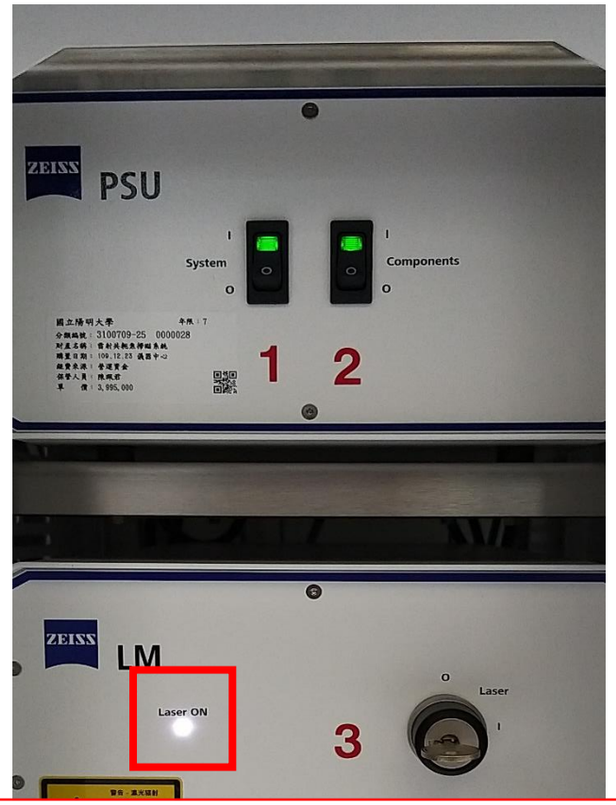
ZEISS LSM 900 System Tutorial

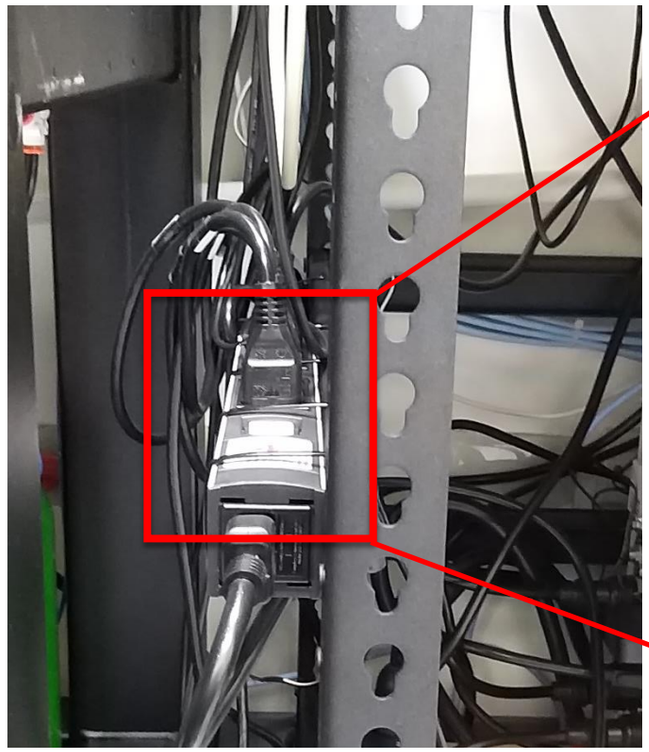
Wan-Chen Yu, Application Specialist, Taiwan Instrument Co.
Wanchen_yu@ticgroup.cpm.tw

Start System - Hardware

Start System - Hardware



- 轉動鑰匙開啟雷射後會亮燈
- 待白光燈號熄滅後再進入軟體



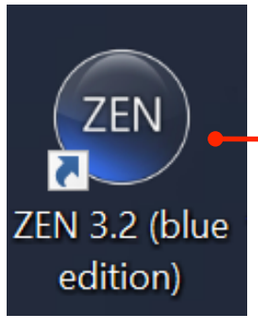
開機順序：1 2 3 4 5 6

關機順序：6 5 4 3 2 1

(***為維護雷射使用壽命，如果不是當天最後一個使用者，請不要將系統關閉，只需清理物鏡和環境)

6

Start System - Software



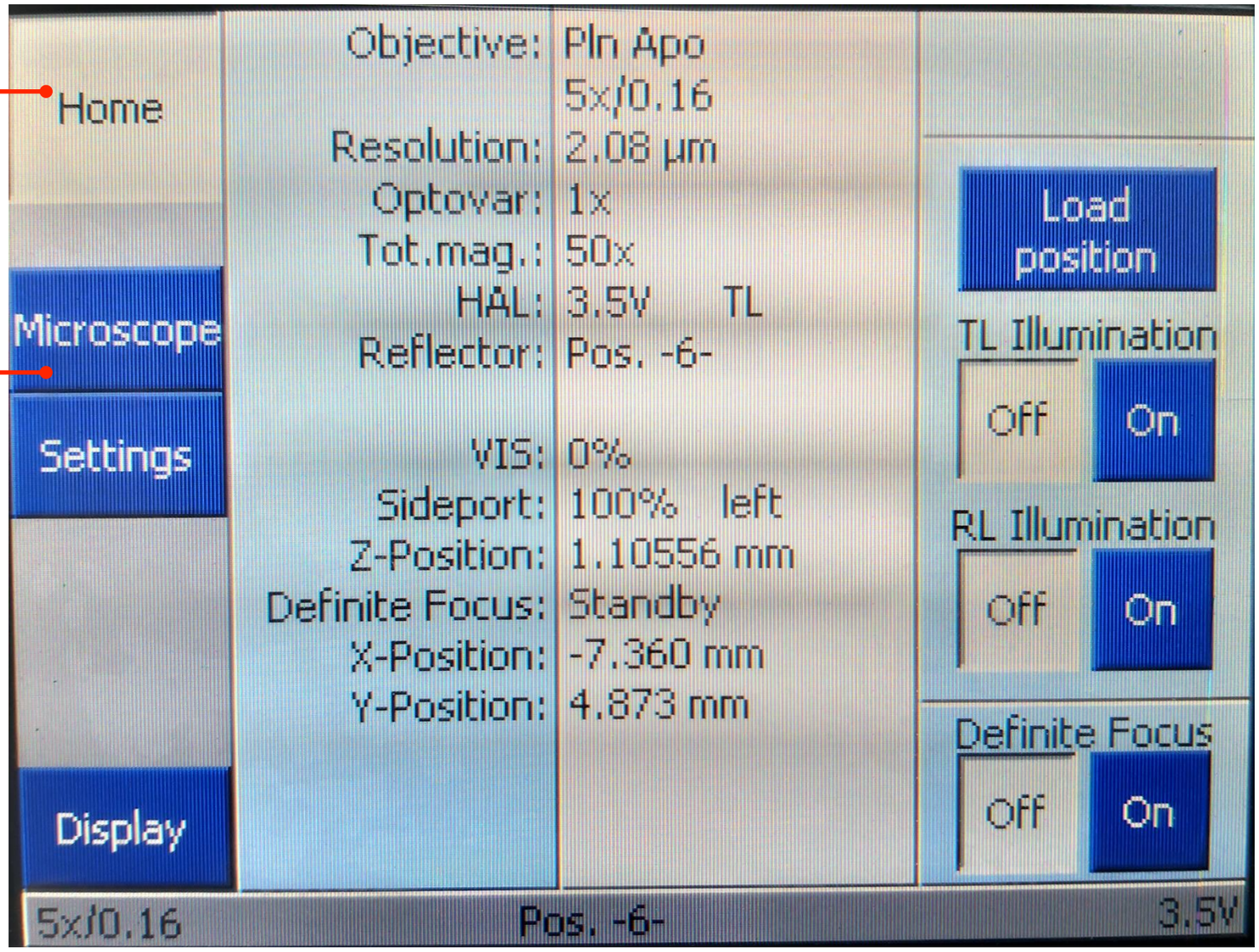
1. 點選桌面上的”ZEN 3.2 (blue edition)”圖示，啟動ZEN 3.2

