

LSM 980 Basic Operation



Carl Zeiss Microscope

Application Specialist

Dr. Lu Xi & Yan Runchuan

1 Startup and Shutdown of the System

2 Acquiring Multi-Channel images

3 Z-stack image

4 Time Series image

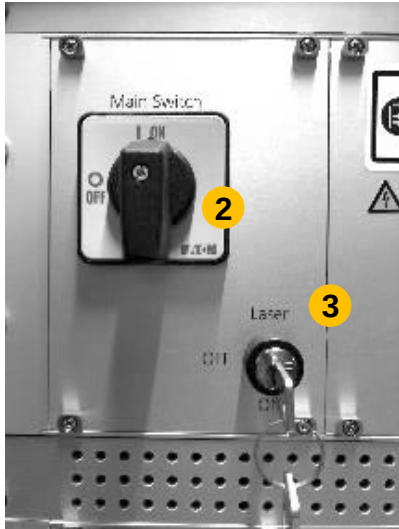
5 Tile Scan

6 Airyscan Imaging

Startup and Shutdown of the System



Startup of the System



开机顺序:

- 1、稳压电源开机
- 2、Main Switch
- 3、Laser (转动钥匙)
- 4、Components
- 5、计算机开机

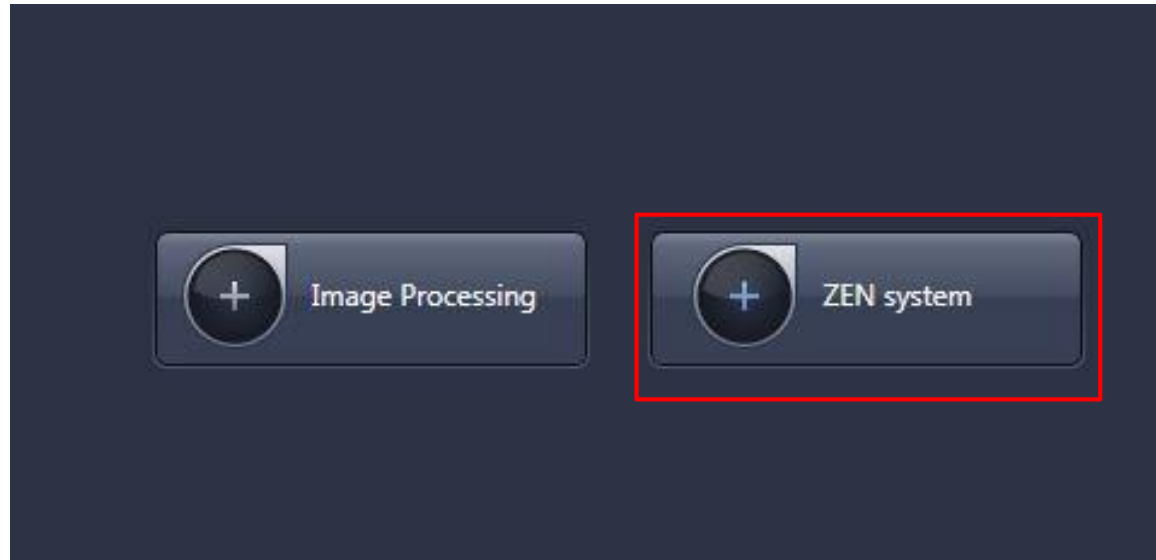
Startup and Shutdown of the System



Startup of the System

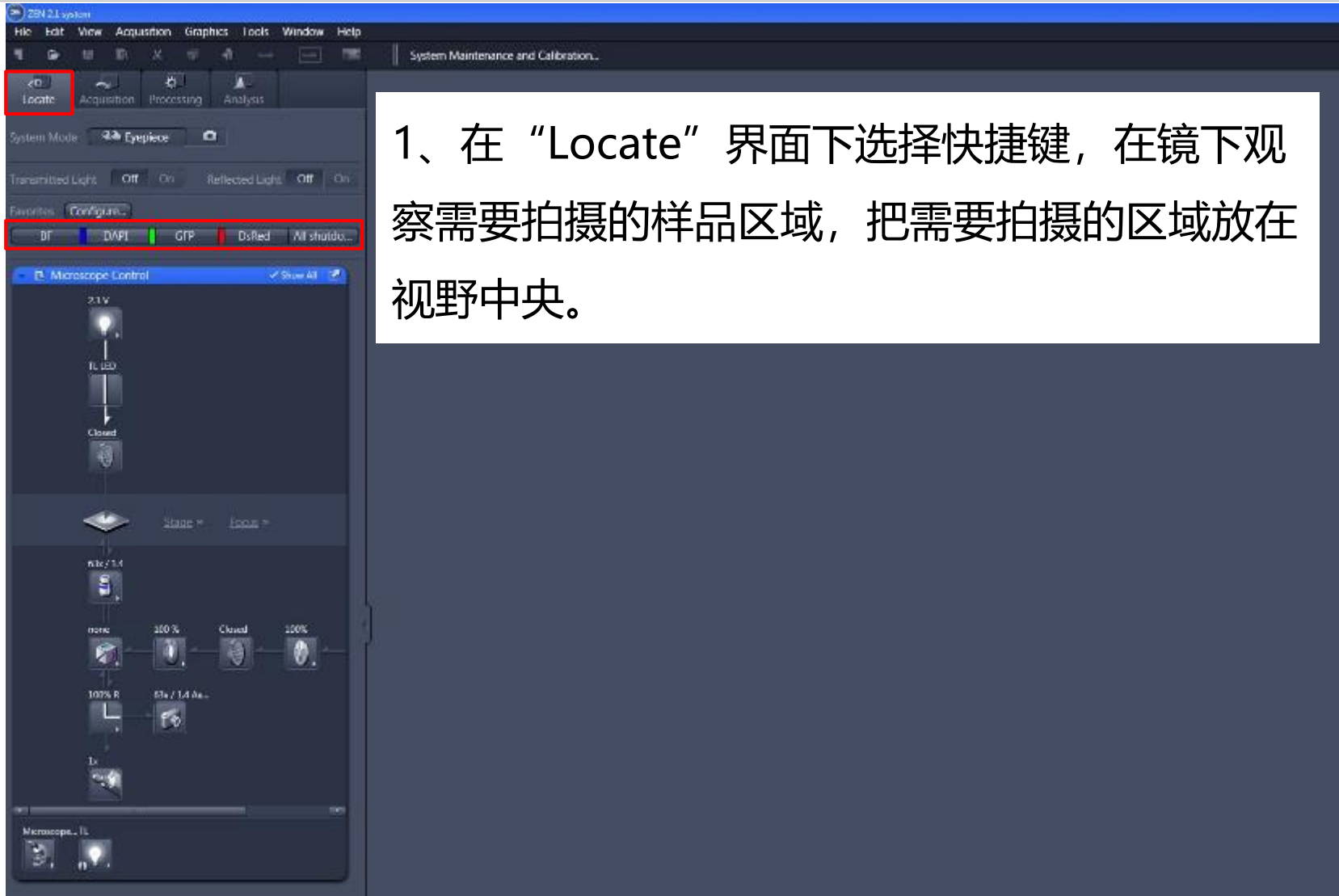


6、启动ZEN软件（Blue），选择“ZEN system”；



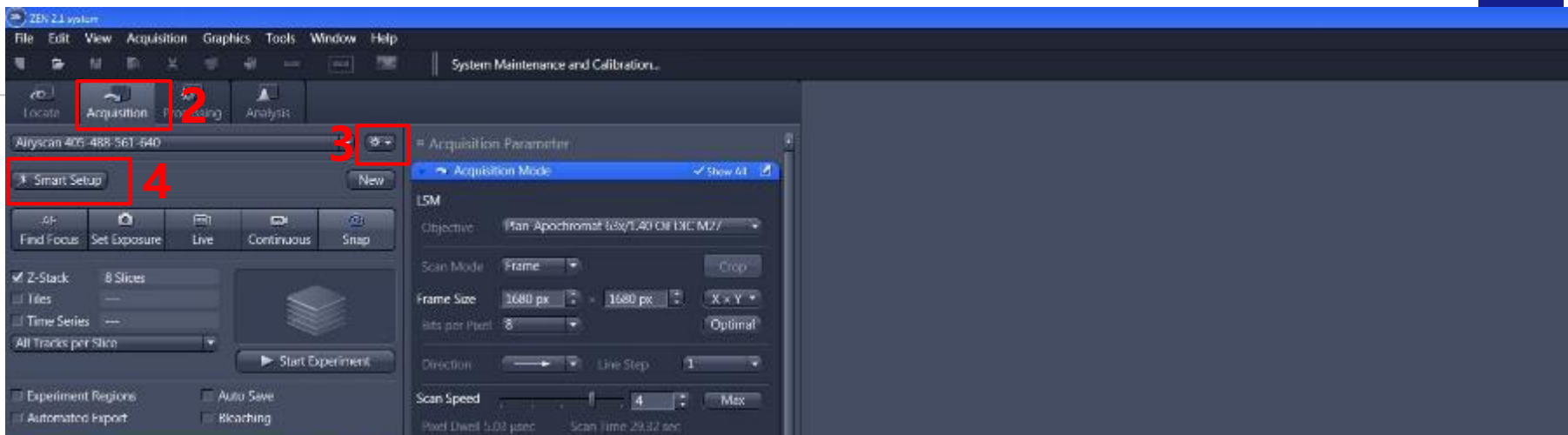
- 1 Startup and Shutdown of the System
- 2 Acquiring Multi-Channel images
- 3 Z-stack image
- 4 Time Series image
- 5 Tile Scan
- 6 Airyscan Imaging

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

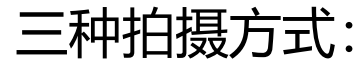


2、进入 “Acquisition” 界面；

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”





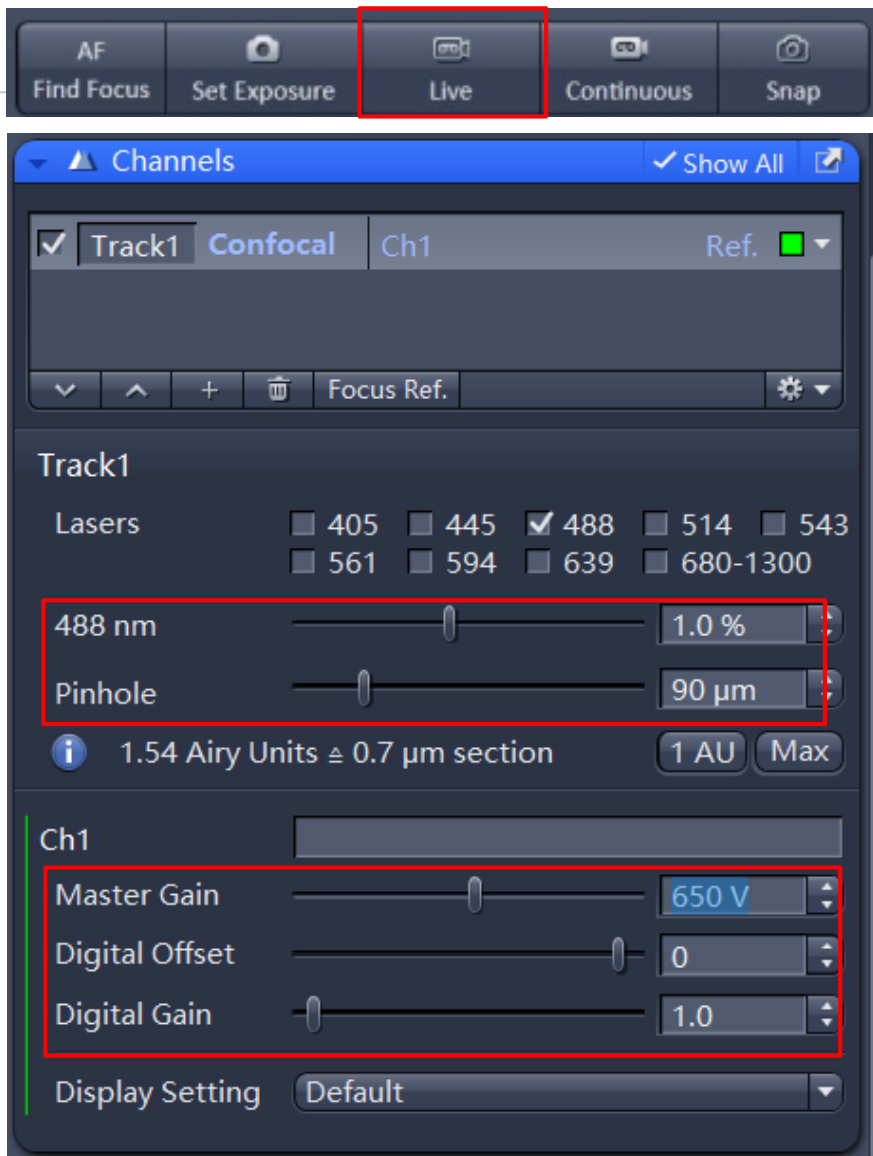
拍摄速度最快，
发射波长接近的荧光染料间存在串色现象；

拍摄速度最慢;
基本避免了发射荧光的串色;

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

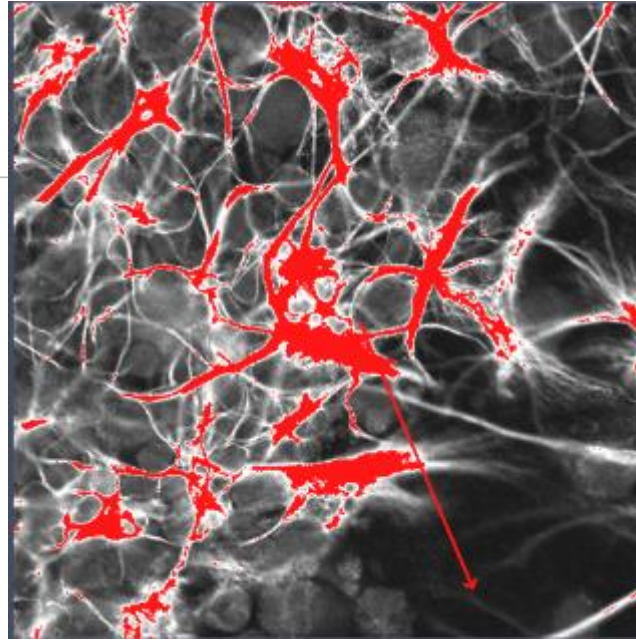
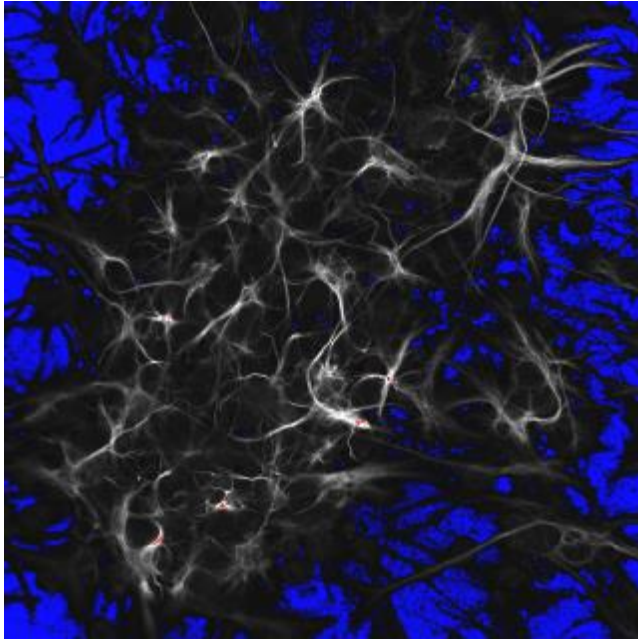


