

蔡司共聚焦显微镜软件操作培训

中国科学技术大学 生命科学实验中心 刘振邦 2020.04.15









说明: 1、总开关 2、系统PC开关 3、硬件开关 4、硬件连接钥匙

- 5、激光器开关 6、激光器输出钥匙 7、电压调节开关
- 8、X-Cite光源开关 9、电脑

注意事项:关机时反向关闭第6步钥匙关掉后等5分钟(激光器冷却) 再继续往下关机。





二. 启动LSM710程序

1. 双击桌面 "LSM710"图标



2. 然后再点击 "Start system",进入软件的操作界面。







三、观察样本

- 1、点击"Ocular"菜单下的 "online";
- 2、转换光源、滤光片及物镜,把 显微镜调到合适的观察模式上。
- 3、使用显微镜调节焦距观察标本







三、观察样本-触摸屏控制











2、调用预设通道





3、手动设置通道

Channels			🗸 Show all 📑
Tracks	Channels	;	
✓ PI	PI		
Track3	Ch1		•
✓ Track1	Ch1		•
		Select all	Unselect all
Track3			
Lasers 405 458 48	1 38 514	543 594 633	750
488 nm		-0	3.500
Pinhole —			45.4 🗘
1.33 Airy Units = 14.3	3 µm section		1 AU max
Ch1 Gain (Maste	er) —		562 🗘
Digital Offse	t —	0	0 \$
Digital Gain	_		5.4

手动设定接收光范围 🔳 Light Path Show all LSM Non Descanned Channel Larr la Mode **Online Fingerprinting** Track1 400 500 600 700 Color Detector Range Use Dye \checkmark 🕶 📕 💌 Ch1 413 - 468 nm 🕶 🔲 💌 Ch2 415 - 735 nm 🕶 🔲 💌 Ch3 415 - 735 nm Reflection _ MBS 488/543 *O* MBS 458 D MBS 458/514 MBS -405 0 *Image MBS* 458/543 MBS 458/514/594 Plate Rear *MBS* 488 None *O* MBS 488/543 Ø MBS -405 // MBS 488/594 O MBS -445 MBS 488/543/633 / MBS 690+ MBS T80/R20 1 @ MBS 760+ Plate Ratio MBS -405/760+ MBS -445/760+ + Q_ MBS T80/R20



4、通道参数设定

Channels			🗸 Show all 📑
Tracks	Channels		
✓ PI	PI		
Track3	Ch1		•
Track1	Ch1		— •
		Select all	Unselect all
Track3			
Lasers 405 458 48	1 8 514	543 594 633	750
488 nm		-0	3.500 🗘
Pinhole —			45.4
1.33 Airy Units = 14.3) µm section		1 AU max
Ch1 Gain (Maste	r) —	-0	562 🗘
Digital Offse	t —	0	- 0 🗘
Digital Gain	—	-0	5.4

点击"Channels"按钮,调节下列参数: Pinhole - 该值增加,光通量增加,图像亮度上升、 信噪比变好;但因光学切片变厚,Z轴分辨力 下降,清晰度下降。通常该值在1~3AU之间; Gain (Master) - 该值增加, 图像对比度上升, 过高则信噪比下降, 图像粗糙。通常Gain值 在500~700之间; Digital Offset - - 背景扣除, 但标本信号也有一 定程度的扣除,需要调节其它参数来弥补。背 景过分消除会导致图像失真; Digital Gain - - 增大信号都增强, 噪音增强较弱, 该Gain值在1-5之间调整对亮度有提升; 激光强度 - - 激光调大, 图像整体亮度上升, 信噪 比变好,但是容易淬灭。在保证图像质量的前 提下,激光强度越低越好。



五、明场通道设置

Light Path		🗸 Show all 📝								- 1
LSM		Non Descanned	💌 📐 Cha	nnels					✓ Show	all 🛃
Channel	Lambda Mode	Online Fingerprinting	Tracks		Cha	nnels				
Track3			Traci	3	Ch1				Ľ	-
					TP	MT			Ľ] 🕶
						C	Select	t all	Unselec	t all
			Track3							
400	500 600	700	Lasers	05 458	✓ 488 :	514 54	3 594	633	750	
400			488	nm —)	20.000	•
Use Dye	Color Detec	tor Range +	Pinhole	-	0				- 75.7	•
\checkmark	👻 📘 👻 Ch1	500 - 572 nm -	2.38 Ai	y Units =	4.2 µm se				1 AU I	max
Π	🔻 📘 👻 Ch2	415 - 735 nm	Ch1	Gain (Ma	ster)				620	
	▼ ■ Ch3	415 - 735 nm	Giri	Diaital Of	leat			0	020	
	Ref	lection		Digital Cr	isci.				0	
MBS 488/543				Digital Ga	3111	0-			4.0	•
e	5		T PMT	Gain (Ma	ster)	0			0	•
Plate	2	Invisible light		Digital Of	fset			-0-	- 0	
Rear	2		1	Digital Ga	ain	-0			1.0	•
		/	► t≠ Foc	IS					 Show a 	al 💽
<	Stage Focus		🕨 🗢 Stag	e					✓ Show a	all 🛃
			# Multidim	ensional A	cquisitic	on				
Ratio			🕨 <u>i</u> Info	mation On	Experi	ment			✓ Show (al 📝
				Save					Show a	
PU 100 %	Free HD 0.24 TB									



