LSM 900 Basic Operation

Carl Zeiss Microscope

Application Specialist

Dr. Lu Xi & Yan Runchuan

Agenda

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

Agenda

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

打开稳压电源：

a、打开稳压电源背后总开关；

b、打开稳压电源前面开关；

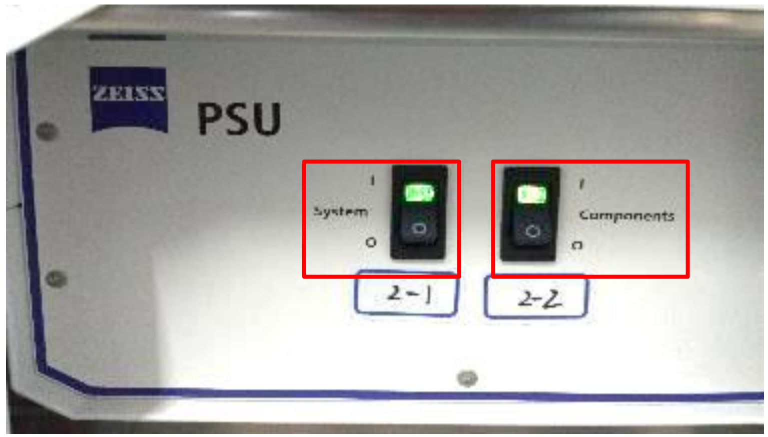
c、确定稳压电源显示220V；

Startup and Shutdown of the System

Startup of the System

开启总电源后，按照如下顺序开启各部件电源：

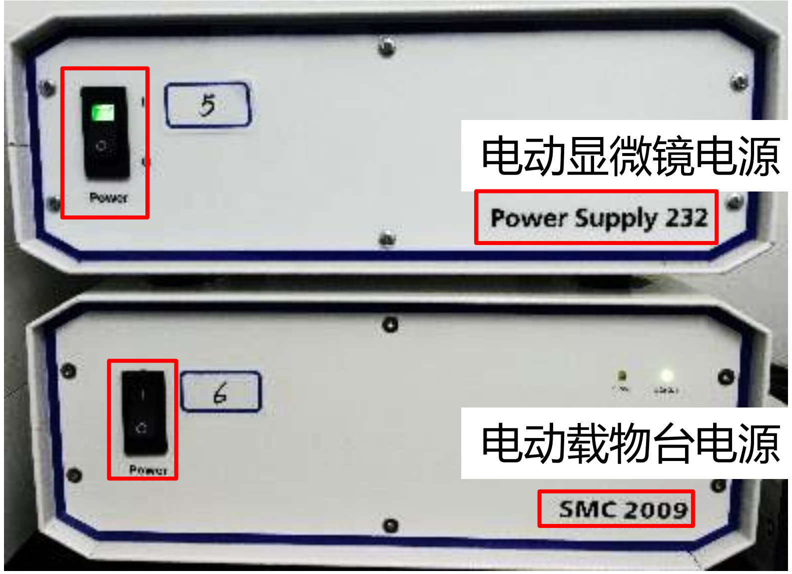
1、打开“System”和“Components”；



2、将Laser Module“LM”的钥匙从“0”转到“1”

Startup and Shutdown of the System

Startup of the System



3、打开电动显微镜电源“Power Supply 232”和电动载物台电源“SMC 2009”；（如果是手动载物台没有“SMC 2009”）

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

Startup and Shutdown of the System

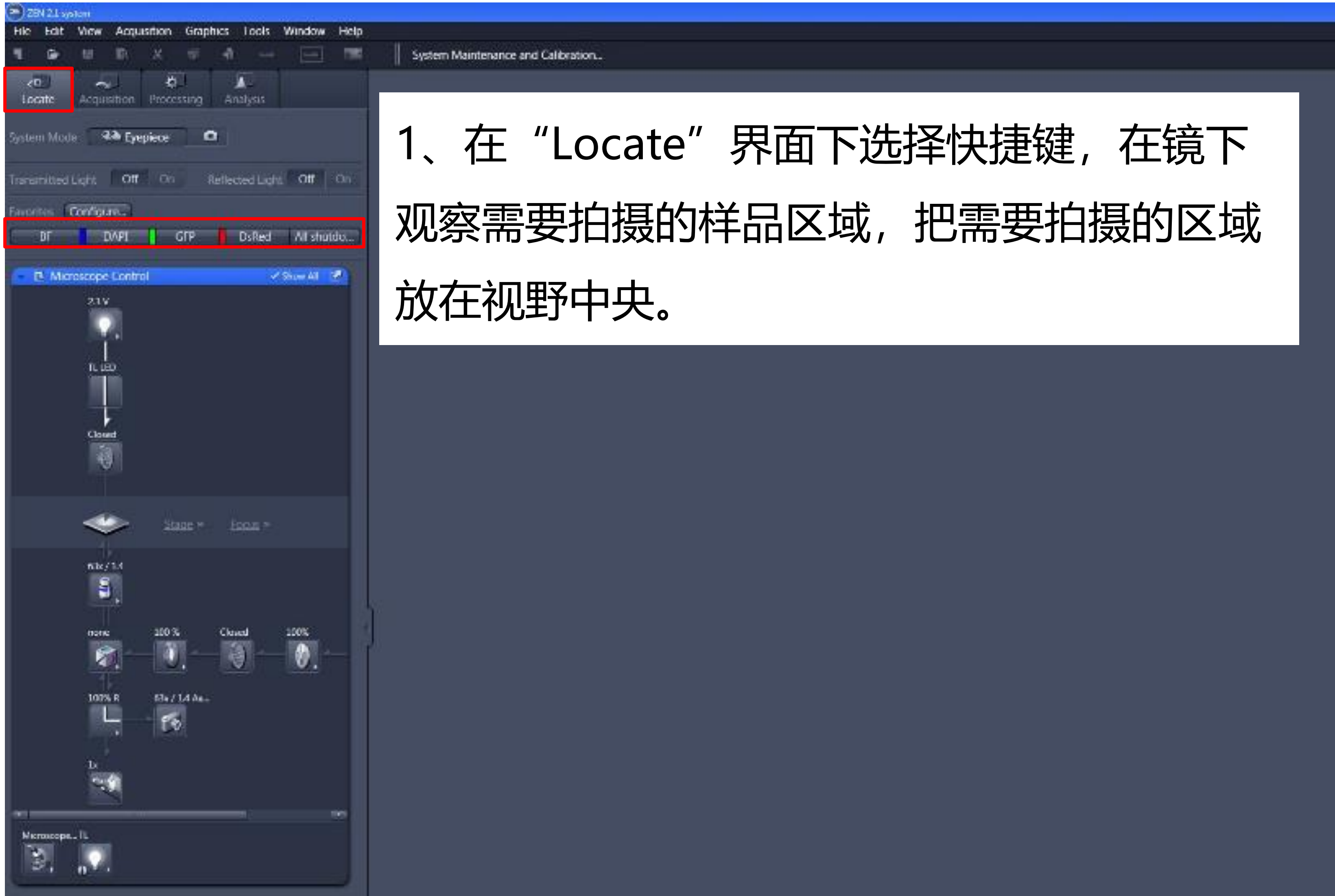
Startup of the System

5、启动ZEN软件（Blue），选择“ZEN system”；

Agenda

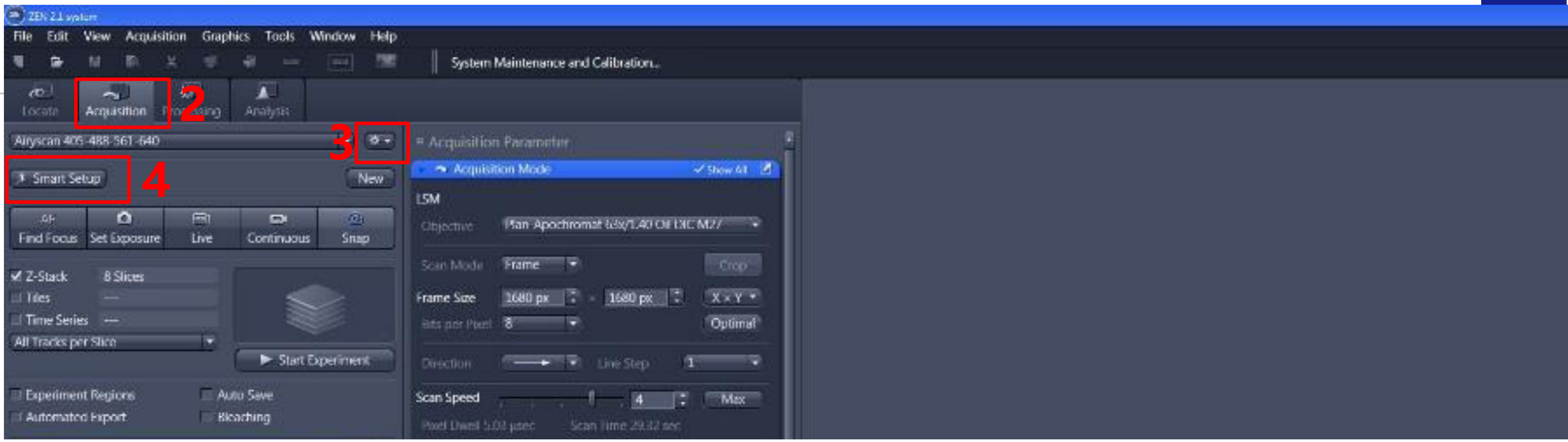
1	Startup and Shutdown of the System
2	Acquiring Multi-Channel images
3	Z-stack image
4	Time Series image
5	Tile Scan
6	Airyscan Imaging