6、在“live”下设置Channels中的激光强度“Laser”，针孔大小

“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有利于提升分辨率，但是会减少图像亮度；

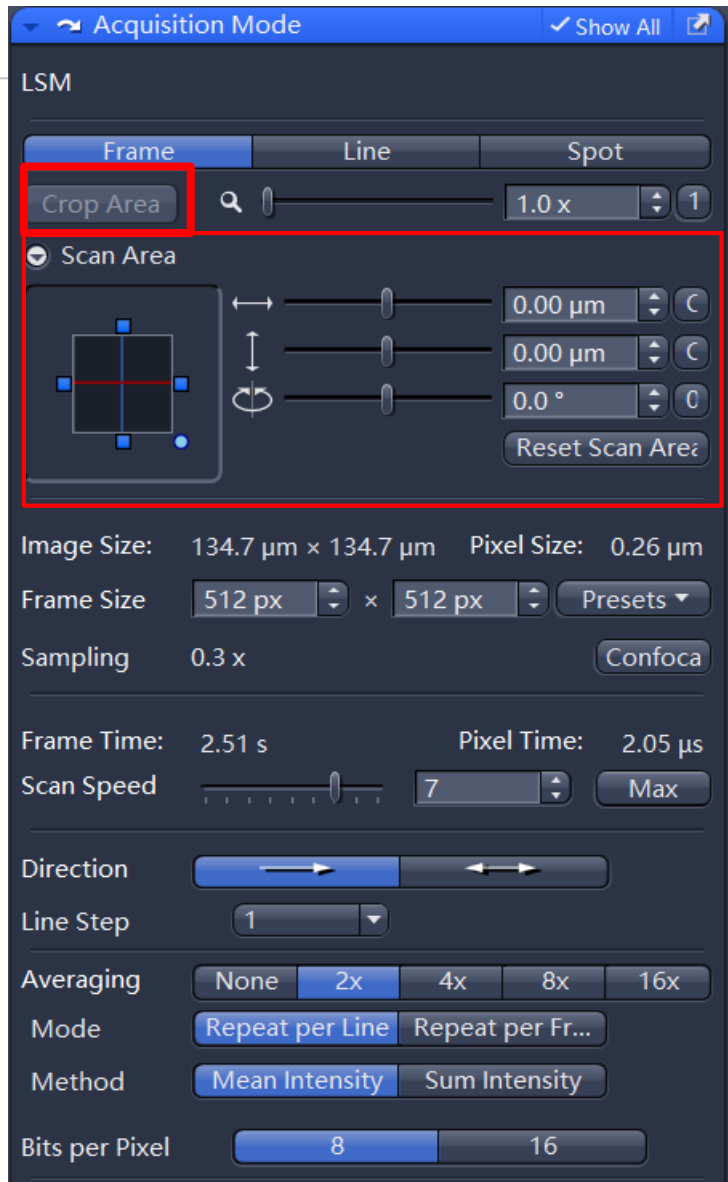
B、“Gain”和“Digital Gain”增加可以增加图像亮度，但是也会提高背景噪音。



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；

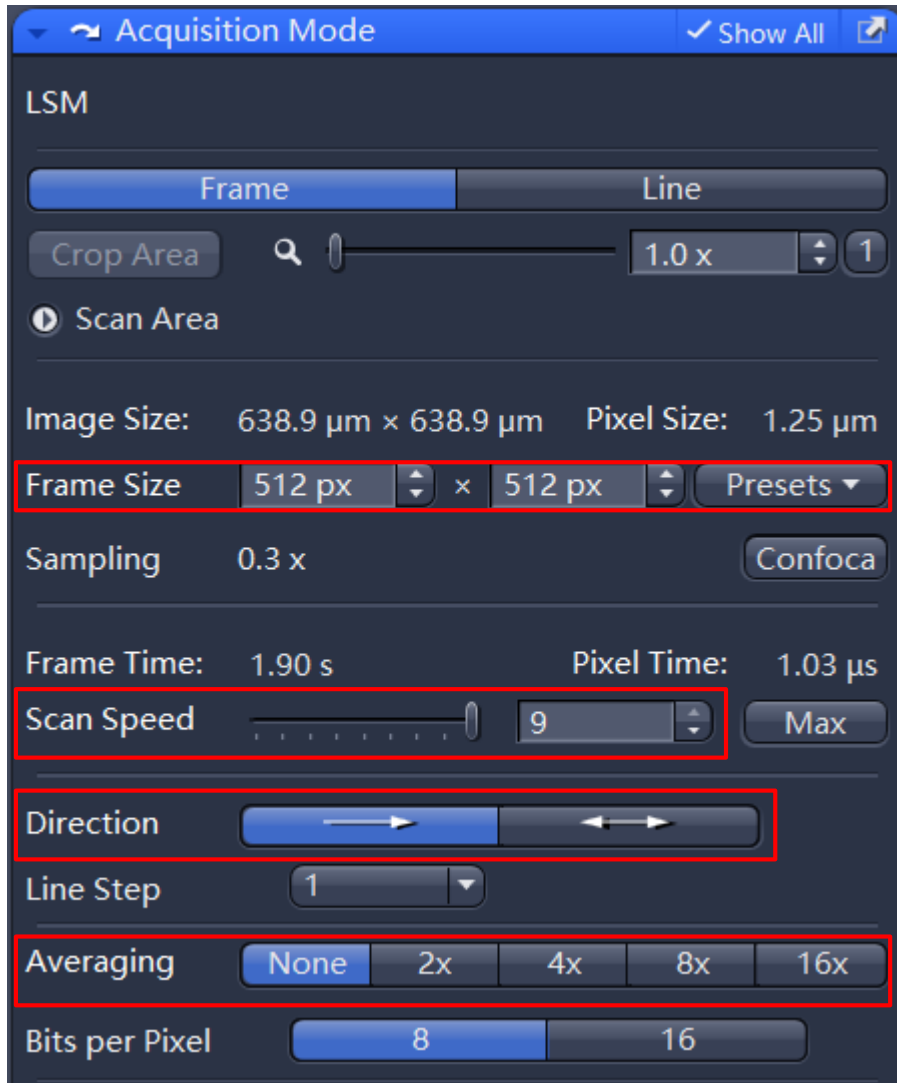
Acquisition Mode



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
“Crop Area” 选择扫描区域;

Acquisition Mode



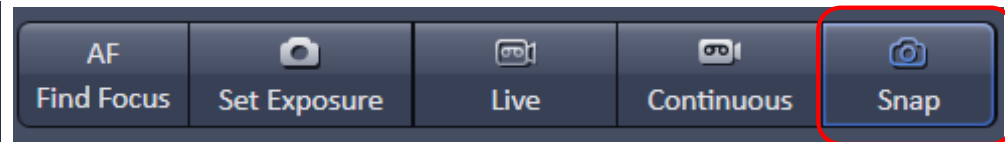
B、设置Scan Speed：扫描速度越慢，信噪比越好，但光漂白越多；

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

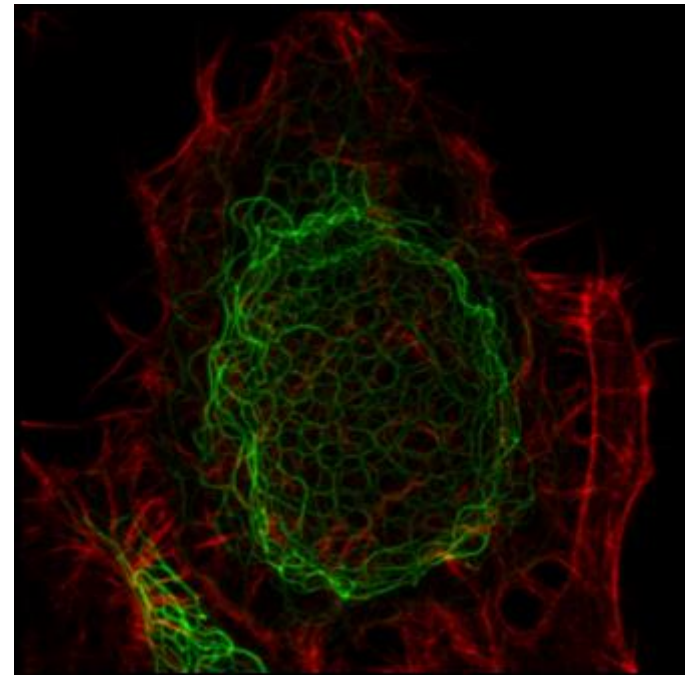
D、Direction：双向扫描可以减少扫描时间；

E、Frame Size：一般选择512×512，图像越大，分辨率提高，但扫描时间越长

Acquiring Multi-Channel images



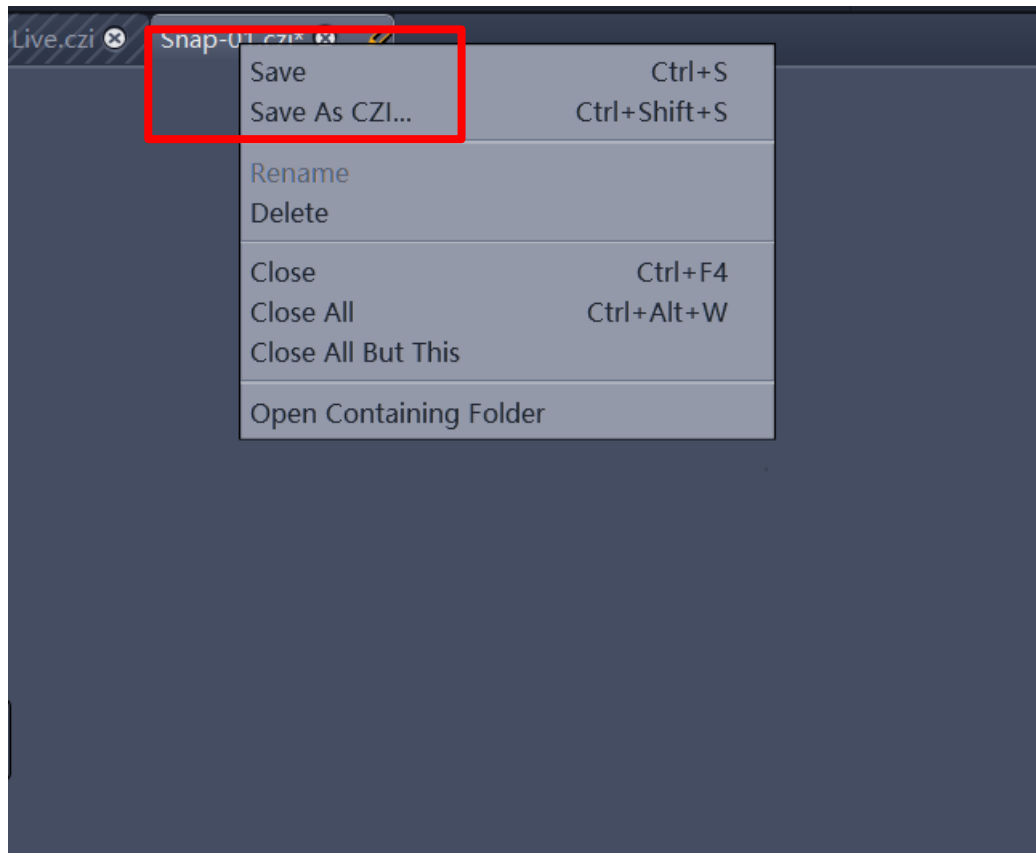
8、选择需要成像的track，单击“Snap”；获得一张多通道图像。



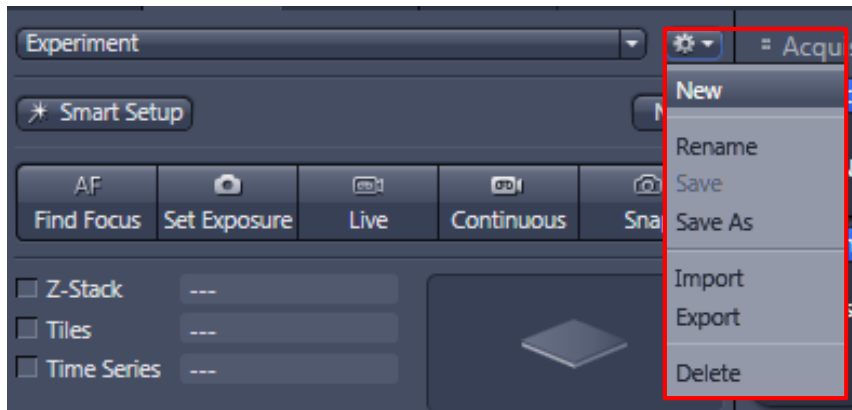
Acquiring Multi-Channel images



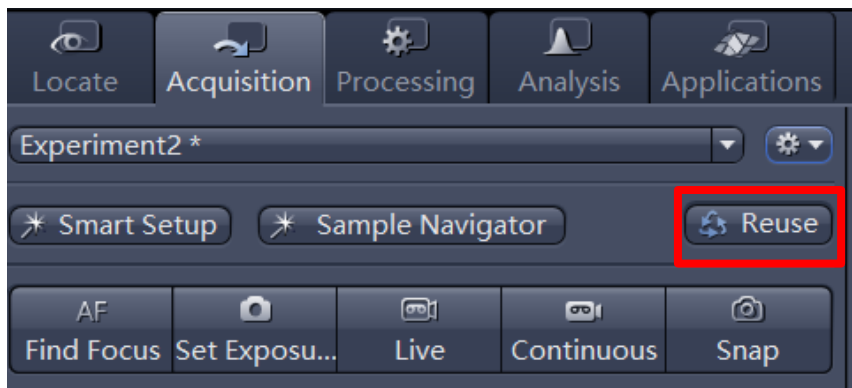
8、右击图像标签，图像保存为“ czi” 格式。



Experiment Manager and Reuse



可以通过Experiment Manager来保存拍摄参数，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

