

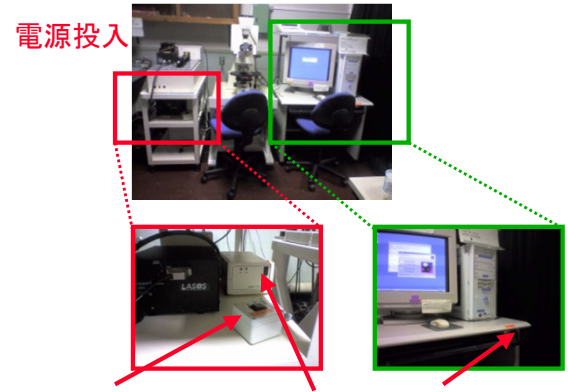
レーザー共焦点顕微鏡 LSM510の簡略な使い方

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】

1. 電源を入れる
2. レーザー点灯
3. 顕微鏡観察(VIS)
4. レーザースキャン用フィルター設定
5. レーザースキャン
6. 画像の保存
(3から6を繰り返す)
7. シャットダウン



①本体電源 ②水銀ランプ電源 ③コンピュータ電源

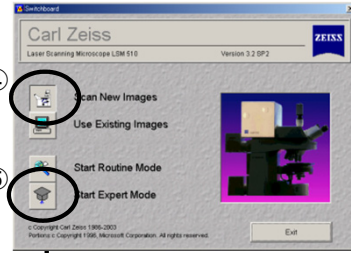
1. 電源を入れる

- ・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 —



メインメニュー



2. 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

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

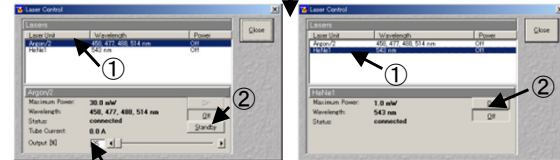
設定後 [Close]



Laser

Ar Laser点灯

HeNe Laser点灯



搭載レーザーの対応色素

Argon/2 (488nm) FITC,Cy2,GFP,Alexa488,Fluo3等(主に緑の蛍光用)
HeNe1 (543nm) ローダミン,Cy3,PE,PI等(主に赤の蛍光用)

3. 顕微鏡観察

[Acquire] - [Micro]

※要確認 対物×10、ND100%、アナライザ抜く、カバーガラス上面

光路切替レバー(金色)を VISポジションへ

- ・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(光が出る)
(UV, FITC LP, Rhodamine, FITC BP, FITC/Rhod, Transmission, OFF)
- ・Objective で対物レンズ選択(最初はx10でフォーカス合わす)
(×10, ×20, ×40oil, ×63oil, ×63W, x40)

視野をさがし、ピントを合わす

光路切替レバーを LSMポジションへ

光路切替レバー

光路切替

LSMポジション
(レバー 番外へ)

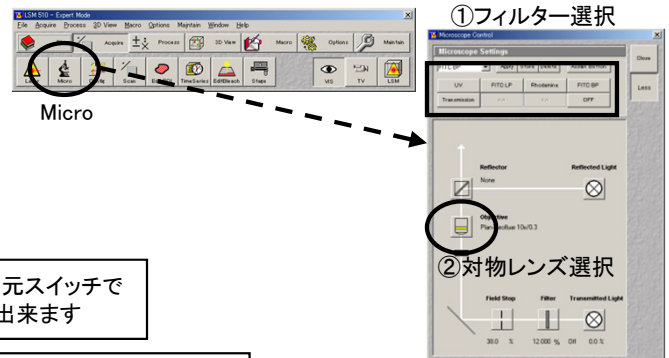
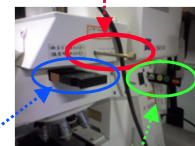
→

←

VISポジション
(レバー 番外へ)

アナライザ

NDフィルター&シャッター



Reflector(蛍光フィルター)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)...ローダミン等(LP590)
FITC BP(Fset17)...FITC等(狭帯域,BP515-545)
FITC/Rhodamine Double BP
(Fset23)...FITC&ローダミン(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。

4. レーザースキャン用フィルター設定

[Acquire] - [Config]

