



From Eye to Insight



FALCON FCS Manual

20200730_JP

手順

1. FCS Wizard の起動	2	ページ
2. Corr の調整(補正環つきレンズの場合)	3	ページ
3. Convaralia などを用いてレーザー照射位置の補正	5	ページ
4. 検出器の設定	8	ページ
5. 位置の指定とデータ取得	11	ページ
6. データの保存	16	ページ
7. Confocal volume などの Calibration	20	ページ
8. FLCS	26	ページ

Tips

* 安定した FCS の解析のため、計測前にフレッシュな標準サンプル(拡散時間、拡散係数が既知の色素)を用いて得られた値で補正してください

* PMT、Standard HyD は FCS 測定に使用できません

* 測定箇所の濃度が 0.5 nM~100 nM

* STED-FCS を行うと、Confocal Volume が小さくなるため、より高濃度(Kd 値が小さい現象)の観察が可能です (Diffusion Time が短くなります)

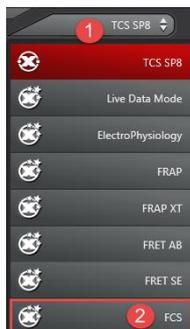
* FCS の解析のみを行う場合は、デスクトップ上の



「LAS_X_SingleMoleculeDetection.exe shortcut」を起動してください、FCS 解析画面だけが立ち上がります(LASX Small では解析できません)

* 通常の輝度イメージで Gating を行う場合は LASX を再起動してください。Gating のタイミングがずれることがあります。

FCS Wizard



①TCS SP8 をクリックすると左記プルダウンメニューが表示されます（表示される内容はライセンスにより異なります）。

②FCS を選択すると、FCS Wizard が起動します。

FCS Wizard を起動するとメニュータブが以下のように切り替わり、Setup Corr-ring から順に設定を行います



Overview	FCS を行うための操作のステップが表示されます
Setup Corr-ring	補正環がついているレンズを使用する場合、補正環の調整を行います (3 ページ参照)
Setup Imaging	FCS を行う場所を決めるため、XYZ 画像の取得を行います (4 ページ参照)
Setup FCS	FCS を行うにあたり、レーザー強度、Pinhole サイズなどの設定を行います (7 ページ参照)
Measurements	取得した XYZ または XZY 画像上で FCS を行う位置の設定を行います。 複数選択、位置の保存や呼び出しを行うこともできます (10 ページ参照)

Setup Corr-ring

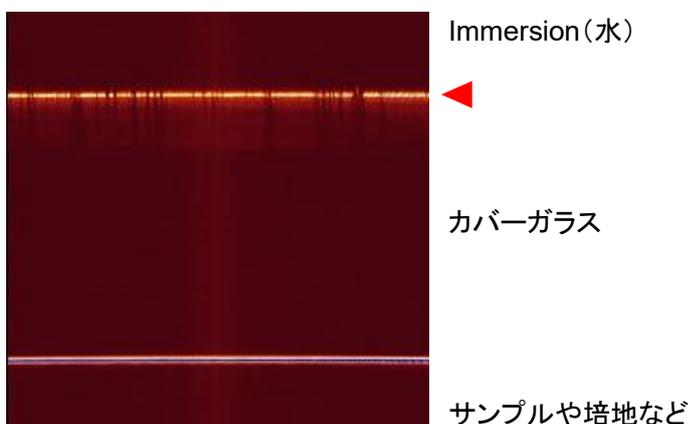
補正環の調整を行います。サンプルを変えるごとに行ってください。下記設定に自動で変わります。

Color look-up table(LUT): Glow (O and U) にします。

Scan mode	XZ-y(Z-Galvo)
Format	512x512
Zoom	1
Lazer line	488 nm
AOBS	Reflection
Detector	PMT

* Super Z Galvano ステージの場合

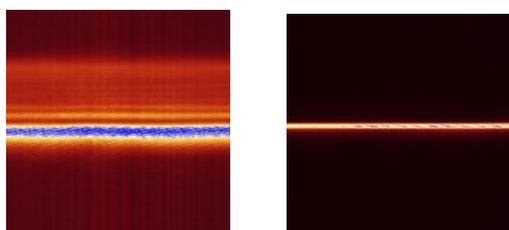
Z 軸方向を動かしていくと、下図のように 2 本の線が見えてきます(倍率により片方しか見えない場合があります) 上側:Immersion とガラスの境界、下側:ガラスとサンプルの境界)。



下側の境界に焦点を合わせ、ズームします(4 – 8 倍程度)。

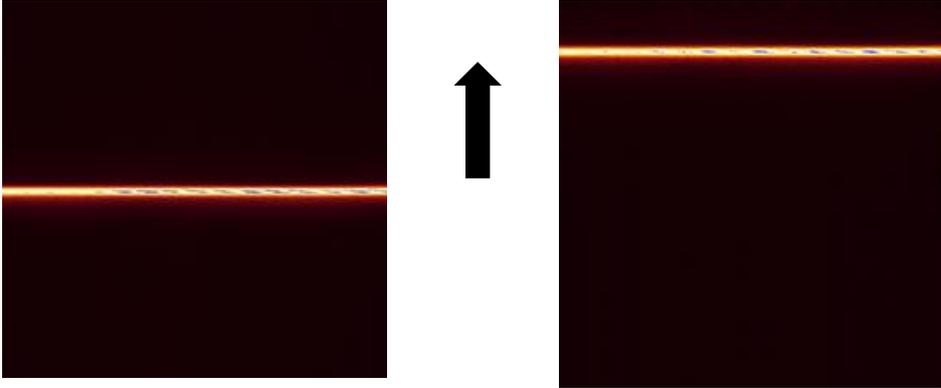
下図左側は補正環が調整できていない状態で複数本の線が見られる

感度を調整し下図右記のように一部分だけ青くなっている状態にしてから補正環を動かし、境界面が最も明るくなる(青い部分が多くなる)場所を探します(全体が青くなった場合は、感度を下げ下図右記のような状態を維持する)。

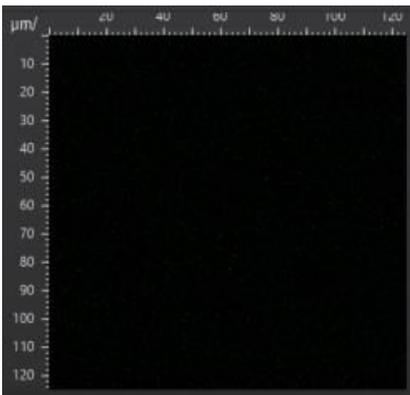


* Super Z Galvano ステージがない場合、サンプルが一番明るくなるように補正環を調整します
補正環を動かすと Z 位置が変わるので、Z 位置を維持しながら行ってください。

