。

スキャンが終わると自動で結合処理が行われます。

顕微鏡を見ながら範囲指定したい方は後述、
「タイリング範囲を目視で設定する方法」をご参照ください。



取り込みたい範囲の
一番外側になる部分(端点)を
探して登録

<枚数指定によるTile Scanの設定>

ツールエリアのTile Scanにチェック。

Tile Scanバーを開く。

Centered gridを選択。Overlapを10%に設定。

Online stitchingにチェックを入れ、Thresholdを0.7にする。

TilesのHorizontalとVerticalに取り込みたい枚数を設定。

Liveをクリックし、画像を表示させる。

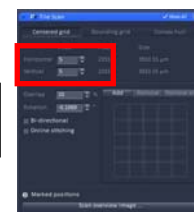
取り込みたい範囲の中心になる部分に移動させる。

Z-Stackを併用する場合は
Online stitchingを使用しないでください

Liveスキャンを停止し、Average等の設定をする。

ツールエリアのStart Experimentでタイリングを開始します。

スキャンが終わると自動で結合処理が行われます。



<手動での結合処理>

Online stitchをoffにした場合、画像取得後こちらの処理を行ってください。

処理をしたい画像を表示させる。

画面上部のProcessingをクリック。

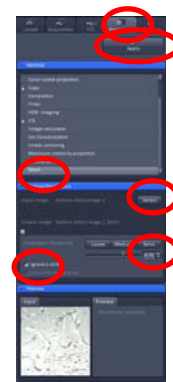
MethodからStitchを選択。

Selectをクリック。

Correlation Threshold を0.7に設定。

Ignore z-shiftにチェックを入れる。(Z-Stack時のみ)

Applyをクリック。



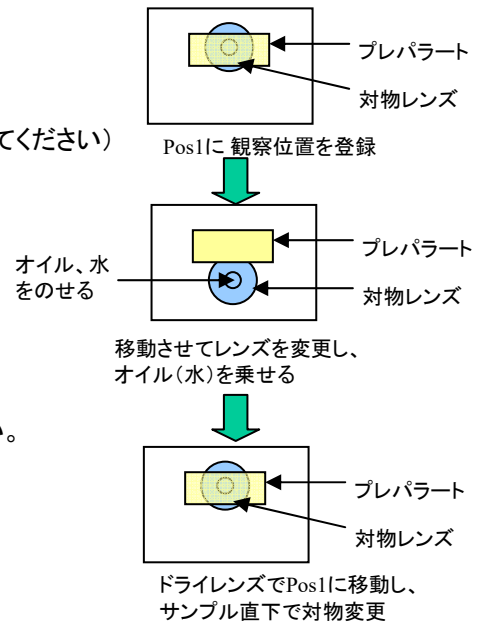
油、水を付けるときに場所を変えない方法

顕微鏡の座標登録機能を使い、Pos1ボタンに観察位置を登録します。

メディウム(水、オイル等)の付け方

ドライレンズで目的の場所を探す。(通常の観察操作を行う)
タッチパネルの(Microscope)-XYZ, Save Position-Pos1とタッチ。
x5レンズで退避位置に移動させる。(フレームとの衝突防止のためx5レンズを使ってください)
タッチパネルの(Microscope)-Control, 液浸レンズとタッチして対物レンズを変える。
対物が下がった位置で止まるのでレンズに液を付け、
タッチパネルのBackを押す。(レンズがx5に戻る)
(Microscope)-XYZ, Pos1 ボタンをタッチして観察位置に移動させる。
タッチパネルの(Microscope)-Control, 液浸レンズとタッチして
対物レンズを変え、Doneをタッチする。
顕微鏡を見てピントを微調整する。

※液浸からドライレンズに戻すときはプレパラートのメディウムを拭き取ってください。
※観察位置が変わったらPos1をSaveしなおしてください。
※顕微鏡の電源を切るとPosition情報は消えます。
※メディウムと封入剤等の異物が混ざるとピントが合わなくなります。
途中から見えなくなった場合はメディウムを拭き取って付け直してください。



視度調整

観察者のピント位置をレーザー顕微鏡のピント位置に近づけます。

Live Scanを行い、サンプルにフォーカスを合わせStopする。
Locateをクリックし、観察モードに切り替え。
レーザーで撮影した像が観察できるフィルターを選択。
以下の操作でフォーカスをさわらないこと。
右目だけで右接眼レンズを覗き、視度調整環を回してピントを合わせる。
左目だけで左接眼レンズを覗き、視度調整環を回してピントを合わせる。
両目で覗いてピントが合っていることを確認。
場所を変えてピントを合わせ、レーザー顕微鏡で像を撮って
だいたいピントが合っていることを確認。



