

# LSM 510 META

## 簡易操作說明

## 1.開機

1.系統總電源

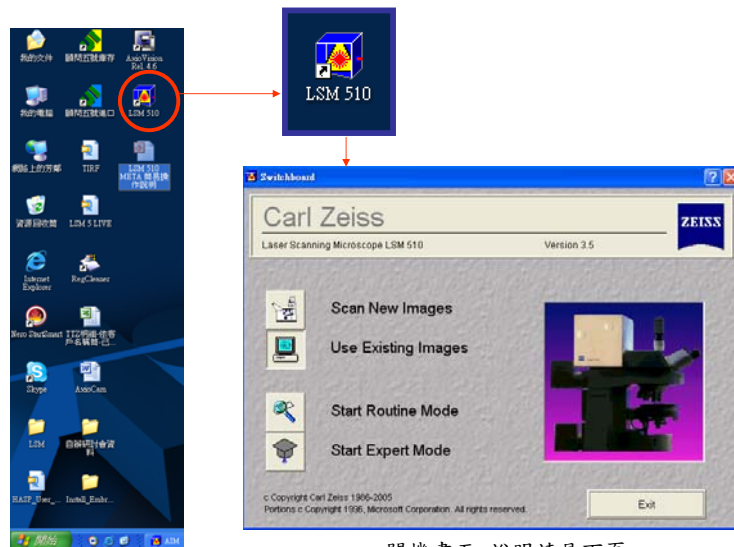
不要動

2.系統電腦及  
周邊電源

3.汞燈電源

4.電腦電源

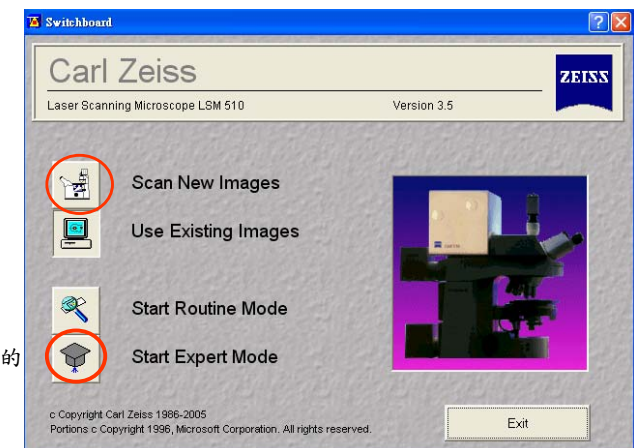
## 2.進入軟體



開機畫面,說明請見下頁

## 3.進入開機畫面

掃圖模式

選擇可彈性變化的  
掃圖模式

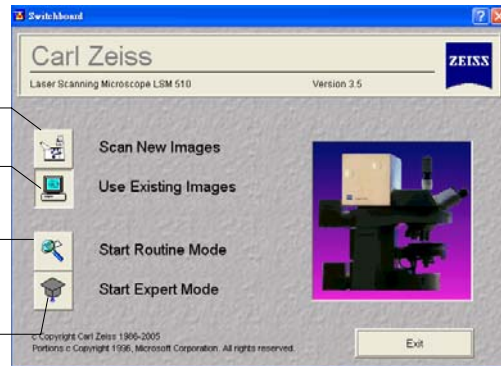
## 開機畫面說明

欲掃描擷取影像，電腦會與周邊系統做連結，方能操作機器掃描。

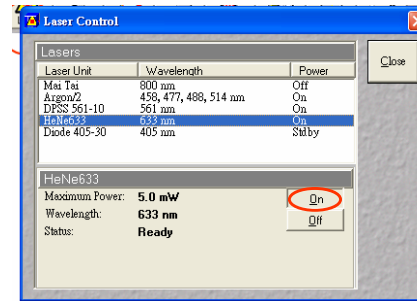
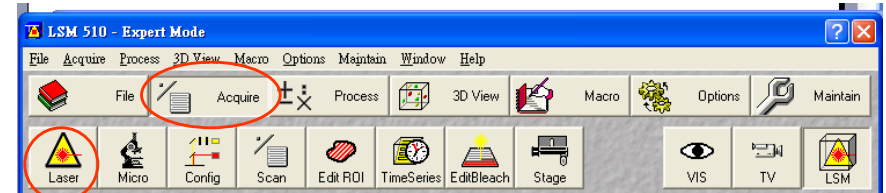
開啟、分析已存檔影像

使用已設定好的程序掃描，適用於個人化、固定不變的掃描工作。

可多樣變化的掃描模式，在此模式中所有掃描參數可隨時調整依情況而變動。適用於對系統操作稍微熟悉的使用者。

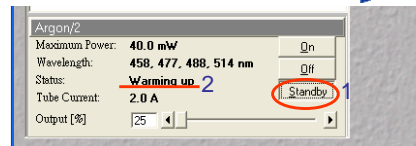
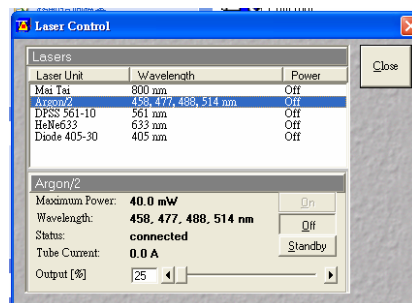


## 4.雷射開啟

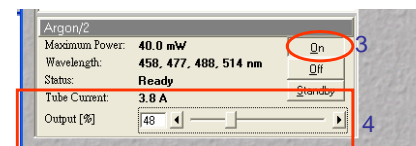


選擇需要的雷射進入,按下ON, Argon和Diode405則按standby, 請看下面兩頁說明

## 雷射開啟-Argon

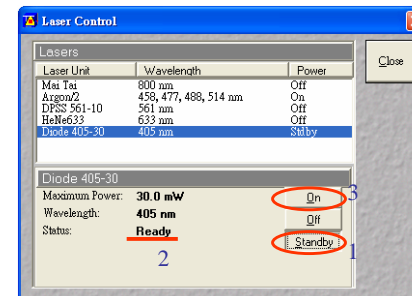


1. 按下standby之後 status會顯示warming up
2. 等待warming up顯示成Ready
3. 按下"ON"



