

新規プレートの登録

このドキュメントでは、ImageXpress システムにおいて新規にプレートを登録する際の手順について記述します。

ImageXpress システムに新しく使用するプレートを追加するには、次の 3 つを順番に行ってください。

- プレート寸法情報の登録
- プレートの底の厚さの測定
- レーザーオートフォーカスのレーザー露光時間の最適化

Table of Contents

新規プレートの登録	1
プレート寸法情報の登録	2
プレートの底厚の測定	4
レーザーオートフォーカスのレーザー露光時間の最適化	6
Laser Autofocus Wizard を使用した自動最適化	6
レーザーオートフォーカス設定の手動設定（ファインチューニング）	10
References	16

プレート寸法情報の登録

1. MetaXpress ソフトウェアを起動し、ログインします。

Plate 設定ファイル（拡張子.plt）は共通のため、どの起動アイコンでログインしても構いません。

Plate Acquisition Setup を開きます。

Configure タブの Plate タブに進み、プレート追加元となるオリジナルのプレートを選択します。類似の寸法のプレートから選びます。特にない場合は、「96 Wells (8x12)」もしくは「384 Wells (16x24)」を選択します。

レーザーオートフォーカス設定が未設定の場合は **Autofocus** タブや **Configure** タブに赤くエラーが付きますが、今は無視します。

2. 追加するプレートの寸法情報をそれぞれ入力します。

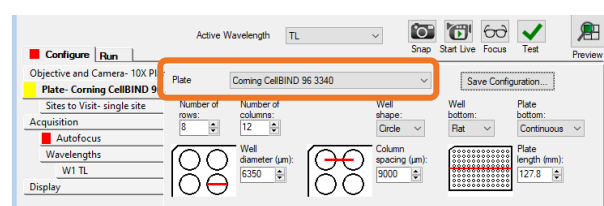
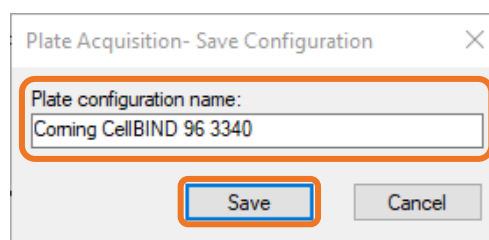
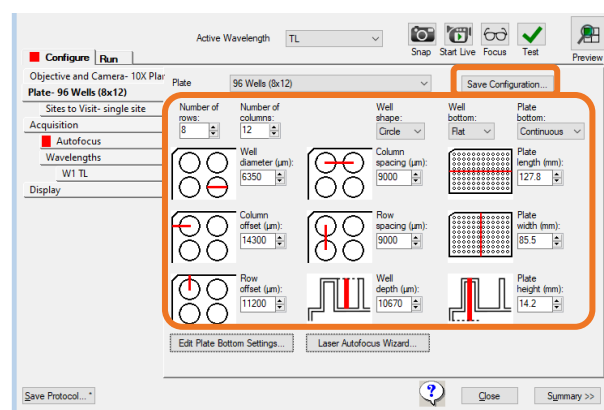
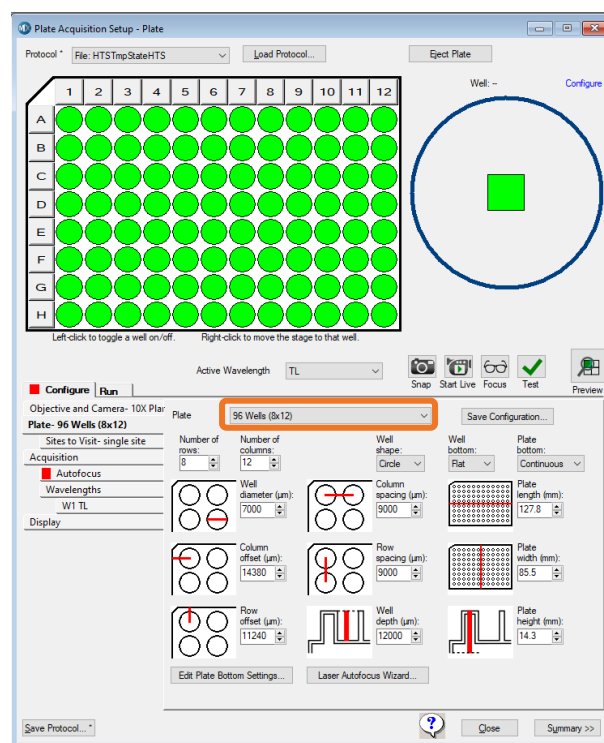
寸法情報はプレートメーカーのウェブサイトなどから入手可能です。

入力を完了したら **Save Configuration** をクリックします。

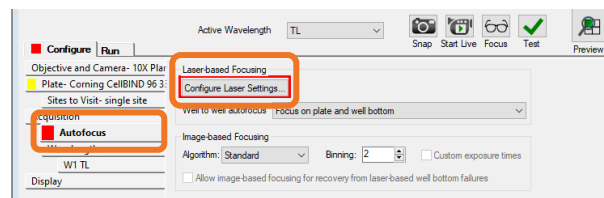
3. **Plate configuration name** 欄にプレート名を入力して **Save** をクリックします。

モレキュラーデバイスでは、メーカー（あるいはブランド）、モデル、ウェルフォーマット、型番の 4 つの要素で名付けるようにしています。モデル名がないプレート登録もあります。

4. **Save** すると、Plate タブのプレート名が更新されます。



5. **Autofocus** タブをクリックし、**Configure Laser Settings** をクリックします。



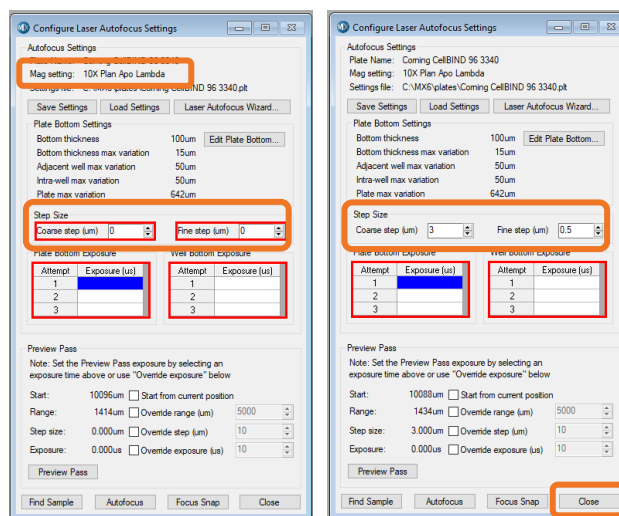
6. **Configure Laser Autofocus Settings** ダイアログが表示されます。

