



ZEISS LSM 7MP System Tutorial

Carl You, Application Specialist, Taiwan Instrument Co.
carl_you@ticgroup.com.tw

1



Start System - Hardwares



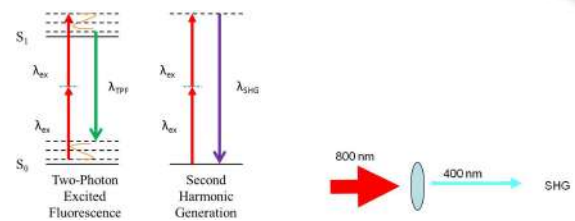
2

Start System - Hardwares



Second Harmony Generation (SHG) - Frequency doubling

多個相同頻率的光子通過非線性介質而合併產生新光子
 → 能量增倍、頻率增倍、波長減半
 Photons with the same frequency interacting with a nonlinear material are effectively "combined" to generate new photons with twice the energy



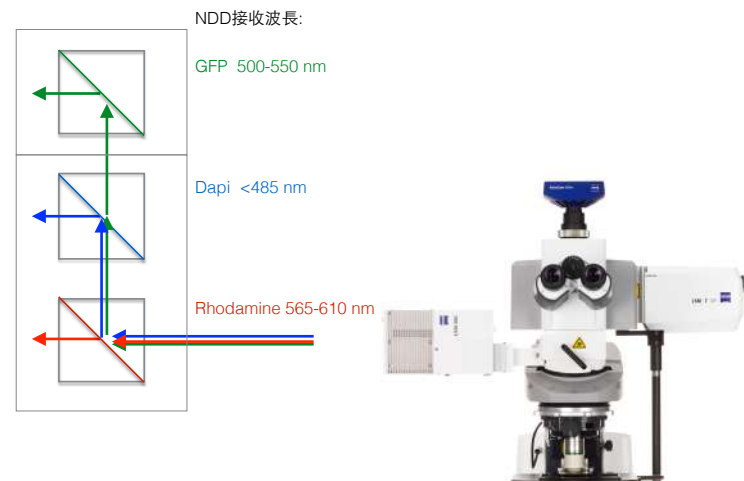
#femtoseconds (10^{-15} s), #SHG, #multi photon, #mode locking

3

3



Start System - Hardwares



4

4

Start System - Hardwares



0 雷射電源 (防震桌下方)

鑰匙轉至"On"開啓雷射電源
鑰匙轉至"Off"關閉雷射電源



1 延長線總電源 (防震桌右下方)

2 電腦開關

3 螢幕開關



5

5

Start System - Hardwares



4 螢光燈源



5 電動載物台主機 (防震桌下方)

主機左下角開關"On"
再按主機右上角綠色按鈕"Remote"



6 軟體 ZEN



開機順序: 0 1 2 3 4 5 6

關機順序: 6 5 4 3 2 1

*每日下午最後一個使用者需關閉所有電源，並將雷射(0)鑰匙轉至"Off"

