

LSM 980 Basic Operation



Carl Zeiss Microscope
Application Specialist
Dr. Lu Xi & Yan Runchuan

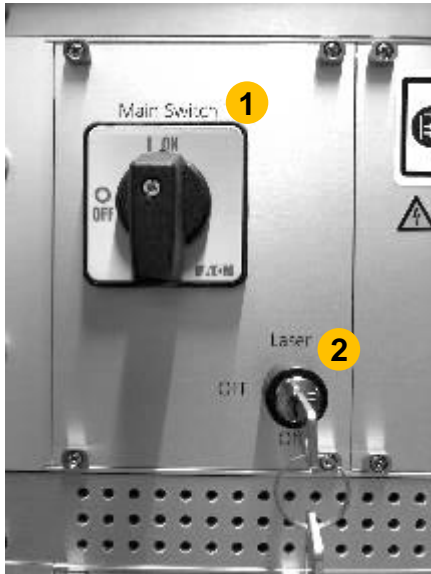
- 1 Startup and Shutdown of the System
- 2 Acquiring Multi-Channel images
- 3 Z-stack image
- 4 Time Series image
- 5 Tile Scan
- 6 Airyscan Imaging

- 1** Startup and Shutdown of the System
- 2** Acquiring Multi-Channel images
- 3** Z-stack image
- 4** Time Series image
- 5** Tile Scan
- 6** Airyscan Imaging

Startup and Shutdown of the System



Startup of the System



开机顺序:

- 1、Main Switch
- 2、Laser (转动钥匙)
- 3、Components
- 4、计算机开机

Startup and Shutdown of the System

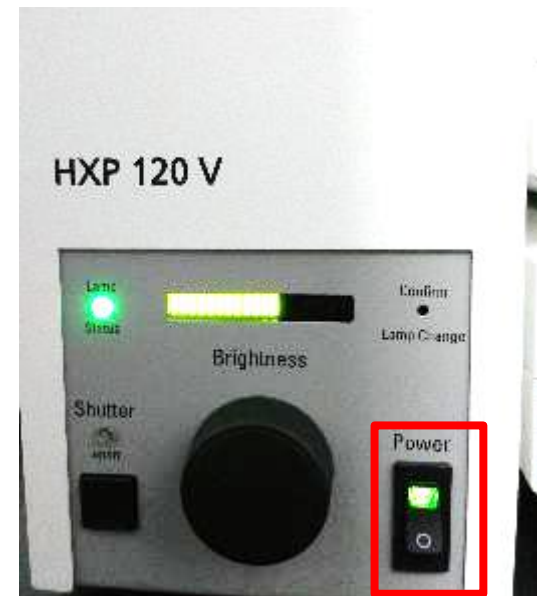


Startup of the System

5、打开金属卤化物灯 “HXP 120” 或 “X-cite 120” （注意：30分钟之内不要反复开关！！）



**30分钟之内
不要反复开关**



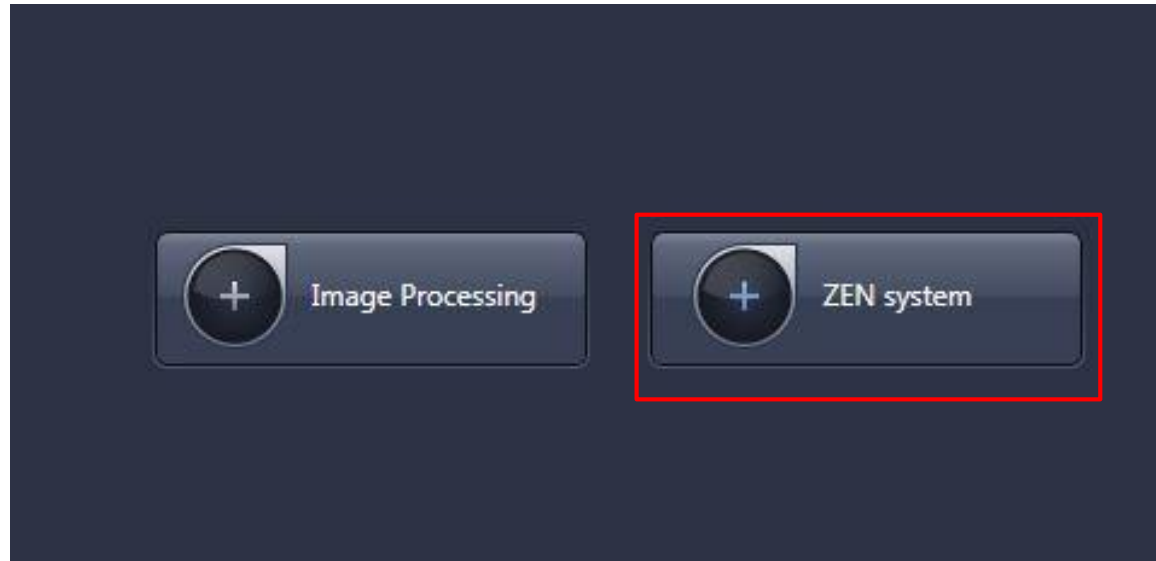
Startup and Shutdown of the System



Startup of the System



6、启动ZEN软件（Blue），选择“ZEN system”；



- 1 Startup and Shutdown of the System
- 2 Acquiring Multi-Channel images
- 3 Z-stack image
- 4 Time Series image
- 5 Tile Scan
- 6 Airyscan Imaging

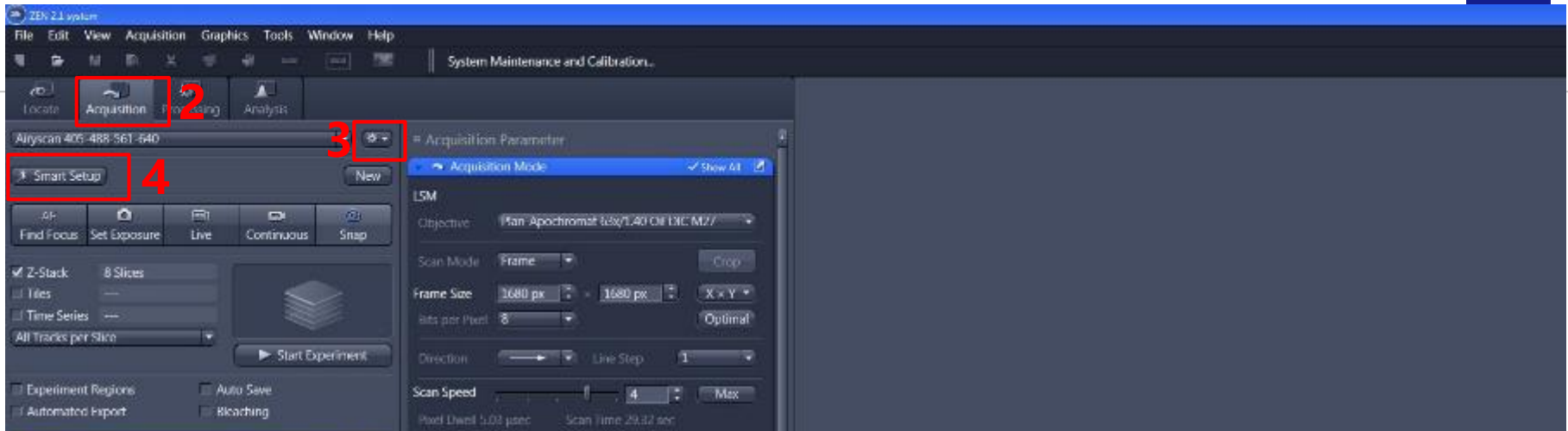
Acquiring Multi-Channel images



The screenshot shows the ZEISS software interface. The 'Locate' tab is selected and highlighted with a red box. Below it, the 'Favorites' list is visible, with 'DF', 'DAPI', 'GFP', 'DsRed', and 'All channels...' highlighted by a red box. The 'Microscope Control' panel on the left shows a vertical flow of controls: 21V, IL LED, Closed, a slide control, a 63x/1.4 objective lens, a 100% zoom, a 100% zoom, a 100% R zoom, a 63x/1.4 objective lens, and a 1x zoom. The 'Microscope.. IL' panel at the bottom shows a small image of the sample.

1、在“Locate”界面下选择快捷键，在镜下观察需要拍摄的样品区域，把需要拍摄的区域放在视野中央。

Acquiring Multi-Channel images



2、进入 “Acquisition” 界面；

3、选择之前保存好的光路设置→ “channel” 和 “Acquisition mode” 设置

4、或者新建光路设置→ “Smart Setup”



5、“smart setup” 中选择染料名称，
 并选择拍摄方式后，点击“OK”



三种拍摄方式：

A、Fastest

拍摄速度最快，
 发射波长接近的荧光染料间存在串色现象；

B、Best signal

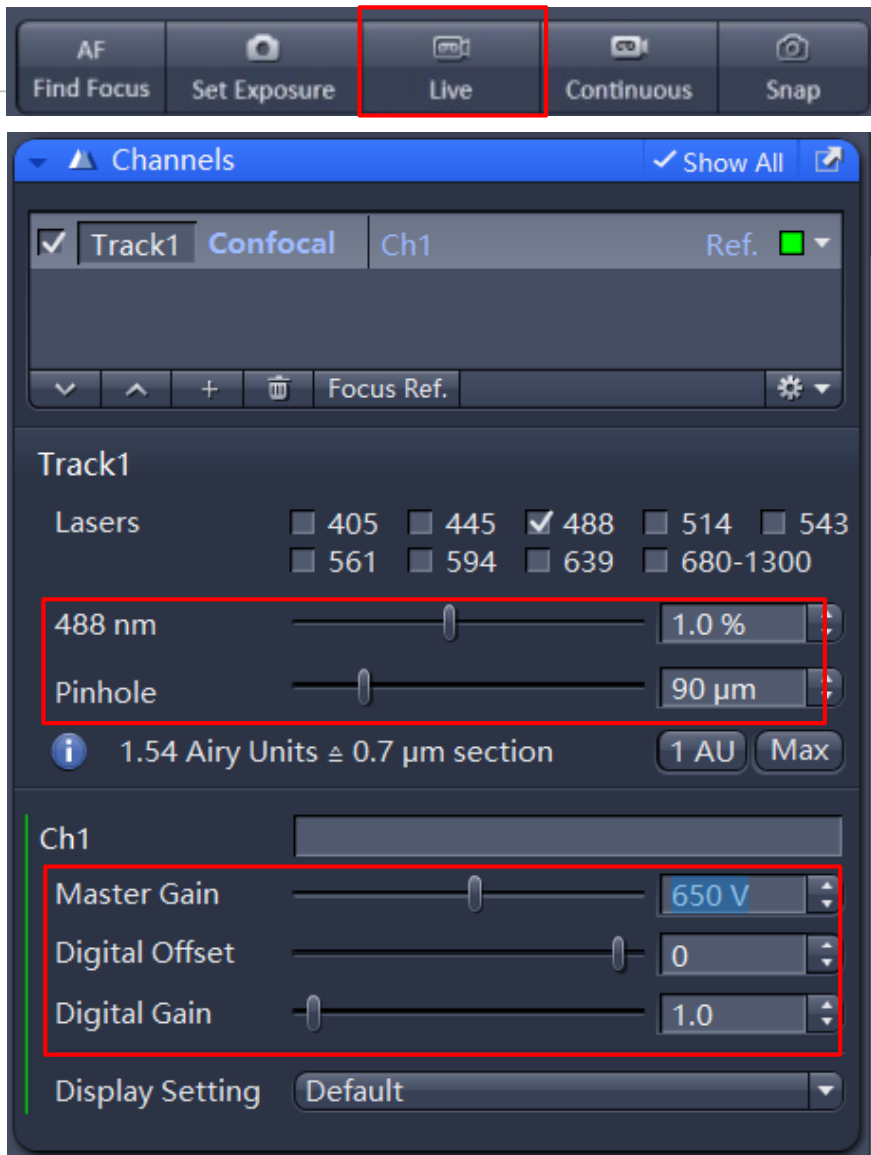
拍摄速度最慢；
 基本避免了发射荧光的串色；

C、Smartest (Line)

结合上述两者优势，减少串色的同时拍摄速度较快，但是光路中硬件设置不能改变。

固定样本推荐使用Best signal、变化较快的样本推荐使用Smartest或者Faster

Channels

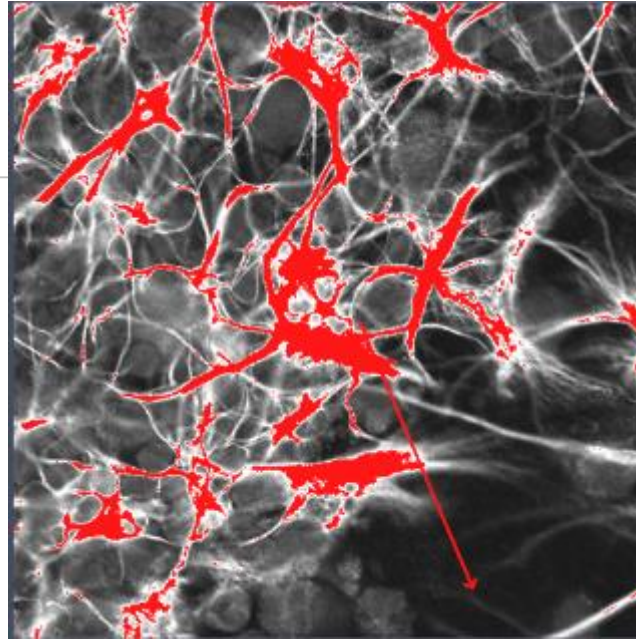
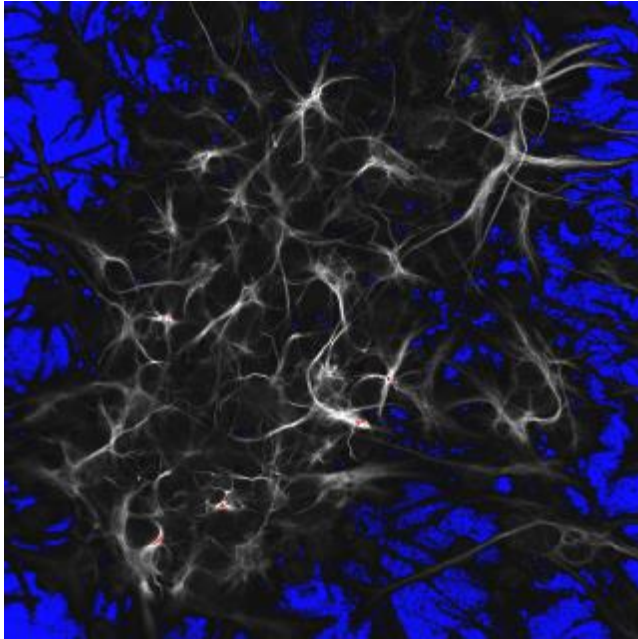


6、在“live”下设置Channels中的激光强度“Laser”，针孔大小

“Pinhole”，检测器“Gain”值，以及“digital gain”或“digital offset”；每个track单独设置，选中该track(选中track高亮)；