使用する対物レンズに合わせて **Step Size** 欄に値を入力します。入力する値は末尾の表 1 レーザーオートフォーカス推奨ステップサイズを参照してください。

この **Step Size** の入力を対物レンズごとにすべて行います。**Plate Acquisition Setup** の **Objective and Camera** タブで対物レンズを切り替えることで、ダイアログを閉じなくても対物レンズをまたいで連続的に変更できます。

Plate Bottom Exposure はこの後行うレーザーオートフォーカスウィザードを経て自動的に入力されるので、この時点で表示されているエラーは無視します。

すべての入力が完了したら **Close** をクリックします。

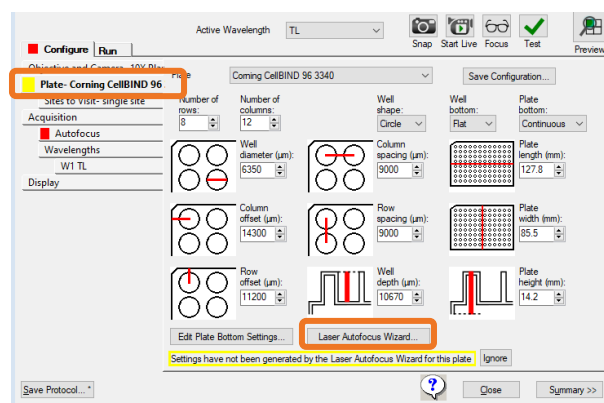


プレートの底厚の測定

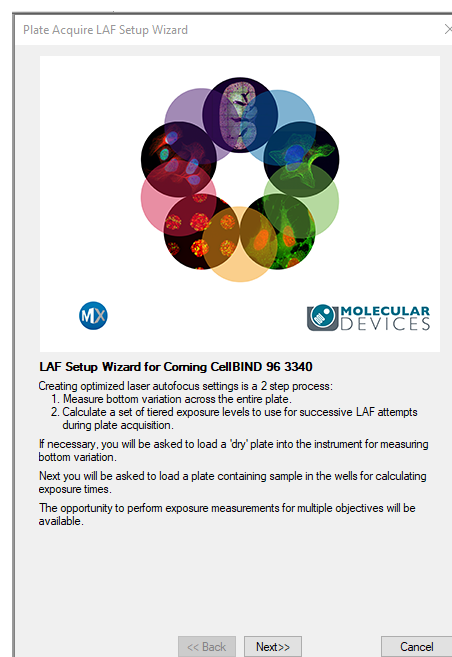
プレートの底厚は、Laser Autofocus Wizard を使用して実際のプレートを実測します。

プレートの底の厚さの測定は、使用するプレートの品質が大きく変わらない限り、一度だけ行えば十分です。

7. Plate タブに戻り、**Laser Autofocus Wizard** をクリックします。



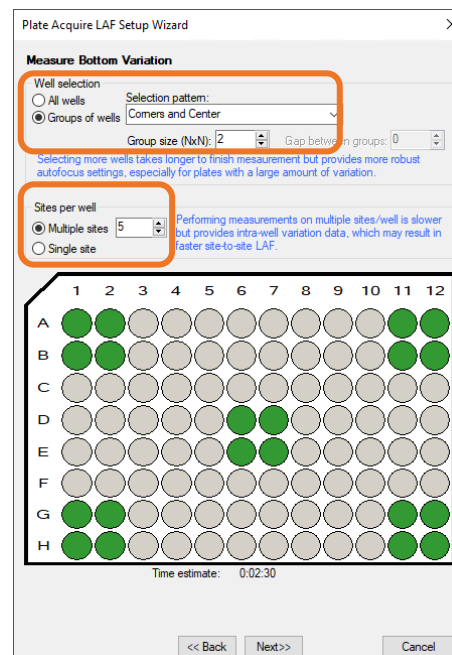
8. Laser Autofocus Wizard が展開します。
Next をクリックします。



9. Measure Bottom Variation において、右図のように Well selection を **Groups of wells, Corners and center** に、Sites per well を **Multiple sites, 5** に設定します。

Well selection のパターンや Group size、Sites per well の数は、登録するプレートに応じて適宜調整します。

Next をクリックします。



10. **Next** をクリックします。

プレートの底の厚さの測定は、使用するプレートの品質が大きく変わらない限り、一度だけ行えば十分です。

既に登録されているプレートに対して、レーザー露光時間の自動最適化のみを実施する場合は **Use existing settings** をクリックして **Measure Bottom Variation** のステップをスキップします。手順 15 に進みます。

11. **Open door/clamp** および **Close door** をクリックしてドアを開閉し、ステージにプレートを入れます。(空のプレートが推奨されます。)

プレートの底の厚みが $100\text{ }\mu\text{m}$ 以下である場合は、**Allow Extreme Variation** にチェックを入れます。

