



Living up to Life



STELLARIS 5 WLL

LAS X

Basic

20211124_JP

I. STELLARIS	1
II. Start up	2
III. Acquire Image	5
1. The Beam Path Setting	6
2. 対物レンズ選択	6
3. Beam Path 設定	7
1. Dye Assistant を使用して励起・蛍光取得領域を新規作成する場合	7
2. Drag and Drop を使用して励起・蛍光取得領域を新規作成する場合	9
3. 使用する検出器を手動設定で新規作成する場合	9
4. 使用するレーザーを手動設定で新規作成する場合	10
5. 設定を削除する方法	10
6. 励起波長の調整	10
7. 蛍光検出領域の調整	11
8. 設定の Save と Load	11
9. Pseudo color look up table の変更	12
10. 画像取得時のスキャン方法： Line Sequence、Frame Sequence、Stack Sequence	13
11. 取得画像データを用いた取得条件の設定	14
4. 画像取得パラメータ設定と画像取得方法	15
1. Live Scan と Fast Live Scan (Preview scan)	15
2. Control Panel	16
3. 画像のサチュレーションチェック	16
4. Acquire image or image series	17
5. 画像取得条件の設定	18
1. Format、スキャンスピード、Zoom の設定	18
2. ナイキストのサンプリング定理と Pixel Size	22
3. Smooth Rendering	22
4. HyD S、HyD X と HyD R の違いについて	23
5. HyD (Hybrid Detector)について	24
6. Z stack (XYZ)画像撮影手順	26
7. z 駆動方法(z-Galvo と z-Wide)	27
8. タイムラプス撮影(XYT, XYZt etc.)	28
9. 透過像(BF: Bright Field)、微分干渉(DIC: Differential Interference Contrast)、位相差像(PH: Phase Difference)撮影	29

IV. TauSense	31
1. TauContrast	32
2. TauGating	33
3. TauScan	34
4. TauSeparation	35
V. Viewer	37
1.取得した画像の Pseudo color や表示スケールを変更する方法	37
2. 右クリックメニュー	38
3. Viewer ボタン機能	38
4. Maximum Projection 画像の作成方法	41
VI. Quantify	42
VII. Data Handling	43
1. Tool Bar	43
2. Save data	43
3. Export image	44
4. Projects でのデータの取扱い	45
5. Free viewer software LAS X Small (For Win10)	46
VIII. Online Help	46
IX. Shut down	47
X. 倒立顕微鏡 DMi8 の使用方法	49

I. STELLARIS description and technical specifications

STELLARIS はポイントスキャン方式の共焦点顕微鏡で、超解像 LIGHTNING を標準搭載しています。

スキャン方式

・ FOV (Field Of View) Scanner

FOV スキャナーは広視野を歪みなく撮影することができます。またガルバノミラーを使用することでスキャンスピードやスキャンする位置を自由に設定することができます。最大フォーマットサイズは 8192 x 8192 pixels です。

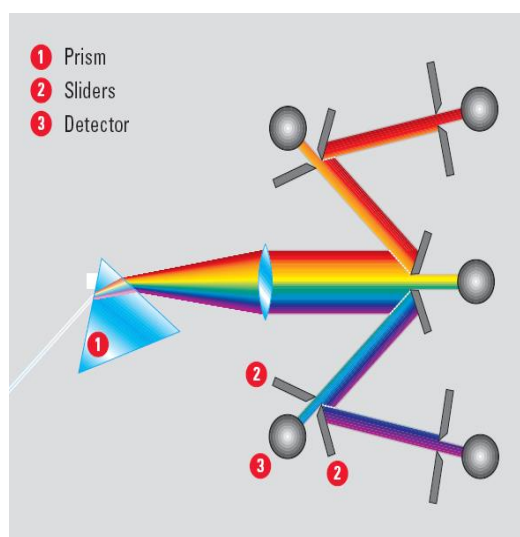
・ Resonant Scanner *Optional

Resonant スキャナーは高速イメージングを可能にしたスキャン方式です。ライブイメージングなどの高速イメージングに適しており、褪色がしにくいという特徴があります。スキャンスピードは固定 (8000 Hz または 12000 Hz、仕様によって異なります) で変更することはできません。

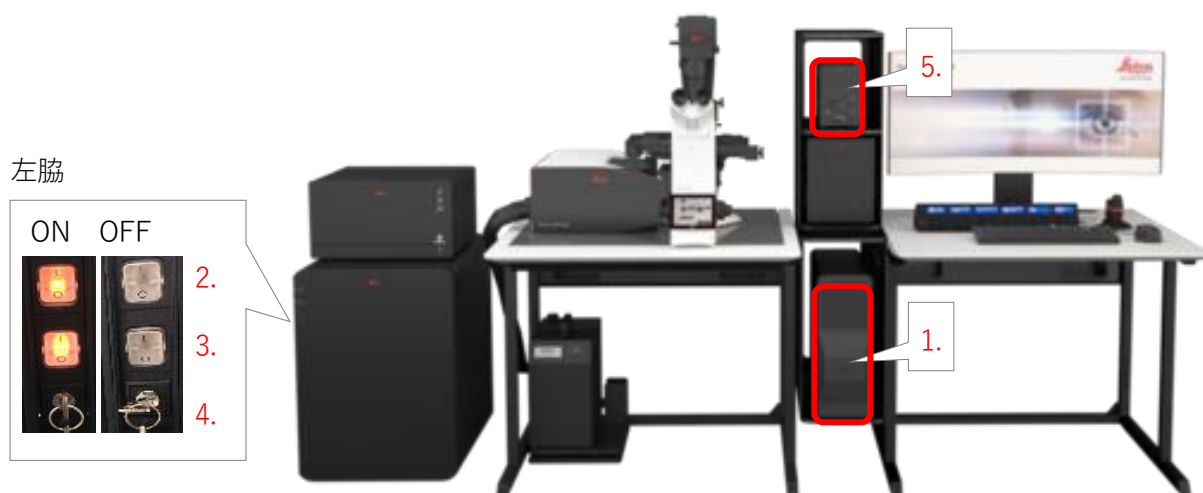
*FOV と Resonant スキャナーはソフトウェア LAS X 上で切替えることができます。

蛍光検出方式 -プリズム分光-

下図のように励起された蛍光はプリズムにより分光され、超高感度検出器 HyD により検出されます。取得できる蛍光波長は検出器の前にあるスリット位置の調整により 1 nm 単位で設定することができます。スリットの表面はミラーになっているため、取得しなかった波長は反射され、他の検出器で検出可能です。このように光は遮られることなく、最大 5 つの蛍光波長を同時取得可能です。



II. Start up



* 装置外観は仕様によって異なります

1. PC の電源を入れる

* 自動的に “LAS X User” にログインします

2. 主電源を入れる

3. レーザーの電源を入れる

4. キースイッチを時計回りに 90 度回す

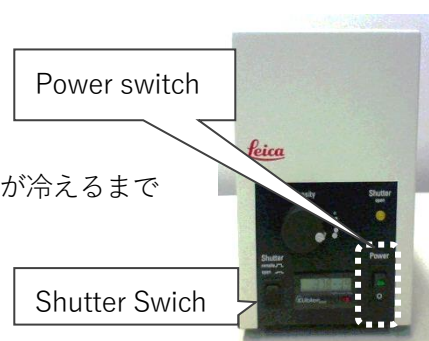
5. 目視観察用水銀光源を使用する場合、電源を入れる

* 目視観察用、画像取得には用いません

* LED 光源の場合、電源が自動で入るので次のステップへ

* 水銀光源の電源を落とした後、再度電源を入れる場合は水銀光源が冷えるまで 15-20 分時間を置く。

* Shutter Switch は “Remote” にする (デフォルト)



6. “LAS X”を起動する

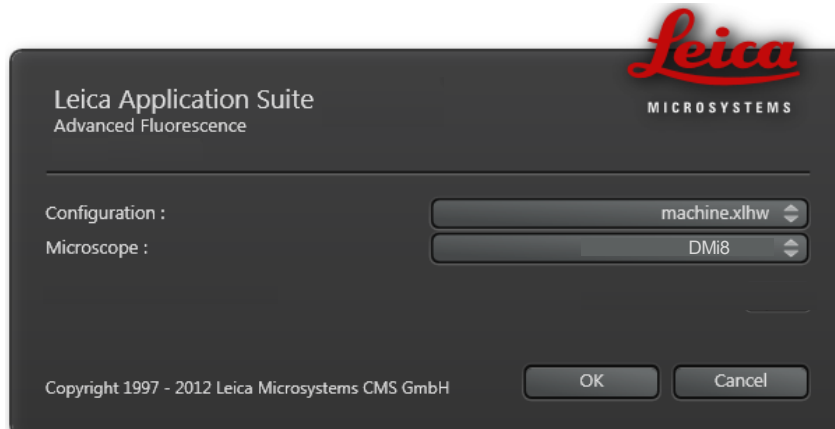


7. 下図の設定を確認する

Configuration に“machine.xlhw”が、Microscope に“DMi8”が選択されていることを確認し、OK をクリックします。

(“Simulator.xlhw”は解析のみを行う場合に使用、画像取得はできません)

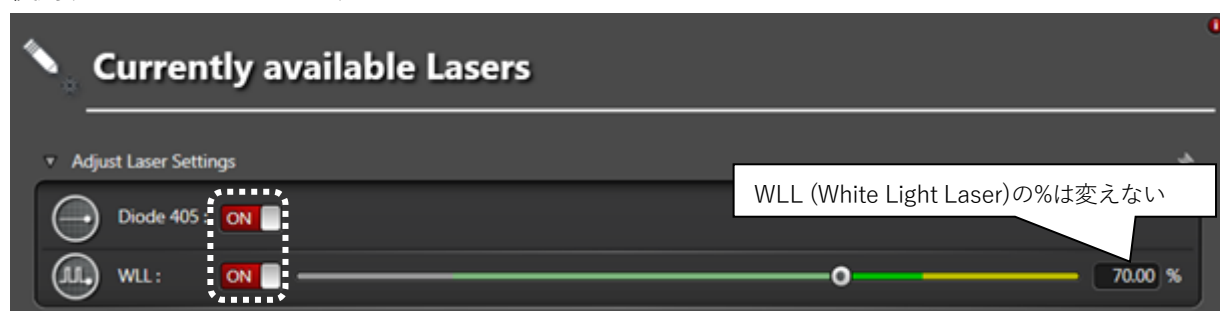
前回使用時設定が表示されます。



9. レーザーの起動



使用するレーザーを ON にする



- * WLL(White Light Laser)の%は変えない
- * OPSL は単波長 CW レーザーです
- * WLL は波長可変パルスレーザーです
- * 表示されるレーザーは仕様によって変わります

レーザー波長(nm)	Fluorescent dye/protein
405	Blue Ex. (DAPI, Hoechst etc.)
WLL: 485-685	Green -Infrared Ex. Green Ex. FITC, Alexa488, Cy2, GFP etc. Yellow Ex. YFP etc. Red Ex. TRITC, Alexa555, Cy3, RFP, DsRed, mCherry etc. Infrared Ex. Alexa633, Cy5 etc.
OPSL 448	Cyan Ex. CFP, Lucifer Yellow etc.
488	Green Ex. FITC, Alexa488, Cy2, GFP etc.
514	Yellow Ex. YFP etc.
561	Red Ex. TRITC, Alexa555, Cy3, RFP, DsRed, mCherry etc.
638	Infrared Ex. Alexa633, Cy5 etc.

III. Acquire image



Acquire

The Beam Path settings : (次ページ参照)
レーザーや検出器、対物レンズ、AOBS(filter cube)の設定

Viewer (37 ページ参照)
取得画像表示と調整

Acquisition/Open Projects 表示を切替えて使用

Acquisition

Format やスキャンスピード、Z-Stack など画像撮影設定

Project

画像取得を行ったデータ名の一覧表示
保存や削除、データの呼び出しなど

Buttons for Image Acquisition

Live **Fast Live** : Preview スキャン (16 ページ参照)

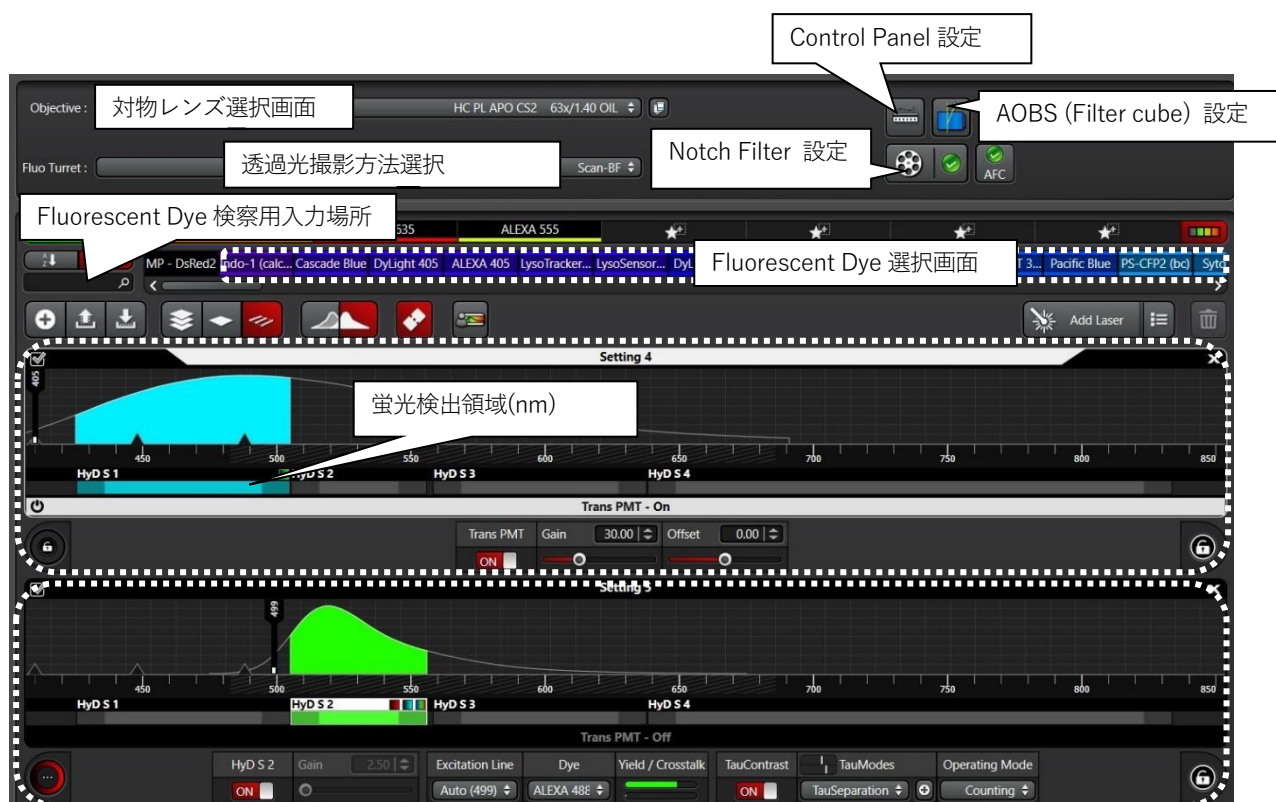
* 画像は保存できません

Capture Image : 設定された条件で現在のステージ位置だけの画像取得時を行います。撮影された画像は Project に一時保存されます。

Start : Z-stack やタイムラプス、タイルスキャンを含め設定された条件通りに画像取得を行います。画像は Project に一時保存されます。Start を押すと、Stop に表示が切り替わり、途中で撮影を止めることができます。撮影された画像は Project に一時保存されます。

III-1. The Beam Path Setting

蛍光色素やレーザー、検出器の設定などができます



* Notch Filter Lines (Optional) : レーザーの反射を抑えます

* 透過光撮影方法 : 29 ページ参照

* Control Panel (Optional) : 16 ページ参照

検出器の Gain、レーザーパワー、Zoom 倍率、Pinhole サイズ、Z 位置を調整できます(18 ページ参照).

