

Leica

MICROSYSTEMS

컨포컬 이미징

Leica TCS SP8

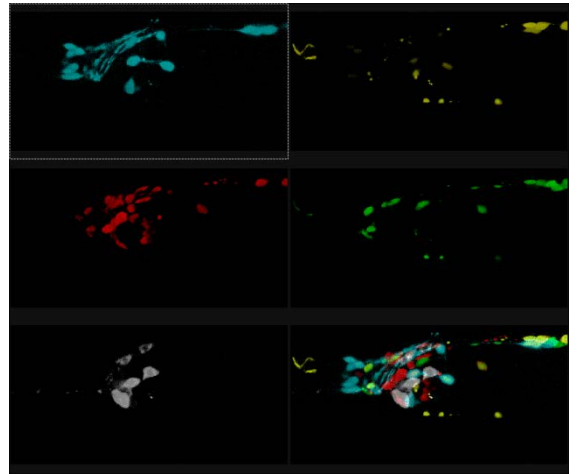
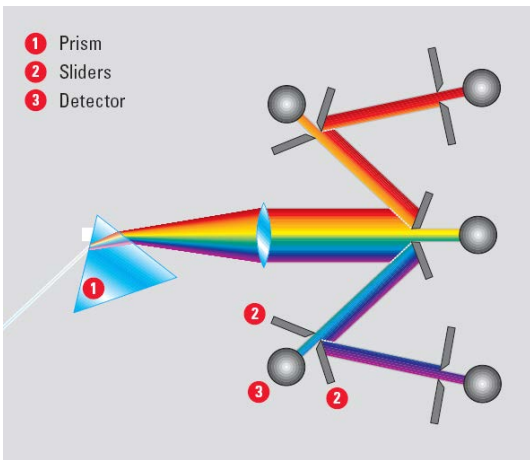
모델명 : TCS SP8 Dichroic/CS
제조사 : Leica Microsystems CMS GmbH



- 시스템 소개
- 시스템 시작 및 종료
- 형광현미경사용법
- 컨포컬 광로설정
- 이미징 파라미터
- Z stacking
- Crosstalk-free 이미징

시스템 소개 - 주요특징

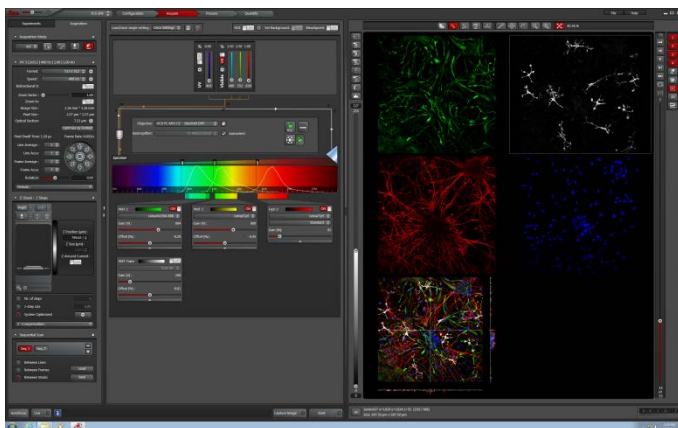
- 무필터식 스펙트럴 감지장치 (SP detector)로 광학적인 Crosstalk-free 다중채널이미징과 밝은 영상



SP detector : 프리즘으로 분광된 빛 중 원하는 파장의 형광만 PMT로 감지

SP Detector로 필터방식보다 적은 레이저 광량으로 보다 밝은 영상을 제공합니다. 또 가변적으로 파장을 골라 Crosstalk free 다중채널 이미징이 용이합니다.

- 사용하기 쉬운 직관적인 소프트웨어와 패널박스



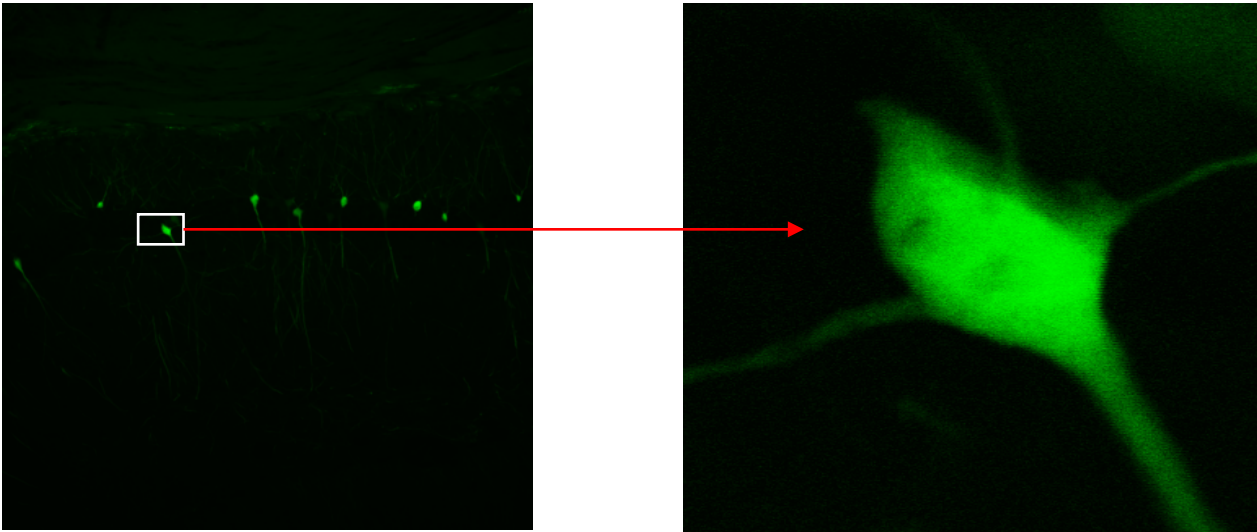
LAS AF : 왼쪽 창은 이미징 설정을 오른쪽 창은 이미지를 보여줍니다. 보다 적은 마우스 클릭과 팝업창으로 매우 직관적인 작업이 가능합니다. 사용하기 쉽고 교육하기 쉽습니다.



패널박스 : 각 다이얼에 이미징 파라미터를 지정하여 라이브영상에서 보다 빠르게 화면조정을 할 수 있어 이미징을 짧은 시간내에 끝낼수 있습니다.

시스템 소개 - 주요특징

■ 64메가 픽셀이미징의 Conventional Scanner

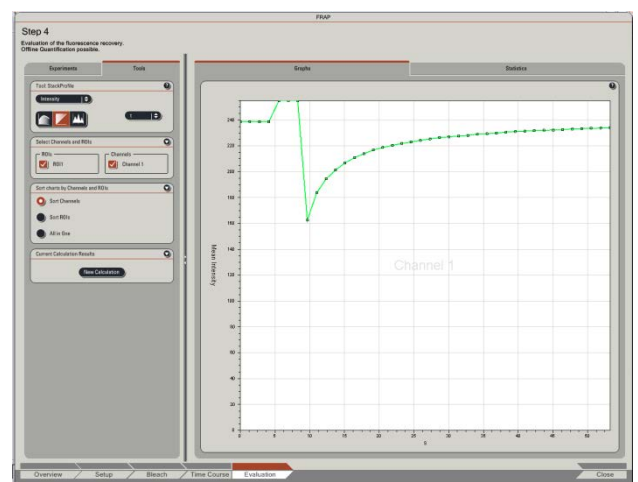


8192x8192픽셀수를 지원하여 10x대물렌즈로 Zoom사용하지 않고 넓은 영역을 많은 수의 픽셀에 담을 수 있습니다. 고배율대물렌즈로 굳이 살펴보지 않더라도 세부사항을 볼 수 있어 저배율오버뷰 이미징에 적합합니다.

■ FRAP, FRET, Calcium imaging, 장시간 live cell imaging용 Application Wizard로 이미징부터 분석까지 지원



Time-critical imaging



analysis

SP8 시스템 구성

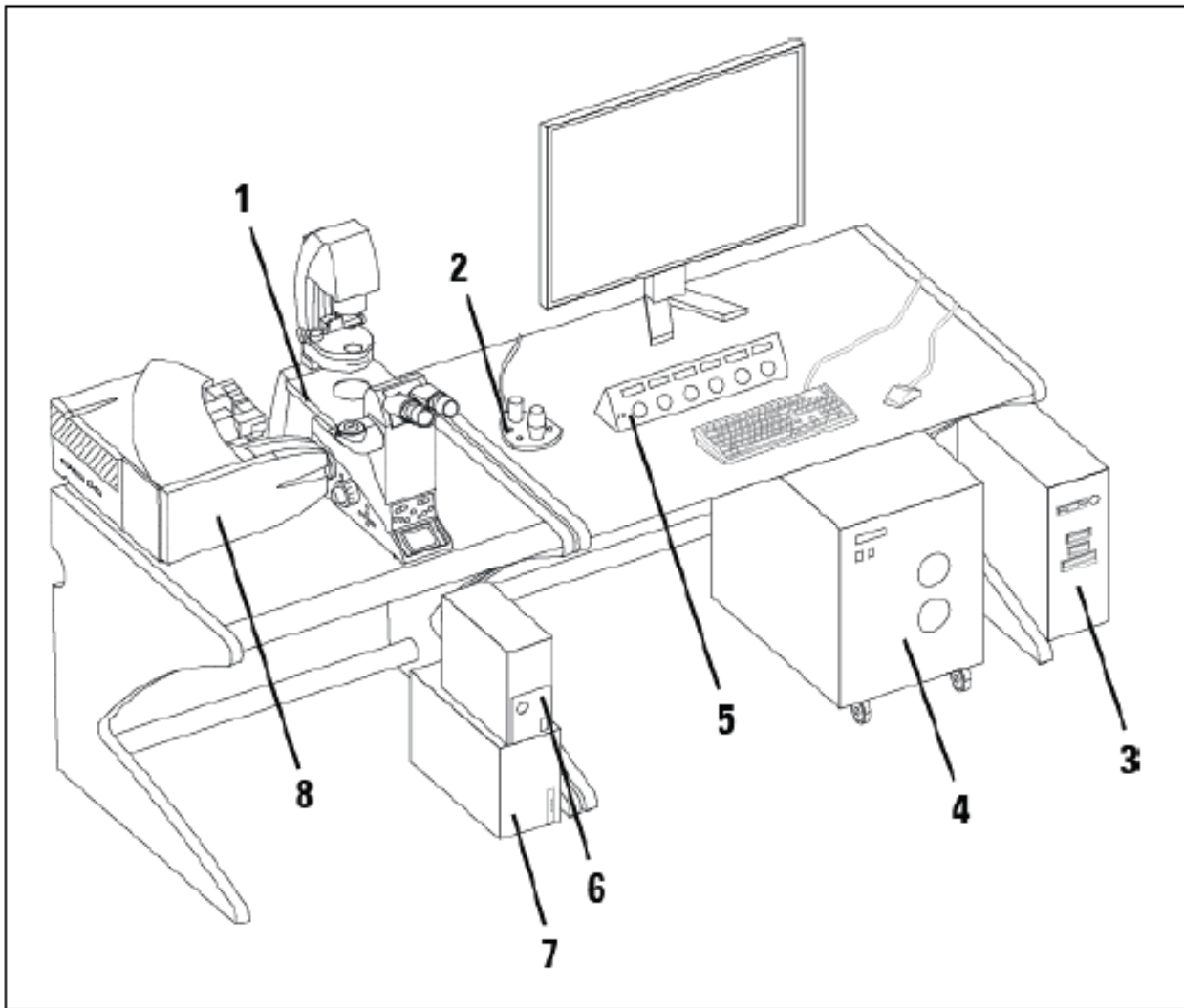
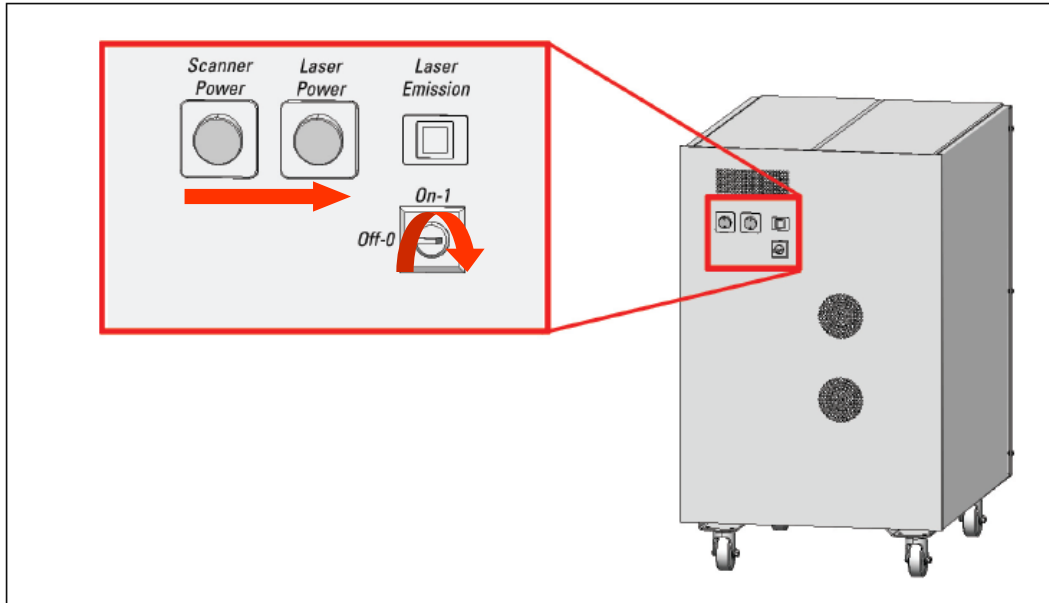


Figure 6: TCS SP8 with inverted microscope and compact supply unit

- | | | | |
|---|---------------------|---|----------------------------|
| 1 | Inverted microscope | 5 | Control panel |
| 2 | SmartMove | 6 | Fluorescence lamp EL6000 |
| 3 | Workstation | 7 | Microscope electronics box |
| 4 | Compact supply unit | 8 | Scan head |

시스템 시작



- 위와 같이 Scanner Power, Laser Power 순으로 전원버튼을 켜고 레이저 키를 오른쪽으로 돌려 점화합니다.

레이저 키를 돌리더라도 실제로는 레이저가 켜지지 않습니다. 나중에 소프트웨어 상에서 켜줘야만 합니다.

- 위 PC/Microscope 버튼을 누르면 컴퓨터는 자동으로 켜지고 현미경쪽으로 전원이 공급됩니다.
- 현미경 전원(CTR6500박스)을 켜고 필요한 경우 외장형광광원(EL6000)을 켭니다.



