From Eye to Insight



# FALCON FLIM Manual

20191120\_JP

FLIM 操作手順

1.	FLIM 測定画面の起動	2	ページ
2.	レーザーと検出器のキャリブレーション	2	ページ
3.	Trigger Level の調整	2	ページ
4.	Detector の選択	5	ページ
5.	Photon/Pulseの調整	6	ページ
6.	繰返し回数の検討	4	ページ
7.	ROI の設定	9	ページ
8.	Fit	15	ページ
9.	FLIM Image Fit	25	ページ
10.	データの保存	31	ページ
11.	Separation of Photons by Lifetime Tuning	33	ページ
12.	Phasor Plot	34	ページ

#### Tips

\* FLIM を起動後、Intensity 画像で Gating を行う場合は LAS X を一度閉じてください

\*FLIM を起動すると Gating のチェックボックスが非表示となりますが、数値は適用されますので、

- 必ず FLIM を起動する前にチェックボックスを外してください
- \* PMT は FLIM 撮影に使用できません
- \* FLIM に使用できるのは、パルスレーザーかつ Notch Filter がある波長だけです

(十分に明るいサンプルの場合、他の波長でも使用できる可能性があります)

\* 以下の Wizard とは併用できません HyVolution Wizard、Lightning Wizard、Smart STED Wizard、FRAP and FRAP XT、Matrix Screener(FLIM 画像に Huygens や Lightning 処理を行うことは可能)

\* FLIMの解析のみを行う場合は、デスクトップ上の

「LAS\_X\_SingleMoleculeDetection.exe shortcut」を起動してください、FLIM 画面のみが立ち上がります。LASX Small では解析できません。

\* STED775 は WLL とパルスのタイミングの同期を取ります。

そのため、STED775 が ON のとき、WLL の Pulse 幅(Hz 数)は変更できません。

WLLの Pulse 幅(Hz 数)が 80 MHz以外の場合、STED775 を ON にできません。



サブモニター右上にある⑦ File Settings Help

Tools から FLIM Calibration を開きま

す。

\*WLL など(MP 以外)の場合:Automatic から Calibrate を行います。



SMD-HyD の場合、Trigger Level から Decay Curve の Background レベルを調整します



\* Calibration を行うと、Sequence の設定が消えます。



\* MP の場合: Manual を選択し、NIM2-4(番号は仕様により異なります)を選択します。下図赤丸 部分の Trigger Level を赤四角部分の Pulse 幅が右側のグラフのようになるまで変えます。





FLIM Settings(メインモニター側)

Filter Supported WLL-Lines:Notchフィルターが入っている波長が表示されます。基本的にこれらの波 長以外は FLIM に使用できません。サンプルが十 分明るい場合、励起を他の波長にすることができる 可能性があります。(表示される波長は仕様により 異なります)。

Lir	ne Repetitions	設定数だけ繰返しスキャンを行い、Photon が検出される時間を測定
		します。(Intensity 画像では設定数分の Line Accumulation が行わ
		れます)
Fra	ame Duration	設定時間中スキャンを繰り返し、Photon が検出される時間を測定し
		ます。(Intensity 画像では、設定数分の Frame Average が行われま
		す)
Fra	ame Repetitions	設定数分だけスキャンを行い、Photon が検出される時間を測定しま
		す。Line Repetitionsと組み合わせて使用できます。(Intensity 画像
		では設定数分の Frame Average が行われます)
Acquire until max		ある Pixel の Photon 数が設定した数値に達するまで、測定を続けま
photons/pixel		す。(Intensity 画像では、Frame Average が行われます)
;	Sum of all Channels	検出された合計 Photon 数
I	Brightest Channel	最も明るい検出器
I	Dimmest Channel	

Definition of FLIM image acquisition time



Specialist Settings:最大4基までの SMD-HyD など の検出器を1 つの検出器として扱うことができる設定 です。

赤矢印部分をクリックすると、左図下側が表示され、 使用する検出器を選択できます。

# ON になっていて FLIM に使える検出器が表示されま



Single Detector	FLIM で使用でき、ON になっている検出器が表示されます。(SMD-HyD、
	HyD、4-Tune(NDD)が使用できます)
Multiple Detector	複数の検出器を 1 つ検出器として扱う場合に選択します。「+」で検出器
	を追加できます。
All Detectors	FLIM に使用できるすべての検出器を組み合わせて使用する場合に選択
	します。
	(FLIM 検出に用いる検出器の数を変えても、Intensity 画像に影響はあり
	ません。検出器の数を増やすことで Pile up effect が抑制されます。また、
	検出できる最大 Photon 数が増えることでより速く蛍光寿命の測定できま
	す。検出される Photon 数が検出器同士で同じになるようにレーザー強度
	や検出波長幅を設定します。次ページ Pixel Intensity Histogram 参照)

Live ボタンを押すと、メインモニターに通常の Intensity 画像が、サブモニターに簡易的な Fast FLIM 画像が下図のように表示されます。



蛍光寿命が擬似カラーで表示されます。 (蛍光寿命が短いと青側、長いと赤側)画 像上で右クリックすると

Show Data Cursor と Export Image が表示されます。Show Data Cursor を選択すると、下記画像のようにカーソルがある Pixel で検出された Photon 数と簡易的な 蛍光寿命が表示されます。



この Photon 数を参考にして、FLIM Settings で繰返し回数などの設定を行い

ます。

上図下側にある Channel 1 🔽 Fast Lifetime 🔹 をクリックすると下図が表示されます。

上側が検出された Photon の検出時間とその頻度を表示し、下側が蛍光寿命の擬似レインボーカ



ラー表示範囲を表示しています。 △を移動することで輝度の調整または、蛍光寿命の擬似カラー表 示コントラストを変更できます。

画像の下に③: Pixel Intensity Histogram と⑤: Lifetime Decay Curve が表示されます。

(Live、Capture、Start の Scan 中、随時更新されます)

Pixel Intensity Histogram\*(\*次ページ参照): 検出器あたりの Photon/Pulse 数が表示されます。

HyD の場合はこの値が 0.5 を、また SMD-HyD、APD、4-Tune の場合は 1 を超えないように、レ ーザー強度や検出波長幅を調整します。

(表示される色は輝度イメージで指定した擬似カラーに依存します)



Pixel あたりの Photon 数を参考にして、FLIM Settings で繰返し回数などの設定を行い Scan します。

\* 検出器あたりの Photon/Pulse 数が多く、かつ HyD の場合 0.5、SMD-HyD、APD、4-Tune の 場合は 1 を超えないようにすることが重要です。

Photon が検出されてから、次の Photon を検出できるようになるまで処理に一定の時間がかかり ます。その処理中に次の Photon が来た場合、Photon を検出することができないため、正確に測 定することができず、本来の蛍光寿命より短く測定されてしまう現象を pulse pile-up effect と呼び ます。このため検出器あたりの Photon /Pulse 数を 0.5 または 1 を越えないようにすることが重要 です。(検出器あたりの Photon /Pulse 数が 0.5 または 1 を超えた場合でも、Photon Filter: Standard (11 ページ参照)で該当する Pulse を除去することで、pulse pile-up effect のない、より 正確な計算結果を得ることができます。