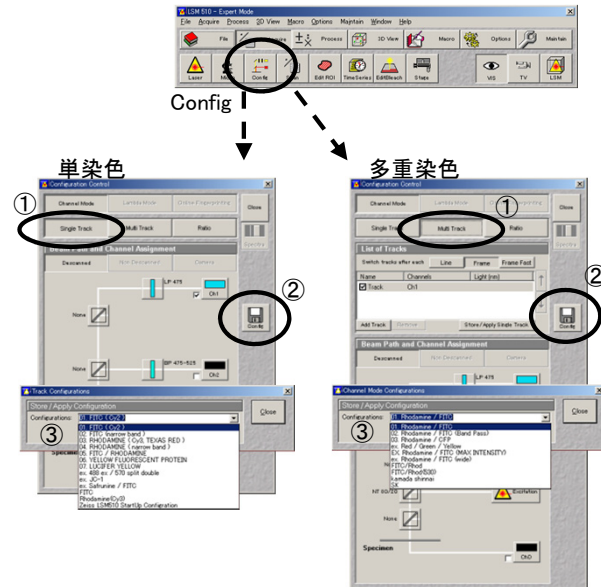
単染色は[Single Track]、多重染色は[Multi Track]を選ぶ

[Config] ボタン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 二重染色はMulti Track の Rhodamine/FITC	



5. レーザースキャン

[Acquire] - [Scan]

[Channels]

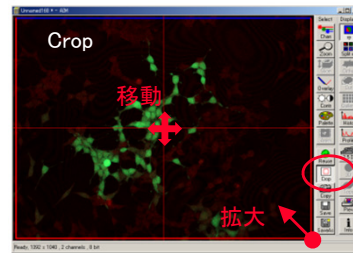
- [1]ボタンでPinhole $\Phi=1.00$ Airy/Unitsに設定
(2チャンネル使用する場合、ch1を1.00Airy/Unitsに設定し、そのときのOptical Sliceと同じになるようにch2の値を調整する)
- [Find] で明るさ自動調整スキャンをする
(条件を変えたくないときはFindしてはいけない)
- [Cont]で連続スキャン
フォーカスを合わせた後、以下の項目を動かし明るさを調整する
 - Detector Gain (検出器の感度を変えて明るさ調整)
 - Ampl Offset (コントラスト調整)
 - Ampl Gain (感度調整 ノイズ増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
(拡大したい場合、[Crop]で場所を指定し、[Single])

[Mode]

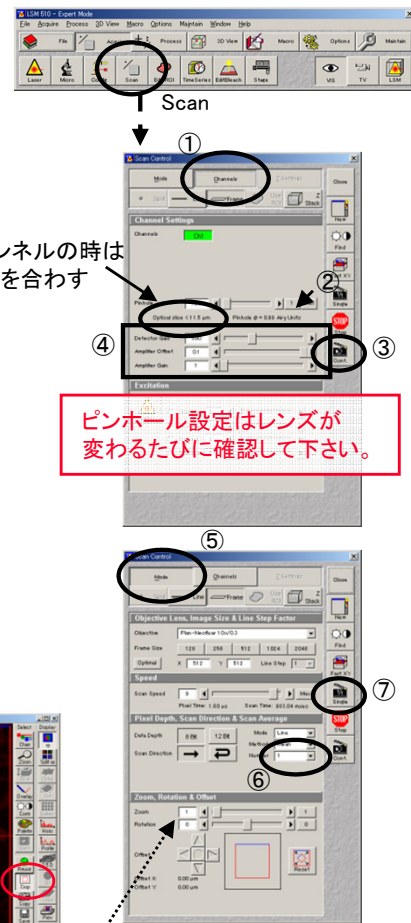
- Average Number(mean)を4回に設定し[Single]
(画像のざらつきが気になる場合はAverageを8又は16にする)

<次項目の画像の保存を行う>

Cropについて
拡大倍率が高いと像がぼけます。
また、サンプルが退色しやすくなります。
×2~×2.5程度を目安にしてください。
いきなり高倍率(4倍以上)に拡大すると位置がずれます。
数回に分けて拡大することをお勧めします。



ズーム倍率はここを見る



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。

6. 画像の保存

記録メディアをセットする

(USBメモリはF:になります。ハードディスクに一時保存する場合はE:¥LSM DATAへ保存してください。)

