

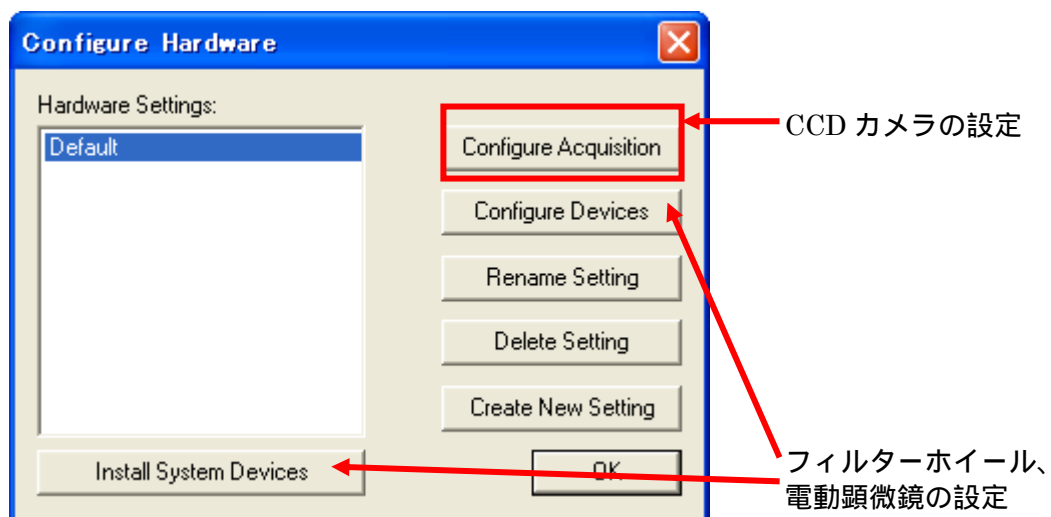
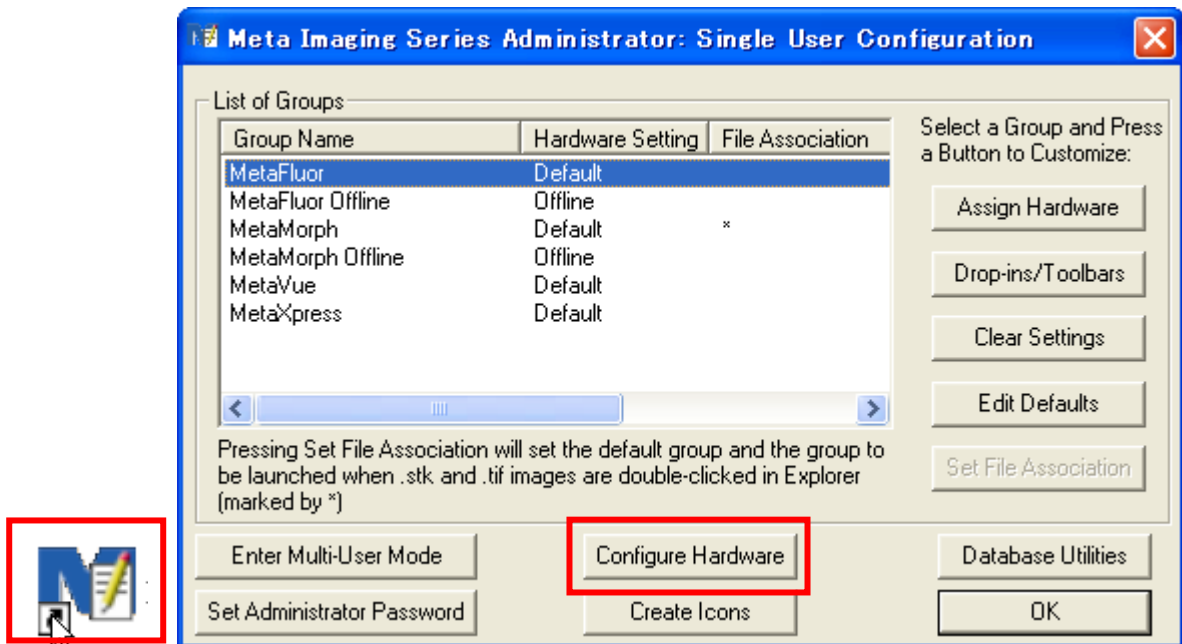
MetaFluor ソフトウェア取り扱い説明書 (Version 7.7)

MetaFluor は蛍光画像における定量的な測定を主目的に設計されたプログラムです。特徴として、励起・吸収波長（透過光も含まれます）を含む5つまでの波長を組み合わせ、レシオ計測・輝度測定やデータ保存を確実にこなせるようになっています。

1. セットアップ

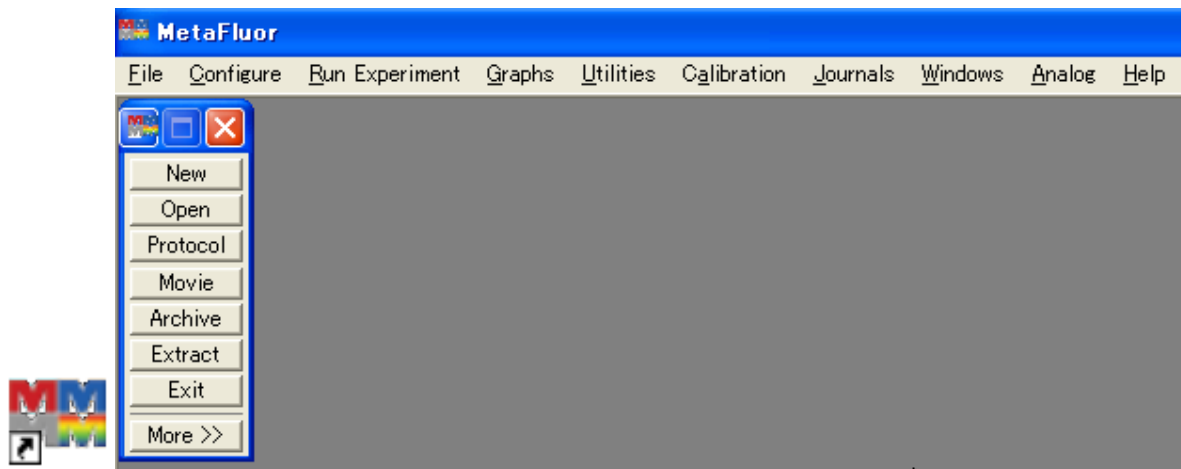
顕微鏡に取り付けられたハードウェアを MetaFluor で制御できるよう設定をします。

MetaFluor を起動する前に Meta Imaging Series 7.x グループフォルダから”Meta Imaging Series Administrator”（下記アイコン）を起動して CCD カメラやフィルターホイール、電動顕微鏡などを設定します。詳細については、「Meta Imaging Series Administrator について」をご参照ください。