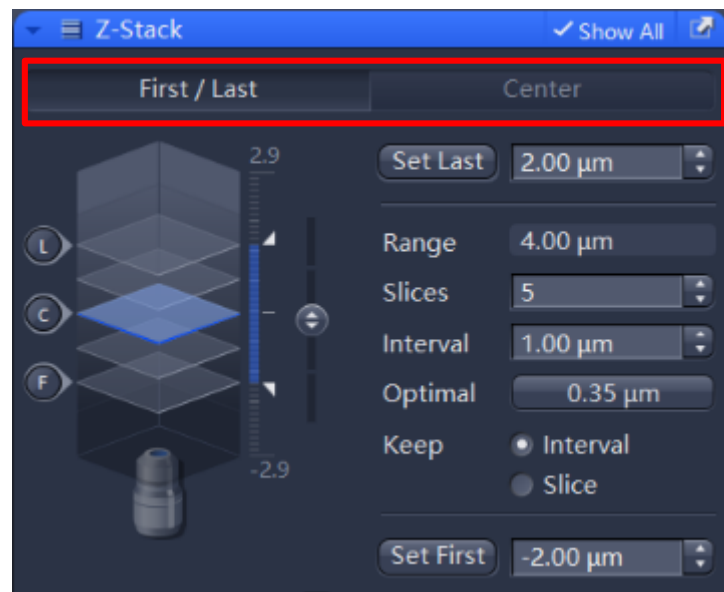


- 1 Startup and Shutdown of the System
- 2 Acquiring Multi-Channel images
- 3 Z-stack image
- 4 Time Series image
- 5 Tile Scan
- 6 Airyscan Imaging

Z-stack image



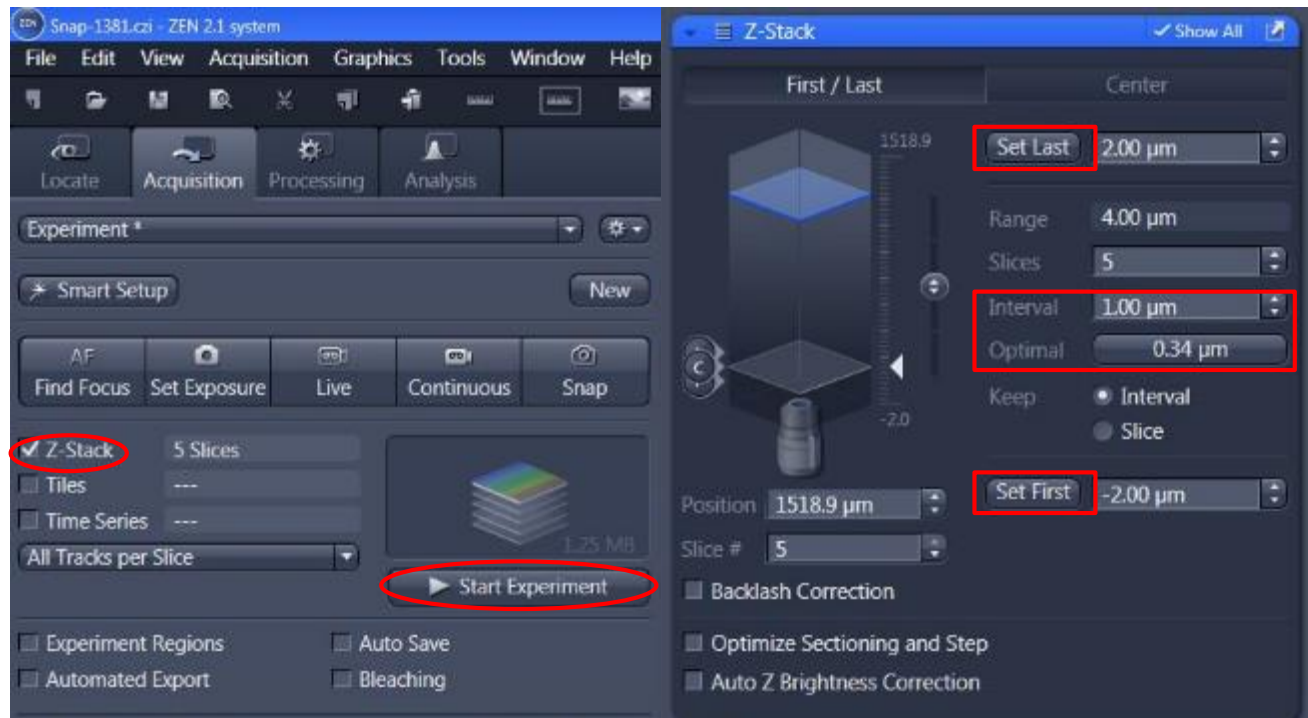
Z-Stack既3D成像，两种模式，主要使用“**First/Last**”模式，通过上下边界决定3D成像的Z轴范围；另一种是“**Center**”模式，主要通过设定Z轴的中间位置和3D厚度来决定成像范围。



Z-stack image



First/Last

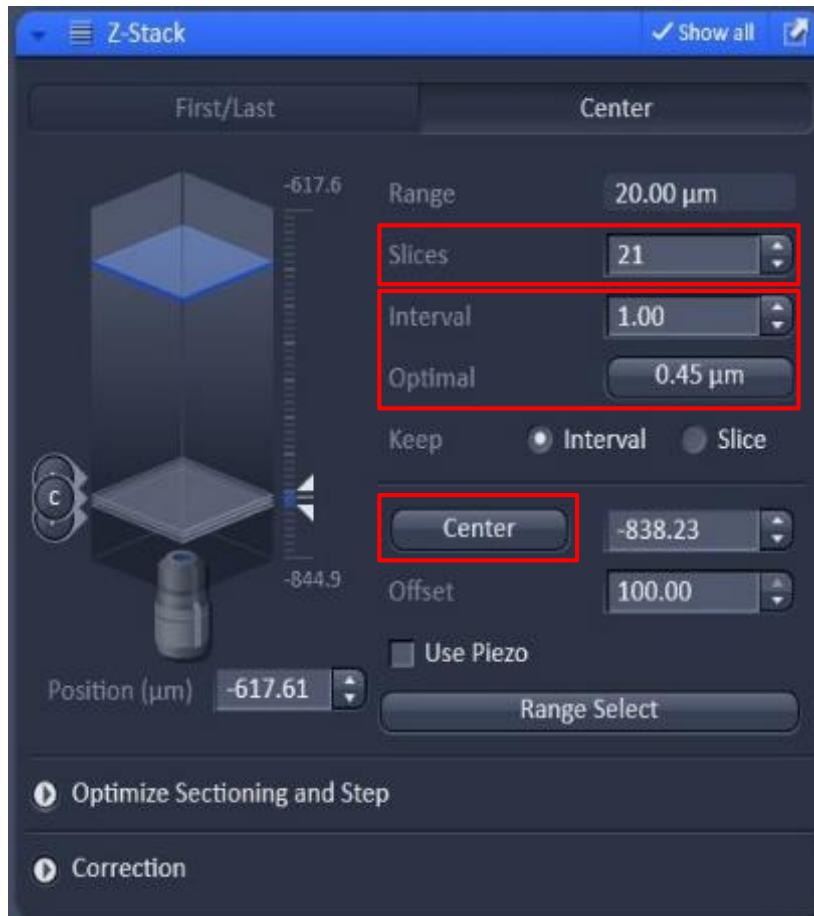


- 1、选择Z-stack;
- 2、在“First/Last”模式下，选择z轴扫描范围：在预览状态下，设置起始“Set First”和结束“Set Last”位置，单击“Optimal”后的“*.**um”按钮来设置最佳间隔;
- 3、单击“Start Experiment”

Z-stack image



Center



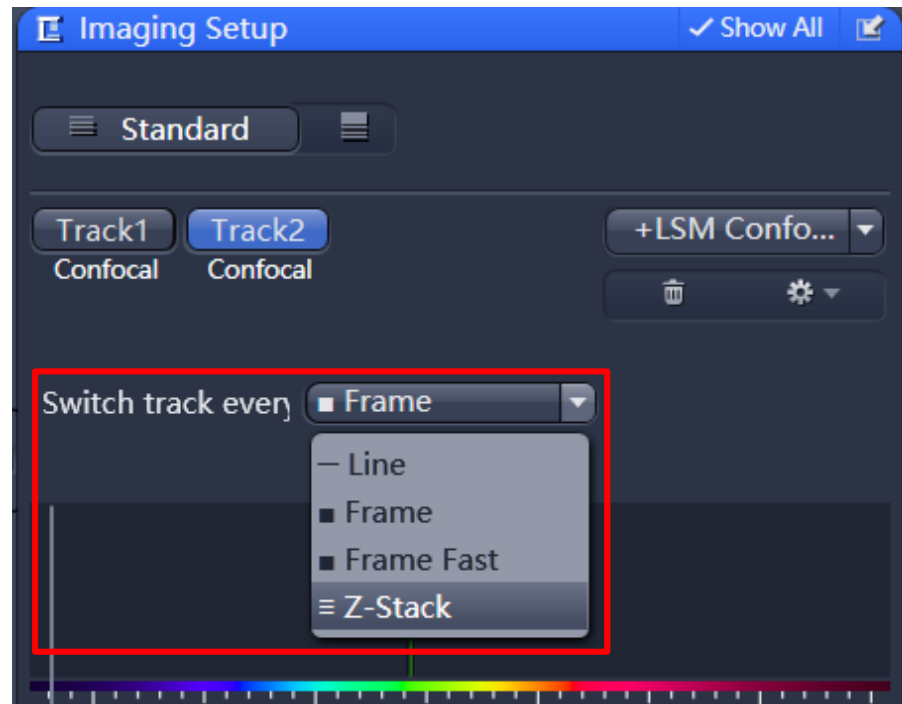
- 1、center模式下，live下选择成像的中间位置，单击“center”，然后设置需要层扫的层数 Slices，并单击“optimal”；
- 2、单击“Start Experiment”

Z-stack image



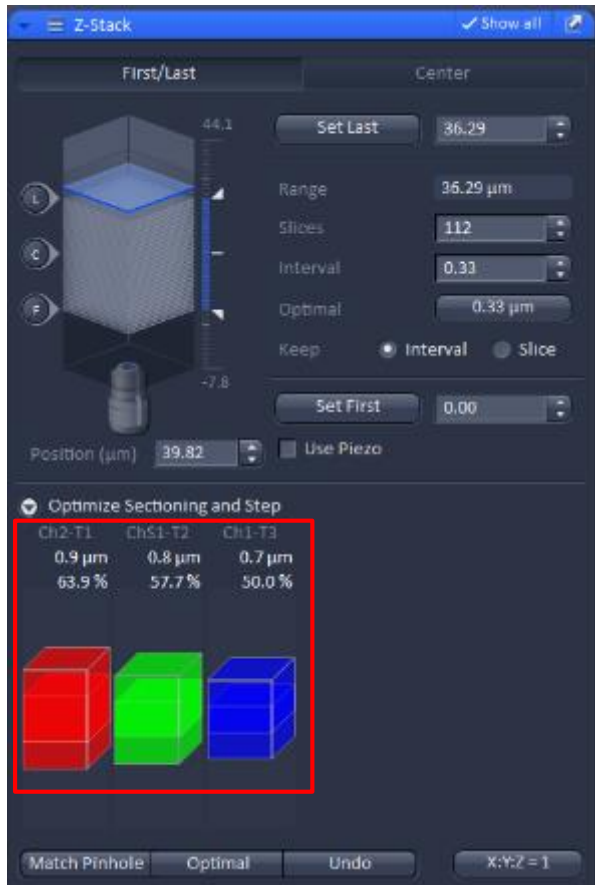
Multi-track Z-stack image

如果是使用Best signal建立多个track，在Z-Stack成像时，在光路中选择 “Switch track every ‘Z-Stack’ ” 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

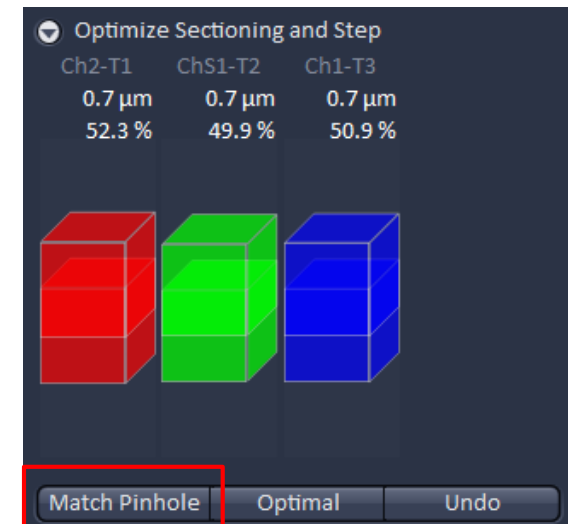
Match Pinhole



多通道荧光拍摄Z-stack需要考虑光切厚度不一致的问题：

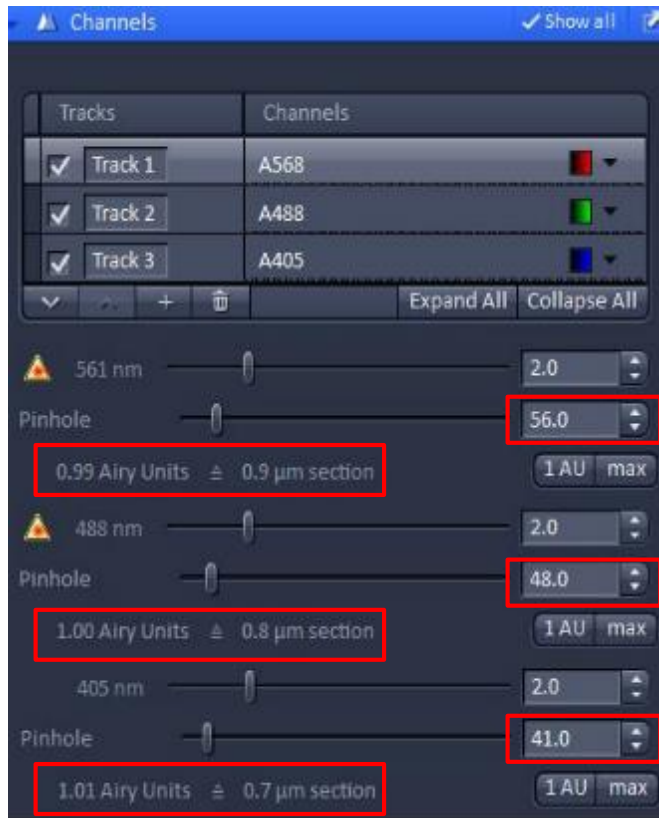
1、可以通过点击“Match Pinhole”自动调节不同track的针孔使光切厚度相似；