2. 點選”Start System”，讓ZEN 3.2啟動系統

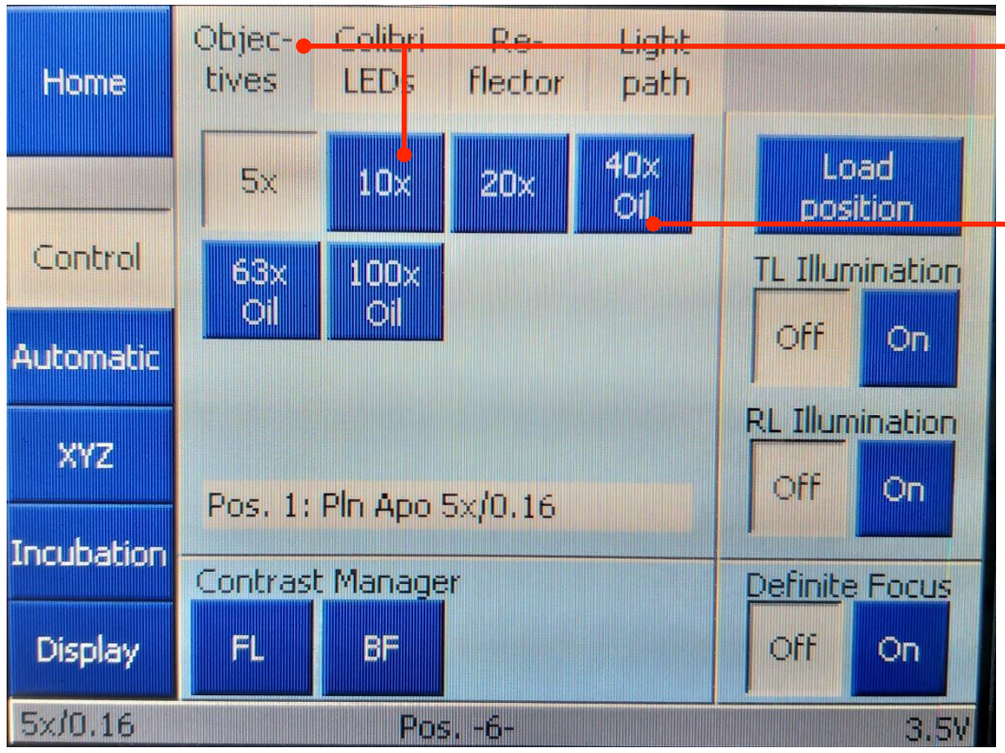
Start System - Hardware

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



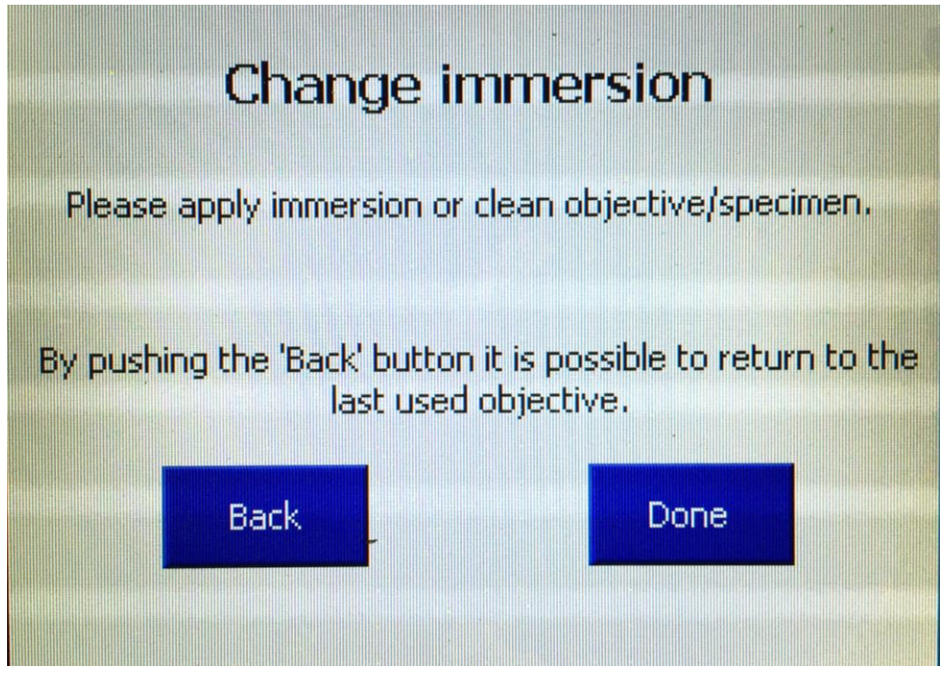
Start System - Hardware



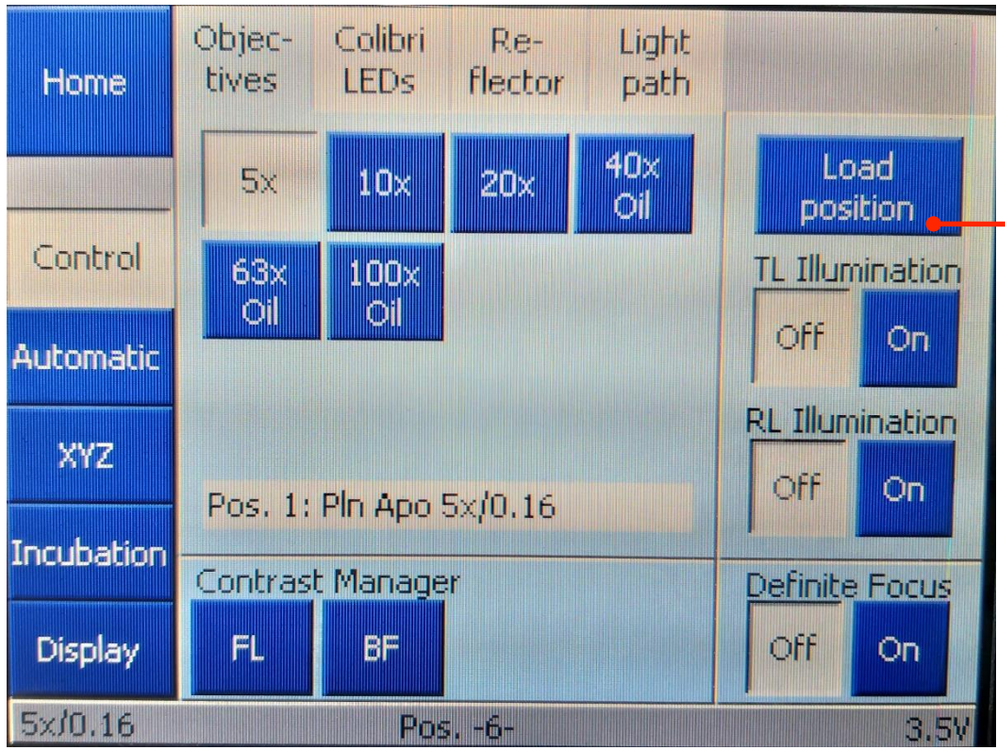
點選”Objectives”選擇物鏡

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

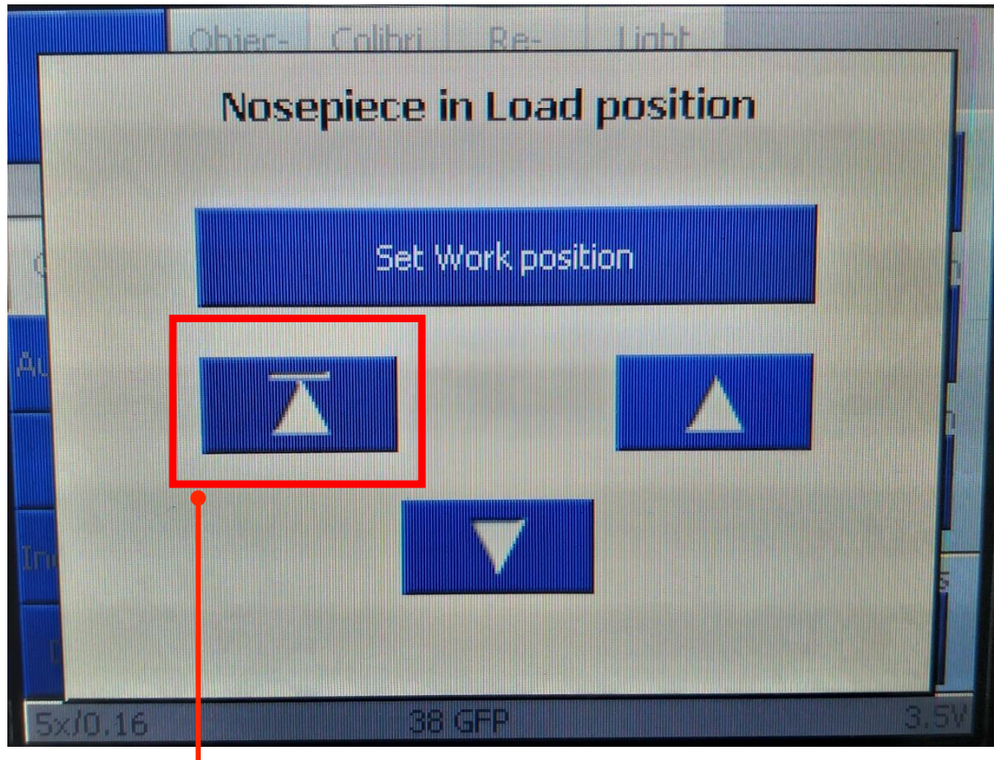


Start System - Hardware



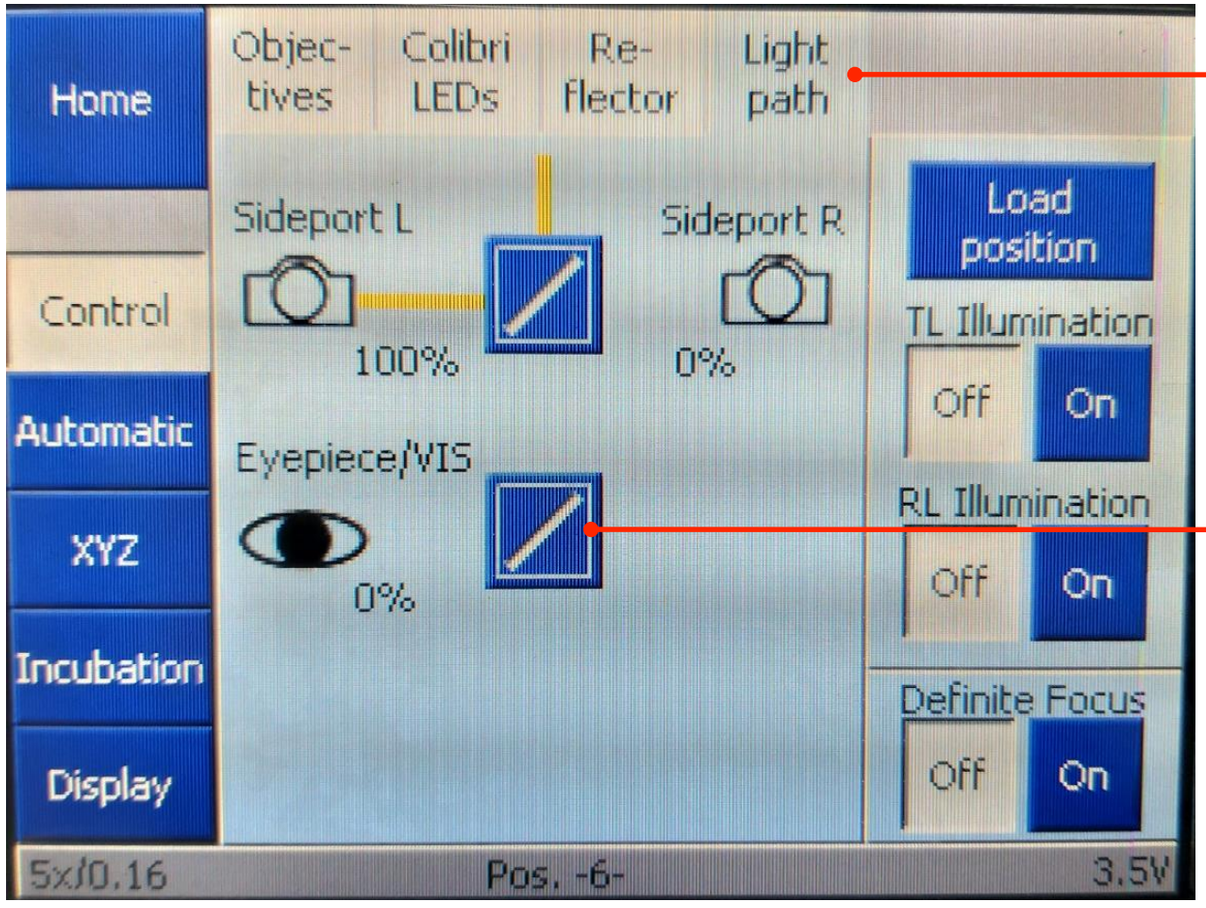
1. 放置樣品前，先將樣品清潔乾淨

2. 點選Load position將物鏡降低 (避免撞到物鏡)