CTR6500 현미경 컨트롤박스



EL6000
외장형광광원

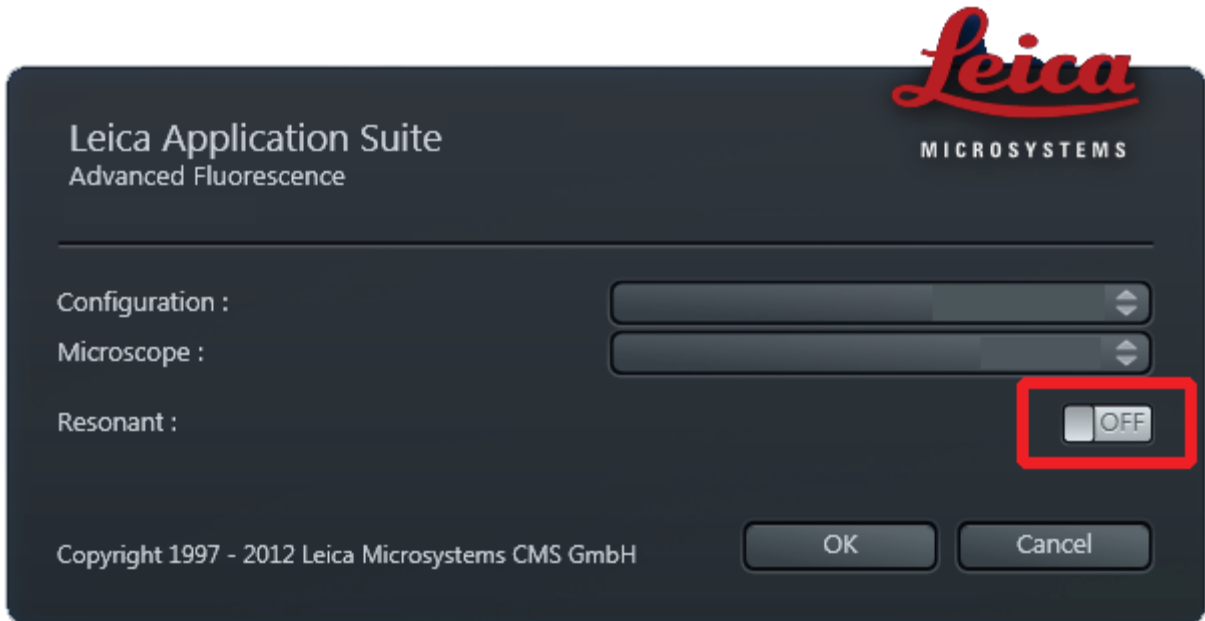
시스템 시작

- TCS_User로 로그인합니다.



- 스캐너와 현미경이 켜진 상태에서 LAS AF 아이콘을 클릭합니다.

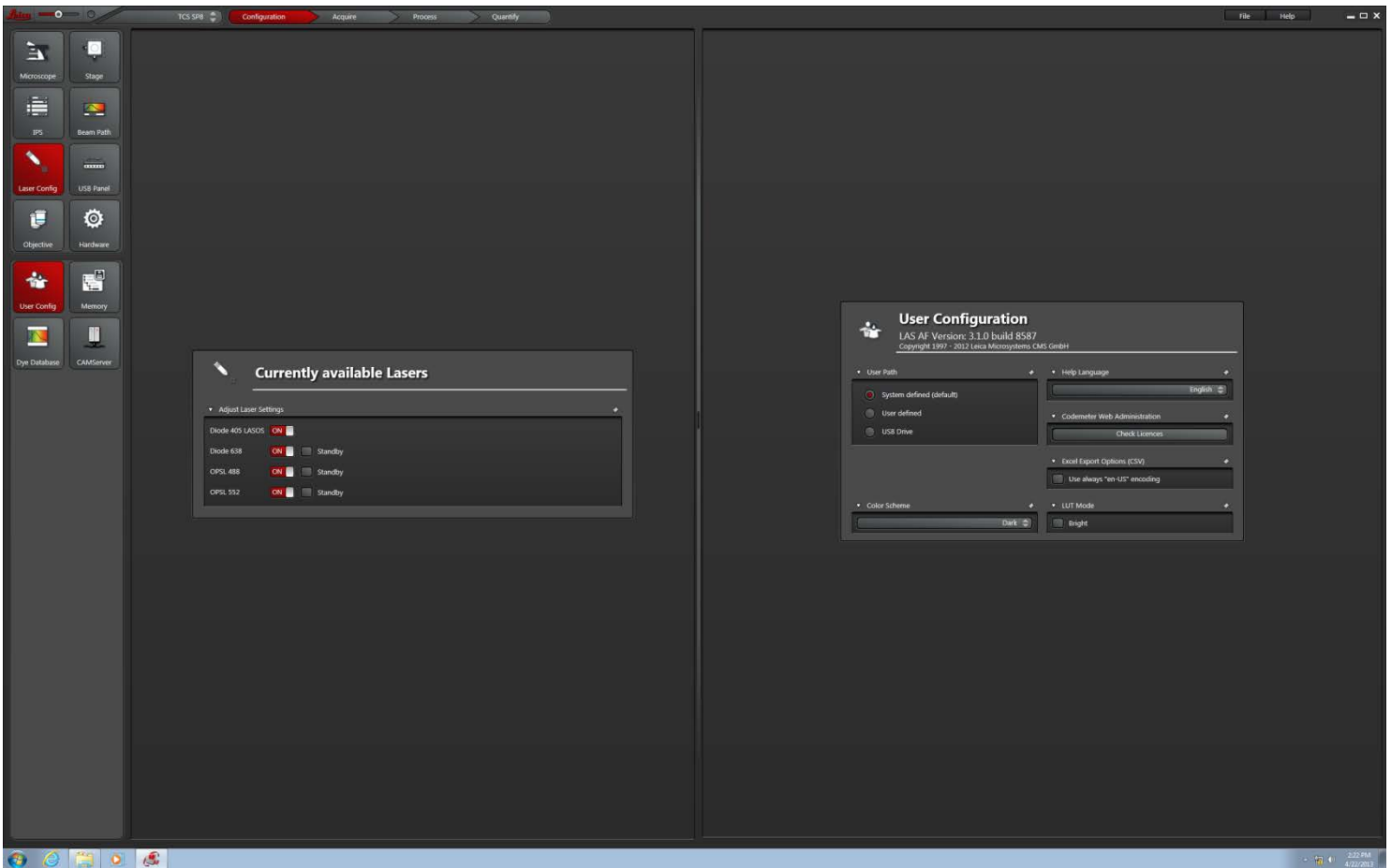
Scanner Power버튼을 누른 후 1분 정도 후에 켜는 것이 좋습니다. Scanner는 켜진 후 초기화가 완료될 때까지 시간이 조금 걸립니다.



- 위와 같이 Splash가 뜨면 Configuration을 machine, Microscope를 DMI6000B로 지정하고 OK를 누릅니다.
 - Configuration을 Simulator (SP8)로 지정하면 스캐너와 현미경을 켜지 않고 LAS AF를 사용할 수 있어서 저장된 파일의 영상처리만 하실 때 유용합니다.
 - Configuration이 machine인 경우는 스캐너와 현미경이 켜져 있어야 정상작동합니다..

시스템 시작

- 하드웨어를 초기화하면서 약 1-2분 후에 LAS AF의 본 화면이 나옵니다.



- LAS AF의 Configuration tab의 Laser 아이콘을 누릅니다.
- 모든 사용 준비가 끝났습니다.

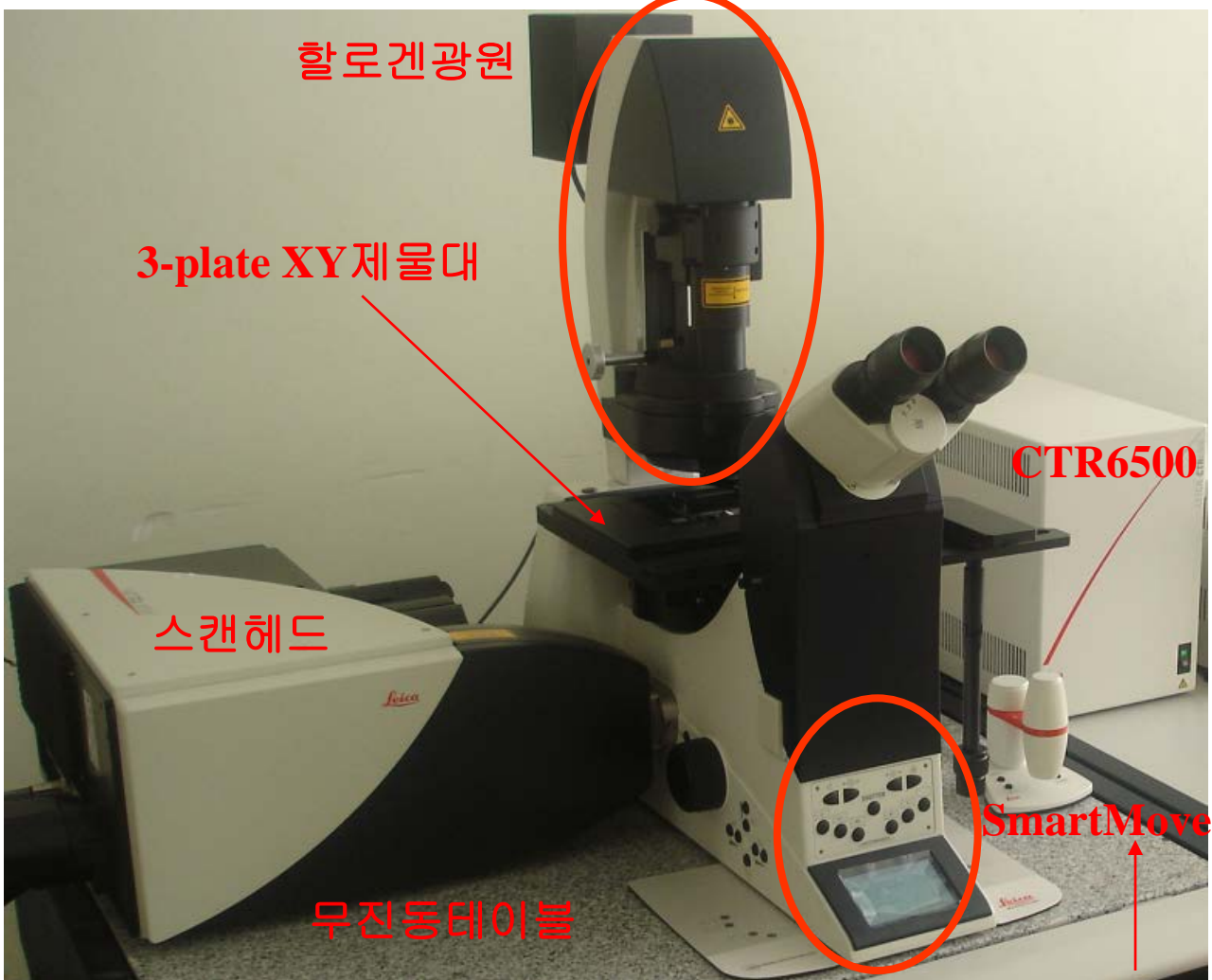
시스템 종료

- 종료는 시작의 역순으로 하시면 됩니다.
- LAS AF의 Configuration tab의 Laser아이콘을 누릅니다. 모든 레이저의 체크를 해제하여 중지시킵니다.
- LAS AF를 종료한 후 컴퓨터를 종료합니다.
- 현미경을 끄고 외장형광전원을 끕니다.
- 레이저 키, PC/Microscope 버튼과 Scanner power 버튼을 끕니다.

형광현미경 – DMI6000 B

- DMI6000 B : 연구용 독립형광현미경
- 전동식 초점장치
- 6 형광큐브 수용
- 관찰법 : 명시야, DIC, 형광
- 관찰설정 자동저장
- XY 3-plate stage

할로겐광원컬럼은 뒤로 젖혀지므로 시료를 제물대에 놓기가 쉽습니다.

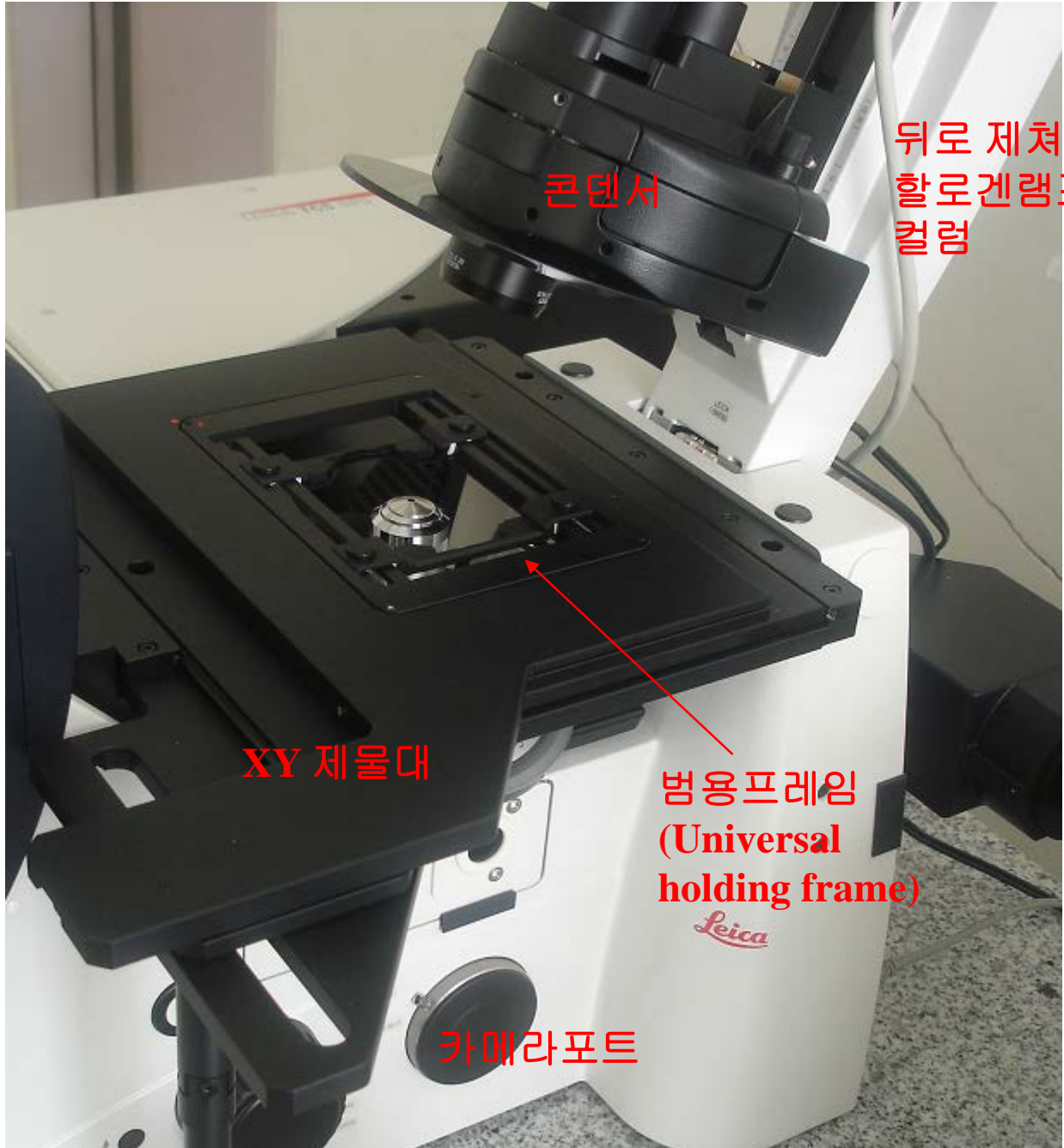


LCD에 관찰설정이 바로 표기되며 형광큐브 버튼이 전면에 배치되어 형광관찰이 용이합니다.

현미경용 remote console, 대물렌즈 변환, 전동XY 제물대 조절, 초점 조절

형광현미경 – DMI6000 B

■ 시료를 올리기



할로겐램프컬럼을 뒤로 젖히고 커버글래스를 아래로 하여 슬라이드를 제물대 위에 조심스럽게 올려놓습니다.

