



Your Vision, Our Future



奥林巴斯(中国)有限公司 生命科学部 产品推进课

http://www.olympus-lifescience.com.cn/zh/

2017.07 Ver. 1.0

图像	采集	
启动系统 ————————		2
通过目镜找到标本 —————		3
XY 图像采集 ——————		4
XYZ 图像采集 ——————		6
XYT 图像采集 ——————		7
XYZT图像采集 ———————		- 8
<u>XYT图像采集(使用Z轴漂移补偿)</u>		- 9
多点时间序列成像(MATL) ————		10
<u>使用预览图的MATL及自动图像拼接</u>		12
图像采集技巧 ———————		15
退出系统	-67	16
设置		17

目录

图像处理	
2D浏览与处理	19
<u>3D浏览与处理</u>	20
<u>3D动画制作</u>	21
处理: 亮度投影	22
图像输出	23
保存和调用观察方法 ———————————————	24

光谱扫描与拆分					
光谱序列扫描(单通道采集)———————————	26				
光谱序列扫描(多通道采集)———————————	28				
处理:光谱拆分(1)	30				
处理:光谱拆分(2)	31				
处理:光谱拆分(3)	32				





Your Vision, Our Future







通过目镜找到标本



- ⑥ 点击TPC界面左下角的[Shutter],打开透射 光照明器的光闸。
- ⑦ 如果需要,可点击[Brightness]分页,调节 光源亮度。
- ⑧ 调节Z轴位置,找到标本焦面。



④ 根据标本染料,选择适合的荧光滤色片,用 于观察。

Ô

2



- ⑤ 点击TPC界面左下角的[Shutter],打开汞灯 的光闸。
- ⑥ 如果需要,选择ND减光片,调节光源亮度。

※也可通过旋转汞灯控制器上的转盘,调节光源亮度

旋转亮度调节转盘



⑦ 调节Z轴位置,找到标本焦面。





Microscope DMT Satting X	
▼ PMT 1	① 在[PMT:
Mode: VBF Lambda	侯 氏。
Sequential Scan O None O Line O Frame O	指定检测证
Dye & Detector Select 2	② 在[PMT:
Phase1 Phase2 ① Averaging功能可去除	钮,打开
Confocal Aperture Auto 219 um 50 100 200 400 600 800	③ 点击 🗛
Airy Disk x 1.00	④ 双击列表
HSD1 HSD2	 ⑤ 指定荧光
	需要TD通
Group 2 CH2	虚拟通道
Laser ND Filter: None 10%	如标记物
P1 ✔ CH1 Alexa Fluor 4 ▼ HSD1 500 - 540 nm G-1	巴成镓。
Gain 1.000 x ◀ ►	④ 如需使用
P1 ✓ CH2 Alexa Fluor 5 ▼ HSD2 570 - 620 nm G-2	按钮增加
✓ 561 ▼ 0.0 % ◀ ▶	的染料。
HV 500 V ◀ ► Gain 1.000 x ◀ ►	
Offset 0 %	⑦ 染料选择
P2 CH3 DAPI HSD1 430 - 470 nm G-1	
	油井亚屿区
Gain 1.000 x	啊!」 火见 译
Dye and Detector Select	⑧ 如需米集
Dye Channel Selected Dye Spectrum Assigned Dye Spectrum	[Sequen] (二夕 七丙
	们多你爸
	山 切 能。
Dye List Assigned Dye 6 Add Phase	
Recent Dyes : Phase 1	
Alexa Fluor 568 579 603 CH1 Alexa Fluor 568 HSD1 Alexa Fluor 488 499 520 CH2 Alexa Fluor 588 HSD1	【注
Alexa Fluor 532 534 553 DAPI 359 461	応尽
mCherry 587 510 Add Cy2 490 504 Remove	
Kegistered Dyes : All Clear Dye Excitation Emission	
Violet 405 430 0 Cyan 445 470 Blue 488 513	⑩ 如使用虚
Emerald 514 539 Yellow 561 586	各个通道
	Offset (
OK Cancel	
analysis ROI: □ ⊙ Z Z C \ 2 2 . tt.	
	<u>(Hi-Lo</u>
	像素 完度
• • •	隊系売度
°°, °°,	

