

激光扫描共聚焦显微镜（FV3000）操作指南

使用前必读

- 1、**每天的最后预约用户**，用完仪器需按规定关闭仪器，**不关机的按实际运行机时补扣机时费并取消一个月使用权限，扣30分信用分。**
- 2、每个预约用户，用完仪器准备下机前，需登录系统（公众号）查看仪器预约界面，**若下机时间距离下一个用户预约开始时间不足两个小时，则不需要关仪器（包括软件和电脑）。**
- 3、将镜油加到（或污染）干镜，或用完油镜未擦干净物镜，违规扣信用分10分/次；。
- 4、为提高利用率和方便更多同学，**爽约一次扣信用分20分；30天内出现2次及以上“单次使用率”（使用率=上机时长÷预约时长*100%）低于50%，扣信用分10分。**

本设备每周安排一次统一培训，培训时间在系统“激光扫描共聚焦显微镜（olympus/FV3000）”预约界面公布；如需培训，请提前发邮件到673410436@qq.com进行报名。

信用分管理细则

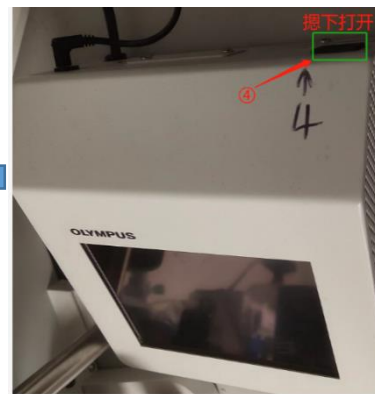
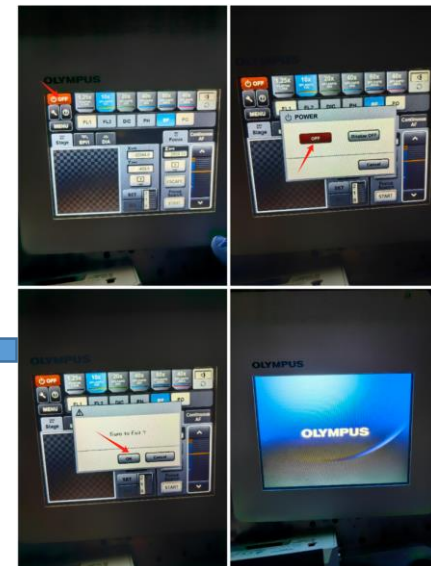
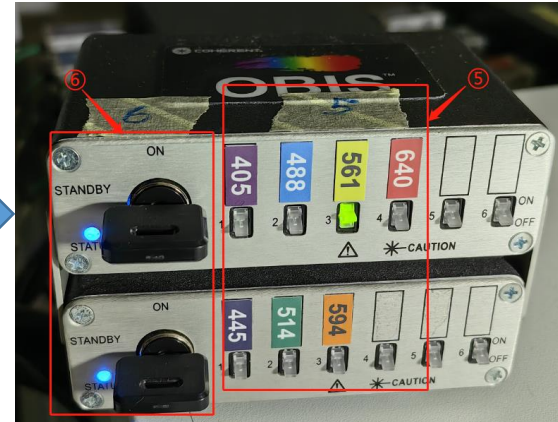
激光扫描共聚焦显微镜（FV3000）

未参加培训或授权，擅自使用仪器	30	三类
未经允许擅自拆装仪器设备零部件	30	三类
违规操作造成仪器或配件损坏，影响仪器正常运行	30	三类
当天最后预约用户，使用完仪器未关机，造成仪器通宵开启和损耗	30	三类
短时间（30分钟）内反复开、关激光器	20	二类
短时间（20分钟）内反复开、关荧光光源	20	二类
发现仪器故障没有及时报告管理老师	20	二类
未经允许擅自使用U盘或硬盘拷贝数据	20	二类
未按规定顺序开、关机	20	二类
借用他人账号上机、使用仪器	20	二类
爽约一次	20	二类
未经允许擅自修改仪器参数，且使用后没有恢复原值	10	一类
使用油镜后，未清洁镜头	10	一类
将镜油加到非油镜上	10	一类
一个月内出现2次及以上“单次使用率”低于50%	10	一类
使用完仪器，关机前未将物镜切换回10X物镜	10	一类
使用完毕未清洁仪器及台面、带走废弃物和个人物品	10	一类

关机流程及要求

关机流程及要求

- 1、退出FV31S-SW软件，shutdown电脑。
- 2、转动钥匙⑧至“OFF”位置，关闭扫描单元电源⑦。
- 3、转动激光器钥匙⑥至“STANBY”位置，关闭已开启的激光⑤。
- 4、关闭触摸屏：先退出软件，再关④（背后黑色方形按钮）。
- 5、关闭③。
- 6、关闭②。
- 7、关闭①：长摁  2秒，松开；进入300秒倒计时，即已关机。



特别强调：每个预约用户，用完仪器准备下机前，需登录系统（公众号）查看仪器预约界面，若下机时间距离下一个用户预约开始时间不足两个小时，则不需要关仪器（包括软件和电脑）

激光扫描共聚焦显微镜（FV3000）操作指南

一、开机

- 1、开启①，蓝色指示灯亮起，将亮度调节旋钮打大调节卤素灯光源亮度；
- 2、开启②；
- 3、开启③；
- 4、开启④（背后黑色方形按钮）；
- 5、按照染料的激发光，开启需要使用的激光⑤，然后转动钥匙⑥至“on”位置；**不使用的激光，不要开启！！！！**
- 6、开启⑦，然后转动钥匙⑧至“on”位置；**等待2分钟，务必不能跳过。**
- 7、开启电脑主机；

重要提醒：

不使用的激光，不要开启！！！！不使用的激光，不要开启！！！！不使用的激光，不要开启！！！！



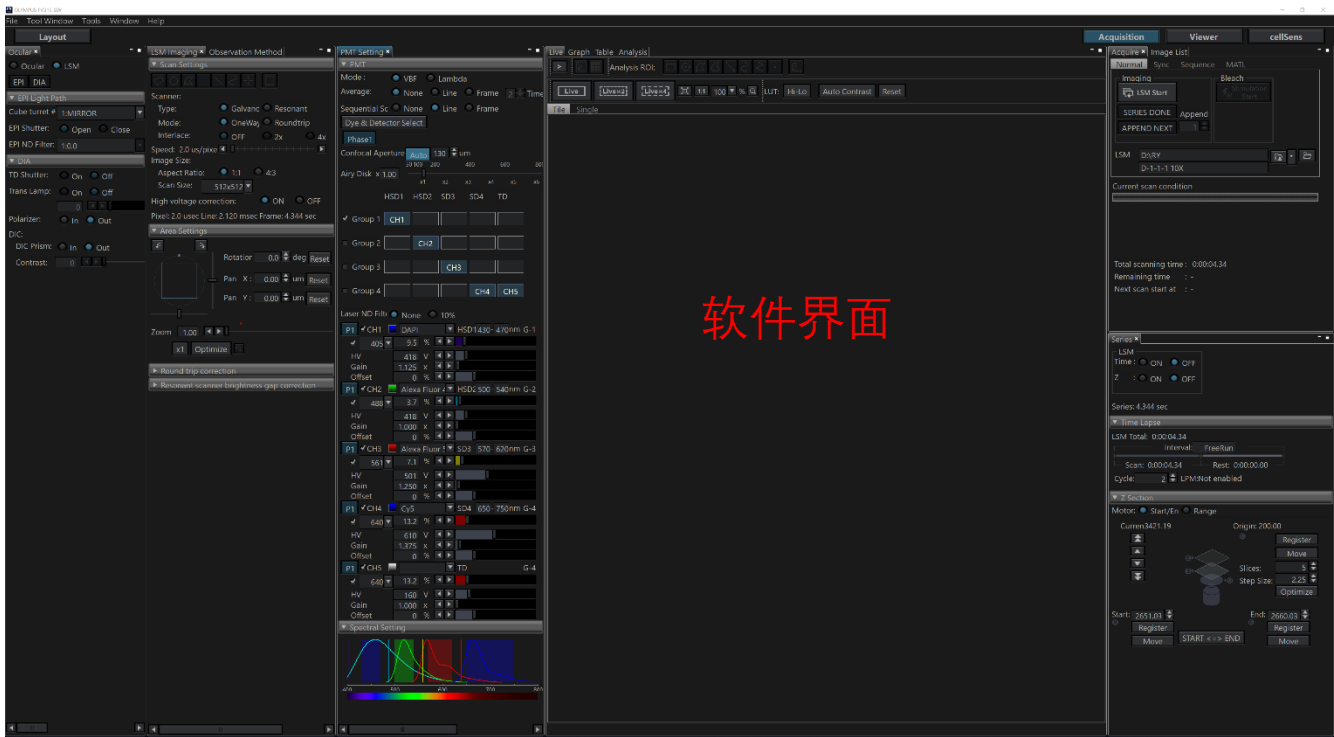
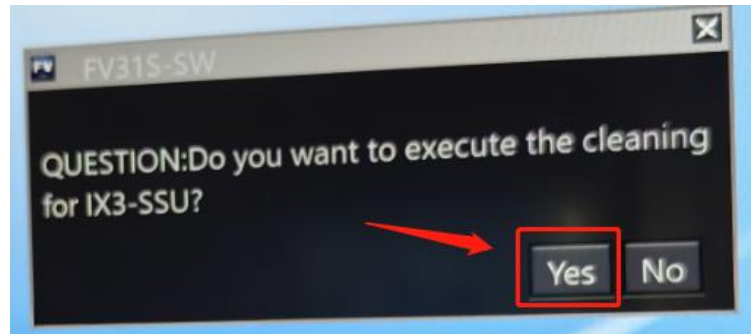
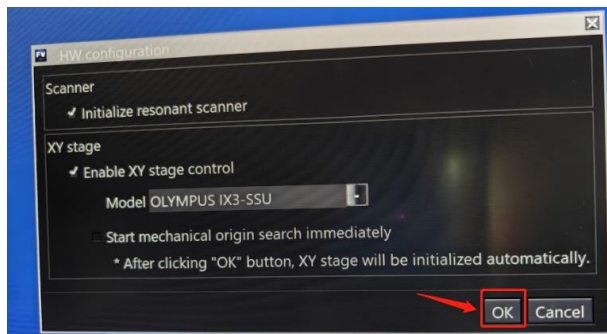
激光扫描共聚焦显微镜（FV3000）操作指南

