

OLYMPUS IX83全自動倒立顯微鏡 cellSens Dimension 基本操作說明



Index

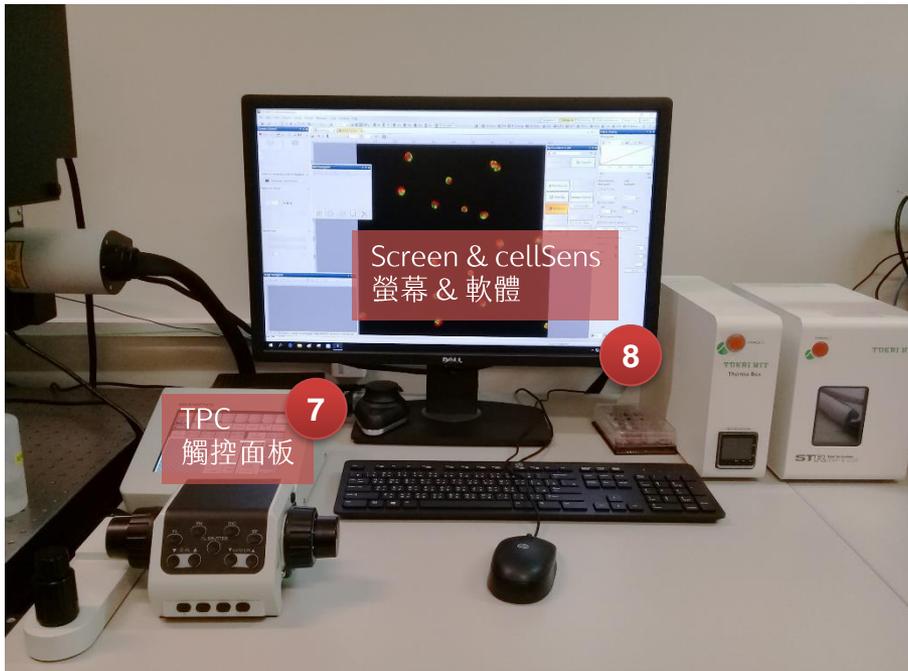


基本操作	頁碼	基本操作	頁碼
開機	2	自動 Time Lapse拍攝 (XYT)	23
樣品載具 Sample Holders	4	小型活細胞載台與清潔	24
cellSens 軟體主介面介紹	5	油鏡清潔步驟	25
顯微鏡控制、螢光濾片	7	關機	26
快捷鍵功能 My Functions	8	◆◆◆補充◆◆◆	
存檔—彩色/灰階圖檔	9	FV31S-DT Viewer 檔案輸出	27
單張拍照 Snapshot	10	Fluorescence Filter Sets	28
Process Manager 介紹	11	X-cite 螢光燈源	31
自動多色螢光拍照 Multi Channels (XYλ)	12		
自動Z層拍照 Z-Stack (XYZ)	17		
Z層疊圖 EFI Processing	19		
自動拍攝多點或拼圖 Multi Position	20		
Well Navigator	22		

倒立式顯微鏡 Olympus IX83



開機順序(1)

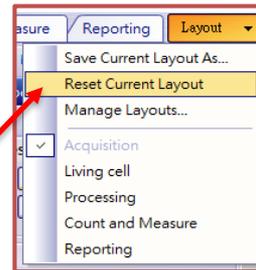
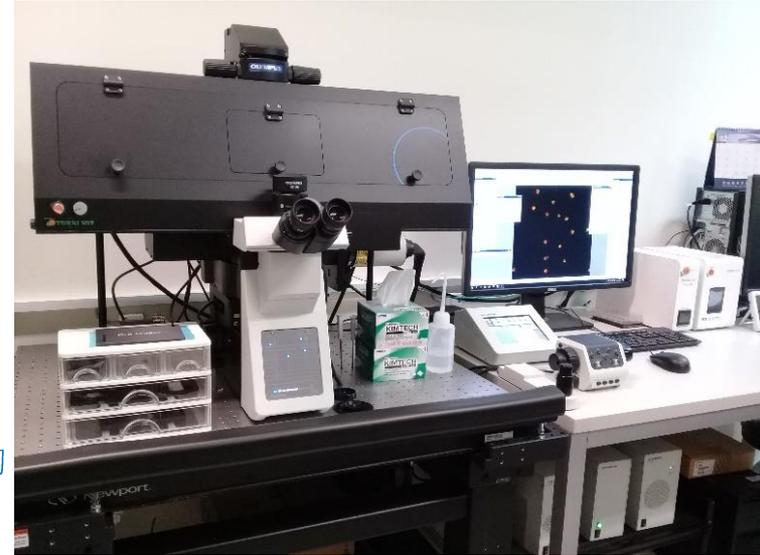


倒立式顯微鏡 Olympus IX83



開機順序(2)

- ① EMCCD (Hamamatsu ORCA-Flash4.0 V3 灰階 sCMOS)
- ② 電腦
- ③ U-CBF 快速螢光轉盤
- ④ Stage 電動平台  勿用手推！只能以XY軸控制桿移動
- ⑤ CBH 顯微鏡控制
- ⑥ LED 螢光燈源 隨開隨用，只拍可見光不用開啟
- ⑦ TPC 觸控面板 面板後側右上方按鈕按一下就好，畫面顯示 Start Operation
- ⑧ 螢幕與 cellSens 軟體 請先至右上角 [Layout ▼] **Reset Current Layout 重設版面**

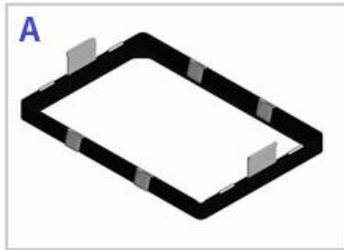


若需使用 [活細胞溫控系統] 建議提早30分鐘開啟

- ⑨ CO₂ 氣瓶 確認壓力值，僅需旋轉黑色開關 
- ⑩ 小型培養載台 Stage top incubator
- ⑪ 外罩溫控黑箱 Thermo Box (拍72小時內不用開)



樣品載具 sample holders



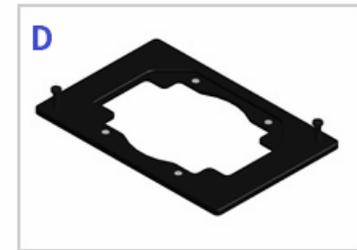
ATX-W
For Well Plate



ATX-CSG
Chamber slide, slide glass and
Chambered coverglass



ATX-D
For 35/50/60mm dish



ATX-A
For installation ATX-D, ATX-CSG

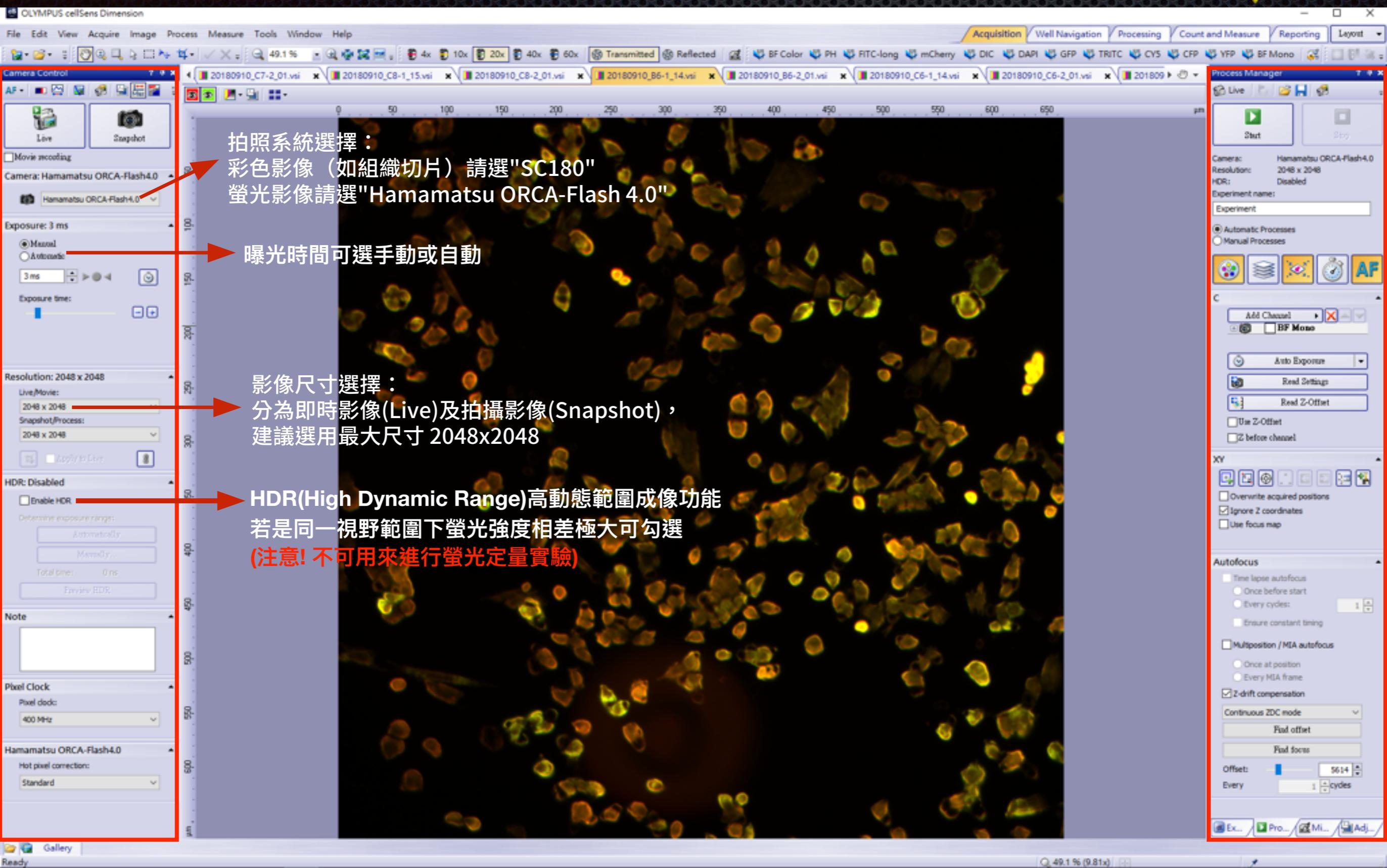
A. 標準多孔盤：6/12/24/96-well cell culture plate

