



# 尼康共聚焦显微镜AX NIS-Elements 6.0快速上手指南

注：此手册旨在协助新用户快速上手操作，更多功能介绍详见完整操作说明或联系您所在地的尼康员工。

# 1. Ti2-E 显微镜操作（务必使用软件Lightpath切换观察模式）

以下仅标注常用的操作功能，其他功能可能倒置光路混乱（可使用软件切换LightPath修复）

## 通用操作:



## 双侧:



## Eyepiece-DIA:



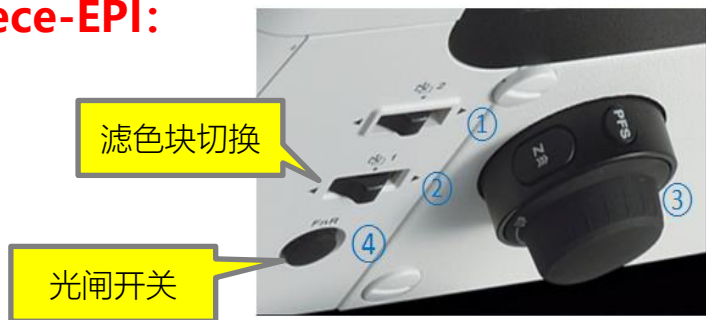
## 左侧

## PFS:

接近焦点时显微镜会有报警声提示



## Eyepiece-EPI:



## 右侧

PFS指示灯闪烁——未锁定焦点

PFS指示灯常亮——锁定焦点

如偏离焦点，使用调焦旋钮继续调焦！

2. 软件界面



界面布局切换

Compact Advanced Wide

File Edit Acquire Calibration Image ROI Binary Measure Reference Macro View Devices Window Applications Assays HCA/JOBS Addons NIS.ai Deconvolution Help

7 564

G: 1.00

0 10000 20000 30000 40000 50000 60000

76 (6, 1252)

G: 1.00

0 10000 20000 30000 40000 50000 60000

20 (0, 920)

Sample Navigation

Stage Document

Full ROI Scan Overview Select Holder

T12-S HU Universal Holder: Slide Focus Position Set Reset

No data Scan for Sample Overview

Focus 1800 1600 1200 500

Escape

ROI Statistics Intensity Profile Measurements

# Length [px] EqDiameter [px] Count

Mean - - -

StDev - - -

Min - - -

Max - - -

Count 0 0 0

快捷功能键

Capture and Store Pad

已打开的图像

20231205\_multi-chns.nd2\* X Captured 1 : Denoised... X Captured 6.nd2\*

AX

11 91%

图像显示

AX GREEN RED 0.04 um/px 2x16bit: 2048 x 2048 pixels [N/A]

图像预览和拍摄区

Live Capture Find AutoSignal Autofocus Short Autofocus Long ND Acquire Large Image

DIA D-LEDE AX AX NSPARC 光路切换 Lightpath

Experiment: Search Sample Settings

Channels: Blue Green 实验(通道)设置 Ch. Setup Add

AX Pad AutoSignal.a Auto Laser Off Denoise.ai

Scanner Resonant Galvano

Averaging 1 2 4 8 16 32 64

Dwell time 1 1.6 2 3.2 4 8 16 32 128

Channel Series 0.286 fps 3.5 sec Frame Time

405 nm Blue 430-475 nm

Gain 3.0 50.0

561 nm Red 571-625 nm

Gain 10.0

640 nm Far Red 663-738 nm

Gain 5.0

Pinhole Size [AU] 1.0 @ 640 nm

Optical Res. 0.47 um Optical Sect. 2.86 um

Configure

Microscope Control

Zoom: 1x DIC Pos: 0.4

4x 10x 20x 20x 60x 100x

484.960 [um] Accuracy [um]: Open

Focus Sample Swap Escape

Filters

Turret Lo [R] [B] [G] [W]

Condenser

7: Shutter Configure...

