



ライカ LMD6000

レーザーマイクロダイセクション
システム

Leica
MICROSYSTEMS

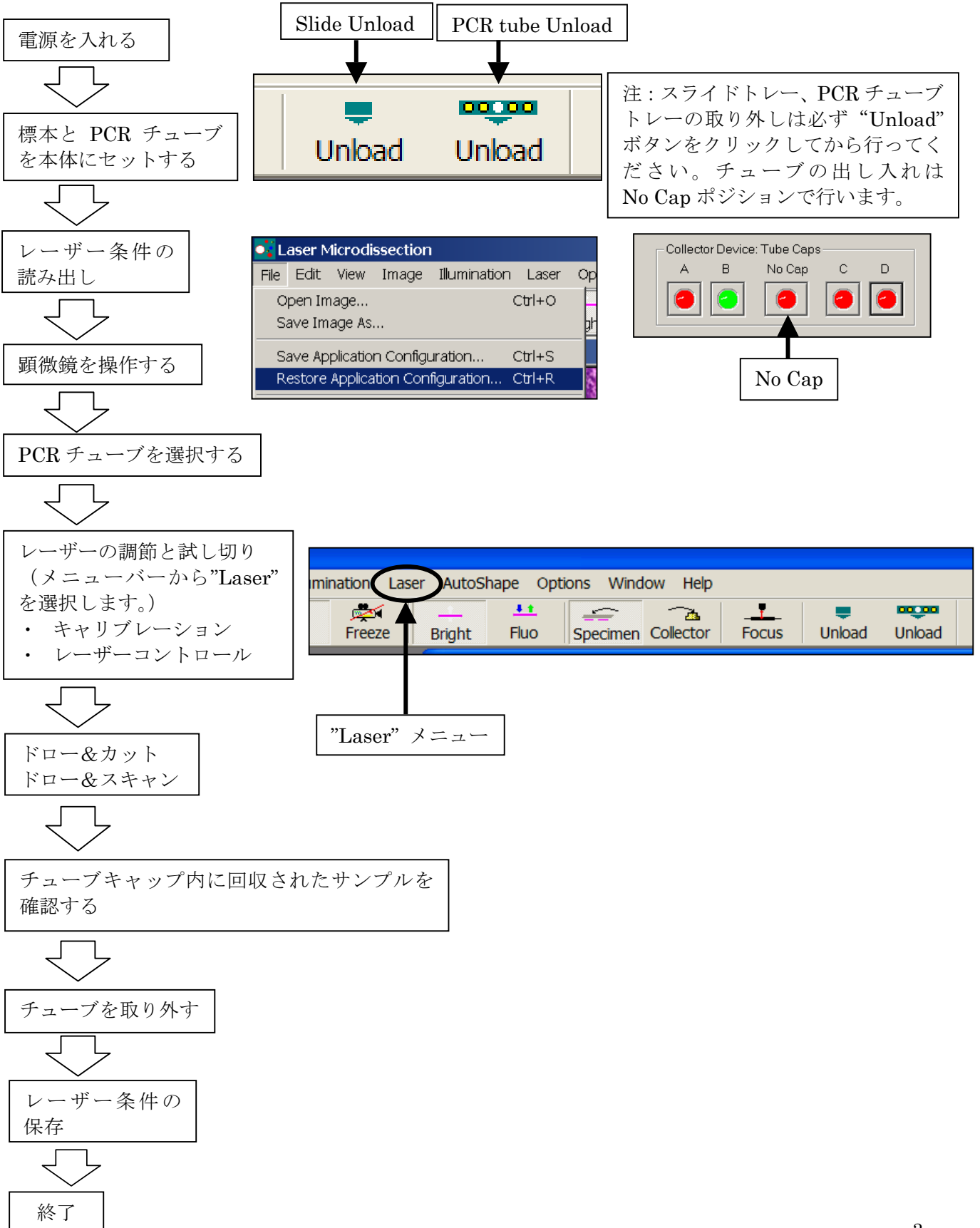
LMD6000 S/W: Ver.6.4

取り扱い簡易マニュアル

1.	基本操作.....	3
1-1.	作業フロー.....	3
1-2.	システムの起動.....	4
1-3.	標本と PCR チューブを本体にセットする	4
1-4.	顕微鏡を操作する.....	6
1-5.	PCR チューブを選択する	8
1-6.	レーザー条件の調整とサンプルのカッティング.....	9
1-7.	チューブキャップの確認.....	12
1-8.	チューブの取り外し.....	12
1-9.	レーザー条件の保存.....	12
1-10.	終了.....	13
2.	特徴のある機能	14
2-1.	マルチカッティング.....	14
2-2.	ライブ計測機能.....	17
2-3.	画像の保存.....	19
2-4.	オーバービュー機能.....	20
2-5.	ステージ位置の記憶.....	23
2-6.	蛍光観察とレーザーカッティング.....	24
参考①:	PCR チューブポジションの調整について.....	26
参考②:	カットラインの精度調節について.....	27
参考③:	オフセットについて.....	28
	消耗品リスト.....	29

1. 基本操作

1-1. 作業フロー



1-2. システムの起動

下記手順に従って電源を入れてください。

1) 電源の入力

☆ 蛍光でのマイクロダイセクションを行う場合は、最初に EL6000 の電源を入れてください。

- ① レーザーのスイッチを入れてください。まずはレーザー電源ボックス背面のスイッチを入れます。

レーザー電源



- ② レーザーボックス前面の鍵を回します。
レーザーはウォームアップが必要です。鍵を回すと、2つあるランプの左側が緑色に点灯します。
ウォームアップが完了すると、緑色のランプが2箇所点灯します。
- ③ 顕微鏡コントロールボックスのスイッチを入れてください。
顕微鏡が初期化されます。次のパソコンのスイッチは初期化が終わってから入れてください。
- ④ パソコンのスイッチを入れてください。

2) LMD6000 ソフトウェアの起動

デスクトップにある”Leica Laser Microdissection”アイコンをダブルクリックしてください。
ステージ部分とレーザー部分の初期化が行われ LMD6000 ソフトウェアが起動します。

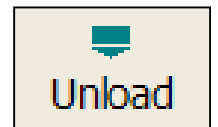
1-3. 標本と PCR チューブを本体にセットする

スライドガラストレイまたは PCR チューブトレイを取り外す場合は、必ず ‘Unload’ ポジションで行ってください。‘Unload’ ポジション以外での取り外しは故障の原因になります。

1-3-1. 標本のセット

1) ‘Unlord’ ボタンのクリック

ツールバーの ‘Slide Unload’ アイコンをクリックして下さい。
ステージが動き、スライドガラストレイが取り外しポジションに移動します。



2) 標本のセット

標本を専用のスライドガラス用トレイにセットし、ステージ上部にトレイごと置きます。
<注意> スライドガラス用トレイは開いている部分が大きく標本セット時にスライドガラスを落としてしまうことがあります。セット時はトレイを机に置いて行ってください。

3) ‘Continue’ のクリック

画面に表示されている ‘continue’ ボタンをクリックして下さい。顕微鏡ステージが動き、作業可能な環境になります。

1-3-2. PCR チューブのセット

1) 'Unlord' ボタンのクリック

ツールバーの 'PCR tube Unload' アイコンをクリックして下さい。
ステージが動き、PCR チューブトレイが取り外しポジションに移動します。

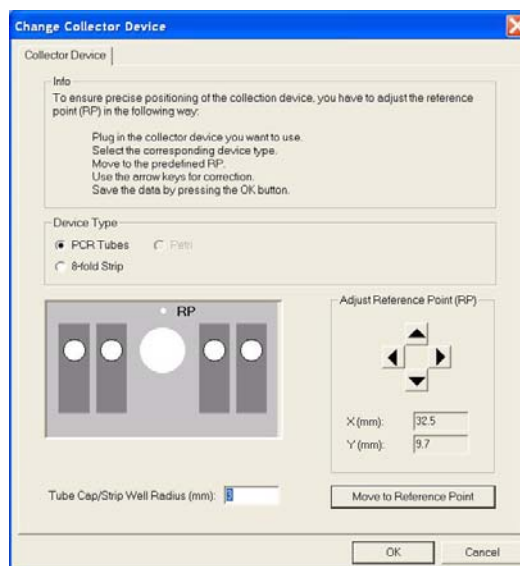


2) PCR チューブのセット

指定の PCR チューブを専用カセットにセットします。チューブを取りつけたカセットを PCR チューブ用トレイにセットし、顕微鏡ステージの下部に置きます。トレイがしっかり固定されるようにセットしてください。

3) 'OK' ボタンのクリック

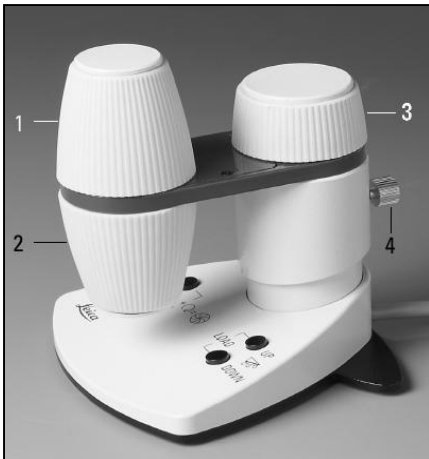
この時点で Collector Device タブが画面に表示されています。この画面中の 'OK' をクリックすると PCR チューブトレイが所定の位置に戻ります。



1-4. 顕微鏡を操作する

1-4-1. スマートムーブからの顕微鏡操作

顕微鏡は画面のライブ画像を見ながらスマートムーブで操作します。
回転ノブ1でステージY方向、2でX方向、3でZ方向（フォーカス）の移動を行ないます。
つまみ4でコントローラーの高さを調節できます。