A、“Pinhole”一般设置为1 AU，增大Pinhole可以提高图像亮度，但会增加非焦面信息；减少Pinhole有利于提升分辨率，但是会减少图像亮度；

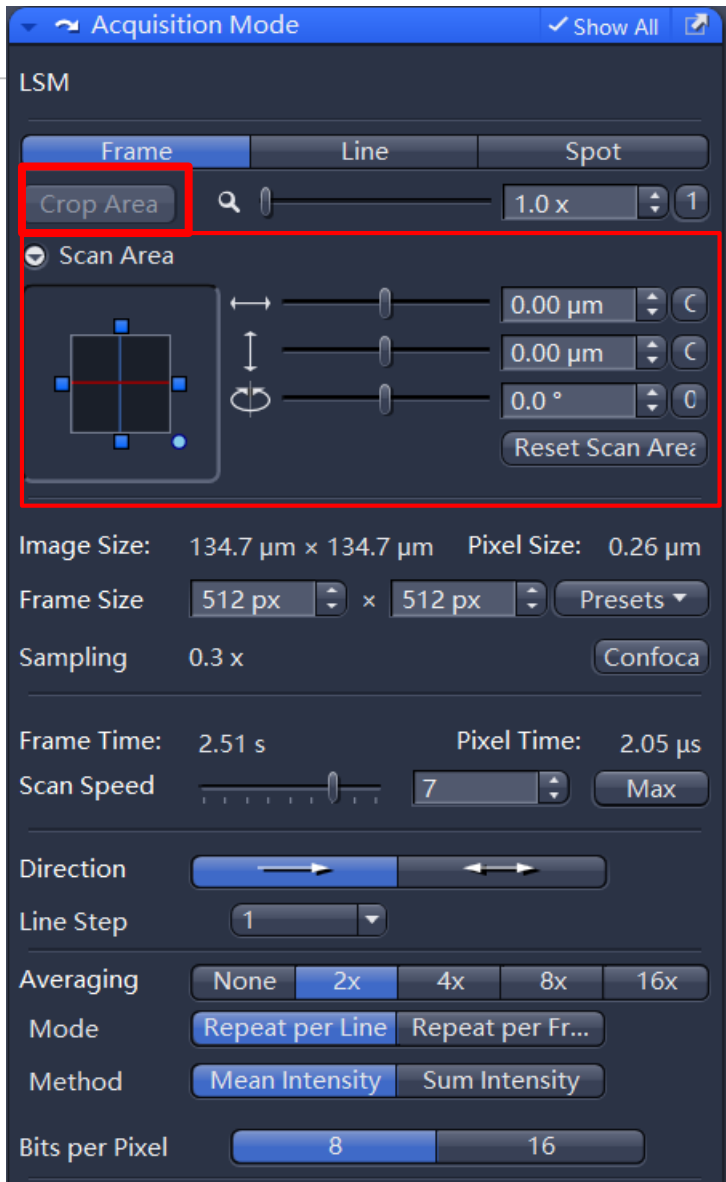
B、“Gain”和“Digital Gain”增加可以增加图像亮度，但是也会提高背景噪音。



设置原则保证图像不要过曝，尽量
减少背景噪音：

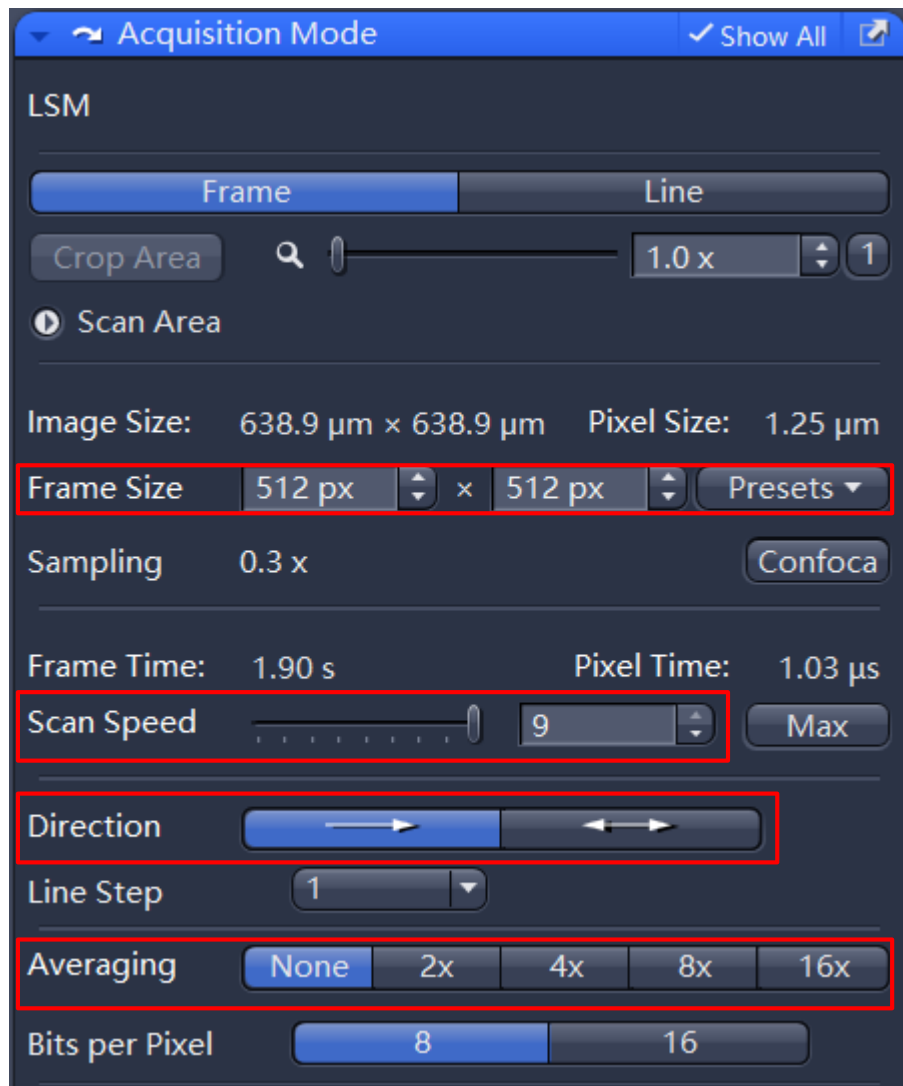
在live下选择“range indicator”可
以显示出曝光程度；

Acquisition Mode



- 7、在Acquisition Mode下主要设置如下参数:
- A、通过scan area选择扫描区域或通过“Crop Area” 选择扫描区域;

Acquisition Mode



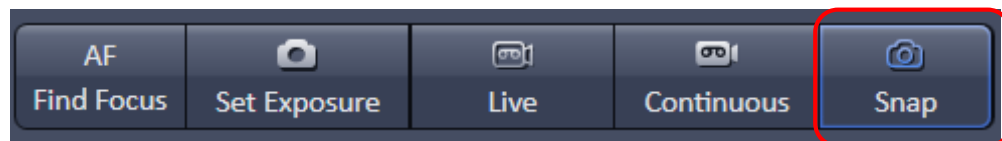
B、设置Scan Speed: 扫描速度越慢, 信噪比越好, 但光漂白越多;

C、Averaging: 增加averaging次数可以减少噪音, 但会增加扫描时间;

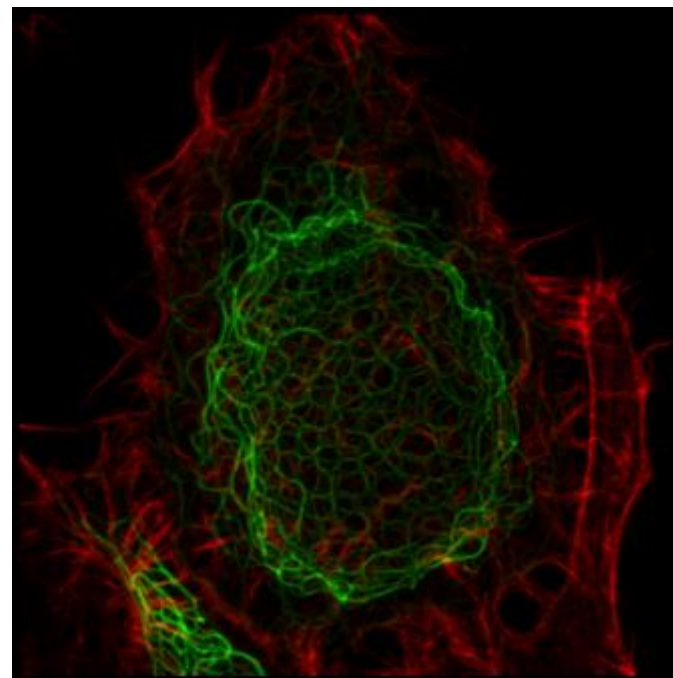
D、Direction: 双向扫描可以减少扫描时间;

E、Frame Size: 一般选择512×512, 图像越大, 分辨率提高, 但扫描时间越长

Acquiring Multi-Channel images



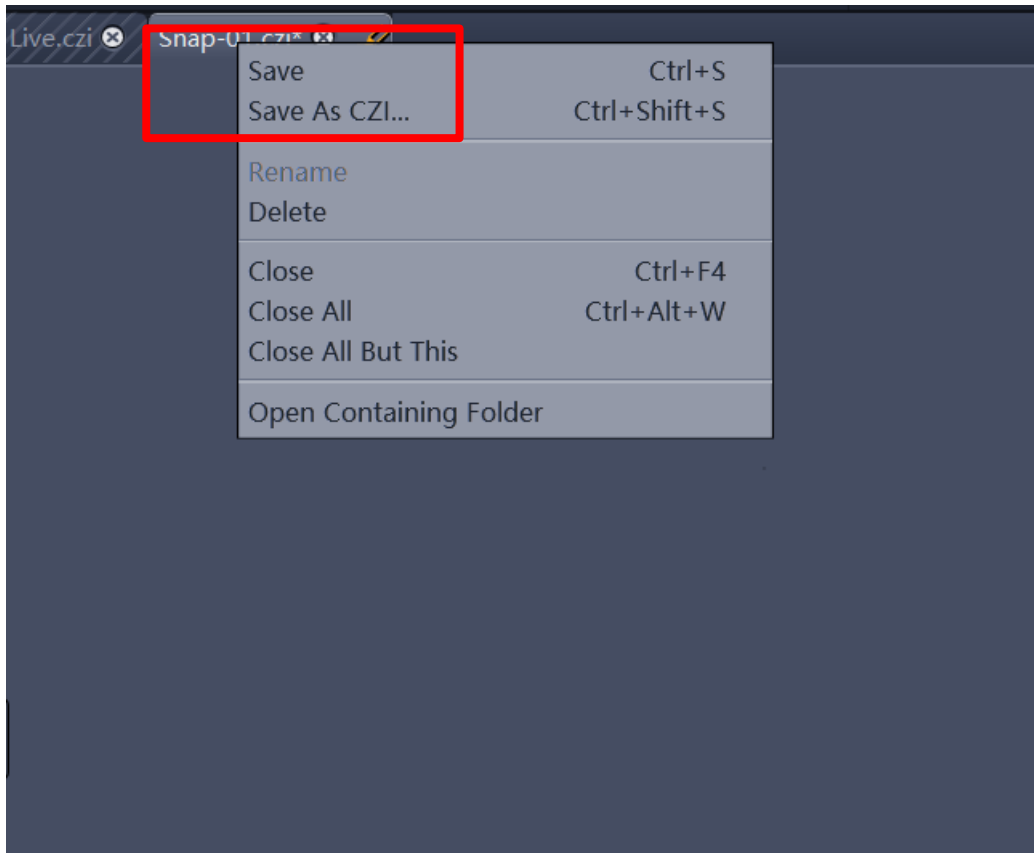
8、选择需要成像的track，单击“Snap”；获得一张多通道图像。



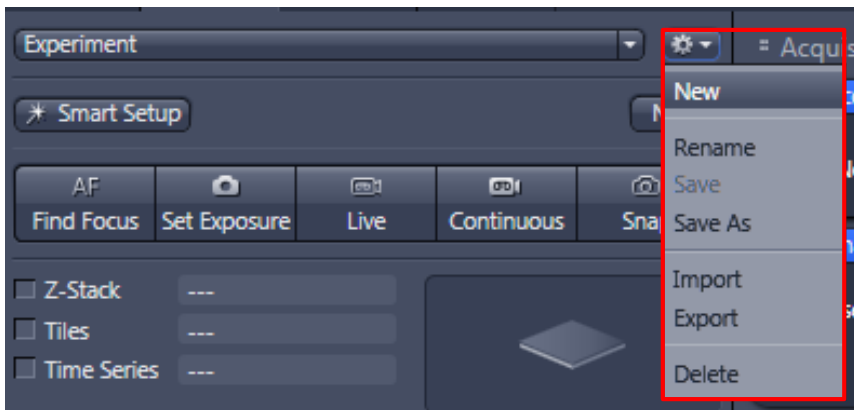
Acquiring Multi-Channel images



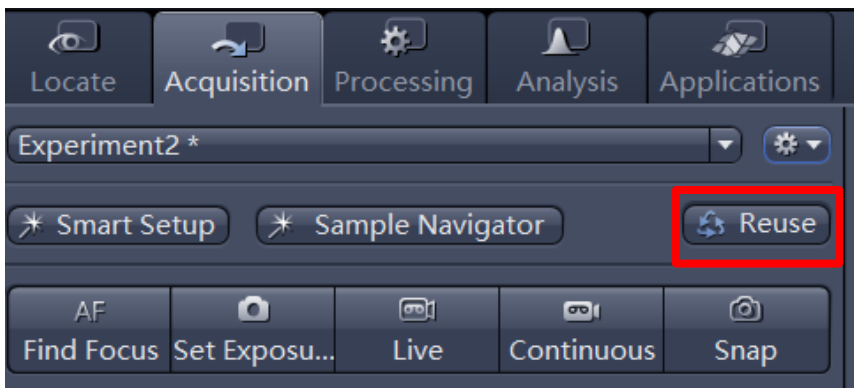
8、右击图像标签，图像保存为“ czi” 格式。



Experiment Manager and Reuse



可以通过Experiment Manager来保存拍摄参数，或打开已经保存的图片（czi格式），通过“Reuse”来调用上次拍摄参数设置

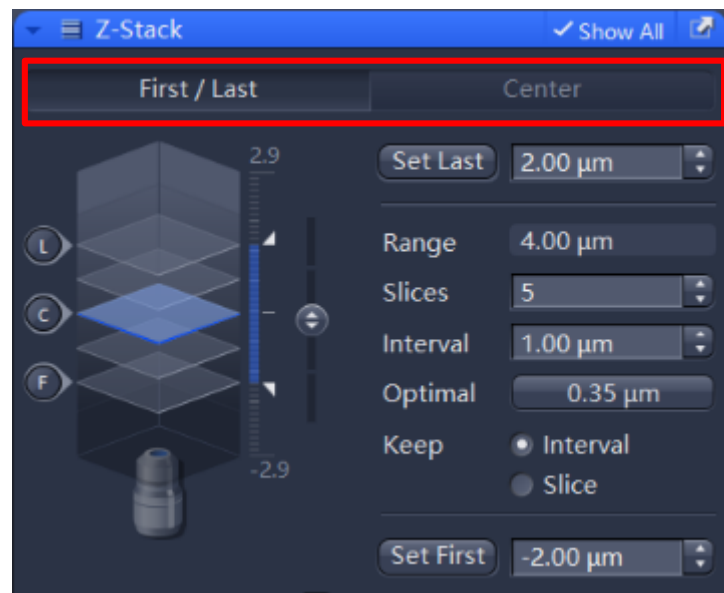


- 1 Startup and Shutdown of the System
- 2 Acquiring Multi-Channel images
- 3 Z-stack image
- 4 Time Series image
- 5 Tile Scan
- 6 Airyscan Imaging

