

# LSM 880 Basic Operation



MultiChannel & TimeSeries & Z-Stack & TileScan



Lu Xi

2016-05-15

- 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
- 7 Fast Airyscan Imaging

## 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

## 7 Fast Airyscan Imaging

# Startup and Shutdown of the System



## Startup of the System

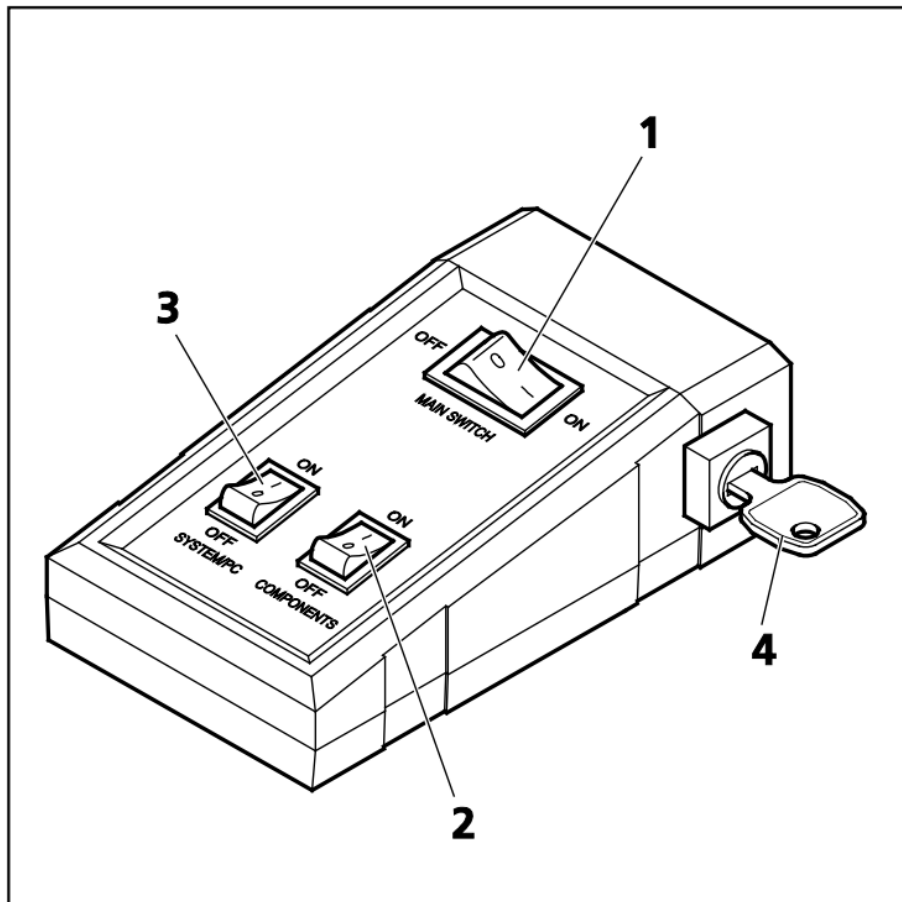


- 1、打开稳压电源：
  - a、打开稳压电源背后总开关；
  - b、打开稳压电源前面开关；
  - c、确定稳压电源显示220V；

# Startup and Shutdown of the System



## Startup of the System



- 1 Main switch ON/OFF
- 2 COMPONENTS switch ON/OFF
- 3 SYSTEM PC switch ON/OFF
- 4 Key switch

- \*在打开整个系统电源之前，确保钥匙（图中4）处于“ON”；
- 2、打开“MAIN SWITCH”（图1）；
- 3、打开“SYSTEM/PC”（图3），随后打开电脑，进入系统；
- 4、打开“COMPONENTS”（图2）；
- 5、打开金属卤化物灯；



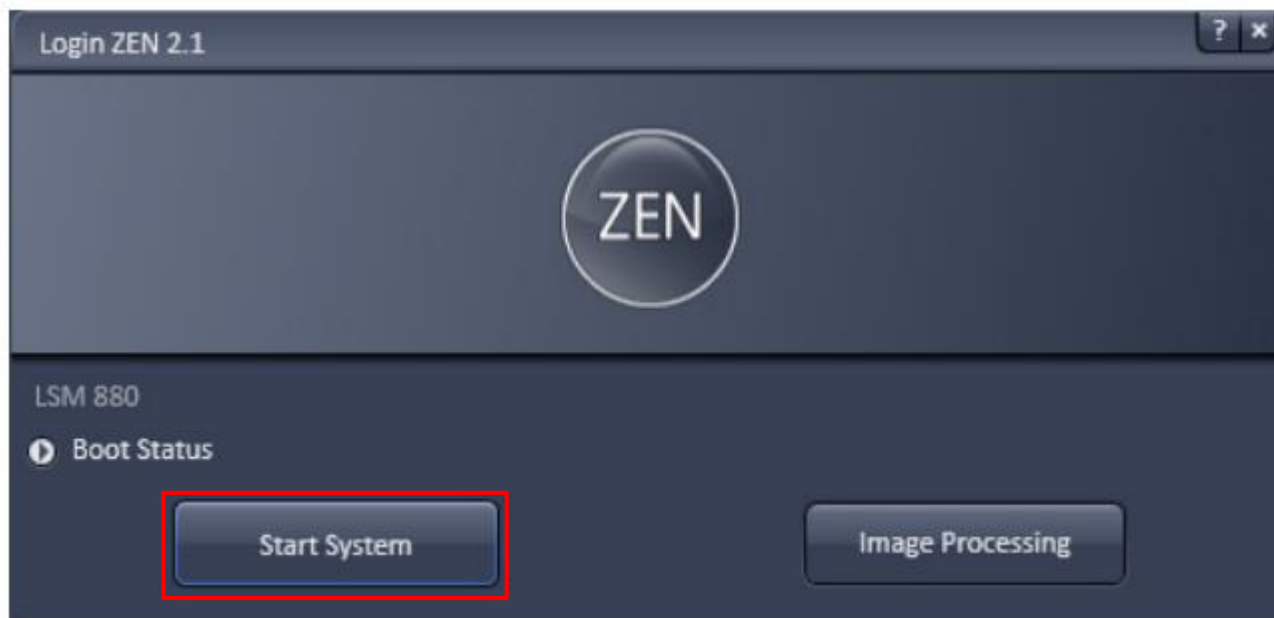
# Startup and Shutdown of the System



## Startup of the System



6、启动ZEN软件（black）；

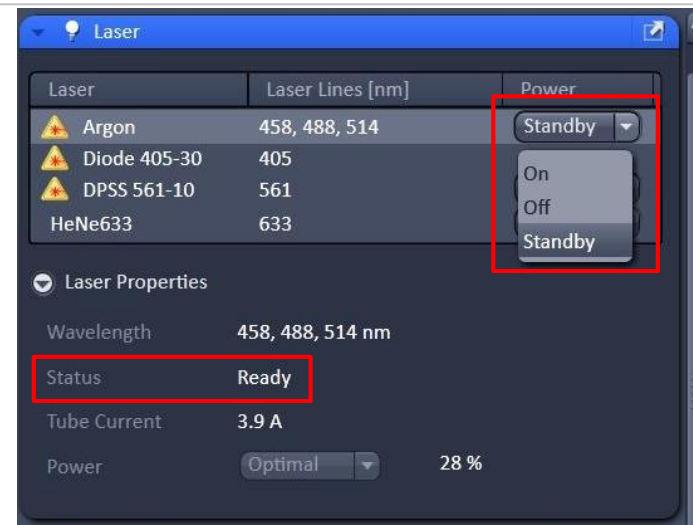
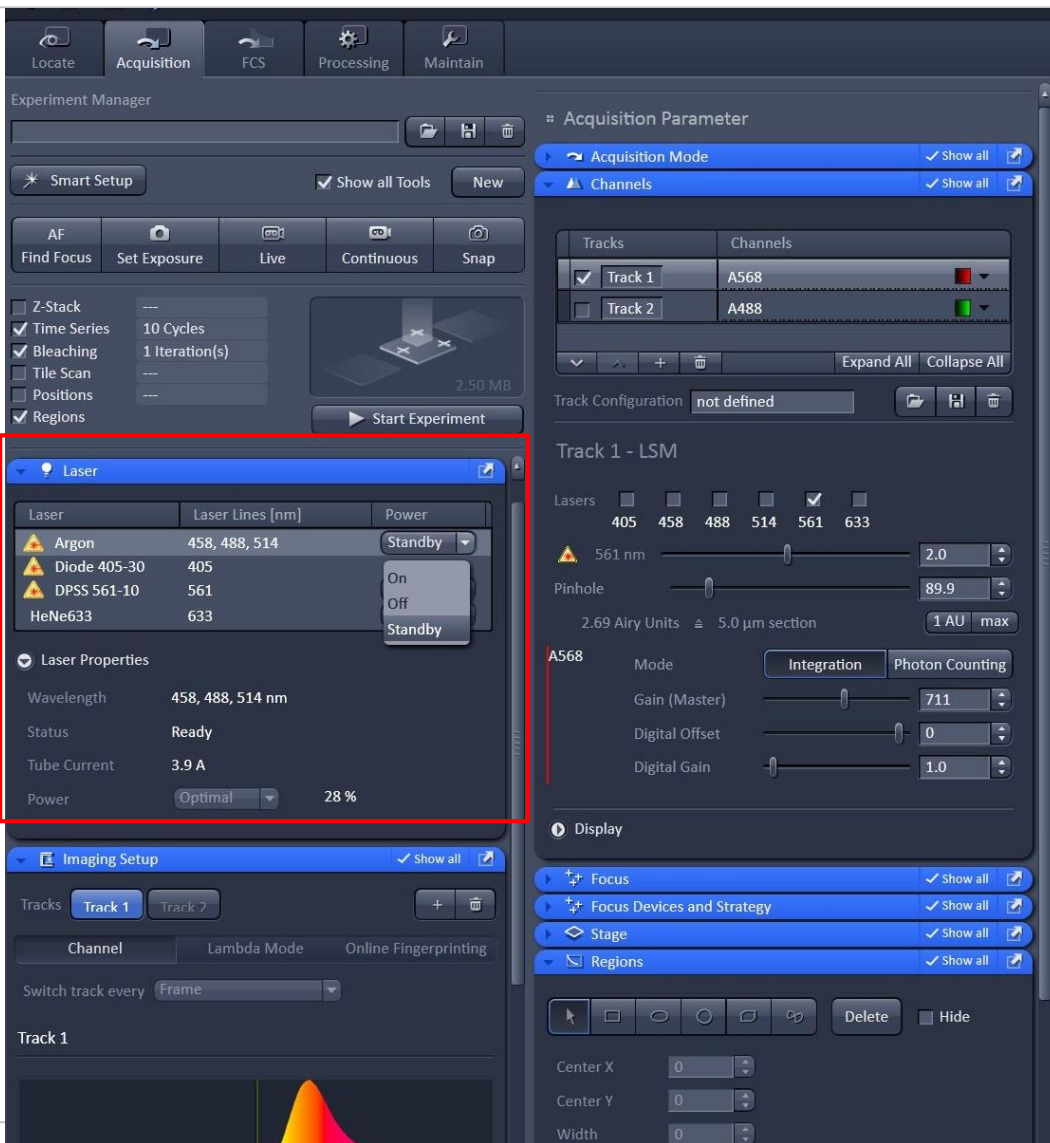


7、点击 “Start System”

# Startup and Shutdown of the System



## Startup of the System



8、如果需要使用458、488、514 需要打开Argon激光器：

a、在“Laser”中“Argon”栏 选择“Standby”，等待激光器预热；

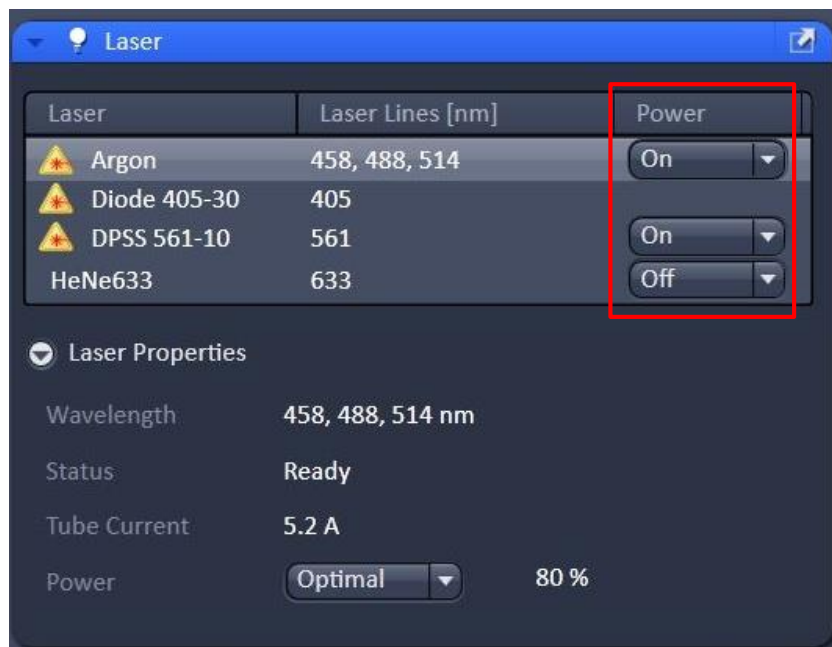
b、预热结束后“status”显示 “Ready”后选择“On”；

9、随后可以开始共聚焦成像

# Startup and Shutdown of the System



## Shutdown of the System



关机过程基本类似开机的倒序过程：

- 1、关闭金属卤化物灯；
- 2、关闭激光器，在“power”中选择“off”，关闭已打开的激光器；
- 3、关闭ZEN软件；
- 4、关闭电脑；
- 5、关闭电脑后等待激光器冷却约5min，此时Argon激光器的风扇停转；
- 6、按顺序关闭“COMPONENTS” → “SYSTEM/PC” → “MAIN SWITCH”
- 7、关闭稳压电源。