AX Scan Area

2048 1024 1024 x 512 512 x 256 256 x 128

Polyline Rotation: 0

Zoom Size: 1.0 Max Fov

Pixel Size: 0.863 um

Shading Correction Nyquist: 0.205 um

XY Size: 884 um x 884 um Optical Res. 0.47 um

扫描区域设置

图像打开和保存

Save Open

简易测量工具

已打开的图像

图像显示

图像显示调节

样品导航

快捷功能键

图像预览和拍摄区

光路切换

实验(通道)设置

显微镜控制

共聚焦参数调节

扫描区域设置

图像打开和保存



### 3. 多通道荧光成像

**Tips:** 在预览图像上滚动鼠标滚轮可以调焦（Z轴）；  
预览图像用鼠标左键拖拽可以移动视野（XY）。

**Nikon**

13. 已拍摄图像依次排列显示。

12. 点击Capture自动获取多通道图像。

8. 点击Find（低画质快速预览）或live（标准预览）。

2. 切换至DIA肉眼白光观察，或D-LEDI肉眼荧光观察。找到样品。

4. 选择实验设置4ch（4通道荧光）。

3. 切换到AX共聚焦成像光路。

1. 选择物镜

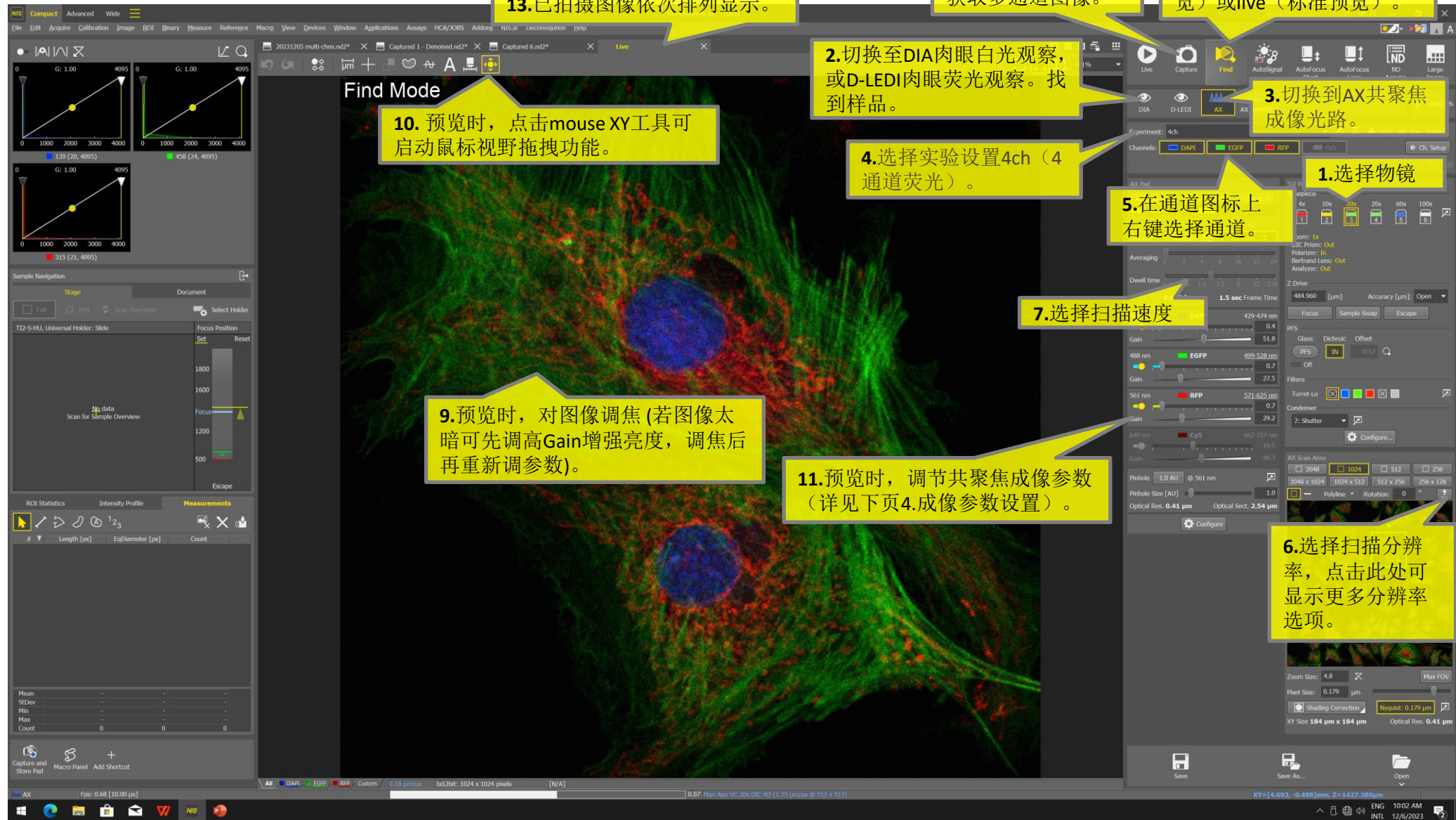
5. 在通道图标上右键选择通道。

7. 选择扫描速度

9. 预览时，对图像调焦（若图像太暗可先调高Gain增强亮度，调焦后再重新调参数）。

11. 预览时，调节共聚焦成像参数（详见下页4. 成像参数设置）。

6. 选择扫描分辨率，点击此处可显示更多分辨率选项。



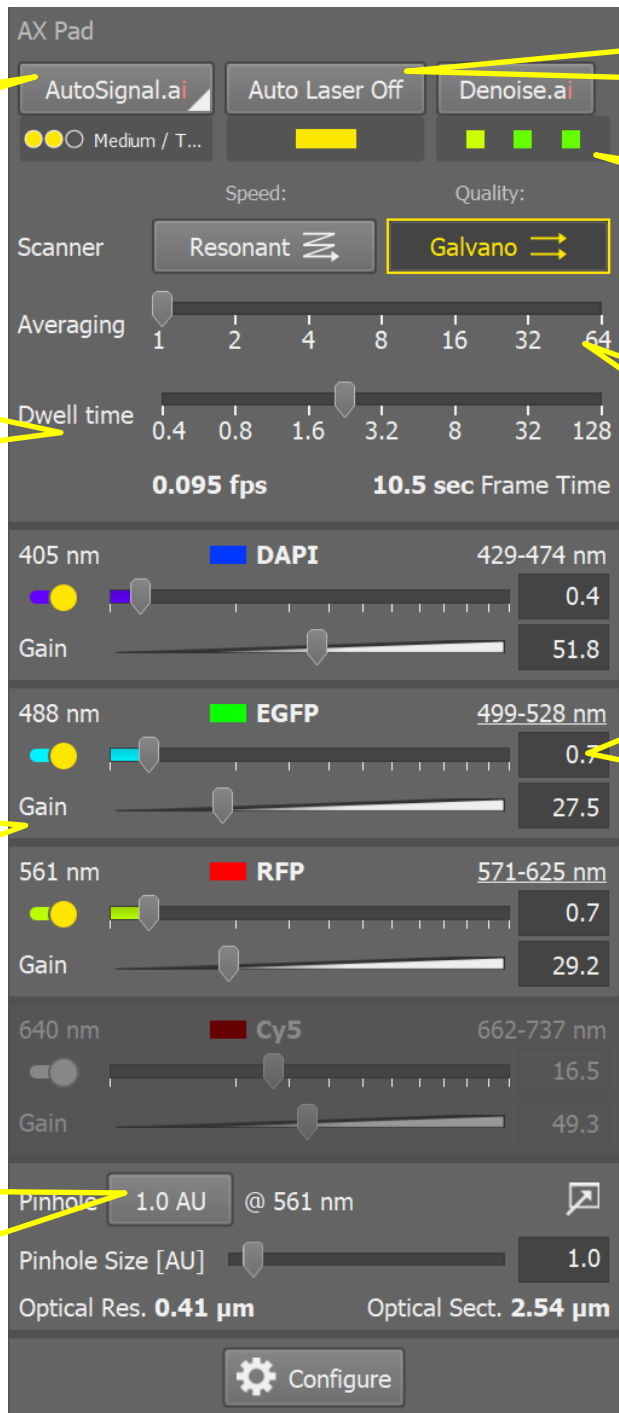
## 4. 图像参数调节

6. 根据需要点击AutoSignal.ai按钮进行共聚焦参数全自动调节。旁边的三角按钮可以预设样品类型以匹配参数调节偏好。

2. 扫描速度（点扫描曝光时间），从左往右速度渐慢。根据样品情况确认合适的扫描速度以平衡成像速度和图像信噪比。

4. 调节Gain值（**边预览边调**），表示检测器的灵敏度，数值越大图像越亮，噪声越高。

5. 针孔调节（**边预览边调**），加大针孔可以增加共聚焦光学切片厚度，从而获得更明亮的图像，但会降低图像分辨率。通常选择“1.0AU”。



7. 按需要打开自动激光关闭功能。预览标本时若长时间无操作激光自动关闭。

8. 色块分别代表每个通道的图像信噪比，信噪比从高到低，色块由绿色渐变至红色。可为参数调节提供参考。

1. 选择扫描平均次数。通常为1，标本信号弱时可适当增加平均次数降低图像噪声。