置換內部夾具後可適用以下樣品規格：

B. 通用夾具：chamber slide/slide glass/chambered cover glass

C. 培養皿：35/50/60mm culture dish

D. 玻片：標準 76mm*26mm



拍照系統選擇：
彩色影像（如組織切片）請選"SC180"
螢光影像請選"Hamamatsu ORCA-Flash 4.0"

曝光時間可選手動或自動

影像尺寸選擇：
分為即時影像(Live)及拍攝影像(Snapshot)，
建議選用最大尺寸 2048x2048

HDR(High Dynamic Range)高動態範圍成像功能
若是同一視野範圍下螢光強度相差極大可勾選
(注意! 不可用來進行螢光定量實驗)

照相系統
控制視窗

主畫面/拍攝完成影像

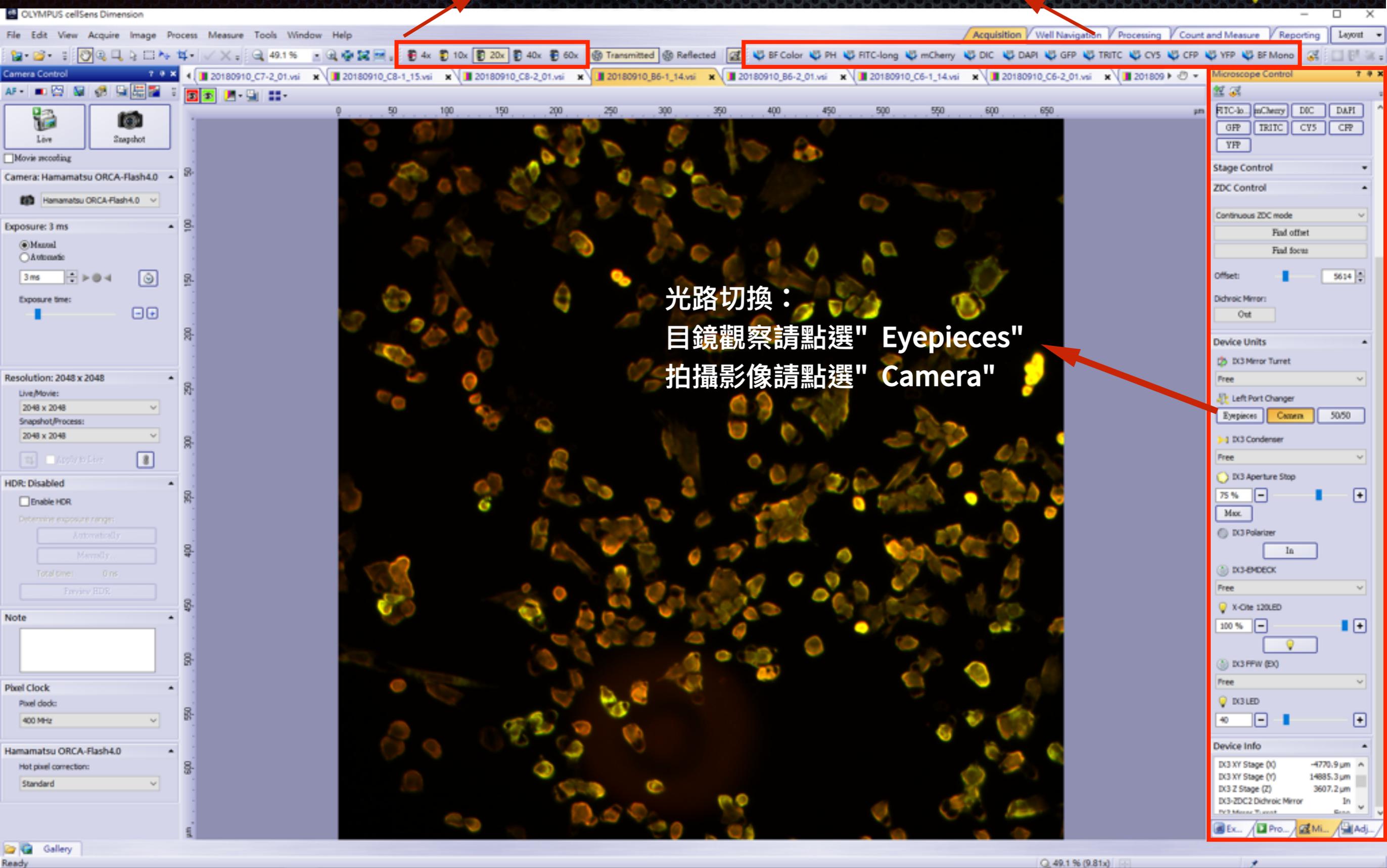
Process Manager
實驗設計控制視窗

6 主要介面介紹



倍率選擇：可直接點選切換倍率
請注意油鏡的使用

觀察法選擇



光路切換：
目鏡觀察請點選" Eyepieces"
拍攝影像請點選" Camera"