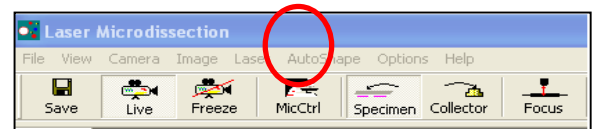
5 : 左側の黒いボタンで対物レンズレボルバーが回転し倍率が変わります。(UP方向: 強拡、DOWN方向: 弱拡)

6 : 右側の黒いボタンでハロゲンランプの電圧調整(明るさ)を行ないます。(UP方向: 明るくなる、DOWN方向: 暗くなる)

1-4-2. ソフトウェアからの顕微鏡操作

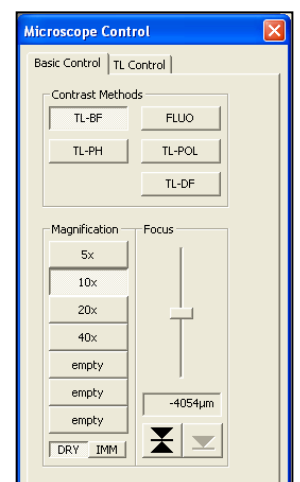
観察方法、対物レンズの倍率、ステージの粗微動変更や光量、視野絞り、開口絞りの調節はソフトウェア上から行なうことができます。

1) ソフト上の”MicCtrl”のアイコンをクリックします。
顕微鏡コントロールパネルが表示されます。



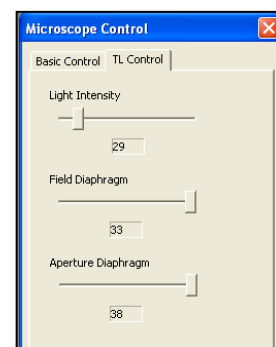
a) 観察方法を変更する場合はコントロールパネル内の’Basic Control’をクリックし”Contrast Methods”から任意の観察方法を選択すると、光学系が位相差、微分干渉などの観察方法に自動的に変更します。(どの観察方法が選択できるかは、装置の仕様に依存します。)

b) 対物レンズの倍率を変更する場合は、”Magnification”から任意の倍率を選んでクリックすると、対物レンズが切り替わります。



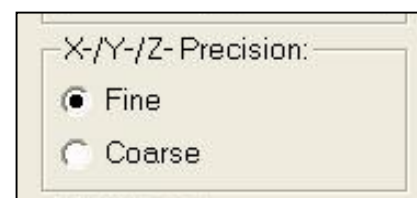
c) 光量調節、視野絞り、開口絞りの調節をする場合は、コントロールパネル内の 'TL Control' をクリックします。

'Light Intensity'、'Field Diaphragm'、'Aperture Diaphragm' を調節します。



2) ステージ XYZ 操作の粗動・微動を変更する場合は、画面右列にある "X/Y/Z-Precision" 欄の "Fine"/"Coarse" から粗動の場合は "Coarse" を、微動の場合は "Fine" を選択してください。

ステージの移動距離が変更されます。



3) 標本全体像を作成しての顕微鏡操作

→P.20 オーバービューからの顕微鏡操作をご参照ください。

1-5. PCR チューブを選択する

ソフトウェア起動時には PCR チューブは選択されておらず No Cap の位置からスタートします。

画面左下にある Tube Caps のアイコンでチューブの選択します。現在選択されているチューブが緑色で表示されます。A~D で回収したいチューブをクリックして下さい。選択したチューブが標本の下に移動し、アイコンが緑色に変わります。

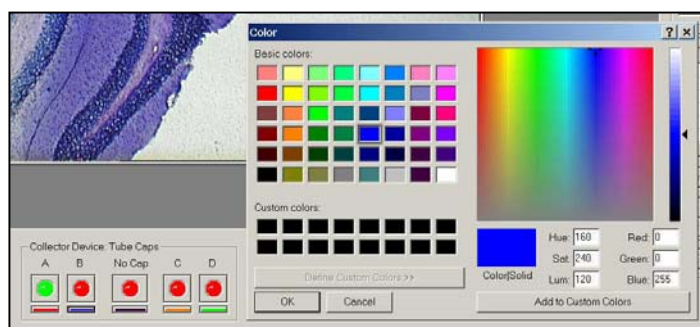


1-5-1. カラーコーディング

ドロラインの色を変えることができます。特に、マルチカットの場合は回収チューブごとに色を変えることができるので非常に便利です。

“Collector Device”の各 Tube Cap アイコン下部に選択したチューブを何色でドロイングするか表示されています。

色の部分をクリックすると Color Palette が現れるので、好きな色を選択して OK をクリックします。

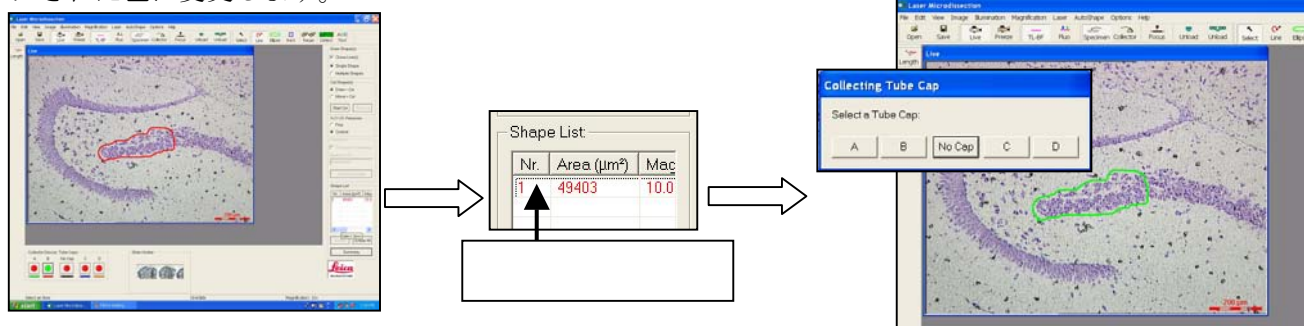


1-5-2. ドロラインの回収先チューブの変更

レーザーでのカッティングに関しては 1-7 節で説明しますが、一度ドロイングしたダイセクション領域の回収先 PCR チューブを変更することができます。

ドロイング後の回収先を変更するには、まず Shape List の変更したい領域をマウスの右ボタンでクリックして下さい。

右クリックを行なうと Tube Cap を選択するウィンドウが表示されますので、新たな回収先のチューブをクリックして下さい。その時点で回収先が変更し、ドロラインの色も回収先チューブにコーディングされた色に変更します。



1-5-3. チューブ名の変更

Collector Tube の名前を指定することができます。A, B など文字の部分をクリックすると別の名前を表示させることができます。入力できる文字数は 5 文字までです。



1-6. レーザー条件の調節と実際のカッティング

1-6-1. レーザーキャリブレーション

レーザーキャリブレーションはソフトウェア起動時に各対物レンズにつき1回実行してください。キャリブレーションを行なう前にカッティング作業を始めることはできません。

(キャリブレーションは、レーザーカットに使うレンズのみでかまいません。)

1) キャリブレーションを行う場合はステージを動かして、画面にフィルムのみが移っている状態にしてから実行します。(サンプルのある場所で実行するとキャリブレーション作業によりサンプル部分をカットしてしまいます。)

2) レーザーメニューから 'Calibrate...' を選択して下さい。

3) 画面の 'OK' 部分をクリックするとキャリブレーションが始まります。

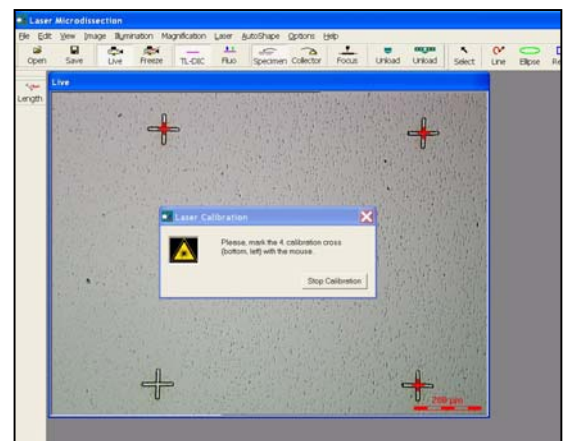


4) 画面の右上部分でレーザーがフィルムを十字にカットします。マウスのカーソルも十字型になっているのでそれぞれの十字を合わせクリックします。

5) 連続して画面の左上、右下、左下をキャリブレーションしますので4)と同じ作業を行ないます。

6) 最後に 'OK' をクリックしキャリブレーションを終了します。

注意) カットモードが 'Move + Cut' モードになっているとレーザーキャリブレーションはできません。キャリブレーションを行う場合は必ず 'Draw + Cut', 'Draw + Scan' を選択してください。



1-6-2. 標本の試し切りから本番のカッティングへ

標本を一度のカッティングで確実に回収するために、予め標本内の 'いらない' 場所で試し切りを行います。試し切りの操作は本番のカッティング操作と同じです。

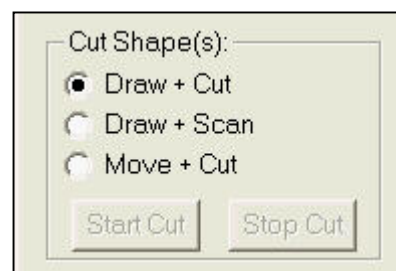
1) 'Line' 'Ellipse' または 'Rect' アイコンを選択します。



2) マウスで任意の形にドローイングを行ないます。(円を描く場合は Ellipse を選択し、Shift を押しながらドローイングして下さい。)