一、开机

8、输入密码“Olympus”进入桌面，双击桌面“FV31S-SW”，启动软件；

9、软件弹出选择载物台型号提示，点击“OK”，随后弹出清理载物台提示，点击“Yes”，软件自动执行（10X物镜才可执行）清理载物台，等待结束；

10、至此，整个系统开机成功，开始使用。



软件界面

重要提醒：

1、如不规范开机或不规范使用，软件可能出现报错，则需要重启系统进行解决。

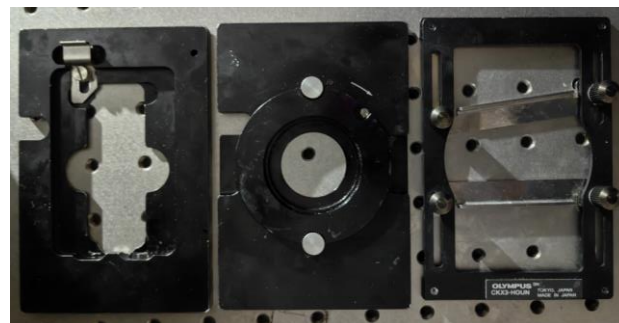
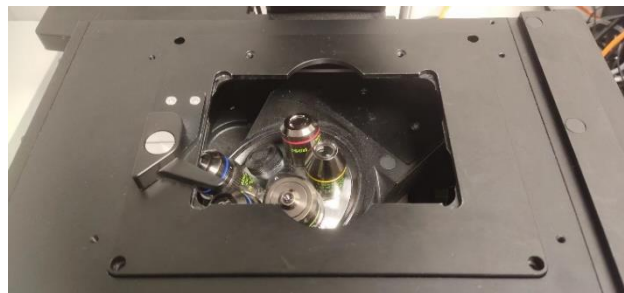
2、仪器重启：依次关软件、电脑（shutdown）、8、7、4、3、2，等待10秒；然后开启2、3、4、7、8，等两分钟，开电脑、软件。

3、1、5、6为光源，不得短时间反复重启，容易损坏！！！！

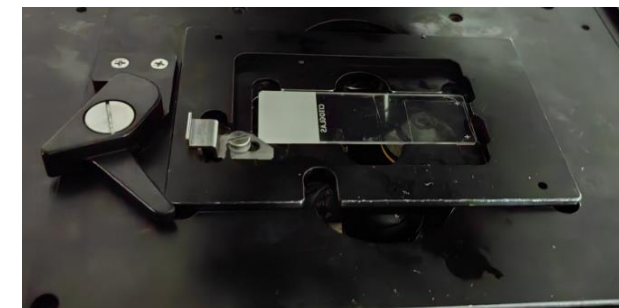
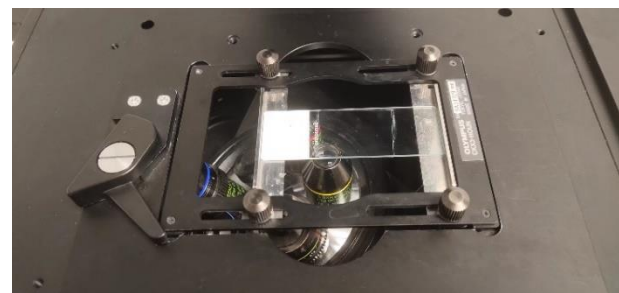
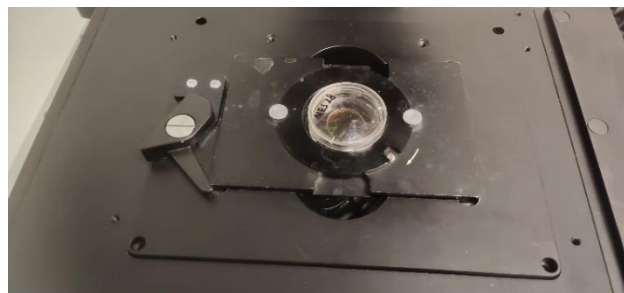
激光扫描共聚焦显微镜 (FV3000) 操作指南

二、根据样本载具选择合适适配器

仪器配套适配器

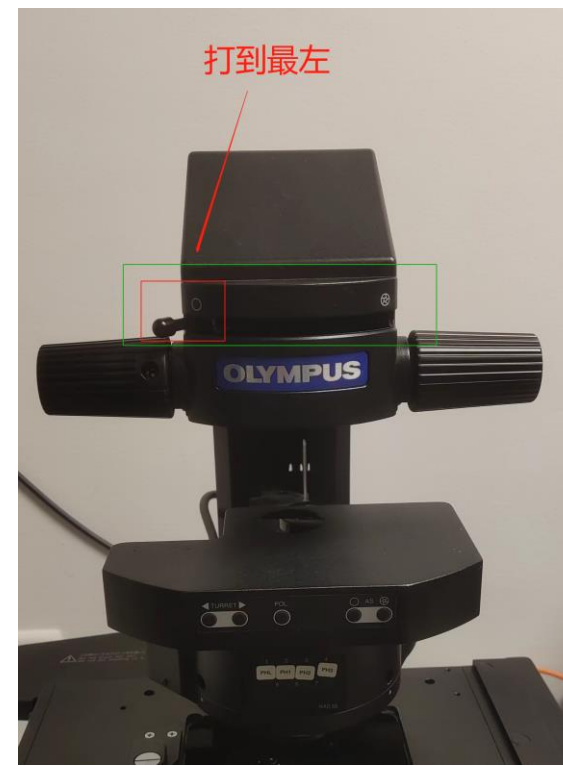
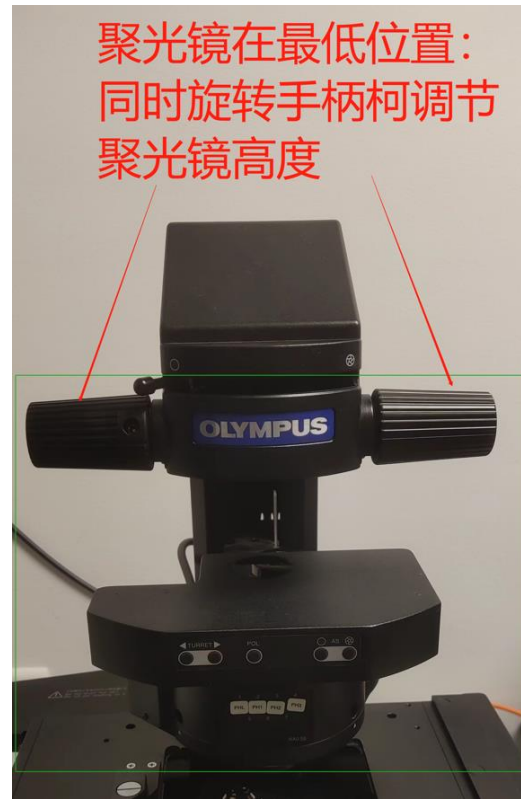