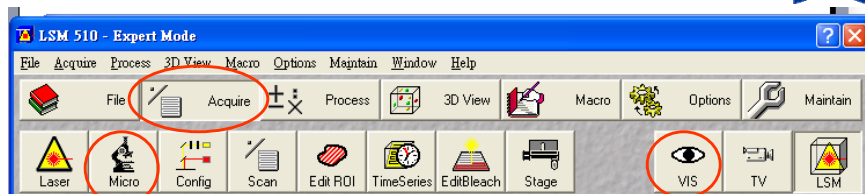
4. 拉動Output%, 調整上方Tube Current 至5~6 A

## 雷射開啟-Diode 405nm



1. 按下standby
2. status會顯示warming up, 等待顯示Ready
3. 按下On

## 5. 控制顯微鏡，於目鏡下找到樣品焦距



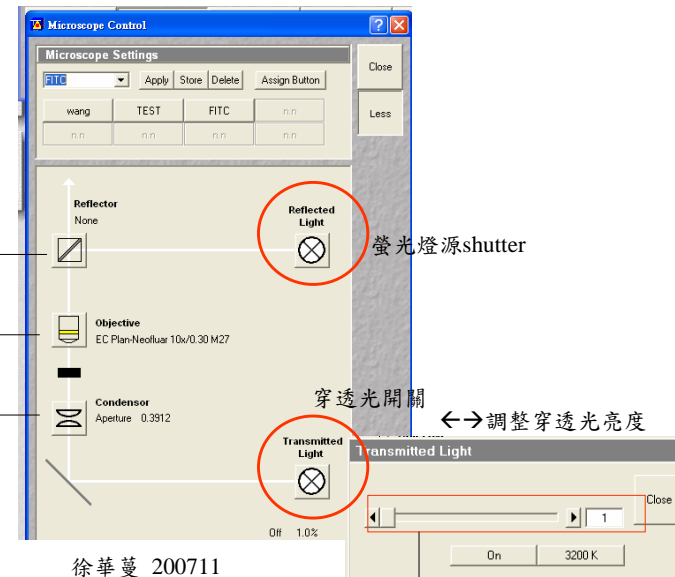
開啟控制顯微鏡控制頁面

以目鏡觀察標本

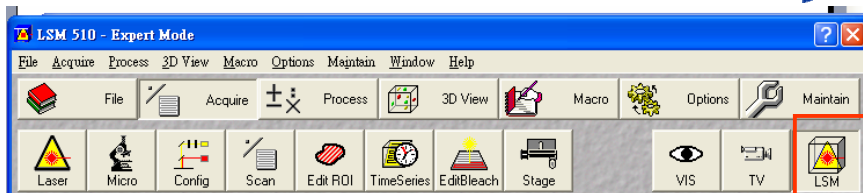
### VIS模式之下

將樣品放於載物台上，在顯微鏡上找到樣品focus。顯微鏡控制可直接於機身手動操作或者由軟體當中控制。顯微鏡控制與觀察模式切換請見下頁說明。

## 顯微鏡控制頁面說明



## 6. 切回LSM，準備開始掃圖



在目鏡下找到樣品焦距後，按下LSM，準備開始掃圖。  
觀察模式切換請見下節“掃圖前之說明-觀察模式切換說明”

## 掃圖前之說明



## Acquire 選單畫面說明



目的要掃圖，所以進入掃圖控制頁面。  
掃圖工作程序：下方工作列大約由左至右。

雷射控制

顯微鏡控制

掃描區域框選

掃描參數設定，畫素、灰階度、雷射強度、掃描速度、感測器敏感度...等等。

Bleach設定，適用於 photo-manipulation.

掃描感測器及濾片的選擇

時間設定，可用於長時間訂時拍攝。

Z軸的控制頁面，有搭配 scanning stage則可控制XY軸。

台灣儀器行 徐華蔓 200711

13

## 觀察模式切換說明



以目鏡觀察標本。此模式之下方能於目鏡用肉眼觀察到樣品。

若有加裝AxioCam於顯微鏡上，可啟用此功能。相機模式，於此模式之下方能利用相機擷取影像，於電腦螢幕上看見影像。

LSM模式觀察標本，於此模式之下方能於電腦螢幕上看見影像。

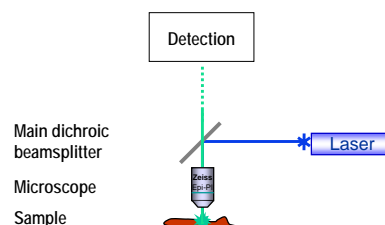
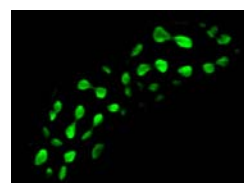
台灣儀器行 徐華蔓 200711

14

## 螢光訊號偵測策略原理說明 Single-track acquisition



可用於只偵測一種螢光訊號（見本頁圖示說明），或者同時開啟兩隻雷射兩隻感測器PMT，同時偵測兩種螢光訊號（見下頁圖示說明）。

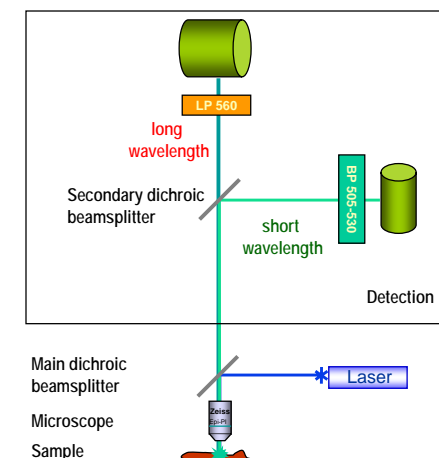
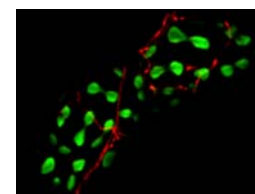


15

## Single-track acquisition



同時偵測兩種螢光訊號，來自於樣品的螢光訊號以 beamsplitter 將兩種不同的發散光區隔開來。



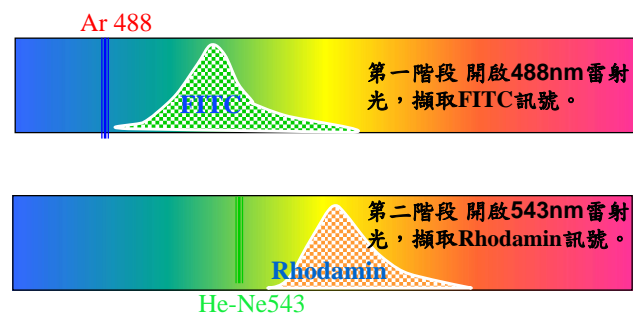
16



## 螢光訊號偵測策略原理說明

### Multi-track acquisition:

以FITC、Rhodamin為例：



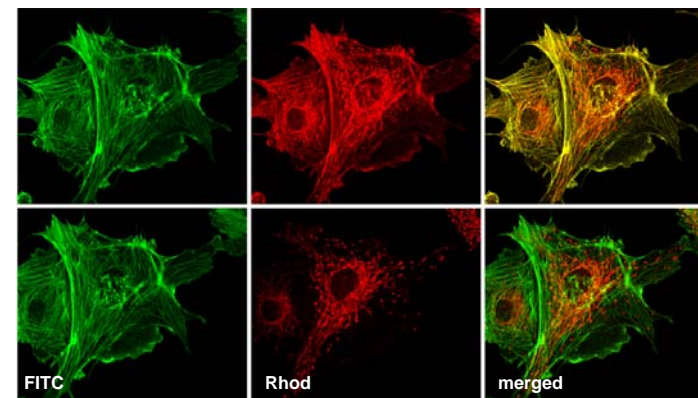
Multi-track acquisition為階段式順序掃描策略。由於順序性的每次只開啟一支雷射光開啟一支感測器，完成第一階段的擷取工作後才開啟第二階段的擷取工作，因此適用於避免螢光訊號漏溢（cross talk）造成表現誤判的情況。