補正間の調整後、下図右記のように画像の中央から10 - 20 μm 上の位置に合わせます。



* 画像表示ウインドウ上側の  をクリックすると、下図のように長さが表示されます



Setup Image

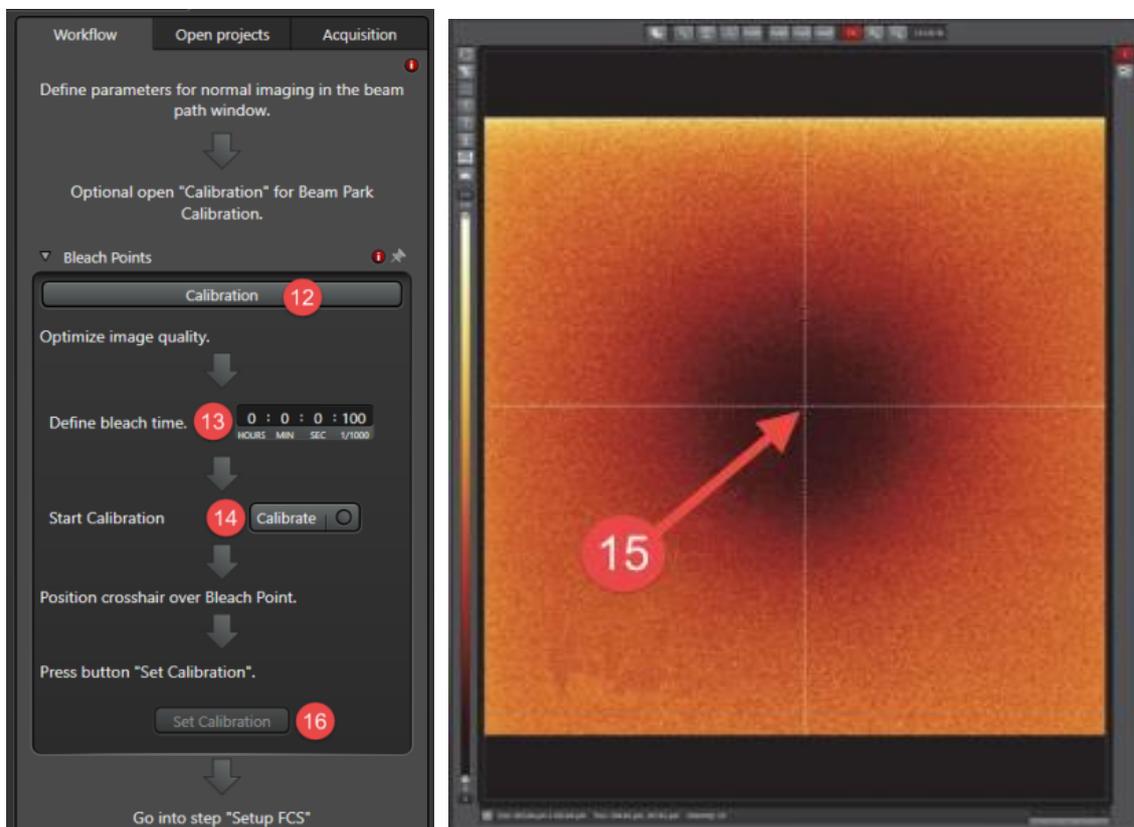
測定する位置とレーザーの照射位置の補正を行います（3日に一度は行う）

FCS 測定で使用する波長のレーザーでブリーチできる（吸収がある）固定サンプルが必要です
（Leica 標準サンプル: Convallaria など）

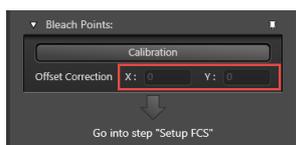


1. ②Setup Imaging を選択します
2. ブリーチするところを中心位置に合せます。(Ctrl + T で中心位置が十字線で表示されます)
3. ⑪Acquisition タブを選択、⑥xyz モード、⑦Bi-directional スキャン速度を 600 Hz 以下にします

4. ⑧レーザー、⑨取得波長、検出器の設定を行います（実際に使用するレーザーを選択します）
5. 取得画像画面で表示を感度表示に設定します（輝度が0のとき緑、サチュレーションのとき青）
6. ⑪Workflow タブを選択します



7. ⑫Calibration をクリックすると上記左側の画面が表示されます
8. Live スキャンを行い、レーザーの出力などの設定を行います 自動的に Zoom:32、Format: 1024x1024 に変わります
9. ⑬Define bleach time でレーザーを照射する時間を設定します（デフォルトは 100 msec、サンプルが薄い場合はブリーチされやすいので 500 msec 以下が推奨）
10. ⑭Calibrate を押すと以下の順序で画像の取得とブリーチが行われます
 - 5.で設定した条件で画像の取得
 - 画像の中心に 5.で設定した波長を 100%の出力、10.で設定した時間照射
 - 5.で設定した条件で再度、画像の取得
11. 上記画像右側のように、⑮中心を示す十字線とともに画像が表示されます
12. 中心位置とブリーチされた場所が同じ場合、⑯Set Calibration を押します
中心位置とブリーチされた場所が異なる場合、ブリーチされた場所をクリックし、⑯Set Calibration を押します。下記画像赤枠部に補正値が表示され、保存されます。
Bleach されなかった場合、サンプルの位置を変える、または照射時間を長くする

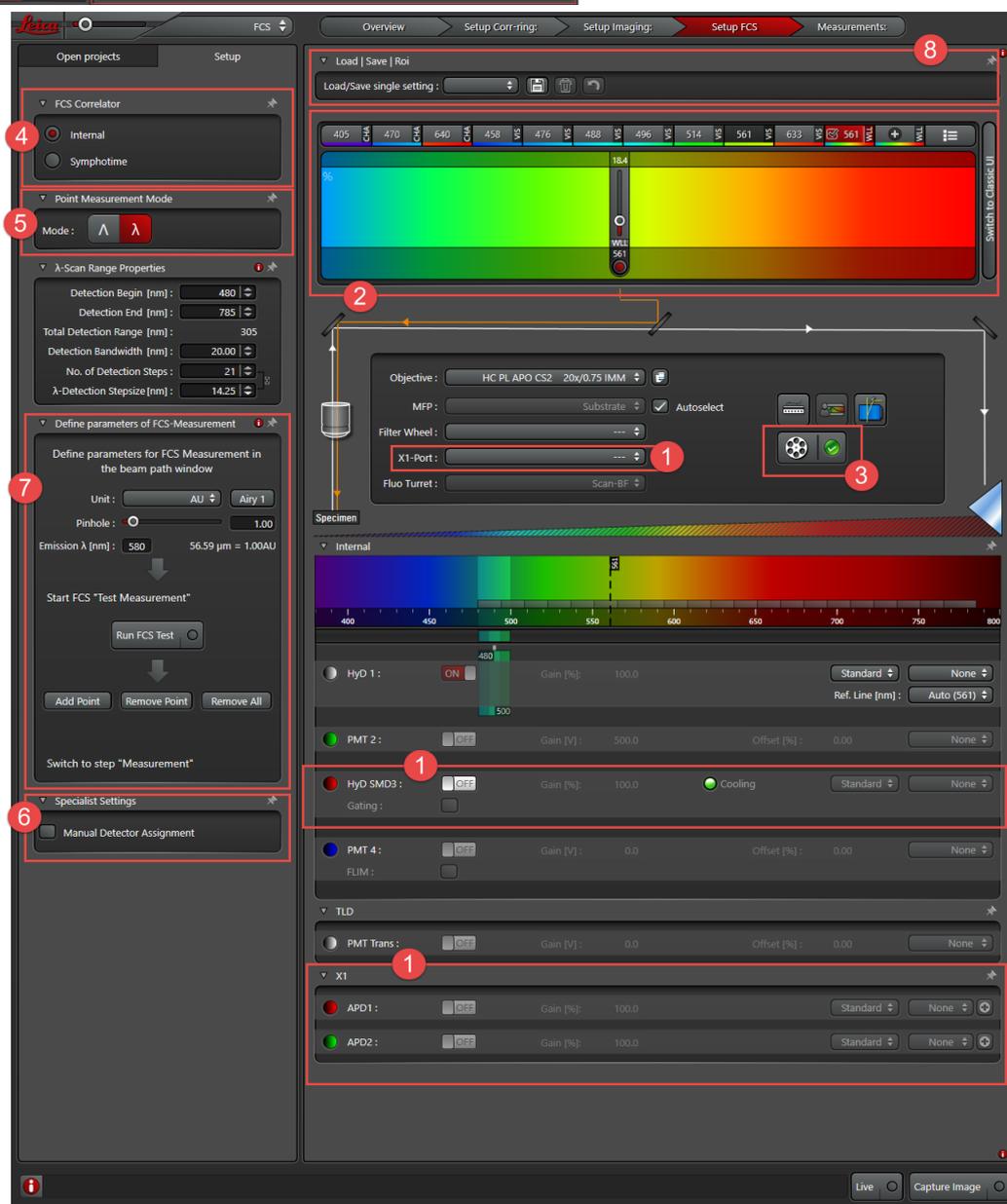


13. 標準サンプルまたは測定するサンプルに変え、画像を取得する

* サンプルを変えた場合、再度補正環の調整を行ってください

Setup FCS

Setup FCS に移ると、サブモニターに下記 FCS 操作画面が表示されます



①検出器の設定を行います(表示される検出器の種類、数は仕様により異なります)

