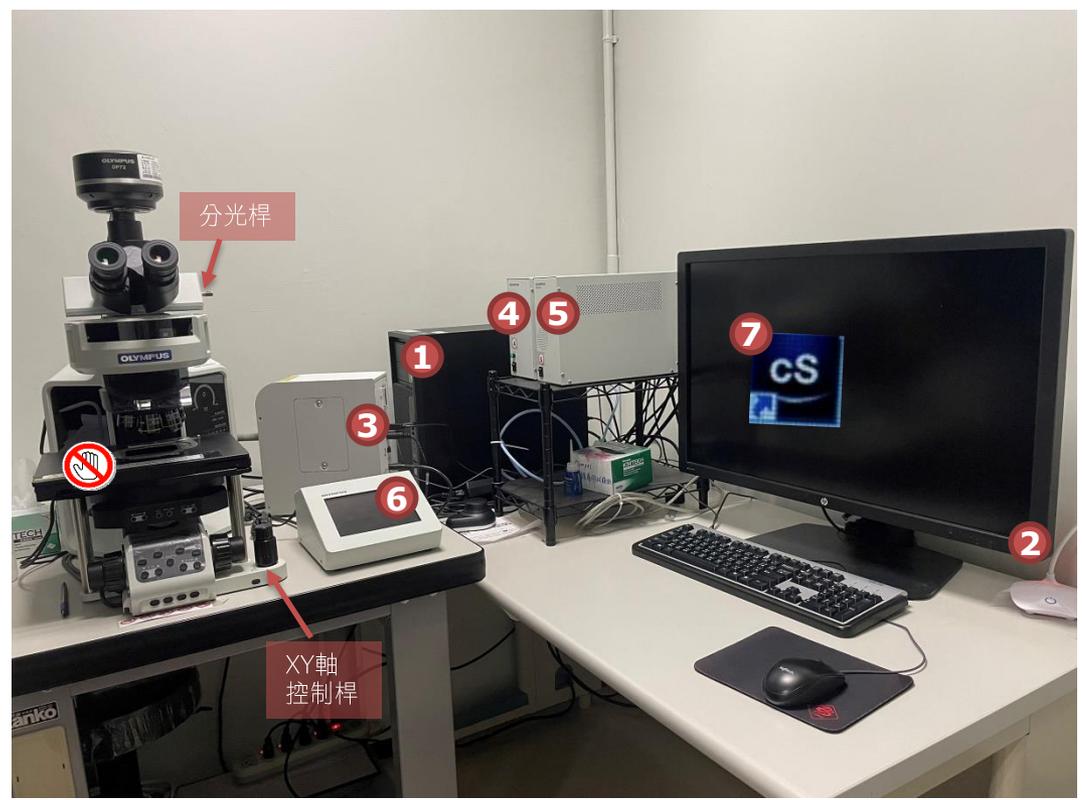


# Index

基本操作	頁碼	補充	頁碼
開機	2	FV31S-DT Viewer 檔案輸出	13
顯微鏡控制、螢光濾片	3	Fluorescence Filter Sets	14
快捷鍵功能 My Functions	4	黑白圖片疊圖套色 Combine Channels	15
存檔--彩色/灰階圖檔	5	Process Manager- Multi Channel	16
單張拍照 Snapshot	6	Process Manager- Z stack	17
自動多色螢光拍照 Multi Channel	7	Process Manager- Multi Position	18
自動拍攝多點或拼圖 Multi Position	8		
自動Z層拍照 Z-Stack	9		
Z層疊圖 EFI Processing	10		
油鏡清潔步驟	11		
關機	12		