Z-stack image



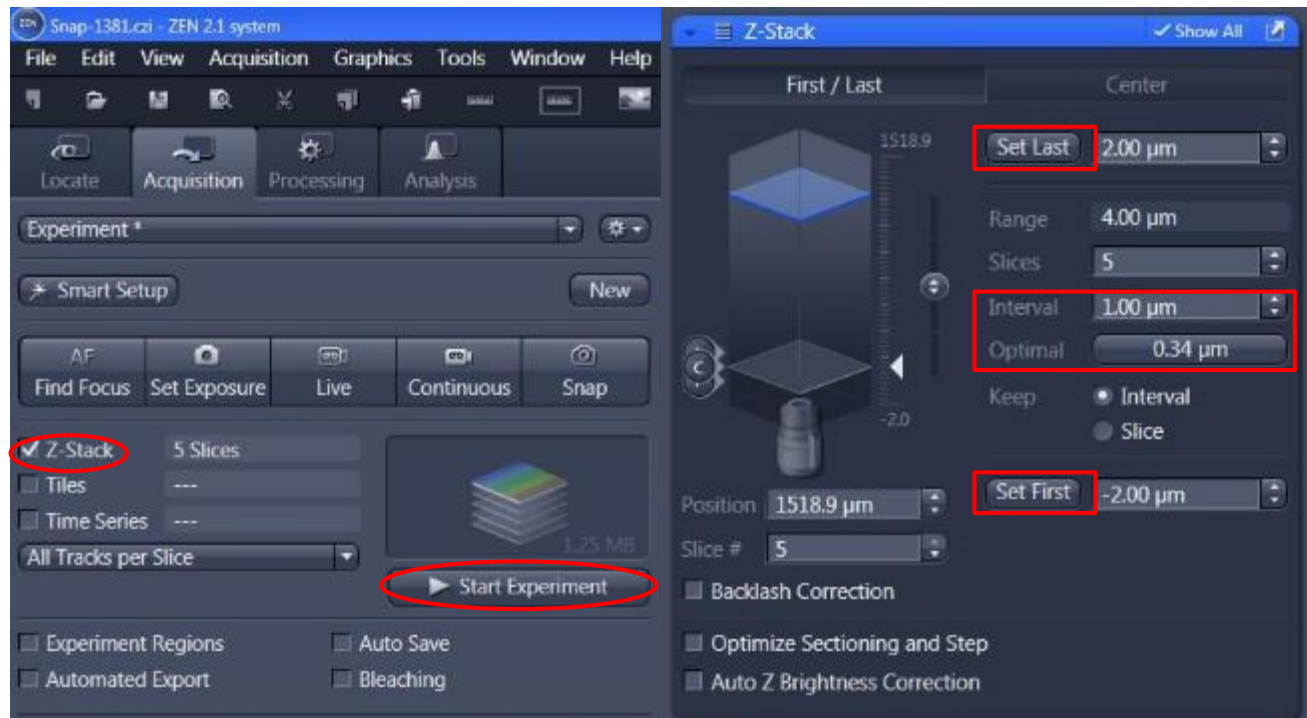
Z-Stack既3D成像，两种模式，主要使用“**First/Last**”模式，通过上下边界决定3D成像的Z轴范围；另一种是“**Center**”模式，主要通过设定Z轴的中间位置和3D厚度来决定成像范围。



Z-stack image



First/Last

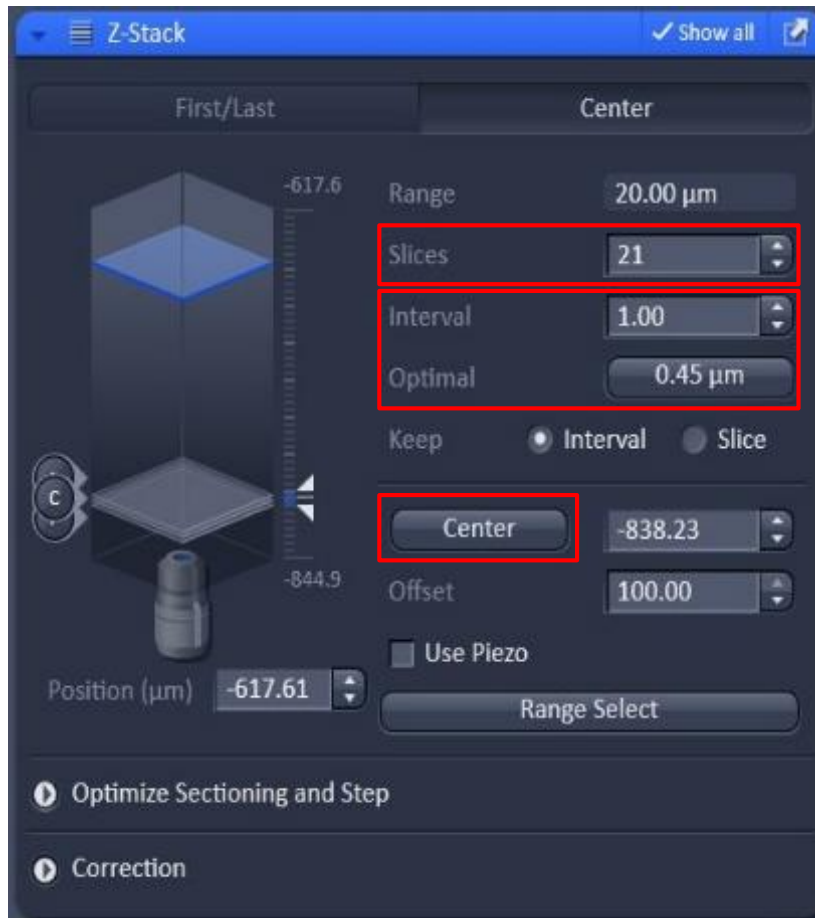


- 1、选择Z-stack;
- 2、在“First/Last”模式下，选择z轴扫描范围：在预览状态下，设置起始“Set First”和结束“Set Last”位置，单击“Optimal”后的“*.**um”按钮来设置最佳间隔;
- 3、单击“Start Experiment”

Z-stack image



Center



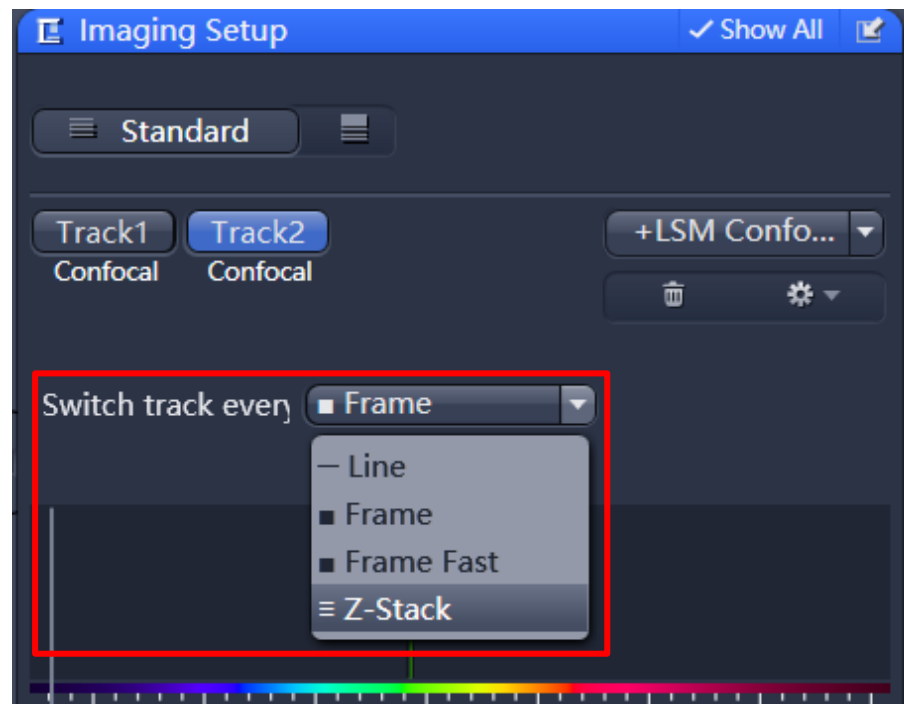
- 1、center模式下，live下选择成像的中间位置，单击“center”，然后设置需要层扫的层数 Slices，并单击“optimal”；
- 2、单击“Start Experiment”

Z-stack image



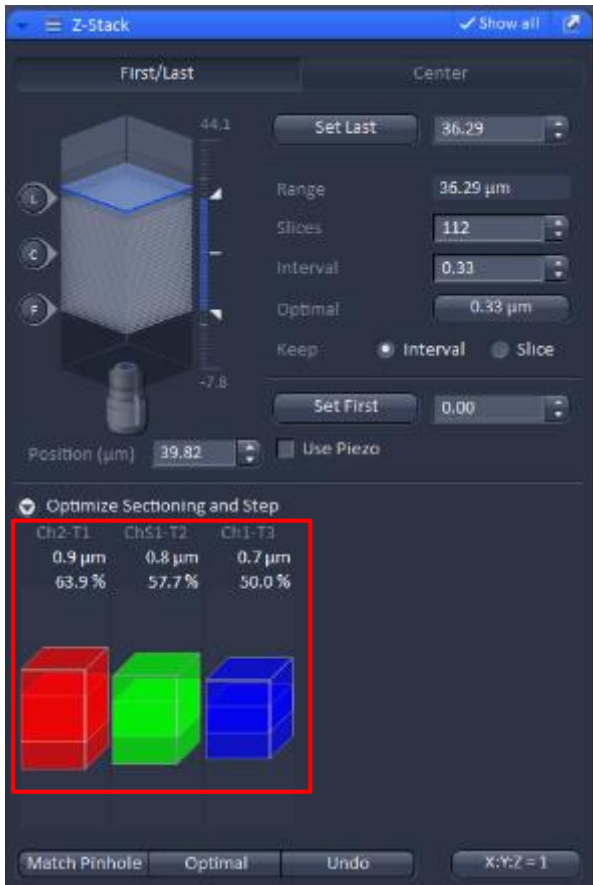
Multi-track Z-stack image

如果是使用Best signal建立多个track，在Z-Stack成像时，在光路中选择“Switch track every ‘Z-Stack’”能够显著提高成像速度，但是这个方法不适合快速变化的样品。



Z-stack image

Match Pinhole

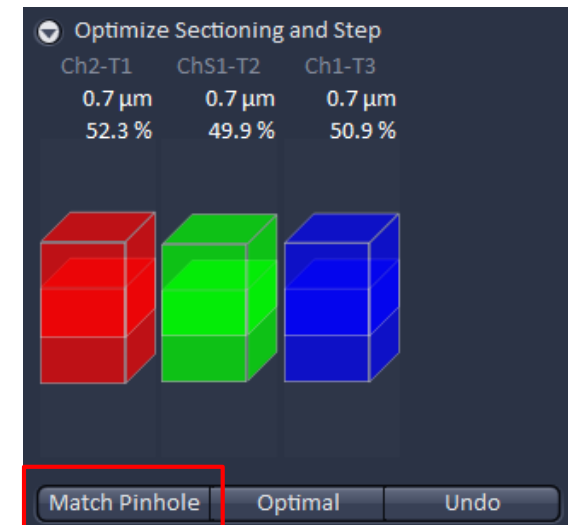


多通道荧光拍摄Z-stack需要考虑光切厚度不一致的问题：

1、可以通过点击“Match

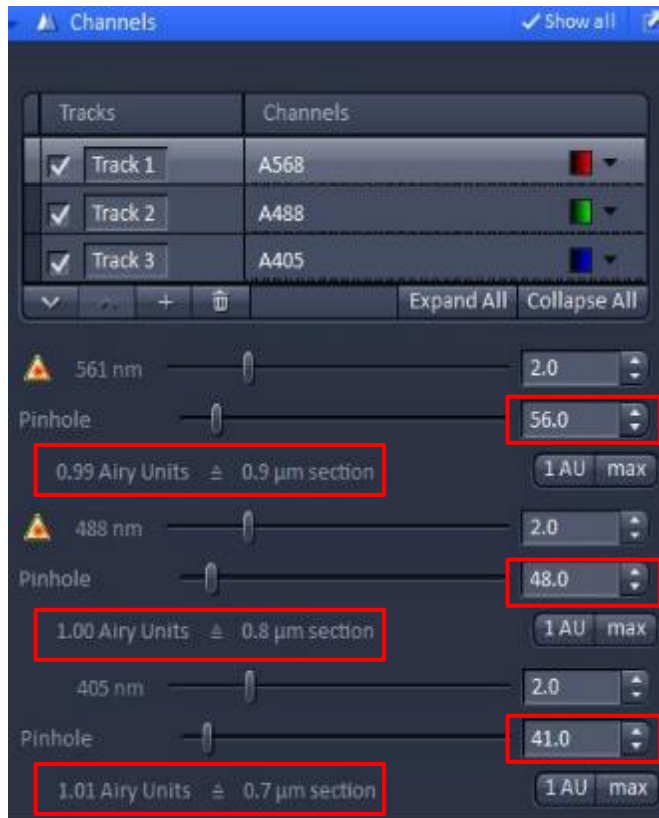
Pinhole”自动调节不同track的针孔使光切厚度相似；

*这种方法的缺点在于可能会使长波长的针孔过于小，不利于弱荧光成像。

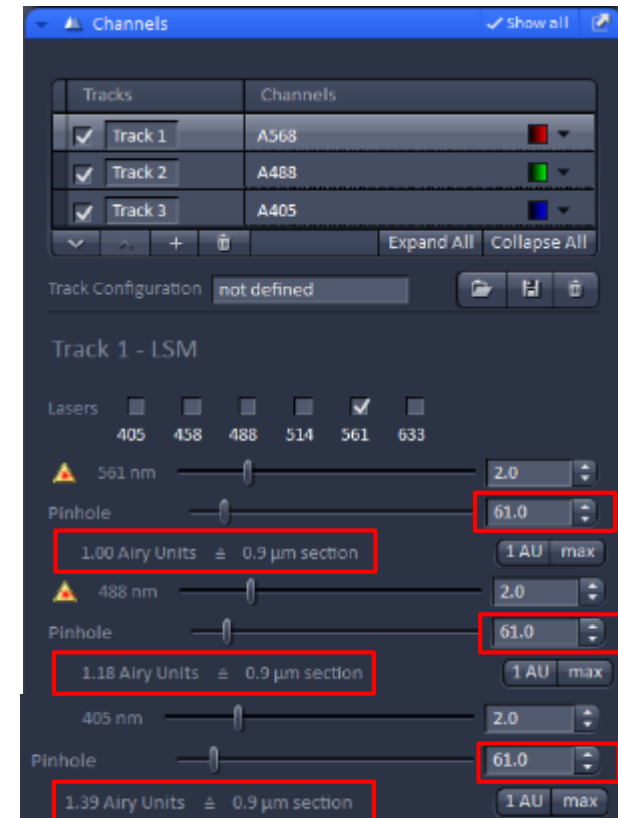


Z-stack image

Match Pinhole



2、通过手动调节针孔到一致，可以保证荧光强度的同时，保证光切厚度一致。

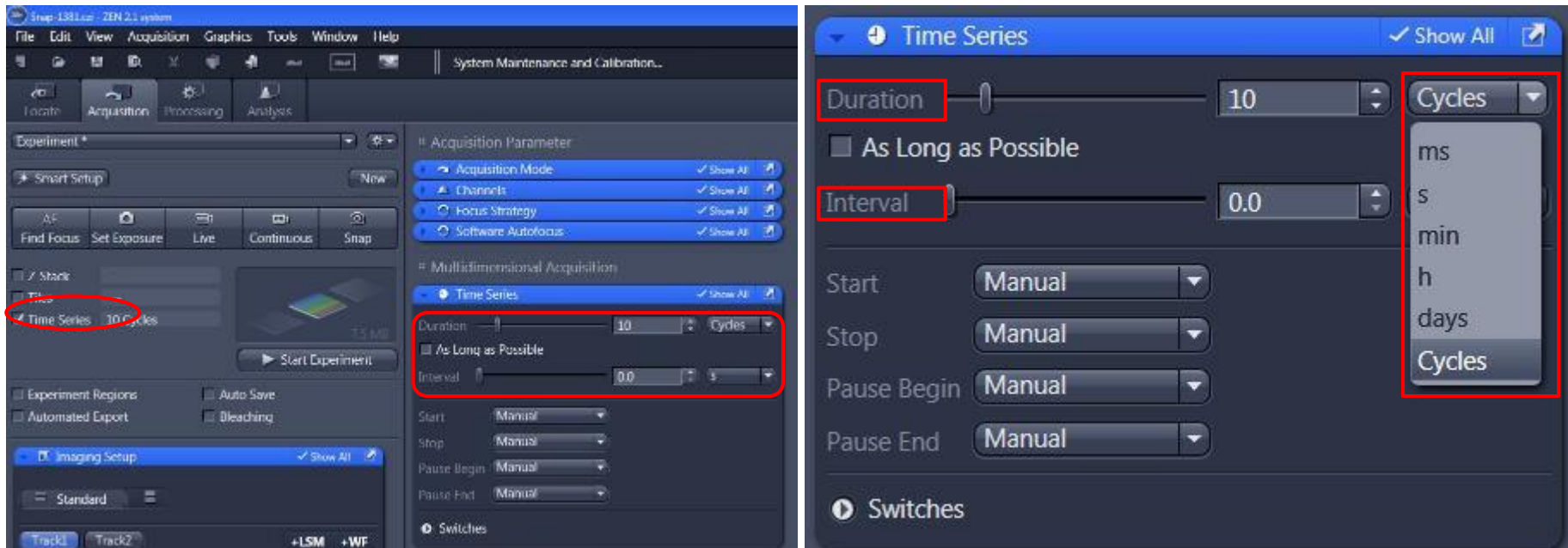


- 1 Startup and Shutdown of the System
- 2 Acquiring Multi-Channel images
- 3 Z-stack image
- 4 Time Series image
- 5 Tile Scan
- 6 Airyscan Imaging