3. 激光功率调节（**边预览边调**），增加激光功率可以提高图像亮度，也可能造成更多荧光淬灭，因此在保证图像良好信噪比的前提下越小越好。

**Tips:**  
“Gain”“激光功率”调节时在滚动条上使用鼠标滚轮为微调，在滚动条上鼠标左键点击可大幅度调节。

**Nikon**

5. 扫描视野设置



AX Scan Area

☐ 2048 ☒ 1024 ☐ 512 ☐ 256

2048 x 1024 1024 x 512 512 x 256 256 x 128

☒ Polyline Rotation: 0 °

矩形扫描 线扫描

方框代表扫描视野区域，红色方框为待确认，点鼠标右键方框变为绿色代表设置生效。

图像扫描缩放，可局部放大扫描。

重置最大视野

Zoom Size: 1.0 Max FOV

Pixel Size: 0.863  $\mu\text{m}$

☒ Shading Correction Nyquist: 0.179  $\mu\text{m}$

XY Size 884  $\mu\text{m}$  x 884  $\mu\text{m}$  Optical Res. 0.41  $\mu\text{m}$

自动阴影校正，可以改善视野亮度均一性。

AX Scan Area

☐ 2048 ☒ 1024 ☐ 512 ☐ 256

2048 x 1024 1024 x 512 512 x 256 256 x 128

☒ Polyline Rotation: 32.9 °

图像旋转角度设置。

拖住小点旋转可以改变成像角度。

Zoom Size: 2.6 Max FOV

Pixel Size: 0.330  $\mu\text{m}$

☒ Shading Correction Nyquist: 0.179  $\mu\text{m}$

XY Size 884  $\mu\text{m}$  x 884  $\mu\text{m}$  Optical Res. 0.41  $\mu\text{m}$

扫描分辨率自动匹配光学分辨率，实现最佳分辨率成像。



## 6. 图像的显示，调节和保存

**Tips:** 平铺多通道视图如需保存，“Edit”菜单“Creat view snapshot 8bit”，新生成的图像可以直接另存为tiff文件。



曝光饱和指示。

添加标尺。

展开预览图

自动亮度对比度按钮。

平铺显示各通道

图像适应窗口

斜线（伽马值）往下拖动，降低弱信号（降低背景）。

左侧竖线往右拖动，去除弱信号（去背景）。

右侧竖线往左拖动，图像整体亮度增加。

通道标签，叠加视图下可以切换显示单通道，或者ctrl多选显示组合通道。

标尺上右键可进行标尺显示设置。

“Save as”，保存图像为“nd2”格式（包含成像参数和测量信息的原始格式）。

Save

Save As...