六. 扫描参数的设置

Acquisition Mode		✓ Show all	1	28 x 128
Objective EC Plan-	Neofluar 10x/0.30 M27		2	256 x 256
Scan Mode Frame			-	40 - 540
Frame Size X 512		Y 512 🗘	3	12 X 512
Line Step 1	P	Optimal	1	024 x 1024
Speed		Max	2	.048 x 2048
Pixel Dwell 1.58 µsec	Scan Time 2.90 se	c	4	096 x 4096
Averaging			6	6144 x 6144
Number 1	Bit Depth	8 Bit 🔻		
Mode Line	- Direction	-> ->		
Method Mean				
		26	1	
			2	
Scan Area			4	
	mage Size: 848.5 µr	m x 848.5 µm	8	_
F F	Pixel Size: 1.66 µm	n li	16	5
•	→	0.0 🗘 C		
		0.0 🗘 C		
	ть			
	200m ()			
		Reset All		

1、从"Frame Size"栏中选择图像的大小 (e.g : 512x512 or 1024x1024or.....) 2、从"Scan speed"栏中选择扫描速度

(一般情况下,预览扫描速度数值设定为9, 正式出图时设定为4~7)。

3、"Number"栏中选择扫描时采用几次 平均 (一般情况下,快速扫描采用一次平 均;正式出图时,4次平均的图像质量已经 可以接受)。

4、扫描时间和速度:时间长、速度慢,图 像信噪比好,清晰度高。但是耗时,易淬 灭。





七、图像扫描及优化

1.	击点	"Ocular"	菜单下	的 "of	ffline"		
			Eile Acquisition	Maintain Macro T	ools View Window	/ Help	
			1	\$		E I	
			Co Ocular	Acquisition	FCS	Processing	Maintain
			? Online	Ç Offline	Fluorescend	ce Shutter Or	n Shutter Off

FITC/GFP

Assign

2. "Acquire"菜单将仪器切换到扫描模式,点击"Acquire"界面下的 "Live"按钮连续扫描图像。

DIC

Rhodamin

DAPI

EN ZEN 2010					
ile Acquisition Maintain Mac	ro Tools View Windo	w Help			
💼 🖺 🎄 👘					
	4				
Ocular Acquisition	FCS Proces	ssing Maintain			
			×		
★ Smart Setup ✓ Sho	w manual tools				
		o (1	
New Auto Exposure	Live Co	ntinuous Snap		/	- iteration



七、图像扫描及优化

3. 连续扫描下微调焦距, 点击右图红圈所示色条区域查看图片质量

如右图所指示的图像中的红点表示信号饱和, 蓝点表示信号为零。



4. 在 "Channels" 界面下综合调节Pinhole、 Gain (Master) 、 Digital Offset、 Digital Gain和激光的强度的大小。

经过参数调节, 右图显示目标图像中有稀疏的红点, 背景中有纯净的蓝背景时图像质量比较如



八、三维成像的简单流程

- 选取三维结构的一个中间层面,优
 化各种参数设置。
- 2. 选择"Z-Stack"。
- 3. 点击"live",开始连续扫描。
- 向一个方向调节焦距至图像信号几 乎消失,点击 "set First",再向 相反方向调节焦距至图像信号几乎 消失,点击 "set Last"。
- 6. 点击"Stop",停止连续扫描。
- 根据需要从 "Slices" 栏中选择扫 描层数或者在 "interval" 中设置 层厚。
- 8. 点击"Start"开始扫描。
- 选择主菜单下的"3D"按钮,观 察图像。





九、时间序列及拼图

ZEN 2010 File Acquisition Maintain Macro Tools View Window Help Image: Construction of the structure of the	Cycles -0 Interval 0 Interval Time Marker Start End Pause	10 \$ 0.0 \$ msec •
Configuration 2channel	🛚 🔺 📷 Tile Scan	🗸 Show all 🏼
* Smart Setup Show manual tools Image: Show manual tools Image: Show m	TilesPixelsImage: StrapHorizontal31536Vertical52560	Size 1275.29 μm 2125.48 μm
 Z-Stack Time Series Bleaching Tile Scan Positions Regions Start Experimental 	Rotation 0.0000 🗘 ° Bi-directional	
	Scan overvier	w image