2. MetaFluor の起動

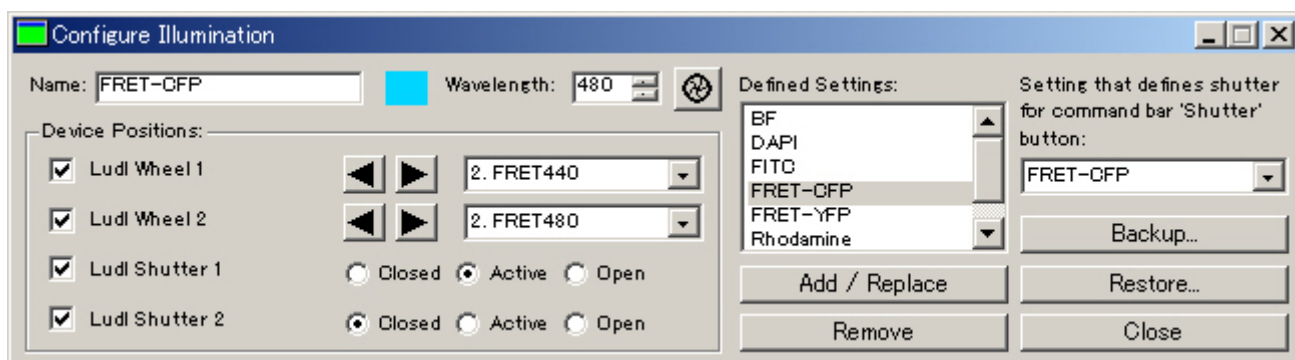
Meta Imaging Series 7.x グループフォルダから MetaFluor (下記アイコン) をダブルクリックします。起動しますと下記が表示されます。



3. イルミネーション設定

MetaFluor でフィルターホイールなどが使用できるように Illumination 設定を行います。Configure メニューから Illumination Control (Configure Illumination)を開きます。実験開始後も追加・変更もできます。

下記は、Ludl 社励起(Ludl Wheel 1)・吸収(Ludl Wheel 2)フィルターホイール、蛍光光源シャッター(Ludl Shutter 1)、透過光シャッター(Ludl Shutter 2)を使用し、FRET-CFP, FRET-YFP, DAPI, FITC, Rhodamine, BF を設定した例です。



フィルターホイール内のフィルターポジション、シャッター開閉などを設定して、Name:に名称を記入して Add / Replace をクリックします。同様の操作で複数の Illumination Setting を作成します。Add / Replace をクリックした後に Defined Settings に登録されます。Backup をクリックしてファイルとして作成した Illumination Settings を保存することができます。

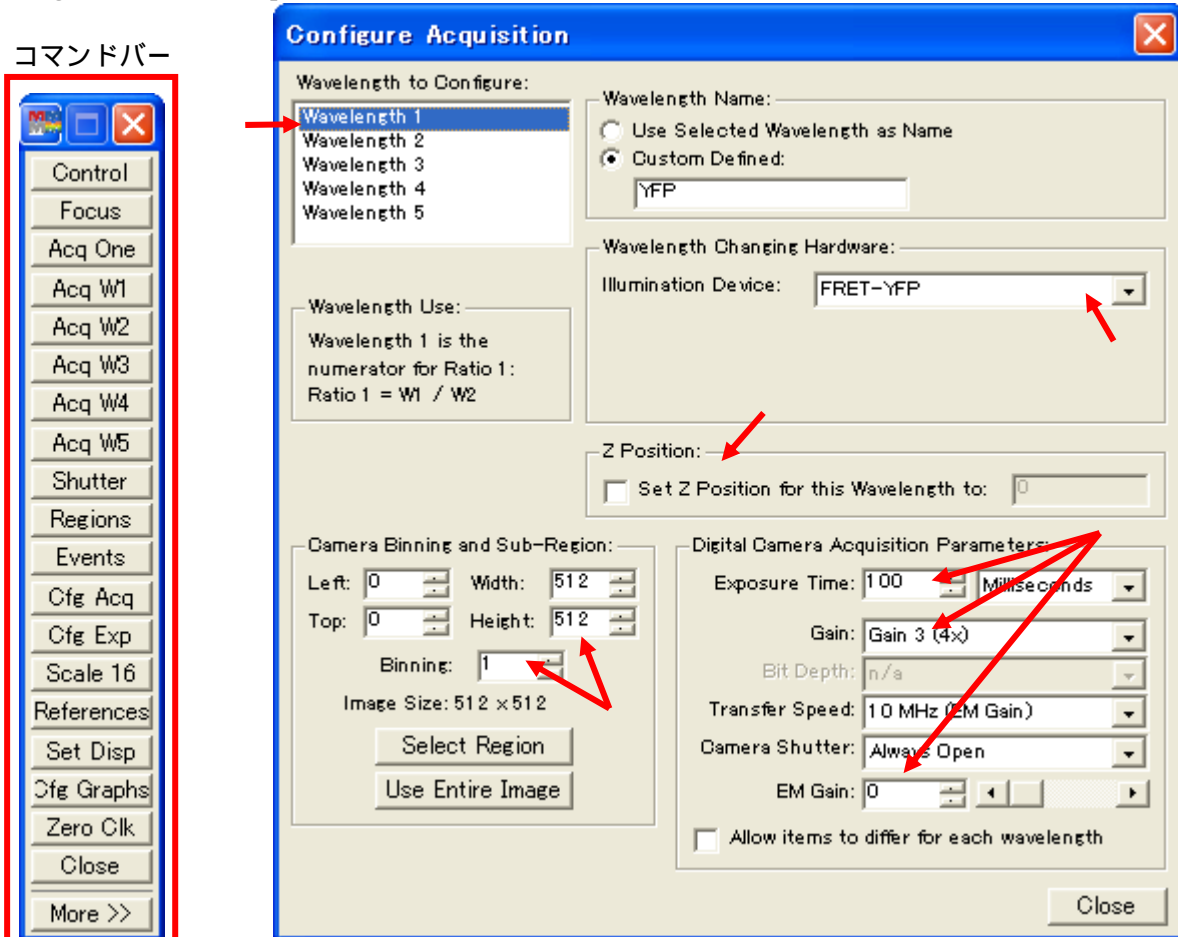
4. 実験の開始

コマンドバーから”New”ボタンまたは File メニューの”New Experiment”を選択し、新しい実験をスタートさせます。新しい下記のコマンドバーが表示されます。More をクリックしますと詳細が表示されます。

画像取得の設定 (コマンドバーの Cfg Acq)

Configure メニューから **Configure Acquisition** を選択します。Configure Acquisition ダイアログで波長の選択(Illumination Device)、露光時間(Exposure Time)、画像取得領域(Camera Binning and Sub-Region)を設定します。

Digital Camera Acquisition Parameters 内の内容は使用するカメラによって異なります。



- ・ Wavelength 1 を選択します。
- ・ Illumination Devices: で Configure Illumination で作成した Illumination を選択します。
- ・ Exposure Time, Gain などを設定します。
- ・ Binning や画像取得範囲(Sub-Region)を設定します。
Select Region で画像から範囲を指定できます。
Use Entire Image でフルサイズにすることができます。
- ・ Wavelength ごとに Z に位置を変えたい場合は Set Z Position for this Wavelength to : にチェックを入れて Z の位置を入力します。(顕微鏡の Z モータが電動で MetaFluor からコントロールが可能な場合に限り。オプションが必要になります。)
- ・ で Wavelength 2 などを選択して を行います。

Allow items to differ for each wavelength にチェックを入れますと Digital Camera Acquisition Parameters の設定を Wavelength ごとに変更できますが、チェックが外れていまずとすべての Wavelength で同じ設定になります。

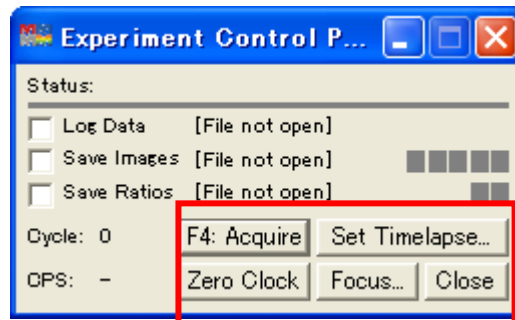
画像の取得 (コマンドバーの Control)