Setting]工具窗口中,在[Mode]栏选择"VBF"

1道

- Setting]工具窗口中,点击 Dye & Detector Select 按 F[Dye & Detector Select]对话框。
- I Clear 按钮, 重置已选染料。
- 長中的染料名称,可自动添加。
- t染料之后,透射光(TD)通道将自动指定。如不 通道,可双击取消。

(选配)

数量大于检测器数量,可使用此功能进行多

- 月虚拟通道功能进行多通道成像,点击 Add Phase I[Phase]。然后在新增[Phase]中添加需要观察
- 释完毕, 点击[OK]按钮。

图像

- [多通道图像,在[PMT Setting]工具窗口中的 tial scan]选项中,选择"Line"模式。例如进 图像采集,染料之间有串色情况存在,建议使用
- ve]工具窗口下的 💷 按键。根据预览图像效 す调节焦面位置,并设置适当的激光强度(%)、₩ Gain(×)和Offset(%)等参数。

意】 尽量避免图像中的像素处于过饱和状态。

記拟通道功能,点击 Phasel Phase2 等进行切换。 值单独设置激光强度(%)、HV值(V)、 Gain(×)和 %)等参数。

模式】 为4095(最大值)时显示为红色,为过饱和状态。 为0时显示为蓝色。

XY 图像采集 (2)



Acquire	×	114.70	
Imag Imag SERI	ISS DONE Append	Bleach	
LSM Current s	C:\Users\olympus\De 0617xyz :can condition	sktop	
		S	
Total sc	anning time: 0:00:	:01.09	

扫描振镜设置

- ① 在[LSM Imaging]工具窗口中,选择扫描振镜的类型[Type],以及工作模式[Mode]。
 (参见15页获取详细信息)
- (11) 设置扫描速度。
- 12 定义图像尺寸[Image Size],设定扫描区域。
- ③ 设定放大倍数[Zoom],旋转角度和成像位置。※红色箭头指示最大光学放大倍数。

透射光通道(TD)观察步骤

- 1. 将显微镜上的DIC滑块移入光路。
- 2. 选用TD通道(参见4页第⑤步)。
- 3. 选择用于成像的激光。
- 4. 调节透射光检测器的HV值。
- 5. 转动DIC滑块的旋钮,调节图像对比度。 (参见3页左侧栏第⑤步。)

F	P1 ≤CH2	3.		▼ TD	G-1
	✓ 488 ▼	3.5	%	 ▲ ▶ 	
	HV	280	۷	▲ ▶	
4.	Gain	1.000	Х		
	Offset	0	%	▲ ▶	

开始采集

- ④ 在[Acquire]工具窗口中选择[Normal]分页,
 点击
 □ 按键打开对话框,选择或新建
 保存图像的文件夹。并输入图像的文件名。
 - ※ 图像采集后将自动保存。如未更改文件名, 新生成图像将自动加入数字后缀,如 ***_0001、***_0002"等。
- ⑮点击 🖫 LSM Start 按键开始图像采集。

※ 如需采集单幅图像,开始图像采集前务必确认 [Series]窗口下的[Z]和[Time]均处于"OFF"状态。



<u>XYZ 图像采集</u>





<u>XYT 图像采集</u>



Acquire ×	
Normal Sync Sequence MATL	A
Imaging ISM Start SERIES DONE APPEND NEXT	-
LSM C:\Users\olympus\Desktop 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2 2	
Current scan condition	
Total scanning time : 0:00:00.66	▼.
Series × Microscope -	
LSM Time: ON OFF Z : ON OFF	
Series: 65.779 msec	
▼ Time Lapse	
LSM Total: 0:00:00.66 Interval: FreeRun Scan: 0:00:00.06 Rest: 0:00:00.00 Cycle: 10	

开始下列步骤之前,请正确设置单幅图像采集参数 (参见4-5页)。

设置时间序列

- ① 在[Series]工具窗口中,将[Time]选为"ON"。
- ② 在[Time Lapse]窗口下,设定XYT图像采集的间隔 时间[Interval]和次数[Cycle]。