Acquiring Multi-Channel images



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。

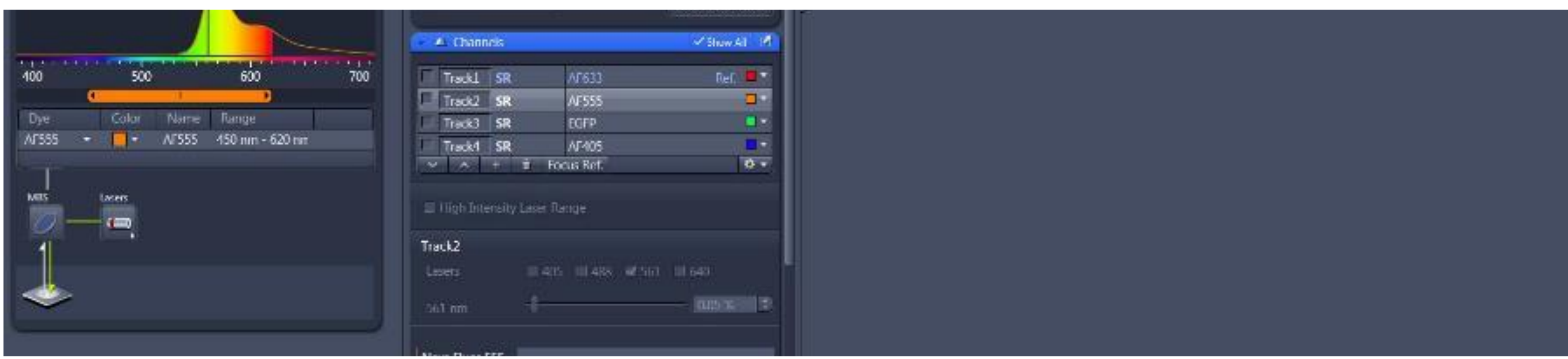
Acquiring Multi-Channel images



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， “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)；

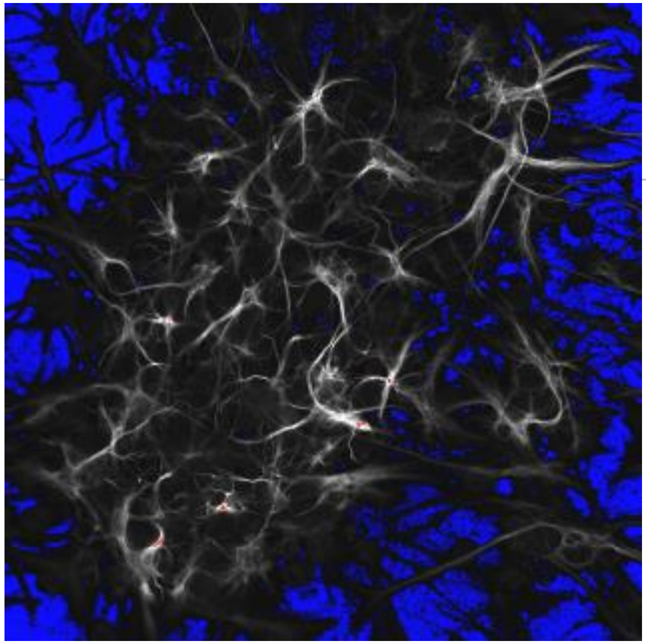
A、“Pinhole”一般设置为1 AU，增大Pinhole可以提高图像亮度，但会增加非焦面信息；减少Pinhole可以增加景深，但是会减少图像亮度；

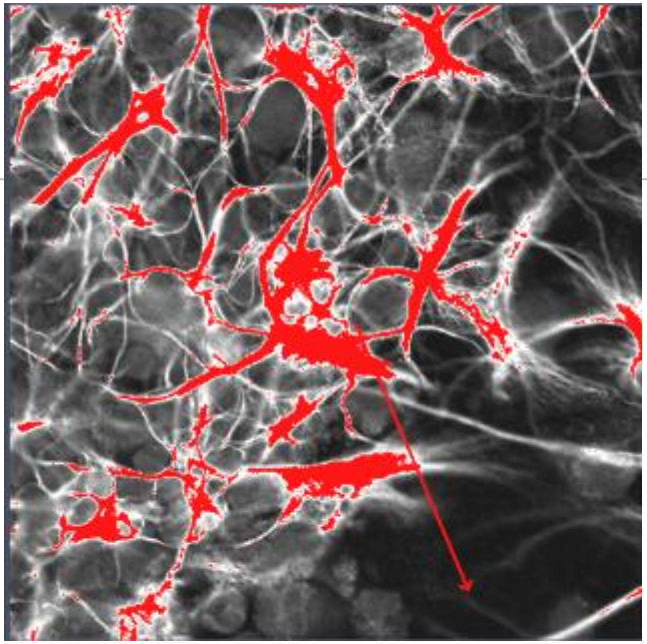
B、“Gain”和“Digital Gain”增加可以增加图像亮度，但是也会提高背景噪音。

“High Intensity Laser Ranger”：

不勾选最小激光值能达到0.01%，但最高值分别只能达到3.5%（405），4.5%（488）和5%（561、640）

勾选后激光值能达到100%，但最小值不能低于0.2%

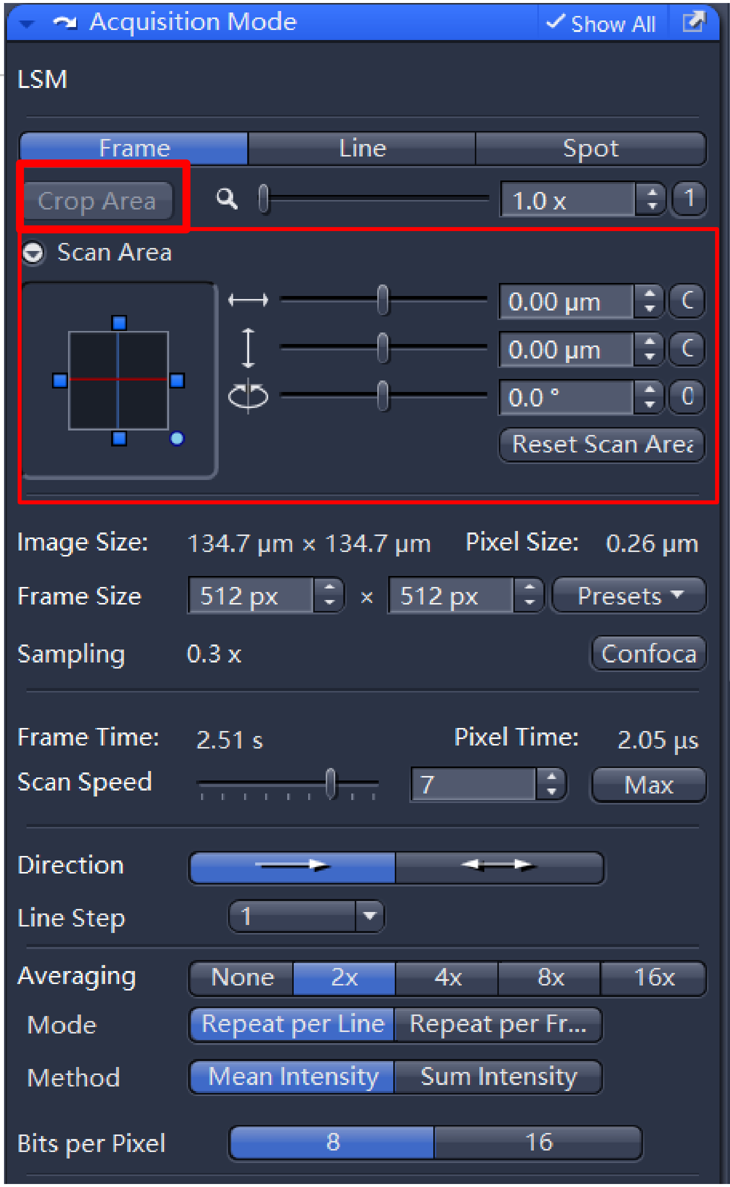




设置原则保证图像不要过曝，尽量减少背景噪音：

在live下选择“range indicator”可以显示出曝光程度；

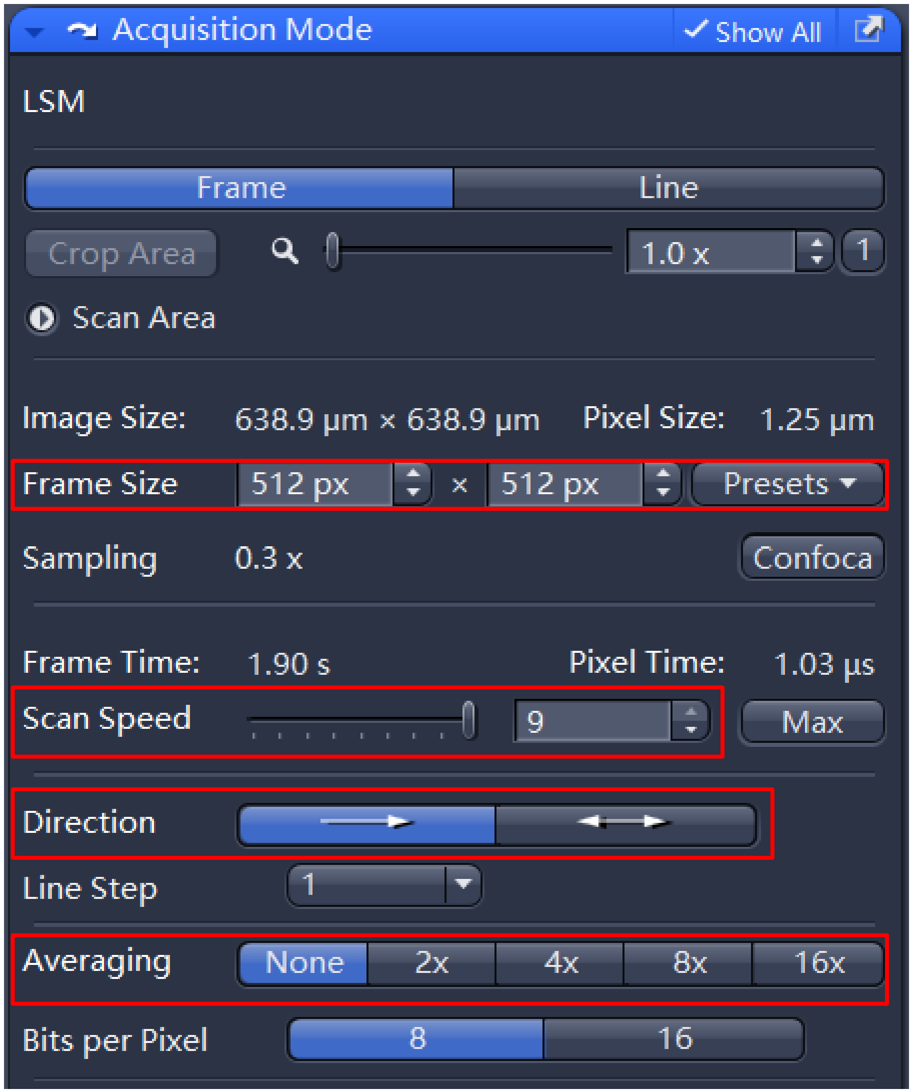
Acquisition Mode



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图像窗口下的“crop”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；