# 正立式顯微鏡 Olympus BX63

## 開機順序



① 電腦

② 螢幕

③ 螢光燈源

可隨開隨用，不須暖機。

④ 電動平台

勿用手推！只能用XY軸控制桿移動

⑤ CBH 顯微鏡控制

⑥ TPC 觸控面板

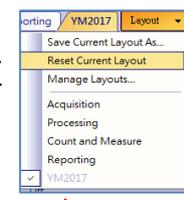
面板後側右上方按鈕按一下就好，  
畫面顯示 Start Operation

⑦ 開啟 cellSens 軟體

請先至右上角功能切換區



YM2017/Reset Current Layout

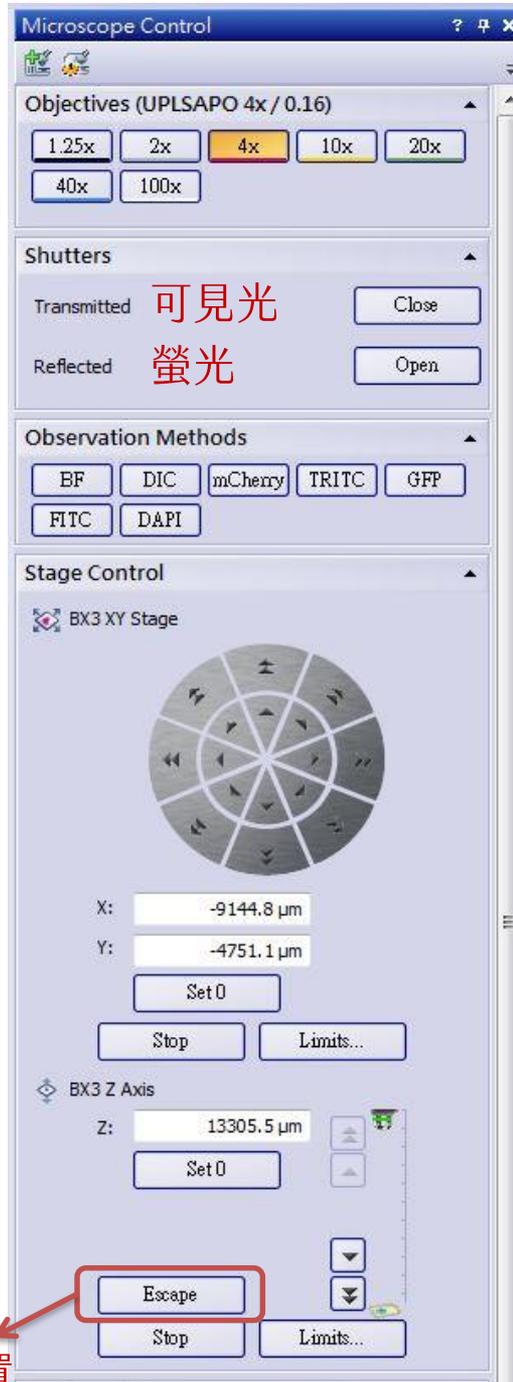


# 顯微鏡控制



## ➤ 鏡頭倍率

關機前請切回 4x 鏡頭  
注意！只有 100x 為油鏡！

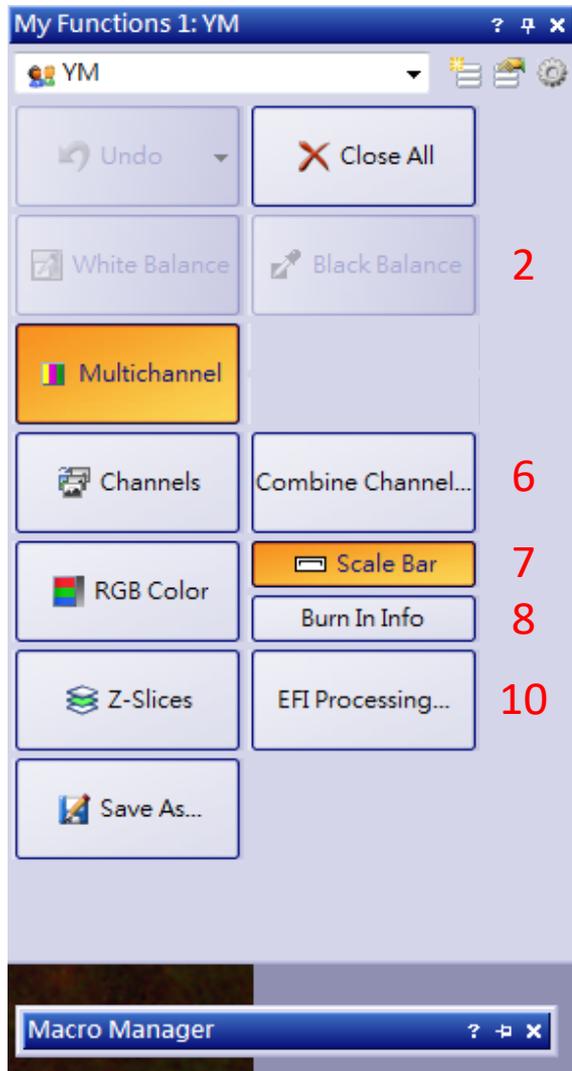


## ➤ 觀察模式

按鍵名	LED	Mirror Unit	Excitation filter	Dichromatic Mirror	Emission filter	適用常見染色
DAPI	385	89402 ET -Multi LED set 多色螢光建議優先選這組濾片，拍照速度較快	391/32	410-458	418-450	DAPI, Hoechst, etc.
GFP	475		479/33	497-540	505-530	eGFP, Alexa488, FITC, etc.
TRITC	525		554/24	570-615	577-610	Alexa546/555/568, DsRed, Cy3, PI, etc.
CY5	630		638/31	655-730	663-725	Cy5, Alexa633, etc.
FITC-long	475	U-FBW	BP460-495	DM505	BA510IF	eGFP, eYFP, Alexa488, etc.
mCherry	575	U-FYW	BP545-585	DM595	BA600IF	Alexa594, DsRed, Texas Red, Cy3.5, etc.
PO		--	可見光，黑背景偏光影像			Picro Sirius red
BF		--	可見光，明視野影像			--
DIC		--	可見光，微分干涉差影像			

退片鈕，再按一次  
Return則回復原本位置

# 快捷鍵功能介紹 My Functions

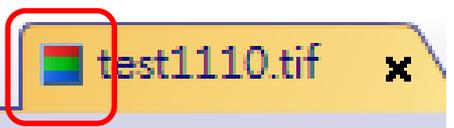


	快捷鍵	功能	說明
1	White Balance	白平衡設定	拍 BF 影像時校正白背景
2	Black Balance	黑平衡設定	拍螢光影像時校正黑背景 所有顏色都會一起扣背景，一般不建議使用！ <b>建議 Reset</b>
3	Multi Channel		表示此圖為多色層灰階圖檔 建議先存.vsi原始檔，再作後續拆色
4	Channels	RGB 拆色	Separate Multi-channel 圖片拆色，拆色後為 10-bit 灰階圖檔
5	RGB Color		將灰階圖檔轉成 24-bit 彩色圖檔
6	Combine Channels	灰階圖檔 疊圖套色	疊圖套色後為 24-bit 彩色圖檔，詳見補充說明
7	Scale Bar	顯示尺規	勿改格式
8	Burn In Info	畫尺規	注意！畫上後無法修改！ <b>畫完請另存新檔，不要覆蓋原始檔</b>
9	Z-Slices	拆開 Z-Stack	將 Z-Stack 影像拆開成單層 Z 圖檔
10	EFI Processing..	EFI 疊圖	將 Z-Stack 影像的所有 Z 層疊合成一張延伸焦距影像
11	Save As...	另存新檔	<b>建議存.tif 或 .vsi</b>