**1** Startup and Shutdown of the System

**2** Acquiring Multi-Channel images

**3** Z-stack image

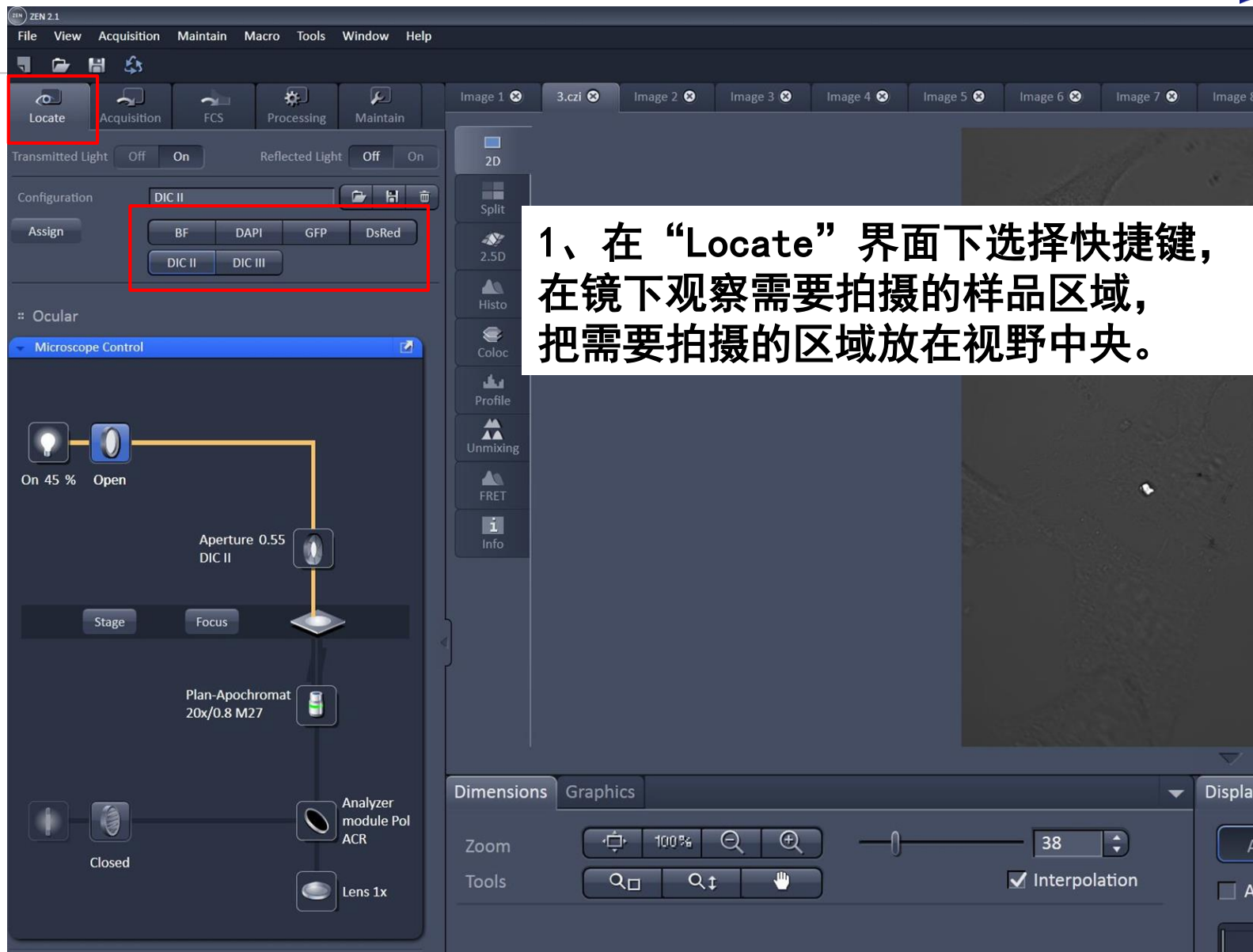
**4** Time Series image

**5** Tile Scan

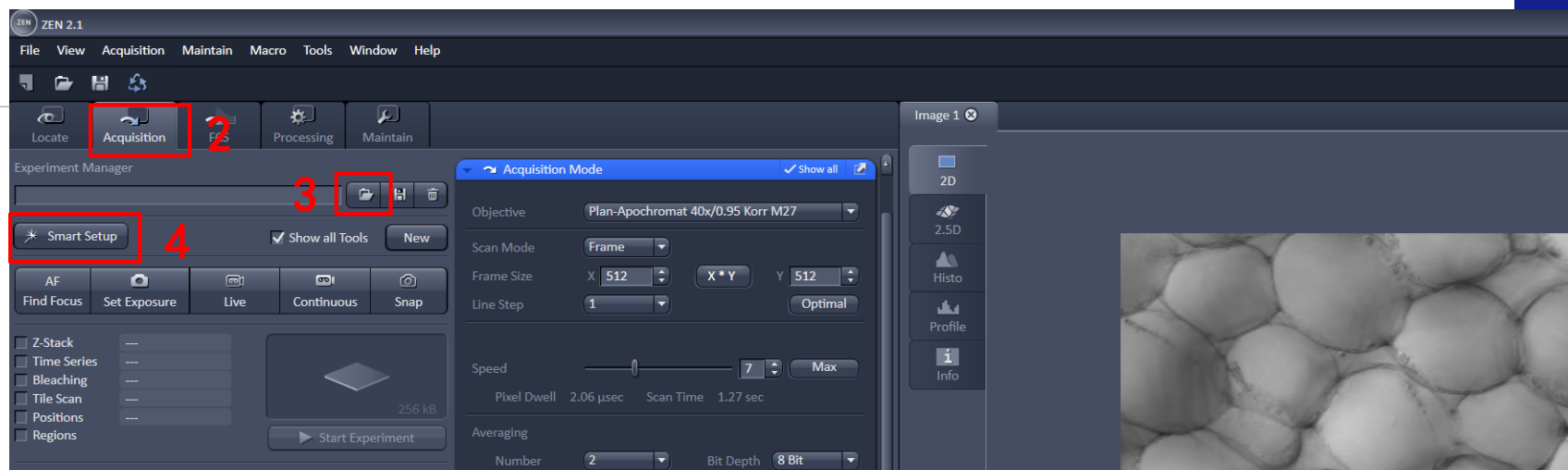
**6** Airyscan Imaging

**7** Fast Airyscan Imaging

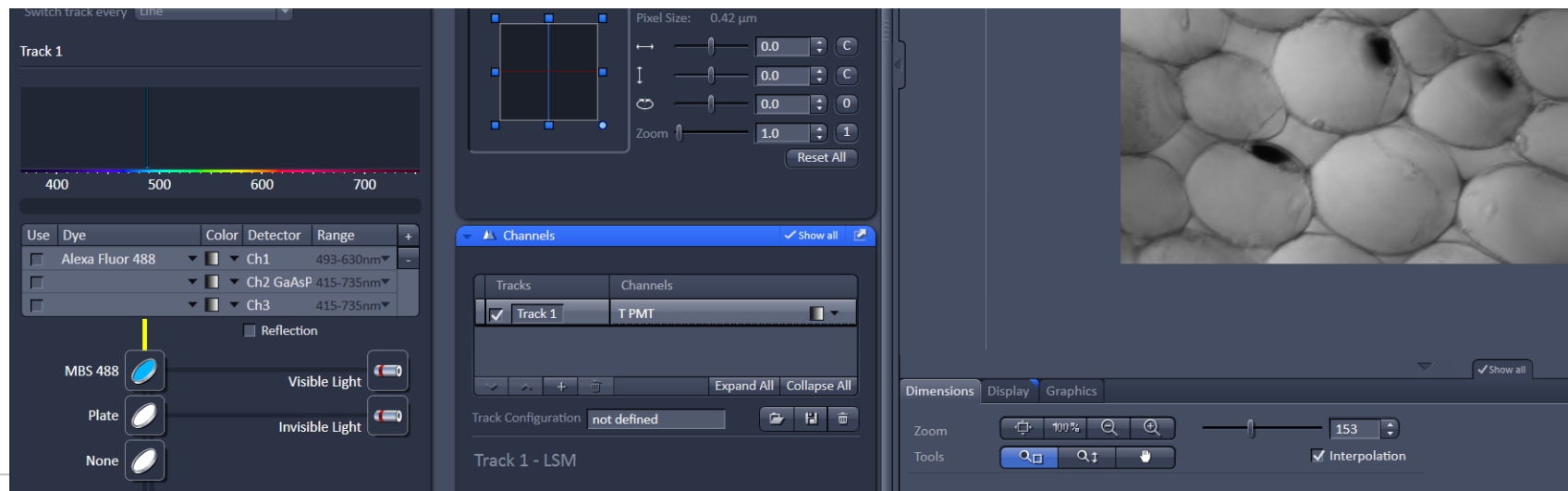
# Acquiring Multi-Channel images

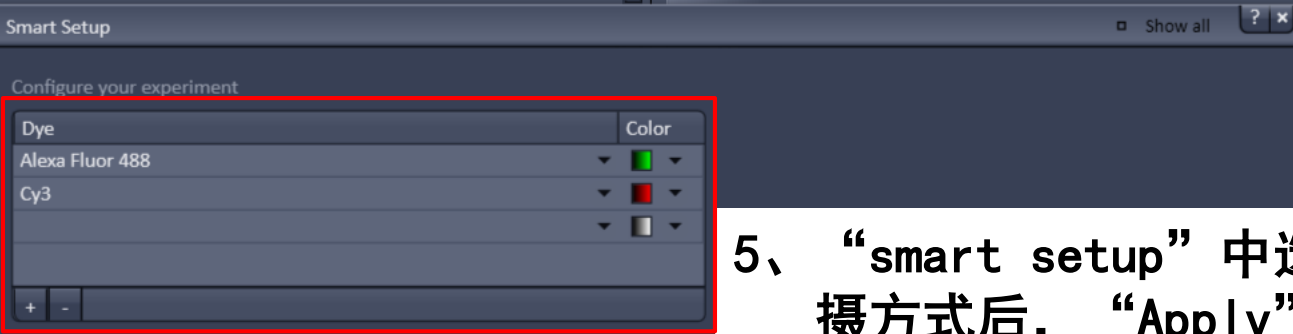


# Acquiring Multi-Channel images



- 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，“Apply”