*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。

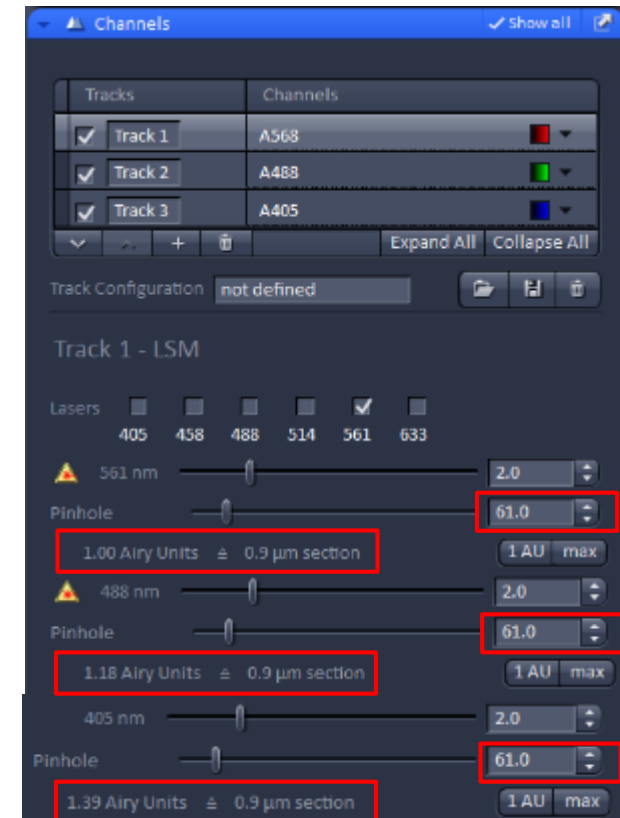


Z-stack image

Match Pinhole



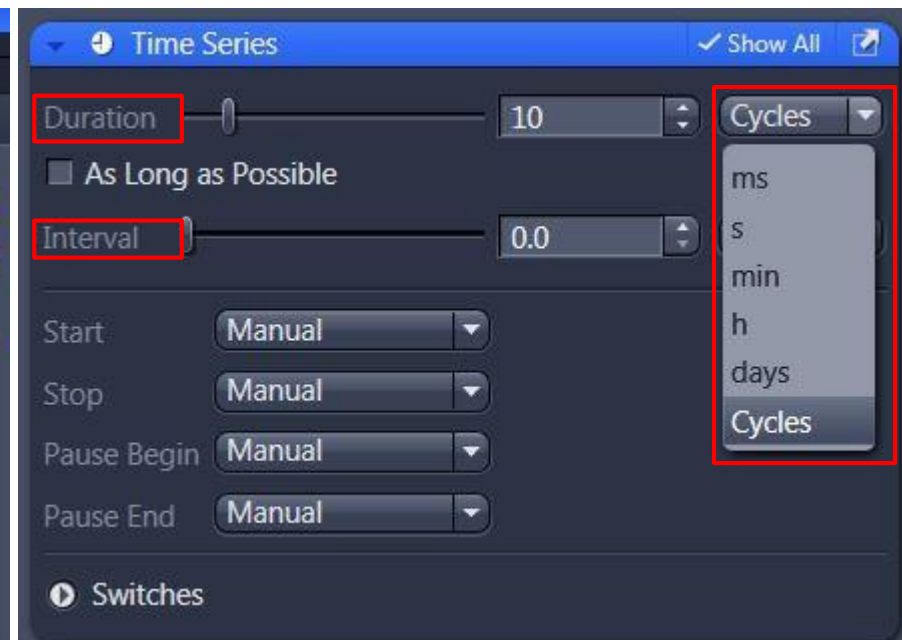
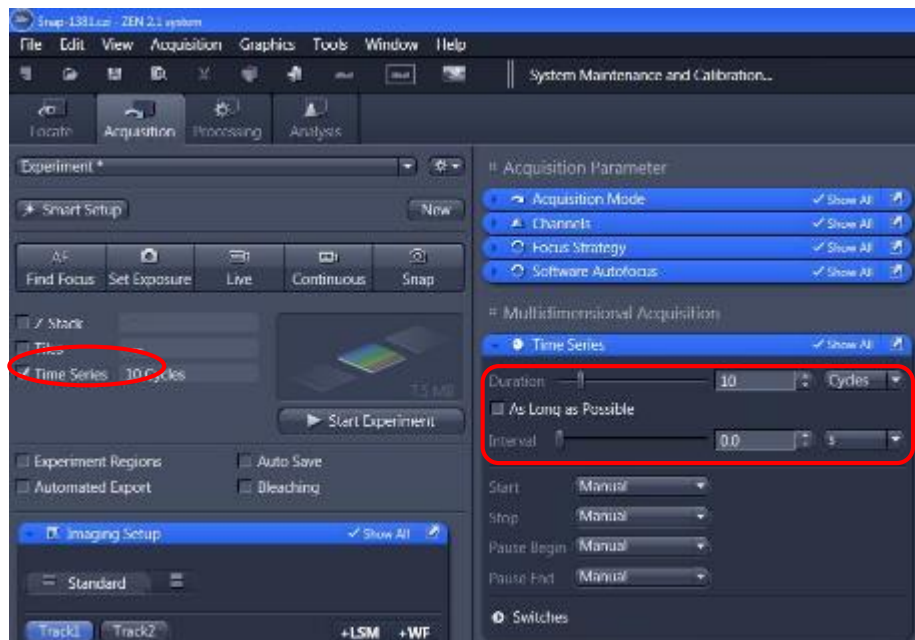
2、通过手动调节针孔到一致，可以保证荧光强度的同时，保证光切厚度一致。



- 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

Single point Time series

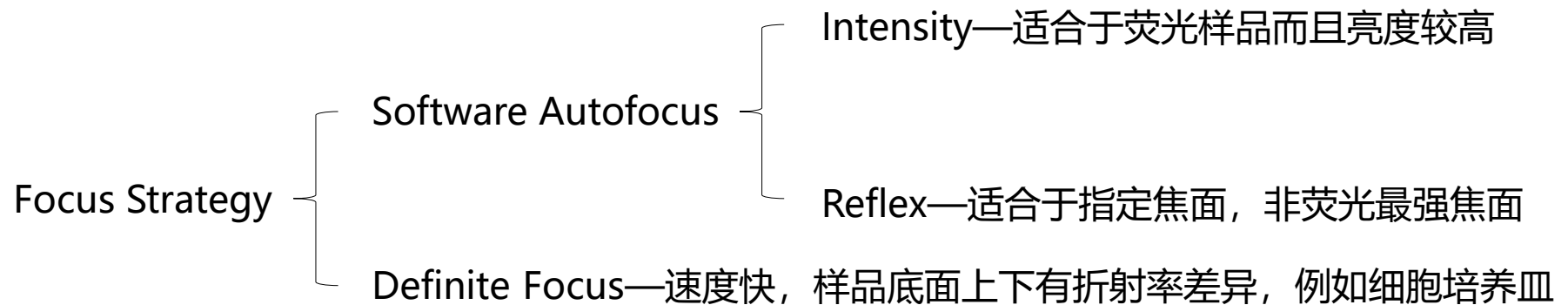
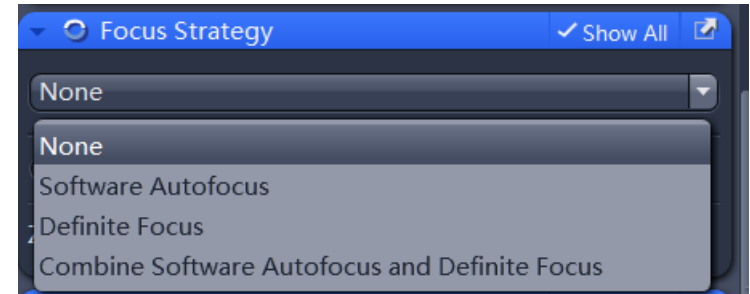


- 1、选择 “Time Series” ；
- 2、拍摄要持续的时间，如循环数cycles或者其他具体时间；
- 3、循环之间的间隔Interval；
interval：两次循环开始时间的间隔，因此interval包含了上一个循环的拍摄时间；
- 4、“Start Experiment”

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。



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：

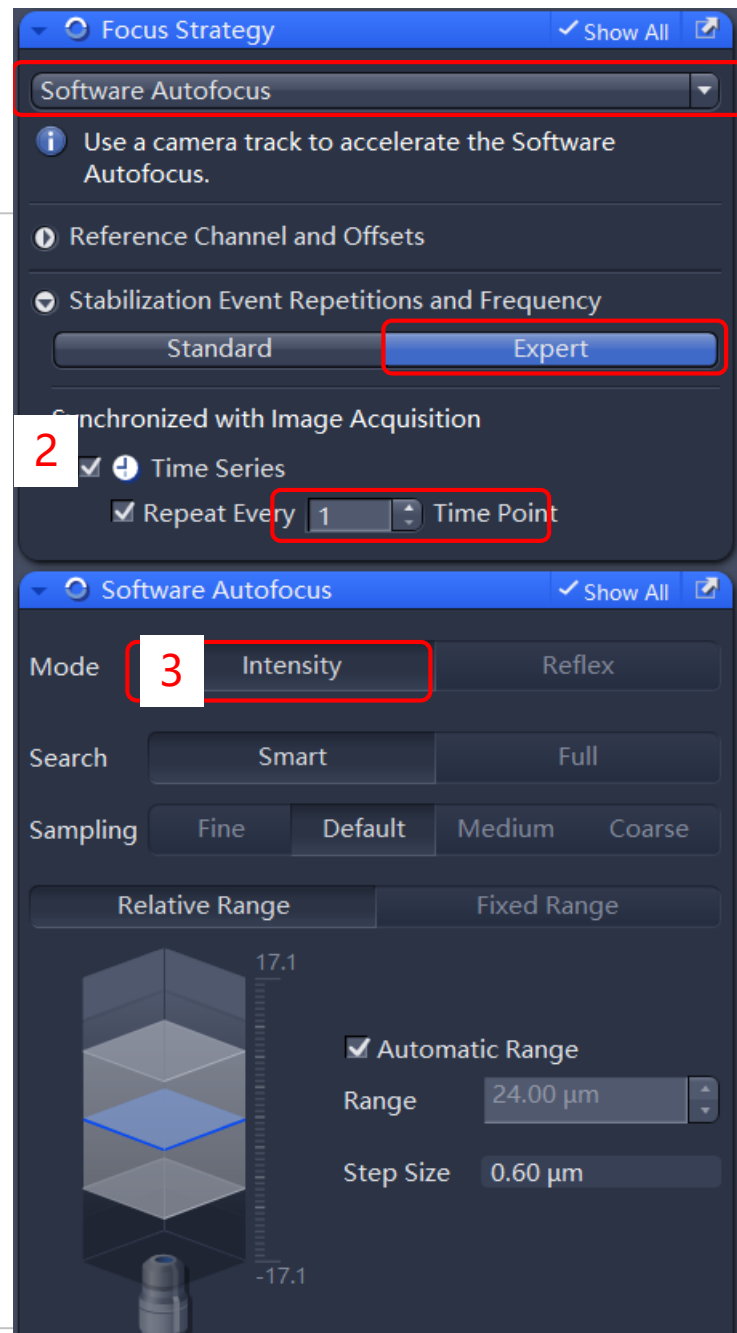
1、选择 “Software Autofocus” ；

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。

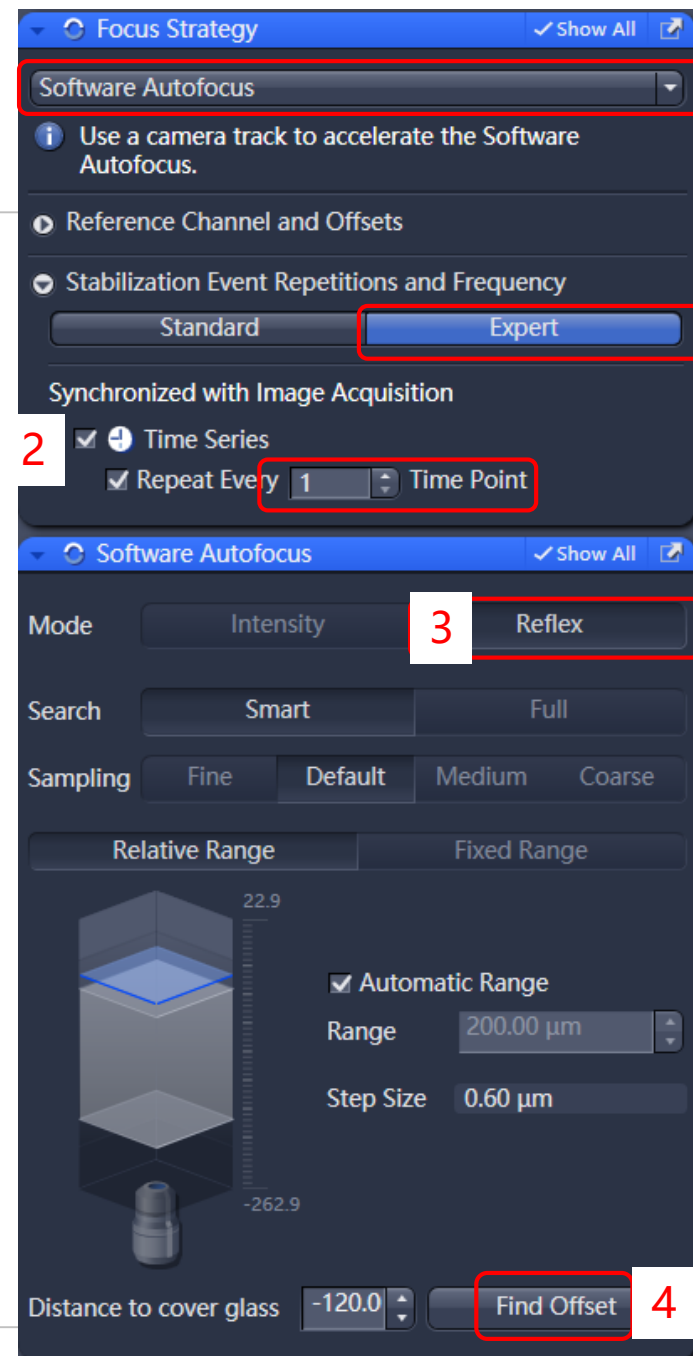


Time Series image autofocus

Software Autofocus Reflex

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：

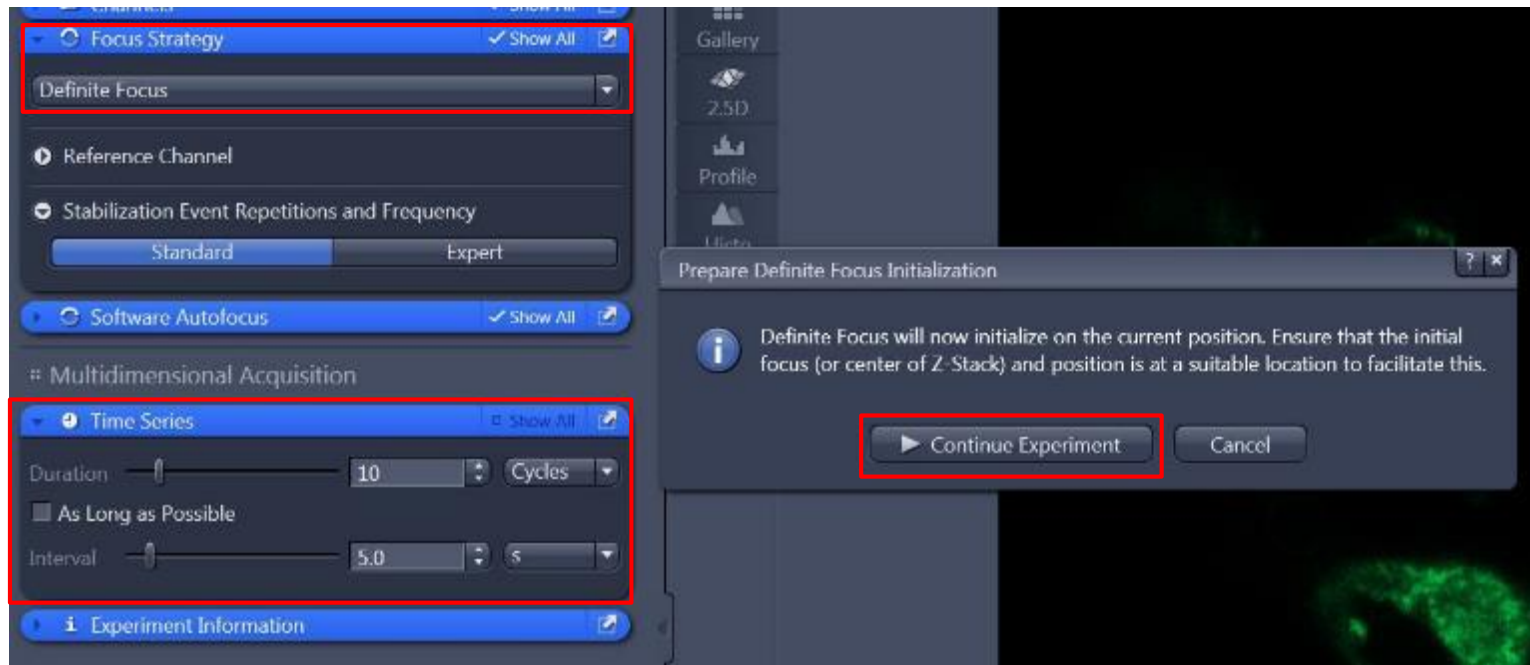
- 1、预览找到想保持的焦面位置后，选择“Software Autofocus”；
- 2、选择适合的自动对焦频率；
- 3、选择“Reflex”对焦模式；
- 4、单击“Find Offset”等待自动测量介质表面到样品的距离；
- 5、等待测量结束后，“Distance to cover glass”后的数据会更新。
- 6、单击“Start Experiment”开始time series试验。