3) Cut Shape(s)から、サンプルをどのように回収するか、カットモードを選択します。



※レーザーでのカットモードは‘Draw + Cut’、‘Draw + Scan’ と ‘Move + Cut’ の3種類あります。

Draw + Cut モード

‘Draw + Cut’モードは、ドローラインをレーザーでカットすることにより、ドローイングして囲んだ範囲のサンプルをPCRチューブのキャップの中へ切り落とすための機能です。

Draw + Scan モード

‘Draw + Scan’モードは、ドローイングにより囲んだ範囲の上部からレーザーを左右に走査させ、その範囲の全面にレーザーを当てる機能です。サンプルを標本スライドから引き剥がすようにして回収します。



Move + Cut モード

このモードでは、ドローラインを確認してからのカットिंगではなくマウス（ペン型カーソル）の動きに合わせていきなりカットिंगが始まります。

ドローラインを確認する必要がない場合や切り残しを切り落とす際に有効なカットモードです。

注意) ‘Move + Cut’モードのままではレーザーキャリブレーションはできません。キャリブレーションを行う場合は必ず‘Draw + Cut’、‘Draw + Scan’に戻してから行ってください。

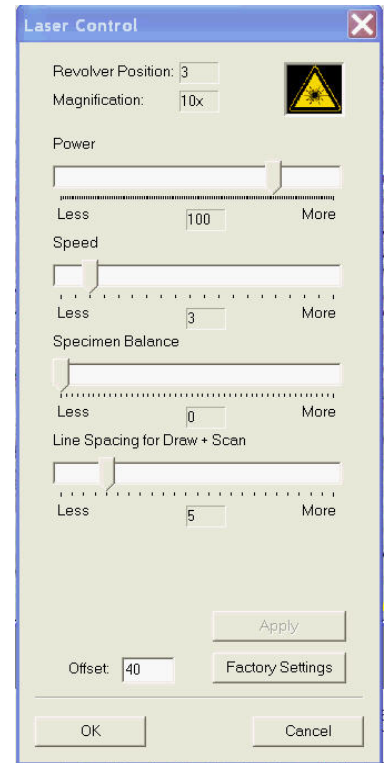
4) メニューの‘Start Cut’ボタンをクリックするとカットिंगが自動的に行なわれます。

5) ファインなカットラインでサンプルを回収できれば試し切りの完了です。そのまま本番のカットを行ないます。

1-6-3. レーザーコントロール

試し切りで切れなかった場合、レーザーコントロールパネルでレーザーの調節を行ない、切れる条件を確認します。

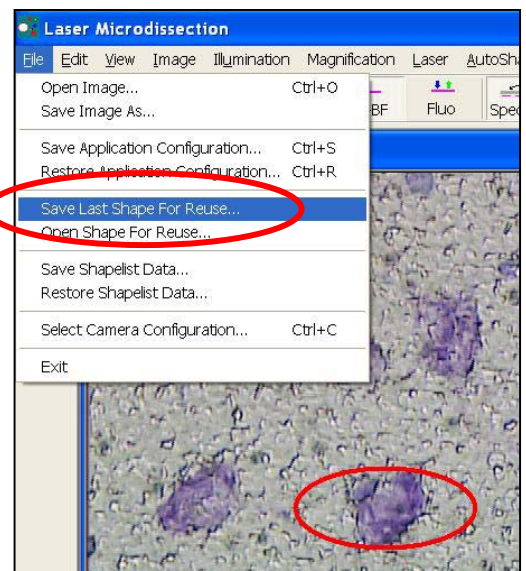
- 1) レーザーメニューから ‘Control...’ を選択して下さい。
 - 2) コントロールパネルの ‘Power’ でレーザーパワーとカットラインの太さを調節します。
 - 3) コントロールパネルの ‘Speed’ でカット速度を調節します。
 - 4) ‘Power’ は大きいほど良く切れ、‘Speed’ は遅いほど良く切れます。まずはこの 2 つのファクターで十分切れる条件を探します。
 - 5) ”Specimen Balance” は、‘Draw + Cut’ モードでのカットの際にレーザーカットでの “切れ残り” を防ぐために、カッティングの後半で出力を上げてより確実に落下させる機能です。特に x 40 以上の対物レンズを使った場合の小さいサンプルの回収に有効です。0 ~ 50 の数値を入力できます。
 - 6) ”Line Spacing for Draw + Scan” は、‘Draw + Scan’ モードでのカットの際に Scan にかかる時間を短縮するため、レーザーラインの間隔を調節する機能です。0 ~ 25 の数値を入力できます。
- 5) 値を変更した場合、必ず ‘Apply’ をクリックして下さい。
- 6) 設定を保存する場合は “Save Application Configuration” で保存できます。(参照 ; P. 12 1-9. レーザー条件の読み出し)



1-6-4. Cut shape の保存

最後にドローイングしたラインの形を保存することができます。

最後に描いたドローラインを保存するには、File から “Save Last Shape for Reuse” を選択して下さい。名前を付けて保存することができます。保存したドローラインの形を呼び出すには、File から “Open Shape for Reuse” を選択して下さい。開いた Window から保存してあるファイルを Open すると、画面上にドローラインが表示されます。



1-7. チューブキャップの確認

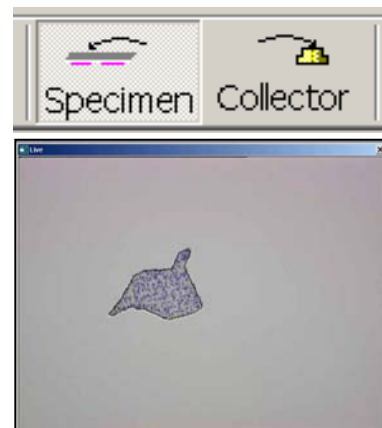
回収したサンプルの確認ができます。

1) ‘Collector’ アイコンをクリックして下さい。顕微鏡ステージが移動し、キャップの内部を確認できます。

2) エルゴコントローラーでフォーカスを回収バッファー水面に合わせます。

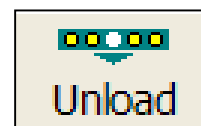
3) エルゴコントローラーでキャップを XY 軸方向に動かし、サンプルを探します。

4) ‘Specimen’ アイコンをクリックするとステージは元の位置に戻ります。



1-8. チューブの取り外し

実験終了時またはチューブ交換時は必ず‘Unload’アイコンをクリックして取り外してください。



1-9. レーザー条件の保存

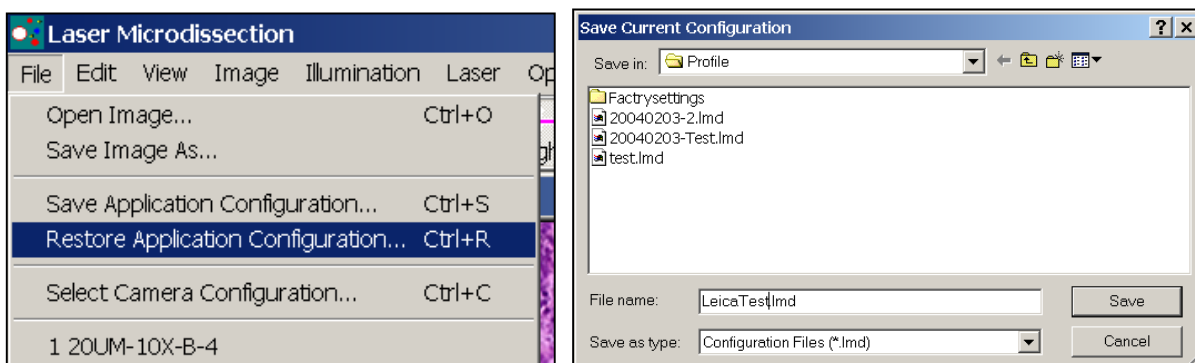
一度設定したレーザー条件・顕微鏡設定・ソフトウェア設定は保存、読み出しが可能です。初めてのサンプルの場合は“1-6. レーザー条件の調整と試し切り”でレーザー条件の設定が必要ですが、2回目以降の場合サンプルごと、使用者ごとの条件がファイルで保存・読み出しができます。

1) 条件の保存

ファイルメニューを開くと“Save Application Configuration” “Restore Application Configuration”というタブがあります。条件保存の場合は“Save Application Configuration”を開き、名前を付けてファイル形式で保存します。

2) 条件の読み出し

次回保存したレーザー条件を用いて作業する場合には、“Restore Application Configuration”から使用する条件のファイルを開いてください。以前に設定した条件が適用されます。(この際、レーザー条件だけでなく顕微鏡設定やソフトウェア設定の条件も同時に適用されます。)



1-10. 終了

1) LMD6000 ソフトウェアの終了

メニューバーの“File”から“Exit”を選択し、終了して下さい。あるいは画面右上の“×”ボタン（close ボタン）をクリックしてください。

2) Windows の終了

画面左下の“Start”メニューから“Shut Down”を選択してください。Windows 終了のダイアログが表示されますので“Shut Down”を選択し、“OK”をクリックしてください。Windows が終了し、パソコンの電源が切れます。

3) 電源の終了

- ① 顕微鏡コントロールボックスのスイッチを切ってください。
- ② レーザーのスイッチを切ってください。（前面鍵を回し、背面のスイッチを切ります。）

2. 特徴のある機能

2-1. マルチカッティング

1) シングルカット

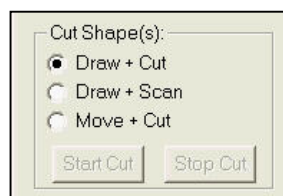
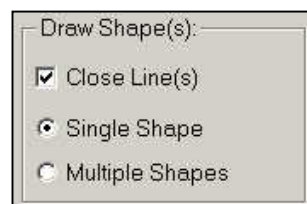
シングルカットは1ヶ所ずつ確実にカッティングと回収をおこなうカットモードです。
システム起動時にはシングルカットモードで起動します。

