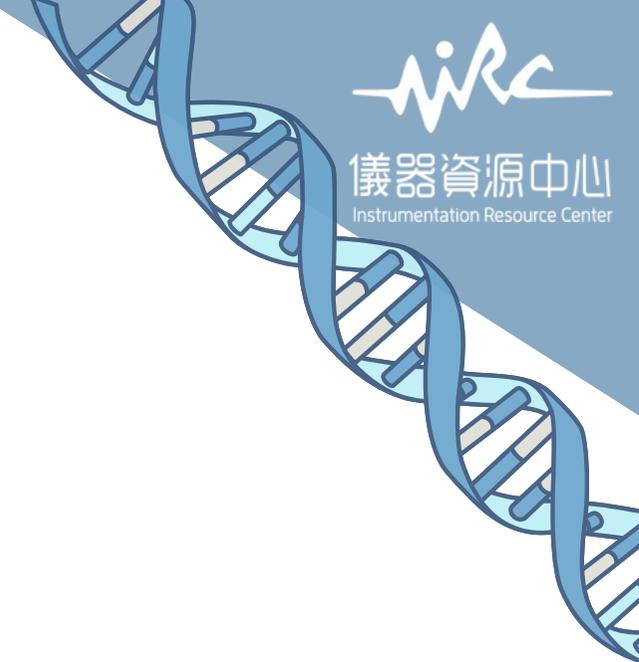


Olympus IX83

倒立式螢光顯微鏡

操作手冊



Index

基本操作	頁碼	基本操作	頁碼
開機	2	小型活細胞培養載台與清潔	16
樣品載具 Sample Holders	4	自動 Time Lapse拍攝 (XYT)	17
顯微鏡控制、螢光濾片	5	油鏡清潔步驟	18
快捷鍵功能 My Functions	6	關機	19
存檔－彩色/灰階圖檔	7	◆◆◆補充◆◆◆	
單張拍照 Snapshot	8	FV31S-DT Viewer 檔案輸出	20
Process Manager 介紹	9	Fluorescence Filter Sets	21
自動多色螢光拍照 Multi Channels (XYλ)	10	X-cite 螢光燈源	24
自動拍攝多點或拼圖 Stage Navigator - 玻片樣品或35mm Dish	11	黑白圖片疊圖套色 Combine Channels	25
自動拍攝多點或拼圖 Well Navigator - 多孔盤或 chamber slide	13		
自動Z層拍照 Z-Stack (XYZ)	14		
Z層疊圖 EFI Processing	15		



倒立式顯微鏡 Olympus IX83

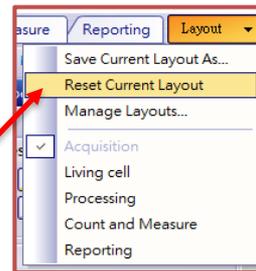
開機順序(1)



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 Stage 電動平台 電源開關在右後方，使用桌上搖桿控制方向
- ④ U-CBF 快速螢光轉盤
- ⑤ CBH 顯微鏡控制
- ⑥ LED 螢光燈源 隨開隨用
- ⑦ TPC 觸控面板 面板後側右上方按鈕按一下就好，待畫面顯示 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

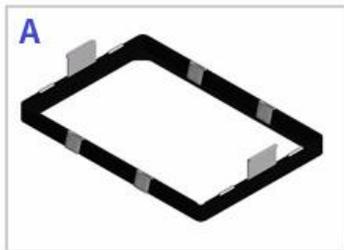
- ⑨ CO₂ 氣瓶 確認壓力值，僅需旋轉黑色開關
- ⑩ 小型培養載台 Stage top incubator
- ⑪ 外罩溫控黑箱 Thermo Box (拍72小時內不用開)



內圈1~2 Kg/cm²

樣品載具 sample holders

實驗前請務必先與管理員確認所用載具是否適用於 IX83，以免無法拍攝並造成儀器損傷！



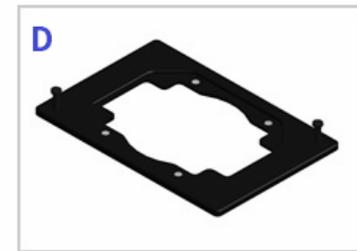
ATX-W
For Well Plate



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：

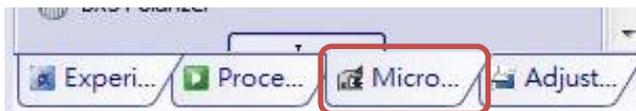
B. 通用夾具：chamber slide/slide glass/chambered cover glass

