



From Eye to Insight



LIGHTNING

Manual

20220217_JP_ST

ライセンスにより取得した画像の再処理の方法と設定できるパラメーターが異なります

	取得画像の自動処理	Lightning Expert (パラメーターの変更)
Lightning Process	×	○
Lightning Expert	○	○
Lightning	○	×

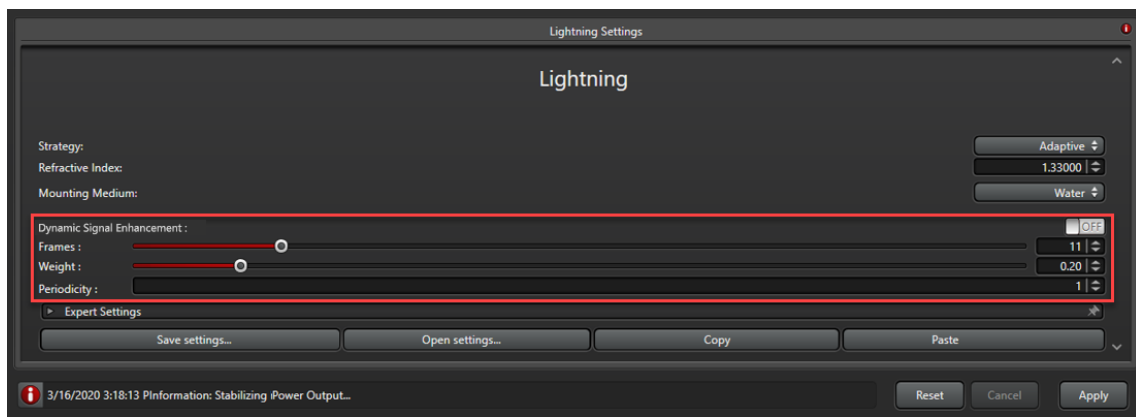
* LAS X Small で画像処理はできません

* Lightning Wizard 上では、Seq の呼び出しや Apply を行うことができません。

必要な場合は一度、STELLARIS に戻り、Seq の呼び出しまたは Apply を行ってから、Lightning Wizard を起動してください。

* TauSeparation、TauSTED など TauSense を使用して取得した画像は、PSF が変わってしまうため、Lightning 処理できません。

* Dynamic Signal Enhancement と一括処理を行うことができますが、その場合 DSE だけ、または Lightning だけ処理した画像は作成されません。

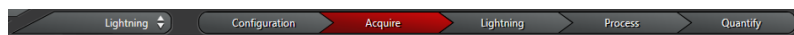
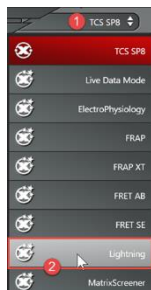


Lightning Wizard

ライセンスにより異なります。

Lightning と Lightning Expert のみ可、Lightning Process は不可

Lightning Wizard を起動するとメニュータブが以下のように切り替わります。

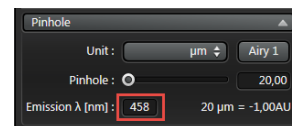


Acquire メニューが左図のように変わります。




① 選択できる Scan Mode は xyz、xyzt、Mark & Find、Tile scan の 4 つです。* Navigator は使用できません

② Pinhole サイズを波長ごとに最適化するために Frame Sequential が選択された状態の Sequential Scan が起動します。



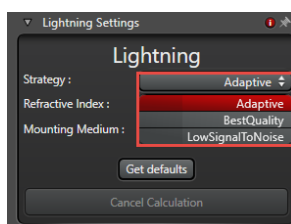
(Line Sequential や Stack Sequential も選択できます)

③ 撮影速度と分解能のどちらを優先させて撮影するか調整することができます。Lightning Grade の設定は変更することができます (11 ページ参照)。(Pinhole size、Format size、Z step size、Scan Speed、Line Average/Frame Accumulation が自動的に設定されます。)