Time Series image



Single point Time series

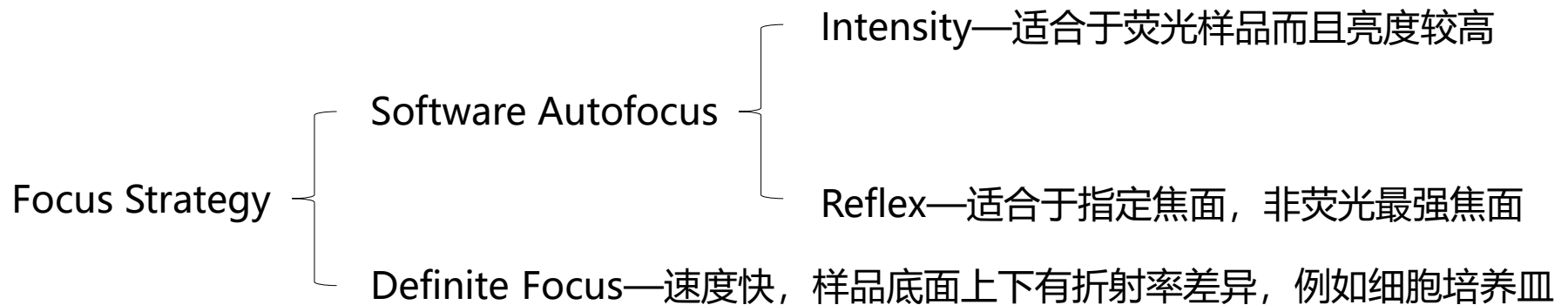
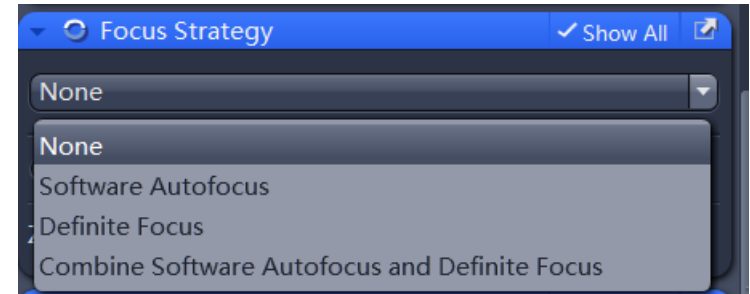


- 1、选择“Time Series”；
- 2、拍摄要持续的时间，如循环数cycles或者其他具体时间；
- 3、循环之间的间隔Interval；
interval：两次循环开始时间的间隔，因此interval包含了上一个循环的拍摄时间；
- 4、“Start Experiment”

Time Series image autofocus



由于长时间拍摄时间序列可能出现z轴漂移的问题，所以需要结合自动对焦来进行长时间的time series成像。自动对焦方法分两类，可以互相组合或者单独使用，下面简单介绍一下每种自动对焦的单独使用方法。



Time Series image autofocus

1

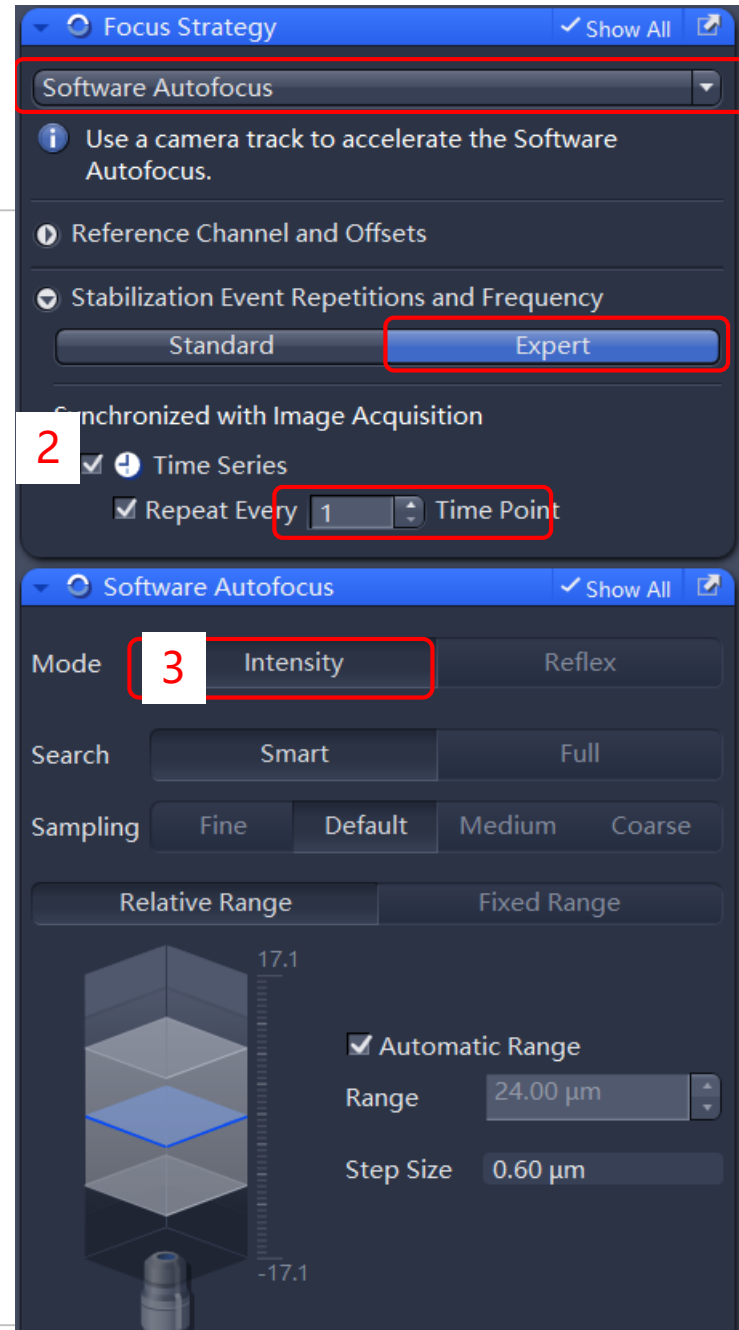
Software Autofocus Intensity

由于长时间拍摄时间序列可能出现z轴漂移的问题，所以需要结合自动对焦来：

- 1、选择“Software Autofocus”；
- 2、选择适合的自动对焦频率；
- 3、选择“Intensity”对焦模式；

*使用“Intensity”自动对焦会寻找检测范围内荧光最强的信号作为焦平面。

- 4、单击“Start Experiment”开始time series试验。



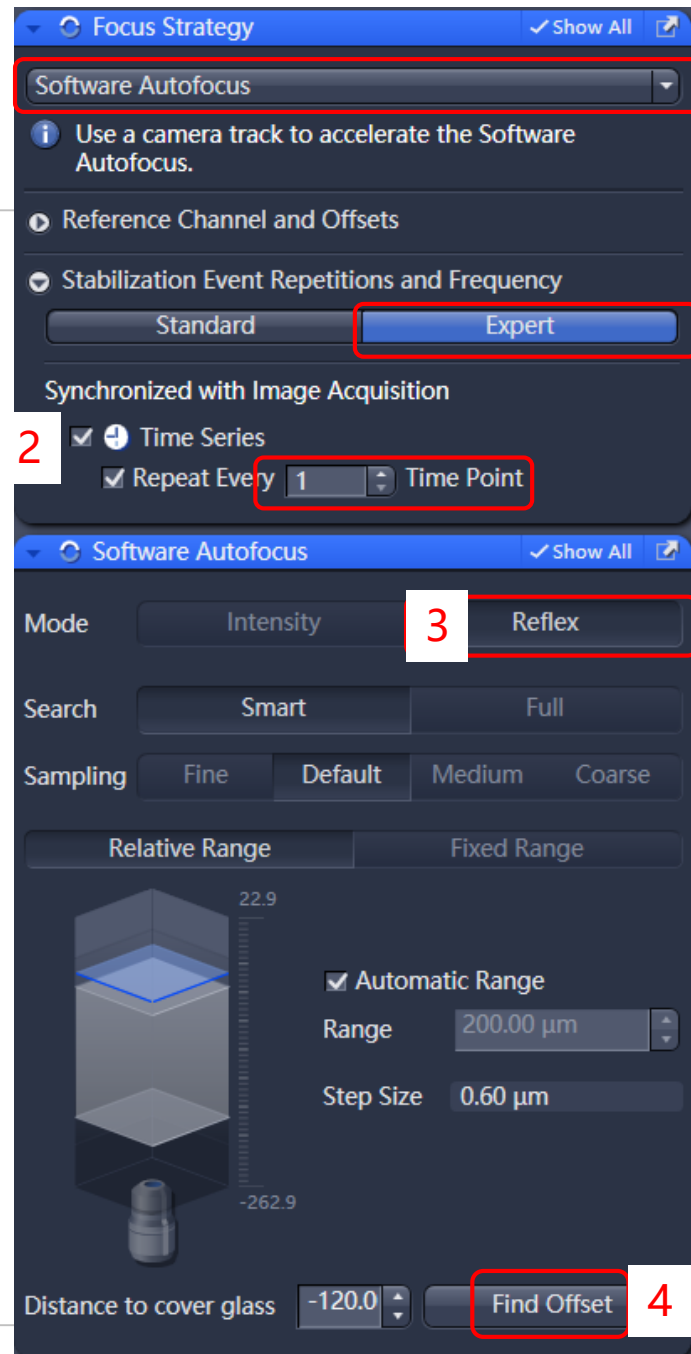
Time Series image autofocus

1

Software Autofocus Reflex

由于长时间拍摄时间序列可能出现z轴漂移的问题，所以需要结合自动对焦来：

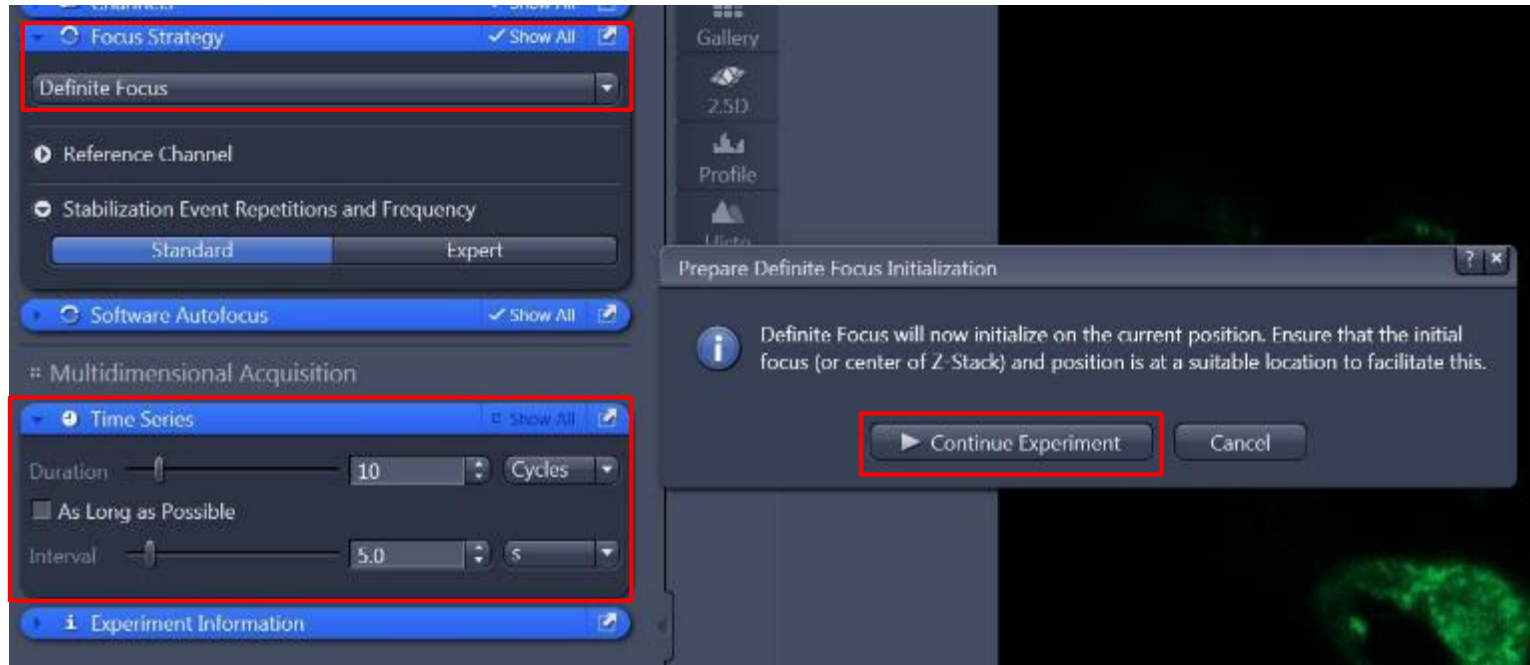
- 1、预览找到想保持的焦面位置后，选择“Software Autofocus”；
- 2、选择适合的自动对焦频率；
- 3、选择“Reflex”对焦模式；
- 4、单击“Find Offset”等待自动测量介质表面到样品的距离；
- 5、等待测量结束后，“Distance to cover glass”后的数据会更新。
- 6、单击“Start Experiment”开始time series试验。



Time Series image autofocus



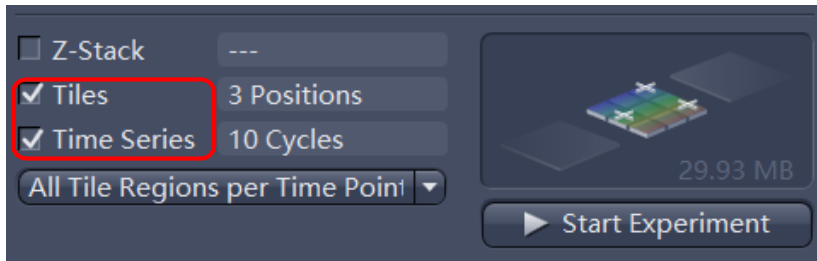
Definite Focus



使用Definite Focus来稳定焦距：

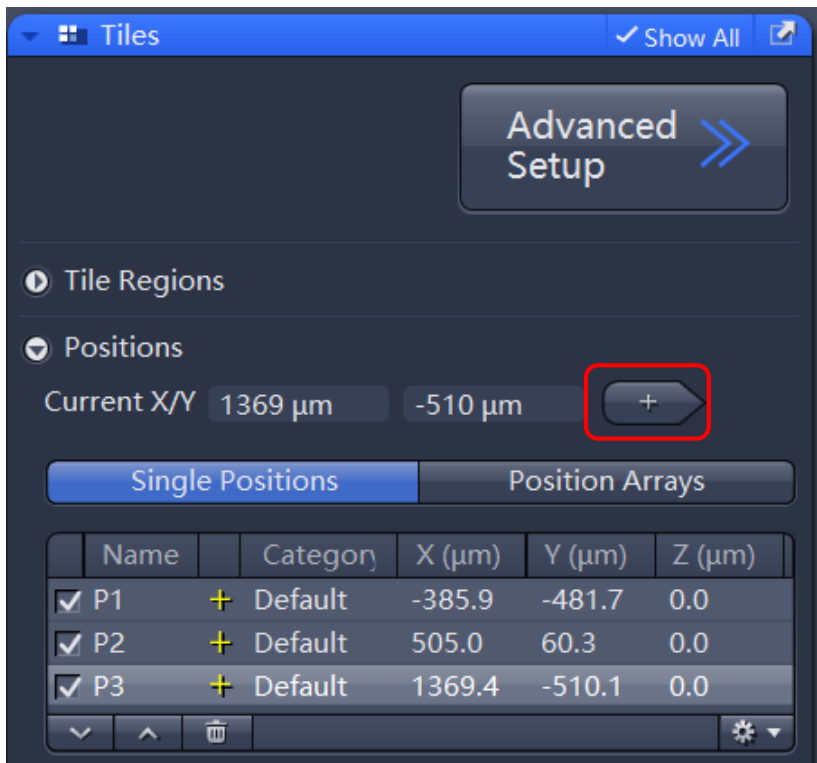
1. 预览下找到需要稳定的焦面位置，
2. 在“Focus Strategy”里选择“Definite Focus”，
3. 点击“Start Experiment”后选择“Continus Experiment”。