C. 培養皿：35/50/60mm culture dish

D. 玻片：標準 76mm*26mm

建議使用 0.17mm 玻璃底
或 1.0mm 塑膠底

顯微鏡控制



➤ 鏡頭倍率

關機前請切回 4x 鏡頭

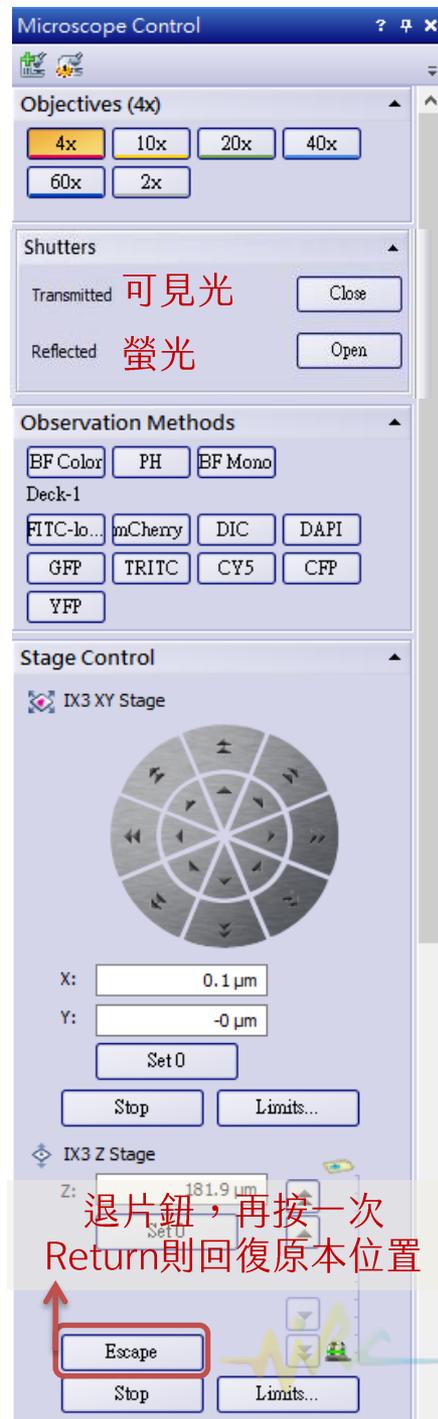
注意！60X為矽油鏡，

如需使用請事先通知管理員！

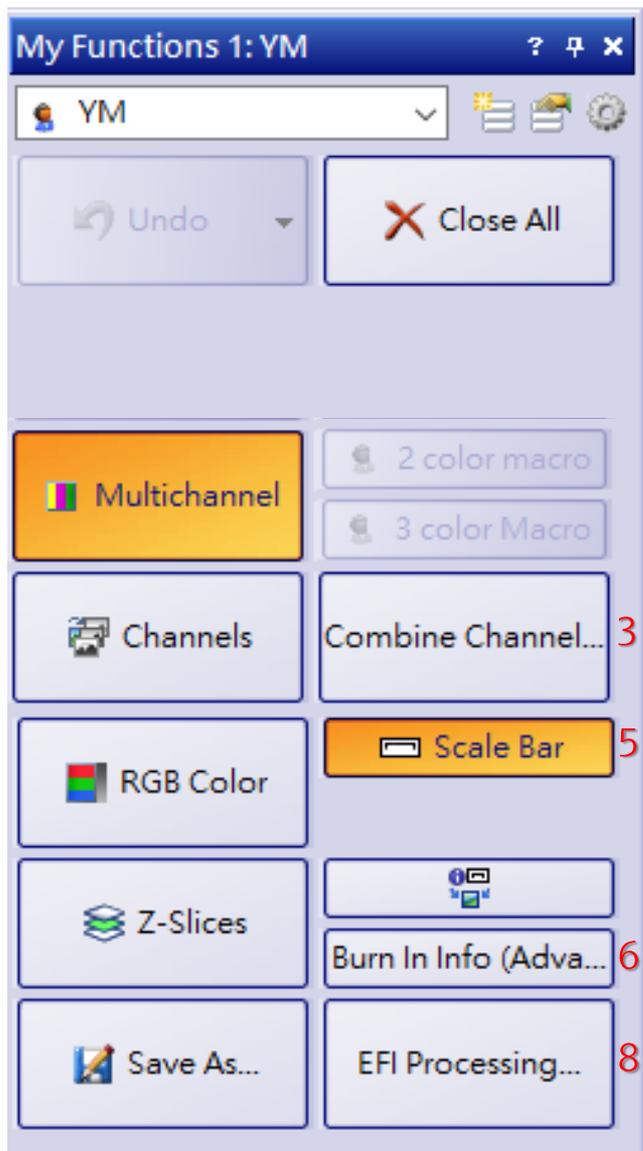
➤ 觀察模式 Observation Methods

按鍵名稱	Excitation filter	Dichromatic Mirror	Emission filter
BF color	可見光，彩色明視野影像，Camera 會自動切換至 SC180		
PH color	可見光，彩色相機拍相位差，Camera 會自動切換至 SC180		
PH	可見光，灰階相位差影像		
BF Mono	可見光，灰階明視野影像		
FITC-long	480/40	505	510IF
mCherry	575/20	595	645/90
DIC	可見光，灰階微分干涉差影像		
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

多色螢光拍照建議使用這組快速轉盤



快捷鍵功能介紹 My Functions



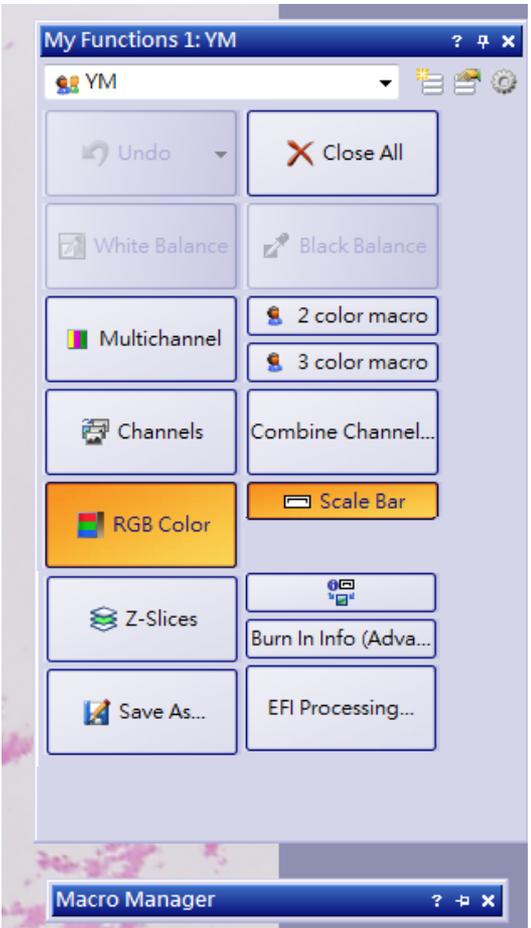
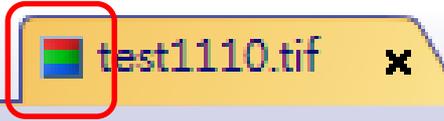
	快捷鍵		說明
1	Multi Channel		此圖為多頻道圖檔，可拆色得到各色圖檔
2	Channels	RGB 拆色	Separate Multi-channel 圖片拆色，拆色後為 16-bit 灰階圖檔
3	Combine Channels	灰階圖檔 疊圖套色	疊圖套色後為 24-bit 彩色圖檔，詳見補充說明
4	RGB Color		按下後將檔案轉成 24-bit 彩色圖檔
5	Scale Bar	顯示尺規	勿改格式
6	Burn In Info	畫尺規	注意！畫上後無法修改！ (不要勾選 resample!) 畫完請另存新檔，不要覆蓋原始檔
7	Z-Slices	拆開 Z-Stack	將 Z-Stack 影像拆開成單層 Z 圖檔
8	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>
9	Save As...	另存新檔	建議存.tif 或 .vsi



存檔格式—彩色/灰階圖檔

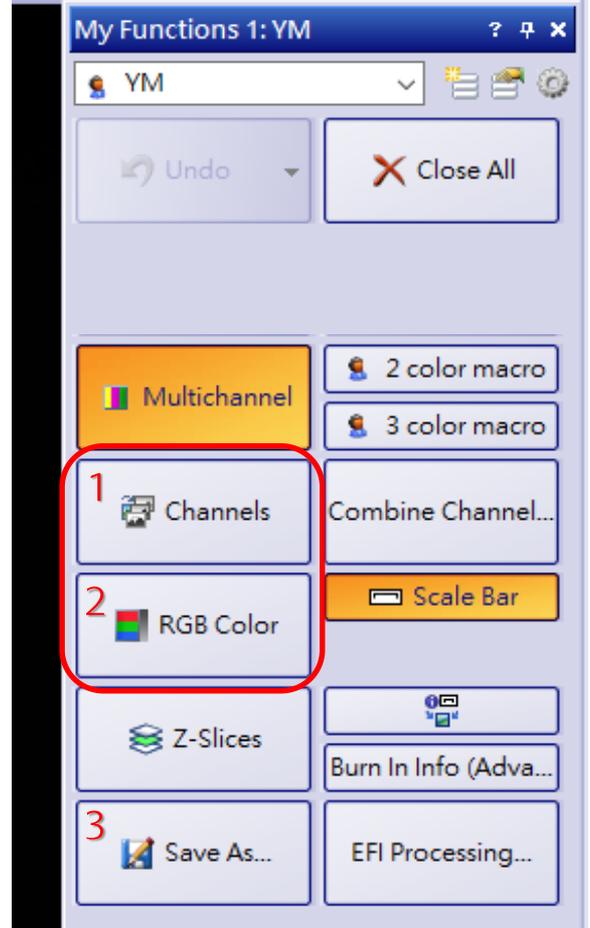
➤ 彩色圖檔 (24-bit)

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

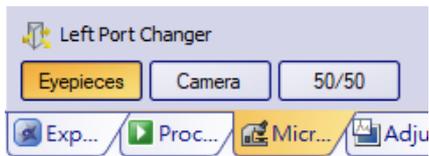
➤ 1. Channels:
Separate Multichannel 圖片，
拆色後為 16-bit 灰階圖檔

➤ 2. RGB color:
將灰階圖轉成彩色圖檔 (24-bit)

➤ 3. Save As...
將轉好的圖檔另存新檔 (.tif)