シングルカットモードを選択する場合は、画面左上の“Select”アイコンを選択し、画面右上の”Draw Shape(S)”メニューから”Single Shape”を選択します。

ドローイングを行うには“Line”, ‘Ellipse’, ‘Rect’ アイコンを選択し、マウスの左ボタンをドラッグしながら必要な領域の周囲を囲います。

カットを行うには、画面右中段の”Cut Shape(s)”メニューにある”Start Cut”をクリックします。

途中でカットを止める場合は”Stop Cut”をクリックしてください。



注：“Start Cut”をクリックすると画面のフォーカスが動くことがあります。カット時のフォーカスは、最初にドローイングしたフォーカス位置に戻ってカットを行います。この機能はレーザーのフォーカスを標本に確実に合わせるために重要な機能です。ソフトウェアのバグ、ハードウェアの故障等ではありません。

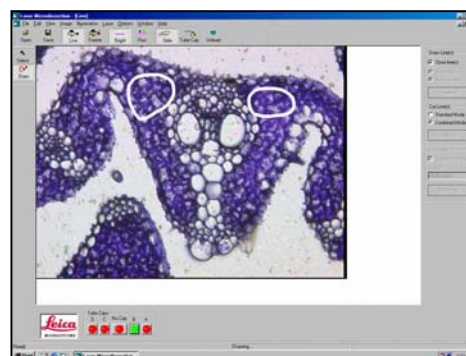
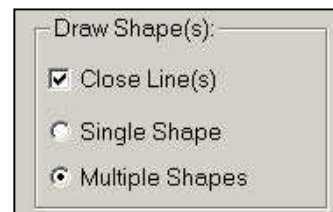
2) マルチカット

マルチカットモードは、複数の領域を一度のカッティング操作で回収するカットモードです。

マルチカットモードを選択する場合は、画面左上の“Select”アイコンを選択し、画面右上の”Draw Shape(S)”メニューから”Multiple Shapes”を選択します。

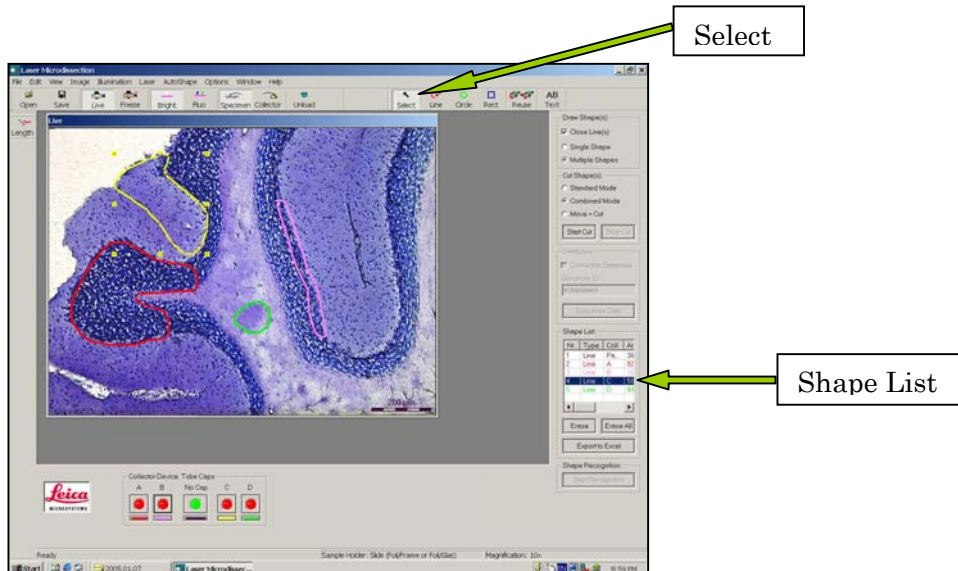
次に回収するチューブを選択します。
チューブ選択後、メニューの“Line”, ‘Ellipse’, ‘Rect’ アイコンを選択し、マウスの左ボタンをドラッグしながら必要な領域の周囲を囲います。

必要な領域を全て囲い終わったら画面右中段の”Cut Shape(s)”メニューにある”Start Cut”をクリックして下さい。
ドローイングした順番にカッティングが始まります。



マルチカットで一度描いた領域を選択してカッティング、あるいは消去することができます。

領域を選択するには、”Select”アイコンをクリックし、ライブ画像内の任意の領域を選んでクリックするか、画面右下の`Shape List`から該当する図形の欄を選択してください。



複数の領域を選択するには、キーボードの”Ctrl”を押しながら任意の領域の欄を選択します。また、ある欄を選択しておき、さらに”Shift”を押しながら任意の欄をクリックすると、選択しているところからそこまでの領域が一気に選択されます。

Nr.	Area (μm^2)	Mag
1	25174	10...
2	27498	10...
3	13603	10...
4	23613	10...
5	19901	10...

Total selected area (μm^2):
109790

Erase Erase All

Summary

Ctrl を押しながら任意の図形選択をした場合

Nr.	Area (μm^2)	Mag
1	7856	10...
2	2913	10...
3	7048	10...
4	7096	10...
5	12694	10...

Total selected area (μm^2):
37607

Erase Erase All

Summary

Shift を押しながら任意の図形選択をした場合

領域を選択し、'Cut Shape(s)'の”Start Cut”をクリックすると、選択したところのみ Cutting されます。また、任意の領域のみ消去する場合には、領域を選択した状態で **Shape List** の下の”Erase”をクリックしてください。全ての図形を消去する場合には、”Erase All”をクリックしてください。

3) チューブ選択マルチカット

チューブ選択マルチカットはカッティングを行う前に、回収する領域をそれぞれのチューブに回収するか決定してからカッティングを行うモードです。

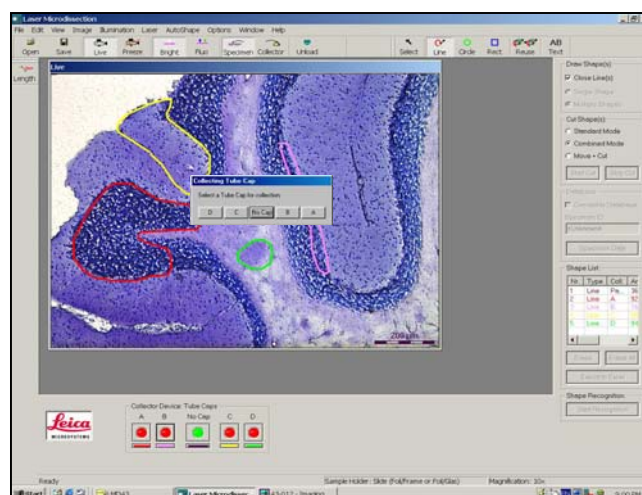
(例えば、癌細胞のみをチューブ A に回収し、正常細胞をチューブ B に回収するという操作が事前に決定できます。)

この機能により、分配回収機能をより有効に活用することができます。

ドローイングの方法は基本的にマルチカットの場合と同じです。

チューブ選択マルチカットにするには、最初にチューブを”No Cap”に合わせます。

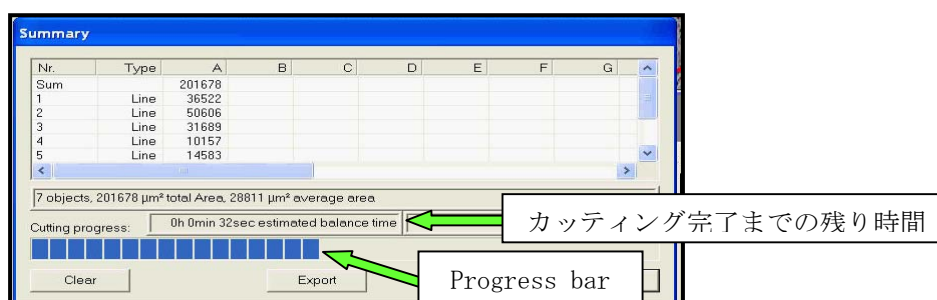
”Select”アイコンを選択し、”Draw Shape(S)”メニューから”Multiple Shapes”を選択します。 ”Line”, ”Circle”, ”Rect” アイコンを選択しドローイングを行うとその都度どのチューブに回収するか確認されますので、チューブを選択します。 ”Start Cut”でカッティングが始まり、分配回収を行います。



4) マルチカット選択時のカッティング完了時間、progress bar の表示

マルチカットで複数の領域をカッティングする場合は、作業を開始すると自動的に window が開き、カッティング完了までの残り時間と progress bar が表示されます。

この機能を設定する場合には、’Options’メニューから’Settings’、’Misc’の中の’Show Progress bar during cutting’ にチェックを入れてください。