3. 樣品放好後，點選此按鈕，物鏡位置將恢復

Start System - Hardware

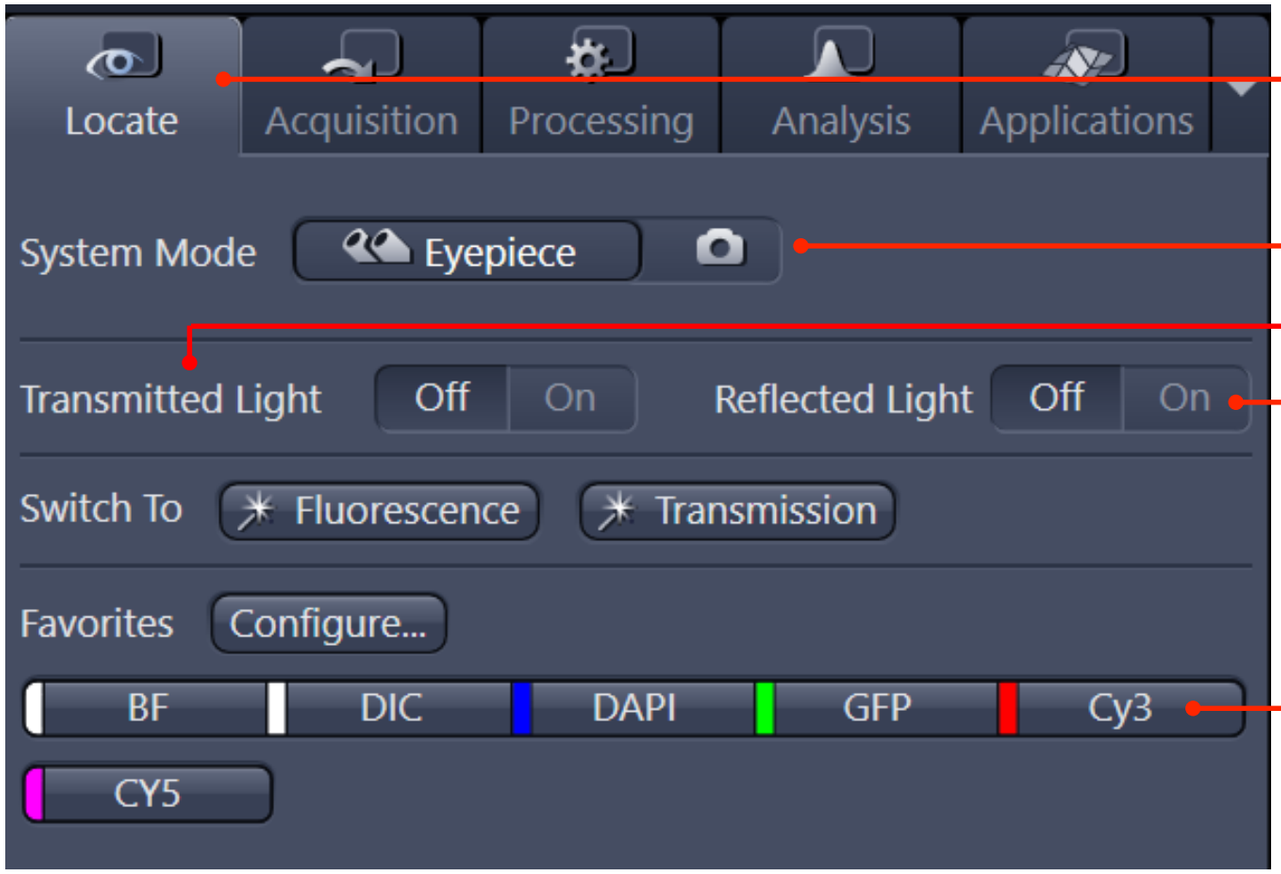


“Light path”頁面中可切換光路

點“Eyepiece/VIS”將光路切換至目鏡，使用眼睛觀察樣本並對焦

Snap

Locate - Microscope Control



點選Locate

Eyepiece：切換至目鏡，眼睛觀察樣品

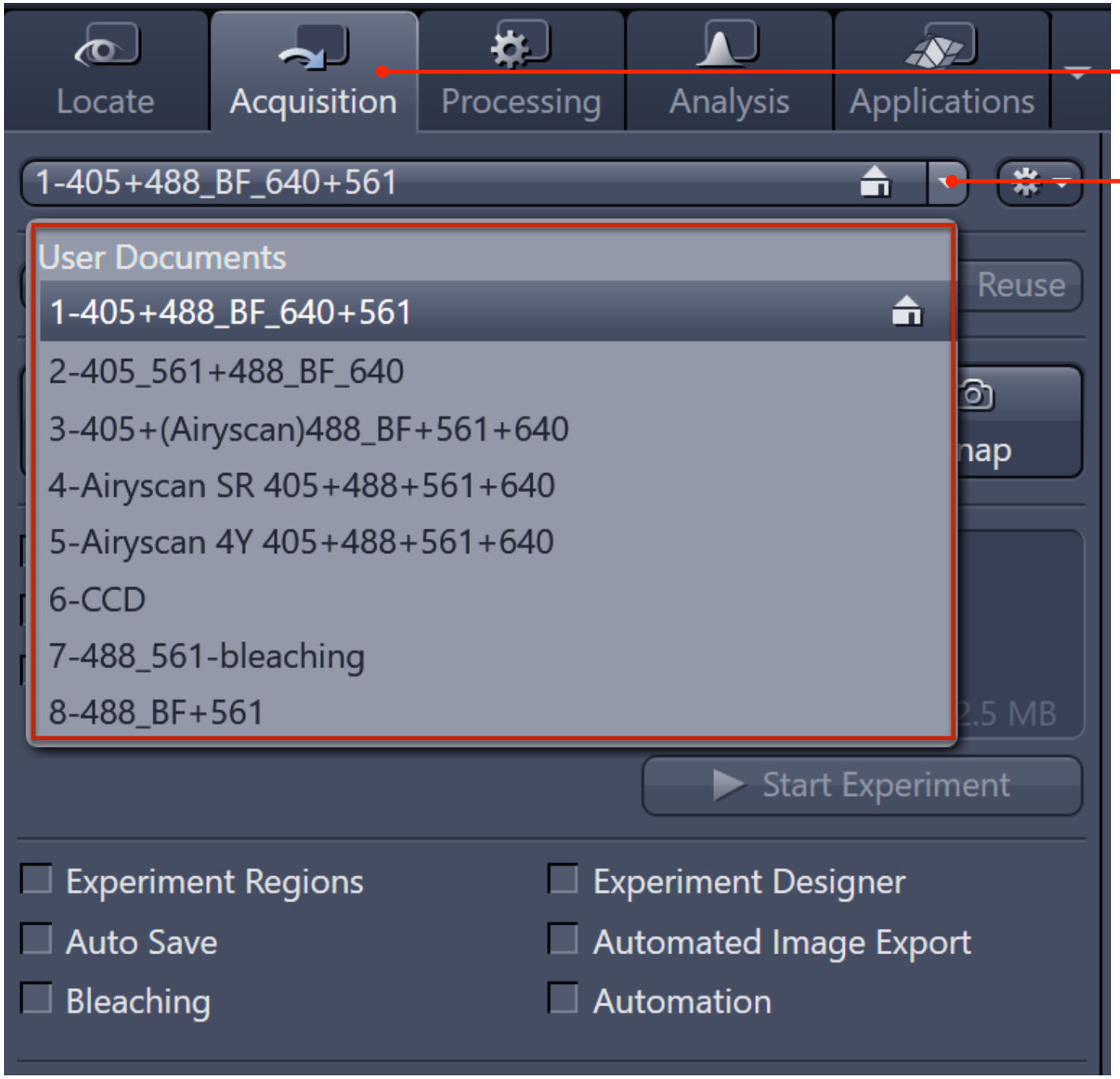
穿透光開關

螢光燈開關

光路檢視樣本

選擇濾片：
穿透光：BF-明視野、DIC-干涉相位差、
螢光：DAPI-藍螢光 、 GFP-綠螢光、Cy3-紅螢光、Cy5-遠紅光

Acquisition - Experiment Manager

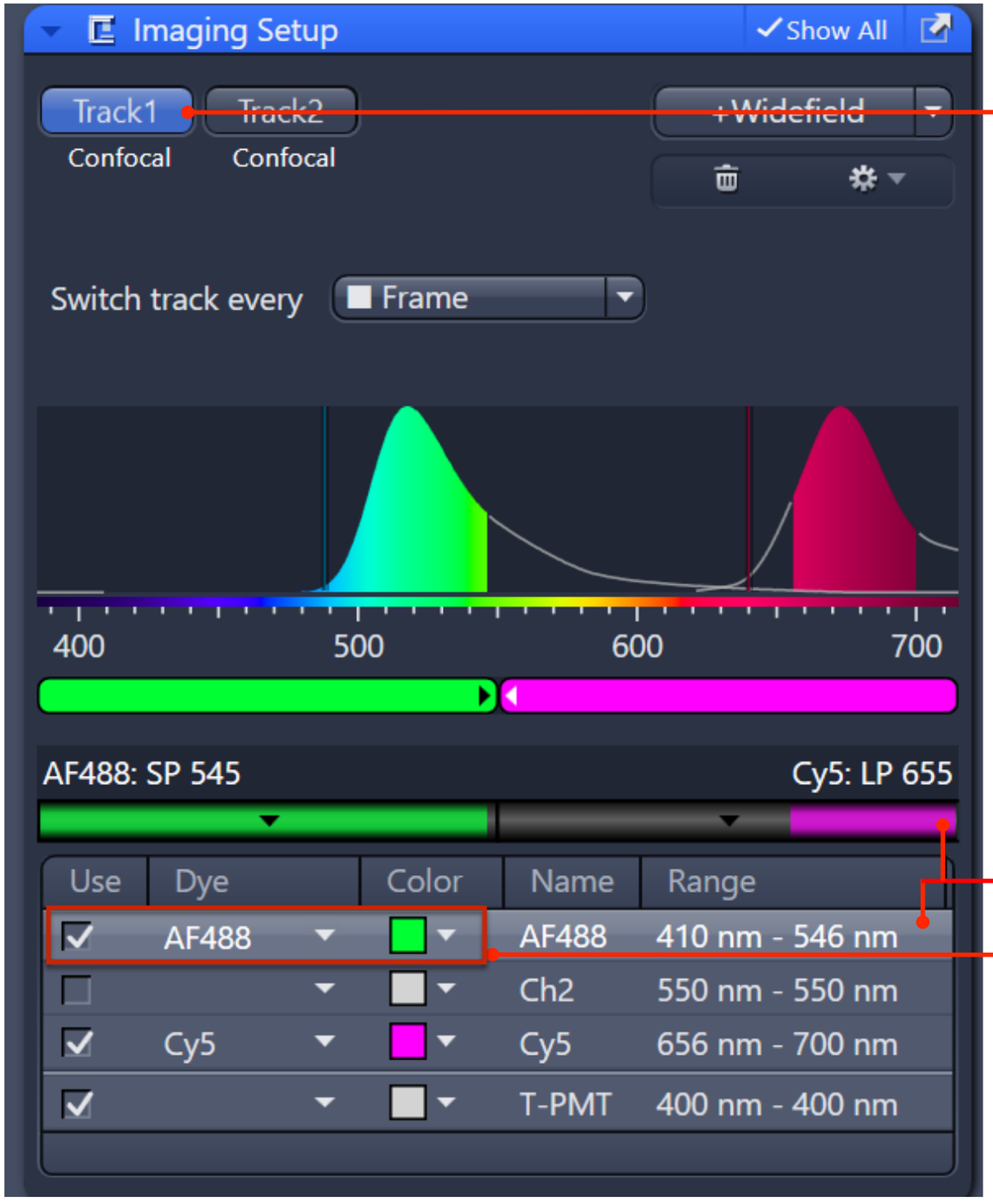


點選”Acquisition”
開始confocal拍照設定

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

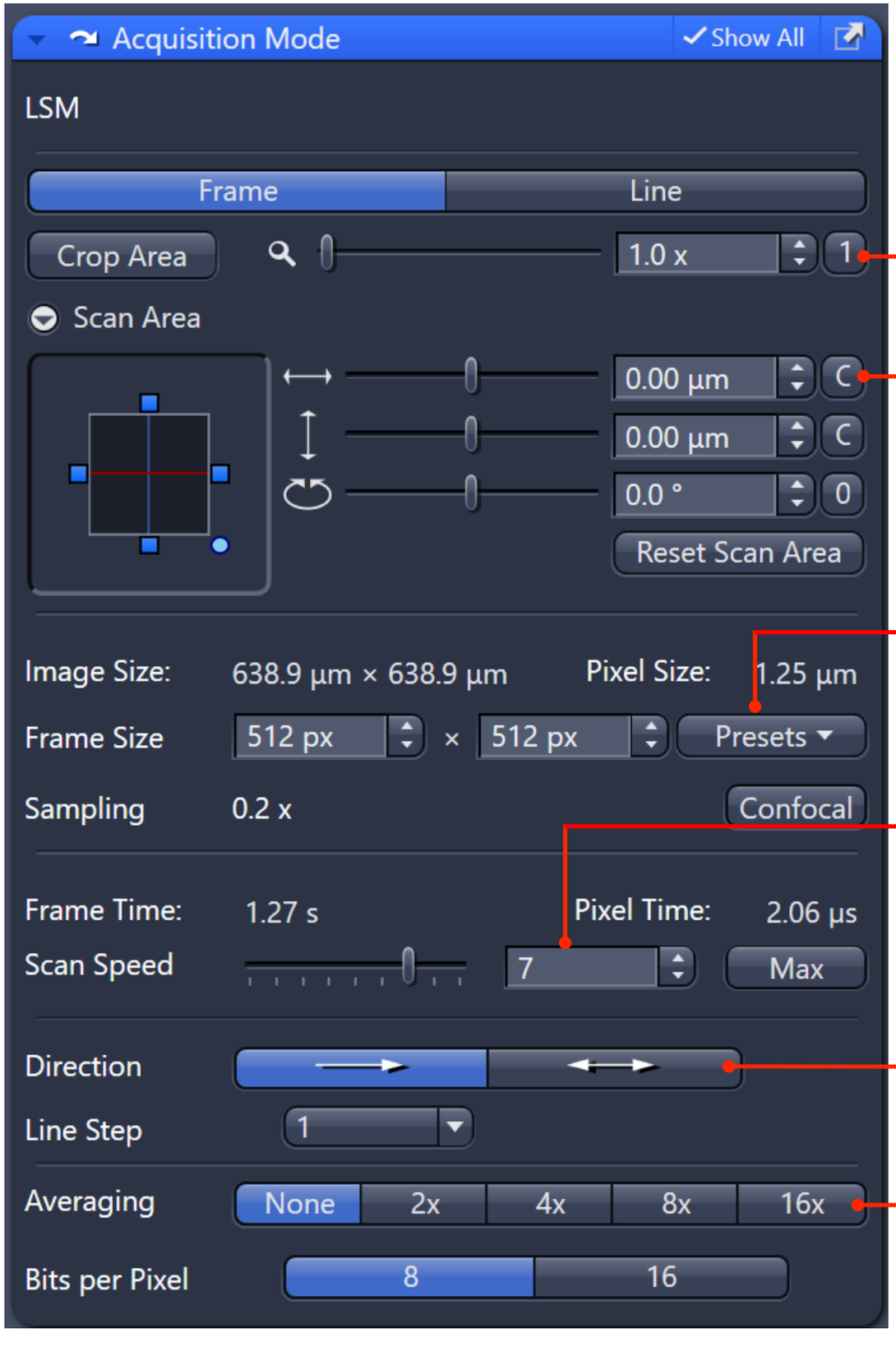


2. 依序檢視每個Track的設定組態

如需更改收光波長範圍及濾片請洽儀器管理員

3. 在此可選擇適合實驗的Dye

Acquisition - Acquisition Mode



4. 掃描版面：最大版面是Zoom=0.5，可crop area後zoom in光學放大 (一般建議勿超過3.0x)

設定掃圖範圍高、寬、旋轉角度

5. 選擇預覽解析度：

預覽時可用較低解析度(ex：≦512x512)

擷取影像時可提高解析度(ex： ≧1024x1024)

6. 調整掃圖速度

➢ 速度必須≦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!!

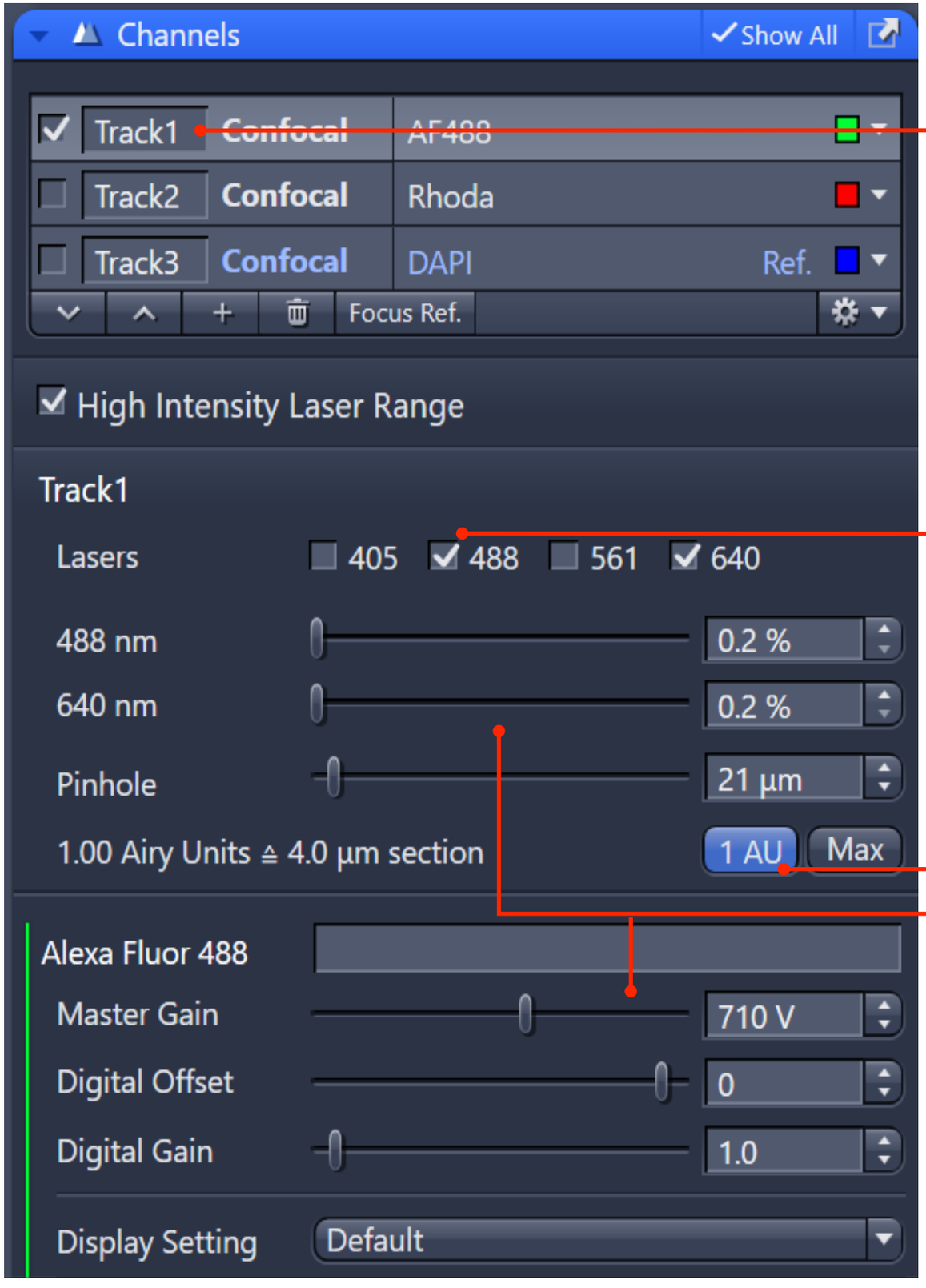
7. 預覽：1. 可選擇雙向

2. Averaging：None

拍攝：1. 建議選擇單向

2. Averaging：可增加Averaging來提高信噪比，但所需的時間也就增加了

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

8. 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

9. 軟體自動啟動對應的雷射

10. 點選"1 AU"，將Pinhole調整成1 Airy Unit

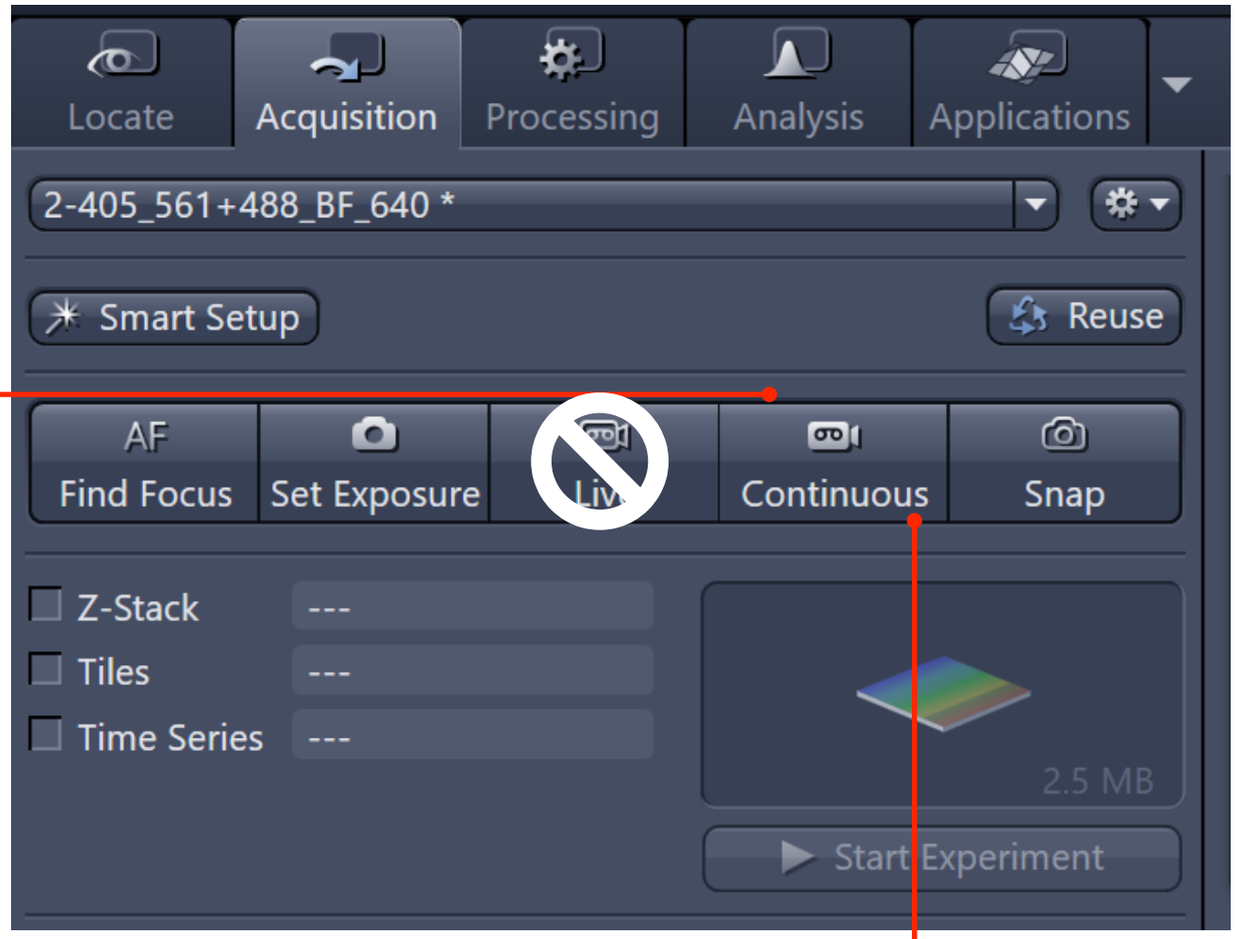
Pinhole設定:
- 一般選擇1AU
- 亦可以設定成所有channel 為相同的um厚度

11. 調整 雷射強度 及 Gain (建議值)

405	*0.2~0.5%*	*600*
488	*0.2~0.5%*	*600*
561	*0.2~0.5%*	*600*
640	*0.2~0.5%*	*600*