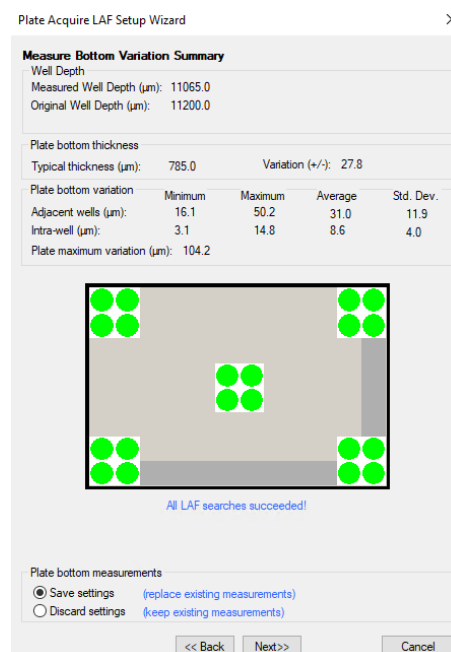
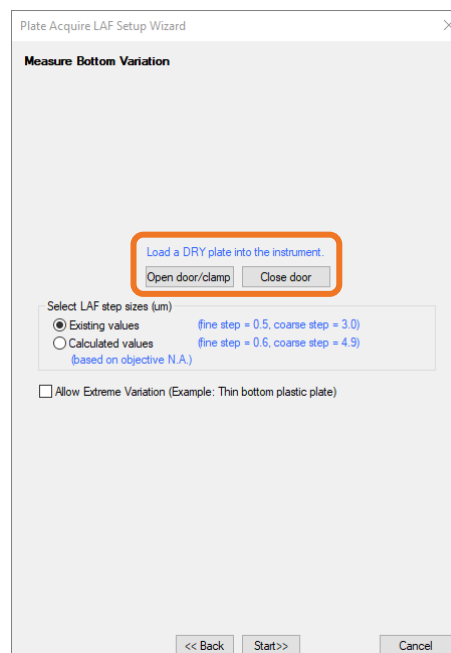
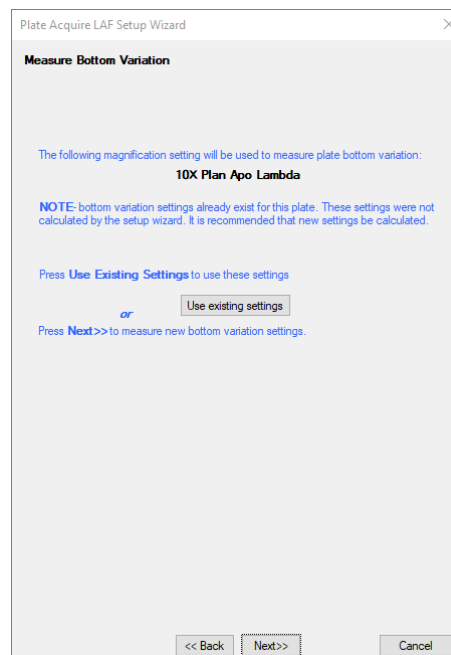
Start をクリックし、プレートの底厚の測定を開始します。

12. 測定が完了すると、右図のダイアログが表示されます。

結果を確認して **Next** をクリックします。

Wizard を終了する場合は **Cancel** をクリックします。

いくつかのウェルが黄色で表示されていても、画面下部に青色で表示される文で **Successfully** と表記されていれば特に問題はありません。



レーザーオートフォーカスのレーザー露光時間の最適化

プレートの底の厚さを測定した後、オートフォーカス用レーザーの露光時間を最適化します。

これは対物レンズごとに設定する必要があります。

レーザーの露光時間を最適化は、Laser Autofocus Wizard を使用して自動的に行う方法と、手動で行う方法があります。

Laser Autofocus Wizard を使用してプレートの底の厚さを測定した後は、それに続いて自動最適化を行うと容易です。

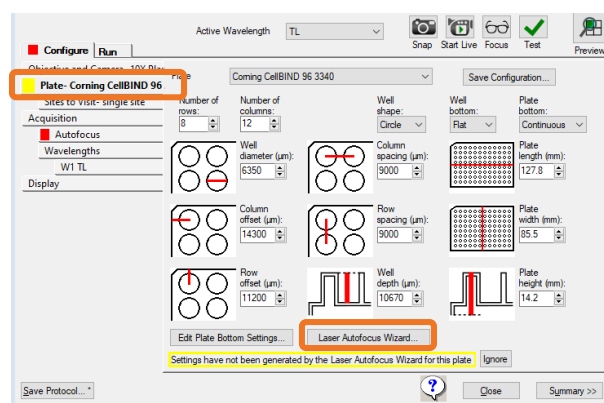
水浸レンズや一部の高倍率レンズでは、Laser Autofocus Wizard による自動最適化が難しいことが多いため、自動最適化手順をスキップし、代わりに p. 10 レーザーオートフォーカス設定の手動設定（ファインチューニング）の手順で最適化を行います。

Laser Autofocus Wizard を使用した自動最適化

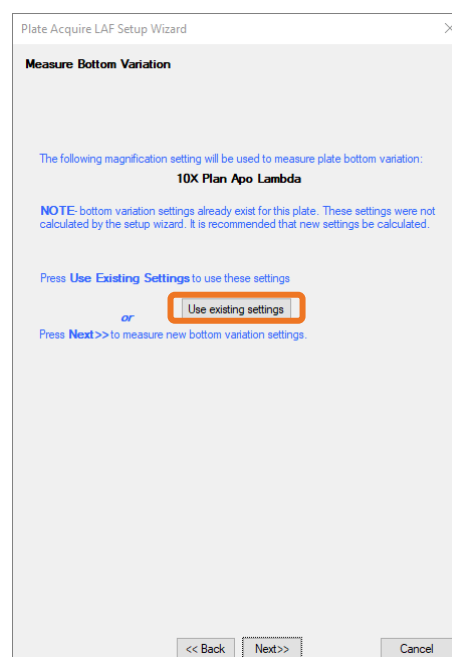
13. Plate タブに戻り、**Laser Autofocus Wizard** をクリックします。

プレートの底の厚さを測定を行っていない場合は、p. 4、プレートの底厚の測定の手順に従ってプレートの底厚を実測してください。

Next をクリックしてウィザードを進めます。



14. 既に登録されているプレートに対してレーザー露光時間の自動最適化のみを実施する場合は、ウィザードの途中で表示される右図のダイアログにおいて **Use existing settings** をクリックして **Measure Bottom Variation** のステップをスキップします。手順 15 に進みます。



15. 続いて、Calculate Exposure Parameters を実行します。

Medium を **Aqueous media** に変更します。

Next をクリックします。

Plate Acquire LAF Setup Wizard

Calculate Exposure Parameters

Select the medium that will be used when running this plate type. Then select the magnification setting to use for calculating exposure times.

Medium: Aqueous media ▼ Refractive index: 1.33

Magnification setting for calculating exposures: 10X Plan Apo Lambda ▼

Select LAF step sizes (um)

☒ Existing values (fine step = 0.5, coarse step = 3.0)

☐ Calculated values (fine step = 0.6, coarse step = 4.9) (based on objective N.A.)