Run Experiment メニューから **Control Experiment Panel** を選択します。 **Experiment Control Panel** ダイアログボックスが表示されます。(通常起動時に自動的にこのダイアログボックスが表示されるように設定がされています)

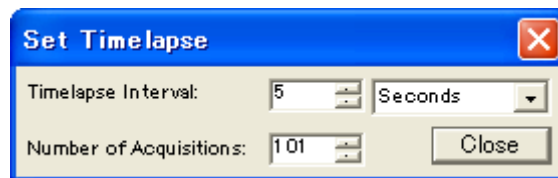
このダイアログボックスを用いて画像取得開始(F4: Acquire)、タイムラプス時間間隔(Set Timelapse)や画像・データの保存設定、フォーカス設定(Focus)などを行います。

“F4: Acquire”で画像取得を開始し、“F2: Pause”(F4: Acquire を押した後にボタンの表示が変わります。) で画像取得を停止します。

“Zero Clock”をクリックしますと経過時間がリセットされゼロになります。画像取得開始直前にクリックするとゼロ秒(分)からの開始の画像取得にすることができます。



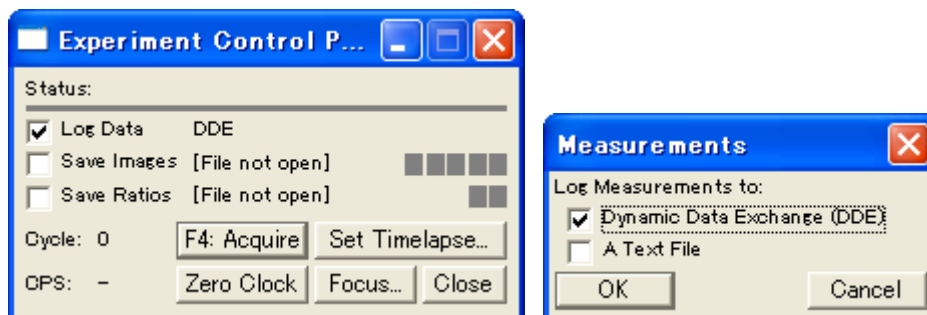
“Set Timelapse...”をクリックしますと Set Timelapse ダイアログが表示され画像取得間隔 (Timelapse Interval) と画像取得回数 (Number of Acquisitions) を設定します。Timelapse Interval をゼロにセットした場合は、最短の時間サイクルで画像取得を行います。Number of Acquisitions 欄は、決められた画像取得回数がある場合に設定します。例えば、101 と入力した場合は、101 回の画像取得をして終了します。Number of Acquisitions をゼロにセットした場合は、停止命令(Pause)をするまで連続的に画像取得を行います。



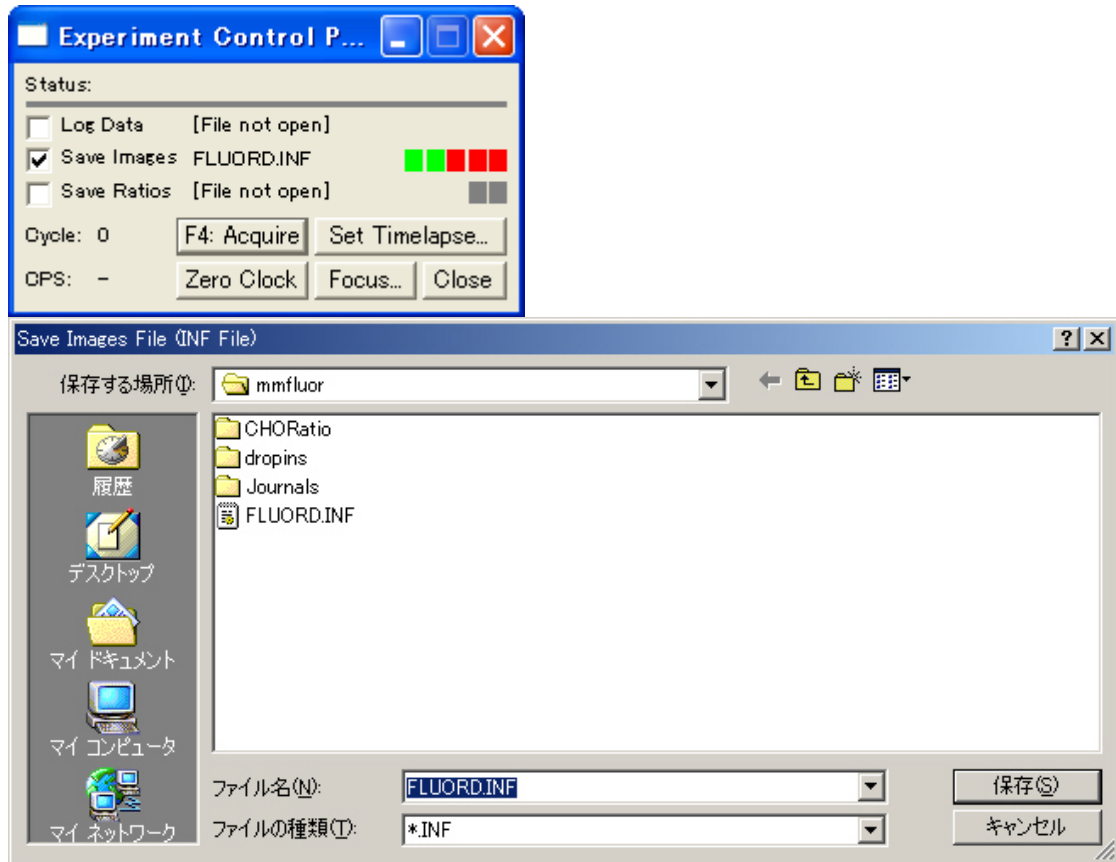
“Log Data”にチェックを入れますとコマンドバーの **Regions** で設定した興味領域の数値出力 (ログ) を行います。ログする内容は Configure Experiment (Cfg Exp)で設定 (Ave, Sum, Area にチェック) した物になります。

Measurements で **Dynamic Data Exchange (DDE)**を選択しますと Microsoft Excel などにデータを出力することができます。(Excel などがインストールされている場合のみ有効になります。) OK をクリックした後に Excel が起動します。

A Text File を選択しますと Log ファイル(カンマ区切りのテキストファイル)として保存できます。OK をクリックした後にファイル名、フォルダを選択します。

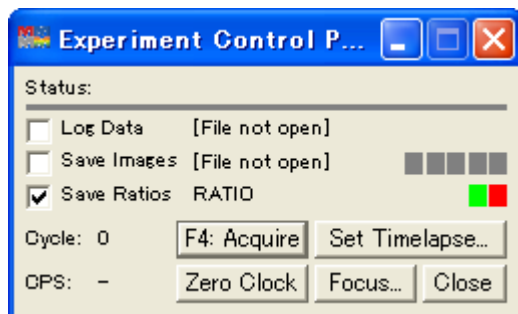


“Save Image”にチェックを入れますと取得画像の保存を行います。実験ごとに新しいディレクトリを作成してデータ保存されることをお勧めします。



タイムスタンプを含む“.INF”ファイル（管理ファイル、拡張子 inf）と画像ファイル（拡張子が 001 からの連番）が保存されます。入力する名称の後に拡張子 inf, **連番数値**が付いたファイルが同じフォルダに保存されますので、ファイルを移動する際には必ず inf ファイル、拡張子連番ファイルのすべてを一緒に移動させてください。