④  をクリックするとグレーアウトし、上記パラメーターを自由に設定することができるようになります。

④ Strategy の選択と封入剤の選択または封入剤の屈折率を入力し

ます。



Adaptive	画像の S/N 比から、各種パラメーターを自動設定します
Global	すべての画像に使える設定です

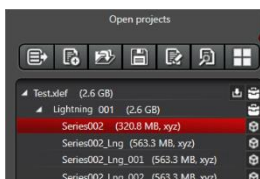
Capture	画像取得のみで、自動処理を行いません
Start Experiment	画像取得と自動処理を行います

⑤Preview 取得方法

Live	設定した Frame size、Scan Speed で Scan します
Fast Live	512x512 pixel、600Hz 以上、Bidirectional で Scan します

⑥画像の取得

Start Experiment を押して画像の取得を行います。バックグラウンドで設定した条件で Lightning 処理が行われます。



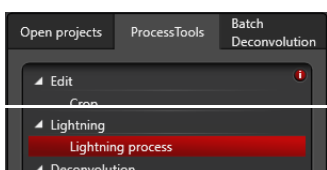
左図のように Project の下に Lightning 001 というフォルダが作成されます。画像はその中に保存されます。Series～が Raw データ、Series～_Lng が Lightning 処理された画像です。同じデータを処理すると Series～_Lng_001 というように数字が追加されていきます。

Process メニュー/Lightning メニュー

取得した画像は Process メニューから再度 Lightning 処理を行うことができます。(ライセンスにより異なります)

Lightning Process	Process メニューから行います
Lightning Expert	
Lightning	Strategy の変更や封入剤の屈折率の変更のみできます。

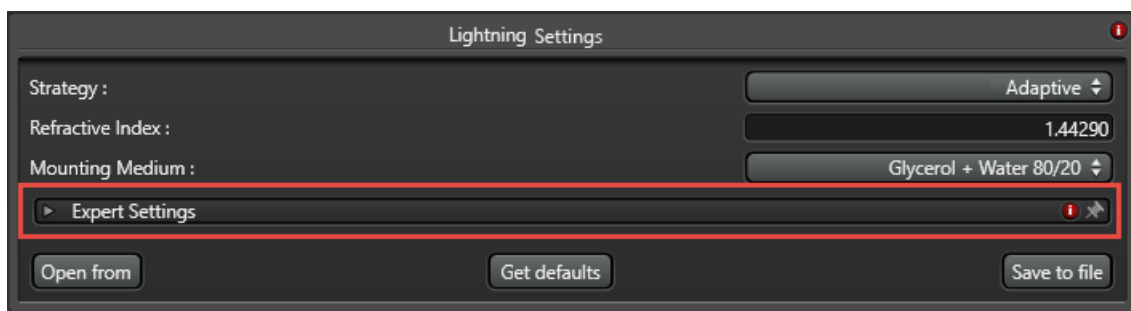
* Lightning Process と Lightning Expert で変更できるパラメーターは同じです。



Process メニューから Lightning/Lightning process を選択します。

下記 Lightning Setting が表示されます。Acquire メニューと同様に Strategy と封入剤の選択または屈折率の入力を行います。

Confocal/STED/Multi-Photon、励起波長、取得波長幅、検出器 (Standard/Counting) などの撮影条件に関する情報は自動で読み込まれ処理に反映されます。