Time Series image with Multi-positions

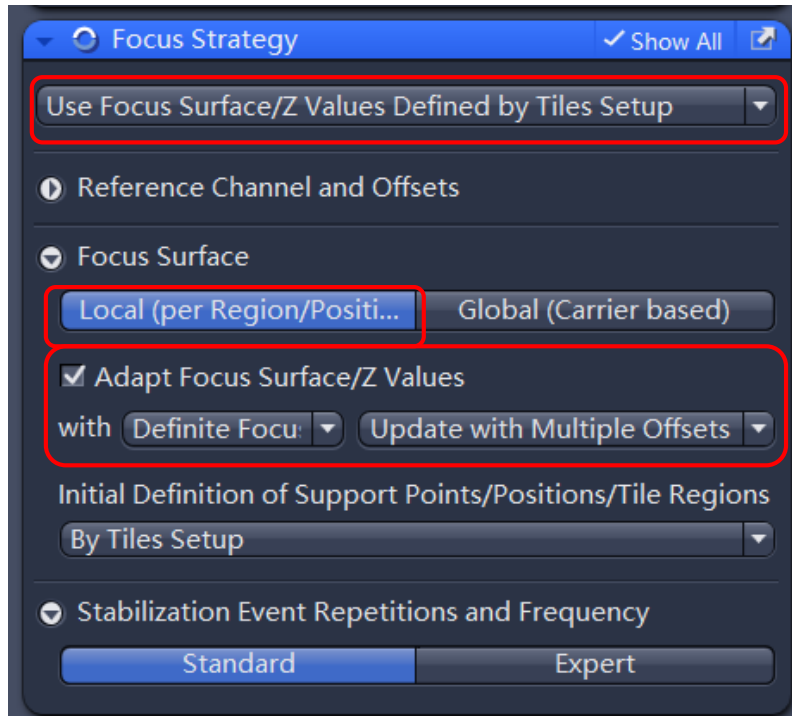


对多个位置进行时间采集时，可以获得更多的数据。需要结合“Time Series”和“Tiles”中的“Position”功能：

- 1、选择“Time Series”和“Tiles”；
- 2、在“Tiles”中点击“Positions”，通过预览移动载物台到感兴趣的点，点击“+”，把该位置保存在“Position”列表中；
- 3、时间序列如前所述设置；



Time Series image with Multi-positions



4、为保证长时间拍摄焦面稳定，按照左图设置
“Focus Strategy”

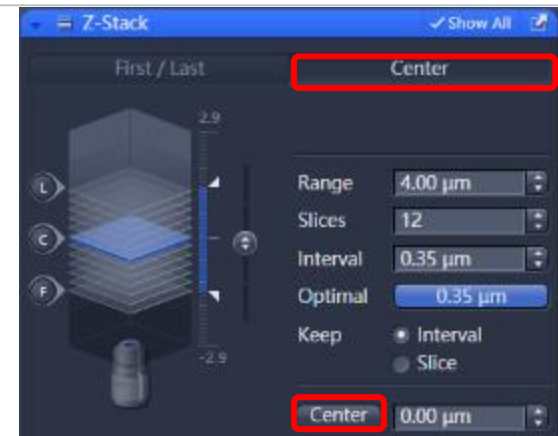
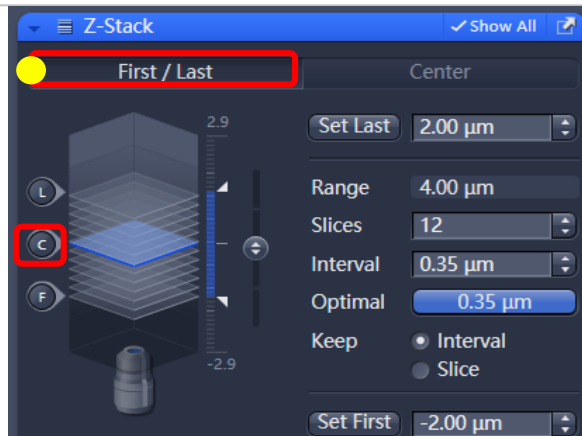
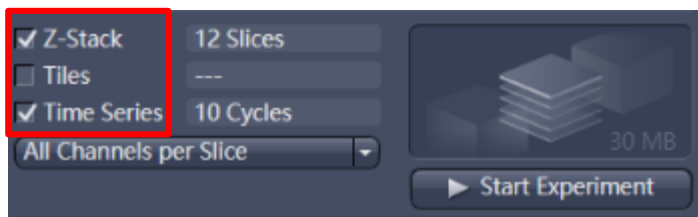
*需要具有Definite Focus 2

5、“Start Experiment”

4D Image



Time Series + Z stack



1. 选择 “Time Series” 和 “Z-Stack” ；
2. 选择z轴扫描方式
 - a. 在 “First/Last” 模式下，选择z轴扫描范围：在预览状态下，设置起始 “Set First” 和结束 “Set Last” 位置，单击 “Optimal” 设置最佳间隔；
 - b. 单击左侧模拟图中 “C” 位置，此处表示z轴最中心位置，单击 “Center” 切换到 “Center” 模式，单击下方的按钮

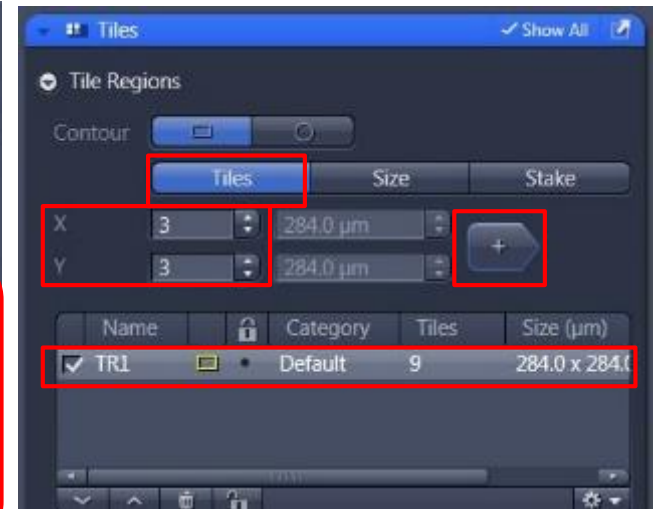
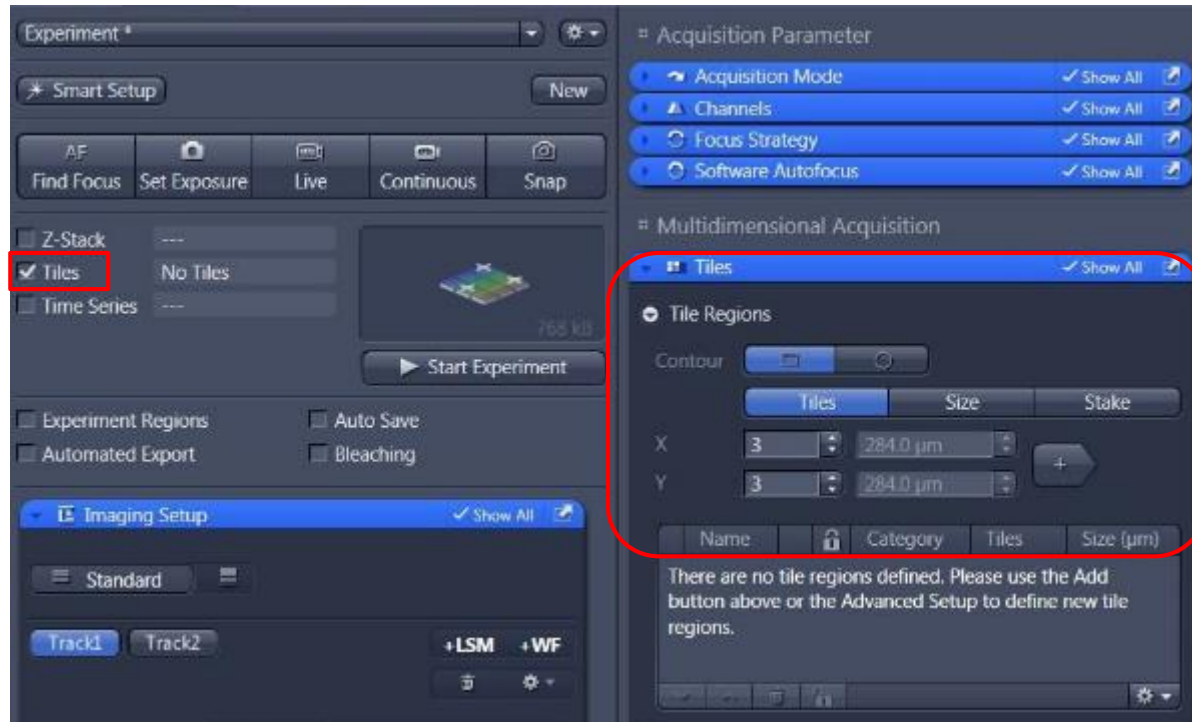
3. “Center” 确定现在的位置是z-stack成像的中间位置，并按照 “Center” 模式开始拍摄。
4. 如果需要自动对焦，此时可选择software autofocus或Definite Focus，此时稳定的是z轴序列的center位置。
4. 单击 “Start Experiment”

- 1 Startup and Shutdown of the System
- 2 Acquiring Multi-Channel images
- 3 Z-stack image
- 4 Time Series image
- 5 Tile Scan
- 6 Airyscan Imaging

Tile Scan



Tiles



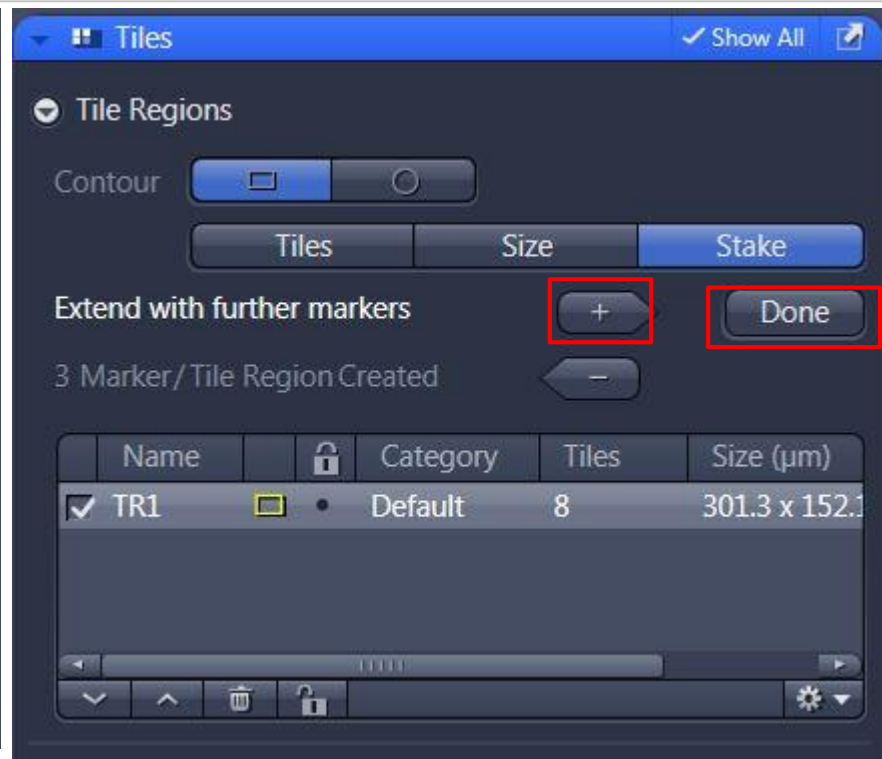
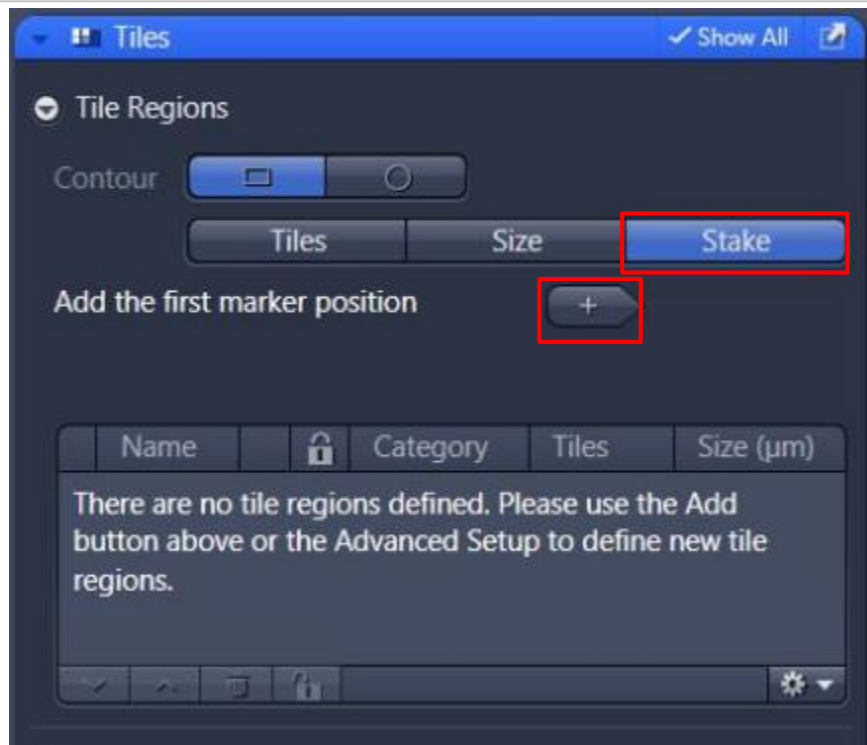
在“Tiles”模块下“Tiles”方法代表以现在视野为中心拍摄拼图，

- 1、选择“Tiles”下的“Tiles”方法；
- 2、“X” & “Y” 分别代表水平和垂直方向拼图范围；
- 3、点击“+”，将要拼图的范围添加到拼图区域中；
- 4、“Start Experiment”