# 存檔格式—彩色/灰階圖檔

## ➤ 彩色圖檔 (24-bit)

RGB color image → [Save As] .tif

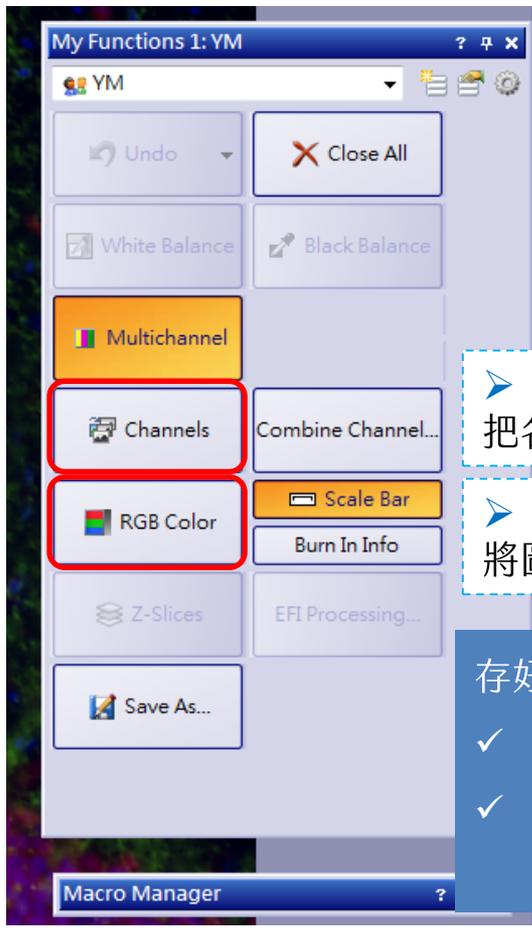
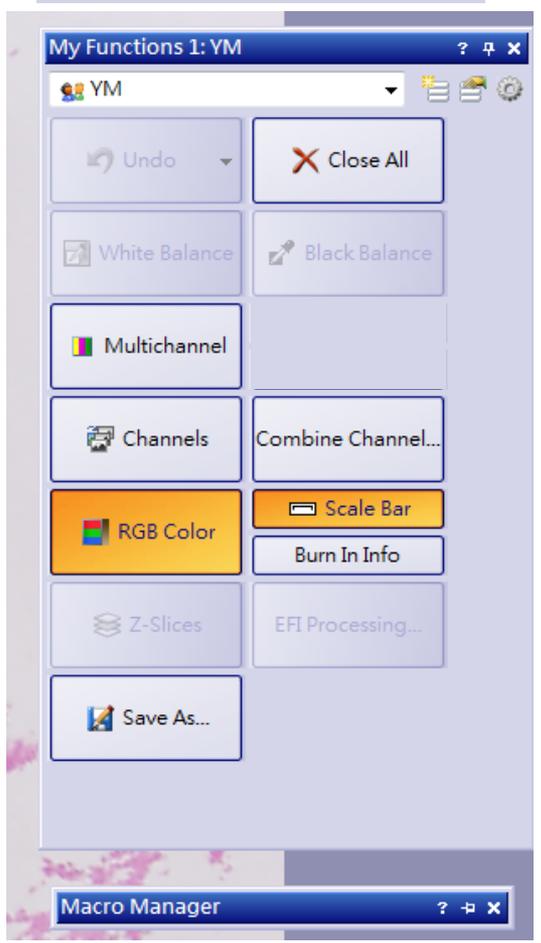


## ➤ 灰階圖檔 (10-bit)

Fluorescence snapshot or Multi-Channel Images



→ [Save As] .vsi  
建議先存原始檔



- Channels: 把各channel圖檔拆色分開
- RGB color: 將圖檔轉成彩色圖檔 (24-bit)。

存好原始檔之後，

- ✓ 可使用 Viewer 畫尺標與輸出 .tif
- ✓ 或使用Channels拆色，再分別 RGB color轉成彩色圖檔存 .tif

# 單張拍照流程

1. 選擇鏡頭倍率
2. 選擇觀察模式 (BF, DIC 或螢光)
3. 目鏡下觀察並選取視野
4. 拉分光桿
5. 軟體 Live 即時預覽

[Ctrl + H]可切換過曝顯示輔助模式

6. 選擇曝光模式：

[可見光]可選擇 Automatic 自動曝光

[螢光]建議選擇 Manual 手動曝光，

以固定各螢光曝光條件

白/黑平衡設定



白平衡：明視野拍照

黑平衡：螢光拍照（建議先 Reset）

7. 微調視野與焦距

8. Snapshot 影像擷取

9. Save As 另存新檔

## 手動曝光



## 自動曝光



SFL：螢光加強模式，會自動調整背景對比  
 ✧ 要比較螢光亮度之實驗請勿勾選！

# 自動多色螢光拍照

## Multi Channel

鏡頭對焦找到要拍攝的視野後

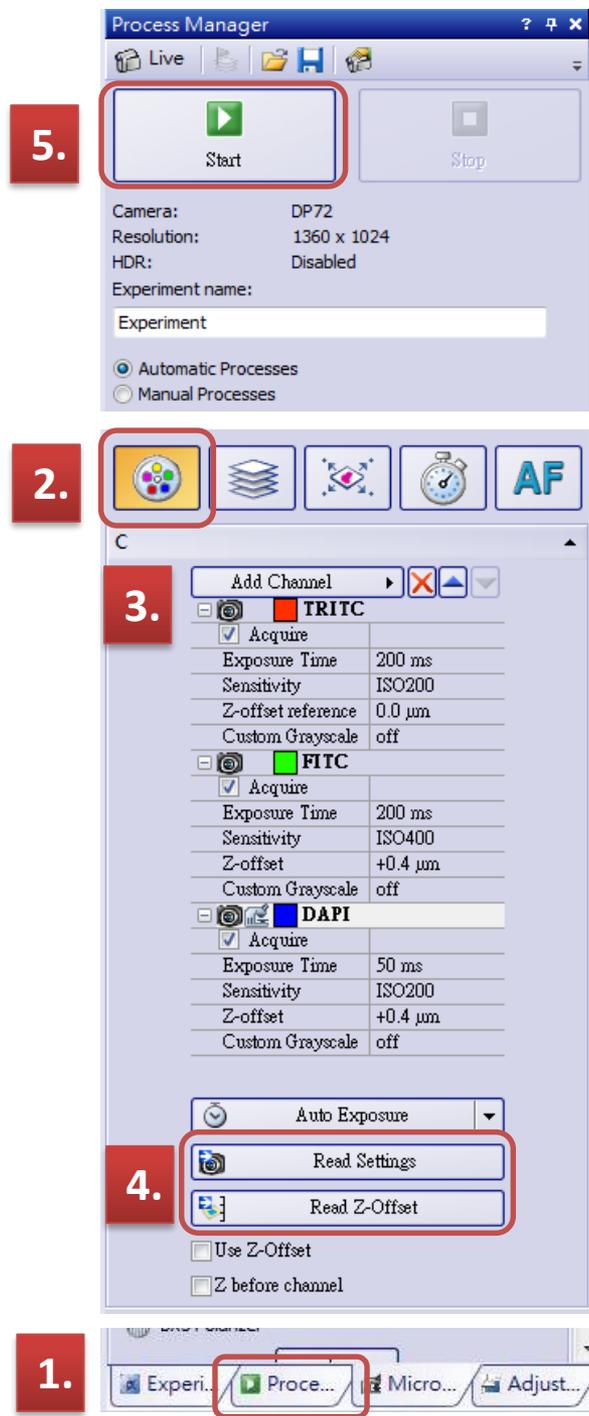
1. 軟體右下角進入 Process Manager 選單
2. 選擇 Multi Channel 功能
3. Add Channel 下拉選單設定要拍攝的螢光
4. Live 調整拍照條件 → Read Settings

每個 Channel 分別設定曝光時間

✧ 若不同 Channel 要設定不同 Z focus :

- (1) 從最上面的第一個 Channel 開始
- (2) 調整 Z focus → Read Z-offset
- (3) 分別設定各 Channel 的 Z focus
- (4) 於拍攝前選取  Use Z-offset