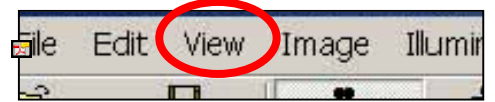


2-2. ライブ計測機能

ライブ画面上で計測が可能です。

1) スケールバー表示

ライブ画面上にスケールバーを表示することが可能です。
スケールバーを表示するにはメニューの“View”から“Scale Bar”を選択して下さい。



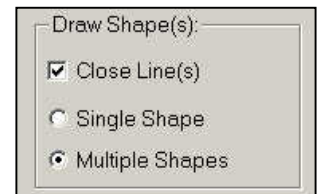
2) 長さ計測

ライブ画面上の長さを計測するには“Length”アイコンを選択し計測したい部分の始点から終点までマウスをドラッグして下さい。長さが表示されます。



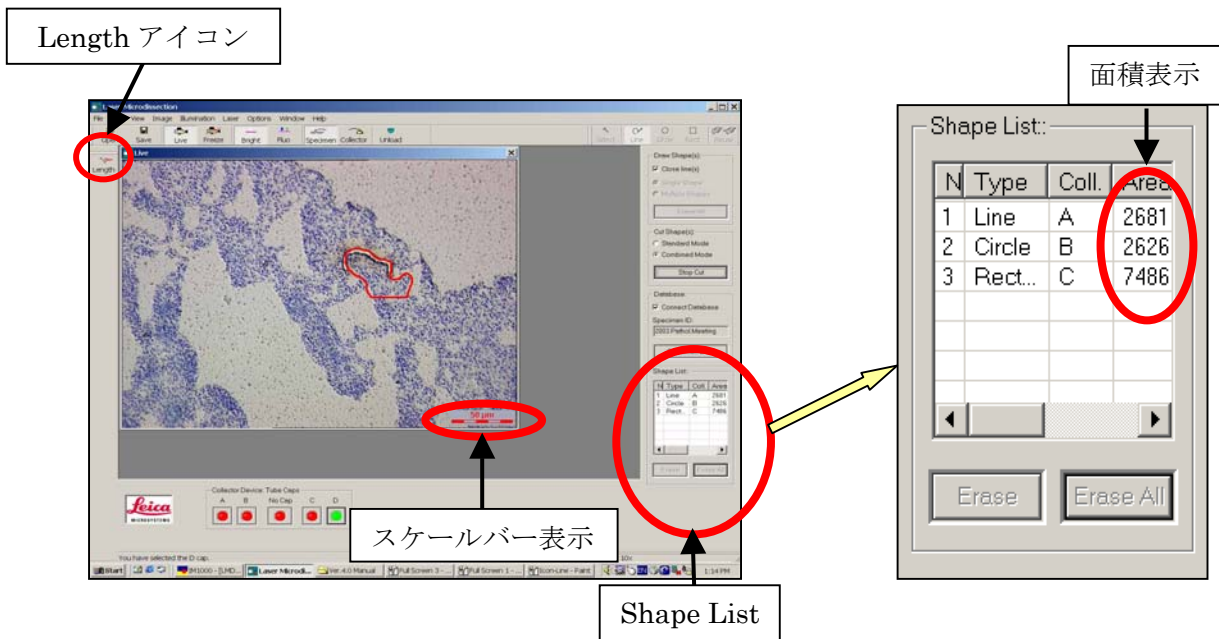
3) 面積計測

ドローイングした領域の面積は画面右下の Shape list に表示されます。
ドローイングを行なった時点で表示されていますのでその都度確認して下さい。
注意：“Draw Shape(s)”内の“Close Line(s)”チェックボックスが外れている場合、面積は0となります。面積表示が必要な場合は必ず“Close Line(s)”にチェックマークを入れてください。



4) Shape List

画面右下に Shape List が表示されています。ここではドローイングのタイプや回収するコレクター、ドローイング部分の面積などが表示されます。



Length アイコン

面積表示

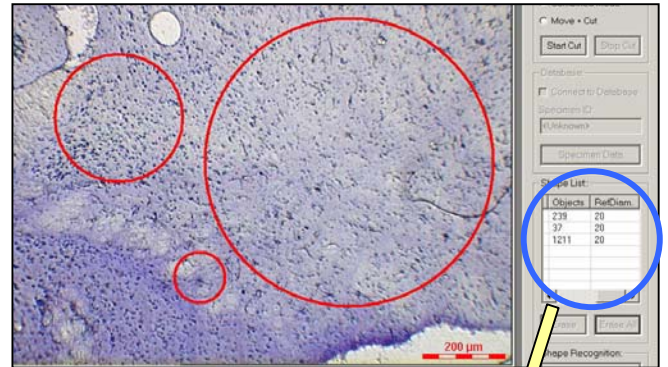
スケールバー表示

Shape List

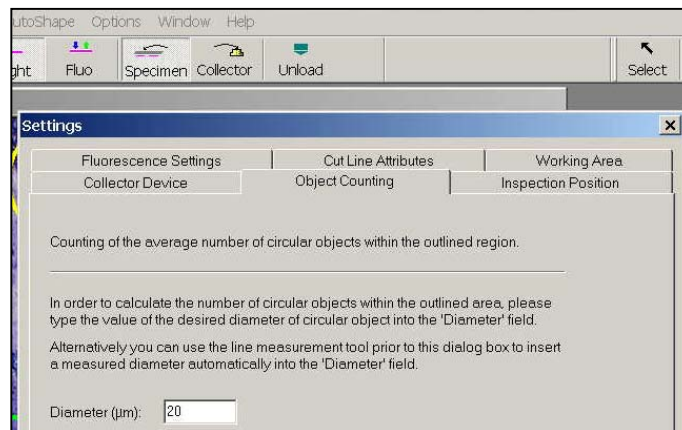
N	Type	Coll.	Area
1	Line	A	2681
2	Circle	B	2626
3	Rect...	C	7486

5) Object Counting 機能

“Shape List” のスクロールバーを右に移動すると、Object、RefDiam. という欄があり数字が表示されています。これはドローラインで囲まれた部分に指定した直径の図形（直径：RefDiam.）が何個含まれているかを“Object”欄に表示する機能です。目的の細胞の大きさがわかっているならば、その細胞の直径を“RefDiam”に設定することにより、回収範囲におおよそ何細胞含まれているかをカウントします。



“RefDiam”の設定は、“Option”メニュー“Settings”の“Object Counting”で変更できます。



Shape List:

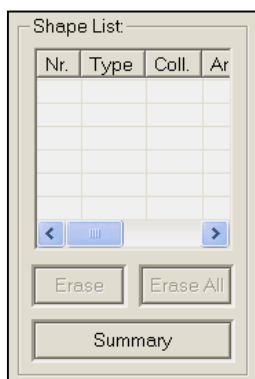
Objects	RefDiam.
239	20
37	20
1211	20

Diameter(µ m)のところに指定する直径の数値を入力してください。

6) Shape List の保存

表示されているリストは Excel ファイルでの保存が可能です。

“Shape List”内の“Summary”アイコンをクリックすると今までカットした累積データがリストで表示されます。“Export”をクリックするとリストをエクセル形式で保存できます。保存するフォルダをプルダウンから選択し、ファイルに名前を付けて保存してください。



Summary

Nr.	Type	A	B	C	D	E	F	G	H
Sum			69237	0					
1	Ellipse		25888						
2	Ellipse		43349						
3	Line			0					
4	Line			0					
5	Rectan...			0					

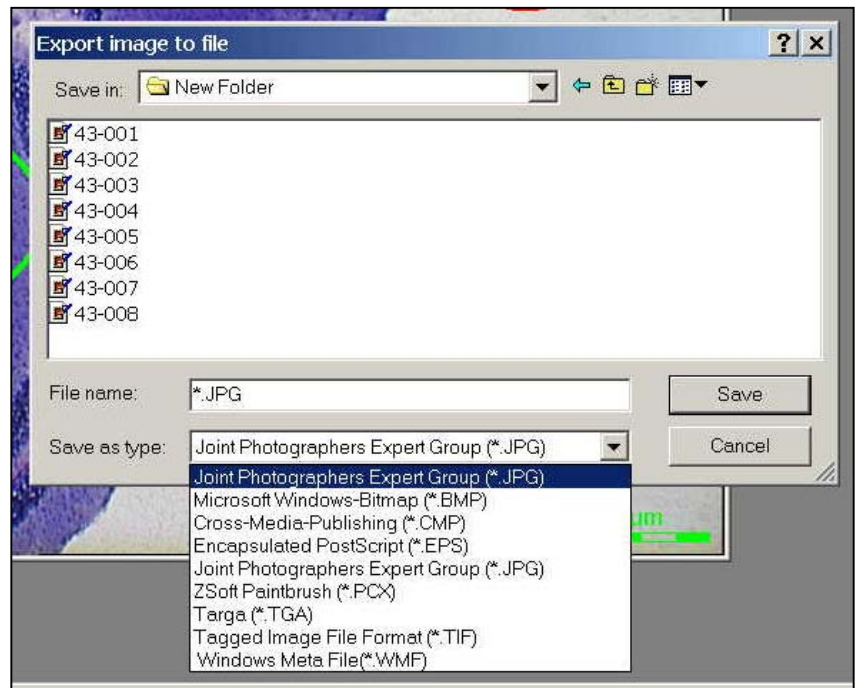
8 objects, 69237 µm² total Area, 8654 µm² average area

Clear Export OK

2-3. 画像の保存

画像を保存する場合はメニューアイコンの“Save”を選択してください。任意のフォルダに名前を付けて保存します。

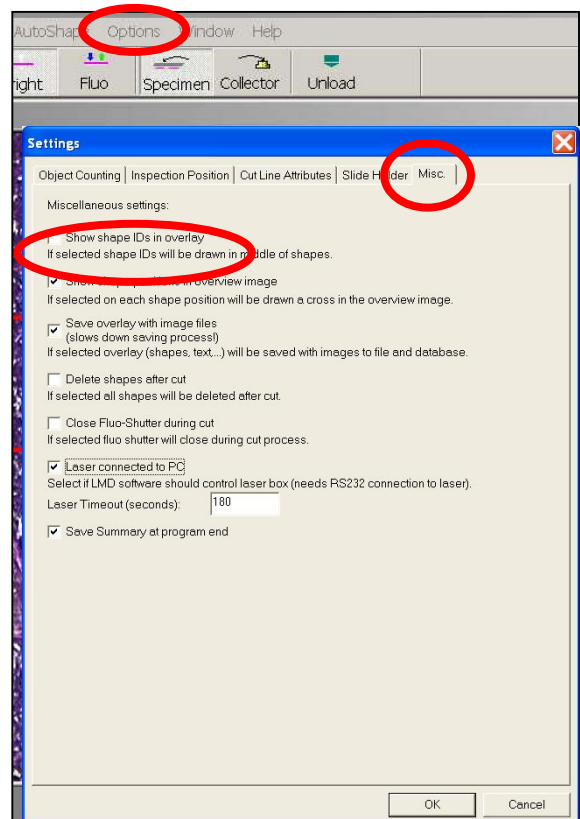
Save in のプルダウンメニューから保存したいフォルダを選択します。また、Save as type のプルダウンメニューから保存する画像のフォーマットを選択することができます。