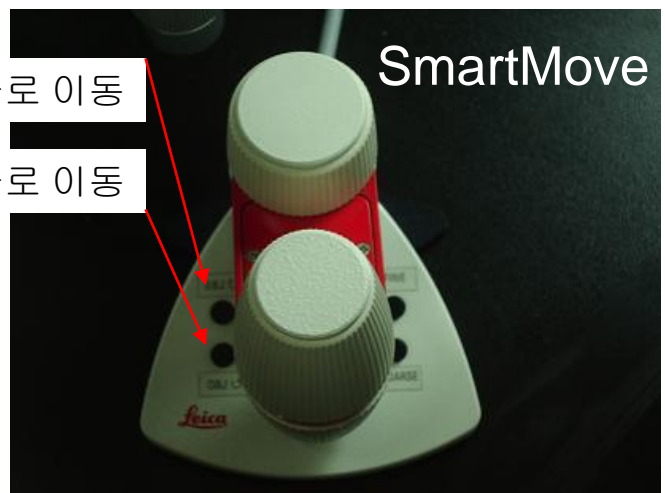
제물대에 탈부착이 되는 범용프레임은 슬라이드, 60mm 디쉬까지 올려서 볼 수 있습니다. 디쉬를 보실 때는 **coverglass bottomed dish**를 사용하시면 좋습니다. **Coverglass**는 **0.17mm**규격인 **#1.5**를 사용하시면 좀 더 좋은 해상도의 영상을 얻을 수 있습니다.

형광현미경 - DMI6000 B



배율/NA	규격	Immersion	Coverglass 두께	Free Working Distance	품번
10x / 0.40	HC PL APO CS	Dry	0.17 mm	2.20 mm	15506285
20x / 0.70	HC PL APO CS	Dry	0.17 mm	0.59 mm	15506513
40x / 1.30	HC PL APO CS2	Oil	0.17 mm	0.24 mm	15506358
40x / 1.10	HC PL APO CS2	Water	0.14~0.18mm	0.65 mm	15506357
63x / 1.40	HC PL APO CS2	Oil	0.17 mm	0.14 mm	15506350
100x / 1.40	HCX PL APO CS	Oil	0.17 mm	0.09 mm	15506210

■ 대물렌즈를 전환하고 싶을 때



Dry 렌즈에서 오일렌즈로 전환할 때는 (또는 반대의 경우) DRY/IMM버튼을 누르고 대물렌즈전환버튼을 누릅니다.

현재 대물렌즈 배율표시



이렌즈인지 표시 (DRY<>IMM)

총 확대배율 표시

전면LCD

형광현미경 - DMI6000 B

■ 초점을 맞출 때

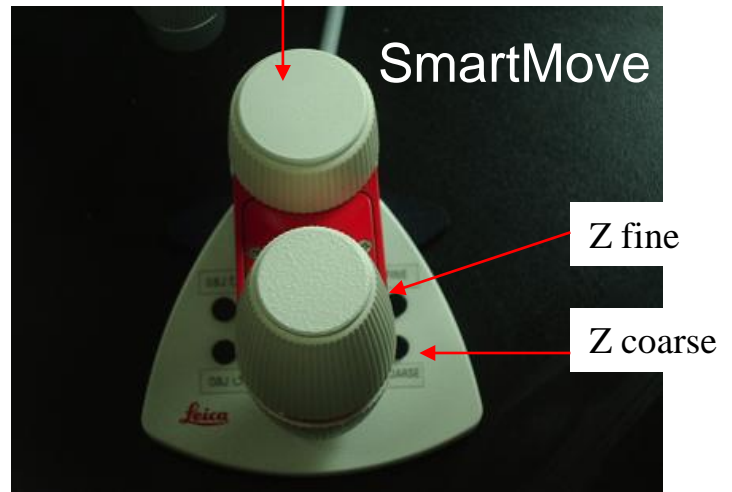


초점면 위치로 이동 → Z ↑
 최저점, 초점면 설정버튼(SET) → SET
 최저점으로 이동 → Z ↓

초점다이얼

전면LCD

FLUO	I3	
40x Obj. IMM		
1.0x MagCh.	Σ 400x	
FIM 100%	FD	O3
100%		
↑↓ Z	- 0.55 mm	coarse



현재 Z위치 표시 :
 초점면 위치가 설정된
 경우에 표시되면 초점면
 위치를 0으로 설정하고
 최저점 방향으로 내려가면
 마이너스 수치, 현재
 초점면 위치보다 위로 가면
 플러스 수치가 표시된다.

초점다이얼을 돌릴 때 속도 표시 Z fine은
 미세하게, Z coarse는 빠르게 이동된다.

최저점 설정 표시 : Z↓와 SET버튼을 동시에 누르면 현재 Z위치를
 최저점으로 표시, 해제하려면 동시에 다시 누르면 됨

초점점 설정 표시 : Z↑와 SET버튼을 동시에 누르면 현재 Z위치를
 초점면으로 표시, 해제하려면 동시에 다시 누르면 됨

형광현미경 – DMI6000 B

- 형광필터를 전환하고 싶을 때



형광셔터버튼

원하는 형광필터큐브 버튼을 누르면 자동으로 형광모드로 바뀌고 필터가 전환됩니다.

현미경전면

형광모드

형광필터 표시

형광셔터 개폐여부 표시

☾	FLUO	I3	⌵
🔍	40x Obj. IMM		
	1.0x MagCh.	Σ 400x	
💡	FIM 100%		
		FD	O3
📷	👁 100%		
⬆️Z	- 0.55 mm	⚡	⏴ coarse



Filter cube	Light color	Excitation	Beamsplitter	Emission
A	UV	BP340-380	400	LP425
I3	Blue	BP450-490	510	LP515
N2.1	Green	BP515-560	580	LP590

형광 현미경 - DMI6000 B

■ 명시야나 DIC 관찰하고 싶을 때

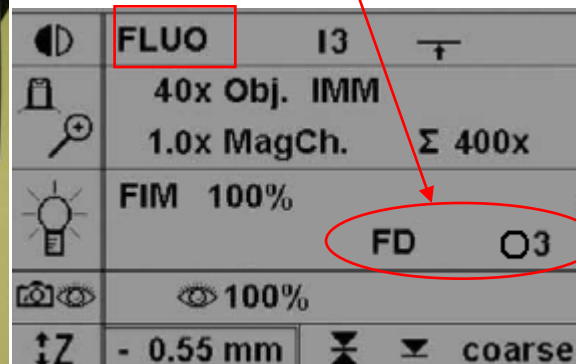
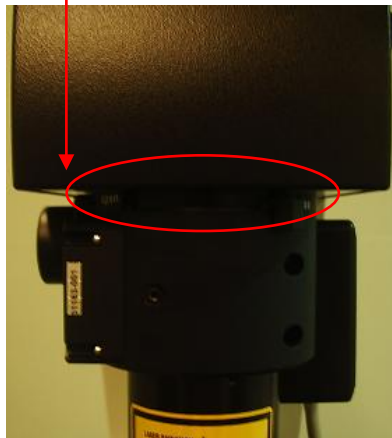
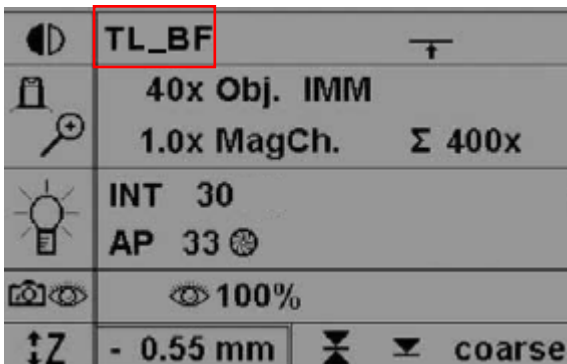
Chg TL 버튼을 누를 때마다
차례대로 명시야 (BF) >
DIC > 편광 (POL) 순서로
투과광 관찰법이 선택됩니다.

INT 두 버튼을 동시에 누르면
fine / coarse로 전환됩니다.



INT : intensity
FD : field diaphragm
AP : aperture diaphragm

	TL(투과광) 명시야, DIC, 편광	IL(반사광) 형광
INT 광량	0-20 (fine) 0-255 (coarse)	FIM 10%, 17%, 30%, 55%, 100%
FD 시야크기	수동조절	1-6 원 1-6 사각
AP 대조조절	0-38	- (완전개방)



형광 현미경 – DMI6000 B

■ 기타버튼

대안렌즈로 관찰

카메라로 관찰



현미경전면



형광모드

형광필터전환

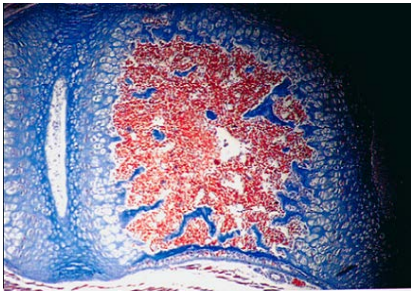
컨포컬모드

LAS AF에서
컨포컬이미징
하면 자동으로
SCAN모드로
전환됩니다.

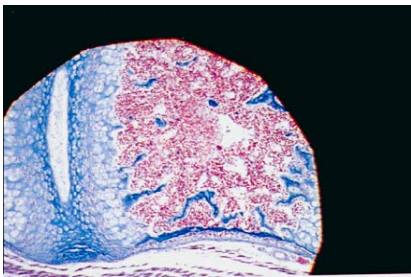
	SCAN	
	40x Obj. IMM	
	SCAN MagCh.	Σ x
	INT 30	
	AP 33	
	- 0.55 mm	coarse

형광현미경 - DMI6000 B

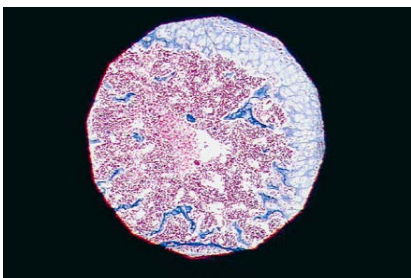
■ 투과광용 Köhler 조명법 설정



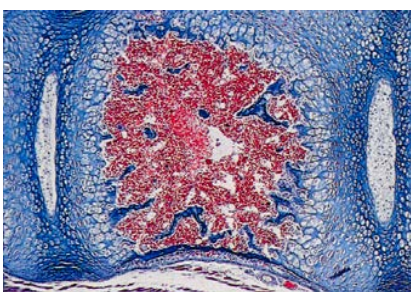
10x대물렌즈/명시야에서 시료를 제물대에 올리고 초점을 맞춘 후 FD를 줄입니다.



시야 가장자리가 뚜렷하게 콘덴서 높이를 조정한다



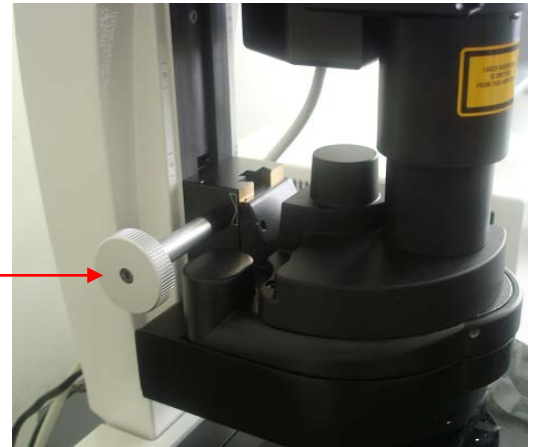
시야를 정가운데로 옮긴다. 조절막대를 뽑아 전면 구멍에 놓고 돌리면서 조정합니다.



FD를 보이는 한계(대물렌즈크기)까지만 연다

투과광 관찰법의 기본설정으로 최적DIC 관찰에 필수적인 조명설정입니다.

고배율 대물렌즈로 DIC관찰시 10x로 전환하지 않고 Köhler를 맞춰보면 보다 나은 결과를 얻습니다.



형광현미경 – DMI6000 B

■ 투과광용 DIC 세부설정

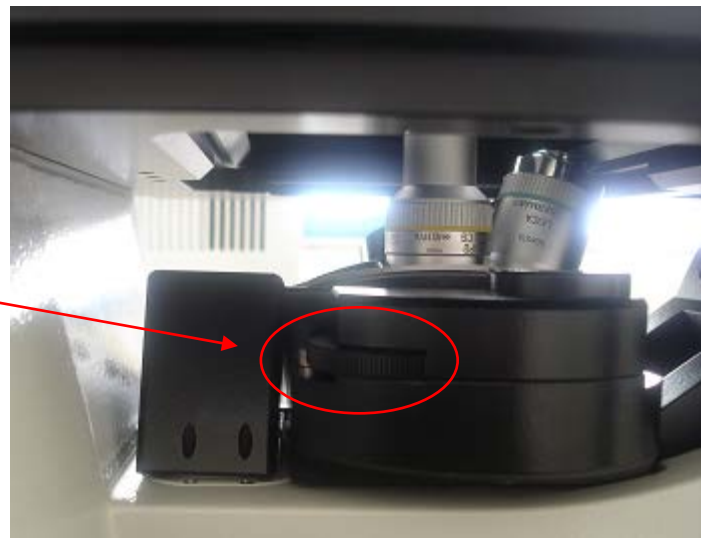
Köhler 조명조건이 최적인 상태에서 시료를 올리지 않고 편광(POL) 모드로 전환합니다.

손잡이를 좌우로 돌려 배경이 완전히 까맣게 보이게 만듭니다.



시료를 올리고 DIC모드로 전환합니다.

대물렌즈 밑 Shear 다이얼을 돌려 알맞은 입체효과영상이 나오도록 합니다.



컨포컬 광로설정

■ LAS AF 좌측 스크린

TCS SP8 켜 후 LAS AF를 실행하면 아래와 같이 Acquire tab이 선택되어 있습니다. Acquisition subtab의 이미징 파라미터는 LAS AF 실행 이후에는 항상 XYZ 모드, 512x512 픽셀수, 400Hz, Zoom 1x, average 1, accumulation 1, rotation 0, pinhole 1 AU로 초기화되어 있습니다.

현미경에 시료를 올리고 형광으로 초점을 맞춥니다. LAS AF 실행하기 전에 초점을 맞추면 LAS AF 실행 시 초점이 초기화되므로 반드시 LAS AF를 실행한 후에 초점을 맞춥니다.

아래의 Beam Path Setting(광로설정)을 설정합니다.