※ 如输入间隔时间小于采集单幅图像所需的时间,则 [Interval]栏将显示为"FreeRun"。此情况下 XYT图像采集的实际间隔时间为 [LSM Imaging]工具 窗口中[Scan Settings]下方显示的"Frame"时间。

开始采集

- ③ 在[Acquire]工具窗口中选择[Normal]分页, 点击 按键打开对话框,选择或新建保存图像 的文件夹。并输入图像的文件名。
- ④ 点击 🕞 LSM Start 按键开始XYT图像采集。

结束采集

⑤ 图像采集结束时,APPEND NEXT 按键开始闪动。

点击 SERIES DONE 按键,可结束图像采集。如需以相同参数继续采集图像,输入需继续采集图像的数量,然后点击 APPEND NEXT 按键,采集额外的图像。

采集完毕后点击 SERIES DONE 按键结束。

<u>XYZT 图像采集</u>



Acquisition Viewer cellSens	开如 参数
Acquire × Normal Sync Sequence MATL Imaging Start SERIES DONE Append Acquire × Start S	1
APPEND NEXT A Contract of the second	设] ②
	设
Total scanning time : 0:04:10.98 Series × PMT/laser adjustment in Z-series - ■ LSM I Time : ON OFF Z : ON	(ф) Тт +
Series: 501.953 msec Time Lapse LSM Total: 0:04:10.98	<i>म</i> 9 5
Interval: FreeRun Scan: 0:00:00.5C Rest: 0:00:00.0C Cycle: 500 ♣ LPM:Not enabled ▼ Z Section	⑥
Motor: Start/Enc Range Current0.00 Origin: 0.00 Register Move Slices: 57 Step Size: 0.25 Optimize	
Start: 5270.85 End: 5256.85 2 Register Register Register Move START <=> END Move	

开始下列步骤之前,请正确设置单幅图像采集 参数(参见4-5页)。

 在[Series]工具窗口中,将[Time]和[Z]都 选为 "ON".

设置Z序列

- ② 改变Z轴位置,注册图像采集的起始/终止位置[Start/End]。
- ③ 根据需要,设置适合的Z轴步进[Step Size] (参见第6页)。

设置时间序列

④ 设置用于时间序列图像采集的时间间隔[Interval]和次数[Cycle](参见第7页)。

开始采集

- ⑥ 点击 □ LSM Start 按键开始XYZT图像采集。

结束采集

⑦ 图像采集结束时, APPEND NEXT 按键开始闪动。 点击 SERIES DONE 按键,可结束图像采集。 如需以相同参数继续采集图像,输入需继续 采集图像的数量,然后点击 APPEND NEXT 按 键,采集额外的图像。

采集完毕后点击 SERIES DONE 按键结束。

<u>XYT 图像采集</u> (使用Z轴漂移补偿[ZDC]) ♦ZDC



<u>多点时间序列(MATL)图像采集</u>

◆电动载**物台**◆



<u>多点时间序列(MATL)图像采集</u> _(使用Z轴漂移补偿[ZDC])

◆电动载物台◆

♦ZDC



♦ motorized stage ♦

<u>使用预览图进行</u> <u>的MATL和自动图像拼接(1)</u>



<u>使用预览图进行</u> <u>的MATL和自动图像拼接(2)</u>



自动图像拼接(选配)

◆电动载物台



图像采集技巧





- 4)增加激光强度/检测器敏感度(HV值) 如果HV值超过700V以上还无法获取足够亮度的图像, 建议配合其他方法提高图像亮度。
- 5) **增大针孔[Confocal Aperture]** 增大针孔可以提高图像亮度,但会降低Z轴分辨率。
- 6)降低扫描速度

将[High voltage correction]设为"OFF"。

■降低图像噪音■

7) 使用[Average] 功能

此项功能通过对多张图像进行计算,去除随机噪点,提升图像质量。 选取"Line"或"Frame",并输入需要平均计算的图片数量。

※ "Line"模式适用于活细胞的图像采集。

8)降低扫描速度

将 [High voltage correction]设为 "ON"。

▼ PMT			
Mode :	VBF	C Lambda	
Average:	None	🔘 Line 🔘 Frame 🛛 2 🧮 Tim	es 7)
Sequential Scan	🔘 None	🔘 Line 🔵 Frame	
Dye & Detecto	or Select		