III-2. 対物レンズ選択

対物レンズが表示されている場所をクリックすると、現在搭載されている対物レンズの一覧のプルダウンメニューが表示されます。対物レンズを選択すると、プルダウンメニューが閉じ、選択された対物レンズに自動的に切り替わります。



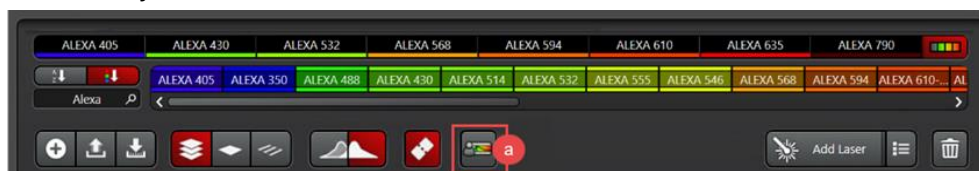
* 表示される対物レンズは仕様によって異なります

III-3. Beam Path 設定

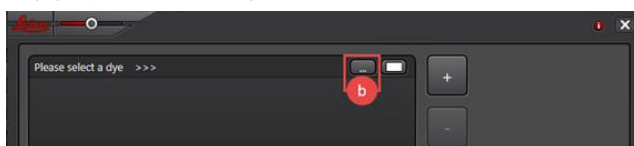
III-3-1. Dye Assistant を使用して励起・蛍光取得領域を新規作成する場合

Dye Assistant を使用して励起・蛍光取得領域を新規作成する手順は以下の通りです。

1. 下図①“Dye Assistant”ボタンをクリックします



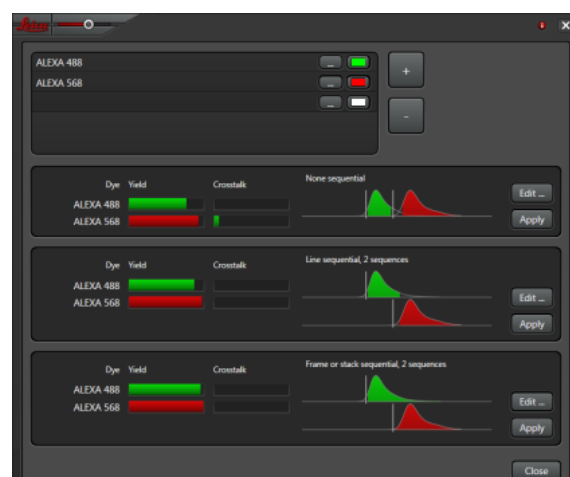
下図が表示されます。



2. 上図①“...”ボタンをクリックするとプルダウンメニューで蛍光色素名が表示されます。

3. プルダウンメニューから色素名を選択すると、右図のように左側に選択した色素名が表示されます。

2つの色素を選択した場合、右図のようになり、下段に撮影方法が提案されます。表示されているカーブはそれぞれの蛍光波長曲線を示しています。また蛍光色素の蛍光波長をすべて取得したときの割合を100としたとき、設定されている蛍光取得領域における割合を“Yield”で、蛍光がほかの検出器へ漏れ込む割合を“Crosstalk”で示しています。“Yield”が高く、“Crosstalk”が低いほうがいいです。



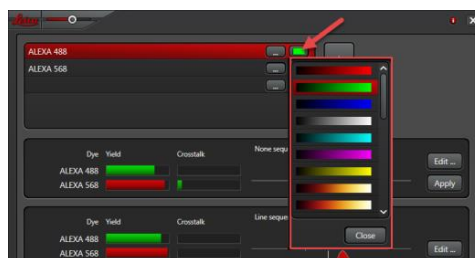
4. 同様にしてサンプルに応じて色素名を選択していきます。

5. 検出器の種類が複数ある場合、色素に応じて使用する検出器を指定することができます。右図のようにプルダウンメニューから任意の検出器を選択します。

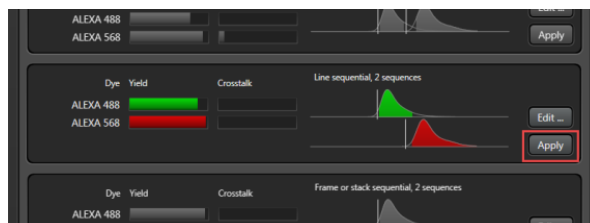


使用する検出器を指定する場合、検出器の組み合わせおよび仕様によって設定できるスキャン方法が制限されます(13 ページ参照)。

6. Pseudo Color は自動設定されますが、右図赤矢印部分をクリックするとプルダウンメニューが表示され任意の色を設定することができます。



7. 色素、検出器、Pseudo color の設定ができたら検出方法を選択し Apply をクリックします。Dye Assistant 画面が閉じ、それらすべての設定が反映されます。



8. Edit をクリックすることで新規ウインドウが表示され、励起波長や蛍光検出領域を調整できます。



9. 励起波長は縦の線③で、蛍光取得領域は④で示され、励起波長曲線が薄い色で表示されます。WLL の場合、③をドラッグすることで励起波長を調整することができます。④の両端をドラッグすることで蛍光取得領域を狭めたり、広げたりすることができます。励起波長や蛍光波長の調整は設定の適用後でも可能です。

10. Apply を押し、設定を適用します

III-3-2. Drag and Drop を使用して励起・蛍光取得領域を新規作成する場合

検索窓で色素名を入力すると、該当する蛍光色素が表示されます。これらを下図①のようにドラッグすると、励起波長②および蛍光取得領域③が自動設定されます。下図は Alexa と入力した場合の例。



ドラッグ中に表示される検出器名に合わせてドラッグすると、使用する検出器を指定することができます。④の枠など何もないところにドラッグすると色素に応じて自動選択されます。

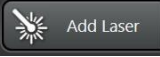
蛍光取得領域は色素が追加されると再度自動調整されます。

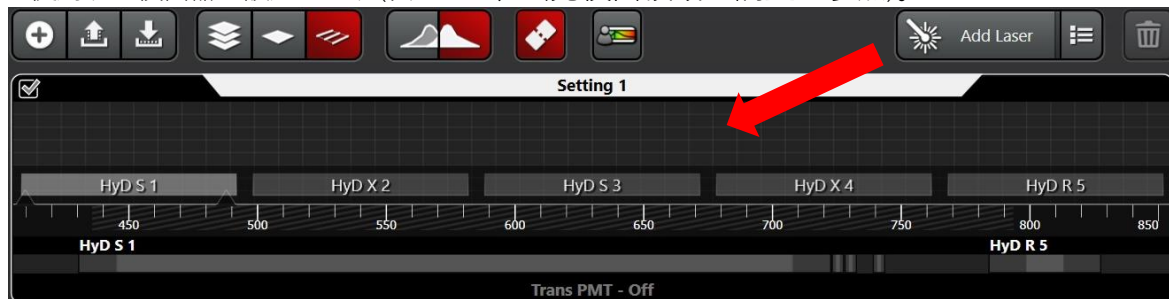
表示されているカーブはそれぞれの蛍光波長曲線を示しています。また蛍光色素の蛍光波長をすべて取得したときの割合を最大としたとき、設定されている蛍光取得領域における割合を“Yield”で、蛍光がほかの検出器へ漏れ込む割合を“Crosstalk”で示しています。“Yield”が高く、“Crosstalk”が低いほうがいいです。

III-3-3. 使用する検出器を手動設定で新規作成する場合

1. 上図“Setting”内の使用する検出器をクリックします(④の下側矢印部分)
2. “Dye”の下をクリックすると表示されるプルダウンメニューから使用する色素名を選択すると、励起波長および蛍光取得領域が自動設定されます。

III-3-4. 使用するレーザーを手動設定で新規作成する場合

1. 下図のように  を Setting 内にドラッグすると最寄りのレーザーが自動選択されます。
2. 使用する検出器を設定します(次ページ、蛍光検出領域の調整を参照)。



III-3-5. 設定を削除する方法

削除したい設定の上図⑥で表示されている蛍光波長曲線部分をクリックし、

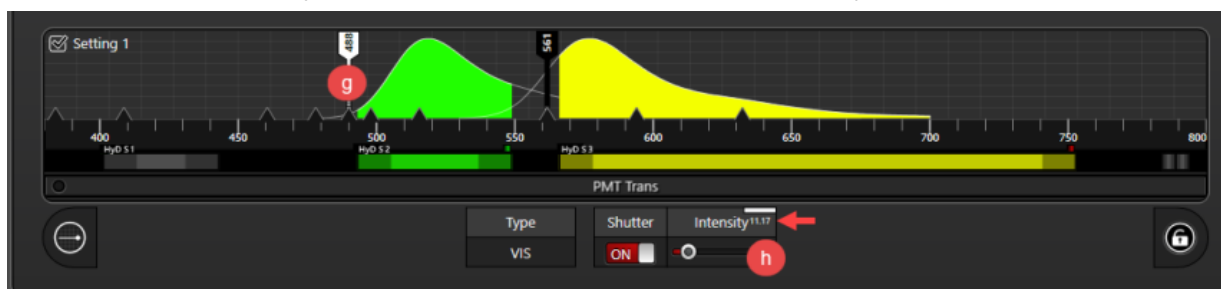
- ・ Delete キーを押す
- ・ 上図右上に表示されているゴミ箱マークをクリックする

削除することができます。

また、削除したい設定の上図⑥で表示されている蛍光波長曲線部分“Setting の外にドラッグすると削除することができます。

III-3-6. 励起波長の調整

1. ⑥で表示される励起波長の縦線部分をクリックすると、白に変わります。また“Setting”の数がレーザー調整用に切替ります。Shutter はデフォルトで ON になっています。



2. 下記方法でレーザーの出力を調整できます。

- ・ ⑥のスライダーバーを動かす
- ・ スライダーバー上でマウスのホイールを回す
- ・ 上図矢印で表示されているレーザー出力表示ウィンドウから直接数値入力する
- ・ Control Panel の“Smart Channel Intensity”を使用する (Viewer 画面上で選択されている画像のレーザー出力を変更)

III-3-7. 蛍光検出領域の調整

1. 調整する検出器の①をクリックすると、検出器の名前部分と辺縁部が白に変わり、Setting 下部が検出器設定用画面に切り替わります。デフォルトで ON になっています。

2. 必要に応じて検出器の蛍光検出領域の調整を行います。↔で表示

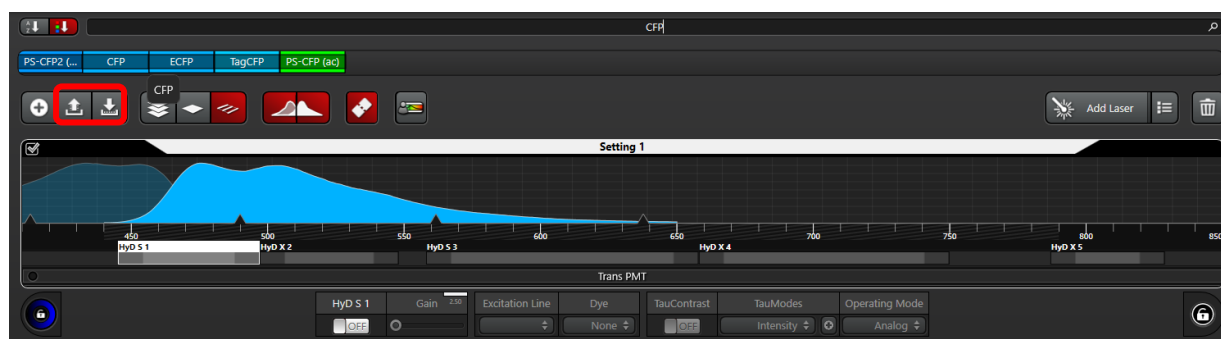
されている部分をドラッグすることで蛍光検出領域を広げたり、狭めたりできます。検出領域をダブルクリックすることで現在の検出領域波長をポップアップで数値表示し、数値を直接入力することもできます。

3. 下記の方法で検出器の Gain(感度)を調整します。デフォルトは 100%です。

- ・ ①のスライダーバーを動かす
- ・ スライダーバー上でマウスのホイールを回す
- ・ 上図矢印で表示されている Gain 表示ウィンドウから直接数値入力する
- ・ Control Panel の“Smart Gain”を使用する (Viewer 画面上で選択されている画像のレーザー出力を変更)




III-3-8. 設定の Save と Load




Save : 設定の保存

作成した画像取得設定を保存することで、次回同じ設定で画像取得を行えます。

1.  ボタンをクリックするとファイルブラウザが開きます。
2. ファイル名と保存先を指定し、“Save”をクリックします。

Load setting : 設定の呼び出し

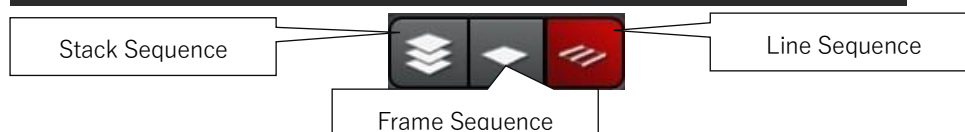
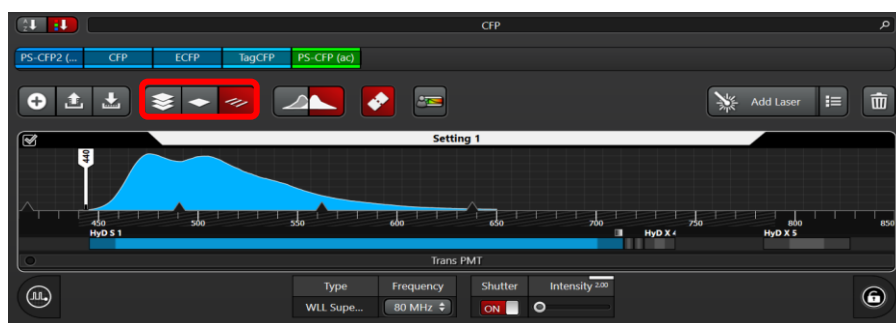
1.  ボタンをクリックするとファイルブラウザが開きます。
2. ファイルを選択し、“OK”をクリックすると、画像取得設定が呼び出されます。

III-3-9. Pseudo color look up table の変更

各検出器の左に表示されている“Pseudo color of look up table”で指定されている色が取得画像の Pseudo color として表示されます。“Pseudo color of look up table”をクリックするとリストが表示され、変えたい色をダブルクリックすると Pseudo color を変更することができます。



III-3-10. 画像取得時のスキャン方法： Line Sequence、Frame Sequence、Stack Sequence

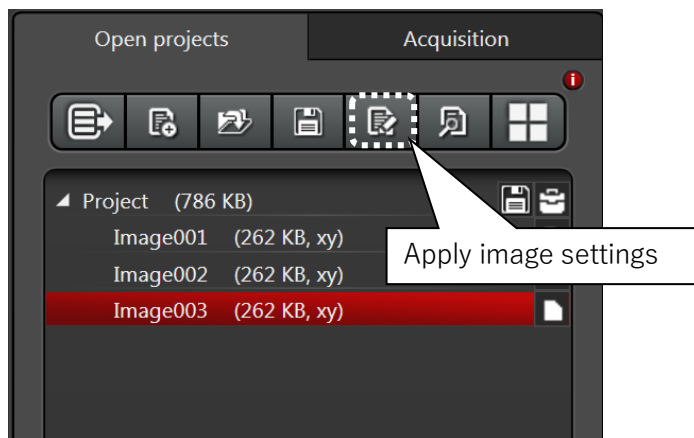


<p>Line Sequence</p> <p>ラインごとに設定を切替え、ラインを積み重ねることで画像取得をおこないます。</p> <p>* ラインは高速に切替えているため、同時取得に近い撮影方法です</p>		<p>撮影対象が動くライブイメージングに適した撮影方法です</p> <p>* この撮影方法では Sequence 間で以下の設定を変更できません。レーザーの設定、Gain、検出器の ON/OFF</p> <p>* 検出器が OFF の状態でも光は検出器に入るため、他の Sequence のレーザー波長と重ならないようにしてください。</p>
<p>Frame Sequence</p> <p>画像を 1 枚撮影するごとに設定を切替えながら画像取得をおこないます。</p> <p>* 励起波長や蛍光波長を変えながら、1 つの検出器だけを使用して複数の Channel の画像取得ができます。</p>		<p>* この撮影方法では Sequence 間で以下の設定を変更できません。レーザーの設定、Gain、検出器の ON/OFF、Frame Accumulation、Line/Frame Average、Pinhole、motCorr、検出器の設定(検出波長領域、Tau Mode、Operation Mode)</p>
<p>Stack Sequence</p> <p>1 つの Channel の Z-Stack を撮影するごとに設定を切替えながら画像取得をおこないます</p> <p>* 励起波長や蛍光波長を変えながら、1 つの検出器だけを使用して複数の Channel の画像取得ができます。</p>		<p>* この撮影方法では Sequence 間で以下の設定を変更できません。レーザーの設定、Gain、検出器の ON/OFF、Frame Accumulation、Line/Frame Average、Pinhole、motCorr、検出器の設定(検出波長領域、Tau Mode、Operation Mode)</p>