顯微鏡硬體控制視窗
建議直接選擇觀察法
不需更改此處設定

顯微鏡控制



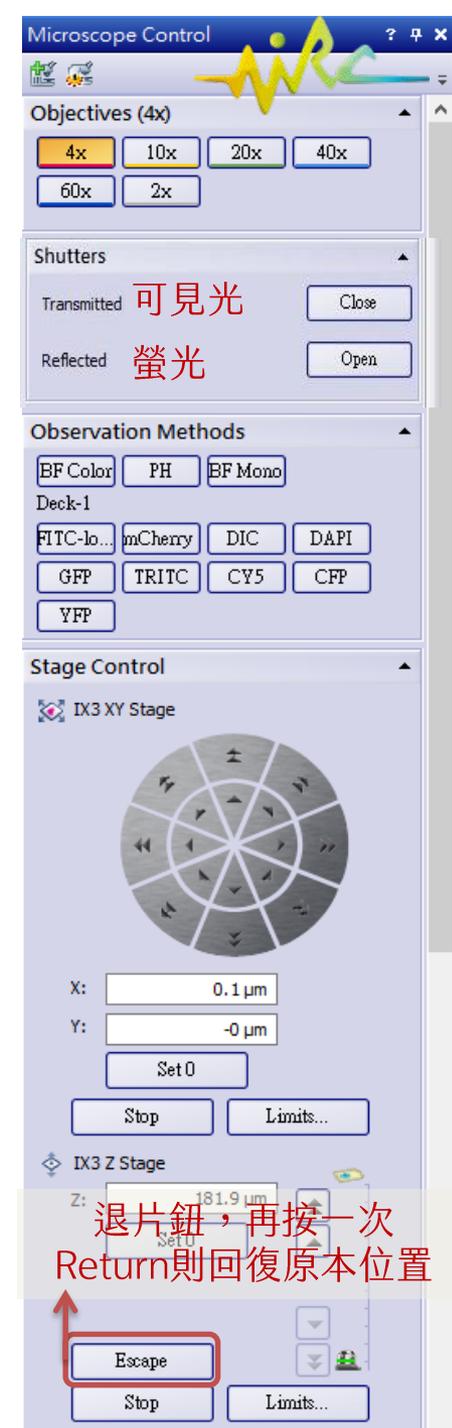
➤ 鏡頭倍率

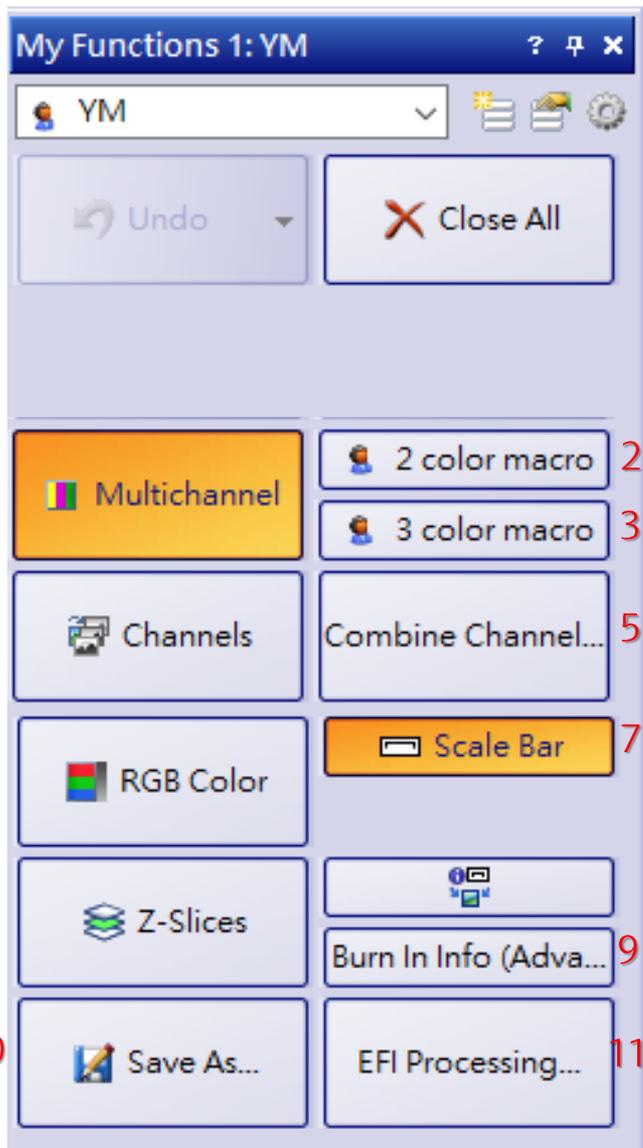
關機前請切回 4x 鏡頭

注意！60X為砂油鏡，
如需使用請先通知管理員！

➤ 觀察模式

按鍵名稱	Excitation filter	Dichromatic Mirror	Emission filter
BF color	可見光，彩色明視野影像，須將Camera切換至SC180		
PH	可見光，相位差影像		
BF Mono	可見光，黑白明視野影像		
FITC-long	480/40	505	510IF
mCherry	575/20	595	645/90
DIC	可見光，微分干涉差影像		
DAPI	387/11	410	440/40
GFP	485/20	504	525/30
TRITC	560/20	582	607/36
CY5	650/13	669	684/24
CFP	427/10	440	472/30
YFP	504/12	520	542/27





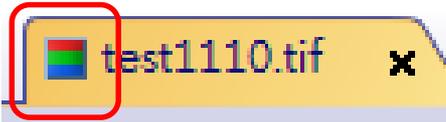
	快捷鍵	功能	說明
1	Multi Channel		
2	2 color macro	雙/三色螢光 拆色後轉彩色	執行 RGB 拆色後將各 Channels 轉成 24-bit 彩色圖片 (等於 ④ Channels → ⑥ RGB color)
3	3 color macro		
4	Channels	RGB 拆色	Separate Multi-channel 圖片拆色，拆色後為 16-bit 灰階圖檔
5	Combine Channels	灰階圖檔 疊圖套色	疊圖套色後為 24-bit 彩色圖檔，詳見補充說明
6	RGB Color		按下後將檔案轉成 24-bit 彩色圖檔
7	Scale Bar	顯示尺規	尺規可移動位置，勿改格式
8	Z-Slices	拆開 Z-Stack	將 Z-Stack 影像拆開成單層 Z 圖檔
9	Burn In Info	畫尺規	注意！畫上後無法修改！ 畫完請另存新檔，不要覆蓋原始檔
10	Save As...	另存新檔	建議存.tif 或 .vsi
11	EFI Processing..	EFI 疊圖	將 Z-Stack 影像的所有 Z 層疊合成一張焦距層較厚的 <u>延伸焦距影像</u>

存檔格式—彩色/灰階圖檔



➤ 彩色圖檔 (24-bit)

RGB color image → [Save As] .tif



➤ 灰階圖檔 (16-bit)

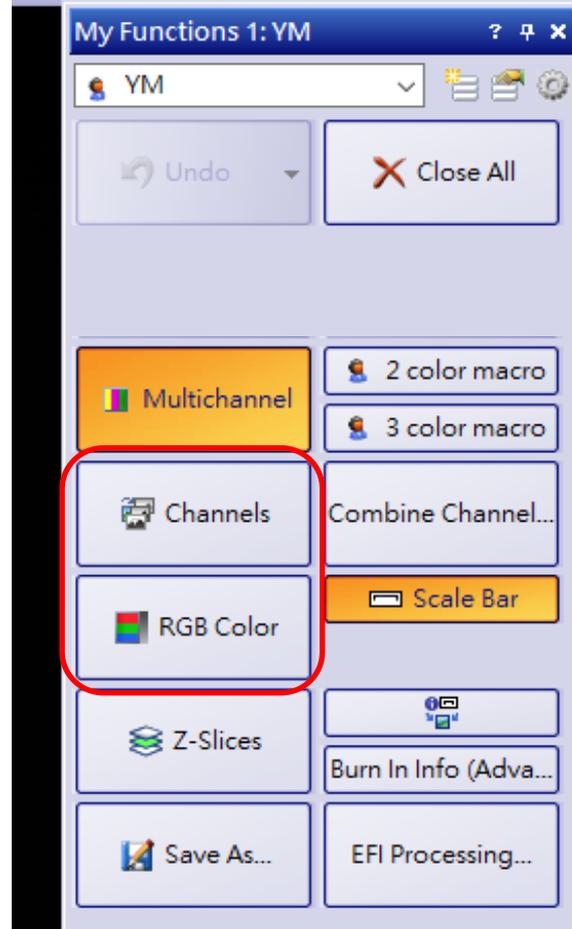
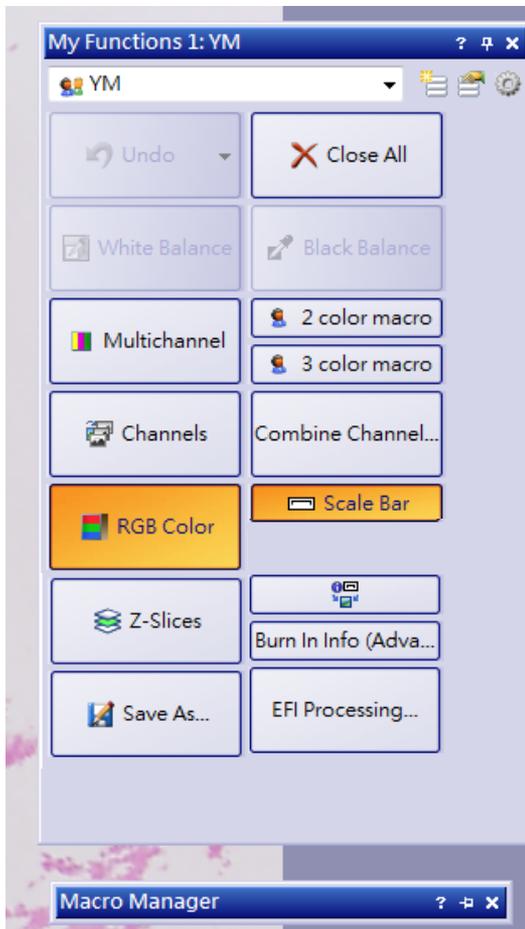
Fluorescence snapshot or Multi-Channel Images



→ [Save As] .vsi 原始檔
使用 Viewer 畫尺標與輸出 .tif

或

→ 使用 My Functions 快捷鍵
拆色及轉檔後儲存 .tif



➤ Channels:
Separate Multichannel 圖片，
拆色後為 16-bit 灰階圖檔

➤ RGB color:
將灰階圖轉成彩色圖檔 (24-bit)

單張拍照流程

1. 設定倍率
2. 選擇觀察模式 (BF, DIC 或螢光)
3. 確認相機

拍攝[BF color]，相機為 SC180；

拍攝其他觀察模式，相機為 Hamamatsu

4. 目鏡下觀察並選取視野

5. 軟體 Live 即時預覽

[Ctrl + H]可切換過曝顯示輔助模式

6. 選擇曝光模式：

[可見光]可選擇 Automatic 自動曝光

[螢光]建議選擇 Manual 手動曝光，

以固定各螢光曝光條件

7. 微調視野與焦距

8. Snapshot 影像擷取

9. Save As 另存新檔

手動曝光



自動曝光



11 Process Manager 介紹



OLYMPUS cellSens Dimension

File Edit View Acquire Image Process Measure Tools Window Help

Acquisition Well Navigation Processing Count and Measure Reporting Layout

Camera Control

20180910_C7-2_01.vsi x 20180910_C8-1_15.vsi x 20180910_C8-2_01.vsi x 20180910_B6-1_14.vsi x 20180910_B6-2_01.vsi x 20180910_C6-1_14.vsi x 20180910_C6-2_01.vsi x 201809

0 50 100 150 200 250 300 350 400 450 500 550 600 650 μm

Live Snapshot

Movie recording

Camera: Hamamatsu ORCA-Flash4.0

Hamamatsu ORCA-Flash4.0

Exposure: 3 ms

Manual Automatic

3 ms

Exposure time:

Resolution: 2048 x 2048

Live/Movie: 2048 x 2048

Snapshot/Process: 2048 x 2048

Apply to Live

HDR: Disabled

Enable HDR

Determine exposure range:

Automatically Manually...

Total time: 0 ns

Preview HDR

Note

Pixel Clock

Pixel clock: 400 MHz

Hamamatsu ORCA-Flash4.0

Hot pixel correction: Standard

Process Manager

Live

Start Stop

Camera: Hamamatsu ORCA-Flash4.0

Resolution: 2048 x 2048

HDR: Disabled

Experiment name:

Experiment

Automatic Processes Manual Processes

AF

Automatic Processes Manual Processes

多頻道拍攝

Z軸拍攝

多點掃描或拼圖

曠時攝影

自動對焦 焦距維持

請點選自動模式

Process Manager 介紹-多頻道拍攝(多色螢光或螢光與穿透光疊合)



The screenshot shows the OLYMPUS cellSens Dimension software interface. The main window displays a multi-channel acquisition setup. The 'Process Manager' window is open, showing 'Automatic Processes' selected. A 'Multi Channel' section is visible, with an 'Add Channel' button highlighted by a red box. Below this, there are buttons for 'Read Settings' and 'Read Z-Offset', and checkboxes for 'Use Z-Offset' and 'Z before channel'. A red arrow points from the 'Z before channel' checkbox to the text '拍攝不同 Z 軸多頻道影像'. Another red arrow points from the 'Add Channel' button to the text '按下顯示下拉選單 可挑選欲拍攝之頻道'. A third red arrow points from the 'Z before channel' checkbox to the text '先拍完第一頻道之所有 Z 軸再切換頻道(速度較快,拍攝XYZλ時建議使用)'. The background shows a live view of a cell sample with yellow fluorescence.

