

FluorCam チュートリアル

ここでは FluorCam を使った、標準的なクロロフィル蛍光の測定手順を説明します。

1. プロトコル作成

サンプルの用意ができたなら、FluorCam のプログラムを起動します。Wizard の画面の中央のグラフ **Quenching Analysis** を選択して **OK** を押します。

設定項目について

・ Global Parameters

Sensitivity 実験全体を通じてのカメラの感度

Electronic Shutter 実験全体を通じてのカメラのシャッタースピード

* FluorCam は蛍光測定の感度を **Sensitivity** と **El. Shutter** の組み合わせで設定します。

Visual Frame 測定後、分析を行う範囲を決定する際に使うイメージを決定します。2つ以上にチェックをいれるとエラーがでます。

・ Fo Measurement (“dark” Level)

Fo Measurement Duration Fo を測定する時間

Every n-th frame イメージを保存する間隔の設定。FluorCam は1秒に最高25枚のイメージ(40ミリ秒ごとに1枚)を撮影することができます。ここではそのうち実際に、何枚目ごとのイメージを保存するかを決定します。例えば、「1」を入れた場合、1枚ごと(1秒間に25枚)に保存されます。また、「25」を入れた場合、25枚ごと(1秒間に1枚)にイメージが保存されていきます。

Average Fo Fo の測定期間中の全てのイメージを平均化

・ Fm Measurement (“dark” Level)

Pulse Duration 飽和光の時間

Pulse Intensity 飽和光の強度

Average Fm 飽和光照射中の全てのイメージを平均化

Pulse Fluorescence Subtraction バックグラウンドでクロロフィル蛍光に重なる光が無視できないほど強いときに使います。測定光を用いて撮ったイメージから測定光なしのイメージを引いたものを保存していきます。1つのイメージの記録に2回の撮影が必要なため、**Every n-th frame** の値は2以上に設定しなければなりません。

・ Dark relaxation after “dark” level Fm measurement

Dark pause after Fm measurement Fm を測定した後、Kautsky induction の測定を開始するまでの時間

Every n-th frame Kautsky induction 間のイメージの保存間隔

・ Kautsky induction

Actinic light exposure 照射光の照射時間

Actinic light intensity 照射光の強度

Every n-th frame Kautsky induction 間のイメージの保存間隔

- Fm measurements during Kautsky induction

First pulse after the actinic light trigger 照射光の照射開始何秒後に飽和光を開始するか

Pulse period during the actinic exposure Kautsky induction 間の飽和光の照射間隔

Average Fm Kautsky induction 間の飽和光照射中の全てのイメージの平均化

Pulse fluorescence subtraction 上記に同じ

- Dark relaxation after Kautsky induction

Relaxation interval Kautsky induction 終了後のイメージ保存期間

Every n-th frame 上記に同じ

以上のパラメータを設定して **OK** をクリックします。

2. カメラ等の初期設定

まず、カメラの **Sensitivity** を最高に、**Electronic Shutter** を最低 (1/100000s) に設定し、**Flashes** にチェックをいれます。これでサンプルのイメージを画面で確認しながら、カメラのピントやズームを調節します。サンプルのイメージ像が明るすぎたり、暗すぎたりする場合は **Sensitivity** や **Electronic Shutter** を使って適切な明るさになるよう調節します。

サンプルの位置を固定できたら、サンプルのイメージ像がなるべく暗く表示されるように **Sensitivity** や **Electronic Shutter** を調節します。

3. 測定開始

以上の設定ができれば、**Start Capture** アイコン  をクリックして測定を開始します。

4. 分析

測定が終了すると **Analysis Window** が開き、サンプルのイメージが表示されます。Pixel interval の **Low** のバーを下げて、分析をしたい範囲 (赤で表示される箇所) を選択し、**Start Analysis** をクリックします。

もし、違った箇所を同時に分析したい場合は、**Identification Type** の **Manual** を選択して、サンプルイメージ上で範囲を選択した後に、Pixel interval の **Low** バーを下げて、分析したい範囲を選択して、**Start Analysis** をクリックします。

5. 結果表示

分析が終了すると、選択した範囲のクロロフィル蛍光 (選択範囲の平均) のグラフと3つのイメージが表示されます。

6. イメージを用いたパラメータの表示

3つのイメージはいろいろなパラメータを2次的に表示 (比較) するために使います。ここでは、その例として **Fv/Fm** の表示方法を説明します。

まず、**Operand A** 上の適当な箇所をクリックします。**Parameter** を **F1-F2** にチェックを入れます。**Operand A** の **First** を **max_fl_dark** に、**Second** を **min_fl_dark** に変えます。

次に、Operand B 上をクリックします。ここでは Parameter は F1 のままにしておきます。

Operand B の First を max_fl_dark にかえます。

Operand Result 上をクリックします。Parameter は F1/F2 を選択します。

以上で、Operand Result に Fv/Fm のイメージが表示されます。

クロロフィル蛍光ではさまざまなパラメータがありますが、それらはこの Operand ウィンドウを使って自由に計算することができます。

7. パラメータ

Fv/Fm や NPQ など主要なパラメータは自動で計算され、Numeric ウィンドウにて確認することができます。

8. グラフの印刷

Experiment-Print より、印刷のスタイルを選びます。pok を選択すると、グラフとプロトコルを印刷し、Results を選択すると、3つのイメージとグラフを印刷します。

9. データ出力

キネティックデータ出力 Experiment-Export Kinetics よりデータを保存します。

パラメータ出力 Experiment-Export Numeric よりデータを保存します。

10. 結果画像保存

Results ウィンドウを表示させ、Experiment-Copy Image to Clipboard を選択します。

Select Image より保存したい Operand を選択し、Save to file をクリックしてイメージを保存します。