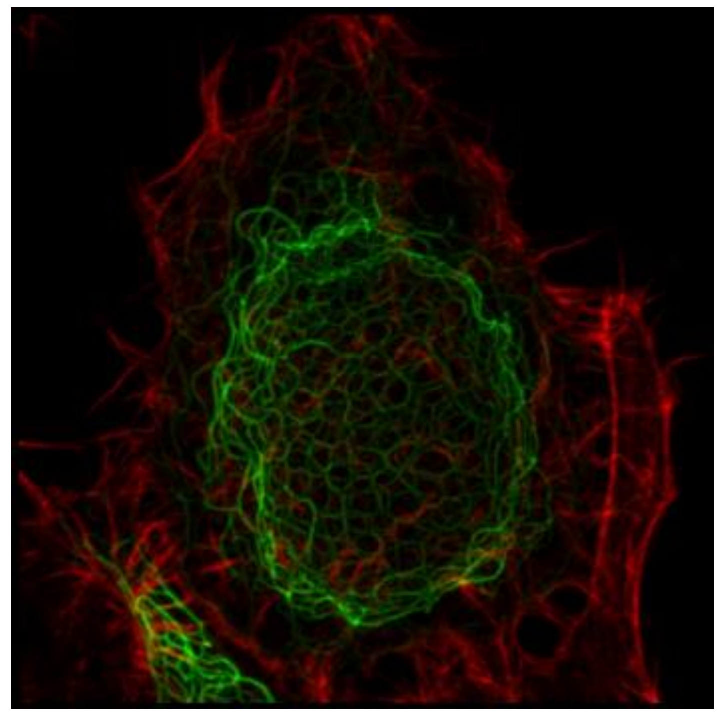
C、Averaging：增加averaging次数可以减少噪音，但会增加扫描时间；

D、Direction：双向扫描可以减少扫描时间；

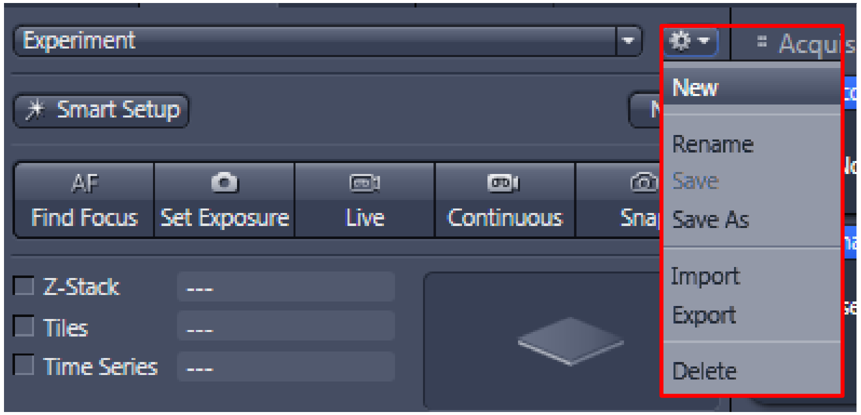
E、Frame Size：一般选择512×512或 1024×1024，图像越大，扫描时间越长

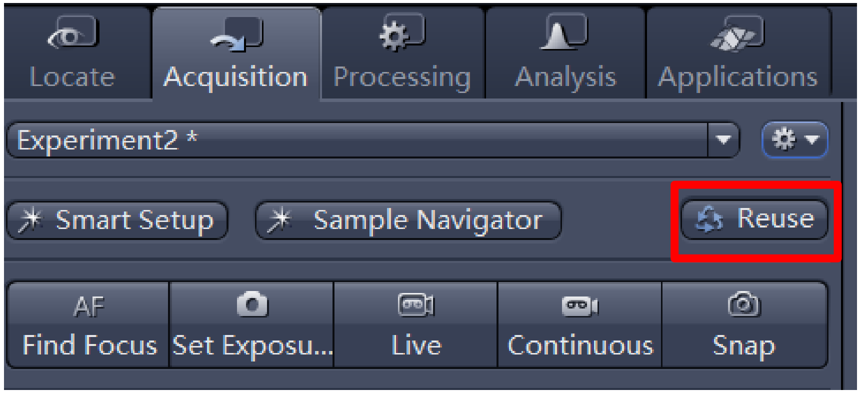
Acquiring Multi-Channel images

8、选择需要成像的track，单击“Snap”；获得一张多通道图像。



Experiment Manager and Reuse





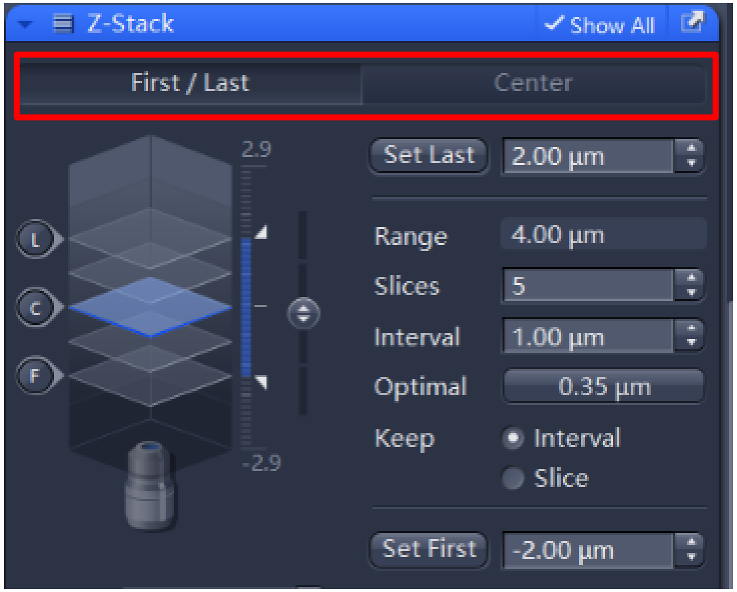
可以通过Experiment Manager来保存拍摄的参数，或打开已经保存的图片（czi格式），通过“Reuse”来调用上次拍摄的参数设置

