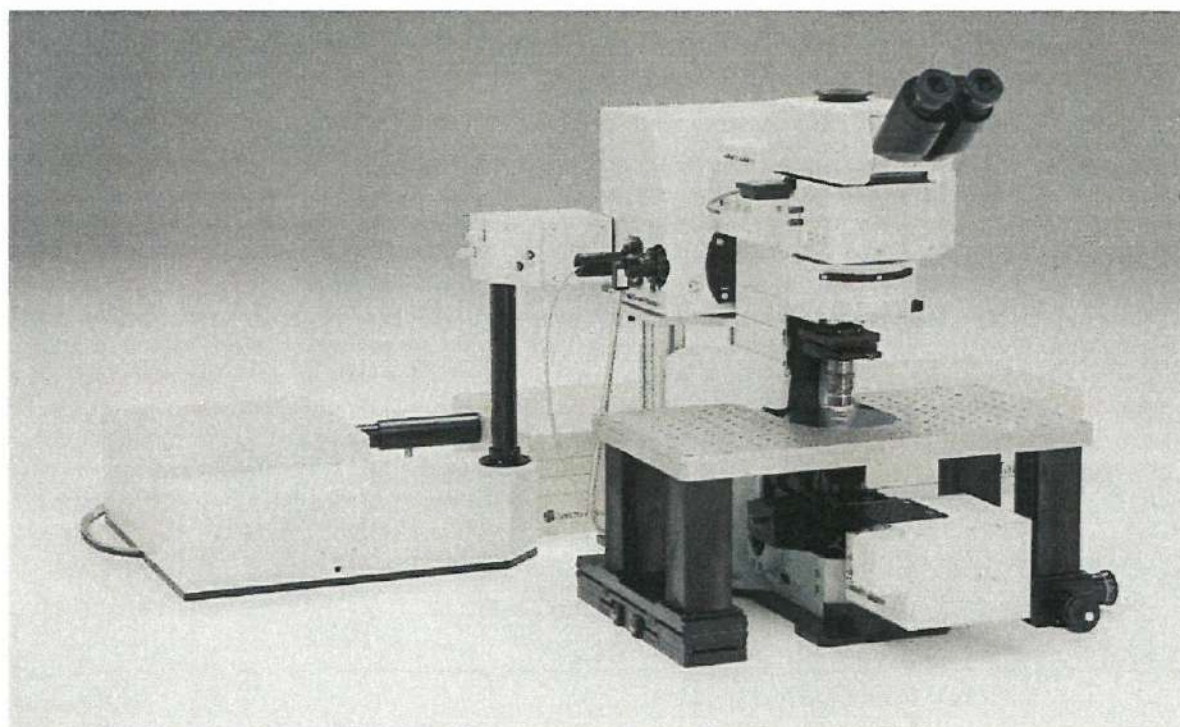


**OLYMPUS**<sup>®</sup>

多光子励起レーザー走査型顕微鏡  
**FLUOVIEW FV1000MPE**

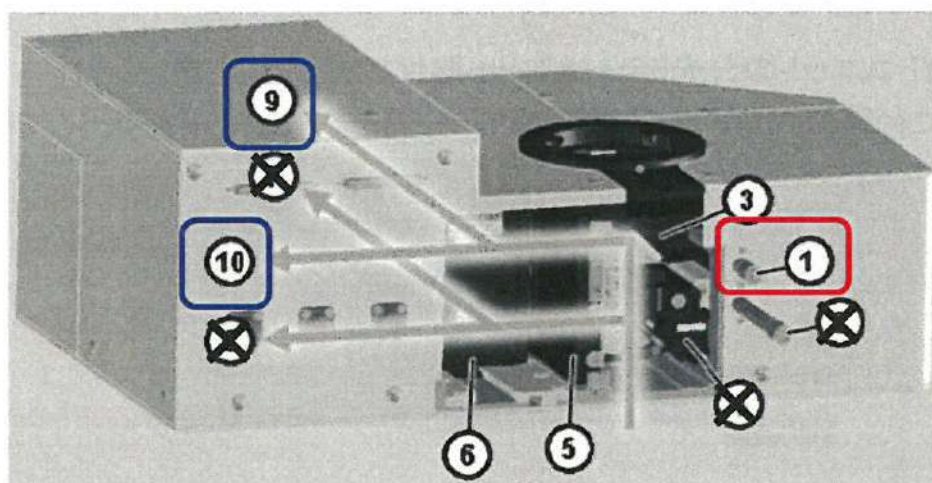
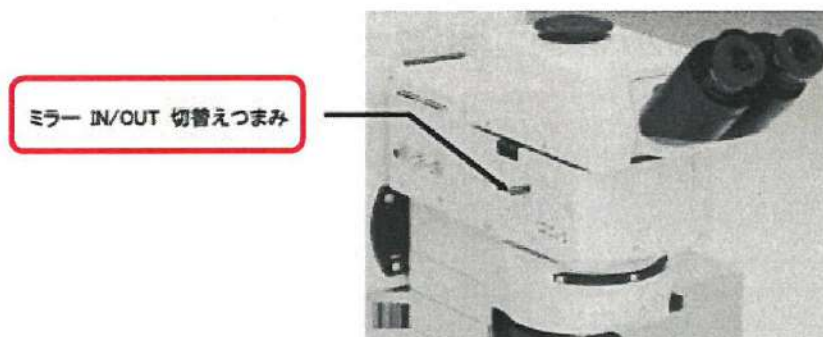
— Bシステム —  
(正立顕微鏡 BX61WI)

簡易取扱説明書



# システム起動前の準備

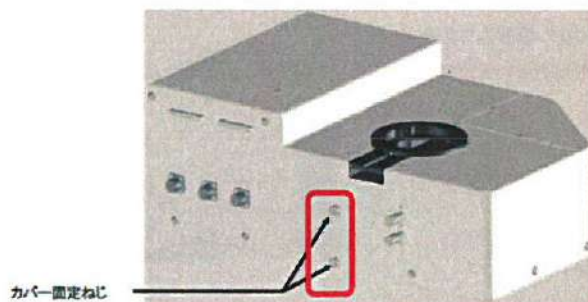
## 外部PMTユニット BXD(2Ch仕様)の概要



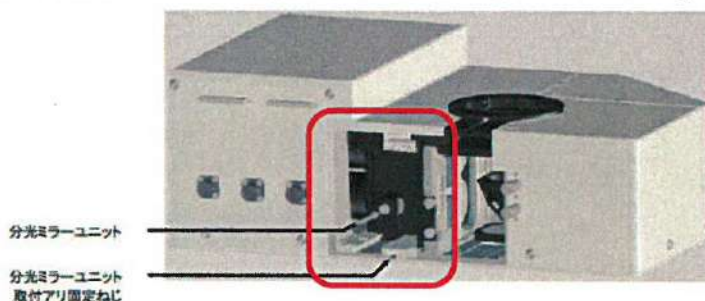
	4チャンネル用 (FV10MP-BXD4CH)	2チャンネル用 (FV10MP-BXD2CH)
①	ミラー IN/OUT 切替つまみ	ミラー IN/OUT 切替つまみ
②	分光 DM IN/OUT 切替つまみ	(なし)
③	100%反射ミラー	100%反射ミラー
④	分光 DM	(なし)
⑤	IR カットフィルタ	IR カットフィルタ
⑥	分光ミラーユニット	分光ミラーユニット
⑦	PMT チャンネル 1 [RXD1]	(なし)
⑧	PMT チャンネル 2 [RXD2]	(なし)
⑨	PMT チャンネル 3 [RXD3]	PMT チャンネル 1 [RXD1]
⑩	PMT チャンネル 4 [RXD4]	PMT チャンネル 2 [RXD2]

## 外部PMTユニット BXD (2Ch仕様) 分光ミラーユニットの交換方法

1. 外部PMT ユニットのカバー固定ねじ(2カ所)を緩めて、カバーを取外します。



2. 外部PMT ユニットの分光ミラーユニット取付アリ固定ねじを、顕微鏡に付属の六角ドライバで緩めて、分光ミラーユニットを引出して取外します。



3. 交換する場合は、分光ミラーユニットの取付アリを、外部PMT ユニットの取付口に挿入し、突当たるまで確実に押込みます。分光ミラーユニット取付アリ固定ねじを顕微鏡に付属の六角ドライバで締付けて固定します。

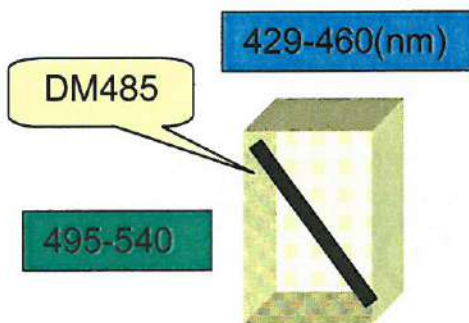


4. カバーを元に戻し、カバー固定ねじを締付けて固定します。

# 落射型蛍光検出器(2CH)のフィルタワーク

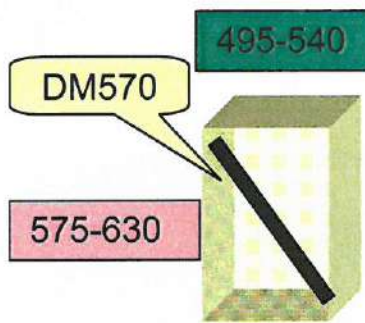
## 蛍光ミラーキューブの種類

### ◆ FV10-MRV/G



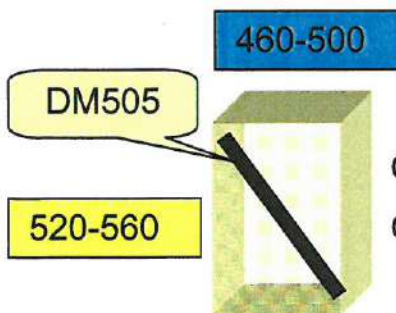
CH1でバイオレット  
(例 BFP)  
CH2でグリーン  
(例 EGFP)

### ◆ FV10-MRG/R

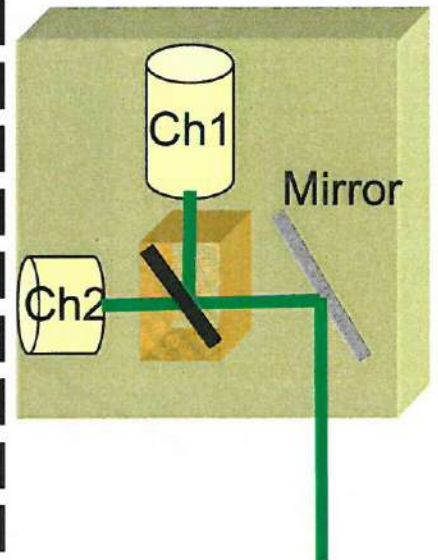


CH1でグリーン  
(例 EGFP)  
CH2でレッド  
(例 DsRed)

### ◆ FV10-MRC/Y

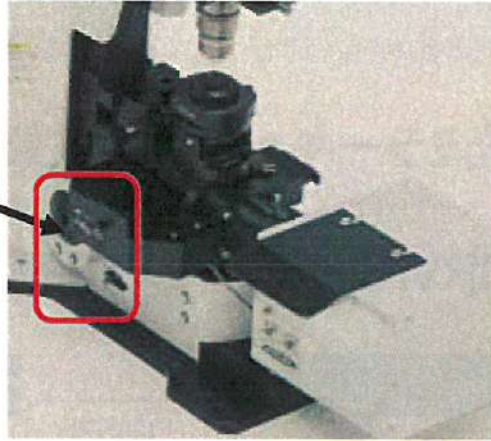


CH1でシアン (例 CFP)  
CH2でイエロー (例 EYFP)

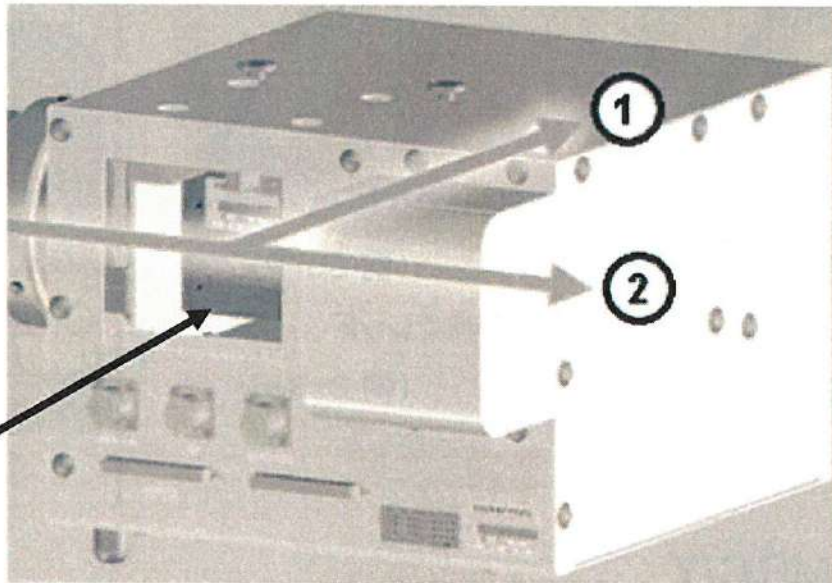


## 透過外部PMTユニット BXTDの概要

光路切替えつまみ  
(透過照明／透過外部PMT)



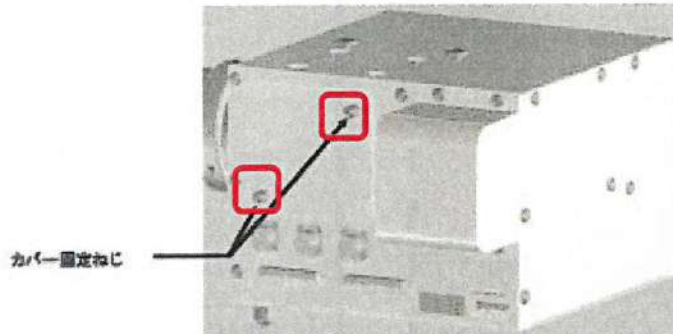
蛍光キューブ



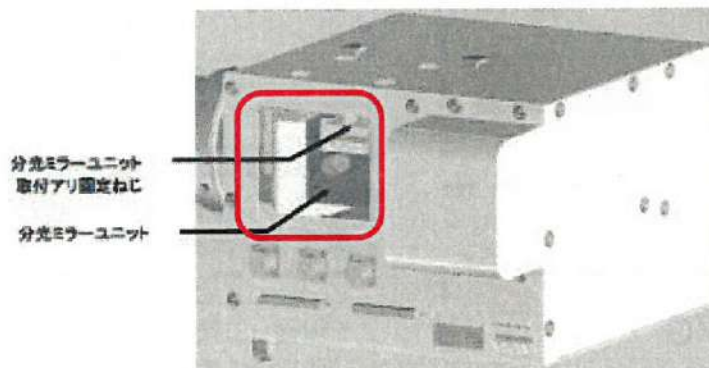
- ① PMTチャンネル1 [TXD1]
- ② PMTチャンネル2 [TXD2]

