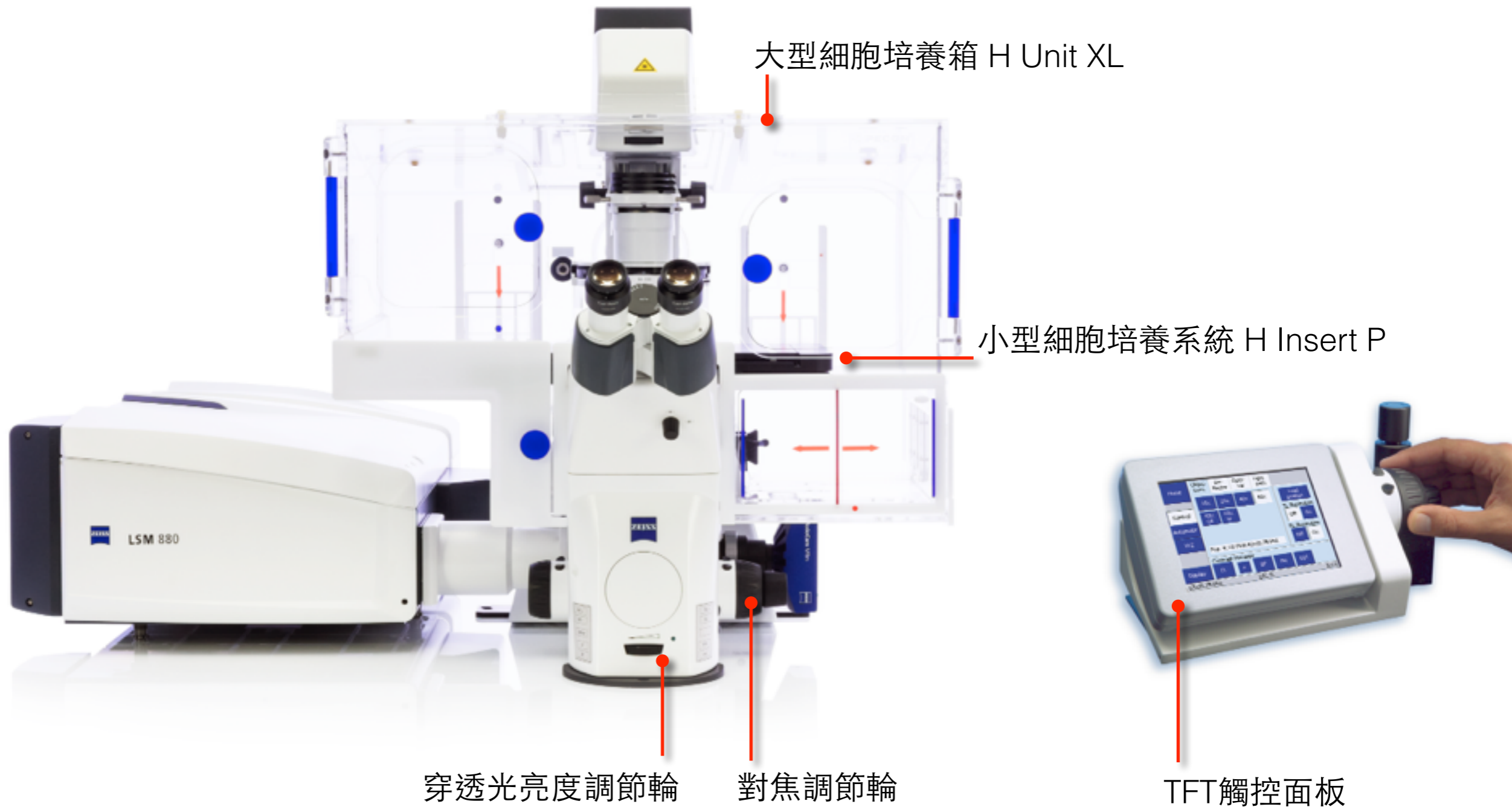




# ZEISS LSM 880 *with Airyscan* System Tutorial

Carl You, Application Specialist, Taiwan Instrument Co.  
[carl\\_you@ticgroup.com.tw](mailto:carl_you@ticgroup.com.tw)

# Start System - Hardwares



# Start System - Hardwares



1 總電源

2 雷射安全開關 (水平:ON, 垂直:OFF)