(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

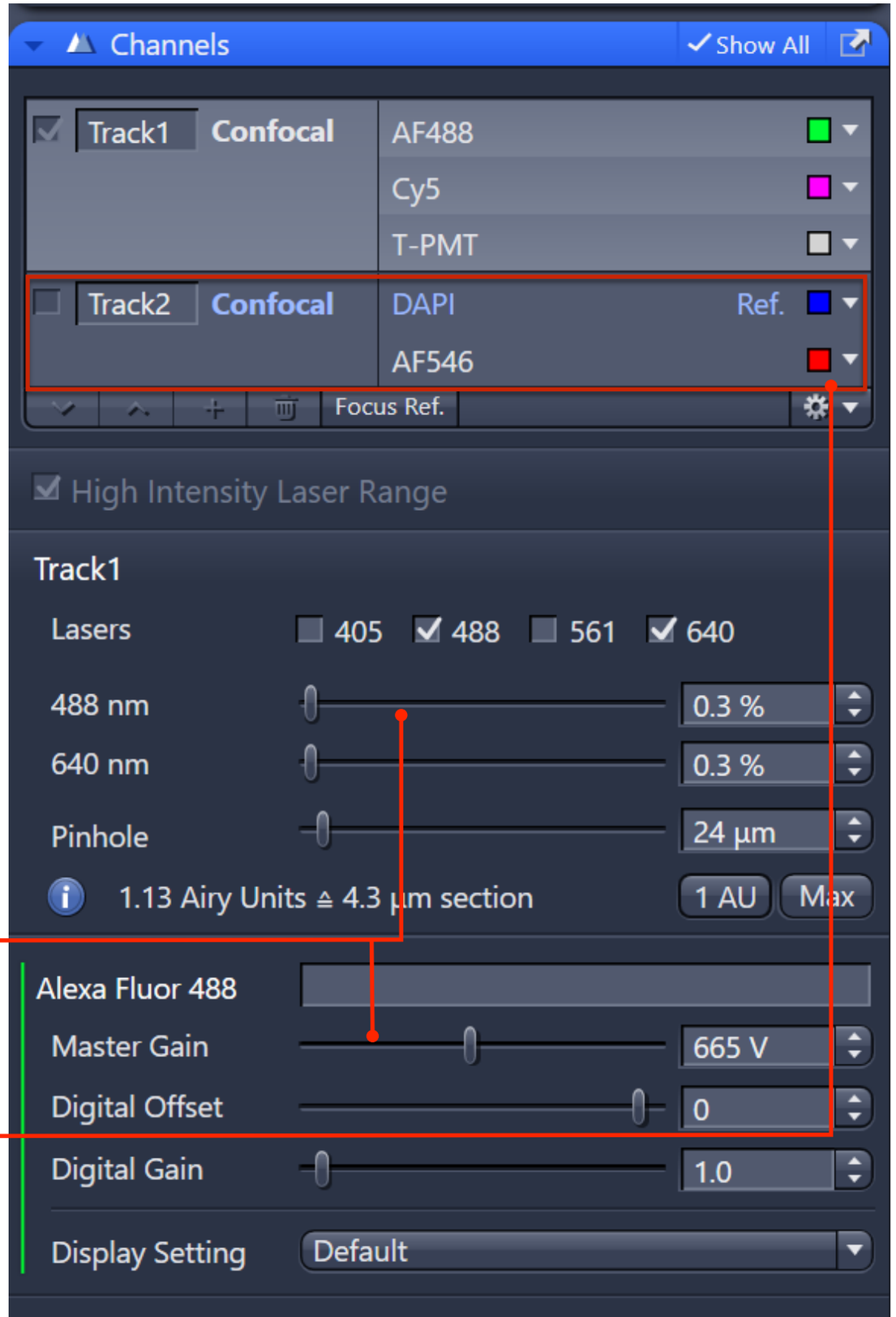


12. “Continuous”預覽掃圖畫面

*切勿點選左邊”Live”按鈕，Live速度過快將導致scanner毀損

13. 適當調整對焦、雷射強度及Gain

14. ”Stop“ Continuous 停止預覽

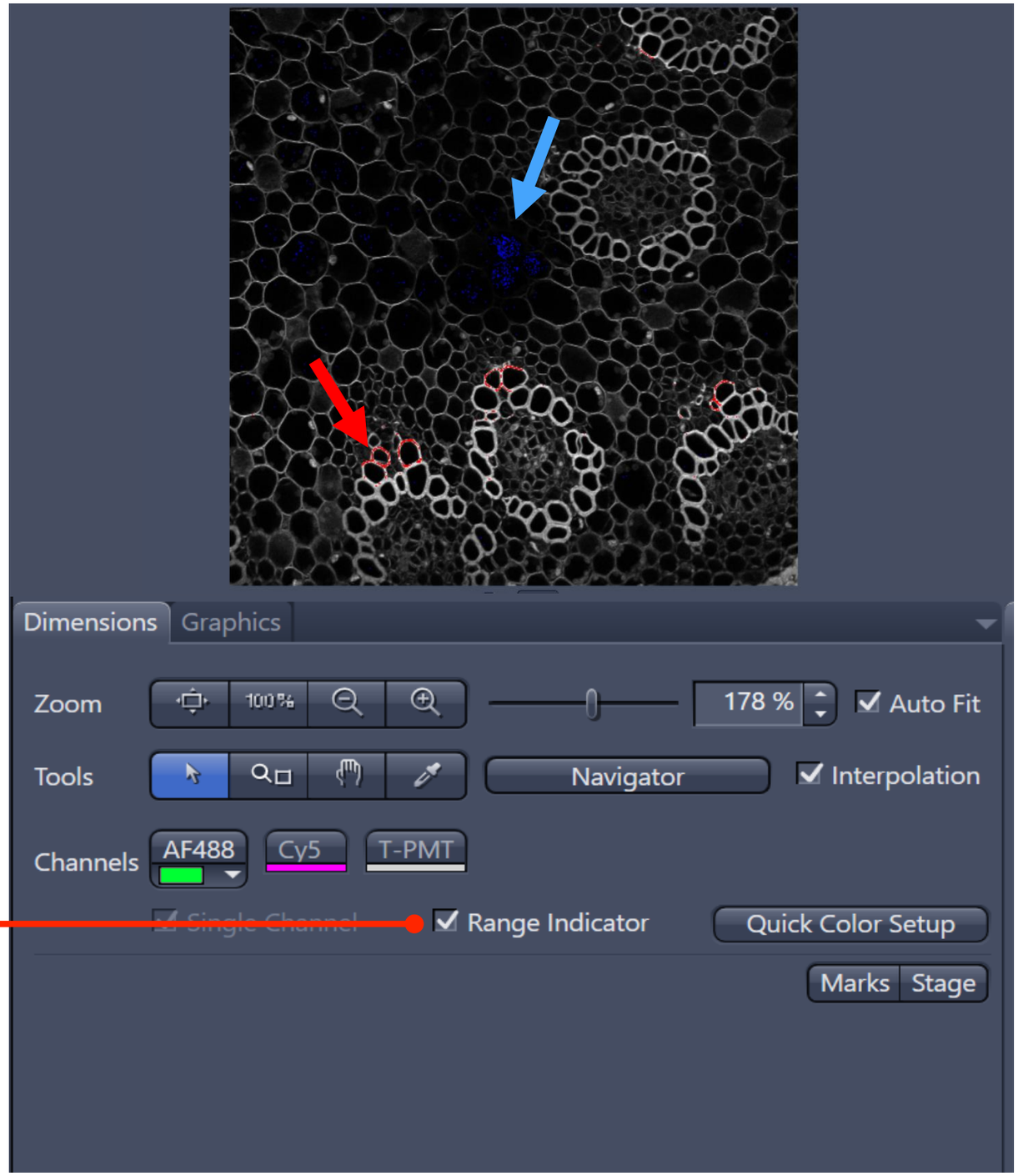


➢ 若還需拍攝其他波長，改選其他track，調整Gain值＆雷射強度至適當亮度。

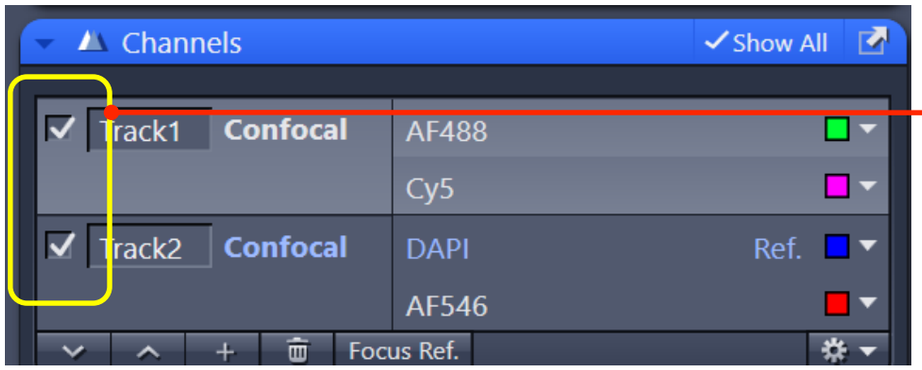
Acquisition - Continuous and Snap

➢ 若在預覽圖下方”Dimensions”頁面裡勾選 “Range Indicator” 將有助於將intensity調到最佳分布，

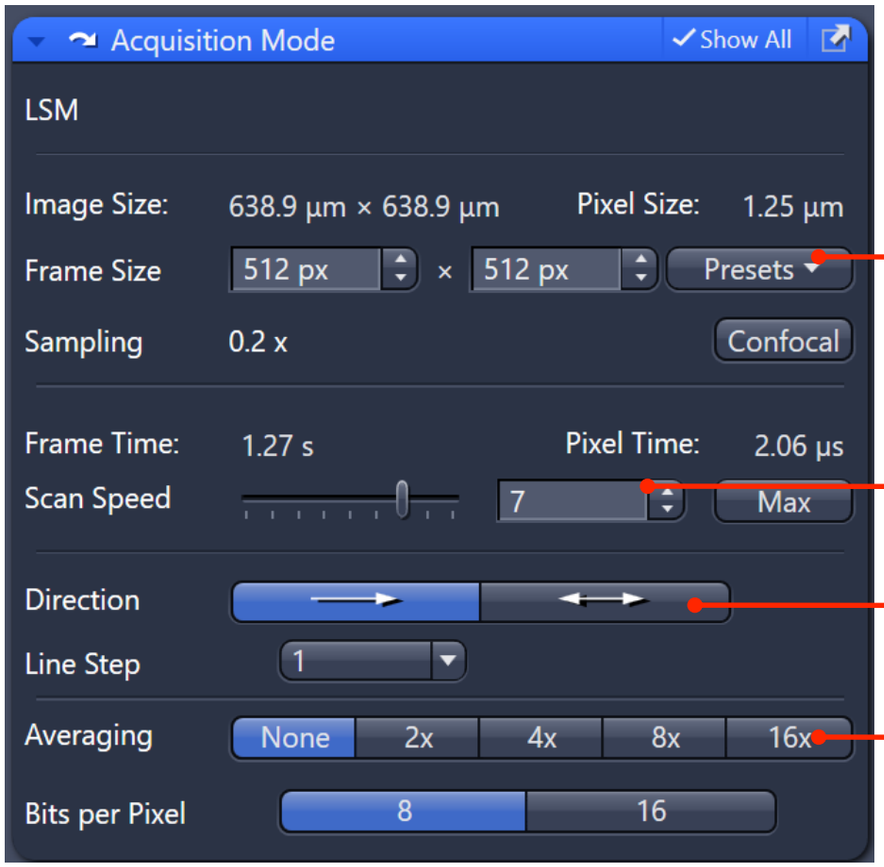
- 紅色表示飽和，建議降低亮度
- 藍表示背景無訊號



Acquisition - Acquisition Mode



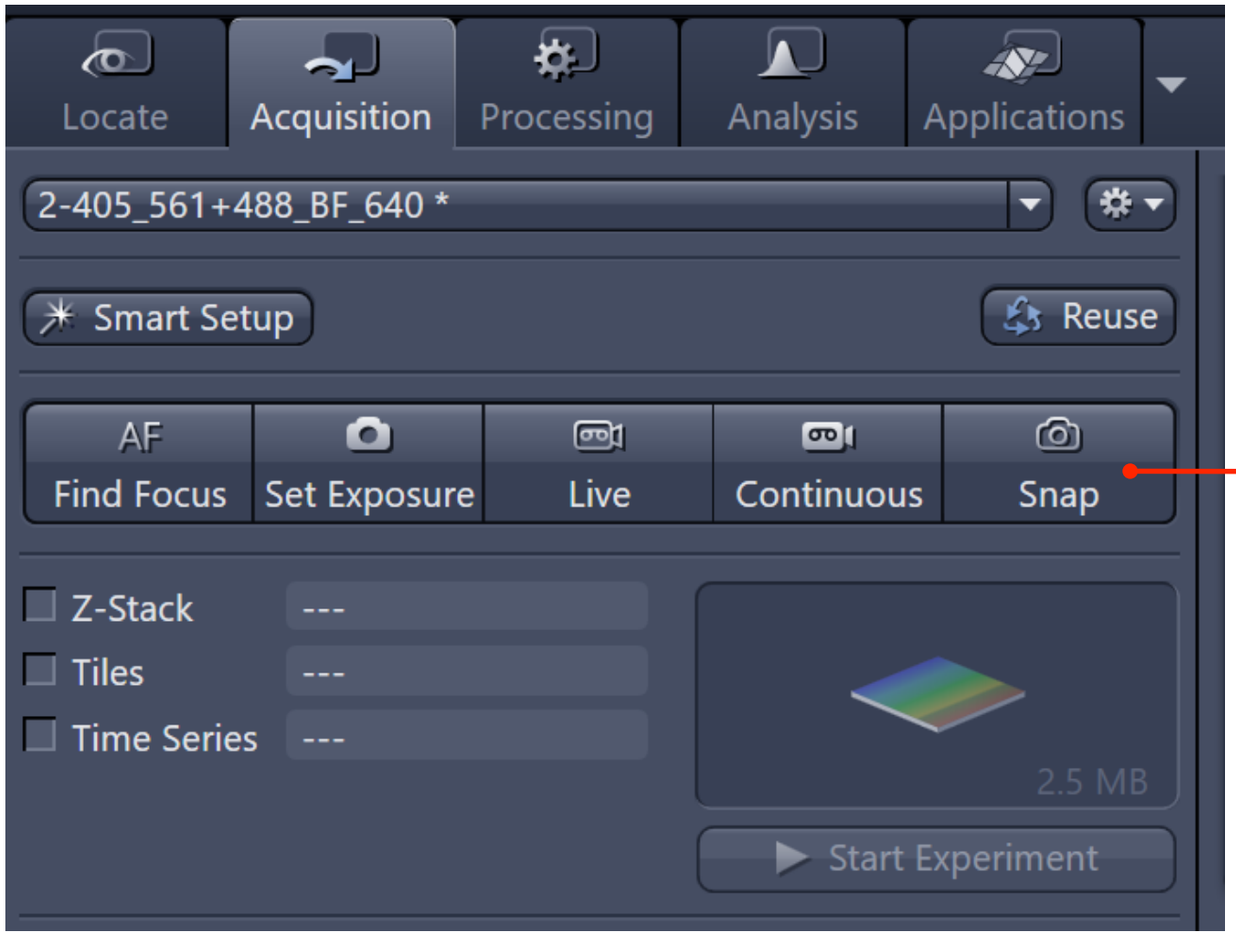
15. 將所有已經調整好參數的track都打勾



調整拍照設定

- 選擇所需的畫素 (可設定≧1024x1024或選擇Confocal)
- 調整掃描速度，建議scan speed 為5~7
  (速度太快將導致掃描馬達損壞！)
- 單向拍攝
- 提高Averaging可提高信噪比
  (所需的時間也會增加)