~	405 🗸	0.0	%	◀	►		
HV		500	V		►		
Gain		1.000	х	•	►		
Offset				◄	▲		
				-			

0 10%

er ND Filter: 🔵 None 🗌

🗹 CH1 📃 DAPI 🔍 HSD1

PMT Setting 🗙				
Confocal Aperture	Auto 219 🔶	um		5)]
	50 100 200	400	600	800
Airy Disk x 1.00				

430 - 470 nm G-1

退出系统





退出软件和PC

- ① 在[File]菜单栏下,选择[Exit]退出软件。
- ② 在Windows系统的Start Menu中,选择"Shut down"关闭系统。



关闭电源

触屏控制器 (TPC)

- ③ 点击TPC界面左上角的"OFF"。
- ④ 按下后方的TPC开关,然后关闭显微镜控制器(CBH)。

※ 切勿长按TPC开关。

激光控制器

⑤ 关闭各个激光控制器的开关,转动电源的 钥匙到"OFF"状态。

汞灯光源

⑥ 长按(2秒)光源前部的ON/OFF开关,上方 液晶屏显示300秒倒计时,结束后再关闭 后侧的汞灯电源总开关

主控制器

⑦ 关闭主控制器电源。

※ 如使用浸油物镜,应及时进行清理。







更换物镜

- 在[Tools]菜单栏下选择[Configuration],打 开[Configuration]对话窗口。
- ② 选择[Microscope]分页。
- ③ 选择[Objective Lens]选项。
- ④ 在下拉菜单中选取安装的物镜名称。
- ⑤ 设置在更换物镜后需要自动匹配的光学部件。

※ 选择与物镜相对应的DIC部件,如: 30X → IX2-DIC30 100X → IX2-DIC100

⑥ 点击 OK 按键确认。

定义多孔板(选配)

- ① 在[Tools]菜单栏下选择[Configuration],打
 开[Configuration]对话窗口。
- ② 选择[Preference]分页。
- ③ 选择[Plate]。
- ④ 选择多孔板类型。
- ⑤ 点击 OK 按键确认。

设置Z轴漂移补偿(ZDC)

- ① 在[Tools]菜单栏下选择[Configuration],打 开[Configuration]对话窗口。
- ② 选择[Microscope]分页。
- ③ 选择[ZDC]。
- ④ 定义标本培养容器的材质: "Glass"或
 "Plastic"。
- ⑤ 输入培养容器的厚度。
- ⑥ 如需配合DIC功能使用, 勾选此项。
- ⑦ 点击 🔽 按键确认。





Your Vision, Our Future

<u>2D浏览与处理</u>



<u>3D浏览与处理</u>





3D动画制作





打开Z序列图像,选择[Volume]进行3D展示。

① 点击 Viewer 按键切换至浏览界面. 在 [Tool Window] 菜单栏下选择 [Volume]

Setting],打开工具窗口。

- ② 在[Volume Setting]工具窗口下选择 [Movie]分页。
- ③ 在[Movie Item]窗口中选择"Key Frame", 点击 Add 按键。"Key Frame"下方将出现 "Sequence xx" 。
- ④ 选中新生成的"Sequence xx"。

注册关键帧(Key Frame)

- ⑤ 在[Image]窗口下,使用鼠标拖动3D图像至预 期位置,单击鼠标右键,选择 [Add Key Frame],将当前位置注册为"Key Frame xx",在[Volume Setting]工具窗口的[Id] 窗口中显示。
- ⑥ 重复第⑤步,直至所有预期位置均被注册为 关键帧(Kev Frames)。
- ⑦ 点击 💵 按键, 预览录制的视频。软件将自 动插补关键帧之间的动作。