單張拍照流程

1. 設定鏡頭倍率
2. 選擇觀察模式 (BF, DIC 或螢光)
3. 確認分光與相機

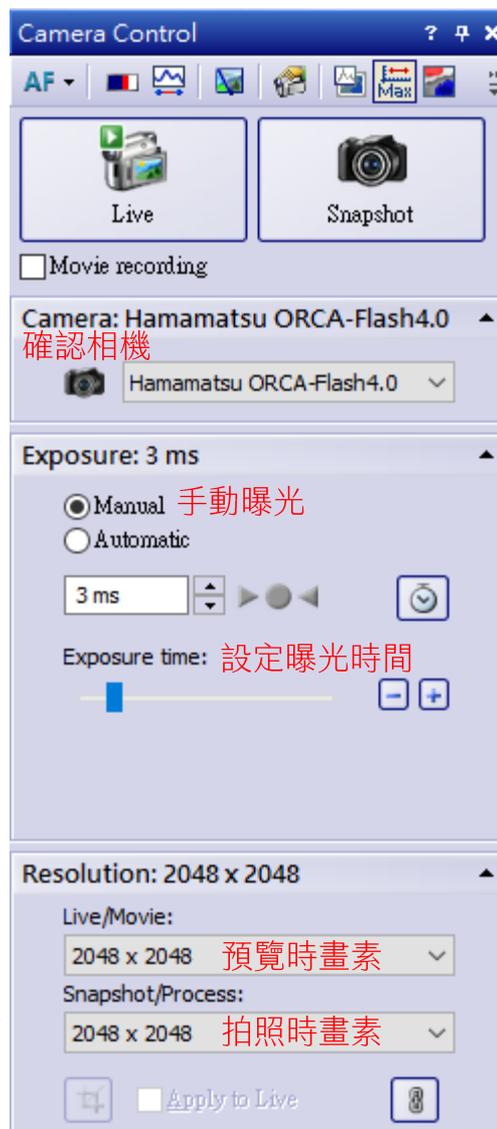


Microscope Control →→

Observation Methods	分光 Left Port Changer	相機 (會自動設定)
BF color, PH color	Eyepieces 或 50/50	SC180
BF mono, PH, DAPI, GFP, etc.	建議選 Camera	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，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



The screenshot displays the OLYMPUS cellSens Dimension software interface. The main window shows a live microscopy image of cells with yellow and green fluorescence. The Process Manager panel on the right is highlighted with a red box and contains the following elements:

- Start/Stop buttons:** A green play button labeled 'Start' and a grey square button labeled 'Stop'.
- Camera and Resolution settings:** Camera: Hamamatsu ORCA-Flash4.0, Resolution: 2048 x 2048, HDR: Disabled.
- Process Mode Selection:** Radio buttons for 'Automatic Processes' (selected) and 'Manual Processes'.
- Feature Icons:** A row of five icons: a multi-colored circle (Multi-channel), a stack of layers (Z-axis), a grid with a central point (Multi-point), a stopwatch (Long exposure), and 'AF' (Auto-focus).

The left sidebar contains various acquisition parameters:

- Exposure:** 3 ms, Manual mode selected.
- Resolution:** 2048 x 2048.
- HDR:** Disabled.
- Pixel Clock:** 400 MHz.

The bottom status bar shows 'Ready' and a zoom level of 37.2% (7.44x).

Automatic Processes **請點選自動模式**

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**

AF

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

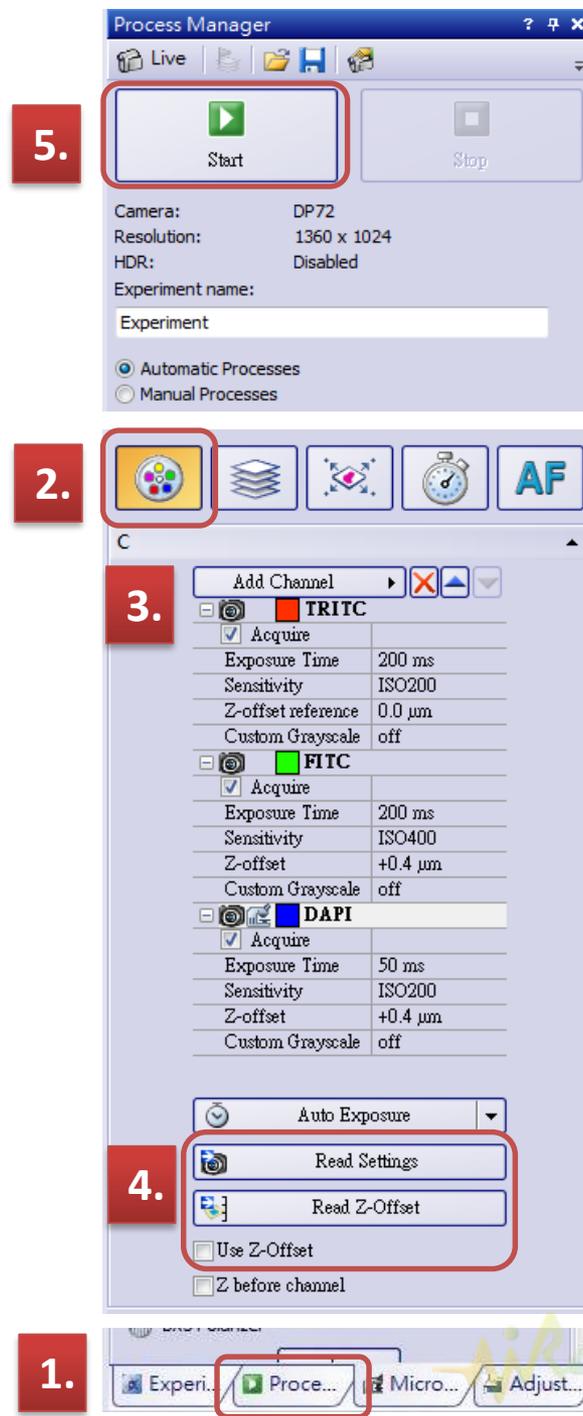
每個 Channel 分別設定曝光時間

✧ 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) 於開始拍攝前選取 Use Z-offset

5. 按 Start 開始自動拍攝

➤ 可搭配 Multi-Position 或 Z-stack 使用



自動拍攝多點或拼圖 Stage Navigator

Multi Position(1) 玻片樣品或 35mm Dish

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 (若無合適的請洽中心人員協助)

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

 Add position 設定單點位置

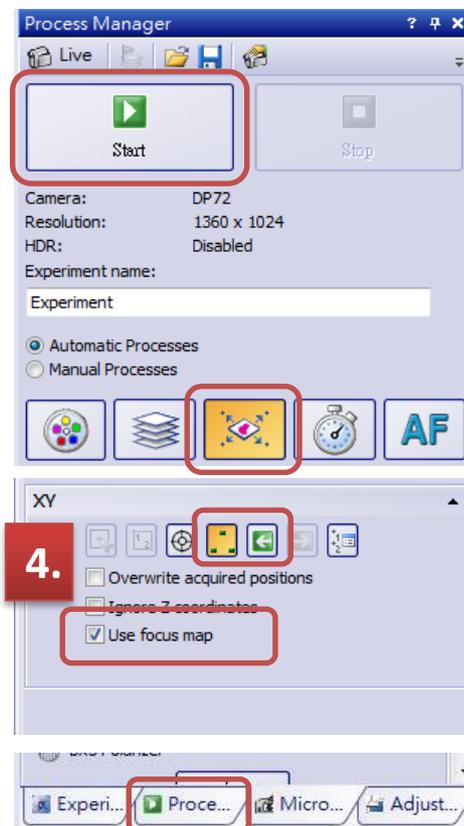
 Select 可點選後修改調整或刪除

4. (Optional) 設定 focus map 

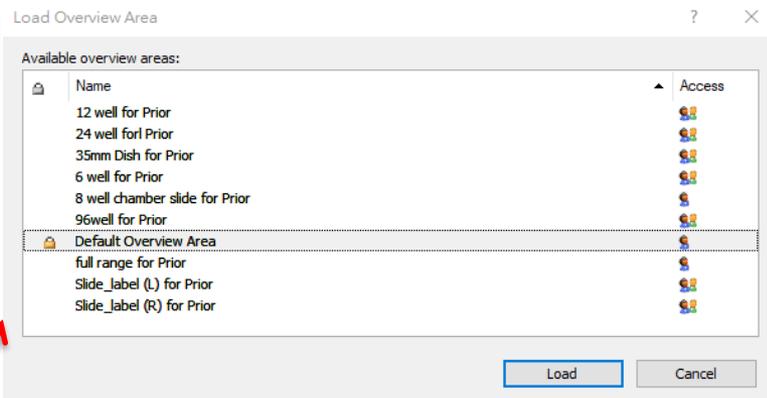
5. 按 Start 開始自動拍攝

➤ 可搭配 Multi-Channel 或 Z-stack 使用

5.