8-① 蛍光寿命の計算に用いるデータの範囲(ROI、時間、検出器)を指定できます。

9ページ

8-② FLIM イメージの表示画面 Live などの Scan 中、Fast FLIM の結果がリアルタイムで表示 されます。下側にあるプルダウンメニューから各検出器で検出された画像のコントラスト調整を行 うことができます。

12 ページ

8-③ Curve Fitting を行う際のパラメーターの設定が行えます。

15 ページ

8-④ 右側に Decay Curve が表示されます。左側に Pixel Intensity Histogram などが表示されます。Live などの Scan 中は Decay Curve と Pixel Intensity Histogram がリアルタイムで表示されます。

27 ページ

8-5 画像をもとに Curve Fitting を行った結果が表示されます。

30 ページ

8-⑥ FLIM 測定結果の保存を行えます。

31 ページ

8-⑦ データのインポートやエクスポート、画面表示設定などが行えます。

31 ページ

# **8-**①

解析に用いる Frame、検出時間、検出器の指定を行うことができます。 ROIの設定方法



上段左から順に

①ブラシ:速く動かすほど幅が太くなります。それが ROI になります。
 ②ポリゴン:クリックした所を頂点に持つ多角形が ROI になります。最後の場所でダブルクリックすると最初の点と自動でつながります。

③四角:2回クリックします。2点を結んだ線を対角線にもつ四角形が ROI になります。 ④楕円:2回クリックします。2点を結んだ線を対角線にもつ四角形に内接する楕円が ROI になり ます。

⑤円:クリック&ドラッグします。クリックした場所からドラッグした場所が直径となる円が ROI になります。

⑥Pixel 指定:クリックした場所が ROI になります。

⑦ROIの選択:ROIの移動、サイズの変更が行えます。

⑧ROIの全選択:選択された全てのROIの移動などが行えます。

⑨選択された ROI の削除

⑪元に戻す

①やり直し

⑫ROIの自動認識:画面上でクリックするとROIが自動認識・作成されます。

Invert: 画像の色調の反転を行います。

### 作成した ROI を一つのエリアとして扱うことができるようになります

ROI 2			
Mour	Rename	Remove	Reset

New	最初の ROI を作ると ROI 1 は自動的に作成されます。New を押すまで全ての
	ROI が一つのエリアとして認識されます。追加する場合は ROI(エリア)を選択し、
	ROIを作成します。
Rename	選択された ROI(エリア)の名前変更
Remove	選択された ROI(エリア)の削除
Reset	全ての ROI(エリア)の削除

上図のように Region IC ROI 1、ROI 2 などのように表示されます。

FIM   Select Frames to Analyze   From   1   To   880   Pixel Binning   1   Lifetime Binning   1   Channels		
From、To	スキャンしたフレームの中から、解析に用いるフレームを選択することがで	
	きます	
Pixel Binning	ピクセルのビニングをかけることができます	
Lifetime Binning	蛍光寿命のビニングをかけることができます。(Binning をかけることで、	
	Photon 数が少なくてもより正確な Curve Fitting を行うことができます)	



赤線部分を掴んで移動させることで、計測に使用する Pulse 内で の計測時間範囲を指定することができます。表示される時間は使 用する Pulse Laser の Hz 数(Pulse の間隔)により異なります。 赤線部分を掴んで移動させることで、計測に使用する Pulse 内で の計測時間範囲を指定することができます。 Select from image を押すと下記画面が表示されます。





①の移動、②および③に数値を入力することで、上限および下限を設定できます。

④Intensity または FastFLIM を切替えることで、下限以下および上限以上の表示方法を変更することができます。

Intensity	下限以下および上限以上を赤で表示します
FastFLIM	下限以下および上限以上をグレーで表示します



Standard (High Speed): Photon/Pulse 数が1の時の Photon の 検出時間を計測に用います(2 つ以上の Photon が検出された場 合 Pulse は計測に用いません)。最も正確な方法で、デフォルトで 選択されています。検出器あたりの Photon/Pulse 数が 1(SMD-HyD または 4-Tune の場合)または 0.5(HyD の場合)以下になる ように調整してください。これらの値よりも多くすると pulse pile-up effect\*が大きくなります。 (\*7 ページ参照)

Standard (High Speed)	Photon/Pulse 数が1の時の Photon の検出時間を計測に用い
	ます(2 つ以上の Photon が検出された場合 Pulse は計測に用
	いません)。最も正確な方法で、デフォルトで選択されています。
	検出器あたりの Photon/Pulse 数が 1(SMD-HyD または 4-
	Tune の場合)または 0.5(HyD の場合)以下になるように調整し
	てください。これらの値よりも多くすると pulse pile-up effect*が
	大きくなります。
	(*7 ページ参照)
All Photons	Photon/Pulse 数に依らず、検出されたすべての Photon の検出
	時間を計測に用います
First Photon	Photon/Pulse 数に依らず、最初に検出された Photonの検出時
	間を計測に用います
Manual assign Detectors	通常、検出器ごとに Photon が検出された時間をもとに蛍光寿
	命が計算されます。しかし、複数の検出器を組み合わせること
	で、Pile-up effect を小さく、より速く蛍光寿命の計算をすること
	ができます。ここでは、どの検出器を組み合わせるかの選択を
	行うことができます。検出器あたりの Photon/ Pulse 数が同程度
	のもの同士のほうが、より正確な蛍光寿命を得ることができま
	す。(5 ページ参照)

# 8-2

221 • + 1:1	Counts Fast FLIM RGB	Gray Lifetime χ <sup>z</sup> Free	
A	STATES OF STATES		0
	- XII-		
	1	X . Sele	
Channel 1 🗸 Fast L	ifetime 🗘	Channel 2 Fa:	t Lifetime 🗘
Θ [] - 232 •	+ 1:1		

- 12 345
- 1:画面にあわせて表示
- 2:ズームアウト
- 3:表示倍率の設定(%)
- 4:ズームイン
- 5:Pixel 等倍表示

B

表示項目は、FLIM、FRET、Pattern Fit で異なりますが、この段階で操作できるのは下記の4つです。

Intensity	検出された Photon 数に応じて Pixel ごとにグレースケールで表示します
Fast FLIM	蛍光寿命の平均値を Pixel ごとに擬似カラーで表示します
X <sup>2</sup>	χ <sup>2</sup> 検定の結果による尤度、モデルの信頼性をピクセルごとに表示します
_	
Free	下図左側の枠線内部分をクリックすると下図石側フルダウンメニューが表示され
	ます。これらのパラメーターを明るさやコントラストに割当てて表示することができ
	ます。

FLIM Image Fit(25ページ参照)後、次ページの表示項目が追加されます

# FLIM の場合

Intensity Fast FLIM C	omponents Grayscale Lifetime $\chi^2$ Free
Components	各 Channel を RBG で表示します
Grayscale	各 Channel をグレースケールで表示します
Lifetime	Components 数に応じて Channel に分け、蛍光寿命を Rainbow カラーで表
	示します。