“Save Ratios”にチェックを入れますと Ratio 画像の保存を行います。Ratio 画像は入力した名称の後に連番が付いたファイル名の TIF（拡張子 TIF）ファイルとして保存されます。



Log Data, Save Ratios は画像取得後にも行うことができます。（取得画像を保存した場合のみ）

“Focus”ボタンをクリックしますと Focus ダイアログが現れます。このダイアログを開いてサンプルのフォーカス調整やXY位置調整および露光時間調整などのカメラの設定を行うと便利です。“Start Focusing”をクリックしますとライブ画像が表示されます。（“Stop Focusing”でライブ画像表示を終了）Illumination:内の Wavelength を選択しますと Configure Acquisition で設定した波長に切り替えることができます。（先に Configure Acquisition で Wavelength ごとの Illumination を設定する必要があります。）

画像を確認しながら Wavelength ごとの露光時間(Camera Settings:, Exp:)設定、ビニング・領域設定(Acquisition Region:)を確認することができます。

また、“Store for this Wave”, “Store as Acq Rgn”をクリックしますと Configure Acquisition 内の設定を直接変更することができます。

ビニング・領域設定

露光時間, CCD カメラのゲイン、速さを設定します

Configure Acquisition 内の Exposure Time と Camera Binning and Sub-Region を変更できます

波長選択

選択しているシャッターの開閉を行います

ライブ表示の時に選択しているシャッターが開きます

Start Focusing をクリックした直後にシャッターが閉じます

ライブ表示開始

Wavelength: で選択した波長でライブ画像が表示されます
ライブ表示後は Stop Focusing で表示終了

Z モータ制御

Z モータ制御

顕微鏡の Z モータを上下移動 (▲ ▼)、0 位置への移動 (Goto 0) ことができます。Store for this Wave で Configure Acquisition 内の設定を変更することができます。

Camera Settings:の内容は使用するカメラによって異なります。

Close で Focus ダイアログボックスを閉じ MetaFluor をデスクトップに戻ります。

Histogram of Image で画像の強度分布が表示されます。露光時間設定の目安にしてください。

画像取得および表示設定(コマンドバーの Cfg Exp)

Configure メニューの **Configure Experiment** を選択します。Configure Experiment ダイアログが表示され、各波長における取得・表示設定を行います。

Image:	Acquire?	Acquire Interval:	Data Logging:	Save Interval:	Show?	Update?	Update Interval:
<input type="checkbox"/> On / <input type="checkbox"/> Off YFP	<input checked="" type="checkbox"/> Acquire	1	<input type="checkbox"/> Avg <input type="checkbox"/> Sum <input type="checkbox"/> Area	1	<input checked="" type="checkbox"/> Show	<input checked="" type="checkbox"/> Update	1
<input type="checkbox"/> On / <input type="checkbox"/> Off CFP	<input checked="" type="checkbox"/> Acquire	1	<input type="checkbox"/> Avg <input type="checkbox"/> Sum <input type="checkbox"/> Area	1	<input checked="" type="checkbox"/> Show	<input checked="" type="checkbox"/> Update	1
<input type="checkbox"/> On / <input type="checkbox"/> Off BF	<input type="checkbox"/> Acquire	0	<input type="checkbox"/> Avg <input type="checkbox"/> Sum <input type="checkbox"/> Area	0	<input type="checkbox"/> Show	<input type="checkbox"/> Update	1
<input type="checkbox"/> On / <input type="checkbox"/> Off Wavelength 4	<input type="checkbox"/> Acquire	1	<input type="checkbox"/> Avg <input type="checkbox"/> Sum <input type="checkbox"/> Area	0	<input type="checkbox"/> Show	<input type="checkbox"/> Update	1
<input type="checkbox"/> On / <input type="checkbox"/> Off Wavelength 5	<input type="checkbox"/> Acquire	1	<input type="checkbox"/> Avg <input type="checkbox"/> Sum <input type="checkbox"/> Area	0	<input type="checkbox"/> Show	<input type="checkbox"/> Update	1
<input type="checkbox"/> On / <input type="checkbox"/> Off Ratio 1	n/a	n/a	<input checked="" type="checkbox"/> Ratio (W1 / W2)	1	<input checked="" type="checkbox"/> Show	<input checked="" type="checkbox"/> Update	1
<input type="checkbox"/> On / <input type="checkbox"/> Off Ratio 2	n/a	n/a	<input type="checkbox"/> Ratio (W4 / W5)	0	<input type="checkbox"/> Show	<input type="checkbox"/> Update	1
<input type="checkbox"/> On / <input type="checkbox"/> Off Calcium	n/a	n/a	<input type="checkbox"/> Calibrated Ratio 1				

Use Acquire Calibration Standards to select which image to calibrate

Acquire ? 画像取得を行う (チェックを入れる) /行わないの設定を行います。

Acquire Interval: 画像取得を行う間隔を数値で設定します。1 だとタイムポイントごと毎回画像取得を行いますが、2 としますとタイムポイント 2 回に 1 回の割合で画像取得を行います。

Data Logging: Experiment Control Panel 内の **Log Data** にチェックを入れてログ設定した場合に画像上に設定した興味領域の Ave (平均輝度)、Sum (総輝度)、Area (面積) のうち数値出力したいものにチェックを入れます。(コマンドバーの **Regions** で設定します。)

Save Interval: Experiment Control Panel 内の **Save Image (Ratio 1, 2 の場合は Save Ratio)** にチェックを入れて取得画像保存設定した場合、画像保存を行う間隔を数値で設定します。

Show ? 取得画像の表示 (チェックを入れる) /非表示の設定を行います。

Update ? 取得画像表示を更新する (チェックを入れる) /しないの設定を行います。

Update Interval: Update にチェックを入れた場合、取得画像更新を行う間隔を数値で設定します。

Ratio 1, Ratio 2, Calcium の場合、表示する (**Ratio(W1 / W2)**、**Ratio(W4 / W5)**、**Calibrated Ratio 1**) にチェックを入れる) /しないの設定を行います。

ON/OFF をクリックしますと各波長(Wavelength)の設定の有効/無効がまとめて行えます。

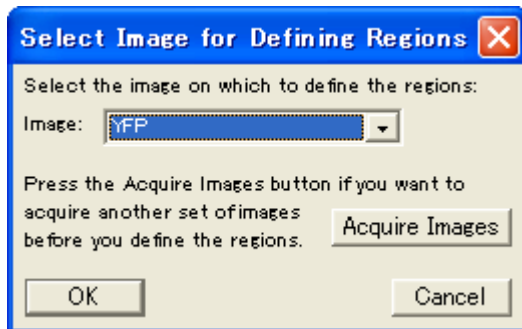
上記の設定では Wavelength 1(FRET-YFP), Wavelength 2(FRET-CFP)とも毎回画像取得・画像保存を行い、Wavelength 1(FRET-YFP), Wavelength 2(FRET-CFP), Ratio 1(W1/W2)とも毎回更新された画像表示を行います。数値出力 (ログ) は設定されていません。

MetaFluor のデフォルト設定では、Wavelength 1・Wavelength 2・Ratio 1 が表示されるようになっています。

Show ?, Update ?, Update Interval, Save Interval, Ratio の設定を変更しますと画像取得繰り返し回数(Frames per Second)が変わる場合があります。高速画像取得を行いたい場合は、取得画像表示、Ratio 表示を行わないで行うことをお勧めします。

計測領域の設定(コマンドバーの Regions)