Press **Next>>** to measure new exposure settings.

<< Back Next>> Cancel

16. Calculate Exposure Parameters において、右図のように Well selection を **Groups of wells, Corners and center** に、Sites per well を **Multiple sites, 3** に設定します。

Well selection のパターンや Group size、Sites per well の数は、登録するプレートに応じて適宜調整します。

高倍率のレンズや水浸レンズを使用する場合は、プレートの縁に隣接するウェルでの測定が行えないため、その分を考慮して多めのウェルで測定を行うように設定します。

Next をクリックします。

Plate Acquire LAF Setup Wizard

Calculate Exposure Parameters

Well selection

☐ All wells

☒ Groups of wells

Selection pattern: Corners and Center ▼

Group size (Nxn): 2 x 2 Gap between groups: 0

Selecting more wells takes longer to finish measurement but provides more robust autofocus settings, especially for plates with a large amount of variation.

Sites per well

☒ Multiple sites 3

☐ Single site

Performing measurements on multiple sites/well is slower but provides intra-well variation data, which may result in faster site-to-site LAF.

Time estimate: 0:01:30

NOTE: due to the working distance of the selected objective, wells at the edge of the plate have been excluded from this search to prevent collisions with the edge.

<< Back Next>> Cancel

17. **Open door/clamp** および **Close door** をクリックしてドアを開閉し、手順 16 で指定したウェルが水溶液で満たされているプレートをステージに入れます。

LAF search type は、10 倍以上の対物レンズの場合は **Plate and well bottom**、4 倍以下の対物レンズの場合は **Plate bottom only** を選択します。

Start をクリックし、オートフォーカス用レーザーの露光時間の最適化を開始します。

18. 測定が完了すると、右図のダイアログが表示されます。

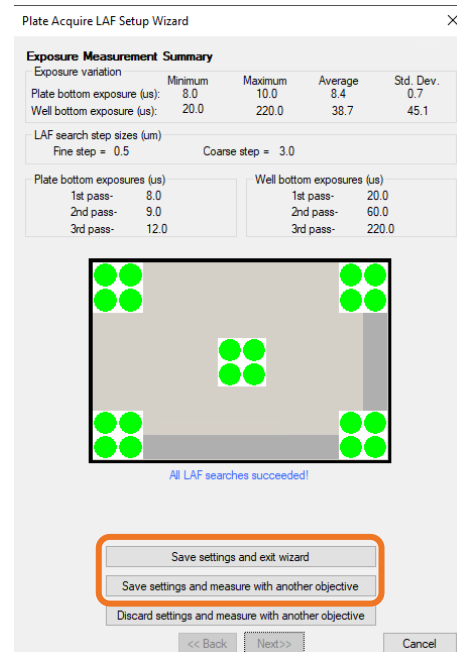
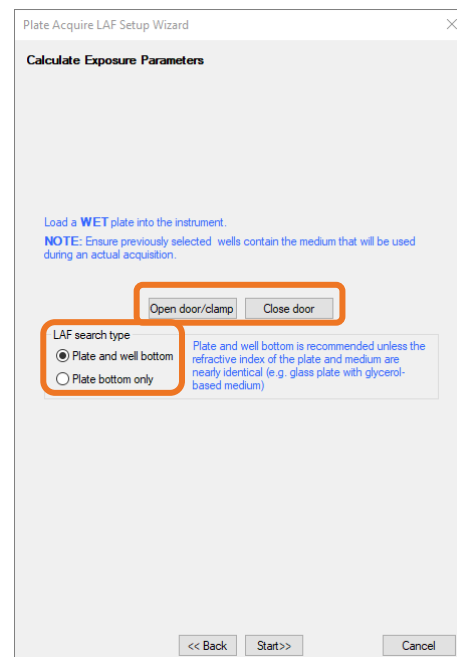
結果を確認します。

いくつかのウェルが黄色表示でも多くの場合問題ありません。

20 倍以上の対物レンズにおいて多くのウェルが赤色表示になる場合、補正環の設定が合っていない可能性が高いです。調整してください。

他の対物レンズに対する Calculate Exposure Parameters を実施する場合は **Save settings and measure with another objective** をクリックして手順 15 に戻り、異なる対物レンズを選択して操作を繰り返します。

すべての対物レンズにおいて Calculate Exposure Parameters を終了した場合は **Save settings and exit wizard** をクリックして Laser Autofocus Wizard を終了します。



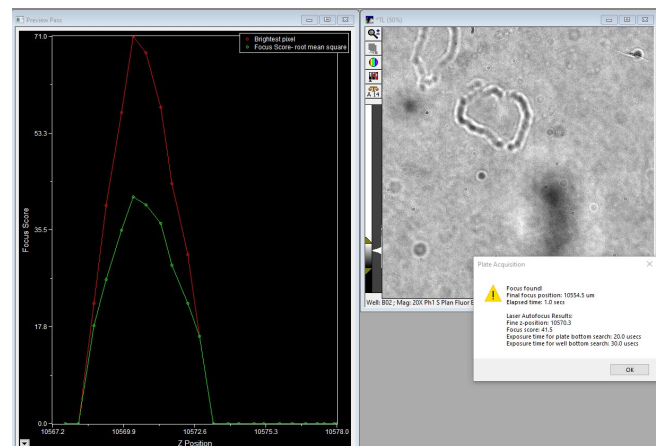
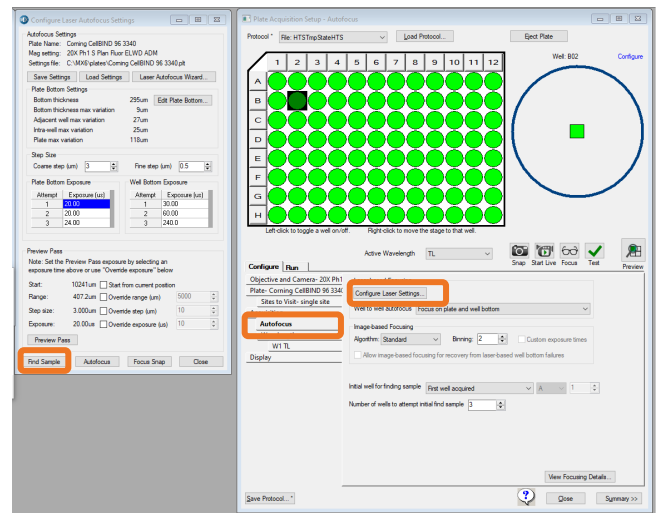
19. オートフォーカス機能が作動することを確認します。