Open

20  $\mu$ m

Mean StDev Min Max Count

0 0 0 0 0

Intensity Profile

Measurements

ROI Statistics

Scan for Sample Overview

Focus

Escape

AX Pad

AutoSignal.a

Auto Laser Off

Denoise.a

Speed

Quality

Scanner

Resonant

Galvano

Averaging

1 2 4 8 16 32 64

Dwell time

0.4 0.8 1.6 3.2 6.4 12.8

0.095 fps 10.5 sec Frame Time

405 nm

Gain

51.8

488 nm

Gain

26.5

561 nm

Gain

29.2

640 nm

Gain

49.3

Pinhole Size [AU]

1.0

Optical Res. 0.41  $\mu$ m Optical Sect. 2.54  $\mu$ m

Configure

Ti2 Pad

Nospiece

4x

10x

20x

60x

100x

Zoom: 1x

DIC Prism: Out

Polarizer: In

Bertrand Lens: Out

Analyzer: Out

Z Drive

484.960  $\mu$ m Accuracy  $\mu$ m: Open

Focus

Sample Swap

Escape

PFS

Glass

Dichroic

Offset

9557

Filters

Turret Lo

Condenser

Z: Shutter

Configure...

AX Scan Area

2048

1024

512

256

2048 x 1024

1024 x 512

512 x 256

256 x 128

Polyline

Rotation: 0

Zoom Size: 4.8

Max FOV

Pixel Size: 0.179  $\mu$ m

Shading Correction

MaxDist: 0.179  $\mu$ m

XY Size 184 x 184  $\mu$ m Optical Res. 0.41  $\mu$ m

Save

Save As...

Open

AX

ShowScaled(1)