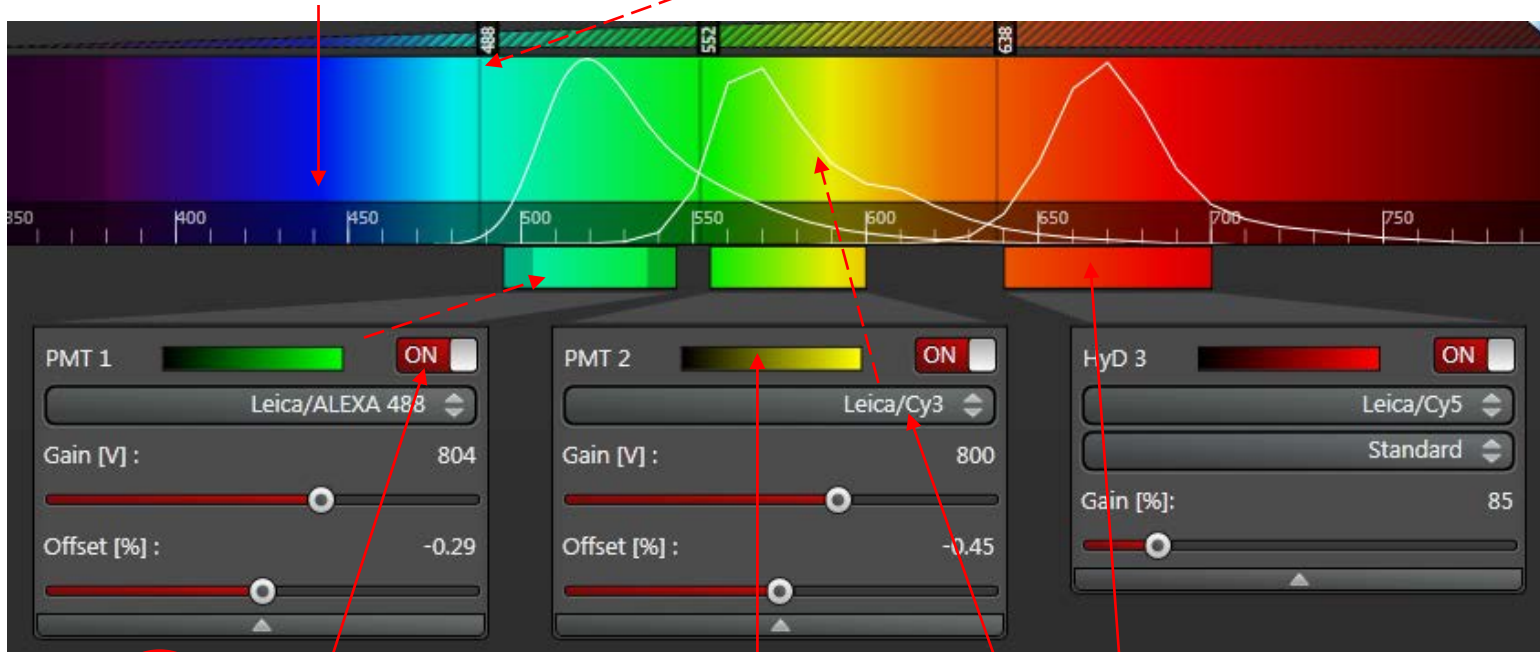
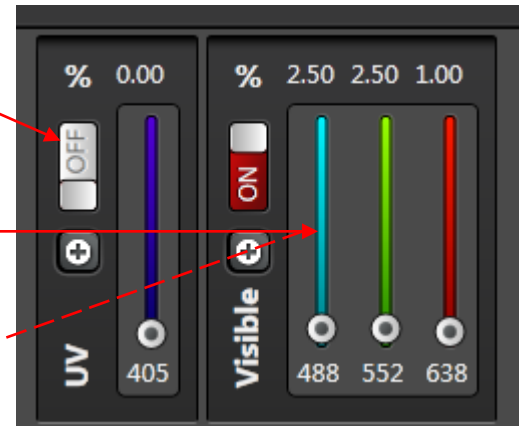
The screenshot displays the Leica TCS SP8 software interface in the 'Acquire' tab. The left sidebar contains the 'Acquisition Mode' section, which is highlighted with a red box and labeled '이미징 파라미터' (Imaging Parameters). This section includes settings for XY resolution (512x512), speed (400 Hz), zoom factor (1.00), and various averaging and rotation parameters. The main window shows the 'Beam Path Setting' section, also highlighted with a red box and labeled '광로설정' (Beam Path Setting). This section includes objective and beamsplitter selection, specimen stage controls, and detailed PMT (PMT 1, PMT 2, PMT Trans) and HyD 3 gain and offset settings. At the bottom, the 'Live' button is labeled '라이브버튼' (Live Button) and the 'Capture Image' button is labeled '날장찍기 여러장찍기' (Live button, Multiple image capture).

컨포컬 광로설정

동시스캔 광로설정

광로설정은 컨포컬 스캔헤드 구조나 기본원리에 나온 것과 유사한 구성을 보입니다. 따라서 사용할 레이저 선택, 광량 지정, PMT 선택, 슈도컬러 선택, 감지대역 설정 순으로 지정하면 됩니다. 아래는 Alexa488, Cy3, Cy5 3채널 동시스캔 설정화면입니다.

- 1 레이저 셔터(UV 또는 가시광선용)를 열면 적색으로 바뀝니다
- 2 원하는 레이저의 광량을 슬라이더를 움직여 AOTF수치를 지정합니다. 선택레이저라인이 아래 무지개색에 그려집니다.
- 3 선택된 레이저라인이 모두 표기된 빔스플리터를 고릅니다.(자동선택)



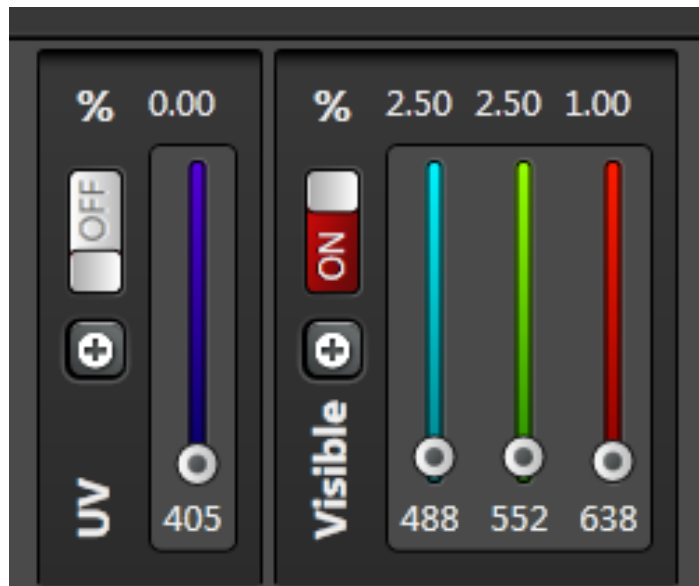
- 4 PMT의 Active를 체크하면 활성화되면서 감지대역까지 그림자가 이어집니다.
- 5 원하는 슈도컬러를 선택합니다.
- 6 Drag하여 레이저라인을 피하여 감지대역을 지정합니다. 이때 Dye를 선택하여 나타난 에미션 그래프에 맞추어 감지대역을 잡으면 쉽습니다.

컨포컬 광로설정

- 레이저 광량설정(CSU)

현재 레이저구성과 최대출력(100% AOTF)은 아래와 같습니다. 광량이 높아질수록 광표백이 점점 심해져 장시간 이미징 할 수 없습니다. 이를 고려하여 AOTF %수치를 조절하여 출력을 줄여 사용하게 됩니다.

Laser	Lines (nm)	Max Power (mW)
Diode	405	50
	448	40
	488	20
	514	20
	552	20
	638	30



컨포컬 광로설정

- 염색시약 별 레이저 선정



Configuration / Dyes를 선택하면 Spectral Database를 볼 수 있습니다. 염색시약에 대한 여기곡선, 에미션곡선과 그 최대파장을 볼 수 있습니다.

여기곡선을 보고 어떤 레이저라인이 최대 흡수도를 갖는지 알아볼 수 있으며, 한 레이저 라인에 의해 시료에 쓰인 각 염색시약의 상대적 흡수도를 살펴볼 수 있습니다.

Table of Spectra

▼ Leica

- ALEXA 488
- ALEXA 514
- ALEXA 532
- ALEXA 546
- ALEXA 555
- ALEXA 568
- ALEXA 594
- ALEXA 633
- ALEXA 647
- BODIPY
- Cy3
- Cy5
- Cy7
- DAPI
- DSRED
- EBFP
- ECFP
- EGFP
- EYFP
- FITC
- FLU03
- HOECHST 33258
- Lucifer Yellow
- Mito Tracker Red

Spectrum data

Emission
Excitation

nm	%
250	100.94
251	94.07
252	88.23
253	82.85
254	78.23
255	74.42
256	71.33
257	69.01
258	66.98
259	65.12
260	63.41
261	62.00
262	60.54
263	59.43
264	58.31
265	57.29
266	56.71
267	56.58
268	56.77
269	57.44
270	58.35
271	59.23
272	60.30

Get Data Points

Name: ALEXA 488 Date: 05/10/2005 14:09:21

Full Name: Alexa Fluor 488

Excitation max: 499 Emission max: 520 Cube:

Comment:

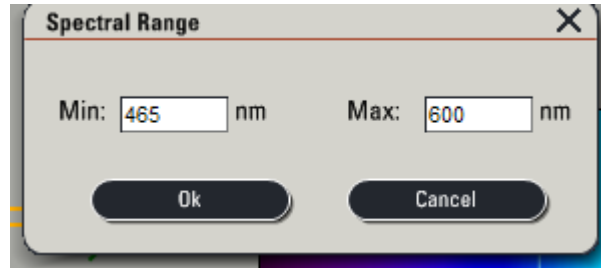
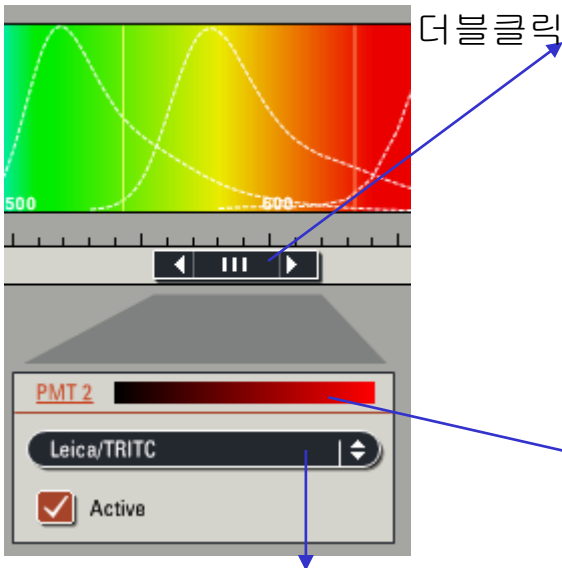
Creator: Leica Copyright: Copyright ©2005 Invitrogen Corporation

또 Molecular Probes사 홈페이지에 여러 염색시약을 살펴볼 수 있는 웹툴이 있습니다.

<http://probes.invitrogen.com/resources/spectraviewer/>

컨포컬 광로설정

■ 감지대역 설정

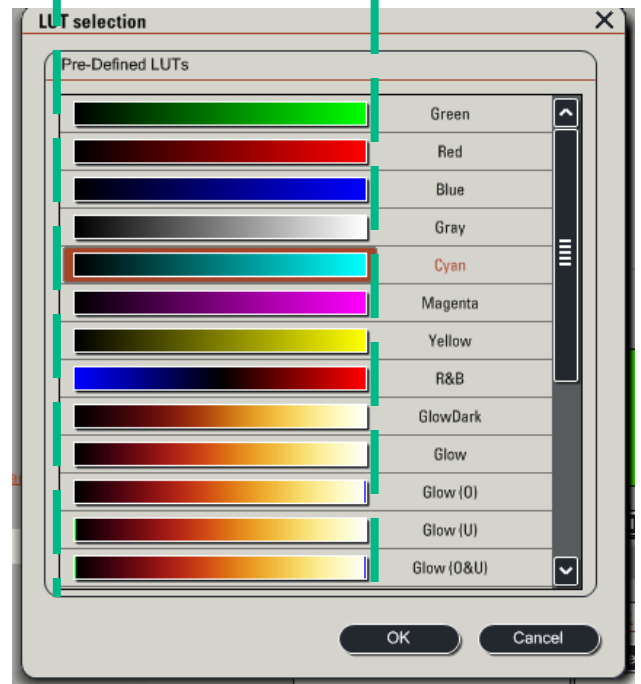


라이브 영상을 보면서 감지대역을 변경

가장자리 마우스 drag로 최소, 최대치 변경, 가운데 drag로 대역 이동

대역폭 감소시 영상밝기 감소

0 8bit 경우 255



Drop list에서 사용중인 dye를 지정하면 해당 dye의 emission graph가 위 무지개그림에 그려진다.

감지대역을 잡을 때 도움이 됨

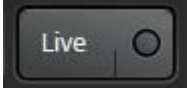
Configuration > Dyes에서 excitation, emission graph를 볼 수 있고, 새로 생성, 편집이 가능

슈도컬러인 LUT(Look Up Table)를 선정합니다.

Configuration > Settings의 Resolution에서 비트수를 바꿀 수 있다.

비트수 증가시 정량에 유리하나 저장된 영상은 일반이미징소프트웨어에서 보이지 않는 경우가 많다.

컨포컬 광로설정

- 라이브 스캔 

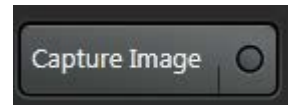
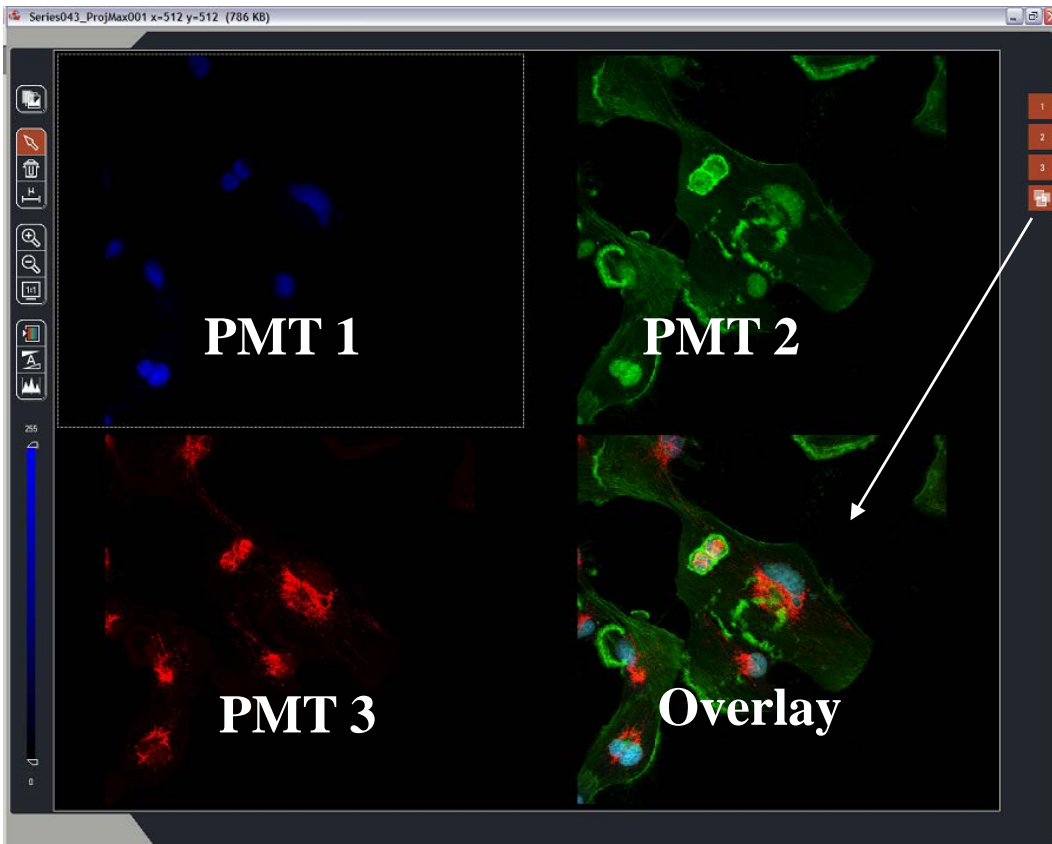
라이브 버튼을 누르면 preview scan이 되면서 현재 화상을 오른쪽 창에 보여줍니다. 현재는 PMT값이 0라서 아무런 영상도 오른쪽 스크린에 나타나지 않습니다.

오른쪽 스크린에서 원하는 채널을 마우스 선택하고 아래 패널박스의 첫번째 다이얼 (Smart Gain)을 이용하여 Gain수치를 올리면 영상이 나옵니다. 나머지 채널도 마찬가지로 조정합니다. 초점이 잘 맞지 않아 보이면 마지막 다이얼 (Z position)을 돌려 초점위치를 재조정합니다.