画像を保存する際に、ドローラインやスケールバーなどのアノテーションを一緒に保存するか、Low 画像のみで保存するかを選択できます。

“Option”メニューの“Settings”から“Misc”内にチェックボックス“Save Overlay with image files”があります。

このボックスにチェックが入っている場合はドローラインやスケールバーも一緒に保存されます。Low 画像のみを保存したい場合はチェックを外してください。



2-4. オーバービュー機能

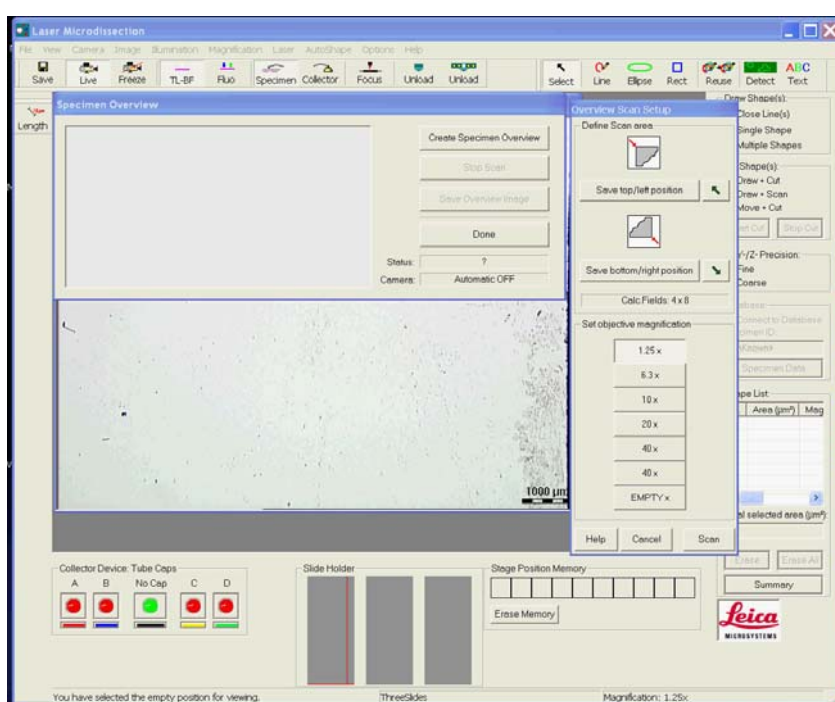
オーバービュー機能を使うと標本の全体像を確認しながらの作業およびそこから顕微鏡操作が可能になります。さらに、取り込んだ Overview 画像を 'Slide Holder' 内のスライドアイコンに表示させることができます。

1) オーバービューの作製

Option-Settings-Specimen Overview を選択してください。オーバービュー画面が出てきます。

“Create Specimen Overview” をクリックするとスキャン範囲指定コマンドが出てきますのでエルゴコントローラーでスキャン範囲の左上と右下、取り込む倍率のレンズを選択して下さい。

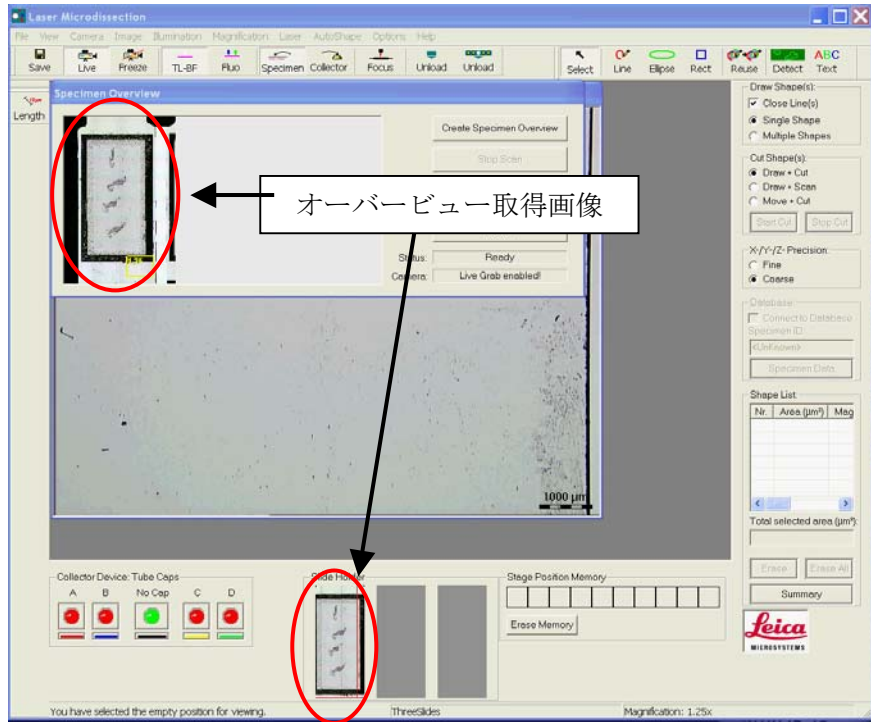
(低倍が使いやすい。スキャンングステージの場合は 1.25x、電動ステージの場合は 6.3x レンズが最適)



“Scan” をクリックするとステージが動きスキャンを開始します。



スキャンが終了すると、オーバービュー画面だけでなく、Slide Holder' 内のグレーの枠にも、取得した画像が表示されます（3 枚スライド搭載可能なスキャニングステージの場合は、スライド毎にオーバービュー画像を取得してください）。



2) オーバービューからの顕微鏡操作

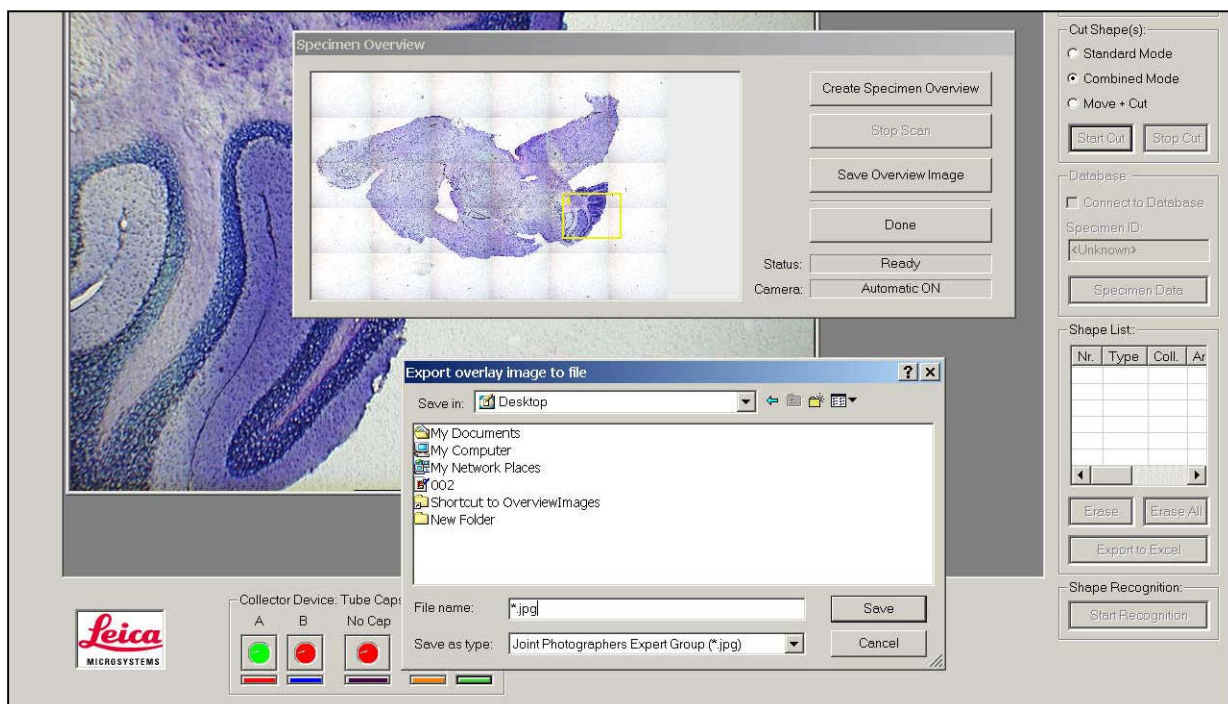
オーバービュー画像内の枠がライブ画面での表示範囲を反映しています。黄色枠内をダブルクリックすると枠が緑色に変わります。緑色の状態で枠を動かすことができます。ライブを表示したい場所で再度ダブルクリックするとステージがその場所に移動し、ライブ画像が表示されます。



緑枠の状態ではマウスの左右ボタンの間にあるホイールを回すとオーバービューが拡大表示されます。該当倍率が枠の左上に表示されます。その状態でダブルクリックするとステージだけでなく対物レンズも指定のものに切り替わりライブが表示されます。

3) オーバービュー画像の保存

オーバービュー画像を保存する場合は“Specimen Overview”画面の“Save Overview Images”をクリックします。Save in プルダウンメニューから保存するフォルダを選択し、画像に名前をつけて保存してください。Over View Image は JPEG フォーマットで保存されます。