根据样本载具类型
选择合适适配器



全自动倒置荧光显微镜(IX83)操作指南

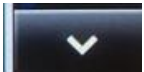
三、保证聚光镜在最低位置，视场光阑在最左；移动载物台，调焦，找到目标视野。

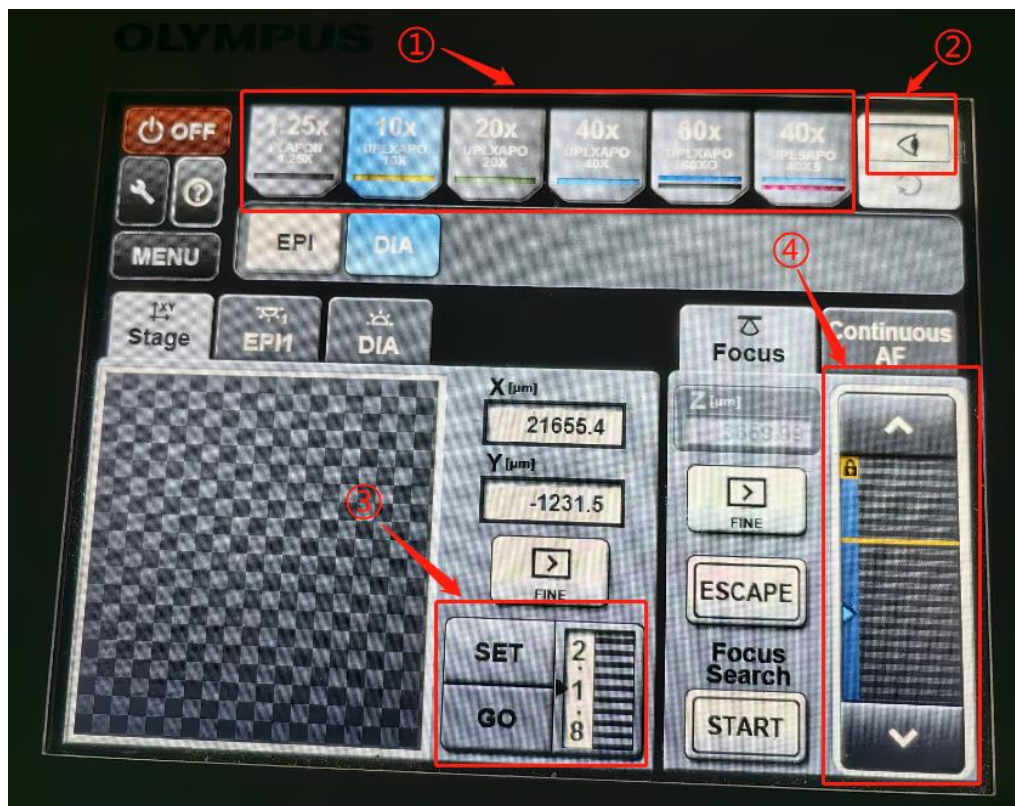


提醒：若载物台不可移动，注意看看速度切换键是否在微调位置。

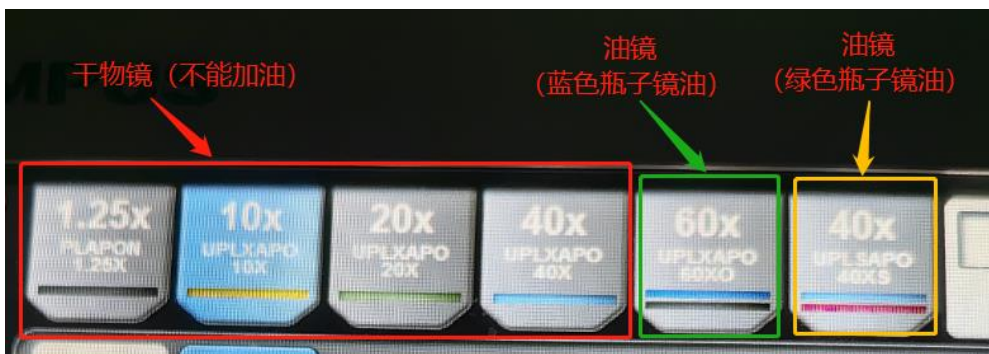
激光扫描共聚焦显微镜 (FV3000) 操作指南

四、触摸屏 (TPC) 功能介绍

- ① 选择合适物镜;
- ② 观察方式选择“眼睛”;
- ③ 显示当前视野XY坐标, 找到目标视野后点击“set”, 可记忆XY坐标位置 (一次最多支持8个), 点击“go”可去到设定位置;
- ④ 可通过   调焦;



**提醒: 干物镜绝对不能加油!
违反扣分, 屡犯禁用!**



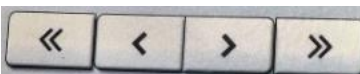
激光扫描共聚焦显微镜 (FV3000) 操作指南

五、目镜下找视野、调焦

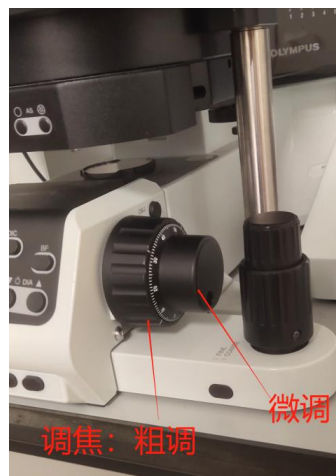
在FV31S-SW软件左上角，点击  Ocular，切换回荧光显微镜光路。

1、明场观察

①点击 ，进入界面后，滤块选择 ，点击shutter ，使光闸处于关闭状态 。

②点击 ，进入界面后，点击shutter  使明场光闸处于打开状态 ，通过  调节亮度。

③移动XY手柄找到目标视野，通过调焦旋钮调焦。

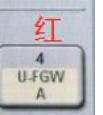


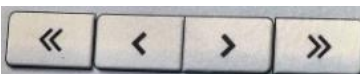
激光扫描共聚焦显微镜（FV3000）操作指南

五、目镜下找视野、调焦

在FV31S-SW软件左上角，点击  Ocular，切换回荧光显微镜光路。

2、荧光观察

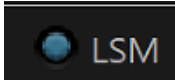
①点击 ，进入界面后，滤块选择  蓝  绿  红，点击 ，使光闸处于打开状态 。