3.



自動拍攝多點或拼圖 - Well Navigator

Multi Position(2) 多孔盤或chamber slide

1. 軟體右下角 Process Manager 選單



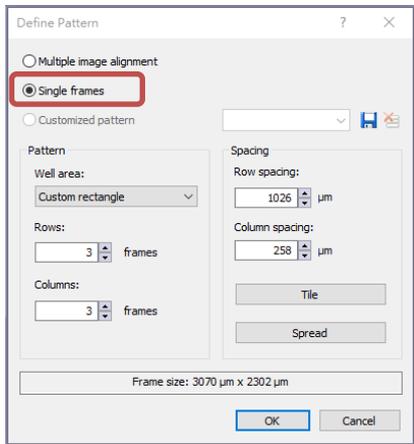
2. 選擇 Multi Position 功能



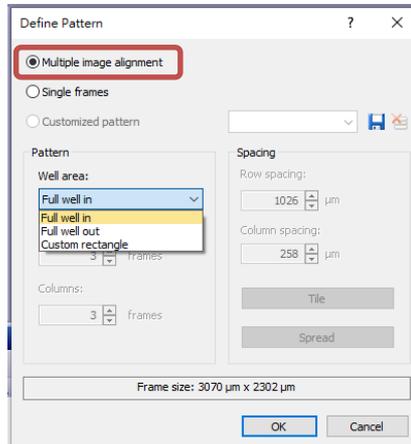
3. Well Navigator 設定位置

① Load Overview Area

② Define Pattern 設定每一個 well 要拍的範圍或位置

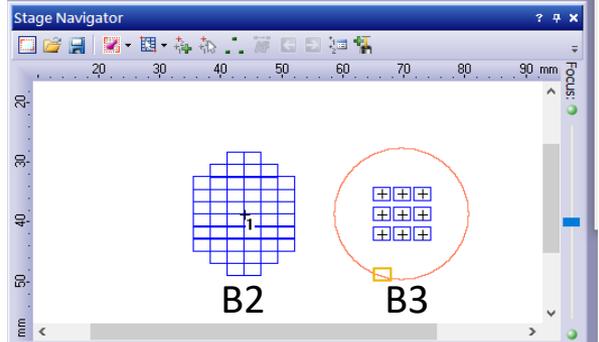
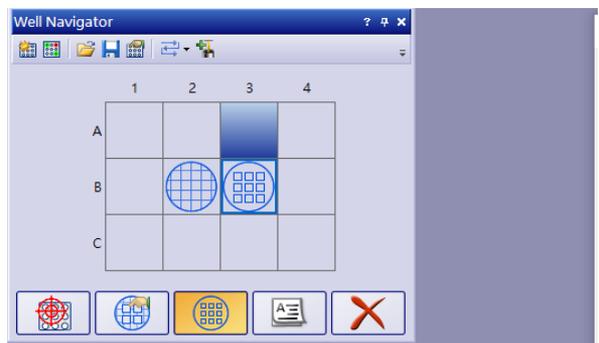
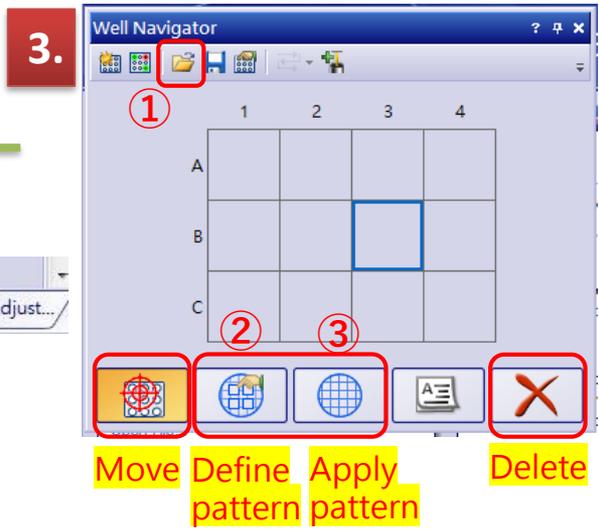


Single frame: 單點或多點
可設定分布方式與 spacing



Multiple image alignment:
拍拼圖，可選涵蓋 well 內/外
或自訂 row x column

③ Apply Pattern 設定要拍哪些 well



範例：
B2: Multiple image alignment + Well-in
B3: single images + 3x3 + 設定 spacing

自動拍攝多點或拼圖 - Well Navigator

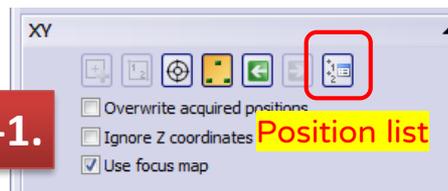
Multi Position(2) 多孔盤或chamber slide

4. 利用 Position List 移動到每個位置



Update XY / Update Z

4-1.