按下多頻道拍攝,橘底表示已開啟此功能



按下顯示下拉選單
可挑選欲拍攝之頻道

拍攝不同 Z 軸多頻道影像

先拍完第一頻道之所有 Z 軸再切換頻道(速度較快,拍攝XYZλ時建議使用)

This close-up shows the 'Multi Channel' section of the Process Manager window. It includes an 'Add Channel' button, an 'Auto Exposure' dropdown menu, 'Read Settings' and 'Read Z-Offset' buttons, and checkboxes for 'Use Z-Offset' and 'Z before channel'. The 'Automatic Processes' radio button is selected.



OLYMPUS cellSens Dimension

File Edit View Acquire Image Process Measure Tools Window Help

Camera Control

Live Snapshot

Camera: Hamamatsu ORCA-Flash4.0

Exposure: 3 ms

Resolution: 2048 x 2048

HDR: Disabled

Note

Pixel Clock

Hamamatsu ORCA-Flash4.0

Automatic Processes

Manual Processes

Add Channel

BF Color

PH

BF Mono

FITC-long

mCherry

DIC

DAPI

GFP

TRITC

CY5

CFP

YFP

Acquisition Well Navigation Processing Count and Measure Reporting Layout

mCherry DIC DAPI GFP TRITC CY5 CFP YFP BF Mono

0_C6-1_14.vsi x 20180910_C6-2_01.vsi x 20180910_C6-2_01.vsi x 20180910_C8-1_15.vsi

Process Manager

Start Stop

Camera: Hamamatsu ORCA-Flash4.0

Resolution: 2048 x 2048

HDR: Disabled

Experiment name:

Experiment

Automatic Processes

Manual Processes

Add Channel

Auto Ex

Read

Read

Use Z-Offset

Z before channel

Ex... Pro... Mi... Adj...

37.2 % (7.44x)

Ready

按下顯示下拉選單
可挑選欲拍攝之頻道

穿透光頻道
(明視野BF,位相差PH)

螢光頻道
(long:long pass濾片)



OLYMPUS cellSens Dimension

File Edit View Acquire Image Process Measure Tools Window Help

Camera Control

Live Snapshot

Camera: Hamamatsu ORCA-Flash4.0

Exposure: 3 ms

Manual Automatic

3 ms

Exposure time:

Resolution: 2048 x 2048

Live/Movie: 2048 x 2048

Snapshot/Process: 2048 x 2048

Apply to Live

HDR: Disabled

Enable HDR

Determine exposure range: Automatically Manually...

Total time: 0 ns

Preview HDR

Note

Pixel Clock

Pixel clock: 400 MHz

Hamamatsu ORCA-Flash4.0

Hot pixel correction: Standard

2.調整曝光時間

1.選取頻道

3.讀取曝光時間

4.讀取Z軸高度(非必需)

5.勾選可拍攝不同Z軸高度(非必需)

6.勾選後先拍攝Z軸再切換頻道(拍攝 XYZλ 建議使用)

Process Manager

Acquisition Well Navigation Processing Count and Measure Reporting Layout

DIC DAPI GFP TRITC CY5 CFP YFP BF Mono

20180910_C7-2_01.vsi 20180910_C8-1_15.vsi

Process Manager

Live

Start Stop

Camera: Hamamatsu ORCA-Flash4.0

Resolution: 2048 x 2048

HDR: Disabled

Experiment name:

Experiment

Automatic Processes Manual Processes

Auto Exposure

Read Settings

Read Z-Offset

Use Z-Offset

Z before channel

Auto Exposure

Read Settings

Read Z-Offset

Use Z-Offset

Z before channel

Ex... Pro... Mi... Adj...

Ready

37.2 % (7.44x)

*1~3步驟為必須設定參數，4~6為額外選項，必要時再使用

Process Manager 介紹-多頻道拍攝(多色螢光或螢光與穿透光疊合)



OLYMPUS cellSens Dimension

File Edit View Acquire Image Process Measure Tools Window Help

Acquisition Well Navigation Processing Count and Measure Reporting Layout

Camera Control

20180910_C7-2_01.vsi x 20180910_C8-1_15.vsi x 20180910_C8-2_01.vsi x 20180910_B6-1_14.vsi x 20180910_B6-2_01.vsi x 20180910_C6-1_14.vsi x 20180910_C6-2_01.vsi x 20180910_C6-2_01.vsi x

Live Snapshot

Movie recording

Camera: Hamamatsu ORCA-Flash4.0

Exposure: 3 ms

Manual Automatic

3 ms

Exposure time:

Resolution: 2048 x 2048

Live/Movie: 2048 x 2048

Snapshot/Process: 2048 x 2048

Apply to Live

HDR: Disabled

Enable HDR

Determine exposure range: Automatically Manually...

Total time: 0 ns

Preview HDR

Note

Pixel Clock

Pixel clock: 400 MHz

Hamamatsu ORCA-Flash4.0

Hot pixel correction: Standard

37.2 %

4x 10x 20x 40x 60x

Transmitted Reflected BF Color PH FITC-long mCherry DIC DAPI GFP TRITC CY5 CFP YFP BF Mono

Process Manager

Live Stop

Camera: Hamamatsu ORCA-Flash4.0

Resolution: 2048 x 2048

HDR: Disabled

Experiment name: Experiment

Automatic Processes Manual Processes

Auto Exposure Read Settings Read Z-Offset

Use Z-Offset Z before channel

37.2 % (7.44x)

Add Channel

TRITC

Acquire

Exposure Time 3 ms

Z-offset reference 0.0 μm

GFP

Acquire

Exposure Time 3 ms

Z-offset +0.0 μm

DAPI

Acquire

Exposure Time 3 ms

Z-offset +0.0 μm

Start

Camera: Hamamatsu ORCA-Flash4.0

Resolution: 2048 x 2048

HDR: Disabled

Experiment name: Experiment

所有頻道參數設定完成後
按下"Start",即可得到多頻道疊合影像

自動多色螢光拍照

Multi Channel

1. 軟體右下角進入 Process Manager 選單
2. 選擇 Multi Channel 功能
3. Add Channel 下拉選單設定要拍攝的螢光
4. Live 調整拍照條件 → Read Settings