## 透過外部PMTユニット BXTD分光ミラーユニットの交換方法

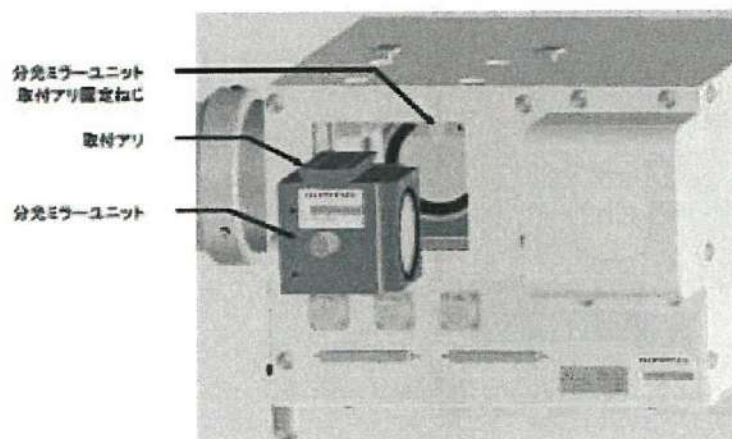
1. 外部PMT ユニットのカバー固定ねじ(2カ所)を緩めて、カバーを取外します。



2. 外部PMT ユニットの分光ミラーユニット取付アリ固定ねじを、顕微鏡に付属の六角ドライバで緩めて、分光ミラーユニットを引出して取外します。



3. 交換する場合は、分光ミラーユニットの取付アリを、外部PMT ユニットの取付口に挿入し、突当るまで確実に押し込みます。分光ミラーユニット取付アリ固定ねじを顕微鏡に付属の六角ドライバで締付けて固定します。



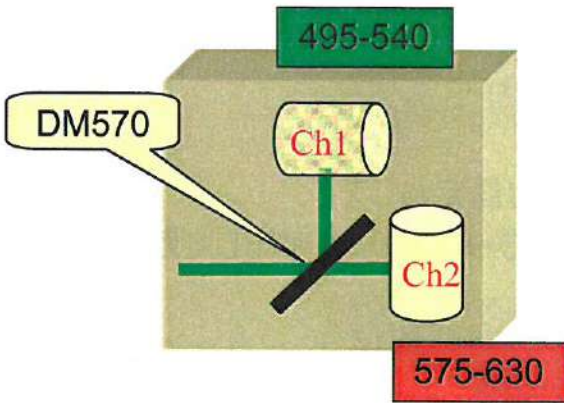
- 7 4. カバーを元に戻し、カバー固定ねじを締付けて固定します。

## 透過外部PMTユニット(2CH)のフィルタワーク

### FV10-MTG/R

TXD1: 緑(例 GFP)

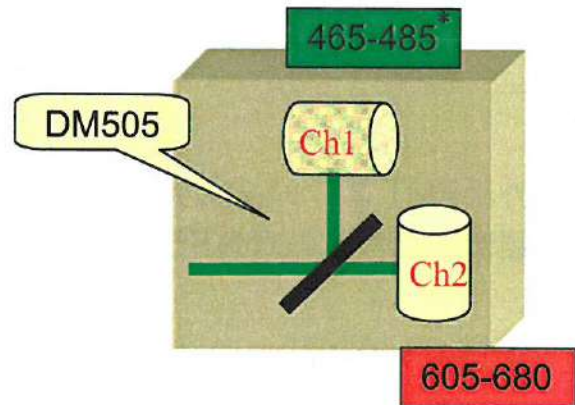
TXD2: 赤(例 DsRed)



### FV10-M475/IR

TXD1: SHG(950nm励起)

TXD2: 赤

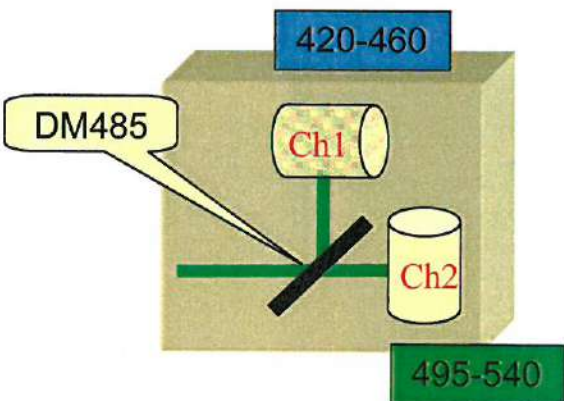


\* SHG(光二次高調波発生)検出用バンドパスフィルタ。SHG光(475nm)は、950nm励起光で発生させます。

### FV10-MTV/G

TXD1: 青(例 DAPI)

TXD2: 緑(例 GFP)



\* 別途、SHG光(425nm)検出用バンドパスフィルタも用意しました。850nmの励起光で発生させます。

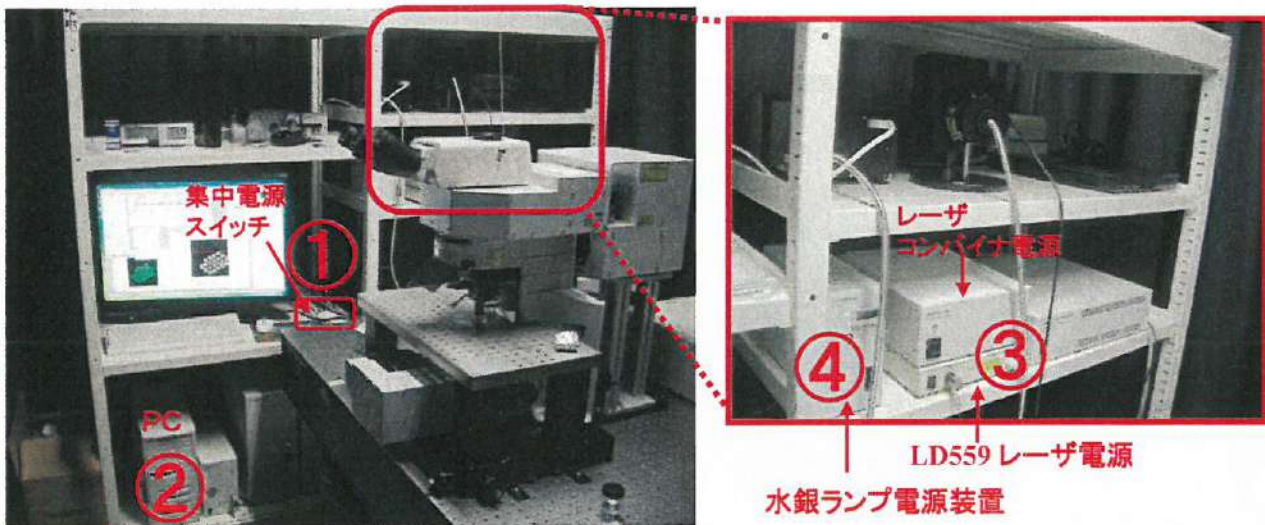


# システムの起動

## Bシステム全体写真（主なユニットの配置例）



# システムの立ち上げ



1. 集中電源スイッチをONにします。

2. コンピュータをONにします。

3. 使用するレーザを立ち上げます。

\* (ダイオードレーザの405/473/635nmは、集中電源スイッチと同期して立ち上がります。)

\* LD559の立ち上げ方

3-1 電源BOXの主電源をONにします。

緑色のPLランプが点灯し、同じく緑色のTEMPランプが点滅します。

3-2 PLランプ点灯後、KeyスイッチをONにします。

赤色のLASERランプが点滅します。

レーザが安定する(赤点滅から点灯)まで暫く時間がかかります。

点灯後、レーザを使用することができます。

\* 2光子励起を観察する場合

Mai Tai HP Deep See(690~1040nm) は、ソフトウェアから立ち上げます。

(次々頁を参照)

## システムの立ち上げ

4



4. 水銀ランプ電源をONにします。

\* 直前に装置を使われている方がいる場合には、20-30分程度の間隔を置き、ランプが冷却してから立ち上げてください。

5. ディスプレイに表示されている Windows VISTA の Log on 画面で ユーザー名・パスワードを入力し、Log on します。

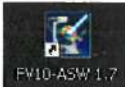
ユーザー名: fluoview

パスワード: fluoview

\* ウイルス対策ソフトをインストールされている場合は、対策ソフトの起動を停止し、またLANケーブルが接続されている場合はケーブルを外します。

6



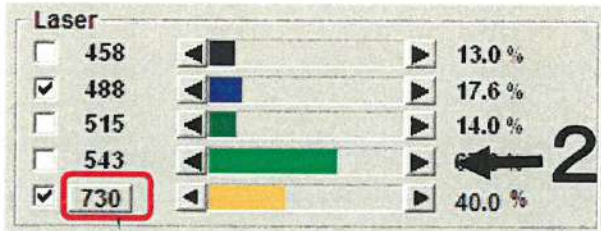
6. デスクトップ上の  をダブルクリックし、FV10-ASWソフトウェア起動します。

ユーザー名: Administrator

パスワード: Administrator

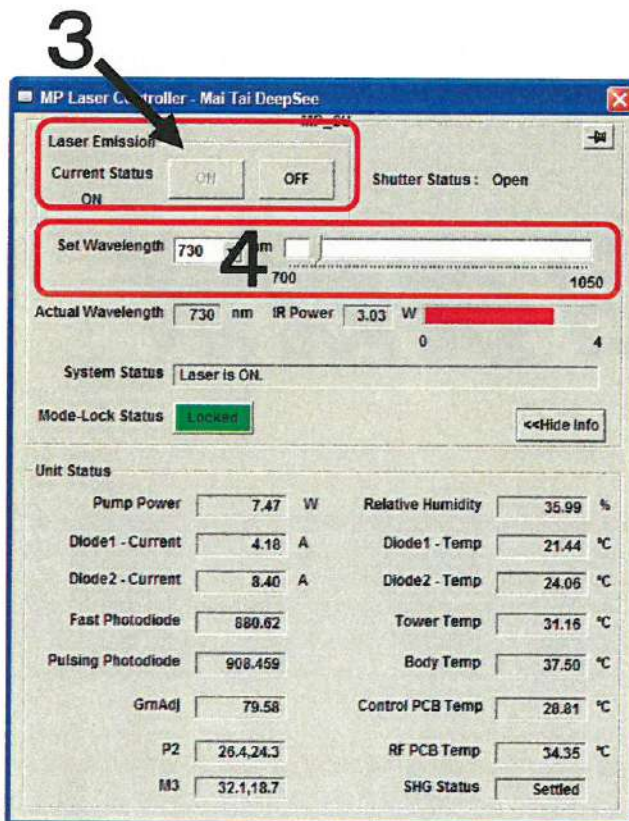
\* 起動するまで少しお時間がかかります。

# 立ち上げ(多光子励起用レーザー Mai Tai HP DeepSee)



1. ソフトウェアFV10-ASWを立ち上げます。
2. レーザの波長ボタンをクリックし、【MP Laser Controller】ウィンドウを表示します。

※レーザーの波長ボタンはレーザーの状態で色が変わります。  
(黄:ウォームアップ中、緑:モードロック中、赤:通信エラー)



3. 【Laser Emission】のONボタンをクリックし、レーザーの発振を開始します。

※ この時、パルスが最もかかり易い800nmまで自動で移動します。

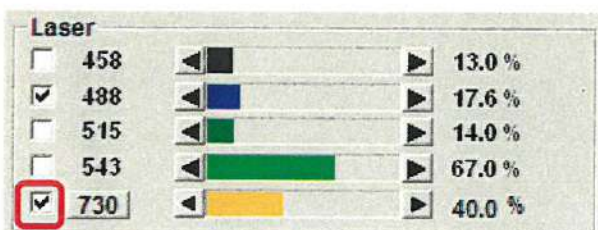
※ 1~2 分後、IR POWERが徐々に上昇し、Mode-Lock Statusがグリーン色の「Locked」の状態になって、準備完了になります。

※ 「Locked」の状態になったあと、立ち上げる前の設定波長に移動します。

4. 【Set Wavelength】にて波長を設定します。

波長 900

5. 【Acquisition Setting】ウィンドウの波長ボタン左横のチェックボックスにチェックを入れると、シャッタが開きます。



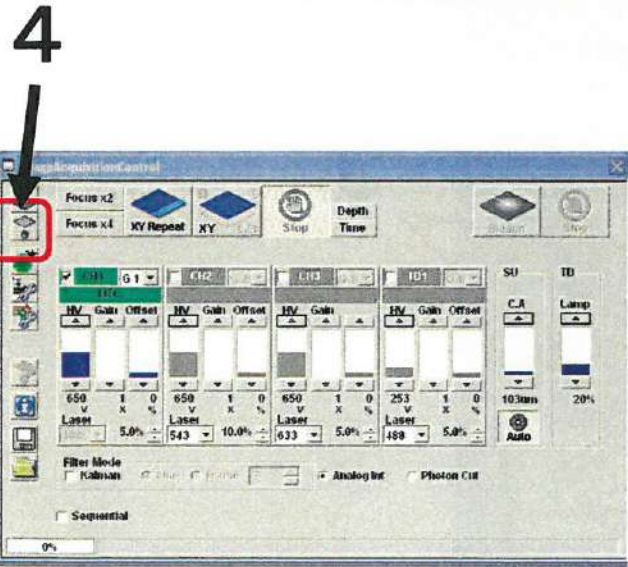
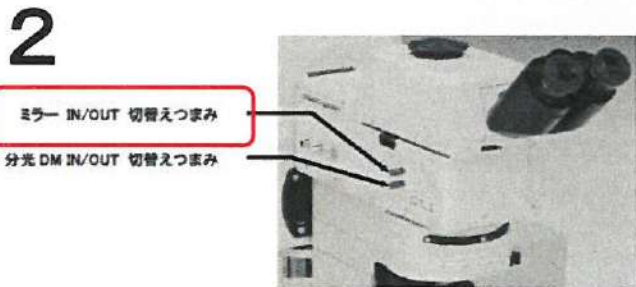
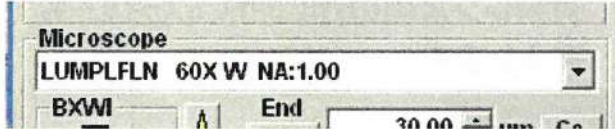
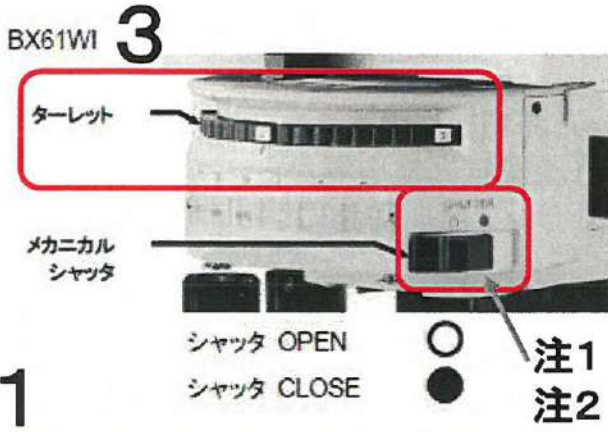
■ 備考 1  
電源とチラーは常時ONの状態でお使いください。  
\* チラーの温度は21℃