III-3-11. 取得画像データを用いた取得条件の設定

画像取得を行ったデータを用いて取得条件を設定できます。

呼び出したい設定で撮影した画像データを選択後、下図”Apply image settings”を押すと設定が呼び出されます(下記参照)。

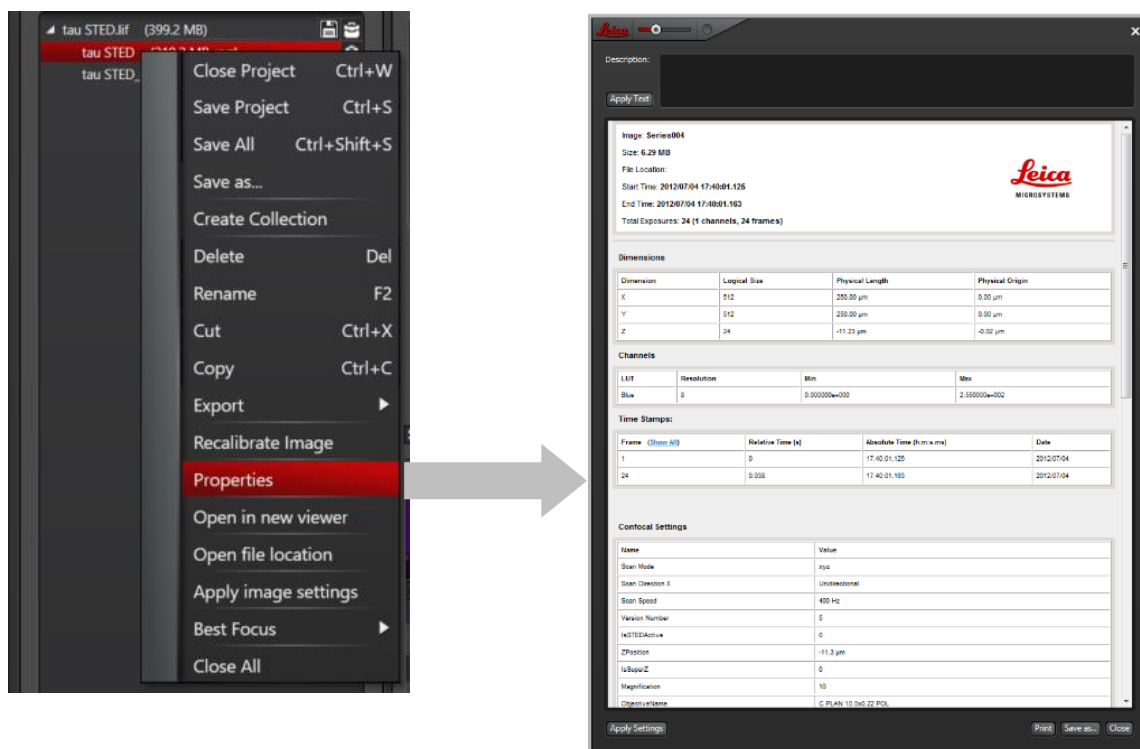


Open the dialog

すべての撮影条件が呼び出されるわけではありません。

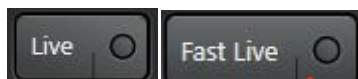
レーザーや検出器の設定、Line/Frame Average/Accumulation、Pinhole の設定が呼び出されますが、他は適用されません。下記の方法で設定を確認の上、手動で設定します。

設定を確認したい画像データを選択後、右クリックし、表示される左下画像から Properties を選択すると、右下図のように新規ウインドウが表示されます。そこにすべての撮影条件が記載されています。



III-4. 画像取得パラメータ設定と画像取得方法

III-4-1. Live Scan と Fast Live Scan (Preview scan)




Preview 画像取得方法には Live と Fast Live の 2 つがあります。

Fast Live mode : 下記設定で Preview 画像を取得します。主に XY 位置や Z 位置の確認などに使用

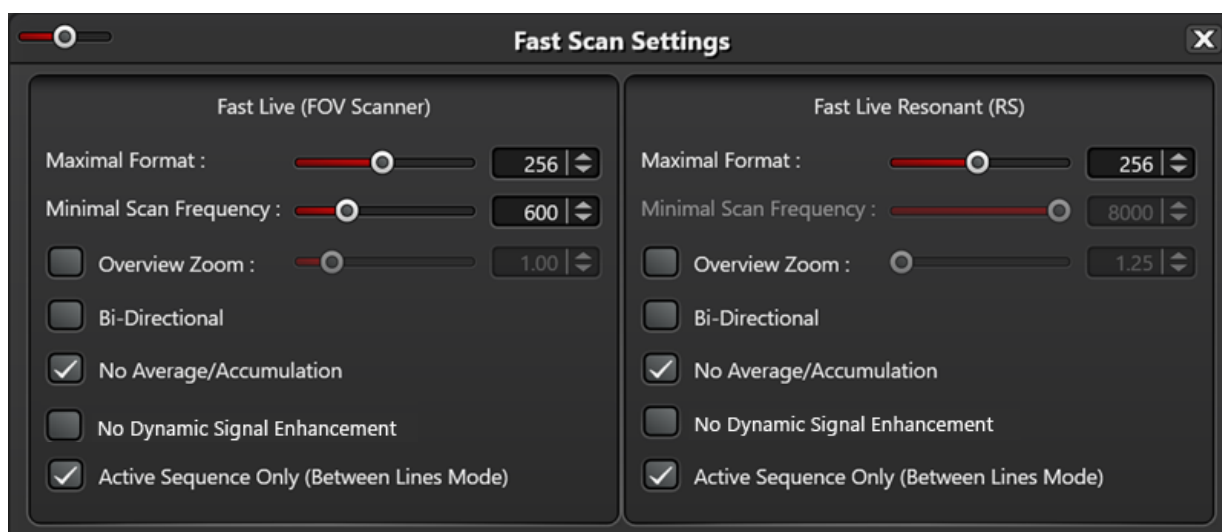
Live mode : 画像撮影時と同じ設定で Preview 画像を作成します。画像撮影時のパラメータ設定の確認などに使用



Fast Live の右側にカーソルを合わせると表示が  のように変わり、歯車部分をクリックすると下図の Fast Live 設定ウインドウが表示されます。

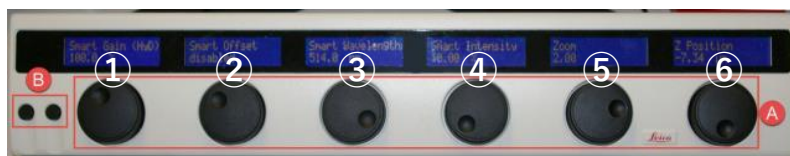
Fast Live の FOV 使用時と Resonant 使用時、それぞれ設定することができます。

* Active Sequence Only(Between Lines Mode) : ON になっていると、Fast Live で画像取得を行うと、現在選択されている Setting だけが画像取得されます。Line Sequence の時のみ有効な機能で、デフォルトは ON です。



III-4-2. Control Panel

“Control Panel configuration”ボタン  をクリックすると、詳細な機能設定ができます
デフォルト設定は下記です。



- ① **Smart Gain** : Viewer 画面上で選択されている Channel の検出器の Gain を調整できます
- ② **Smart Intensity** : Viewer 画面上で選択されている Channel のレーザー出力を調整できます
- ③ **Smart Wavelength** : Viewer 画面上で選択されている Channel のレーザー波長を調整できます
- ④ **Pinhole** : 選択されている Sequence の Pinhole size を調整できます
- ⑤ **Zoom** : Zoom 倍率を調整できます
- ⑥ **Z position** : Z 位置を調整できます


z-Galvo: super Z ステージ (Galvano ステージ)の Z 位置を調整します

z-Wide: 倒立顕微鏡の場合、レポルバーの Z 位置を調整します

正立顕微鏡の場合、サンプルステージの Z 位置を調整します

z-Galvo と z-Wide については 27 ページ参照

III-4-3. 画像のサチュレーションチェック

Quick Look-up table  ボタンをクリックすると、画像の表示色を変更することができます。

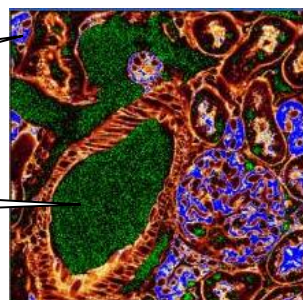
Pseudo Color (デフォルト) → Grow Over/Under → Gray → Pseudo Color →

Grow Over/Under : 下図のように輝度が 0 (設定した値以下)の Pixel を緑で、サチュレーションしている(設定した値以上の)Pixel を青で表示し、その間を黒、茶、白で表示します。



青：サチュレーションまたは設定値以上の値

緑：輝度値が 0 または設定値以下の値

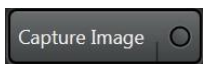


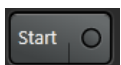
III-4-4. Acquire image or image series

画像撮影ボタン

 : Preview スキャン用ボタン(15 ページ参照)

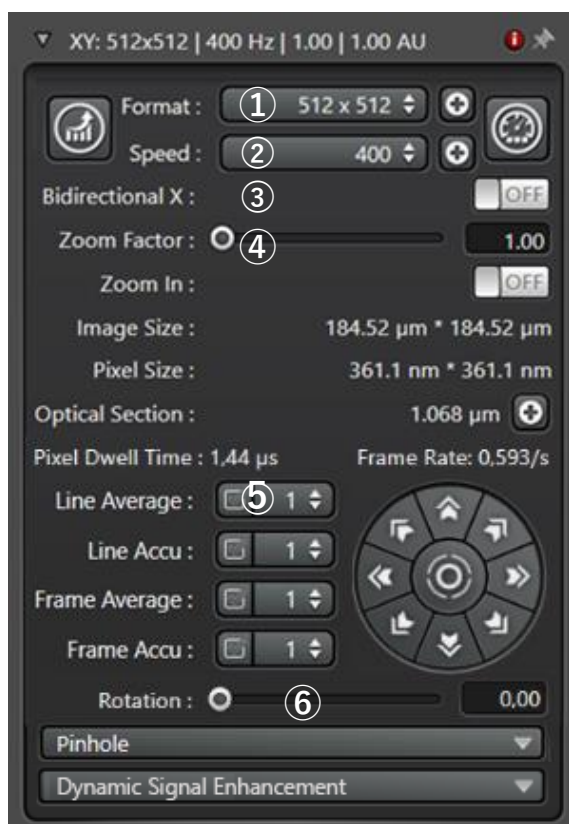
* 取得画像は保存できません

 : 設定された条件で現在のステージ位置だけの画像取得時を行います。撮影された画像は Project に一時保存されます。

 : Z-stack やタイムラプス、タイルスキャンを含め設定された条件通りに画像取得を行います。画像は Project に一時保存されます。Start を押すと、Stop に表示が切り替わり、途中で撮影を止めることができます。撮影された画像は Project に一時保存されます。

III-5. 画像取得条件の設定

III-5-1. Format、スキャンスピード、Zoom の設定



①Format：画像の Pixel 数を設定します。デフォルトは 512 x 512 Pixels です。数値部分をクリックするとプルダウンメニューで表示される組み合わせに、また右側にある⊕ボタンをクリックすると任意の数値を入力でき、その値に変更できます。

②Speed：スキャンスピード(Hz)を設定します。デフォルトは 400 Hz です。数値部分をクリックするとプルダウンメニューで表示される組み合わせに、また右側にある⊕ボタンをクリックすると任意の数値を入力でき、その値に変更できます。

*601 Hz 以上になると数値に応じてズームが掛かります。

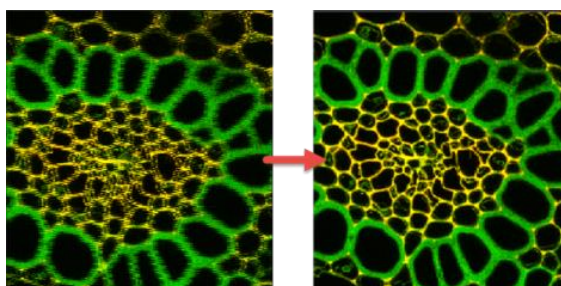
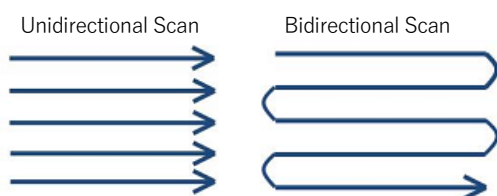
*スキャンスピードを遅くすると S/N は上がりますが、退色しやすくなります。

*Resonant スキャナーのスキャンスピードは固定値 (8000 Hz または 12000 Hz) で変更できません。

③Bidirectional X：画像取得速度を最大で 2 倍速く

することができます。(Phase を調整する必要があります)

ガルバノミラーは左から右、右から左の往復運動をしていますが、デフォルトの設定では下左図のように左から右への移動時のみレーザーの照射および画像取得を行っています。Bidirectional X を ON にすると下中央図のように左から右だけでなく右から左の移動時にもレーザー照射および画像取得を行うことで、画像取得速度を速くします。しかし、左から右と右から左の位相を合わせる“Phase” (Bidirectional X を ON にすると表示されます)の調整が必要です。位相がずれていると下図のようになります。



④Zoom：光学 Zoom を設定します。

下記の方法で Zoom 倍率を変更できます。

・スライダーバーを動かす。Zoom In を ON にして、Viewer 画像上で ROI を指定する。Control Panel 上の Zoom を操作(16 ページ参照)

* 601 Hz 以上にするとその値に応じて自動的に Zoom が掛かります。

⑤Line/Frame Average/Accumulation

Average および Accumulation により S/N が向上します

一般的に検出器の Gain を低くすると、必要な Average 数は減ります。

左にあるチェックボックスを ON にすると、設定した値がすべての Sequence に適用されます。

⑥Rotation：画像の回転(Optional)

プリズムを回すことで画像を +/- 100°まで自由に回転させることができます。Control Panel からでも操作できます(16 ページ参照)

画像の Pseudo color は下図、Viewer 画面左の白点線内をダブルクリックすると表示されるウィンドウで色を選択すると、その色に変更できます。

表示スケールは下図の白点線部分の上端または下端をドラッグすると変更できます。また上端または下端に表示されているウィンドウに数値を直接入力することも変更できます。

画像の表示スケールについて

撮影した画像の輝度に合わせて Viewer 画面左にあるスライダー位置を調整します。

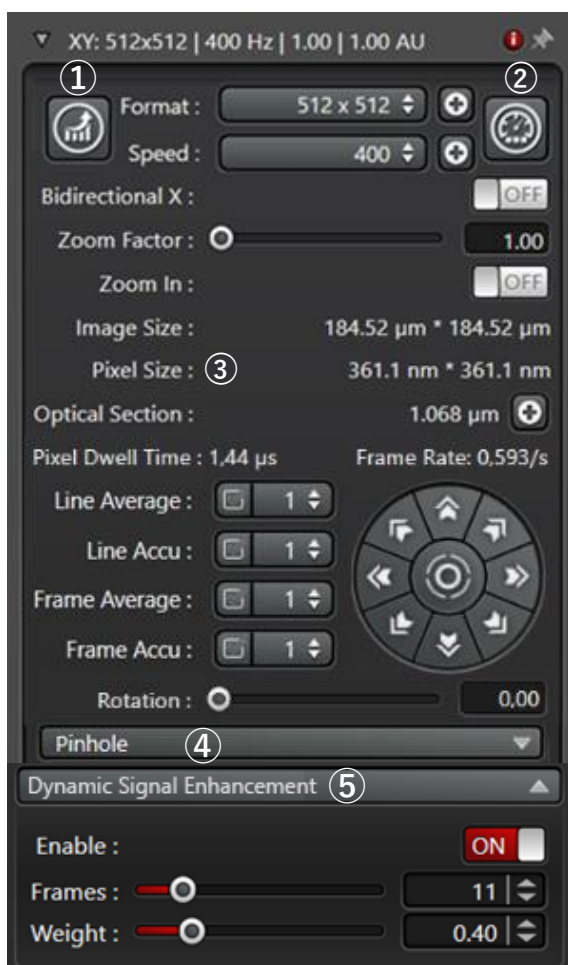
Auto Scale ボタン

すべての画像において輝度値/Pixel のヒストグラムの最高値と最低値に表示スケール上端と下端を自動的に合わせます。これによりダイナミックレンジを広く見せることができます。