➤ 可搭配 Multi-Position 或 Z-stack 使用



# 自動拍攝多點或拼圖

## Multi Position

鏡頭對焦調整曝光時間後（一般可用BF+自動曝光）

1. 軟體右下角進入 Process Manager 選單
2. 選擇 Multi Position 功能
3. Stage Navigator 設定拼圖或多點位置
  - ① Load Overview Area 套用單張玻片或兩張玻片之範本
  - ② Acquire Overview 以低倍率執行玻片預覽



建議先以低倍率確認曝光時間跟對焦後再按



點此鍵後以滑鼠設定拍攝範圍

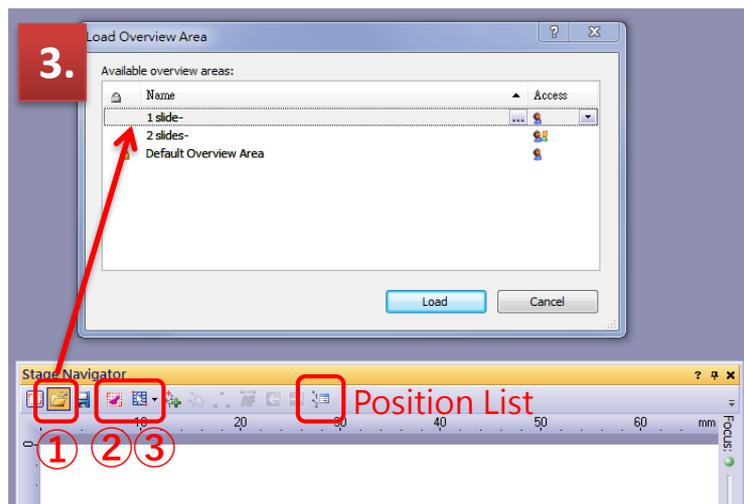
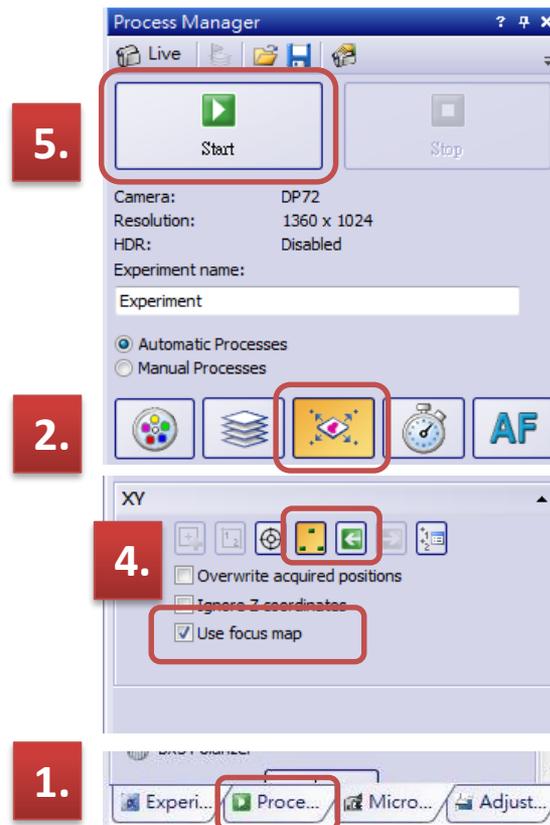