②点击 ，进入界面后，点击shutter  使明场光闸处于打开状态 ，通过  调节亮度。

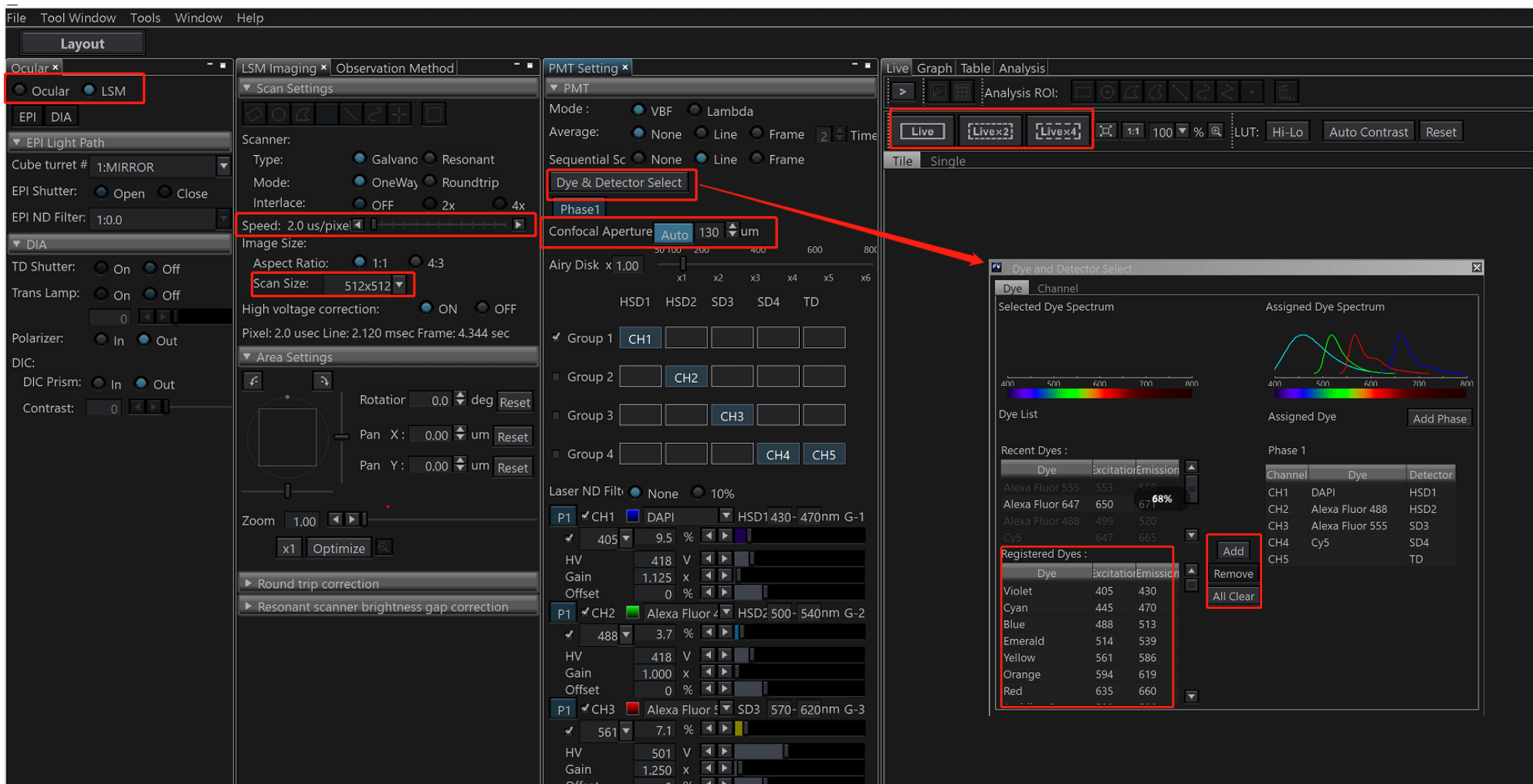
③移动XY手柄找到目标视野，通过调焦旋钮调焦。



六、共聚焦LSM扫描

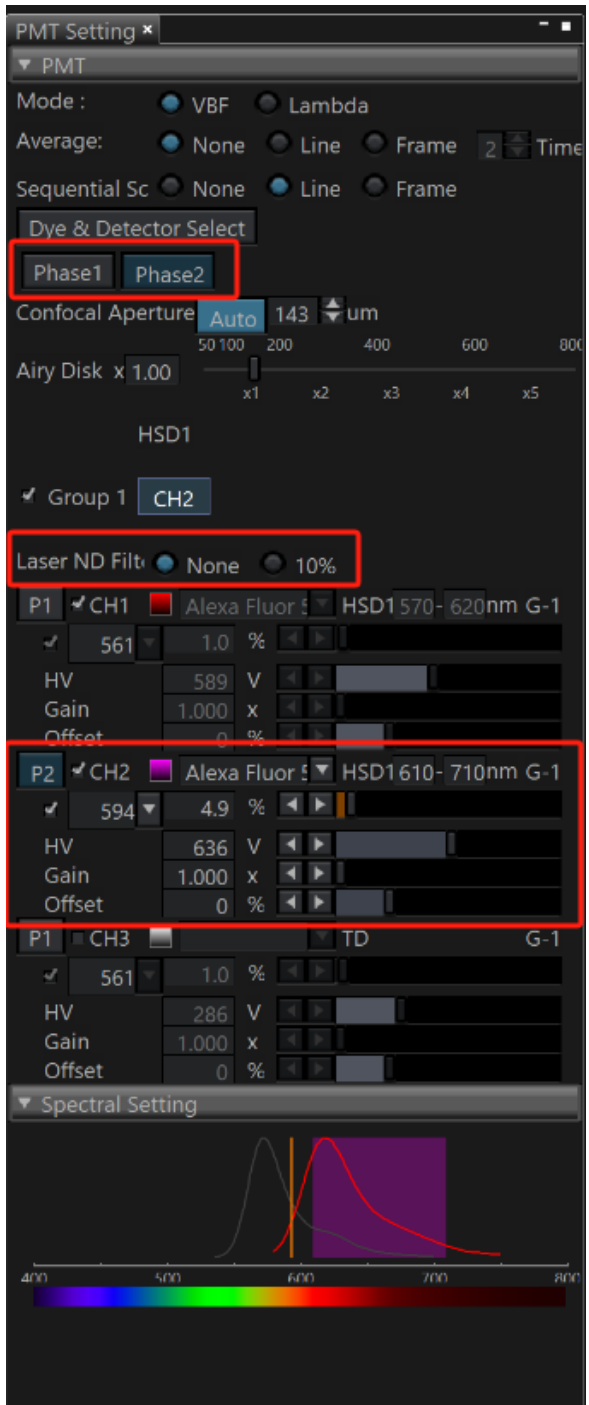


- ①按照“步骤五”找到目标视野，通过调焦旋钮调焦；在FV31S-SW软件左上角，点击 **LSM**，切换回共聚焦光路。
- ②点击 **Dye & Detector Select**，选择所用染料；设置预览参数，推荐为：speed = 2.0，Scan Size = 512x512，Confocal Aperture 选择 Auto；点击 **Live** **[Livex2]** **[Livex4]** 可以用一倍、两倍、四倍速度预览，推荐用两倍速。



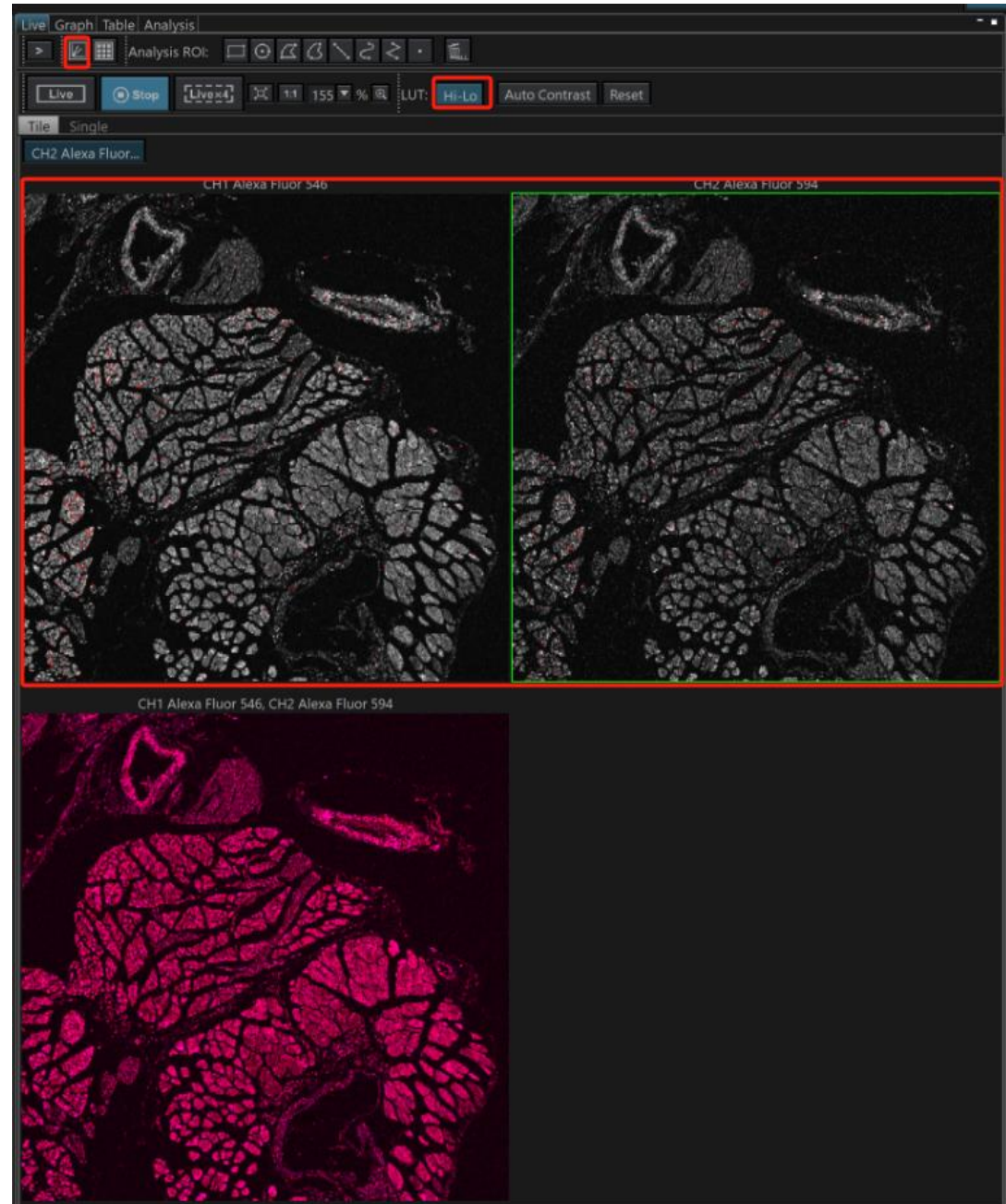
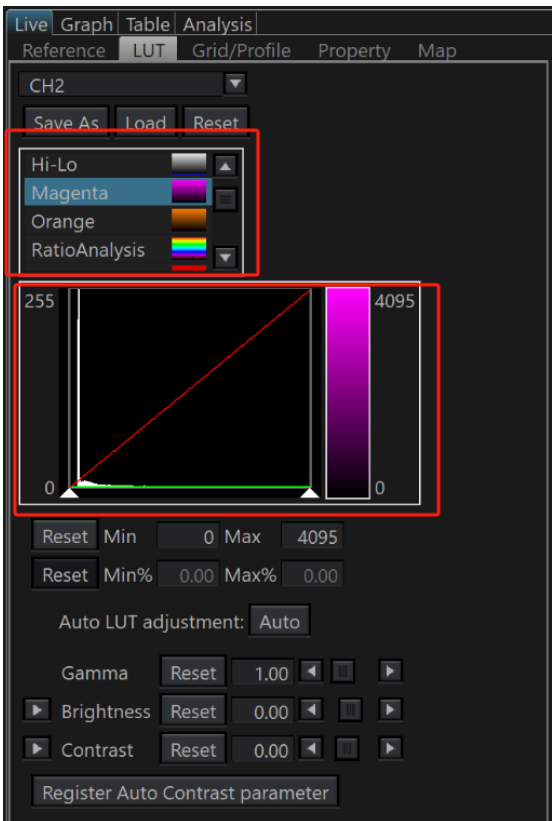
八、共聚焦LSM扫描-主要成像参数调节