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

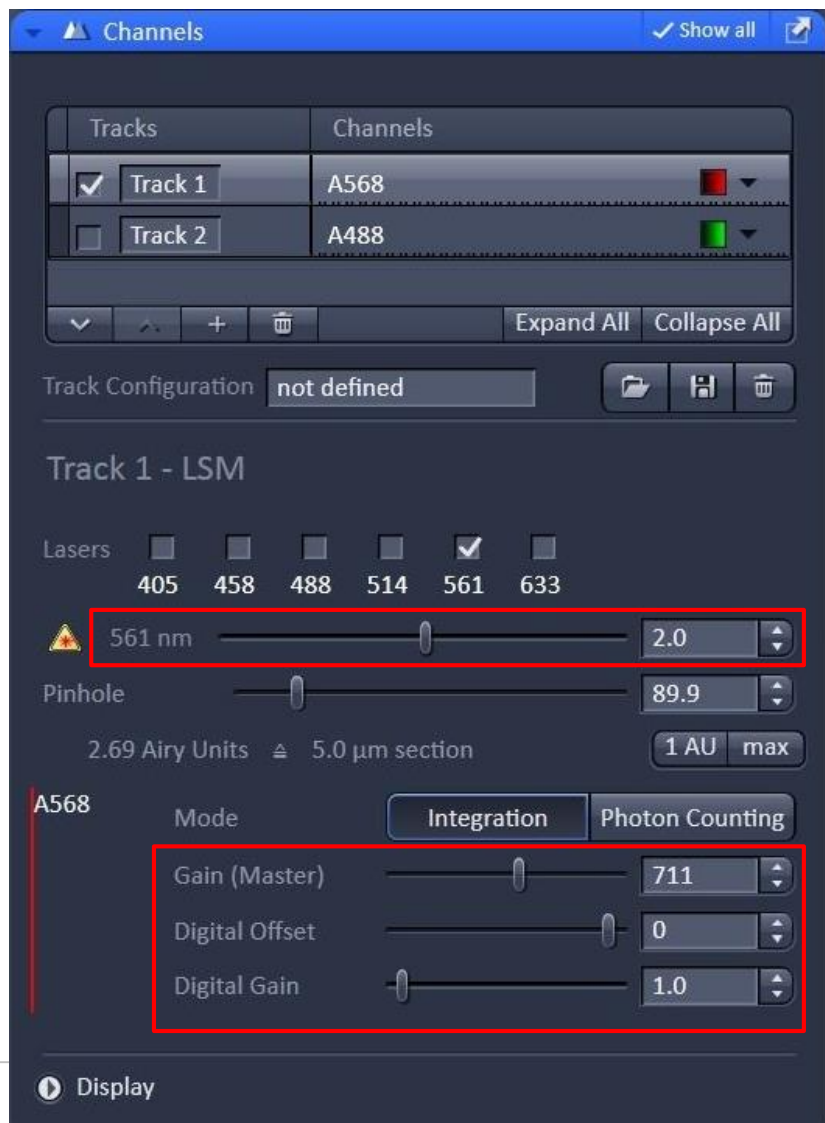
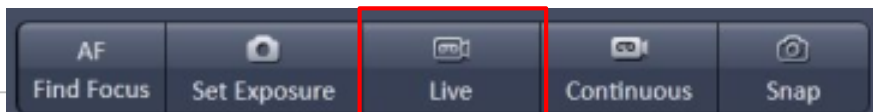
拍摄速度最慢；  
基本避免了发射荧光的串色；

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Fastest

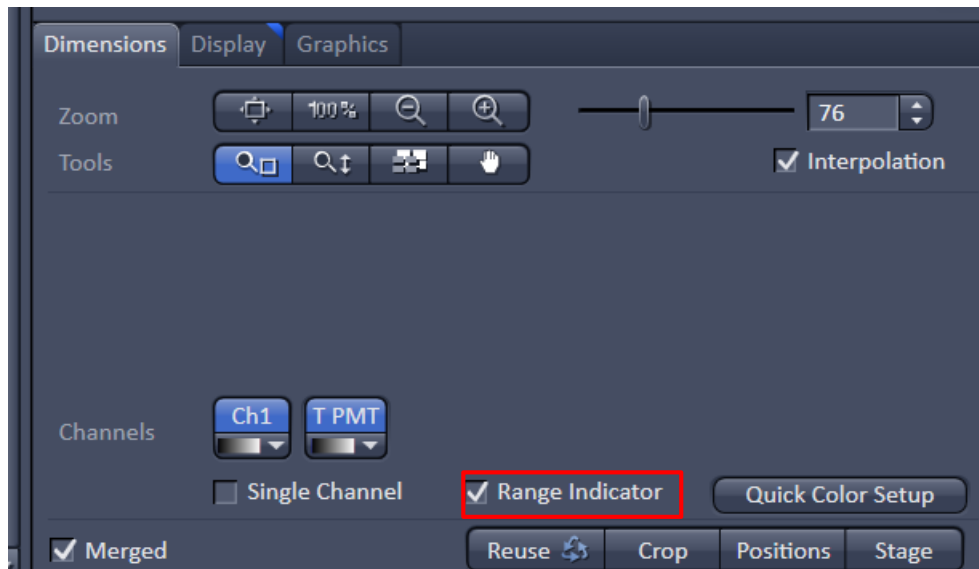
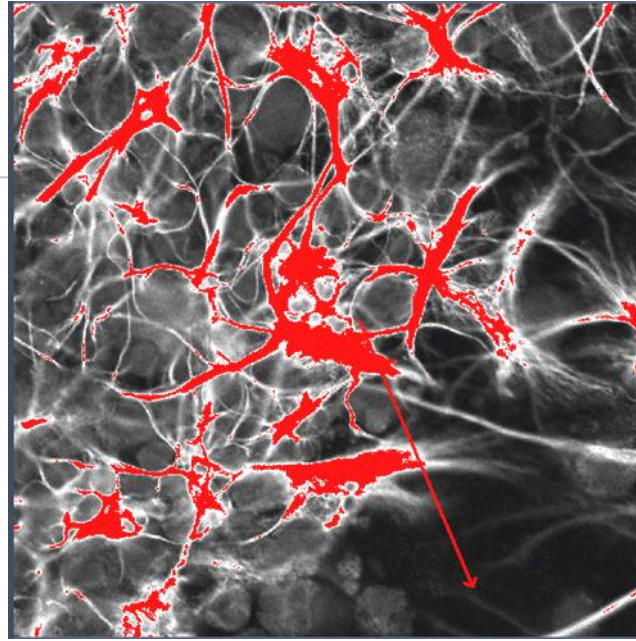
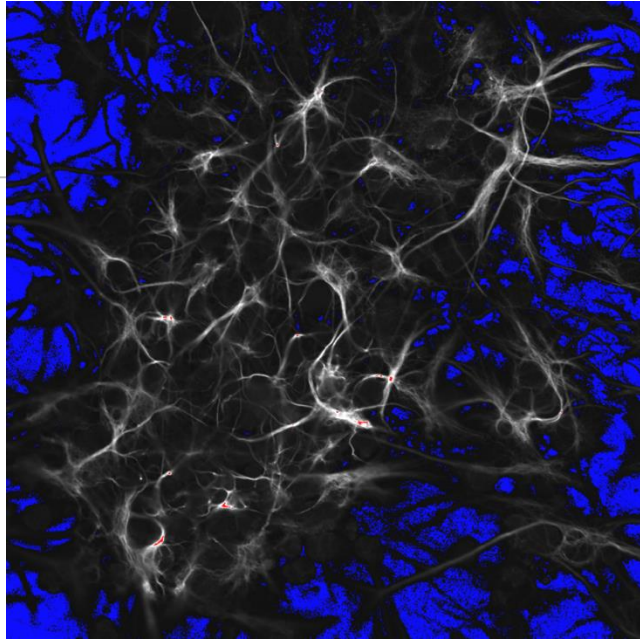
# Channels



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，所以每次只勾选一个track，并选中该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。

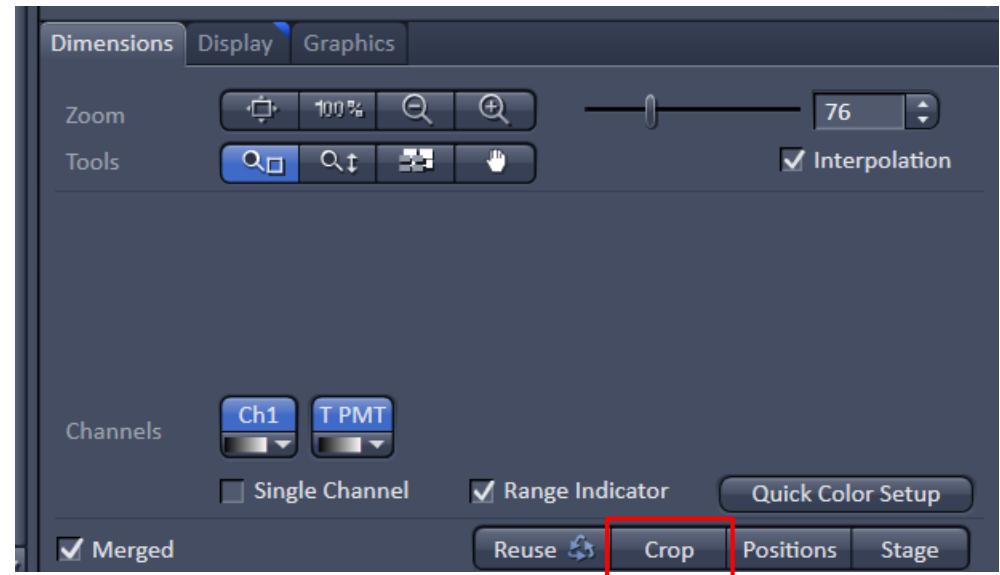


设置原则保证图像不要过曝，尽量  
减少背景噪音：  
在live下选择“range indicator”  
可以显示出曝光程度；

# 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；

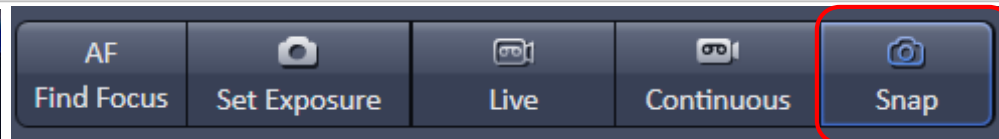


# Acquisition Mode

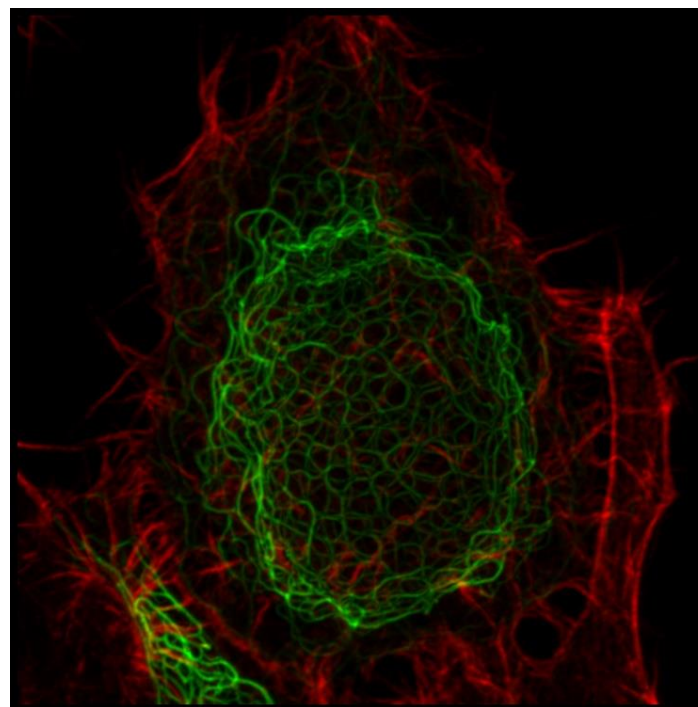


- B、设置speed：扫描速度越慢，信噪比越好，但光漂白越多；
- C、Averaging：增加averaging次数可以减少噪音，但会增加扫描时间；
- D、Direction：双向扫描可以减少扫描时间；
- E、Frame Size：一般选择512×512或1024×1024，图像越大，扫描时间越长