②使用するレーザーの設定を行います

③レーザーの漏れ込みを抑える Notch フィルターの設定の確認を行います(デフォルト:自動で変わります)

④取得したデータを解析する方法の選択を行います(仕様により表示されないこともあります)

Internal: LASX 上での解析、Symphotime(オプション): PicoQuant のソフトウェア上での解析

⑤スペクトルスキャンを行えます。行わない場合はどちらも OFF

Λ	取得波長を固定し、励起光を変えながら FCS を行うことで励起スペクトルを取ることができます(励起光を変えずに取得することも可能です)
λ	励起光を固定し、取得波長を変えながら FCS をおこなうことで蛍光スペクトルを取ることができます(取得波長を変えずに取得することも可能です)
$\Lambda \lambda$	励起光および取得波長を変えながら FCS を行うことで、励起および蛍光のスペクトルを取ることができます

⑥SMD HyD など最大 4 つの検出器を 1 つの検出器として扱うことができます。

(通常、検出された Photon は検出器ごとに計算されますが、Special Setting によりデータを1つにまとめて計算できるようになります 測定後でも設定可能)

ON になっている検出器から自動選択されますが、チェックを入れると下記左側画像が表示され、変更することができます(自己相関の場合は下記中央、相互相関の場合は下記右側)



自己相関係数の場合

Auto-Correlation

①をクリックすると上記中央のように表示されます

②FCS で使用できる検出器が表示され、1 つの取得波長につき 1 つの検出器を使います

③FCS で使用できる検出器が表示され、1 つの取得波長につき複数の検出器を使えます

④③で使用できるすべての検出器が自動で選択されます(最大 4 基)

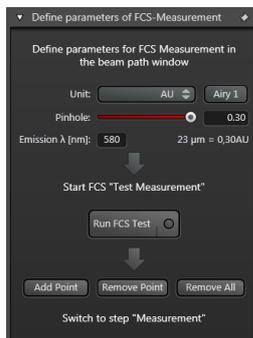
⑤②、③での設定に名前をつけられます

相互相関係数の場合

上記左 Auto-Correlation で 2 つ以上の検出器を指定します。Cross-Correlation で表示される Channel ⊗ Channel をクリックすると、上記右側画像のように表示されます

左右それぞれに使用する検出器を選択します

⑦Pinhole サイズ、励起波長などの調整および FCS を行うポイントの設定を行います



1. FCS 測定箇所の登録を行います。FCS を行う箇所をマウスでクリックすると画像上の十字線が移動します。Add point で登録できます。
2. Run FCS Test を押すと、測定が始まります。計測中 Correlation curve がリアルタイムでサブモニターに表示される蛍光強度、Count rate、Count per molecule (cpm) を参考に調整を行います。cps と同時に Correlation から計算された cpm もリアルタイム表示されます。

Tips

- ・Count rate が 10～500 kcps (count per second) になるように調整します
- ・cpm の値が高いほうが Correlation curve の S/N が良くなります
- ・サチュレーションの影響を避けるため、cpm の値が最大値の 2/3 程度になるようにレーザーの出力を調整してください
- ・褪色や三重項への移行の影響が見られる場合、さらにレーザーの出力を下げてください

Measurements

FCS を行うポイントや測定回数の設定を行います

Open projects Setup

Define laser intensity for FCS-measurement

Time Series :

Number of Cycles : 1

Cycle Interval : 0.00 s

Minimize

Image Before FCS Measurement

Image After Each 1 Repetitions

Image After Each 1 Points

Image After Each 1 Cycles

Total Number of Measurements : 0

Definition of Point Measurement :

Pre-bleach : 0.00 s

Measurement Duration : 5.00 s

Measurement Until : 1.00 MCounts

Repetition at Point : 1

Repetition Interval : 5.00 s

Minimize

Number of Defined Points : 0

Number of λ-Steps : 21

Base name : BaseName

Run : 1

Comment :

Define Measurement Points

Add Remove

GoTo Remove All

Hide ROIs Save List Load List

Press "Run FCS" button to start.

Live Capture Image Run FCS

①FCS を行う位置の設定を行います

Define laser intensity for FCS-measurement

Define Measurement Points

Add Remove

GoTo Remove All

Hide ROIs Save List Load List

Press "Run FCS" button to start.

Run FCS

1. 取得した画像上で測定を行う箇所をクリックすると、十字線が移動します
2.  Add を押すと測定箇所として追加され、取得画像上にのように表示されます
 - 1 箇所以上指定する(最大 200 箇所)
 - Z フォーカスを動かす(Z を取得していた場合、を操作する)ことで異なる位置の Z での測定もできます
3.  Save List からリストの保存、 Load List からリストの呼び出しを行えます
 - Remove、Remove All からそれぞれ各ポイント、すべてのポイントの削除も行えます
4.  から指定した測定箇所をテキストに出力することができます

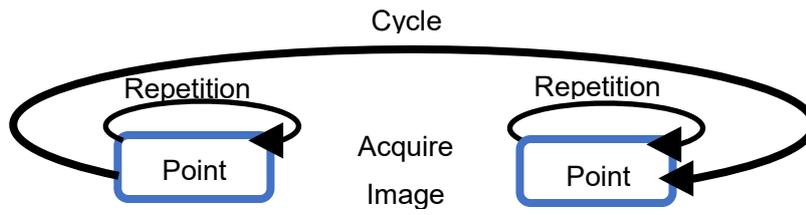
②FCS の繰返し回数などの設定を行えます

Number of Cycles	FCS 測定 Point を複数指定した場合、それを 1 Cycle としてその繰返し回数を指定します
Cycle Interval	上記 FCS の Cycle を複数回行う際、測定間隔を指定します
Minimize	上記 Cycle Interval を最小値に設定します
Image Before FCS Measurement	FCS 測定前に画像取得を行います
Image After Each Repetitions	 Repetition at point で同一 Point での FCS 測定を行う際、指定した回数おきに画像取得を行います
Image After Each points	複数 Point 指定した際、指定 Point おきに画像取得を行います
Image After Each Cycles	指定 Cycle 数おきに画像取得を行います
Total Number of Measurements	Cycle と Repetition で設定した合計測定回数