■ 備考 2  
'Info' をクリックし、Unit Status表示からその他のパラメータも確認できます。

# 顕微鏡で目視観察

# 顕微鏡で目視観察

## ■ ■ 蛍光画像の観察 ■ ■



1. 対物レンズをセットします。  
ASWソフトウェア上の対物モデル設定もマニュアルでモデル名を選択します。
2. ミラー IN/OUT切替えつまみを左に引く。
3. 蛍光ミラーユニットを選択します。  
(参照 ■メモ ■)

■メモ■  
蛍光ミラーユニットについて

- WU : UV励起 / 青紫色蛍光  
(例: DAPI, Hoechst33258等)
- WBV: 紫色励起 / 青色蛍光  
(例: ECFP等)
- NIBA: 青色励起 / 緑色蛍光  
(例: FITC, EGFP等)
- WIG : 緑色励起 / 赤色蛍光  
(例: Rhodamine, DsRed等)

4. FV10-ASWソフトウェアの  をクリックします。

注1: 操作3で蛍光目視モードに切り替わります。この瞬間に水銀ランプのメカニカルシャッターが開きますのでご注意ください。(予め、水銀ランプのマニュアルシャッターを Close ● にしておくことをお勧めします。)

注2: 検鏡する時は、水銀ランプのマニュアルシャッターを Open ○ の位置にします。

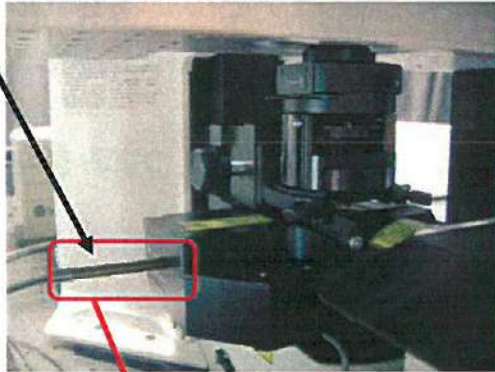
5. フォーカスを合わせます。

G  
P43A  
三光子観察へ  
P.247

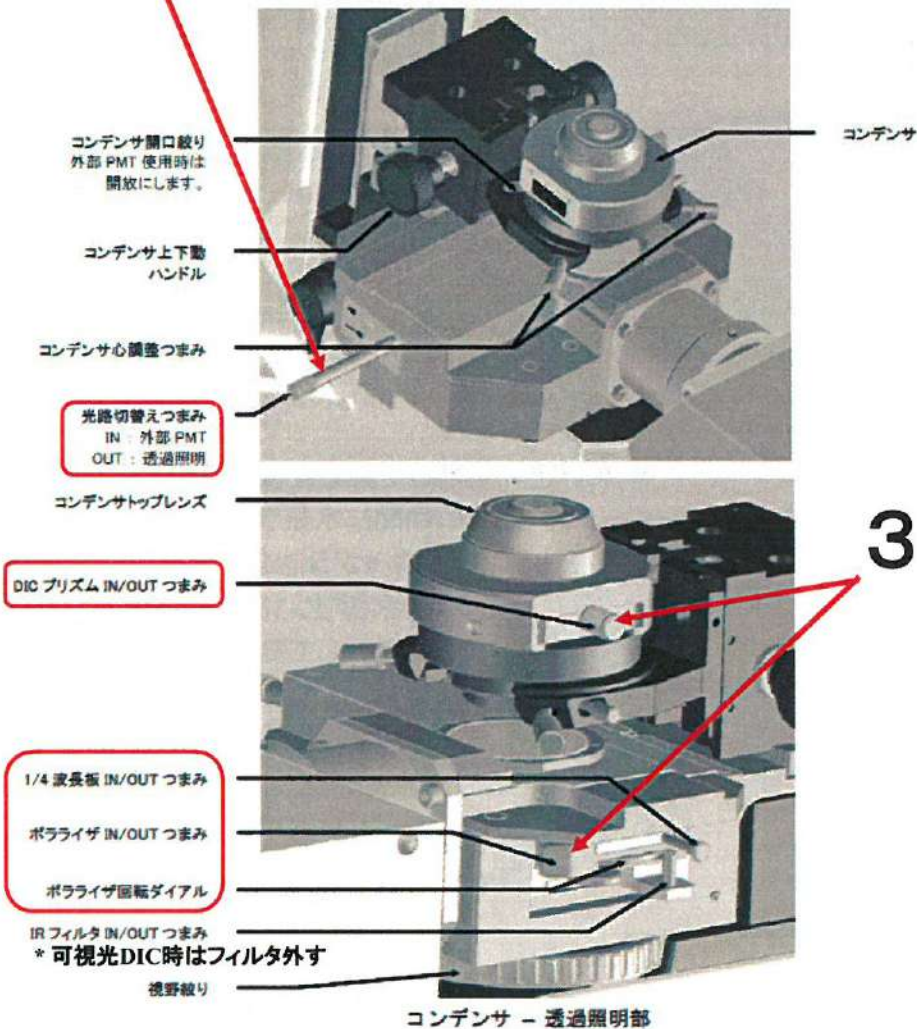
# 顕微鏡で目視観察

## ■■ 微分干渉画像の観察 ■■

2 ブリッジステージ下、コンデンサ付近



1. ミラー IN/OUT切替つまみを左に引く。
2. 光路切替つまみを左に引きます。  
(透過蛍光検出器から、ランプ照明光路に切り替わります。)
3.  $\lambda/4$ 波長板・ポラライザを光軸上に挿入し、コンデンサ側のDICプリズムは使用する対物レンズに応じた素子を挿入します。
4. 対物レンズ側のDICプリズムスライダーも挿入します。

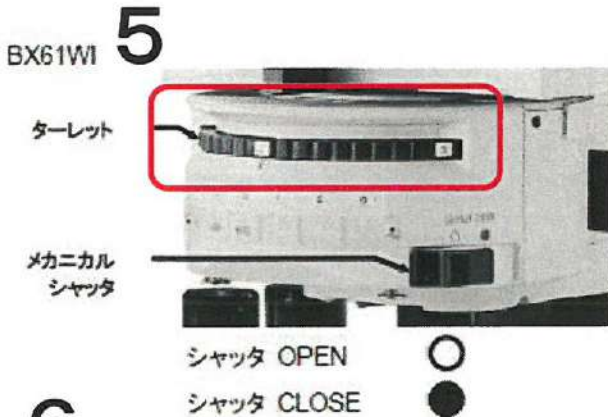


3

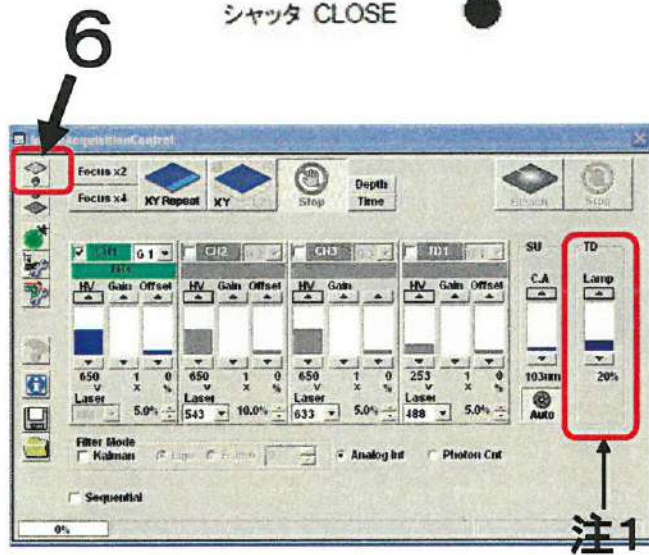


# 顕微鏡で目視観察

## ■■ 微分干渉画像の観察 ■■



5. ミラーユニットターゲットで、微分干渉アナライザ(6: DICT)を選択します。  
\* メカニカルシャッタはCLOSEのままで使用して下さい。

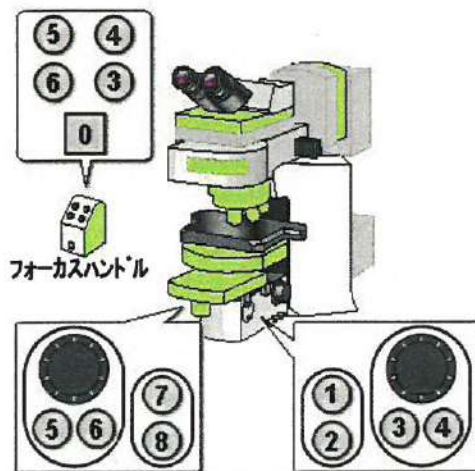


6. FV10-ASWソフトウェアの  をクリックします。
7. フォーカスを合わせます。

注1: ハロゲンランプの調光は、FV10-ASWソフトウェア上のTR-Lampスライダで行います。

注2: コントラスト調整は、標本にピントを合わせた後に、ポラライザ回転ダイヤルを回して行います。

### 【参考】 BX61正立顕微鏡 のボタン機能 (デフォルト設定)



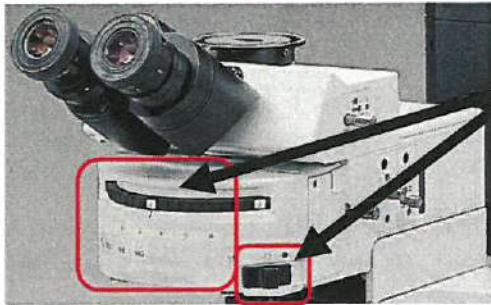
ボタン	機能
0	未使用
1	透過照明の調光アップ
2	透過照明の調光ダウン
3	Zステージがレボルパに近づく
4	Zステージがレボルパから離れる
5	ステージ退避/復帰切換え
6	フォーカスの粗微動切換え
7	未使用
8	透過照明のON/OFF切換え



# 共焦点觀察編

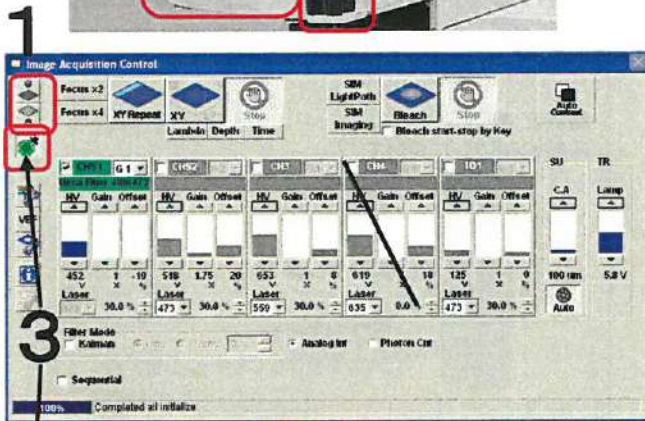
## 共焦点画像の取得(単染色 XY)

■ ■ 1枚の画像(XY平面)取得 (蛍光画像のみ) ■ ■

サンプル例: 緑色蛍光(FITC)の単染色



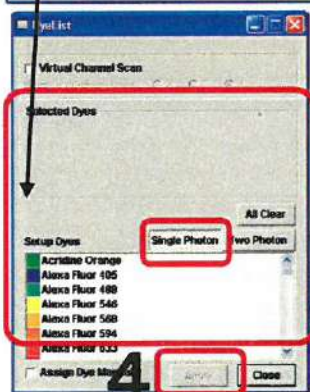
1. FV10-ASWソフトウェアの  をクリックし、  
 蛍光ランプのシャッターを閉じます。  
 (微分干渉で目視観察していた場合は、  
 をクリックし、ハロゲンランプの  
 シャッターを閉じます。)



2. ミラーユニットターレットで、“1:LSM”  
 キューブを選択します。またマニュアル  
 シャッターをOpen ○ の位置にします。

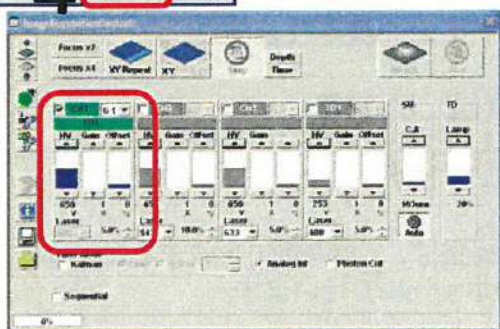
3. DyeListボタン  をクリックし、  
 Single Photon ボタンを押した状態で、  
 Setup Dyesから観察する蛍光試薬を  
 選びダブルクリックします。

\* 選びなおすときは、一度「All Clear」を  
 クリックして 蛍光色素名を消去した後に  
 操作3を行います。



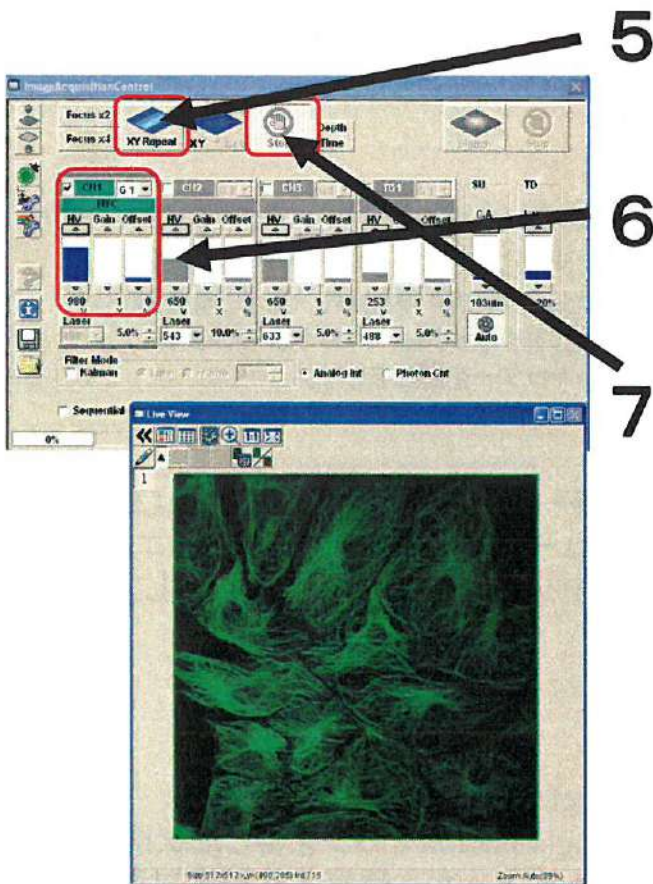
4. Apply ボタンをクリックします。

(DyeListパネルは、CloseボタンでCloseできます)



Dye Apply後の画面

## 共焦点画像の取得(単染色 XY)



5. XY Repeat ボタンを押して、スキャンします。

6. 緑色 (FITC) 画像の調整をします。  
(画像調整概略は下記をご参照下さい。)

7. STOPボタンを押して、スキャン停止します。(参照 ■メモ ■)

### ■メモ ■

スキャンボタンについて



: 連続スキャン



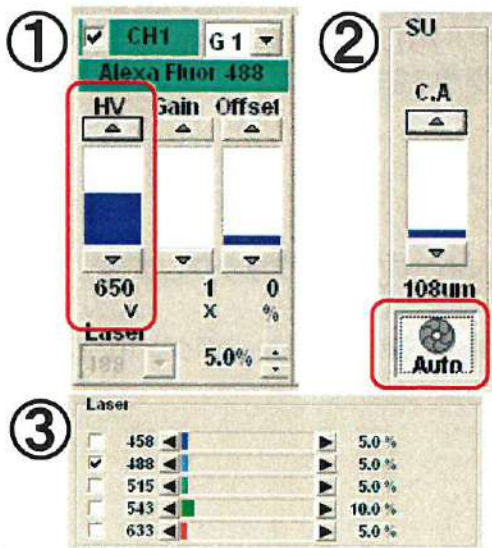
: スキャン停止



: ラフスキャン

(ラインを飛ばしてスキャンします。)

### 画像調整の概略



① 検出器の感度調整 (HV)

設定値 ↑ > 感度 ↑ > 画像の明るさ ↑

(ただしノイズが目立つようになります。)

\* 約700V以下で使用することをお勧めします。

「補足」Offset(背景を暗くする)の調整

Gain(十分な明るさが得られない場合)の調整

② コンフォーカルアパチャーの調整 (C.A.)