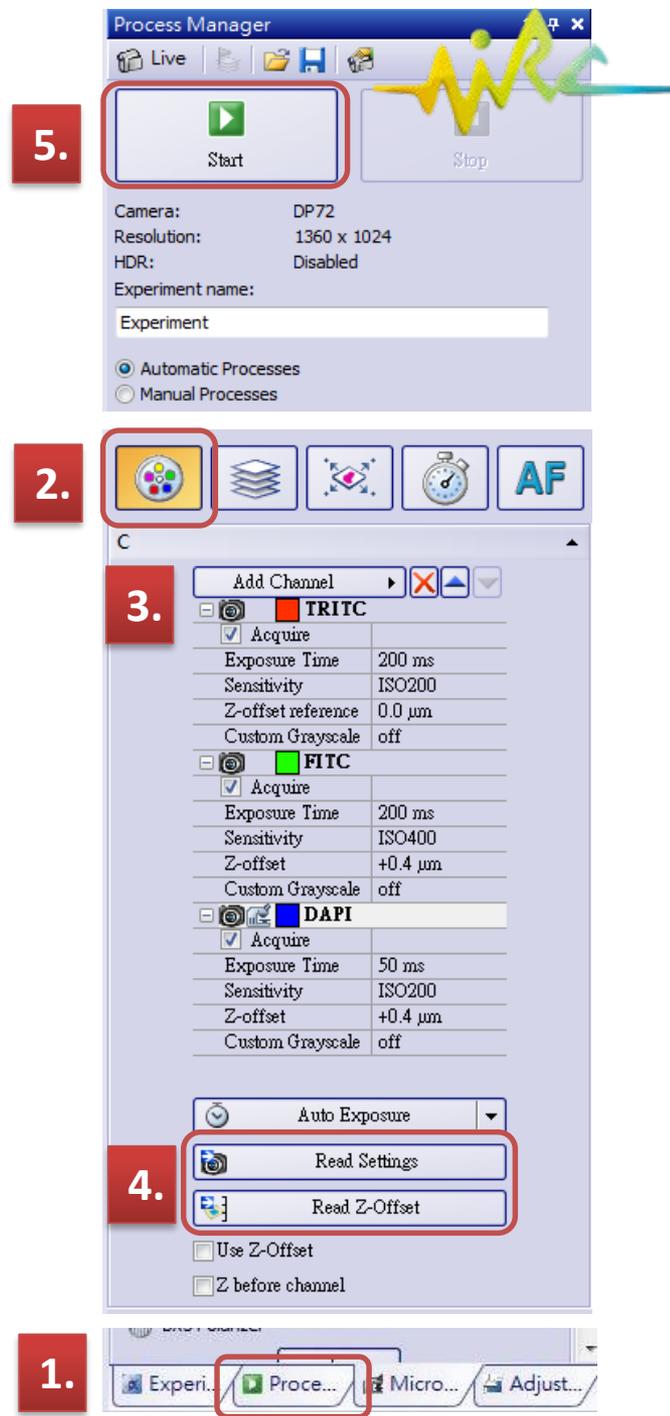
每個 Channel 分別設定曝光時間

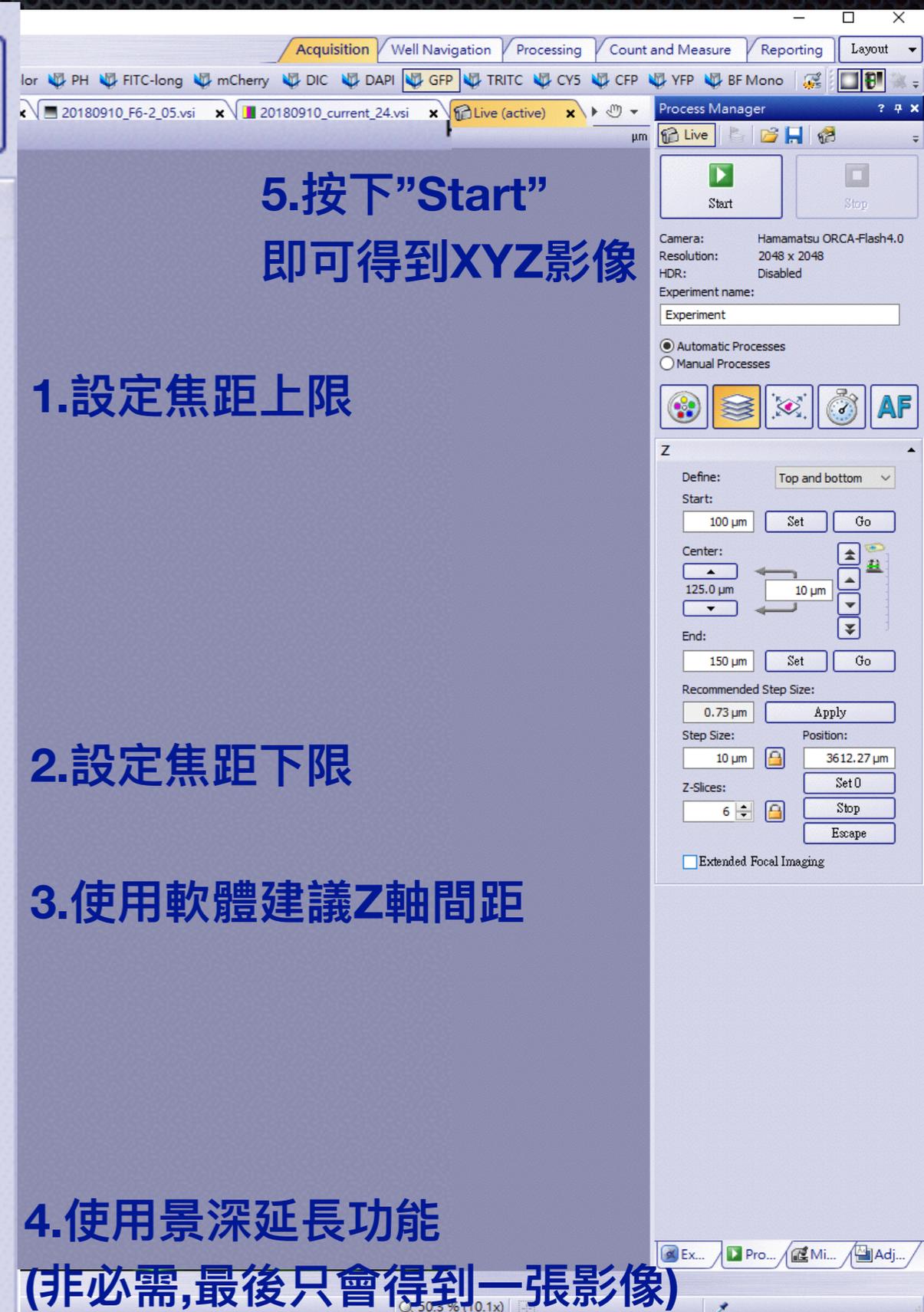
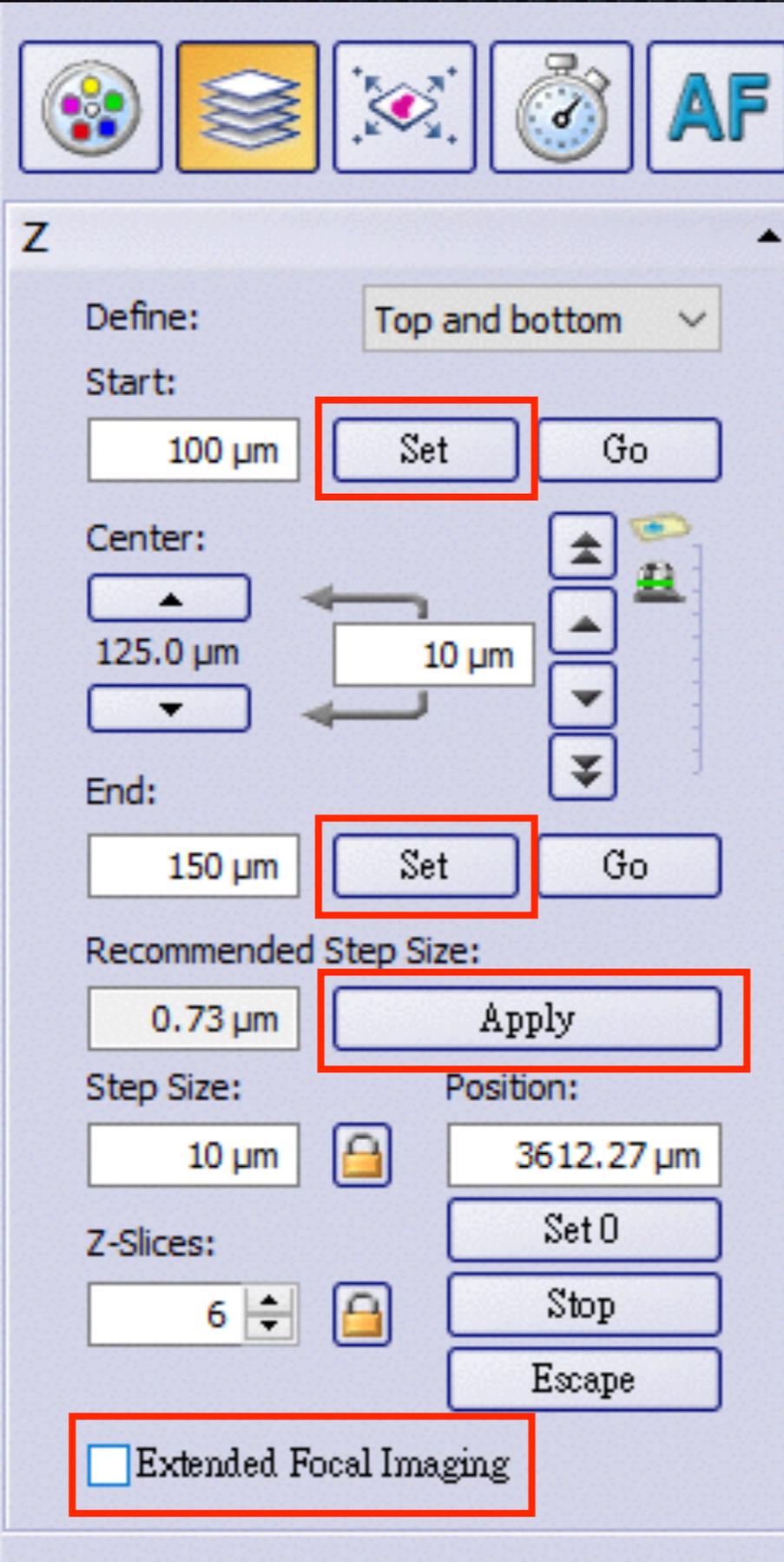
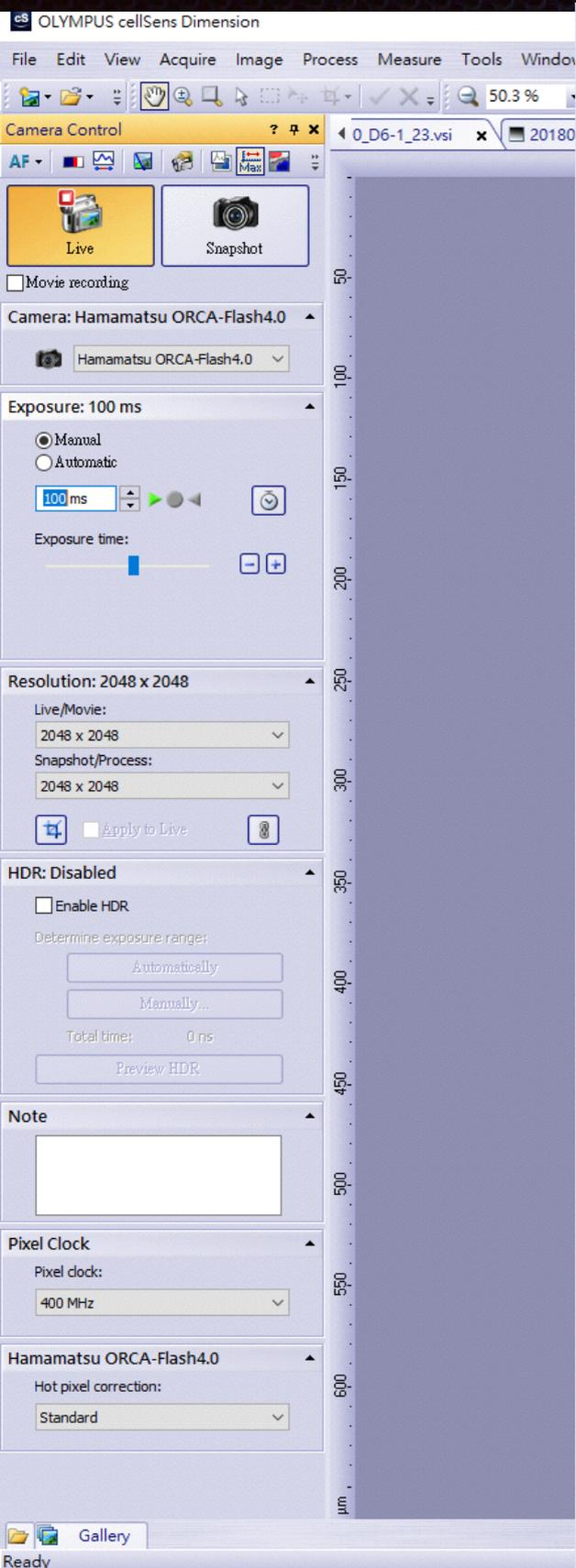
✧ 若不同 Channel 要設定不同 Z focus :