6

6

Start System - Software



1. 點選桌面上的圖示, 啟動ZEN

2. 點選"Start System", 啟動系統



7

7

Acquisition Snap



8

8

Ocular - Microscope Control

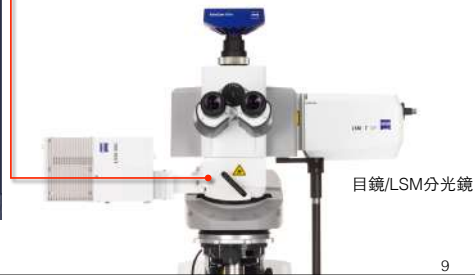


點選"Locate", 初步操控顯微鏡

點選"DAPI", 以DAPI進行對焦, 或可切換其他光路組態

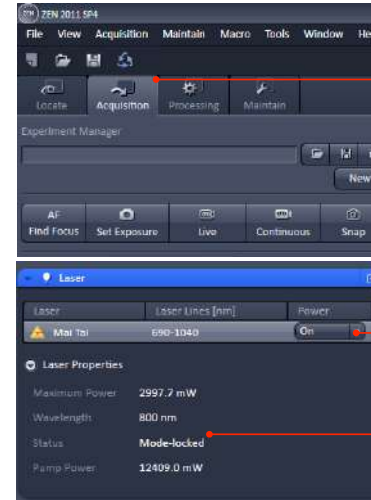
*抽出分光鏡可以目鏡觀察樣本/插入分光鏡為LSM模式

*由於NDD感測器非常敏感, 使用LSM模式前請蓋上黑布並開燈, 避免NDD受損。



目鏡/LSM分光鏡

Acquisition - Turn On Laser



點選"Acquisition", 開始LSM拍照設定

"On"啟動雷射, 出現紅色字樣表示雷射暖機中

約五分鐘後Status轉為"Mode-locked"完成暖機

Acquisition - Imaging Setup



1. 設定Track的數量

一個Track對應一種激發波長
一個Track最多可啟用三個NDD

2. 勾選拍攝所需的NDD, 點按圖示可為影像套色

NDD可接收的波長(由左至右):

Rhodamine 565-610 nm

Dapi <485 nm

GFP 500-550 nm

Acquisition - Acquisition Mode



3. 確認物鏡倍率

4. 選擇預覽解析度:
預覽時可用較低解析度(ex:≤512x512),
擷取影像時可提高解析度

5. 調整掃圖速度

*速度必須≤7, 速度太快將導致掃描馬達損壞!
變更掃圖解析度時此數值也會改變, 務必特別注意!!

6. 預覽時Averaging Number=1, 擷取影像時可增加Averaging Number以降低雜訊, 但會增加掃圖時間

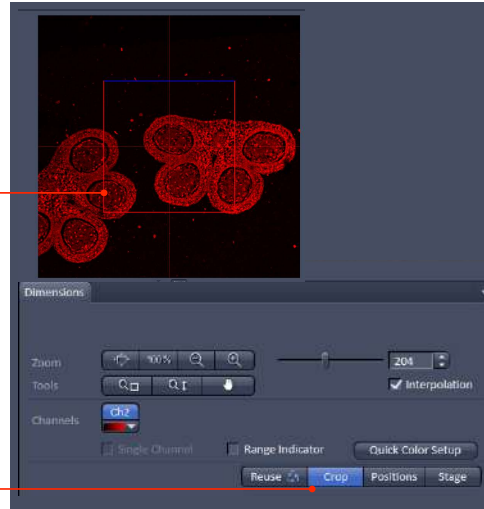
設定單向拍攝 "→"

7. 掃描版面: zoom=0.6, 或拖曳方框
變更局部掃圖範圍
或設定掃圖範圍高, 寬, 旋轉角度

Acquisition - Crop



*也可使用圖片下方Dimensions頁面裡的“Crop”功能
在預覽圖上以滑鼠拖曳或旋轉方框，輕鬆設定掃圖範圍



13

13

Acquisition - Channels

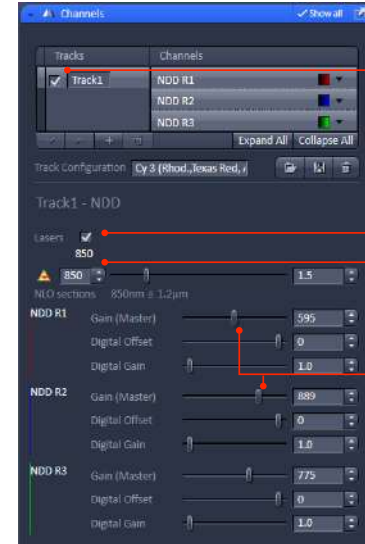


8. 勾選拍照需要的波長種類(Track)
一次單獨勾選一個Track，請取消勾選其他Track

9. 確認雷射已啟動

10. 根據牆上表格，依染劑種類設定雷射波長
並先調整雷射強度至1.5%

11. 預先調整各NDD Gain 至 600 (建議值)
(雷射切勿過強，長時間過曝將造成樣本bleach及感測器燒燬)