• イメージウィンドウの[Save As]

• **最初のデータの時のみ** [New MDB]

• 保存場所を選び 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ておく

ハードディスク内のデータは一定期間経過したものは予告なく消します。

保存場所内にDatabase Nameと同じ名前フォルダが自動作成されます

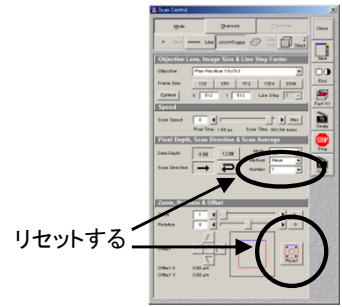
画像の名前

新規にデータベースを作成

保存したデータはそのままでは他のソフトから使用できません。他のソフトで使用する場合やMACで使用するには、後記の「画像フォーマットの変更」を行って下さい。

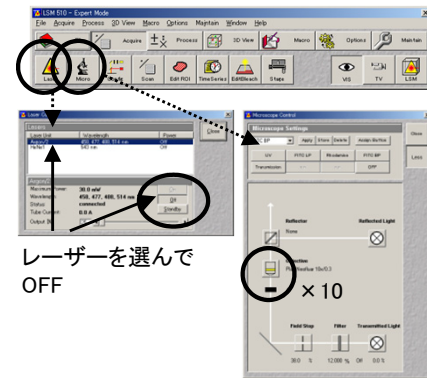
次の視野へ

- ・ [Mode] **Reset**を押し **Average Number**を1回にする
- ・ 項目3の顕微鏡観察から繰り返す
以降通常は、 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



7. 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] (Laser Cooling [5min]のメッセージが出るが-OK)
- ・ 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



クリック-F:を停止します

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 -
- ・ 「コンピューターの電源を切ることができます」のメッセージが表示されたら、電源OFF(机の下)
- ・ 水銀ランプOFF
- ・ 本体電源 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)
- ・ 使用ノートに記帳する

LSMのPCはシャットダウンしても自動で電源が切れません
シャットダウン後、手動で切ってください

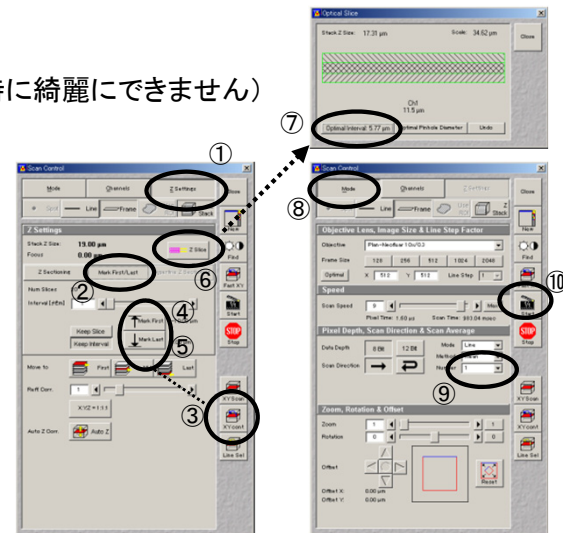
部屋全体の照明スイッチは
廊下にあります。

8. 三次元画像取り込み

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)

[Zスキャン操作]

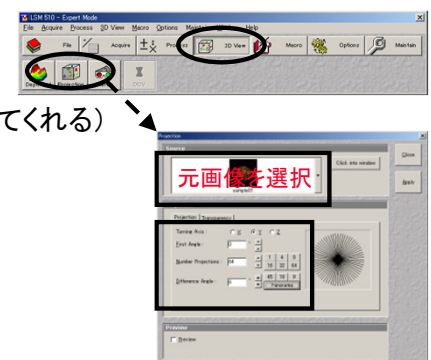
- ・ Average Number(mean)を1回に戻す
- [Z Stack]
 - ・ [Mark First/Last]
 - ・ [XY cont] でスキャンさせ、
フォーカスノブを手前に回しスタート地点で [Mark First]
フォーカスノブを奥側に回し終了地点で [Mark Last]
 - ・ [Stop]
 - ・ [Z Slice] - [Optimal Interval]-[Close]
(ピンホールで設定された半値幅で枚数が自動設定される)
 - ・ [Mode]のAverageを設定して [Start] でセクションング開始
 - ・ スキャン終了後 画像の保存