Time Series image autofocus



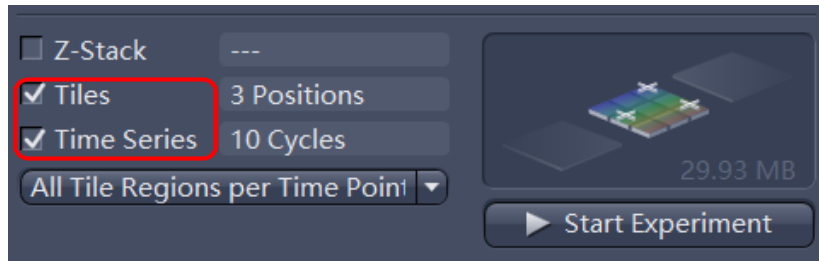
Definite Focus



使用Definite Focus来稳定焦距：

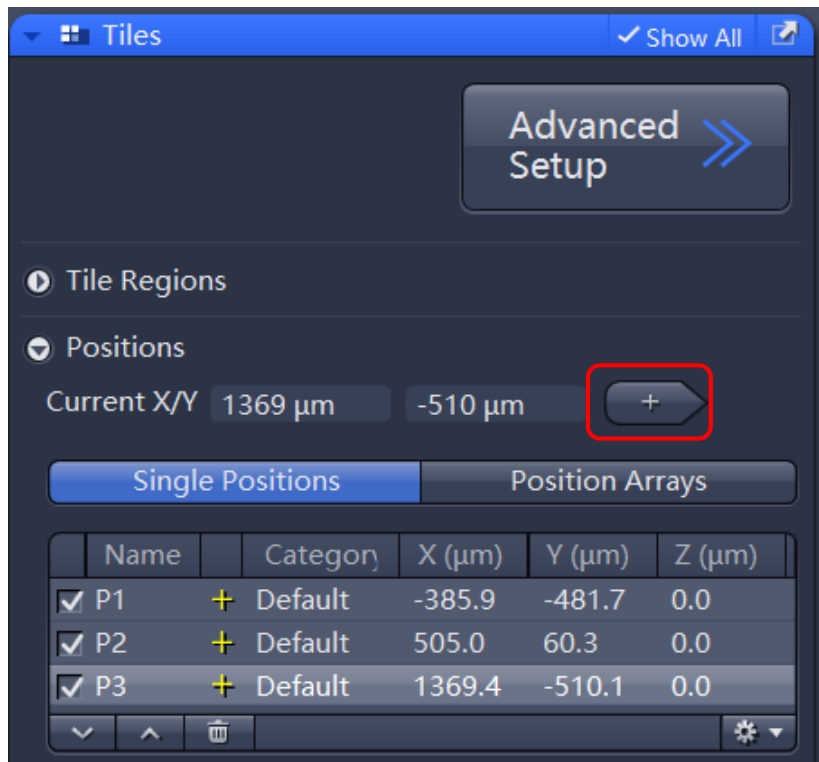
1. 预览下找到需要稳定的焦面位置，
2. 在“Focus Strategy”里选择“Definite Focus”，
3. 点击“Start Experiment”后选择“Continus Experiment”。

Time Series image with Multi-positions

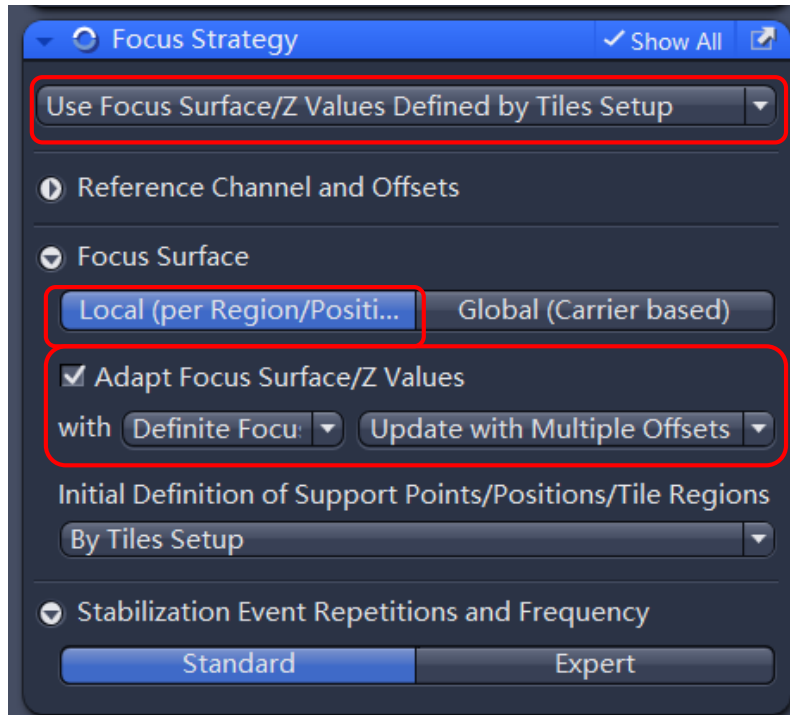


对多个位置进行时间采集时，可以获得更多的数据。需要结合“Time Series”和“Tiles”中的“Positon”功能：

- 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；



Time Series image with Multi-positions



4、为保证长时间拍摄焦面稳定，按照左图设置
“Focus Strategy”

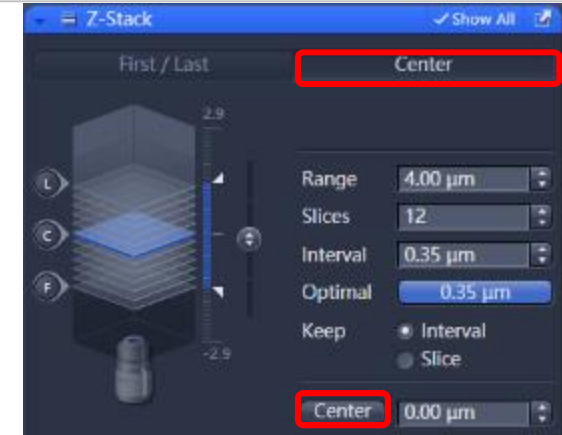
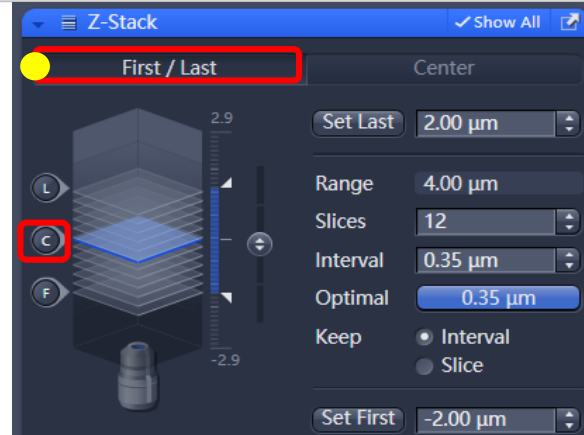
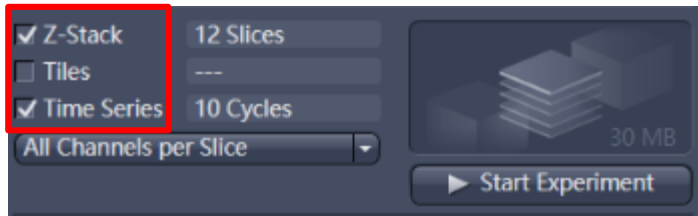
*需要具有Definite Focus 2

5、“Start Experiment”

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

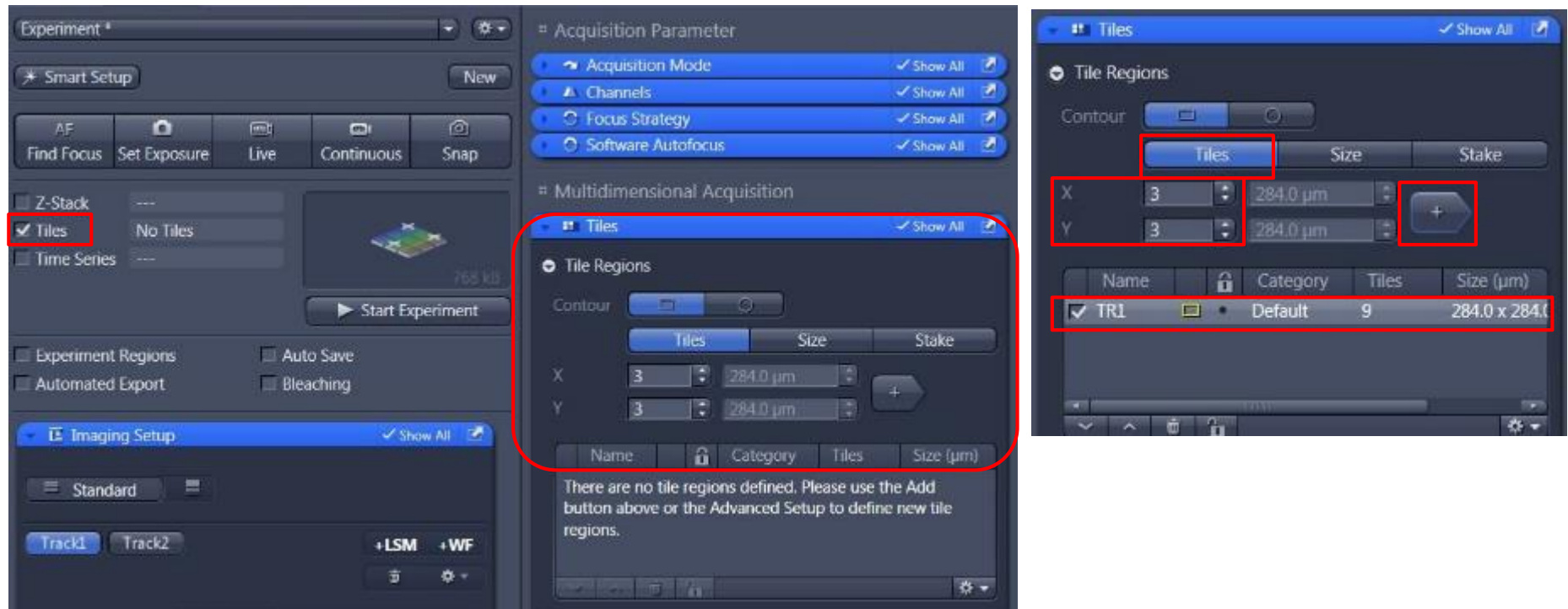
“Center” 确定现在的位置是z-stack成像的中间位置，并按照 “Center” 模式开始拍摄。

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”

- 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

Tile Scan

Tiles



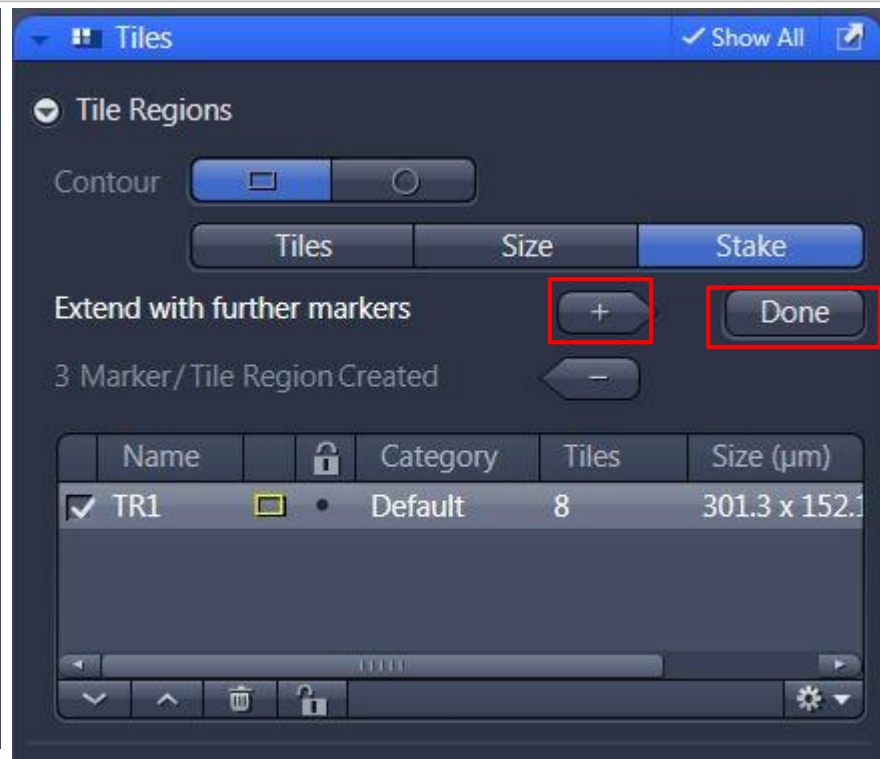
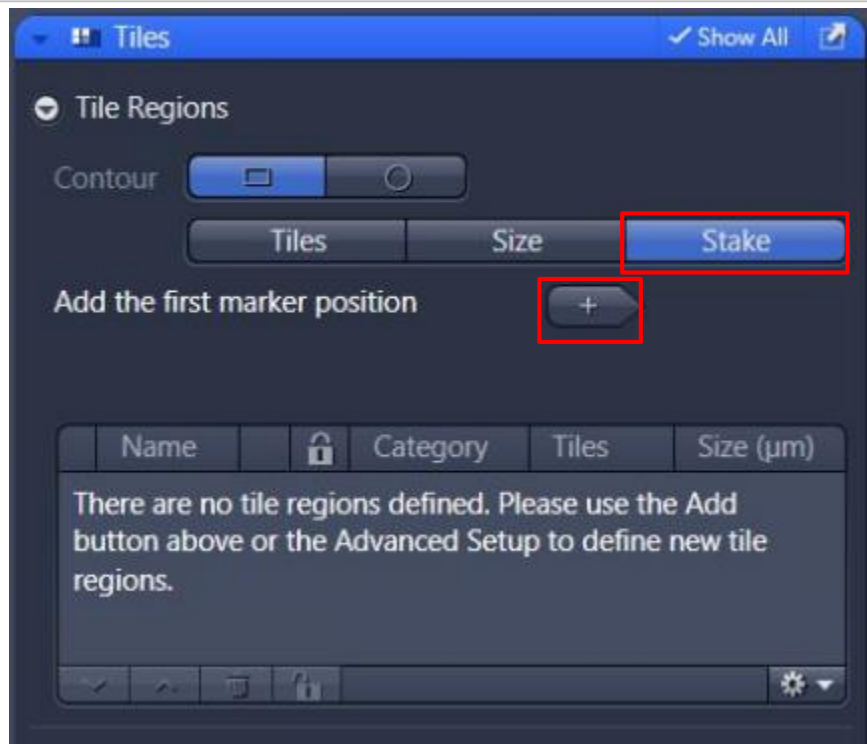
在“Tiles”模块下“Tiles”方法代表以现在视野为中心拍摄拼图，