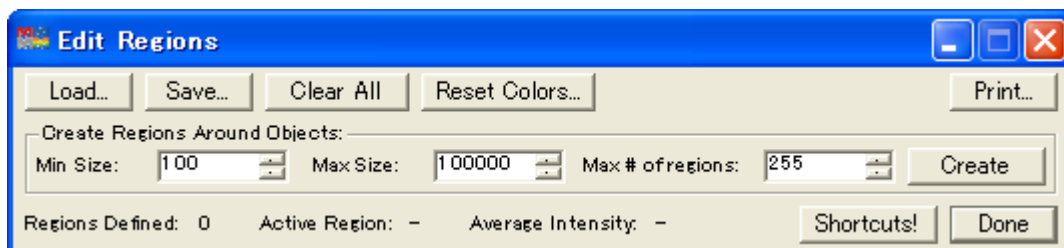
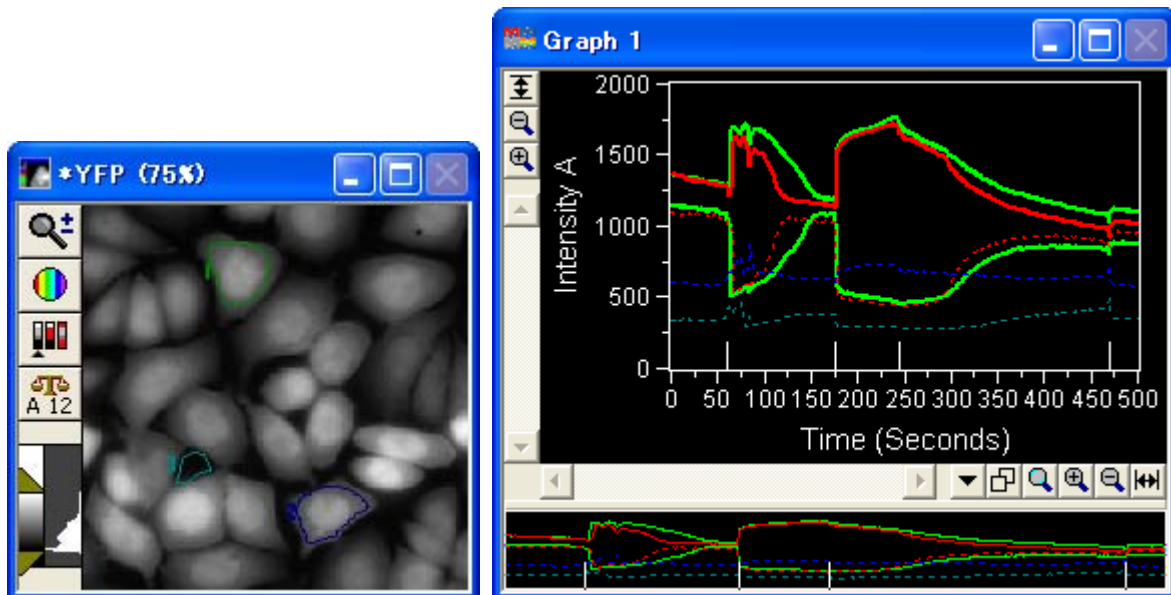
Run Experiment メニューから **Select Save Regions...** 選択します。
輝度計測を行うために興味領域(Region, ROI)の設定を行います。



Select Image for Defining Regions ダイアログの **Image:** でどの画像から Region を設定するかを選択します。Region を設定するための画像が表示されていない場合は **Acquire Images** をクリックすると画像を 1 枚取得します。OK をクリックすると Region Tool



が表示されますのでツールを使用して画像上に Region を作成することができます。複数設定可能です。



Edit Regions ダイアログで Region を保存することができます(Save)。保存した物を読み出すことも可能です(Load)。

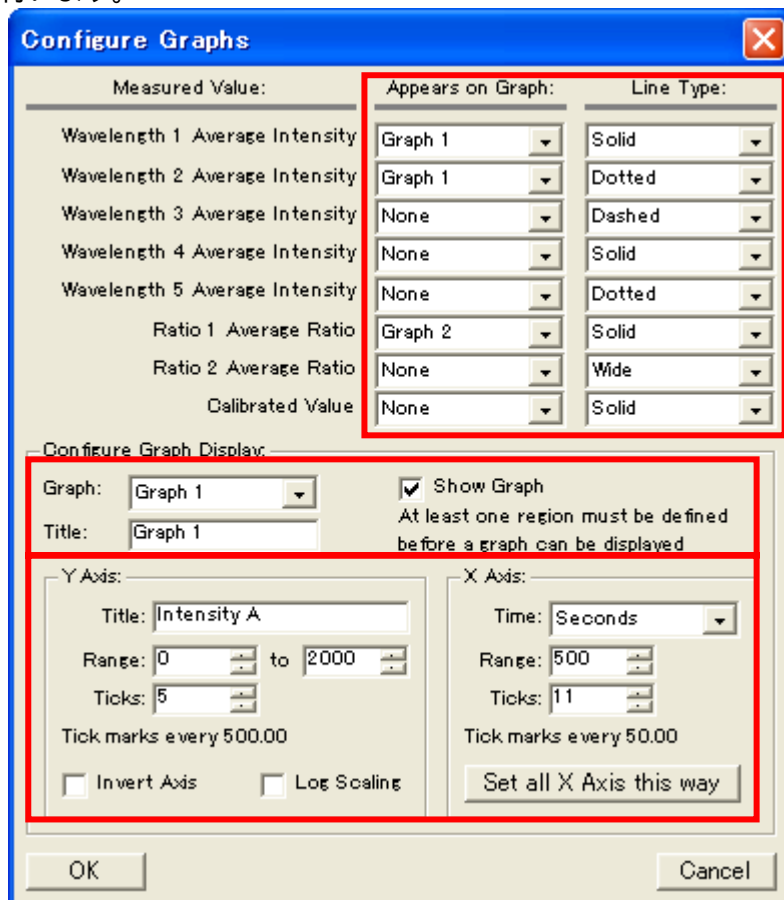
画像上に Threshold を設定して **Create** をクリックすると自動的に Region を作成することができます。

Done をクリックするとダイアログボックスが終了しデスクトップ上にグラフが表示されます。

表示されるグラフの設定はでコマンドバーの Cfg Graphs で行います。

グラフの設定 (コマンドバーの Cfg Graphs)

Graphs メニューの **Configure Graphs...** を選択します。Configure Graphs ダイアログでグラフの設定を行います。

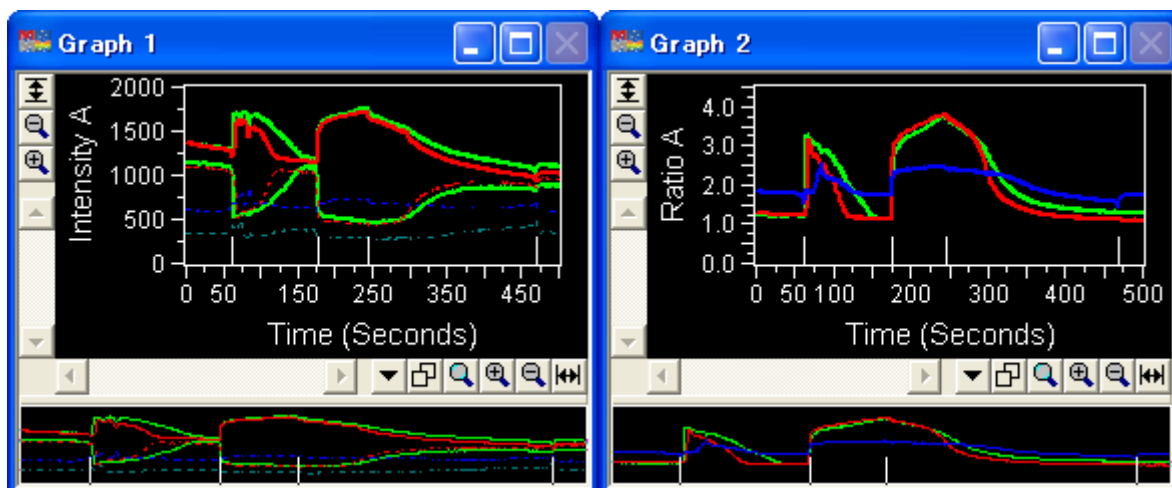


Appears on Graph: で Wavelength 1, 2, 3, 4, 5 Average Intensity それぞれを表示するグラフを指定します。None, Graph 1, 2, 3, 4, 5 の中から選択します。Line Type: でグラフの線の種類を選択します。Solid, Wide, Dotted, Dashed の中から選択します。