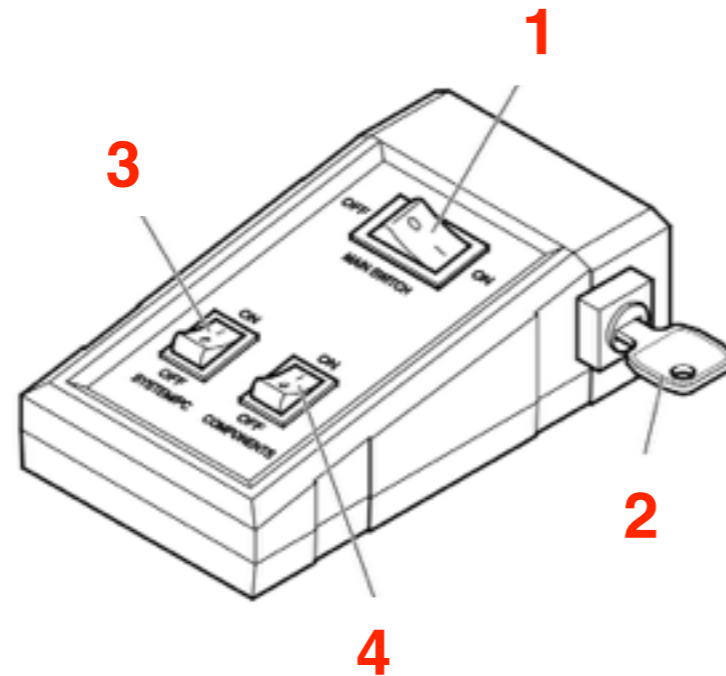
3 顯微鏡系統

4 雷射電源

5 電腦電源

6 螢光燈電源

7 軟體ZEN2



開機順序:1 2 3 4 5 6 7

關機順序:7 6 5 4 3 2 1

\*每日最後一個使用者需關閉雷射，先從軟體ZEN關閉雷射，待約5分鐘後散熱風扇停止再轉動鑰匙2至"OFF"。否則將導致雷射燒燬。

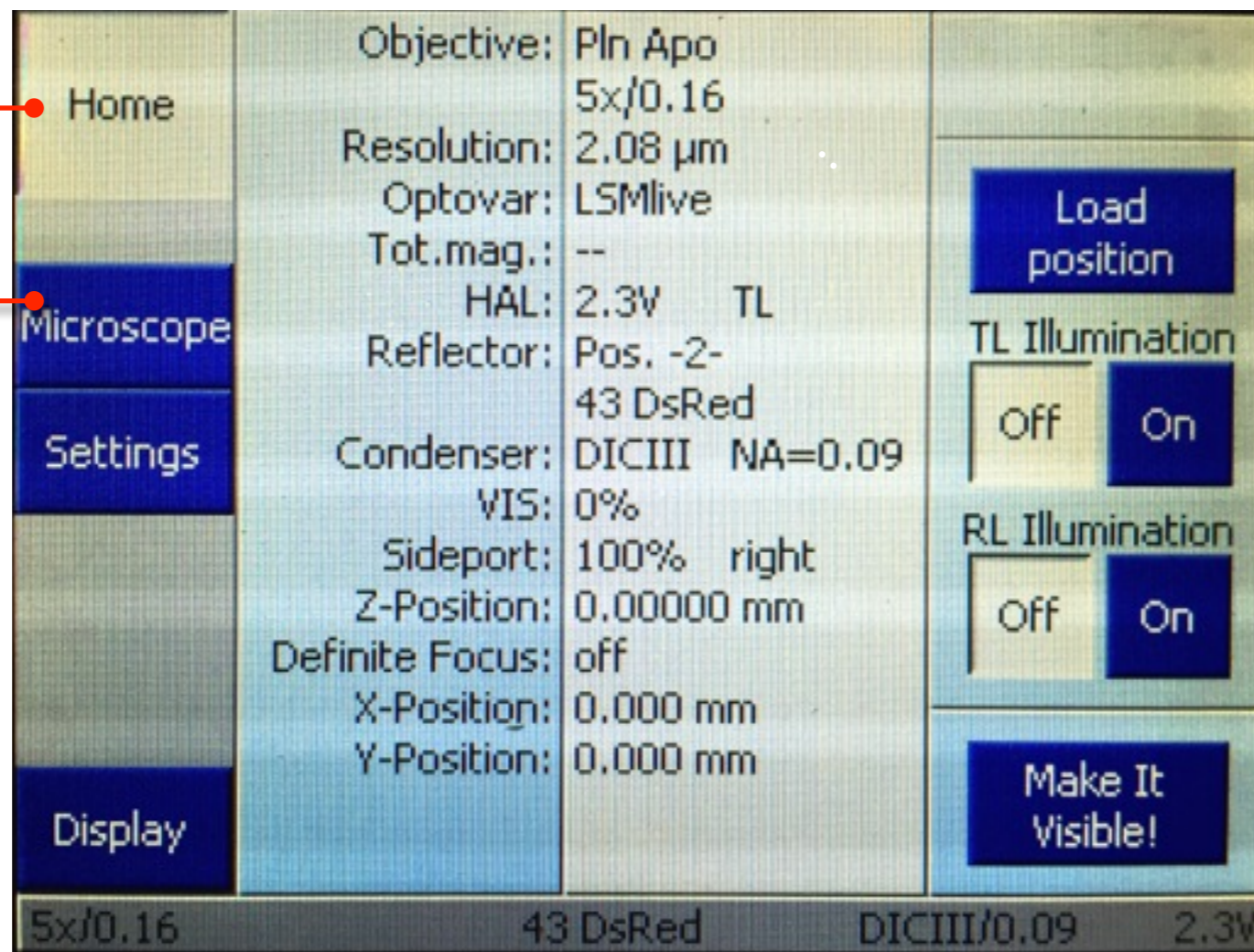


# Start System - Hardwares

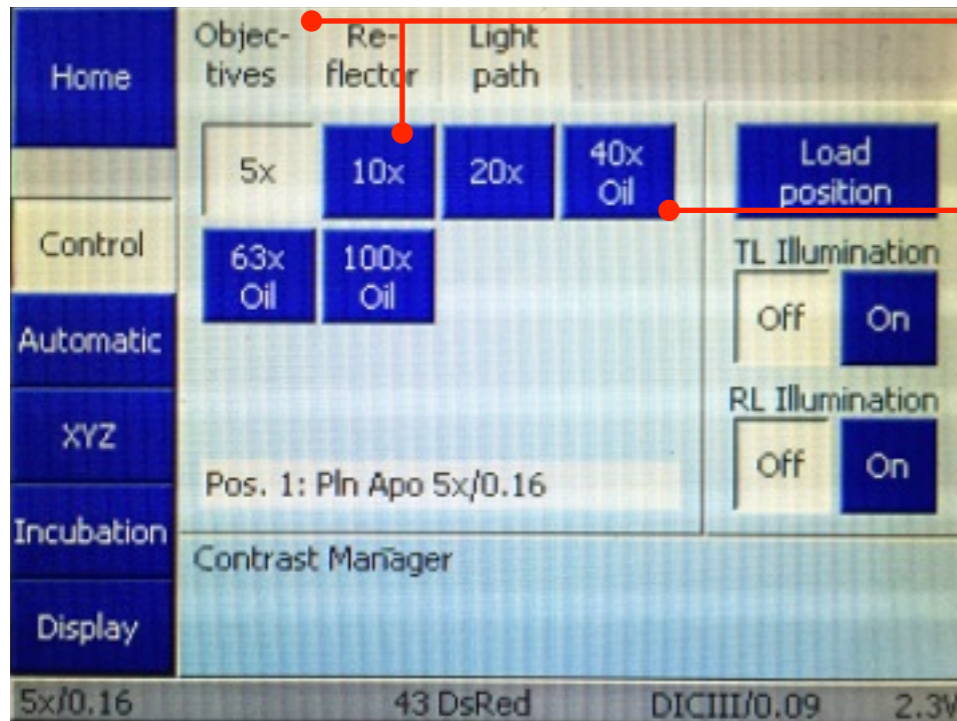


顯微鏡開機後TFT面板“Home”即時顯示目前顯微鏡各部件的狀態

點“Microscope”進入"Control"頁面控制顯微鏡



# Start System - Hardwares

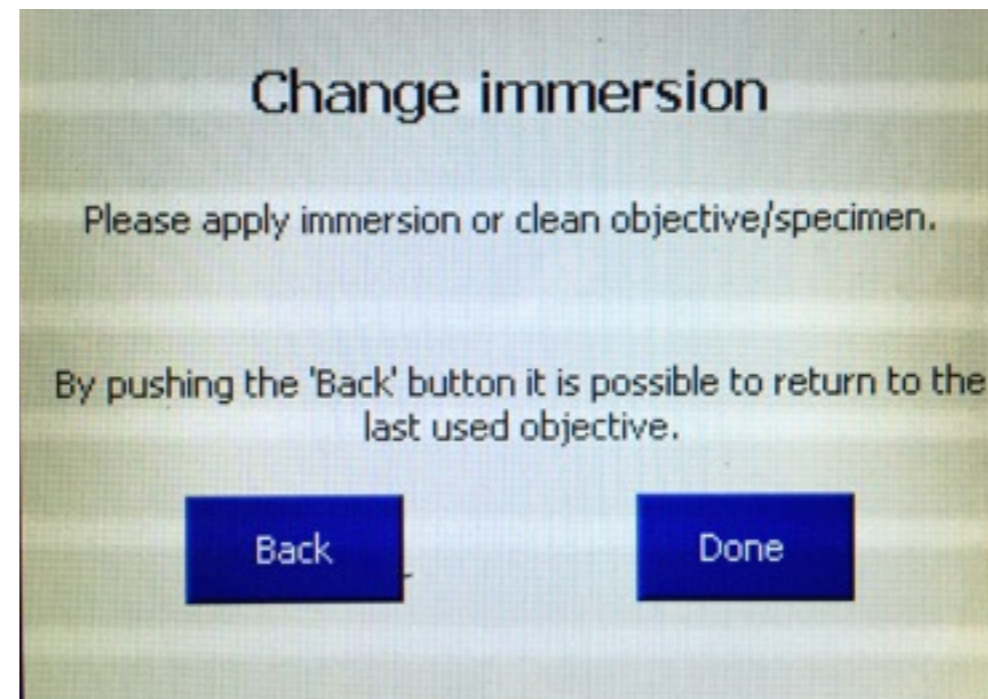


Control頁面裡點選“Objectives”可選擇物鏡

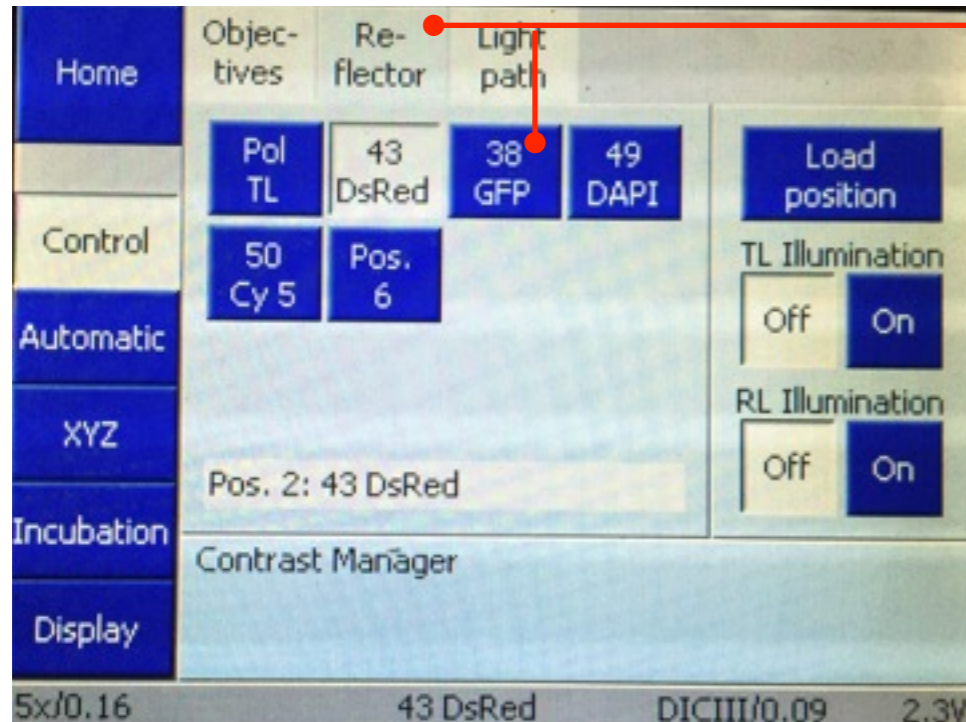
從非油鏡切換至油鏡前會出現如下方提示畫面，  
務必注意鏡油是否已點上；  
反之，請先擦除油鏡上及玻片上的油再切換至非油鏡

按“Done”完成切換

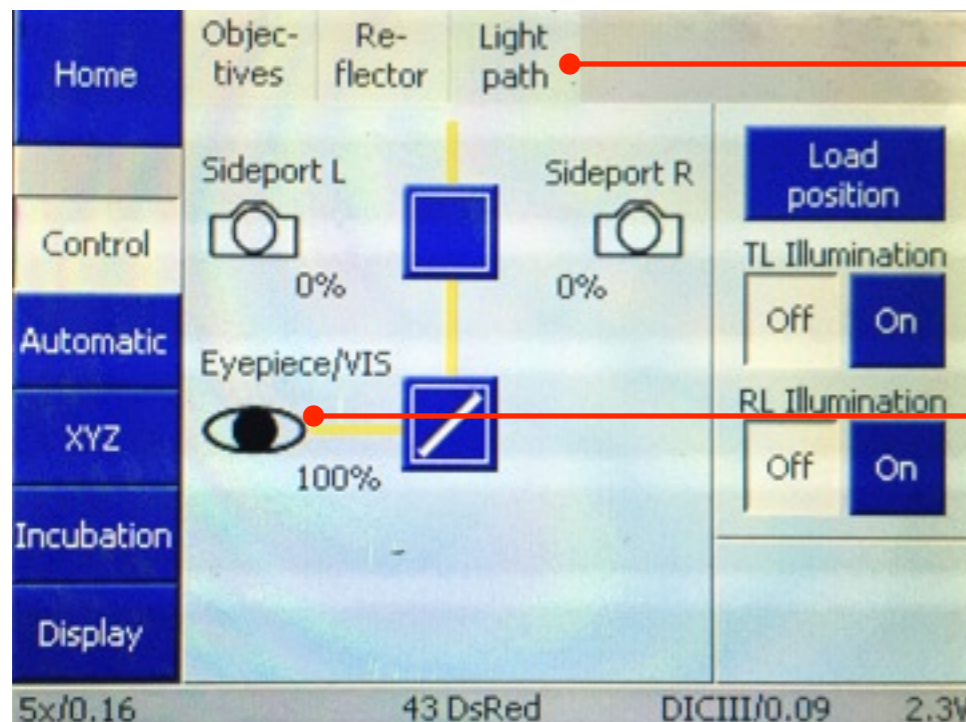
若誤切換物鏡，“Back”可返回前物鏡



# Start System - Hardwares



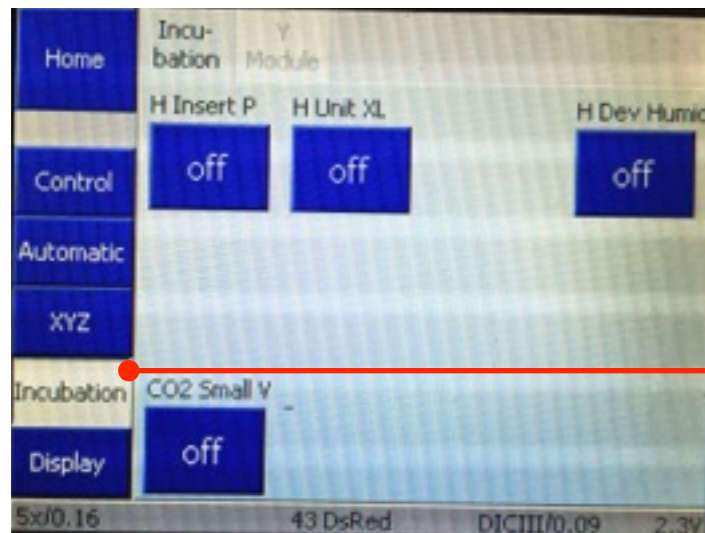
“Reflector”頁面中可切換不同螢光濾片



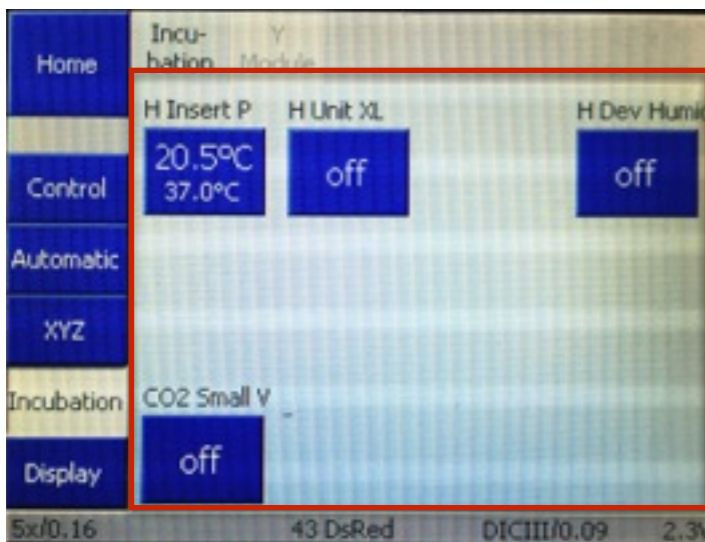
“Light path”頁面中可切換光路

點“Eyepiece/VIS”將光路切換至目鏡，  
使用眼睛觀察樣本並對焦

# Start System - Incubation



“Incubation”可設定細胞培養箱



點選按鈕以設定下列裝置：

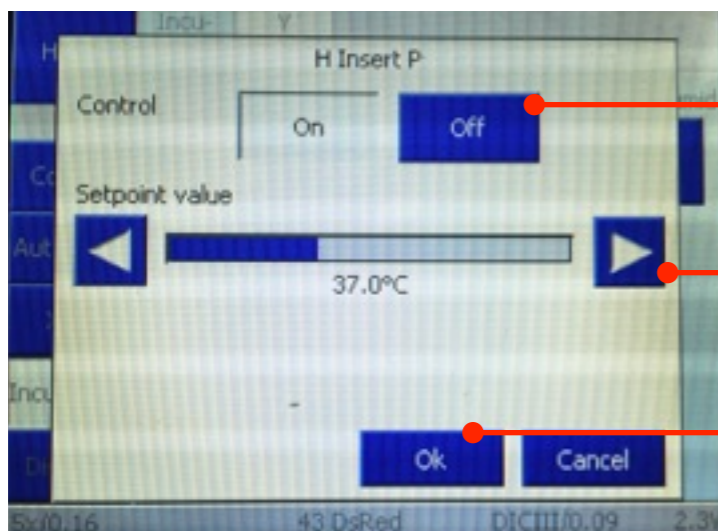
H Insert P 小型溫控板溫度

H Unit XL 大型壓克力培養箱溫度

H Dev Humid 加濕器溫度

CO2 Small V 二氧化碳濃度

(實驗前請確定設備可正常運作、溫濕度控制&CO2供應)