# FRET の場合

Intensity Fast FLIM E	ficiency FRET Binding Distance $\chi^{z}$ Free
Efficiency	Apparent FRET の結果をもとに Pixel ごとの平均 FRET 効率を擬似カラーで
	表示します
FRET	FLIM-FRET も結果をもとに Pixel ごとの平均 FRET 効率を擬似カラーで表示
	します
Binding	FLIM-FRET の結果と Förster 距離をもとに Pixel ごとの平均 Donor-Acceptor
	の結合率(%)を擬似カラーで表示します
Distance	FLIM-FRET の結果と Förster 距離をもとに Pixel ごとの平均 Donor-Acceptor
	の距離を擬似カラーで表示します

# Pattern Fit の場合

Intensity Fast FLIM Co	mponents Grayscale $\chi^{z}$ Free
Components	各 Channel を RBG で表示します
Grayscale	各 Channel をグレースケールで表示します

©: Display Options for the Channels



- ①各 Channel を重ね合わせて表示
- ②各 Channel を個別に並べて表示
- ③個別と重ね合せ両方を表示
- ④下図の明るさと蛍光寿命などのコントラストの調整画面を表示
- ⑤下図の蛍光寿命などのコントラストスケールバーの表示



O: Contrast Setting



左記画像のチェックボックスを OFF にすると画像の表示を OFF にすることができます。

上記画像赤枠部分をクリックすると、Photon が検出された数とその頻度をグラフにした Events [kCnts]と、Pixel 毎の蛍光寿命とその頻度をグラフにした Fast Lifetime [ns]の下記画像が表示さ れます

△は任意の位置に設定可能です。



Auto Range	範囲の自動調整を行います
Full Range	全範囲を選択します

⑧で Free を選択した場合、上記枠部分をクリックすると、下記画像が表示パラメーターを変更することができます。



FLIM 画像の保存

画像上で右クリックすると下記左側の画像が表示されます。 Export Raw Image を選択すると下記右側の画像が表示されます。

Show Data Cursor	Leica	-0		Save	Image			2
Export Image					T			
Export Raw Image		ome tiff	ImageJ TIFF	TIFF	JPEG	PNG	ВМР	
		Save Palett	e Image as RGB					
				QK	Cancel			

Save Pallet image as RGB のチェックを入れると、FLIM 画像が RGB 画像として保存されます。 JPG と BMP は 8 Bit で、それ以外は 16 Bit で出力されます。

Save Pallet image as RGB のチェックを外すと下記画像が表示されます。

Norm Toul2   Seen Methodage an ECE  Anti-Recy  Antice Series  Antice Series Antice Ser	
Auto Range	蛍光寿命や明るさの最小値と最大値を認識し、自動的に変換します。 出
	カ画像に定量性はありません。
Fixed Range 蛍光寿命の値を指定した割合で輝度値へ変換します。蛍光寿命の構	
	成分が複数含まれている場合、すべて同じ割合で変換されます。出力画
	像に定量性があります。
per Grey Level	指定した割合で、輝度値に変換します。出力画像に定量性があります。
Range	指定した範囲を輝度値に振り分けます。出力画像に定量性がありま
	す。
Individual Range	蛍光寿命の値を指定した割合で輝度値へ変換します。蛍光寿命の構成
	成分が複数含まれている場合、個別に指定した割合で変換されます。出
	カ画像に定量性があります。

8-③ Fit Settings FLIM の場合 FLIM 用画面で FLIM を選択します。



IM FRET	FLIM

ds BIM

Fit	8-⑤で選択されている ROI について、設定
	した Parameter をもとに計算を行います
Fit All	8-⑤で選択されている全ての ROI につい
	て、設定した Parameter をもとに計算を行い
	ます
FLIM	Fit Setting で行った計算をもとに画像解析・
Image	表示を行います
Fit	

	Fit Fit All	FLIM Image Fit						
E	xponential	いくつの蛍光寿命から Curve が構成されているか選択します。(左記画像						
С	omponents	は Components を 3 として計算した場合の結果、構成される Component						
		数の決め方は 34 ページ参照)						
Select Fit Model		計算式の選択を行います。(詳細な計算式は選択時に表示されます)						
	n-Exponential	IRF の形を考慮し、Curve の最初の方を使って計算します。相対的な蛍光						
	Reconvolution	寿命を算出し、比較するのに有効です。						
	with IRF							
	n-Exponential	IRF の影響を受けない Curve の後ろ側を計算に使うため、蛍光寿命を精確						
	Tail Fit	に測定できます。*500 nsec 以下など IRF より短い蛍光寿命が含まれる						
		場合、使用できません。						
Li	fetime (τ)	蛍光寿命を表示します						
A	mplitude	該当する蛍光寿命で検出された Photon 数からバックグランドを除去した値						
Та	ail Offset	バックグラウンド(Curve の裾野部分の時間で検出された Photon 数)						
IF	RF Background	IRFを考慮したバックグランドの蛍光強度(IRFを測定した場合に有効)						
IF	RF Shift	IRF のピークと Photon 検出のピークのズレ(IRF を測定した場合に有効)						
In	tensity	該当する蛍光寿命で検出された Photon 数						
S	um Amplitude	検出された Photon 数からバックグランドを除去した値						
М	ean τ, Intensity	Intensityを考慮した ROI 全体での加重平均蛍光寿命						
W	/eighted							
М	ean τ, Amplitude	Amplitude を考慮した ROI 全体での加重平均蛍光寿命						
W	/eighted							
X	2	χ <sup>2</sup> 検定の結果による尤度、モデルの信頼性を表示します						

Fit of the Lifetime Decay Curve: Determining the Number of Exponential Components 計測された Life time Decay Curve と理論値での Fitting をおこない、含まれている蛍光寿命の数 とその位置を算出します。



Fit Settings で Fit Model を選択し、Exponential Components を 1 として Fit します。 Fitting を行うと Decay Curve の画面に@(実測)に加え()(理論)と()(偏差)が表示されます。



以下の点を確認します。

・ aと bの Curve が重なっていること

・
 の変動が小さいこと

・Fit した後の FLIM 画像にノイズが入っていないこと

・ $\chi^2$ の尤度が1に近いこと

これらが合致しない場合、Componentの数が1つであることが否定されます。その場合、 Exponential Componentsを2、3などに変更して上記項目を確認します。

\* Time Gate や Intensity Threshold (10 ページ参照)で反射やノイズなどのシグナルを取り除き Fitting に用いる範囲を変更することで、より正確な蛍光寿命を測定できる場合があります。