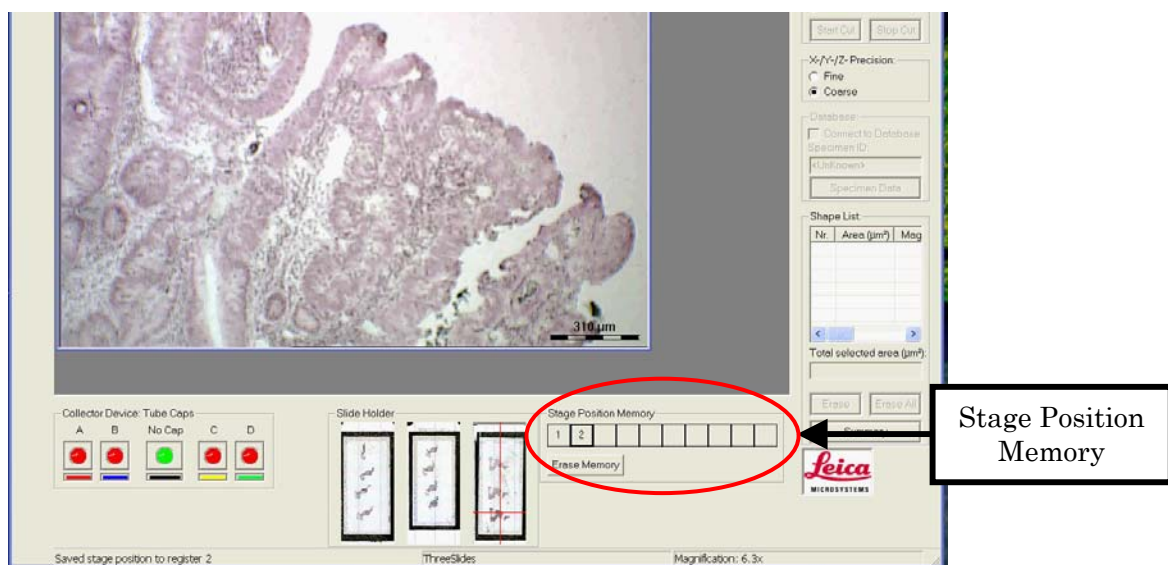


注意：新しいオーバービューを作成するとそれまで表示されていたオーバービューイメージは消去されます。また、ソフトウェアを終了した際にも消去されます。
保存は必要に応じて実行してください。

2-5. ステージ位置の記憶

ステージ位置の情報を、最大 10 箇所まで記憶させておくことができます。

Live 画面に記憶させたい位置が映っている状態で、**Stage Position Memory** のカラムをクリックするとカラムの中に番号が表示されます。番号が表示されているところにステージ位置が記憶されています(対物レンズの倍率は記憶されません)。



記憶させたステージ位置を再現したい場合は、番号の表示されたカラムをクリックします。ステージが動き、Live 画面に記憶した位置の画像が表示されます。

記憶を消去する場合には、消去させたい番号をクリックして選択してから、**Erase Memory** をクリックします。

2-6. 蛍光観察とレーザーカッティング (LMD6000 Fluo、Living Cell、Multi user で可能)

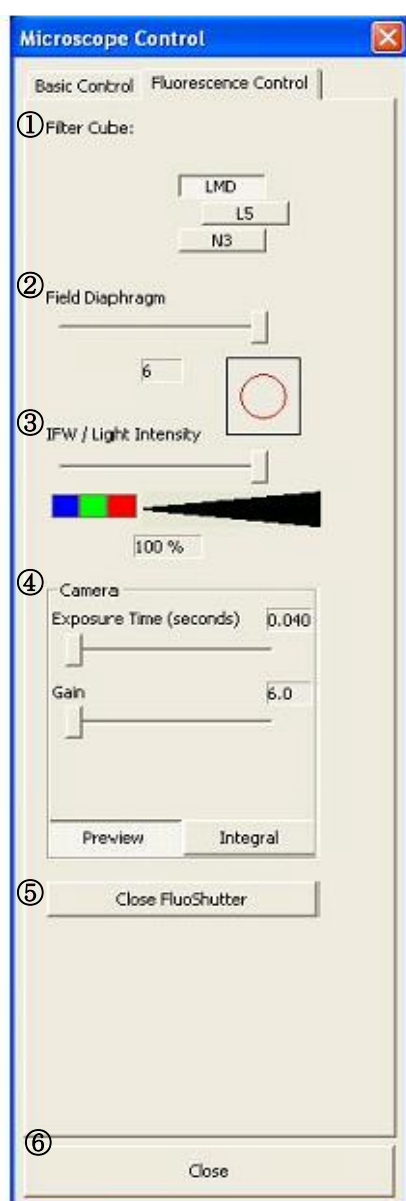
蛍光観察をしながらカッティング作業をする場合には、まず水銀蛍光装置 EL6000 のスイッチを入れます。ランプが安定するのに 20 分程度かかります。

ソフト画面上部の Mic ctrl のアイコンをクリックし、コントロールパネルを表示させます。

Basic control タブを選択し、'Contrast methods'から”Fluo”をクリックします。



<蛍光観察時 Microscope control コントロールパネル構成>



'Fluorescence control'タブをクリックして、蛍光観察のための詳細な設定を行います。

① Filter cube

挿入されている蛍光観察用の励起/吸収フィルターセットを表示しています。使用するフィルターのボタンをクリックすると、光路内にセットされます。

フィルター例)

LMD…青/緑/赤色蛍光を検出するトリプルバンドのフィルターです。このフィルターは 3 色を重ね合わせた状態で蛍光観察することができます。また、観察をしたままダイセクション作業をすることができます。

L5…GFP や FITC 等の緑色蛍光観察用フィルター

N3…Rodamine、Texas Red 等の赤色蛍光観察用フィルター
これらのフィルターは、レーザーカット中自動で明視野に切り替わります。

② Field Diagram

照明が当たる部分の大きさや形を、バーをスライドさせて調整します。

③ IFW/Light Intensity

バーをスライドさせ、単色の蛍光観察や水銀ランプ光量調節を行います。

LMD フィルターなどトリプルバンドフィルターを使用している場合は、バーを左側の青/緑/赤の部分に置くとそれぞれの蛍光を単色で観察することができます (単色フィルターの場合は使用できない)。

バーを右側の三角の部分に置くと、水銀ランプの光量調節をすることができます。右に行くほど光量が強くなります。

④ Camera

Exposure time… バーをスライドさせ、カメラの露出時間を調節します。時間を長くするとライブ画像の追随性が損なわれることがあります。

Gain…バーをスライドさせ、電気信号に変換されたシグナル強度の増幅度合いを決定します。ゲインを上げると画像を明るくすることができますが、同時にノイズも増幅されます。

カメラのモードとして、**preview** モードと **Integral** モードがあります。

Preview モードは **Integral** モードに比べてカメラの露出時間を短くし、蛍光の退色を防ぐことができますが、ゲイン値が高いためノイズが多くなります。

画像を取り込む（→P.19 2-3. 画像の保存）ときは、まず **preview** モードで撮影イメージを掴んでから **Integral** モードをクリックし、**Exposure time**、**Gain** を調節します。

⑤ Close/Open shutter

こちらのボタンをクリックし、蛍光シャッターの閉/開を行います。なお、ソフト画面上部の”Freeze”アイコンをクリックすると、画像を取り込んで静止画像として表示します。このとき蛍光のシャッターは自動的に閉じられます。



④ Close

コントロールパネルを閉じます。

<実際のカッティング作業>

- 1) まず、使用する対物レンズでキャリブレーションを行います（→P.9 1-6-1. レーザーキャリブレーション）
- 2) 通常のカッティングと同様に、ライブ画面内をドローイングして領域指定を行います。
- 3) 'Cut Shapes'内の”Start+Cut”をクリックしてカッティングします（LMD フィルター以外を用いて蛍光観察している場合にはダイセクション中自動で明視野に切り替わります）。
- 4) 蛍光の退色が気になる場合は、まずソフト画面上部アイコンの”Freeze”をクリックして静止画像を取り込み、領域をドローイングで指定してから **Start+Cut** でカッティングします。ダイセクション中は’Cut Shapes’の”Start +cut”がグレースアウトしています。この”Start +cut”がアクティブの状態になればカッティング終了です。
- 5) 作業終了の際には、コントロールパネル内の’Basic control’タブをクリックし、’Contrast method’から”TL-BF”を選び明視野の状態にします。EL6000 のスイッチを切ります。