## Avoid cross talking by multitracking

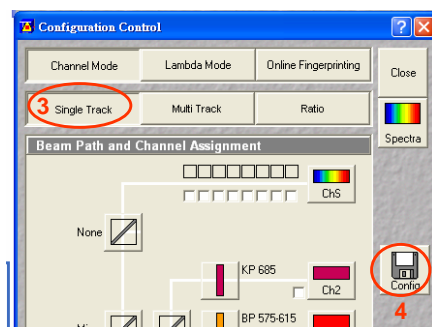
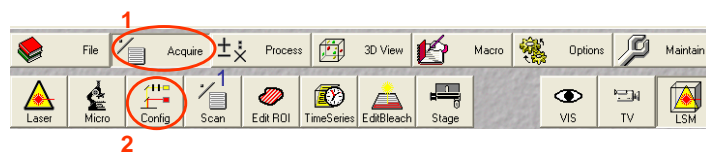
### Multitracking

- Effective elimination of emission crosstalk
- Improved signal/noise by using **long pass** - instead of band-detection

Simultaneous  
Single track



## 7.選擇掃圖方式及濾片位置-Single track

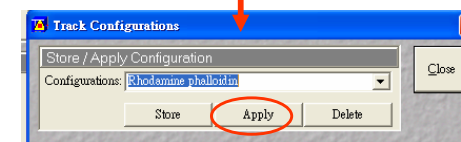
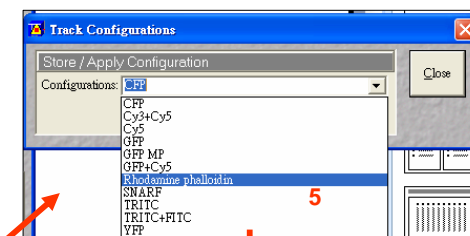


2.選擇config，進入configuration設定畫面

3.Single track

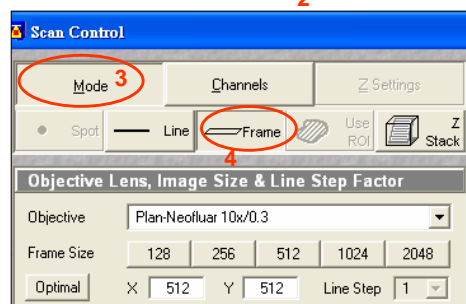
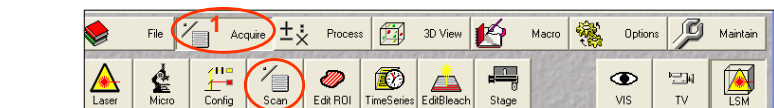
4.可以在此選單之下依照個人需求選擇各個位置的擺放，或者按下4選擇已經設定好的configuration。

## 續7.-Single track



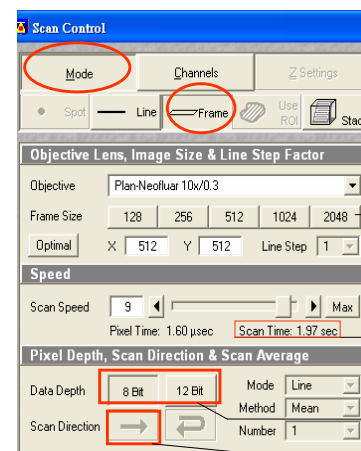
5,6 Config按下後下拉選單會出現已經設定好的configuration list，選擇一個合適的configuration，然後Apply

## 8. 掃描參數設定



2. 進入掃描參數設定畫面
- 3.4 mode模式，若是欲掃描的是XY 2D 影像選擇Frame

## 續8. 掃描參數設定



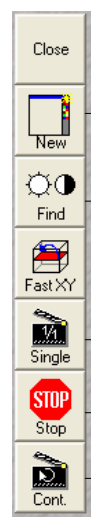
- 5 拍照前可做以下調整所需拍照條件

顯示目前物鏡，或者可由下拉選單換鏡頭  
選擇需要的畫素

調整掃圖速度  
顯示在此速度下掃一張圖所需要的時間

選擇要8bit影像或12bit影像  
選擇掃圖方向，一般選擇以單向掃圖

## 掃圖控制鍵功能說明



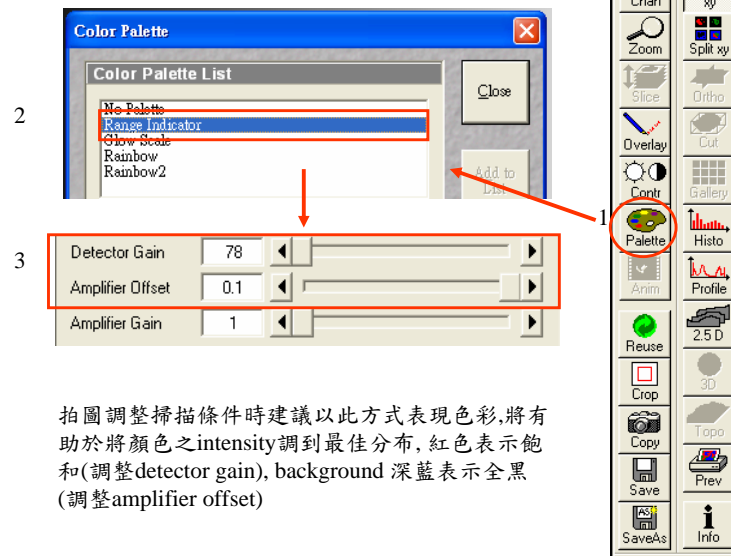
- 新增一張空白影像視窗 (可避免已經拍好但未存檔之影像被覆蓋)
- 快速自動預覽影像，電腦auto調一個粗略的條件拍下一張影像
- 以最快速度快速掃描影像影像，相當於快速預覽功能
- 依目前的拍照設定(影像畫素,掃描速度,detector強度...等等)拍一張影像
- 暫停掃圖
- Live即時影像

## 9. 擷取影像



- 1.進入channel ( Scan control→ channel )，調整拍照收影像訊號的channel設定
- 2.find 左方視窗會先看到粗略的預覽圖相
- 3.按下1 會自動調整到1 AU Pinhole大小
- 4.cont (continual)可以持續看到live影像
- 5.上排調整訊號強弱  
下排左拉可降低background  
調整時必須要在cont按下的情況下才能在視窗內看見live的調整情況，cont下持續太久易照成sample bleach
- 6.調整完畢後按下stop，暫停掃圖
- 7.Single 用調整好的條件拍一張影像