Acquisition - Continuous and Snap



16. 按”Snap”完成拍攝

REVIEW SNAP Steps

. Load Experiment setting 選擇掃圖需要的波長

. 調整預覽解析度≦512x512，並設定掃圖速度≦7

. 單獨調整預覽Track的雷射強度、Pinhole、Gain

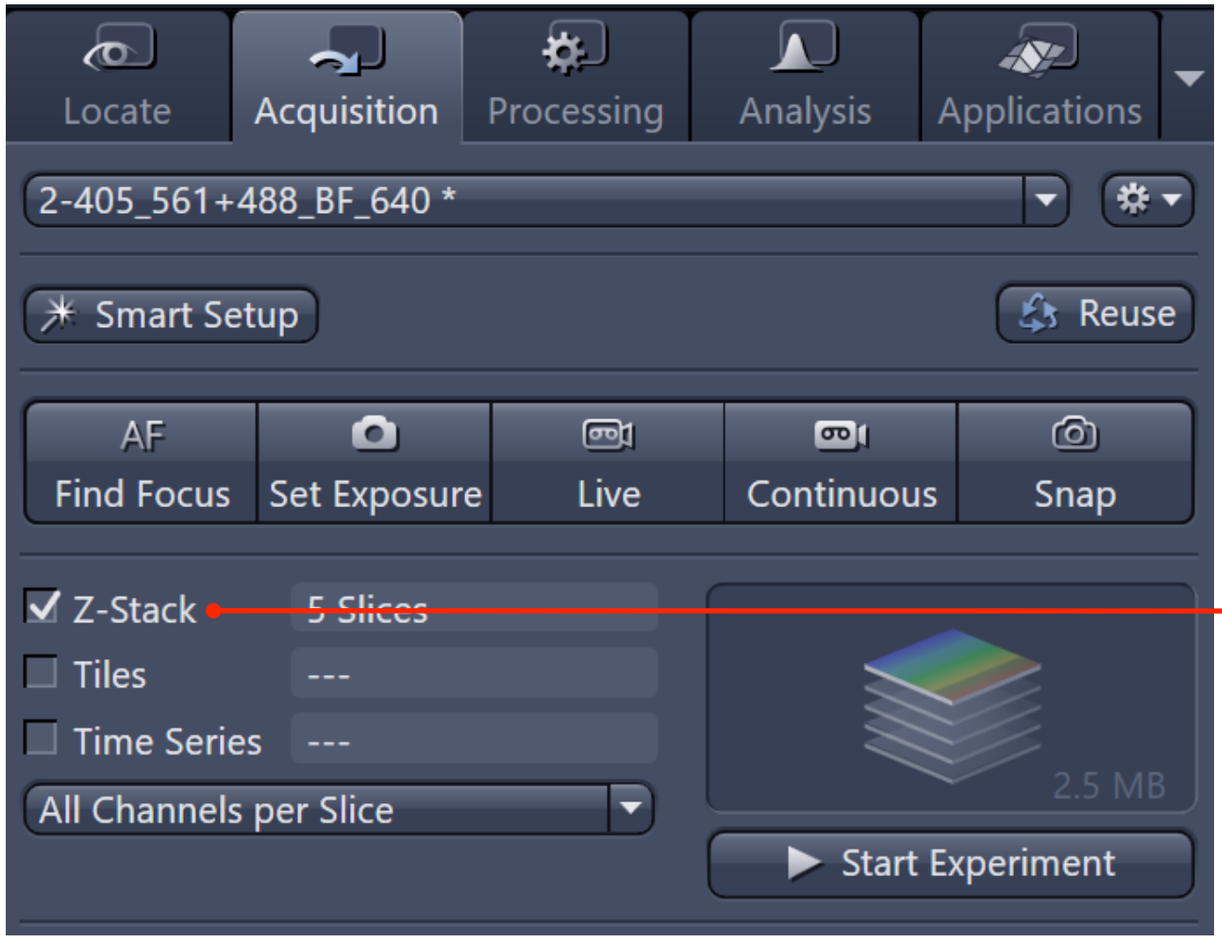
. Continuous開始預覽、對焦，再調整雷射、Gain

. Stop Continuous，Snap!

Experiment

Z-Stack

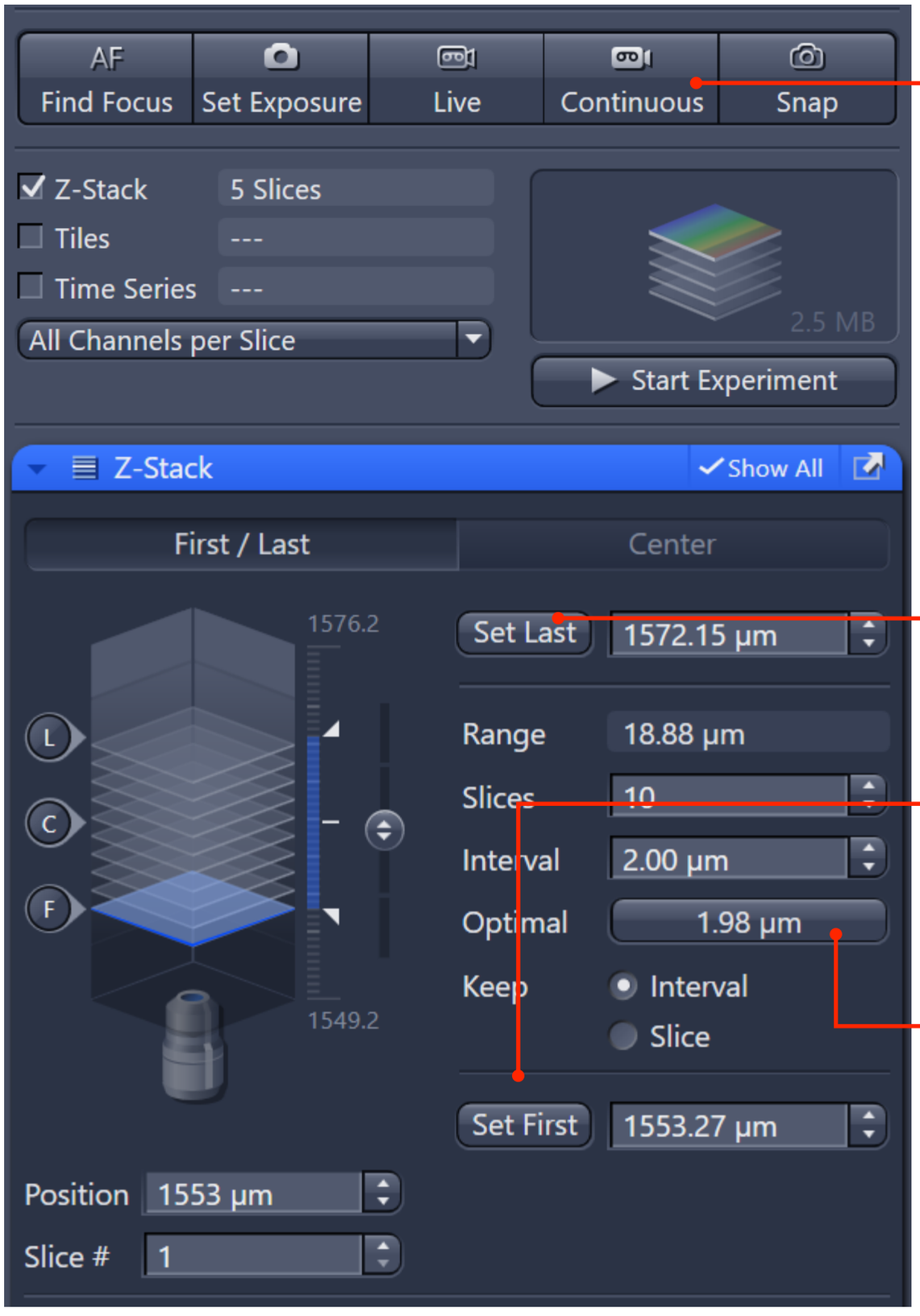
Acquisition - Z-stack



1. 先完成Snap的設定步驟1~14

2. 勾選Z-Stack啟動Z軸拍攝功能

Acquisition - Z-stack



2. “Continuous”啟動掃圖預覽

Focus drive

4.

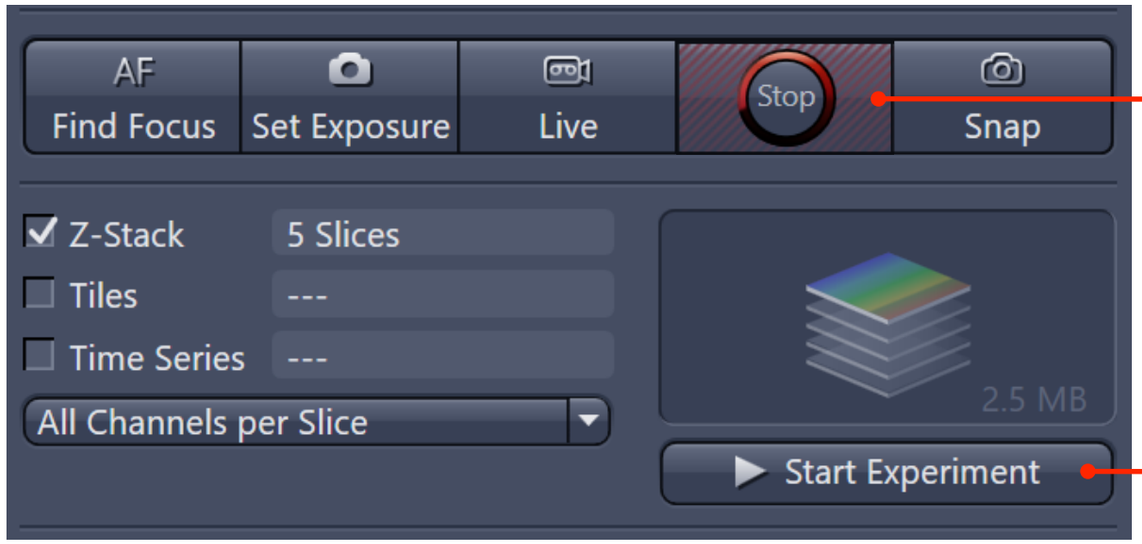
4. 用Focus drive找到觀察樣品厚度之最高/低點
→Set first

反方向轉動細調節輪找到欲觀察範圍的最高/低點
→Set last

3. 按“Optimal”或自行設定拍攝張數與距離

- Optimal：ZEN將自動運算出最佳Z軸堆疊拍攝張數與距離

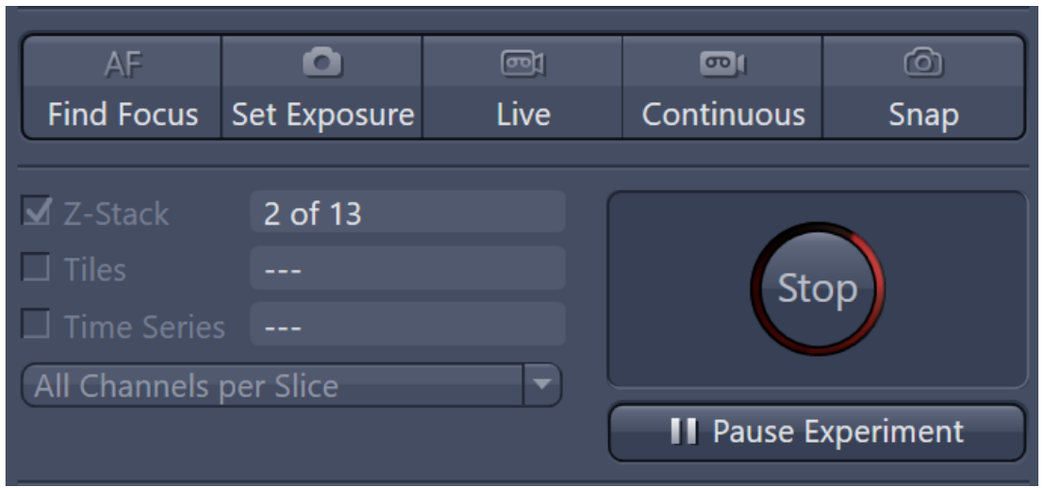
Acquisition - Z-stack



5. Stop “Continuous”，並確認掃圖解析度

6. “Start Experiment”開始拍攝Z-Stack

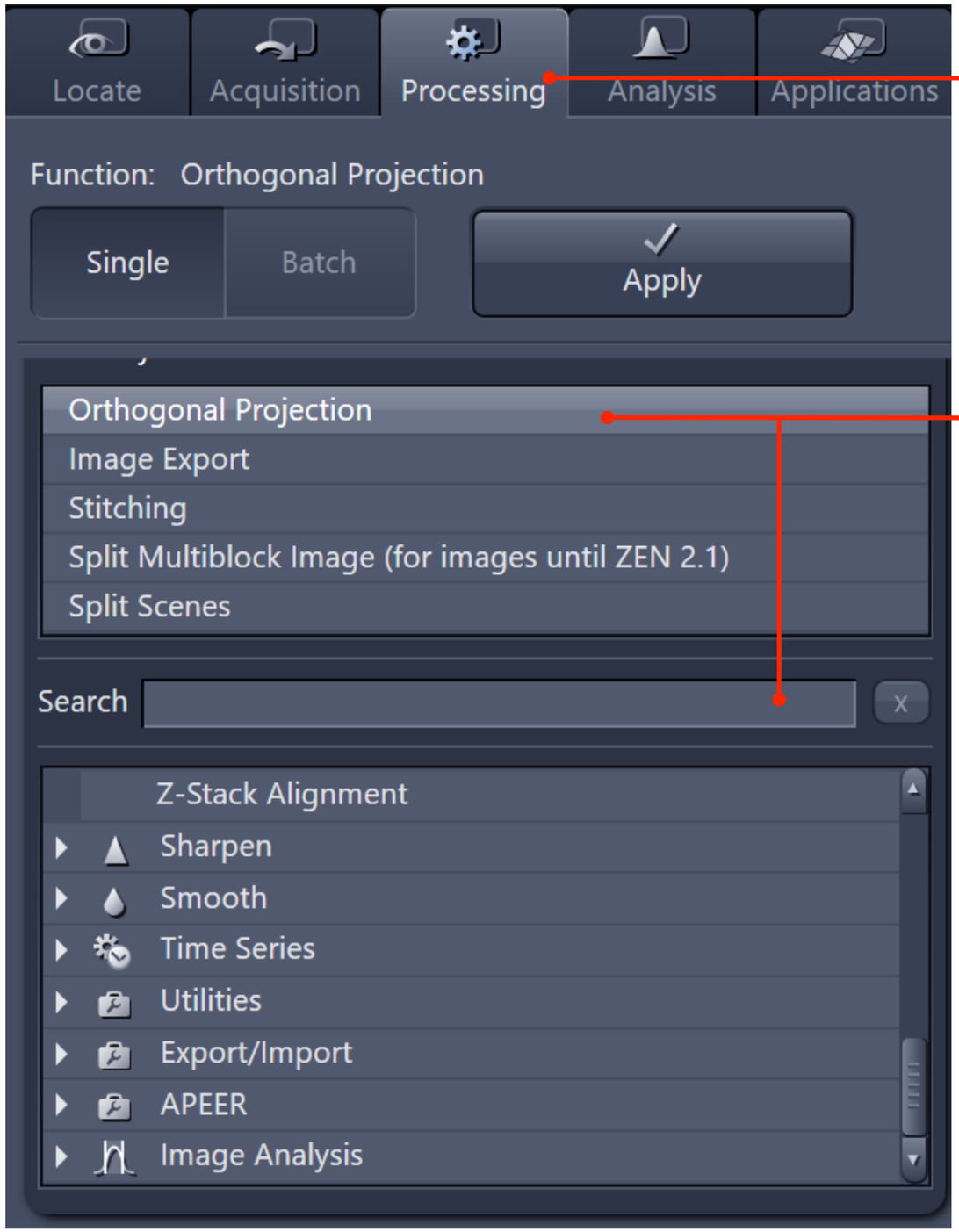
- 若拍攝時需終止拍攝可按”Stop”停止拍攝



- Stop：停止拍攝 (當下的那張拍完即停止拍攝)
- Pause：暫停拍攝 (直接停在當下拍到的位置)

