

立ち上げの手順

< 電源の操作 1 >

1. ①のメインスイッチを入れる fig.1



← fig.1

2. ②の電源キー(鍵)が水平になっているか確認する (常に水平=ON の状態) fig.2



← fig.2

3. ③のサブスイッチを2つとも ON にする fig.1
4. ④-1 のレーザー発振装置を ON にす fig.3
5. ④-2 のレーザー発振キーを右に回す fig.3



← fig.3

6. レーザーのウォーミングアップのため 5 分程度待つ ※待ち時間で次 (7 以降) の操作に進みます
7. ⑤の蛍光ランプ(テーブルの下)のスイッチを入れる fig. 4



※蛍光ランプには自動調整機構がついています。電源投入後 5 分程度は蛍光が安定しません。

レンズを覗くと蛍光が強弱を繰り返すのが見える場合があります。

1~2 分程度で終了するのでお待ちください。

← fig.4

< PC とソフトウェアの操作 > ※ レーザーのウォーミングアップの待ち時間の間に PC・撮影用ソフトウェアを起動します

8. [6]のコンピューターの電源を入れる (電源ボタンはキーボードにあります) fig. 5
9. 「LSM ユーザー」のアイコンをクリックする (パスワードはありません)
10. 「ZEN2009」のアイコンをクリックし、撮影用ソフトウェアを起動する
11. 「Start System」をクリックするとソフトウェアが撮影モードで起動する

←fig.5



< 電源の操作 2 >

12. 5.の操作から 5 分程度経過したら [4]-3 のスイッチを入れる
13. [4]-4 のレーザー出力つまみを赤いランプが点灯しない程度までゆっくり右に回し、レーザーの出力を上げる (緑のランプが点灯した状態にする)

Fig. 6→



終了の手順

1. 「ZEN2009」のウィンドウを閉じて終了する (またはメニューの File→Exit)
2. オイルを使用した場合 (x40、x63、x100 のレンズ) はレンズの清掃を行う → 清掃後、x10 のレンズに戻しておく
※清掃方法 レンズペーパーでオイルを吸い取った後、レンズクリーナーで湿らせた綿棒でレンズの奥から手前にさっと一拭きする。
綿棒のきれいな面で同様にもう一拭きする。
3. コンピューターをシャットダウンする
4. [5]の蛍光灯の目盛りを確認し、値を使用記録簿に記入してからスイッチを切る
※メモリを確認せずにスイッチを切ってしまった場合も、改めてスイッチを入れて値の確認をしないでください。ランプの寿命が短くなってしまいます。
値を確認できなかった旨を使用記録簿に記入してください。(利用料金などには影響しません)
5. [4]-4 のレーザー出力つまみを左に回し出力を下げる
6. [4]-3 のスイッチを切る
7. [4]-2 のレーザー発振キーを左に回し、レーザーの発振を止める
8. レーザーボックスのファンが止まるまで 5 分程度待つ
9. [4]-1 のレーザー発振装置を OFF にする
10. [3]のサブスイッチを 2 つとも OFF にする
11. [2]の電源キー(鍵)が水平のままになっているか確認する (常に水平=ON の状態)
12. [1]のメインスイッチを切る
13. 顕微鏡に青いカバーをかける

※使用したオイルなどはプラスチックの箱に戻しておく。テーブルにオイルが垂れていたら拭いておく。

<重要> レーザー及び蛍光灯の再点灯は、少なくとも 15 分以上間を開けてから行ってください

■次に利用する人が待っている場合などは、システムは立ち上げたままにし、次の利用者は続けてそのまま利用してください

基本操作

※この装置には x10、x20、x40、x63、x100 のレンズが取り付けられています (x40、x63、x100 は油浸レンズ)

< 1 蛍光ランプ(接眼)での確認 >

<PC>…コンピュータ画面での操作 <タッチパネル>…TFT タッチパネルでの操作

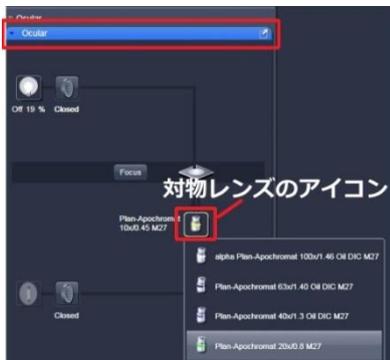


TFT タッチパネルは顕微鏡の隣にあります

1. <タッチパネル> 「Lord Position」ボタンを押す ⇒ 顕微鏡の対物レンズが下降します
2. サンプルを顕微鏡のステージにセットする ※プレパレートはカバーガラスを下にしてセットする
3. <PC> 左上の「Ocular」タブをクリックする
4. <PC> 「Ocular」タブの下の「Online」ボタンをクリックする ⇒ PCと顕微鏡操作装置がつながり、接眼の状態で見えます