Z-Stack 画像やタイムラプス画像の場合、各 Stack、各時間の画像に自動調整されます。もう一度クリックすると、その時の値で固定されます。

Counting Mode を使用した場合、表示できる Photon/Pixel 数は Bit スケールによって変わります。





① XY format optimization

選択されている対物レンズの NA と設定されているピンホールサイズを考慮し、得られる最大の分解能を表現できる Pixel サイズになるように画像の Pixel 数が自動設定されます(23 ページ参照)。

② FOV Scanner と Resonant Scanner の切替えボタン

グレー : FOV Scanner

赤 : Resonant Scanner

* Resonant スキャナーのスキャンスピードは固定値 (8000 Hz または 12000 Hz) で変更できません。

* Resonant scanner 選択時は HyD S の Analog mode は使用できません。

⑤ Dynamic Signal Enhancement (DSE) : DSE は指数加重移動平均化処理により画像取得速度を損なうことなく、タイムラプス画像の S/N を向上させる機能です(次ページ参照)。

* Raw データと処理画像両方作成されます。

* Process/Lightning/Dynamic Signal Enhancement から再処理することも可能です。

Enable : DSE 機能の ON/OFF をします。

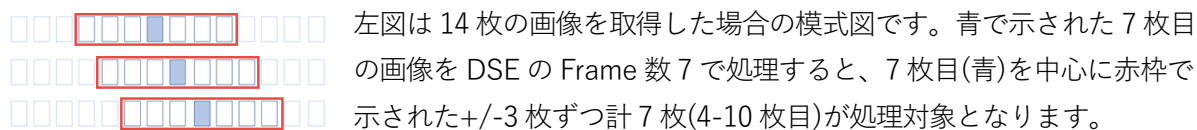
Frames : 指数加重移動平均処理の対象となる画像の枚数(Z-Stack の場合は Stack 数)を設定します(最大 65)。現在画像とその前後の画像に対して処理を行うため、設定値は必ず奇数です。

Weight : 指数加重移動平均処理を行う際の加重を設定します(0 - 2)。数値が大きくなるほど加重(貢献度)が大きくなります。

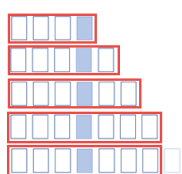
* Counting Mode で DSE を使用する場合、輝度値は平均化ではなく積算されます。

サチュレーションに注意してください。

DSE は指数加重移動平均処理により画像取得速度を損なうことなく、タイムラプス画像の S/N を向上させる機能です。



*8 枚目や 9 枚目を処理する場合は、赤枠ごと移動して処理をしていきます。



そのため、前後に余裕を持たせた撮影を行ってください。そのあと、Process/Edit/Crop で必要な枚数を切り抜きます。

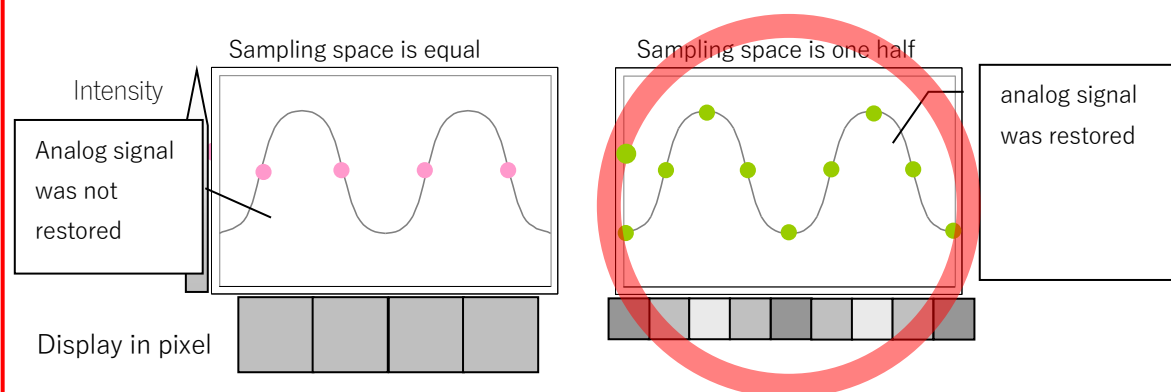


III-5-2. ナイキストのサンプリング定理と Pixel Size

Nyquist-Shannon サンプリング定理ではどのようなアナログ波形であっても 2 倍以上のサンプル情報量があればデジタル波形から戻すことができるというものです。

Pixel Size を表現したい分解能の 1/2 から 1/3 の値にする必要があるということになります。

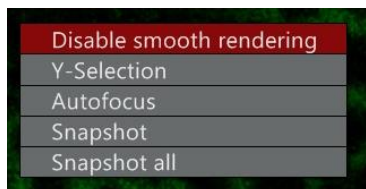
Pixel Size と表現したい分解能が同じ場合左下図のように、分解能を表現できない場合があります。



III-5-3. Smooth Rendering

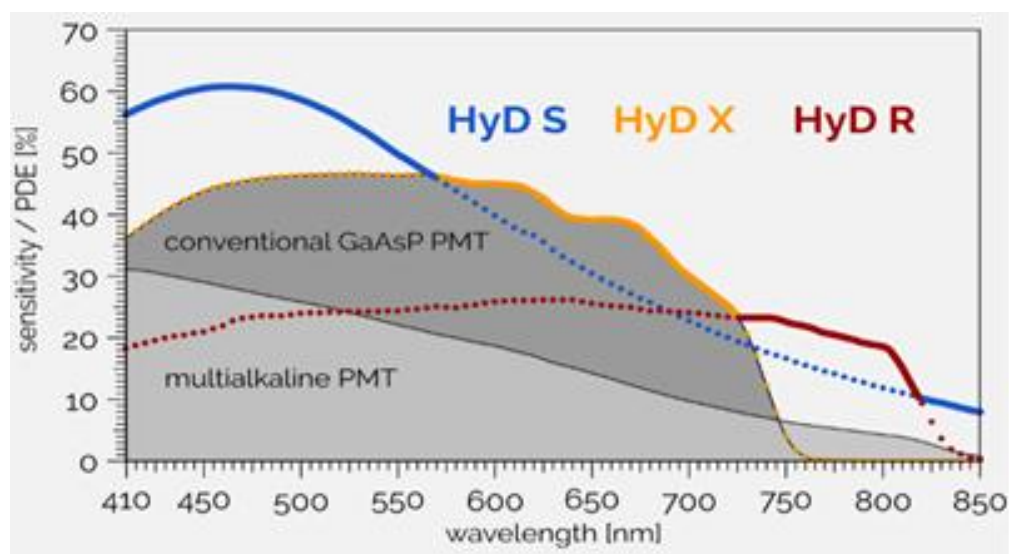
Viewer 画面上 Smooth Rendering を OFF にしてください。起動時は ON です。

Smooth Rendering を OFF にした画像が Raw データとなります。



III-5-4. HyD S、HyD X と HyD R の違いについて (Ref: Volker Schweikhard et al., Nature Method 2020)

各検出器の波長と PDE(Photon Detection Efficiency)の関係を示した下表を参考に HyD S、HyD X、HyD R から使用する検出器を選択してください。



- HyD S

HyD S は受光素子にシリコンを用いた Multi-Pixel Photon Counter (MPCC)検出器です。

*HyD S は TauSense や τ -STED に使用できますが、FLIM や FCS には使用できません。

HyD S には 3 つの Operation mode があります： Analog、Counting、Reflection(次ページ参照)

- HyD X、HyD R (搭載できません)

HyD X は FLIM や FCS 測定に特化した検出器です。

HyD R は近赤外検出に特化した検出器です。

HyD X と HyD R はどちらも冷却により、低ノイズを実現しています。

HyD X と HyD R には 2 つの Operation mode があります： Digital、Counting(次ページ参照)

III-5-5. HyD (Hybrid Detector)について

Operation mode

検出器により使える Mode が異なります。

-Counting : Counting mode はすべての検出器で使用できます。Counting mode を使用すると、検出した Photon 数を輝度値として表示するため、定量性の高い解析が可能となります。ある Pixel で 15 個の Photon が検出されると、その Pixel の輝度値は 15 となります。

* FRET などの Ratio イメージングに有効です

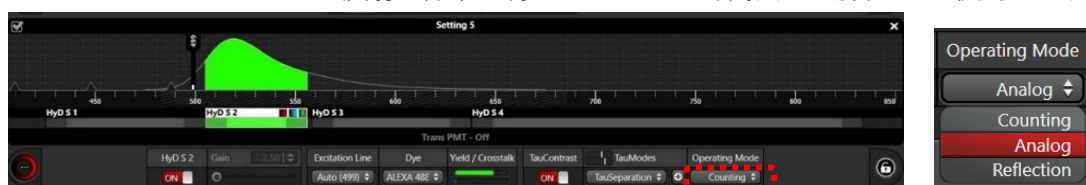
* Gain は変更できません

* 輝度値が 8 Bit スケール(255)を超える場合、12 Bit(4095)や 16 Bit(65535)に変更してください(次ページ参照)。

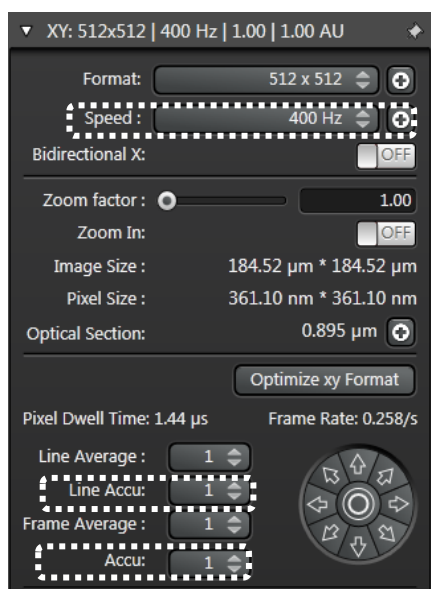
* 画像の輝度値を ASCII ファイルへ出力できます(44 ページ参照)。

-Analog : この Mode は通常の輝度画像取得に使用します。サンプルの明るさに合わせて Gain を調整します。

-Reflection : この Mode は反射や非常に明るいサンプルを撮影する場合にのみ使用します。



Counting mode を使用した画像取得方法



1. Analog mode(Gain 50 - 100)でレーザー出力の調整を行う
2. Counting mode に変更
3. スキャンスピードや Accumulation の調整を行う(レーザー出力や Average ではなく)

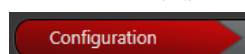
* スキャンスピードを遅くすると、Pixel Dwell time が長くなり、得られる Photon 数が増えます

* Resonant scanner はスキャンスピードを変更できません。

* Counting mode では、検出した Photon 数を輝度値として表示するため、Accumulation を行うとより明るく表示できるようになります。

* Accumulation 設定時には 8 Bit スケール(255)を超えないようにするため 1 スキャン当たりの明るさを Auto Scale で確認します(19 ページ参照)。または 12 Bit や 16 Bit に変更してください(次ページ参照)。

Bit スケール変更方法

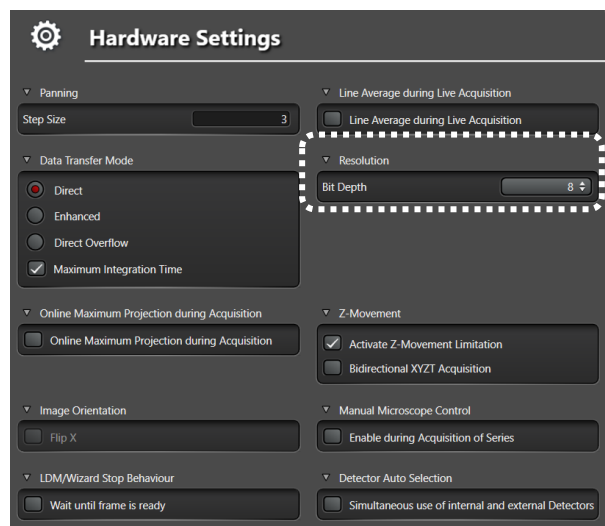


“Configuration”を選択し、

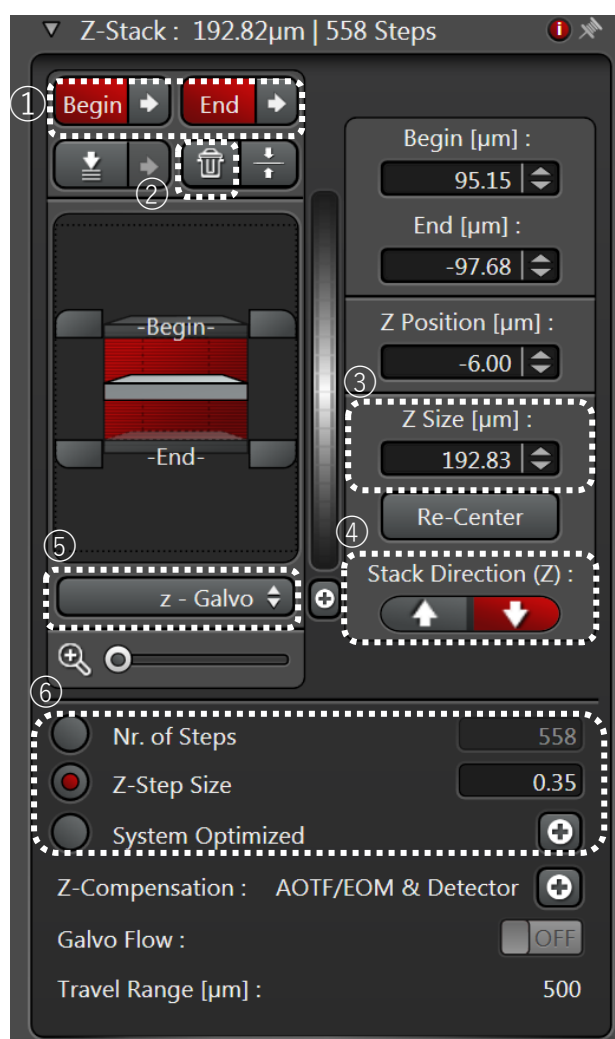


“Hardware を開きます。”

下図“Hardware Settings”が表示されます。白枠内の“Resolution”にある“Bit Depth”のプルダウンメニューから 12 Bit または 16 Bit へ変更します。デフォルトは 8 Bit です。



III-5-6. Z stack (XYZ)画像撮影手順



1. “Acquisition Mode”から XYZ または XYZT を選択します。

2. Control Panel や Smart Move を使用して Z-Stack を撮影する範囲の上端または下端まで移動します。

3. ①“Begin”をクリックします

4. 2.と同様に Control Panel や Smart Move を使用して Z-Stack を撮影する範囲のもう一方の端まで移動します。

5. ①“End”をクリックします。

① Begin や End の右にある矢印をクリックすると、Begin または End の設定位置へ移動します。

② Begin と End 位置を削除します。

③ Begin から End までの距離です。

④ Stack Direction (Z) : 下から上に撮影するか、上から下に撮影するか変更できます

⑤ Z 位置の調整方法を変更できます。“z-Galvo”と“z-Wide”の違いなどについては次ページ参照。

⑥z-Stack 撮影枚数の設定

Nr. of Steps : 撮影枚数を手動で設定

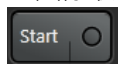
Z-Step Size : 撮影間隔を手動で設定

System Optimized : 使用する対物レンズと設定

されている Pinhole サイズをもとに Z 方向の分解

能を表現できる枚数を自動設定します。

6. 画像取得



“Start”をクリックします。

III-5-7. z 駆動方法(z-Galvo と z-Wide)

・ z-Galvo(Optional)

ガルバノ駆動で右図のようにステージ自身が動きます。薄いサンプルを高いz分解能で撮影するのに適しています。最大駆動幅は 500 μm (Restrict Range)または 1500 μm (Whole Range)です。



* z-Galvo 選択時に Control Panel からのみ操作できます。

* z-Galvo 選択時でも Smart Move や顕微鏡本体のノブでレボルバー(倒立顕微鏡の場合)の z 位置を変更することができます。

Control Panel または LAS X 画面上では現在の z 位置を表示します。しかし、どちらにおいても z-Galvo の位置のみを認識・表示しており、レボルバー(倒立顕微鏡の場合)の z 位置は認識していません。そのため、z-Stack 設定時 Begin を設定したあとは Smart Move や顕微鏡本体のノブを操作しないでください。設定後 Smart Move や顕微鏡本体のノブを操作すると撮影したい場所とズレます。

・ z-Wide

顕微鏡のレボルバー(倒立顕微鏡)が動きます。厚いサンプル撮影に適していますが、z分解能が低いです。撮影できる厚さは撮影に用いる対物レンズの作動距離に依存します。

* z-Galvo 選択時でも Smart Move や顕微鏡本体のノブでレボルバー(倒立顕微鏡の場合)の z 位置を変更することができます。

* z-Wide 選択時に Control Panel から操作できます。

-Control panel (16 ページ参照)

z-Galvo と z-Wide どちらも Control Panel から操作できます。

同時操作は不可



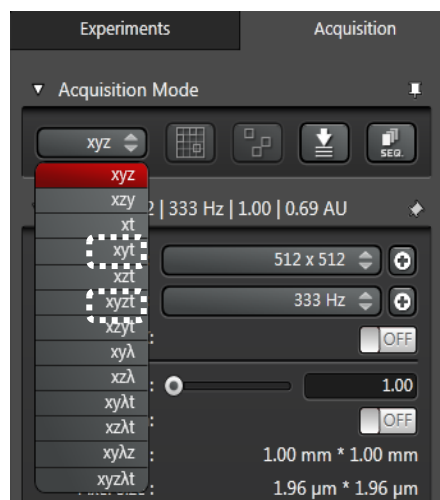
Z position



-Smart Move (49 ページ参照)

III-5-8. タイムラプス撮影(XYT, XYZt etc.)