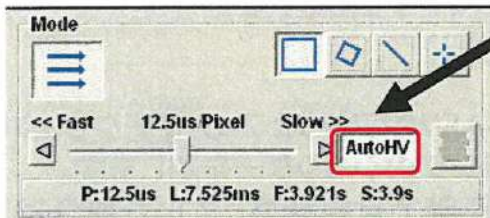
③ レーザー出力の調整 (Laser)

#### 調整方法(例 HV調整):

スライダ上でクリックすると、その場所まで一気にHVを上げる(または下げる)ことができます。

また、微調整は、をクリックするか、マウスのホイールで行います。

## 共焦点画像の取得(単染色 XY)

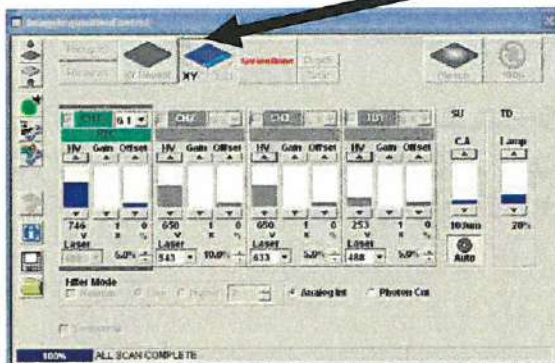


8

8. AutoHVを選択して、

Scan Speed を選択します。

\* よりSlowにする程、現在の明るさを保ちながら、ノイズを落としたスキャンになります。  
(また、別の方法として Kalman積算があります。)



9

9. XYボタンを押して、画像取得します。



取得後の画像

10. 取得した画像は、「2D View」ウィンドウ上で表示されます。

画像の保存: 画像上で右クリックをし、表示されたコマンドリストから **Save As** を選択して画像データを保存します。

(Save as Type 「 oib 」または「 oif 」が、

FV10-ASWソフトウェア専用のファイル形式です。

また**Export**を選択すると、TIFF、BMP、JPEG形式で保存できます。)

### ■ メモ ■

FV10-ASW専用ファイル形式について

#### OIF 形式:

「画像が入ったフォルダ(16bit TIFF)」と「付属ファイル」が作成されます。これら2つがないと、ファイルを開くことができません。

#### OIB 形式:

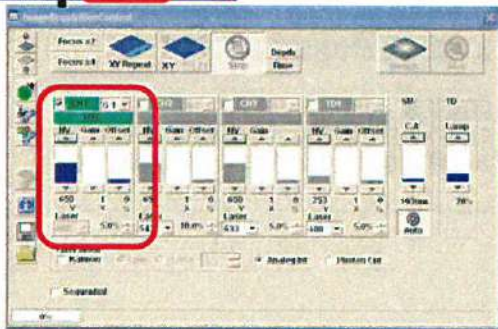
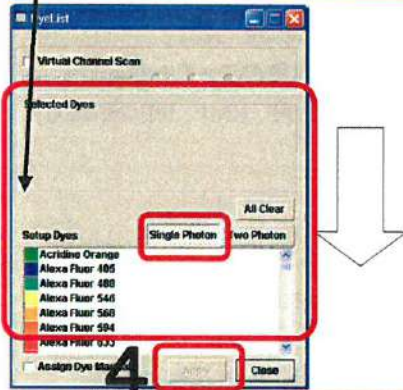
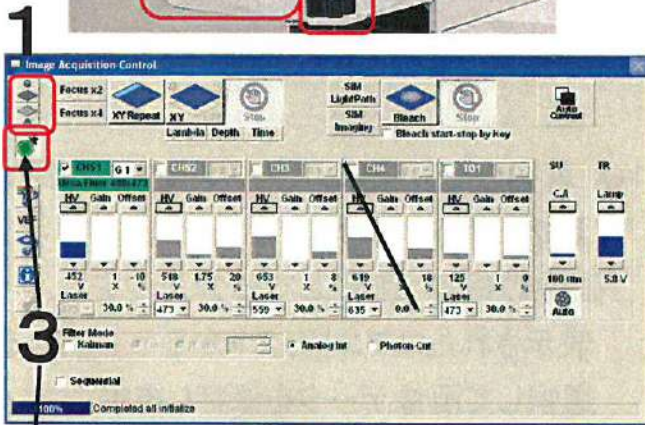
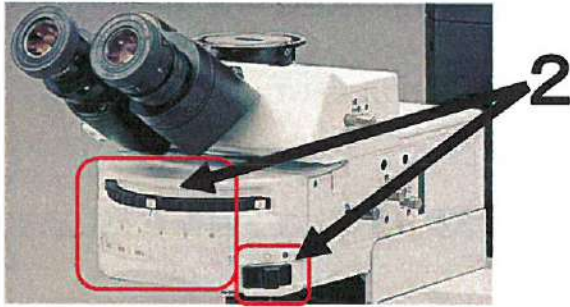
OIF 形式を1つのファイルにまとめたもの。ファイルの移動などをする際は、こちらが便利です。

## 共焦点画像の取得(二重染色 XY)



### ■ 1枚の画像(XY平面)取得 (蛍光画像のみ) ■

Sequentialスキャン編 (ここではLine Sequentialをご紹介します)

※ 個別に蛍光画像を取得することにより、蛍光のクロストークを回避するモード



Dye Apply後の画面

1. FV10-ASWソフトウェアの  をクリックし、  
 蛍光ランプのシャッターを閉じます。  
 (微分干渉で目視観察していた場合は、  
  をクリックし、ハロゲンランプの  
 シャッターを閉じます。)

2. ミラーユニットターレットで、“1:LSM”  
 キューブを選択します。またマニュアル  
 シャッターをOpen ○の位置にします。

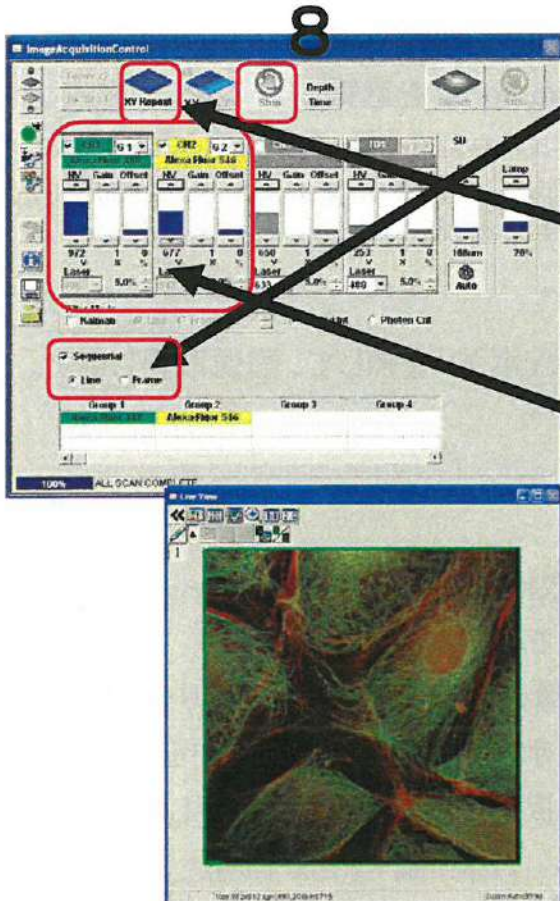
3. DyeListボタン  をクリックし、  
 Single Photon ボタンを押した状態で、  
 Setup Dyesから観察する蛍光試薬を  
 選びダブルクリックします。

\* 選びなおすときは、一度「All Clear」を  
 クリックして 蛍光色素名を消去した後に  
 操作3を行います。

4. Apply ボタンをクリックします。

( DyeListパネルは、CloseボタンでCloseできます)

## 共焦点画像の取得(二重染色 XY)



5

5. Sequentialをチェックし、Lineを選択します。

6

6. XY Repeat ボタンを押して、スキャンします。

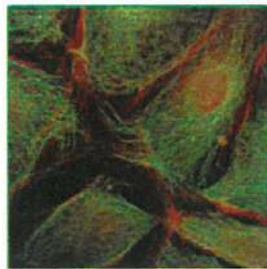
7

7. 1色目の画像と2色目の画像それぞれの調整をします。  
(画像調整概略は、8ページ下段をご参照下さい。)

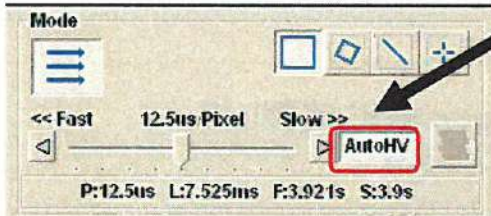
8. STOPボタンを押して、スキャンを停止します。

### MEMO

キーボード上で **Ctrl + H key** を押すことにより、画像の色表示をHi-Low表示できます。輝度が最大の4096であるピクセルは、赤色で表示されます。一方、輝度が最小のゼロであるピクセルは、青色で表示されます。またHi-Low表示から通常のカラー表示に戻す際も、**Ctrl + H Key** を押します。



## 共焦点画像の取得(二重染色 XY)

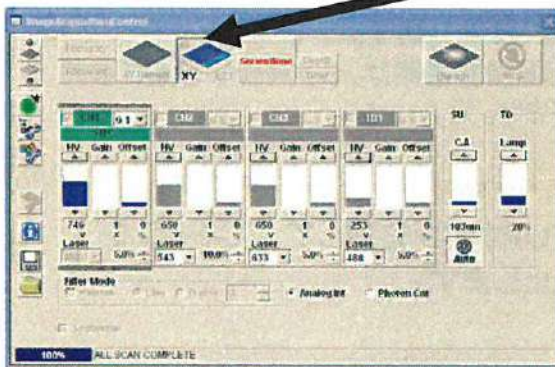


9

9. AutoHVを選択して、

Scan Speed を選択します。

\* よりSlowにする程、現在の明るさを保ちながら、ノイズを落としたスキャンになります。  
(また、別の方法として Kalman積算があります。)



10

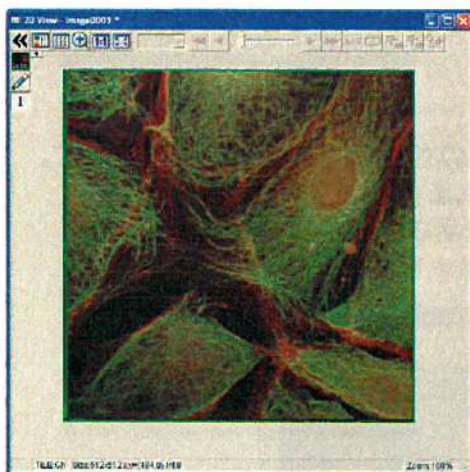
10. XYボタンを押して、画像取得します。

11. 取得した画像は、「2D View」ウィンドウ上で表示されます。

画像の保存: 画像上で右クリックをし、表示されたコマンドリストから **Save As** を選択して画像データを保存します。

(Save as Type 「oib 」または「oif 」が、

FV10-ASWソフトウェア専用のファイル形式です。またExportを選択すると、TIFF、BMP、JPEG形式で保存できます。)



取得後の画像

### ■ メモ ■

FV10-ASW専用ファイル形式について

#### OIF 形式:

「画像が入ったフォルダ(16bit TIFF)」と「付属ファイル」が作成されます。これら2つがないと、ファイルを開くことができません。

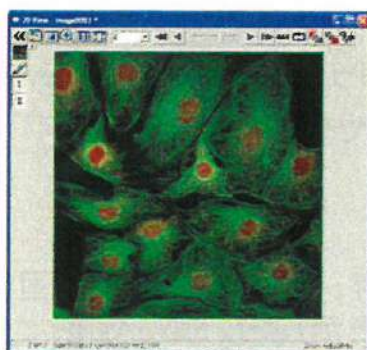
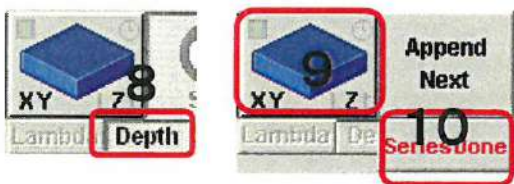
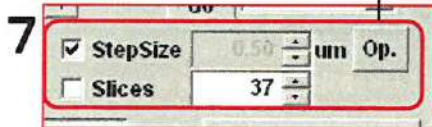
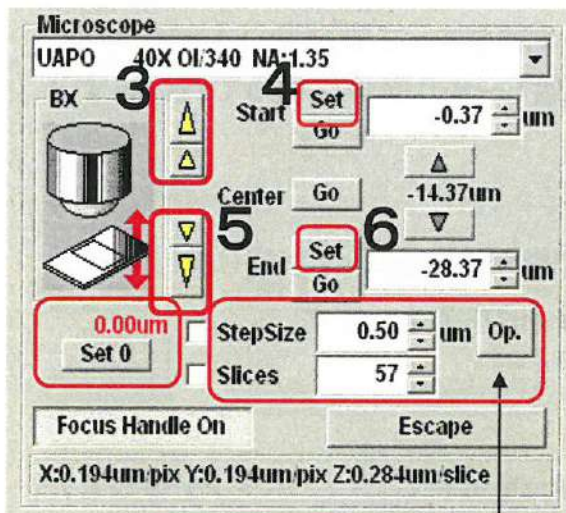
#### OIB 形式:

OIF 形式を1つのファイルにまとめたもの。ファイルの移動などをする際は、こちらが便利です。



## 画像の取得(二重染色 XYZ)

### ■■ 連続断層画像(XYZ)取得 (蛍光画像のみ) ■■



取得後のXYZ画像

1. P.22~23の一連の操作手順で  
画像調整を行います。

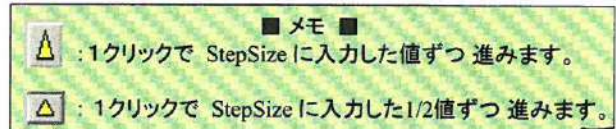
ここでは、連続断層画像の上限と下限を  
決定します。

2. XY Repeat、もしくはFocus x2/4 ボタンを  
押してスキャンします。

3. をクリックしていき、フォーカスを  
移動していきます。

4. 画像を見てサンプル上限位置を決め、  
Start の Set ボタンをクリックします。

5. をクリックしていきフォーカスを  
移動させます。



6. 画像を見てサンプル下限位置を決め、  
End の Set ボタンをクリックします。

7. StepSize又はSliceを入力します。  
(Op.ボタンで、Z光学分解能に応じた推奨値を入力できます)

8. Depthボタンを選択します。

9. XYZボタンをクリックし、画像取得します。

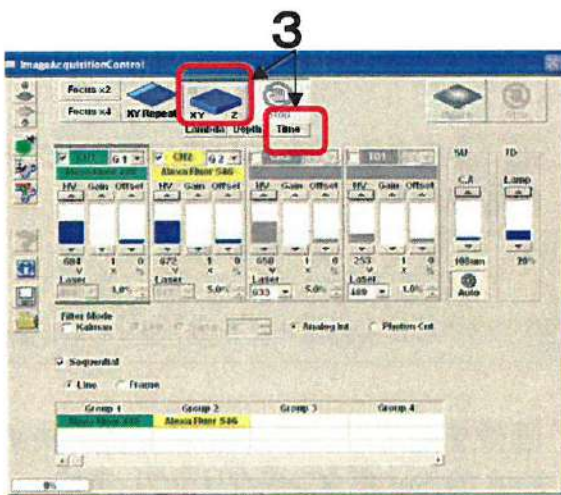
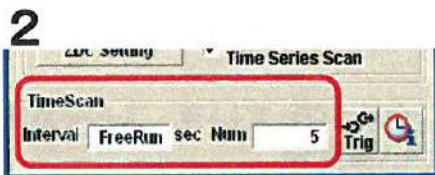
10. SeriesDoneボタンをクリックし、  
撮影を終了します。

## 画像の取得(二重染色のタイムシリーズ XYT)

### ■■ タイムシリーズ画像(XYT)取得 ■■

サンプル例: 緑色蛍光(Alexa488) + 赤色蛍光(Alexa546)の二重染色

Line Sequential スキャン + タイムシリーズ 編



1. 画像調整を、二重染色 XY画像取得手順1~8の操作に従って行います。

2. 時間間隔(Interval)と繰り返し回数(Num)を入力します。

3. Timeを選択し、XYTボタンを押して、画像取得します。

4. "Series Done" をクリックすると、取得し終わった画像は、「2D View」Window上で表示されます。

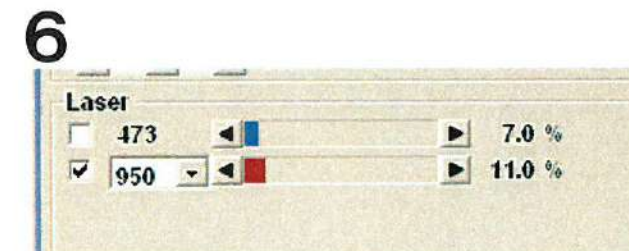
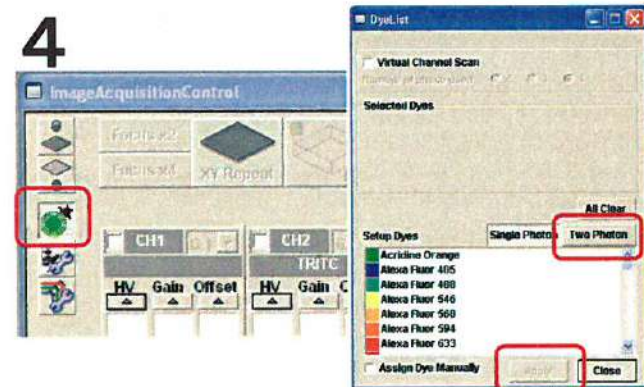
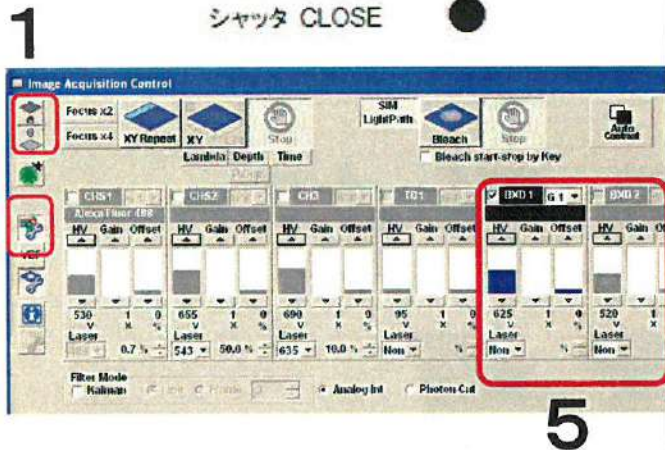
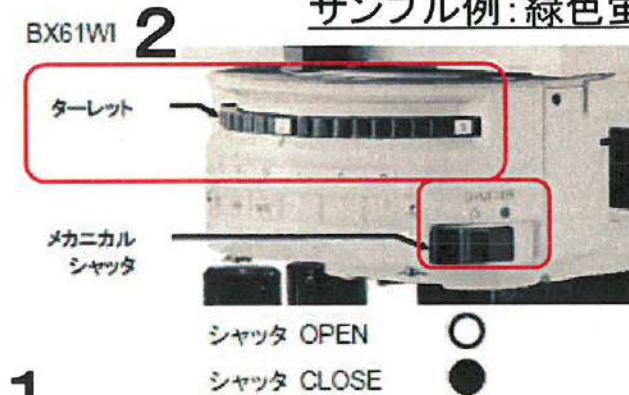
5. 画像の保存: Fileメニュー(又は画像上で右クリック表示)より、SaveAs を選択して画像データを保存します。

# 2 光子励起 觀察編

## 2P画像の取得(XY)

■■ 1枚の画像(XY平面)取得 (蛍光画像のみ) ■■

サンプル例: 緑色蛍光(FITC)の単染色



1. FV10-ASWソフトウェアの をクリックし、  
 蛍光ランプのシャッターを閉じます。  
 (微分干渉で目視観察していた場合は、  
 をクリックし、ハロゲンランプの  
 シャッターを閉じます。)

2. 蛍光ミラーユニットターレットを、  
 "NRDM690"にします。またマニュアル  
 シャッターをOpen ○ の位置にします。

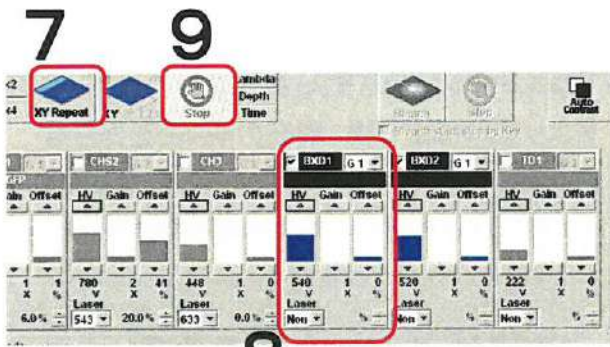
3. ミラーIN/OUT切替つまみを、  
 右(IN)へ押し込みます。  
*ら暗室. 室温* *キョウブを巻く。*

4. DyeListボタン をクリックし、  
 Two Photon ボタンを押して、  
 Apply ボタンをクリックします。

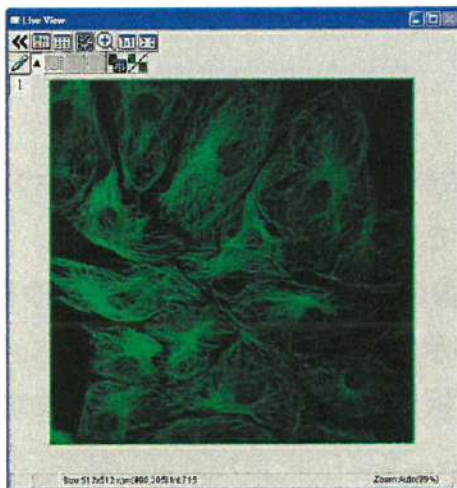
5. 室内の蛍光灯を消灯し、顕微鏡付近を  
 暗室状態にした上で、  
 [Image Acquisition Control]ウィンドウで、  
 使用する[BXDx]にチェックを入れます。

6. [Acquisition Setting]ウィンドウの  
 [Laser]のIRレーザにチェックを入れ、  
 使用する波長をプルダウンから  
 選択します。

## 2P画像の取得(XY)



8



7. XY Repeat ボタンを押して、  
スキャンします。

レーザーの強度を上げる

7DのHVEを上げる

8. 緑色 (FITC) 画像の調整をします。  
(画像調整概略は下記をご参照下さい。)

9. STOPボタンを押して、  
スキャン停止します。(参照 ■メモ■)

HVEの値を上げる

### ■メモ■

スキャンボタンについて



: 連続スキャン



: スキャン停止

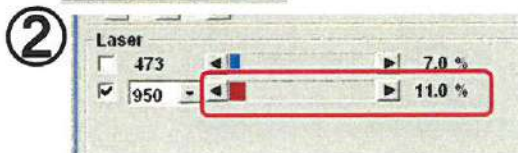
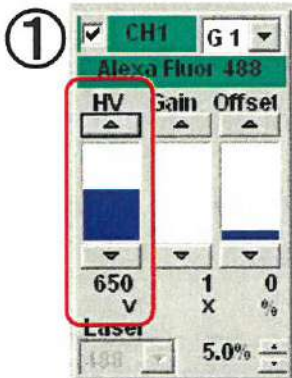


: ラフスキャン

(ラインを飛ばしてスキャンします。)

レーザーの強度を上げる

### 画像調整の概略



- ① 検出器の感度調整 (HV)  
設定値 ↑ > 感度 ↑ > 画像の明るさ ↑  
(ただしノイズが目立つようになります。)  
\* 約500~800Vで使用することをお勧めします。

「補足」Offset(背景を暗くする)の調整  
Gain(十分な明るさが得られない場合)の調整

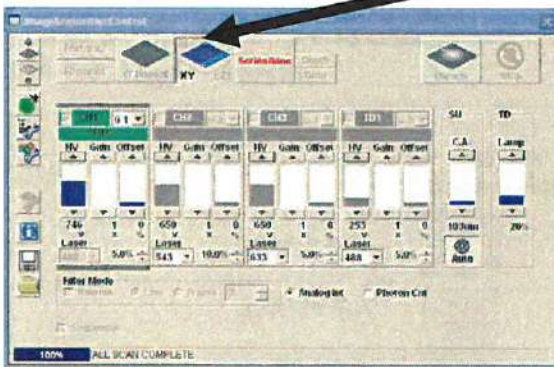
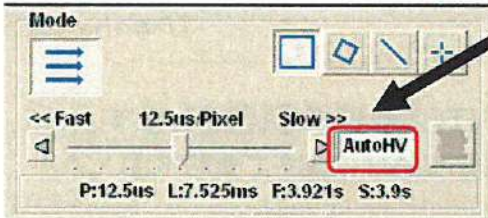
- ② レーザー出力の調整 (Laser)

#### 調整方法(例 HV調整):

スライダ上でクリックすると、その場所まで一気にHVを上げる(または下げる)ことができます。

また、微調整は、 をクリックするか、マウスのホイールで行います。

## 2P画像の取得(XY)



取得後の画像

10. AutoHVを選択して、

Scan Speed を選択します。

\* よりSlowにする程、現在の明るさを保ちながら、ノイズを落としたスキャンになります。  
(また、別の方法として Kalman積算があります。)

11. XYボタンを押して、画像取得します。

12. 取得した画像は、「2D View」ウィンドウ上で表示されます。

画像の保存: 画像上で右クリックをし、表示されたコマンドリストから **Save As** を選択して画像データを保存します。

(Save as Type 「oib」または「oif」が、

FV10-ASWソフトウェア専用のファイル形式です。また**Export**を選択すると、TIFF、BMP、JPEG形式で保存できます。)

### ■ メモ ■

FV10-ASW専用ファイル形式について

#### OIF 形式:

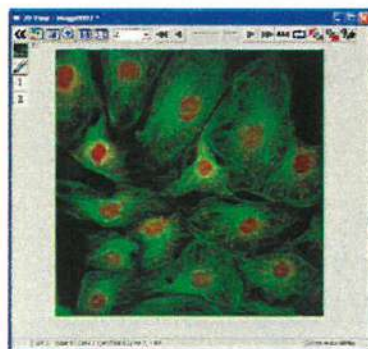
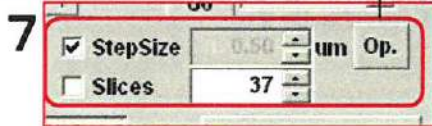
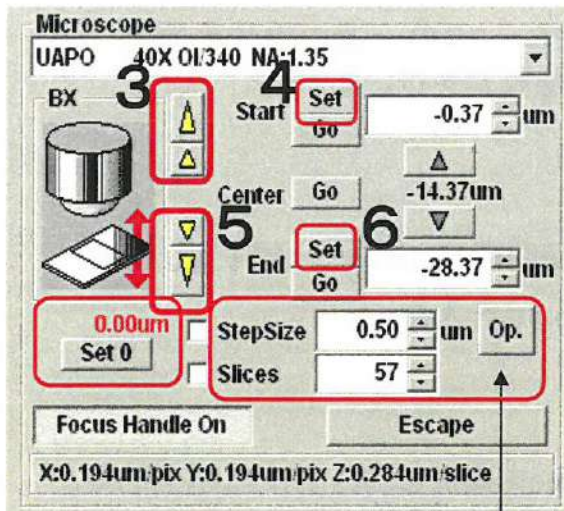
「画像が入ったフォルダ(16bit TIFF)」と「付属ファイル」が作成されます。これら2つがないと、ファイルを開くことができません。

#### OIB 形式:

OIF 形式を1つのファイルにまとめたもの。ファイルの移動などをする際は、こちらが便利です。

## 2P画像の取得(連続断層像 XYZ)

### ■■ 連続断層画像(XYZ)取得 (蛍光画像のみ) ■■



取得後のXYZ画像

1. P.28~29の一連の操作手順で  
画像調整を行います。

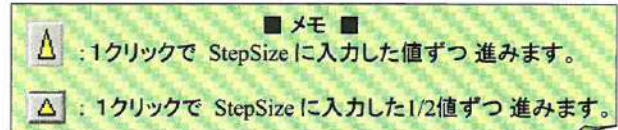
ここでは、連続断層画像の上限と下限を  
決定します。

2. XY Repeat、もしくはFocus x2/4 ボタンを  
押してスキャンします。

3. をクリックしていき、フォーカスを  
移動していきます。

4. 画像を見てサンプル上限位置を決め、  
Start の Set ボタンをクリックします。

5. をクリックしていきフォーカスを  
移動させます。



6. 画像を見てサンプル下限位置を決め、  
End の Set ボタンをクリックします。

7. StepSize又はSliceを入力します。  
(Op.ボタンで、Z光学分解能に応じた推奨値を入力できます)

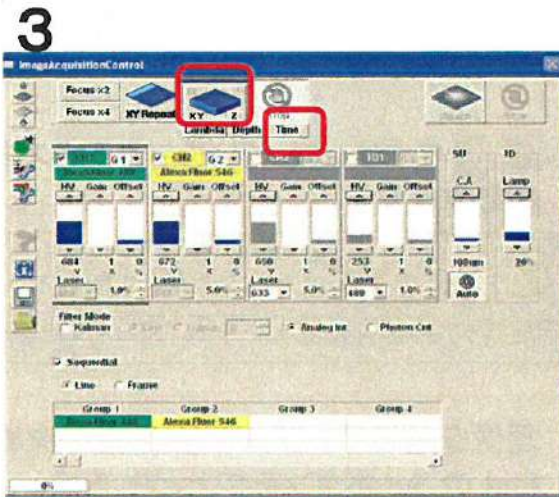
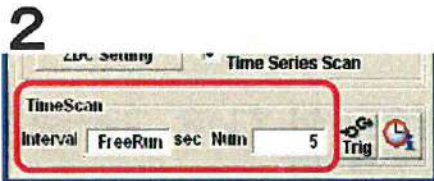
8. Depthボタンを選択します。