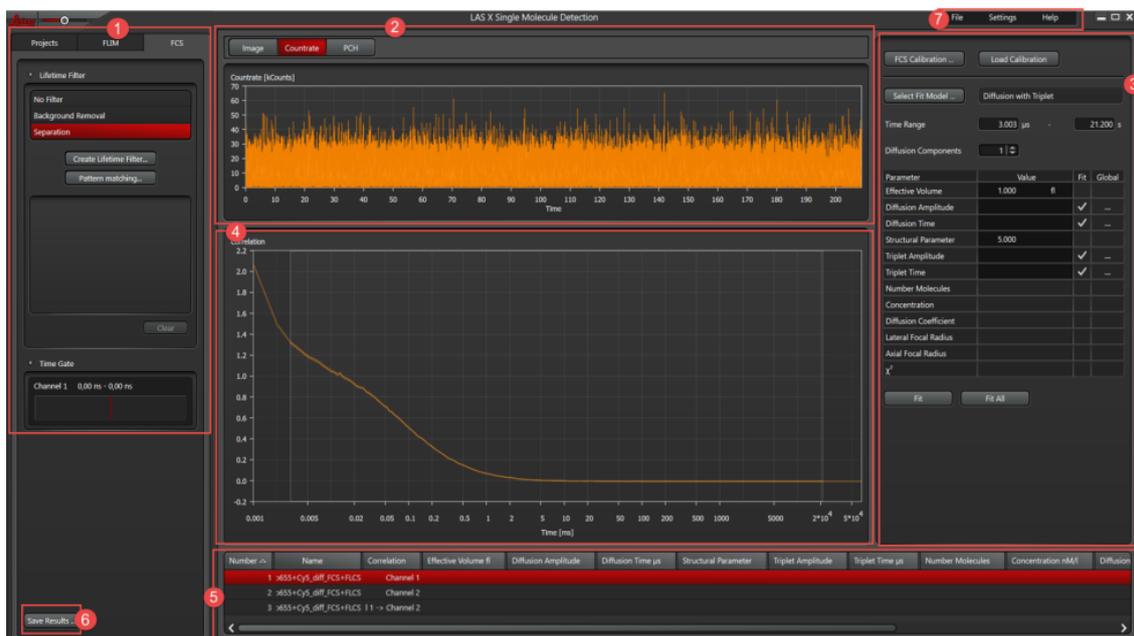
③FCS を行う Point で繰返し測定を行う際の設定を行えます

Pre-Bleach	FCS 測定前に指定時間 Bleach を行います (FCS 測定中の Photo-bleach 効果を低減できます)
Measurement Duration	指定時間中繰返し FCS 測定を行います
Measurement Until	Count 数が指定値になるまで繰返し FCS を行います
Repetition at Point	同一 Point で FCS を指定回数繰返し行います
Repetition Interval	同一 Point で FCS を繰返し測定する際、測定間隔を指定します
Minimize	上記“Repetition Interval”を最小にします
Number of Defined Points	 で指定した Point 数を表示します
Number of λ -Steps	8 ページで指定した λ スキャンのステップ数を表示します
Base name	データ取得の際、入力した名前が自動で挿入されます
Run	上記 Base name の後ろにつきます データ取得を行うと数字が足されていきます

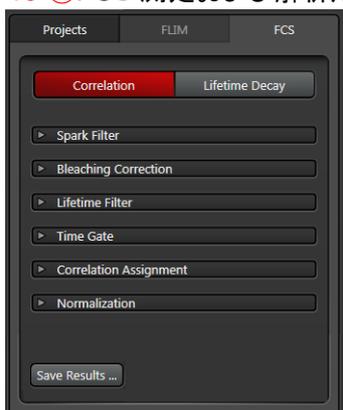
Comment	データにコメントを記載できます LAS X FLIM/FCS Property の Comment に表示されます
---------	---



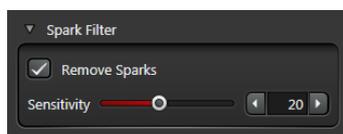
FCS 測定結果表示画面



13-① FCS 測定および解析用のタブです



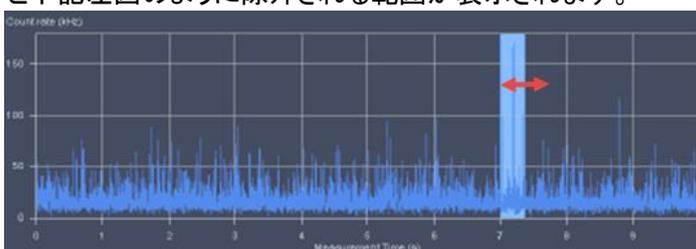
Correlation を選択すると、左図のように表示されます



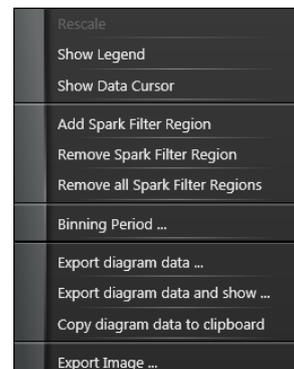
Spark Filter

測定後、計算によるノイズの除去を行えます

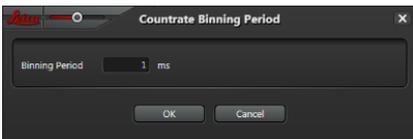
クリックすると左図のように表示されます。Sensitivity を変えると、と下記左図のように除外される範囲が表示されます。



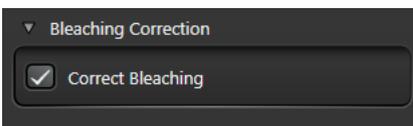
さらに上図上で右クリックすると、右図が表示されます(次ページ参照)



Add Spark Filter Region	Sensitivity で決定された箇所から除外する範囲の幅を指定できます
Remove Spark Filter Region	選択した箇所を除去します
Remove all Spark Filter	すべての箇所を除去します
Binning Period	検出された時間の Binning をかけます



Bleaching Correction



ブリーチの影響が考えられる場合、チェックを入れると計算が行われ、ブリーチがおきたと思われる箇所に補正がかかります

Lifetime Filter は 24、25 ページ参照、Time Gate は FLIM のマニュアル 10 ページ参照

Correlation Assignment: 最大 4 つまでの検出器を 1 つの検出器のように扱うことができ、その設定が行えます。また FCCS の場合には、Channel と使用する検出器の選択を行えます。

通常は自動で選択されますが、検出器の変更を行う場合は Manual にチェックを入れると下図左のように表示され、FCS と FCCS の選択を行うことができます。

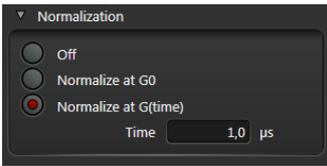
FCS (Auto-Correlation) の場合

- ①をクリックすると、下図中央のように表示されます。
- ②1 つの Channel を検出するのに、1 つの検出器を用いる場合
- ③1 つの Channel を検出するのに、複数の検出器を用いる場合
- ④1 つの Channel を検出するのに、使用可能なすべての検出器を用いる場合
- ③または④の場合、FCS の測定ができるすべての検出器が表示されます (PMT や通常の HyD は使用できません、SMD-HyD が必要)

FCCS (Cross-Correlation) の場合

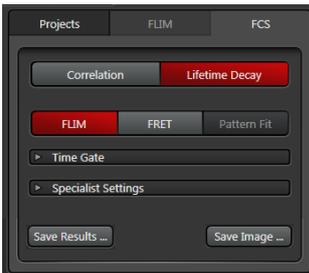
Channel ⊗ Channel をクリックすると、下図右側のように表示され、FCCS を行う検出器の選択を行えます





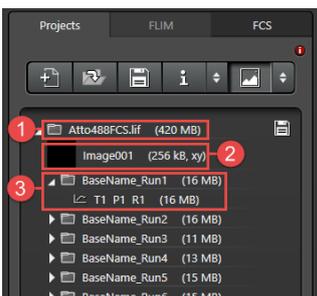
Normalization : Correlation Curve の時間(Y 軸)補正が行えます

Off	補正を行いません
Normalize at G0	Correlation Curve を $G(\tau)=0$ の位置に補正します
Normalize at G(time)	Correlation Curve を $G(\tau)=1 \mu\text{sec}$ の位置に補正します



Save Results/Save Image: 解析結果とその設定の保存ができます

FLIM/FRET/Pattern Fit	(FLIM のマニュアル参照)
Time Gate	(FLIM のマニュアル参照)
Special Settings	(FLIM のマニュアル参照)
Save Results...	FCS 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... (FLCS の場合のみ)	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。