Agenda

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

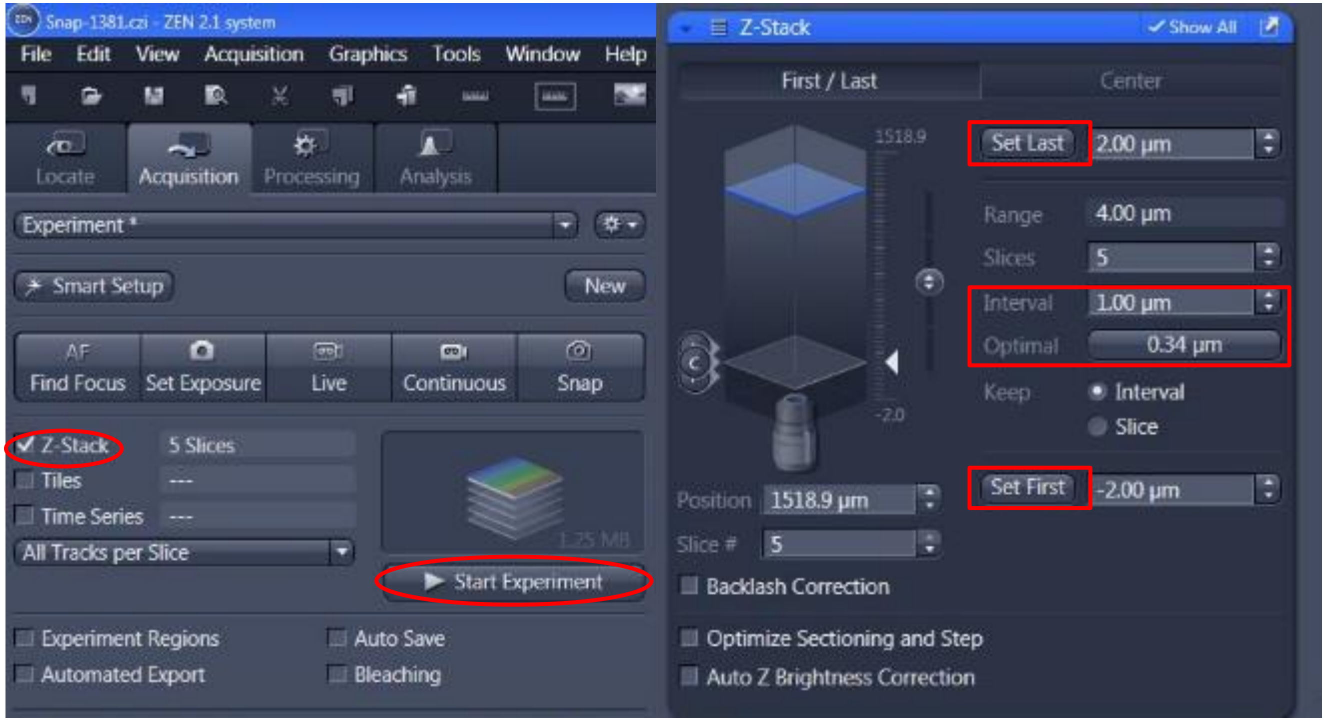
Z-stack image

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



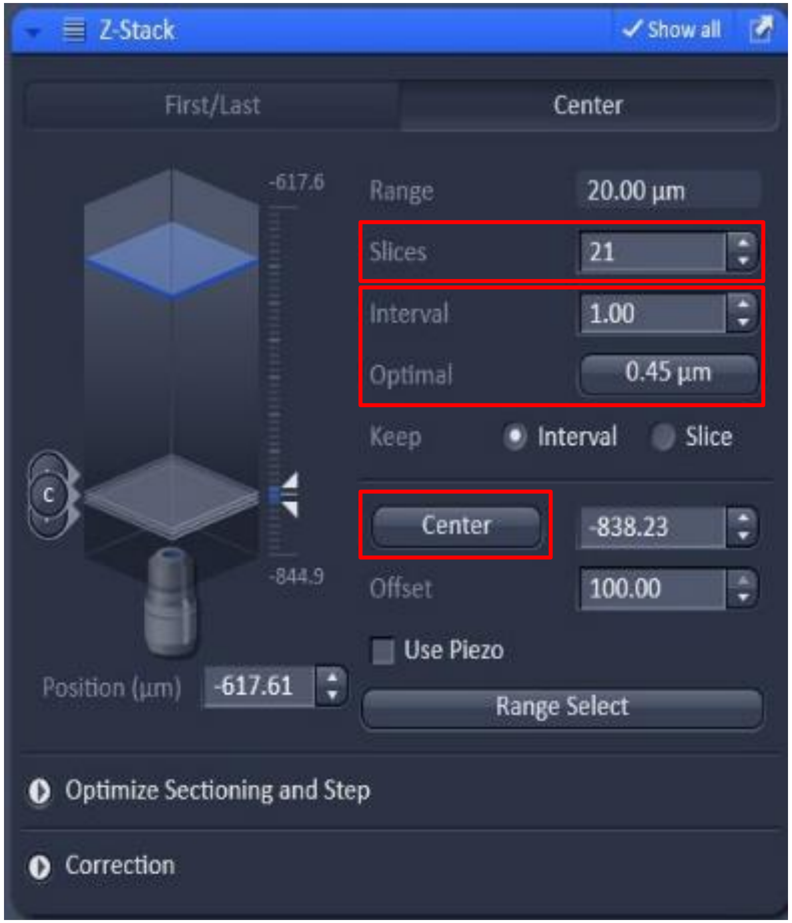
1、选择Z-stack;

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”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”

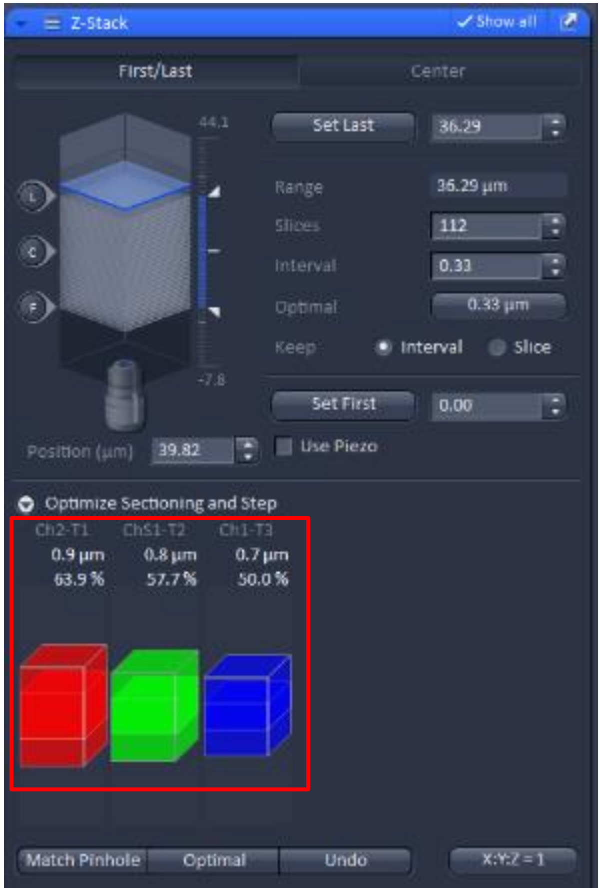
Z-stack image

Multi-track Z-stack image

如果是使用Best signal建立多个track，在Z-Stack成像时，选择“all stack per track ”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

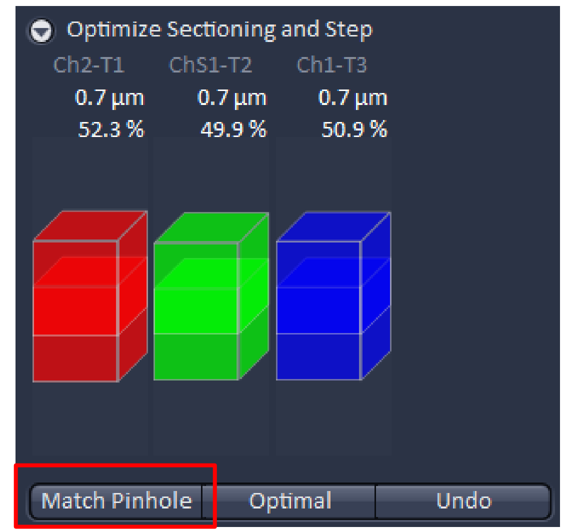
Match Pinhole



多通道荧光拍摄Z-stack需要考虑光切厚度不一致的问题：

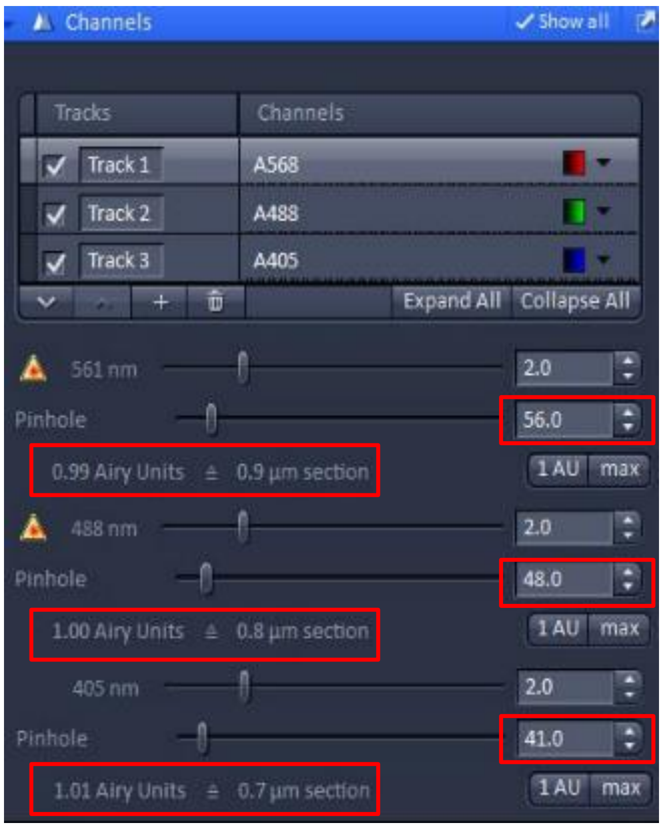
1、可以通过点击“Match Pinhole”自动调节不同track的针孔使光切厚度相似；

*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。

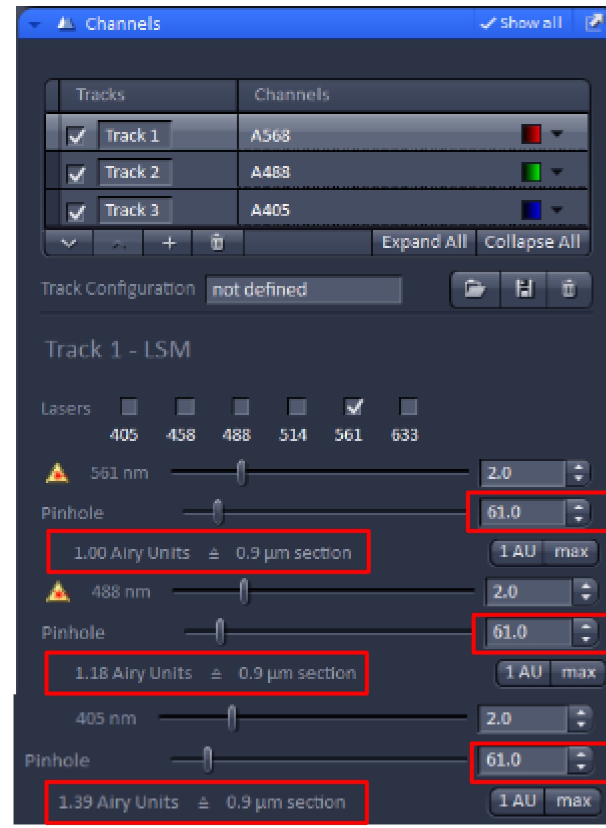


Z-stack image

Match Pinhole



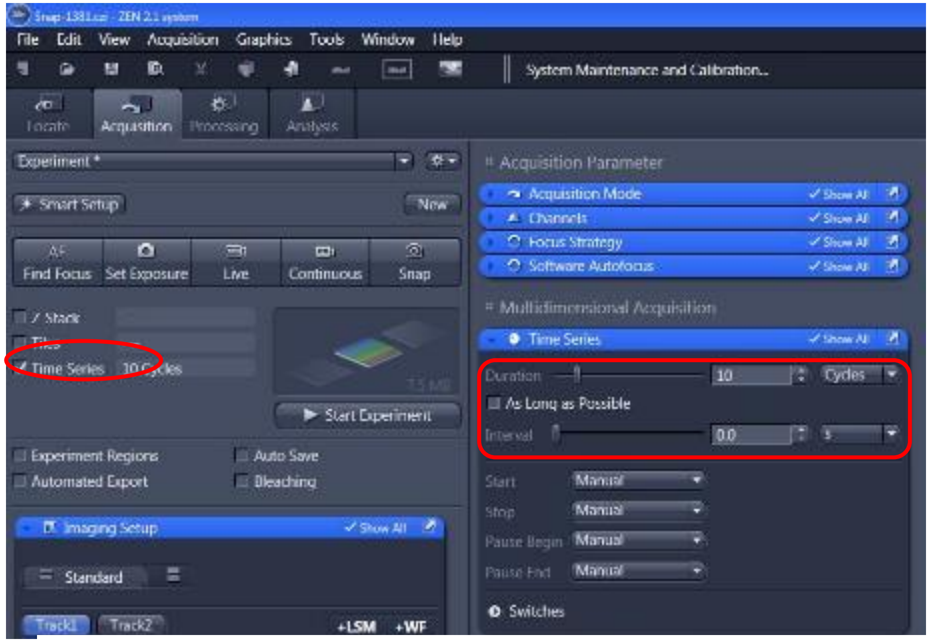
2、通过手动调节针孔到一致，可以保证荧光强度的同时，保证光切厚度一致。



Agenda

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



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；

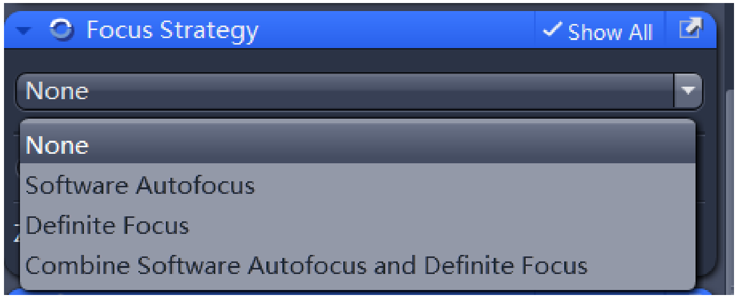
3、循环之间的间隔Interval；

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。



Focus Strategy
- Software Autofocus
  - Intensity—适合于荧光样品而且亮度较高
  - Reflex—适合于指定焦面，非荧光最强焦面
- Definite Focus—速度快，样品底面上下有折射率差异，例如细胞培养皿