Smart Gain

Z Position

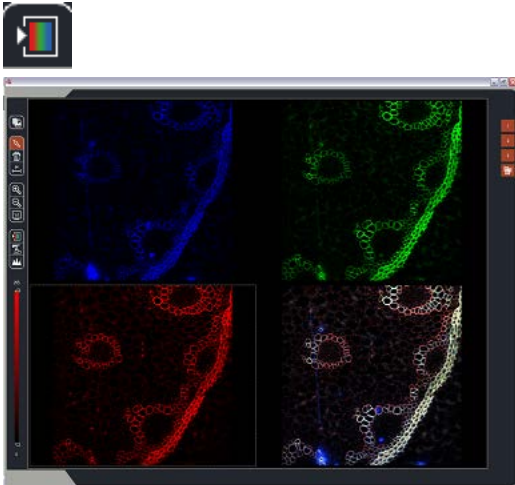


라이브 버튼을 끄고 낱장 버튼을 누르면 한 장이 찍힙니다.

오른쪽 스크린에 여러 채널을 겹쳐보고 싶으면 Overlay버튼을 누릅니다.

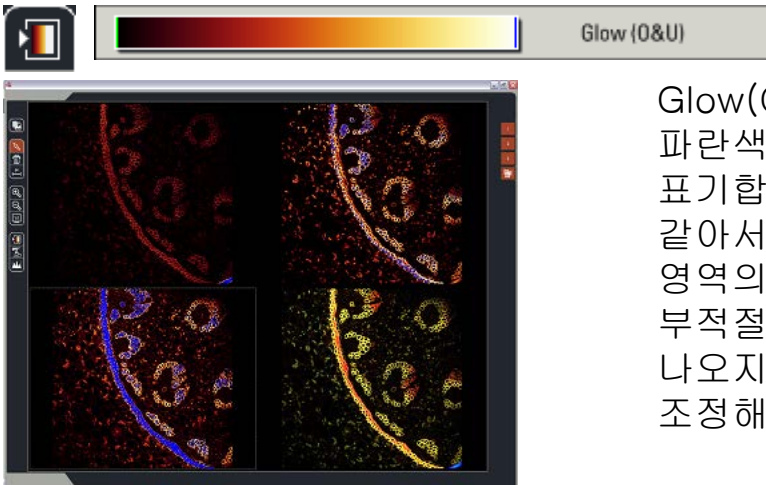
컨포컬 광로설정

- 라이브스캔 중 밝기조정

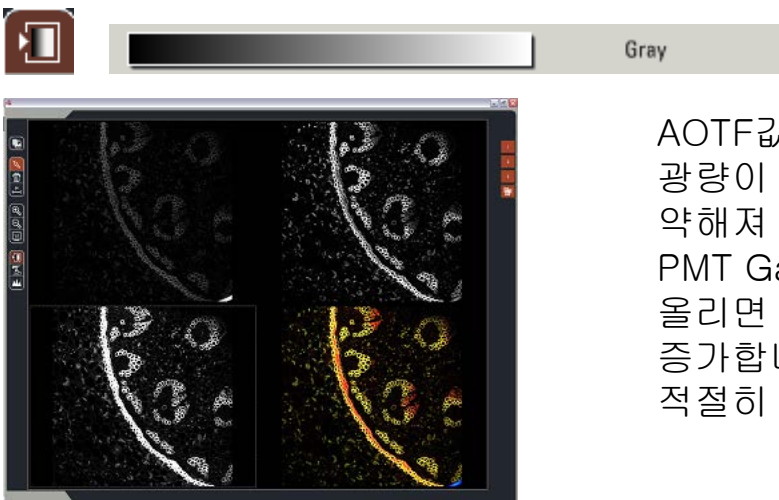


화면의 밝기를 조정하려면 감지기증폭수치인 PMT Gain을 조정하거나 레이저 광량인 AOTF 값을 바꾸어야 합니다.

값을 조정할 때 밝기비교를 위해 오른쪽과 같이 QuickLUT가 있어 누를 때 마다 Original > Glow(O&U) > Gray로 LUT를 바꿔줍니다.



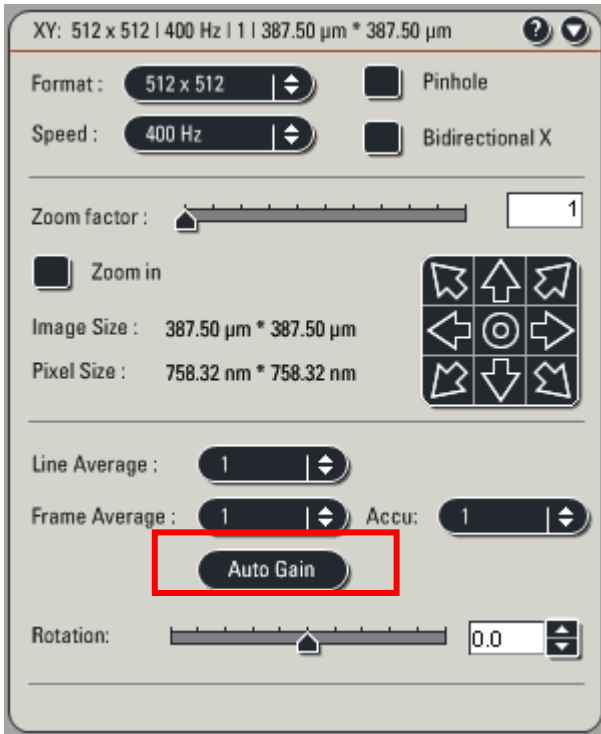
Glow(O&U) LUT는 포화된 픽셀(255)을 파란색으로 빛을 못 받은 픽셀(0)을 녹색으로 표기합니다. 포화 픽셀들 사이에는 값이 같아서 실제 차이가 있는 것을 알 수 없으므로 영역의 밝기 수치가 필요한 정량분석에 부적절합니다. 따라서 파란 포화된 픽셀이 나오지 않도록 PMT Gain 또는 AOTF값을 조정해야 합니다.



AOTF값을 너무 올리면 시료상에 떨어지는 광량이 증가하므로 광표백이 증가하여 형광이 약해져 오래 관찰할 수 없습니다. PMT Gain값은 850V 이하가 적당하며 너무 올리면 점점이 나타나는 dark noise가 증가합니다. 따라서, 시료상태에 따라 두 값을 적절히 사용해야 합니다.

컨포컬 광로설정

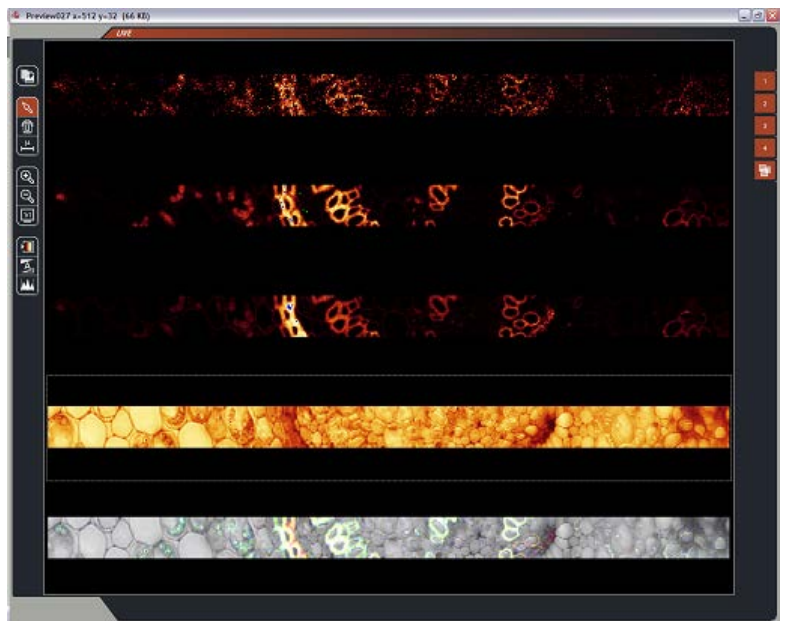
Autogain



AutoGain 실행 중인 화면

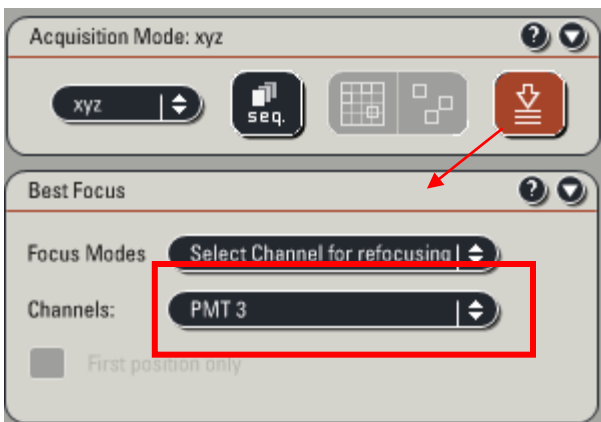
AutoGain 버튼을 누르면 자동으로 화면의 중앙부만 이미징하여 최적의 PMT gain 값을 자동으로 조절해서 날장스캔 해 줍니다.

동시스캔모드에서만 사용가능하며 라이브 버튼을 한 번 누른 후 사용해야 합니다.



Best Focus

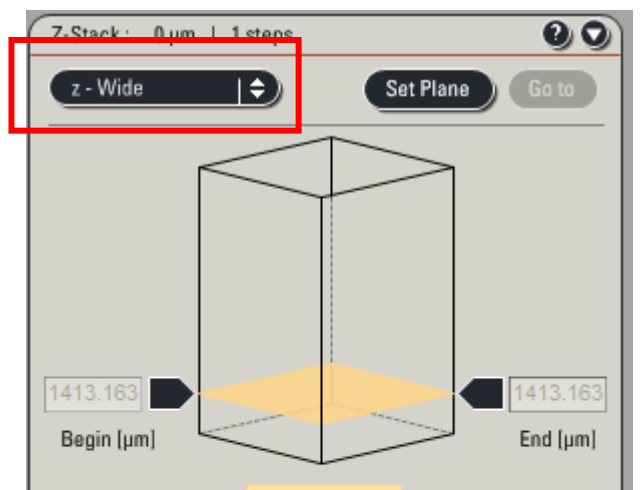
Best Focus



Best Focus 버튼을 누르면 현재 대충 맞춰진 초점을 시스템이 자동으로 찾아 줍니다.

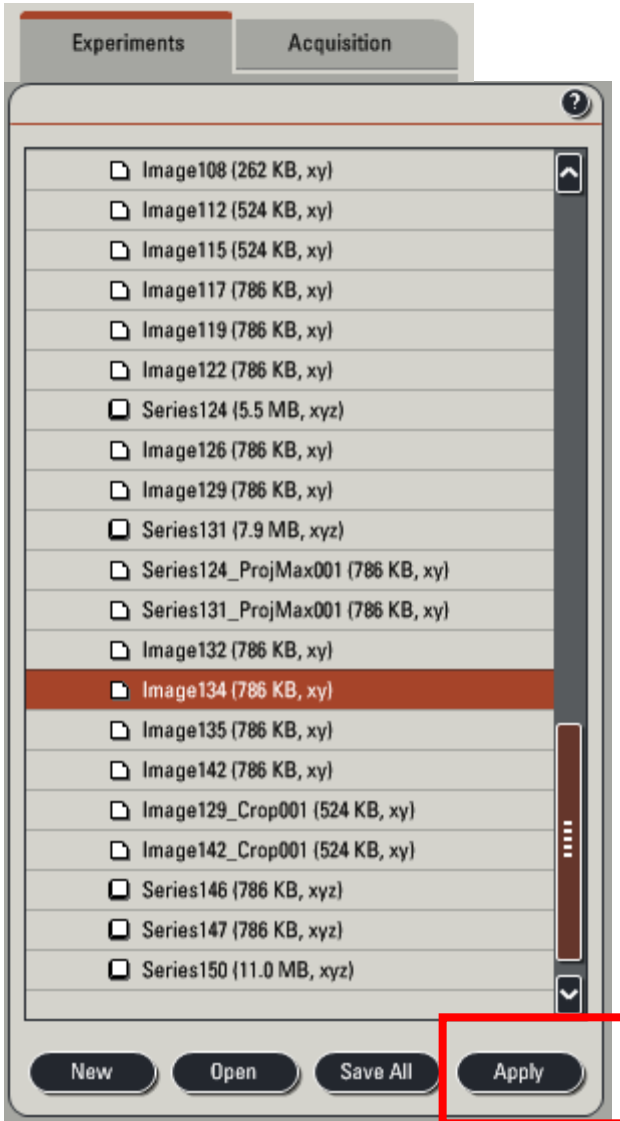
초점을 찾을 때 사용하는 이미징 채널을 선정할 수 있습니다.

이 기능을 사용하시려면 Z stack tab에서 Z wide로 지정되어야 합니다.



컨포컬 광로설정

- 예전에 찍었던 스캔설정 불러오기

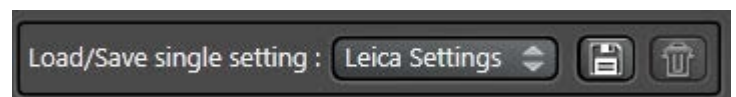


날장찍기 및 여러장찍기 버튼을 누른 경우는 Experiment tab에 차곡차곡 영상이 쌓여있습니다. 각 항목을 클릭하면 이전에 찍었던 영상을 볼 수 있습니다. 밑의 SaveAll버튼을 누르면 라이카 포맷인 *.LIF라는 한 파일로 저장됩니다.

이전에 찍었던 파일은 Open버튼으로 열고 원하는 영상을 선택한 후 Apply버튼을 누르면 영상을 찍었던 당시의 이미징세팅으로 변경됩니다.

New버튼을 누르면 새 Experiment폴더가 생성되고 그 밑에 파일을 옮기거나 새로 스캔한 영상을 넣을 수 있습니다.

만일 현재 이미징스캔세팅이 마음에 들어 별도의 설정파일로 저장하고 싶은 경우 beam path settings에 있는 다이얼로그를 사용하면 됩니다.



이미징 파라미터

패널박스



라이브 스캔
다음 채널 선택

패널박스는 라이브스캔 중 화면조정을 할 수 있는 이미징 파라미터를 지정하여 빠르게 조정할 때 사용됩니다. LCD에는 현재파라미터와 그 값이 표시됩니다.

각 다이얼을 설정하려면 Configuration / USB Control Panel을 선정하거나 Acquire의 링크를 이용합니다.

USB Control Panel

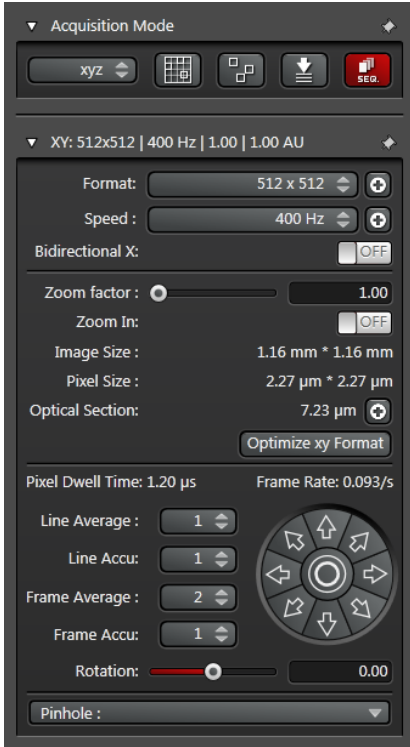
다이얼에 이미징 파라미터 지정

다이얼 한 바퀴 돌릴 때 값 변경 수준

변경된 패널박스 설정 저장 및 불러오기

이미징 파라미터

■ 파라미터 종류



옆 파라미터들은 보통 XY단면영상을 찍을 때 관여되는 항목들입니다.