# 8-③ Fit Settings FRET の場合 FLIM 用画面で FRET を選択します。



Select Fit Model	Mono-Exponential Donor					
Fitting Range	0.048 ns - 11.976	ns				
Parameter Forster Distance	Value Fit	Global	Fit	18-⑤で選択されている ROI について、設定		
Unquenched Donor Lifetime	2.489 ± 0.045 ns 🗸			した Parameter をもとに計算を行います		
Unquenched Donor Amplitude Quenched Donor Lifetime	0.585 ± 0.258 ns 🗸		Fit All	18-⑤で選択されている全ての ROI につい		
Quenched Donor Amplitude	2.660 ± 0.838 kCnts 🗸			て、設定した Parameter をもとに計算を行い		
IRF Background	0.000 Cnts					
IRF Shift FLIM FRET Efficiency	0.000 ns 76.479 ± 9.895 %					
Apparent FRET Efficiency	1.422 ± 0.841 %			Fit Setting で行うた計算をもとに画像件机・		
Binding	7.396 ± 2.351 %		Image	表示を行います		
Donor-Acceptor Distance	0.822 ± 0.073 nm 0.969		Fit			
Fit Fit All	FRET Image Fi	t				
Förster Distand	e	FR	ET 効率だ	が 50%になるときの分子間距離(蛍光色素の		
		組∂	9合わせに	こよって変わります)		
Unquenched D	onor Lifetime	FR	FRET が起きていない Donor の蛍光寿命			
Unquenched D	onor Amplitude	FR	FRET が起きていない Donor のバックグラウンドを除去し			
		た蛍光強度				
Quenched Don	or Lifetime	FR	ET が起き	ている Donor の蛍光寿命		
Quenched Don	or Amplitude	FR	ET が起き	きている Donor のバックグラウンドを除去した		
		蛍ን	蛍光強度			
Tail Offset		バッ	バックグラウンド(Curve の裾野部分の時間で検出された			
		Pho	oton 数)			
IRF Backgroun	d	IRF	を考慮し	たバックグランドの蛍光強度(IRF を測定した		
		場合	場合に有効)			
IRF Shift		IRF のピークと Photon 検出のピークのズレ(IRF を測定し				
		た場合に有効)				
FLIM FRET Eff	iciency	Donor の蛍光寿命変化をもとに計算された FRET 効率				
Apparent FRET	「 Efficiency	蛍ን	七の輝度変	を化をもとに計算された FRET 効率		
FRET Intensity		FR	ET が起き	ている Pixel で検出された Photon 数		
Binding		Dor	nor & Ac	ceptor の結合割合(Acceptor と結合している		
		Doi	nor の割合	\$(%))		
Donor-Accepto	r Distance	För	ster Dista	ance と FLIM FRET 効率をもとに計算された		
		Dor	norとAcc	eptor の平均分子間距離(nm)		
X <sup>2</sup>		χ <sup>2</sup>	検定の結	果による尤度、モデルの信頼性を表示します		

FLIM FRET の計算方法

Acceptor のない Donor のみのサンプルを用いて FLIM 解析を行います。

Donor の蛍光寿命が 1 つの場合: Mono-Exponential Donor を選択し、 Fit を行い、 Unquenched Donor Lifetime の値をコピーします

Donor の蛍光寿命が複数ある場合: Fit を行い、Mean τ, Amplitude Weighted の値をコピーしま す

FRET のサンプルに対して FLIM 解析を行います

Unquenched Donor Lifetime のチェックをはずし、コピーした値を貼り付けたあと Fit を行います。 Donor の蛍光寿命が 1 つの場合、Fit Model は Mono-Exponential Donor を選択します Donor の蛍光寿命が複数ある場合、Fit Model は Multi-Exponential Donor を選択します

Select Fit Model	Mono-Exponential	Donor		[	Select Fit Model	Mono-Exponential	Donor	
Fitting Range	0.048 ns -		11.97	6 ns	Fitting Range	0.048 ns -		11.
Parameter	Value		Fit	Global	Parameter	Value		Fi
Forster Distance	1.000	nm			Forster Distance	1.000	nm	
Unquenched Donor Lifetime	2.489 ± 0.045	ns	~		Unquenched Donor Lifetime		ns	
Unquenched Donor Amplitude	33.299 ± 0.957	kCnts	~		Unquenched Donor Amplitude	33.299 ± 0.957	kCnts	~
Quenched Donor Lifetime	0.585 ± 0.258	ns	~		Quenched Donor Lifetime	0.585 ± 0.258	ns	~
Quenched Donor Amplitude	2.660 ± 0.838	kCnts	1	111	Quenched Donor Amplitude	2.660 ± 0.838	kCnts	~
Tail Offset	691.472 ± 40.234	Cnts	~		Tail Offset	691.472 ± 40.234	Cnts	~
IRF Background	0.000	Cnts			IRF Background	0.000	Cnts	
IRF Shift	0.000	ns			IRF Shift	0.000	ns	
FLIM FRET Efficiency	76.479 ± 9.895	%			FLIM FRET Efficiency	76.479 ± 9.895	%	
Apparent FRET Efficiency	1.422 ± 0.841	%			Apparent FRET Efficiency	1.422 ± 0.841	96	
FRET Intensity	16.053 ± 13.236	kCnts			FRET Intensity	16.053 ± 13.236	kCnts	
Binding	7.396 ± 2.351	%			Binding	7.396 ± 2.351	%	
Donor-Acceptor Distance	0.822 ± 0.073	nm			Donor-Acceptor Distance	0.822 ± 0.073	nm	
χ²	0.969				y <sup>2</sup>	0.969		

FLIM FRET 効率は以下のように算出されます



FRFT - = -	τ <sub>no FRET</sub>		TFRET
rive reff	τ <sub>no</sub>	FRET	

76 ns

Global

# 8-③ Fit Settings Pattern Fit の場合



FLIM	用画面で	Pattern	Fit を選	択します	0

Parameter	Value	Fit	Global
Tail Offset	14495.284 ± 977.966 Cr	ts 🗸	
Amplitude 1	1255.932 ± 248.552	✓	
Amplitude 2	1.381 ± 0.126	<ul><li>✓</li></ul>	
Background 1	10.000 Cr	its	
Background 2	1900.889 Cr	ts	
Shift 1	0.081 ± 0.030 ns	✓	
Shift 2	-0.013 ± 0.010 ns	✓	
Intensity Sum	251609.144± 4476.57 kC	ints	
Intensity Integral 1	63.908 ± 0.000 kC	nts	
Intensity Integral 2	125436.93'± 0.000 kC	ints	
Effective Integral 1	78794.263 ± 15594.7 kC	ints	
Effective Integral 2	172814.88°± 15796.8kC	nts	
Fractional Intensity 1	0.313 ± 0.062		
Fractional Intensity 2	0.687 ± 0.062		
x <sup>2</sup>	5136.215		

Fit8-⑤で選択されている ROI について、設定<br/>した Parameter をもとに計算を行いますFit All8-⑤で選択されている全ての ROI につい<br/>て、設定した Parameter をもとに計算を行い<br/>ますFLIMFit Setting で行った計算をもとに画像解析・<br/>1mage<br/>表示を行いますFit...モーロー<br/>との目

左図は ROI を2つ作成し Fit を行った結果

Tail Offset	バックグラウンド(Curveの裾野部分の時間で検出された Photon 数)
Amplitude	輝度値
Background	バックグラウンドレベル
Shift	IRFと蛍光のズレ
Intensity Sum	検出された Photon 数からバックグランドを除去した値
Intensity Integral	指定した ROI 内の合計輝度値
Effective Integral	指定した ROI と同じ蛍光寿命をもつ箇所の合計輝度値
Fractional Intensity	指定した ROI と同じ蛍光寿命をもつシグナル量が全体のシグナル量
	に占める割合(合計は1)
χ <sup>2</sup>	χ <sup>2</sup> 検定の結果による尤度、モデルの信頼性を表示します