Autofocus タブの **Configure Laser Settings** をクリックします。

任意のウェル（水溶液サンプルが入っているウェル）を右クリックで選択します。

ダイアログ左下にある **Find Sample** をクリックします。

レーザーオートフォーカスが正常に機能していれば **Focus found** とメッセージが表示され、画像取得が行われます。



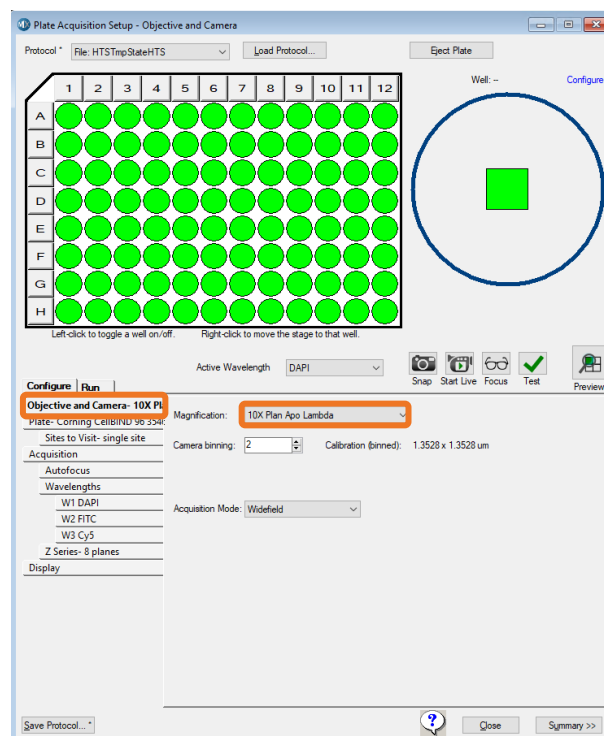
レーザーオートフォーカス設定の手動設定（ファインチューニング）

水浸レンズや一部の高倍率レンズでは、Laser Autofocus Wizard による自動最適化が難しいことが多いため、自動最適化手順をスキップし、手動での最適化を行います。

登録済みのプレートでオートフォーカスが合わない・合いにくくなった場合も、この手順によってオートフォーカス設定を確認することで改善することができます。

20. **Objective and Camera** タブをクリックします。

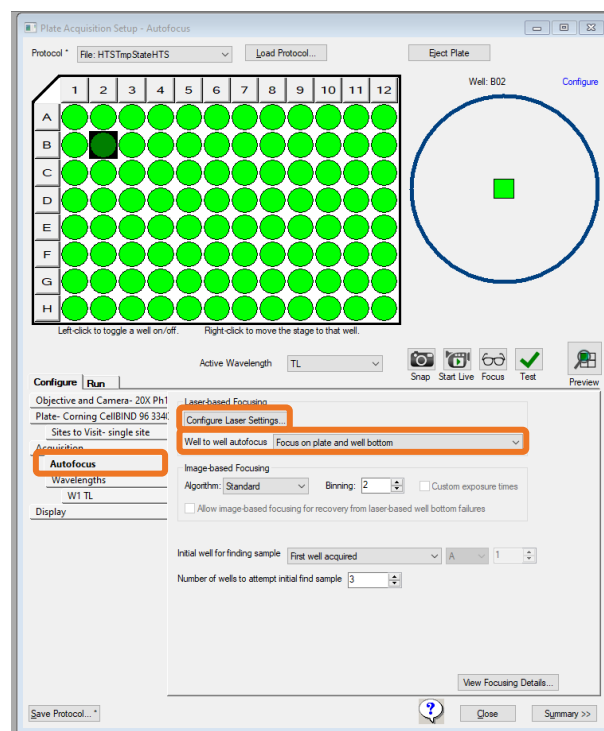
Magnification で設定を行う対物レンズを選択します。



21. **Autofocus** タブをクリックします。

Well to well autofocus を **Focus on Plate and well bottom** に設定します。

Configure Laser Settings をクリックします。



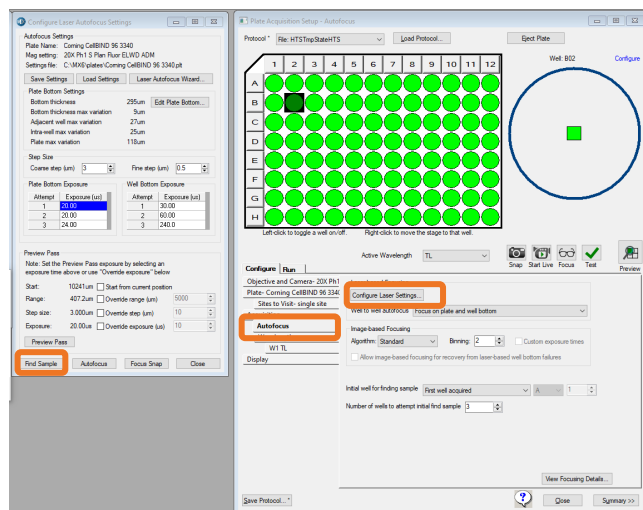
22. Configure Laser Autofocus Settings ダイアログが表示

示されます。

任意のウェル（水溶液サンプルが入っているウェル）を右クリックで選択します。

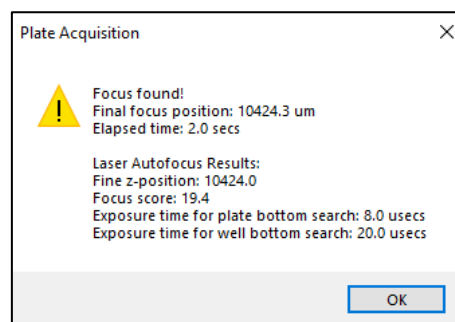
ダイアログ左下にある **Find Sample** をクリックします。

レーザーオートフォーカスが正常に機能していれば **Focus found!**とメッセージが表示され、画像取得が行われます。

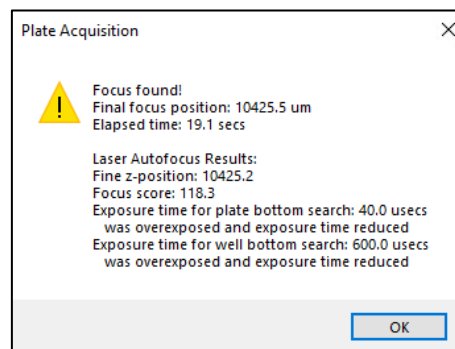
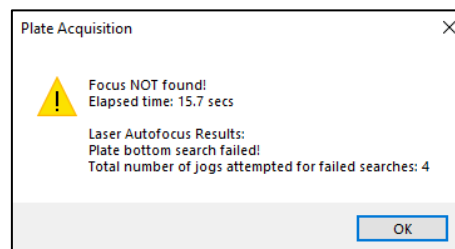