Processing - Orthogonal Projection

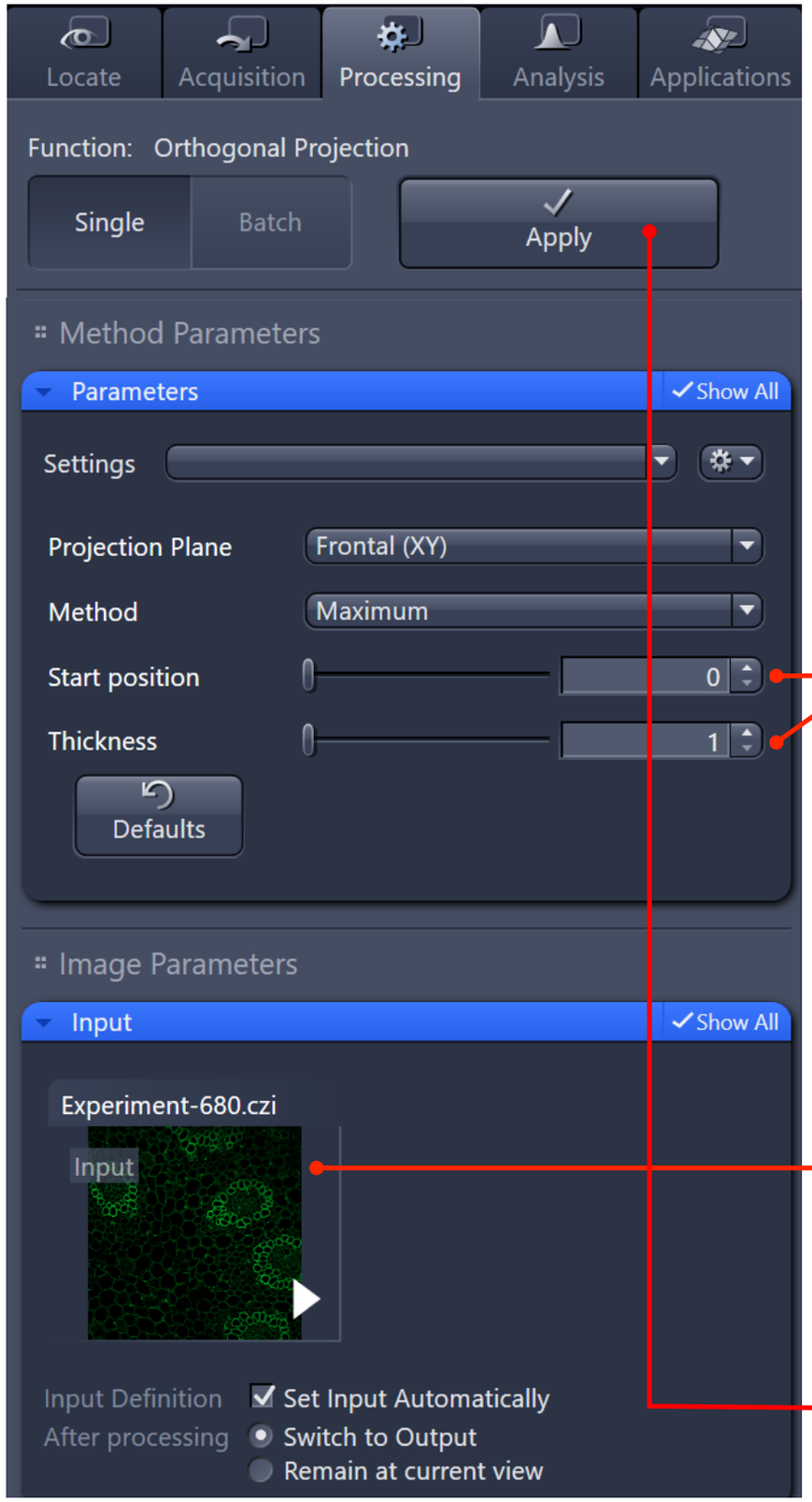
Z-stack可透過疊圖整合為一張全景深影像



1. “Processing”

2. 在Method中點選 “Orthogonal Projection”
   或下方搜尋

Processing - Orthogonal Projection



Z-stack可透過疊圖整合為一張全景深影像

4. 確認疊圖張數
- Start position：Start
- Thickness：Number of slice

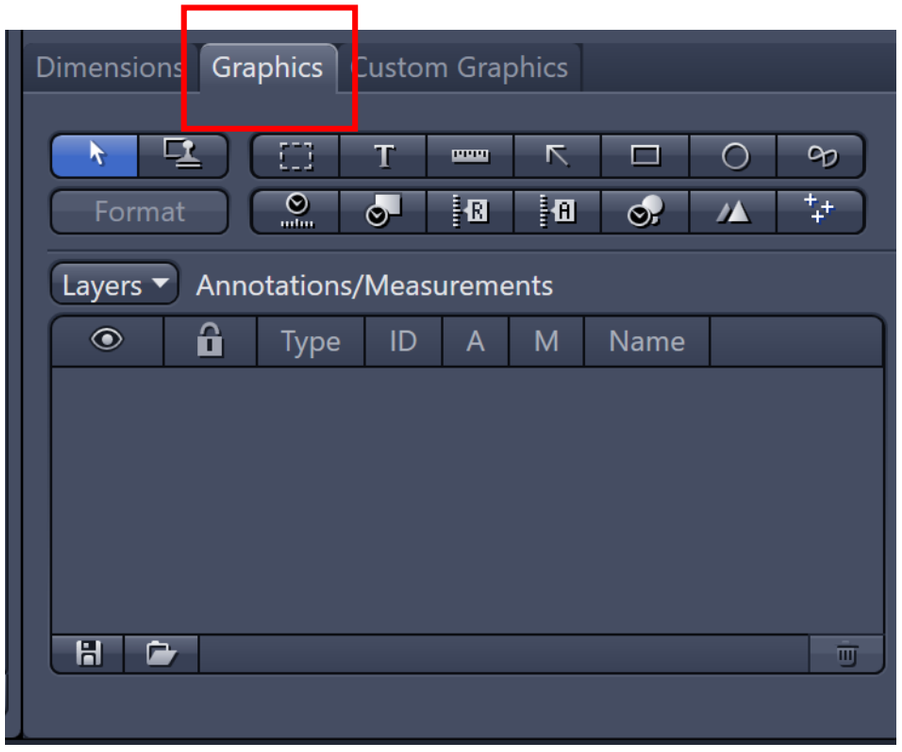
例如:
Start position：2
Thickness：5
就只有#2、#3、#4、#5、#6會疊圖

3. “Input”欲處理的Z-stack檔案

5. 回到視窗上方，點”Apply”開始處理影像

Image Processing

Image Processing - Graphics

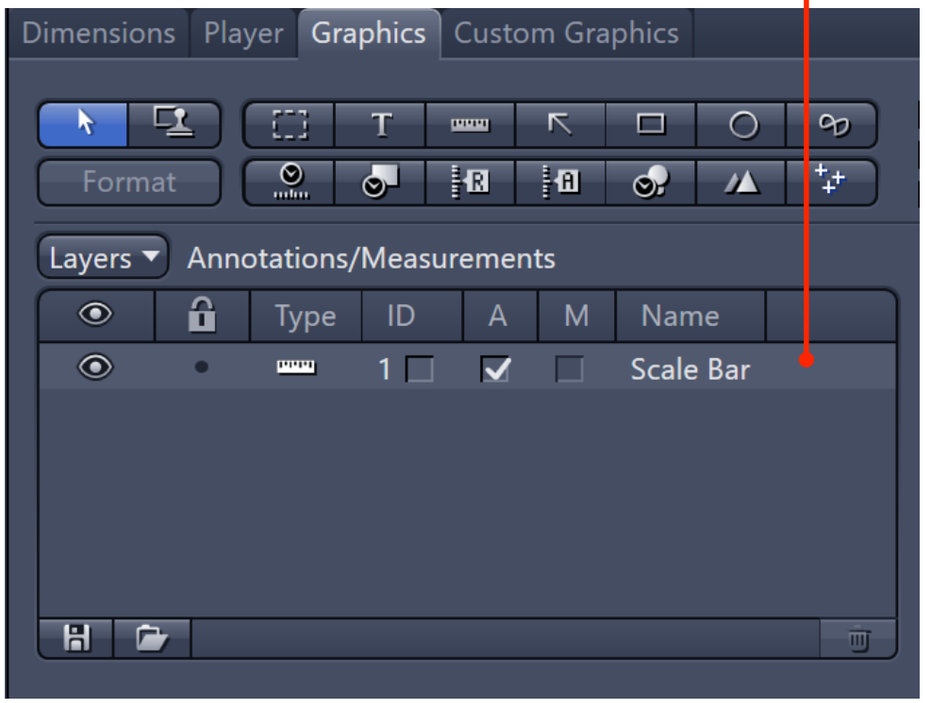


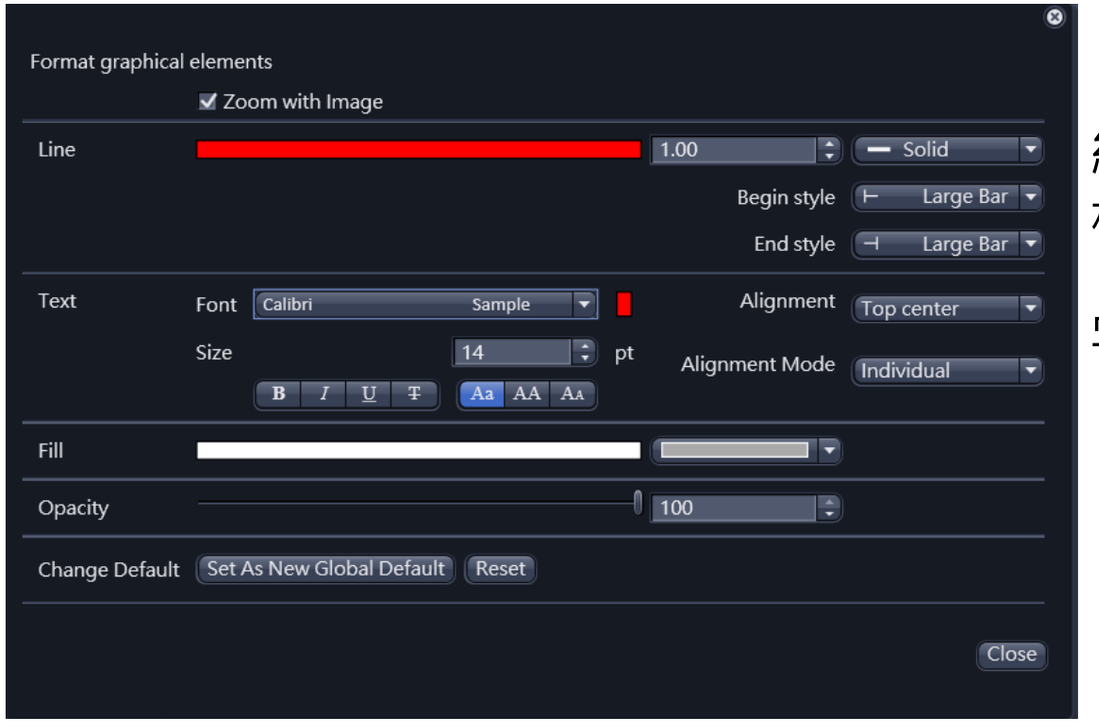
在Image的下方可找到"Graphics"工具列，使用此工具列可在Image上加入註記(包含Scale bar及文字)及執行基礎的測量功能，例如:

- 加入Scale bar
- 加入文字
- 加入方框或設定方框後做測量

Image Processing - Graphics

在物件上雙點擊滑鼠會出現設定視窗，可修改物件的格式

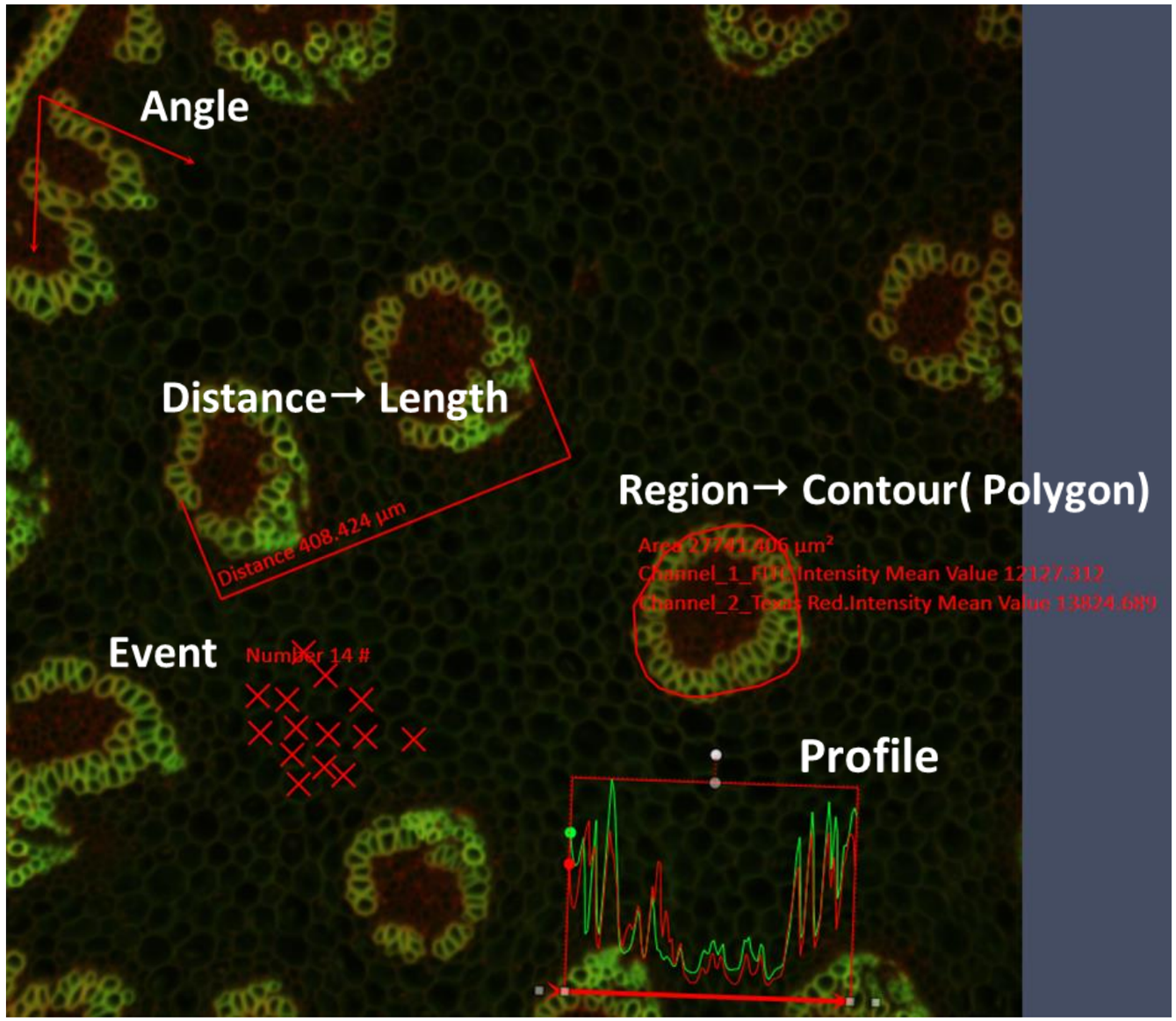




線的粗細、顏色、樣式

字的大小與顏色

Image Processing - Basic Measurement



測量值會顯示在圖片上，
若要改變測量的參數(例如：不想測量面積，想測量螢光強度等)，則在圖片上選取物件後按下滑鼠右鍵，選擇“Choose Measurement Features”，及可修改參數。