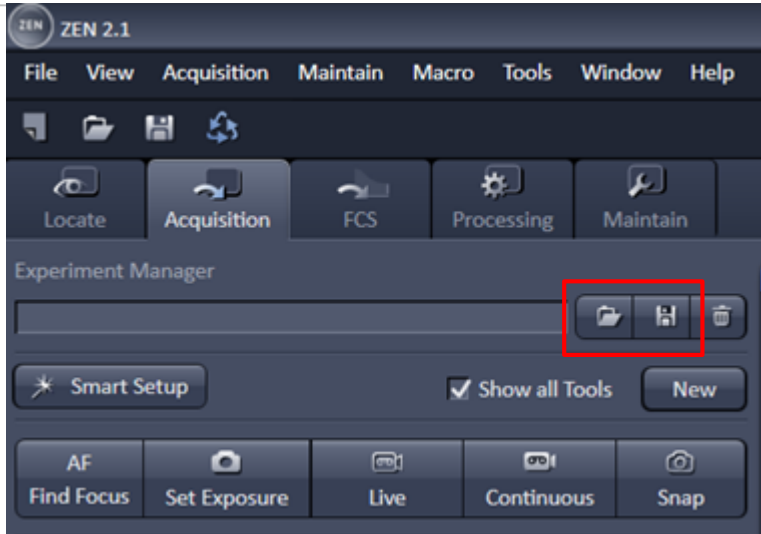
# Acquiring Multi-Channel images



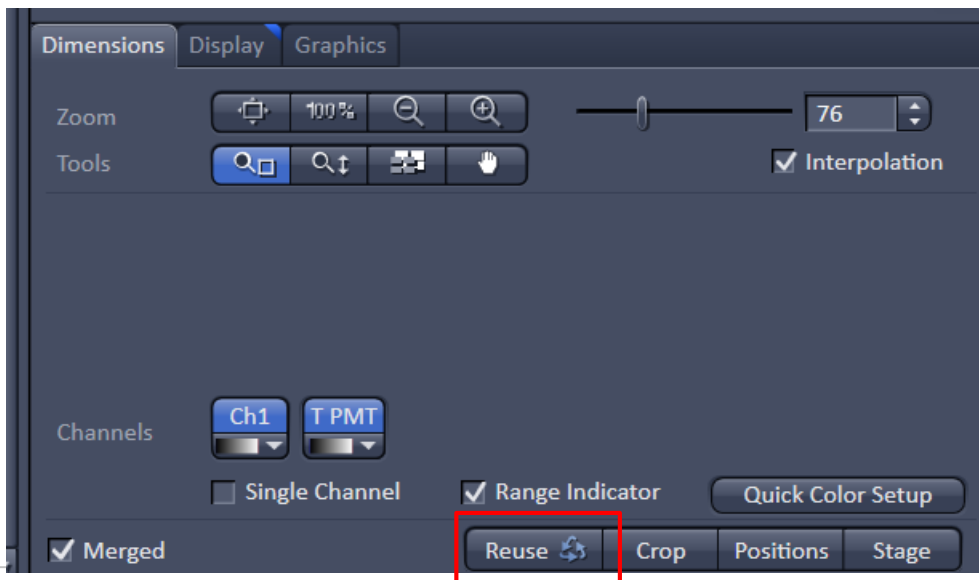
8、选择需要成像的track，单击“Snap”；获得一张多通道图像。



# 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

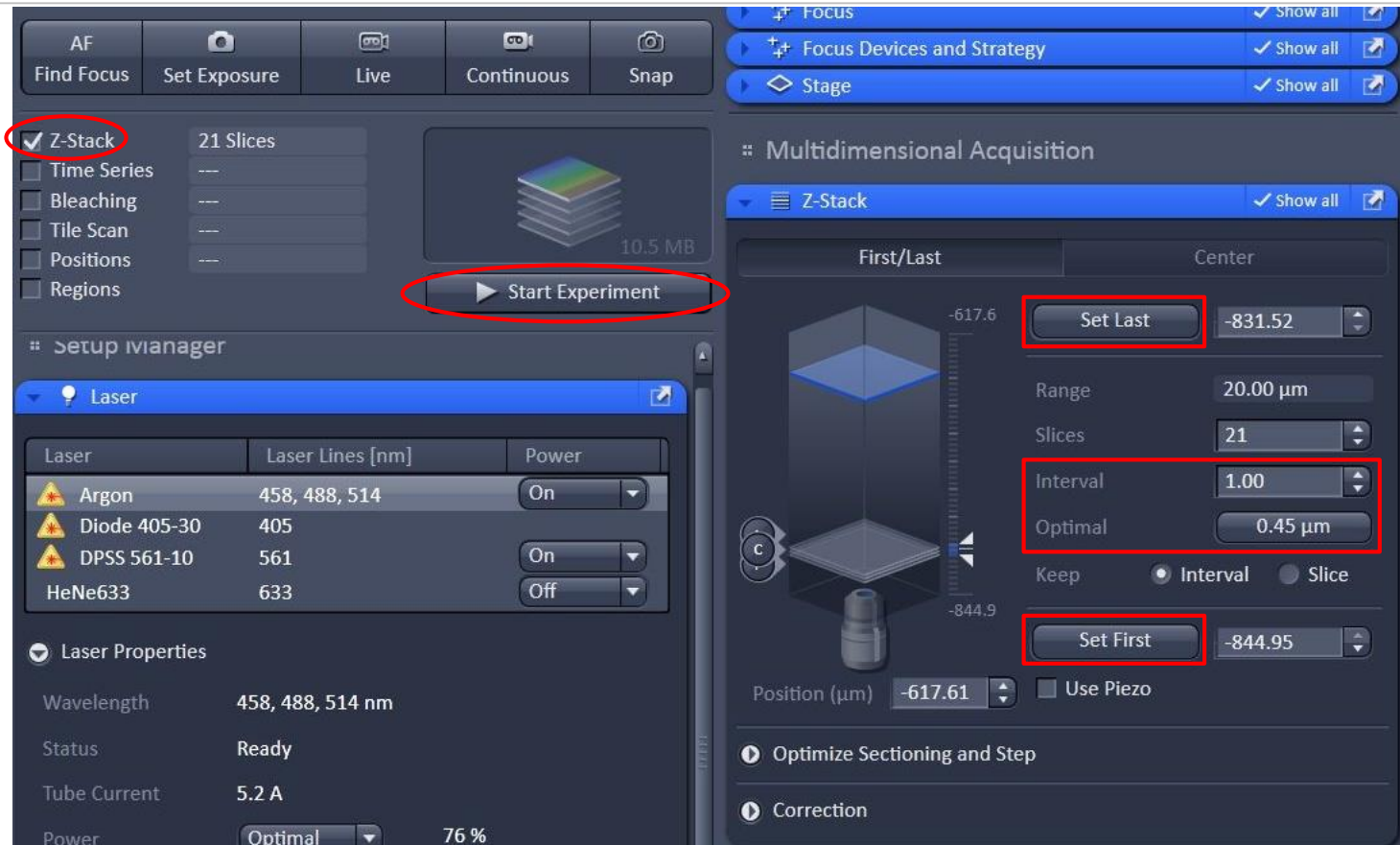


- 1 Startup and Shutdown of the System
- 2 Acquiring Multi-Channel images
- 3 Z-stack image
- 4 Time Series image
- 5 Tile Scan
- 6 Airyscan Imaging
- 7 Fast Airyscan Imaging

# Z-stack image



## First/Last

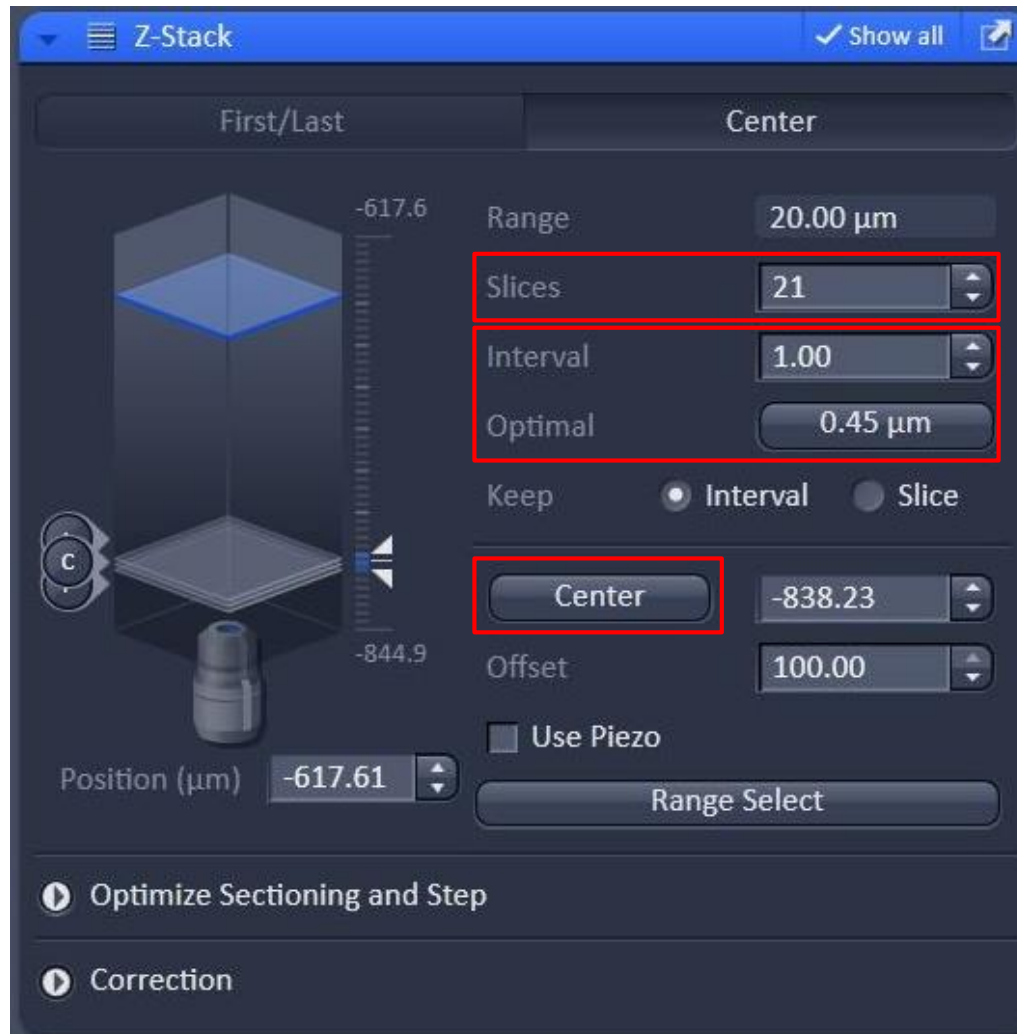


- 1、选择Z-stack;
- 2、在live下调节焦距选择层扫图像的上下范围: “set first” 和 “set last”;
- 3、单击 “optimal” 让间距在最适合范围;
- 4、单击 “Start Experiment”

# Z-stack image



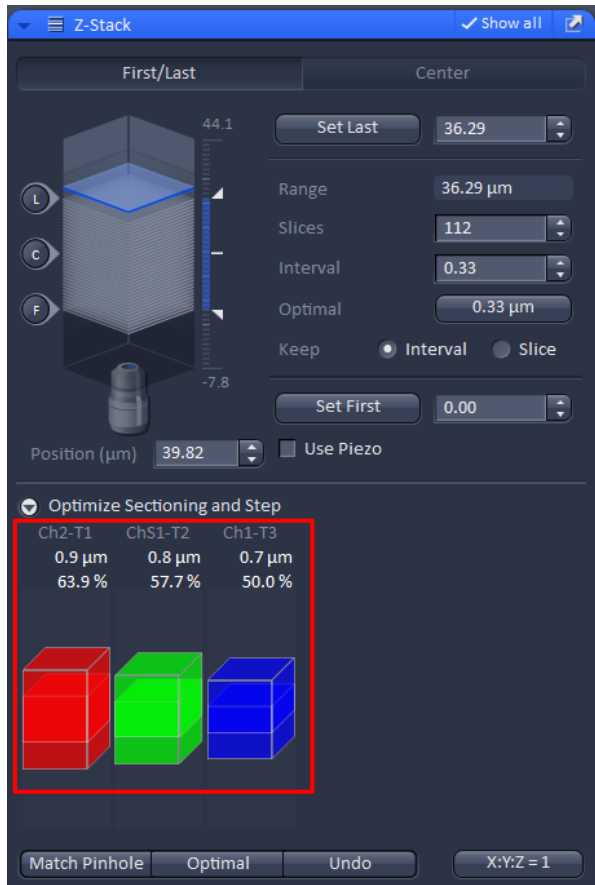
## Center



- 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

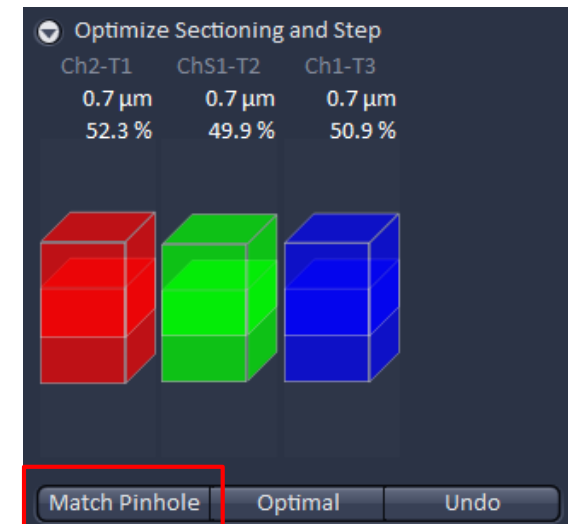
## Match Pinhole



多通道荧光拍摄Z-stack需要考虑光切厚度不一致的问题：

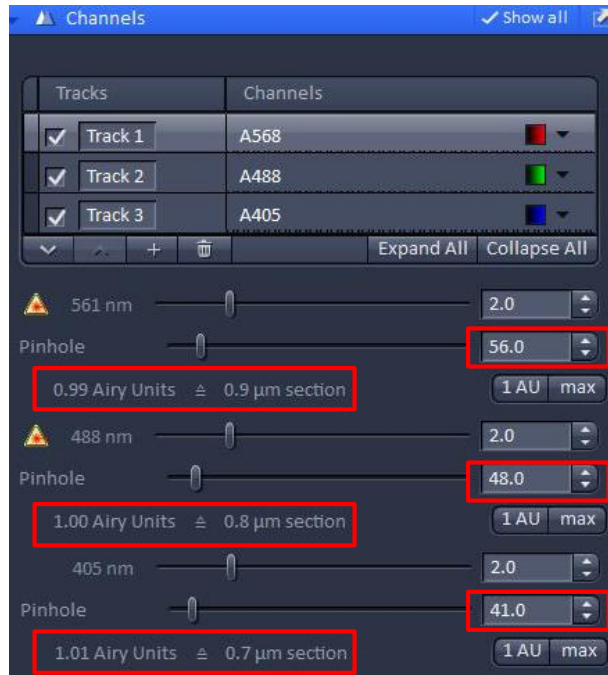
1、可以通过点击“Match Pinhole”自动调节不同track的针孔使光切厚度相似；