- (1) 從最上面的第一個 Channel 開始
- (2) 調整 Z focus → Read Z-offset
- (3) 分別設定各 Channel 的 Z focus
- (4) 於拍攝前選取 Use Z-offset

5. 按 Start 開始自動拍攝

➤ 可搭配 Multi-Position 或 Z-stack 使用





自動 Z 層拍照

Z-Stack

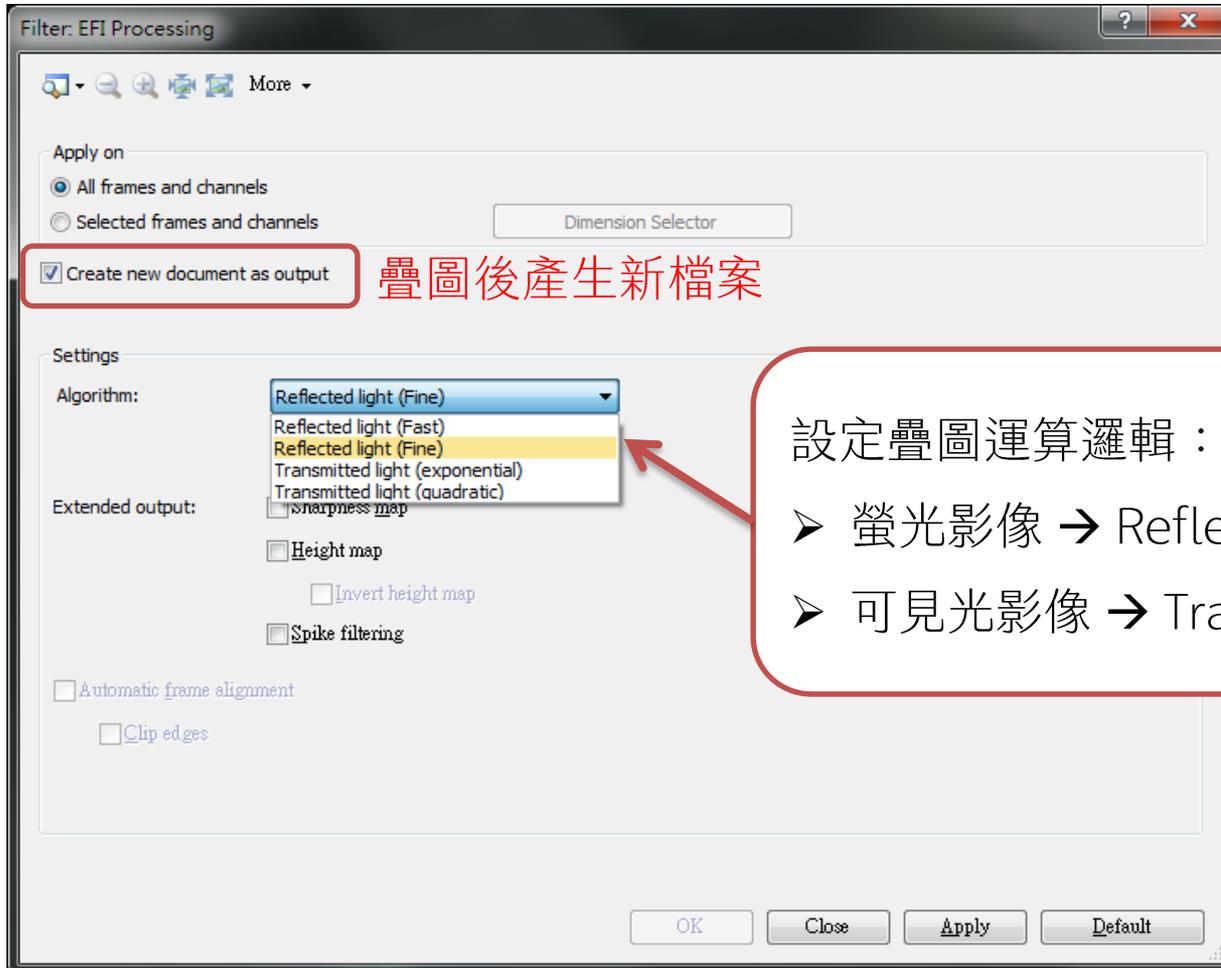
1. 軟體右下角進入 Process Manager 選單
2. 選擇 Z-Stack 功能
3. Live 調整調節輪將焦距上/下移至離焦位置，分別 [Set] 樣品厚度上/下限
4. 設定 Z 層間距以計算總切層數
 - ✧ 分別 [Go] 確認樣品上/下限位置
 - ✧ 建議勿勾選 Extended Focal Imaging，若 只會得到一張所有 Z 層疊合之延長景深影像，可拍完 Z-stack 後使用快捷鍵 [EFI processing..] 疊合。
5. 按 Start 開始自動拍攝

➤ 可搭配 Multi-Channel 或 Multi Position 使用



Z層疊圖

EFI Processing



疊圖後產生新檔案

設定疊圖運算邏輯：

- 螢光影像 → Reflected light
- 可見光影像 → Transmitted light

Focus map : 在進行大拼圖時可運用此功能來事先計算出標本的傾斜度，進而得到較好的焦距拼圖影像

1. 決定標本範圍 (如切片範圍,well,dish範圍)
2. 掃描一個 overview (以便利於設定點位)
3. 設定所要拍攝的點位或範圍
4. 點選 Process Manager
5. 點選 XY-positions / MIA (也可與 Z-stack, multi channel 結合作拍攝)
6. Start 開始拍攝

小提醒：確認好拍照的曝光時間與物鏡是否正確

針對大範圍拼圖設定
焦距補正(focus map)

變更點位順序

相同於
StageNavigator
的功能

已拍照過的點位，
當在進行點位登
錄時將會被清除

不使用已設定
的Z軸位置

如有設定 focus
map請打勾

刪除點位

①決定標本範圍

② 掃描一個 overview

③設定所要拍攝的
範圍或單點位置

選擇所設定的點位
(可刪除或拉動)

點此鍵用滑
鼠設定範圍

此鍵為設定
單點位置

目前所登錄的
全部點位

移動至所選
擇的點位

針對各點可設定
各自的焦距

Position List

Position	X (µm)	Y (µm)	Z (µm)	Well ID	Well Posit
1	-21046.58	-19081.18	0.00	-	-
2	-13110.67	-20592.09	0.00	-	-
3	-10888.64	-20830.74	0.00	-	-

List sorted by: undefined

Z coordinate: Z: 0.00 µm

ZDC offset

Update Z

Read Offset

Delete Offset

Go to Position

Delete Position

OK

Start ⑥

⑤

XY

Overwrite acquired positions

Ignore Z coordinates

Use focus map

④

自動拍攝多點或拼圖

Multi Position

1. 軟體右下角進入 Process Manager 選單
2. 選擇 Multi Position 功能
3. Stage Navigator 設定拼圖或多點位置