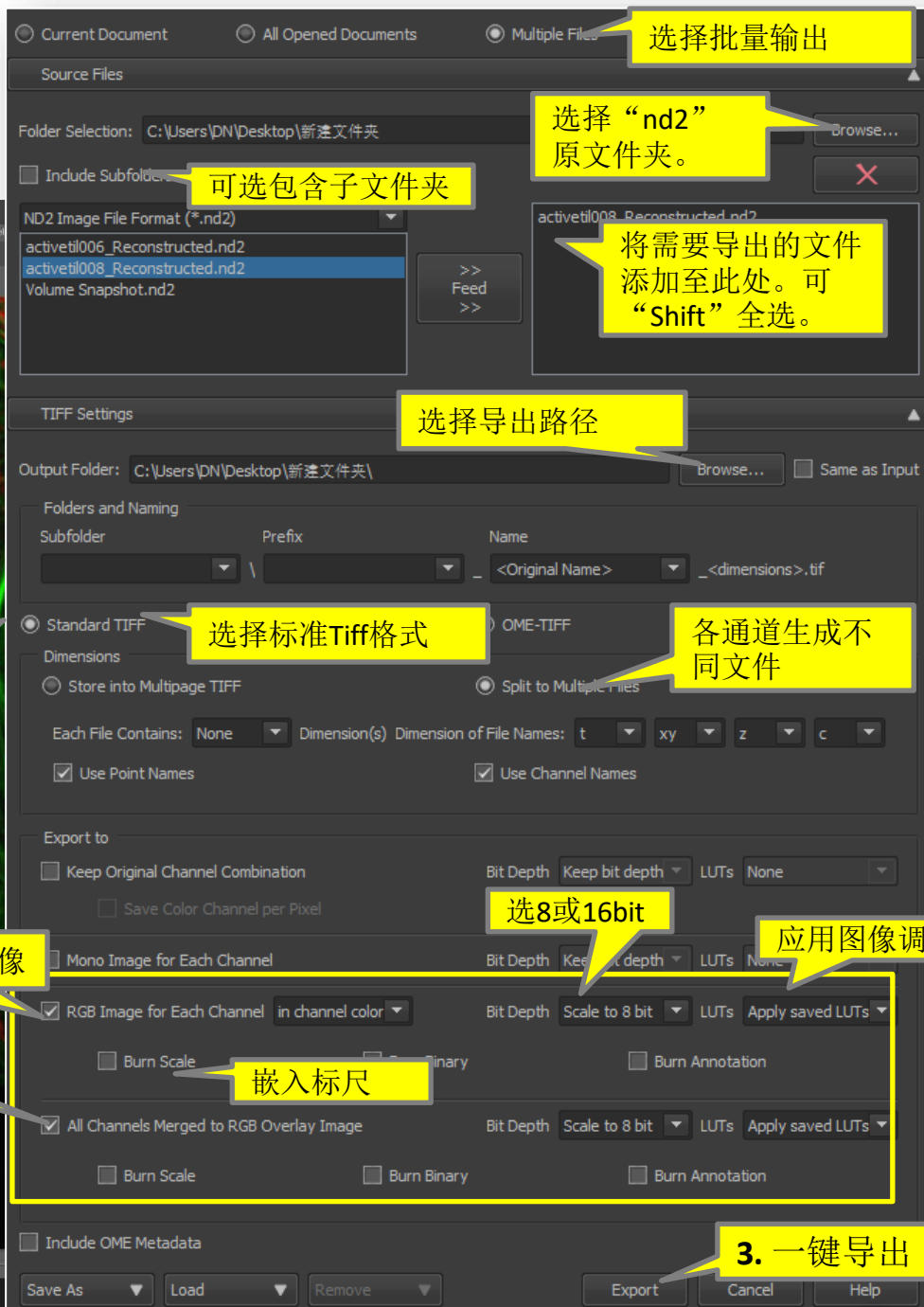
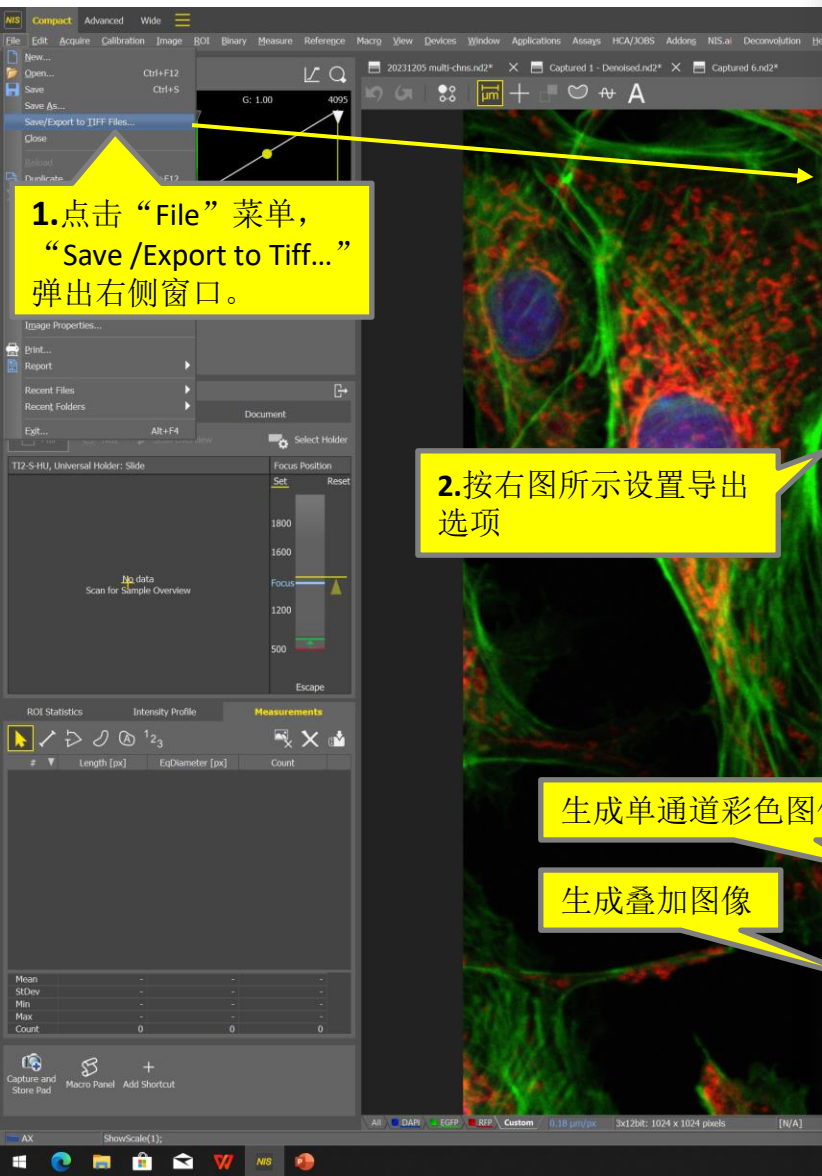
Plan Apo VC 20x DIC N2 (1.73  $\mu$ m/px @ 512 x 512)