Projects FUM FCS		Select Fit Model	
FLIM FRET Pattern Fit		Time Range	0.020 ns - 24.988 ns
* Patterns		Parameter	Value Fit Global
		Tail Offset	202.666±0.181 Cnts 🗸
		Amplitude 1	1.635±0.003 🗸
N 🔉 🗇 🗢 🐄		Amplitude 2	4.036±0.004 🖌
		Background 1	26.773 Cnts
Pattern 1		Background 2	16.620 Cnts
Pattern 2		Shift 1	-0.043±0.002 ns 🖌
		Shift 2	0.019±0.001 ns 🖌
Add ROI Load Remove		Intensity Sum	21710.033 ± 4.402 kCnts
• RUM 6		Intensity Integral 1	4700.253 ± 0.000 kCnts
		Intensity Integral 2	3558.981 ± 0.000 kCnts
Select Frames to Analyze		Effective Integral 1	7553.442 ± 15.747 kCnts
Pixel Binning 🕥 1 🖬		Effective Integral 2	14156.591 ± 14.698 kCnts
Lifetime Binning 🔳 1 🕨 Channels		Fractional Intensity 1	0.348±0.001
	Channel 1 Fast Lifetime 🗘	Fractional Intensity 2	0.652±0.001
Time Gate		x	3.810
Specialist Settings	Decay Diversity Map Lifetime Directors (Director) 100 - 100 -	FR. TR AN	TAMinop R.
Save Image _			×)

Pattern Fit (Dye Separation with FLIM)の方法

Define reference sample (a), (b)

1. Pattern Fit にします

2. Fast FLIM 画像または Decay Diversity Map 上に ROI を指定します

Fast FLIM 画像上に ROI を指定した場合、Decay Diversity Map 上の相当する場所が赤く表示 されます。また Decay Diversity Map 上に ROI を指定した場合、Fast FLIM 画像の相当する Pixel が赤く表示されます。ROI を複数選択することも可能です。



3.  $\bigcirc$ 、@、@、①: Add ROI を押すと、それまで選択していたすべての ROI に対する Pattern と Curve が新たに追加されます

2.0 2.5



◎:FLIM Image Fit を行うと ROI と同じ蛍光寿命をもつ場所が分離して表示されます。

- 4. 作製した ROI に対して Fitting を行います
- 5. Pattern Image Fit により ROI の数に応じて画像を出力されます



8-③ Fit Settings Mean ROIの場合

\*タイムラプスイメージの場合のみ有効です



①Mean ROI を選択後、FLIM、FRET または Pattern FIT を選択します。

Jam — O	LAS X FLIM/FCS	Eile Settings Help - • 🗆 🗙
Projects FLIM 3D	Test FLM Components Grayscale Lifetime X Free	
PLIM     FRET     Patterns FR       Mean ROI     1       * ROI     0       Ø     0       Ø     0       Ø     0       Ø     0       Ø     0       Ø     0		
FUM     U     T     All Ronge Single     Single     Split     From     C     2200     C		859 of 2300
Pixel Binning   Lifetime Binning	HyD 2 + HyD 4 ▼ Fast FLIM ◆	
Reflection Filter  Time Gate	Mean ROI Fast RUM (re)	
Intensity Threshold     Specialist Settings		
	0.29 0.19 0.15	
Save ResultsSave Image	Number         Name         Channel         Tail Offset (Crics)         Amplitude (ICrics)         Lifetime (n) (nd)         TRF Background (Crics)         IFF           1         Series001 r/0 2 + Hy0 4	Shift (ng) Intensity (kCnts) Sum Amplitudes (kCnts) Sum Intensity (k

②任意の箇所に ROI を設定すると、FastFLIM の結果(③ROI 中の平均 Photon 検出時間と④ その Photon 数)が表示されます。

(\*グラフの線の色は ROI を囲んだ線の色と対応します)

8-③ Fit Setting (FLIM、FRET、Pattern Fit で共通)

0			
		Ũ	Link Region
	Fit	チェックが入っていると Curve をもとに自動算出されます。チェック	Link Time Link Stage
		をはずすと値を入力でき、計算結果に反映されます。	Link Excitat
(	Global	過去のデータから右記パラメーターを引用して計算を行うことがで	Link Measu
		きます	All

Link Channels

Emission Wavelength Measurements None

To Clipboard

and show ...

bility Level ... Correlation Plot.

Close

Fit Setting 画面上で右クリックすると、下記画像が表示されます。

Copy to Clipboard	Fit した結果をクリップボードに保存します	Cop
Export	Fit した結果をエクセル/CSV に保存できます	Exp
Export and show	Fit した結果をエクセル/CSV に保存した上で、	Lim Pro
	エクセルを開きます	Errc
Limits	各パラメーター上で右クリックすると、そのパラ	
	メーターの Fitting に用いる範囲を指定できます	
Probability Level	確率変数を選択・指定できます(デフォルトはσ	
	1)(σ1:68.27%, σ2:95.45%, σ3:99.73%)	
Error Correlation plot	Ordinateと Abscissa で選択したパラメーターを	
	Bootstrap 法で下図のように表示することがで	
	きます	

		Parameter I	Μοτ		×
					Orderen
Onter 1(m)					
					Of DesyTeral
					Will Decay Ter+2
					In taken at
117					E Institut
					Tara Argandan
10.					Saminanty
					Mean Photon Nevel Team
					Mean Decay Tarte
					- ×
in					
					C anto
					= Mate
					and the second
					And and a
10					= ANORA
					E Dem Tera I
					= DuaTer2
					- Depring 1
					I IN BADRIN PL
					= = =
					C 144491
					= 188792
					- 14mm (
					= ten/epit.do
Deser Tere 21m2		3 Nater			Pobliky beet 2 S
		0~			
Ordinata	2	: 翌 +ロレ チュッペ	ニョーカ_	_ たい 詰し	ィア主ニー

Ordinate	選択したパラメーターを Y 軸として表示します
Abscissa	選択したパラメーターを X 軸として表示します
Probability Level	確率変数の選択・指定を行えます。オレンジの枠内が確率変数の範囲内
	であることを示します

FLIM Image Fit...をクリックすると下図のウインドウが開きます。 (の表示は FLIM、FRET、Pattern Fit で異なります)



◎と◎の操作方法は 10 ページ Intensity Threshold と同じです。

◎ Parameter to fit: チェックを入れると Pixel ごとの計算結果が画像として表示されます。

FLIM、FRET、Pattern Fit で表示される項目が異なります。

FLIM	の場合
------	-----

Lifetime	蛍光寿命
Amplitude	蛍光強度
Tail offset	バックグランドの蛍光強度
IRF Background	IRFを考慮したバックグランドの蛍光強度(IRFを測定した場合に有効)
IRF Shift	IRF のピークと蛍光強度のピークのズレ(IRF を測定した場合に有効)

\* Lifetime のチェックボックスは外れています。チェックを ON にすると、漏れ込みをチェックでき るようになります。

FRET の場合

Unquenched Donor Lifetime	FRET が起きていない Donor の蛍光寿命
Unquenched Donor Amplitude	FRET が起きていない Donor の蛍光強度
Quenched Donor Lifetime	FRET が起きている Donor の蛍光寿命
Quenched Donor Amplitude	FRET が起きている Donor の蛍光強度
Tail Offset	バックグラウンドの蛍光強度