Time Series image autofocus

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：

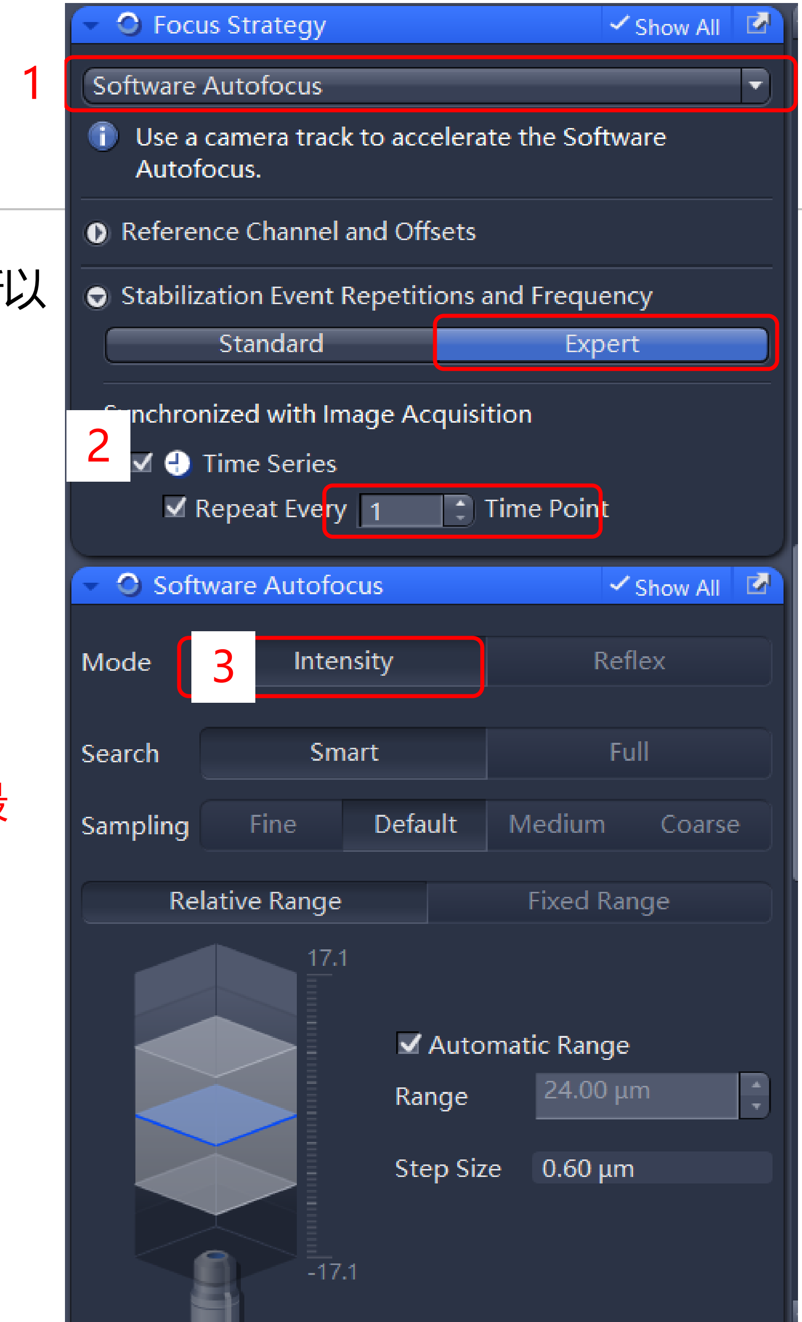
1、选择“Software Autofocus”；

2、选择适合的自动对焦频率；

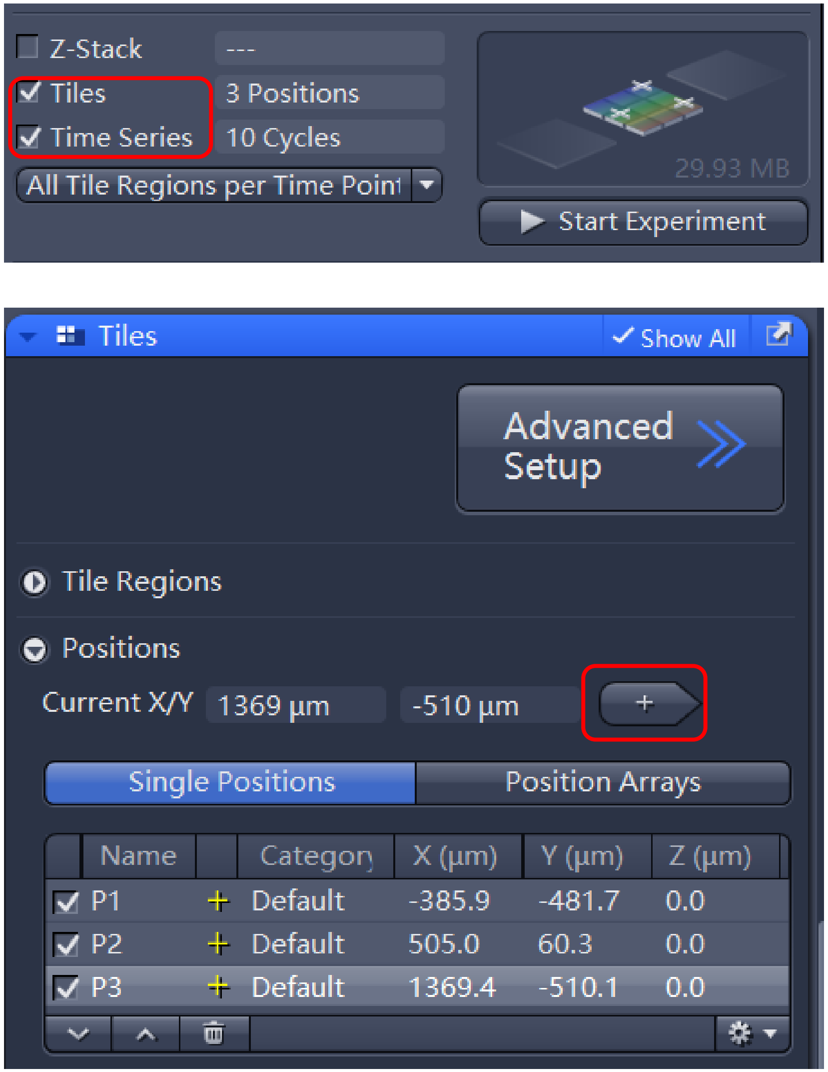
3、选择“Intensity”对焦模式；

*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 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“Positon”功能：

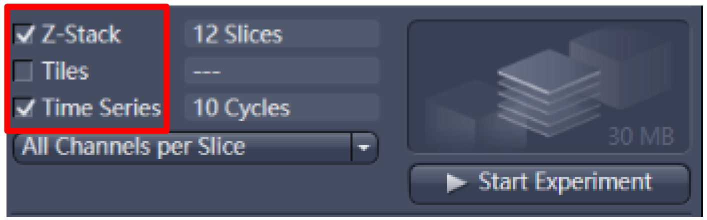
1、选择“Time Series”和“Tiles”；

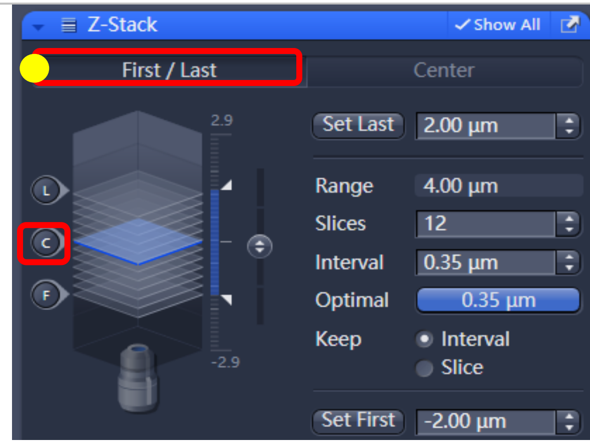
2、在“Tiles”中点击“Positions”，通过预览移动载物台到感兴趣的点，点击“+”，把该位置保存在“Position”列表中；