5. <PC> 「Ocular」タブ左側の真ん中あたりにある対物レンズのアイコンをクリックする ⇒ レンズ選択ウィンドウが開きます



6. <PC> 対物レンズの倍率を 10 倍に変更する ⇒ 鏡筒が回転し対物レンズが 10 倍に変更されます

※違う倍率で観察したい場合でも、まず 10 倍のレンズで焦点を合わせます

7. <タッチパネル>  ボタンを押す ⇒ 対物レンズが上昇します

8. <PC> 「Ocular」タブ内の「Fluorescence」右にある「Shutter On」ボタンを押す

⇒ 蛍光ランプの光が顕微鏡内に導入されて対物レンズから出ます



9. <PC> 「Ocular」タブ内の「Configuration」横のボタンから、使用している蛍光色素に対応したフィルターを選択する



10. 接眼レンズを覗きサンプルに焦点を合わせる ※必要ならばフィルターを他の蛍光色素用に変更しサンプルが染まっているかどうかを確認する



<注意> 長時間蛍光ランプの光をサンプルに当て続けると蛍光が退色してしまいます

11. <PC> 「Ocular」タブ内の「Shutter Off」ボタンを押す ⇒ サンプル面への光が遮られます



12. 違う倍率のレンズを使用する場合は、それぞれの倍率で同じように焦点を合わせる

油浸レンズ(40倍、63倍、100倍)を使用する場合 例・・・40倍のレンズを使用する場合

- 「Ocular」タブ左側の真ん中あたりにある対物レンズのアイコンをクリックする
- 40倍ではなく20倍のレンズを選択する(40倍の隣に配置されているレンズです) ⇒ 対物レンズが回転します
- サンプルの真下には20倍のレンズが来ているので、その隣の40倍のレンズにオイルを少量つけます



- オイルをつけたら対物レンズアイコンの中から40倍のレンズを選択し、TFTタッチパネルで「DONE」をタッチします
※油浸レンズを選択すると、TFTパネルにオイルをつけるよう指示が出ます。オイルを付け終わったら「DONE」をタッチしてください



- 焦点を再び調整します
-

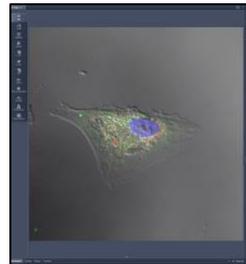
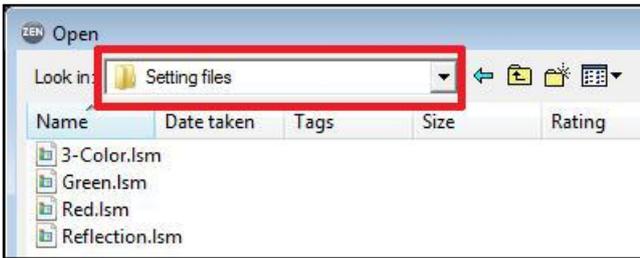
< 2 共焦点画像の取得 > ※すべて<PC>での作業です

1. 「Shutter Off」ボタンを確認する
2. 「Acquisition」タブをクリックする ⇒ 光路が画像取得モードに切り替わる



画像の取得設定ファイル(Setting File)を利用して設定を読み込みます

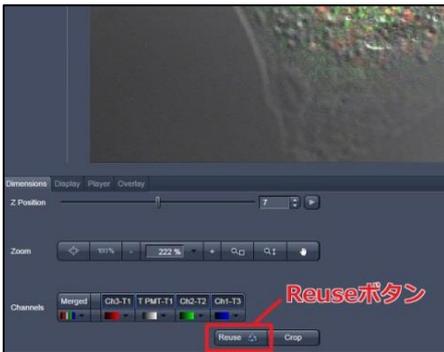
3. メニューの「File」⇒ 自分の研究室のフォルダ内にある「Setting File」を選択し開く ⇒ 設定ファイルの画像が開かれます
※「Setting File」はゲノム研究分野でご用意します。初回利用時は担当スタッフまで事前にご連絡ください。



↑ 「Setting File」からファイルを選択して開く

↑ 取得設定ファイルの画像(3-Color.lsm の場合)

4. 開かれた取得設定ファイル画像の左下にある「Reuse」ボタンをクリックする ⇒ 明るさや画質等の設定が読み込まれます



← Reuse ボタンで既に取得された画像の撮影条件を現在の撮影条件として呼び出します

これで蛍光観察・透過光観察時に使用する設定が読み込まれました。以下再び先ほど接眼で焦点を合わせたサンプルに戻ります

5. それぞれの色素に対応したチャンネル(緑・青・赤 及び 透過光)の画像取得条件の調整をする

①画面左側 「Imaging Setup」ツール内の「Track 1~3」で色の設定を確認します



Reuse ボタンを利用した場合は自動的に対応する色にチェックが入ります

※手動で設定する場合は使用する色素に対応するものの中から選択してください

②「Continuous」ボタンを押す ⇒ 先ほど肉眼で確認したサンプルのスキャンが開始

され、画面に画像が現れます



※「Continuous」ボタンを押しても画像が出てこない場合

- 対処方法 1. 「Imaging Setup」ツール内の「Track 1~3」のすべてにチェックを入れて「Continuous」ボタンを押す
- 対処方法 2. 次項③以降で説明している Gain(Master)のパラメーターを上げて感度を調整する