Graph 1, 2, 3, 4, 5 それぞれのタイトルおよび表示 (Show Graph にチェック) / 非表示を設定します。

Graph: で選択されているグラフの X 軸、Y 軸の設定を行います。

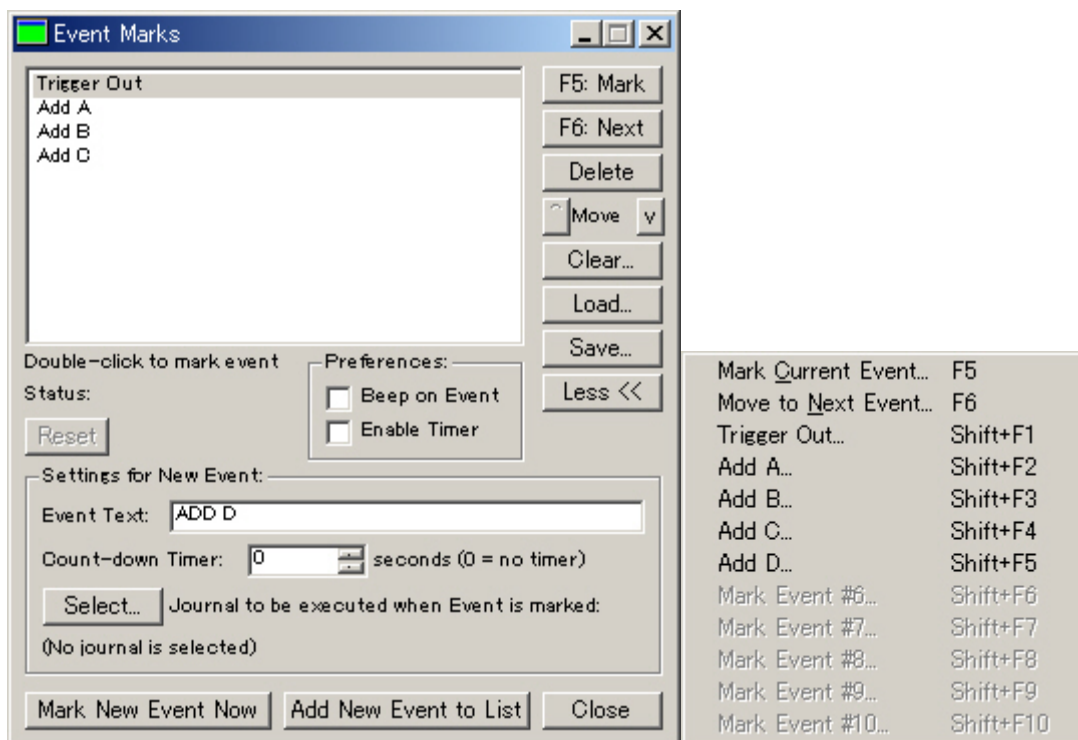
また、グラフ中にカーソルを移動させマウスの右ボタンをクリックしますと Graph Setting が現れてグラフの編集ができます。



イベントマークの設定(コマンドバーの Event)

Run Experiment メニューの **Event Marks** を選択します。

実験の中で、ある事象に注釈を加える場合に便利な機能です。例えばサンプルにドラッグを加えた時に記録をしたりできます。MetaFluor では、この注釈をイベントマークと呼んでいます。



Event Marks ダイアログの **Mark New Event Now** をクリックすると表示中のグラフにイベントマークを残すことができます。Inf ファイルにも登録されますので、取得画像再生の時に確認することができます。

複数のイベントマークを残す場合、あらかじめイベントの内容を記述しておくとうわかりやすくなります。Setting for New Event の **Event Text**: にイベントの内容を入力し **Add New Event to List** をクリックするとイベントリストに登録されます。リストから選択して **F5: Mark** をクリックしますと記述内容を含めたイベントマークが残ります。

ボタンを押します。

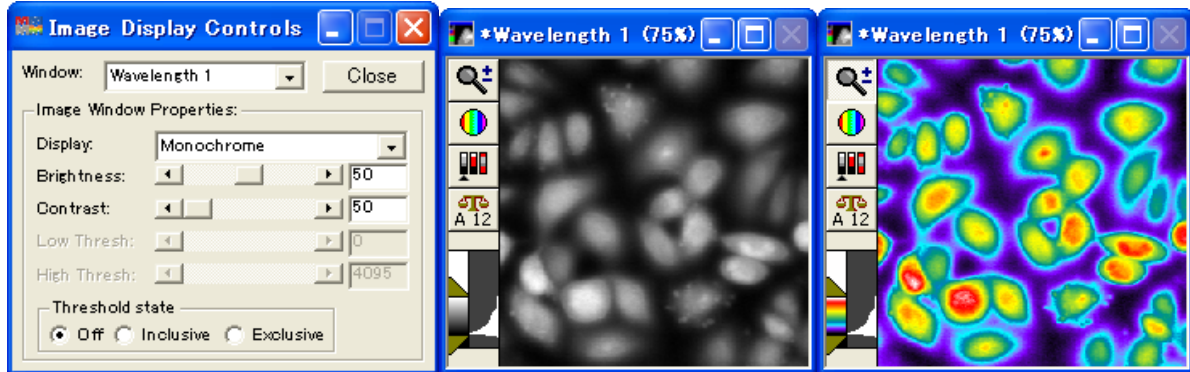
キーボードで F5, F6 キーを使用しても行えます。

表示画像の設定(コマンドバーの Set Disp)

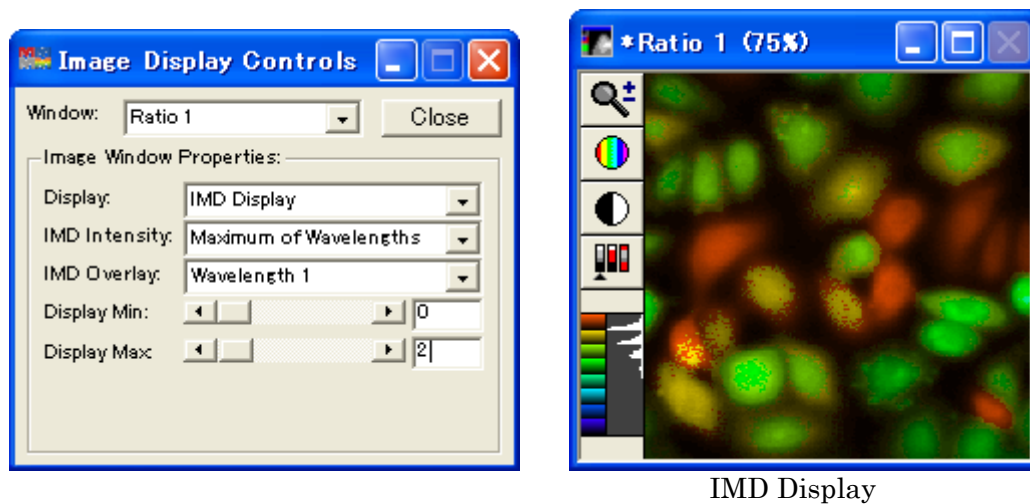
Configure メニューの Image Display Control を選択します。