Pattern Fit の場合

Tail Offset	バックグランドの蛍光強度
Amplitude	蛍光強度

B Histogram:検出された Photon/Pixel 数を横軸に、その頻度を縦軸にしたもので、Threshold
 と Pixel Binning で調整できます。

Threshold	計算に用いる閾値を設定します。左下の欄に直接入力または、Histogram
	中のバーを動かすことで設定できます。結果は、右隣の画面 C に反映され
	ます。
Pixel Binning	検出された Photon 数が少ない場合、Binningを行うことで Photon/Pixel が
	増え、より正確な計算を行うことができるようになります

© Preview: <sup>(A)</sup>、<sup>(B)</sup>で設定した画像が表示されます。下記パネルから表示サイズを調整することができます。



ROI 数の Channel に分けられます。

# 8-④ Fit



Photon 数を縦軸に、計測された時間を横軸にしたグラフ

 
 IRF(Instrument Response Function)レーザーや検出器などシステムすべてを含めた時間分 解能を示す関数

**⑥**:励起してから検出された Photon 数をプロットしたもの

グラフの左右両端をつまみ、動かすと計算に用いる範囲の指定を行えます。

グラフ上で右クリックすると、下図が表示されます。

	Rescale Show Legend	Rescale	自動で縦軸のスケールを調整し元の状態に
	Show Data Cursor		戻します
~	Intensity logarithmic	Show Legend	線の色と名前(ファイル名 ROI 名 Channel
	Export diagram data		名)を上記グラフ中に表示します
	Export diagram data and show	Show Data Cursor	グラフ上でマウスをおいた線上の名前、時
Copy diagram data to clipboard			間、Photon 数を表示します
	Export image	Intensity logarithmic	縦軸を線形目盛から対数目盛に切替えます
		Show number	グラフで選択した範囲の Photon 数と全体に
		Photons	占めるその割合を表示します
		Export diagram	グラフをエクセル/CSV に保存します
		data	
		Export diagram data	グラフをエクセル/CSV に保存した上で、ファ
		and show	イルを開きます
		Copy diagram data	グラフデータをクリップボードにます
		clipboard	
		Export Image	グラフを TIFF、JPEG、PNG、BMP、GIF で
			保存します
		l de la constante de	

Histogram

FLIM、FRET、Pattern Fit で、また項目によって表示されるパラメーターが異なります。選択するものによって、表示される Histogram のパラメーターは変わります。

Pixel Intensity Histogram Number Pixels [Events]	Pixel Intensity	Photon/Pulse を横軸に、そのピクセル数
1*105-	Histogram	を縦軸にしたグラフ
1*10 <sup>+</sup> -		Fast FLIM Histogram:励起されてから
		Photon が検出されるまでの時間を横軸
0.2 0.4 0.6 0.8 1.0 Photons per Laser Pulse		に、その頻度を縦軸にしたグラフ
Fast FLIM Histogram Occurrence [Events]	Fast FLIM	励起されてから Photon が検出されるまで
160000 - 140000 - 140000 -	Histogram	の時間を横軸に、その頻度を縦軸にしたグ
120000 - 100000 - 80000 - 60000 -		ラフ
40000		
-1 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 Time[ns]		
Efficiency Histogram Occurrence [Events]	Efficiency	FLIM FRET 効率を横軸に、その頻度を縦
	Histogram	軸にしたグラフ
8000		Donor-Acceptor Distance Histogram :
4000 - 2000		Förster 距離をもとに計算された分子間距
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 FRET Efficiency [%]		離を横軸に、その頻度を縦軸にしたグラフ
Donor-Acceptor Distance Histogram Occurrence [Events]	Donor-Acceptor	FLIM FRET 効率を横軸に、その頻度を縦
30000 - 25000 -	Distance	軸にしたグラフ
20000 - 15000 -	Histogram	Donor-Acceptor Distance Histogram :
5000 -		Förster 距離をもとに計算された分子間距
0.7 0.8 0.9 1.0 1.1 1.2 1.3 1.4 1.5 1.6 1.7 1.8 Distance [nm]		離を横軸に、その頻度を縦軸にしたグラフ
Binding Histogram Occurrence [Events] 20000 -	Binding Histogram	Acceptor と結合している Donor の割合を
18000 - 16000 - 14000 -		横軸に、その頻度を縦軸にしたグラフ
12000 - 10000 - 8000 - 6000 -		
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 FRET Binding [%]		
Decay Diversity Map Lifetime Distribution [ns]	Decay Diversity	蛍光寿命を縦軸に、その標準偏差を横軸
9 - 8 - 7 -	Мар	にしたグラフ
6 - 5 - 4 - 3 -		
2-		
0 2 4 6 8		

# Histogram 上で右クリックすると、下図が表示されます。

	Rescale	
	Show Legend	
	Show Data Cursor	
$\checkmark$	Intensity logarithmic	
	Show number Photons	
	Export diagram data	
	Export diagram data and show	
	Copy diagram data to clipboard	
	Export Image	
F	Rescale	自動で縦軸のスケールを調整し元の状態に戻します
s	Show Legend	線の色と名前(ファイル名 ROI 名 Channel 名)を上記グラフ中に表
		示します
S	Show Data Cursor	グラフ上でマウスをおいた線上の名前、時間、Photon 数を表示し
		ます
Ir	ntensity logarithmic	縦軸を線形目盛から対数目盛に切替えます
S	Show number Photons	グラフで選択した範囲の Photon 数と全体に占めるその割合を表示
		します
E	xport diagram data	グラフをエクセル/CSV に保存します
E	xport diagram data	グラフをエクセル/CSV に保存した上で、エクセルを表示します
a	nd show	
С	Copy diagram data	グラフデータをクリップボードにコピーします
c	lipboard	
E	Export Image	グラフを TIFF、JPEG、PNG、BMP、GIF で保存します

# 8-5 FLIM 計算結果の表示

画像取得後は、使用した検出器の数だけ下記画像のように表示されます。

Number	Name	Channel	Region	Tail Offset Crits	Amplitude 1	Amplitude 2	Background 1 Cnts	Background 2 Crits	Shift 1 ns	Shift 2 ns	Intensity Sum kCnts	Intensity Integral 1 kCnts
	1 P-labelled_cells_for_FRET	. + Channel 2	Overall Decay									
	2 P-labelled_cells_for_FRET	Channel 1	Overall Decay									
<												>

# Image Fit を行うと、結果が反映され FLIM の場合下記画像のように表示されます。

Number 4	Name	Channel	Region	Tail Offset Cnts	Amplitude kCnts	Decay Time ns	IRF Background Crits	IRF Shift ns	Intensity kCnts	Sum Amplitudes kCnts	Sum Intensity kCnts	Mean F
	1 P-labelled_cells_for_FRET	Channel 1	Overall Decay	32,790	56,616	3,041	0,000	0,000	10760,212	56,616	10760,212	
	2 P-labelled_cells_for_FRET	Channel 1	ROI 1	3,341	6,411	3,073	0,000	0,000	1231,565	6,411	1231,565	
	3 P-labelled_cells_for_FRET	Channel 2	Overall Decay		3,354	2,782	0,000	0,000	583,290	3,354	583,290	
	4 P-labelled cells for FRFT	Channel 2	ROF 1	0 321	0.424	2 841	0.000	0.000	75 373	0.424	75 373	