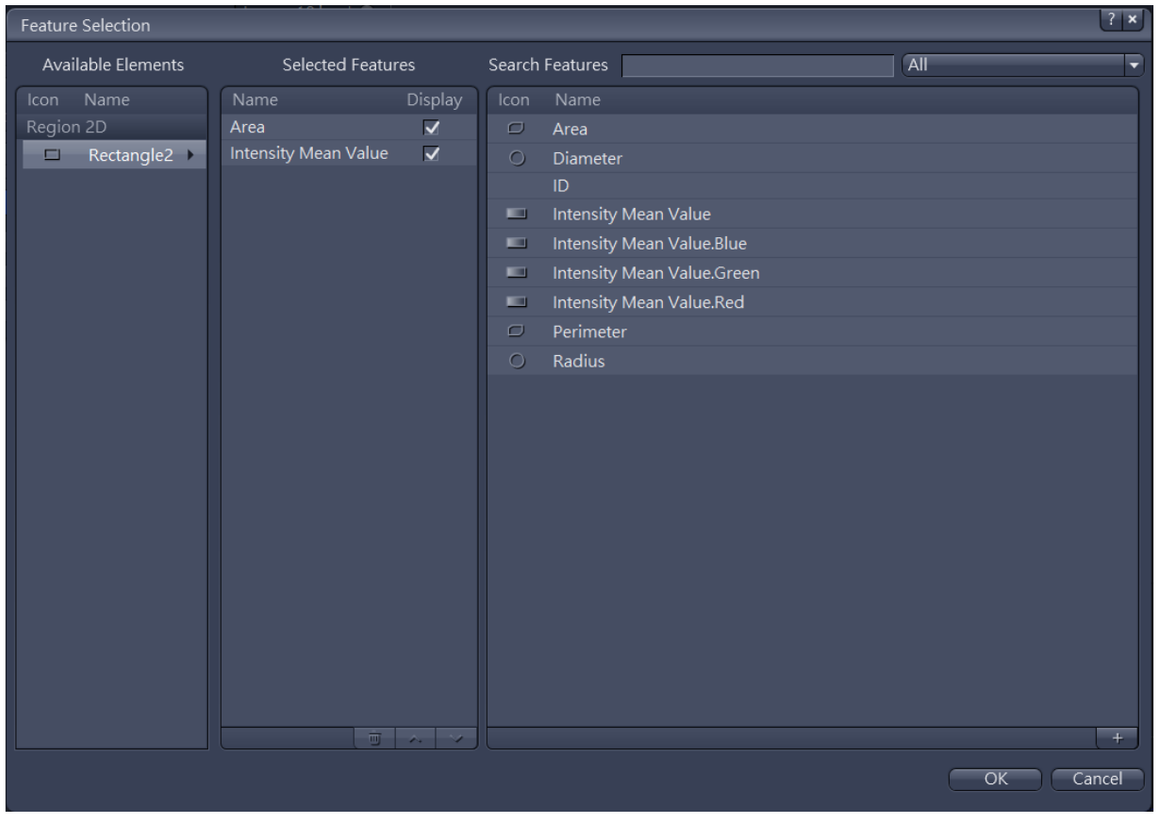
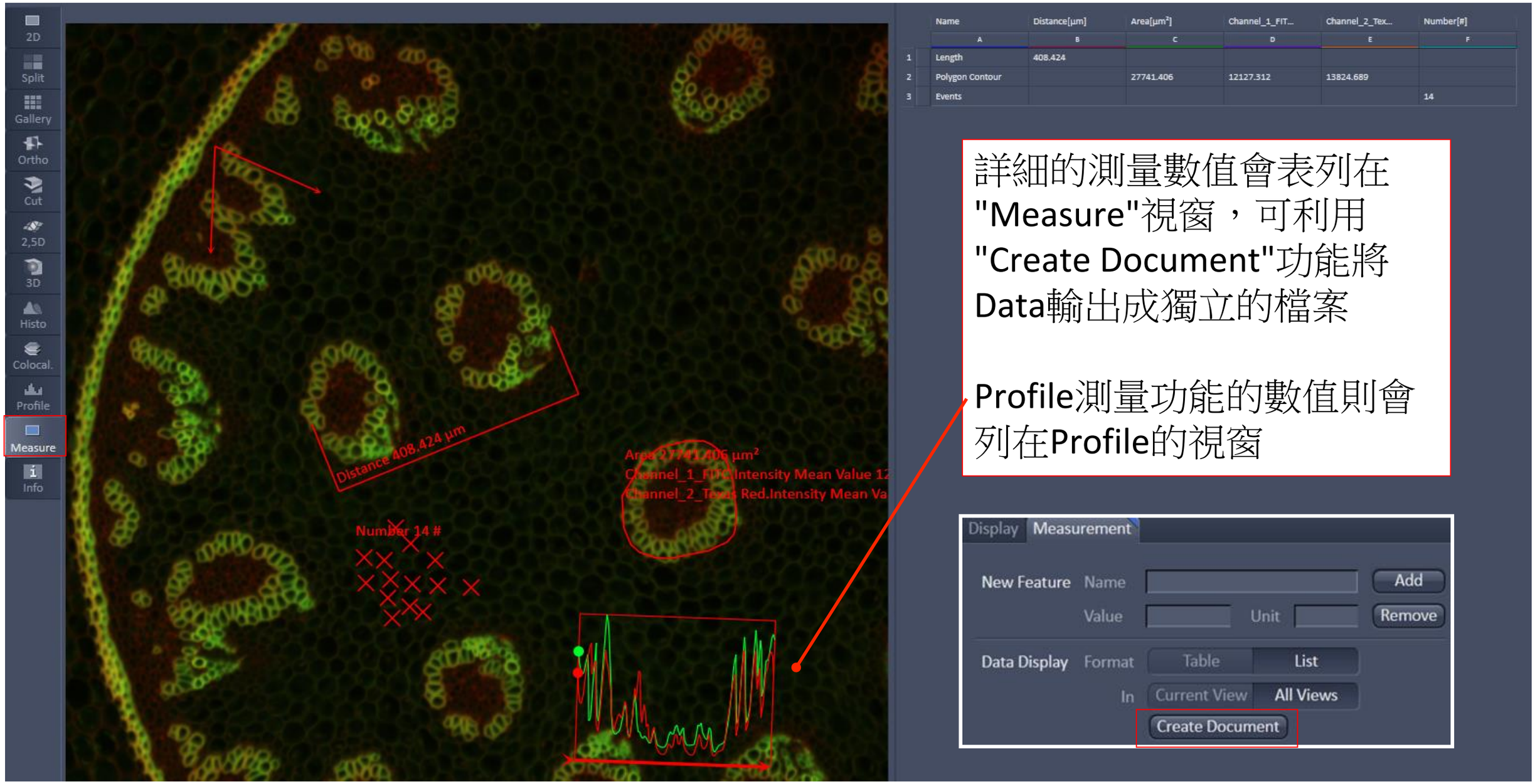


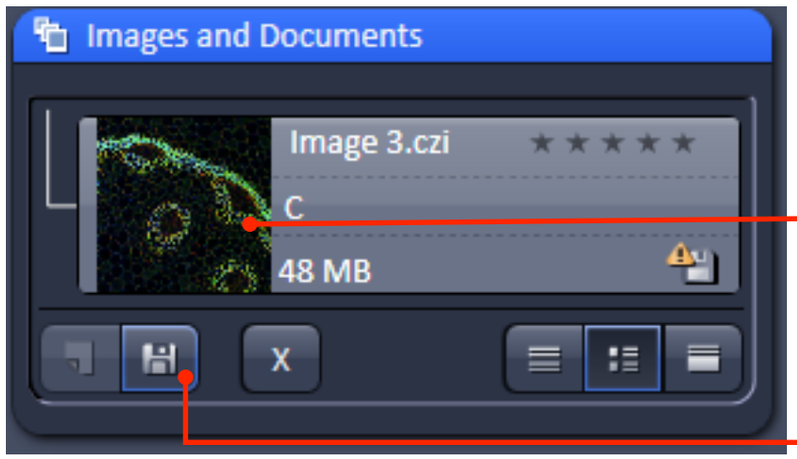
Image Processing - Basic Measurement



Save and Export Images

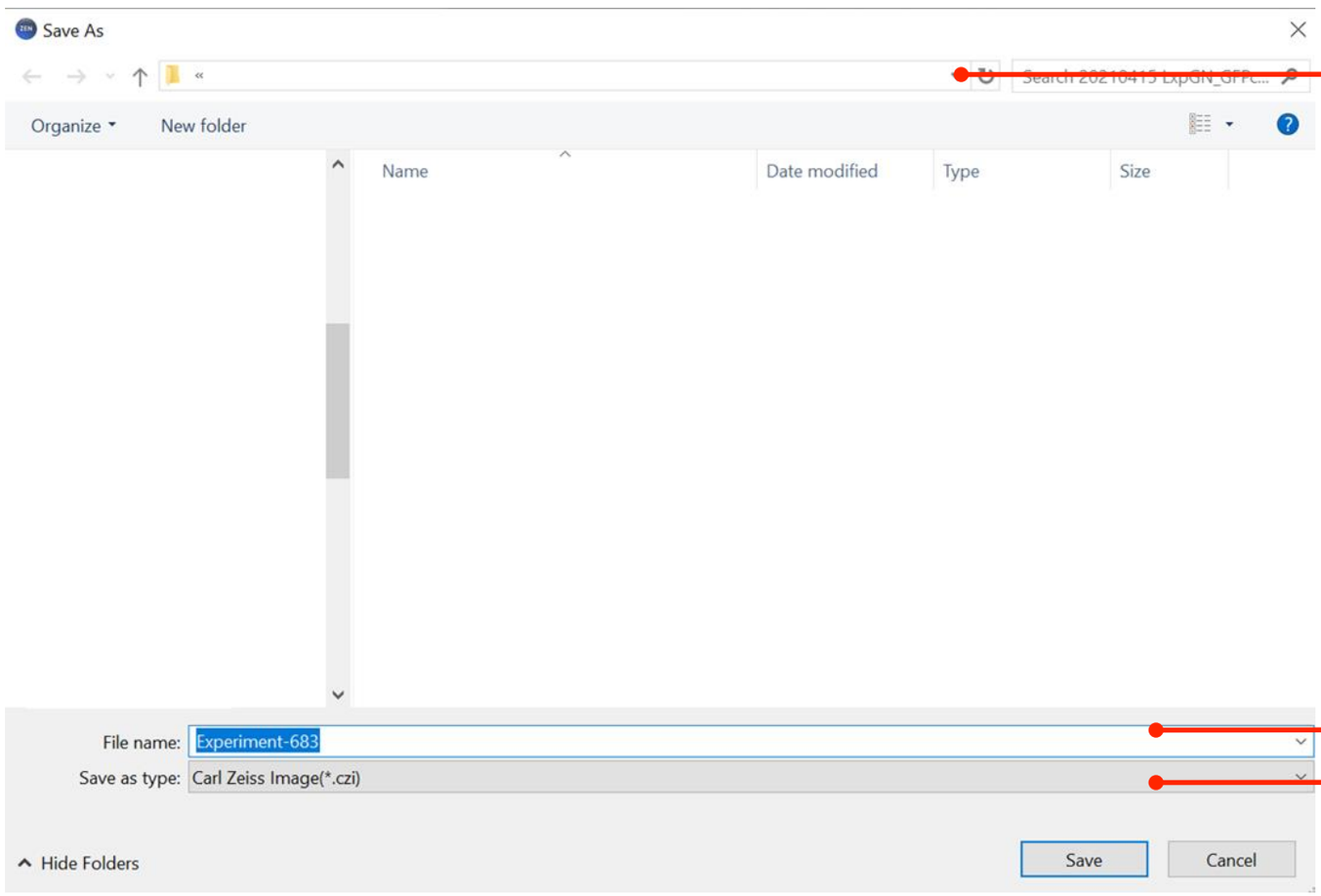
Save Raw Image

- 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)