“On”或“Off”啓閉裝置

以箭頭增減目標數值

“Ok”完成設定

# Start System - Software



1. 點選桌面上的"CONFOCAL"圖示, 啟動ZEN2

2. 點選"Start System", 讓ZEN2啟動系統

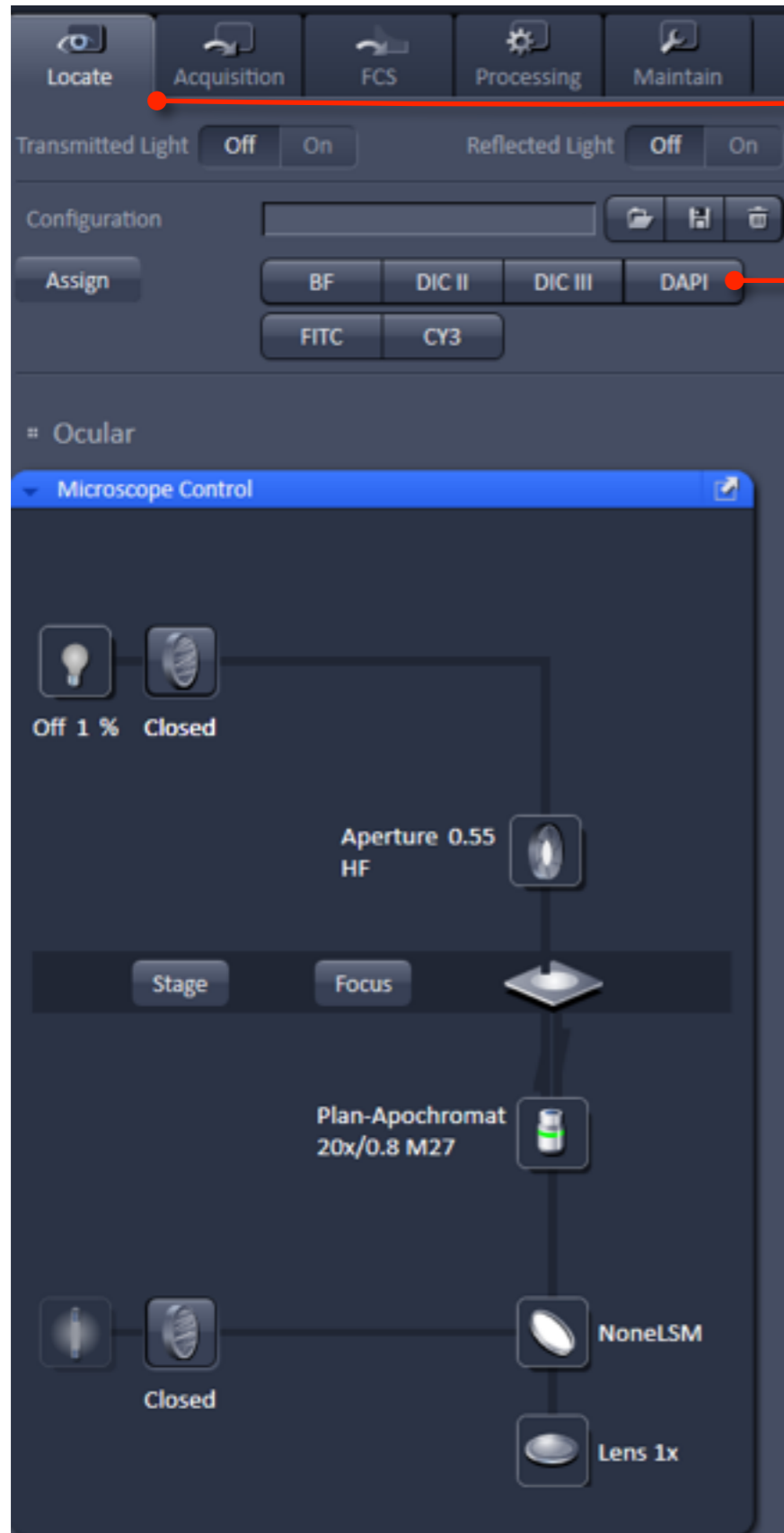






Snap

# Locate - Microscope Control



點選Locate, 進行初步操控顯微鏡

點"DAPI", 以DAPI進行對焦,  
或切換其他光路檢視樣本

光路設定：

BF-明視野 DICII-干涉相位差II DICIII-干涉相位差III

DAPI-藍螢光 FITC-綠螢光 CY3-橙螢光

# Locate - Incubation



	設定值	實際數值
Temperature (°C)		
<input checked="" type="checkbox"/> H Insert P	37.0	20.5
<input checked="" type="checkbox"/> H Unit XL	20.0	20.1
<input checked="" type="checkbox"/> H Dev Humid	37.0	19.7
<hr/>		
Atmosphere (%)		
<input checked="" type="checkbox"/> CO <sub>2</sub>	5.0	0.1

除可於TFT觸控面板操控溫度、CO<sub>2</sub>，軟體上亦可操作Incubation

勾選項目啟動硬體並在設定值欄位輸入數值：

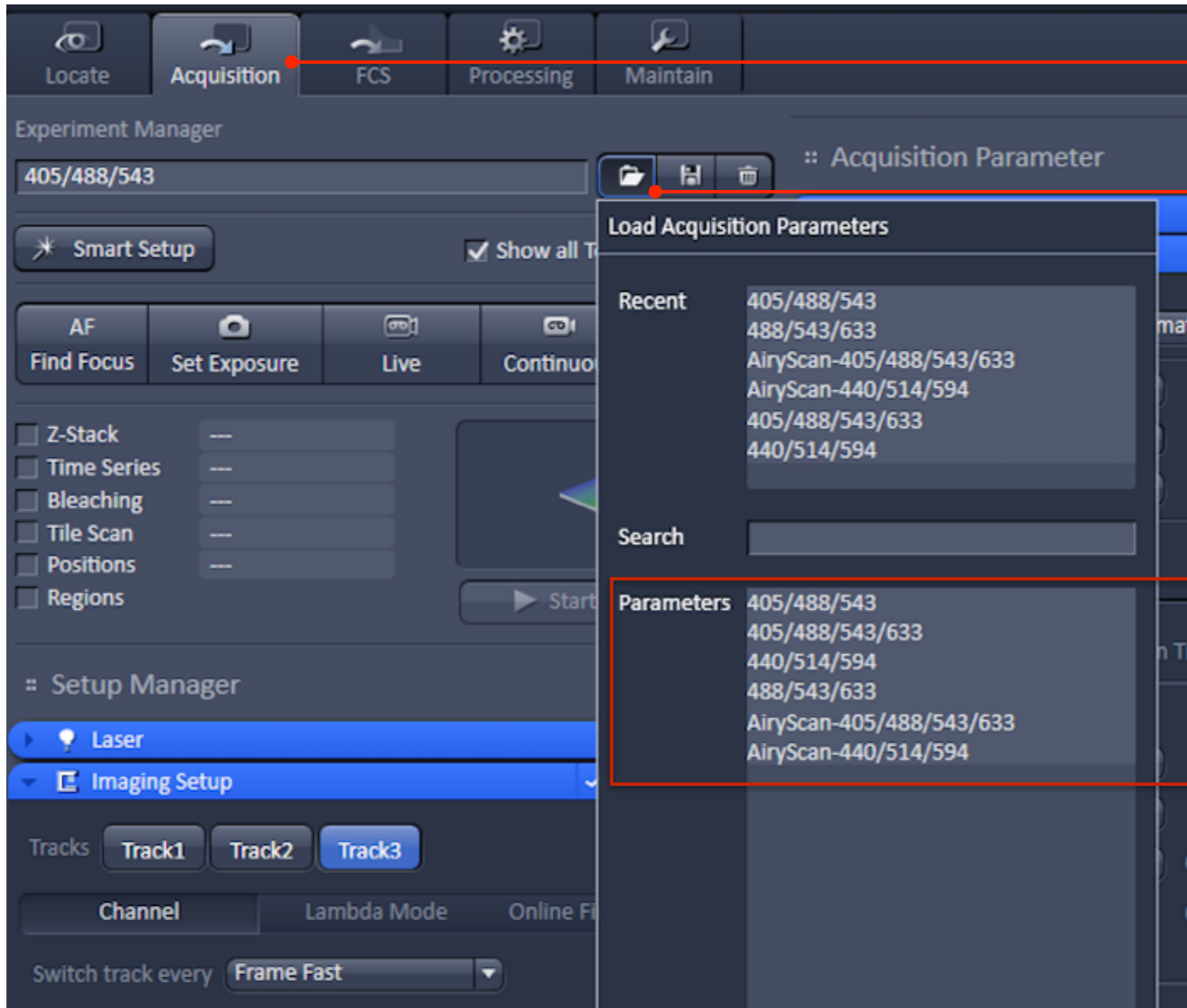
H Insert P - 小型加熱板溫度

H Unit XL - 壓克力培養箱溫度

H Dev Humid - 加濕器溫度

CO<sub>2</sub> - 二氧化碳濃度(使用前請打開隔壁鋼瓶氣閥)

# Acquisition - Experiment Manager



點選"Acquisition"  
開始confocal拍照設定

1. Experiment Manager :  
選擇拍照雷射波長，顯微鏡  
將自動切換對應的光路組態  
(Tracks)

\* 請勿任意更改，儲存或刪  
除設定，如需特殊設定請洽  
儀器管理員

# Acquisition - Channels



Imaging Setup ✓ Show all

Tracks Track1 Track2 Track3 + 🗑️

Channel Lambda Mode Online Fingerprinting

Switch track every Frame Fast

Track3

400 500 600 700

Use	Dye	Color	Detector	Range	+	-
<input type="checkbox"/>			Ch1	405-461nm		
<input type="checkbox"/>			Ch2 GaAsP	500-551nm		
<input checked="" type="checkbox"/>	Cy3		Ch3	550-735nm		

Reflection

Plate ChA

Mirror

MBS 488/543 Visible Light

2. 依序檢視每個Track的設定組態

3. 在此可選擇適合實驗的Dye  
如需更改收光波長範圍請洽儀器管理員

# Acquisition - Channels



Imaging Setup ✓ Show all

Tracks Track1 Track2 Track3 + 🗑️

Channel Lambda Mode Online Fingerprinting

Switch track every Frame Fast

Track3

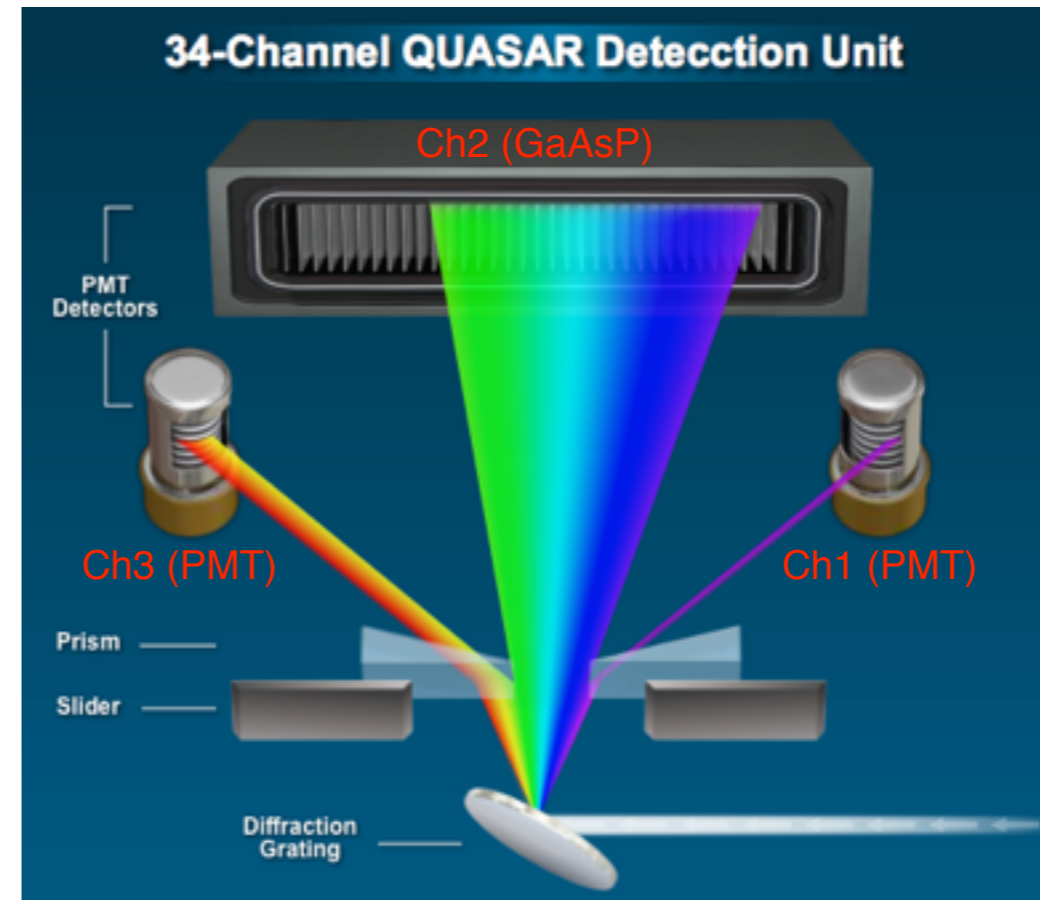
400 500 600 700

Use	Dye	Color	Detector	Range	+	-
<input type="checkbox"/>			Ch1	405-461nm		
<input type="checkbox"/>			Ch2 GaAsP	500-551nm		
<input checked="" type="checkbox"/>	Cy3		Ch3	550-735nm		