③各色の感度の調整をする

例・・・緑色 (FITC) の調整をする場合 (赤、青を調整する場合もそれぞれ対応する色で同様に操作してください)

①画像左の「Channels」ツール内の Track1 にチェックを入れ、「FITC」と書かれている部分をクリックして選択する



②画像下の「Channels」内の「Ch2-T2」の文字をクリックして選択する

③「Ch2-T2」の下の緑色のアイコンをクリックし、グレー(透視状態)にする



←「Ch2-T2」の文字と緑色のアイコンをクリックした状態

④画像の左にある「Channels」ツール内の「Gain (Master)」のスライダを動かして感度を調整する

分が色部表示さ

※画像 over exposure(感度が under exposure(低すぎ) 赤色 れるかされないか 度よい感度です。

画像の中の赤色部分が多い場合は Gain(Master)のスライダーで調整する

Ch2-T2(緑色)を選択し 緑色をクリックして透過にした状態

の中の赤色部 高すぎる)、青 (る)を示してい がら

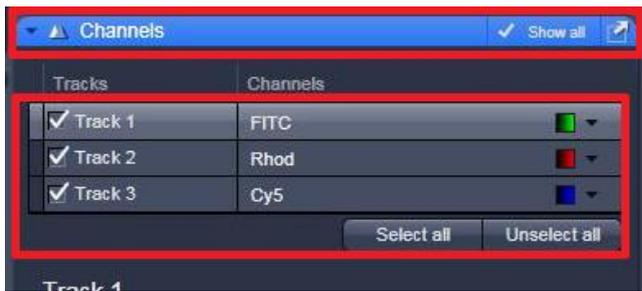
⑤「Channels」ツールのチェックボックスを各色切り替えてそれぞれ感度を調整する

※デジタルオフセットは基本的に0でよいですが、バックグラウンドが高いと感じる場合は0から-10くらいまでの間で調整します。

あまり下げすぎるとコントラストが不自然に強くなってしまふので下げすぎないようにします。

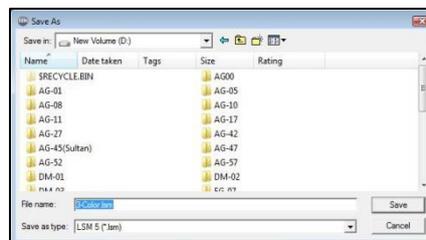
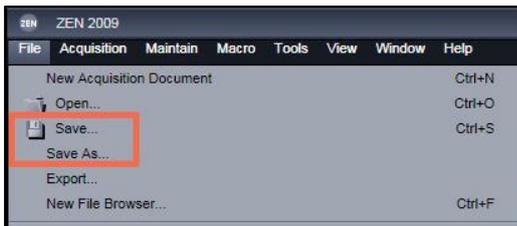
透過光に関してのみデジタルオフセットをさらに下げた方が対象物がきちんと見える場合があります。

④すべての色について感度調整を行ったら、「Channels」ツールのチェックボックスを(使用した色について)すべて選択する



⑤「Snap」ボタンを押して画像を撮影し、保存する

※保存せずに新たに画像を表示すると上書きされます



Save または Save As を選択し

⇒

自分の研究室のフォルダに保

存

・通常は LSM5(*.lsm) 形式で保存します。LSM 形式では、取得した際の諸条件を保持したまま画像を保存できます。

・ご自分の研究室で画像を解析する場合は、Carl Zeiss 社ホームページから画像閲覧ソフト「ZEN Light Edition」(無料)をダウンロードしてご利用ください。(Windows版のみ)

・.lsmファイルに対応した画像処理ソフト「ImageJ」(無料)は <http://imagej.nih.gov/ij/> からダウンロードしてご利用ください。

⑥ 次の画像を取得する場合は「New」をクリックし、新規ウィンドウを作成してからスキャンする



< 3 共焦点画像の取得・Zスタック画像(3D)の場合 >

1. 画面左側・ツールエリア内の「Z-Stack」にチェックを入れる



2. 読み込んで調整したサンプル画像の左にある「Z-Stack」ツール内の「First/Last」タブを選択する



3. 撮りたいサンプルのZ軸の始点と終点を登録する

①「Live」をクリックし、連続スキャンの状態にする



② 顕微鏡本体右側面のフォーカスプを回し、撮りたいエリアがフォーカスアウトする位置までフォーカスを下げる
(または撮りたい個所のZ軸の一番下まで下げる)

③「Set First」をクリックし、Zスタックの開始面を登録する



④顕微鏡本体右側面のフォーカスノブを先程と逆方向に回し、撮景したいエリアがフォーカスアウトする位置までフォーカスを上げる
(または撮景したい個所のZ軸の一番上まで上げる)

⑤「Set Last」をクリックし、Zスタックの終了面を登録する（下から上に向かってスキャンします）

⑥「Stop」を押してスキャンを停止する

⑦「Optimal」ボタンをクリックし、Zスタックのフォーカスインターバルを決定する

⑧画面左側・ツールエリア内の「Start Experiment」をクリックしてZスタックの取得を行う