Tile Scan



Stake

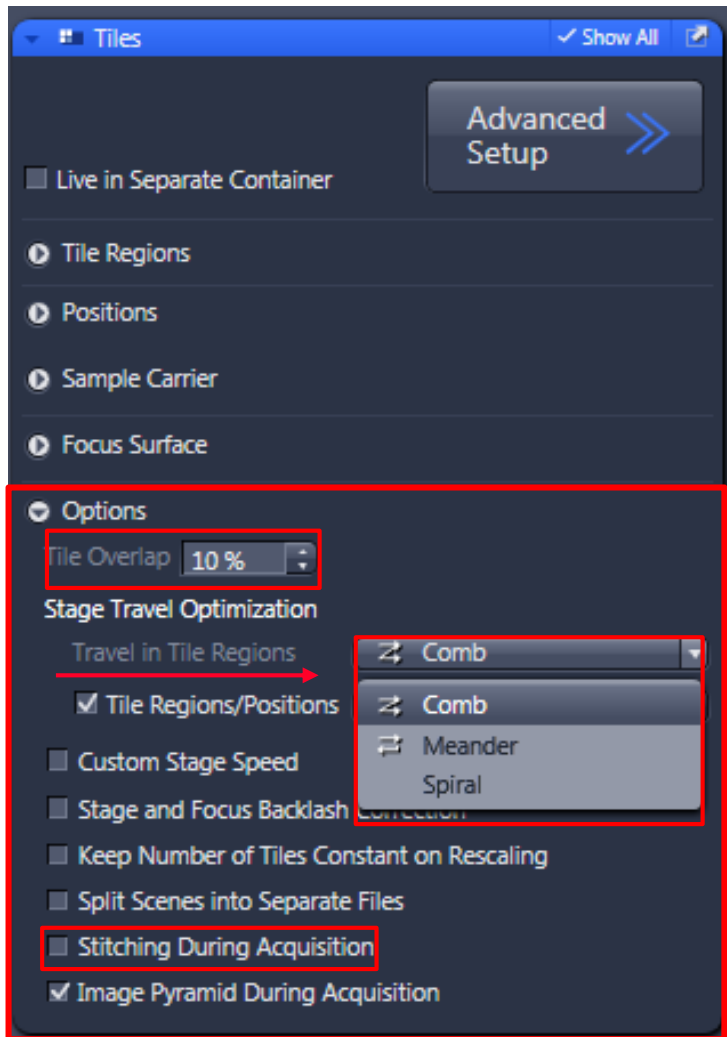


“Stake”方法能够通过定义拼图边缘自动计算拼图大小，完成拼图：

- 1、“Stake”下通过移动载物台到想拼接的样品边缘，单击“+”，添加边缘范围。所有边缘定义后，点击“Done”，软件自动定义拼图范围。
- 2、“Start Experiment”。

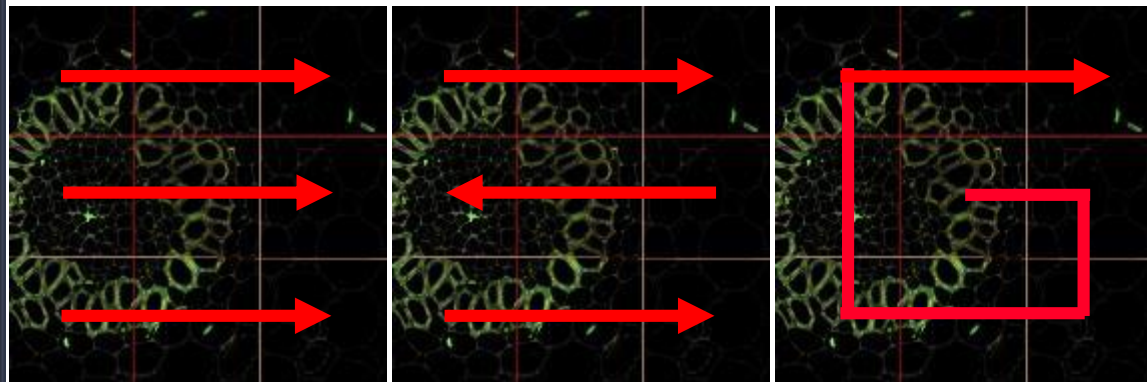
Tile Scan

Option



“Option” 中几个关键参数：

- 1、“Tile Overlap” 代表图片边缘互相重叠百分比，一般默认10%；
- 2、“Travel in Tile Regions” 代表拼图时的方向：
“Comb”：单方向拼图；“Meander”：双向拼图；
“Spiral”：螺旋形从中向外拼图。



Comb

Meander

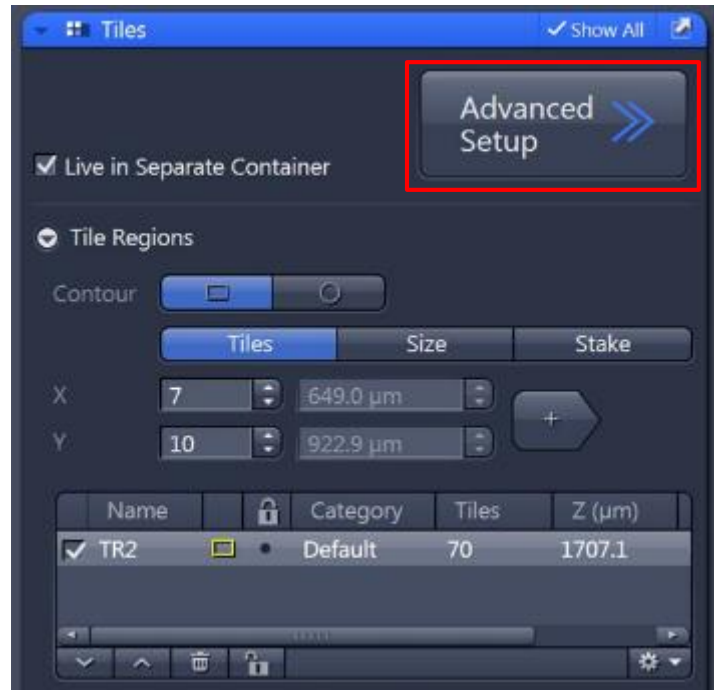
Spiral

- 3、“Stitching During Acquisition” 在拼图后自动拼接，消除拼图中的接缝。

Tile Scan



Advanced Setup

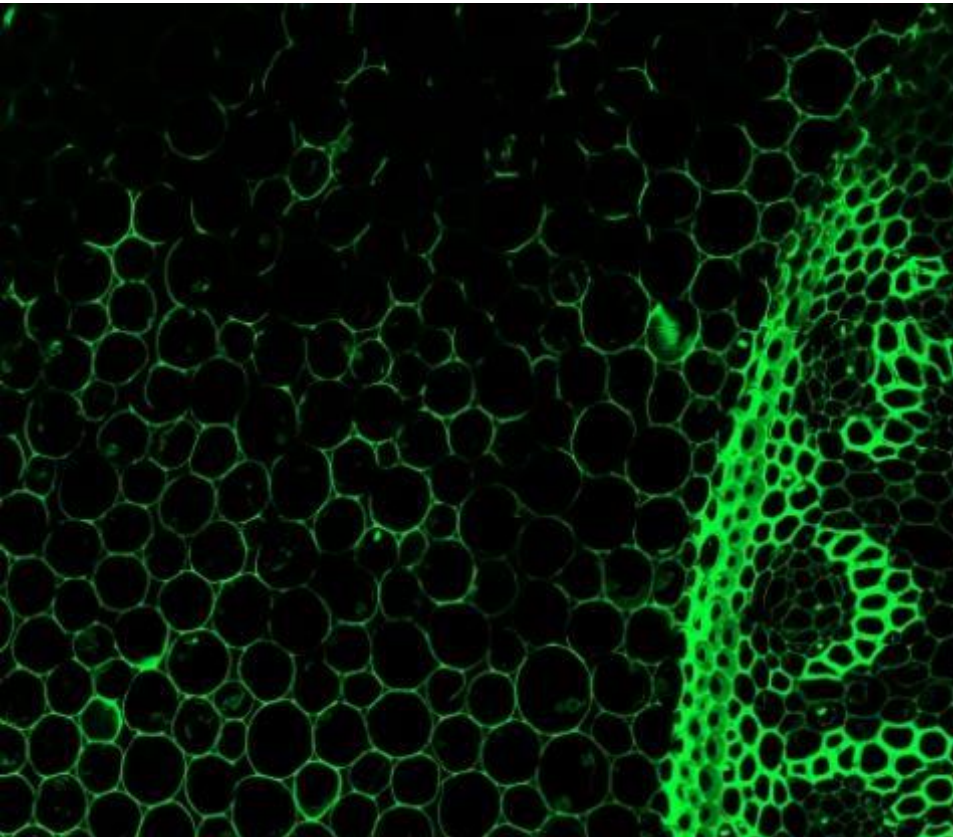


高级拼图功能主要包括两个部分：

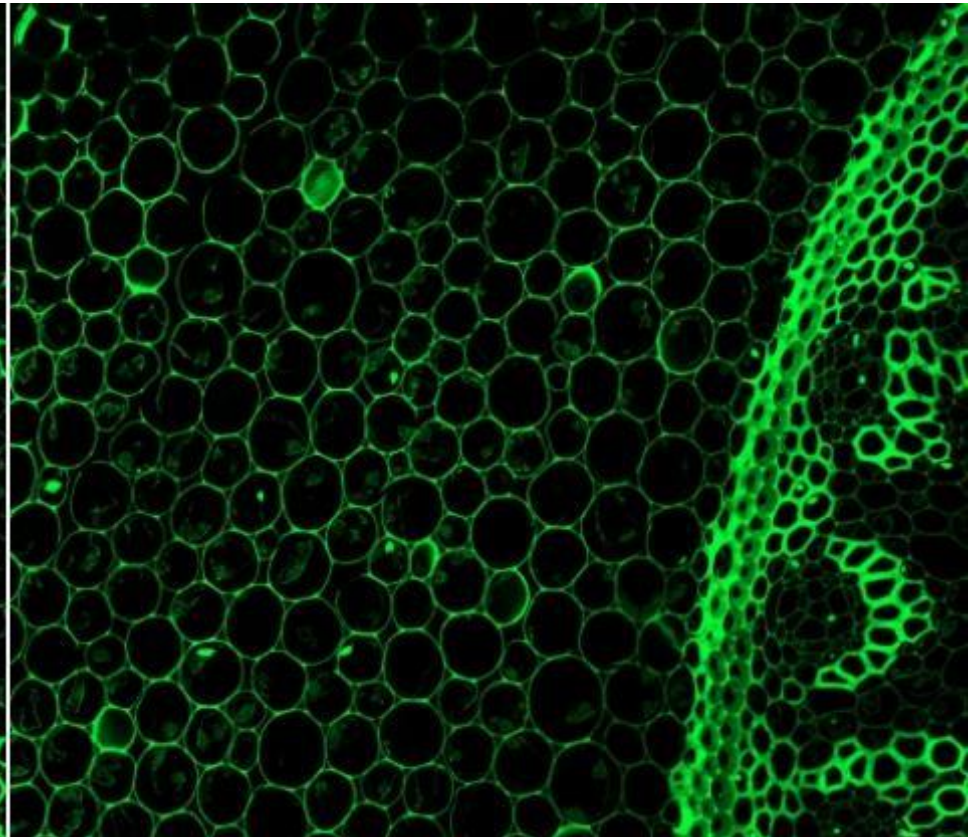
- 1、可以通过拼图前分析拼图区域的焦距变化，有利于校正拼图不同焦距的问题 (support point) ；
- 2、如果同时配置有CCD，可以通过CCD的快速成像来获取预扫图像，辅助拼图区域的选择 (preview scan)

Tile Scan

Advanced Setup



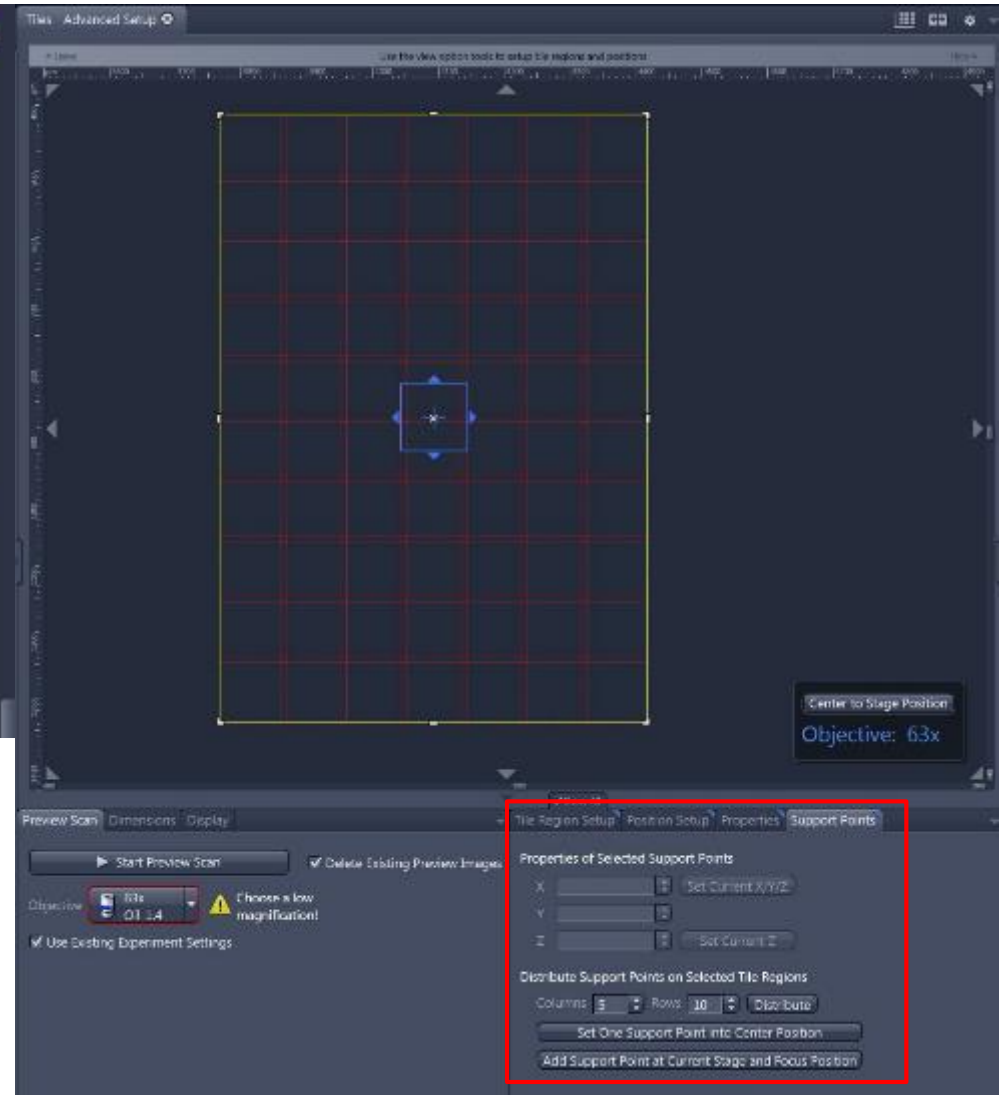
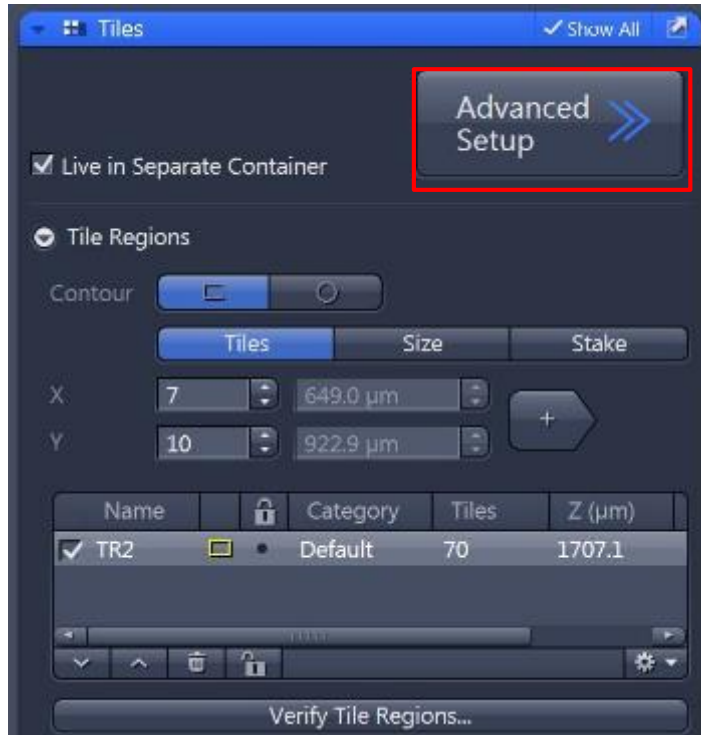
Without support point