XY= [4.694, -0.488]mm, Z= 3.425.900 $\mu$ m

ENG 10:16 AM 12/6/2023

## 7. 输出Tiff格式图像

**Tips:** 推荐先保存所有nd2原始数据，再批量一键导出tiff。





## 8. 多维图像拍摄之Z轴序列拍摄（Z轴序列图像获取）



**Tips:** 若对Z轴分辨率没有极致的要求，可以在软件推荐层数基础上除以2至2.5左右，减少成像数提高成像速度。

**1.** 点击多维拍摄按钮，调出多维拍摄弹窗。

**2.** 勾选Z-stack选项

**3.** 点击Z-stac标签，显示Z轴设置窗口。

**4.** 选择自动保存文件夹

**5.** 选择通过设置上下边界确定厚度范围。

**6.** 预览图像。调焦至样品最上层，点击Top，反向调焦至最底层，点击Bottom。结束预览，减少荧光淬灭。

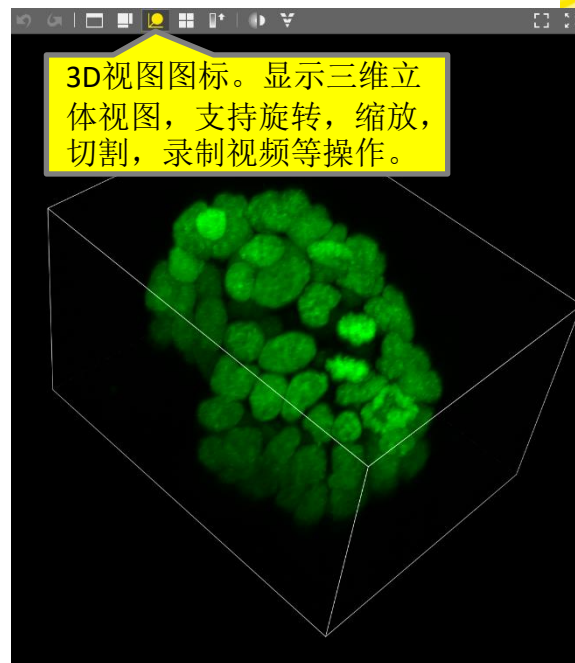
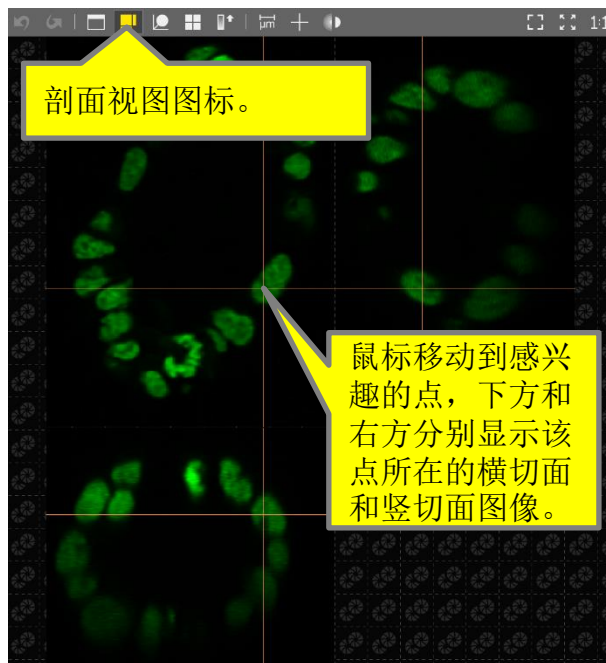
**7.** 样品厚度确定后显示在此处。

**8.** 点击此键，填入推荐Z轴步进。

**9.** 或手动输入拍摄层数，软件自动计算步进。

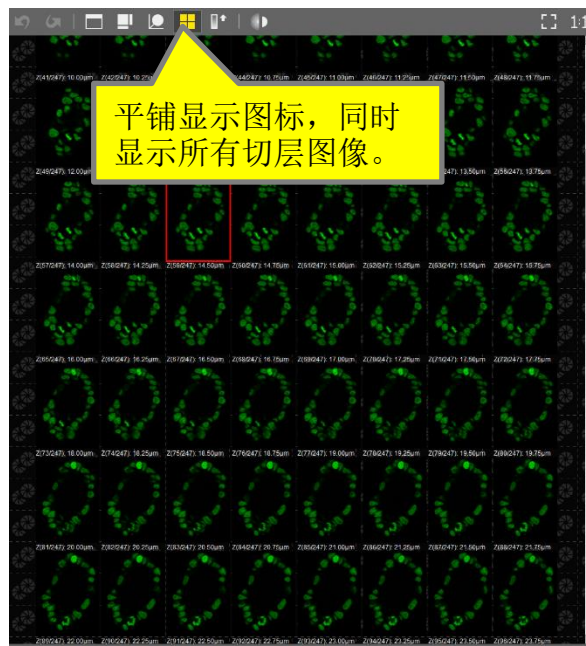
**10.** 点击run开始自动拍摄Z轴序列图像。

## 8. 多维图像拍摄之Z轴序列成像（Z轴序列图像显示）



### Tips:

以上视图如需保存，“Edit”菜单“Creat view snapshot 8bit”，新生成的图像可以直接另存为tiff文件。



在图像上右键，选择“Create New Document from Current View”生成相应图像。

## 9. 多维图像拍摄之时间序列成像

**Tips:** 多维拍摄窗口中的timelapse, Z-stack等同时勾选, 可以拍摄多维图像, 最多支持6维。

**Tips:** 动态成像务必打开完美对焦系统PFS, 防止焦点漂移。



The screenshot displays the Nikon NIS-Elements AR software interface. The main window shows a live view of a sample with multiple channels (DAPI, EGFP, RFP). Overlaid on this are several windows and callouts:

- ND Acquisition Wizard:** A central window with tabs for Acquisition Parameters and Timelapse. The Timelapse tab is active, showing options for Timelapse, Multipoint, Z-stack, and Multichannel. The 'Filename' field is set to 'Experiment'.
- Callout 1:** Points to the 'PFS' (Perfect Focus System) button in the bottom right corner of the main window.
- Callout 2:** Points to the 'ND Acquisition' button in the top right corner of the main window.
- Callout 3:** Points to the 'Timelapse' checkbox in the ND Acquisition Wizard.
- Callout 4:** Points to the 'Timelapse' tab in the ND Acquisition Wizard.
- Callout 5:** Points to the 'Save file(s) into folder' radio button in the ND Acquisition Wizard.
- Callout 6:** Points to the 'Time Sequence Name' field and the table below it in the ND Acquisition Wizard.
- Callout 7:** Points to the 'Run' button in the bottom right corner of the ND Acquisition Wizard.