1. “Acquisition Mode”で XYT や XYZT などを選択する



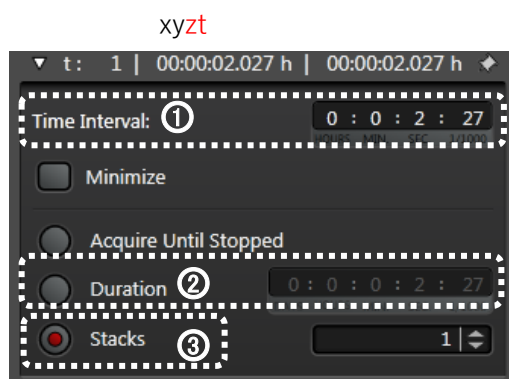
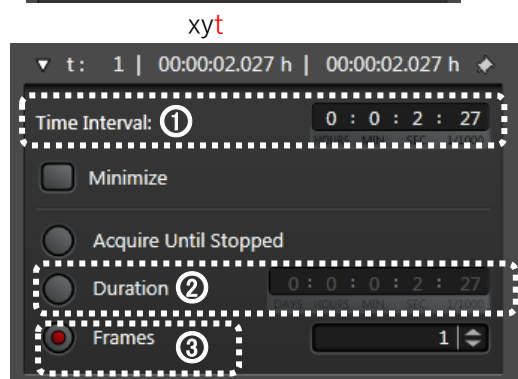
xyt : XY 画像のタイムラプス

xyzt : XY または XYZ 画像のタイムラプス

下記ウィンドウが表示されます。

左 : xyt 選択時

右 : xyzt 選択時

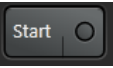


2. ①“Time Interval”を設定します。撮影開始から次の撮影開始までの時間です。

“Minimize”を選択すると、最小間隔で撮影します。

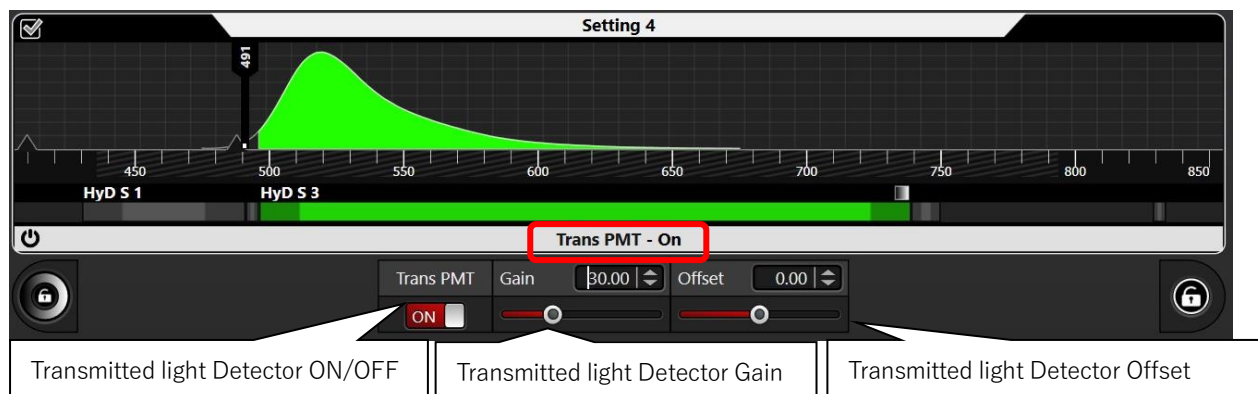
3. ②、③全撮影時間または撮影回数を設定します。

Acquire Until Stopped を選択すると、Start したあと Stop するまで撮影し続けます。ファイルは 2 GB ごとに分割されます。

4.  “Start”をクリックし、撮影を開始します。

III-5-9. 透過像(BF: Bright Field)、微分干渉(DIC: Differential Interference Contrast)、位相差像(PH: Phase Difference)撮影

蛍光画像撮影設定を行ったあとに設定します。“Trans PMT”をクリックすると下図のように Setting 下部の画面が切り替わります。



撮影方法を選択します

Scan-BF：透過像を撮影します。

Scan DIC(Optional)：微分干渉像を撮影します。撮影には Polarizer および Analyzer (Optional)が必要です。



微分干渉像撮影手順

1. “Scan-DIC”または“Scan-DIC-Pol”を選択します
2. 右図のように Prism と Bias が表示され、Prism は自動選択されます。



画像のコントラストを見ながら Bias のスライダーバーを操作し、位置を決めます。

3. 必要に応じてレーザー出力や検出器の Gain を調整します。

透過像または位相差像撮影手順

1. “Scan-BF”または“Scan-PH”を選択
2. 必要に応じてレーザー出力や検出器の Gain を調整します。

透過像撮影時の注意点

微分干渉像撮影にはプラスチックディッシュは適していません。プラスチックディッシュを使用する場合は位相差撮影を選択してください。

画像撮影に用いるレーザー出力や波長は画像自身やその明るさに影響します。

ケーラー照明の調整が必要です。

Scan-DIC と Scan-DIC-POL の違い

Scan-DIC は1つの偏光板と2つのプリズムの計3つの素子を用います。

一方 Scan-DIC-POL は2つの偏光板と2つのプリズムの計4つの素子を用います。

これらの素子が光路中に存在するため、Scan-DIC または Scan-DIC-POL と蛍光像を同時取得すると、蛍光画像が暗くなります。このため、Scan-DIC または Scan-DIC-POL と蛍光像を別の Setting で設定し、Frame Sequence を使用して撮影してください。

*レーザーはコヒーレントであるため、偏光板は1つでも微分干渉像を撮影できます。

IV. TauSense (Ref: M Julia Roberti et al., Nature Research 2020)

TauSense はパルスレーザーで励起されてから、Photon が検出される時間を解析して輝度とは異なる画像や情報が得られる技術です。

反射など不要なシグナルの除去や蛍光寿命の違いを用いて蛍光を分離することができます。

*WLL などパルスのレーザーが必要です。


*TauSense は、レーザー照射量はそのままに輝度画像と同時に画像取得することができます。



①TauContrast: 次ページ参照

②TauMode



プルダウンメニューから TauMode を変更できます。右にある  をクリックすると TauMode に応じた調整画面が表示されます。

None : TauContrast を ON にしたときだけ使用でき、TauContrast 画像のみを取得し、輝度画像を取得しません。

Intensity : 輝度画像を取得します。デフォルトで選択されています。

TauGating : 33 ページ参照

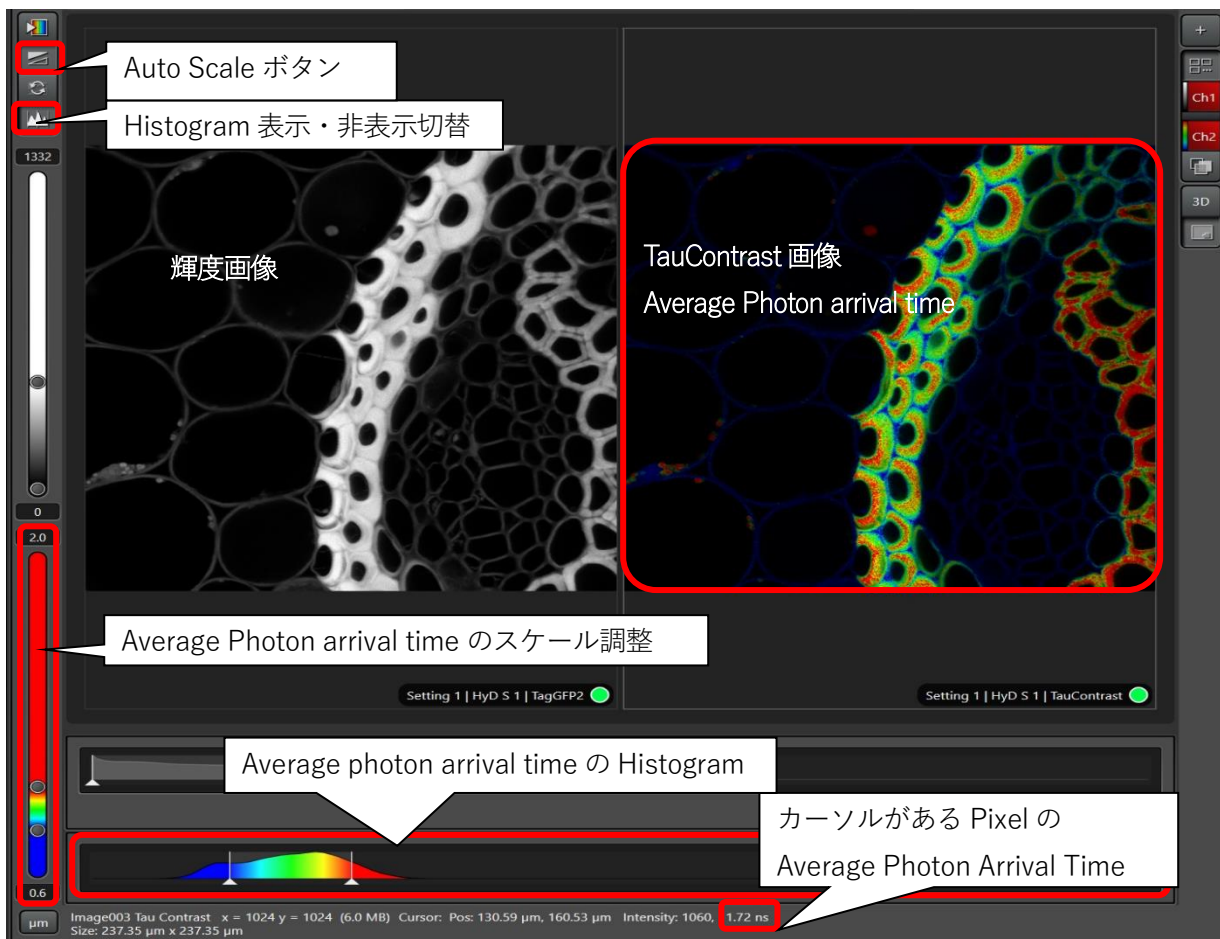
TauScan : 34 ページ参照

TauSeparation : 35 ページ参照

IV-1. TauContrast

“TauContrast”は Pixel ごとに励起されてから Photon が検出されるまでの時間の平均値を算出し、その平均値に応じた色で表示します。TauContrast(前ページ①)を ON にして撮影すると、下図のように輝度画像と TauContrast 画像の 2 つの画像が表示されます。


Start/Capture で画像取得できます。



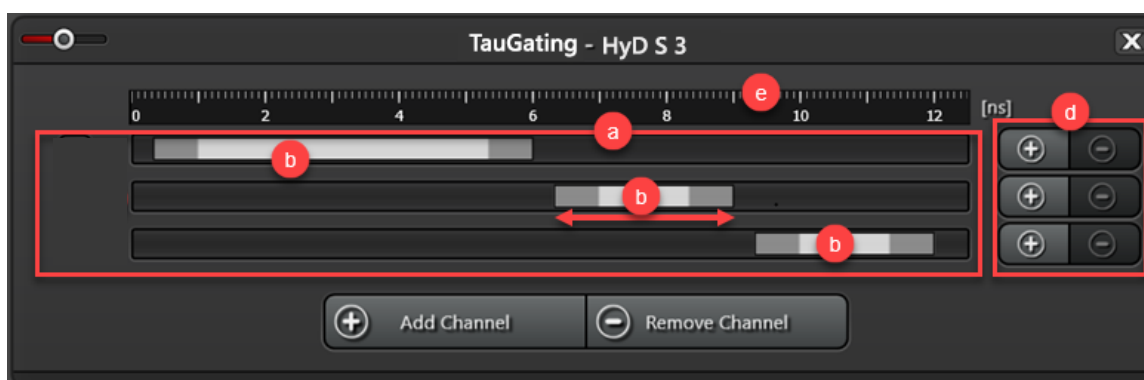
*上記 Average photon arrival time のスケールを調整した際、TauContrast 画像が 2 色以上になる場合、自家蛍光、反射、蛍光色素/タンパク質など複数の蛍光寿命成分が膨れている可能性を示唆しています。

IV-2. TauGating

パルスレーザーで励起されてから Photon が検出される時間を測定し、設定された時間範囲内に検出された Photon のみを用いて画像を作成します。

TauGating を選択した状態で  (31 ページ参照) をクリックすると、下図が表示されます。1 つの検出器につき複数の Channel を設定することができ、1 つの Channel につき 1 つの画像が取得表示されます。また 1 つの Channel につき最大 3 つの Gate **b** を設定できます。複数の Gate を設定した場合、すべての Gate で取得した Photon の総和を輝度画像として表示します。

下図赤枠内横 **a** のライン 1 つが 1 つの Channel を示しており、その中のグレーで示されているのが Gate **b** を示しています。Gate の位置と幅で Photon を取得する時間と時間幅を示しています。



d +/- ボタンで Channel 内の Gate 数を増やすことができます(最大 3 つ)。

Gate の時間範囲はマウス操作で移動、拡大・縮小することができます。またダブルクリックするとポップアップウィンドウが表示され、時間を直接入力できます。

a 横軸は時間(ns)です。


Add Channel : Channel を追加します。

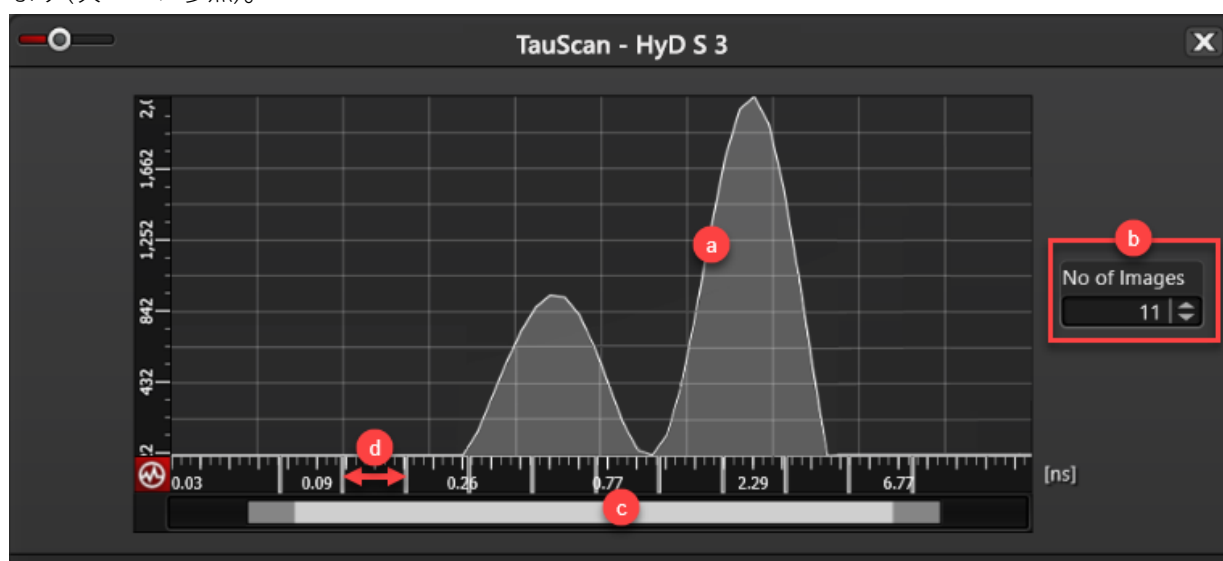
Remove Channel : 選択されている Channel を削除します。