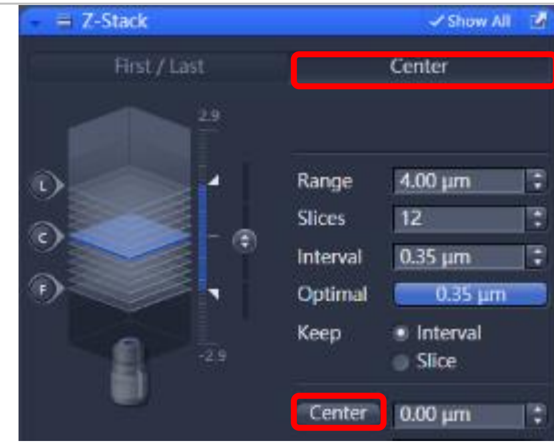
3、时间序列如前所述设置；

4D Image

Time Series + Z stack





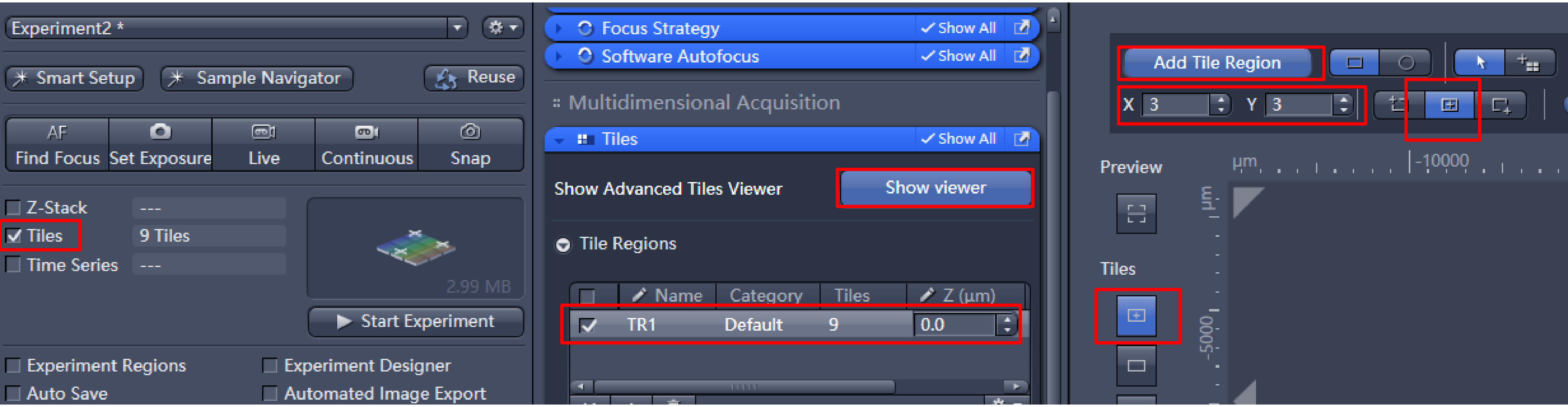


1. 选择“Time Series”和“Z-Stack”；
2. 选择z轴扫描方式
a. 在“First/Last”模式下，选择z轴扫描范围：在预览状态下，设置起始“Set First”和结束“Set Last”位置，单击“Optimal”设置最佳间隔；
b. 单击左侧模拟图中“C”位置，此处表示z轴最中心位置，单击“Center”切换到“Center”模式，单击下方的按钮“Center”确定现在的位置是z-stack成像的中间位置，并按照“Center”模式开始拍摄。
3. 如果需要自动对焦，此时可选择software autofocus或Definite Focus，此时稳定的是z轴序列的center位置。
4. 点击“Start Experiment”

Agenda

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；

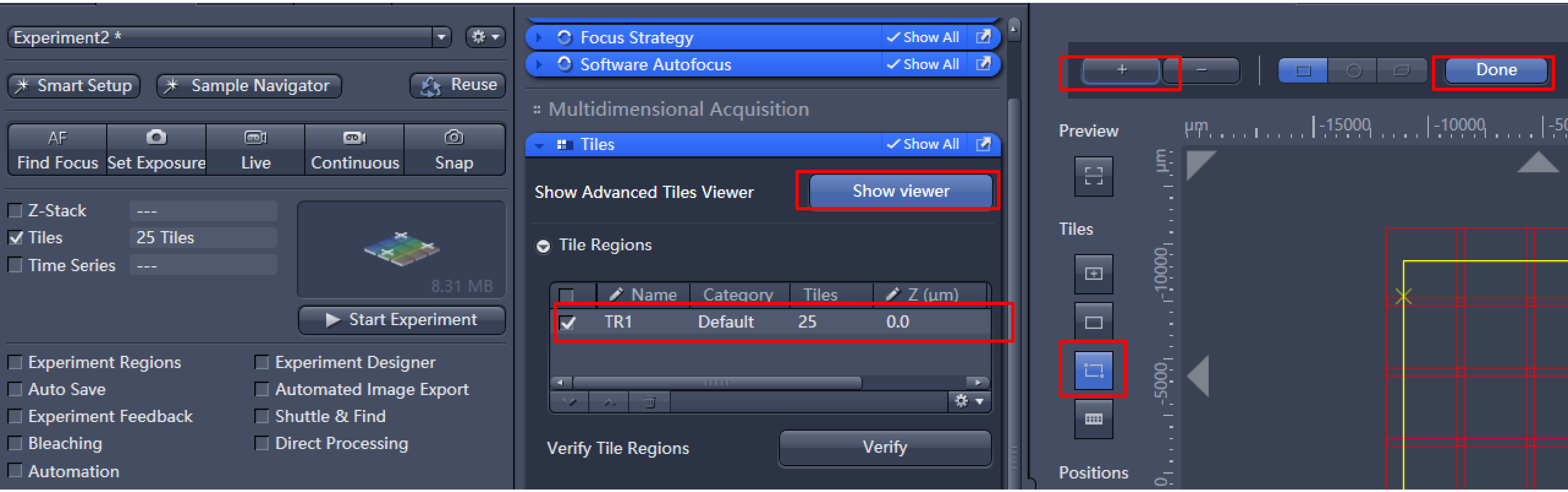
2、 “X” & “Y”分别代表水平和垂直方向拼图范围；

3、点击“+”，将要拼图的范围添加到拼图区域中；

4、 “Start Experiment”

Tile Scan

Stake



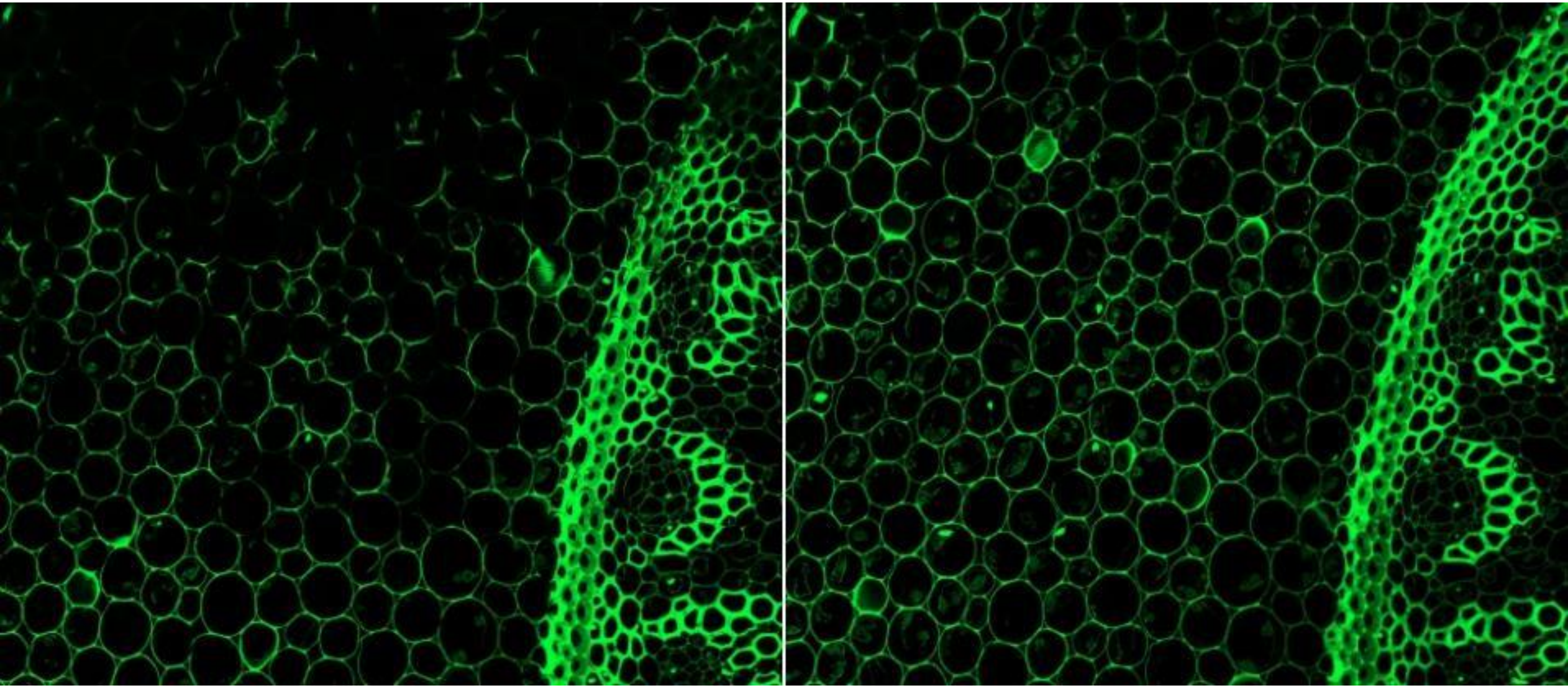
"Stake"方法能够通过定义拼图边缘自动计算拼图大小，完成拼图：

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

Advanced Setup



Without support point

Manual support point

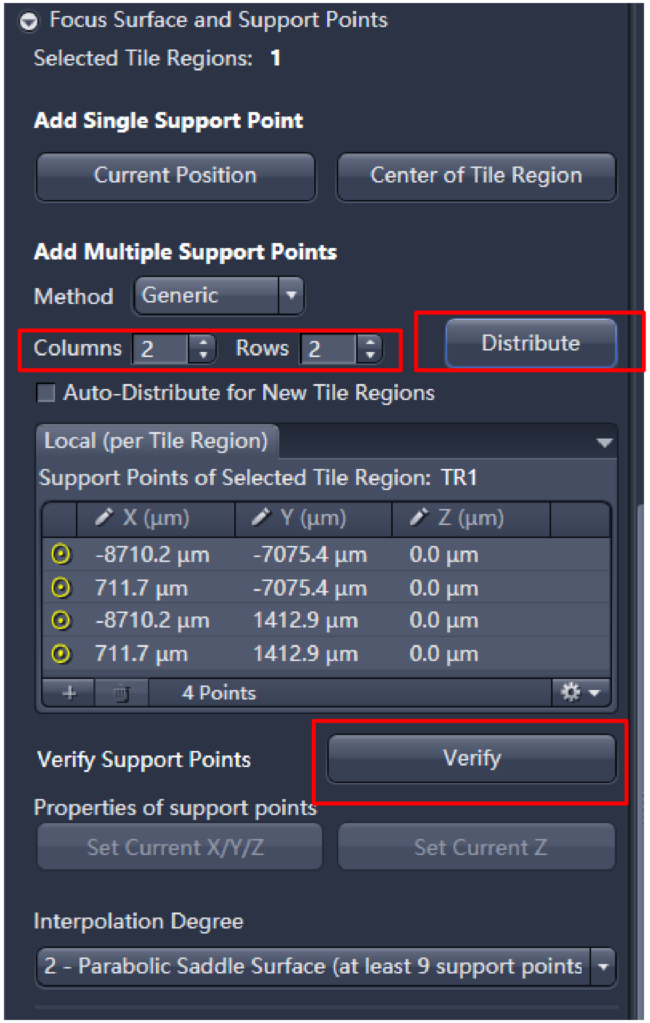
Tile Scan

Focus Surface

1、建立好拼图范围后在右侧看见扫描区域，并进入下方选项“Focus Surface and Support Points”