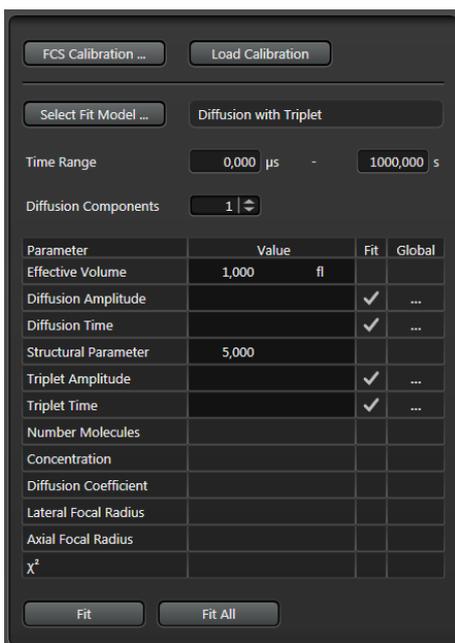
- 1: すべての撮影データはここに保存されます
- 2: FCS 設定時に撮影した画像などが保存されます
- 3: Run FCS を行うごとに新しいフォルダが作製されます
BaseName_Run の数字が増えていきます

T: Trace
P: Point
R: Run

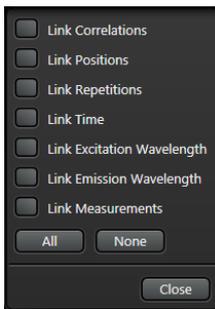
13-② FCS の測定結果の表示画面

Image	取得した画像上に FCS 測定 Point を表示します
Counts	縦軸に検出された Photon 数を、横軸に時間のグラフを表示します

13-③ 計測結果をもとに演算処理を行います



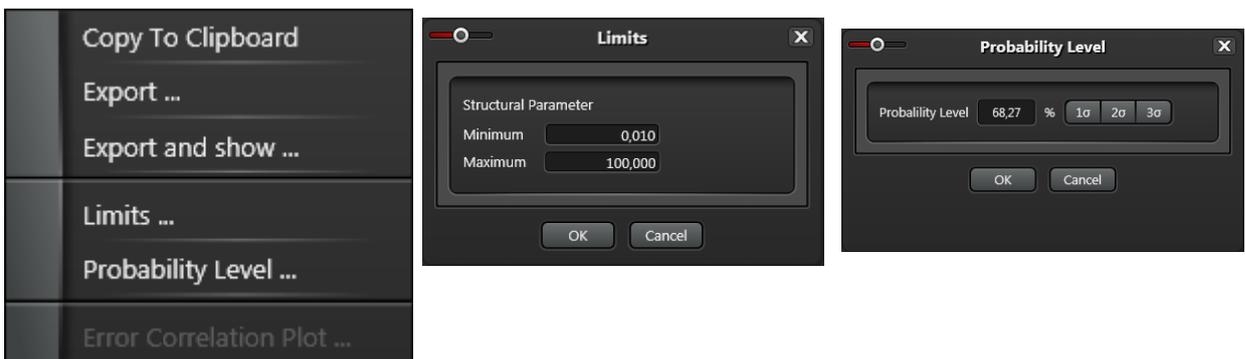
FCS Calibration	Calibration で測定した Effective Volume の値が自動入力されます (19 ページ参照)
Load Calibration	過去の設定を呼び出して、同じ設定で解析を行うことができます
Select Fit Model	演算に用いるモデルを選択します 下記の 5 つがあります
Pure Diffusion	拡散の影響だけで、Triplet の影響が無い
Diffusion with Triplet	観察領域中で蛍光を出さない状態をとる可能性がある (Dark State や Triplet)
Triplet Extended 3D	観察領域 (3D) を自由に動けない可能性がある
Triplet Extended 2D	観察領域が細胞膜などの観察で移動が平面のみの可能性がある (STED-FCS など)
Protonation	プロトン化の可能性がある
Conformational	構造が変化する可能性がある
Time Range	Fitting に用いる時間範囲を設定できます



13-③エリア内で右クリックすると、左記テーブルが表示されます
 チェックを入れた項目で設定した値を複数の測定に適用することができます

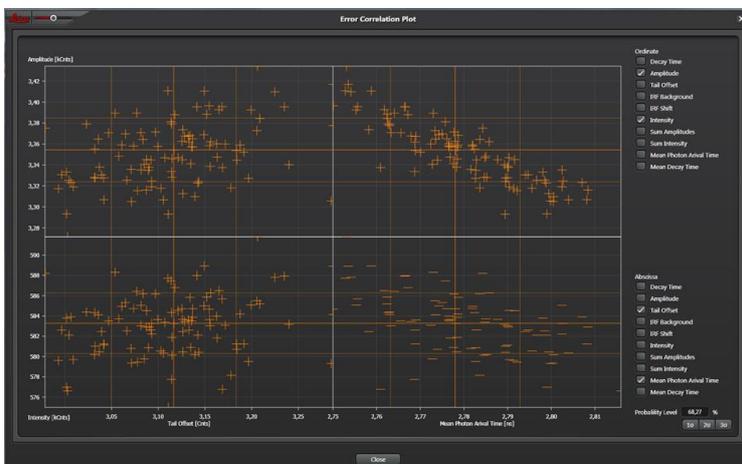
Diffusion Components	拡散している要素の個数を設定できます
Fit	上記設定で Fitting が行われます
Fit All	選択した複数の測定に対して上記設定で Fitting が行われます

Fit Setting 上で右クリックすると、下記左図が表示されます。
 また、Limit または Probability Level... をクリックすると下記中央または右図が表示されます。



Copy to Clipboard	Fit Setting 中のパラメーターとその値をクリップボード上にコピーします
Export	Fit Setting 中のパラメーターとその値をエクセルにエクスポートします
Export and show	Fit Setting 中のパラメーターとその値をエクセルにエクスポートし、表示します
Limits	Fitting に用いる値の範囲を設定します
Probability Level...	Error Correlation plot... (次ページ参照) で表示する際の確率変数を選択・指定できます。デフォルトは $\sigma 1$ です。($\sigma 1$: 68.27%、 $\sigma 2$: 95.45%、 $\sigma 3$: 99.73%)

Probability Level...をクリックすると下図が表示されます。

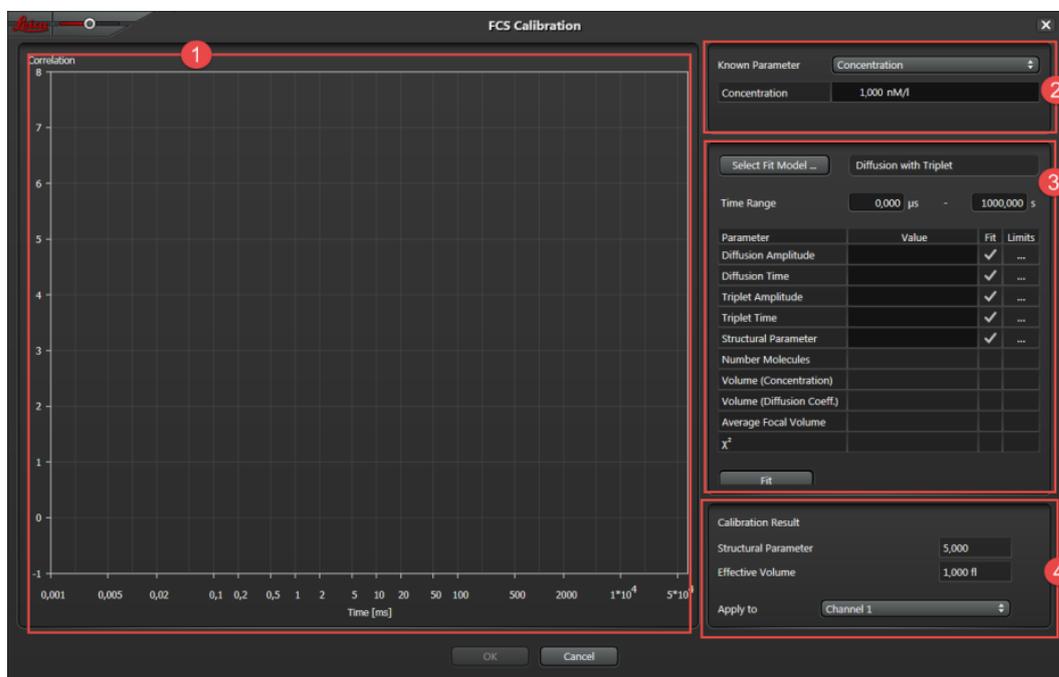


Error Correlation plot...	Ordinate と Abscissa で選択したパラメーターを Bootstrap 法で表示することができます
Ordinate	選択したパラメーターを Y 軸として表示します
Abcissa	選択したパラメーターを X 軸として表示します
Probability Level	Probability Level... で指定した確率変数の範囲をオレンジの枠で表示します