Strategy

Adaptive	画像の S/N 比から、各種パラメーターを自動設定します
Global	S/N の良い画像に適しています

* デフォルトは Adaptive です。

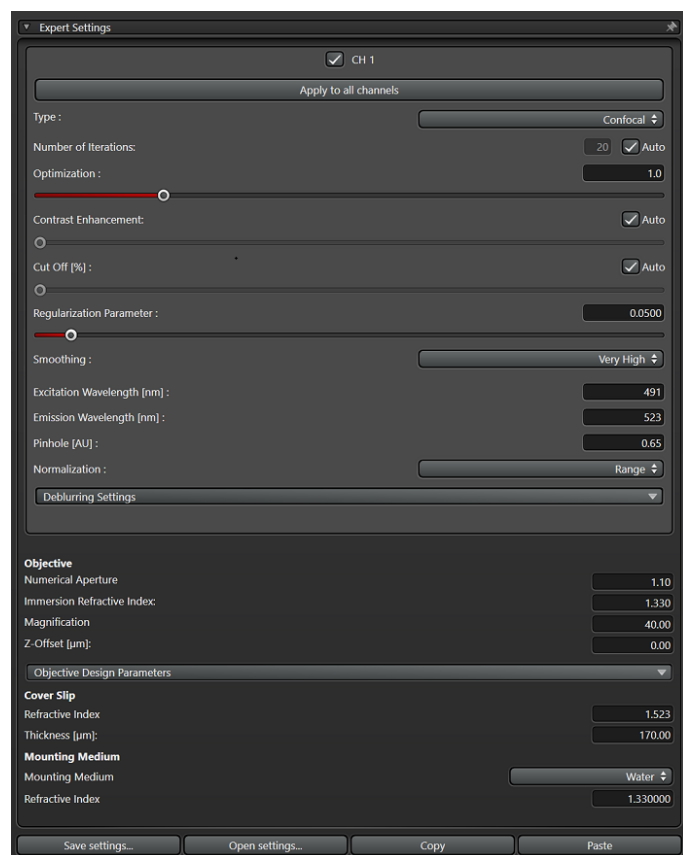
赤枠内をクリックすると Expert Setting (オプション) が開き、設定することができます (Expert Setting については次ページ参照)。

Expert Setting を行わない場合は Apply を押して Lightning 処理を行います。

Open from	保存した Lightning 処理の設定を呼び出すことができます
Get defaults	設定をデフォルトに戻します
Save to file	Lightning 処理の設定を保存することができます

* Lightning 処理に関する設定は、Open Project/lif ファイルを右クリック/Properties から見ることができます。

Expert Settings



Apply to all channels	多色の場合、設定を他の Channel にも反映させることができます
Type	Confocal、Multi-Photon、STED、Passthrough から自動選択されます *Passthrough は TauSense を使用した画像に対して適用され、Lightning 処理されません
Number of iterations	Lightning では反復計算が行われ、その回数の設定が行えます。数値が大きいほど、結果は良くなる傾向にあります。しかし、Artifact が出る可能性も大きくなります。デフォルトである Auto では、画像の S/N などを考慮し、Artifact を抑える回数が自動で算出されます。
Optimization	0 から 5 まで変化させることで、Deconvolution の強度と分解能のバランスを調整できます。デフォルトは 1 です。最小の 0 でも Deconvolution は行われます。 S/N が高い画像に対しては数値を上げた方が効果的です
Contrast Enhancement	Lightning の計算を始める前にバックグラウンドとシグナルのコントラスト比の調整を行うことができます (0 - 1)

Cut off (%)	Lightning の計算を始める前にバックグラウンドのレベルを設定できます (0 -1)
Regularization Parameter	Regularization の度合いを設定できます。値が小さいほどノイズが小さくなります。 (0 - 1)
Smoothing	特にノイズの多い画像に効果があります。Automatic、None、Very Low、Low、Medium、High、Very High の7つの方法があります。ノイズが多い場合はデフォルトの High が、超解像画像には Low や Very Low がお勧めです。シグナルの強弱に応じて選択してください。

Excitation Wavelength (nm)	励起波長
Emission Wavelength (nm)	検出波長（最短波長+15%の値が表示されます）
pinhole (AU)	pinhole サイズ
Normalization	表示スケールの選択を行えます
Range	16 Bit スケールに明るさが変換されます
Photon Count	検出された Photon 数（定量性）を保ったまま、16Bit に変換されます
Deblurring Settings	Out of Focus からのボケなどのシグナルを除去し、特に STED や MP、DLS 画像に有効です。デフォルトでは無効になっています
Enable	チェックボックスを ON にすると有効になります
Object Size (nm)	Deblurring 効果を調整できます。小さい値を入れると、より細かい構造を観察することができます。観察対象よりも小さい値を入力しないでください。
Objective	使用した対物レンズについての情報が自動入力されます
Numerical Aperture	使用した対物レンズの NA が自動で入力されます
Immersion Reflective Index	使用したレンズの封入剤の屈折率が自動で入力されます
Magnification	使用したレンズの倍率が自動で入力されます
Z-Offset (μm)	Z ステップサイズが自動で入力されます
Objective Design Parameters	使用した対物レンズの推奨値で、変更できません
Immersion Reflective Index Design	推奨される封入剤の屈折率
Cover Slip Thickness Design	推奨されるカバーガラスの厚さ
Cover Slip Reflective Index Design	推奨されるカバーガラスの屈折率
Cover Slip	カバーガラスの屈折率と厚さについて入力できます
Refractive Index	使用した封入剤の屈折率が表示されます
Thickness (μm)	カバーガラスの厚さ
Mounting Medium	使用した封入剤の選択と屈折率を入力できます
Mounting Medium	使用した封入剤の選択を行うと、下記 Reflective