Manual support point

Tile Scan

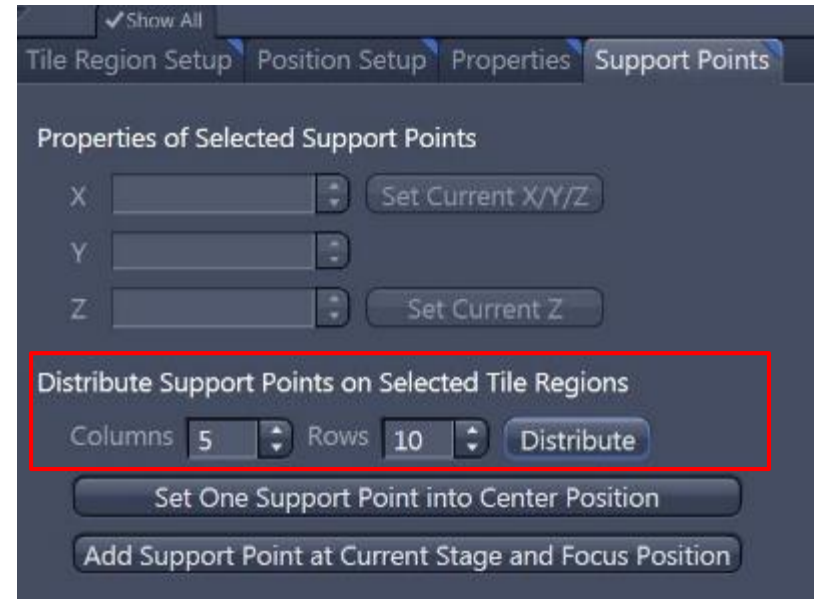
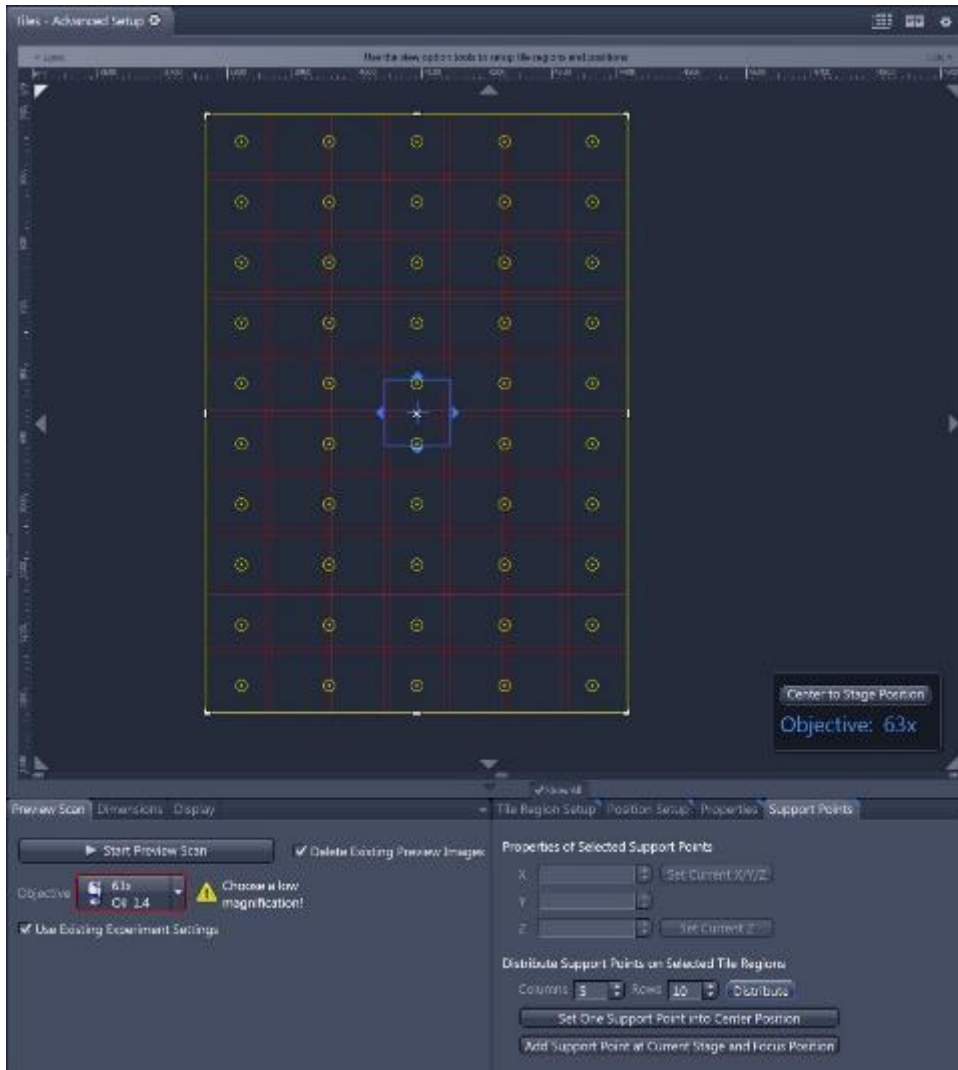
Focus Surface



1、建立好拼图范围后选择“Advanced Setup”，在右侧看见扫描区域，并进入下方选项“Support Points”

Tile Scan

Support Point

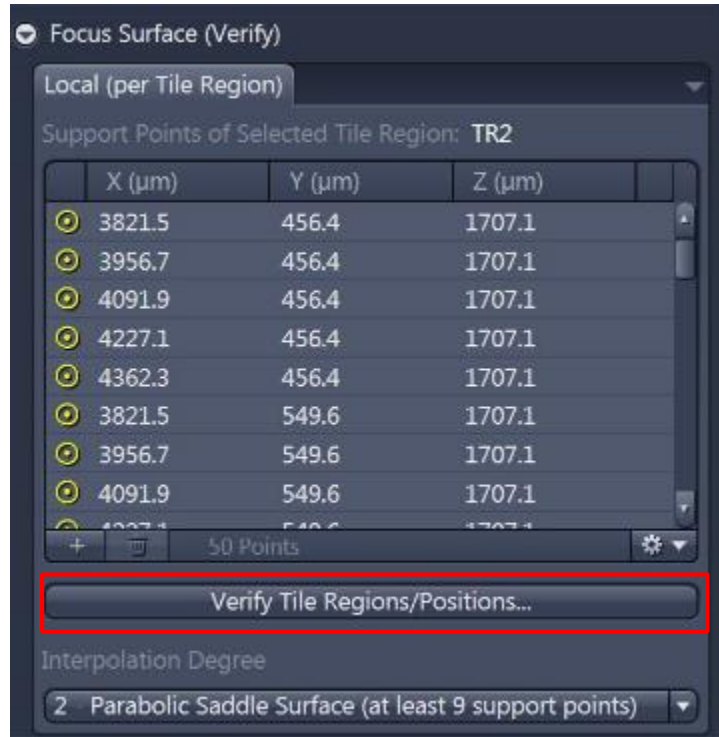


2、在“Support Points”选项下选择支持点，这些支持点将帮助你确定拼图区域内的焦距变化；

设定好需要分布的支持点的行列数量后点击“Distribute”，拼图区域上出现黄色小圆点，代表支持点，可以手动调节这些点的具体位置。

Tile Scan

Verify Support Points



3、在“Tiles”窗口下选择“Focus Surface (verify)”，点击“Verify Tile Regions/Positions”对选好的support points进行校正；

Tile Scan



Verify Support Points

Name	Z (μm)	Tile Region	Array
SP	1155.9	TR1	
SP	1155.9	TR1	
SP	1155.9	TR1	
SP	1155.9	TR1	
SP	1155.9	TR1	
SP	1155.9	TR1	
SP	1155.9	TR1	
SP	1155.9	TR1	
SP	1155.9	TR1	

Select Verification Helper Method

None manual adjustment

None manual adjustment

Autofocus (AF)

Definite Focus (DF)

! Current Stage X/Y \neq Current Point

Include Z when Moving to Points

Current Z: 1155.9 μm

! Not all points have been verified.

Close

- 4、根据配置不同，主要包括以下三种校正方法：
 - a. None (Manual adjustment) 手动校正，在预览模式“Live”下，双击第一个SP (Support Point) 进行手动调焦后保存焦距位置“Set Z & Move to Next”，随后对后续SP进行逐个校正；
 - b. Autofocus (AF) 软件自动对焦，通过软件计算的方法找到最佳焦距；
 - c. Definite Focus (DF) 自动对焦系统，需要硬件Definite Focus支持，通过DF能够迅速找到介质表面来确定样品焦面。

Tile Scan



Autofocus Verify Support Points

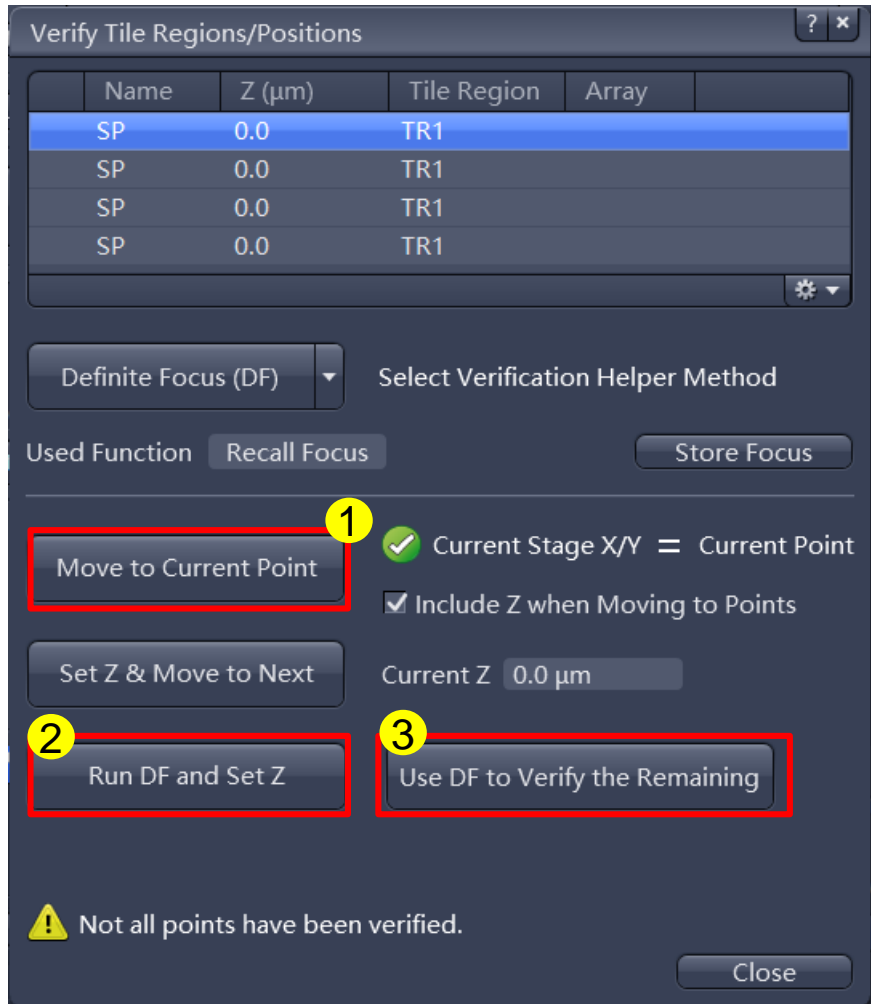


5、选择AF校正方法后选择“Use AF to Verify the Remaining”，软件会自动对所有Support Points进行焦距校正；

Tile Scan



Definite Focus Verify Support Points



6、选择DF校正方法后，

① 选择第一个“Support Point”点，点击“Move to Current Point”；

② 选择“Run DF and Set Z”，等待Definite Focus校正结果；

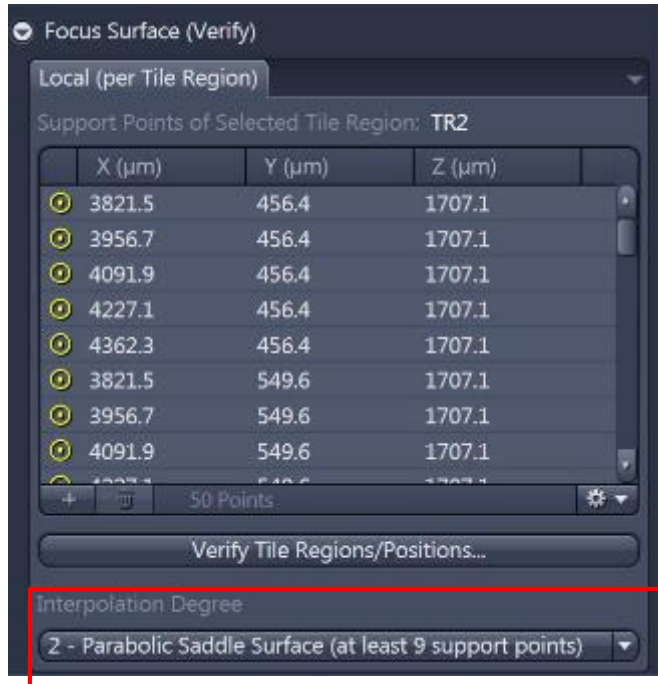
③ 最后选择“Use DF to Verify the Remaining”，软件会自动对所有Support Points进行焦距校正。

当校正SP结束后，选择“Close”关闭Verify窗口

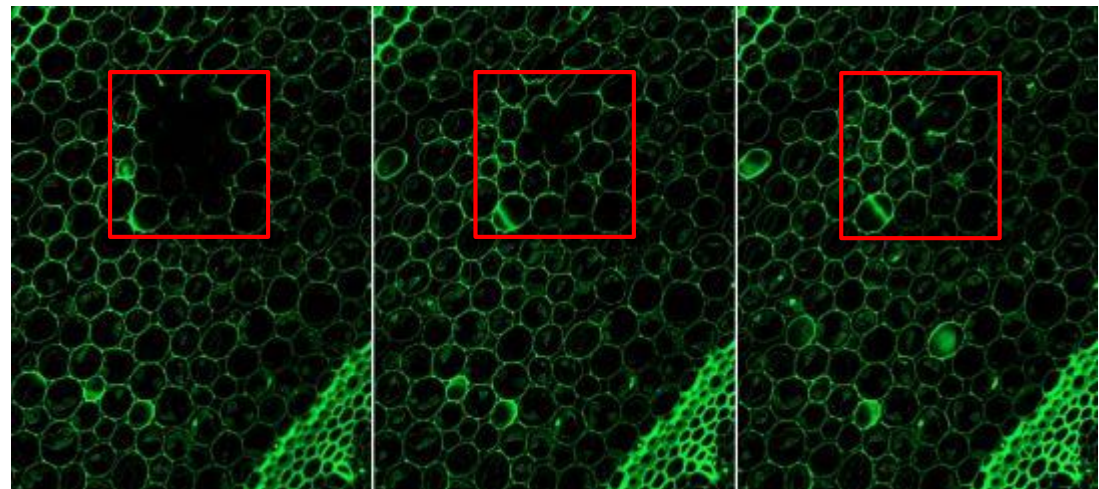
Tile Scan



Definite Focus Verify Support Points



7、校正所有SP后，选择适合的“Interpolation Degree”；样品表面越不平整需要Interpolation Degree越高，选择的SP数量超过Interpolation Degree需要的最小值可以增加计算的可靠程度。