\*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。

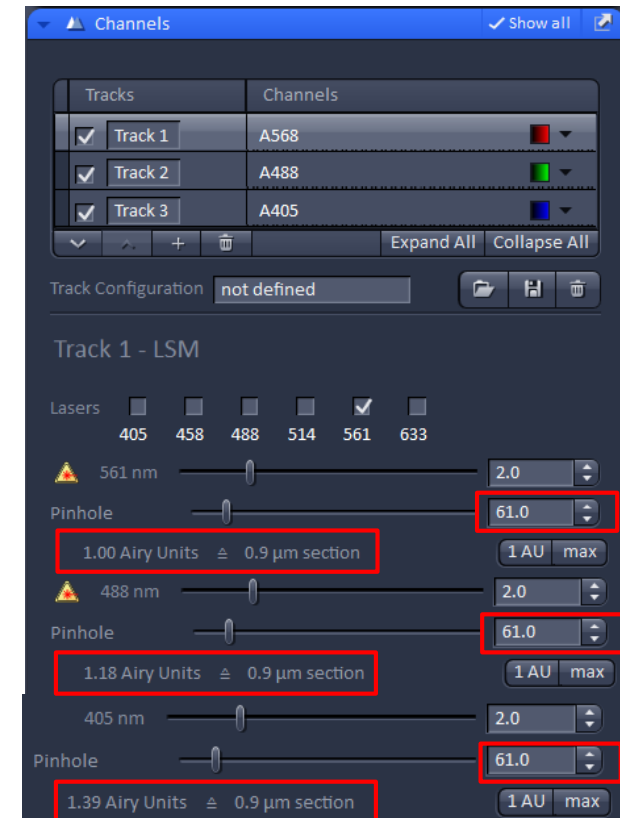


# Z-stack image

## 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。



**1** Startup and Shutdown of the System

**2** Acquiring Multi-Channel images

**3** Z-stack image

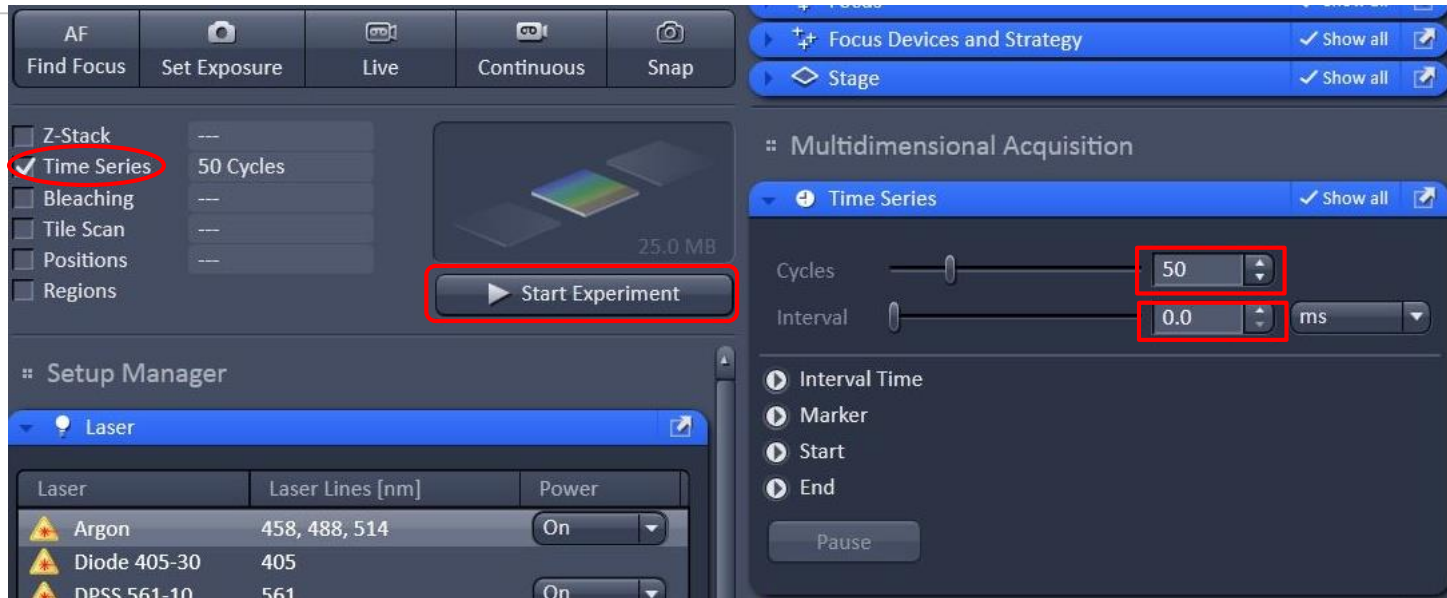
**4** Time Series image

**5** Tile Scan

**6** Airyscan Imaging

**7** Fast Airyscan Imaging

# Time Series image



- 1、选择“Time Series”；
- 2、拍摄要进行的循环数cycles；
- 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”

**1** Startup and Shutdown of the System

**2** Acquiring Multi-Channel images

**3** Z-stack image

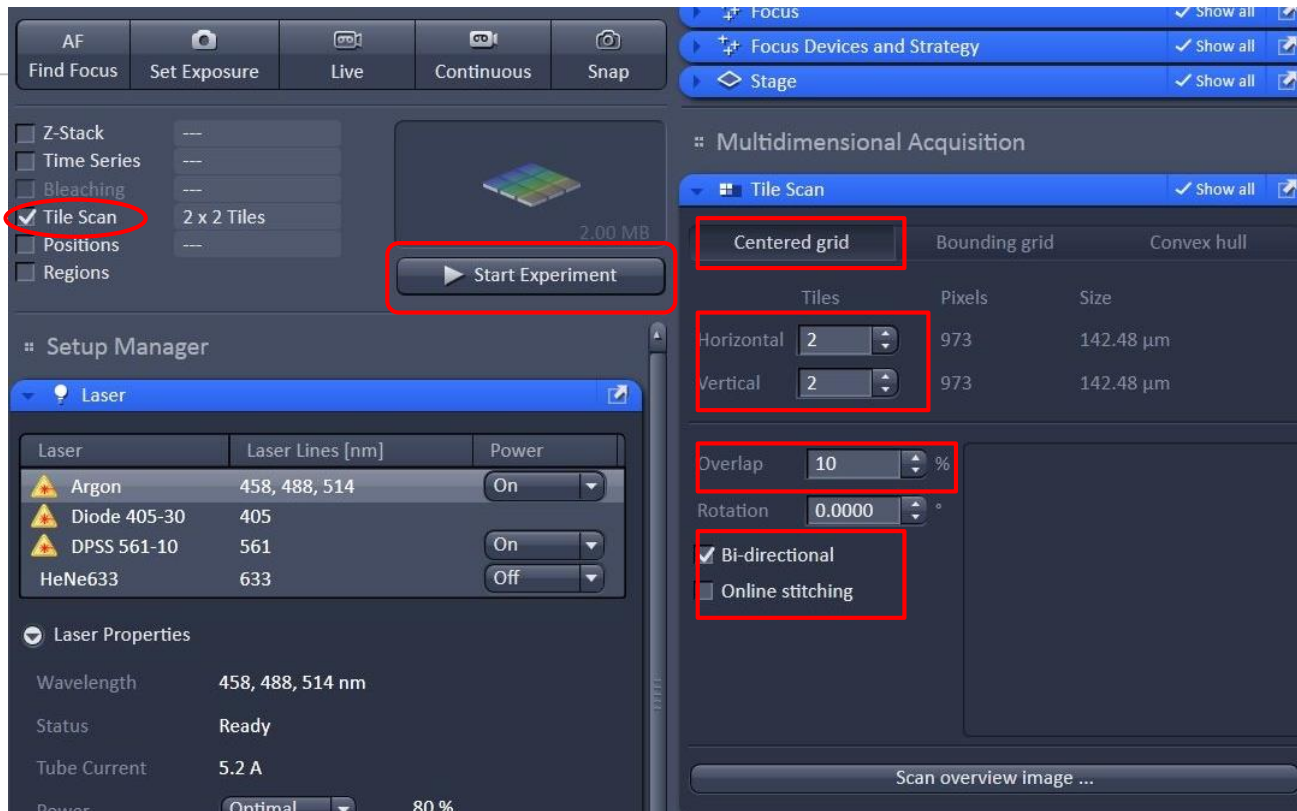
**4** Time Series image

**5** Tile Scan

**6** Airyscan Imaging

**7** Fast Airyscan Imaging

# Tile Scan

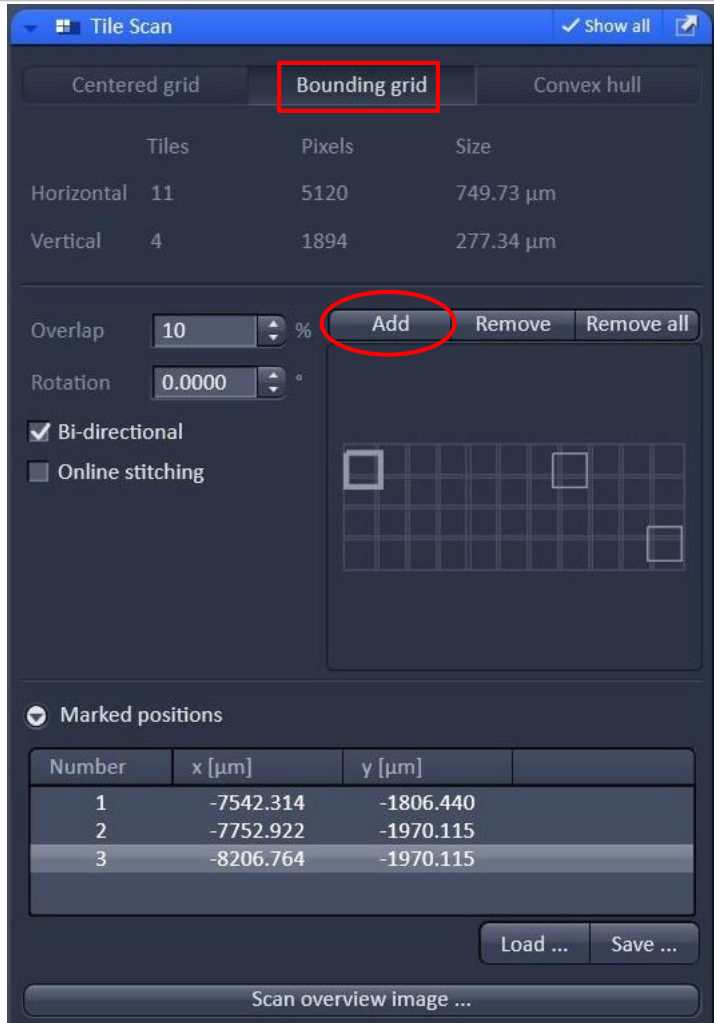


- 1、选择“Tile Scan”；
- 2、Centered grid下以现在视野为中心，拍摄拼图：
  - A、Horizontal & Vertical 水平和垂直拍摄范围；
  - B、拼图之间的重叠overlap、是否双向拼图Bi-directional以及拍摄后拼接Online stitching；
- 3、“Start Experiment”

# Tile Scan



## Bounding grid

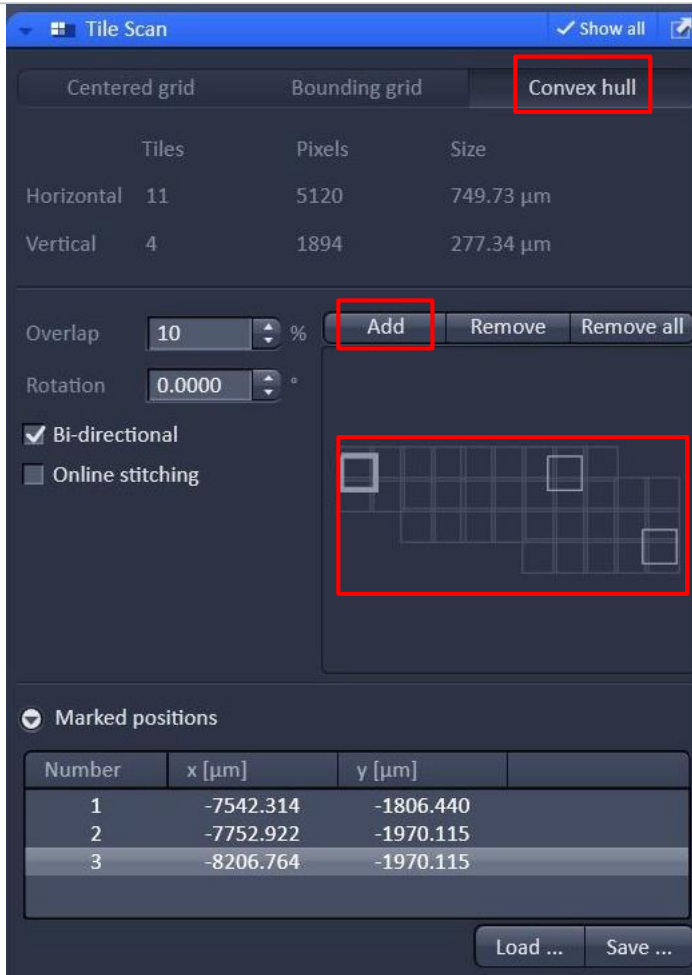


- 1、Bounding grid下通过移动载物台到想拼接的图像边缘，单击“Add”，添加边缘范围。软件自动定义拼图范围。
- 2、“Start Experiment”。