# 上図グラフ上で右クリックすると下記画面が表示されます。

Select Columns
Copy table content
Copy selected Rows
Copy all
Export table content
Export selected rows
Export all
Export table content and show
Export selected rows and show
Export all and show
Parameter Plot

Select Columns	表示項目の選択ができます。表示項目できるは FLIM、FRET、
	Pattern Fit で異なります
Copy table content	表示項目について全ての行をクリップボードにコピーします
Copy selected Rows	選択されている行の表示項目をクリップボードにコピーします。
Copy all	Select Columnsで選択/表示されていない項目についても全
	ての行をクリップボードにコピーします
Export table content	表示項目について全ての行を Excel/CSV に保存できます
Export selected rows	選択された行を Excel/CSV に保存できます
Export all	Select Columnsで選択されていない項目も含めて全ての行
	を Excel/CSV に保存できます
Export table content and	表示項目について全ての行を Excel/CSV に保存し、ファイルを
show	開きます
Export selected rows and	表示項目について選択された行を Excel/CSV に保存し、ファイ
show	ルを開きます
Export all and show	Select Columnsで選択されていない項目も含めて全ての行
	を Excel/CSV に保存し、ファイル開きます
Parameter Plot	Ordinate と Abscissa で選択したパラメーターを Bootstrap 法
	で表示することができます(次ページ参照)

8-⑥ FLIM 画像など解析後のデータを保存できます。

Save Results	FLIM 画像としての情報を保持した状態で解析結果が保存されます。
	Raw データへ上書きはされません。
Save Image	FLIM 画像としてではなく、通常の輝度画像と同様に保存されます。保存
	後、3D 画像の作成などを行うことができます。FLIM に関する情報は保
	存されないため、再度解析を行うことはできません。

Save Results または Save Image を押すと、左記画面が開き名前を付けて保存することができます。保存先は開いている lif になります。



Save Pallet Image as RGB

得られた Fast FLIM や FLIM 画像の蛍光寿命イメージを、蛍光寿命に応じて RGB の輝度 イメージに変換して保存します。保存された画像には蛍光寿命の情報が含まれないので、 解析に用いることはできません(右図上から3つめのボタンを押すと、3色に分割表示され ます)。



<b>k</b> =0	Save Image		
Name Test22			
Save Palette Image as RGB			
Auto Range			
Fixed Range			
Individual Range			
Category	fac	tor or Range	
Category Intensity (Crita)	Fac per Grey Level 🔹	tor or Range	T
Category Intensity (Cnto) Lifetime (1) [ns]	Fac per Grey Level * per Grey Level *	tor or Range	
Category Intensity (Crita) Lifetime (1) (m)	Fac per Grey Level = per Grey Level =	tor or Range	
Category Intensity (Cris) Lifetime (1) (m)	fac per Grey Level \$ per Grey Level \$	tor or Range	
Category Intensity (Crts) Lifetime (1) (m)	Fac per Grey Level 🔹 per Grey Level 🔹	tor or Range	

Auto Range	蛍光寿命や明るさの最小値と最大値を認識し、自動的に変換します。 出				
	カ画像に定量性はありません。				
Fixed Range	蛍光寿命の値を指定した割合で輝度値へ変換します。蛍光寿命の構成				
	成分が複数含まれている場合、すべて同じ割合で変換されます。出力				
	像に定量性があります。				
per Grey Level	指定した割合で、輝度値に変換します。出力画像に定量性があります。				
Range	指定した範囲を輝度値に振り分けます。出力画像に定量性がありま				
	す。				
Individual Range	蛍光寿命の値を指定した割合で輝度値へ変換します。蛍光寿命の構成				
	成分が複数含まれている場合、個別に指定した割合で変換されます。出				
	カ画像に定量性があります。				

File	e Settings	Help		
F	ile			
File	Settings New Experiment	Help Ctrl+N	New Experiment	新しい Project を作成します。名前を自由に 設定できます。
	Open Experiment Import Export	Ctrl+O	Open Experiment…	過去に撮影したデータを開きます
	Save Ctrl+S Save as		Import	PicoQuant を使用して撮影したデータを開き ます。(.pt3、.ptu など)
	Close All Exit	Alt+F4	Export	Time Gate など設定した範囲内のデータ を.pt3、.ptu または.bin としてエクスポートし ます
			Export Raw Data	Time Gate などの設定によらず全てのデー タを.pt3、.ptu または.bin としてエクスポート します
			Save Save as Close Close All	lif として新規/上書き保存します lif として名前を付けて保存します 選択されている lif ファイルを閉じます 開いている全ての lif ファイルを閉じます
			Exit	FLIM 用画面を閉じます

Settings

8-7

画面の表示色を変更できます。

SPLIT (Separation of Photons by Lifetime Tuning)

励起光の出力を共焦点で撮影する程度または少し明るめの強さに、また STED 光の出力を設定 し撮影を行います(これまでの STED の半分程度、未検討の場合は 30~40%程度から検討を行 ってください)。

- 1. 撮影データに対し、2 成分で Fitting
- 2. FLIM Image Fit (Background は0に設定)。
- 3. Save Image から Auto Range を選択し保存します。

\* STED 光はこれまでの半分程度で分離可能です。

分からない場合は 20-30%程度からはじめてください。

\* STED-FLIM のメリット

STED で分解能を上げる方法として Gated STED (gSTED)があります。STED 光が照射され た箇所では誘導放出が起こり、蛍光寿命が短くなります。gSTED は励起してから取得までの時間 をずらし、誘導放出が起こした箇所からのシグナルを捨て、STED 光が照射されていない中心部 分からだけのシグナルを得ることで分解能を上げる方法です。より蛍光寿命を短く、誘導放出を起 こすため、STED パワーを上げる必要がありました。また励起から取得開始までの「捨てるシグナ ル」にも中心部分からのシグナルが含まれているため、シグナルは減っていました。それを補うた め励起を上げていました。しかし、STED-FLIM では Fitting により STED 光が照射された箇所と その中心箇所を分離するため、シグナルを捨てる必要がなく、STED パワーを押さえることができ ます。その結果、褪色しにくくなります。



左 : gSTED

励起 6%、STED 60%、0.3 - 6.0 nsec 中央:STED-FLIM で分離した STED 光により蛍光寿命が短くなった箇所 右 :STED-FLIM で分離した STED 光が照射されていない箇所

励起 3%、STED 30% Lanzanò L *et al* <u>Nat Commun.</u> 2015 Apr 2;6:6701. doi: 10.1038/ncomms7701.

34

Phasor Plot

Phasor Plot は FLIM の結果を下図のように視覚的に表示したもので、FLIM 画像の各 Pixel が プロットされます。そのため、モデルの選択や蛍光寿命の構成成分数について検討を行う必要が ありません。

![](_page_35_Picture_2.jpeg)

蛍光寿命は右下が一番短く、半円(Universal Circle)の線上を通り左下に行くに連れ長くなりま す。単一の蛍光寿命を持つ場合、半円の線上に分布します。一方、複数の蛍光寿命を持つ場合、 半円の内側に分布します。

![](_page_35_Figure_4.jpeg)

Figure 1: Mapping FD and TCSPC FLIM data to the phasor plot.