- 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

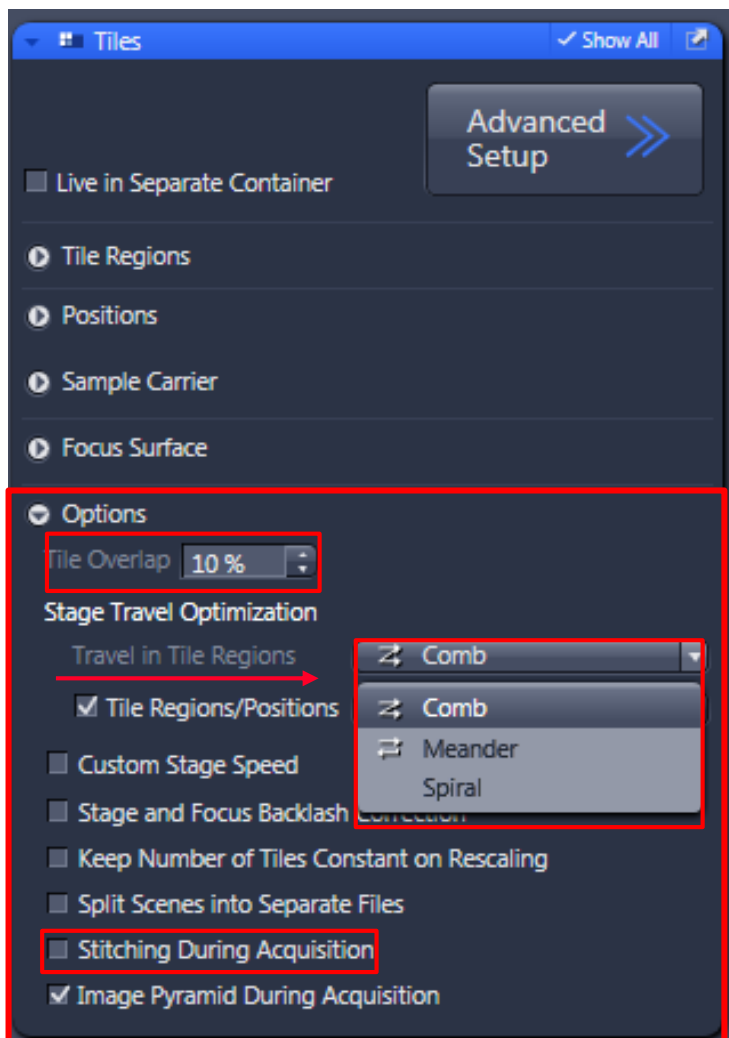


“Stake” 方法能够通过定义拼图边缘自动计算拼图大小，完成拼图：

- 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” 。

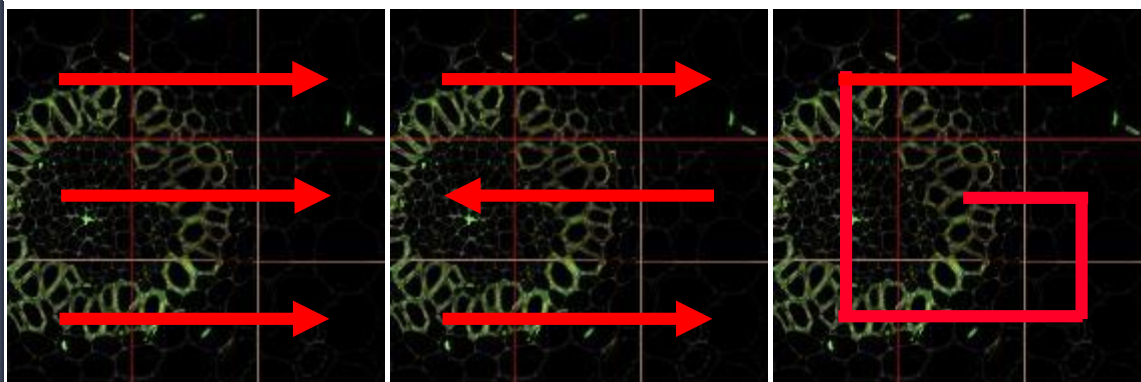
Tile Scan

Option



“Option” 中几个关键参数：

- 1、“Tile Overlap” 代表图片边缘互相重叠百分比，一般默认10%；
- 2、“Travel in Tile Regions” 代表拼图时的方向：
“Comb”：单方向拼图；“Meander”：双向拼图；
“Spiral”：螺旋形从中向外拼图。



Comb

Meander

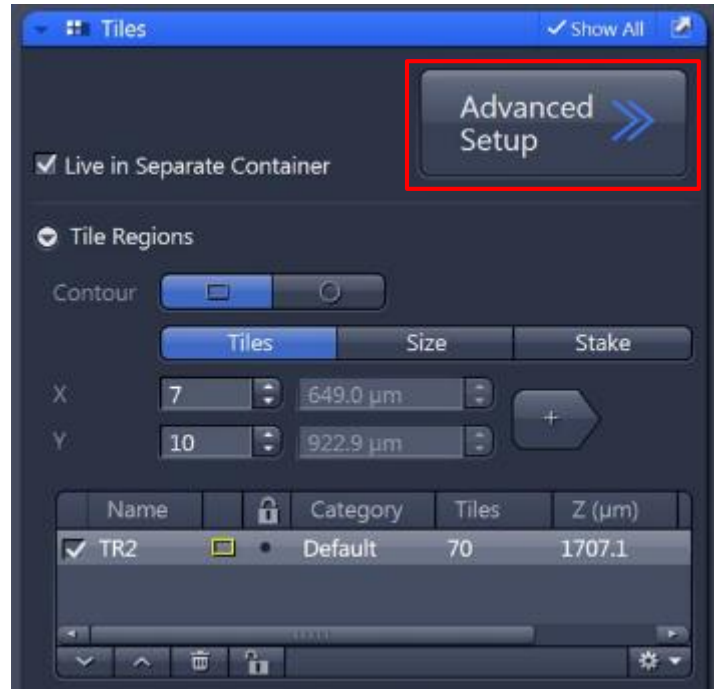
Spiral

- 3、“Stitching During Acquisition” 在拼图后自动拼接，消除拼图中的接缝。

Tile Scan



Advanced Setup

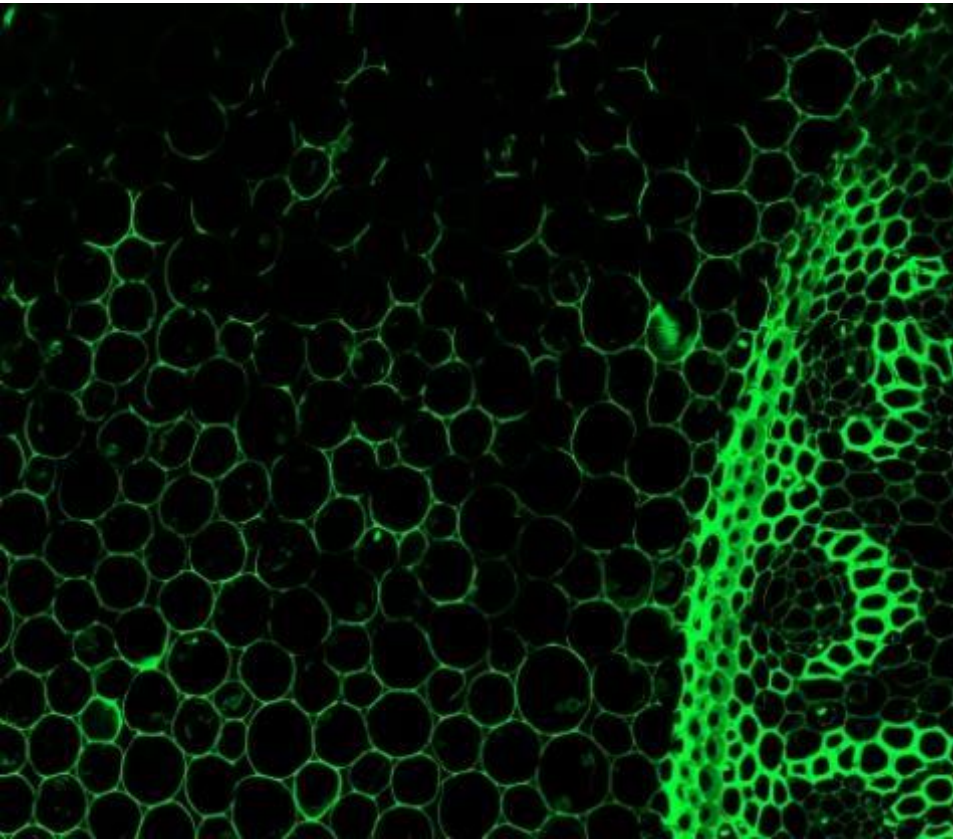


高级拼图功能主要包括两个部分：

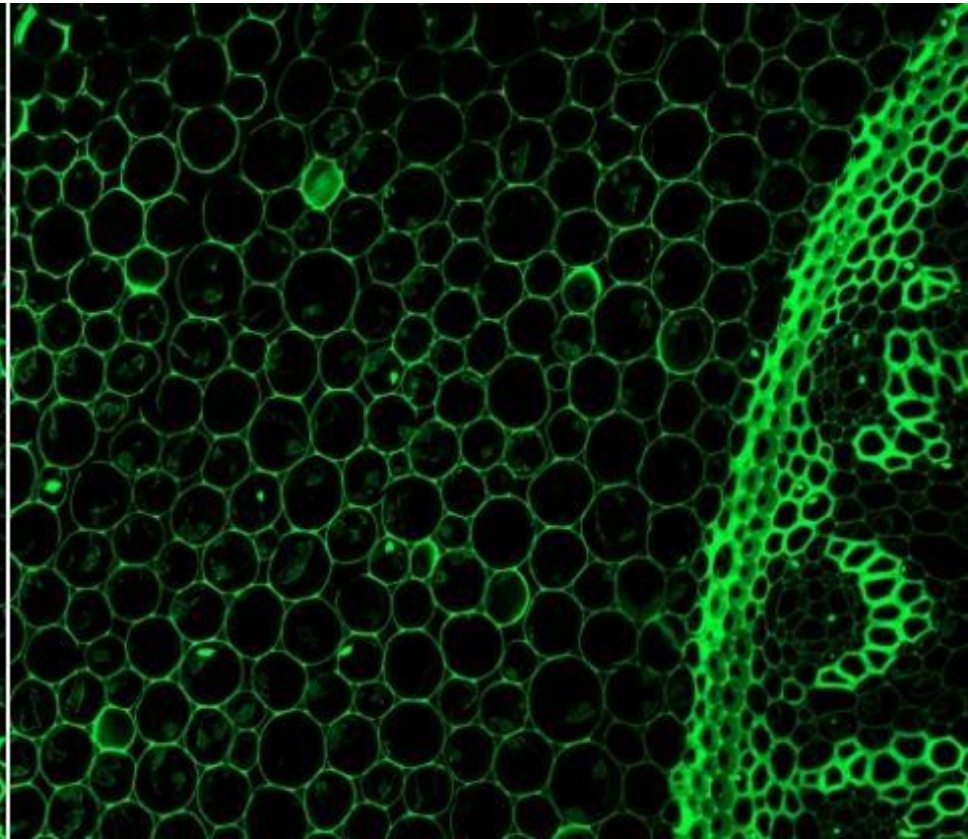
- 1、可以通过拼图前分析拼图区域的焦距变化，有利于校正拼图不同焦距的问题（support point）；
- 2、如果同时配置有CCD，可以通过CCD的快速成像来获取预扫图像，辅助拼图区域的选择（preview scan）