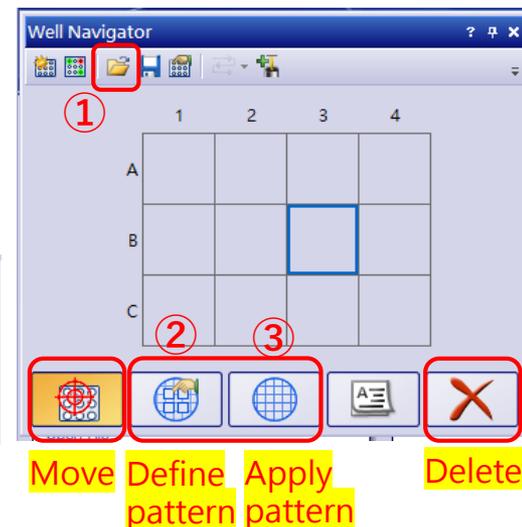
Position list

5. (Optional) 若拍攝活細胞Time-lapse，建議搭配 AF

功能設定ZDC 穩定焦距

6. 按 Start 開始自動拍攝

➤ 可搭配 Multi-Channel, time-lapse & AF



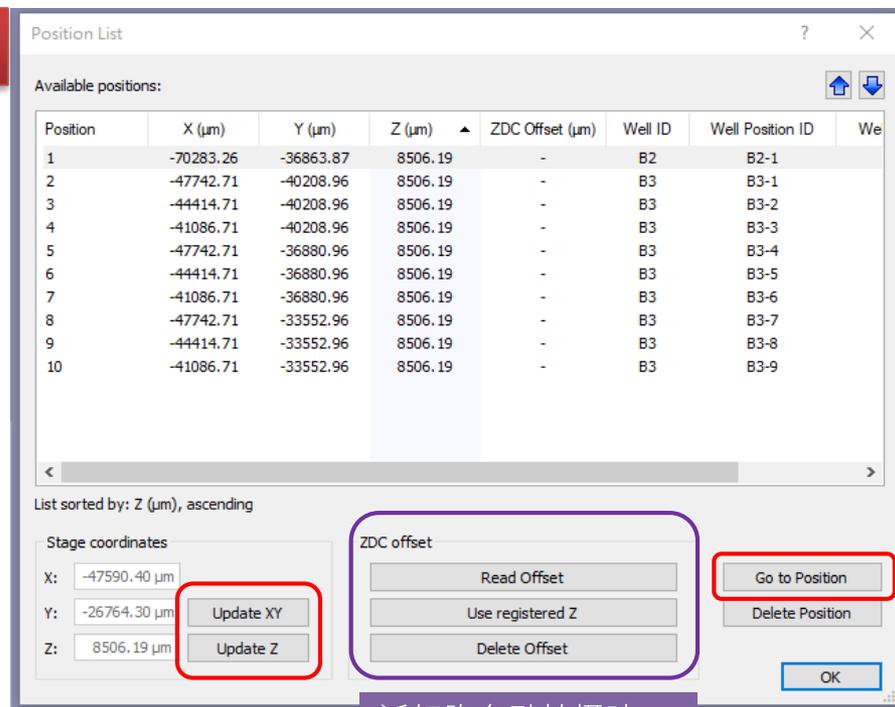
Move

Define pattern

Apply pattern

Delete

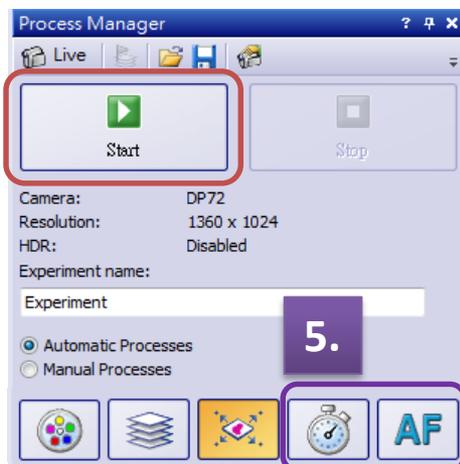
4-2.



活細胞多點拍攝時，
才須設定 ZDC offset



6.



5.

活細胞縮時攝影時，
建議搭配 AF (ZDC)

自動 Z 層拍照

Z-Stack

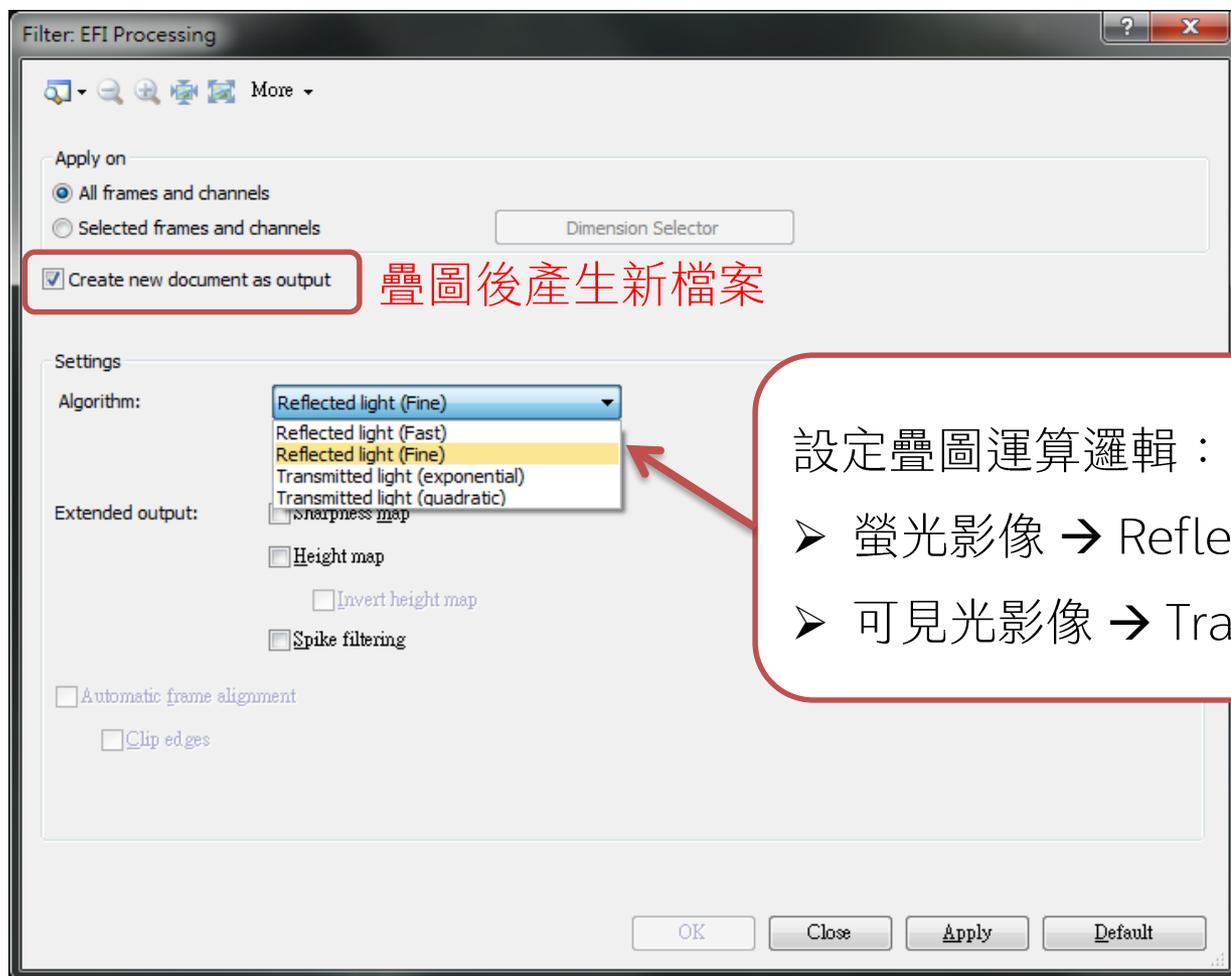
1. 軟體右下角進入 Process Manager 選單
2. 選擇 Z-Stack 功能
3. Live 調整調節輪將焦距上/下移至離焦位置，分別 [Set] 樣品厚度上/下限
4. 設定 Z 層間距以計算總切層數
 - ✧ 分別 [Go] 確認樣品上/下限位置
 - ✧ 建議勿勾選 Extended Focal Imaging，若 只會得到一張所有 Z 層疊合之延長景深影像，可拍完 Z-stack 後使用快捷鍵 [EFI processing..] 疊合。
5. 按 Start 開始自動拍攝

➤ 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

活細胞培養系統 小型培養載台



玻璃上蓋請如圖轉開，
絕對不能直接拔開！

- 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

Shut down



① 排水後先擦乾，
以少量酒精清潔

Use soft cloth to remove remaining water & use a small amount of ethanol with soft cloth (Kimwipe) to wipe after

Shut down



② 用Kimwipe仔細
將水槽擦乾

Finally wipe it again with dry cloth. Keep the Water Bath completely dry condition.
CAUTION!! the remaining water can result in molt, breeding of bacteria

Shut down



③ 以少量酒精小心
清潔載台玻璃上蓋

Hold the frame and clean Top Heater with soft close + ethanol.
NOTE: clean it gently to prevent breakage (Top Heater is made of glass).

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
若拍攝時間少於72小時，不須開啟 ⑪



Process Manager 介紹-XYT拍攝(曠時攝影)

OLYMPUS cellSens Dimension

File Edit View Acquire Image Process Measure

Camera Control

Live Snapshot

Camera: Hamamatsu ORCA-Flash4.0

Exposure: 100 ms

Resolution: 2048 x 2048

HDR: Disabled

Note

Pixel Clock

Hamamatsu ORCA-Flash4.0

Camera Control Position List Vi...