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。

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

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. Autofucus（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。

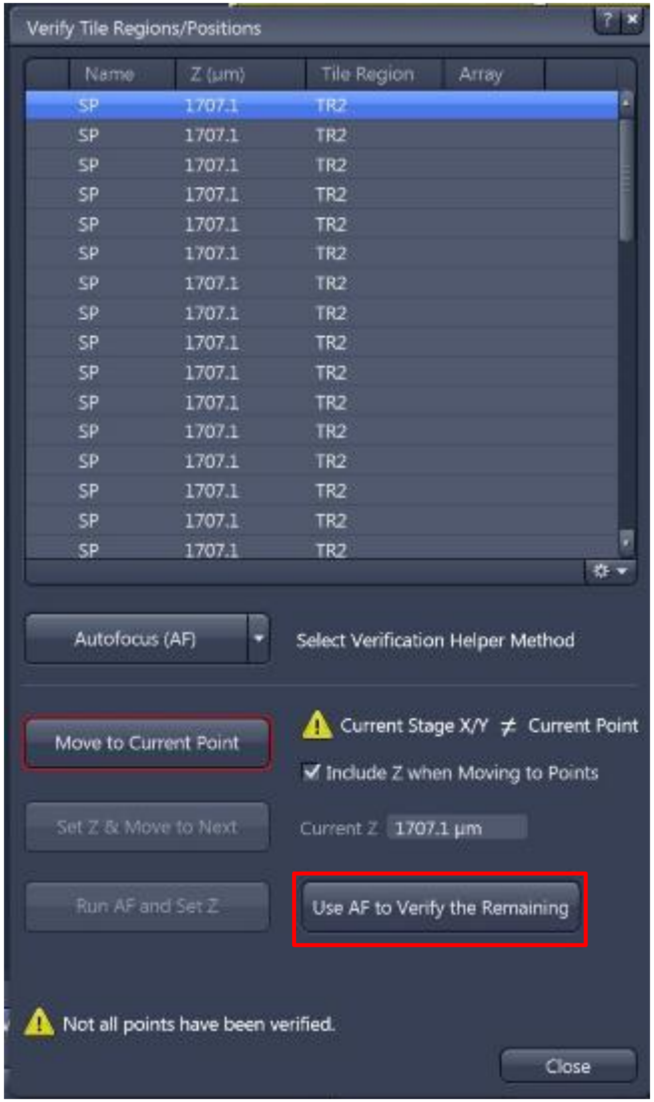
Tile Scan

Verify Support Points

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；

Tile Scan

Autofocus Verify Support Points

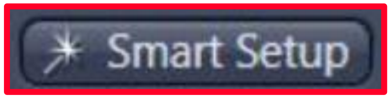


5、选择AF校正方法后选择“Use AF to Verify the Remaining”，软件会自动对所有Support Points进行焦距校正;

Agenda

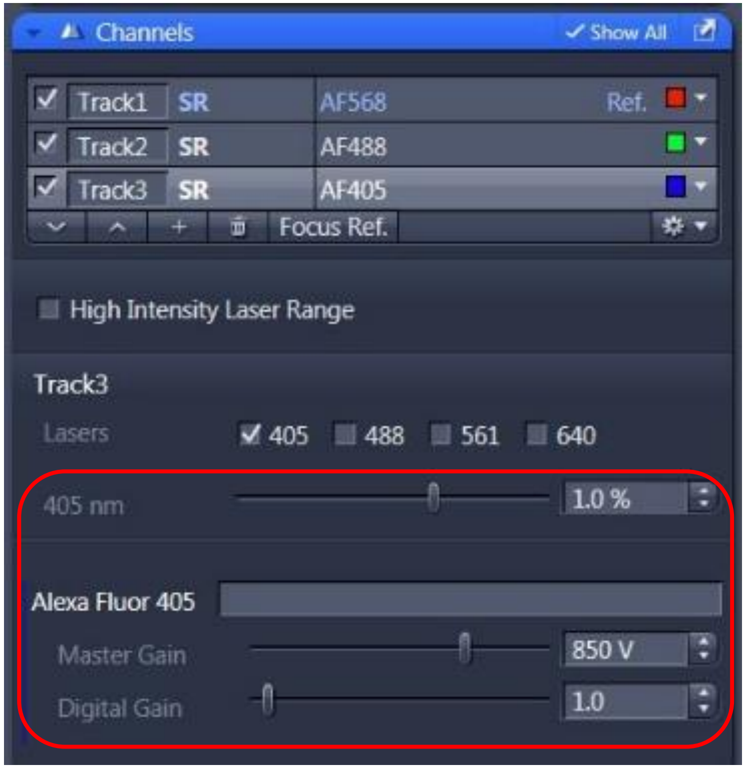
1	Startup and Shutdown of the System
2	Acquiring Multi-Channel images
3	Z-stack image
4	Time Series image
5	Tile Scan
6	Airyscan Imaging

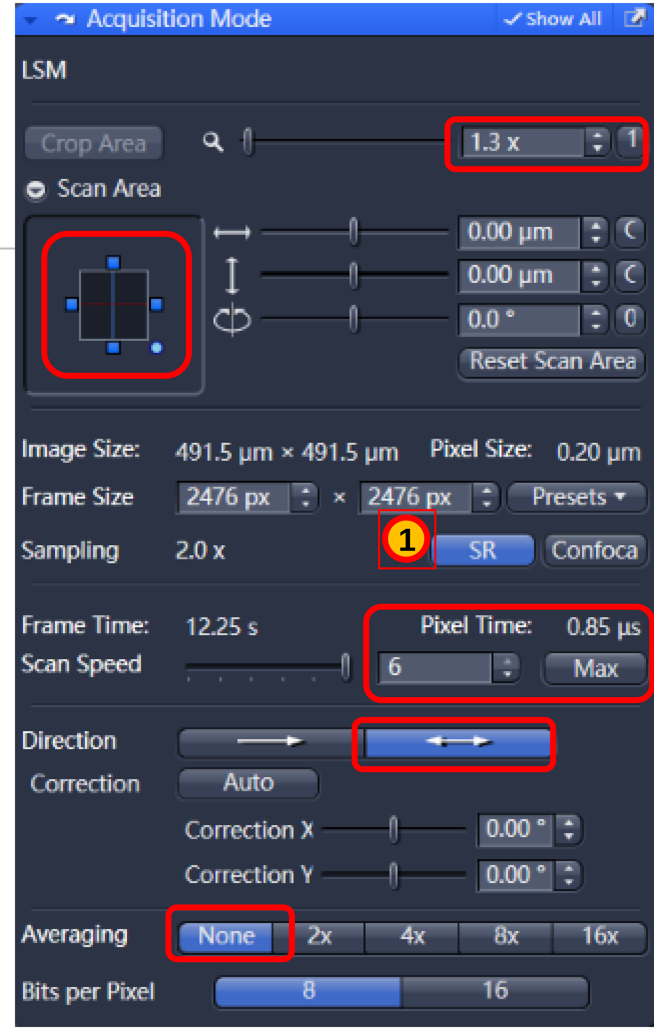
Airyscan SR mode



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



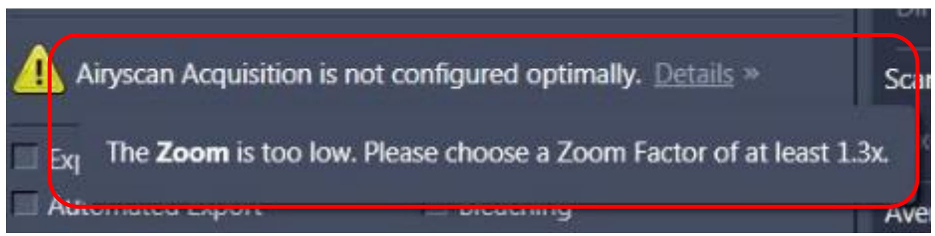


5. 设置激光大小“Laser”，检测器“Master Gain”和“Digital Gain”

*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1.3，双向扫描，“Averaging”选择“None”