# Tile Scan



## Convex hull



- 1、Convex hull类似Bounding grid，通过移动载物台到想拼接的图像边缘，单击Add，添加边缘范围点。软件自动定义拼图范围。不同于Bounding grid软件定义拼图范围会更接近选择的位置点。
- 2、“Start Experiment”。

**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

**7** Fast Airyscan Imaging





#### 4、Channel I 中已经添加好tracks



#### 5、在此处设置Airyscan光路

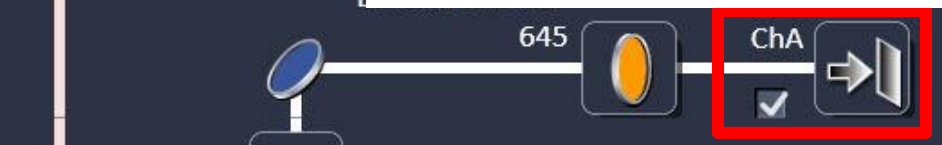


Track 1



| Use                                 | Dye             | Color | Detector | Range     |   |
|-------------------------------------|-----------------|-------|----------|-----------|---|
| <input type="checkbox"/>            |                 |       | Ch1      | 415-735nm | + |
| <input type="checkbox"/>            |                 |       | ChS1     | 410-696nm | - |
| <input checked="" type="checkbox"/> | Alexa Fluor 568 |       | Ch2      | 568-712nm |   |

7、软件会自动关闭其他检测器，并在右下角提示 “Airyscan 不能与其他检测器共用”



6、选择ChA检测器（即Airyscan检测器）

MBS 458/561

Plate

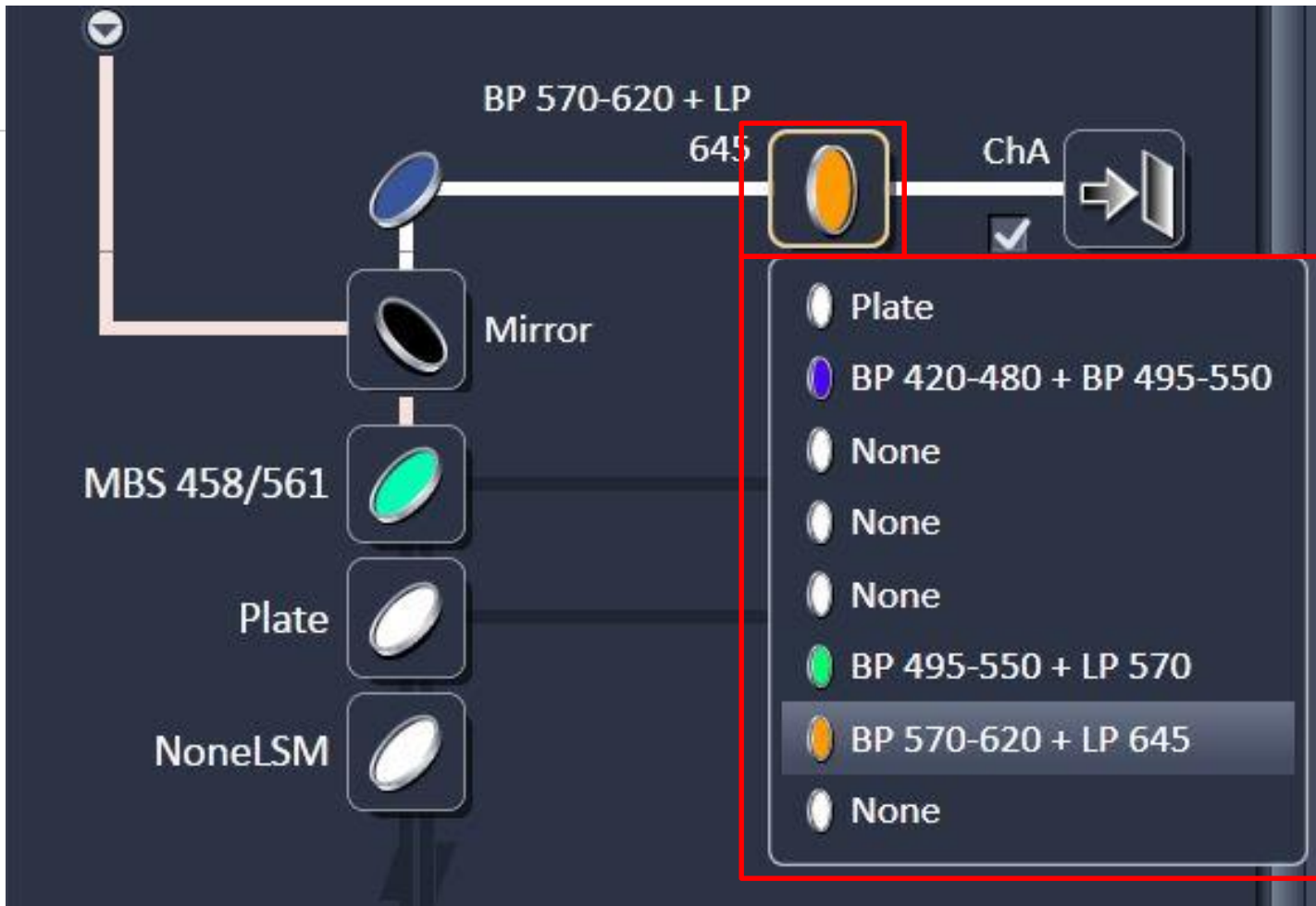
NoneLSM

Visible light

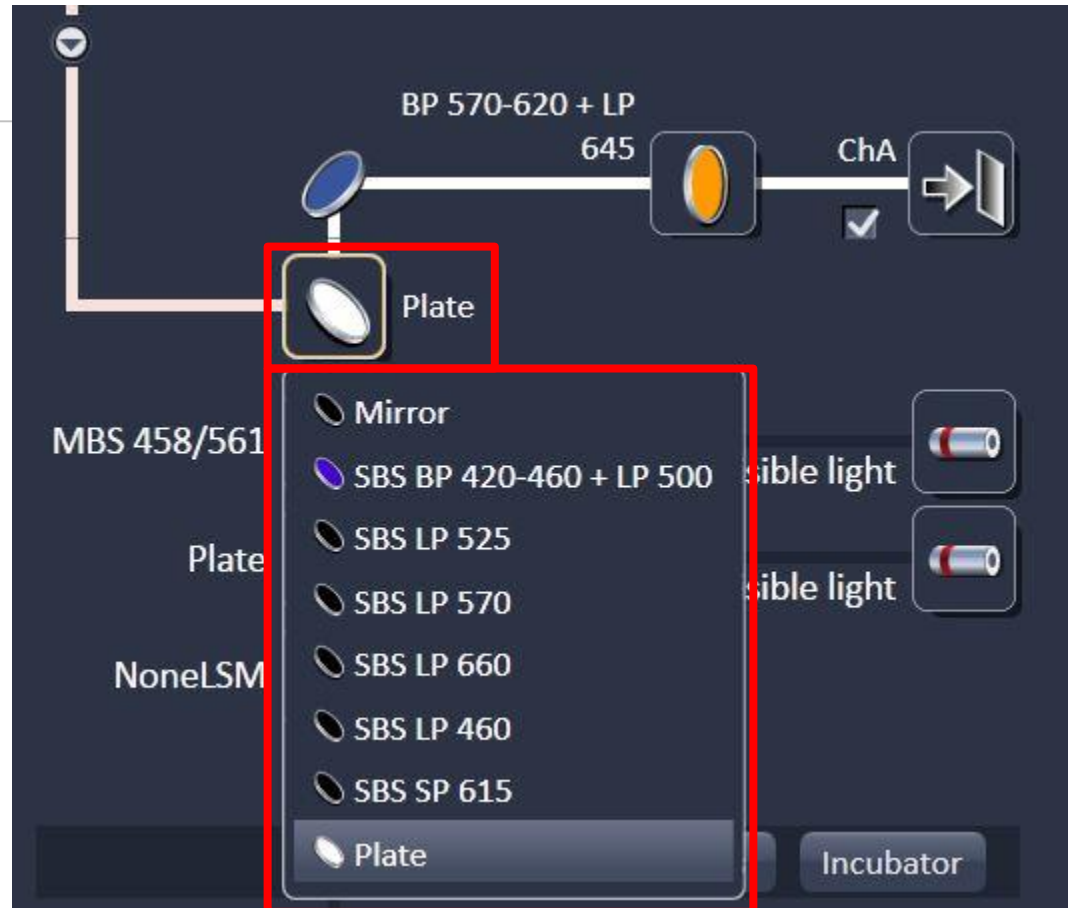
Invisible light

Info

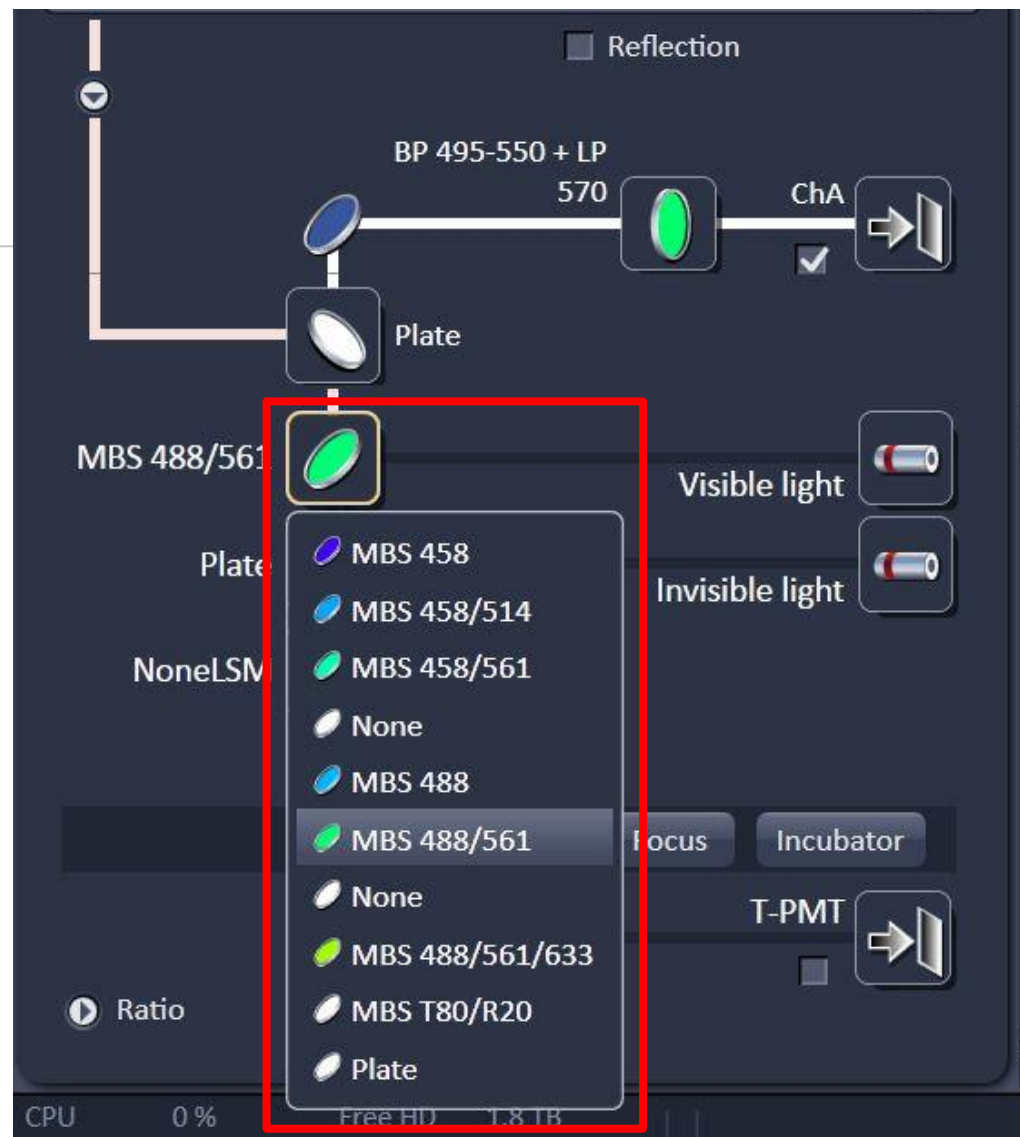
Airyscan can not be used with other detectors so they will be deactivated