Ready

AF

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

Acquisition Well Navigation Processing Count and Measure Reporting Layout

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

2180910 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:

Experiment

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)

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

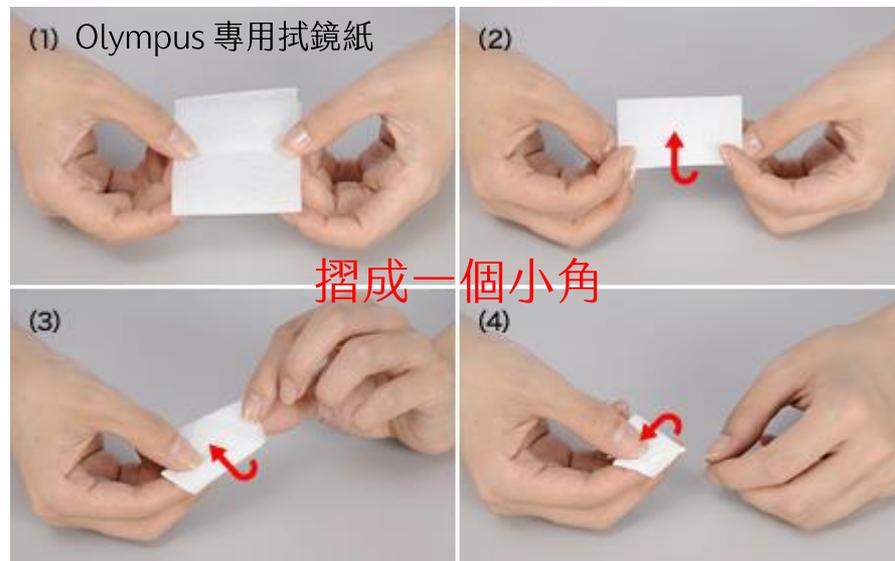
3.在此可得到總拍攝時間

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。



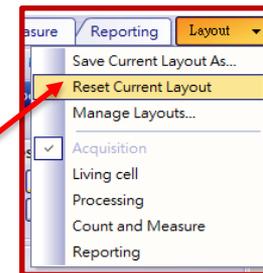
Olympus
矽油鏡專用油



倒立式顯微鏡 Olympus IX83

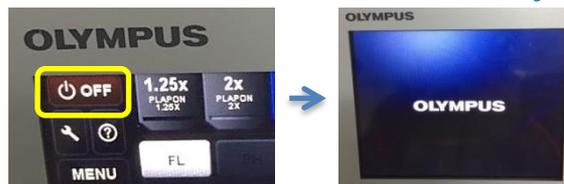
關機順序

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
鏡頭請切回 4X，並將鏡頭 Z 降到最下面

- ⚠ 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 U-CBF 快速螢光轉盤

- ③ 關閉電動平台

- ② 關閉電腦

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



關閉 [活細胞溫控系统]

- ⑨ 旋緊 CO₂ 氣瓶黑色開關

- ⑩ ⑪ 關閉培養溫控系统



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

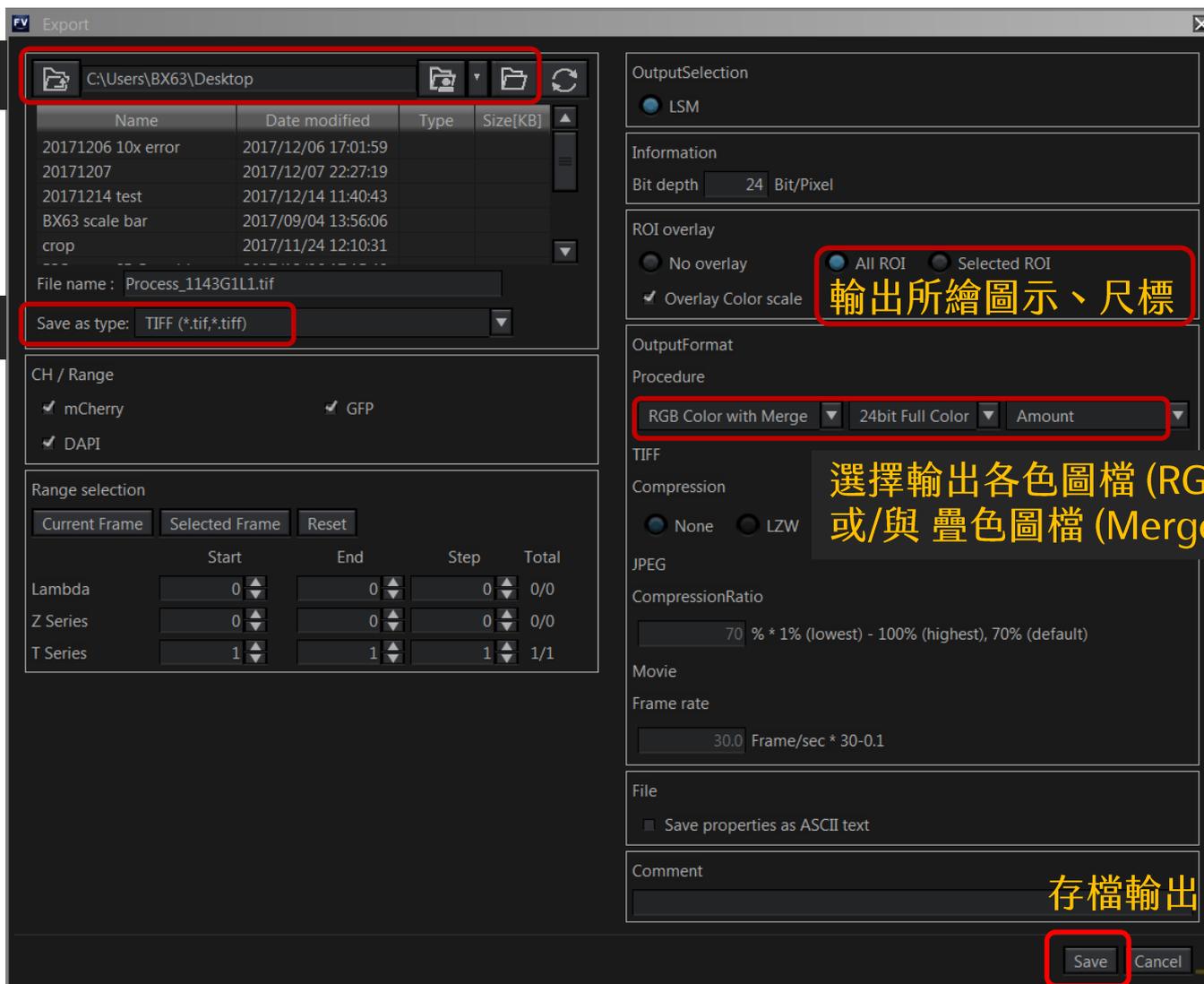
使用軟體輸出圖檔 FV31S-DT



(64-bit 電腦可安裝)