23. 右図のように、**Focus Found!**と表示され、画像取得が高速に行われるのであれば調整の必要はありません。

OK をクリックし、Configure Laser Autofocus Settings ダイアログを **Close** で閉じて手順を終了してください。



24. 右図のように、**Focus NOT Found!**と表示されたり、ダイアログの下半分で「**Exposure time for ~ was overexpressed**」と表示された場合は、最適化する必要があります。次の手順に進みます。



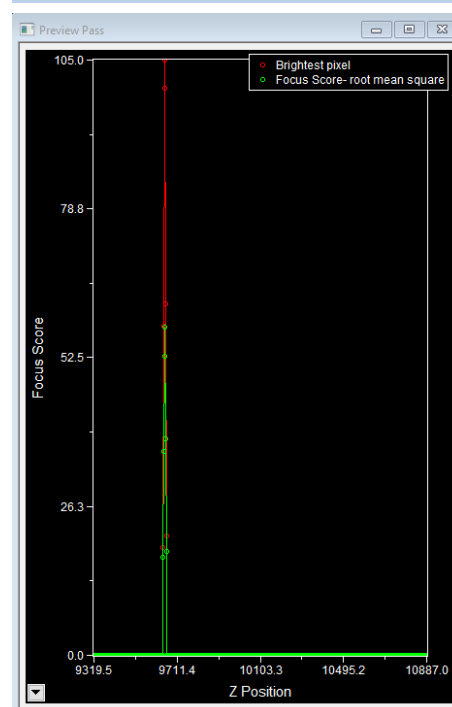
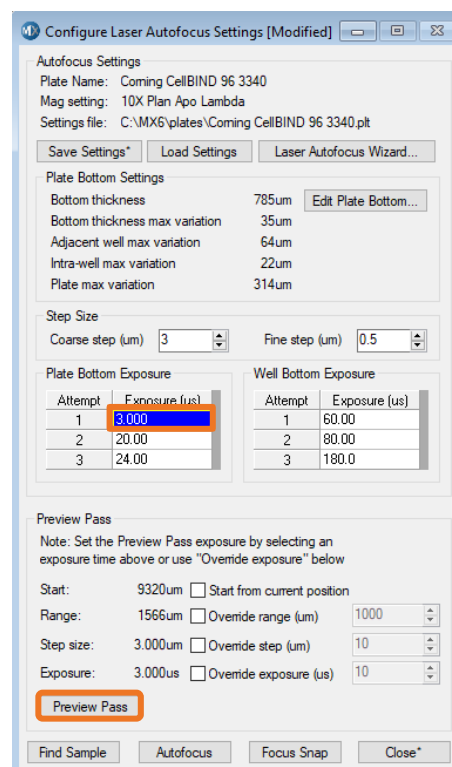
25. Configure Laser Autofocus Settings ダイアログに戻ります。

まず、**Plate Bottom Exposure Attempt 1** の **Exposure** 欄をクリックによりハイライトしてから **Preview Pass** をクリックし、Preview Pass グラフを表示させます。

いくつかのウェルで **Brightest Pixel** (赤色) のグラフの形状を確認し、ピークの形成が確認できる **Exposure** 時間を推定します。通常、**Plate Bottom Exposure** は 5 – 30 μs で十分にピークを確認できるはずです。

ピークが 2 本現れた場合は、Plate Bottom では左のピークに注目してください。

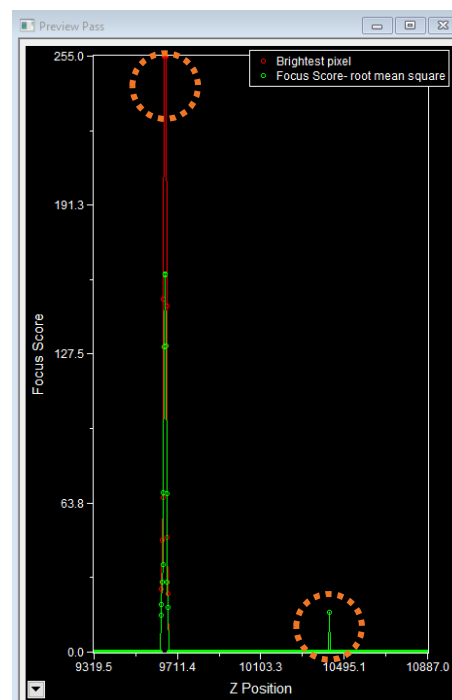
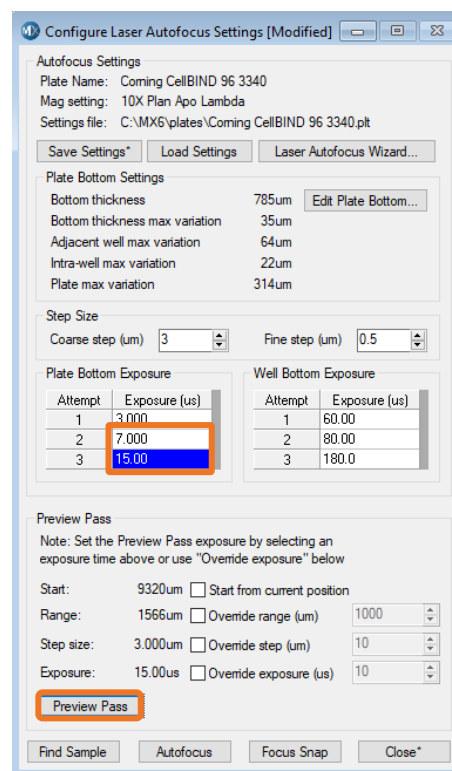
ピークの形成が確認できたら、**Preview Pass** でピークの形成を確認しながら、**Plate Bottom Exposure Attempt 1** の数値を少しずつ増やし、**Brightest Pixel** (赤色のグラフ) のピークが 60–100 程度となるようにします。