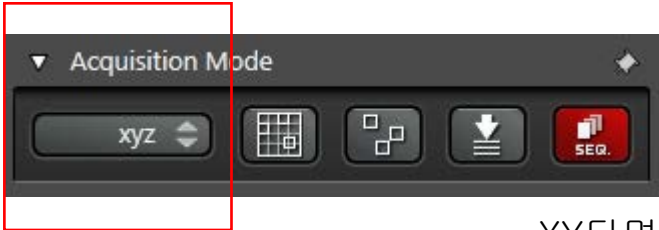
찍혀진 영상으로부터 Apply버튼을 눌러 현재 하드웨어세팅을 변경할 경우 원하는 파라미터들만 적용할 수 있습니다.

Configuration/Instrument Parameter Settings Masks의 Confocal Apply항목을 편집하면 됩니다.

파라미터	설명	패널박스로 지정 가능	스캔 중 변경 가능
Mode	스캔모드	X	X
Format	픽셀수	X	X
Speed	단방향스캔속도	X	X
Bidirectional scan	양방향 스캔	X	X
Phase	양방향 스캔 중 영상 얼라인	O	O
Zoom	스캔 줌	O	O
Pan	스캔필드의 시야 내 이동	O	O
Rotation	스캔필드회전	O	O
Pinhole	핀홀크기	O	O
Average	Dark noise제거	X	O
Accumulation	픽셀값 증가	X	X
AOTF	레이저광량	X	O
PMT Gain	증폭비율로 화면밝기	O	O
PMT Offset	화면대조	O	O
Detection range	감지파장대역	X	O
beamsplitter	빔스프릿터	X	X
Z position	초점위치	O	O
Objective	대물렌즈	X	X

이미징 파라미터

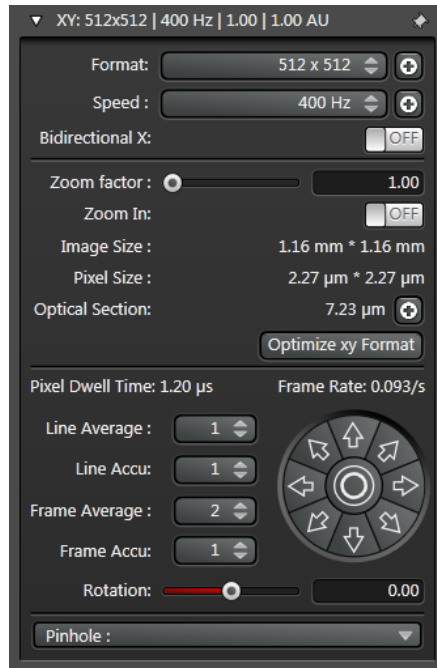
■ Acquisition Mode



XY단면영상용 설정

Z stack용 설정

- **XYZ**
- **XT**
- **XYT**
- **XYZT**
- **XYλ**
- **XYλT**
- **XYλZ**
- **XYZλT**



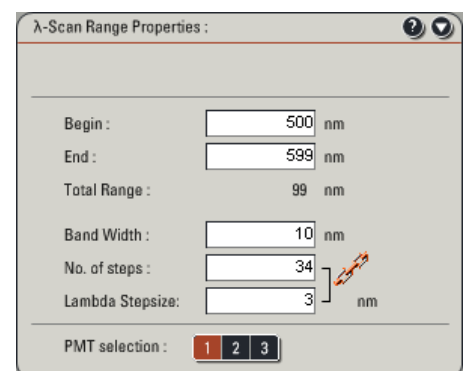
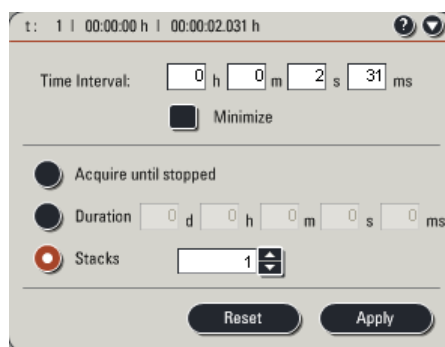
Timelapse용 설정

Wavelength scan용 설정

위의 8가지 스캔모드가 지원되면 적색은 주로 사용되는 모드입니다.

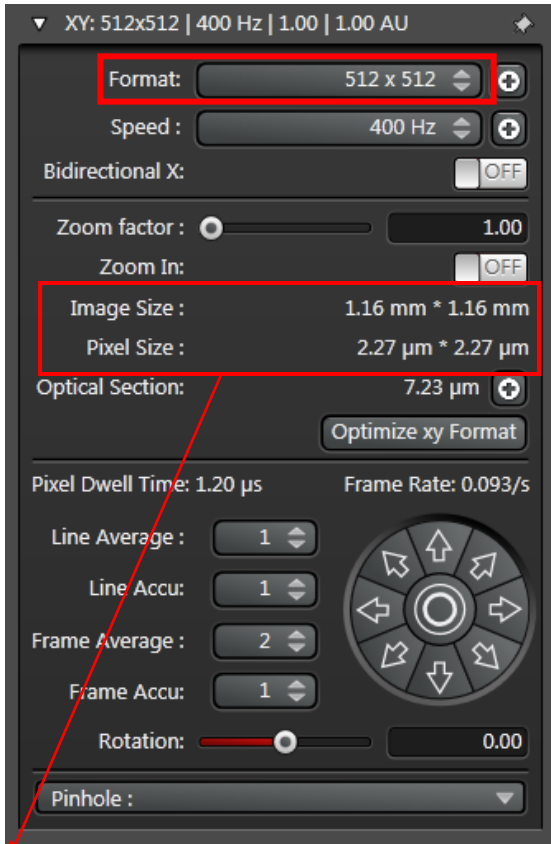
스캔모드는 Z, T, λ의 조합으로 XY영상용 설정탭이외에 선택된 Z, T, λ설정탭이 따로 나옵니다.

XYZT는 일정시간마다 Z stack을 찍는 모드입니다. Z가 T보다 먼저 나오므로 Z가 더 작은 규모로 인식됩니다.



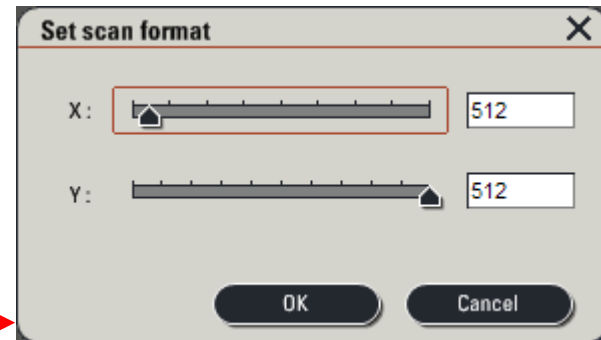
이미징 파라미터

Format



16x16 ~ 8192x8192까지 픽셀수를 지원하나 주로 512x512를 사용합니다.

3000x3000과 같이 임의크기의 픽셀포맷을 만들 수 있습니다.



영상 실제크기는 대물렌즈와 줌배율에 따라 바뀌고 개별픽셀크기는 영상크기 / 픽셀수에 따라 변합니다.

Nyquist Sampling Theorem에 따라 찍히기를 원하는 구조물의 크기보다 2배 이상 작은 픽셀크기를 가져야 제대로 이미징됩니다.

픽셀크기를 줄으려면 픽셀수를 늘이거나 줌하여 일부영역만 이미징하면 됩니다. 이때 대물렌즈의 XY해상력의 절반까지가 픽셀크기의 유효한계입니다.

Configuration / Objective에서 각 대물렌즈의 XY해상력크기를 볼 수 있습니다.

Description:	
Type:	HCX PL APO CS
Magnification:	20
Numerical Aperture:	0.7
Immersion	DRY
Coverglass:	0,17
Resolution XY(488nm):	279
Resolution Z(488nm):	768
Free Working Distance:	590
Focus Depth:	0
Focus Offset:	0
Phase Ring:	
IC Prisms:	C
Technique:	
Cond. Prism DIC	K3
Order Number:	11506513
405 Correction Optic:	Lens 10x
UV Correction Optic:	Lens 10x

이미징 파라미터

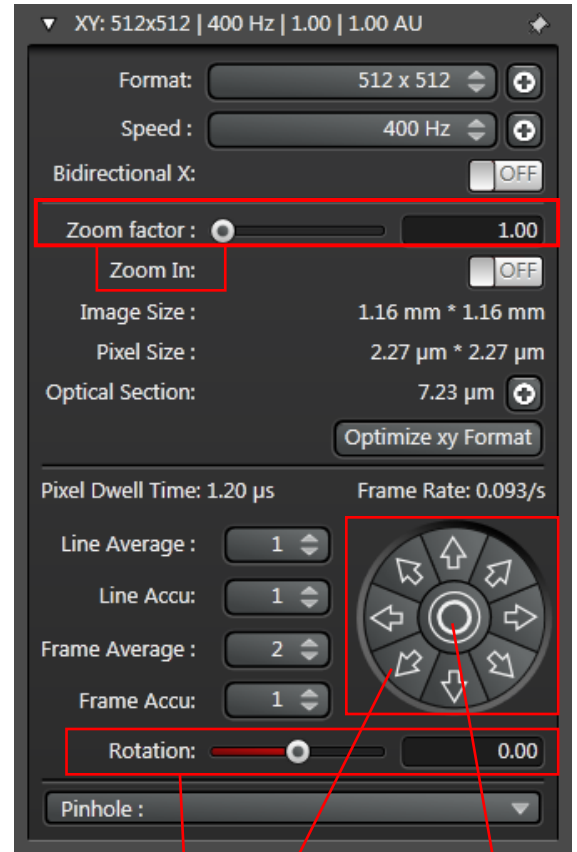
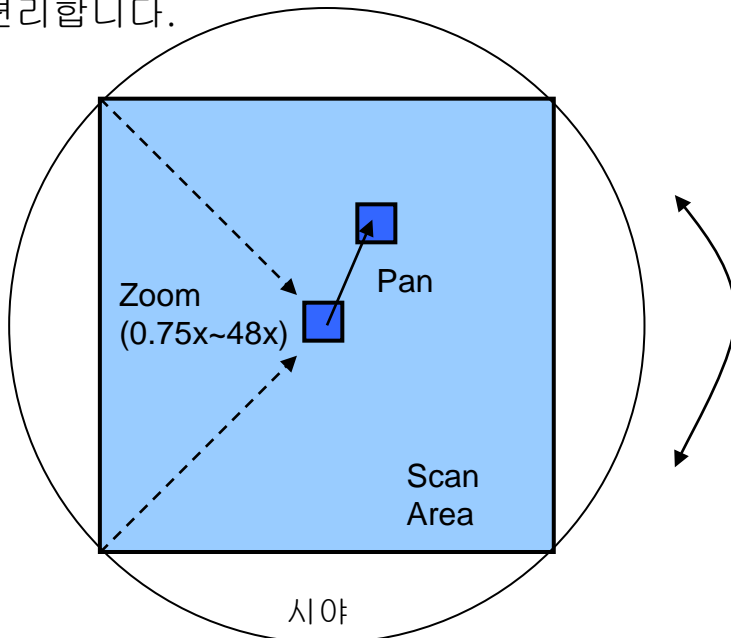
Zoom, Panning, Rotation

Zoom을 바꾸면 영상의 실제크기가 변경되며 연달아 픽셀크기도 바뀝니다. 스캔영역크기가 작아져 광포백이 심해집니다.

시료의 일부만 확대해 볼 때 사용하며 Zoom in 체크박스를 체크하고 오른쪽 모니터에서 원하는 곳을 drag하면 바로 확대됩니다.

Zoom이 들어간 경우에는 스캔영역이 원래시야보다 작아서 좌우로 움직이는 panning을 할 수 있습니다.

패널박스에서 Panning Horizontal, Panning Vertical을 각 다이얼에 지정하여 사용하면 편리합니다.



Panning 버튼들

시야중심으로 스캔영역 복귀버튼

Scan field rotation :
-100° ~ 100° 시야 정중앙을 중심으로 회전

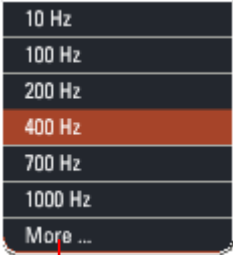
Rotation은 neuron axon, muscle cell의 칼슘이미징과 같이 고속 라인스캔(XT 모드)이 필요한 경우에 세포의 장축을 가로로 놓기 위해 주로 사용됩니다.

Zoom in, Panning이 사용된 경우는 스캔영역의 중심이 시야중심과 다릅니다. 시야중심으로 회전하는 Rotation을 사용하면 시료가 사라지므로 Zoom 1x상태에서 제물대를 움직여 시료를 시야중심으로 가져와야 합니다.

제물대가 움직이는 방향과 이미지의 방향을 같게 하려면 Rotation 90° 하고 Configuration / Settings의 Image Orientation/Flip X를 체크하면 됩니다.

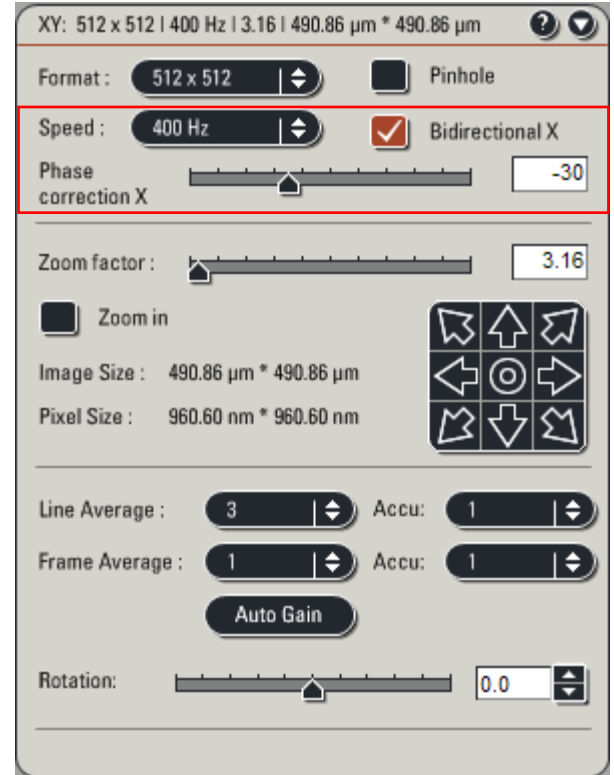
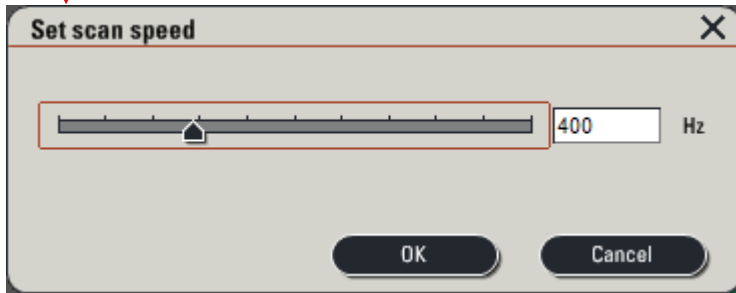
이미징 파라미터

- Speed, bi-directional scan, phase



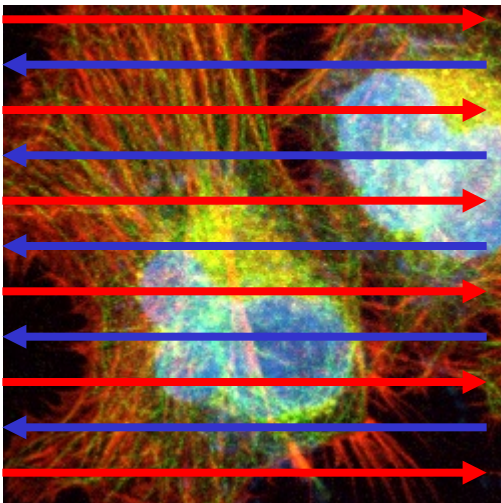
Speed는 단방향스캔속도를 초당 라인수로 표현한 것으로 주로 400Hz를 주로 사용합니다.