➤ 開啟 Multi Channel 之 .vsi 或 .tif 圖檔 → 滑鼠右鍵點選 Export

存檔位置



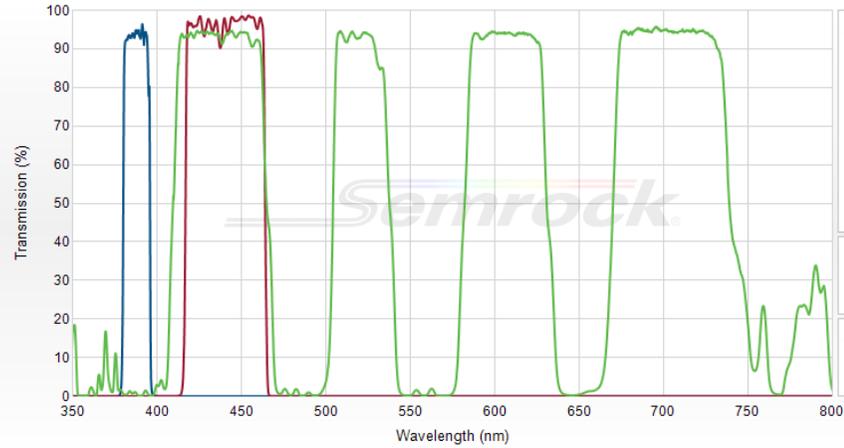
建議選存 .tif檔



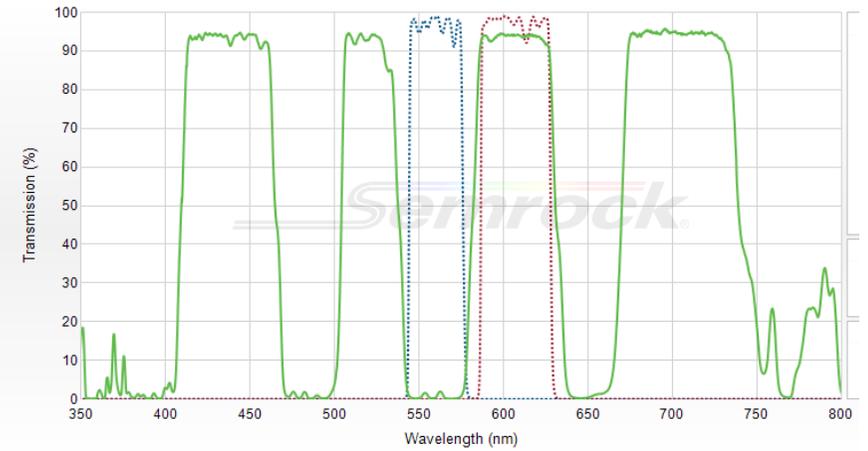
螢光濾片組-1

● Excitation
● Emission

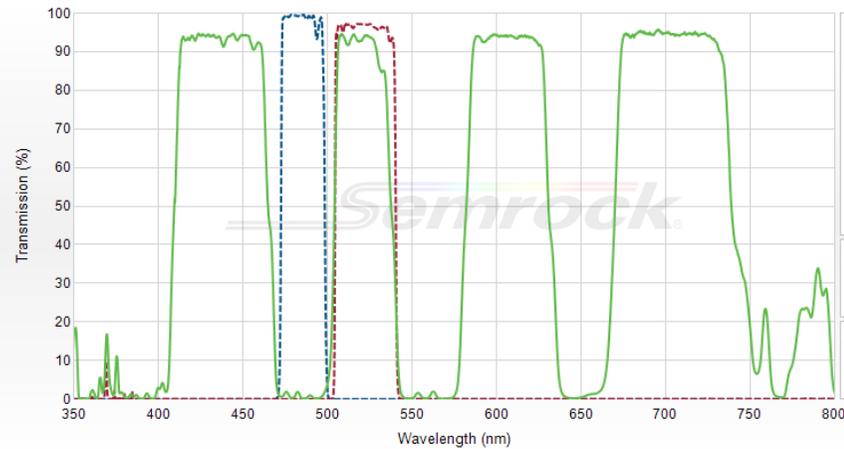
DAPI



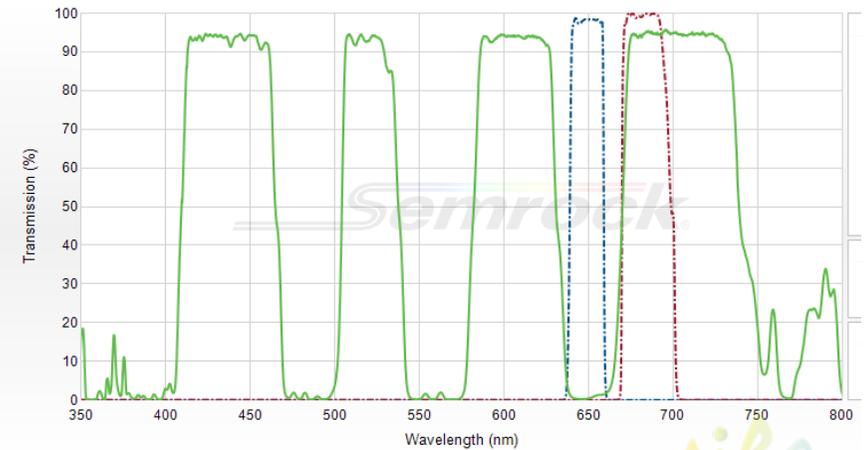
TRITC



GFP



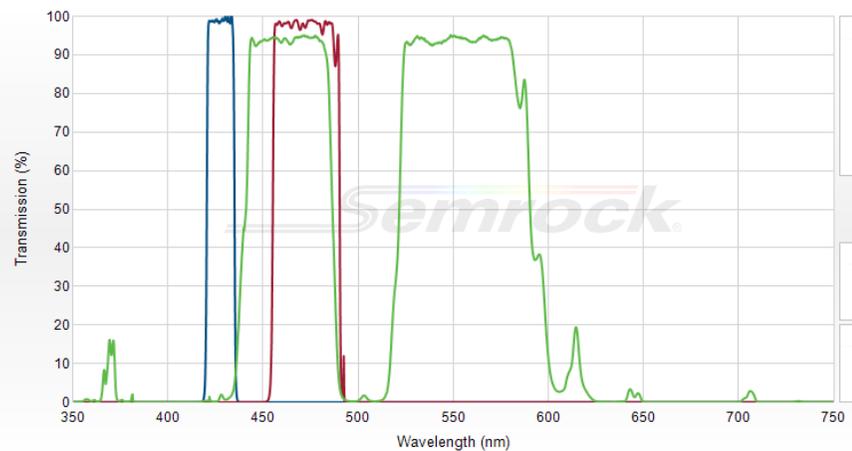
Cy5



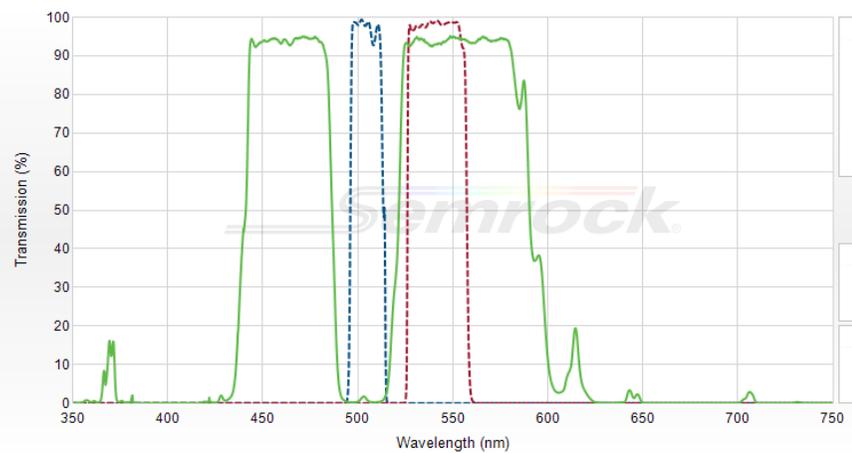
螢光濾片組-2

● Excitation
● Emission

CFP