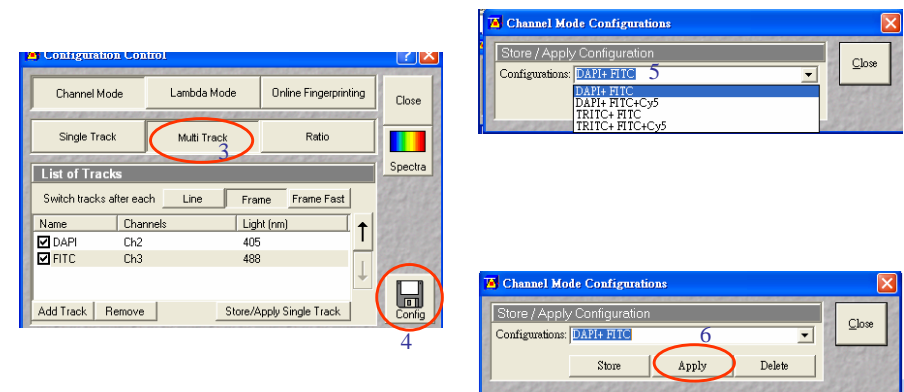
## 掃圖提示



拍圖調整掃描條件時建議以此方式表現色彩,將有助於將顏色之intensity調到最佳分布,紅色表示飽和(調整detector gain), background 深藍表示全黑(調整amplifier offset)

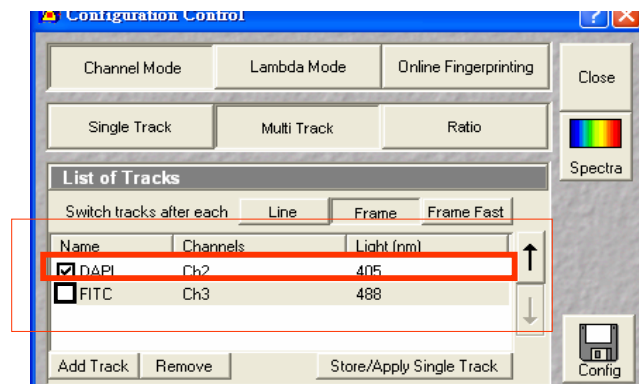
## 10. Multi track補充說明

### 選擇掃圖方式及濾片位置

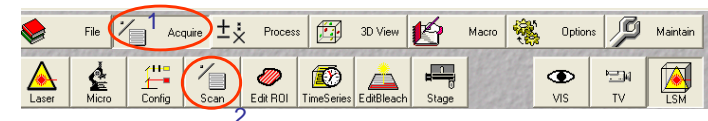


### Multi track掃圖前提示:

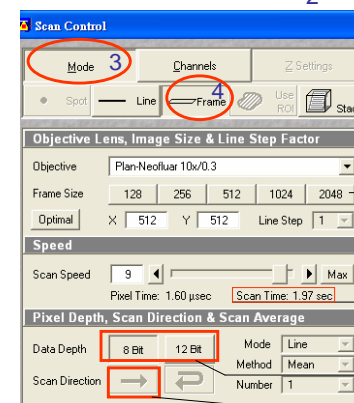
每一次只選擇一個track進行gain和 offset等....掃圖參數調整,要正式拍照時才同時勾選欲掃描的channel,調整好每一個track的掃圖參數時才將所有track勾選起來



## 續10. Multi track補充說明



### scanning設定



5 拍照前可以做以下調整所需拍照條件

顯示目前物鏡, 或者可由下拉選單換鏡頭  
選擇需要的畫素

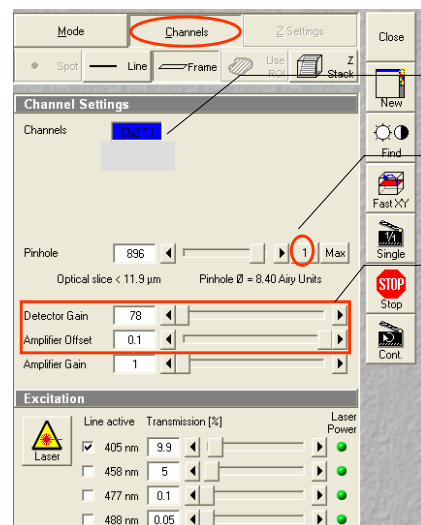
調整掃圖速度, 一般建議8以下

顯示在此速度下掃一張圖所需要的時間

選擇要8bit 影像或12bit影像

選擇掃圖方向, 一般選擇以單向掃圖

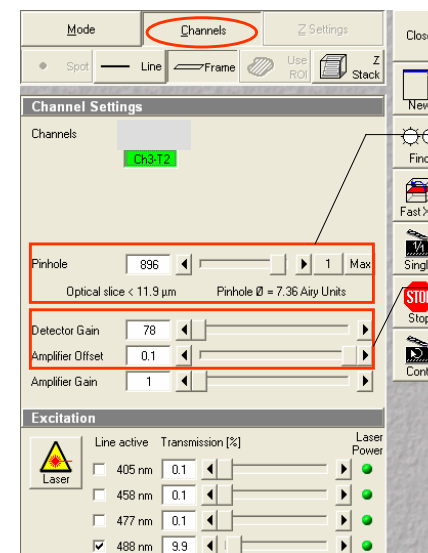
## 續10. Multi track補充說明



1. 進入channels
2. 再configuration中先選擇一個要調整的track, 見page27
3. 按下1 會自動調整到合適的Pinhole大小
4. cont (continual)可以持續看到live影像
5. 上排調整訊號強弱  
下排左拉可降低background  
調整時必須要在cont按下的情況下才能在視窗內看見live的調整情況, cont下持續太久易照成sample bleach
6. 調整完畢後按下stop, 暫停掃圖

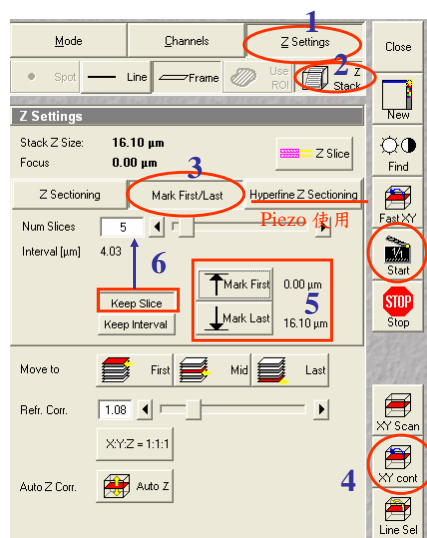
29

## 續10. Multi track補充說明



2. 於configuration頁面中, 選擇下一個track, 見page27
3. 按下1 自動調整Pinhole為1AU或者可將pinhole調整到與上一個channel差不多大小使得optical slice厚度相同
4. cont (continual)可以持續看到live影像
5. 上排調整訊號強弱  
下排左拉可降低background  
調整時必須要在cont按下的情況下才能在視窗內看見live的調整情況, cont下持續太久易照成sample bleach
6. 調整完畢後按下stop, 暫停掃圖
7. 於configuration頁面中, 勾選所有調好的track, 見page27
8. Single用調整好的條件拍一張影像