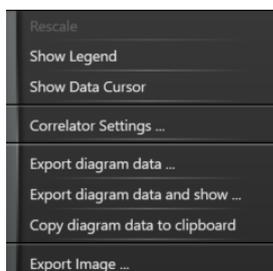
FCS Calibration

観察領域の補正を行えます 測定に用いるレーザー波長に応じた標準サンプルを用いてください

13-③で FCS Calibration を押すと表示されます



①測定した Correlation カーブが表示されます マウスのホイールで拡大縮小ができ、右クリックすると下記ウインドウが表示されます



Rescale	拡大縮小したのを元に戻します
Show Legend	図形のレジェンドを表示します
Show Data Cursor	マウスを合せた位置の時間と輝度を表示します
Export diagram data	図形を TIFF、JPEG、PNG、BMP または GIF で出力を行います
Export diagram data and show	図形を TIFF、JPEG、PNG、BMP または GIF で出力を行い、表示します
Copy diagram data to clipboard	図形をクリップボード上にコピーします
Export Image	図形を TIFF、JPEG、PNG、BMP または GIF で出力します

②濃度または拡散係数について機知のパラメーターを入力できます

Diffusion Coefficient, Concentration or Diffusion Coefficient and Concentration

③FCS のキャリブレーションを行うにあたって、パラメーターの設定ができます

Select Fit Model	演算に用いるモデルを選択します 下記の2つがあります
Pure Diffusion	拡散の影響だけで、Triplet の影響が無い場合
Diffusion with Triplet	観察領域中で蛍光を出さない状態をとる可能性がある (Dark State や Triplet)
Time Range	Fitting に用いる時間範囲を設定できます
Diffusion Amplitude	拡散係数
Diffusion time	拡散時間
Triplet Time	三重項に遷移した時間
Structural Parameter	観察領域 (Confocal Volume) の縦横比
Volume (Diffusion coeff.)	拡散係数を基準に求めた観察領域
Average Focal Volume	Concentration と Diffusion coefficient から求められた観察領域の平均値
χ^2	χ^2 検定の結果による尤度を示し、モデルの信頼性を表示します
Fit	③で設定した条件で Fitting が行われます

④FCS 測定および Fitting の結果が表示されます

Structural Parameter	算出された観測領域の縦横比
Effective Volume	算出された観測領域の体積 (fl、 10^{-15} l)
Apply to	算出結果を補正值として別の測定結果の選択した Channel に適用することができます キャリブレーションを終えた場合は"OK"を押してください 算出結果は③Fit Setting に表示されます キャリブレーションの結果は測定に適用されます

Fluorophore	λ_{Em} maximum in nm	Diffusion coefficient in water at 25°C (298.15 K) in $10^{-6} \text{ cm}^2\text{s}^{-1}$	Methods and references
Atto655-maleimid	686	4.07 ± 0.10 4.06 ± 0.09 4.09 ± 0.07	2fFCS [1], PFG-NMR [1] 2fFCS [4, 8] pmFCS [4]
Atto655-carboxylic acid	685	4.26 ± 0.08	2fFCS [1,3], PFG-NMR [1,3]
Atto655-NHS ester	685	4.25 ± 0.06	2fFCS [8]
Cy5	670	3.6 ± 0.1	2fFCS [8]
Alexa 647	665	3.3 ± 0.1	2fFCS [8]
Alexa 633	647	3.4 ± 0.1	2fFCS [8]
Rhodamine 6G	550	4.14 ± 0.05 4.3 ± 0.4 4.14 ± 0.01	2fFCS [1, 8] PFG-NMR [6] PB/CF [7]
Rhodamine B	560	4.5 ± 0.4 4.27 ± 0.04	PFG-NMR [6] PB/CF [7]
Rhodamine 123	530	4.6 ± 0.4	PFG-NMR [6]
Rhodamine 110	535	4.7 ± 0.4	PFG-NMR [6]
Fluorescein	520	4.25 ± 0.01	PB/CF [7]
Oregon Green 488	550	4.11 ± 0.06 4.10 ± 0.08	2fFCS [1] 2fFCS [8]
Atto488-carboxylic acid	523	4.0 ± 0.1	2fFCS [5]
TetraSpeck Beads, 0.1 μm diameter	430 515 580 680	0.044 ± 0.07	2fFCS [2], DLS [2]

Abbreviations of measurement methods:

2fFCS, Dual Focus Fluorescence Correlation Spectroscopy; PFG-NMR, Pulsed Field Gradient Nuclear Magnetic Resonance; pmFCS, Polarization-Modulation Fluorescence Correlation Spectroscopy; PB/CF, Plug Broadening/Capillary Flow; DLS, Dynamic Light Scattering.

PicoQuant

Absolute Diffusion Coefficients: Compilation of Reference Data for FCS Calibration

13-④ スキャン中リアルタイムで Auto-Correlation や Cross Correlation の Curve を表示します

13-⑤ FCS 測定の結果が Channel ごとに表示されます

Number ^	Name	Correlation	Effective Volume fl	Diffusion Amplitude	Diffusion Time μs	Structural Param
1	FCS_2_Komponenten	Channel 1	1,000	0,084	1000000,000	
2	FCS_2_Komponenten	Channel 2	1,000	1,296	259,969	
3	FCS_2_Komponenten	Channel 1 -> Channel 2	1,000	0,691	459850,426	

表示項目はドラッグすることで移動させることができます

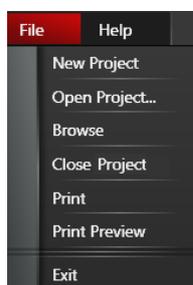
Select Columns ...
Copy table content
Copy selected Rows
Copy all
Export table content ...
Export selected rows ...
Export all ...
Export table content and show...
Export selected rows and show...
Export all and show...
Parameter Plot ...