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]

イメージウィンドウの[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)

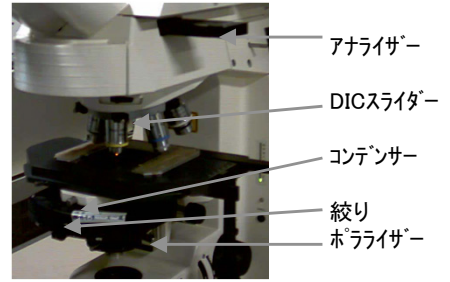


その他の操作

① 微分干渉像の取り込み (明視野、非共焦点像)

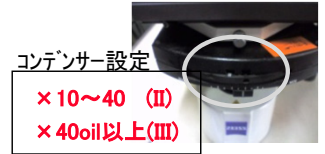
〈顕微鏡観察〉

- ・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
- 重要→
- ・コンデンサーを設定 (×10~40 II、×40oil以上 IIIにセット)
 - ・ポライザーを入れる(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

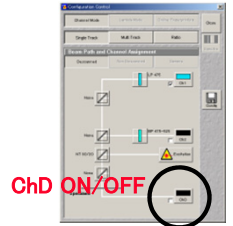


〈レーザーキャン〉

- ・光路切替レバーをLSMI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

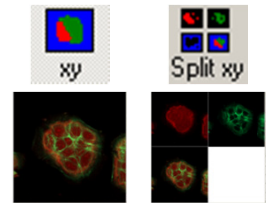


イメージウィンドウの[Split XY]で画像を確認し、必要であれば保存する
途中で対物レンズを変えた場合、顕微鏡観察から調整をやり直す必要があるので注意
微分干渉像が不要になったら[Acquire] - [Config], ChDのチェックをはずす



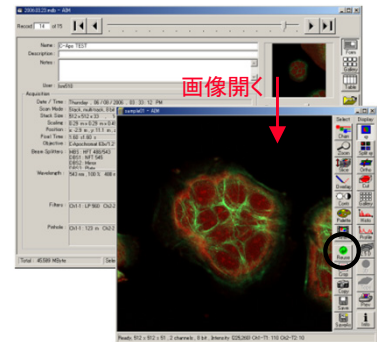
② 微分干渉像や多重染色像の分離、重ね合わせ

イメージウィンドウの[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。



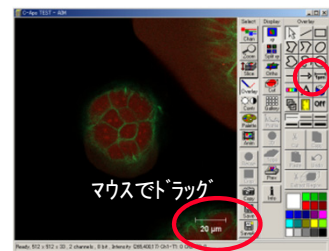
③ 前回使用条件の読み出し(本体のみ)

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。)



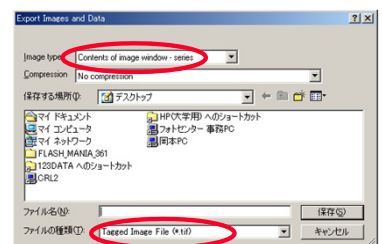
④ スケールの入れ方

- ・[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
- ・イメージウィンドウの[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)



⑤ 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]



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)

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

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µm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

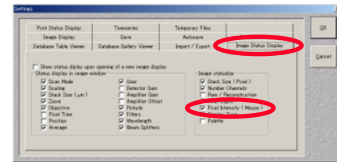
Image Browserを起動する。

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ィンドウの下部に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

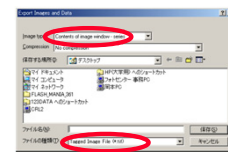
- [File] - [Open] でデータベースを開く
データベースからスケールを入れたい画像を選んでダブルクリックで開く
- イメージウィンドウの[Overlay]をクリックしてスケールのアイコンをクリック
- 画像内でドラッグすると長さを計算しながらスケールバーを引いてくれる
(位置の修正、色の変更が可能)
(他のボタンを使うと字を入れたり、図形を書いて長さを表示させたりできます)



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]