8、选择适合的滤片，如BP420-480代表蓝色波段，BP495-550代表绿色波段，BP 570-620 代表红色波段



## 9、次级分色镜（SBS）选择“Plate”



10、如果是多色荧光成像，可以选择多激光反射主分色镜（MBS），如图中MBS可以同时反射488和561，减少MBS转换

The screenshot displays the Zeiss LSM software interface. On the left, the 'Track 1' panel shows a spectral graph and a table of channel configurations. The table lists three channels: Ch1 (415-735nm), ChS1 (410-696nm), and Ch2 (568-712nm) using Alexa Fluor 568 dye. Below the table is an optical diagram showing the light path from the dye to the detector (ChA) through a BP 570-620 + LP filter and a Plate. The right panel shows the 'Channels' configuration for Track 1 - LSM, with the Pinhole size set to 142.4 (2.51 Airy Units) and the Airyscan Mode set to SR. The SR mode is highlighted with a red box.

| Use                      | Dye             | Color | Detector | Range     |
|--------------------------|-----------------|-------|----------|-----------|
| <input type="checkbox"/> |                 |       | Ch1      | 415-735nm |
| <input type="checkbox"/> |                 |       | ChS1     | 410-696nm |
| <input type="checkbox"/> | Alexa Fluor 568 |       | Ch2      | 568-712nm |

BP 570-620 + LP 645

ChA

Plate

MBS 488/561

Plate

NoneLSM

Visible light

Invisible light

Reflection

Track Configuration: not defined

Track 1 - LSM

Lasers: 405, 458, 488, 514, 561, 633

561 nm

Pinhole: 142.4 (2.51 Airy Units, 0.4  $\mu\text{m}$  section)

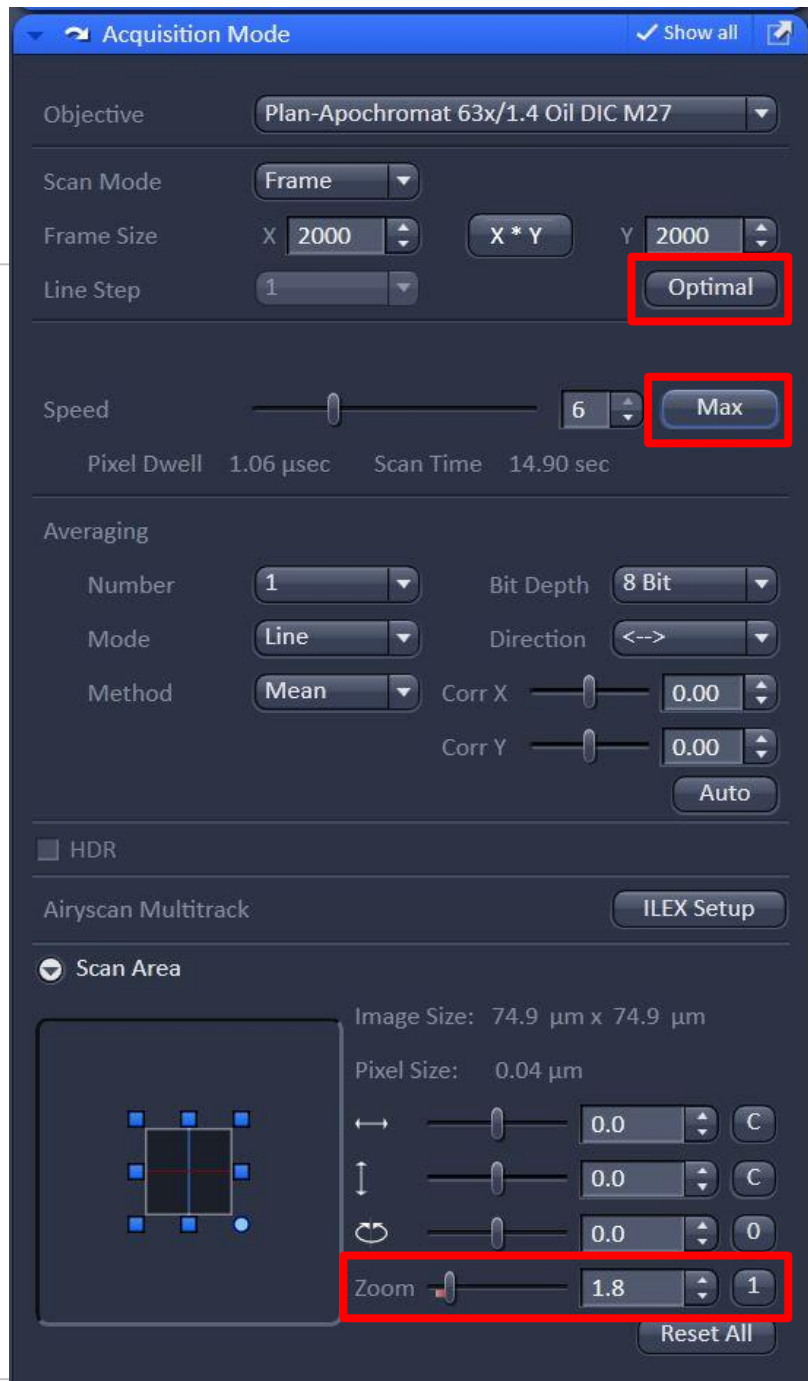
Airyscan Mode: SR, VP, CO

Gain (Master): 0

Digital Gain: 1.0

Display: Auto copy from last acquired, Range indicator

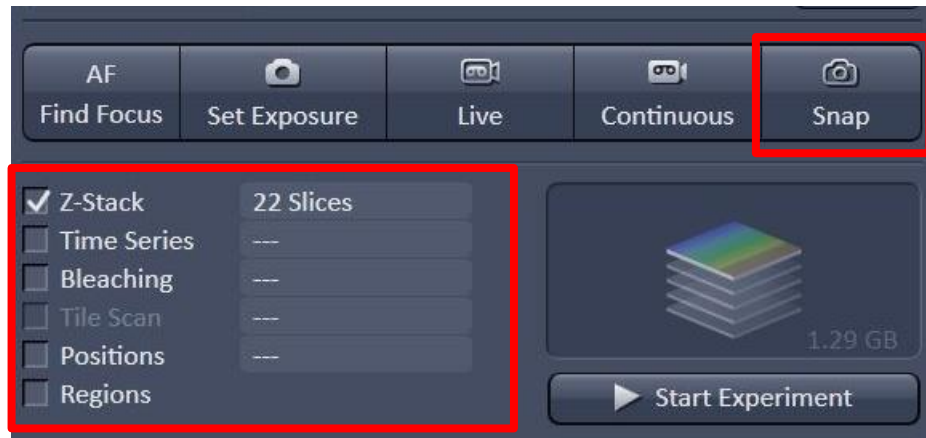
11、不要更改针孔 (Pinhole) 大小, Airyscan Mode 确认是 “SR” 模式



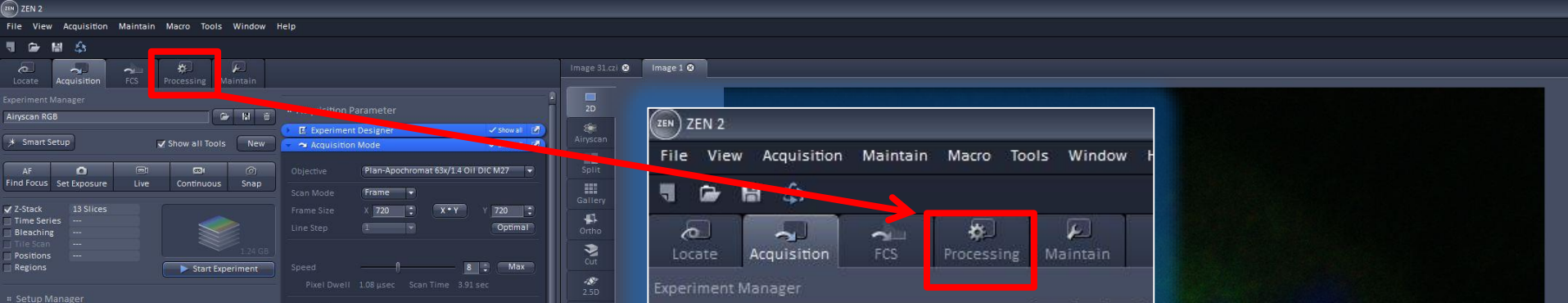
13、Frame Size选择“optimal”

14、Speed选择“Max”