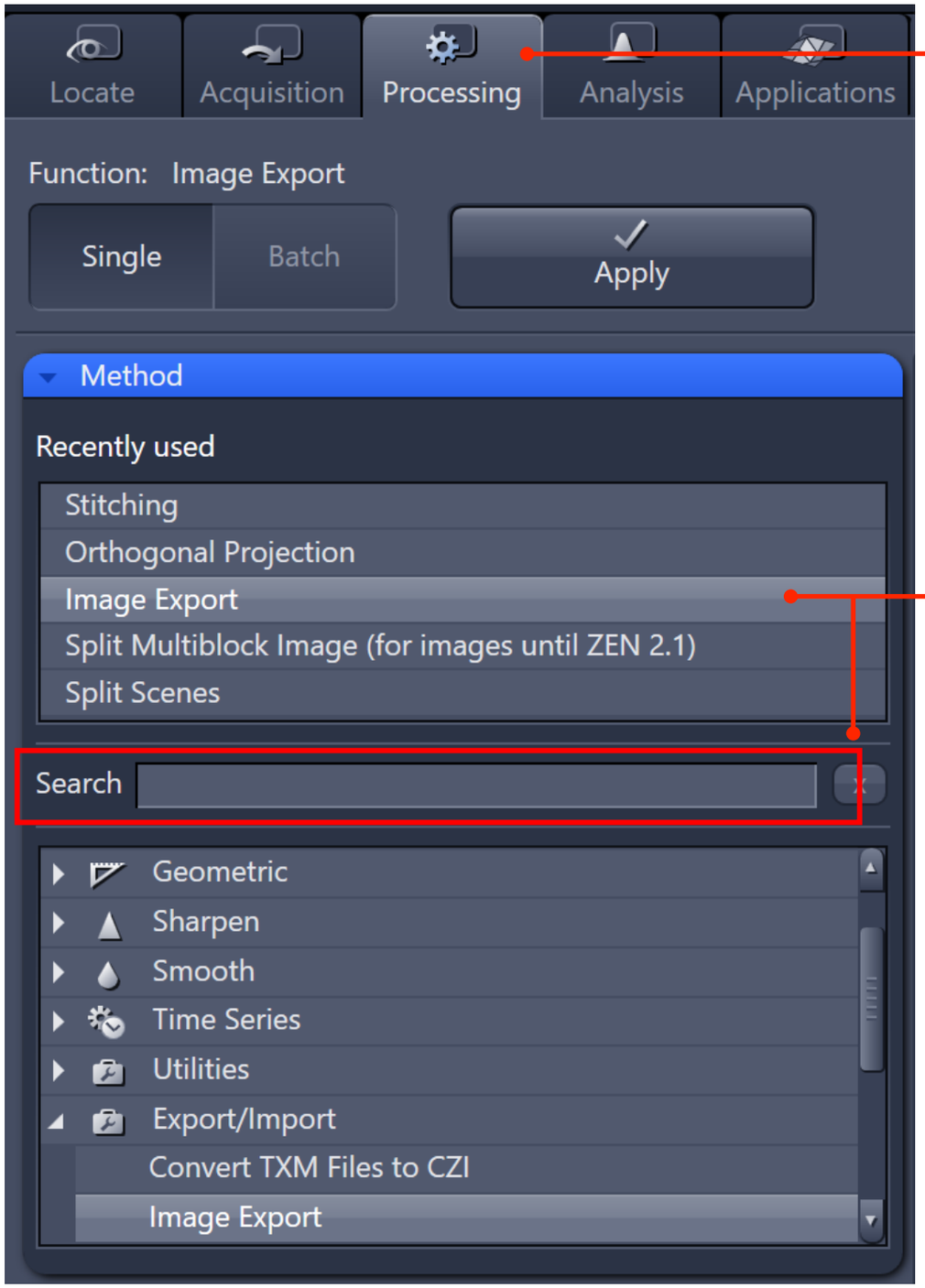
3. 選擇檔案儲存位置

4. 輸入檔案名稱

5. 選擇檔案格式為.czi，”Save”儲存檔案

Export Image

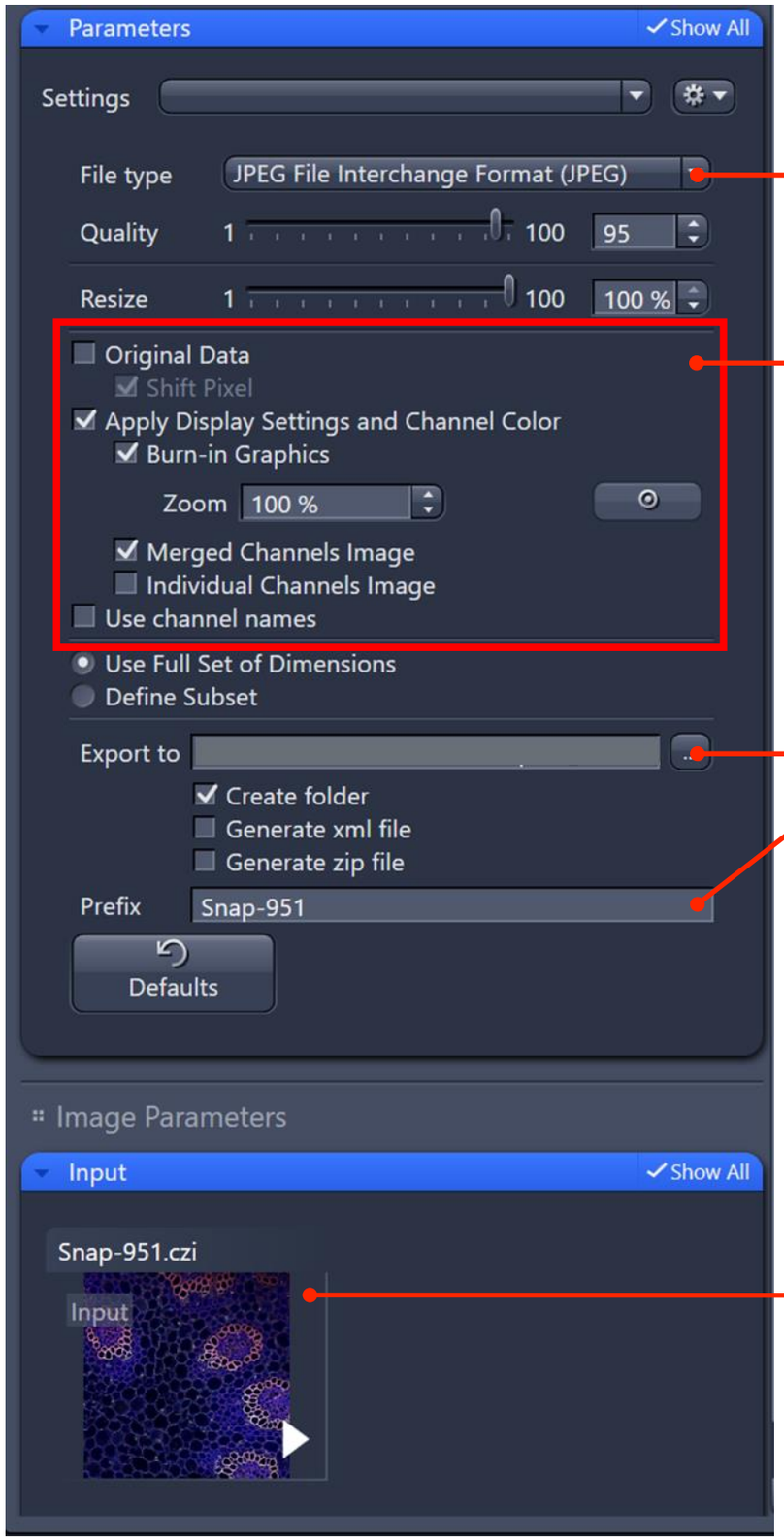
➢ 若需將原始檔轉換為Tiff或JPG等一般影像格式



1. “Processing”

2. 點選 “Image Export” 或於下方搜尋

Export Image



4. 選擇轉檔格式 (Tiff, JPFG)

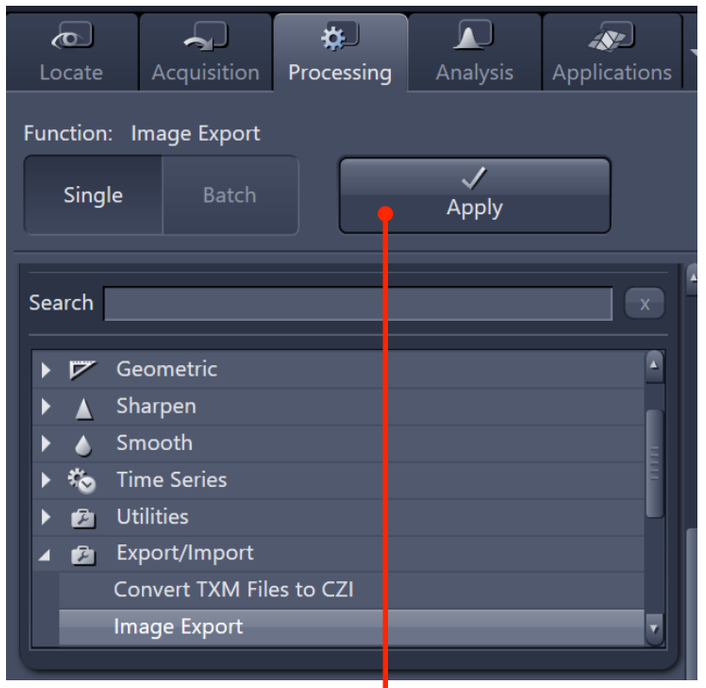
5. 編輯存檔設定

Original Data：輸出螢光照片的原始黑白圖片

Burn-in Graphics：顯示圖片上的註記及比例尺等繪圖物件

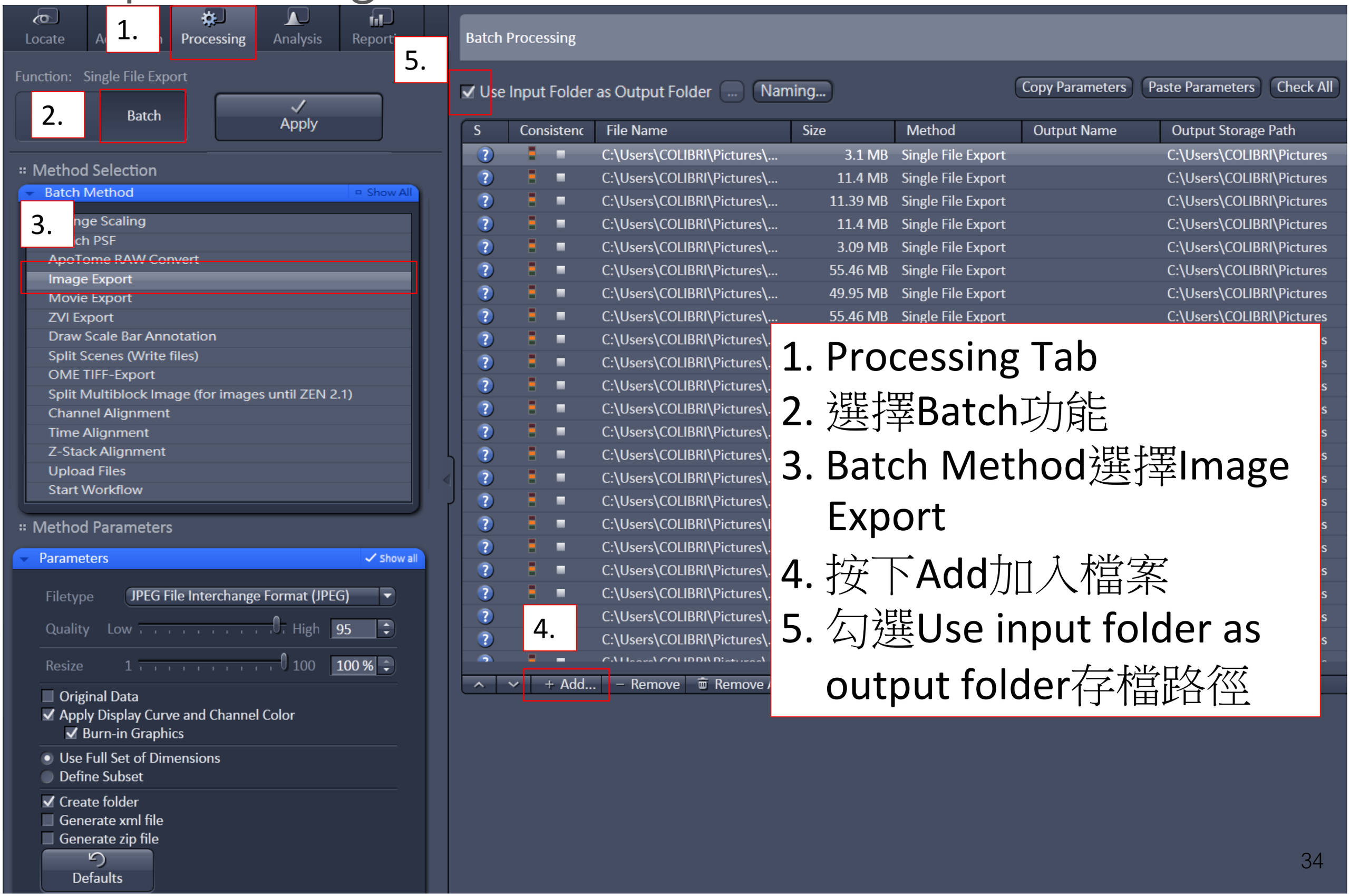
6. 設定儲存位置及檔名

3. “Input”欲處理的檔案



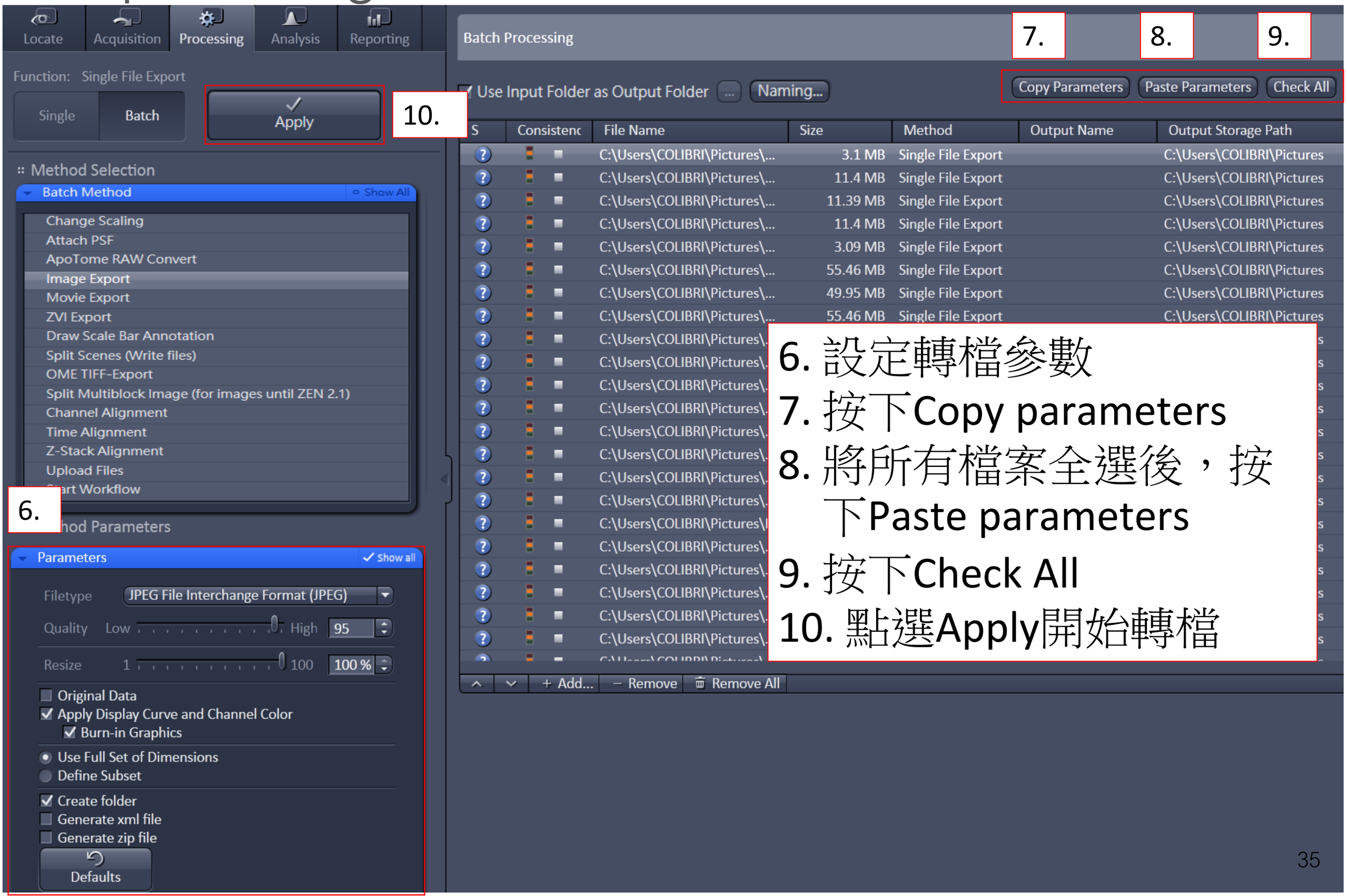
7. “Apply” 存檔

Export Image



1. Processing Tab
2. 選擇Batch功能
3. Batch Method選擇Image Export
4. 按下Add加入檔案
5. 勾選Use input folder as output folder存檔路徑

Export Image



Congratulations !!