設定單點位置

4. (Optional) 設定 focus map

5. 按 Start 開始自動拍攝

▶ 可搭配 Multi-Channel 或 Z-stack 使用



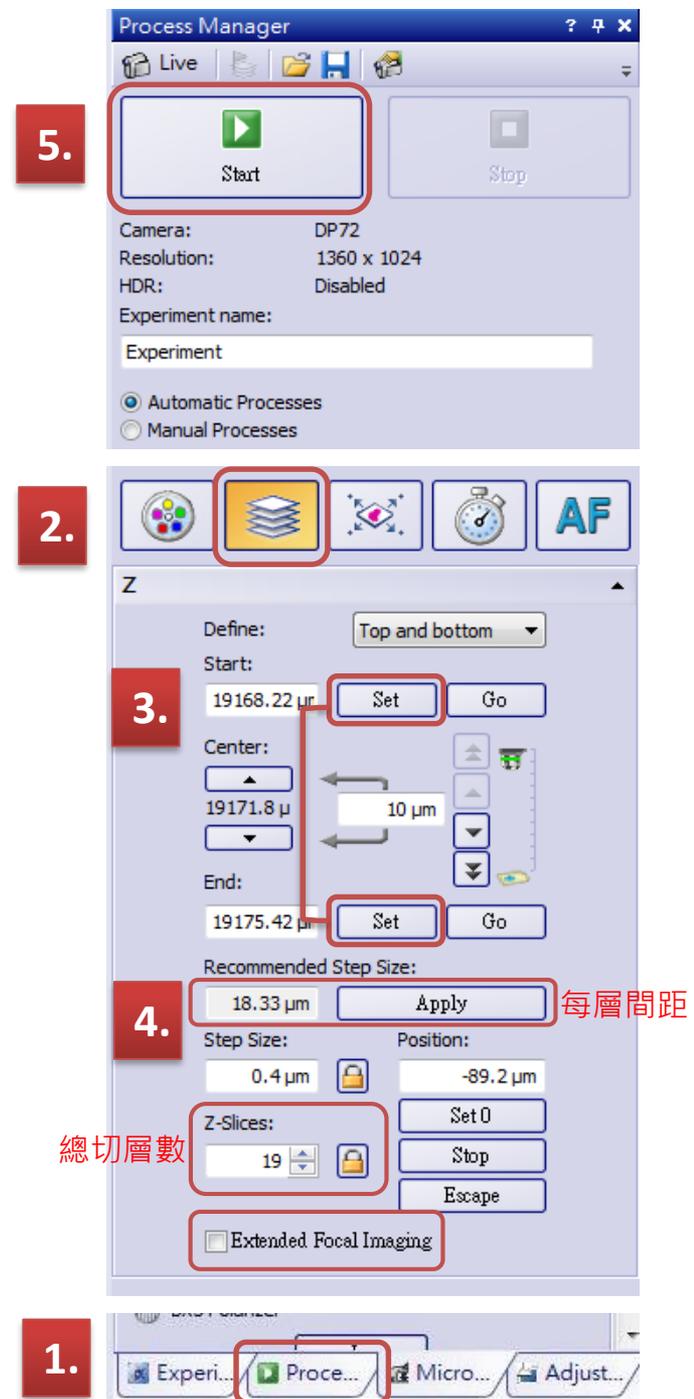
# 自動 Z 層拍照

## Z-Stack

鏡頭對焦、選好視野、設定曝光時間後

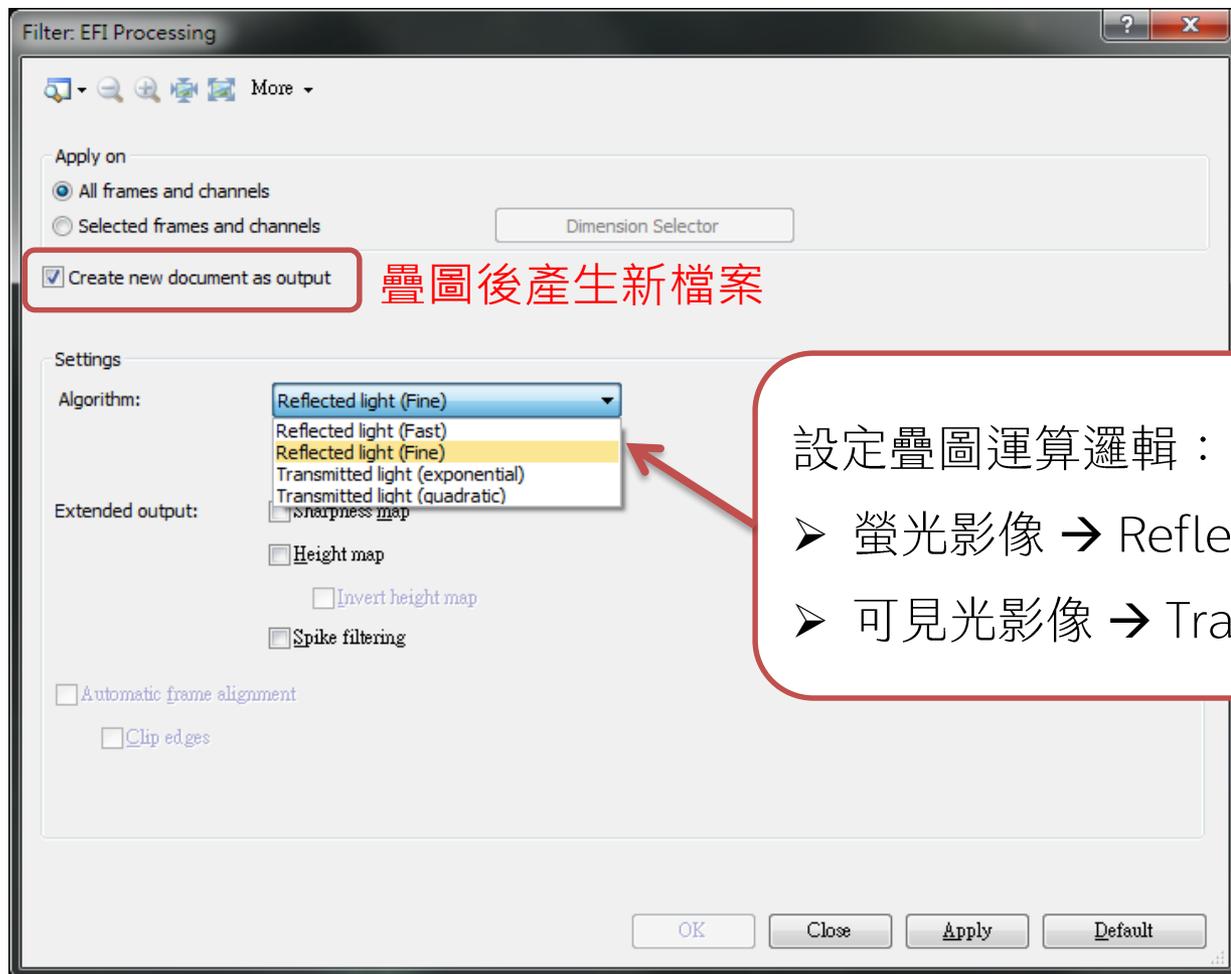
1. 軟體右下角進入 Process Manager 選單
2. 選擇 Z-Stack 功能
3. Live 調整調節輪將焦距上/下移至離焦位置，分別 [Set] 樣品厚度上/下限
4. 設定 Z 層間距以計算總切層數
  - ✦ 分別 [Go] 確認樣品上/下限位置
  - ✦ 建議勿勾選  Extended Focal Imaging，若  只會得到一張所有 Z 層疊合之延長景深影像，可拍完 Z-stack 後使用快捷鍵 [EFI processing..] 疊合。
5. 按 Start 開始自動拍攝

▶ 可搭配 Multi-Channel 或 Multi Position 使用



# Z層疊圖

## EFI Processing



疊圖後產生新檔案

設定疊圖運算邏輯：

- 螢光影像 → Reflected light
- 可見光影像 → Transmitted light

# 油鏡清潔步驟

## 100X

- (1) 先用一張拭鏡紙將大部分的油帶走
- (2) 取一張新的拭鏡紙摺成有一個小角
- (3) 小角的部分沾取少量的95%酒精
- (4) 從鏡頭的中心由內向外做螺旋狀的擦拭將鏡油帶出鏡頭
- (5) 取一張新拭鏡紙檢查是否有擦乾淨