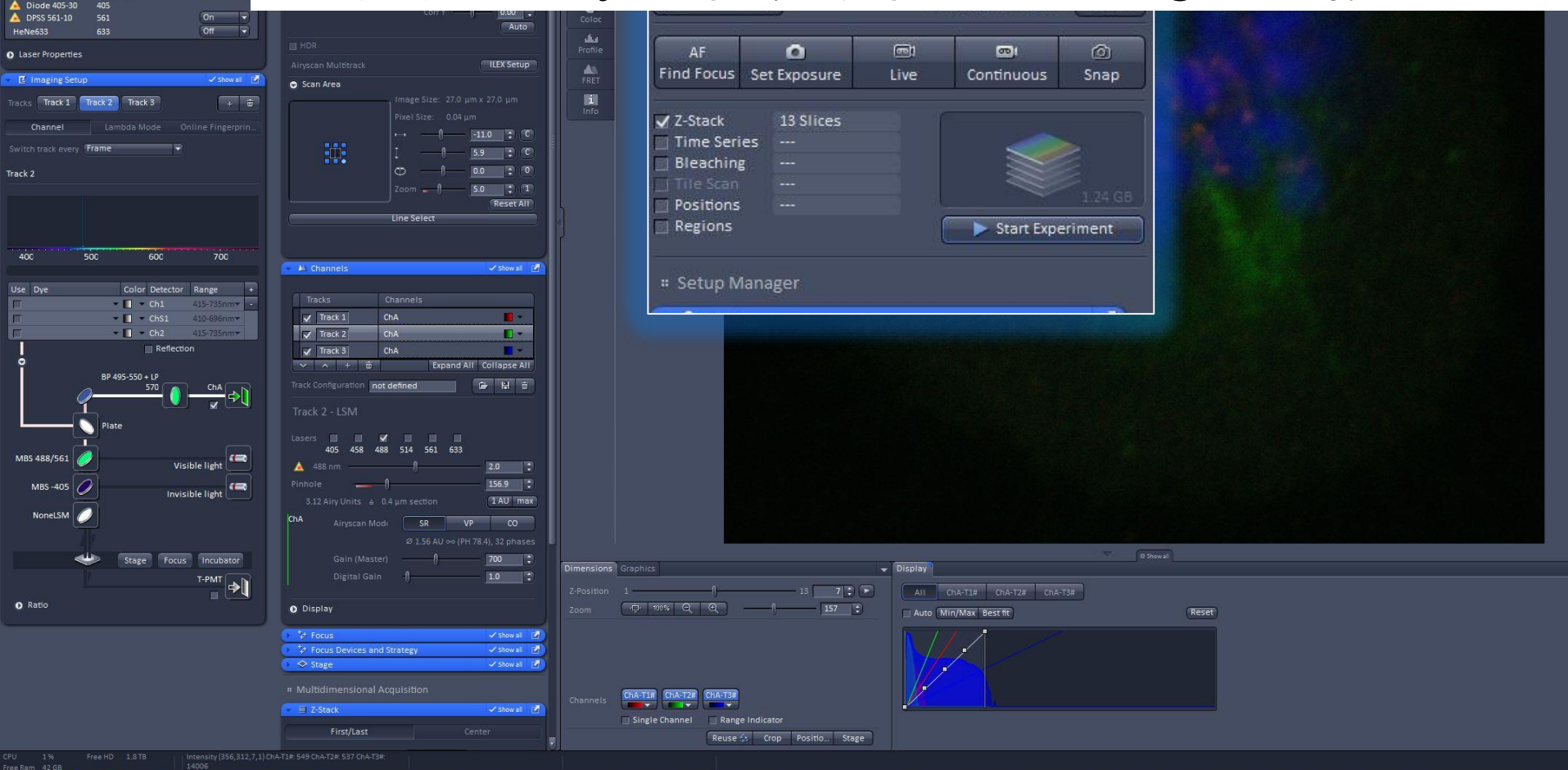
12、Zoom不能小于1.8

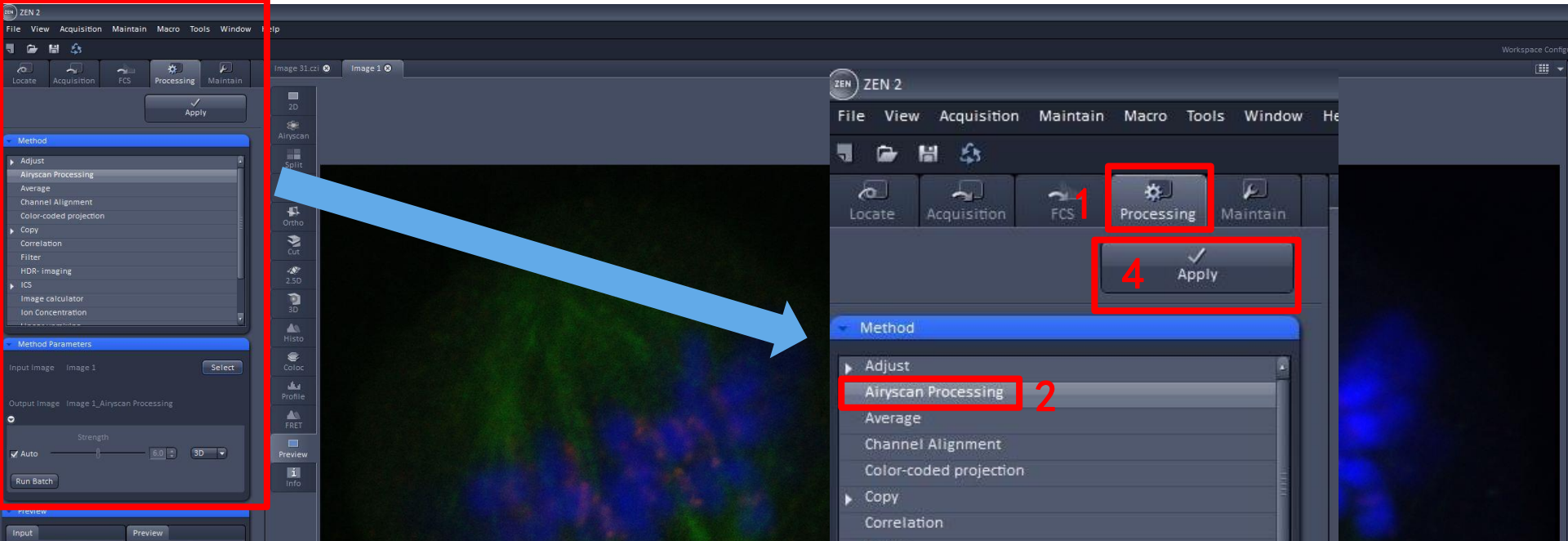


15、随后可以进行二维图像拍摄（Snap）或者多维图像拍摄

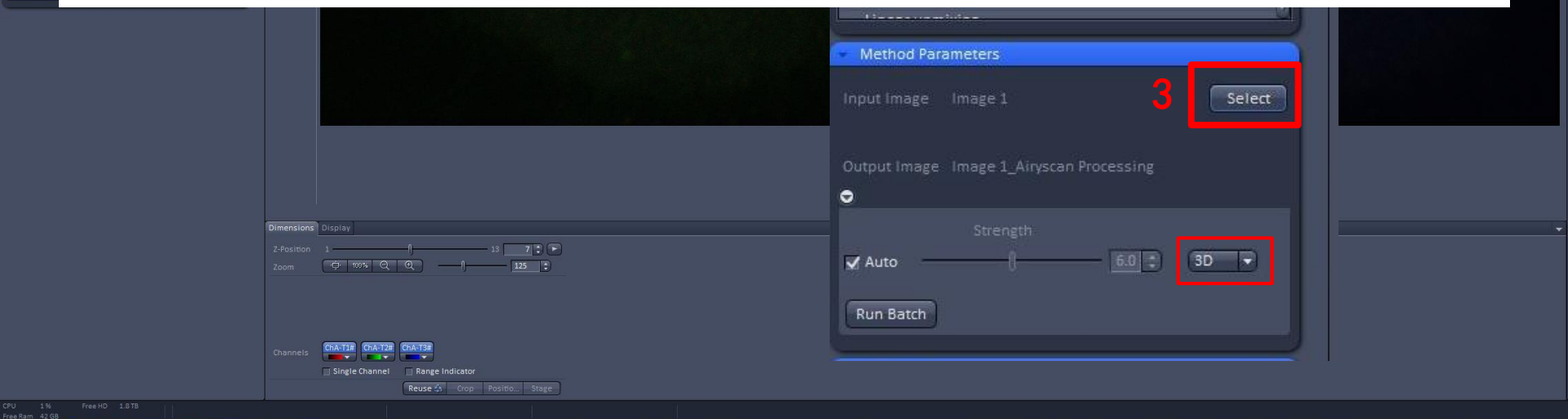


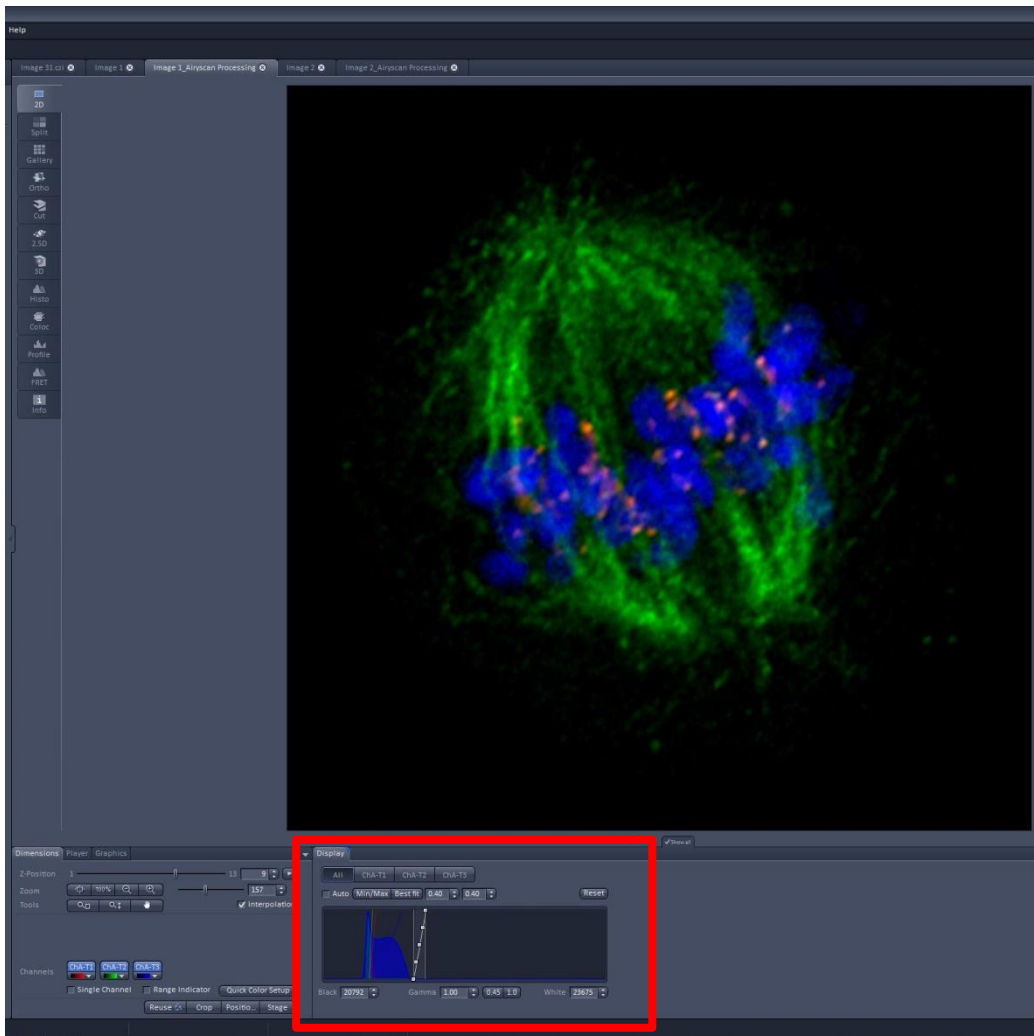
## 16、拍摄后的airyscan图像需要在“Processing”中进行后续处理





17、按照“Processing → Airyscan Processing → Select → Apply”进行图像处理。如果是z-stack图像，请选择“3D”





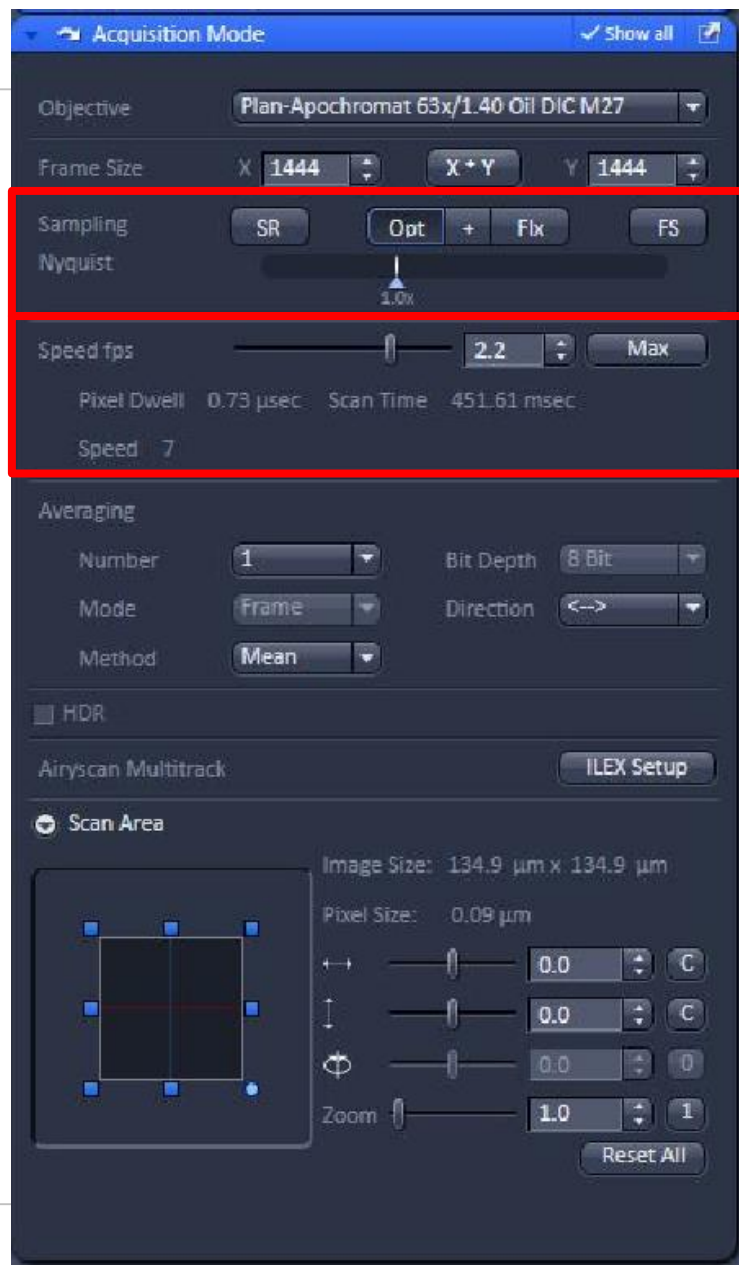
18、处理后的图像，在Display处选择Min/Max或者手动调节显示效果

只需保存处理后的图像

- 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
- 7** Fast Airyscan Imaging

在Airyscan光路的基础上进行Fast Airyscan的设置（参见31-36页）。





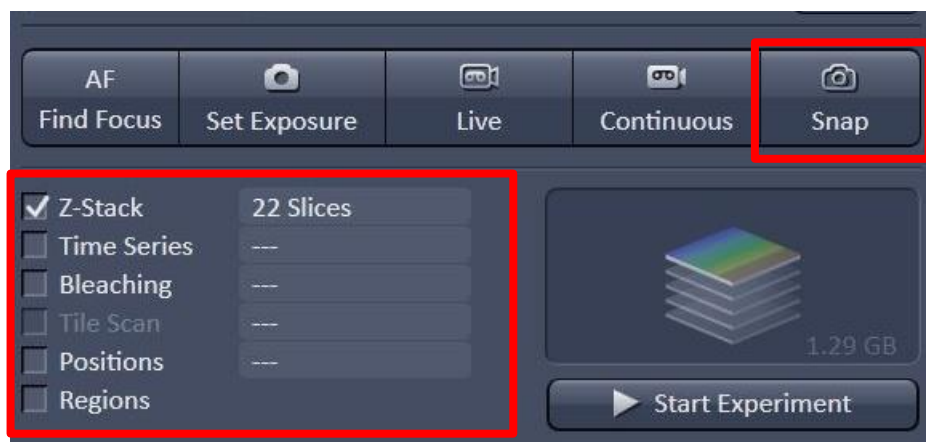
## 4、选择Sampling采样率。

采样率：SR                  Opt                  Flx                  FS



分辨率：逐渐下降  
速度：逐渐提升

SR: Superresolution; 最佳分辨率;  
Opt: Optimal;  
Flx: Flexible;  
FS: Fastest Speed; 最快速度;



5、随后可以进行二维图像拍摄（Snap）或者多维图像拍摄

**成像后务必进行Airyscan Processing**（否则无法获得超高图片），与Airyscan成像后处理一致（参见40-42页）。

# 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](http://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！