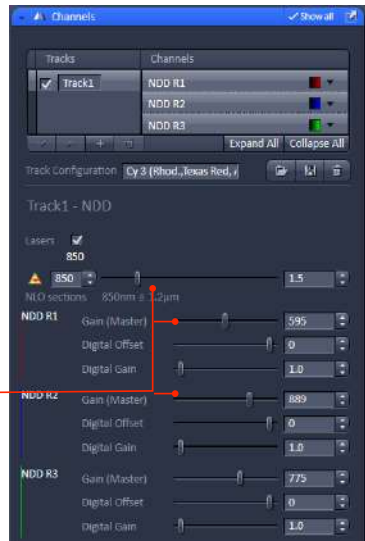
14

14

Acquisition - Continuous and Snap



12. "Continuous"預覽掃圖畫面
*切勿點選左邊"Live"按鈕，長時間Live將導致scanner毀損
13. 適當調整對焦，雷射強度及Gain
14. "Stop" Continuous 停止預覽



15

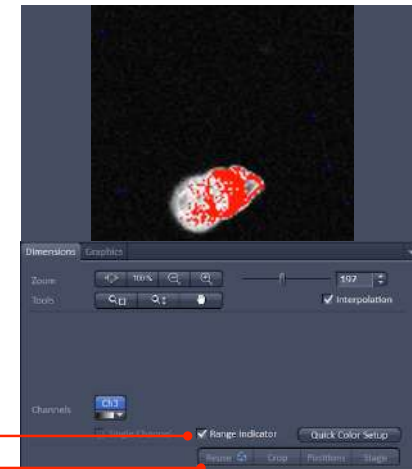
15

Acquisition - Continuous and Snap



*可在預覽圖下方"Dimensions"頁面裡勾選"Range Indicator"，過曝區域將以紅色區塊標示。

**"Reuse"可選原此檔案的拍攝條件：
Tracks, 雷射波長，強度，Gain,
Scan speed, resolution等...



16

16

Acquisition - Acquisition Mode



15. 選擇正式掃圖的解析度 (可設定 $\geq 1024 \times 1024$)

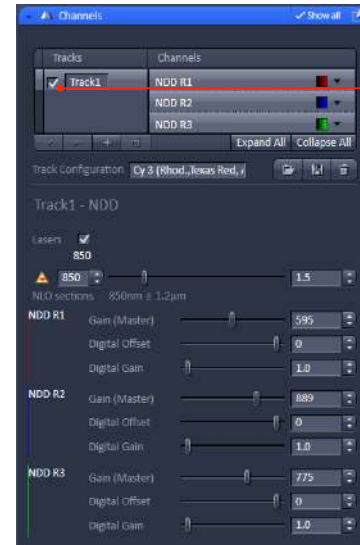
再次確認速度必須 ≤ 7 , 速度太快將導致掃描馬達損壞!

確認Averaging Number

17

17

Acquisition - Channels

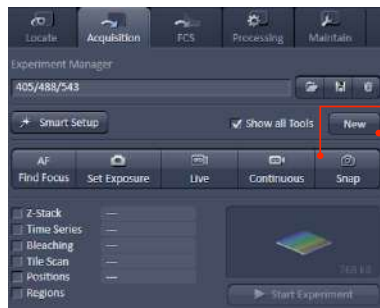


16. 確認已勾選所有掃圖需要的Track

18

18

Acquisition - Continuous and Snap



17. 按"Snap"完成拍攝

*欲拍攝新圖片, 點選"NEW", 重複前述1~17步驟, 完成新圖片拍攝

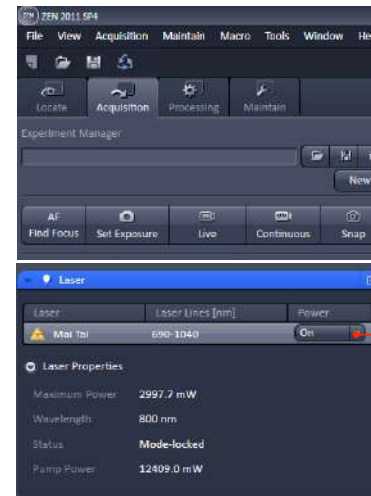
REVIEW SNAP Steps

- . 設定Track
- . 調整預覽解析度 $\leq 512 \times 512$, 並設定掃圖速度 ≤ 7
- . 調整預覽Track的雷射強度, Gain
- . Continuous開始預覽, 對焦, 再調整雷射, Gain
- . Stop Continuous, Snap!