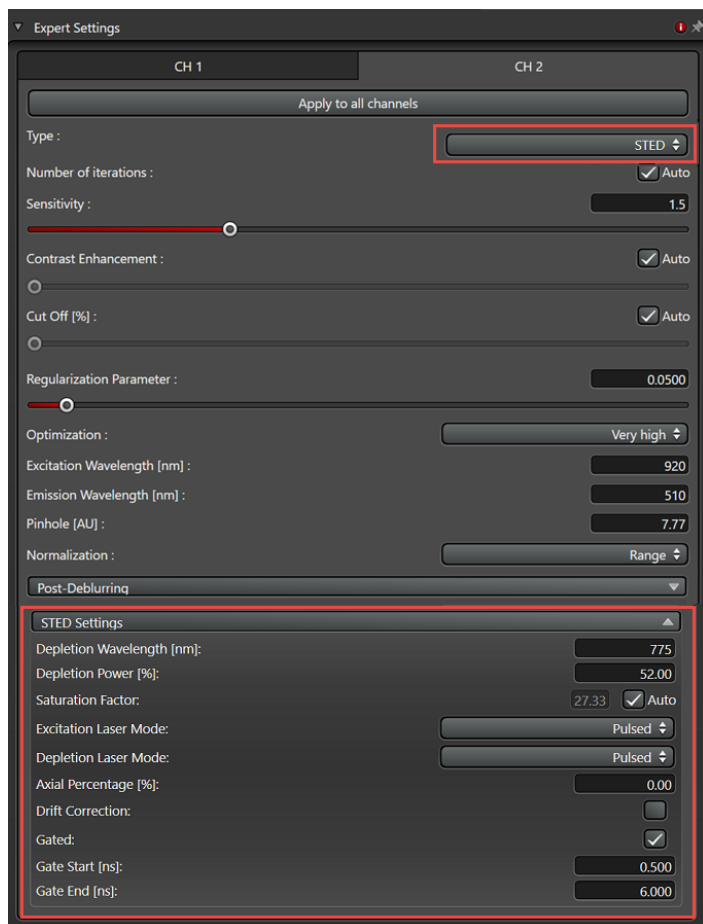
	index に値が自動入力されます
Refractive index	選択した封入剤の屈折率が表示されます
Saving and Loading Setting	
Open from file	保存した Expert Setting を呼び出すことができます。(Lightning 処理に関する設定は、Open Project/lif ファイルを右クリック/Properties から見るすることができます。)
Save to file	Expert Setting の保存を行えます。Open from file から呼び出すことができます