Start/Capture で画像取得できます

IV-3. TauScan

スキャンすると下図のようにスキャン範囲中におおよそいくつの Lifetime Component があるのが表示されます。これにより異なる蛍光寿命を持つものが含まれているかどうか分かります。


TauScan を選択した状態で  (31 ページ参照) をクリックすると、下図が表示されます。スキャン行くと、下図のように Lifetime diversity curve **a** が表示され、**c** で指定した範囲を **b** で指定した数の画像に分割します。取得画像から異なる蛍光寿命を持つものが含まれているか判断することができます。また異なる蛍光寿命を持つものが含まれている場合、必要に応じて TauSeparation で分離することができます(次ページ参照)。

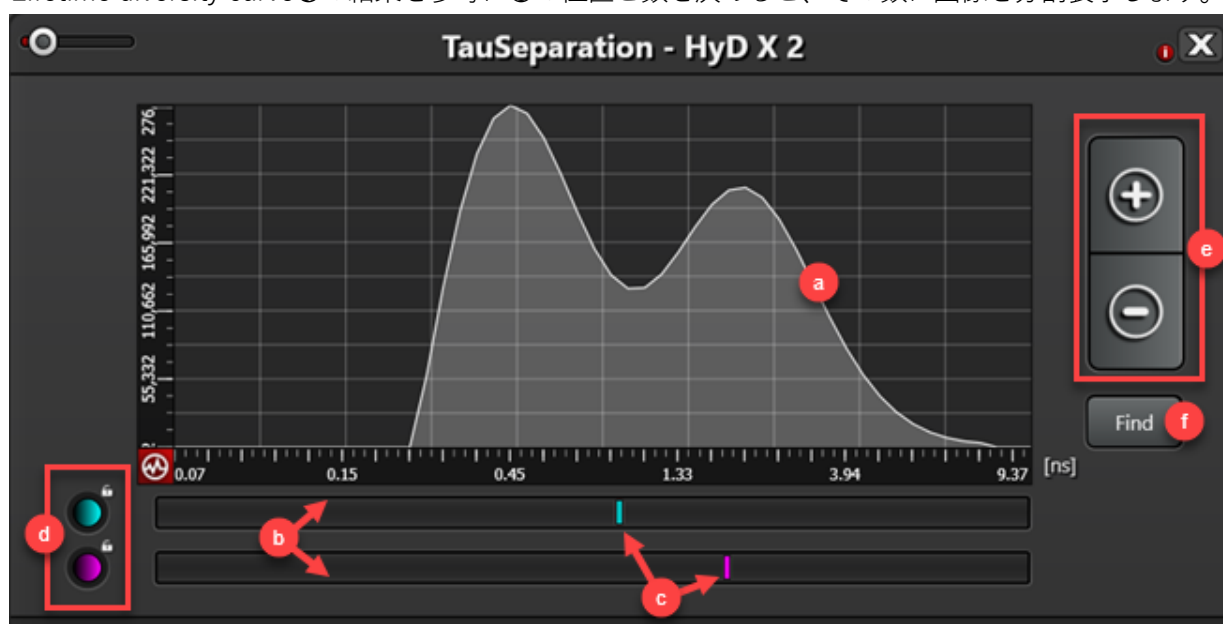


- a** スキャンされた画像に含まれる Lifetime Component から Lifetime diversity curve が作成・表示されます。各ピークがそれぞれの Lifetime Component のピークを示しています。
 - b** Lifetime diversity curve をいくつの画像に分割するか設定します。設定した数の画像取得が行われます。
 - c** Lifetime diversity curve のどの範囲を分割するか設定します。時間範囲はマウス操作で移動、拡大・縮小することができます。またダブルクリックするとポップアップウィンドウが表示され、時間を直接入力できます。
 - d** 画像の分画幅を示しています。
- Start/Capture で画像取得できます

IV-4. TauSeparation

TauScan(35 ページ参照)などでスキャン画像中に蛍光寿命が異なるものが含まれているのが確認できた場合、Dye Separation 機能のように異なる蛍光寿命のものを分離して画像取得できます。

TauSeparation を選択した状態で  (31 ページ参照) をクリックすると、下図が表示されます。スキャンすると、下図のように Lifetime diversity curve **a** が表示されます。TauContrast や TauScan、Lifetime diversity curve **a** の結果を参考に **c** の位置と数を決めると、その数に画像を分割表示します。



a スキャンされた画像に含まれる Lifetime Component から Lifetime diversity curve が作成・表示されます。各ピークがそれぞれの Lifetime Component のピークを示しています。

b 横のライン1つが1つの Channel を示しています。**e** で追加と削除できます。

c Lifetime diversity curve **a** を分割する位置を示しています。時間位置はマウス操作で移動できます。またダブルクリックするとポップアップウィンドウが表示され、時間を直接入力できます。

* 時間位置のある特定の時間範囲を表示するわけではありません。設定された **c** の位置や数に応じて変化します。

d 画像の Pseudo color を表示します。ダブルクリックすると表示されるウィンドウで変更できます。

e + / - で Lifetime diversity curve **a** を分割表示する Channel の数の追加と削除できます。

f “Find” ボタンをクリックすると、設定した **c** の数 Lifetime diversity curve **a** に応じて **c** の位置を自動設定します。

Start/Capture で画像取得できます

TauContrast 画像で複数の色になっていても、Lifetime diversity curve 上では1つのピークしか表示されないことがあります。

この場合、TauContrast の Average photon arrival time のスケールの上下端を、画像の一部が青や青になるように調整します。この時の上下端の値を TauSeparation 上で設定します。

TauContrast 画像で3色以上の場合はさらにスケールの上下端を調整し、画像中の緑などの箇所が青または赤になるようにし、同様に TauSeparation 上で設定します。

蛍光寿命測定および分離時の注意点

下記の条件を満たすと蛍光寿命の分離がしやすくなります。

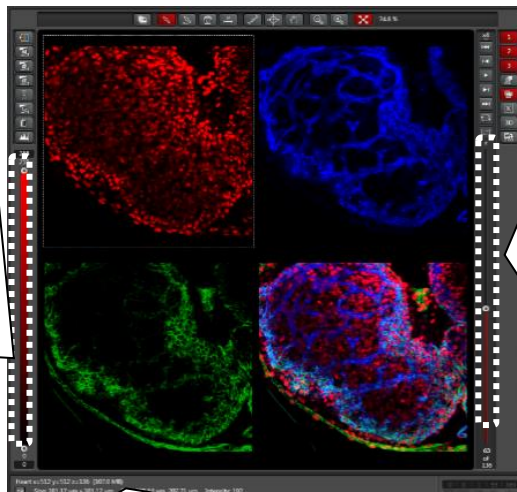
- ・ 蛍光寿命差が大きい
- ・ 取得する蛍光波長範囲において、輝度差が小さい
- ・ 蛍光寿命成分の局在が異なる

分離前の輝度画像が8 Bit スケールでサチュレーションしていなくても、TauSeparation を行うとサチュレーションすることがあります。その場合は Bit スケールを12 または16 に変更してください(25 ページ参照)。

V. Viewer

V-1. 取得した画像の Pseudo color や表示スケールを変更する方法

画像の Pseudo color は右図、Viewer 画面左の白点線内をダブルクリックすると表示されるウィンドウで色を選択すると、その色に変更できます。表示スケールは右図の白点線部分の上端または下端をドラッグすると変更できます。また上端または下端に表示されているウィンドウに数値を直接入力することでも変更できます。

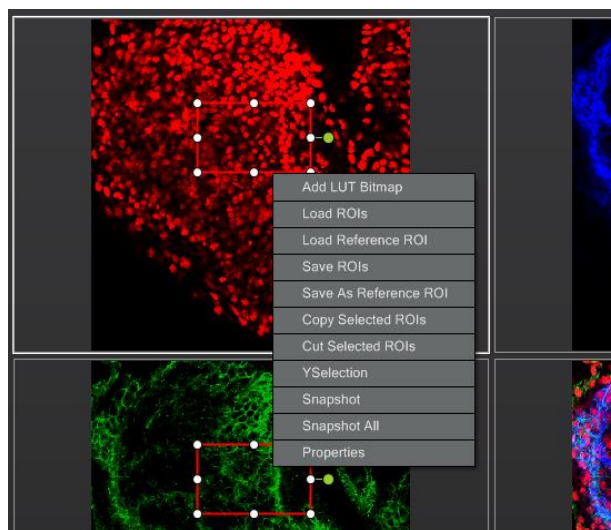


取得した画像の Format サイズ、データ容量などを表示します。

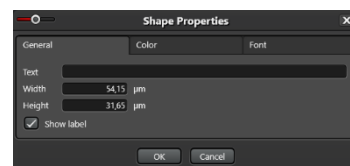
*  “μm” と “pixel” の表示切替ボタン

Z-Stack 撮影やタイムラプス撮影を行うと、Viewer の右または下に表示される Z またはタイムスケールバーを操作することで断面を変えられます。

V-2. 右クリックメニュー




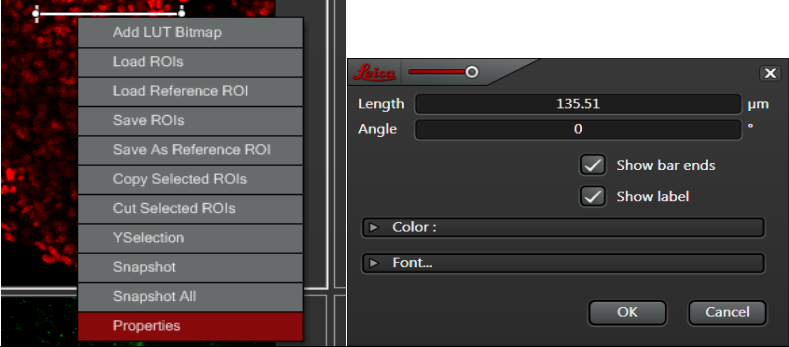



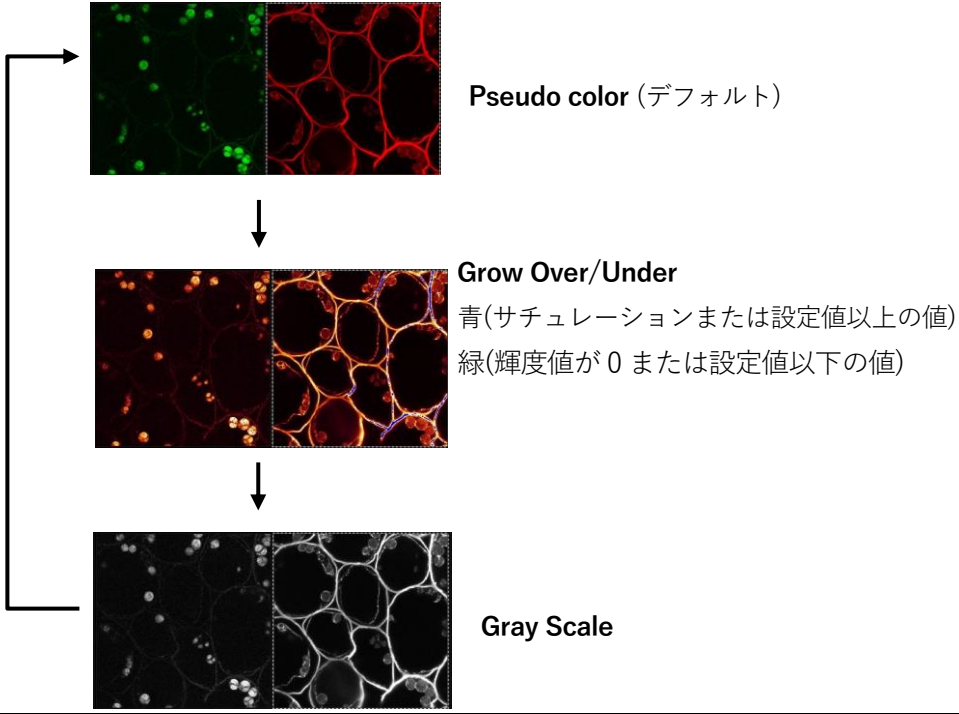


ROI Reference ROI	<p>Save：ファイルブラウザを開き、選択されている ROI を保存できます。XY 位置を含めて保存する場合は Reference ROI を、ROI の形のみ保存する場合は ROI を選択します。</p> <p>Load：ファイルブラウザを開き、保存された ROI を呼び出せます。XY 位置を含めて呼び出す場合は Reference ROI を、ROI の形のみ呼び出す場合は ROI を選択します。Load ROI を選択した場合は ROI が画面中央に呼び出されます。</p>
Snapshot	Snapshot を撮りたい画像上で行くと、その画像の見える状態での Snapshot が作成されます。ROI、スケールバーなども含まれます。
Snapshot All	表示されているすべての Channel で、それらの画像の見える状態での Snapshot が作成されます。余白や ROI、スケールバーなども含まれます。
Properties	<p>選択ツールを選んだ状態で、ROI やスケールバー上で右クリックすると表示されます。</p> <p>General：サイズを数値指定できます</p> <p>Color：色を変更できます</p> <p>Font：フォントやサイズを変更できます</p>


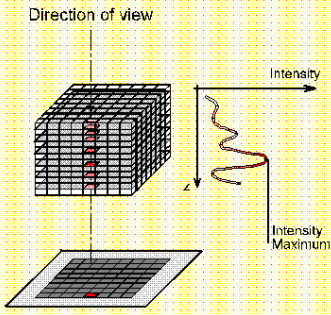

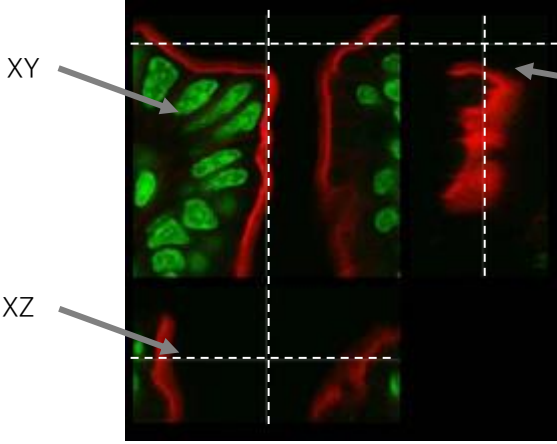





V-3. Viewer ボタン機能

(詳細は Advanced Manual 参照)

	画像上に図形や注釈を挿入できます
	ROI やスケールバーなどの選択ツール
	選択した ROI などを削除します
	クリックしたあと画像上で左クリック場所から話した場所までのスケールバーを作成します(単位は μm)。

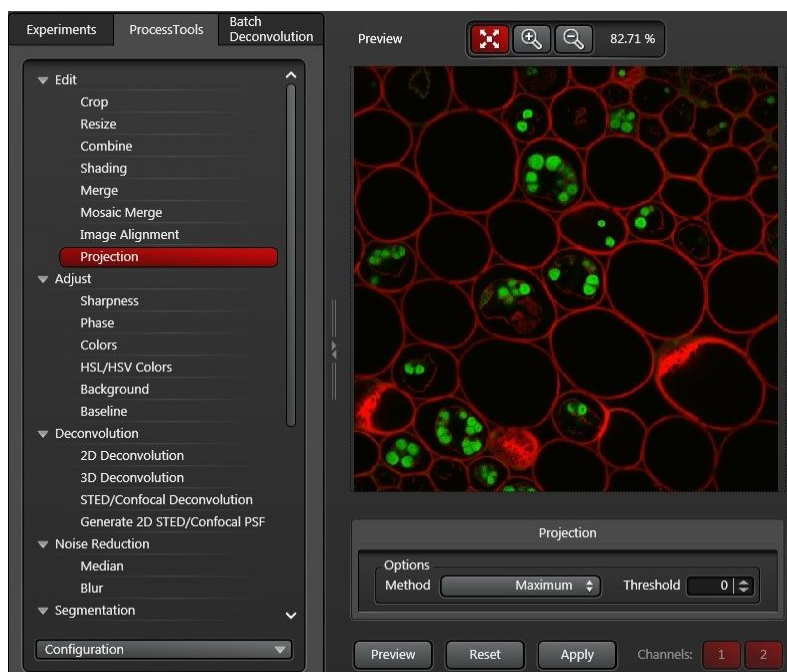
	<p>* TIFF などに任意のスケールバーを入れた状態で出力する場合、上記“Annotation”をクリックしてから作成してください。</p>  <p>選択ツールで選択後、右クリック“Properties”で表示される画面でサイズ、角度、色などを変更できます。</p> 
 151.95 %  100 %	<p>画像表示サイズ切替ボタン 最大画面表示(赤) Pixel 等倍表示(グレー)を切替えます</p>
	<p>Quick Look-up table ボタンをクリックすると、画像の表示色を変更することができます。</p> <p>Pseudo Color (デフォルト) → Grow Over/Under → Gray → Pseudo Color → . . .</p>  <p>Pseudo color (デフォルト)</p> <p>Grow Over/Under 青(サチュレーションまたは設定値以上の値) 緑(輝度値が0 または設定値以下の値)</p> <p>Gray Scale</p>
	<p>選択した Channel のみの表示 ↔ すべての Channel 表示切替ボタン 画像のダブルクリックでも同様の切替ができます</p>
	<p>重ね合わせ画像の表示/非表示切替ボタン</p>