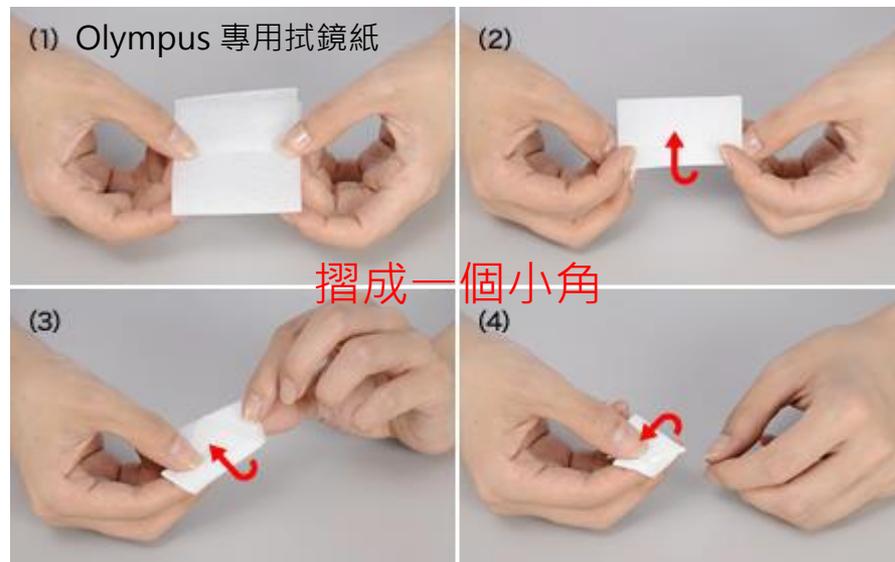
點油時建議：

將鏡油輕輕擠出管口，靠近油鏡最上端讓它吸附上去，**一小滴即可不要過量**，過量不好清理且可能會流到鼻輪上。



Olympus  
螢光專用鏡油

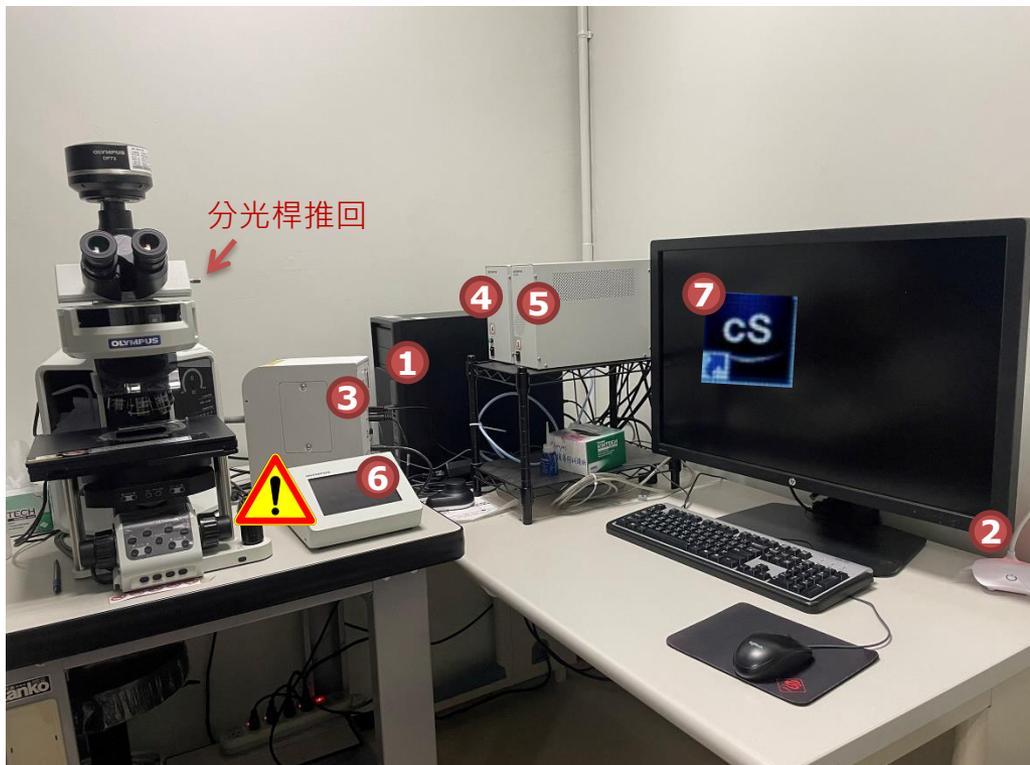
請使用專用拭鏡紙，不可以用Kimwipes！



此為示意圖，  
請勿將鏡頭拆下！

# 正立式顯微鏡 Olympus BX63

## 關機順序



離開前請務必確認所有電源已依序關閉，  
並確實記錄所用鏡頭倍率。

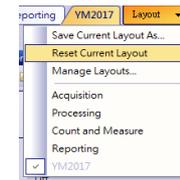
• 換成4X，鏡頭升到最高

• 推回分光桿

⑦ 關閉軟體

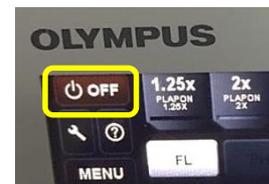
關閉前請先至右上角 YM2017 Layout

→ 選擇 Reset Current Layout



⑥ 觸控面板 ⚠

觸控面左/右上角 出現 Olympus  
選擇 Off 關閉 → 按一下後方按鈕



⑤ 關閉CBH 顯微鏡控制

④ 關閉電動平台

③ 關閉螢光燈源

① ② 關電腦與螢幕

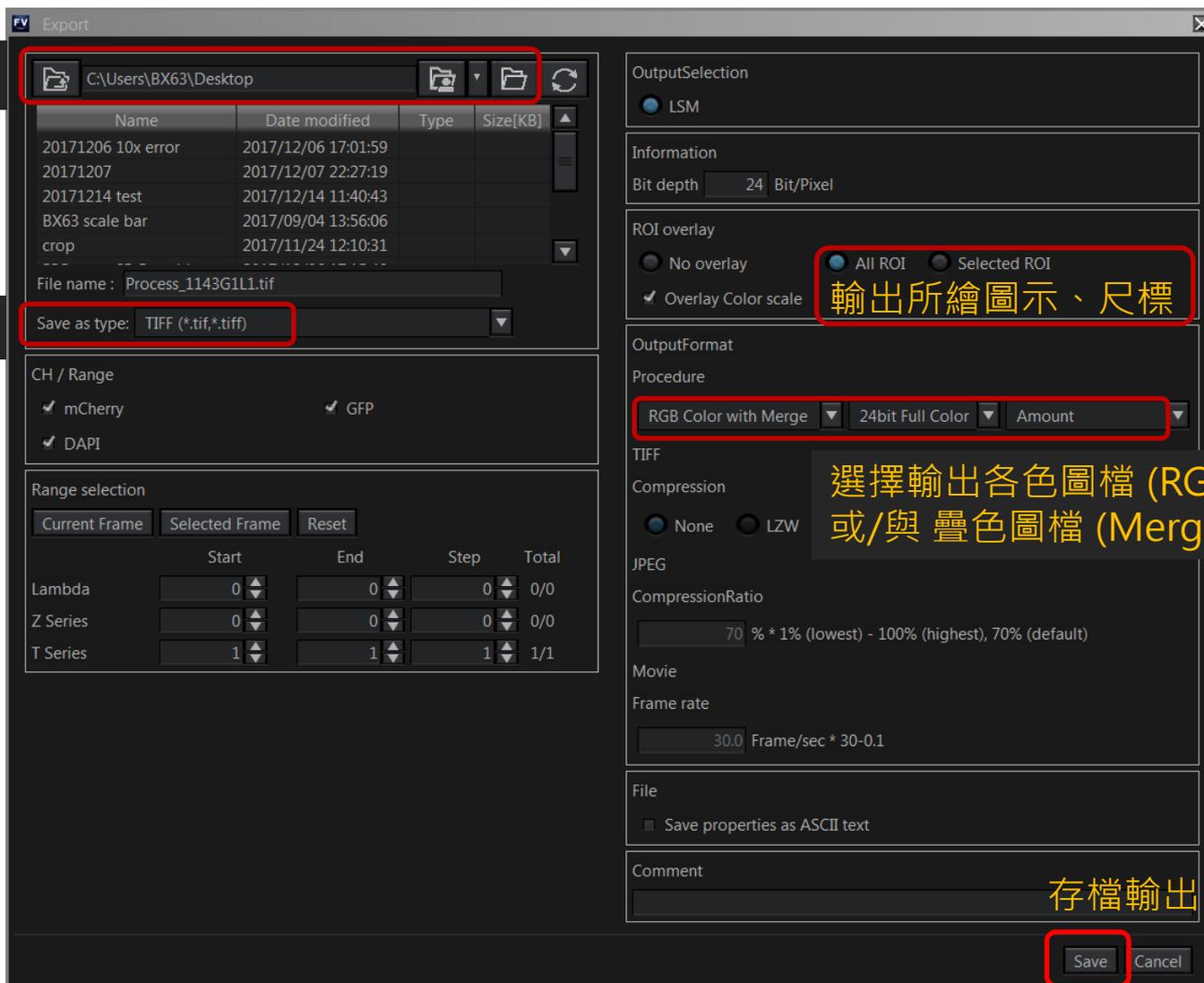
# 使用軟體輸出圖檔 FV31S-DT



(64-bit 電腦可安裝)

➤ 開啟 Multi Channel 之 .vsi 或 .tif 圖檔 → 滑鼠右鍵點選 Export

存檔位置

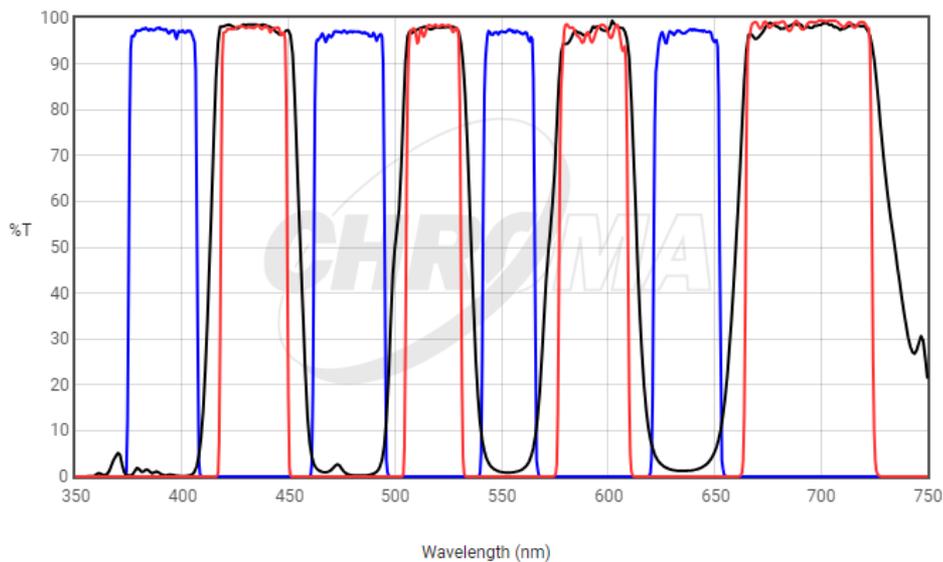


建議選存 .tif檔

# 螢光濾鏡組 Fluorescence Filter Set

- DAPI/eGFP/TRITC/Cy5
- 89402 ET –Multi LED set

- 89402x
- 89402bs
- 89402m

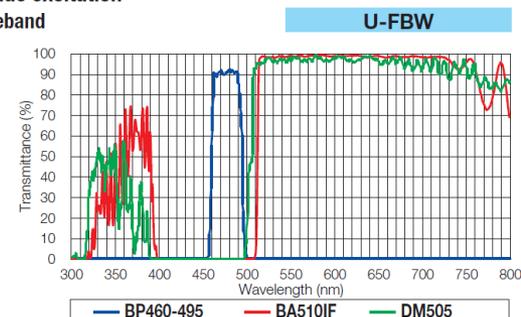


X-Cite TURBO unit contains the following LED Wavelengths:

LED Position	LED Center Wavelength	Useable Wavelength Range
1	385nm	375nm-400nm
2	430nm	410nm-450nm
3	475nm	460nm-495nm
4	525nm	505nm-550nm
5	575nm	555nm-610nm
6	630nm	615nm-660nm

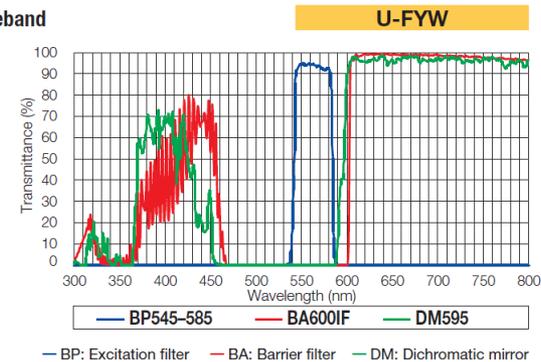
- FITC-long

Blue excitation  
Wideband



- mCherry

Yellow excitation  
Wideband



— BP: Excitation filter — BA: Barrier filter — DM: Dichromatic mirror

# 黑白圖片疊圖套色

cellSens Standard

File Edit View Acquire Image Process Measure Tools Window

HER2 (3x16-bit) - DAPI

Adjust Display  
Pseudo Color...  
Mode  
Geometry  
Burn In Info  