9. XYZボタンをクリックし、画像取得します。

10. SeriesDoneボタンをクリックし、  
撮影を終了します。

## 2P画像の取得(タイムシリーズ XYT)

### ■■ タイムシリーズ画像(XYT)取得 ■■



1. P.28～29の一連の操作手順で  
画像調整を行います。

2. 時間間隔(Interval)と 繰り返し回数  
(Num)を入力します。

3. Timeを選択し、XYTボタンを押して、  
画像取得します。

4. "SeriesDone" をクリックすると、  
取得し終わった画像は、「2D View」  
Window上で表示されます。

5. 画像の保存: Fileメニュー(又は  
画像上で右クリック表示)より、  
SaveAs を選択して  
画像データを保存します。



# 画像取得設定の 補足

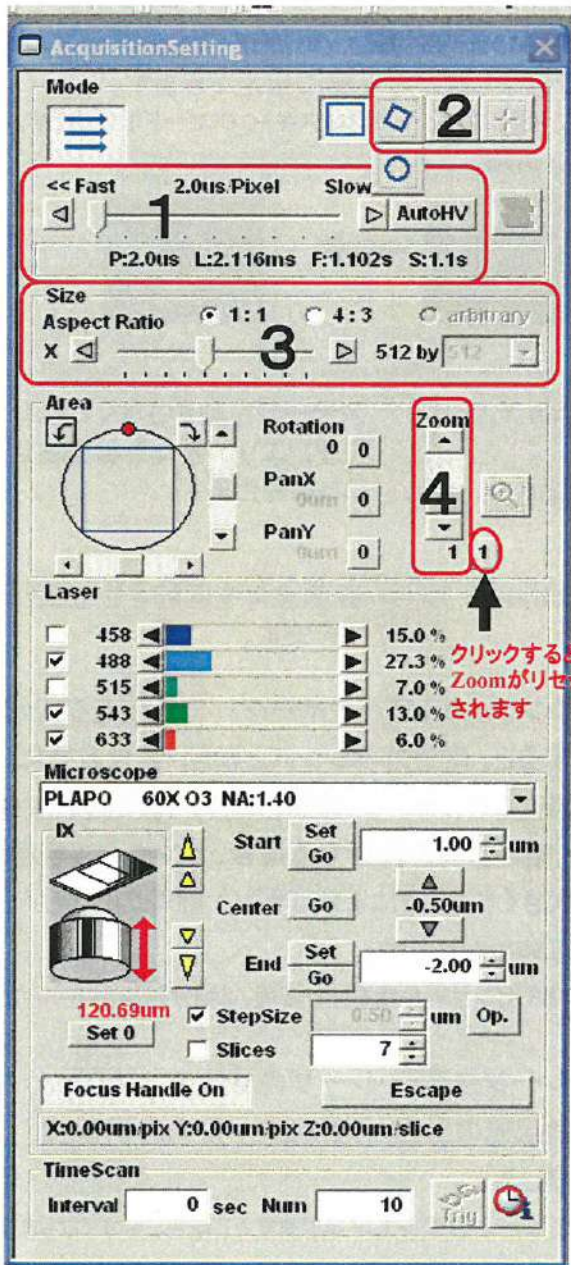
# 画像取得設定、画像取込みウィンドウ概略

**スクリーンショット 1: 取得設定 (Acquisition Settings)**  
 スキャンモード (Scan Mode) → Mode  
 スキャン速度 (Scan Speed) → 2.000 Pixels / Sec  
 画素数 (Resolution) → Size: 512 by 512  
 Zoom & Pan (Zoom & Pan) → Zoom: 1.00, PanX: 0, PanY: 0  
 レーザー出力調整 (Laser Output Adjustment) → Laser: 450 (15.0%), 480 (22.2%), 510 (7.0%), 540 (13.0%), 630 (6.0%)

**スクリーンショット 2: 観察モードとチャンネル設定 (Observation Modes & Channel Settings)**  
 透過観察 (目視) (Transmission Observation) → Focus w/2  
 蛍光観察 (目視) (Fluorescence Observation) → Focus w/1  
 Dye設定 (Dye Settings) → Dye: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10  
 光路設定 (Optical Path Settings) → Wavelength, Depth, Time  
 スリット調整 (分光タイプSUのみ) (Slit Adjustment) → Slit: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10  
 SIM Scanner設定 (SIM Scanner Settings) → SIM: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10  
 スキャンボタン各種 (Various Scan Buttons) → Scan, Stop, Pause, etc.  
 XYZ・XYT選択 (XYZ/XYT Selection) → XYZ, XYT  
 各Chの調整 (Adjustment for Each Channel) → Channel 1-10 settings  
 コンフォーカルアパチャー (Confocal Aperture) → C.A. settings  
 ハロゲンランプ調光 (Halogen Lamp Dimming) → Halogen Lamp settings  
 Kalman モード設定 (Kalman Mode Settings) → Kalman Mode settings

**スクリーンショット 3: 表示ウィンドウ (Display Windows)**  
 2DControlPanel表示 (2D Control Panel Display) → 2D Control Panel  
 画像表示 Window (Image Display Window) → Image Display Window  
 画像ファイルのサムネール表示 (Image File Thumbnail Display) → Image File Thumbnails  
 メモリ上にあるファイルの表示 (Display of Files in Memory) → Files in Memory

# 画像調整補足

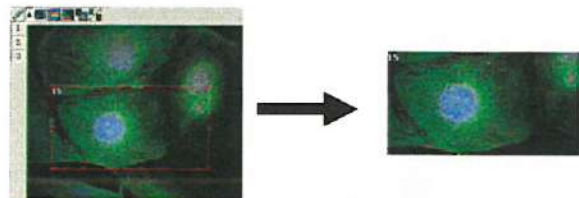


1. AutoHVを選択して、ScanSpeedを選択します。



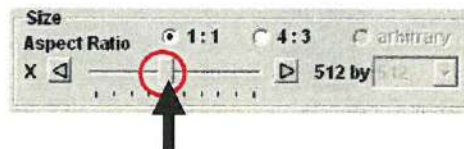
\* よりSlowにする程、現在の明るさを保ちながらノイズを落とすことができます。  
(また、別の方法として Kalman積算があります。)

2. "Clip Scan" アイコンをクリックして視野全体像の中から取得したい画像領域を範囲指定します。



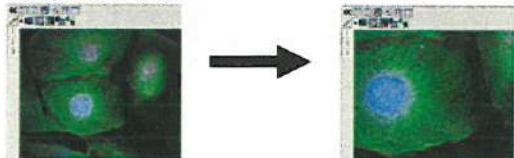
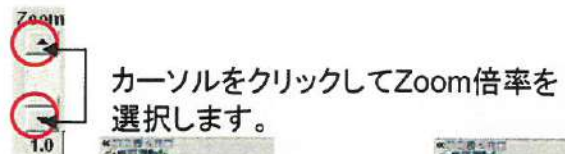
ROIで範囲指定後に、XY (Repeat) スキャン

3. 画素数の設定



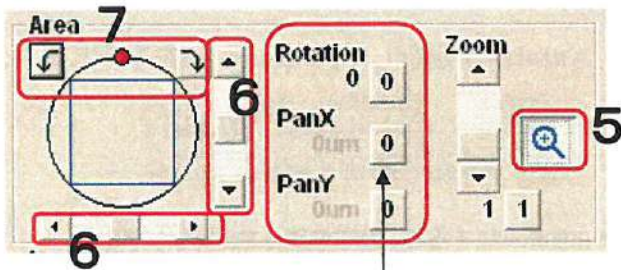
左右にカーソルを移動させ、画素数を選択します。

4. Zoomの設定




例. 1倍から2倍へZoomで拡大

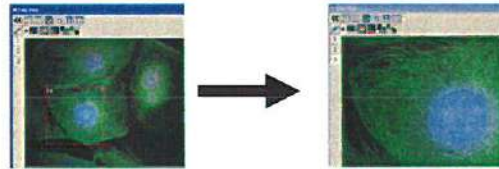
## 画像調整補足





0をクリックすると  
Rotation、Panが  
リセットされます




5. Zoomスキャン  をクリックすると視野全体像の中から取得したい画像領域の範囲をZoomで拡大しながら任意に指定できます。  
※手順3のZoomと同様スキャンスピードは同じです。



6. Pan X,Y  ステージを動かさなくてもスキャンエリア全体を移動させることができます。

7. Rotation  画像全体を回転させることができます。

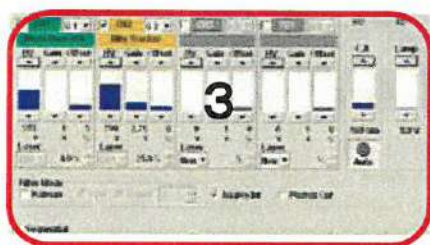
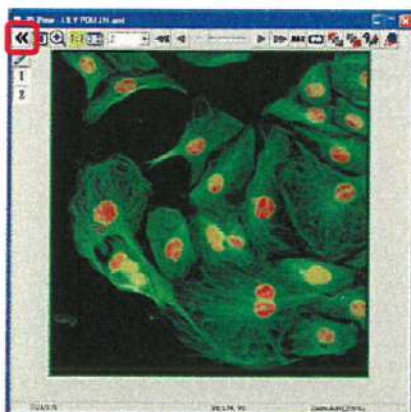
8. コンフォーカルアパチャー...  をクリックすると、使用対物レンズと励起・蛍光波長に最適なピンホール径が自動的に設定されます。  
・暗い蛍光を撮影する場合、ピンホール径を大きくすることにより、明るい画像の取得が可能になります。  
(但しピンホール径を開ける程、Z軸分解能が下がります。)

9. レーザ強度...レーザの強度を上げると、励起光の出力が増加して、蛍光の明るさが増します。  
※レーザ強度を上げ過ぎますと、褪色しやすくなります。


10. Kalman積算...指定した回数の画像取り込みを行いながら画像の平均化をします。  
Kalmanのチェックボックスにチェックを入れ、Line(またはFrame)を選択します。  
画像の積算回数(スキャン回数)を入力します。  
利点: ノイズの少ない画像が得られる。  
欠点: 撮影時間がかかる。

## 設定条件のリロード(Acquisition Control)


1



1. 前回撮影した画像ファイルを開き、

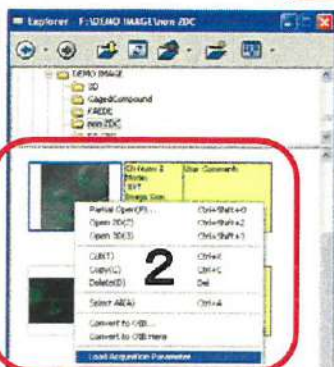
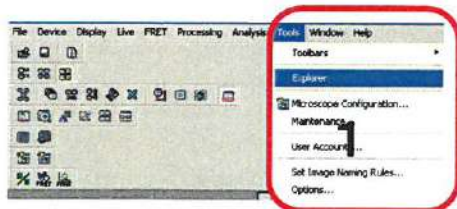
 をクリックします

2. 左の "2D Control Panel," が現れ

 をクリックします。

3. 前回実験した全く同じ観察条件(蛍光色素、HV、Gain、Offset、ピンフォール径等)がリロードされます。

## 設定条件のリロード(Explorer)



3



1. Tool→Explorerを選択します。

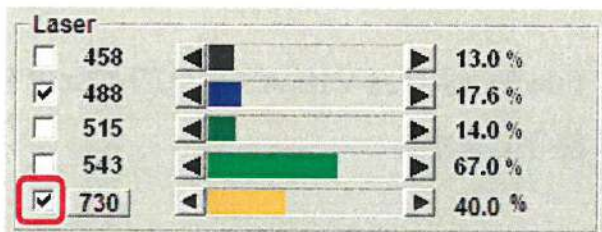
2. リロードしたいサムネイル画像で右クリックし、Load Acquisition Parameter を選択します。

3. 条件がリロードされます。

# システムの終了

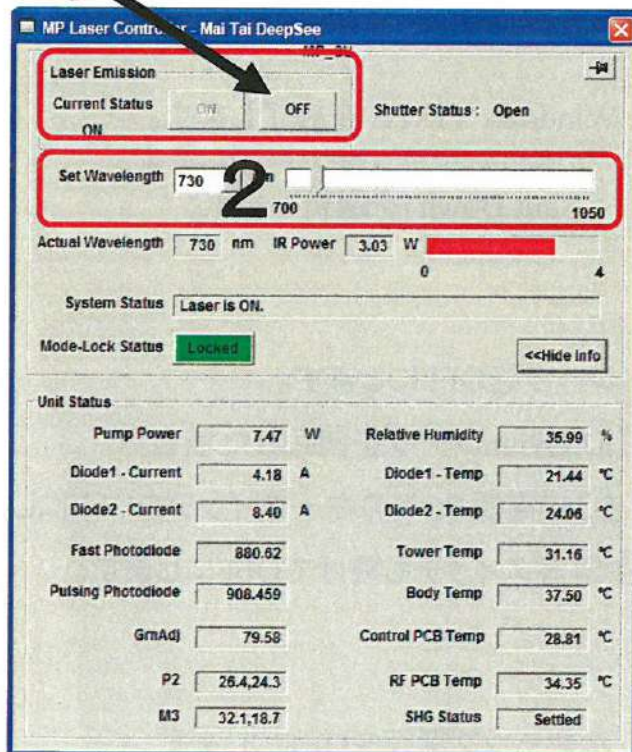
2000年10月20日

## レーザー発振の終了 (多光子励起用レーザー MaiTai HP DeepSee)



1

3

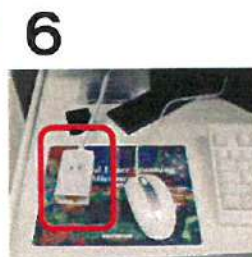
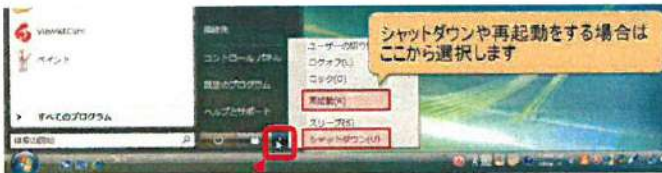
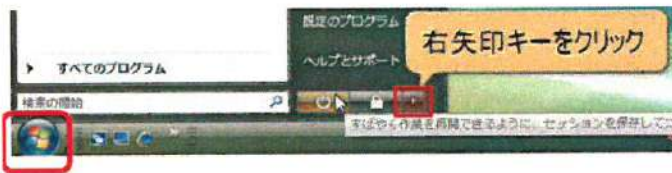
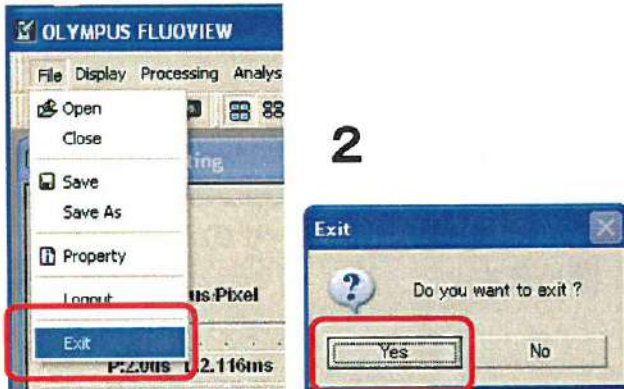