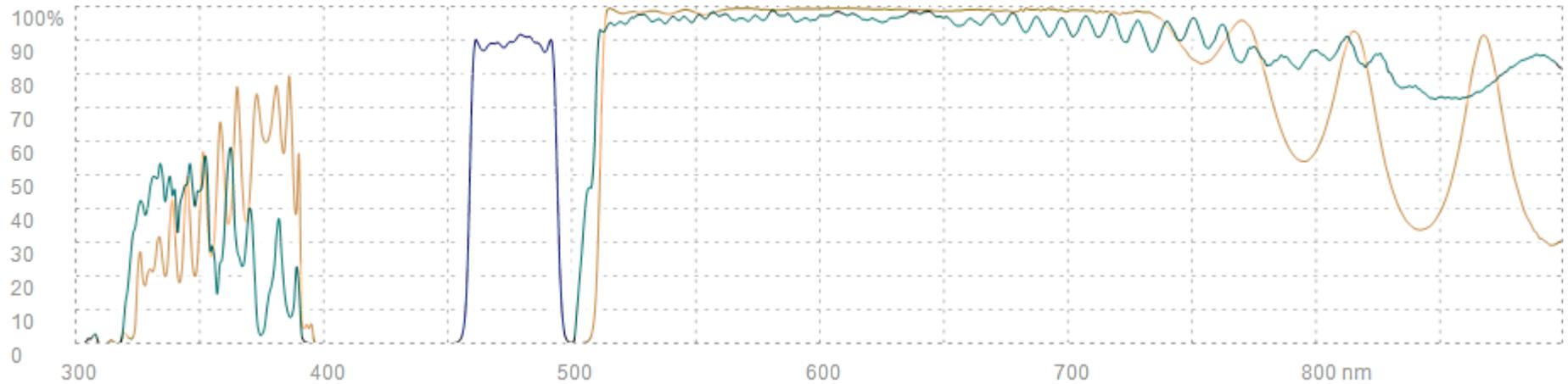
YFP



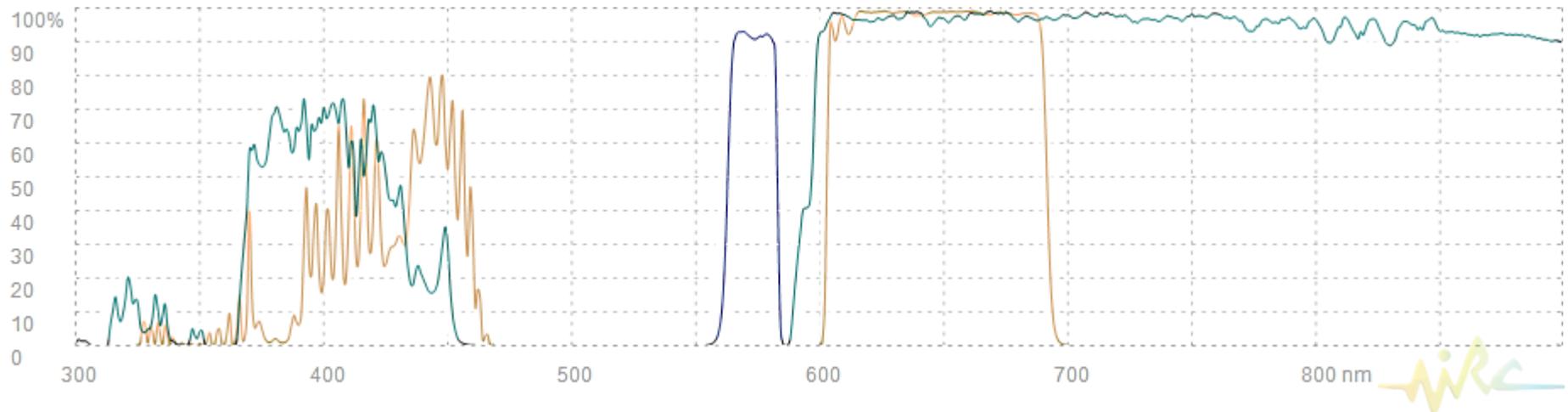
螢光濾片組-3

● Excitation
● Emission

➤ FITC-long

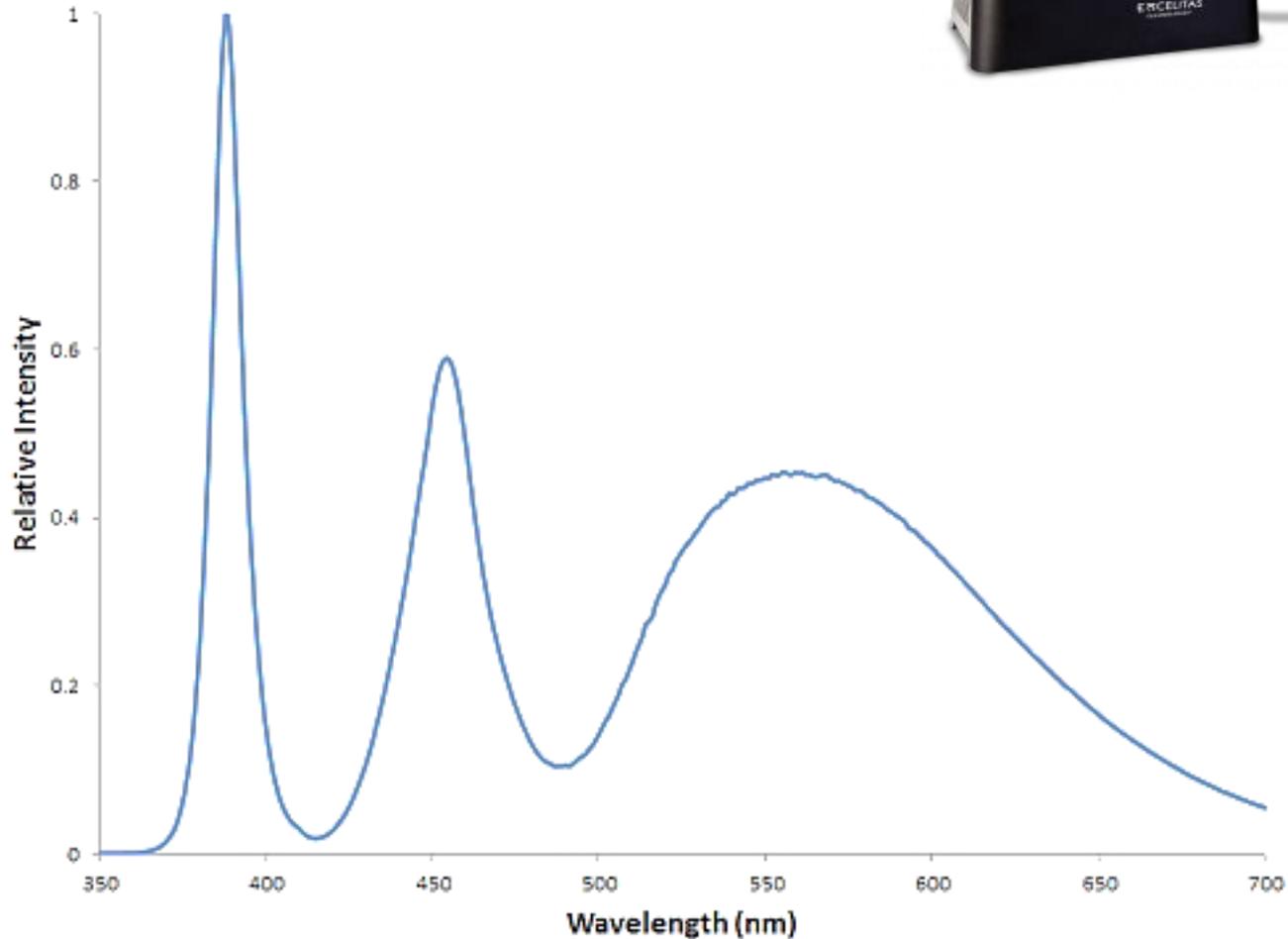


➤ mCherry



螢光燈源

X-cite® 120 LED Boost



黑白圖片疊圖套色

事前將黑白圖片放至到軟體中且要同畫素同Bit數否則無法疊圖

25

1

2

在此用滑鼠選擇所要疊圖的圖片

微調偏移位置

影像強度調整

套色後轉換成彩色圖片

選擇所要套用的顏色

可套用一張黑白穿透光影像 (DIC / PH / BFmono)

OK Cancel Apply

① 在軟體上方點選 Image

② 下拉式選單選擇 Combine channels

確認設定無誤後
點選 OK 即完成