Crop...  
Calibrate Image...  
Change Basic Unit  
Separate  
**Combine Channels...**  
Combine Color Images...  
Duplicate

Combine Channels

Preview

Input

Available images:

Images	Name	Color	X Shift	Y Shift	Intensity
HER2 (3x16-bit) - DAPI.tif	DAPI	...	0.0	0.0	50
HER2 (3x16-bit) - DAPI.tif					
HER2 (3x16-bit) - FITC.tif					
HER2 (3x16-bit) - Texas Red (Sulfonyl chloride).tif					

Convert to RGB → 套色後轉換成彩色圖片

Transmission:  
No transmission

Pixel shift

X: 0  
Y: 0  
 Clip edges

微調偏移位置  
影像強度調整

選擇所要套用的顏色

OK Cancel Apply

事前將黑白圖片放至到軟體中且要同畫素同Bit數否則無法疊圖

在此用滑鼠選擇所要疊圖的圖片

可套用一張黑白 DIC PH RC的影像

①在軟體上方點選Image

②下拉式選單選擇Combine channels

確認設定無誤後點選OK即完成

# Process Manager Multi Channel

The screenshot shows the OLYMPUS cellSens Dimension software interface. The main window displays a live image of a sample. The Process Manager window is open, showing the 'Automatic Processes' tab. The 'Add Channel' button is highlighted with a red box and number 4. The 'Auto Exposure' dropdown menu is open, showing 'Read Settings' and 'Read Z-Offset' options, with 'Read Settings' highlighted by a red box and number 6. The 'Start' button in the Process Manager is highlighted with a red box and number 8. The 'Camera Control' panel on the left shows the 'Exposure' settings, with the 'Exposure Time' set to 1.964 ms and the 'Gain' set to 1x. The 'Stage Navigator' panel shows the current position of the stage. The 'File' menu is open, showing the 'Export to' option, which is highlighted with a red box and number 7.