1. 【Acquisition Setting】ウィンドウの波長ボタン左横のチェックボックスにチェックを外して、レーザーのシャッタを閉じます。

2. 800nm に目標設定値を変更します。

3. レーザー発振を停止します。  
【Laser Emission】のOFFボタンをクリックします。

## システムの終了



1. 多光子励起用レーザの発振を停止します。(前頁参照)

2. File/Exitより、FV10-ASW ソフトウェアを終了します。

\* Cautionメッセージに従い、蛍光ミラーユニットターゲットのマニュアルシャッターも閉めます。

\* 使用した水浸/油浸タイプや、ドライタイプ対物レンズも汚してしまった場合はクリーニングを行います。

3. Windows VISTA を終了します。

① Windowsボタンをクリックします。

② 「Shut Down」を選択します。

4. レーザをOFFにします。

\* LD559nmレーザを使用した場合

LD559電源BOXのキースイッチをOFFにし、主電源スイッチも続けてOFFにします。

5. 水銀ランプ電源をOFFにします。

6. 集中電源スイッチをOFFにします。

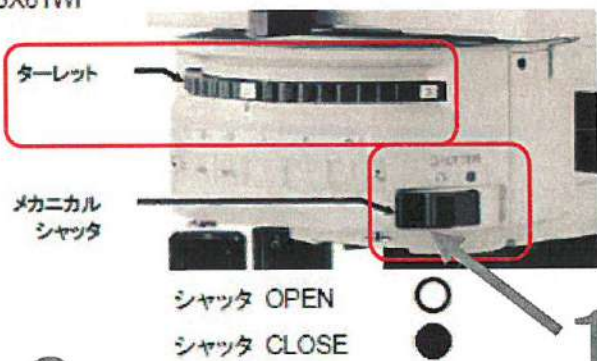


# 2 光子 勵起 觀察 “光軸調整”編

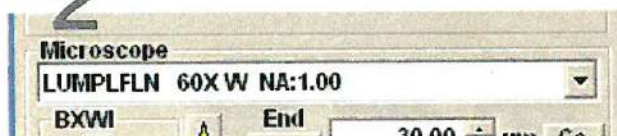
## 2Pの光学調整(像位置調整)

2.

BX61WI



2



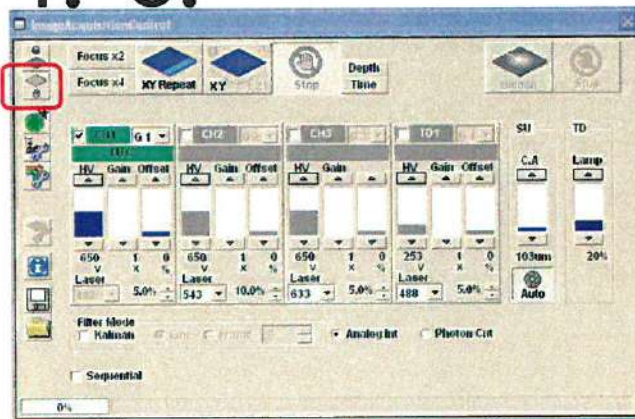
3.

ミラー IN/OUT 切替つまみ

分光 DM IN/OUT 切替つまみ  
(PMT4ch仕様のみ)



4.・6.



### 【準備】

1. 顕微鏡の落射光のメカニカルシャッタが閉じられていることを確認します。

2. 使用する対物レンズを顕微鏡に装着します。

\* 対物レンズの設定

[Acquisition Setting]ウィンドウの[Microscope]に、使用する対物レンズの名前を設定します。


### 【接眼レンズを通して、

蛍光ビーズ(φ2μm)、又は蛍光標本で確認]


1. 蛍光ビーズ、又は蛍光標本をセットします。

2. 蛍光ミラーユニットターレットを、"NIBA" にします。

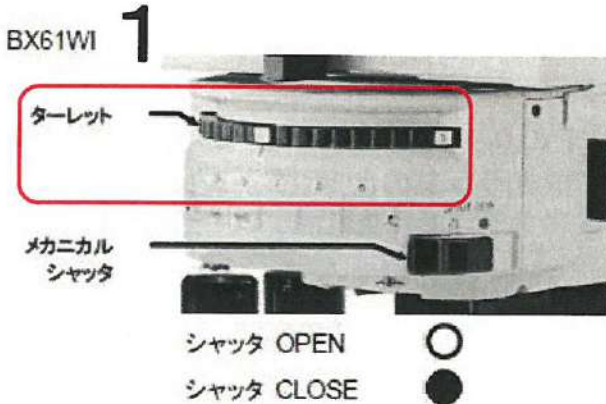
3. ミラー IN/OUT切替つまみを左に引く。

4.  EPIボタンをクリックし、メカニカルシャッタを開き、励起光を照射します。

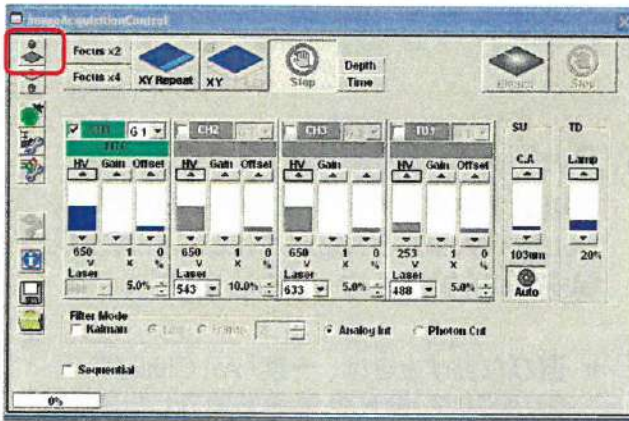
5. (クロス)接眼レンズを通して、蛍光ビーズを確認しフォーカスをあわせませます。

6.  EPIボタンを再度クリックして、シャッタを閉じ、励起光を切ります。

## 2Pの光学調整(像位置調整)



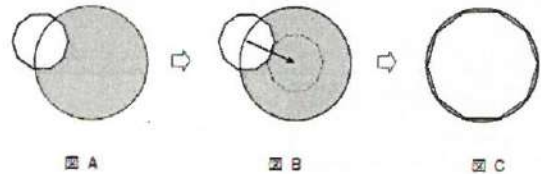
## 2・4



### 【透過コンデンサの心出し調整】

1. 蛍光ミラーユニットターゲットを”6: DIC” にします。
2. Transボタンをクリックし、ハロゲンランプ光を照射します。
3. <sup>像に合わせる</sup> 視野絞りを絞り、絞りの像が標本面の中心にフォーカスされるように、コンデンサ上下動ハンドルと、コンデンサ心調整つまみで調節します。

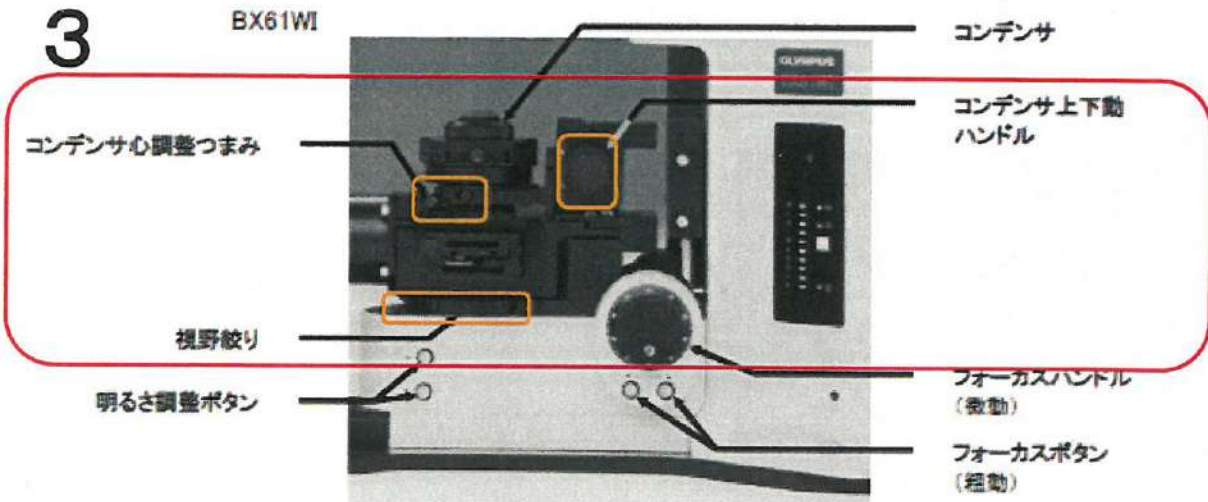
調節後は、視野絞りを徐々に開いていき、絞りの像が視野に外接する程度開きます。



4. Transボタンをクリックし、ハロゲンランプ光を切ります。

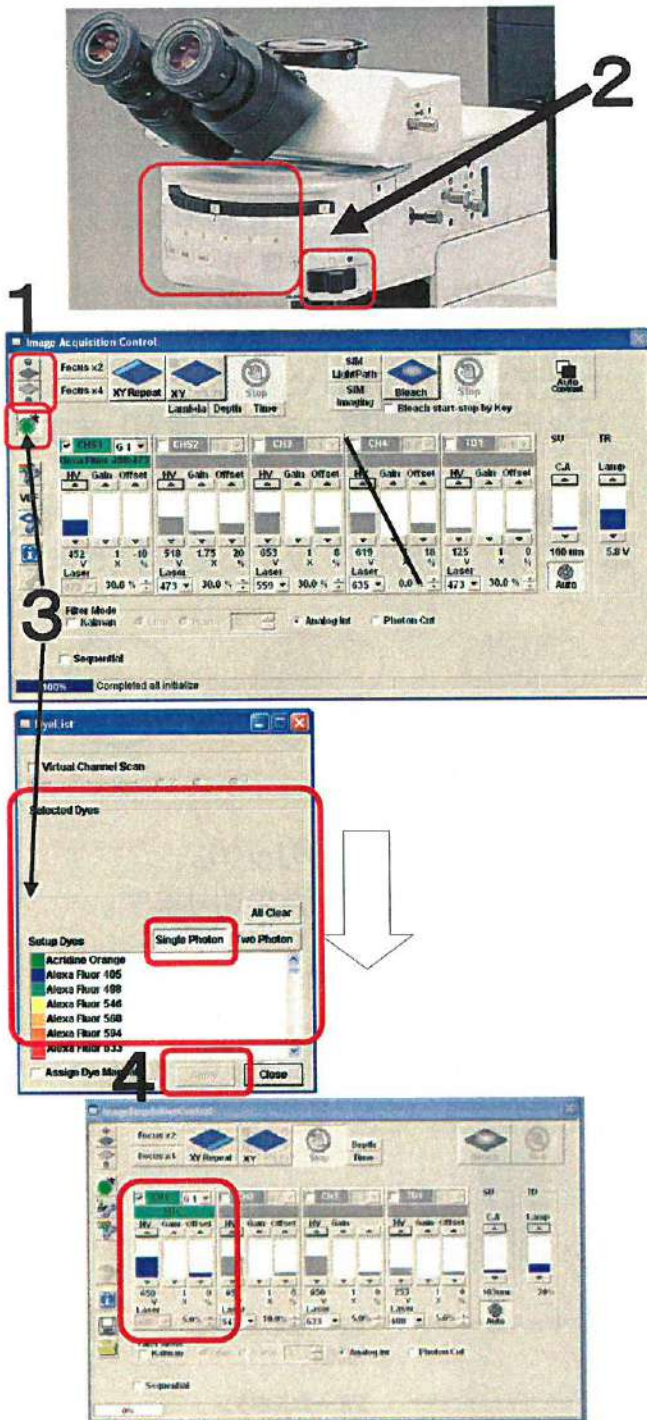
## 3

BX61WI





## 2Pの光学調整(像位置調整)

### 【蛍光ビーズ・標本の“共焦点画像”の取得】



Dye Apply後の画面

1. FV10-ASWソフトウェアの  をクリックし、  
 蛍光ランプのシャッターを閉じます。  
 (微分干渉で目視観察していた場合は、  
 をクリックし、ハロゲンランプの  
 シャッターを閉じます。)

2. ミラーユニットターレットで、“1:LSM” の  
 キューブを選択します。またマニュアル  
 シャッターをOpen O の位置にします。

3. DyeListボタン  をクリックし、  
 Single Photon ボタンを押した状態で、  
 Setup DyesからAlexa Fluor 488やEGFP  
 等を選びダブルクリックします。

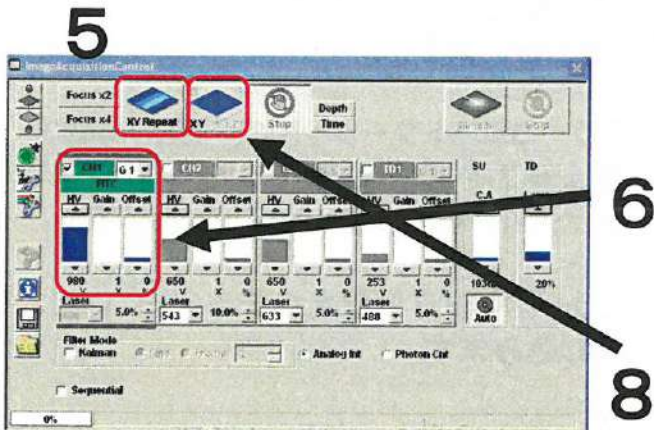
\* 選びなおすときは、一度「All Clear」を  
 クリックして 蛍光色素名を消去した後に  
 操作3を行います。

4. Apply ボタンをクリックします。

(DyeListパネルは、CloseボタンでCloseできます)

## 2Pの光学調整(像位置調整)

### 【蛍光ビーズ・標本の“共焦点画像”の取得】



5. XY Repeat ボタンを押して、スキャンします。

6. 緑色 (FITC) 画像の調整をします。レーザー (473/488nm) の出力は3%以下で十分です。PMTの感度調整をHVで基本は行います。

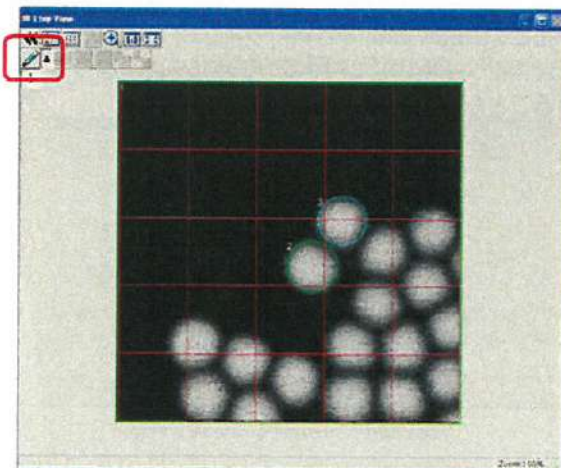
7. ZOOM を15~20x程度掛けます。






(1xずつズームを掛けていき、ビーズ像が視野から外れたらステージを動かし、視野の真ん中に持ってきます。)