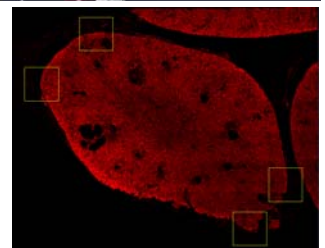
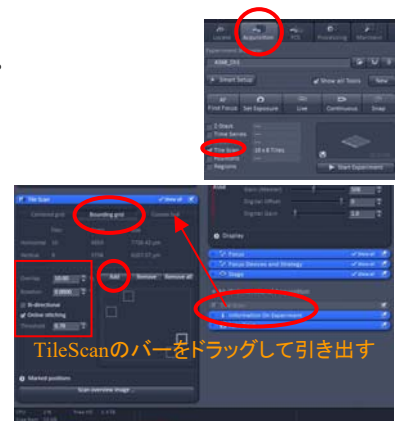
弱拡大精度が甘いです

タイリング範囲を目視で設定する方法

Bounding gridは欲しい場所を指定して範囲設定できるので便利ですが、Live Scanで動かすのは少し面倒です。
目視観察でタイリング範囲を設定するやり方をご紹介します。

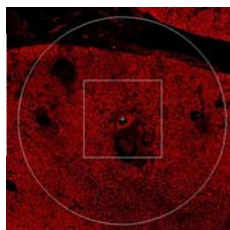
Acquisitionをクリックし、レーザー顕微鏡モードにする。
Tile Scanにチェックを入れる。
ウィンドウ下部のTile Scanバーを引き出す。
Bounding gridを選択。Overlapを10に設定。
Online stitchingにチェックを入れ、Thresholdを0.7にする。
Locateをクリックし、目視観察モードにする。
観察できる状態にし、取り込みたい範囲の端点部分を探す。
(図の黄色枠の部分)
端点部分を目視の中央に移動させてTile ScanウィンドウのAddをクリック。
他の端点もAddで登録する。(4点以上の場合、一番外側の範囲が選択されます。)
全ての点を登録したらAcquisitionをクリックし、レーザー顕微鏡モードにする。
Live Scanで像を出し、明るさ、ピントを合わせる。
Average等の設定をし、Start ExperimentでTile Scanを開始する。

Z-Stackを併用する場合は
Online stitchingを使用しないでください



おまけ

Tile Scan後、Stageをクリックし、画像内をクリックすると
その場所にステージが移動します。
(範囲を表す口はレンズ倍率やZoom倍率に連動します)



参考: ○が目視視野
□がスキャン範囲(Zoom × 1)

サンプルキャリア設定を使用しWell間の移動を簡単に行う方法

多点撮影機能の一部を使いWellの移動を簡単に行います。

Acquisitionをクリック。Positionsにチェックを入れる。(右下にPositionsバーが追加される)

Positionsバーを開く。Sample Carrierタブを選択。

すぐ下のフォルダーアイコンをクリックし、使用しているプレートを選択する。

(ない場合はPropertiesをクリックし、表の値を参考に作成する。)

ステージを動かしA1wellの中央あたりに移動する。

Calibrateをクリックし、プレートイメージのA1の部分をクリック。(現在地がA1の中央として登録される)

プレートイメージの任意のwellをクリックするとそこに移動するようになる。

Positionsバーをドラッグするとウィンドウが取り出せる。

ウィンドウを取り出しておくことでLocateで観察時にもSample Carrierを使用することができます。

画像を撮影する時は誤動作防止のためPositionsのチェックを外しておくこと。



Plate	Columns	Rows	Distance
6well	3	2	40
12well	4	3	27
24well	6	4	19.5
48well	8	6	13
96well	12	8	9

Distanceはメーカーにより若干違うかもしれません

ピント面の目安 ※10xでのステージ下限からの距離



XYZをタップ。
 ステージをいっぱいまで下げる。
 Lower Z-limit reached表示が出ている状態で
 Set zeroのmanをタップ。(現在値が0になる)
 Z-Position値が目安の位置くらいになるよう
 フォーカスを移動させる。

プレパラート専用ステージ...(カバーガラス側) 約4.2mm、(スライドガラス側) 約4.9mm

ウェルプレートステージ...(プラ底) 約7.2mm

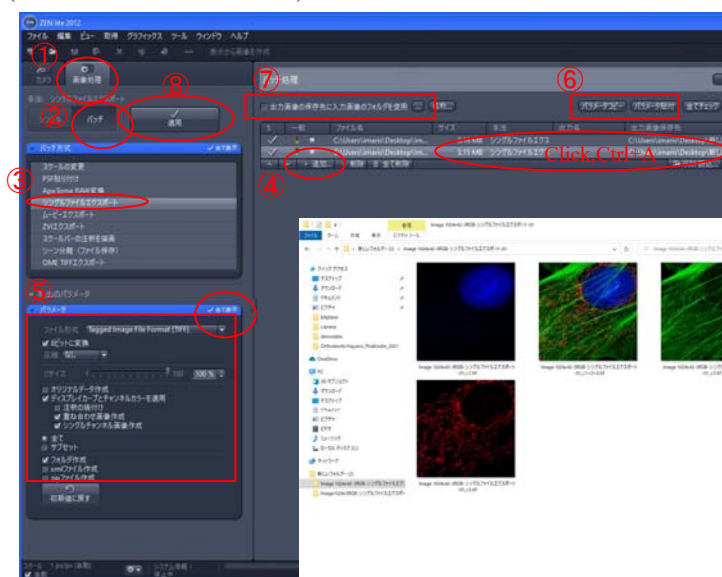
可変ステージ...(プレパラートカバーガラス側) 約4.5mm、(プレパラートスライドガラス側) 5.1mm