	<p>Maximum projection</p> <p>XYZ 画像の Z 軸方向において最も高い輝度を採用し、XY 平面に表示します。</p> <p>Z-Stack 画像撮影時に表示されます。</p> <p>* このボタンで作製される画像は Preview 画像のため保存できません。</p> <p>* 保存する方法は次ページ参照</p>	
	<p>Orthogonal Sectioning</p> <p>XYZ 画像から、XY、XZ、YZ 断面画像を表示します。下図のように表示される十字線を動かすことで断面の位置を変えることができます。</p> <p>* このボタンで作製される画像は Preview 画像のため保存できません。</p> <p>* 保存するには右クリックで表示される Snapshot を使用してください。</p>	
	<p>3D Viewer(Optional)を開きます(Advance Manual 参照)。</p>	
	<p>各 Channel の右下に下図のような撮影情報ウインドウの表示非表示の切替えを行います。Setting 名、使用した検出器名、使用した色素名を表示します。また TauMode によっては蛍光寿命の値や設定した Gate の時間などを表示します。</p> <p>例：Setting の番号 検出器名 or gate or lifetime 色素名 Pseudo color</p> <p>Setting 3 HyDS 2 ALEXA 488 </p> <p>* Setting の番号表示は“Setting”部分をダブルクリックし、名前を入力すると、その名前で表示します。</p>	

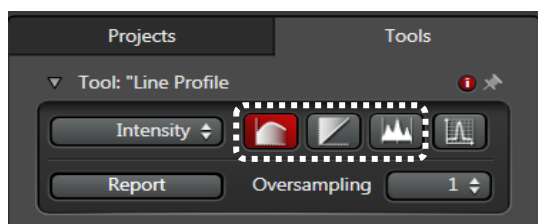
V-4. Maximum Projection 画像の作成方法



1. “Process”メニューを選択します。
2. “Open projects”から Maximum Projection を作成する画像を選択します。
3. ProcessTools 内の Edit/Projection を選択します。
4. 画面下にある“Apply”をクリックすると画像が作成されます。
作成された画像は Project 内に一時保存されます。






VI. Quantify

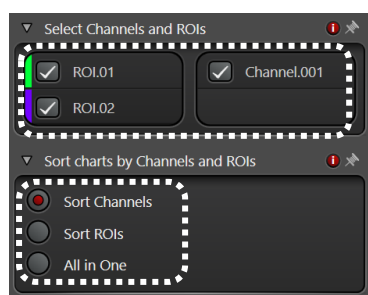


ROI 中の値をグラフで表示する“Graph”と表で表示する“Statistics”があります。

グラフや表の上で右クリックすると表示される画面から

画像や Excel を出力できます。

	Line Profile : 画像上に直線の ROI を作成し、その線上の値を表示します。
	Stack Profile : ROI 中の平均値を表示します。ROI を作成しない場合は画像全体の平均値になります。Z-Stack やタイムラプス画像に使用します。
	Histogram : ROI の輝度値のヒストグラムを作成します。



Select Channels and ROIs : Graph や Statistics で表示する ROI や Channels を選択できます。

ROI/Frame : Graph や Statistics 上で設定した ROI の数値データの表示非表示切替えができます。

Channel : 多色画像を撮影した場合、Graph や Statistics 上で数値データを表示する Channel の切替えができます。

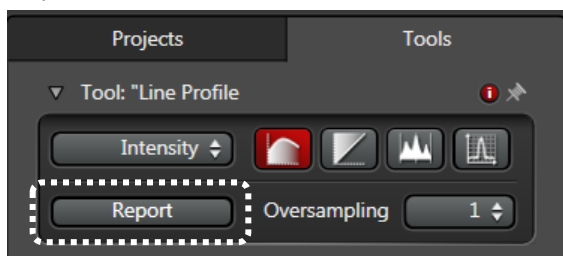
Sort charts by Channels and ROIs : 計測したデータを Graph や Statistics 上でどのように表示するか選択できます。

Sort Channels : Channel ごとにグラフや表を分けて表示します。

Sort ROIs : ROI ごとにグラフや表を分けて表示します。

All in One : すべてを 1 つのグラフや表に表示します。

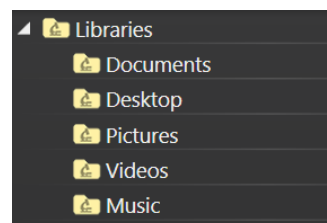
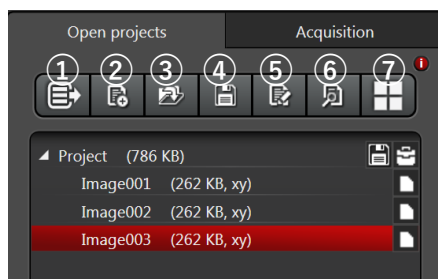
Report : 数値データを別のソフトで解析することが出来るように ROI やグラフ、表、さらには画像取得時の設定も合わせて出力されます。



VII. Data Handling

VII-1. Tool Bar

保存したデータを開いたものや撮影した画損の一時保存などすべての画像は“Open Projects”タブに Directory 構造で表示されます。



①“Work in Folders”：データの表示方法を左図のように保存先が分かる形で表示します。

- ②新規 Project を作成します。
- ③保存した lif ファイルを開きます。
- ④現在開いているすべての Project を保存します。
- ⑤選択した画像データを撮影したときの画像取得条件を呼び出します(14 ページ参照)。
- ⑥専用ファイルブラウザが開き、XYZT λ ファイルサイズ、保存場所などの条件で目的の画像を探ることができます。
- ⑦Project 内の画像をサムネイル表示します。

VII-2. Save data

保存したデータを開いたものや撮影した画損の一時保存などすべての画像は“Open Projects”タブに Directory 構造で表示されます。Project データを保存する場合、表示されている状態の Directory 構造で指定された場所に保存されます。

*ファイル形式は Leica オリジナルフォーマット lif です。


Project：撮影されたすべての画像を含むフォルダのようなもの。Project 名が lif ファイル名になります。


*Directory 内のすべての画像ファイルが1つの Project に保存されます。

Image series：XY などの Capture で撮影したデータ(Image)、XYZT など Start で撮影したデータ (Image Series)Directory 構造上 Project 下になります。

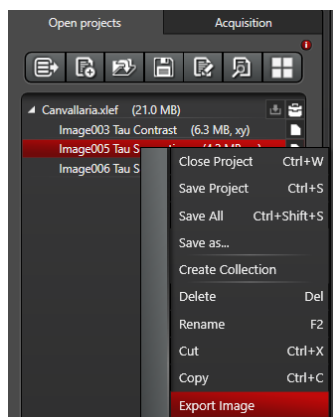
Metadata：データ保存時に lif ファイルとともに作成され、LUT 設定や ROI などの情報が含まれています。

撮影されたすべての画像は Project 内に一時保存されます。

保存されていない Project や保存したデータにおいて輝度調整などの操作を行った Project には  マークが表示されます。必要に応じて保存してください。

右クリックして表示される Save as や  をクリックするとファイルブラウザが開き保存先を指定するとデータを保存されます。

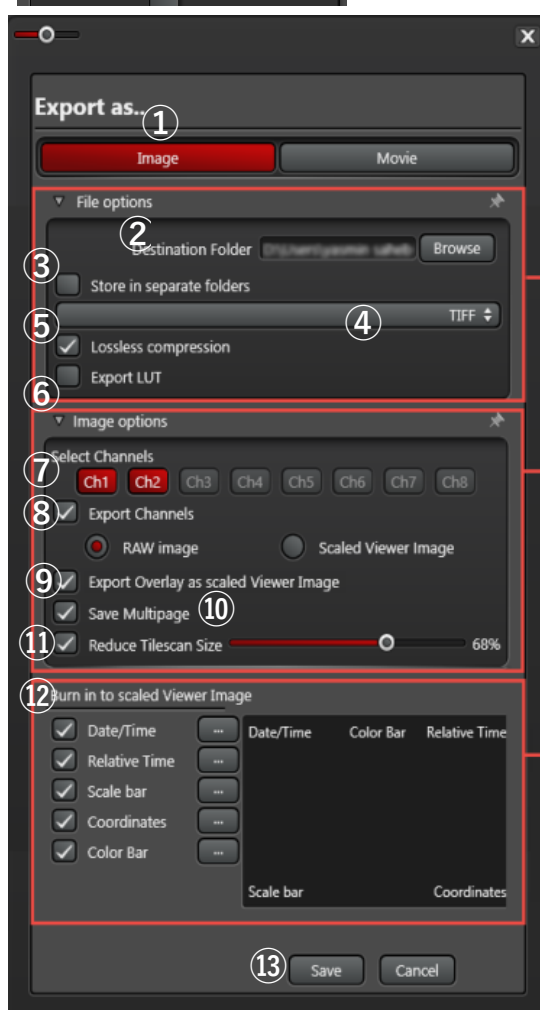
VII-3. Export image



Export したい画像を選択し、右クリックで表示される画面(左図参照)で“Export image”を選択すると下図が表示されます。

*XY(Z)T、XYZ など複数の画像を Auto Scale が ON になっている状態で出力すると、画像間の輝度値が異なります。

特に XY(Z)T など動画を出力する場合、画像のちらつきの原因となりますので、Auto Scale を OFF にしてから出力するのをお勧めします (19 ページ参照)。



- ① Image : 画像として Export、Movie 動画として Export
- ② Destination Folder : データの保存先を指定します。
- ③ Store in separate folders : 複数の画像データを選択している場合にのみ表示され、ON にすると画像毎に保存先のフォルダを自動的に分けます。
- ④ Select the export format : 保存形式の選択
Image : TIFF、ImageJ TIFF、JPEG、ASCII (画像の輝度値の出力)、BMP、PNG
Movie : Avi、QuickTime、MPEG-4、WMV
- ⑤ Lossless compression/Quality : 可逆圧縮(画質が低下しない方法)で行うかの選択
TIFF : 可逆圧縮(画質が低下しない方法)で行うかの選択
JPEG/Quicktime : 圧縮率を設定できます
- ⑥ Export LUT : color look-up table(LUT)を指定した保存先の Metadata フォルダへ出力します。
- ⑦ Select Channels : 多色撮影を行った場合、出力する Channel を選択します。赤 : 出力する、グレー出力しない。
- ⑧ Export Channels : ON になっていると、上記“Select Channels”で選択した Channel の単色画像を出力します。


Raw image : LUT で調整した(Viewer で表示されている)明るさではなく、フルスケール(8 Bit の場合 0-255 の範囲)で出力します(TIFF/ImageJ TIFF の場合選択可)。

Scaled Viewer Image : LUT で調整した(Viewer で表示されている)明るさで出力します(TIFF/ImageJ TIFF の場合選択可)。

⑨Export Overlay as scaled Viewer Image：多色画像の場合、上記“Select Channels”で選択した Channel の重ね合わせ画像を作成するか選択します。

⑩Save Multipage：XYZ や XY(Z)T などの画像を TIFF に出力する場合、マルチページ TIFF で出力するか選択します。例えば XYZ 画像の場合、OFF になっていると、各 Channel の XY 画像が Z 撮影枚数分出力されます。ON になっていると Z 情報が 1 つのファイルにまとめられるため、各 Channel の XY 画像が Channel 数だけ出力されます。ファイルブラウザのページ送り機能などで見ることはできません。

⑪Reduce Tilescan Size：ファイルサイズが大きくなりやすい TileScan 画像の場合、圧縮率(%)を指定することでファイルサイズを小さくすることができます。

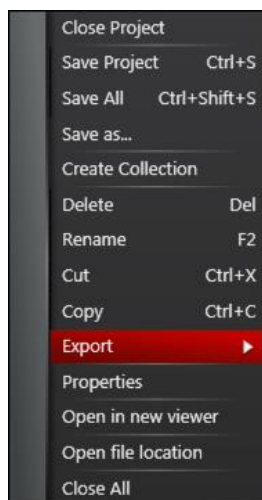
⑫Burn in to scaled Viewer Image：チェックボックスを ON にした情報を入れた状態で画像出力時を行います。チェックボックスを ON にすると右側に  が表示されます。これをクリックすると表示されるウインドウで詳細設定ができます。

*任意の位置やサイズのスケールバーを挿入する場合は 38、39 ページを参照。

⑬Save：指定した上記条件で出力を行います。

VII-4. Projects でのデータの取扱い

保存したデータを開いたものや撮影した画損の一時保存などすべての画像は“Open Projects”タブに



Directory 構造で表示されます。

Close Project：選択している Project を閉じます。

Save Project：選択している Project を保存します。

Save All：表示されているすべての Project を保存します。

Save as 選択している Project を別名で保存します。

Delete：選択されている Project を完全削除します。ゴミ箱にもありません。
*非表示ではありません。

Rename：選択している Project や画像ファイルの名前を変えます。

Cut：選択している画像を Cut します。

Copy：選択している画像を Copy します。

Paste：Cut または Copy した画像を Paste します。

Export：選択している画像を Export します(前ページ参照)。

Properties：画像撮影時の設定を表示します(14 ページ参照)

Open in new viewer：選択した画像を新規ウインドウで表示します。

Open file location：ファイルブラウザが開き、選択した画像の保存先を表示します。

Apply image settings：選択した画像の画像取得時の設定を適用します(14 ページ参照)。

Close All：すべての Project を閉じます。

VII-5. Free viewer software LAS X Small (Win10)

LAS X Small では画像表示、画像の Export、スケールバーの挿入、輝度測定などライセンスが必要な機能以外の操作が可能です。

“Leica LAS X Core”と検索し、出てくるライカのページ内の”Download free LAS X Core Offline version for Life Science”からダウンロードできます。


Downloads

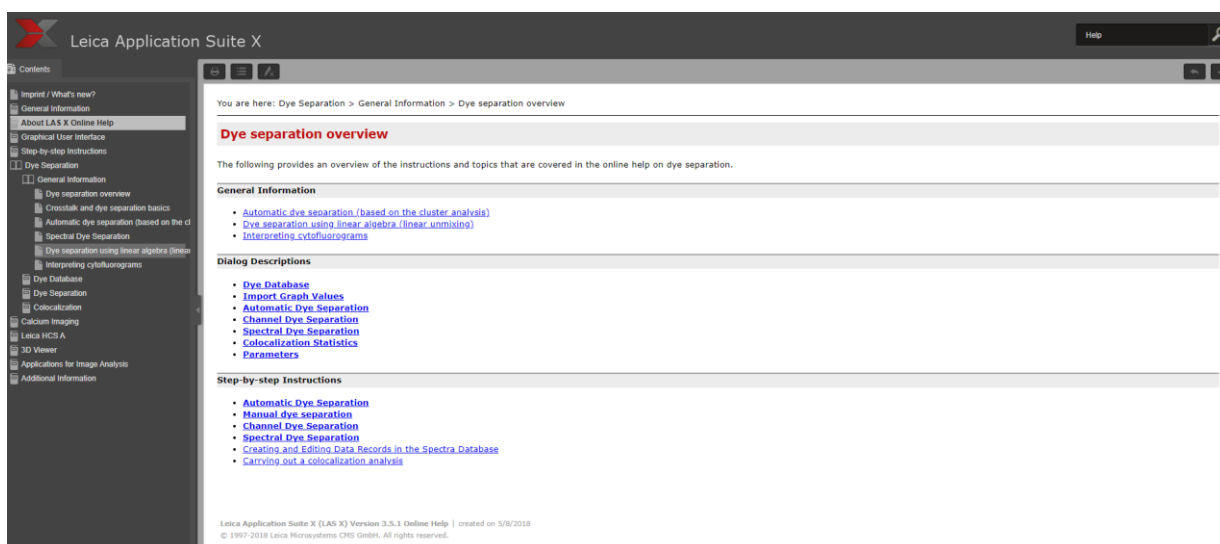
- [Download free LAS X Core Offline version for Life Science](#)
- [Download Leica LAS X Brochure \(English\)](#)
- [Download the LAS X Mobile Connection app free of charge](#)