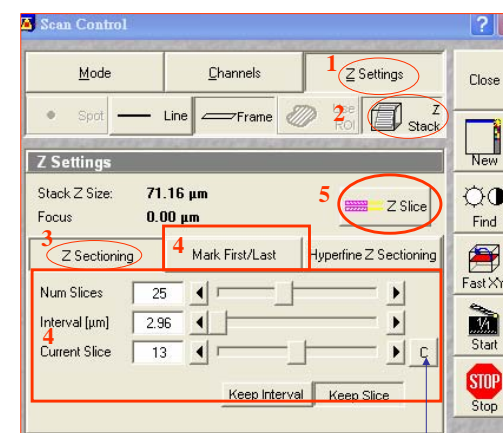
## 11. Z section



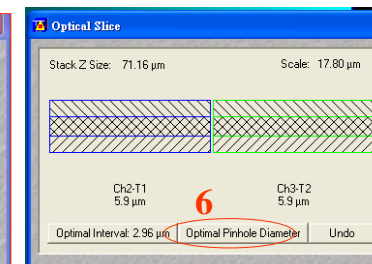
1. 進入Z setting
2. 進入Z stack
3. 進入 Mark First/Last
4. XY cont, live觀察
5. Cont 之下手動調整顯微鏡粗細調節輪找到觀察樣品厚度之最高點—按mark first 然後反方向轉動粗細調節輪找到欲觀察範圍的最底部—按mark last, 設定完畢後按stop, 避免樣品被bleach
6. keep slice 選擇在上面步驟選擇的厚度範圍之下想要拍幾張影像, 下行的interval會顯示每張圖片之間的z軸距離。
7. Start 開始執行Z section拍照

31

## 續11. Z section



以目前xy平面位置為z section之中心

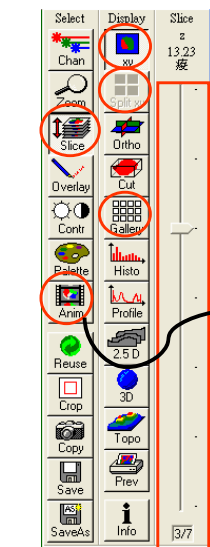


4. 利用4來設定z section厚度, 間距, slice數目
5. 拍兩個channel以上時請點入z slice
6. 將兩個channel的pinhole開口調整至相同大小, 如此可增加螢光表現位置co localize之準確性

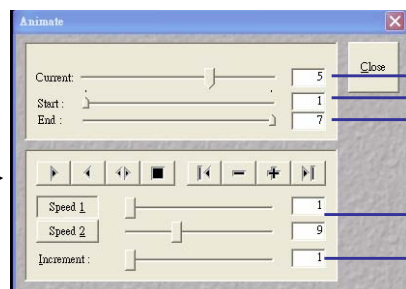
32



## 續11. Z section



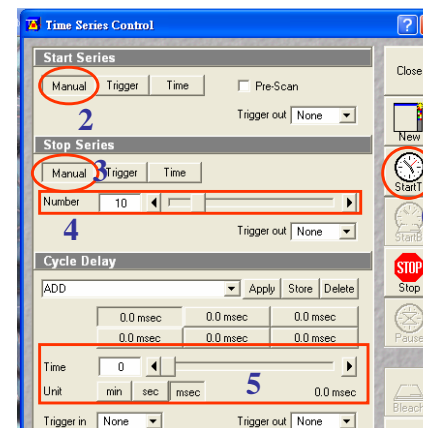
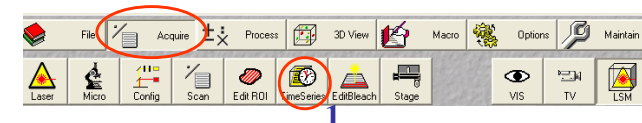
→ 可利用這些功能鍵來瀏覽已經拍完的Z section圖片



目前位置於第幾張  
起始張數  
結束張數  
播放速度  
每幾張影像播放一格

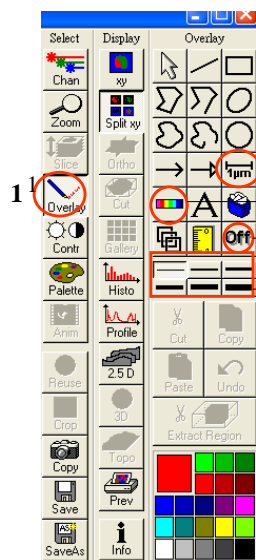
Anim可以將所拍下來的Z section以動畫影片來播放

## 12. Time series



1. Scan control調整完拍照條件進入time series
2. 選擇manual手動開始
3. 選擇manual手動結束time series
4. 選擇重複拍照次數
5. 調整每次拍照的時間間距, 並選擇時間單位
6. StartT開始拍照

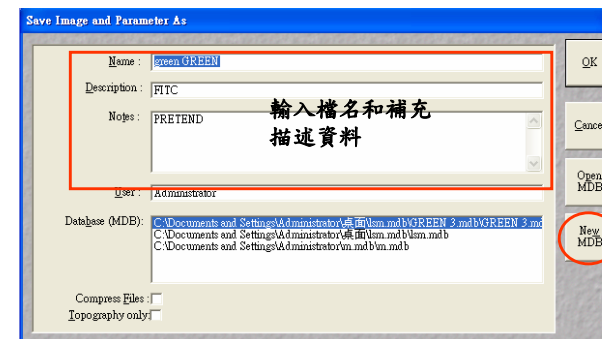
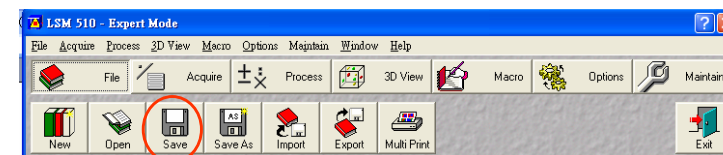
## 13. 加入尺規 ( Scale bar )



1. 更改尺規顏色
2. 選示或不顯示尺規
3. 可選擇線條樣式

1. 進入overlay
2. 選擇尺規
3. 到圖片視窗拉出適當長度之scale bar

## 14. 存檔—整個存下來

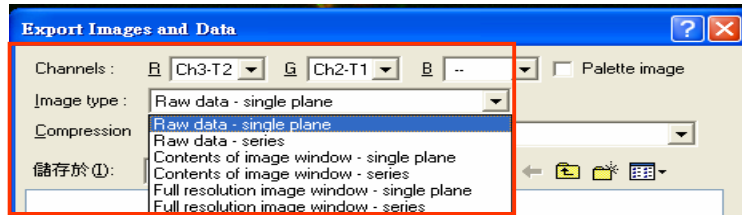
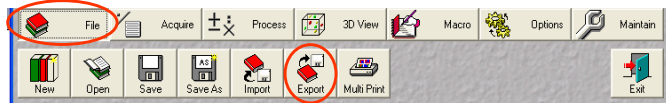