- 點選 Process Manager
- 在 Process Manager windows 當中選擇 Automatic Process
- 點選 Multi Channel 圖示(點選後該圖示底色將呈現黃色)
- 點選 Add Channel 加入所需要的螢光顏色(Dye)
- 選擇一個 Channel 將拍照條件 曝光時間調整到所要的亮度
- 點擊 Auto Exposure 讓軟體決定曝光時間 或 Read settings 將目前調整好的 Channel 曝光時間讀入 (Read Z-Offset 可讀取各 CH 的最佳 Z 軸位置 最上方 CH 為:0)
- 重複 5 6 的步驟將設定其他 Channel 的曝光時間
- 進行 Start 開始進行拍攝

拍照條件調整

File > Export to > TIFF Series > 可將每個 Channel 拆開成每一張影像

# Process Manager Z-Stack

The screenshot shows the OLYMPUS cellSens Dimension software interface. The main window displays the 'Start Page' with the 'Acquisition' tab selected. On the right, the 'Process Manager' window is open, showing 'Automatic Processes' selected. The 'Z' section of the Process Manager is active, with 'Top and bottom' defined. The 'Start' button is circled in red with the number 8. The 'Set' buttons for 'Start' (100 µm) and 'End' (150 µm) are also circled in red with numbers 5 and 6 respectively. The 'Recommended Step Size' is set to 1.99 µm, with the 'Apply' button circled in red with the number 7. The 'Z-Slices' section shows 6 slices, with the '6' circled in red with the number 3. The 'Extended Focal Imaging' checkbox is checked, with the 'E...' button circled in red with the number 1. The 'Camera Control' panel on the left shows 'Automatic' exposure mode selected, with the '4' circled in red. The 'Resolution' is set to 1280 x 1024. The 'AF' button is also visible in the Process Manager window.

1. 點選 Process Manager

2. 在 Process Manager windows 當中選擇 Automatic Process

3. 點選 Z-STACK 圖示(點選後該圖示底色將呈現黃色)

4. 調整標本焦距與設定拍照條件 (如接著 Multi channel 的話可跳過)

5. 從標本焦距層向上移到離焦位置 Set 標本厚度上限

6. 從標本焦距層向下移到離焦位置 Set 標本厚度下限

7. 設定完上下限厚度後執行 Apply 計算最佳拍攝層數

8. Start 開始進行拍攝

每層厚度

總切層數

Extended Focal Imaging 為 EFI 疊圖可將不同層的影像疊合在一起得到一張焦距層較厚的影像, 請注意此時你只會得到一張影像, 而非每一切層的影像, 所以如無必要時請勿打勾

# MultiPosition

需要MultiPosition模組與電動載台

Focus map:在進行大拼圖時可運用此功能來事先計算出標本的傾斜度進而得到較好的焦距拼圖影像



小提醒:要確認好拍照的曝光時間與物鏡是否正確(特別是手動顯微鏡)

- 1.決定標本範圍 (如切片範圍,well,dish範圍)
- 2.掃描一個over view (以便利於設定點位)
- 3.設定所要拍攝的點位或範圍
- 4.點選Process Manager
- 5.點選XY-positions / MIA (也可與Z-stack ,multi channel結合作拍攝)
- 6.Start 開始拍攝



①決定標本範圍

②掃描一個over view

③設定所要拍攝的範圍或單點位置

針對大範圍拼圖設定焦距補正(focus map)

變更點位順序

相同於stageNavigator的功能

已拍照過的點位,當在進行點位登錄時將會被清除

不使用已設定的Z軸位置

如有設定focus map請打勾

Position List

Position	X (µm)	Y (µm)	Z (µm)	Well ID	Well Posit
1	-21046.58	-19081.18	0.00	-	-
2	-13110.67	-20592.09	0.00	-	-
3	-10888.64	-20830.74	0.00	-	-

目前所登錄的全部點位

List sorted by: undefined

Z coordinate: Z: 0.00 µm

ZDC offset: Read Offset, Delete Offset

Update Z, Go to Position, Delete Position, OK

針對各點可設定各自的焦距

移動至所選擇的點位

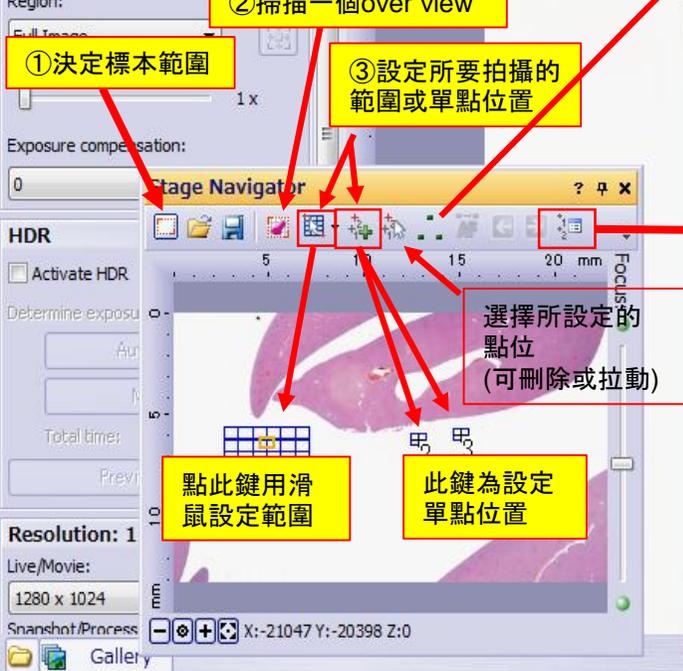
刪除點位



Overwrite acquired positions

Ignore Z coordinates

Use focus map



點此鍵用滑鼠設定範圍

此鍵為設定單點位置

選擇所設定的點位(可刪除或拉動)

④