26. 同様に、**Plate Bottom Exposure Attempt 2** および **Plate Bottom Exposure Attempt 3** の **Exposure** 欄について、クリックによりハイライトしてから **Preview Pass** をクリックして Preview Pass グラフを表示させます。

いくつかのウェルで Brightest Pixel（赤色）のグラフの形状を確認し、次の条件でピークが形成できるように、**Plate Bottom Exposure Attempt 2** および **Plate Bottom Exposure Attempt 3** の **Exposure** 値を設定します。

- Brightest Pixel（赤色のグラフ）のピークが、Attempt 2 では 100 – 200、Attempt 3 では 225 を超える程度。
- Attempt 2 の Exposure time は Attempt 1 の 2 倍、Attempt 3 は Attempt 1 の 3 – 4 倍程度の値が目安。
- Well Bottom Exposure は Plate Bottom Exposure よりも大きな値になりやすい。が、条件によっては逆転する。



左側のピークがプレートボトム（Z Position = 9653）、右側のピークがウェルボトム（同 10425）を示す。したがって、プレートの底厚は約 770 μm であると推定される。

2 本のピークがグラフの中央部にはない場合は、レーザーオートフォーカスのスキャン範囲がずれているので、ウェルの深さ（Well Depth）の値を調整する。

27. 続いて、**Well Bottom Exposure Attempt 1** の **Exposure** 欄をクリックによりハイライトしてから **Preview Pass** をクリックし、Preview Pass グラフを表示させます。

いくつかのウェルで **Brightest Pixel** (赤色) のグラフの形状を確認し、ピークの形成が確認できる **Exposure** 時間を推定します。

通常、**Well Bottom** のピークが検出する場合、ピークは2本検出されます。**Well Bottom** では右のピークに注目してください。

左のピークがサチレーションに達していても問題ありません。

ピークの形成が確認できたら、**Preview Pass** でピークの形成を確認しながら、**Well Bottom Exposure Attempt 1** の数値を少しずつ増やし、**Brightest Pixel** (赤色のグラフ) のピークが60-100程度となるようにします。

Configure Laser Autofocus Settings [Modified]

Autofocus Settings

Plate Name: Coming CellBIND 96 3340
Mag setting: 10X Plan Apo Lambda
Settings file: C:\MX6\plates\Coming CellBIND 96 3340.plt

Save Settings* Load Settings Laser Autofocus Wizard...

Plate Bottom Settings

Bottom thickness 785um Edit Plate Bottom...
Bottom thickness max variation 35um
Adjacent well max variation 64um
Intra-well max variation 22um
Plate max variation 314um

Step Size

Coarse step (um) 3 Fine step (um) 0.5

Plate Bottom Exposure

Attempt	Exposure (us)
1	3.000
2	7.000
3	15.00

Well Bottom Exposure

Attempt	Exposure (us)
1	60.00
2	80.00
3	180.0

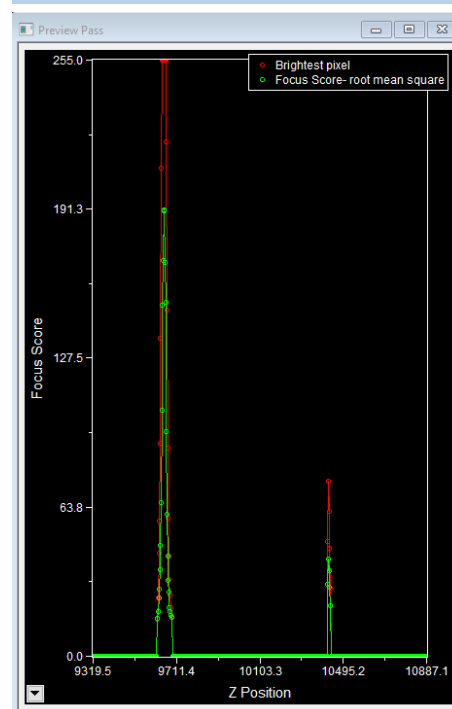
Preview Pass

Note: Set the Preview Pass exposure by selecting an exposure time above or use "Override exposure" below

Start: 9320um Start from current position
Range: 1566um Override range (um) 1000
Step size: 3.000um Override step (um) 10
Exposure: 60.00us Override exposure (us) 10

Preview Pass

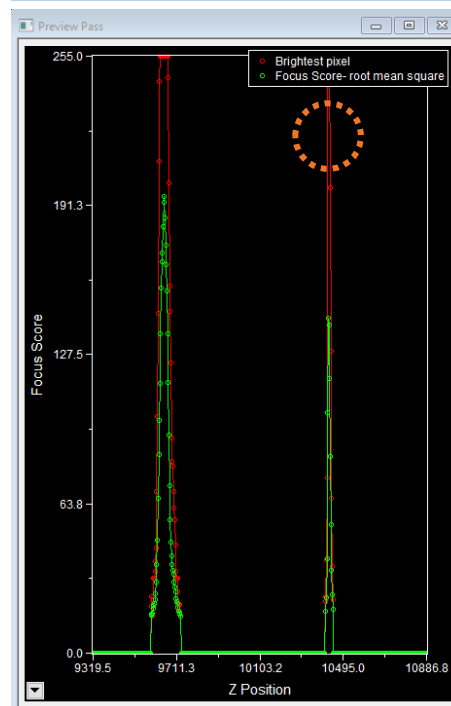
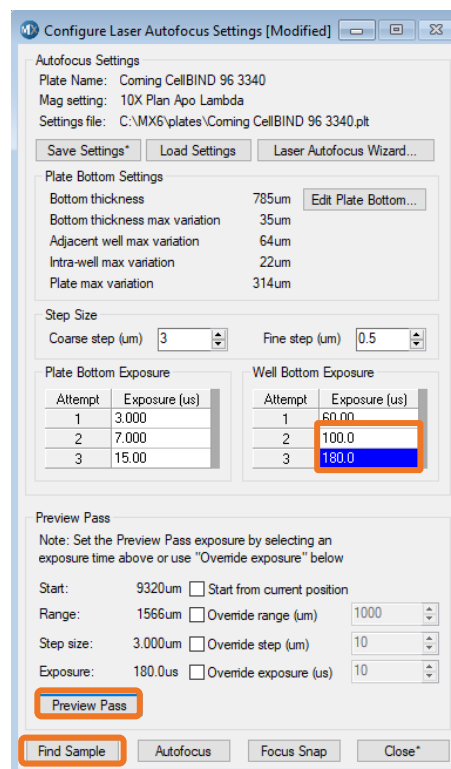
Find Sample Autofocus Focus Snap Close*