Reflection

MBS 488/543 Visible Light

Mirror Plate ChA



勿更動掃圖的感光器\*

如需更改收光波長範圍請洽儀器管理員

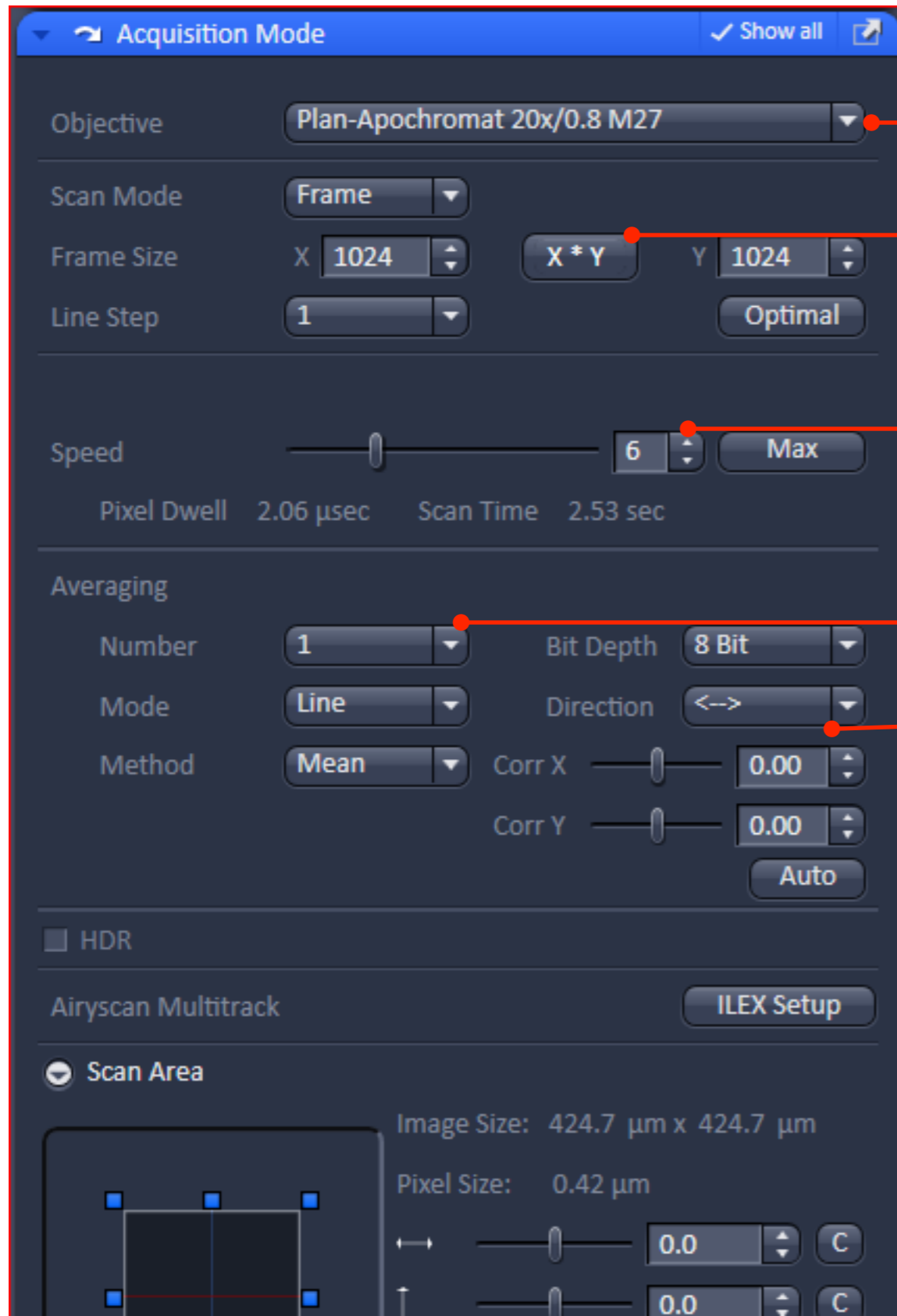
\*一般情況下:

短波長(藍光)由Ch1 PMT接收

中波長(綠光)由Ch2 GaAsP接收

長波長(紅光)由Ch3 PMT接收

# Acquisition - Acquisition Mode



4. 確認物鏡倍率

5. 選擇預覽解析度：  
預覽時可用較低解析度(ex:  $\leq 512 \times 512$ )，  
擷取影像時可提高解析度

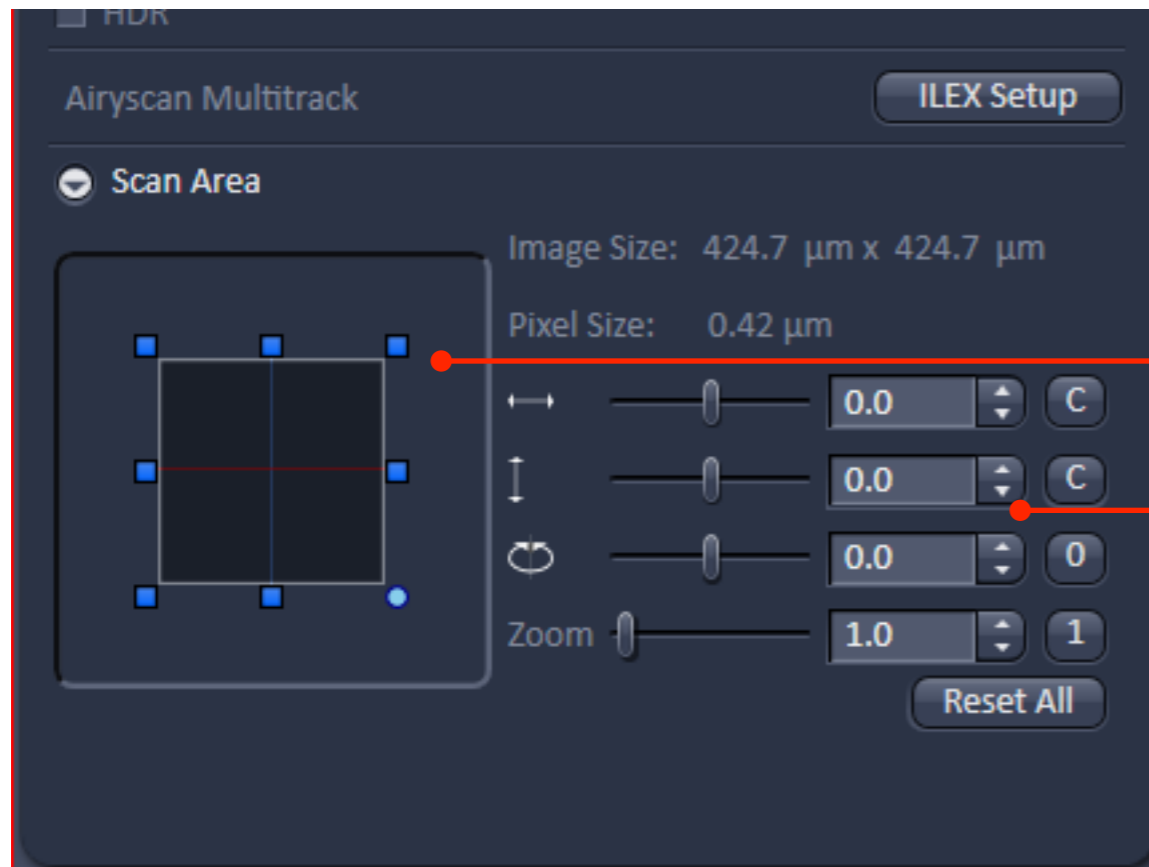
6. 調整掃圖速度

\*速度必須  $\leq 7$ ，速度太快將導致掃描馬達損壞！  
變更掃圖解析度時此數值也會改變，務必特別注意！！

7. 預覽時Averaging Number=1，擷取影像時可增加  
Averaging Number以降低雜訊，但所需時間亦會增加

設定單向拍攝 “->”