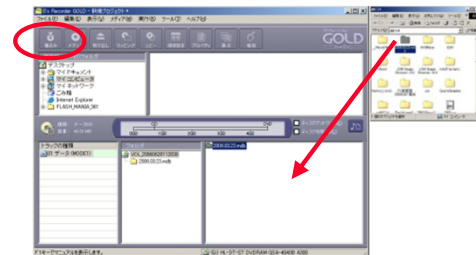
Image typeのキーワード
Raw... 画像取得時のまま出力(白黒)
Contents...画面上の変更全て含めて出力
Full Resolution...画像取得時の解像度で出力
Single... 現在表示されているスライスのみ出力
Series... 全てのスライスを一括出力
Split XYやGallery表示でも保存できます



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)

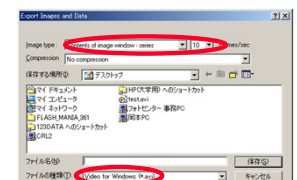
CD-R(RW)への保存方法

- 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]

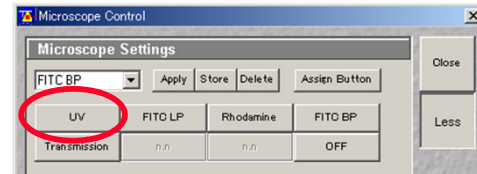


UVレーザー非搭載LSM510での UV励起像 (DAPI, Hoechst等) の撮り方

注) これは本来のレーザー顕微鏡像の取り方ではありません。
ここで取得される像は共焦点像ではありません。
光源は水銀ランプを使用しています。
画像取得にはかなり強い蛍光が必要です。
裏技的な使い方なので像にクオリティを求めないでください。

1. UV以外の染色がある場合はLaserで必要なレーザーを点灯してください。
UVのみの場合はレーザーは不要です。

2. Microで観察します。撮りたい場所が決まったら光路をLSMIにします。



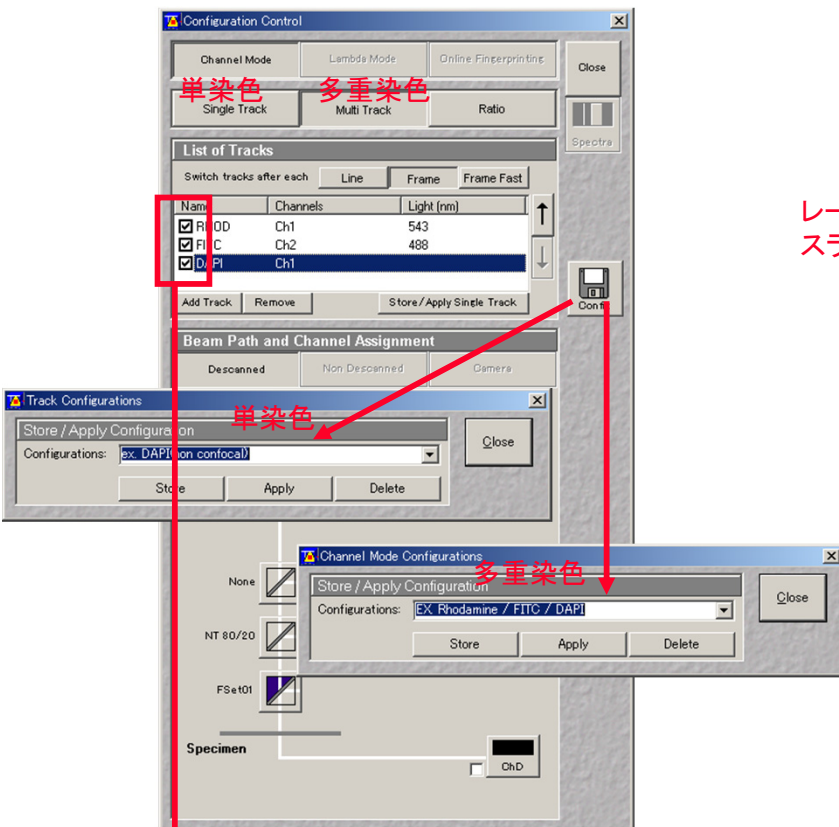
3. ConfigでUV取得用の設定をApplyします。
単染色...Single track の “EX. DAPI(non confocal)”