Time Series

Show all



十、关机顺序



关机时顺序相反

特别注意:6处的钥匙先转到垂直位置后,必须等待5-6分钟左右,待后部风 扇停转后再关闭5处及前面开关,否则会引起电源损坏。





十一. 注意事项

- 载玻片、盖玻片、培养皿一定要选择质量好、光洁、无杂质的, 以免产生荧光干扰。
- 好的图像,须使用高数值孔径的物镜,工作距离短,必须使用 玻璃底培养皿;或者盖玻片朝下、载玻片朝上,这就需要封片, 封片剂要干净,无自发荧光;
- 3. 贴壁细胞培养,需尽量避免培养液中的荧光标记物或荧光杂质 沉积在玻片或皿底,这会使图像的背景不纯,严重时,无法成 像;
- 4. 荧光标记的发光效率,特异性,直接影响成像信噪比,清晰度;





- 5. 组织切片样品,贴片要贴平,如有气泡,重叠,影响图像质量;
- 封片时,载玻片要放平,用力要均匀,保证载玻片、盖玻片呈平行 状态,避免因倾斜影响图像质量;
- 双光子成像,针孔是开到最大的,因此能够接收更多的荧光,具有 更好的成像质量。710显微镜可以在全波长实现双光子成像。另外, 710何880共聚焦显微镜配置有GaAsP NDD(超高灵敏度直接检测 器),具有极弱荧光的成像能力。
- 8. 油镜使用完毕,及时清洁;避免镜油透过物镜渗入显微镜光路。







激光的分类



潜在损害增强







- 激光等级介绍
- 1. 第I类激光产品没有生物性危害。任何可能观看的光束都是被屏蔽的,且在激光 暴露时激光系统是互锁的。
- 例如: CD-ROM 驱动器
- 2. 第II类激光产品输出功率小于1毫瓦。不会灼伤皮肤,不会引起火灾。由于眼睛 反射可以防止一些眼部损害,所以这类激光器不被视为危险的光学设备
- 例如:超市扫描仪
- 3. 第IIIa类激光产品输出功率1毫瓦到5毫瓦。不会灼伤皮肤。在某种条件下,这 类激光可以对眼睛造成致盲以及其他损伤。
- 例如:激光笔











- 第IIIb类激光产品输出功率5毫瓦到500毫瓦。这类激光产品明确定义为对眼睛 有危害,尤其是在功率比较高时,将造成眼睛永久性损伤。
- 例如: LSM用各类常规激光器



- 第IV类激光产品输出功率大于500毫瓦,非常危险!能灼烧皮肤和点燃衣物和 其他材料。
- · 例如: 双光子激光器







激光安全:

蔡司共聚焦LSM 系统在没有外加双光子系统 时有38类激光系统;当配备双光子系统,则 属于4类激光,尤其要注意激光安全!! 禁止任何人在没有授 权的情况下私自拆卸 或维修此系统!!!

Laser	Wavelength operated	Class	Nominal Power Laser head
Ar Gas Laser Lasos LGK7812 ML5 or ML8	458/488/ 514 nm	38	25 mW or 35 mW
HeNe Gas Laser 543 nm Lasos LGK7786P	543 nm	38	1 mW
HeNe Gas Laser 594 nm Lasos LGK7512PF	594 nm	38	2 mW
HeNe Gas Laser 633 nm Lasos LGK 7628-1F	633 nm	38	5 mW
DP Solid State Laser 561 nm Lasos YLK6120T	561 nm	38	20 mW
Diode laser 405 nm Lasos	405 nm	38	30 mW
Diode laser 405 nm CW/pulsed Lasos	405 nm	38	30 mW







万一碰到意外..

万一碰到或推测可能激光照入眼睛





万一碰到意外

保持冷静!

可能只是强光?只要4至5分钟后完全恢复视力功能!

看一张擦镜纸,看你能否看清楚各处的结构?

不管如何,请去医院看眼科医生!(fluorescence angiography血管造影)

还有就是告知设备管理员并立即反馈给蔡司公司工程师处理后续事宜!





激光安全:

880系统内的激光安全装置 1. 激光安全钥匙



HeNe and diobe laser units:主控控制开关钥匙 Argon laser unit:单独电源和开关钥匙 NLO laser unit:独立电源和开关钥匙

2. 警示标语、标签以及内部互锁机构