**Time Sequence Name Table:**

Name	Phase	Interval
#1	Fixed Duration	3 min
		Run Every
		1 sec



## 10. 多维图像拍摄之多点成像



**Tips:** 多点成像和时间序列成像同时勾选，可提高单位时间内的拍摄通量。

**Tips:** 多点成像和Z轴序列成像同时勾选，设置好之后可以自动拍摄多个样品的三维图像。

The screenshot displays the Nikon NIS-Elements AR software interface. The main window shows a live view of a sample with green and red fluorescence. Overlaid on this are several windows and panels:

- ND Acquisition Wizard:** A central dialog box with tabs for Acquisition Parameters, Timelapse, and Multipoint. The Timelapse and Multipoint options are checked. The Multipoint section shows a list of predefined points with their X, Y, and Z coordinates.
- Acquisition Parameters:** A panel on the left showing various acquisition settings like exposure time, gain, and filter.
- Timelapse:** A panel on the left showing settings for time-lapse imaging.
- Multipoint:** A panel on the left showing settings for multi-point imaging.
- ROI Statistics:** A panel at the bottom left showing statistics for the region of interest.
- Measurements:** A panel at the bottom right showing measurement results.

Yellow callout boxes provide numbered instructions for setting up the acquisition:

1. 打开PFS完美对焦系统，之后预览样品并调焦。
2. 点击多维拍摄按钮，调出多维拍摄弹窗。
3. 勾选Timelapse和multipoint选项
4. 选择自动保存文件夹
5. 点击Timelapse标签，设置好延时拍摄参数。
6. 点击multipoint标签，显示多点设置窗口。
7. 预览图像，找到合适视野之后在白框处打勾。该视野的XY坐标被记录下来。
8. 必要时勾选包含Z轴坐标，则XYZ的坐标都会被记录。
9. 点击run开始自动拍摄。

Point Name	X [mm]	Y [mm]	Z [μm]
#1	4.694	-0.488	1422.120
#2	4.042	-0.457	1424.380
#3	4.052	-0.264	1424.340
#4	3.941	0.041	1424.420