* ImageJ、Fiji や Imaris でも lif ファイルを開くことができます。

* ImageJ の場合、plug-in “Bio-Format”が必要です。

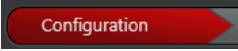
VIII. Online Help

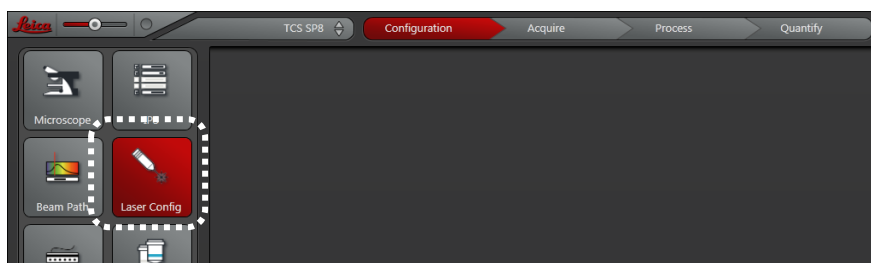
 をクリックすると下図のようにブラウザが開き、該当項目の Online Help が表示されます。



IX. Shut down

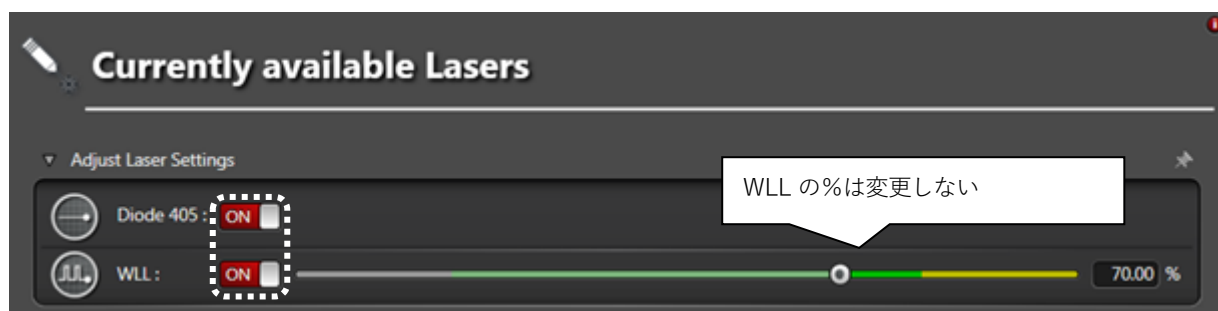
1. レーザーを OFF にします

 Configuration メニューを開き、Laser Config を選択します。



ON になっているすべてのレーザーを OFF にします。

* WLL の出力%は変更せずに OFF にします



2. LAS X を閉じます

3. 目視観察用水銀光源の電源を切る

* 水銀光源の場合、目視観察にしか使用しないので、使用しなくなったときに切ります。

* 水銀光源の電源を落とした後、再度電源を入れる場合は水銀光源が冷えるまで 15-20 分時間を置く。

* LED 光源の場合、電源が自動で切れるのでスキップ



5. キースイッチを反時計回りに 90 度回す

6. レーザーの電源を切る

7. 主電源を切る



液浸レンズのクリーニング方法

使用後は必ずすぐにクリーニングしてください

キムワイブは使わないでください

オイルレンズの場合

1. クリーニングペーパーや綿棒でオイルを取り除きます
2. 100% Ethanol などのクリーニング液をクリーニングペーパーや綿棒にとり、残っているオイルを取り除きます
3. オイルが完全に取り除けるまで新しいクリーニングペーパーや綿棒を使用して 2 を繰り返します。

水浸レンズの場合

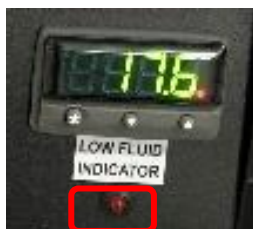
1. クリーニングペーパーや綿棒で水を取り除きます
2. 100% Ethanol などのクリーニング液をクリーニングペーパーや綿棒にとり、残っている水を取り除きます
3. 水が完全に取り除けるまで新しいクリーニングペーパーや綿棒を使用して 2 を繰り返します。

グリセリン浸レンズの場合

1. クリーニングペーパーや綿棒でグリセリンを取り除きます
2. 100% Ethanol や水などのクリーニング液をクリーニングペーパーや綿棒にとり、残っているグリセリンを取り除きます
3. グリセリンが完全に取り除けるまで新しいクリーニングペーパーや綿棒を使用して 2 を繰り返します。

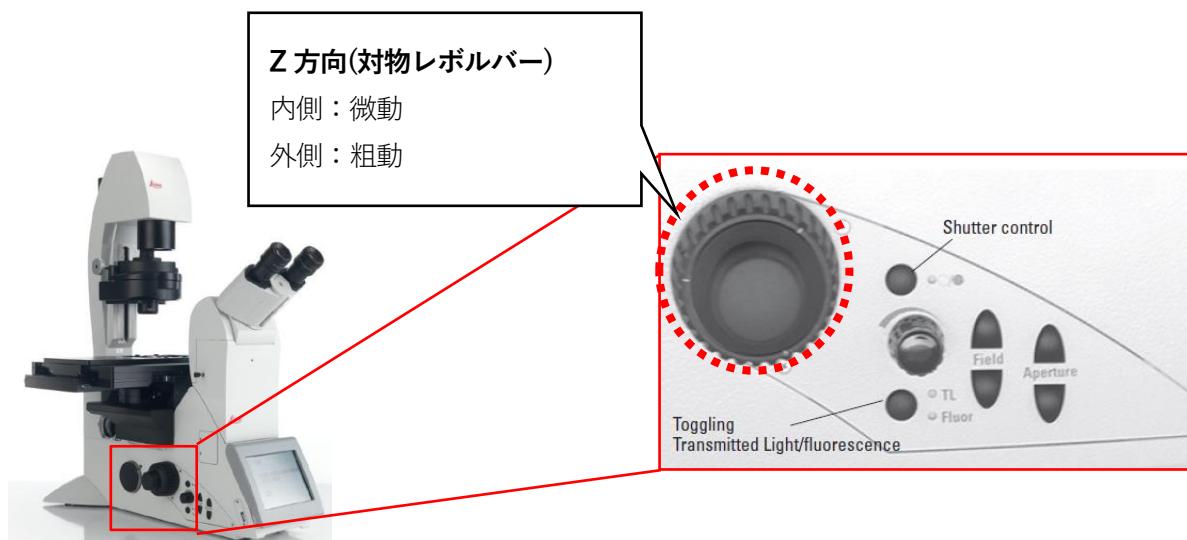
チラーの冷却水の水位について

チラーの“LOW FLUID INDICATOR”ランプが ON になっている場合、下記溶液を足してください

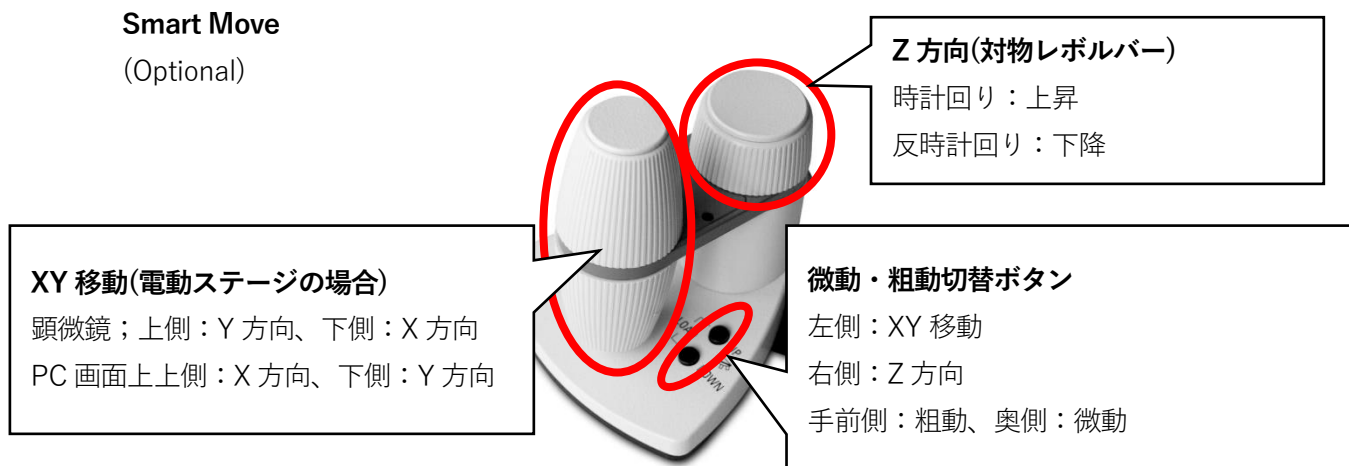


X. 倒立顕微鏡 DMI8 の使用方法

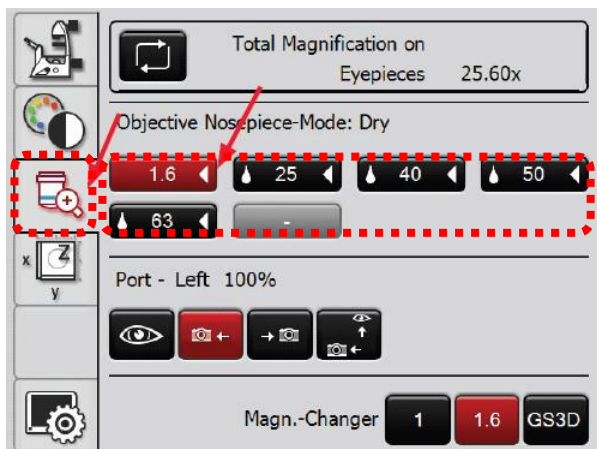
X-1. XYZ 方向の操作





Smart Move (Optional)



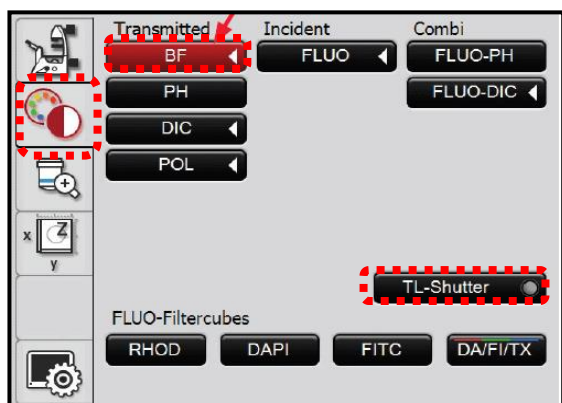
X-2. 対物レンズ切替




①  をタッチすると左図に切り替わります。使用できるすべての対物レンズが表示されます。液浸レンズは  のように数字の左にドロップマークが表示されます。現在選択されている対物レンズは赤く表示されます。

② 任意の対物レンズをタッチすると自動的に切り替わります。異なる液浸レンズを指定すると選択した対物レンズが点滅し、再度タッチすると自動的に切り替わります。

X-3. 透過光観察方法



①  をタッチすると左図に切り替わります。

② BF (Bright Field) をタッチします。

③ “TL-Shutter” をタッチすると透過光のシャッターの開閉を制御できます。

* シャッターの制御は顕微鏡の左側面からでもできます(下図参照)。

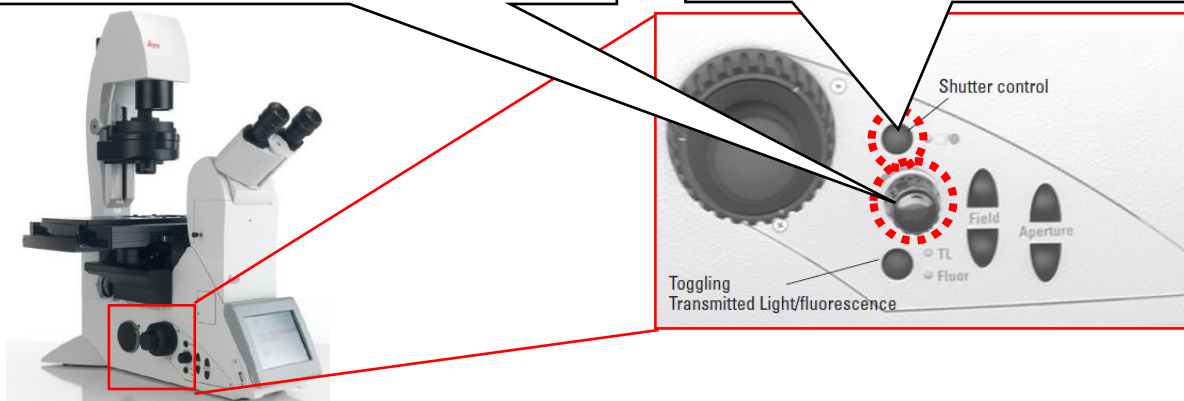
④ 透過光の光量は顕微鏡の左側面のノブ(下図参照)または FIM(次ページ参照)で行います。

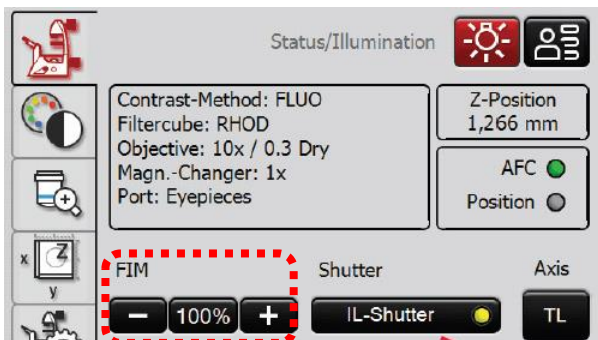
光量の調整

TL (Transmitted Light) と FLUO (Fluorescence) で共通

シャッターの制御

TL (Transmitted Light) と FLUO (Fluorescence) で共通





光量の調整はタッチパネル上でもできます。

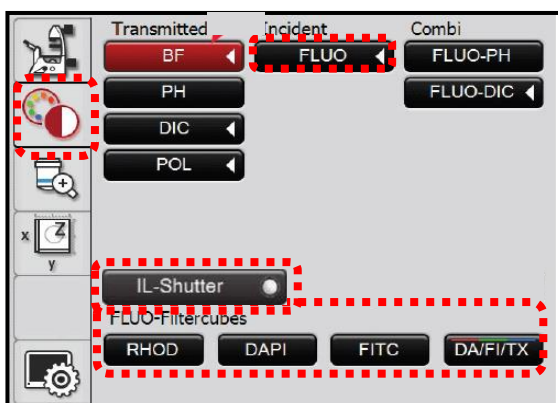


をタッチすると左図に切替ります。

赤点線内の FIM から確認・調整できます。

* 光量は 10、17、30、55、100% の 5 段階です

X-4. 蛍光観察方法(目視観察用)



① をタッチすると左図に切り替わります。

② “FLUO” をタッチします

③ 使用できるすべてのフィルターが表示されます

④ “IL-Shutter” をタッチすると LED または水銀光源のシャッターの開閉を制御できます。

⑤ LED または水銀光源の光量調整は透過光と同じく、顕微鏡の左側面のノブ(前ページ参照)または FIM(上記参照)で行います。

Specification

Filter Name	Fluorescence	Ex. Range	Ex. Filter	Dichroic	Em. Filter
DAPI	DAPI	UV	BP 350/50	400	BP 460/50
FITC	FITC	Blue	BP 480/40	505	BP 527/30
FITC LP	FITC	Blue	BP 470/40	510	LP 515
RHOD	Rhodamine	Green	BP 515-560	580	LP 590

*BP: Band-Path, LP: Long-Path



ライカ マイクロシステムズ 株式会社

本社 〒169-0075 東京都新宿区高田馬場1-29-9
Tel.03-6758-5640 Fax.03-5155-4336

大阪セールスオフィス 〒531-0072 大阪府大阪市北区豊崎5-4-9 商業第2ビル
Tel.06-6374-9771 Fax.06-6374-9772

名古屋セールスオフィス 〒460-0003 愛知県名古屋市中区錦2-15-20 三永伏見ビル2F
Tel.052-222-3939 Fax.052-222-3784

福岡セールスオフィス 〒812-0025 福岡県福岡市博多区店屋町8-30 博多フコク生命ビル12F
Tel.092-282-9771 Fax.092-282-9772

●<http://www.leica-microsystems.co.jp> E-mail: lmc@leica-microsystems.co.jp

※この製品のデザインおよび仕様は改良などのために予告なく変更する場合があります