28. 同様に、**Well Bottom Exposure Attempt 2** および **Well Bottom Exposure Attempt 3** の **Exposure** 欄について、クリックによりハイライトしてから **Preview Pass** をクリックして Preview Pass グラフを表示させます。

いくつかのウェルで **Brightest Pixel** (赤色) のグラフの形状を確認し、次の条件でピークが形成できるように、**Well Bottom Exposure Attempt 2** および **Well Bottom Exposure Attempt 3** の **Exposure** 値を設定します。

- **Brightest Pixel** (赤色のグラフ) のピークが、**Attempt 2** では 100 – 200、**Attempt 3** では 225 を超える程度。
- **Attempt 2** の **Exposure time** は **Attempt 1** の 2 倍、**Attempt 3** は **Attempt 1** の 3 – 4 倍程度の値が目安。
- **Well Bottom Exposure** は **Plate Bottom Exposure** よりも大きな値になりやすい。が、条件によっては逆転する。



29. 最後に **Find Sample** をクリックしてレーザーオートフォーカスが正常に機能することを確認します。問題がなければ **Focus found!** とメッセージが表示され、画像取得が行われます。
Save Settings をクリックして設定を保存し、**Close** をクリックしてダイアログを閉じます。

30. 以上の操作を、使用する対物レンズそれぞれについて繰り返し行います。

References

表 1 レーザーオートフォーカス推奨ステップサイズ

Mag	Objective Mag and Type	Part #	Phase Contrast	NA	Working Distance (mm)	LAF coarse step size (um)	LAF fine step size (um)
1x	1x Plan Achromat ¹	6500-0119	no	0.04	3.2	25	25
2x	2x Plan Apo	1-6300-0451	no	0.1	8.5	25	10
4x	4x S Fluor	1-6300-0189	no	0.2	15.5	15	3
4x	4x Plan Apo	1-6300-0121	no	0.2	15.7	15	3
4x	4x Plan Fluor DL	1-6300-0292	Yes, PhL	0.13	16.2	25	5
10x	10x Plan Fluor	1-6300-0190	no	0.3	16	5	1
10x	10x S Fluor	1-6300-0122	no	0.5	1.2	2	0.3
10x	10x Plan Apo	6500-0120	no	0.45	4	3	0.5
10x	10x Plan Fluor DLL	1-6300-0294	Yes, Ph1	0.3	16	5	1
10x	10x Plan Fluor DL	1-6300-0293	Yes, Ph1	0.3	15.2	5	1
20x	20x Super Plan Fluor ELWD cc 0-2 mm	6500-0108	no	0.45	8.1 - 7.0	3	0.5
20x	20x S Fluor	1-6300-0411	no	0.75	1	1.2	0.2
20x	20x Plan Apo	1-6300-0196	no	0.75	1	1.2	0.2
20x	20x Plan Fluor DLL	1-6300-0295	Yes, Ph1	0.5	2.1	3	0.5
20x	20x Super Plan Fluor ELWD ADM cc 0-2 mm	6500-0111	Yes, Ph1	0.45	8.1 - 7.0	3	0.5
20x	20x Water Apo LambdaS LWD WI	5075816	no	0.95	0.95	0.8	0.3
40x	40x Super Plan Fluor ELWD cc 0-2 mm	6500-0109	no	0.6	3.7 - 2.7	1.5	0.3
40x	40x Plan Apo Lambda cc 0.11-0.23 mm	1-6300-0412	no	0.95	0.16 - 0.25	0.6	0.1
40x	40x S Fluor cc 0.11-0.23 mm	1-6300-0197	no	0.9	0.3	0.6	0.1
40x	40X Water Apo LambdaS LWD WI	5075817	no	1.15	0.59	0.5	0.1
40x	40x Plan Fluor Oil ²	1-6300-0416	no	1.3	0.2	0.5	0.1
40x	40x Plan Fluor DLL	1-6300-0297	Yes, Ph2	0.75	0.72	1.2	0.2
40x	40x Super Plan Fluor ELWD ADM cc 0-2 mm	6500-0112	Yes, Ph2	0.6	3.7 - 2.7	1.5	0.3
60x	60x Super Plan Fluor ELWD cc 0.1-1.3 mm	6500-0110	no	0.7	1.8 - 2.62	1.2	0.2
60x	60x Plan Apo Lambda cc 0.11-0.23 mm	5038915	no	0.95	0.11 - 0.21	0.6	0.1
60x	60x Plan Fluor	1-6300-0414	no	0.85	0.3	0.6	0.1
60x	60X Water Plan Apo VC XA WI	5075818	no	1.2	0.28	0.5	0.1
60x	60x Plan Apo Oil ²	1-6300-0417	no	1.4	0.21	0.5	0.1
60x	60x Plan Fluor ELWD ADL cc 0.1-1.3 mm	6500-0113	Yes, Ph2	0.7	1.8 - 2.62	1.2	0.2
100x	100X CFI L PLAN EPI cc 0-0.7 mm	1-6300-0419	no	0.85	1.2 - 0.85	0.6	0.1
100x	100x Plan Fluor Oil ²	1-6300-0418	no	1.3	0.2	0.5	0.1

<https://support.moleculardevices.com/s/article/ImageXpress-and-MetaXpress-Working-distances-and-recommended-LAF-step-sizes-for-different-objectives>

お問い合わせ

モレキュラーデバイスジャパン株式会社

Phone: 0120-993-656

Web: www.moleculardevices.co.jp

Email: info.japan@moldev.com