(35mmガラスボトム) 約4.8mm、(35mmプラ) 約5.4mm、(60mm) 約5.6mm

インキュベーター...(35mmガラスボトム) 約5.6mm、(35mmプラ) 約6.2mm、(60mm) 約6.9mm

CZIファイルから一括でTIFFファイルに変換する方法

(Blue Editionを使用します)



ZEN Blue Editionを起動させる。

- ① 画像処理を選択。
- ② バッチを選択。
- ③ シングルファイルエクスポートを選択。
- ④ 追加をクリックし、変換したい画像を追加する。
- ⑤ 全て表示にチェックし、画像のように設定する。
- ⑥ パラメータコピーをクリック。
リストの1つをクリック後、Ctrl+Aで全選択する。
パラメータ貼付をクリック。
- ⑦ (出力フォルダを指定する場合)
全選択状態で出力画像の保存先に...のチェックを外す。
...ボタンをクリックし、出力先のフォルダを指定する。
- ⑧ 適用をクリック。
指定フォルダに一括エクスポートされる。

画像ファイル名の意味

xxx_C1...チャンネル1の画像

xxx_Z1...Zスタックの1枚目の画像

これらの表記が組み合わされてファイル名になります。

例) xxx_Z1C1+2+3...Zスタック1枚目の

チャンネル1,2,3マージ画像

(管理用) LSM780仕様一覧
倒立顕微鏡: AxioObserver.Z1

蛍光フィルター						
励起	No	表示名	励起フィルター	ダイクロイック	蛍光フィルター	コード
UV	49	DAPI	G365	FT395	BP445/50 (420-470)	488049-9901-000
B	38	GFP	BP470/40 (450-490)	FT495	BP525/50 (500-550)	000000-1031-346
G	43	DsRed	BP545/25 (533-558)	FT570	BP605/70 (570-640)	000000-1114-101
B	16	AF488	BP485/20 (475-495)	FT510	LP515	488016-9901-000

対物レンズ							
グレード	倍率	種類	開口数	作動距離	コード	プリズム	コード
Plan Achromat	10	Air	0.45	2.1	420640-9900-000	II	000000-1045-073
Plan Achromat	20	Air	0.8	0.55	420650-9901-000	II	426940-0000-000
Plan Achromat	40	Air	0.95	0.25	420660-9970-000	III	426944-0000-000
C-Achromat	63	Water	1.2	0.28	421787-9970-000	III	426946-0000-000
Plan Achromat	63	Oil	1.4	0.19	420782-9900-799(000)	III	426957-0000-000
Plan Achromat	5	Air	0.16	12.1	420630-9900-000	-	非対応
APO Kalbrierobjekti		Air			420639-9000-700		※調整用レンズ

ランプ			
種類	パワー	寿命	コード
メタルハライド	120W	1500h	000000-1313-162
ファイバー	1.5m	3year	000000-1313-164
ハロゲン	12V100W	2000h	000000-0518-961

オイル			
名称	屈折率	容量	コード
イメージンオイル	1.518	20ml	444960-0000-000
イメージンウォーター	1.3339	20ml	444969-0000-000

レーザー			
種類	パワー	寿命	波長
Diode	30mW	5000h	405
Ar	25mW	5000h	488,458,514
DPSS	20mW	5000h	561
HeNe	2mW		594
HeNe	5mW	10000h	633

検出器			
名称	種類	稼働域	分解能
Ch1	PMT	371-740nm	1nm
ChS	32chGaAsP-PMT	410-694nm	最小3nm、通常8.7nm
Ch2	冷却PMT	379-758nm	1nm

ビームスプリッター一覧	
MBS 458	Plate
MBS 458/514	MBS 355/445
MBS 458/561	MBS -405
MBS 458/514/594	MBS -445
MBS 488	MBS 690+
MBS 488/561	MBS 760+
MBS 488/594	MBS -405/760+
MBS 488/561/633	MBS -445/760+
T80/R20	T80/R20
Plate	None

対応する容器	
プレパラート	マルチプレート
35mm、60mmディッシュ (Co2インキュベーターでも使用可能)	