1~1400Hz사이의 1282Hz와 같은 임의의 스캔속도를 지정할 수 있습니다.



Speed	최저 줌
400Hz이하	1x
700Hz	1.7x
1000Hz	3x
1400Hz	6x

Speed가 올라가면 스캐너 구조상 자동으로 줌이 들어가 스캔영역을 줄입니다. 즉 1400Hz에서는 6x이하 줌을 사용할 수 없다는 이야기입니다. 스캔속도가 올라가면 픽셀이 빛을 받는 시간인 pixel dwell time이 감소하여 어둡게 영상이 나옵니다.



Bidirectional scan은 순방향과 역방향스캔으로 얻어진 영상을 조합하여 보여줍니다. 조합이 잘못된 경우 어긋난 영상을 보여주며 Phase correction X를 사용하여 재조정해야 합니다.

단방향 스캔과 같은 pixel dwell time을 가지면서 두 배의 속도를 낼 수 있어 효과적입니다. 줌이 들어가지 않은 상태에서 400Hz bidirectional으로 800Hz를 낼 수 있습니다.

이미징 파라미터

■ 영상밝기 및 노이즈

영상의 밝기는 Pixel dwell time, PMT Gain, AOTF에 따라 달라집니다.

레이저 광량인 AOTF를 올리면 영상이 밝아 지지만 시료에 광표백이 증가하여 형광이 감소하므로 오래 관찰할 수 없습니다.

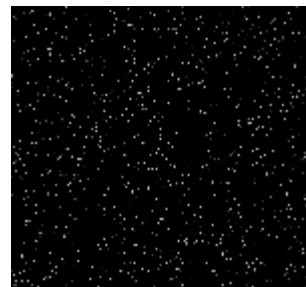
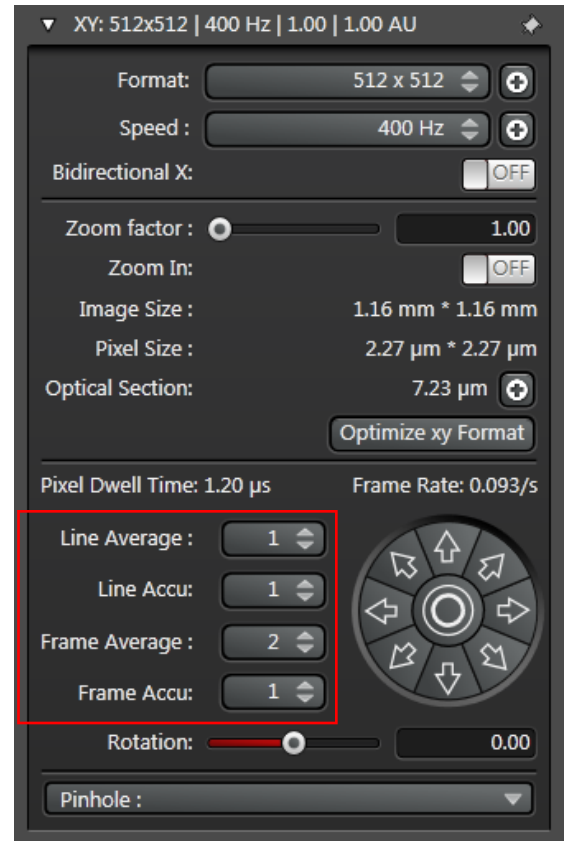
Pixel dwell time은 각 픽셀이 빛을 받은 시간으로 픽셀수가 증가할수록, 단방향 스캔 속도가 증가할수록 짧아집니다. 하지만 양방향스캔에 의해서는 변화가 없습니다. Pixel dwell time이 매우 짧아지면 PMT가 충분한 빛을 받지 못해 노이즈가 증가할 수 있습니다.

PMT Gain값이 850V 이상으로 커지면 PMT 자체 잡음인 dark noise가 증가합니다.

노이즈가 있는 경우 line average나 frame average를 사용하여 픽셀을 여러 번 스캔 후 평균을 취하면 깨끗한 영상을 얻을 수 있으나 스캔을 여러 번 하므로 스캔속도가 느려집니다.

광표백이 심하여 AOTF를 1~2%로 낮게 주어야 하는 경우 Frame accumulation을 사용하여 여러 번 스캔후 픽셀값을 더해주면 밝기를 올릴 수 있습니다. 이때 노이즈도 증폭되는 것을 막기 위해 line average를 같이 사용하면 좋습니다.

시료자체의 배경이 살짝 밝은 경우 PMT offset을 마이너스%를 주면 이것을 제거할 수 있지만 보고자 하는 밝은 부분도 밝기가 줄어듭니다.

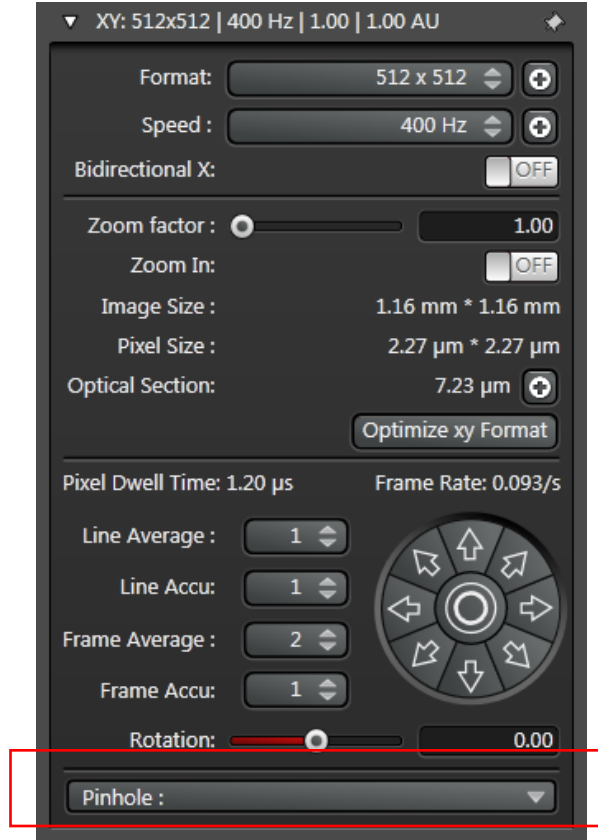
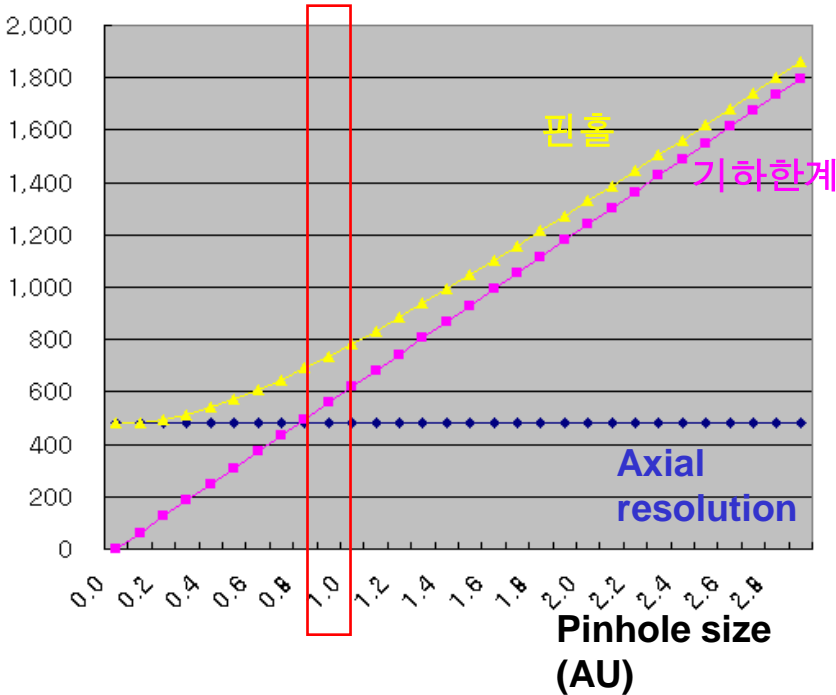


1250V PMT Gain에서의 dark noise



이미징 파라미터

■ Pinhole
Slice thickness (nm)

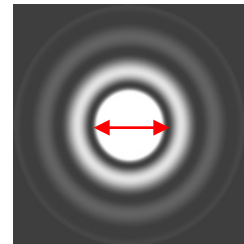


핀홀크기는 1.0 AU가 많이 사용되어 Airy1 버튼이 제공되고 있으며 최저 0.5AU에서 최대 600um까지 지원됩니다. 픽셀크기와 마찬가지로 보려는 구조물의 Z축 두께보다 2배 이상 작은 slice thickness를 가져야만 제대로 이미징됩니다. 하지만 slice thickness는 대물렌즈 Z축해상도 이하로 내려갈 수 없습니다. 그래서 최저 타협점이 1.0 AU입니다. 또, 보는 것처럼 1.0 AU보다 큰 핀홀크기에서는 기하한계와 많이 가까운 slice thickness를 보입니다. 기하한계는 파장성분이 없어서 파장감지대역폭이 넓어도 파장에 따른 두께차이가 거의 없습니다.

PH : 감지핀홀크기 (nm)
MAG : 대물렌즈 배율
NA : 대물렌즈 개구수
n : immersion media 굴절율

$$d_{\text{airy}} = 1.22 \lambda \cdot 3.6 \text{ Mag.} / \text{NA}$$

Airy disc 크기 (AU; Airy Unit)



이미징되는
초점면 두께

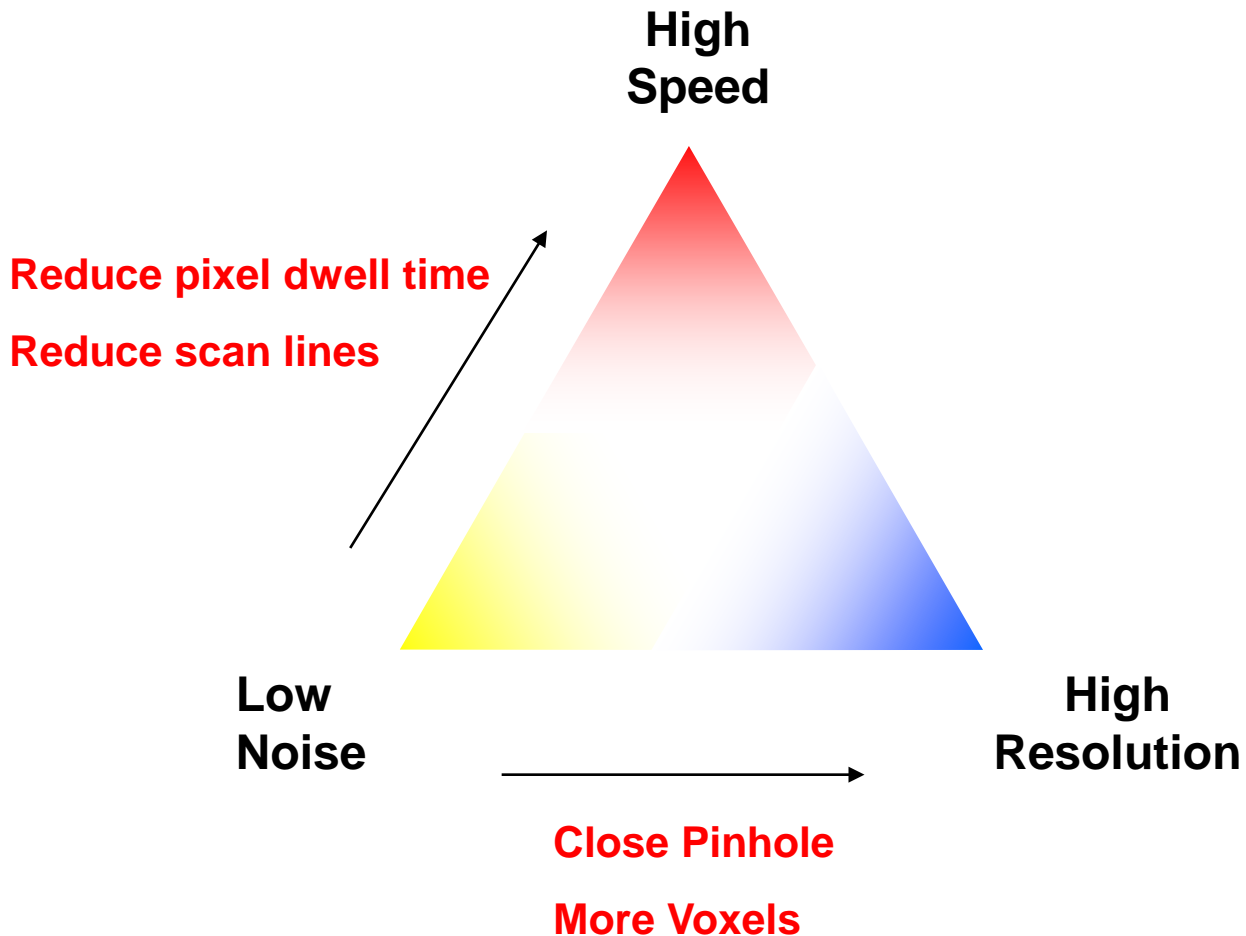
$$d_z = \sqrt{\left(\frac{0.45 \lambda}{n - \sqrt{n^2 - \text{NA}^2}}\right)^2 + \left(\frac{\sqrt{2} n \text{ PH}}{3.6 \text{ Mag. NA}}\right)^2}$$

회절한계,
axial
resolution

기하한계

이미징 파라미터

- 동시에 이루기 힘든 이미징 목적들



Point scan confocal의 원리상 위의 Low Noise, High Resolution, High Speed를 동시에 만족하는 컨포컬은 없습니다. 따라서, 각 시료에 맞추어 적절한 타협점을 찾는 것이 현실적인 방법입니다.

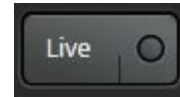
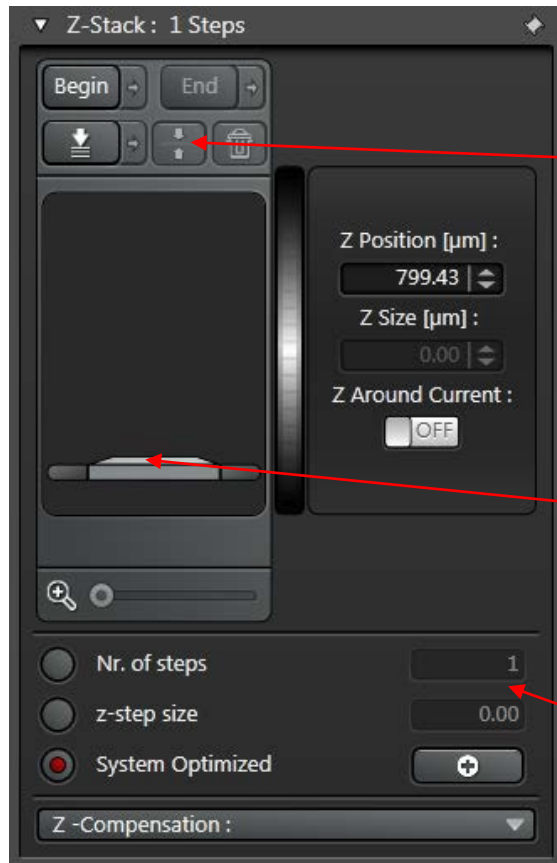
Low noise : 깨끗하고 밝은 영상을 얻으려면 감지기에 빛이 많이 모일수록 좋습니다. 즉, pixel dwell time이 길수록, AOTF 수치가 클수록, 핀홀크기가 클수록, 픽셀크기가 클수록 밝은 영상이 나옵니다.