選擇一個現有的或者  
Create NEW MDB為存檔  
目的地

## 續14.存檔—只存下圖片檔或者影片

ZEISS

### Export檔案操作說明

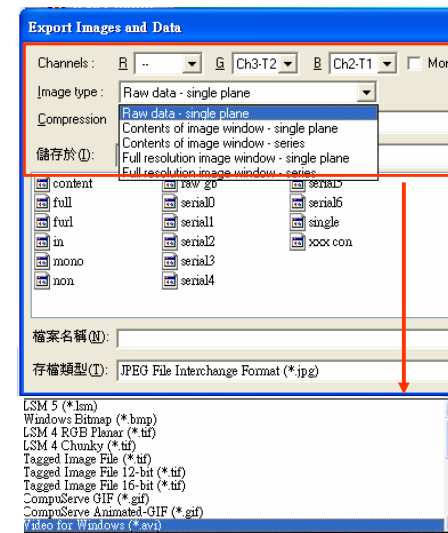


single plane:單張,目前所顯示的

series :一系列圖,適用於Zstack, time series

## 續14.存檔—只存下圖片檔或者影片

ZEISS



File → Export

Raw data—不含尺規,選擇要存的顏色,是否為灰階等等

Content of image和full resolution—包含尺規

Full resolution—依照拍照時的畫素存檔

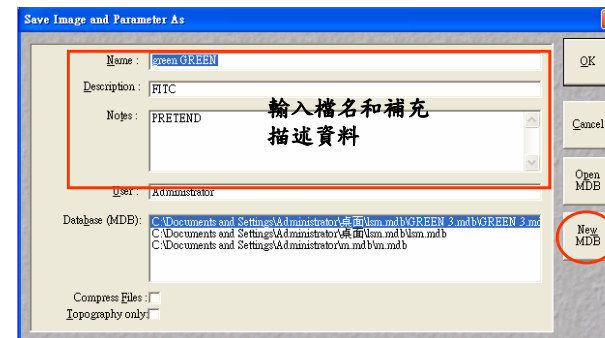
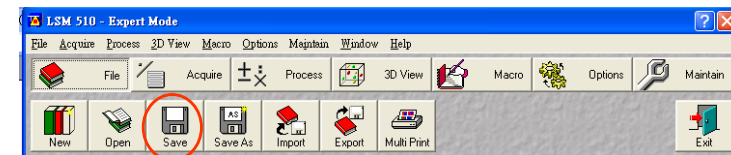
Series—存serial section (例如包含時間T或Z軸)的每張圖

下拉選擇欲存檔之類型(tif, jpeg...),建議以tif檔儲存,減少壓縮損失,可儲存serial section 成動畫影片檔(.avi)

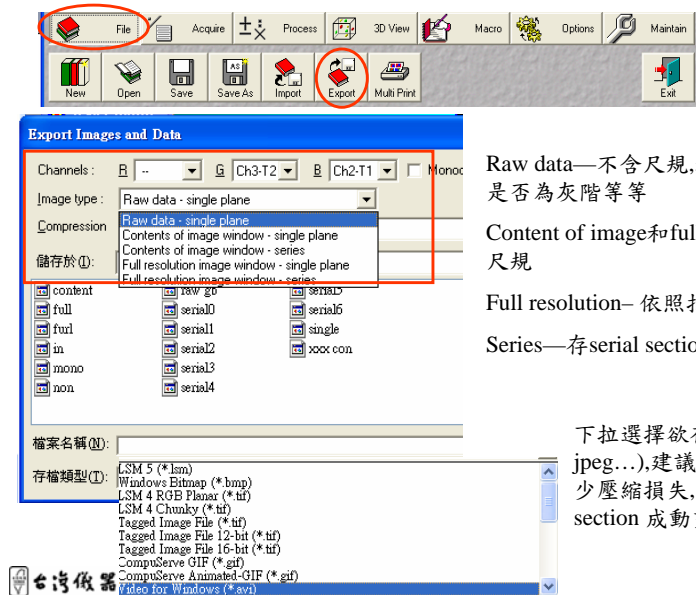
\*\*\*\*\*  
Anita Hsu, 徐華蔓  
4F 272 Nanking East Road., Sec.3, Taipei 105, Taiwan  
TEL: +886-2-2772-3333 ext.108  
FAX: +886-2-2731-1700  
E-Mail: anita\_hsu@ticgroup.com.tw  
\*\*\*\*\*

## 存檔—整個存下來

ZEISS



## 存檔—只存下圖片檔或者影片



Raw data—不含尺規,選擇要存的顏色,是否為灰階等等

Content of image和full resolution—包含尺規

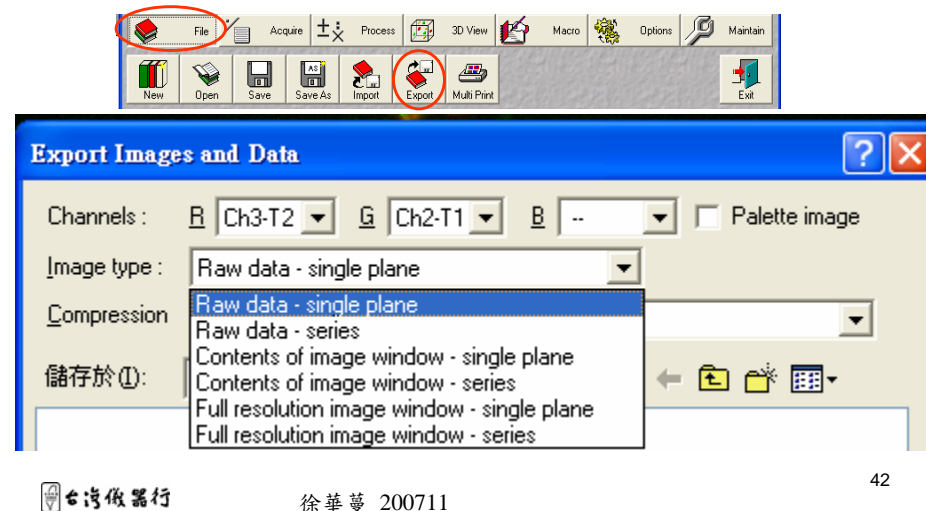
Full resolution—依照拍照時的畫素存檔

Series—存serial section的每張圖

下拉選擇欲存檔之類型(tif, jpeg...),建議以tif檔儲存,減少壓縮損失,可儲存serial section 成動畫影片檔(.avi)