Tile Scan

Advanced Setup



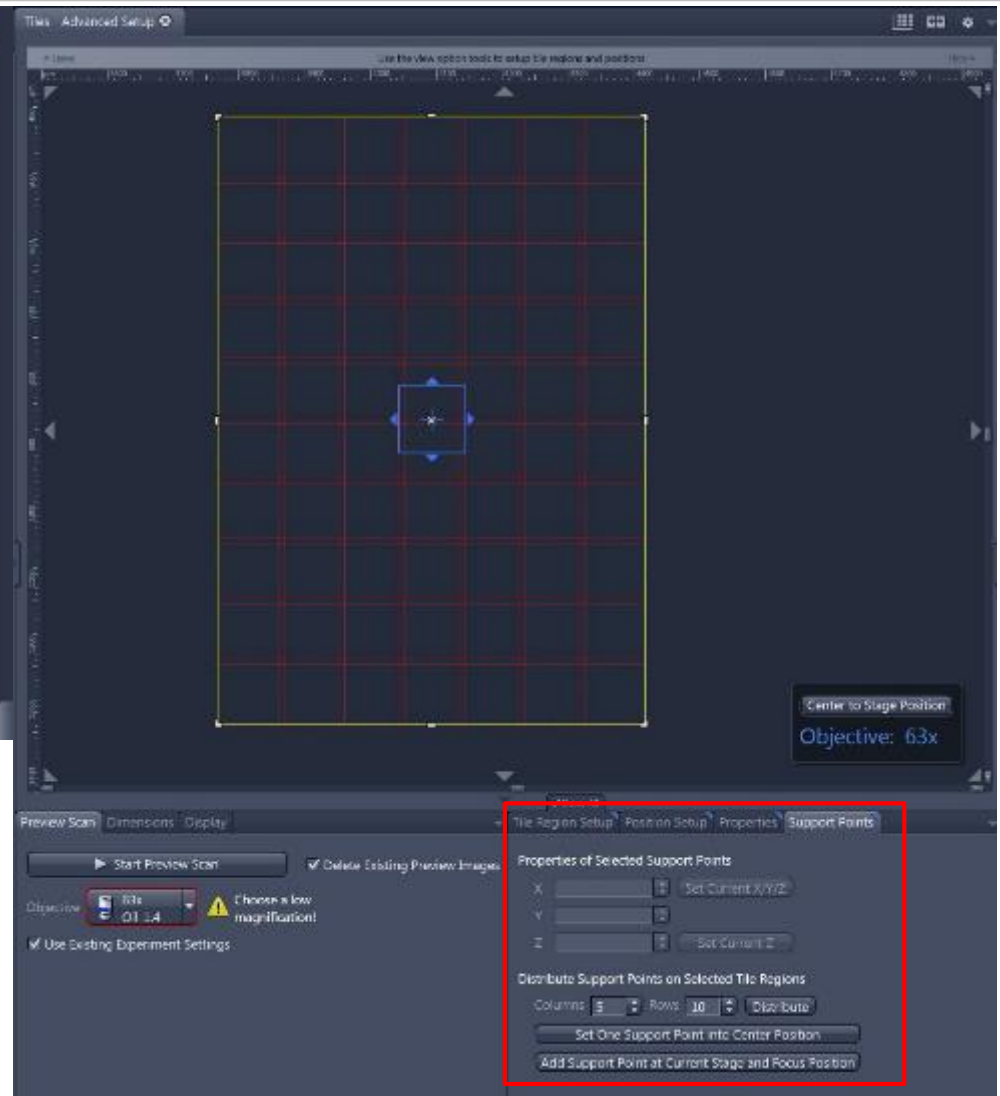
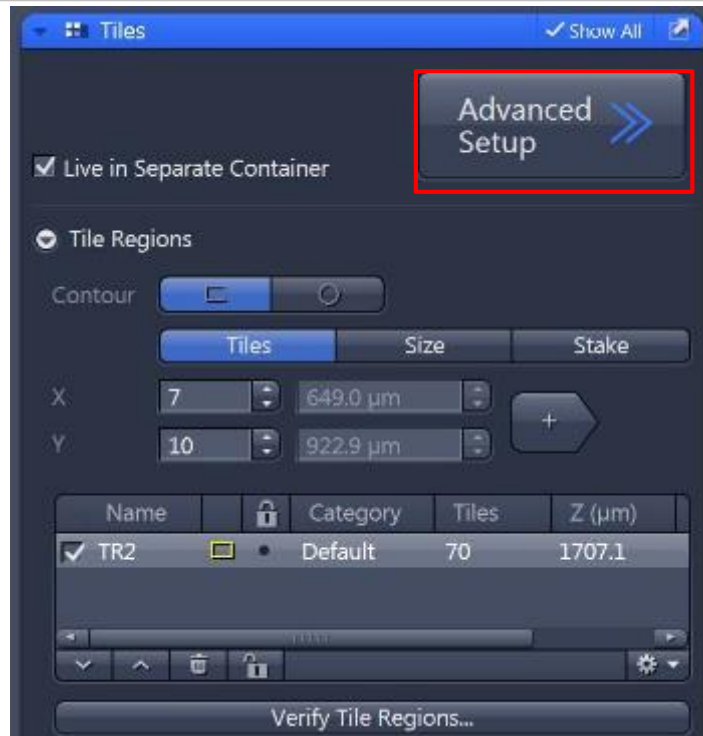
Without support point



Manual support point

Tile Scan

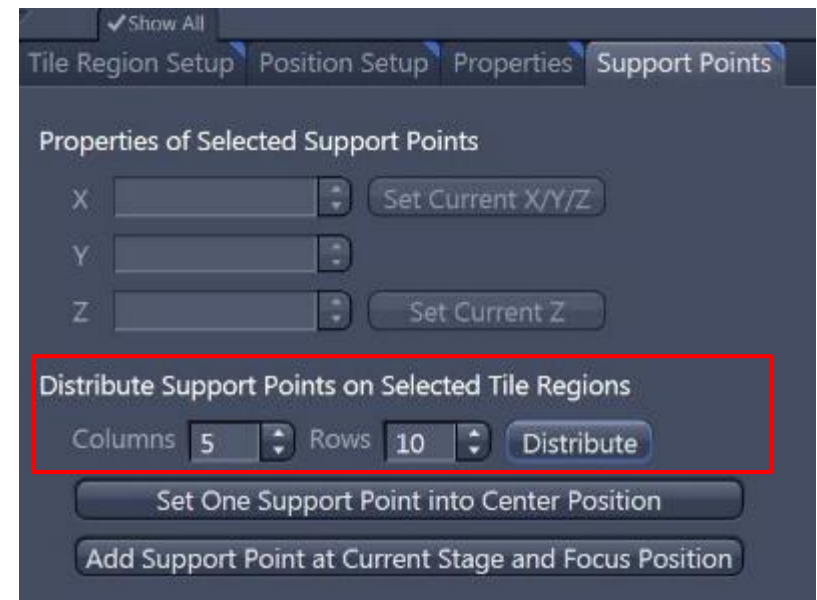
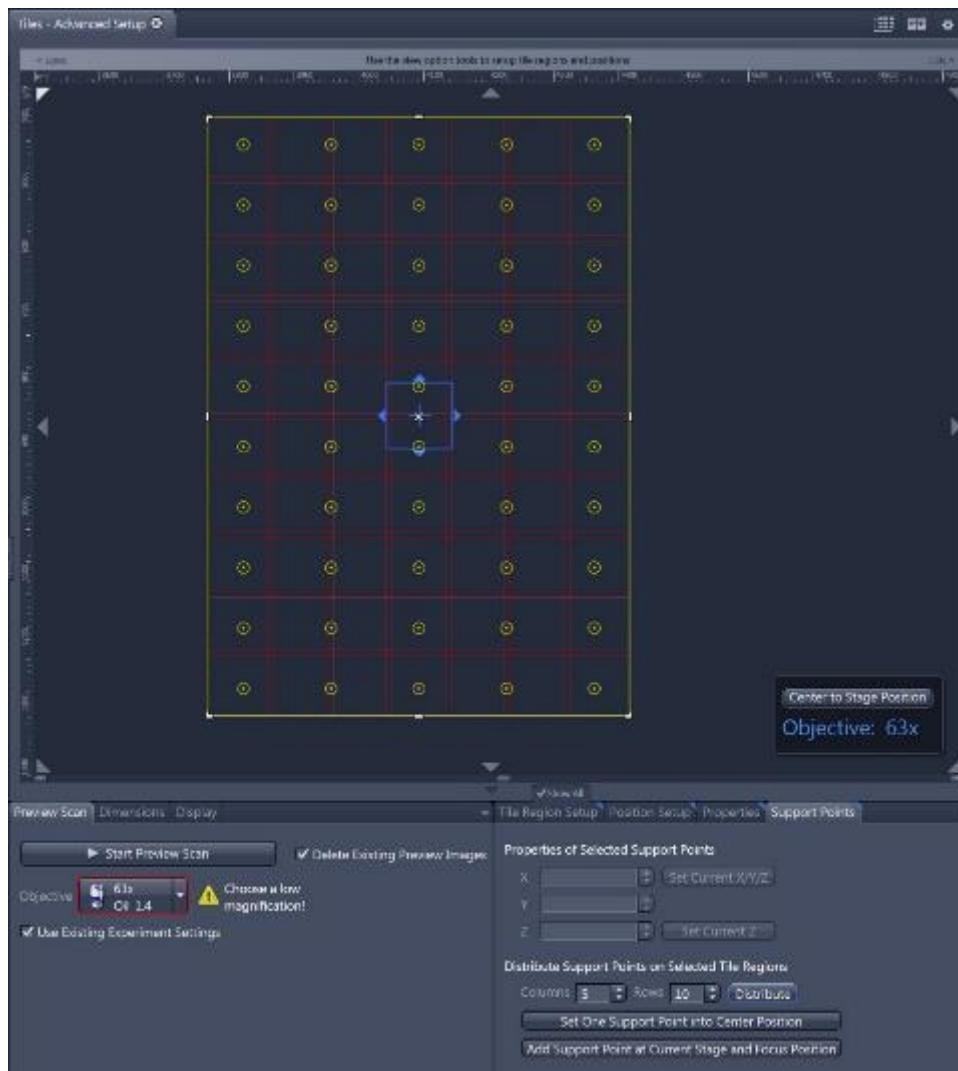
Focus Surface



1、建立好拼图范围后选择“Advanced Setup”，在右侧看见扫描区域，并进入下方选项“Support Points”

Tile Scan

Support Point

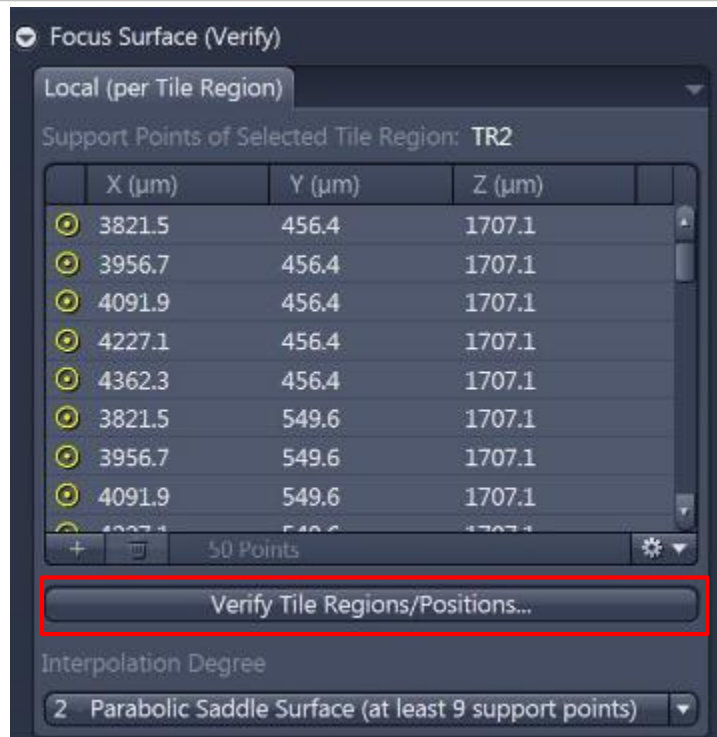


2、在“Support Points”选项下选择支持点，这些支持点将帮助你确定拼图区域内的焦距变化；

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。

Tile Scan

Verify Support Points



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：
- 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；
 - Autofocus (AF) 软件自动对焦，通过软件计算的方法找到最佳焦距；
 - 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



Autofocus Verify Support Points

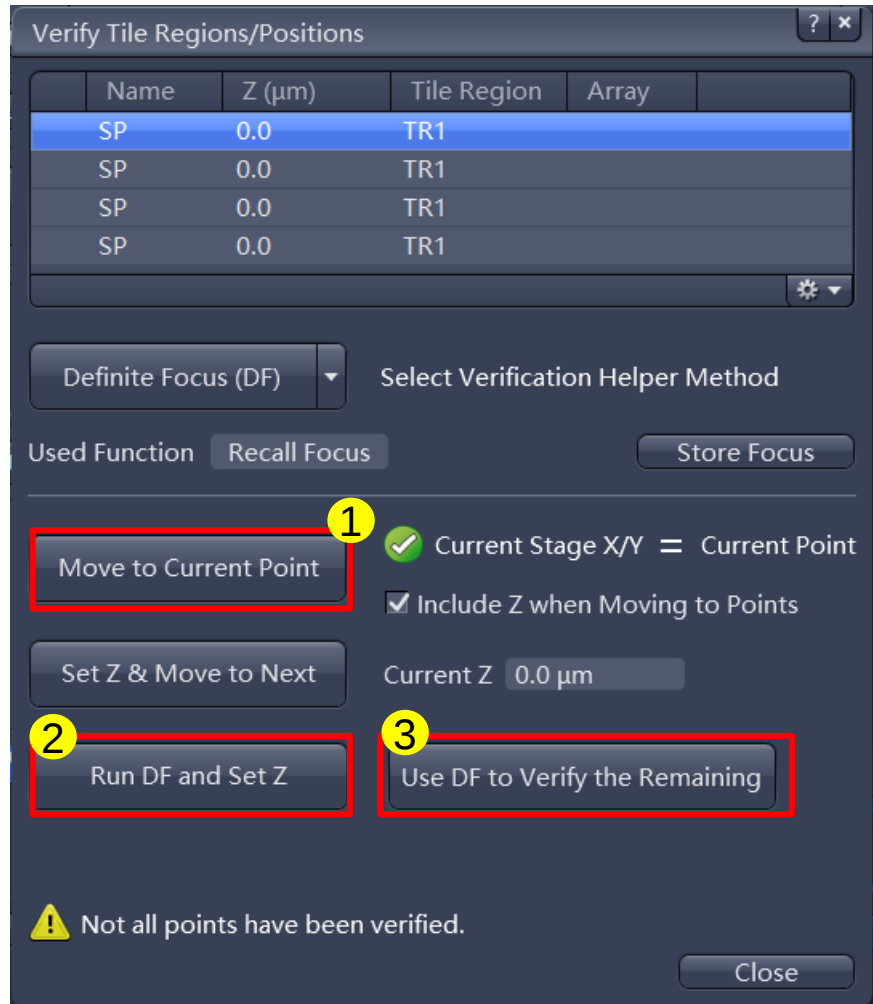


5、选择AF校正方法后选择 “Use AF to Verify the Remaining” ，软件会自动对所有Support Points进行焦距校正；

Tile Scan



Definite Focus Verify Support Points



6、选择DF校正方法后，

① 选择第一个“Support Point”点，点击
“Move to Current Point”；

② 选择“Run DF and Set Z”，等待Definite
Focus校正结果；

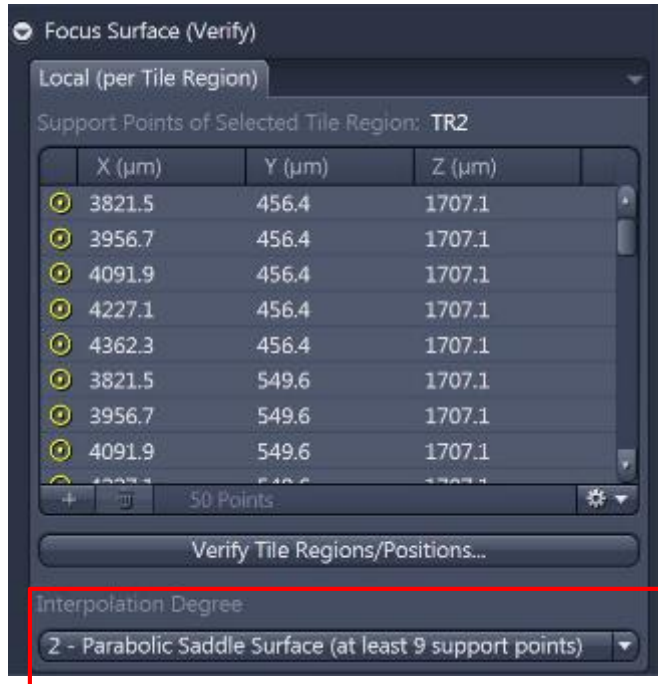
③ 最后选择“Use DF to Verify the
Remaining”，软件会自动对所有Support
Points进行焦距校正。