High Resolution : 매우 작은 구조물도 관찰하려면 voxel 크기가 작을수록 좋아집니다. 즉, 픽셀수가 많을수록, 줌이 들어갈수록, 핀홀크기가 작을수록 좋습니다.

High Speed : 빨리 일어나는 현상을 캡처하려면 고속스캔이 필요합니다. Speed가 클수록, bidirectional scan 사용할수록, format에서 Y축 픽셀수가 작을수록 속도가 빨라집니다.

Z Stacking

Z Stack 설정



포커스 중앙단면을 지정합니다.

휴지통 아이콘을 클릭, 설정값을 모두 지울 수 있습니다.

Live 스캔하면서 시작위치 (Begin)와 끝위치(End)를 지정합니다.

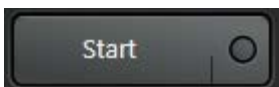
Z-Volume에 Begin-End길이가 나오며 z-step size나 step수를 입력합니다.

System Optimized를 선택하면 현재 대물렌즈 Z축 해상력의 절반크기로 z-step size를 자동지정합니다.

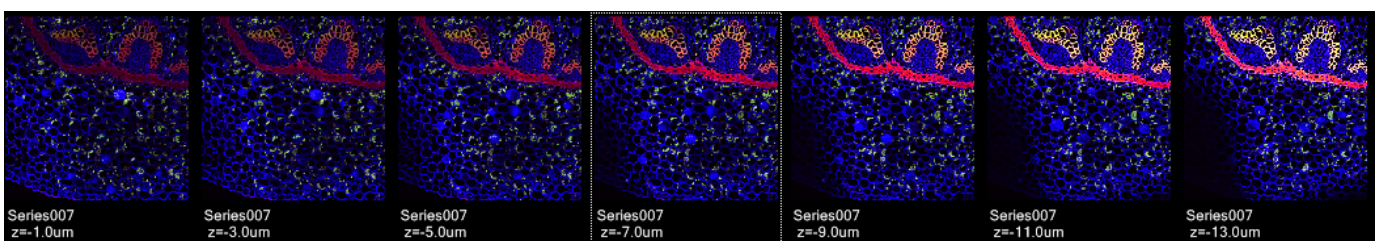
Nyquist Sampling Theorem에 따라 보고자 하는 구조물의 Z축 두께의 절반이하로 핀홀을 조정 한 후 z-step size도 같거나 그의 절반으로 지정합니다.

System Optimized의 z-step size보다 작게 할 수도 있지만 대물렌즈 Z 해상력을 넘어섬으로 무의미합니다.

Navigation tool



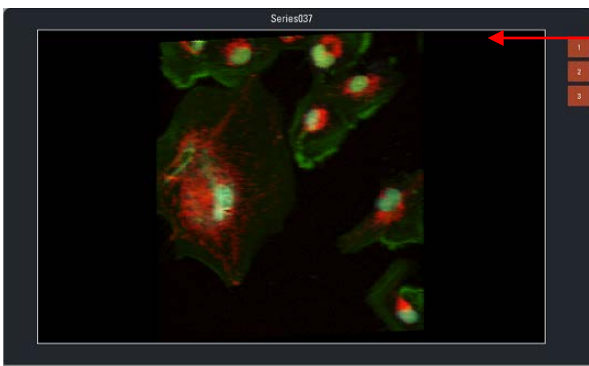
Start버튼을 누르면 자동으로 Z stack영상을 얻습니다.



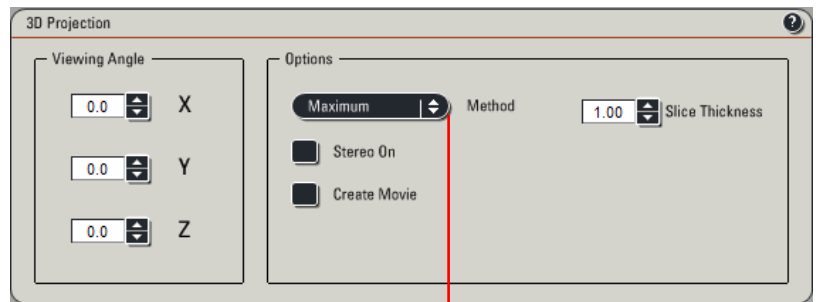
Z Stacking

■ Projection & Rotation Movie

Z Stack영상을 한 장의 Projection영상으로 만들기 : Experiment창에서 Z series 선택 후 Process / Tools / Visualization / 3D Projection에서 Apply 버튼 클릭하면 Projection 영상이 생성된다.



화면에서 마우스 드래그하여 영상을 회전하여 옆을 볼 수 있다.

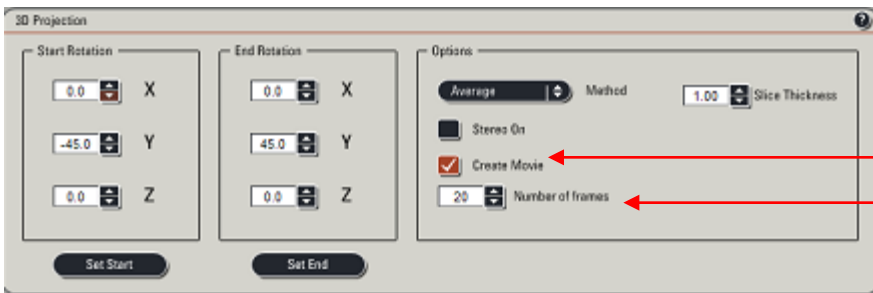


Maximum (MIP) : 픽셀값 중 최대치로 표현

Average : 픽셀값들의 평균값으로 표현

Transparent : 가까운 쪽은 밝게, 먼 쪽은 어둡게 가중치를 주어 표현

Color-coded projection : 깊이에 따라 달라지는 색으로 표현



회전동영상제작 체크

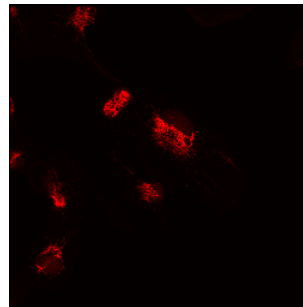
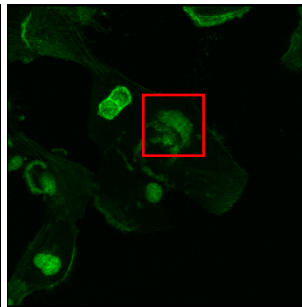
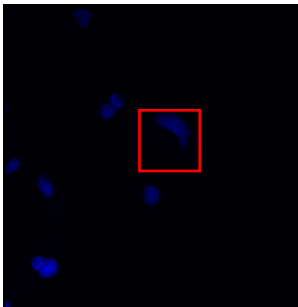
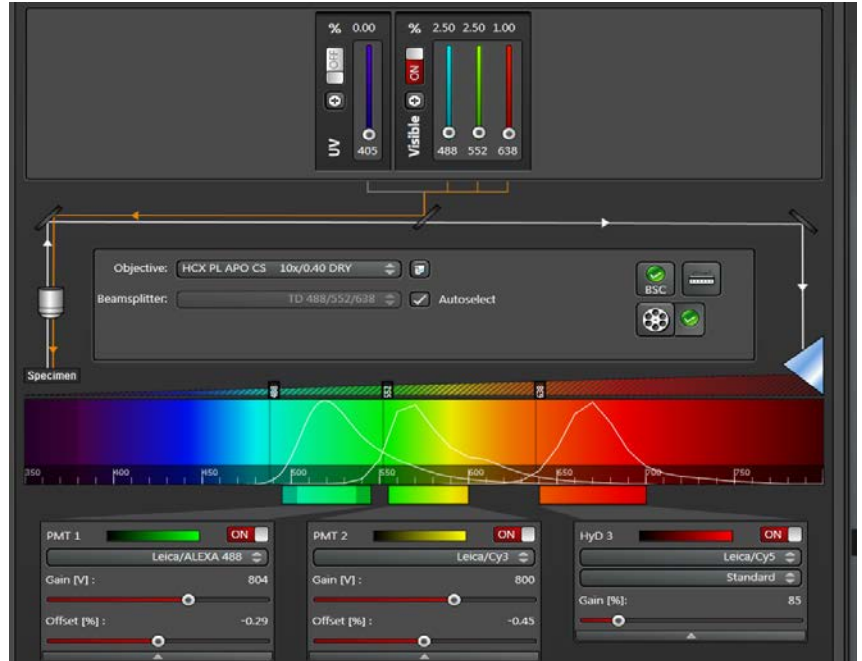
프레임 수

화면에서 마우스 드래그하여 영상을 회전한 후 시작각도와 종료각도를 지정하고 Apply버튼을 누르면 회전동영상이 생성된다.

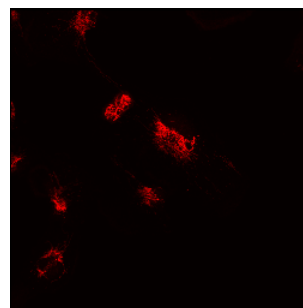
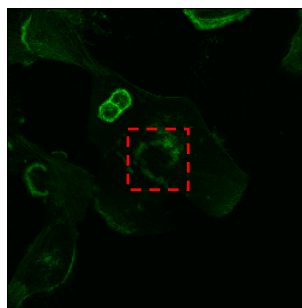
Crosstalk-free Imaging

- 동시스캔시 Crosstalk 확인 및 배제

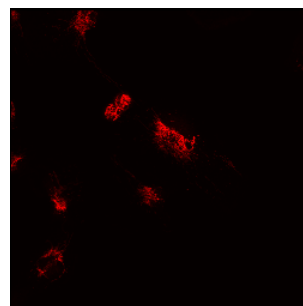
아래와 같은 동시스캔설정에서 각각 레이저를 하나씩 꺼보면 Crosstalk을 쉽게 확인해 볼 수 있다.



405nm off



405nm, 488nm off



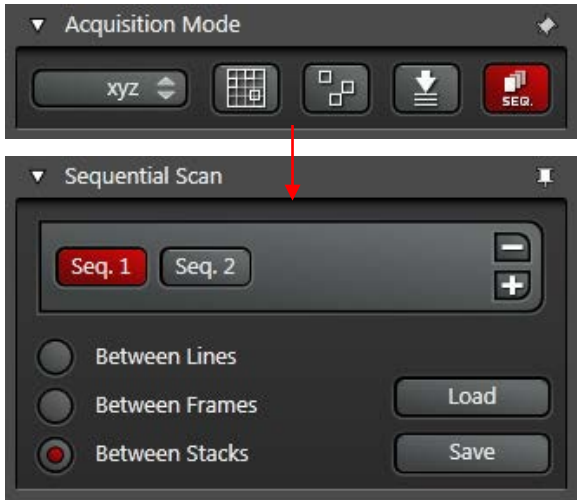
405nm 레이저를 켜고 있을 때 녹색채널에 DAPI crosstalk이 확인되었다. 적색채널은 405nm, 488nm 레이저를 켜고 있을 때 별다른 이상이 없어 Crosstalk이 없음을 확인하였다.

이로서 405nm의 레이저광량이 높은 것으로 보여 ND3.0로 바꾸고 PMT1 Gain을 높였다. 상대적으로 PMT2 Gain을 낮추고 대신 488nm AOTF를 올렸다. 488nm 광량이 증가하여 적색채널에 Crosstalk이 생겼는지 다시 한번 확인하였다.

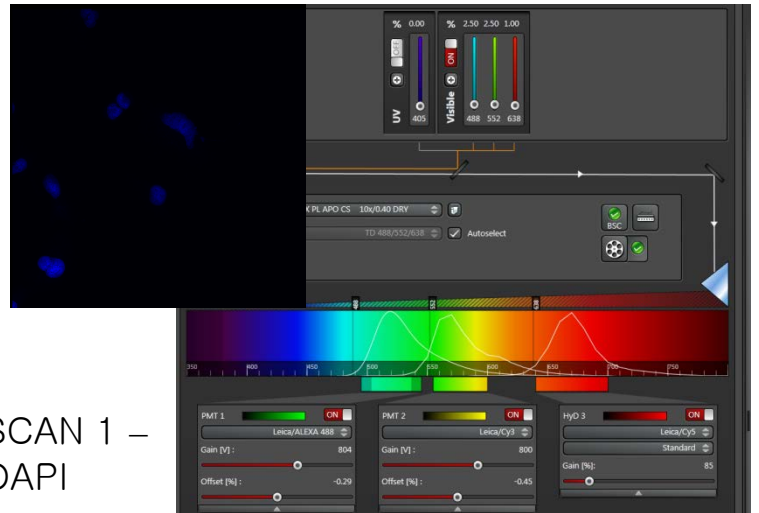
결과적인 crosstalk-free 동시스캔 이미지는 약간 어둡고 노이즈가 조금 증가하였다.

Crosstalk-free Imaging

■ 순차스캔



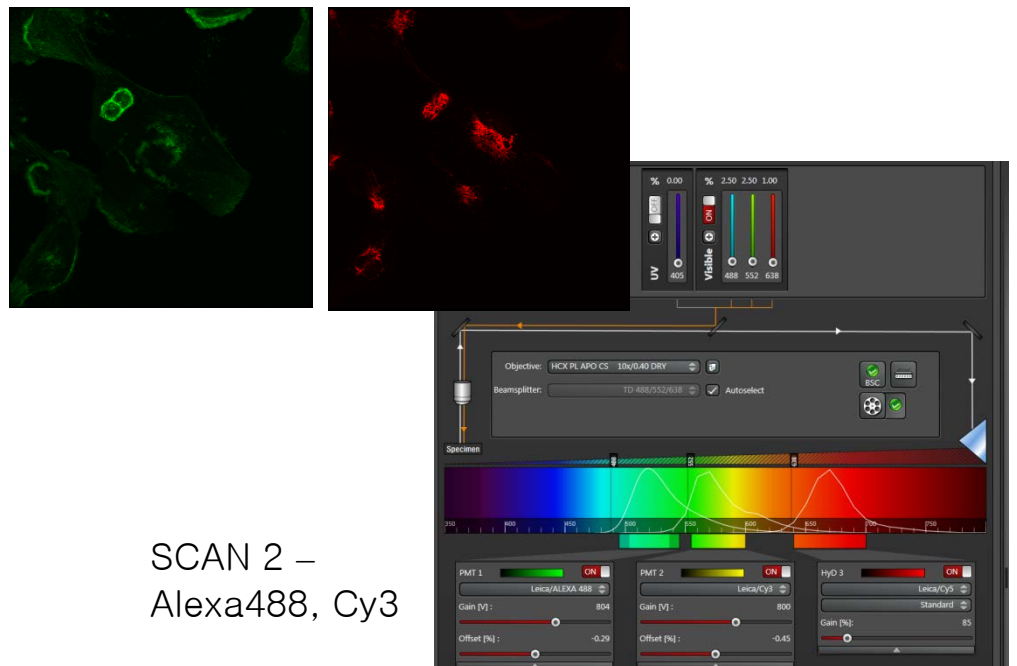
순차스캔 버튼을 누른 후
SCAN1과 SCAN2를 더하고
between frames모드로 설정합
니다.



SCAN 1 –
DAPI

각각 SCAN1에 DAPI를 SCAN2
에 Alexa488과 Cy3를 더하고
Live버튼을 눌러 화면조정한 후
Start를 눌러 순차스캔합니다.

이와 같이 Crosstalk을 유
발하는 채널을 따로 분리
하여 이미징하여 효과적
으로 signal to noise를 유
지하며 crosstalk을 배제
합니다.



SCAN 2 –
Alexa488, Cy3