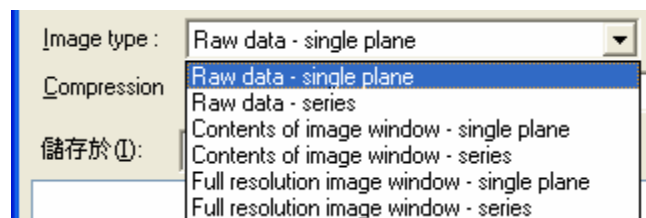
41

## Export檔案操作說明



42

## Single plane與Series



single plane:單張,目前所顯示的

series :一系列圖,適用於Zstack, time series

## Contents of image window



- 使用原則:存下display視窗所顯示的內容
- 使用時機:
  - 1.合併存下尺規或字標示等
  - 2.單channel 或多channel之各種存圖組合都適用
  - 3.colocalization分布圖
- 範例:

(配合下頁)

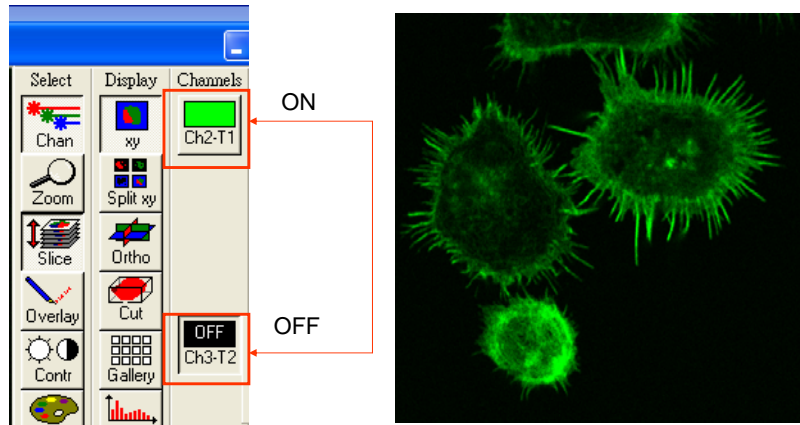
範例一單純存下單channel 影像

將其它Channel的顏色關掉,只留下要存的channel然後→export→ contents of image Window→選擇單張(single plane)或者一系列(serial) (適用於Z stack, time series)