8. XY ボタンを押して、撮像します。  
(XYZになっていたら、Depthを解除すること)

9

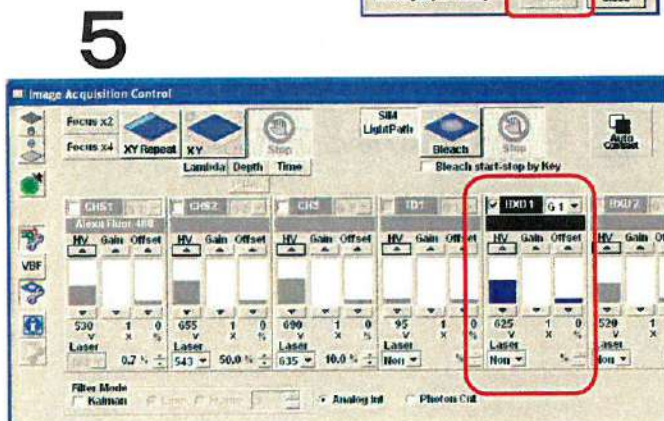
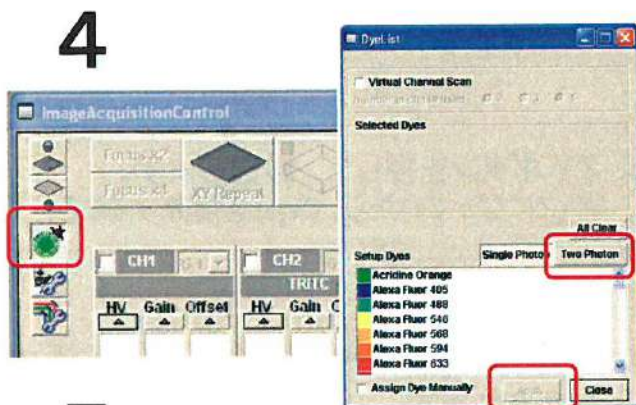
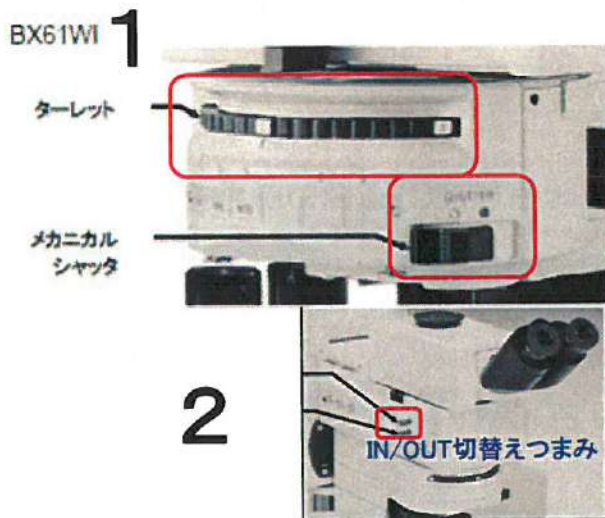


9. 取得した蛍光ビーズ像はLive View上で表示されます。

 をクリックすると表示されるROI Toolで、 や  (Grid)などを選択して、  
蛍光ビーズ像位置をマークします。

## 2Pの光学調整(像位置調整)

### 【蛍光ビーズ・標本の“2光子励起画像”の取得】




\* 共焦点観察で取得した像位置に対して、2光子励起での像位置を合わせ込む調整を行います。

1. ミラーユニットターレットで、“NRDM690” キューブを選択します。またマニュアルシャッターをOpen O の位置にします。
2. ミラー IN/OUT切替つまみを右(IN)に押し込みます。

3. 室内の蛍光灯を消灯し、顕微鏡付近を暗室状態にします。

4. DyeListボタン  をクリックし、Two Photon ボタンを押して、Apply ボタンをクリックします。

ちなみに、Light Path & Dyesボタン  をクリックすると、[Light Path & Dyes]ウィンドウを表示します。[Excitation DM]が 2P用の“RDM690”になっていることが確認できます。

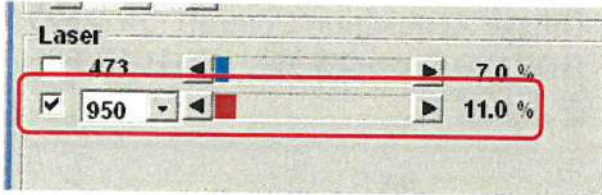


5. [Image Acquisition Control]ウィンドウで、[BXD2]にチェックを入れます。

## 2Pの光学調整(像位置調整)

### 【蛍光ビーズ・標本の“2光子励起画像”の取得】

6



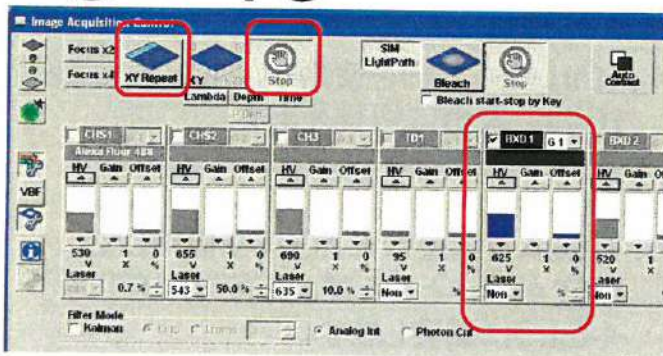
6. [Acquisition Setting]ウィンドウの [Laser]のIRレーザにチェックを入れ、使用する波長をプルダウンから選択します。

(蛍光ビーズでは、レーザ出力は3%以下で十分です。強過ぎるとビーズが壊れます。)

- 2P画像の調整—外部PMT(BXD)を使用  
7. 共焦点時と同じZoom倍率を掛けます。



8 10



8. XY repeat ボタンをクリックし、スキャンを開始します。  
\* レーザパワーは1%程度から始め、必要に応じて徐々に上げます。(蛍光ビーズは通常2~3%程度)  
\* 外部ディテクタのHVはHV500V程度、スキャン速度は2us/Pixelで通常観察できます。

9. 位置調整つまみX,Yを使用して、先の共焦点で取得した像に対しLive View上で付けた目印に、2Pのビーズ像が来るように調整します。

10. 調整後は[Stop]ボタンをクリックし、繰り返しスキャンを止めます。

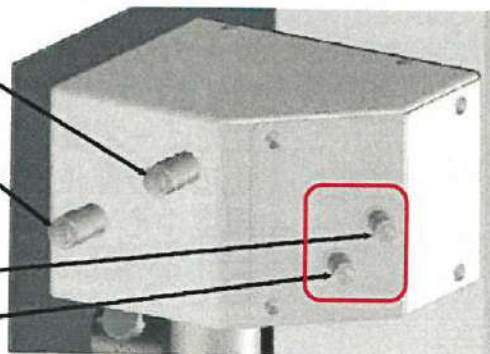
9

視野ムラ調整つまみ Y

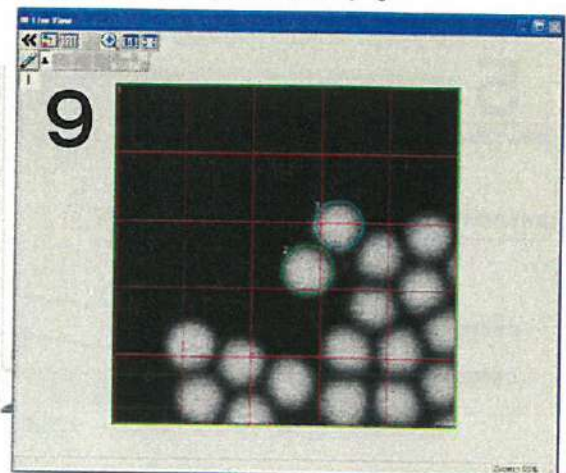
視野ムラ調整つまみ X

位置調整つまみ X

位置調整つまみ Y

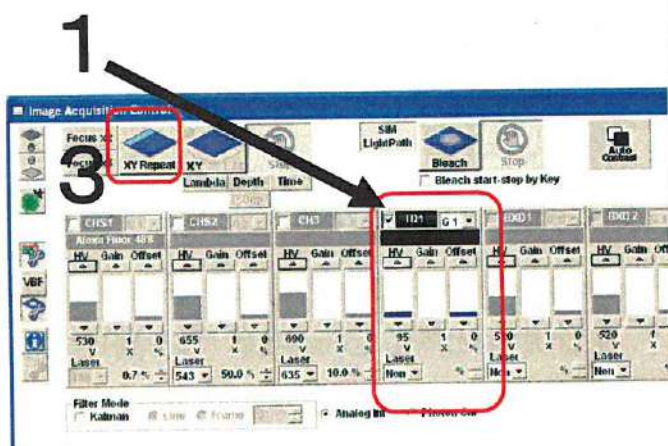


光学調整ユニット

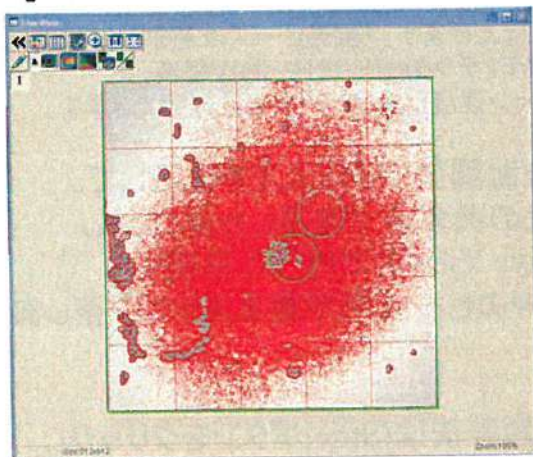


## 2Pの光学調整(視野ムラの調整)

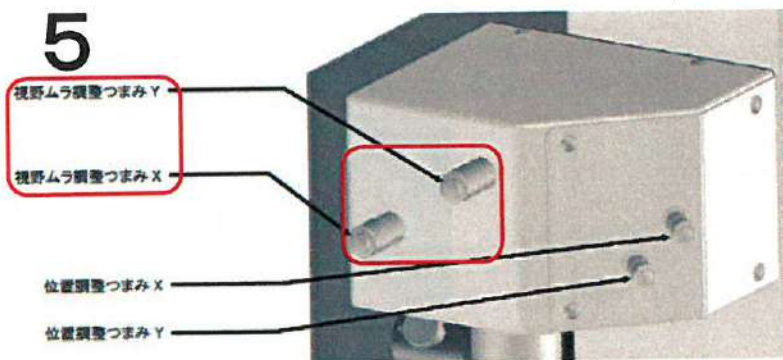
### 【“2光子励起”の視野ムラ調整】



4



5



光学調整ユニット

### 2P画像の調整—透過PMT(TD1)を使用

1. [Image Acquisition Control] ウィンドウの [BXD]のチェックを外し、[TD1]にチェックを入れます。

2. Zoom 1X にします。



3. XY repeatボタンをクリックし、Live View上に繰り返しスキャン画像を表示します。

4. “Ctrl + H”キーを使用し、画像のLUTをHi-Low表示に切替えます。

5. 視野ムラ調整つまみX,Yを使用して、輝度が高いところが、画面の中心にくるように調整します。

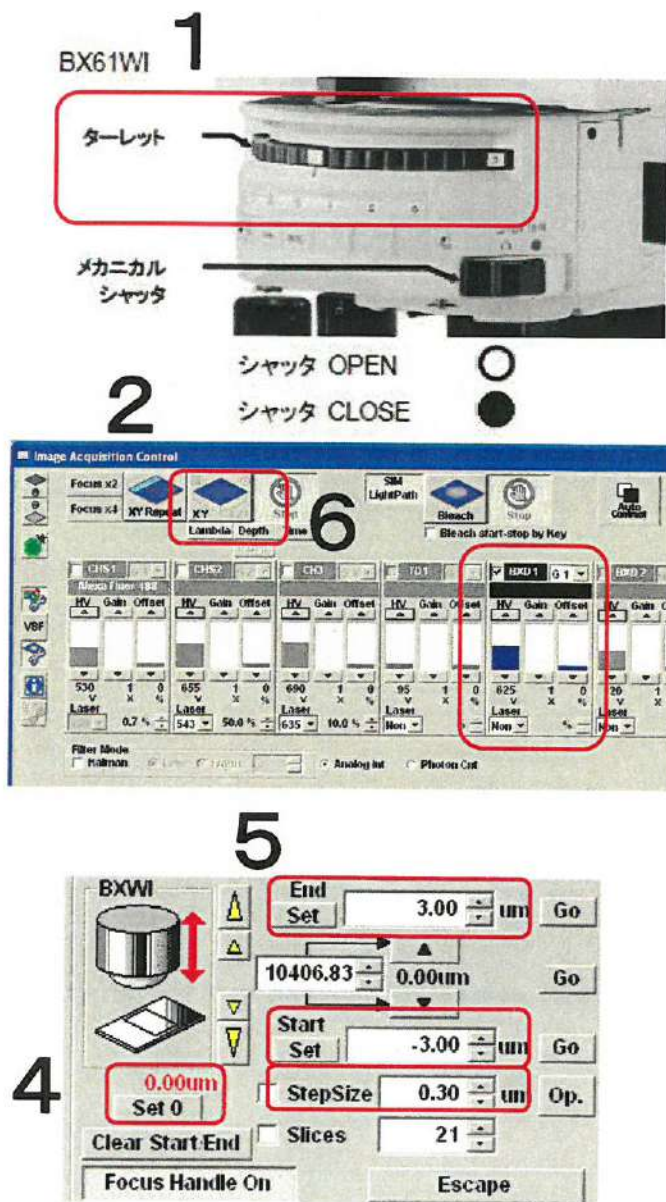
6. 調整後は[Stop]ボタンをクリックし、繰り返しスキャンを止めます。


以上の像位置と視野ムラの調整を繰り返して、最終的に共焦点での蛍光ビーズ像の目印位置が、2光子励起での像位置と一致し、輝度中心が透過画像の中心に来るように調整します。



## 2Pの光学調整(蛍光ビーズ・標本での連続断層像確認)

### 【蛍光ビーズ・標本の連続断層像取得】



1. 蛍光ミラーユニットターレットを、”NRDM690“にしておきます。
2. [TD1]のチェックを外し、暗室状態の上で、[BXD2]にチェックを入れます。
3. Zoom  を15~20X程度に設定します。
4. 蛍光ビーズ・標本の中心にフォーカスをあわせ、[Set 0]をクリックします。
5.  $\phi 2 \mu\text{m}$ 径ビーズの場合は、Z撮像レンジを $\pm 3 \mu\text{m}$ 程度に設定します。またStep Sizeを $0.3 \mu\text{m}$ 前後にセットします。
6. Depthボタンを押した状態で、“XYZ” ボタンをクリックして、XYZ画像を取得します。
7. 取得したXYZ画像の断面を確認し、蛍光ビーズ像が大きく斜めになっていないかを確認します。