# 11. 多维图像拍摄之自动大图拼接（需要电动载物台）

**Tips:** 如果不关注大图像的细节，可以适当降低扫描分辨率，提高拼接速度。



1. 点击大图拼接图标。调出弹窗。

2. 勾选Z focus surface。

3. 选择自动保存文件夹。

4. 选择拼接方式。下拉显示更多选项。

5. 设置拼接区域。移动视野至样品各方向边界，并对各位点进行调焦，点击箭头记录各边界坐标位置。

6. 区域设置好后，对应样品区域的实际大小和拼接图像大小信息显示在此。

7. 拼接模式通常选择blending。

8. 开始拍摄。



# 12. 透射光DIC（微分干涉相差）图像拍摄

**Tips:** 鼠标悬停在物镜图标上，会显示该物镜信息，可以确认该物镜匹配N1或N2棱镜。通常10x物镜选N1，20x及以上选N2。

**9.** 点击“Capture”获取荧光和DIC叠加图。

**Tips:** TD通道默认使用488激发，因此488激光功率也会影响DIC图像亮度。点击此处修改可修改TD通道激发光。

**6.** Live或Find预览图像。

**3.** 选择实验4ch+DIC。

**4.** 此时透射光通道已添加。可通过右键off。

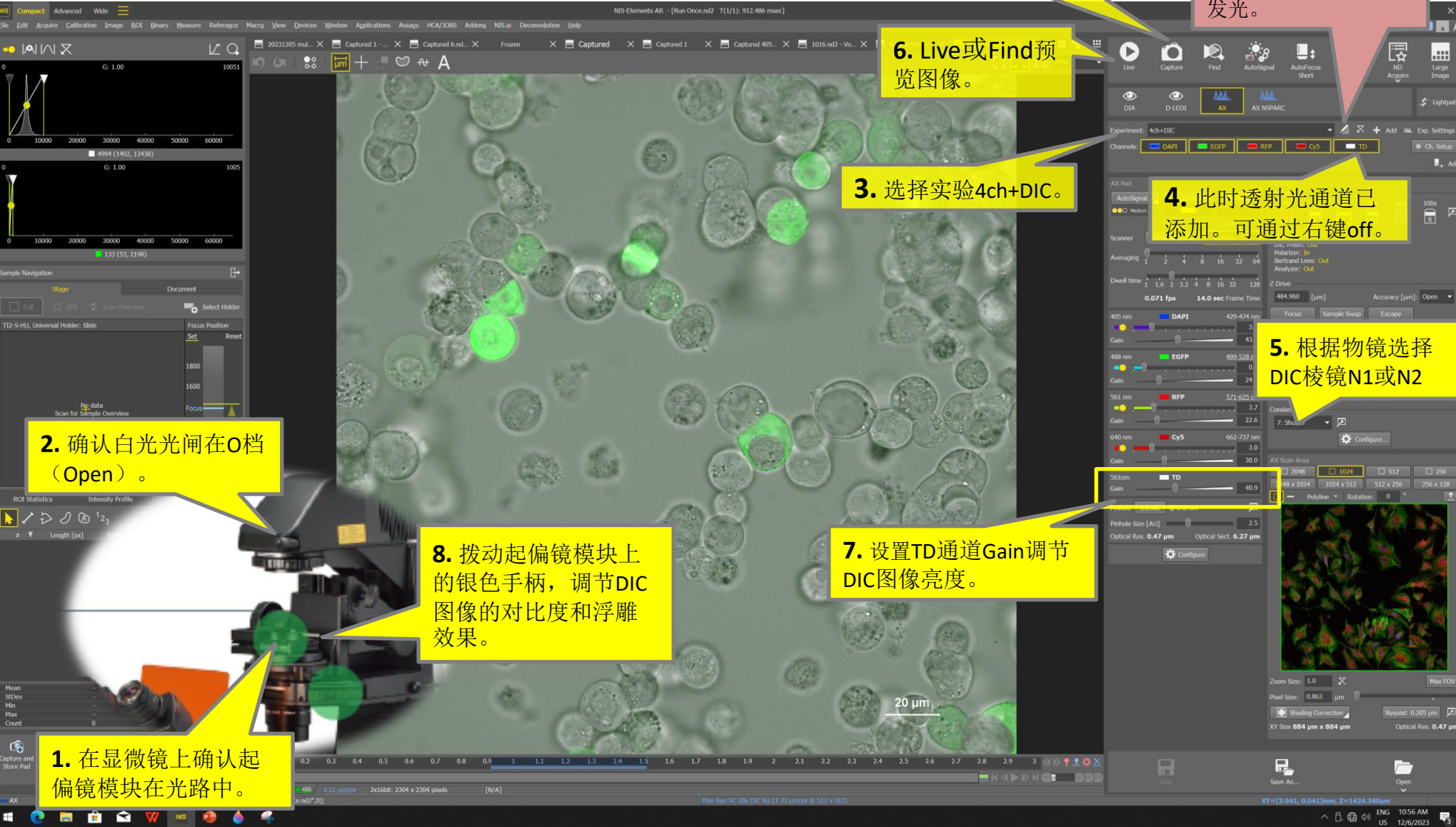
**5.** 根据物镜选择DIC棱镜N1或N2

**2.** 确认白光光闸在O档（Open）。

**8.** 拨动起偏镜模块上的银色手柄，调节DIC图像的对比度和浮雕效果。

**7.** 设置TD通道Gain调节DIC图像亮度。

**1.** 在显微镜上确认起偏镜模块在光路中。





# 选配功能 —— ER高分辨率成像

此功能仅限配置了ER分辨率增强模块的系统使用

Tips: 请移除物镜下DIC棱镜，否则会影响分辨率。



3. 成像后点击图像上方ER按钮。

1. 适当缩小针孔至0.3-0.8AU。

2. 提高扫描分辨率（采样率）。可按Niquist 推荐值除以1.5设置pixel size。

4. 点击OK即得到反卷积之后分辨率增强的共聚焦图像。

**Automatic Deconvolution**

**Basic Settings**

Magnification: 60x

Numerical Aperture: 1.4

Immersion Refractive Index: 1.515

Calibration: 0.21  $\mu\text{m}/\text{px}$

Z-Step: 0.470  $\mu\text{m}$

Pinhole Size: 30.00  $\mu\text{m}$

**Channels**

Name	ExW	EmW
EGFP	488	525
TRITC	561	785

☐ Use Spherical Aberration Correction

☐ Create new document

☐ Do not show this dialog for images with valid metadata

OK Close

Resolution: 1024 x 1024 x 24 | Calibration: X

XY = 3.941, 0.041  $\mu\text{m}$ , Z = 1424.400  $\mu\text{m}$

Nyquist值会随物镜变化。

Nyquist: 0.179  $\mu\text{m}$

Optical Res. 0.41  $\mu\text{m}$

# 选配功能——光谱成像

此功能仅限配置了光谱型检测器的系统使用



7. 点击“Capture”自动获取全光谱图像。

6. 预览，调整图像焦点和视野。

1. 点击实验“full spectra”。

9. 平铺显示所有光谱通道。

8. 原LUTs窗口自动生成光谱曲线图。

2. 设置光谱成像的波长范围

3. 设置光谱分辨率

4. 选择激发光

5. 预览图像，调节激光功率和Gain值。

8. 点击光谱标签显示单个光谱通道或点击All显示所有光谱通道叠加图。