- 1、Live预览时，可点击 **Phase1** **Phase2** 切换通道观察，成像时各通道自动merge。
- 2、根据需要勾选或取消各通道 **CH1** **CH2** **CH3**，进行预览或成像。
- 3、在 **Alexa Fluor 5** 处可修改染料名字。
- 4、在 **HSD1 610-710nm G-1** 处可调节发射波长收集范围，可以根据染料说明书推荐值选择合适范围，或者在软件推荐接收范围基础上根据染色串色情况、信号强弱情况进行他调整。
- 5、下拉 **594** 可选择激发光，一般情况下选择最接近 染料最大激发波长的激光作为激发光。
- 6、**4.9 %** 可调节激光强度，激光越强，信号强度越高；但是也越容易发生淬灭； **Laser ND Filt** **None** **10%** 选10%可微调激光强度。
- 7、**HV** **636 V** 可调节电压，电压越大，信号强度越高，推荐值500-650；但是，HV过大图像信噪比下降。
- 8、**Gain** **1.000 x** 增大可增强信号，但一般选默认值1X。
- 9、**Offset** **0 %** 可适当扣除背景，提高对比度，一般大于3%，但不宜过大（过大会扣掉信号）。

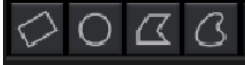


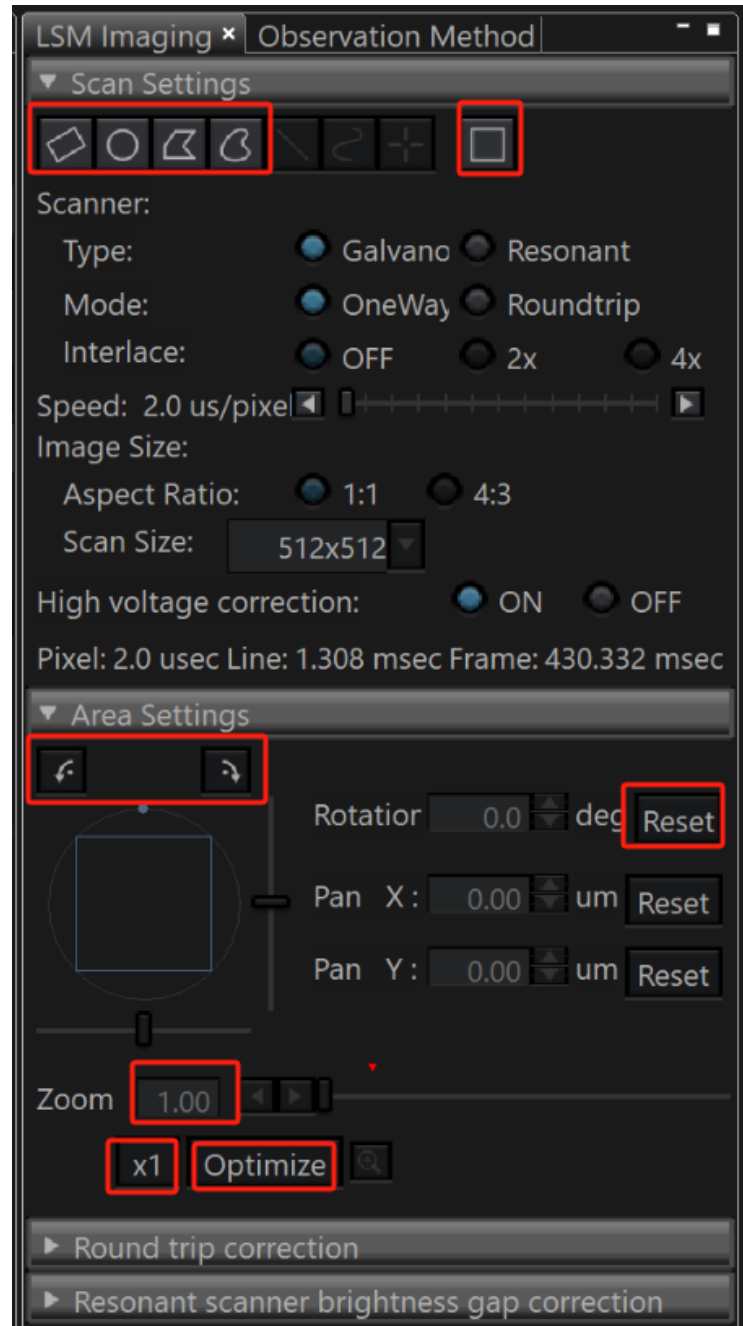
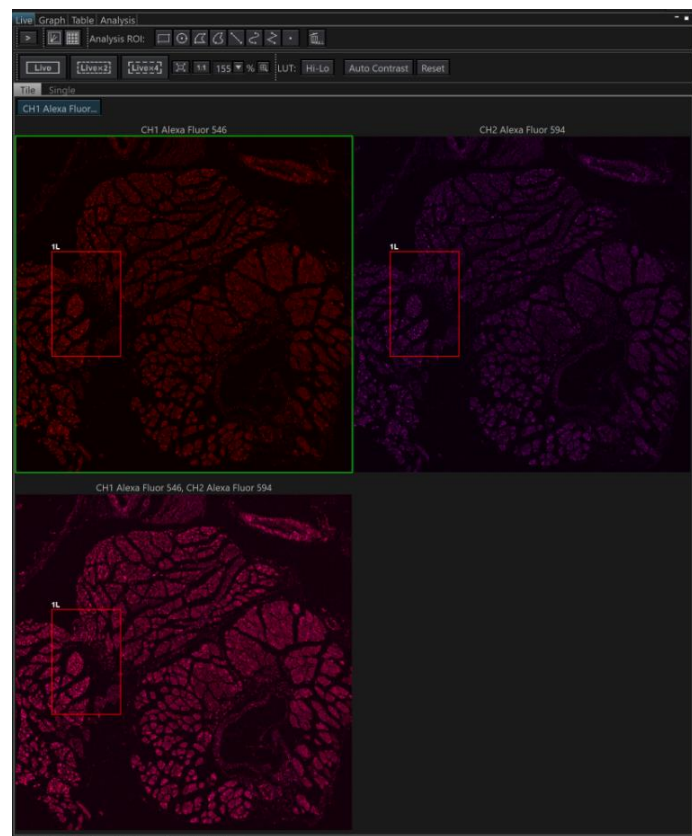
六、共聚焦LSM扫描-查看过曝情况寄更改伪彩色

- 1、Live预览时，可点击 **LUT: Hi-Lo** 查看过曝情况，红点代表已过曝，一般情况下建议不要过曝。
- 2、更换伪彩色：共聚焦成像为灰度图，伪彩色为后期添加，因此可以修改；点击  弹出的LUT工具窗口可以更改伪彩色，也可以调焦图片显示；调节完成后，点击  可以收回窗口。

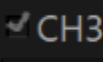


九、共聚焦LSM扫描-感兴趣视野（ROI）选取、图像旋转

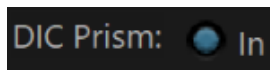
- 1、使用ROI选取工具 在预览图像内圈选感兴趣视野，调好参数后，即可成像；点击可恢复原始图像尺寸。
- 2、输入Zoom数值Zoom 1.00，也可进行图像放大后成像；点击x1可恢复原始图像尺寸；为保证较佳成像效果，推荐使用Optimize。
- 3、使用 可将图像旋转一定角度进行成像，点击deg Reset可恢复。