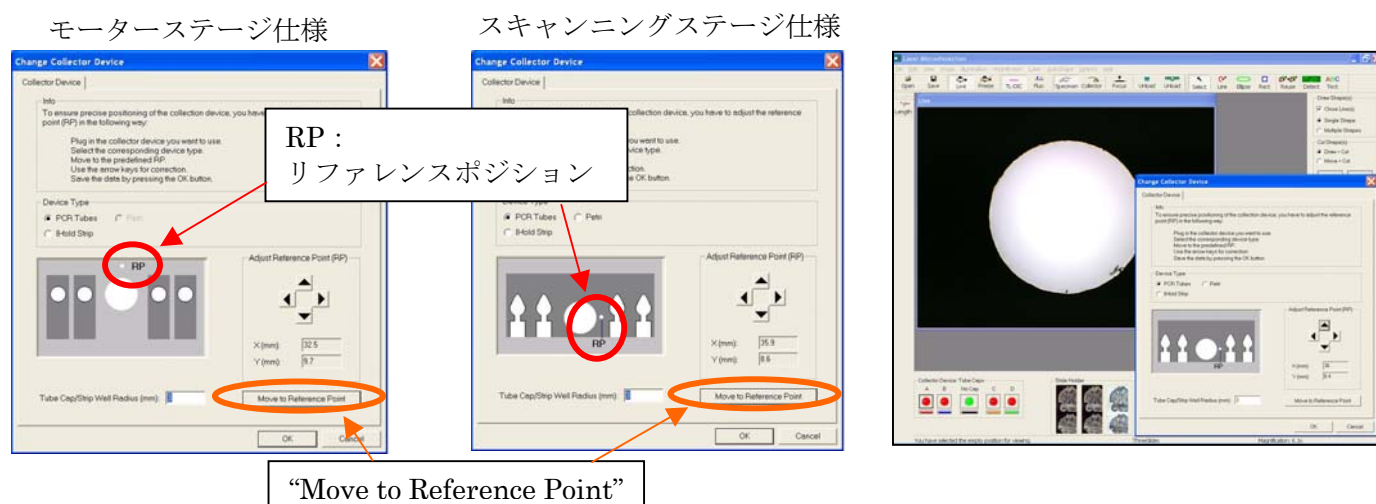
参考①：PCRチューブポジションの調整について

PCR チューブのポジションがずれてしまった場合、チューブトレイのセンターにステージの座標を調整する必要があります。

座標の調整は LMD ソフトウェア画面の Unload アイコンをクリックして表示される“Collector Device”ページで行ないます。

PCR チューブホルダーには4本の PCR チューブが配置される場所の他に、センターに No Cap ポジション用の大きな穴が開いています。さらに、その脇に小さな穴が開いており、それをリファレンスポイント (RP) と呼びます。

PCR チューブのポジションは RP の座標からの距離で設定されますので、PCR チューブのポジションがずれている場合は RP の座標を設定することにより正常な環境となります。



1) Move to Reference Point アイコンのクリック

“Move to Reference Point” アイコンをクリックすると、PCR チューブトレイが現在設定されているポジションに移動します。

対物レンズを 6.3 倍（または 5 倍、10 倍など低倍率レンズ）に設定して画面を確認します。

2) リファレンスポイント (RP) を見つけ、画面中央に移動させます。

右図のように RP が画面中央に来るように Collector Device 画面中の十字ボタンで PCR チューブトレイを動かします。中央に移動させた状態で“OK”をクリックすると設定が完了します。

参考②：カットラインの精度調節について

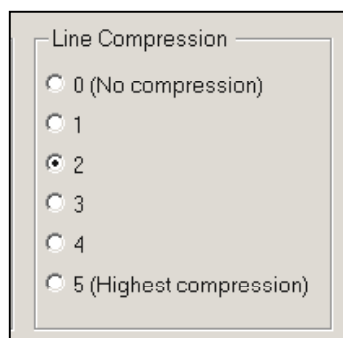
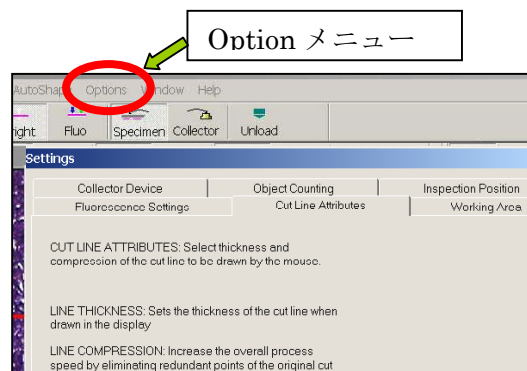
1) ラインコンプレッション

“Cut Line Attributes” ページ内の “Line Compression” でカット精度と速さを6段階で調節できます。

オリジナルカットライン、レベル0 (No Compression)は高精度でのカットができますが正確なラインカーブをたどるためカットに時間がかかります。

カーブのポイントを減らして直線的にカットすることによりラインの精度は荒くなりますが早いカットが可能になります。

デフォルトではレベル2で設定されています。

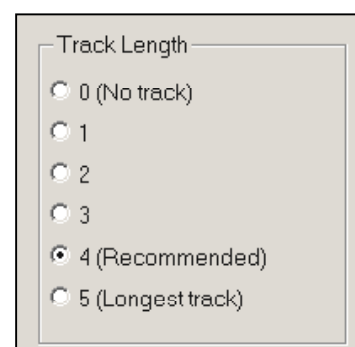


No Compression と Highest Compression の比較

2) トラックレングス Track Length

ここではマルチカットの際のリポジショニング（ステージ位置再現性）の精度を調節できます。

トラック数の数値が大きくなると座標位置の確認回数が多くなります。従って、数値が大きくなるとステージ移動の時間は長くなりますが、細かく正確なステージ移動を行なうことができます。



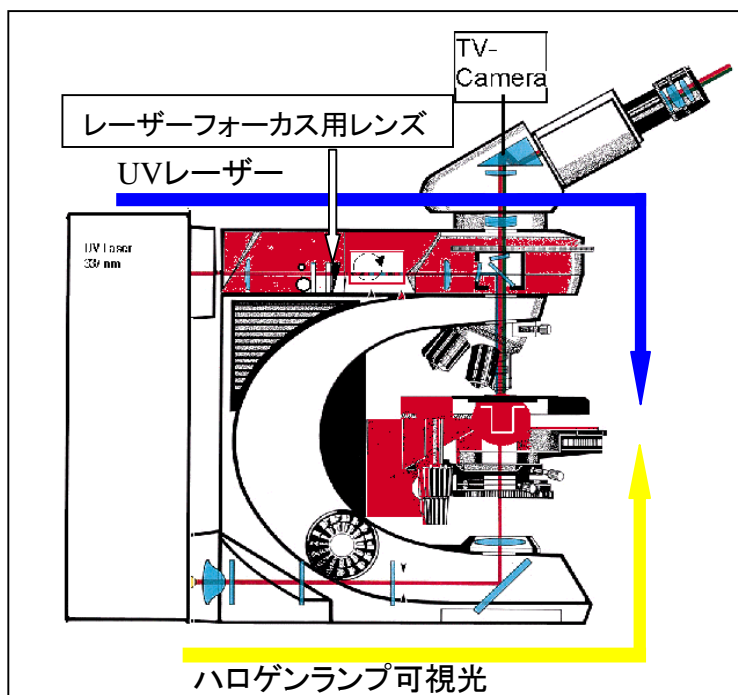
参考③：オフセットについて

LMD6000 を使用するにあたって目で見える、あるいはカメラで見える標本は通常ハロゲンランプの光で観察しています。(黄色矢印) それに対して、カットするレーザーはハロゲン光とは独立した光路により対物レンズで集光しています。(青色矢印)

従って、ハロゲン光のフォーカスポジション(標本が観察できるフォーカス位置)とレーザーのフォーカス位置は互いに独立した関係にあります。

LMD6000 で標本を切るためには標本の位置(つまりハロゲン光のフォーカス位置)とレーザーのフォーカス位置が一致した点にないとシャープに切ることはできません。

UV レーザーのフォーカスはモジュール内のレンズ位置で調整しています。

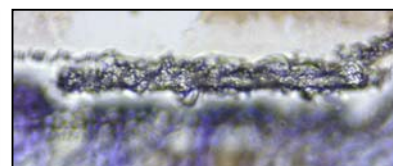
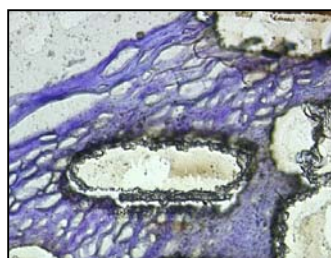


LMD6000 のレーザー調整欄にある「off set」の値はレーザーフォーカス用レンズの位置を調整する値で対物レンズ毎に「off set」値が正しい位置にあつて初めて正常なカットが可能です。

LMD6000 を使用する際には「off set」値が正しい位置にあることを確認してからカットを行なうことが良い実験を行なうには非常に重要なファクターになります。

「off set」の数値は1～449で変更可能です。449段階にレーザーフォーカス用レンズの位置を調整でき、ハロゲン光のフォーカス面に対して「off set」の数値が小さいとレーザーのフォーカス面は下に「off set」の数値が大きいと上に動きます。

どちらに移動した場合もレンズごとに設定した「off set」値以外だと良く切れませんが特にレーザーのフォーカスが少し上に来た場合図のようにガラスを弾いてしまい、2回目以降のカットが難しくなってしまいます。



ガラスを切ってしまっている。こうなるとレーザーが散乱し、上手く切れない

消耗品リスト

- 標本作成用 フォイル付きスライドグラス
- 回収用 PCR チューブ
- LCC 用培養ディッシュ

☆フォイル付きスライドグラス

品名	品番	価格
RNase-Free フォイル付きスライド 50 枚	11505189	¥37,000
RNase-Free フォイル付きフレーム 50 枚	11505191	¥41,000
フォイル付きフレーム (PET) 50 枚	11505151	¥33,000
フォイル付きスライド (広範囲フォイル) 50 枚	11505158	¥30,000
フォイル付きスライド 50 枚	8076666×2	¥25,000

150x 対物レンズを使用する場合は RNase-Free フォイル付きフレーム 11505191 を使用してください。

☆PCR チューブ

PCR チューブのライカマイクロシステムズ社取り扱いは 0.2ml 用になります。
0.5ml 用をご利用の場合は、エッペンドルフ社 PCR チューブ販売店へお問い合わせください。

- ・ 0.5ml 用 エッペンドルフ社PCRチューブ
PCR-tube 0,5ml (500本) Order-No.: 0030 124.502
- ・ 0.2ml 用 BIOZYM社PCRチューブ (ライカマイクロシステムズ取り扱い品)
PCR チューブ 0.2ml 用 (1000 本) 品番: 8078812 ¥14,000

☆LCC 用ディッシュ

	品番	価格
LCC 用 ディッシュ ペンフォイル 20 枚	11505172	¥22,000