One SP

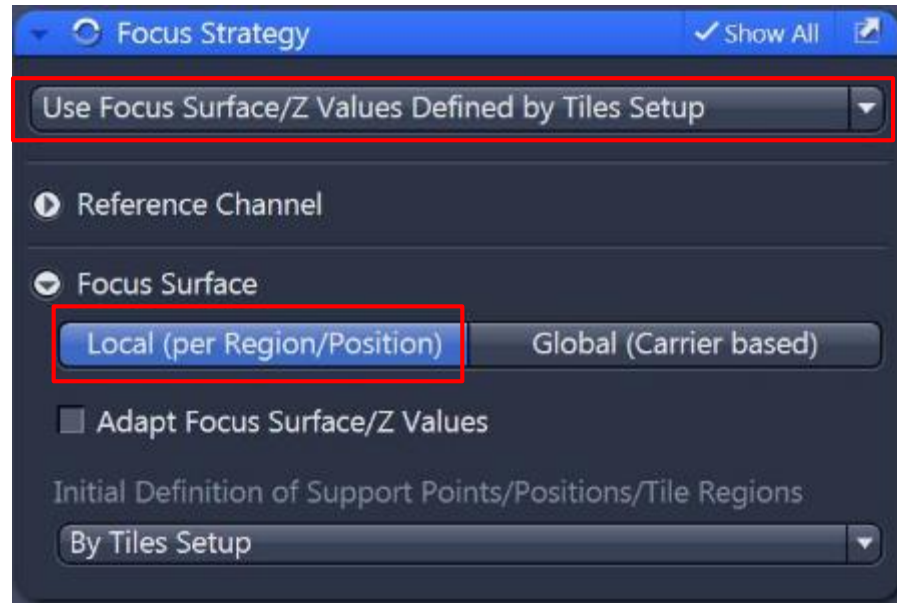
4 SP

22 SP

Tile Scan



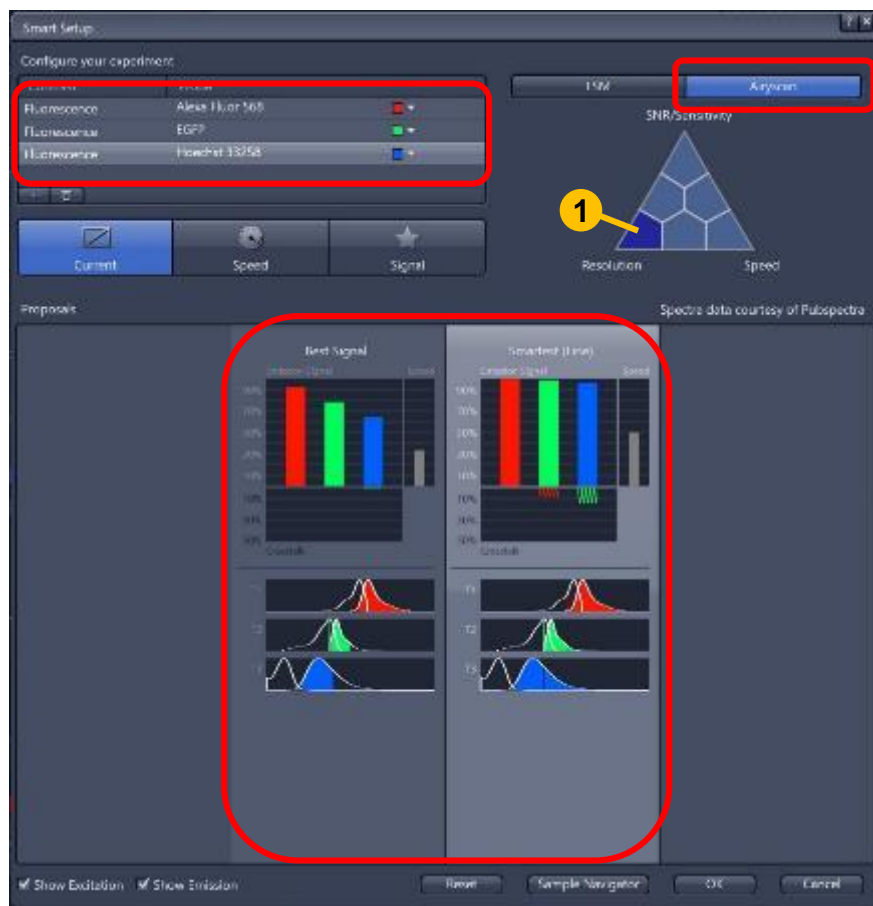
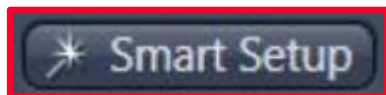
Definite Focus Verify Support Points



- 8、随后在“Focus Strategy”工具栏中确定如上图所示选项：对焦方法为“Use Focus Surface/Z Values Defined by Tiles Setup”，Focus Surface的方法为“Local (per Region/Position)”；
- 9、上述设置结束后，点击“Start Experiment” 拼图

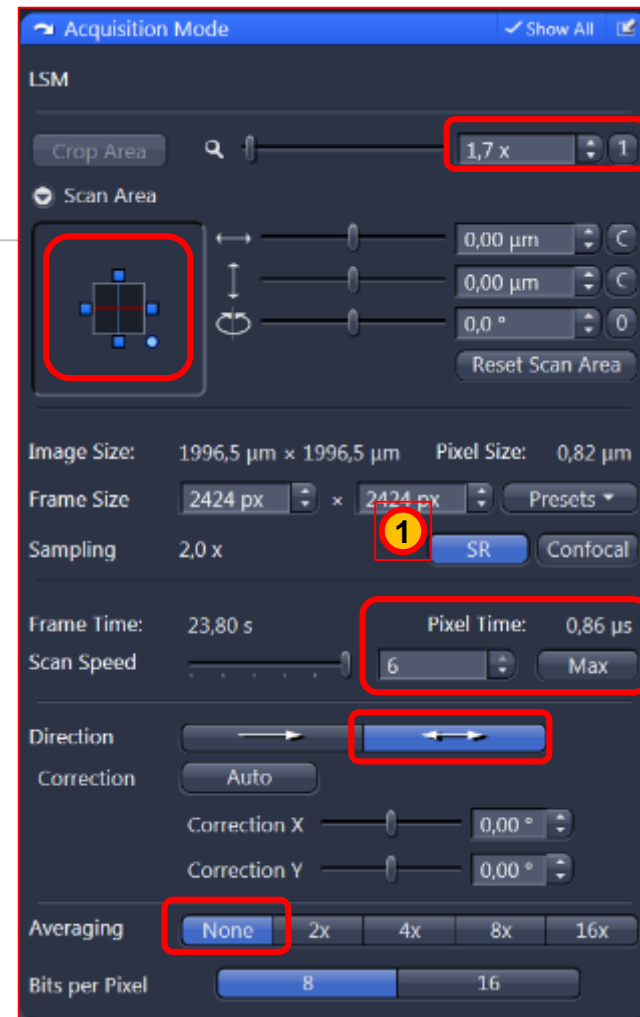
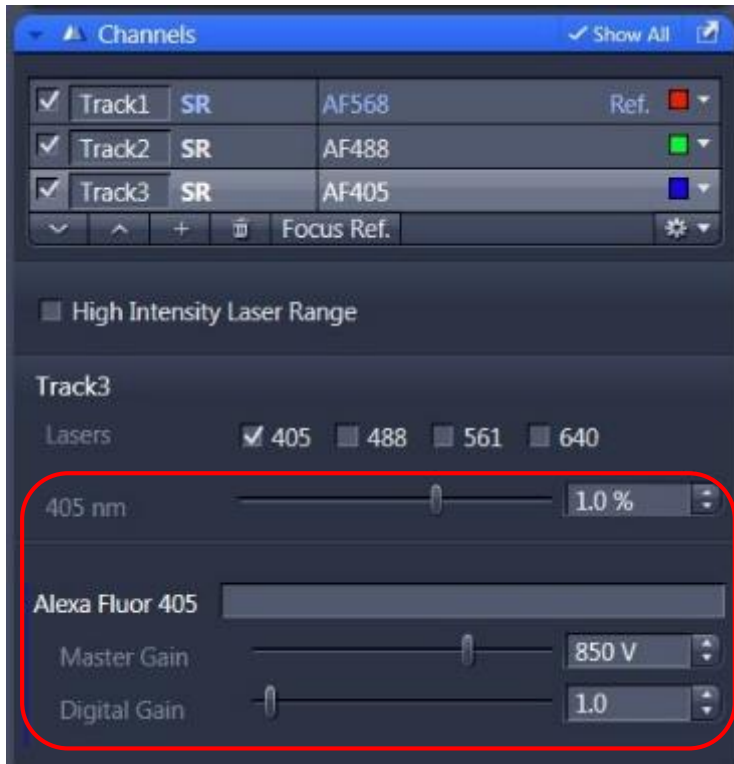
- 1 Startup and Shutdown of the System
- 2 Acquiring Multi-Channel images
- 3 Z-stack image
- 4 Time Series image
- 5 Tile Scan
- 6 Airyscan Imaging

Airyscan SR mode



1. 点击 “Smart Setup” ， 选择需要的染料；
2. 点击 “Airyscan”
3. 在下方的三角中选择不同的Airyscan模式，例如左下角 “Resolution” 代表Airyscan的SR模式，右小角代表Airyscan的快速模式。
4. 选择 “Best Signal” 或 “Smartest” 模式；类似前述共聚焦中的原则，Smartest相对于Best Singal会经可能提高拍摄速度，但是要注意可能发生的串色问题。

Airyscan SR mode

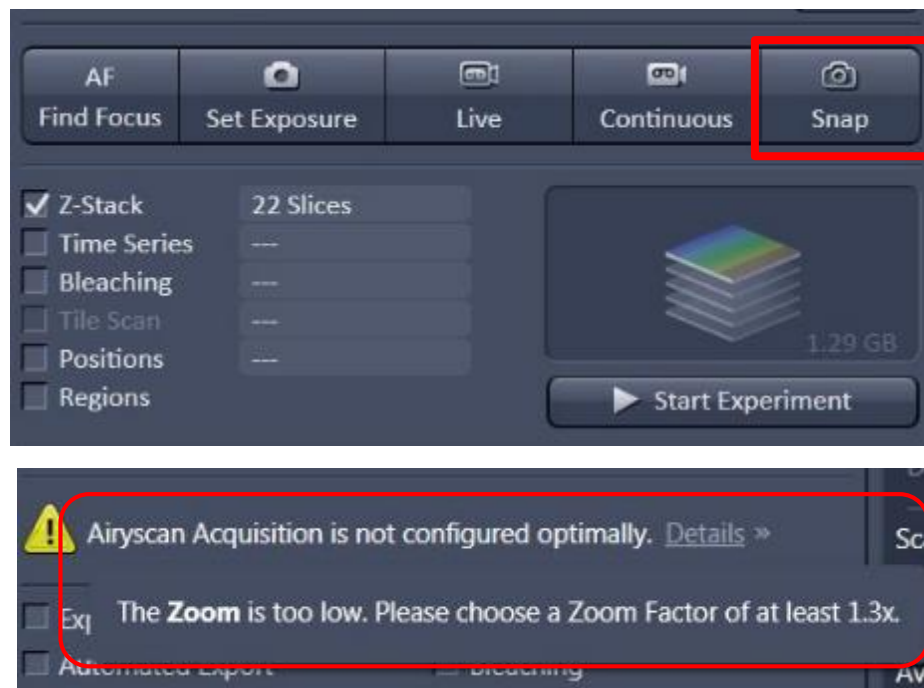


5. 设置激光大小 “Laser” ， 检测器 “Master Gain” 和 “Digital Gain”

*注意不能过曝，而且也不要试图占满整个Display的动态范围。

6. “Scan Area” 扫描区域居中，选择最快扫描速度，“Crop Area” 不要小于1.7，双向扫描，“Averaging” 选择 “None”

Airyscan SR mode



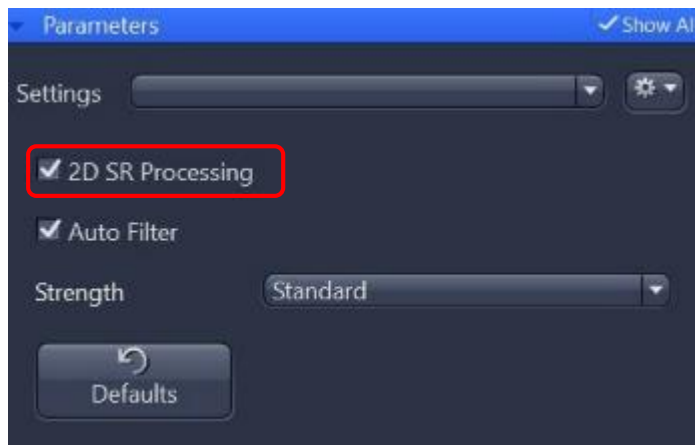
7. 如果有参数设置不能满足达到Airyscan 最高分辨率，软件会有相应提示，根据提示更改参数后可以进行二维图像拍摄（Snap）或者多维图像拍摄（Strat Experiment）

Airyscan SR mode

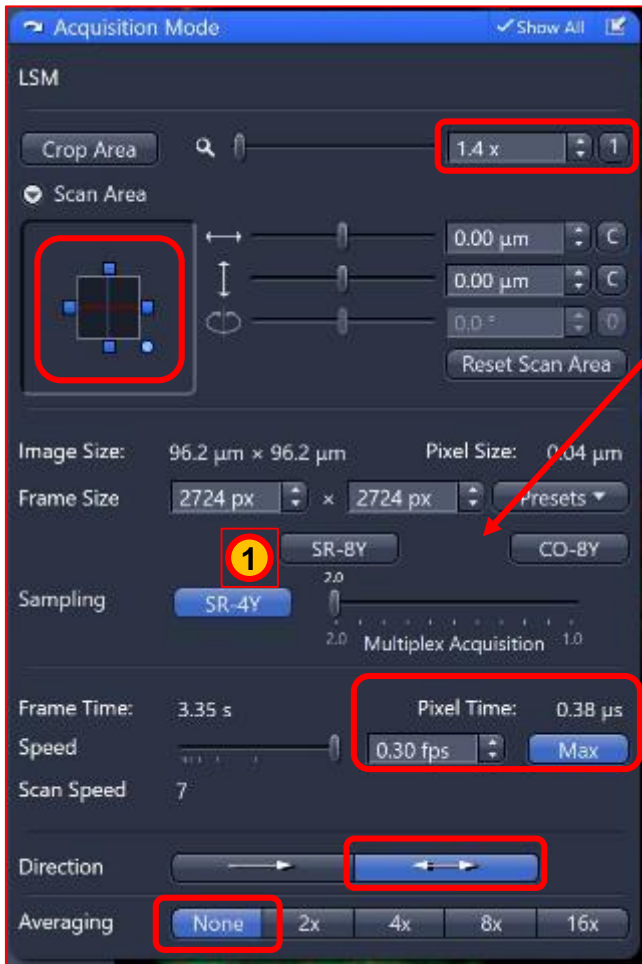


8. 按照 “Processing → Airyscan Processing → Input → Apply” 进行图像处理。

如果是z-stack图像，请选择 “3D Processing”
2D图像可以勾选 “2D SR Processing” 进一步提高分辨率



Airyscan Multiplexing: SR-4Y and SR-8Y Mode



Airyscan的multiplex模式，例如4Y和8Y，通过smart setup设置后，其Crop Area不小于1.0，其他设置和Airyscan SR模式一样。

*如果选取Airyscan SR-4Y或SR-8Y，sampling（采样率）会自动选取2x Nyquist（图中①）利于提高分辨率，如果选择CO-8Y会采取1x Nyquist采样率（图中②），有利于提高图像信噪比。

拍摄完成后进行Airyscan Processing

欢迎您采用如下方式随时与我们联系

任何关于技术应用或者新系统问题

您都可以拨打我们的热线服务电话：**400 - 6800 - 720**

或者访问网站：www.zeiss.com.cn

扫描二维码关注**蔡司显微镜/ZEISSMIK**，与我们一起探索奇妙的微观世界！