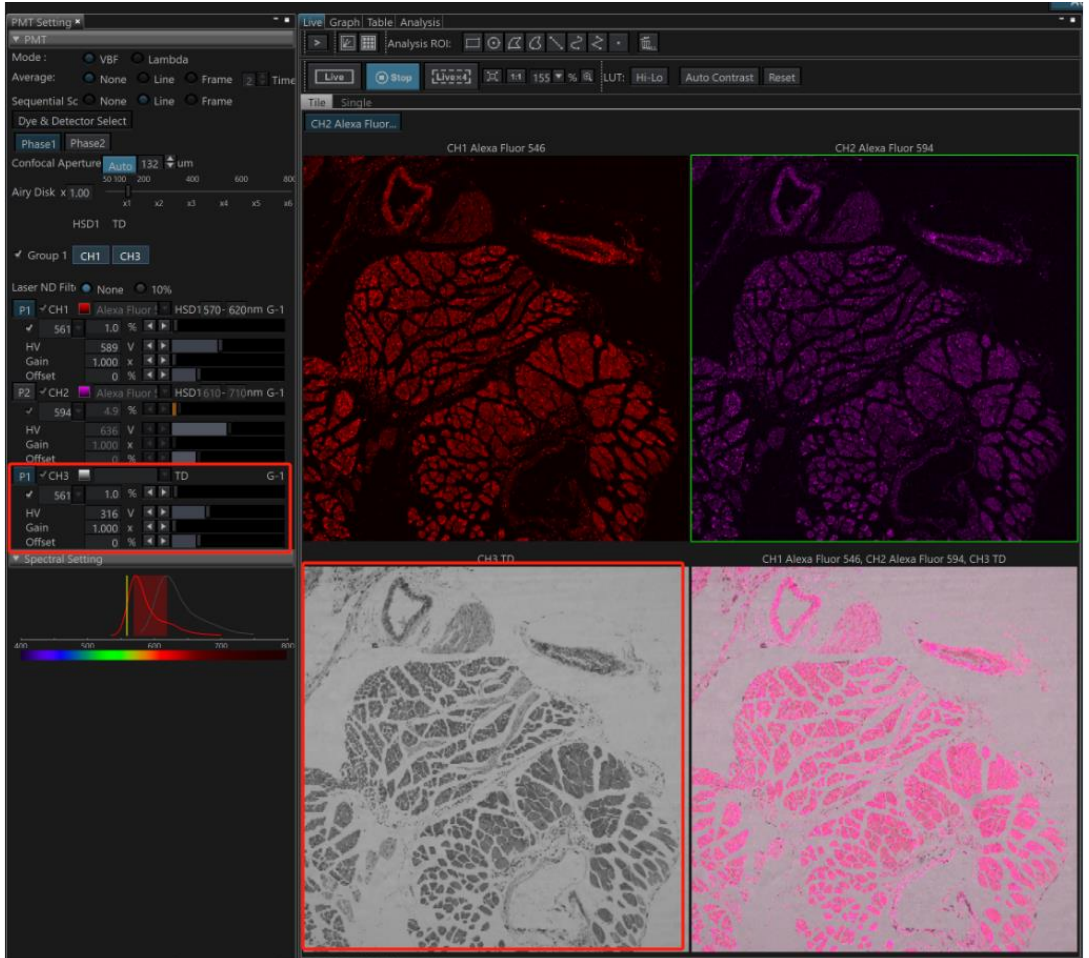
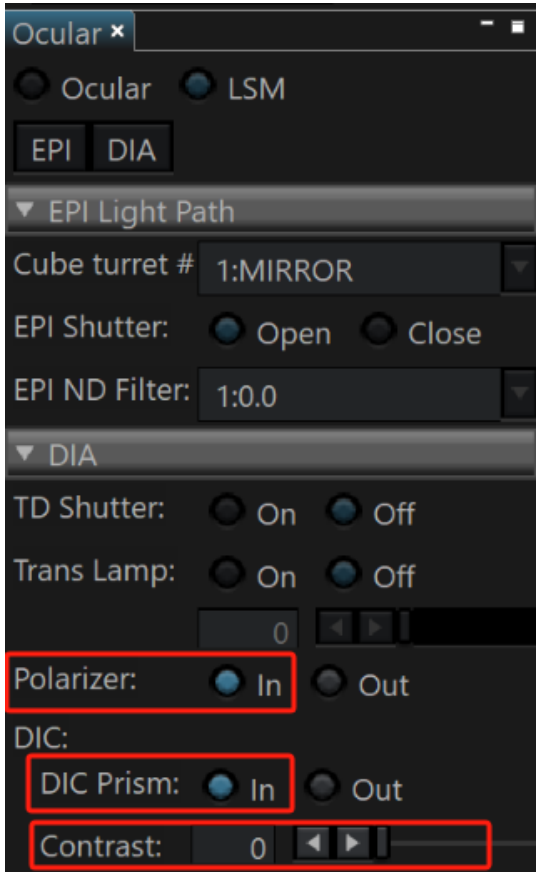
十、共聚焦LSM扫描-透射光TD成像、DIC使用

1、如果在荧光成像同时，如需借助透射光（类似明场）成像进行细胞定位，则 勾选上  CH3  TD

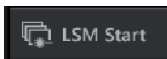
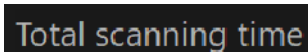
TD通道后，通过调节HV值等使图像达到合适亮度。

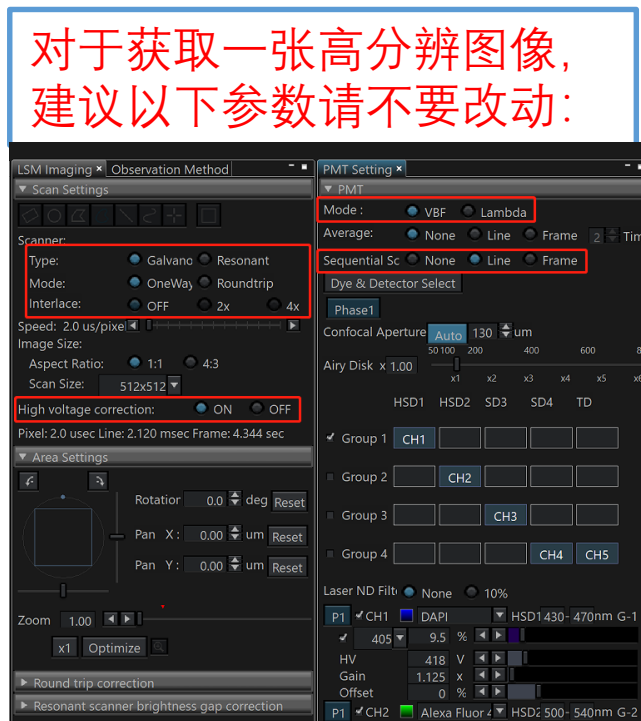
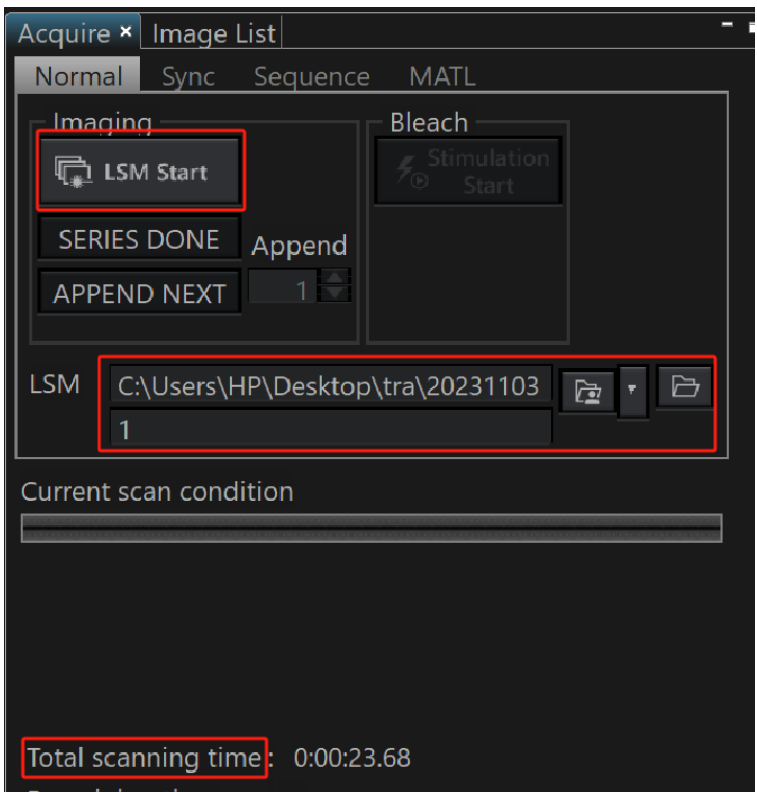
2、贴壁细胞或细胞爬片的细胞成像对比度较低，进行TD成像时，可以使用DIC:  Polarizer:  In 和  DIC Prism:  In