*バッチ処理方法（複数の画像に同じ設定の Lightning 処理を行う）

Control キーを押したまま同じ処理を行いたい画像を選択し、Apply をします。

STED の場合

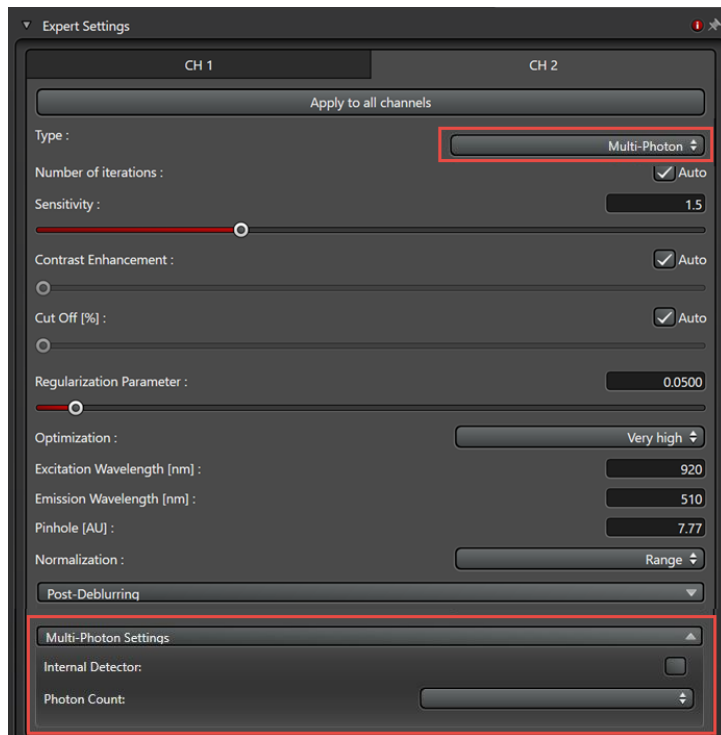
下図の Type から STED を選択することで、STED 用の設定を行うことができます。



Depletion Wavelength [nm]	使用した STED レーザーの波長
Depletion Power [%]	使用した STED レーザーの出力
Saturation Factor	誘導放出の効率 Auto のチェックボックスをはずした場合、値を入力することができます
Excitation Laser Mode	励起に使用したレーザーの種類を選択します: パルスレーザー (Pulsed)、連続発振レーザー (CW)
Depletion Laser Mode	使用した STED レーザーの種類を選択します: パルスレーザー (Pulsed)、連続発振レーザー (CW)
Axial Percentage [%]	3D STED の場合、Z に何%の STED 光を当てたか(0: xy のみ; 1: z のみ)
Drift Correction	Z スタック取得時の xy 平面ドリフト補正
Gated	Time Gate を使用して撮影した際に用いる
Gate Start [ns]	Time Gate の取得開始時間
Gate End [ns]	Time Gate の取得終了時間

Multi-Photon の場合

下図の Type から Multi-Photon を選択することで、Multi-Photon 用の設定を行うことができます。



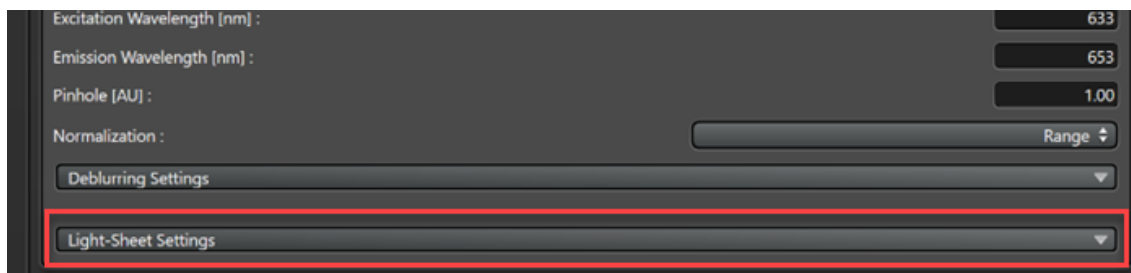
Internal Detector	撮影に使用した検出器の種類を選択します： ピンホールのある内部検出器 (descanned detection), ピンホールのない外部検出器 (non-descanned detection)
Photon Count	2 光子または 3 光子の選択を行います

DLS

LightSheet Settings

Lightning DLS ライセンスが有効な状態で下図赤枠部分をクリックすると、ドロップダウンメニューが表示され、DLS 画像用の設定ができます。

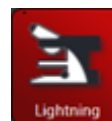
Lightning DLS ライセンスが有効かつ Lightning Expert または Lightning Process ライセンスが無効な場合、Deblurring Setting と Light-Sheet Setting のみ表示され、設定できます。



Illumination NA	イルミネーション対物レンズの NA を入力します
Illumination Position	Axial shift of the light sheet relative to the axial focus position