右クリックすることで左図が表示されます

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 show...	表示項目について全ての行を Excel/CSV に保存し、ファイルを開きます
Export selected rows and show...	表示項目について選択された行を Excel/CSV に保存し、ファイルを開きます
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 (18 ページ参照)

13-⑥ Save Result: 解析結果とパラメーターを保存できます

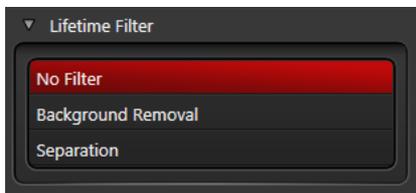
13-⑦ File



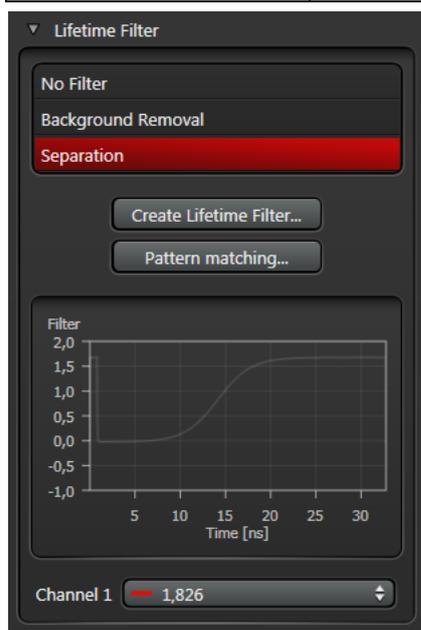
New Project	Project や Experiment を新規作成します
Open Project	lif、lei、tif など保存したデータを読み出します
Browse	撮影データの検索と表示ができます (lif、lof、tif、jpeg、bmp、png)
Close Project	Project 内の Project や Experiment を閉じます
Print	表示されている画像の名前、Channel、モード、画像を印刷します
Print Preview	印刷される内容のプレビューを表示します
Exit	FCS 用画面を閉じます

Lifetime Filter: FLCS の設定を行うことができます。蛍光寿命を測定により、FCS のバックグラウンドの低下が期待できます。

*** FLCS を行う場合は 40 MHz で行うのを推奨**



No Filter	蛍光寿命によるバックグラウンドの除去を行いません
Background Removal	自己相関の演算結果をもとに、バックグラウンドとなっている検出時間を除きます
Separation	色素間の漏れこみの補正を行います。選択すると下記左図のようになります Create Lifetime Filter Pattern matching

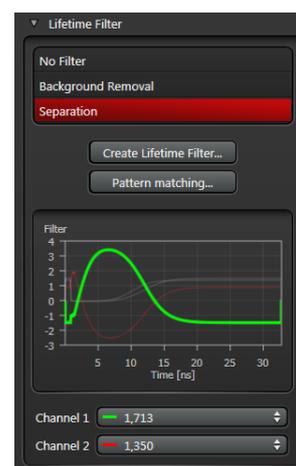


Create Lifetime Filter

FCS や FCCS において蛍光寿命ごとに分離することができます。

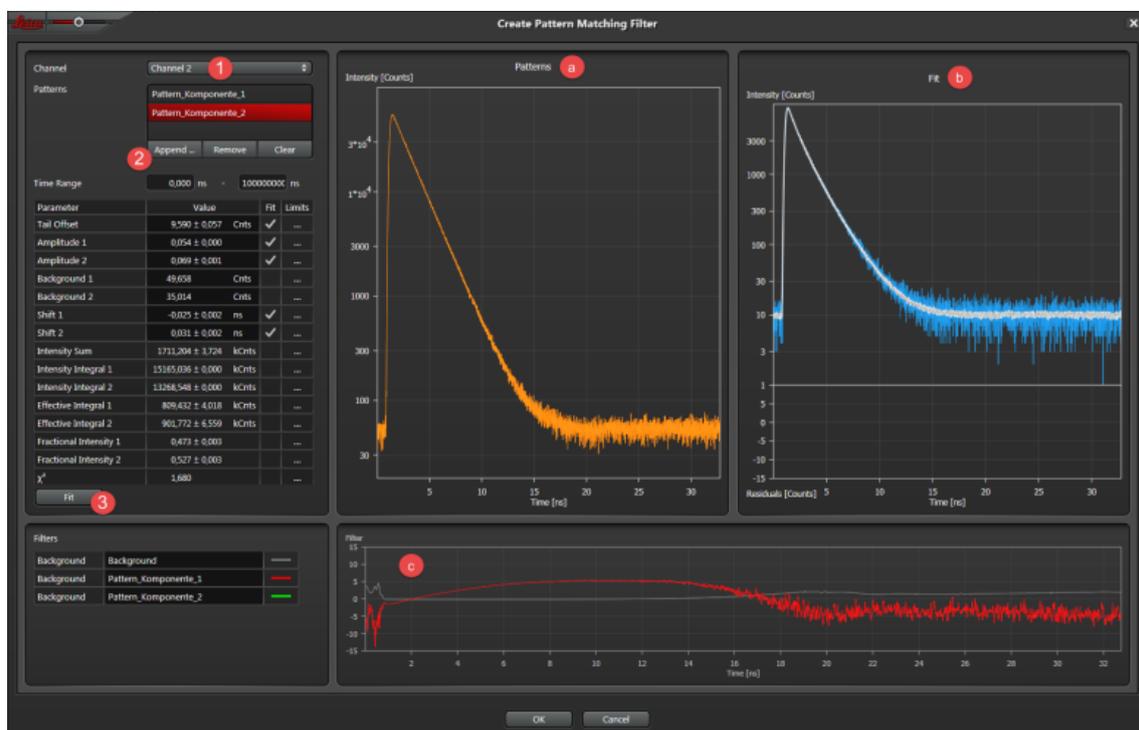


1. ①漏れ込みを除去したい Channel を選択します
 2. ②使用する Fit Model を選択します
 3. ③レーザーパルスの影響が無い範囲の検出時間の選択を行います
 4. ④いくつの蛍光寿命を含んでいるかの設定をします
 5. ⑤Fit の設定を行います (FLIM マニュアル 15-22 ページ参照)
- Fit setting のページ
6. ⑥Fit を行うと、その結果がⒶに表示されます
 7. ⑦各 Channel について 1. から 6. を行うと、漏れ込みの計算行われ、Ⓑに表示されます
 8. OK で Filter が作成され、ウィンドウが閉じ、右図のように表示されます