多重染色...Multi Track の “EX. Rhodamine/FITC/DAPI”

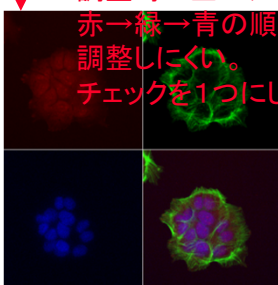
多重染色の場合、明るさ、ピントを合わせにくい動きをします。調整するときはRhodamine, FITC, DAPIの横のチェックをどれか1つだけにし、1つずつ調整して、最後に全部にチェックを入れて画像を取得するようにしてください。

4. Scanで通常通り画像を取得します。

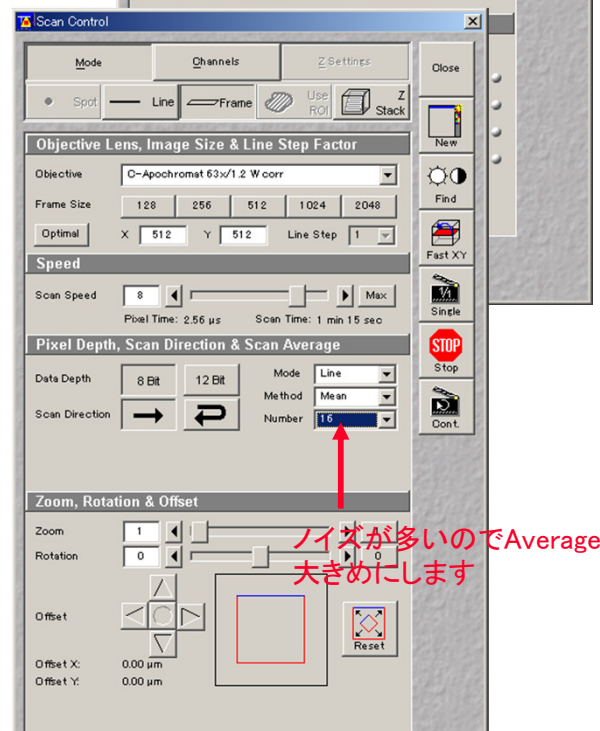
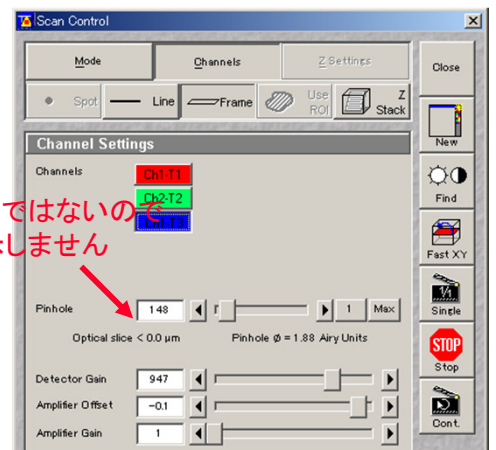
UVはかなりGainを上げないと撮れません。このため、Averageは8か16が必要になります。
スキャン中はかなり広範囲で退色が進みます。ご注意ください。