① Load Overview Area

② Acquire Overview 以低倍率執行玻片預覽

 自動以低倍率執行全玻片預覽

③ 設定拍攝範圍或設定單點位置

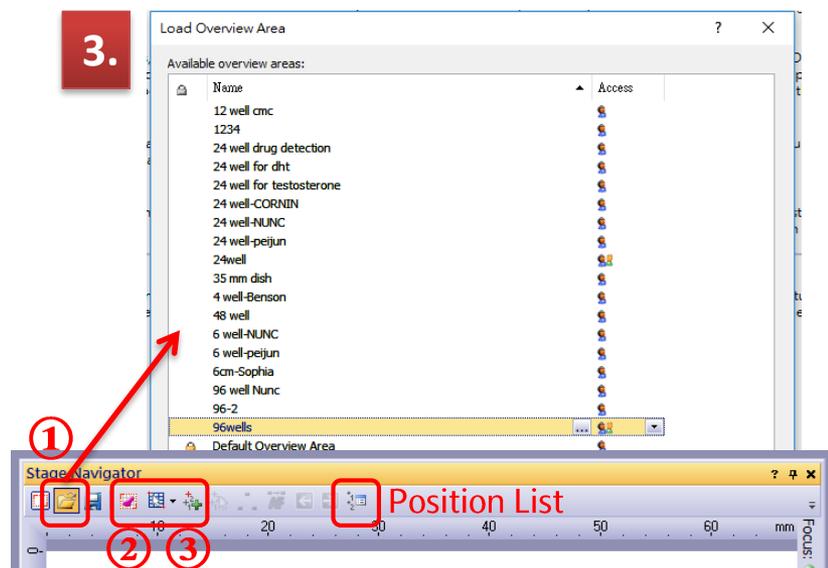
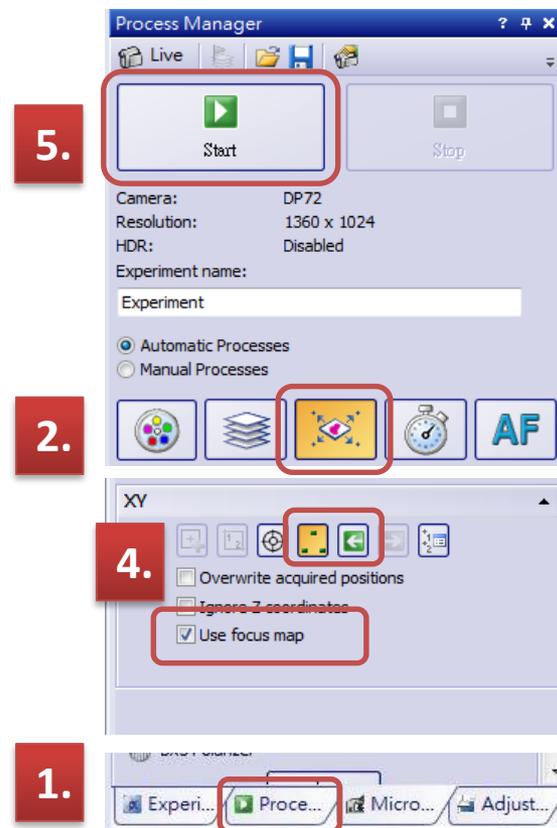
 點此鍵後以滑鼠設定拍攝範圍

 設定單點位置

4. (Optional) 設定 focus map

5. 按 Start 開始自動拍攝

➤ 可搭配 Multi-Channel 或 Z-stack 使用



Multiple image alignment : 運用於各wells的自動拼圖(一個well 1張)
Single frames : 運用於只需要well的單張圖片不拼圖(一個well多張)

Single frames
Custom rectangle
設定各well內圖與圖間
的間隔

(1) Full well in **(2) Full well out** **(3) Custom rectangle**

**1. 點選此鍵在選擇
所要孔位即可自動
移動到該位置**

**2. 可在各空位
加入訊息**

**3. 設定所要
拍攝的孔位**

刪除設定的點位

**進行順序為 1>2>3>α
設定完成後按下 Start 即開始拍攝**

設定孔位之前，要先設定好所要拍攝的參數，
如需要範圍拼圖，請點選 Multiple image alignment ;
如只需要單張影像，可選擇 Single frames

進行順序為 1>2>3>α
設定完成後按下 Start 即開始拍攝



OLYMPUS cellSens Dimension

File Edit View Acquire Image Process Measure

Camera Control

Live Snapshot

Movie recording

Camera: Hamamatsu ORCA-Flash4.0

Exposure: 100 ms

Manual Automatic

Resolution: 2048 x 2048

HDR: Disabled

Note

Pixel Clock

Hamamatsu ORCA-Flash4.0

Camera Control Position List Vi...

Ready

Recording time: 0000:00:00.321

Interval: 00:00:00.321

Cycles: 2

Start delay: 00:00:00

As fast as possible

Duration: 0:00:01

1.選擇鎖定"Interval",輸入欲拍攝之間隔
ex:如需5分鐘拍攝一次,請輸入"300"

2.在Cycles裡面輸入欲拍攝之張數

3.在此可得到總拍攝時間

Acquisition Well Navigation Processing Count and Measure Reporting Layout

PH FITC-long mCherry DIC DAPI GFP TRITC CY5 CFP YFP BF Mono

20180910_F6-2_05.vsi x 20180910_current_24.vsi x Live (active) x

Process Manager

Start Stop

Camera: Hamamatsu ORCA-Flash4.0

Resolution: 2048 x 2048

HDR: Disabled

Experiment name:

Automatic Processes Manual Processes

Recording time: 0000:00:00.321

Interval: 00:00:00.321

Cycles: 2

Start delay: 00:00:00

As fast as possible

Duration: 0:00:01

Ex... Pro... Mi... Adj...

50.3 % (10.1x)

活細胞培養系統 小型培養載台



玻璃上蓋請如圖轉開，不可直接拔開！

- 水浴內槽容量為 40mL
- 建議添加上限 20mL，以防載台移動時液體潑濺
- 請使用二次水 (ddH₂O)
- 水浴槽內每小時蒸發量約 0.5~1mL



⑩ Stage top incubator
小型培養載台之溫度及CO₂控制，一般設定為 37°C, 5% CO₂

⑪ Thermo Box 外罩溫控黑箱設定

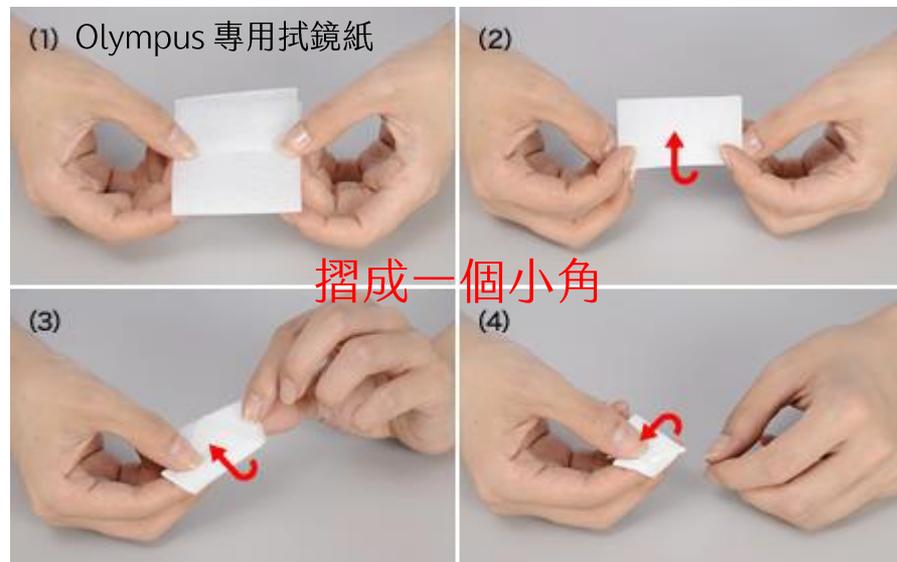


油鏡清潔步驟

請使用專用拭鏡紙，不可以用 Kimwipes !

60X 矽油鏡

- (1) 先用一張拭鏡紙將大部分的油帶走
- (2) 取一張**新的**拭鏡紙摺成有一個小角
- (3) 小角的部分沾取少量的**95%酒精**
- (4) 從鏡頭的中心**由內向外**做螺旋狀的擦拭將鏡油帶出鏡頭
- (5) 取一張新拭鏡紙檢查是否有擦乾淨



點油時建議：

將鏡油輕輕擠出一滴，靠近油鏡最上端讓它吸附上去，**一滴即可不要過量**，過量不好清理且可能會流到鼻輪上。



Olympus
矽油鏡專用油



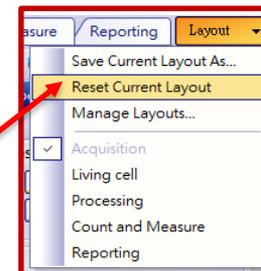
此為示意圖，
請勿將鏡頭拆下！

倒立式顯微鏡 Olympus IX83



關機順序

離開前請務必確認所有電源已依序關閉，
並確實記錄所用鏡頭倍率。



⑧ 關閉軟體與螢幕 關閉前請先至右上角 [Layout ▼] Reset Current Layout 重設版面



⑦ TPC 觸控面板 面板左/右上角選擇 OFF 關閉 → 畫面出現 Olympus 時按一下後方按鈕



⑥ 關閉 LED 螢光燈源

⑤ 關閉 CBH 顯微鏡控制

④ 關閉電動平台

③ 關閉 U-CBF 快速螢光轉盤

② 關閉電腦

① 關閉 EMCCD 電源 (Hamamatsu ORCA-Flash4.0 V3 灰階 sCMOS)



關閉 [活細胞溫控系統]