Ref: ISS, FLIM Analysis using the Phasor Plots

![](_page_37_Picture_0.jpeg)

◎ Phasorを選択すると上記画面が表示されます

⑧ ◎Phasor Plot 表示画面設定

◎ Phasor Plot 表示画面で選択した範囲が⑥で設定した色で表示されます。デフォルトは Intensity 表示です。

- Phasor Plot 表示画面
- ◎ Phasor Plot 用のツールバー
- € €で選択したツールバーと結果の表示画面
- ◎ ©で ROI を指定した際、 ◎に表示する ROI を選択することが出来ます

36-<mark>®</mark>

![](_page_38_Picture_1.jpeg)

Harmonic	フーリエ変換の際パルス変調を行うことで、 <sup>10</sup> Phasor Plot の右下に位置する短
	い蛍光寿命の位置を見やすくすることができます (最大値は 9)
Threshold	Phasor 表示する際の閾値 (デフォルトは 5)
No Filter	Filter なし
Filter	Median Filter の切り替えとその度合いの設定
Preview	撮影中に Phasor を見るときに使います。Live 中でも SN を上げることができま
	す。

![](_page_39_Figure_0.jpeg)

![](_page_39_Figure_1.jpeg)

- O Universal Circle
- ⑥ 円に含まれた範囲に対応するピクセルが 34-◎上で線と同じ色で表示されます
- ◎ Phase Shift の角度が表示されます
- ◎ それぞれの Lifetime をあらわします。Monoexponential component の場合 Universal circle
- 上に表示され、Multiexponential componentの場合 Universal circle の内側に表示されます。
- ◎ ツールバー選択画面

	Zoom
a	Click and Drag した箇所の拡大表示
	Reset
	拡大表示解除
R	Select
	Cursor などの選択および移動
0	Draw Cursor
	2 つ目の Cursor を作製 (40 ページ参照)
	Draw Ratio Cursor for two Components
о.	2つの蛍光寿命が含まれる場合に使用(42ページ参照)
507	Draw Ratio Cursor for three Components
<b>6</b>	3つの蛍光寿命が含まれる場合に使用(43ページ参照)
1	Draw Connected Color Coding Line
	青から赤に変化する直線を引けます (41 ページ参照)
~	Draw Connected Color Coding Lines
	青から赤に変化する多関節の線を引けます(41 ページ参照)

	Draw Connected Color Coding Triangle
	青から赤に変化する三角形を作成できます (41 ページ参照)
Þ	Draw FRET Trajectory
	Donor の Lifetime 変化から FRET 効率を算出できます (44 ページ参照)

![](_page_40_Picture_1.jpeg)

Draw Cursor

選択後、蛍光寿命の中心をクリック

![](_page_40_Figure_4.jpeg)

- ∂ 表示/非表示切り替え
- ⑥ 対応するツールのアイコンが表示されます
- ◎ 表示色設定 ツールおよび、画像の対応箇所がこの色で表示されます
- ◎ 削除

Lifetime [ns]	円で囲まれた範囲の平均蛍光寿命
Radius	円のサイズ

Р	I	Name	Channel
~	0	Position 3	HyD 4
		Position 3	HyD 5
~		FLIM	

Р	Phasor Plot 上で表示する際に ON
1	36-ⓒに表示されている画像に〇がつきます
Name	Project 名が表示されます
Channel	撮影に使われた Channel が表示されます

Adding Color Coding in the Phasor Diagram

![](_page_41_Figure_1.jpeg)

1. ①で任意のツールを選択します。

2. ②、③、④の場所でクリックすると⑤のように青から赤へ変化する線が表示されます。白い線 (⑥)の範囲内に対応する Pixel は⑦で対応する色で表示されます。範囲外の Pixel は白で表示さ れます。

![](_page_41_Picture_4.jpeg)

![](_page_42_Figure_0.jpeg)

Determining and Visualizing the Lifetime using the Phasor Method

Phasor(①)を選択すると、画面中央下側に Phasor Diagram (②)が表示されます。
 強いシグナル(a)と弱いシグナル(b)を分離・識別するには

2. Phasor Diagram (②)で Phasor Diagram 上で(a)と(b)のクラスターの形がはっきりとするように調整します。

3. Cursor (③)をドラッグしながら移動させます。

4. Cursor にマウスを合わせ、センターホイールを回し Cursor のサイズを調整します。

5. 6に下記パラメーターが表示されます。

Lifetime	蛍光寿命
Radius	Cursor のサイズ

6. Tool Bar(5)から Cursor を追加することができます。

7. 3. と4. を行い、Cursorを調整します。

![](_page_43_Figure_0.jpeg)

# Determining the Ration of Two Components in the Phasor Diagram

- 1. Draw Ratio Cursor for two Components(①)を選択します。
- 2. 2と3のエリアの中心をクリックします。
- 3. ④のように2と③がつながります。
- 4. Cursorを⑤の位置にまでクリック&ドラッグします。
- 5. 6に下記パラメーターが表示されます。

Ratio	2と3の比率
Lifetime 1, Lifetime 2	2と3との蛍光寿命
Radius	⑥の Cursor のサイズ

![](_page_44_Figure_0.jpeg)

# Determining the Ration of Three Components in the Phasor Diagram

- 1. Draw Ratio Cursor for three Components(①)を選択します。
- 2. 2、3と4のエリアの中心をクリックします。
- 3. 5のように2、3と4がつながります。
- 4. Cursorを⑥の位置にまでクリック&ドラッグします。
- 5. ⑦に下記パラメーターが表示されます。

Ratio	2、3と4の比率 (合計 1)
Lifetime 1, Lifetime 2, Lifetime 3	<ol> <li>3と④の蛍光寿命</li> </ol>
Radius	⑥の Cursor のサイズ

![](_page_45_Figure_0.jpeg)

# Drawing a FRET Trajectory in the Phasor Diagram

- 1. Draw FRET Trajectory(1)を選択します。
- 2. 自家蛍光に相当する箇所(2)をクリックします。
- 3. FRET を起こしていない Donor (Unquenched Donor)に相当する箇所(③)をダブルクリックします。
- 4. ④の FRET Trajectory を蛍光寿命が短くなっている個所を通るように調整します。
- 5. Cursor(⑤)をクリックし、Trajectory 上を移動させます。
- 6. 6に下記パラメーターが表示されます。

Unquenched $\tau$	FRET が起きていない Donor の蛍光寿命
Quenched $\tau$	FRET が FRET が起きている Donor の蛍光寿命
Background	Backgroud のノイズ比
FRET Efficiency	FLIM-FRET 効率

Phasor 画像の保存

画像上で右クリックし、Export Raw Image を選択すると、下記画像が表示されます。

![](_page_46_Picture_2.jpeg)

Save Phasor Mask

\_Ch0 から4 まで作成されます。\_Ch0 は Gray Scale 画像\_Ch1-3 は RGB

Apply Phasor Mask to Image Cursor で指定された範囲を Save Phasor GS