Wavelength 1 などの取得画像の場合、表示している画像の表示上の明るさ(Brightness)、コントラスト(Contrast)を変更できます。

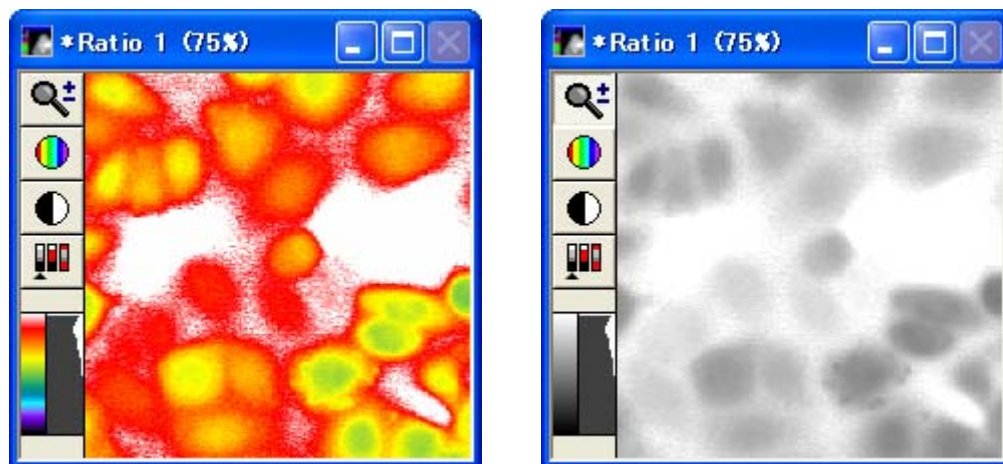
Display で Monochrome, Pseudocolor の選択ができます。



Ratio 画像の場合、Ratio 値の最小値(Display Min:)、最大値(Display Max:)設定、Ratio 表示設定 (IMD Display, Pseudocolor, Monochrome)を変更することができます。IMD Display にしますと Ratio 値を色で表現して、さらに輝度を明るさで表現することができます。



IMD Display



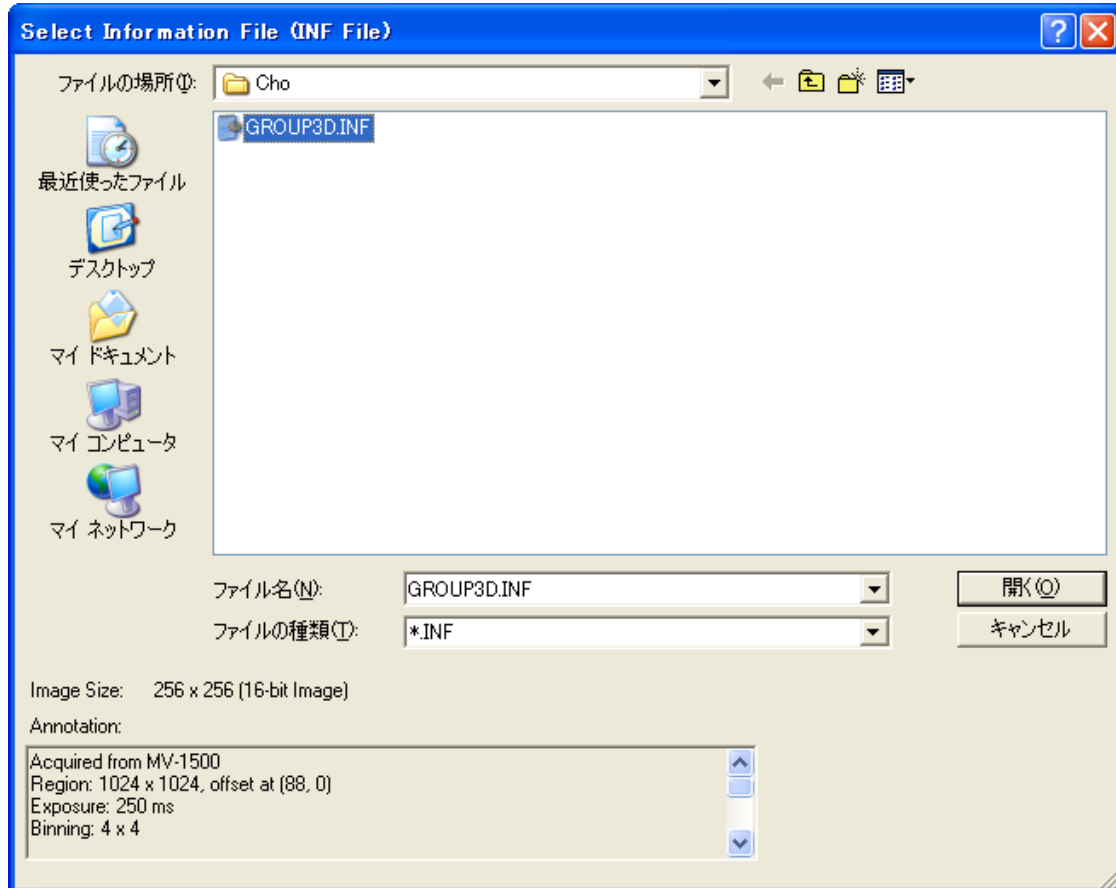
Pseudocolor

Monochrome

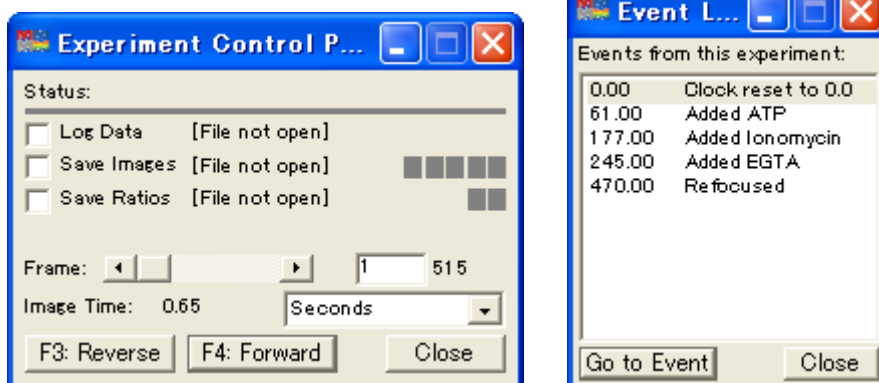
5. 存済画像の再生(コマンドバーの Open)

保存済画像の再生を行うには、File メニューの **Open Experiment** を選択します。
画像取得したときの表示の場合が File メニューの **Close Experiment** (コマンドバー Close) を
選択して表示を閉じます。

INF ファイルを選択して”**開く(O)**”をクリックします。



通常は Experiment Control Panel と Event List が表示されます。



Experiment Control Panel には保存した画像をスクロールするためのスクロールバー
(Frame)があります。Image Time:フィールドにはそれぞれの画像が収集された時間が表示さ
れます。”F3: Forward”, ”F3: Reverse”, ”F2: Pause”をクリックすることにより画像をスクロ
ールしたり停止したりできます。Retio 画像保存、データのログ、画像表示、興味領域の編集、グ
ラフの設定などは、画像取得を行ったときと同様に機能します。