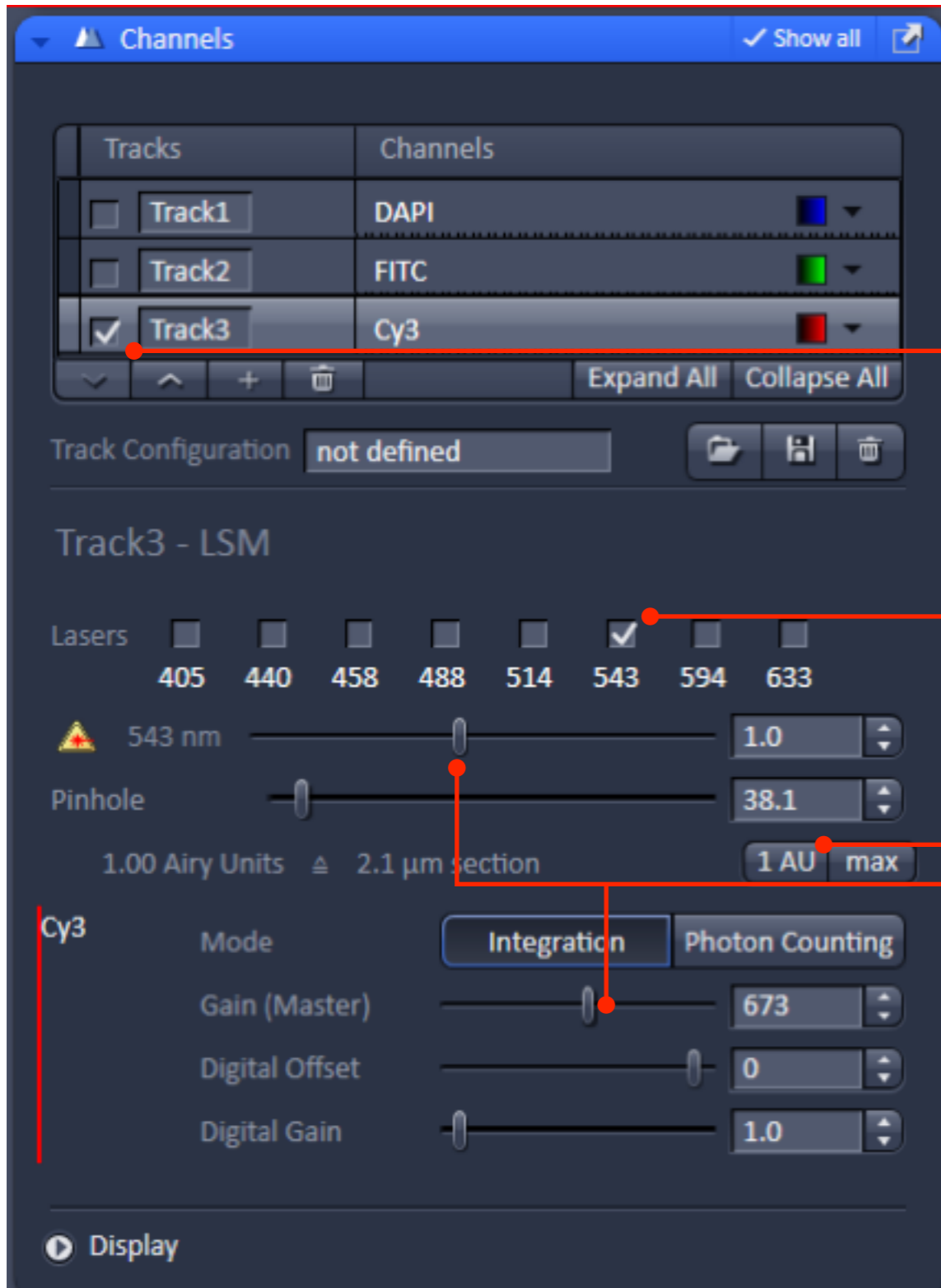
# Acquisition - Acquisition Mode



8. 掃描版面歸零：zoom=0.6，或可變更改為局部掃圖，拖曳方框可變更局部掃圖範圍
- 或設定掃圖範圍高，寬，旋轉角度



# Acquisition - Channels



先前在Experiment Manager選擇拍照雷射後  
光路組態(Tracks)已自動產生,並自動開啟所需雷射

9. 設定拍照需要的波長種類(Track)  
一次單獨勾選一個Track，取消勾選其他Track

10. 軟體自動啟動對應的雷射

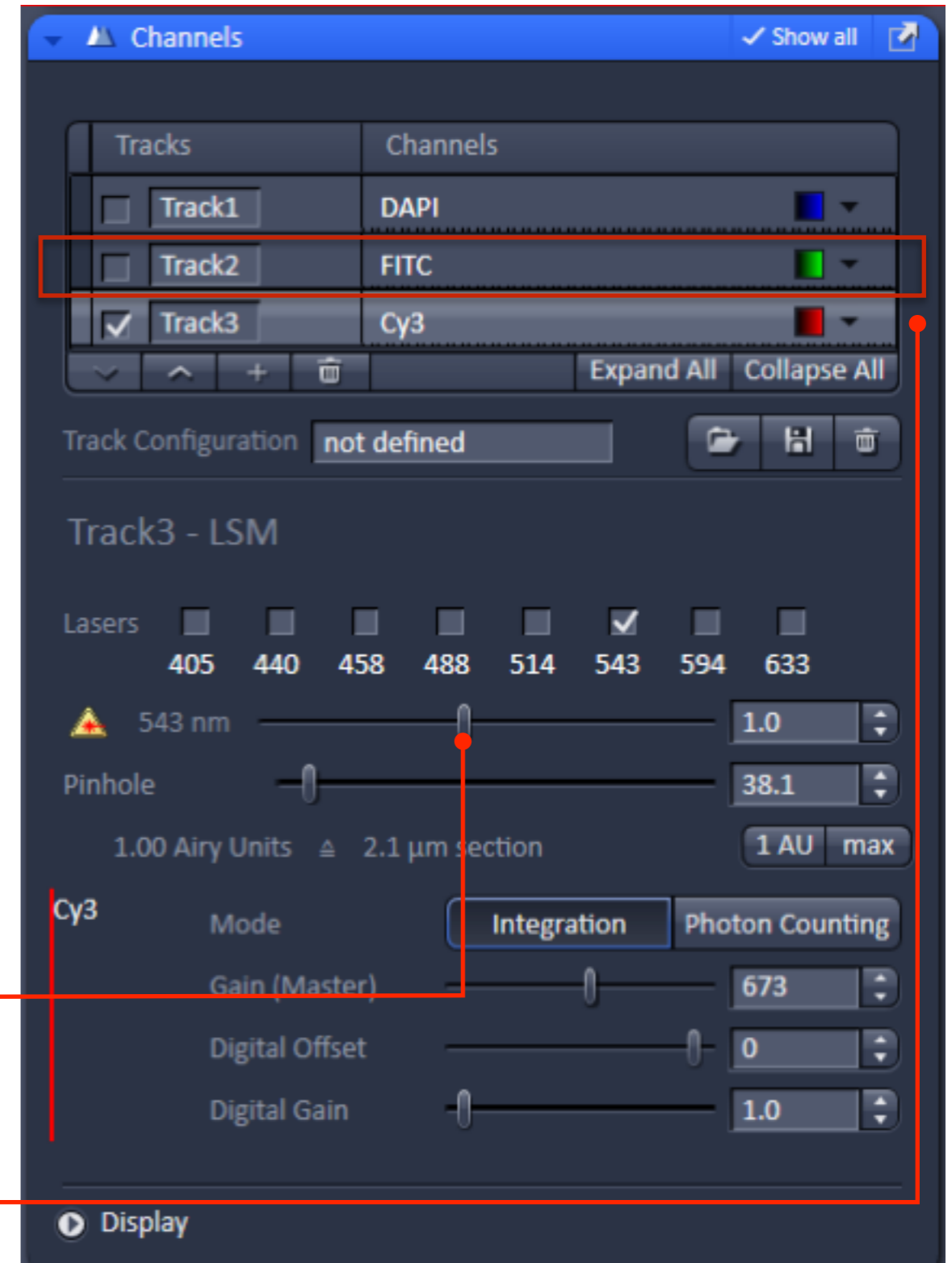
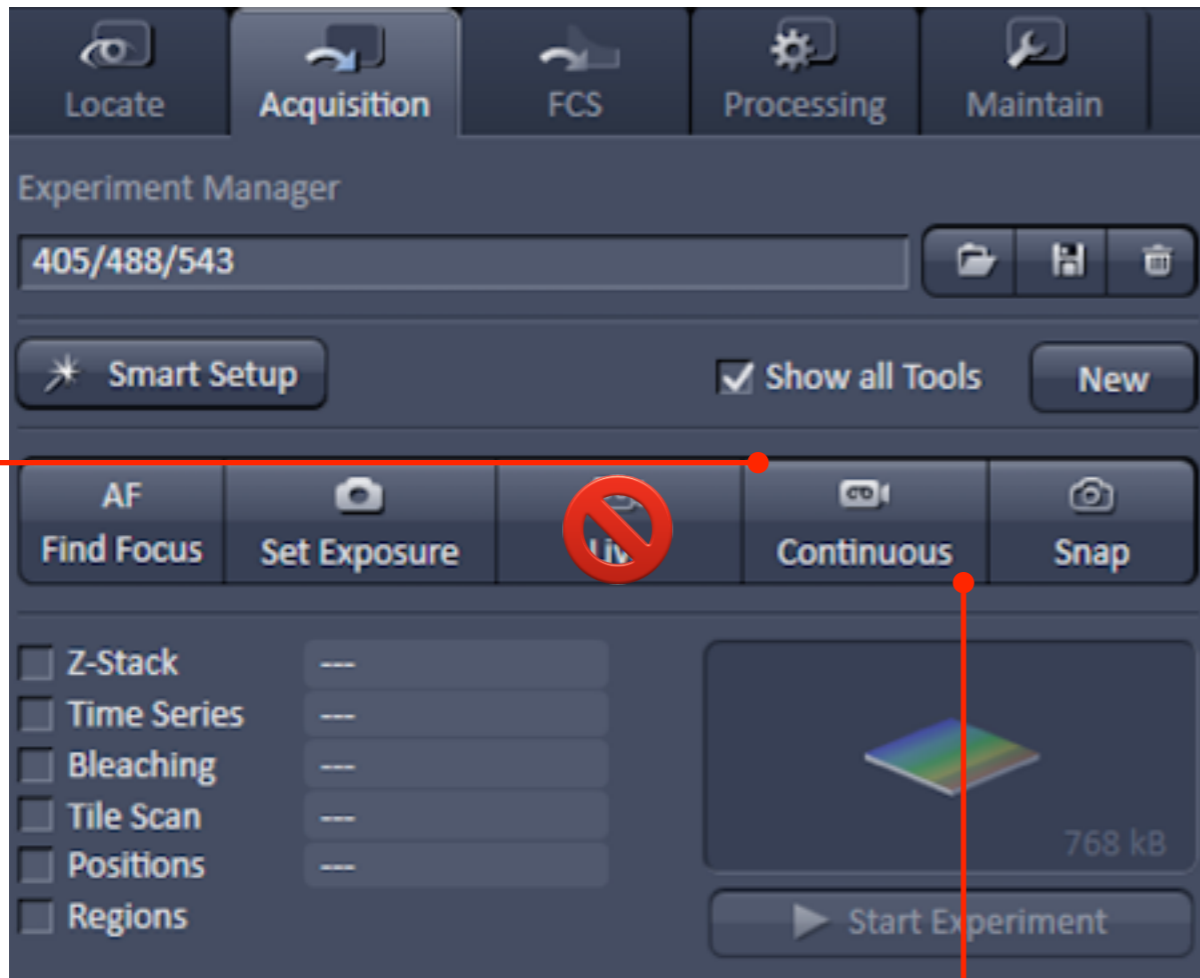
11. 點選"1 AU", 將Pinhole調整成1 Airy Unit

12. 調整 雷射強度 及 Gain (建議值)

405/440	3%	700
488	10%	700
543/594	30%	700
633	10%	700

(雷射切勿過強, 長時間過曝將造成樣本bleach及感測器燒燬)

# Acquisition - Continuous and Snap



13. “Continuous”預覽掃圖畫面

\*切勿點選左邊”Live”按鈕，長時間Live將導致scanner毀損

14. 適當調整對焦，雷射強度及Gain

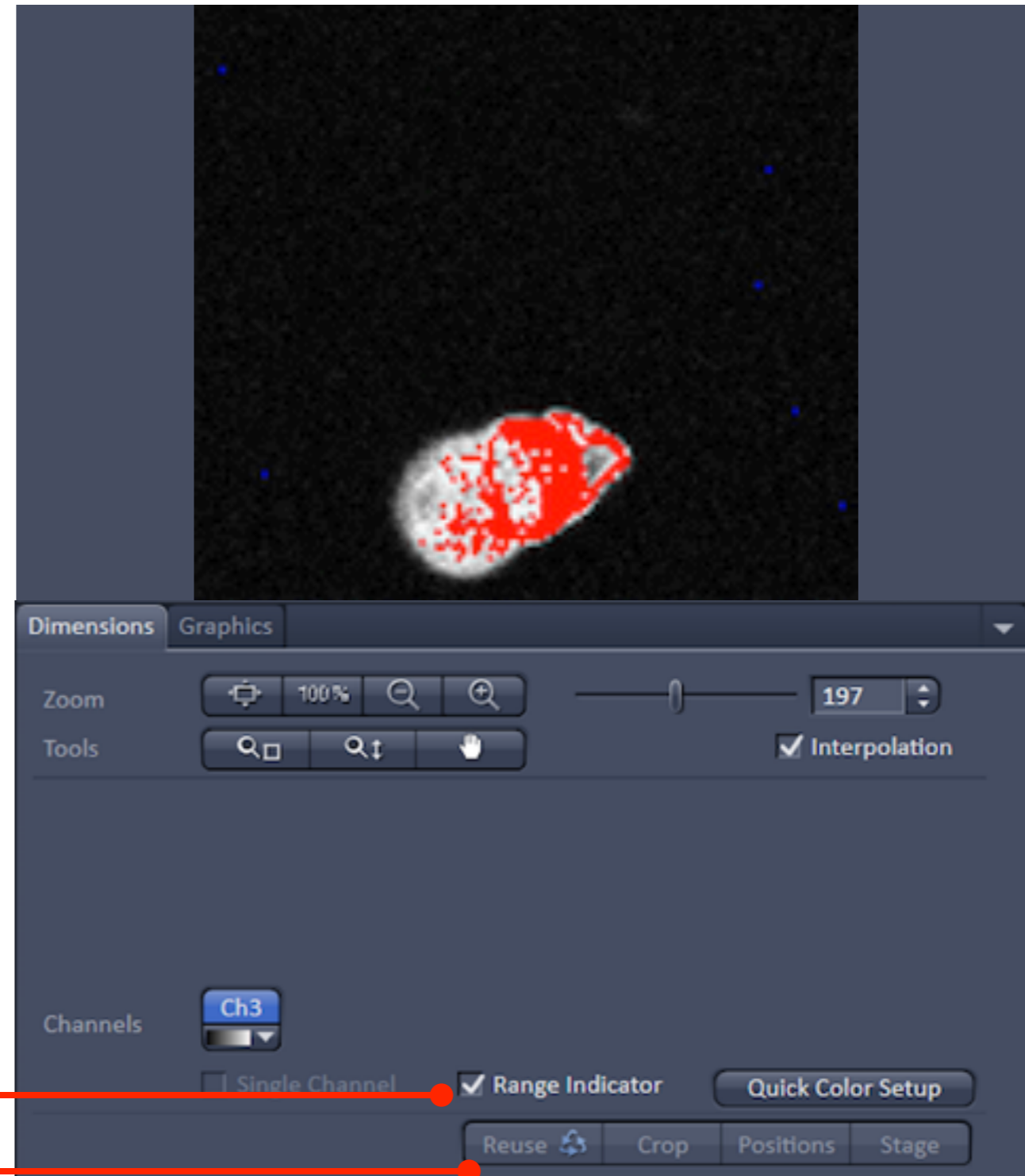
15. ”Stop” Continuous 停止預覽

\*若同時還需拍攝其他波長，改選其他track，調整Gain值 & 雷射強度至適當亮度。

# Acquisition - Continuous and Snap



\*若在預覽圖下方“Dimensions”頁面裡勾選“Range Indicator”，過曝區域將以紅色區塊標示。



\*“Reuse”可還原此檔案的拍攝條件：  
Tracks, 雷射波長, 強度, Gain, Pinhole,  
Scan speed, resolution等....