均选择  In ，然后调节  Contrast: 0  使图像更立体，从而提升对比度。



十一、共聚焦LSM扫描-图像获取

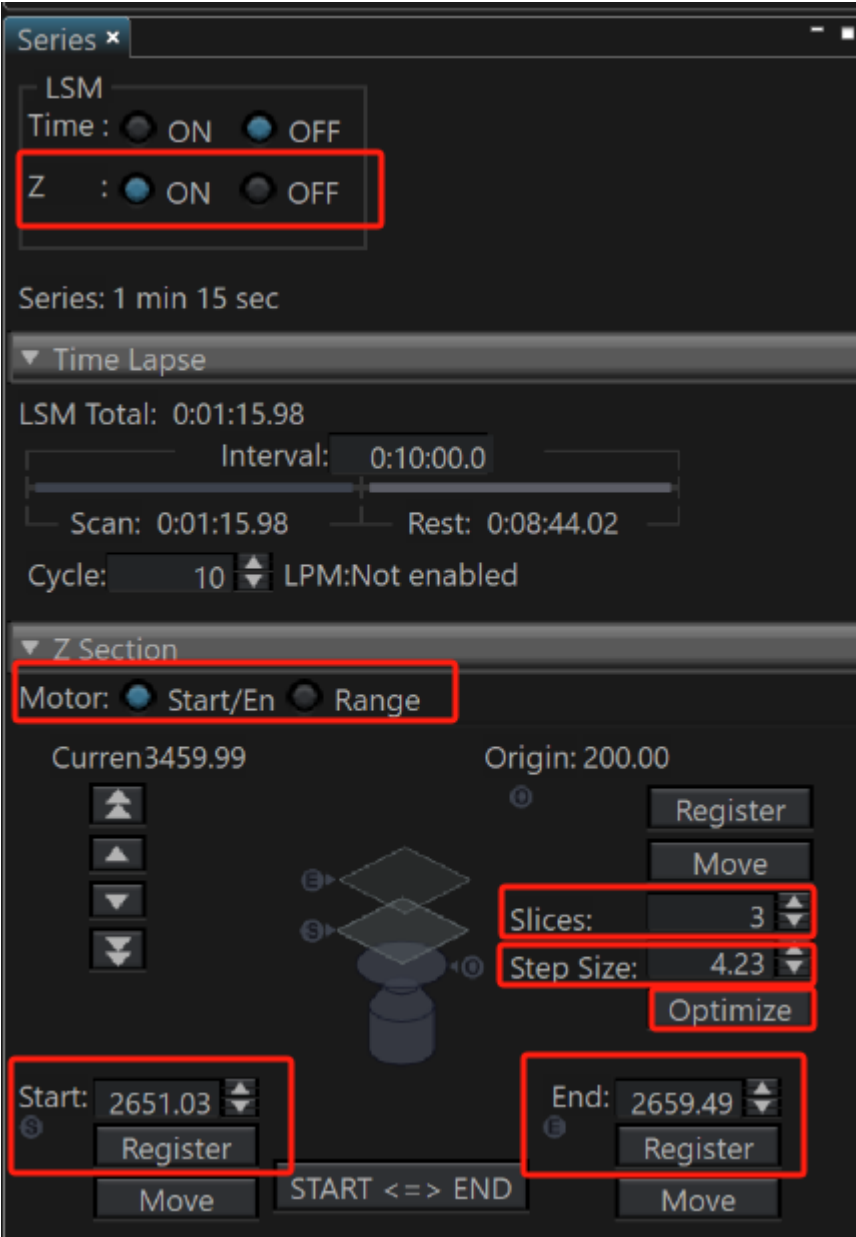
- 1、安照上述步骤预览、选取好视野、聚焦、调节好参数后，即可进行图像扫描：在  处选择文件存储路径、输入图片命名，点击  即可进行图像扫描；扫描总时间在  处显示。
- 2、为了得到一张亮度合适、信噪比较高的图像，建议：speed数值越大，图像亮度越大，但成像时间越久，荧光也越容易淬灭，一般推荐2.0或4.0；Scan size越大，图像分辨率越高，一般推荐1024x1024；Average次数越多，图像信噪比越好，一般推荐值为2;根据实际情况调节各个成像参数，没有标准值。
- 3、如不需要进行 Series Scan，请务必在  处将Time 和 z 选择成off。



十三、共聚焦LSM扫描- Time Series

1、Z-stack 层扫：按前述步骤预览、选取好视野、聚焦、调节好参数后，在 **Z : ☒ ON ☐ OFF** 处选择ON，调焦至所需成像起始焦面后，在 **Start: 2651.03** 处点击Register；然后再调焦至所需成像终止焦面后，在 **End: 2659.49** 处点击Register；点击 **Optimize**，软件会推荐扫描步进和扫描层数 **Slices: 3** **Step Size: 4.23**，如果觉得推荐值不合适，可以修改Step Size 进行更改。

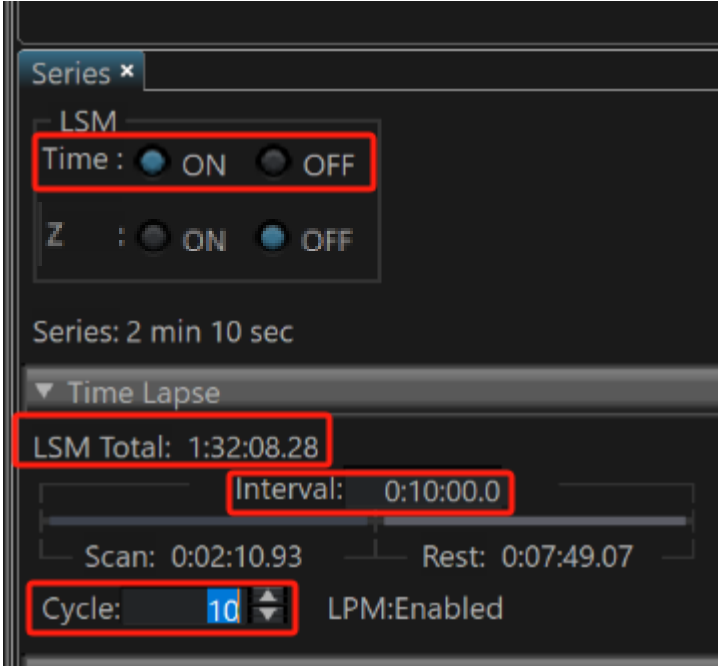
2、开始扫描：可进行图像扫描：在 **C:\Users\HP\Desktop\tra\20231103** 处选择文件存储路径、输入图片命名，点击 **LSM Start** 即可进行图像扫描；扫描总时间在 **Total scanning time** 处显示。



十二、共聚焦LSM扫描- Time Series

1、**Time Series**：按前述步骤预览、选取好视野、聚焦、调节好参数后，在 **Time : ☒ ON ☐ OFF** 处选择ON，在 **Interval: 0:10:00.0** 输入两次成像时间间隔；在 **Cycle: 10** 处输入成像周期数；成像总时长在 **LSM Total: 1:32:08.28** 处显示。

2、开始扫描：可进行图像扫描：在 **C:\Users\HP\Desktop\tra\20231103** 处选择文件存储路径、输入图像命名，点击 **LSM Start** 即可进行图像扫描；扫描总时间在 **Total scanning time** 处显示。