Lightning Grade の設定変更

Configuration/Lightning 左図をクリックすると下記画像が表示されます。

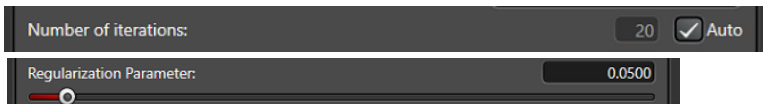


Lightning Grade で自動設定される、パラメーターの設定を変更することができます。

Pinhole AU	ピンホールサイズ (XY、Z Oversampling に影響します)
XY Oversampling	XY 平面での分解能 (Pixel size)
Z Oversampling	Z での分解能
Line Average / Accumulation	HyD (Analog または Digital Mode) のときは Averaging の回数 HyD (Counting Mode) のときには Accumulation の回数
Speed	画像取得時のスキャンスピード

Tips

* Iteration:回数が多くの方が、分解能が上がります。回数が多すぎると、アーティファクトが出やすくなります。Properties から Iteration 回数を確認できます。

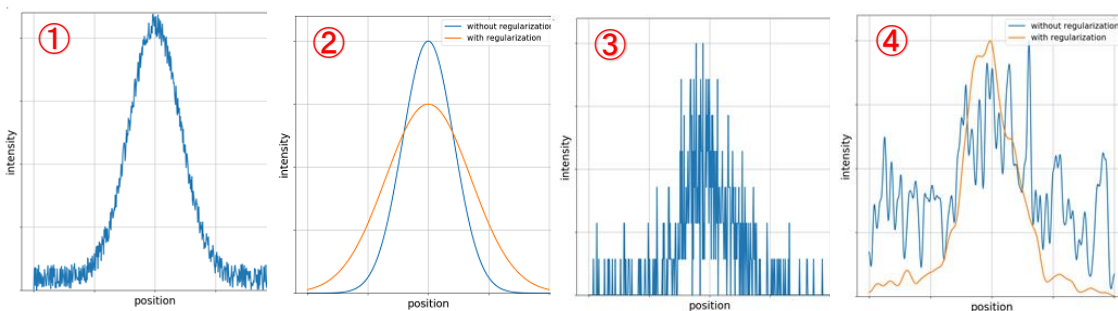


* Smoothing: S/N の低い画像に対して有効です。None から Very High までの6つがあり、S/N が非常に低い画像には、High や Very High が有効です。また、S/N が高い画像に処理を行うと、ノイズやアーティファクトが出るので、None または Very Low が有効です。

高 S/N 画像 None > Very Low > Low > Normal > High > Very High 低 S/N 画像

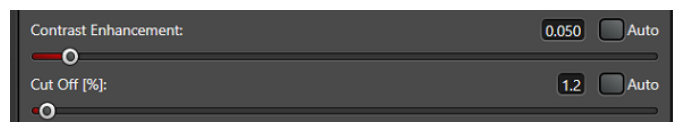


①のように S/N の高い画像に対して LIGHTNING 処理を行う場合、Optimization を行わない方が S/N が高い。しかし③のように S/N が低い画像に対して LIGHTNING 処理を行う場合、Optimization を行った方が S/N が高くなる。Optimization を行った場合(青)と行わなかった場合(オレンジ)。



* Cut Off: LIGHTNING 処理を行う前にシグナルの閾値を設定します。シグナルが消えている場合やノイズが残っている場合に有効です。

Contrast Enhancement や Cut Off を Auto から 0 などに変更



* バッチ処理方法 (複数の画像に同じ設定の Lightning 処理を行う)
処理を行いたい画像を Control を押しながらか選択し、Apply をします。

* 封入材の屈折率

Mounting Medium	Refractive Index
Water	1,333
100% PBS	1,335
Glycergel®	1,38
50% Vectashield® + 50% PBS	1,39
50% PBS + 50 % Glycerol	1,406
80% Glycerol + 20 % Water	1,451
100% Vectashield®	1,452
Mowiol®	1,46
ProLong® Gold / Diamond	1,47
Kaiser's Glycerol Jelly	1,47
Fructose (80,2%)	1,49
DPX	1,525
CFM-3	1,52
ProLong® Glass	1,52
TDE	1,33 – 1,52