# Acquisition - Acquisition Mode



Acquisition Mode ✓ Show all

Objective: Plan-Apochromat 20x/0.8 M27

Scan Mode: Frame

Frame Size: X 1024 X \* Y Y 1024

Line Step: 1 Optimal

Speed: 6 Max

Pixel Dwell: 2.06  $\mu$ sec Scan Time: 2.53 sec

Averaging

Number: 1 Bit Depth: 8 Bit

Mode: Line Direction: <-->

Method: Mean Corr X: 0.00 Corr Y: 0.00 Auto

HDR

Airyscan Multitrack ILEX Setup

Scan Area

Image Size: 424.7  $\mu$ m x 424.7  $\mu$ m

Pixel Size: 0.42  $\mu$ m

0.0 C

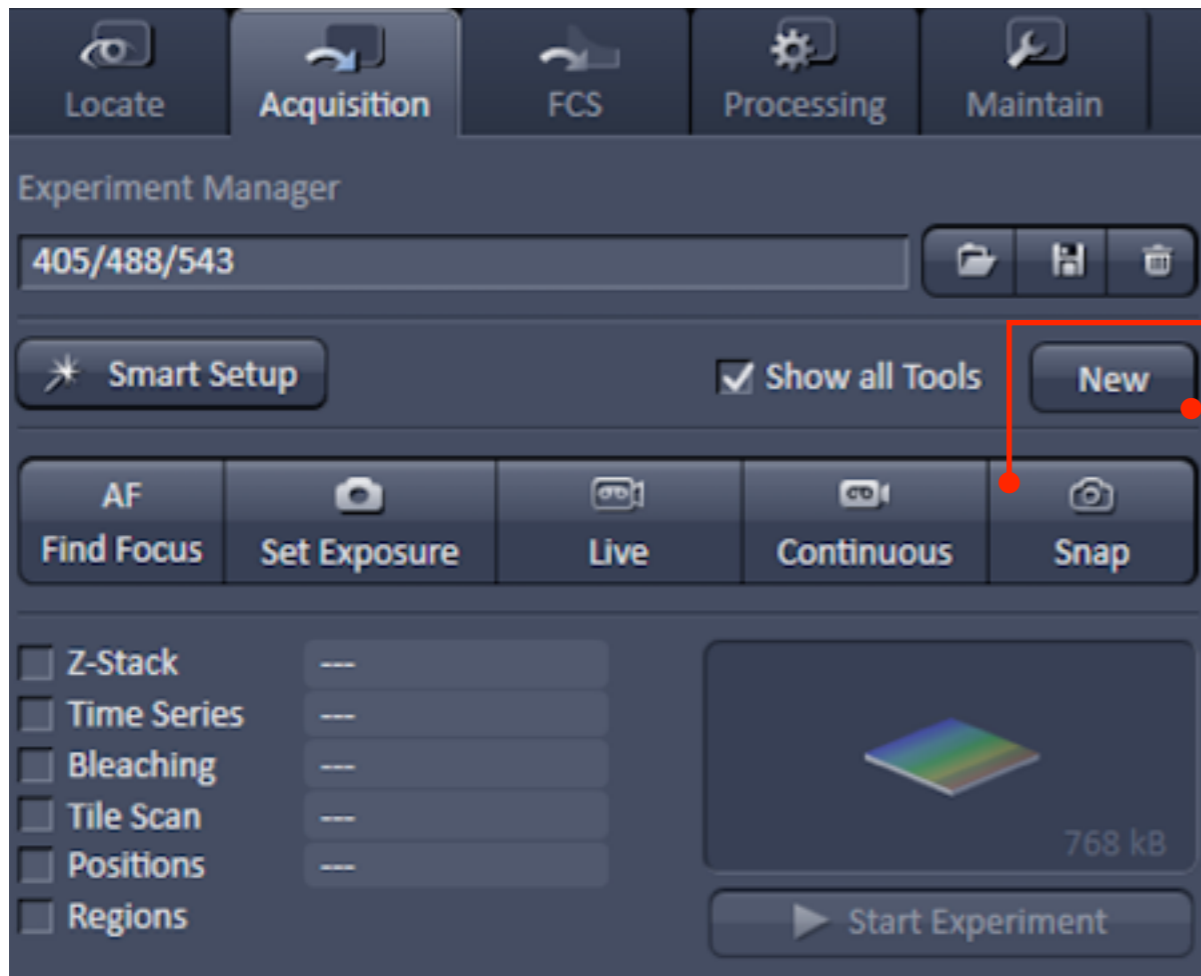
0.0 C

16. 選擇正式掃圖的解析度 (可設定 $\geq 1024 \times 1024$ )

再次確認速度必須 $\leq 7$ , 速度太快將導致掃描馬達損壞!

確認Averaging Number

# Acquisition - Continuous and Snap



17. 按”Snap”完成拍攝

\*欲拍攝新圖片, 點選”NEW”, 重複前述1~17步驟, 完成新圖片拍攝

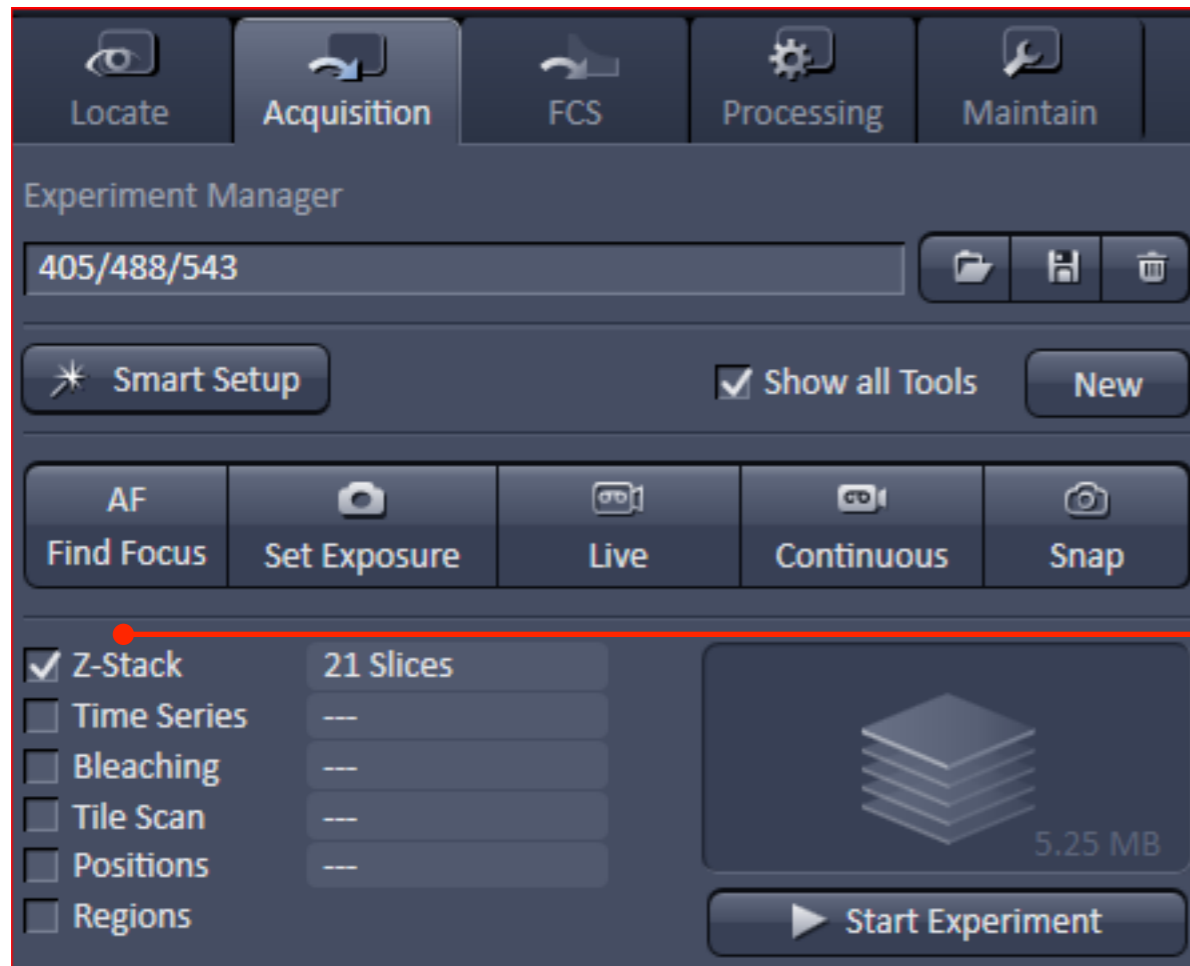
## REVIEW SNAP Steps

- . Load Experiment setting 選擇掃圖需要的波長
- . 調整預覽解析度  $\leq 512 \times 512$ , 並設定掃圖速度  $\leq 7$
- . 單獨調整預覽Track的雷射強度, Pinhole, Gain
- . Continuous開始預覽, 對焦, 再調整雷射, Gain
- . Stop Continuous, Snap!



# Experiment Z-Stack

# Acquisition - Z-stack



1. 先完成Snap的設定步驟1~15
2. 勾選Z-Stack啟動Z軸拍攝功能

# Acquisition - Z-stack



2. “Continuous”啟動掃圖預覽

3. 於Z-Stack子欄位中設定Z軸上界及下界：  
轉動顯微鏡對焦細調節輪，將焦距移至Z軸上界，  
按”Set Last”

\*右手順時針轉對焦細調節輪物鏡上昇，逆時針則下降

4. 轉動顯微鏡對焦調節輪，將焦距移至Z軸下界，  
按”Set First”

5. 按“Optimal”，ZEN自動運算出最佳Z軸堆疊拍攝張數



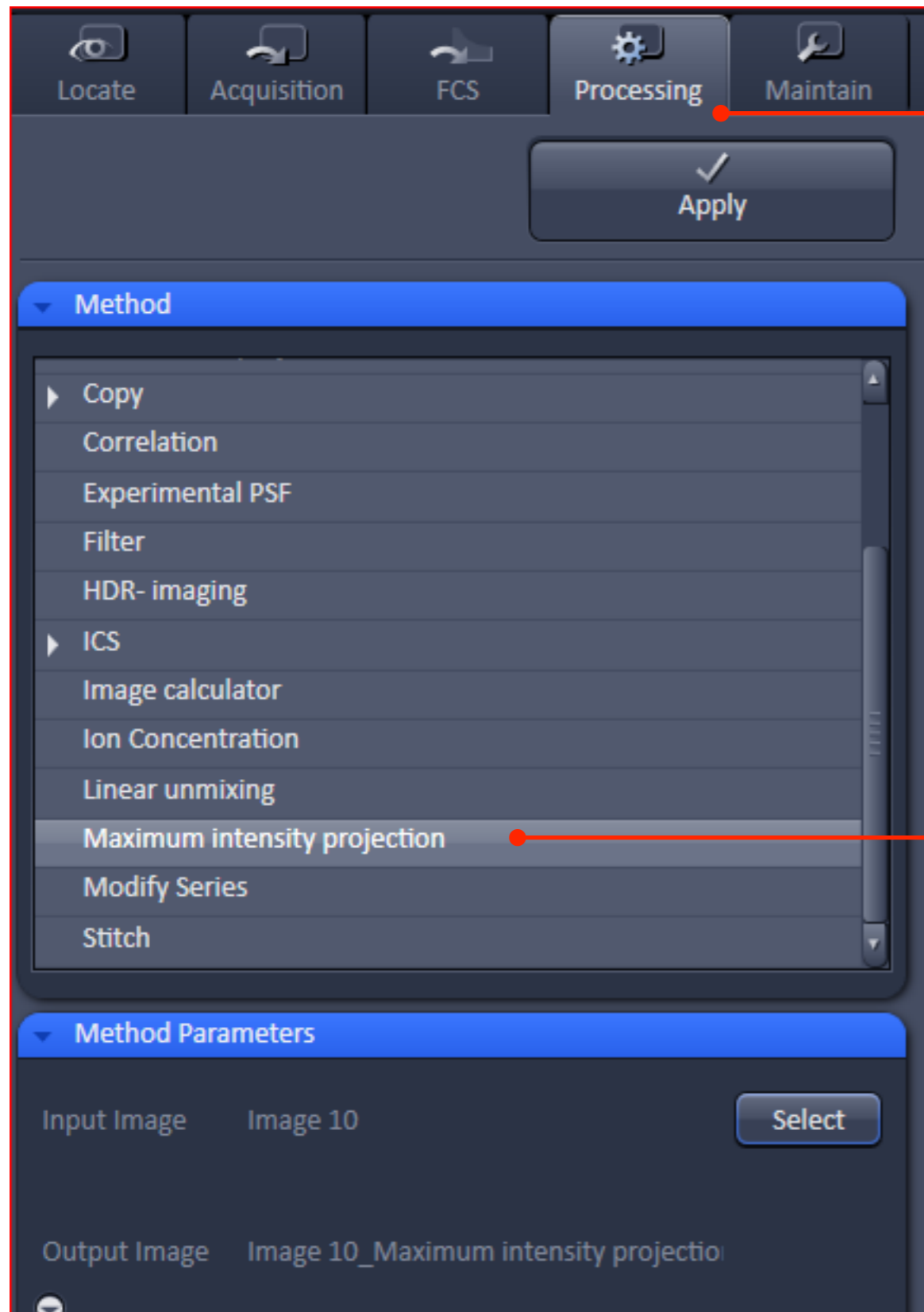
# Acquisition - Z-stack



6. Stop “Continuous”, 確認掃圖解析度

7. “Start Experiment”開始拍攝Z-Stack  
\*若拍攝時需終止拍攝可按”Stop”停止拍攝

# Processing - Maximum Intensity Projection

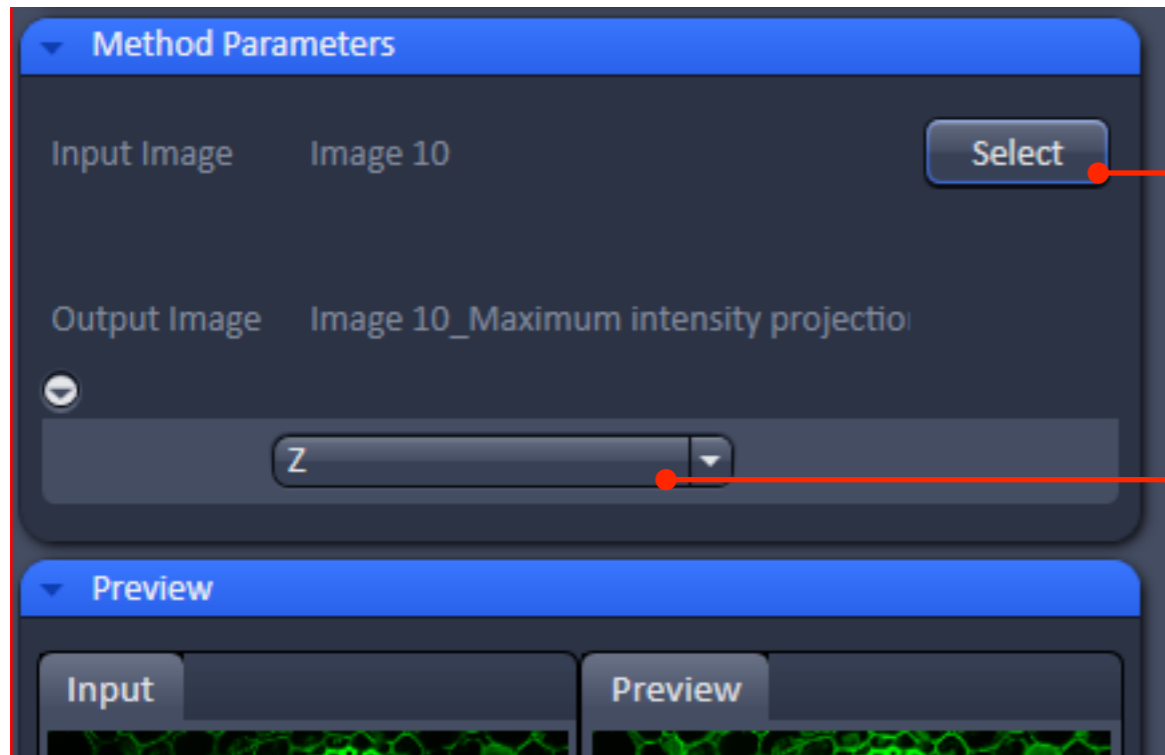


Z-stack可透過疊圖整合為一張全景深影像

1. “Processing”