Airyscan SR mode

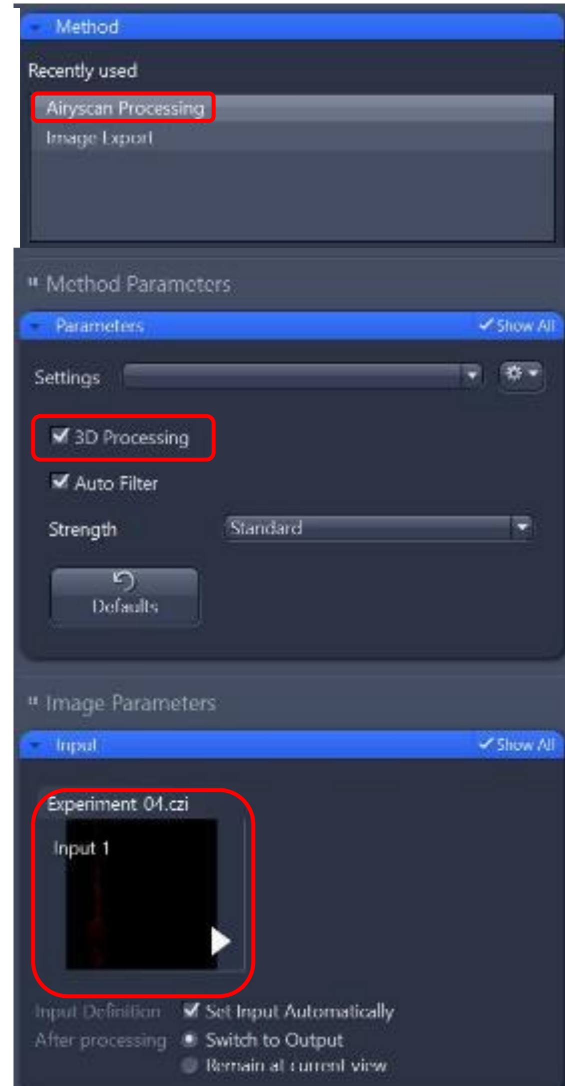


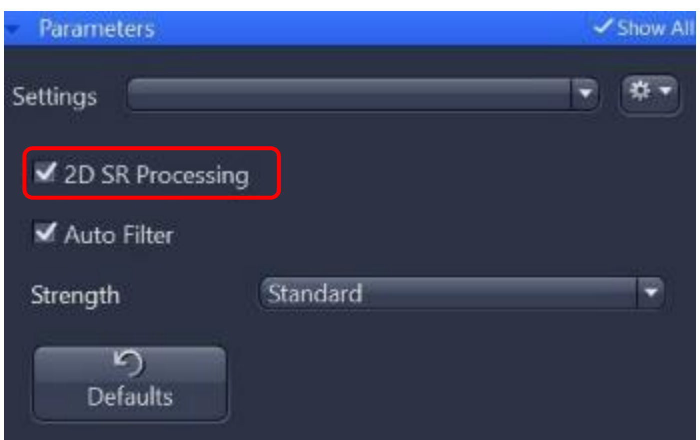
7. 如果有参数设置不能满足达到Airyscan 最高分辨率，软件会有相应提示，根据提示更改参数后可以进行二维图像拍摄（Snap）或者多维图像拍摄（Strat Experiment）

Airyscan SR mode

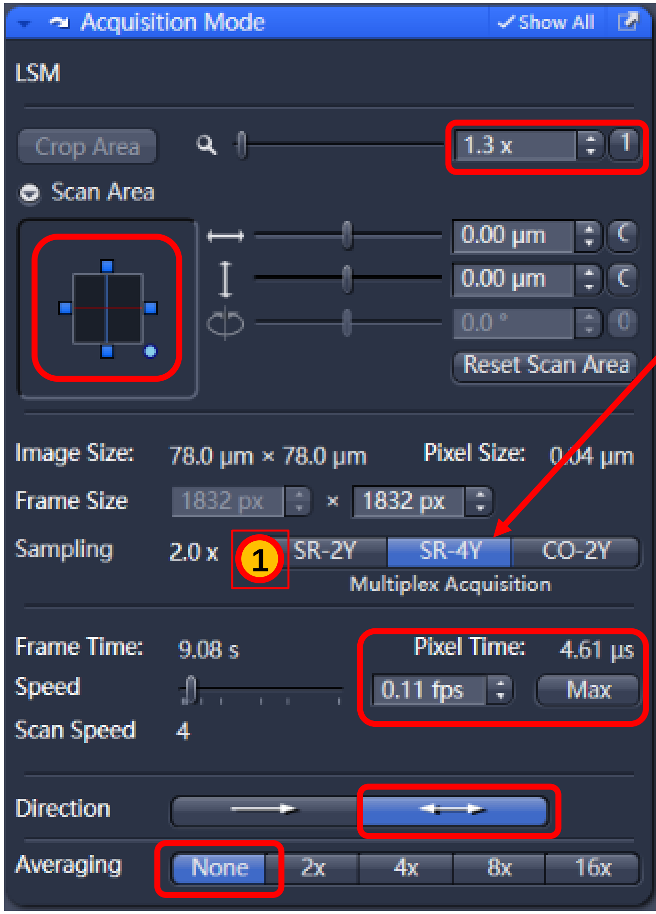
8. 按照“Processing → Airyscan Processing → Input → Apply”进行图像处理。

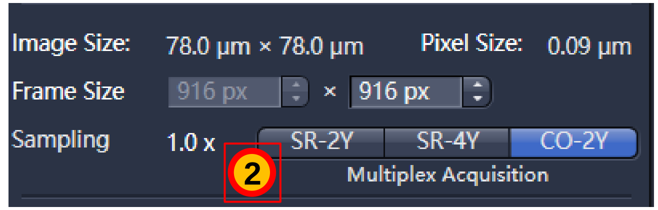
如果是z-stack图像，请选择“3D Processing”
2D图像可以勾选“2D SR Processing”进一步提高分辨率





Airyscan Multiplexing: SR-2Y and SR-4Y Mode



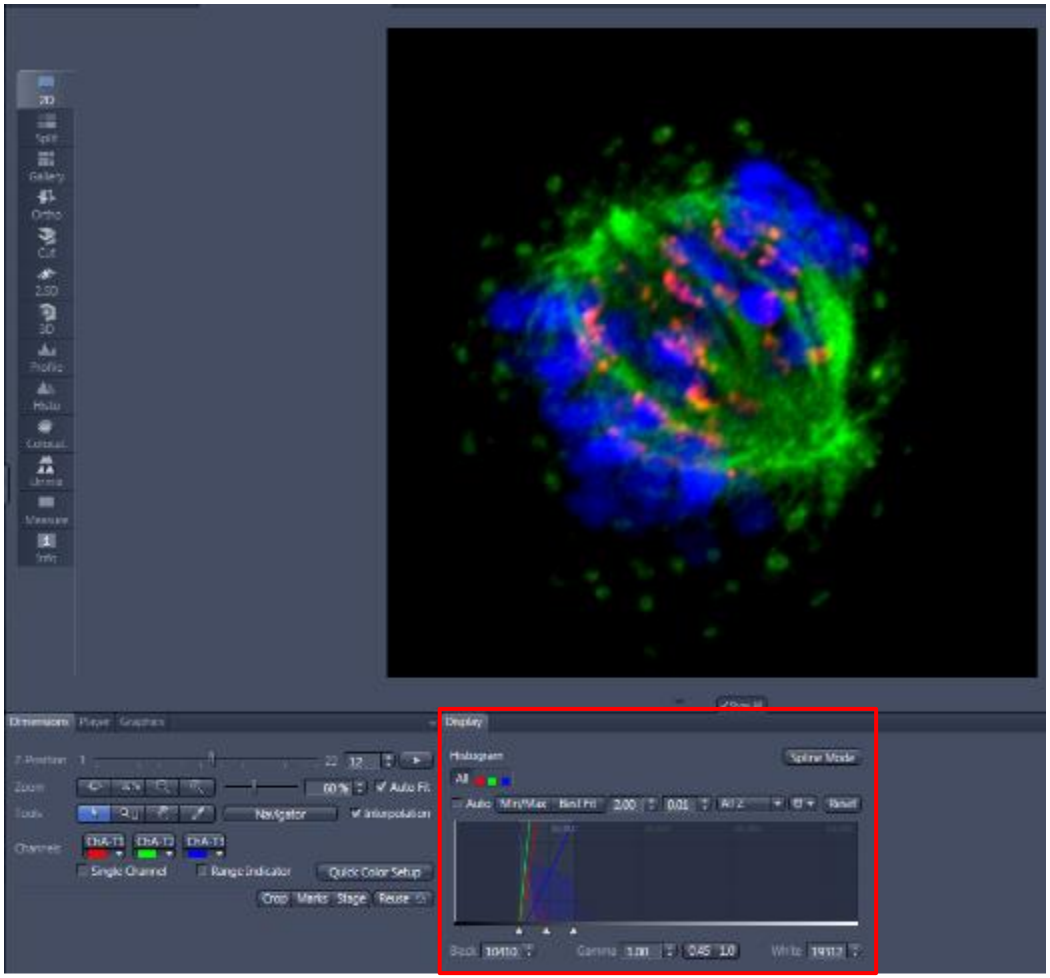


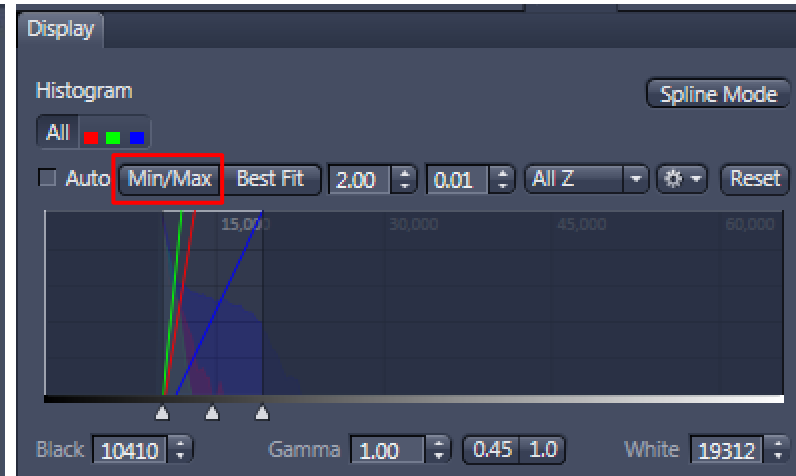
Airyscan的multiplex模式，例如2Y和4Y，通过smart setup设置后，其Crop Area不小于1.3，其他设置和Airyscan SR模式一样。

*如果选取Airyscan SR-2Y或SR-4Y，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-2Y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

Airyscan





10、处理后的图像，在Display处选择Min/Max或者手动调节显示效果

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！