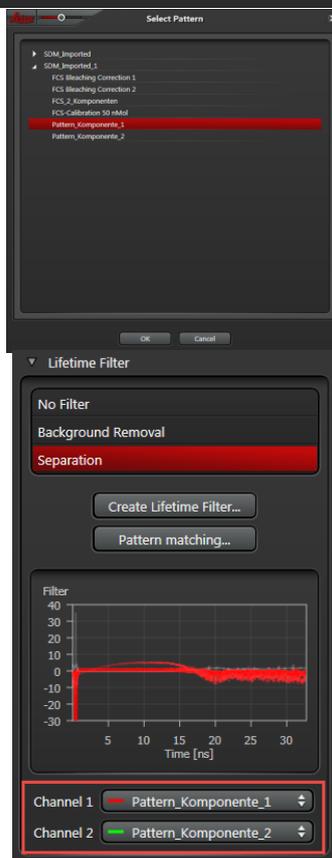
Create Pattern Matching Filter

FCCS において事前に取得した単一の蛍光寿命をもちいて、その蛍光寿命からのシグナルを除去することができます

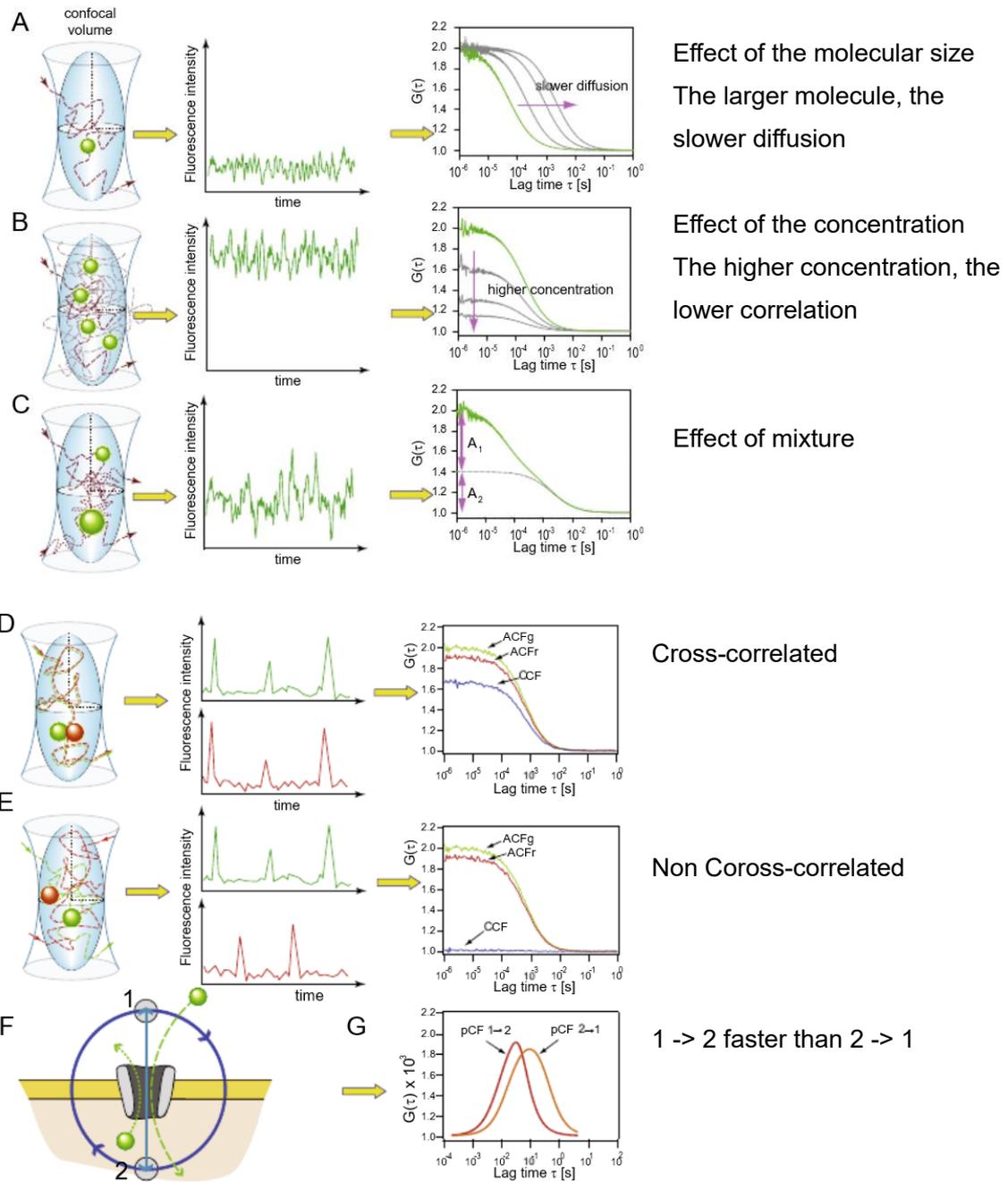


1. ①で漏れ込みを除去したい Channel を選択します
2. ②Append を選択すると、右上図が表示されます
3. 1.で選択した Channel 1 色だけで撮影したときのデータを呼び出します
4. 呼び出されたデータが③に表示されます
5. ③Fit を行うと呼び出したデータを参考に補正を行います
6. 各 Channel について 1.から 5.を行うと、漏れ込みの計算が行われ、④が表示されます
7. OK で Filter が作成され、ウィンドウが閉じ、右下図のように表示されます

作成した Filter は右下図赤枠部分の Channel から選択できます

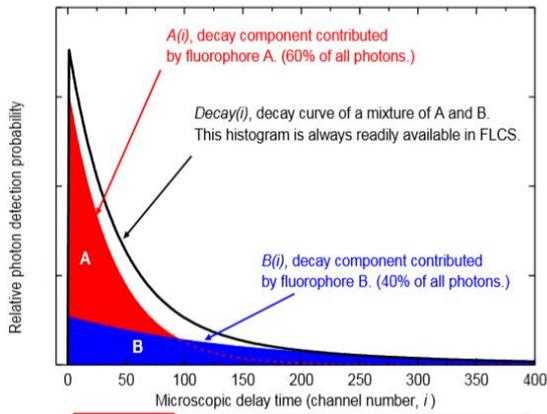


Principal of FCS, FCCS, pCF
 FCS(A-C), FCCS(D, E), pCF(F, G)



Ref: R. Macháň, T. Wohland / FEBS Letters 588 (2014) 3571–3584

Statistical filter function



Photons with channel numbers in this range are more likely emitted by A, rather than B. However, there is a considerable probability of origin from B.

Photons with these channel numbers are most likely emitted by B. As the channel number increases, there is less and less probability that such a photon was emitted by A, but this probability never decreases to zero.

Fig. 2: Pulsed excitation: Note that the vast majority of photons has a very ambiguous origin. However, the relative probability of origin changes during the decay and can be determined for each single photon, looking up its channel number.

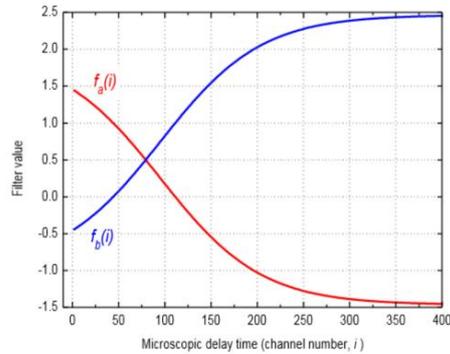


Fig. 3: Example of statistical filter functions

Note that the filter value entering the calculation is not an integer and can be even negative! However, the sum of the two filter values is always exactly 1. Applying the $f_a(i)$ filter during software correlation of all photon records one obtains the ACF of compound A. The same holds for $f_b(i)$ and compound B.

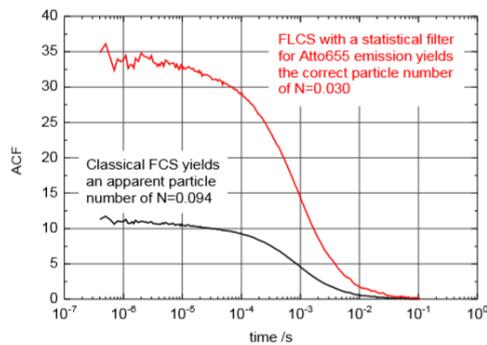
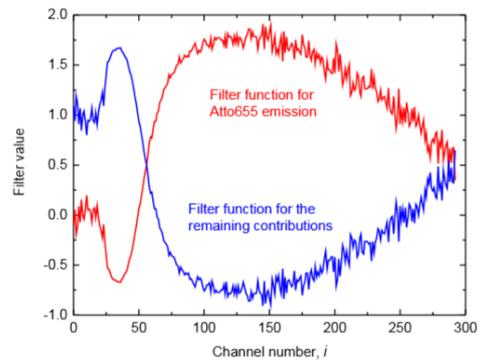
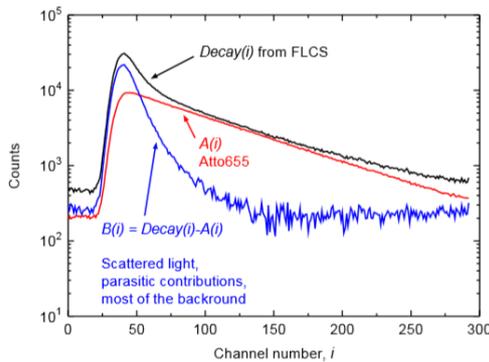


Fig. 4.: FLCS can be used to remove the influence of scattered light. The example shows results from measurements with Atto655.

Ref: PicoQuant Application Note, FLCS – Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy

Diffusion coefficient D given by

$$D = \frac{RT}{6\pi\eta r N_A}$$

Universal gas constant R, the temperature T, the particle radius r, viscosity η , Avogadro constant N_A