当校正SP结束后，选择“Close”关闭Verify窗
□

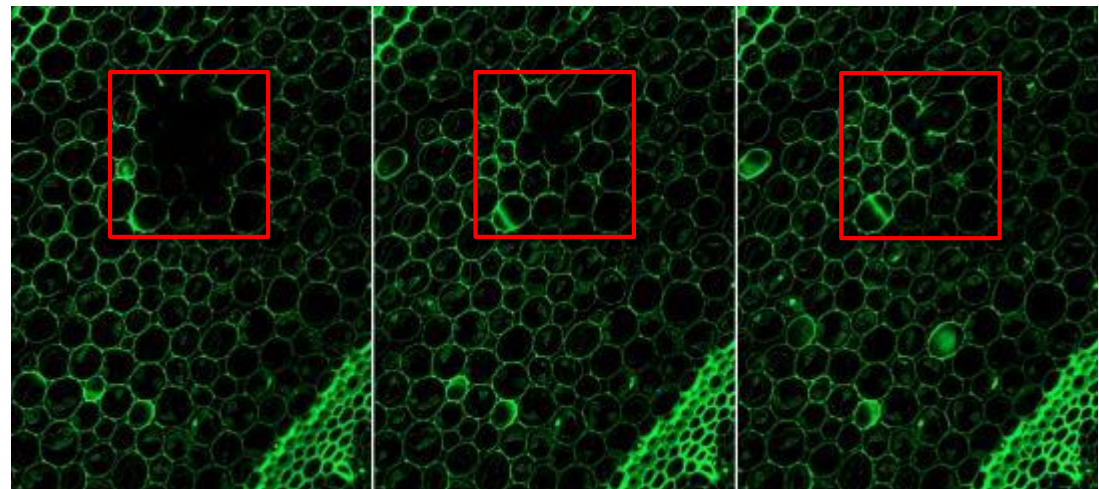
Tile Scan



Definite Focus Verify Support Points



7、校正所有SP后，选择适合的“Interpolation Degree”；样品表面越不平整需要Interpolation Degree越高，选择的SP数量超过Interpolation Degree需要的最小值可以增加计算的可靠程度。



One SP

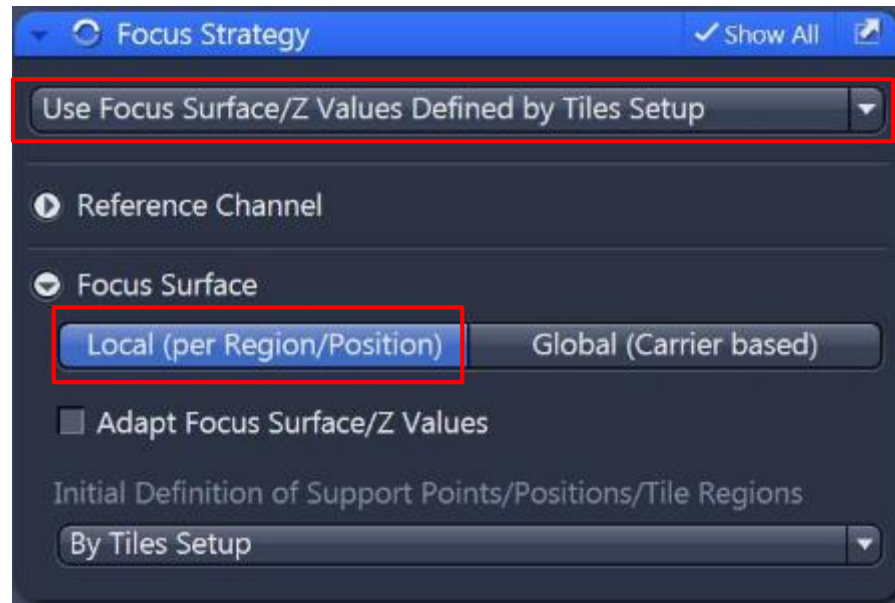
4 SP

22 SP

Tile Scan



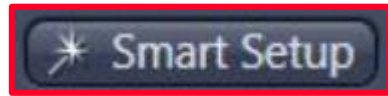
Definite Focus Verify Support Points



- 8、随后在 “Focus Strategy” 工具栏中确定如上图所示选项：对焦方法为 “Use Focus Surface/Z Values Defined by Tiles Setup” ， Focus Surface的方法为 “Local （per Region/Position）” ；
- 9、上述设置结束后，点击 “Start Experiment” 拼图

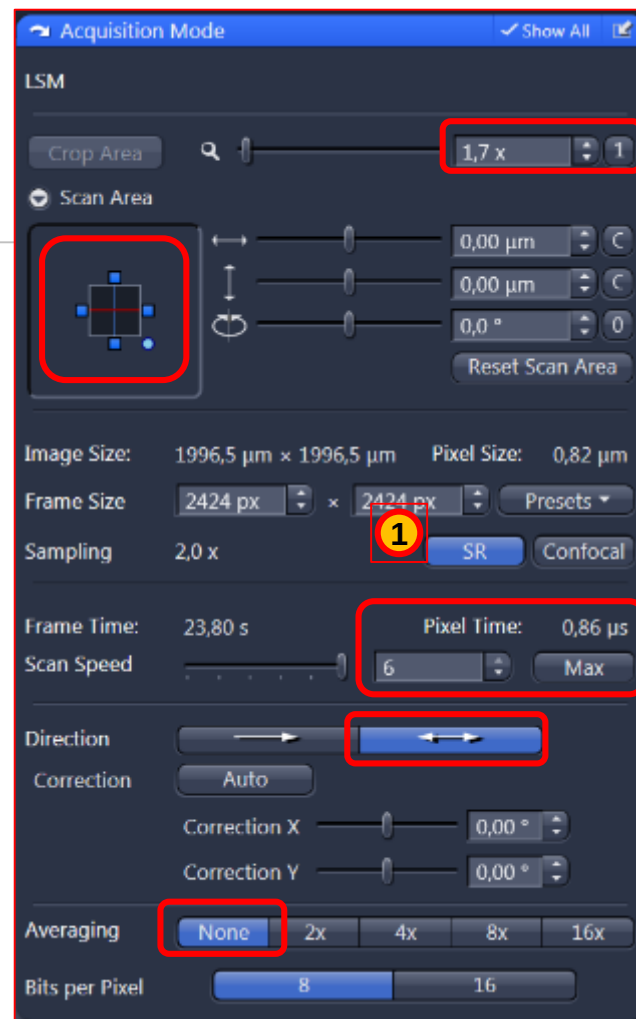
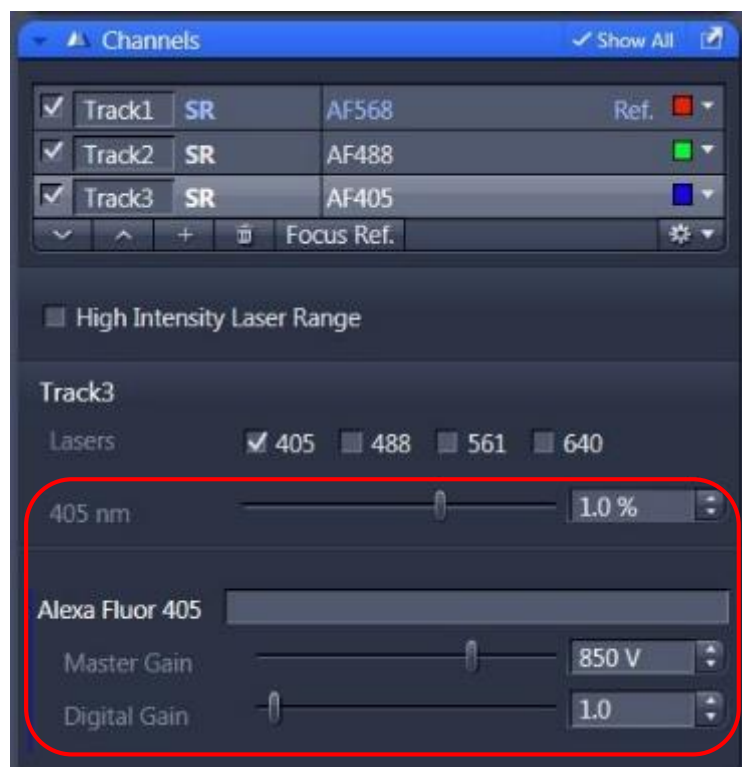
- 1 Startup and Shutdown of the System
- 2 Acquiring Multi-Channel images
- 3 Z-stack image
- 4 Time Series image
- 5 Tile Scan
- 6 Airyscan Imaging

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合适的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

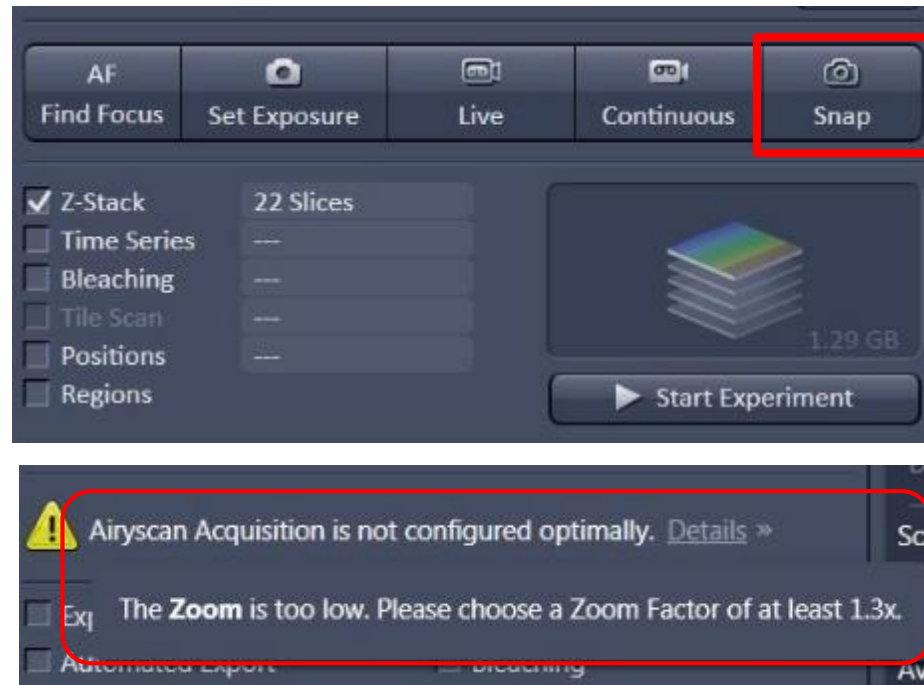


5. 设置激光大小 “Laser” , 检测器 “Master Gain” 和 “Digital Gain”

*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1.7, 双向扫描, “Averaging” 选择 “None”

Airyscan SR mode



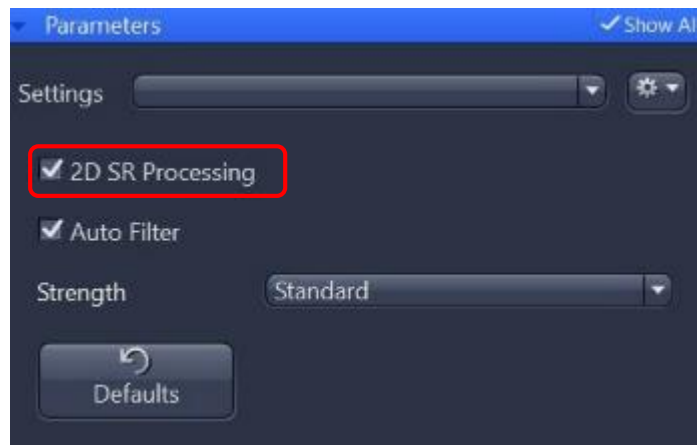
7. 如果有参数设置不能满足达到Airyscan 最高分辨率，软件会有相应提示，根据提示更改参数后可以二维图像拍摄（Snap）或者多维图像拍摄（Strat Experiment）

Airyscan SR mode

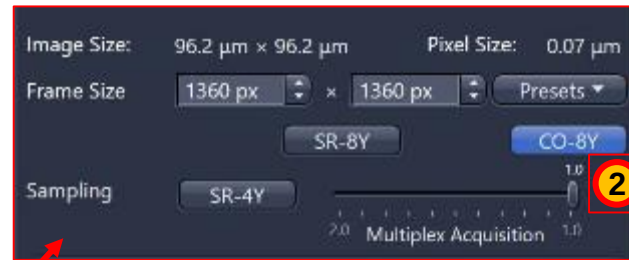
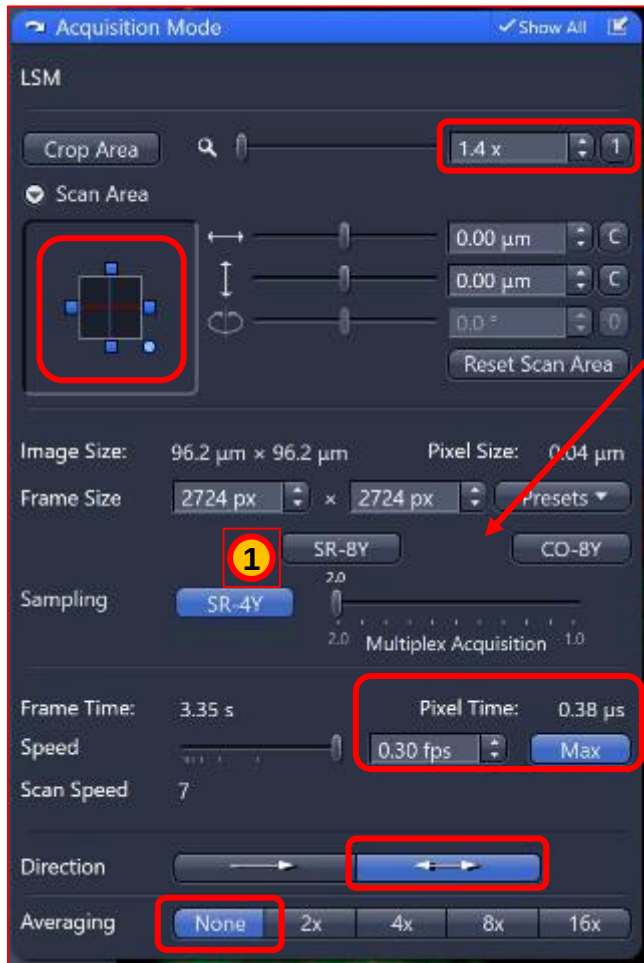


8. 按照 “Processing → Airyscan Processing → Input → Apply” 进行图像处理。

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-4Y and SR-8Y Mode



Airyscan的multiplex模式，例如4Y和8Y，通过smart setup设置后，其Crop Area不小于1.0，其他设置和Airyscan SR模式一样。

*如果选取Airyscan SR-4Y或SR-8Y，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-8Y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

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！