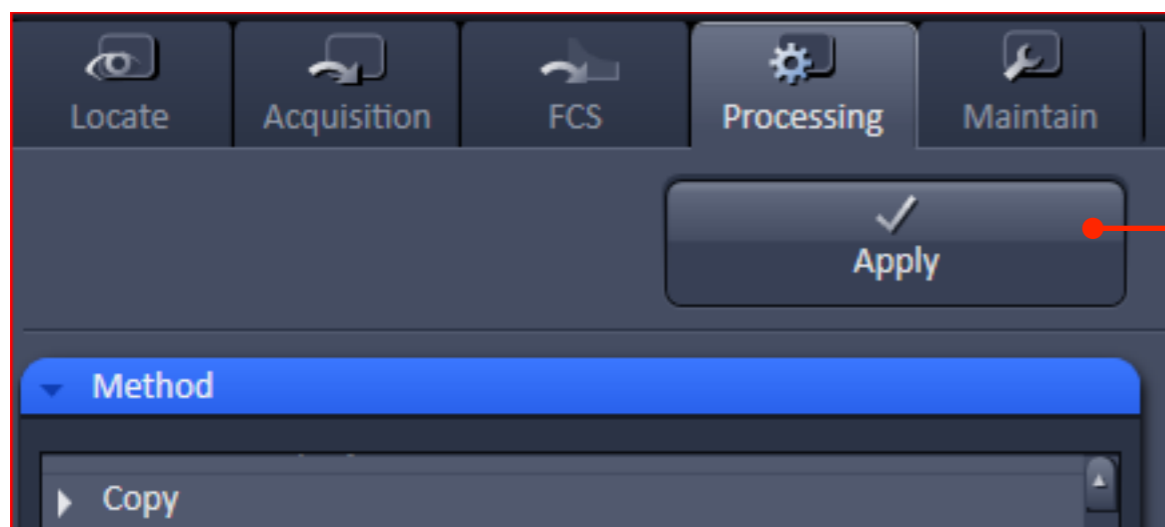
2. 在Method中點選  
“Maximum intensity projection”

# Processing - Maximum Intensity Projection



3. 在Method Parameters中“Select”欲處理的Z-stack檔案

4. 確認模式為“Z”