提示：Interval必须大于每个Cycle的成像总时间。



1、宏管理器使用

使用离线软件cellSens的“宏管理器”工具，可以进行批量处理图片，如批量加标尺、加伪彩、拆分通道、消卷积等等。

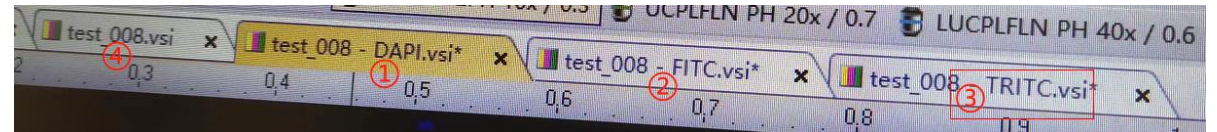
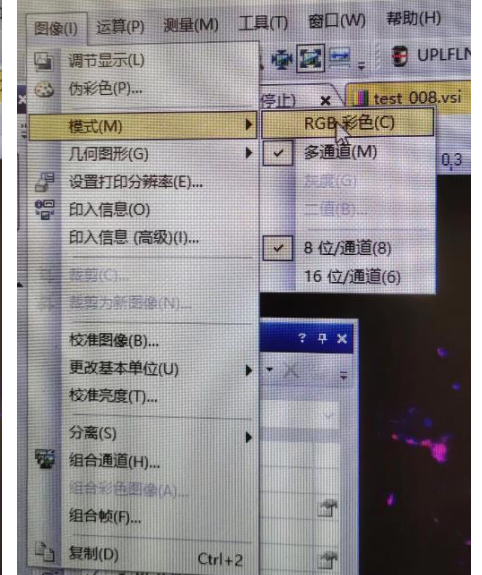
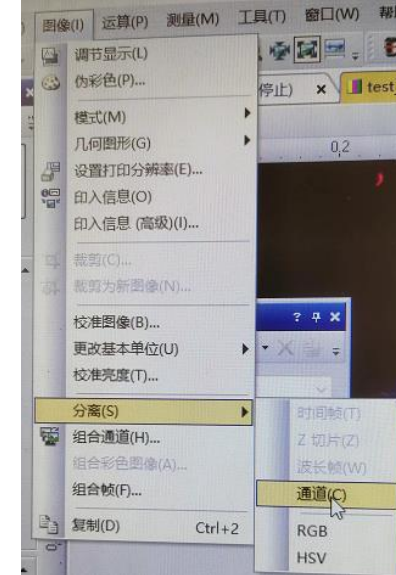
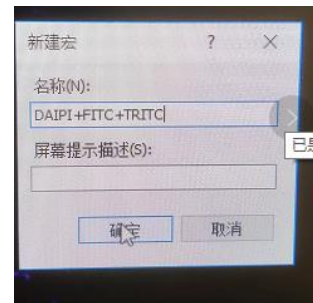
怎样创建宏？

以下以“拆分通道”为例，介绍如何创建宏，其他宏创建方法类推即可：

①首先打开一张要处理的图像，单击“视图/宏管理器”，在弹出的“新建宏”对话框中，可以对新建宏进行命名如“DAPI+FITC+TRITC”，点“确定”后开始录制。

②拆分通道：选择“图像/分离/通道”。

③单击DAPI通道，点击“图像/模式/RGB彩色”，即可给DAPI通道加上伪彩；按以上步骤，依次把FITC、TRITC、merge图片都加上伪彩。



数据处理向导

④单击  “停止宏记录”。

⑤“执行模式-静默”：所有“激活文档”前面的图标都点击一次。至此，已完成设置。

如何使用宏？

①下拉  DAIP+FITC+TRITC 找到要执行的宏。

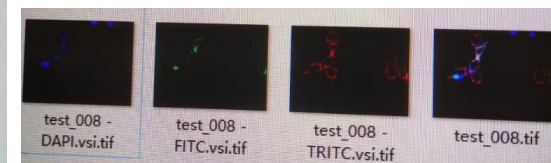
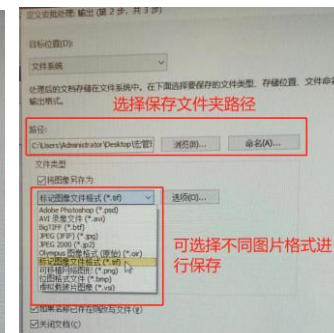
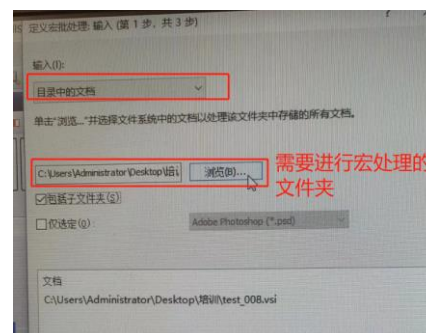
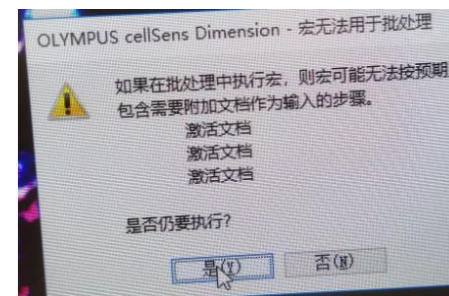
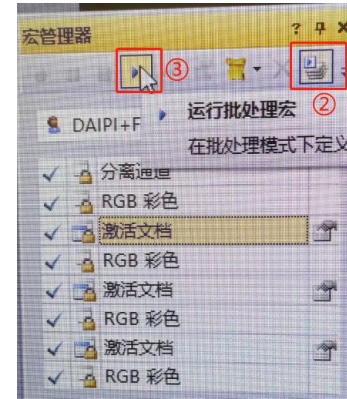
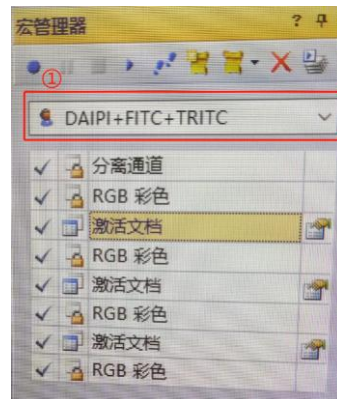
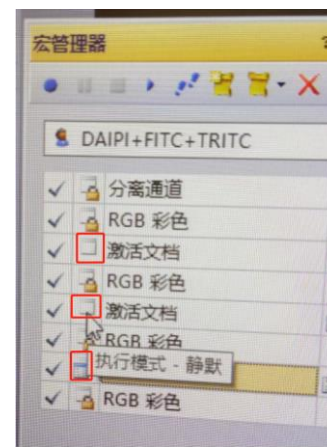
② 单击  “切换批量处理模式”，再点击  “运行批量处理宏”。

③ 在弹出窗口点击“是”，执行批量处理。

④ 选择需要进行宏处理的文件夹，点击“下一步”。

⑤ 选择宏处理后产生图像的保存路径，选择图片格式，点击“下一步”。

⑥ 点击“开始”，开始运行批量处理，待完成后，图像将自动保存。



数据处理向导

2、更多

提示：更多数据处理方法，请从仪器共享系统查看《cellSens常用分析功能操作手册》。

激光扫描共聚焦显微镜
(olympus/FV3000) - 培训安排：1月11号8:00开始，请需要培训的同学发邮件到673410436@qq.com进行报名。

课题组：中山一院精准医学研究院

归属平台：-

运行中

位置：1307

联系人：黄文杰 / 87606865转1416 / 673410436@qq.com

开放预约至：2024-01-12 周五 24:00(8天)

单次最大预约时长：180 分钟 (按时段)

单次最小预约时长：30 分钟

每人每天最多预约：1 次 (按时段)

仪器分类：2类：贵重仪器

仪器分类：显微成像系统

说明文档：

- 快速操作指南 (密码是olympus) .pdf
- cellSens常用分析功能操作手册-密码olympus.pdf
- OlyVIA (CellSens免费版) 软件安装包下载地址.doc
- 仪器预约、培训和使用指引 - FV3000.pdf
- FV31S-DT软件安装包下载地址.docx

预约须知：阅读

当前操作人：卜浪 / 已使用：00时 11分 49秒

上机计费表：计费系数：0.00 抵扣费：0.00 元 直接从账户余额扣费

在预约开始前取消可退预约费

• 00:00:00 - 23:59:59 : 0.00 元/分钟(内部)

预约名单 (日历)

预约名单 (列表)

预约/上机策略

介绍说明

设备报修

2023-12-31 ~ 2024-01-06

<< 上周 本周 下周 >>

预约时间段	12-31 星期天	01-01 星期一	01-02 星期二	01-03 星期三	01-04 星期四	01-05 星期五	01-06 星期六
16:00-16:30	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
16:30-17:00	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
17:00-17:30	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
17:30-18:00	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
18:00-18:30	✓	■	✓	✓	✓	✓	✓
18:30-19:00	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
19:00-19:30	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
19:30-20:00	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
20:00-20:30	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
20:30-21:00	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
21:00-21:30	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
21:30-22:00	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓

☐ 可预约 ☒ 不可预约 ☒ 已选择 ☒ 自己预约 ☒ 他人预约

预约时间

至

预约

备注：由于水平有限，编写本指南时难免会有错漏之处，大家使用过程中如对本操作指南有任何疑问，欢迎发邮件给黄文杰老师（673410436@qq.com）进行指正，谢谢！本指南为平台所有，未经允许，请勿转载！