調整時に全てチェックがあると赤→緑→青の順にスキャンし、調整しにくい。
チェックを1つにし、1つずつ調整する。



レーザースキャンではないのでスライス厚は表示しません



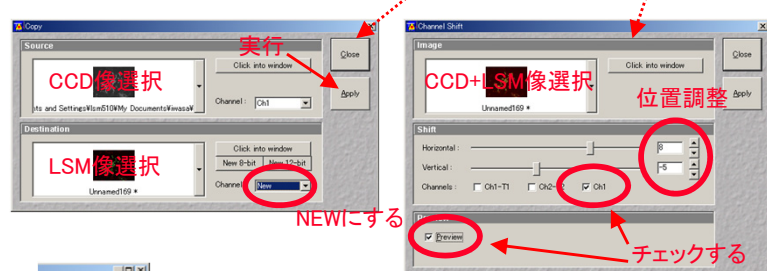
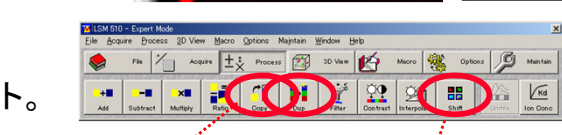
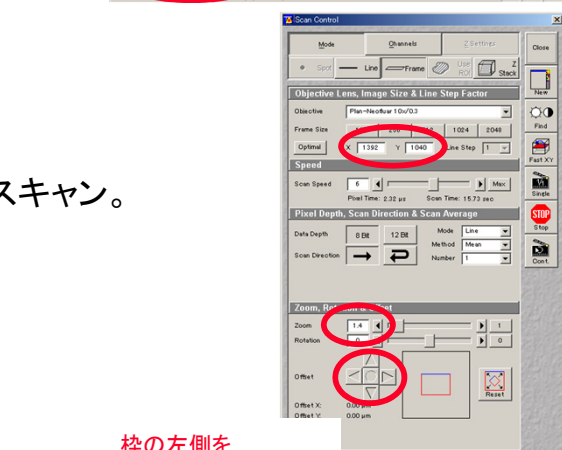
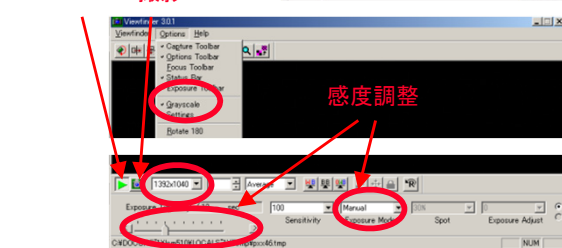
ノイズが多いのでAverageは大きめにします

LSM取得像とCCDカメラ像の合成方法

注) CCDカメラで取得される像は共焦点像ではありません。
物理的に違うものから取得される像を合成するため必ず位置ずれが生じます。
完全一致を求める方は使用しないで下さい。

＜こちらの例ではHoechstをCCD、GFP/PIをLSMで取得しています＞

1. 光路切り替えレバーをVISにし、励起光を出し、およその場所を決める。
2. 撮りたい場所が決まったら光路切り替えレバーをゆっくりVIS→TVにする。(逆方向不可)
レバー切り替え時、フィルターが変わった場合、Fset**の部分で変える。
3. CCD制御ソフトView Finderを起動する。
4. プレビューを開始し、画面でピント、位置を合わせる。
5. メニューから Option - Grayscale を選択。
6. 1392x1040で重ね合わせたい画像を取り込み保存する。
(この例ではHoechst像)
7. フィルターを変えて位置合わせに使う画像を取り込み保存する。
(位置合わせに使う像はLSMでも取得できるものにします。
この例ではGFP像)
8. 光路切り替えレバーをLSM1にする。
9. Config、Scanの設定をし、LSM画像が取り込める状態にする。
10. 解像度を1392x1040、スキャンズームを1.4にして
スキャンし、ピントを合わせる。(ステージは動かさないこと)
11. スキャン範囲のOffsetの十字ボタンを上5回、右10回押しsingleスキャン。
12. Cropを押し、図を参考に枠の大きさを調整、singleスキャン。
(この画像を使うので必要ならAverageを加える)
13. Process - Dup で取り込み画像を複製。
複製したものに位置合わせの処理を行う。
14. File - Import でCCDの位置合わせ用画像(GFP)をインポート。
15. Process - Copy でLSM像とCCD像を合成。
図を参考に設定し、Applyする。
16. Chanで位置合わせに不要なチャンネル(PI像)を消す。
17. Process - Shift でPreview像を見ながら位置合わせをする。
大きさが合わない場合、スキャンズームを再調整してやり直し。
Horizontal, Verticalが目一杯で位置が合わせられない場合は、
スキャン範囲のOffsetのクリック数を変えてやり直し。
18. 位置合わせができたなら数値を覚えてウィンドウを閉じる。
19. 未加工のLSM像を残し、他の像を閉じる。
20. File - Import でCCDの重ね合わせたい画像(Hoechst)をインポート。
21. Process - Copy でLSM像とCCD像を合成。
22. Process - Shift で数値を位置合わせ時のものにしてApply。
23. ChanでCCD像の色を任意のものに変更する。



Offsetのクリック数は2010.3.30現在の状態の目安です。
機械の調整状態で多少変わる可能性があります。
また、Rotationが必要になる可能性もあります。