19

19

Acquisition - Turn Off Laser



關閉系統前請記得先關閉雷射

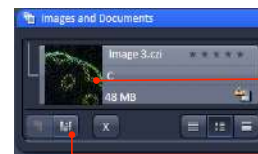
"Off"關閉雷射

20

20

Save and Export Images

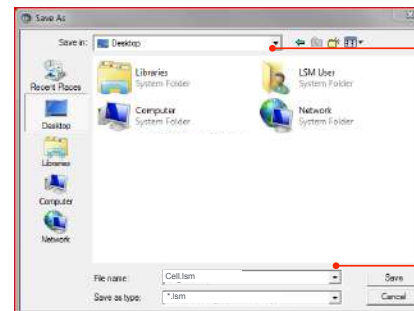
Save Raw Image



辛苦拍攝影像後, 建議將影像先儲存為原始格式以利日後的影像處理及分析

1. 在軟體視窗右上角找到已拍攝完成的影像清單選擇欲儲存的檔案

2. 點選 "Save" (儲存檔案)

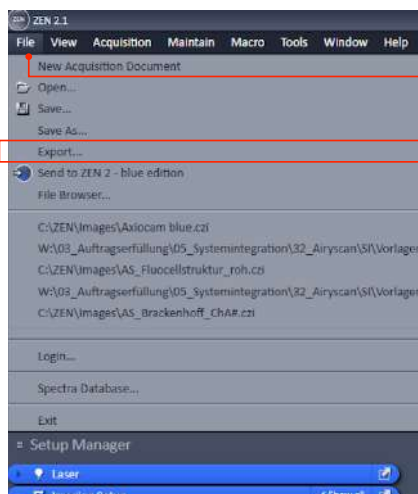


3. 選擇檔案儲存位置 D:/YM/...

4. 選擇檔案格式為*.lsm, "Save"儲存檔案

Export Image

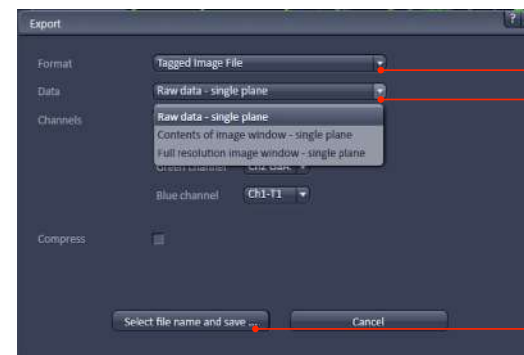
若需將原始檔轉換為TIFF影像格式:



1. 點選軟體視窗左上角"File"

2. 點選 "Export..."