## Contents of image window

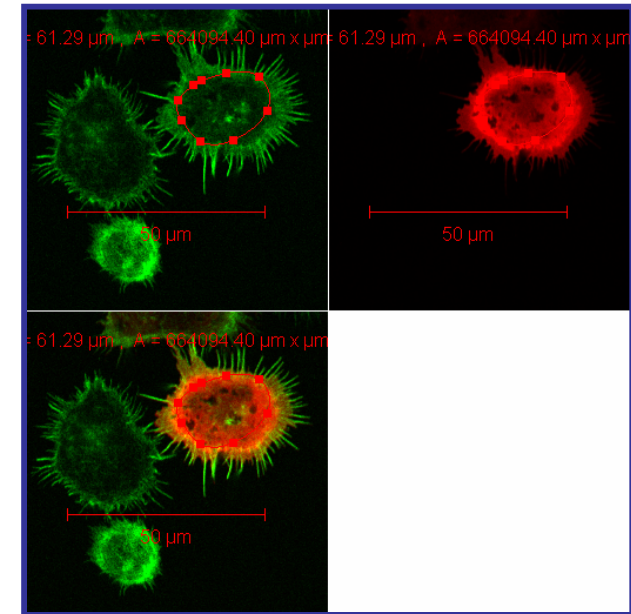


範例一:只想要存下綠色Ch2-T1時,必須將Ch3-T2關掉



## Contents of image window

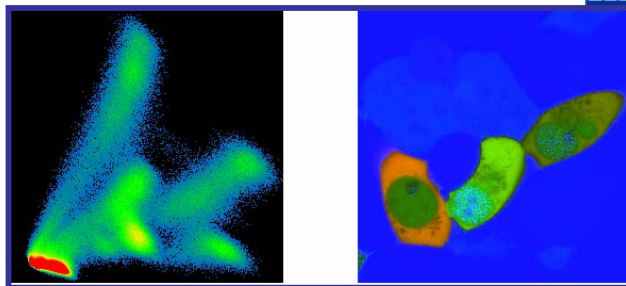
範例二, 包含尺規



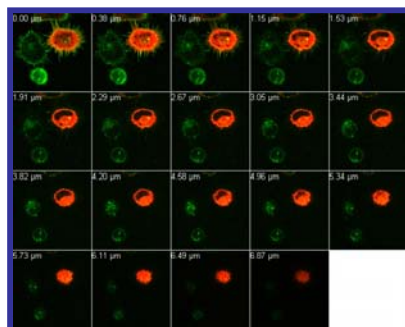
## Contents of image window



範例三, Colocalization



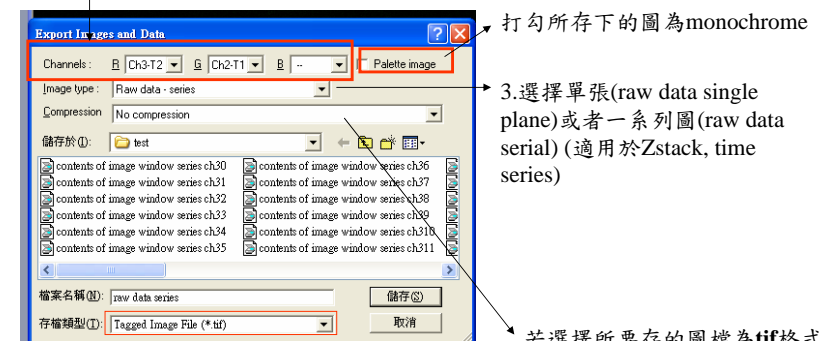
範例四, Gallery



## Raw data與Full resolution image window

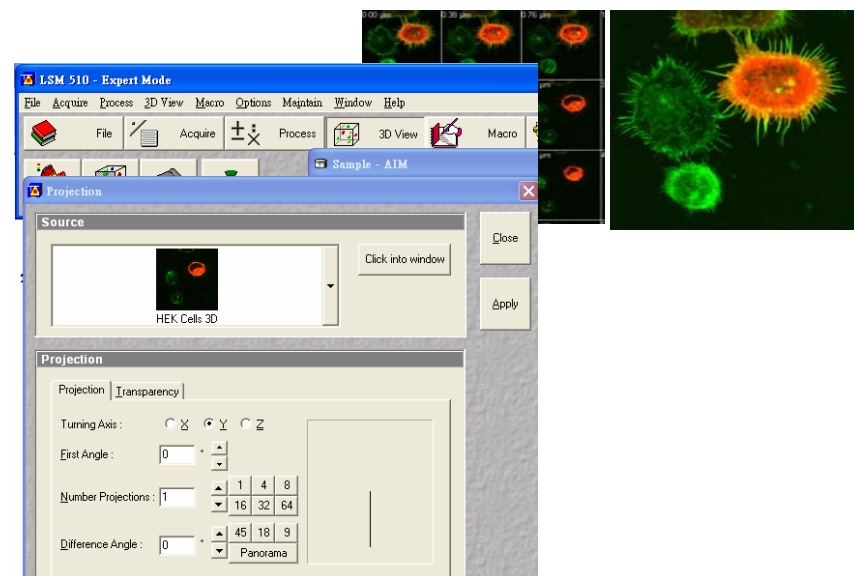
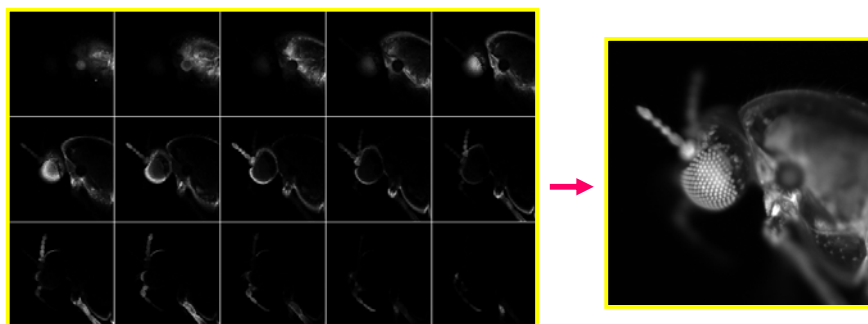


1. 不管螢幕中的display
2. 選擇要的channel顏色, 不要存下的channel關掉, 以下圖為例所存下的圖將為紅色和綠色merge的影像



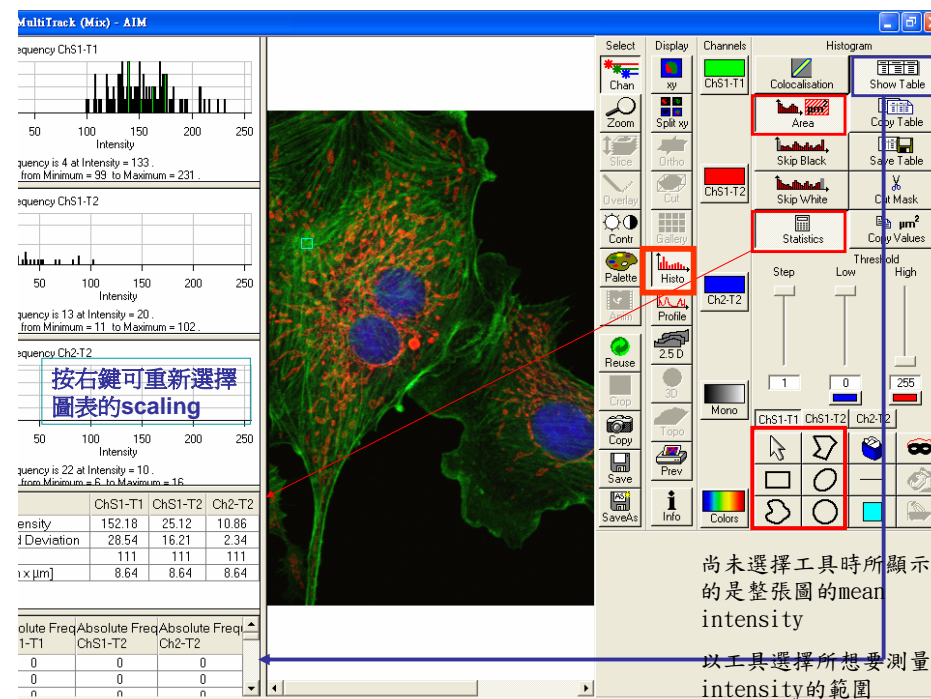
tif檔若選16bit在windows之下無法開啟,  
要專業的看圖軟體才能開喔!!



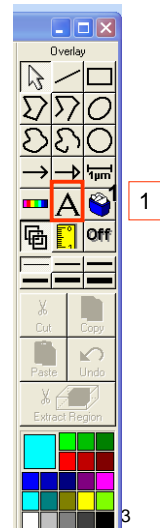
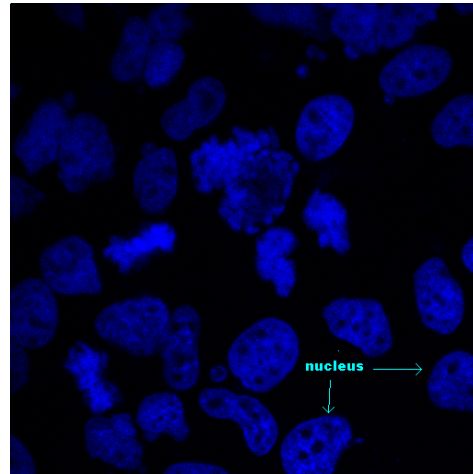
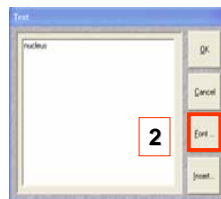


3D view → projection → first angle=0, no projection=1 → apply 50

測量intensity



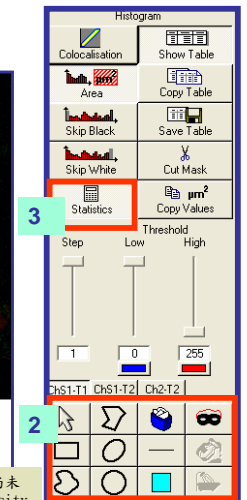
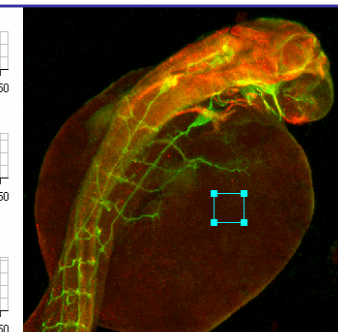
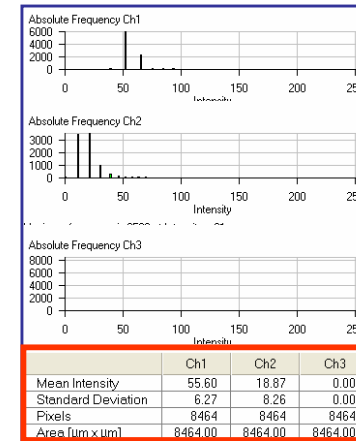
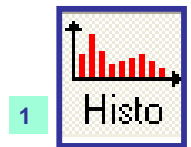
# Annotation



台灣儀器行

徐華蔓 200711

# Intensity Measurement--Histo



以工具選擇所想要測量intensity的範圍，尚未選擇工具時所顯示的是整張圖的mean intensity