⑨ 旋緊 CO₂ 氣瓶黑色開關



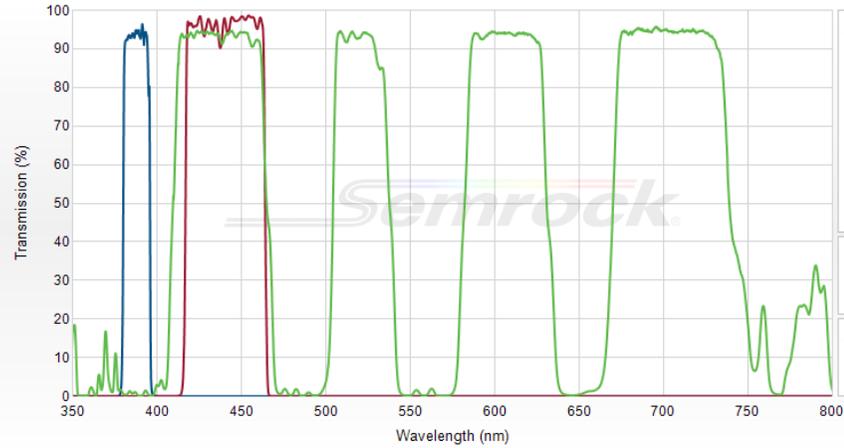
⑩ ⑪ 關閉培養溫控系統

若使用水浴內槽，排空水槽後請以95% EtOH 清潔，並用 Kimwipe 拭乾

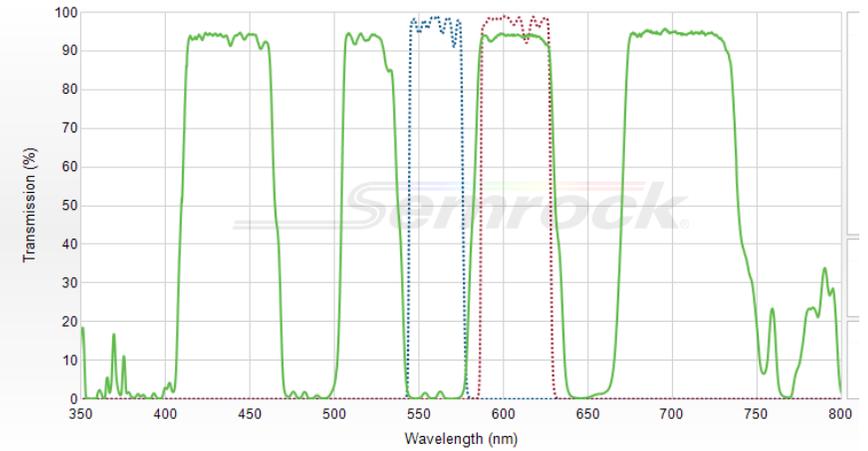
螢光濾片組-1

● Excitation
● Emission

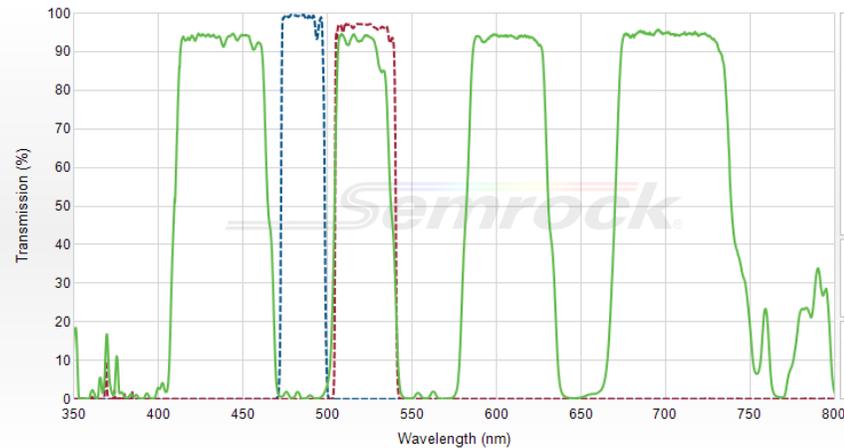
DAPI



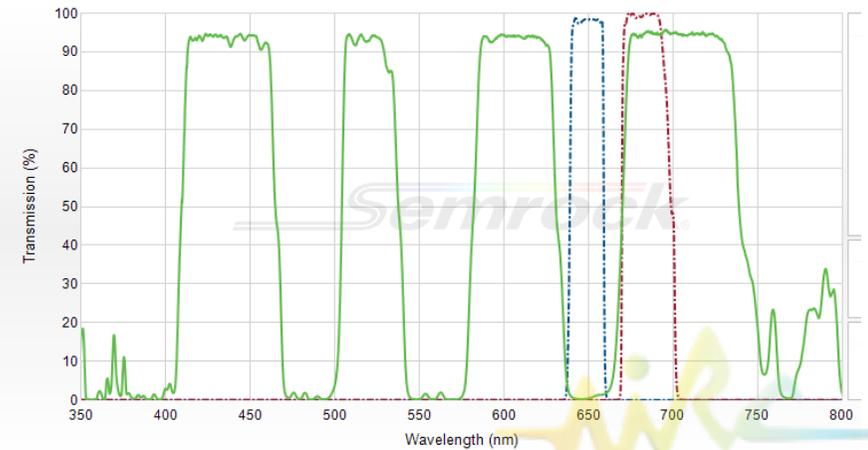
TRITC



GFP

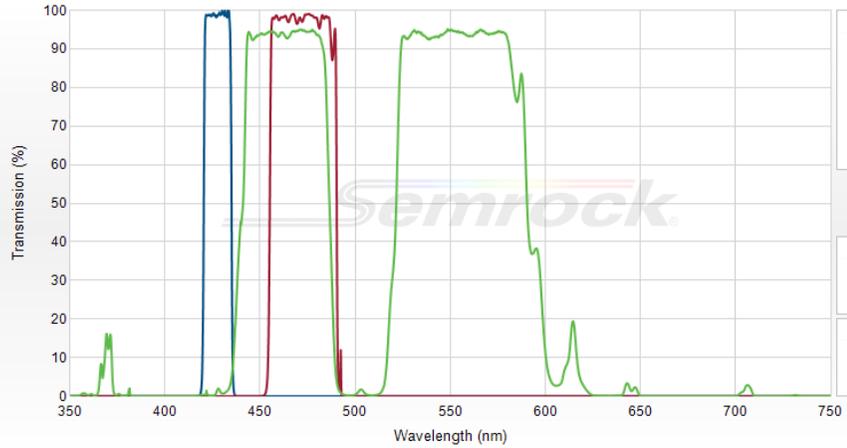


Cy5

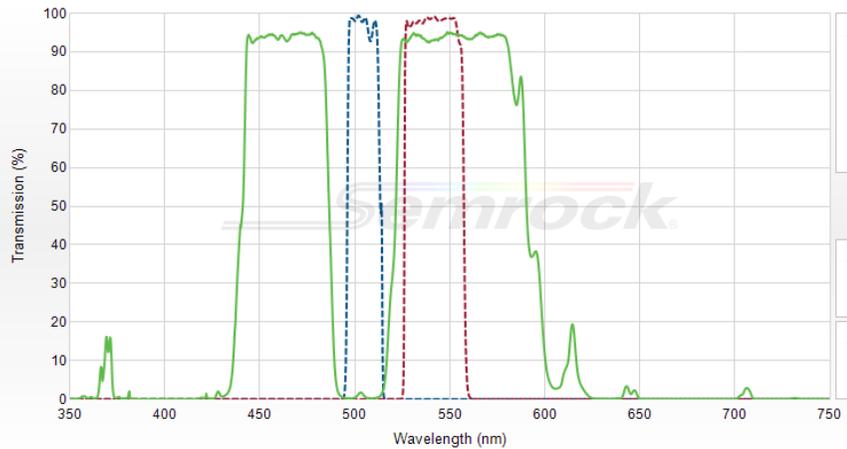


● Excitation
● Emission

CFP



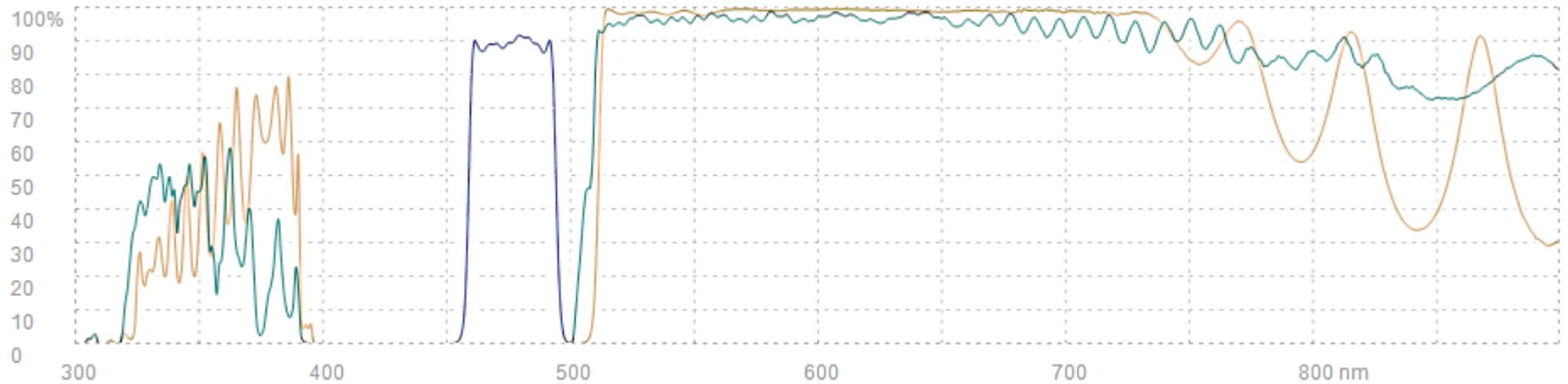
YFP



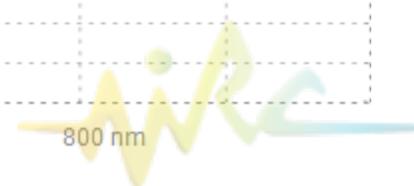
螢光濾片組-3

● Excitation
● Emission

➤ FITC-long



➤ mCherry



螢光燈源

X-cite[®] 120 LED Boost