Export Image



3. 選擇轉檔格式

4. 選擇Full resolution image window

*Z-stack或Time series則須點選 "Full resolution image window-series" 才能將各層/各時間點照片一起輸出

5. 設定儲存位置及檔名

Export Image



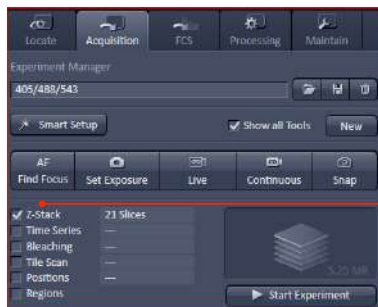
6. 選擇檔案儲存位置

7. 選擇檔案格式為*.Tiff, "Save" 儲存檔案

Experiment Z-Stack



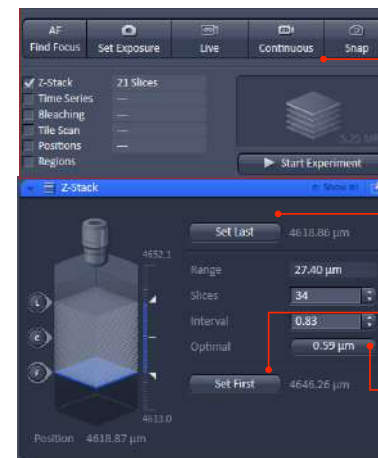
Acquisition - Z-stack



1. 先完成Snap的設定步驟1~16

2. 勾選Z-Stack啟動Z軸拍攝功能

Acquisition - Z-stack



2. "Continuous"啟動掃圖預覽

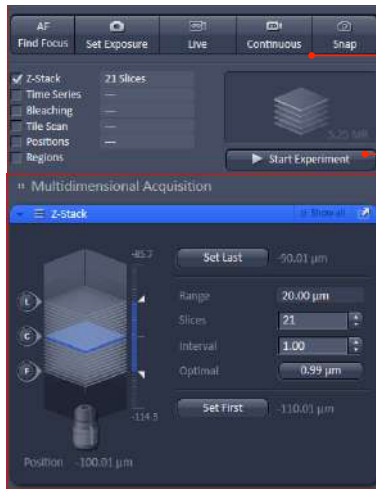
3. 於Z-Stack子欄位中設定Z軸上界及下界:
轉動顯微鏡對焦細調節輪, 將焦距移至Z軸上界,
按"Set Last"

* 右手順時針轉對焦細調節輪物鏡上昇, 逆時針則下降

4. 轉動顯微鏡對焦調節輪, 將焦距移至Z軸下界,
按"Set First"

5. 按"Optimal", 自動運算出最佳Z軸堆疊拍攝張數

Acquisition - Z-stack



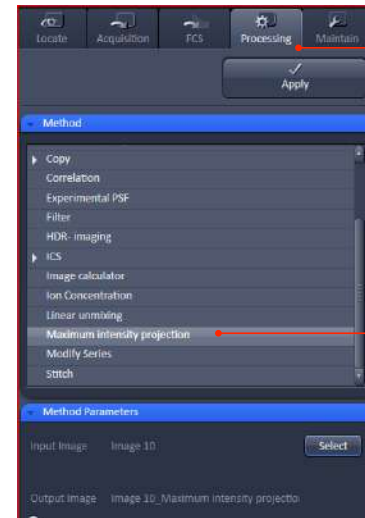
6. "Stop"Continuous, 確認掃圖解析度

7. "Start Experiment"開始拍攝Z-Stack
*若拍攝時需終止拍攝可按"Stop"停止拍攝

29

29

Processing - Maximum Intensity Projection



Z-stack可透過疊圖整合為一張全景深影像

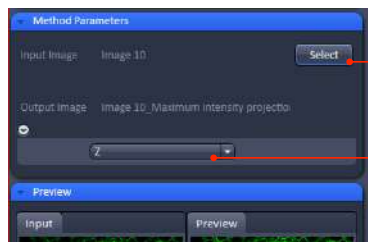
1. "Processing"

2. 在Method中點選
"Maximum intensity projection"

30

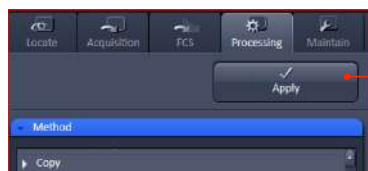
30

Processing - Maximum Intensity Projection



3. 在Method Parameters中"Select"欲處理的
Z-stack檔案

4. 確認模式為'Z'



5. 回到視窗上方, 點"Apply"開始處理影像

31

31

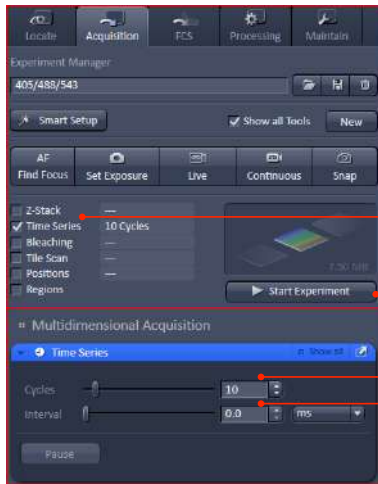
Experiment
Time Series



32

32

Acquisition - Time Series



1. 先完成Snap的設定步驟1~16
2. 勾選"Time Series"啟動曠時拍攝功能
3. "Cycles"設定拍攝次數
4. "Interval"設定拍攝間隔時間長度及時間單位
5. "Start Experiment"開始曠時拍攝

33

33



Congratulations !!

34