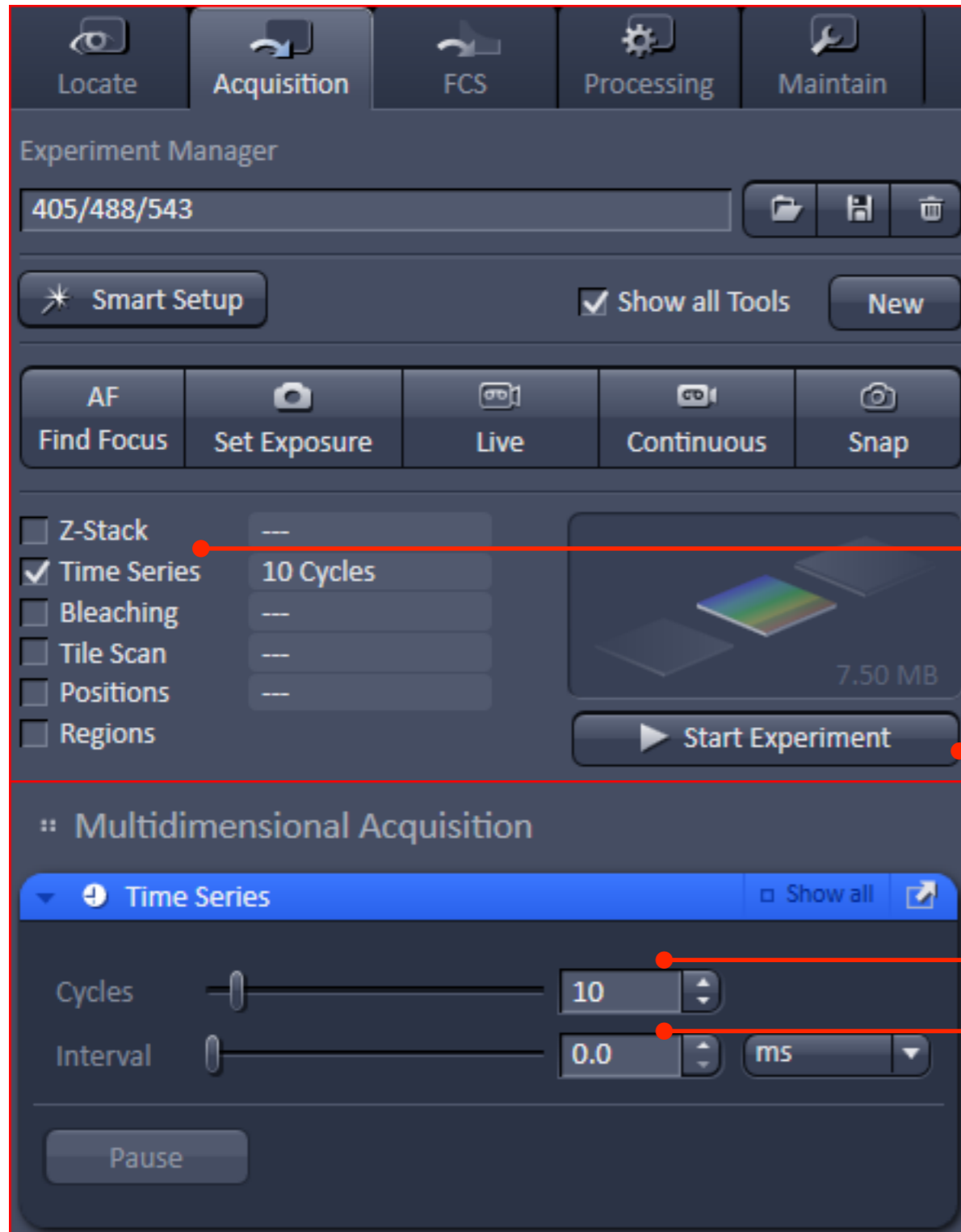


5. 回到視窗上方, 點“Apply”開始處理影像



# Experiment Time Series

# Acquisition - Time Series



1. 先完成Snap的設定步驟1~15

2. 勾選“Time Series”啟動曠時拍攝功能

3. “Cycles”設定拍攝次數

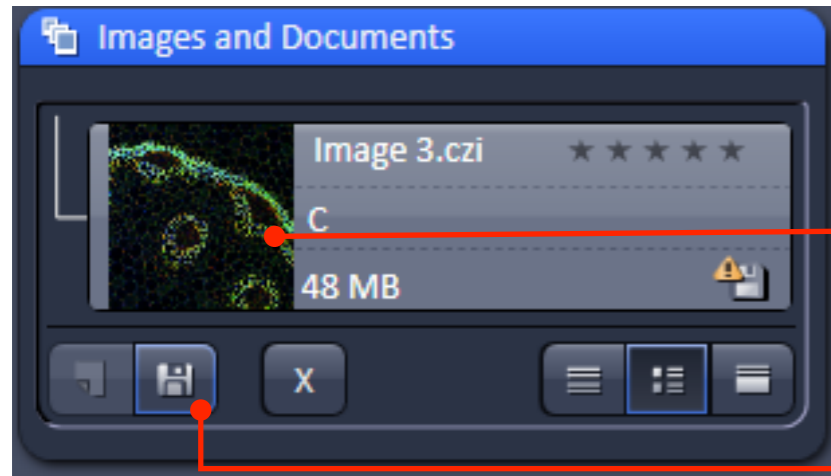
4. “Interval”設定拍攝間隔時間長度及時間單位

5. “Start Experiment”開始曠時拍攝



# Save and Export Images

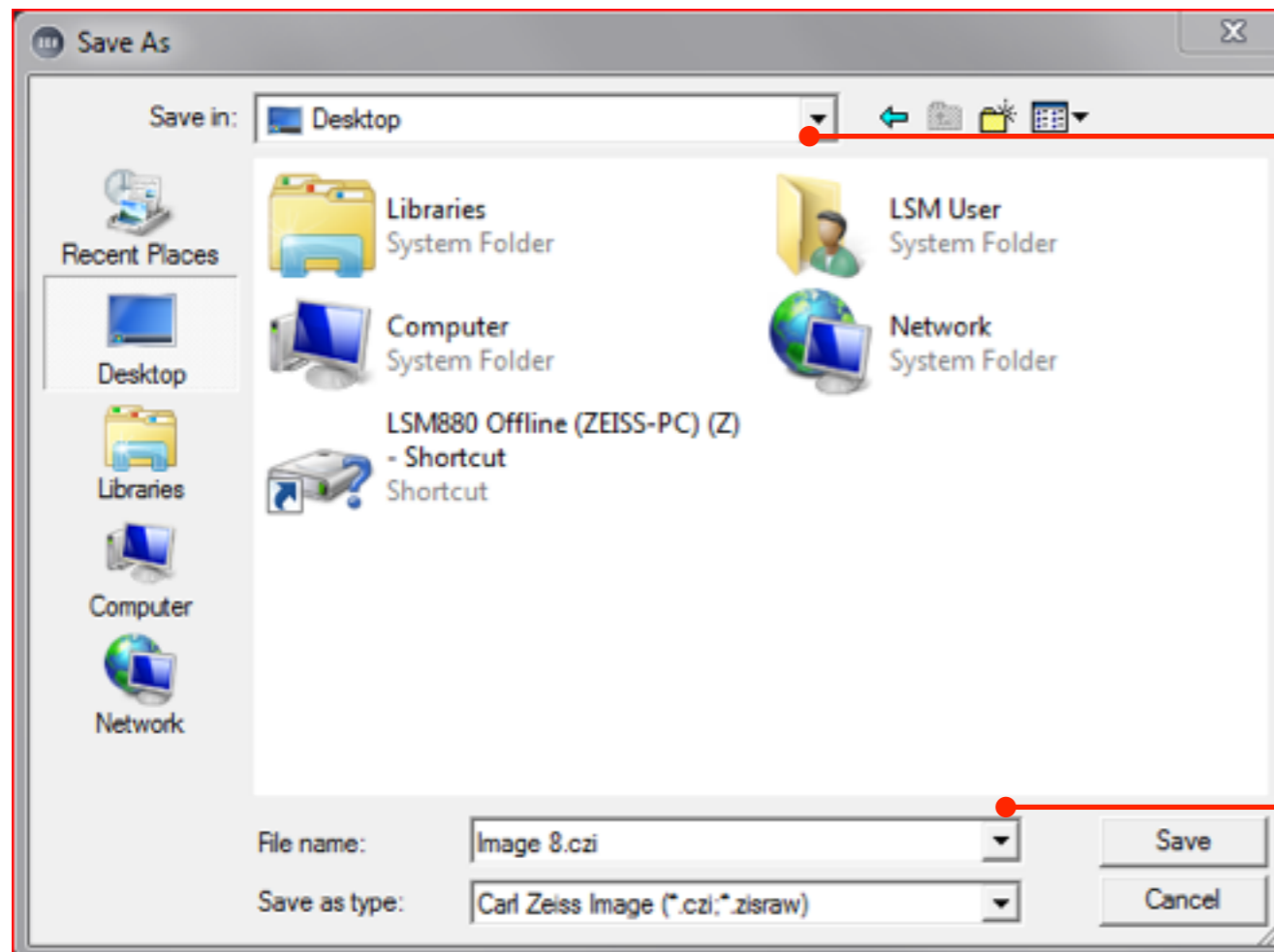
# Save Raw Image



辛苦拍攝影像後，建議將影像先儲存為原始格式以利日後的影像處理及分析

1. 在軟體視窗右上角找到已拍攝完成的影像清單選擇欲儲存的檔案

2. 點選“Save”（儲存檔案）



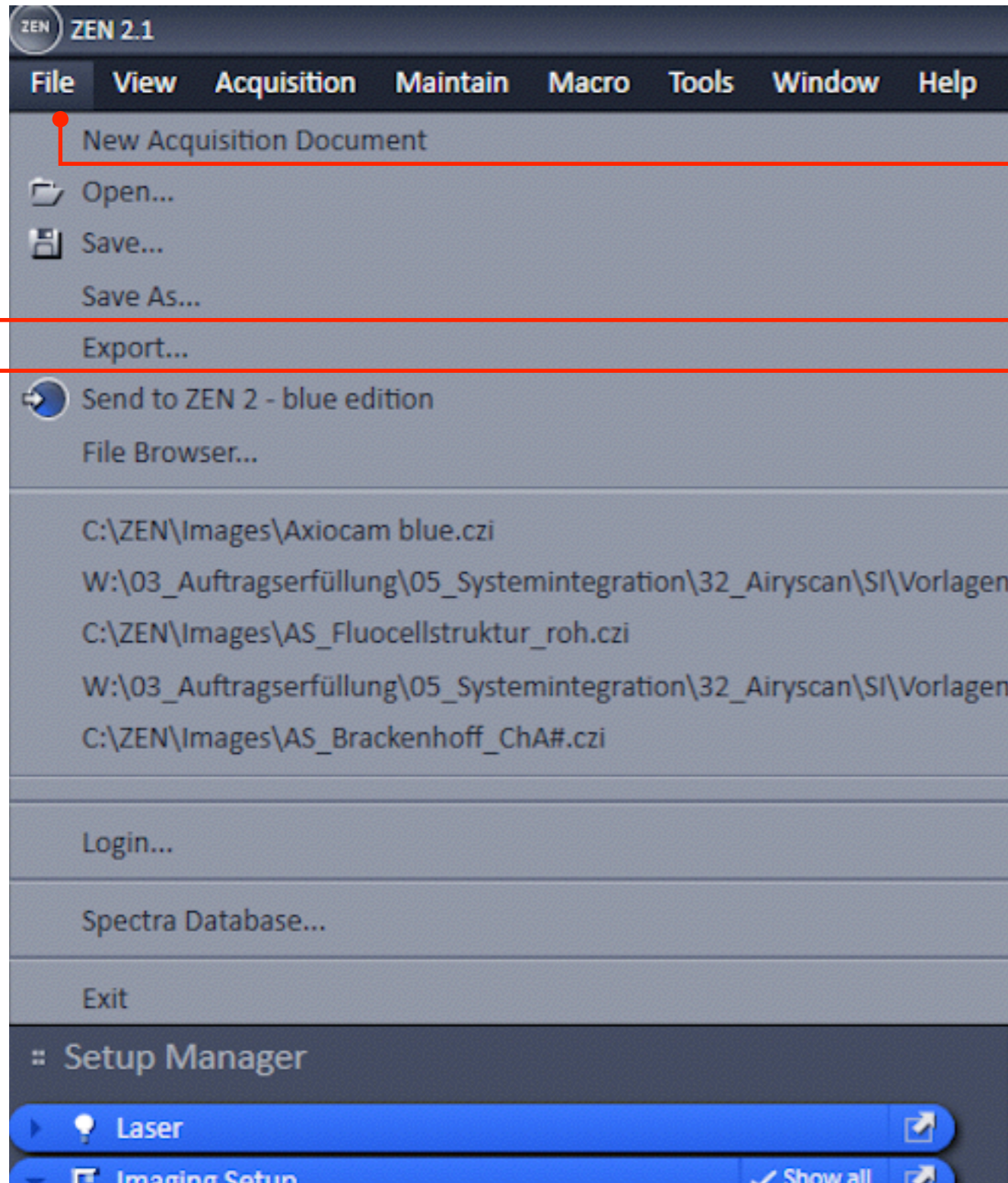
3. 選擇檔案儲存位置D:/105/User

4. 選擇檔案格式為\*.czi, "Save"儲存檔案

# Export Image



若需將原始檔轉換為TIFF或JPG等一般影像格式:

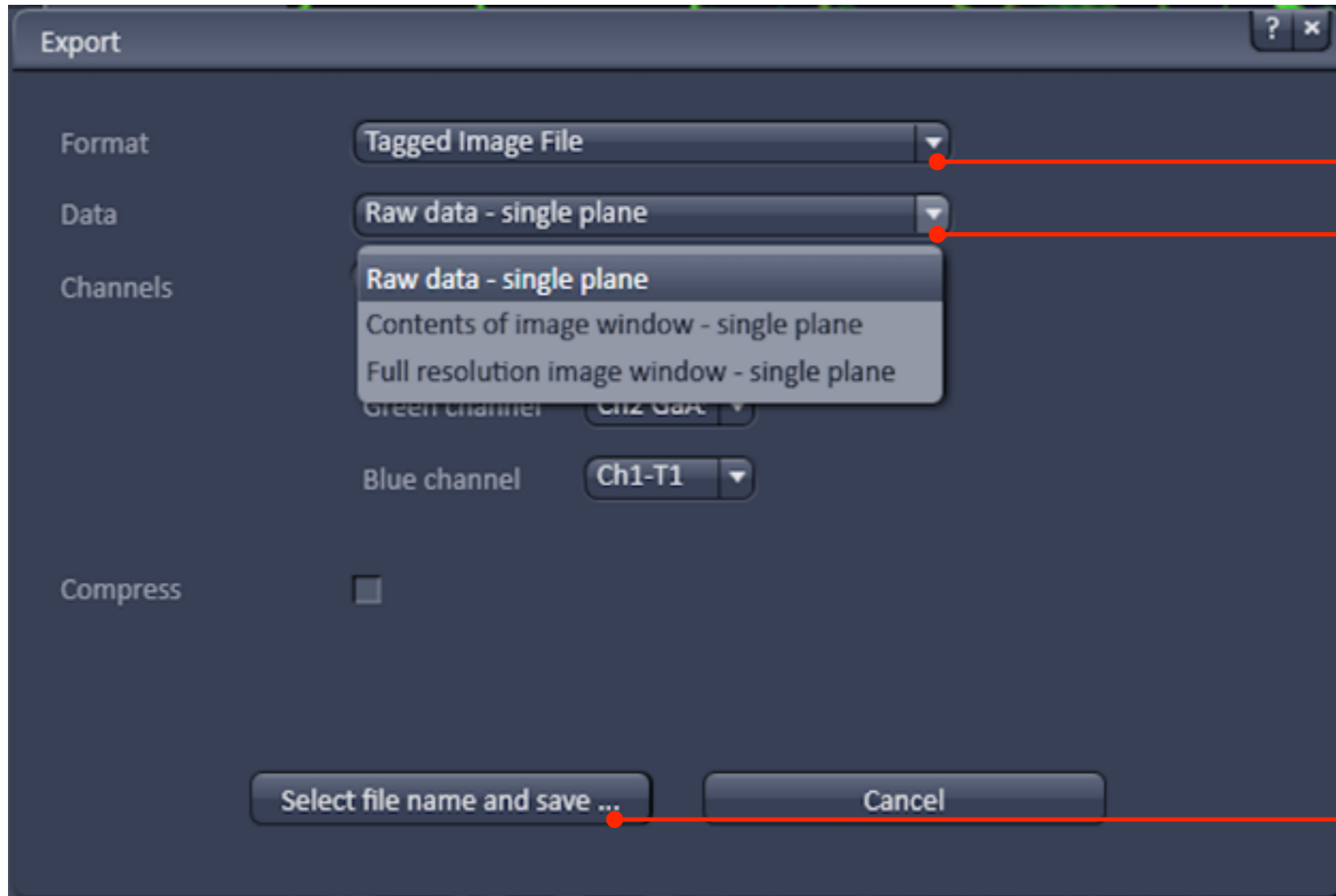


1. 點選軟體視窗左上角"File"

2. 點選 "Export..."



# Export Image



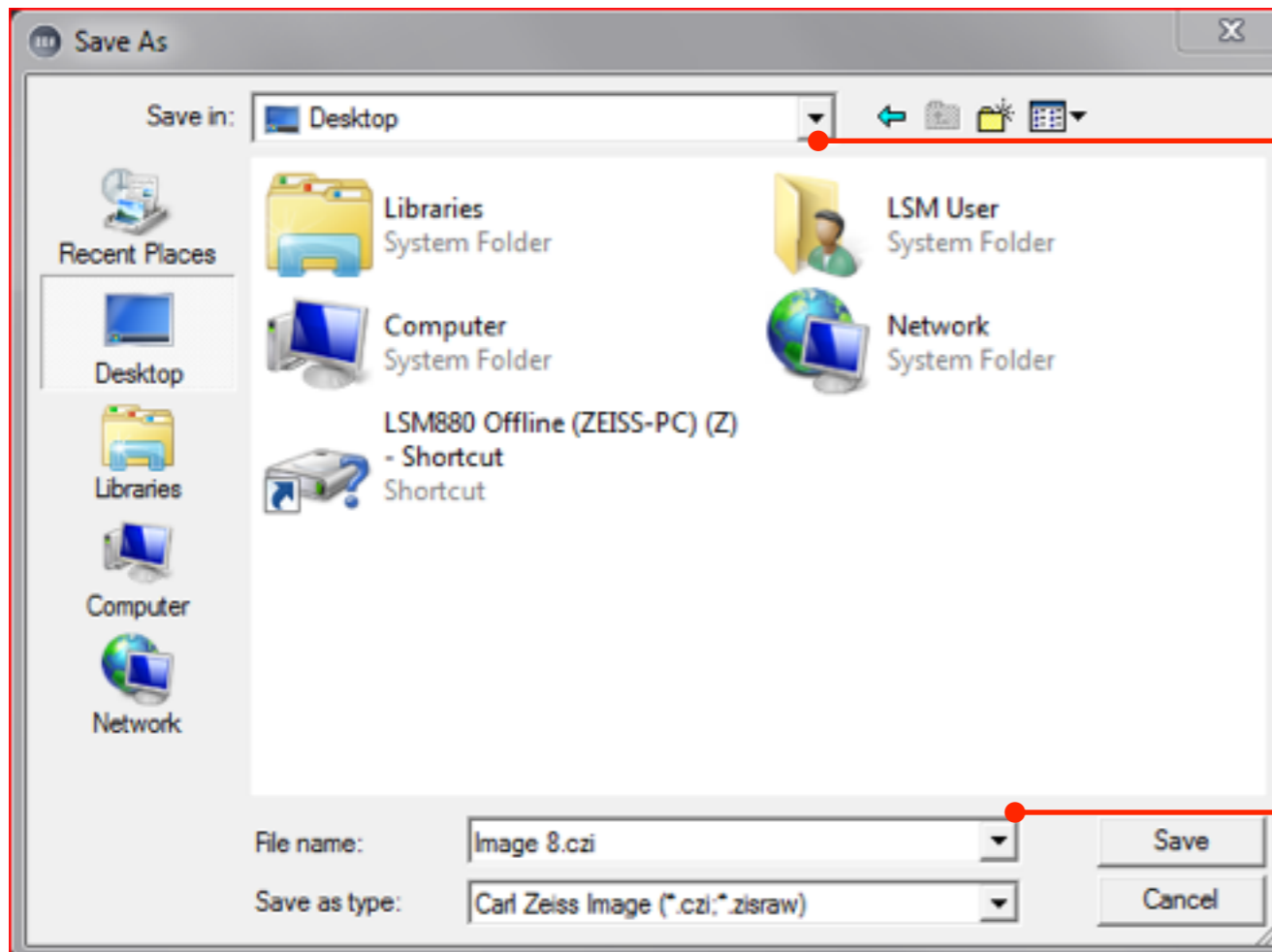
3. 選擇轉檔格式

4. 選擇Full resolution image window

\*Z-stack或Time series則須點選  
“Full resolution image window-series”  
才能將各層/各時間點照片一起輸出

5. 設定儲存位置及檔名

# Export Image



6. 選擇檔案儲存位置D:/105/User

7. 選擇檔案格式為\*Tiff, "Save"儲存檔案



Congratulations !!