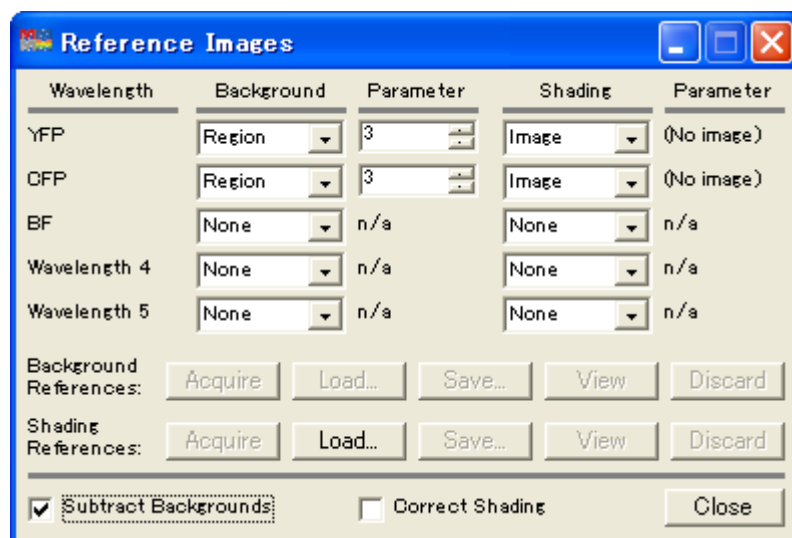
Event List には記録された全てのイベントがリストアップされていますので、希望のイベン
トをダブルクリックすることで瞬時にそのイベントへ移動できます。

6. バックグラウンドの補正(コマンドバーの References)

Run Experiment メニューの Reference Images を選択します。Reference Images ダイアログで背景の補正(除去、平滑化)を行います。

各 Wavelength で Background および Shading の設定を選択します。Image を選択した場合、補正するための画像を Load をクリックして選択します。Region を選択した場合、Parameter の項目で画像上に作成された複数の Region の内いずれか Region 番号を設定します。(選択された Region の平均輝度を背景として画像全体から差し引きします。)

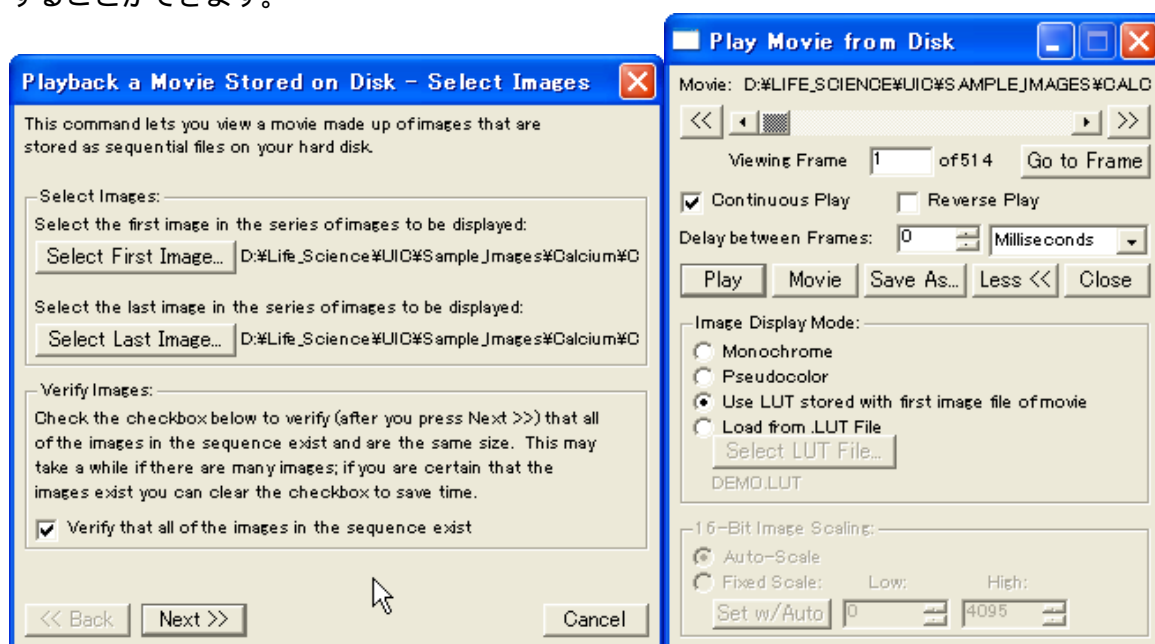
その後 Subtract Backgrounds または Correct Shading にチェックを入れてバックグラウンド補正機能を有効にします。



通常蛍光画像上に複数の Region を作成しますが、その内1つを背景となる場所に作成します。上記のような設定で Parameter に Region の番号を入力して Subtract Background を行います。Wavelength 1, 2 と同じ Region を使用します。

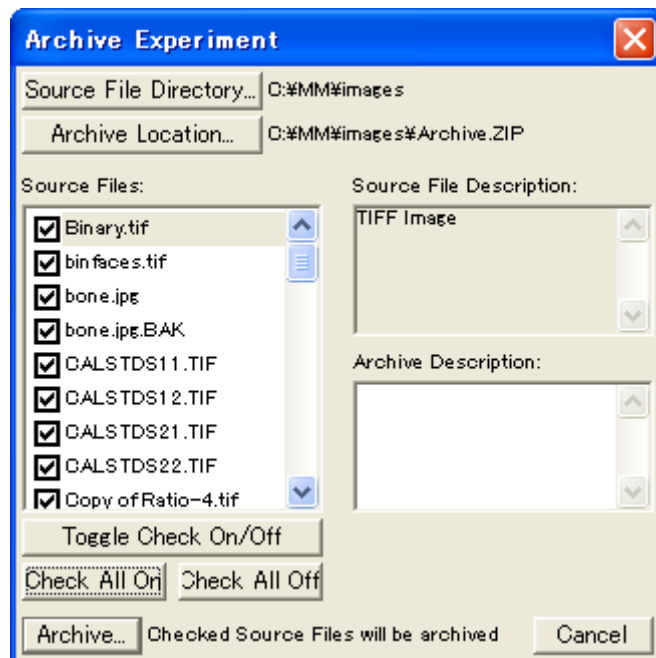
7. ムービーファイルの作成

Utilities メニューの Play Movie from Disk を選択します。Playback a Movie Stored on Disk – Select Images ダイアログの Select First Image... と Select Last Image... を選択します。Next >> を2回クリックして Play Movie from Disk ダイアログの Save As... で AVI ファイルを保存することができます。



8. データの圧縮

MetaFluor の実験では、特に長い時間に渡りデータ収集した場合などには、それに供ない大量のディスクスペースを必要とします。そのため新しい実験を開始する前に不要なデータをハードディスクから消去しておくことをお勧めします。MetaFluor は、ZIP 方式による圧縮ルーチンが組み込まれています。これを使用するには、File メニューの **Archive Experiment** を選択します。



Source File Directory...と Archive Location...を選択します。Source Files で圧縮を希望するファイルを選びます。INF ファイルを選択した場合は、実験での全波長画像が選択されます。必要があれば Archive Description 欄に説明を記入します。Archive...ボタンを押すことで、圧縮作業を実行します。