输出视频

- ⑧ 在[Movie Item]窗口中,选中需输出的 "Sequence xx", 点击 Export 按键, 打开 [Export]对话窗口。
- ⑨ 点击 ▶ 按键选择保存视频文件的位置,在 [File name] 输入文件名. 在 [Frame rate] 设 置适合的播放帧速。
- ⑩ 点击 Save 按键,保存视频文件。

<u>处理:亮度投影</u>





图像输出





将图像保存为可供第三方软件识别的格式。

输出单个图像文件

- ① 在图像上单击鼠标右键,选择弹出菜单中的 [Export], [T开[Export]对话窗口。
- ② 在框内显示图像的输出位置,如果需要,点
 击
 按键改变图像保存位置。
- ③ 在[Save as type]栏中选择输出图片类型。
- ④ 在[CH/Range]窗口中,选择需要输出图像的 通道,如为序列图像,可设置输出图像的范 围和步进。
- ⑤ 如第③步中[Save as type]的选择了常规图 像格式,此处可选择是否将图像上的R01和 标尺印入图像。
- ⑥ 如第③步中[Save as type]的选择了常规图像格式,此处可选择输出图像的位数和模式(彩 色/黑白。建议输出模式如下图所示。

RGB Color with Merge 🔽 24bit Full Color 🚺 Amount 🔹

- ⑦ 勾选此项,图像属性(图像采集条件)将输出 为文本<u>文档</u>。
- ⑧ 点击 Save 按键,输出图像。

输出多个图像文件

- ⑦ 在软件的[File]菜单栏下,选择[Export multiple files],打开[Export multiple files]对话窗口。
- ⑩ 选择需处理图像的方法。点击
 一 按键选择
 需处理图像的位置。
- 选择保存输出图像的位置,在 [Save as Type]栏选择输出图像的类型。
- 12 重复第<u>④</u>到⑦步。
- (13) 点击 Save 按键,输出图像。

保存和调用观察方法

Live Tile





查看图像的采集参数

- ① 点击 🧲 按键,打开扩展窗口。
- ② 选择[Property]分页,查看图像采集参数。

从已有图像中调用采集参数

在[Property]分页中,点击 🕞 按键。



双击鼠标左键可直接输入

1

V OLYMPUS FV31S-SV Tool ₩indow

Layout

D⁰

保存/调用观察方法

① 在[Tool Window]菜单栏下,选择[Observation] Method]。

各按键功能:

Ŕ

- :调用预先保存的图像采集参数(观察方法)。 5
- ٥.
- \mathbf{D}^{*}_{\odot} :将当前的图像采集参数更新至列表中选中 的观察方法。
 - :删除列表中已有的观察方法。

光谱扫描与拆分



Your Vision, Our Future

<u>光谱序列扫描(单通道采集)</u>



开始下列步骤之前,请正确设置单幅图像采集参数(参见4-5页)。

更换至光谱扫描模式

在[PMT setting]工具窗口中,在 [Mode]栏选择 "Lambda"模式。

选择检测通道

- ② 点击 Dye & Detector Select 按键,打开[Dye & Detector Select]对话窗口。点击 All Clear 按键 清除已选通道。
- ③ 在[Dye & Detector Select]对话窗口,选择 [Channel]分页。在[Detector List]中选择 "High Sensitive Detector CH1(选配)"或 "Standard Detector CH1",点击 Add 按键。 然后点击 K 按键确认。
- ④ 勾选所需的激发光波长,打开相应激光器。

设置DM和SDM

- ⑤ 在[Tool Window]菜单栏中选择[Lightpath], //打开[Lightpath]工具窗口。
- ⑥ 在[Lightpath]工具窗口中选择[LSMScanner]
 分页。点击"DM"按键显示二向分光镜列表。
 选择与第④步所选激发光波长匹配的"DM"。
- ⑦ 参考图A,检查光路是否正确设置。

设置带宽[Band width]和步进[Step Size]

⑧ 在[PMT Setting]工具窗口中,在[Band width]栏设置带宽,定义光谱序列扫描时每次 采集图像的波长范围,在[Step size]栏设置 步进,定义每次图像采集之间的波长间隔。

【推荐值】:

- ・帯宽[Bandwidth]:
- 推荐值为15nm,如预览图像过暗,适当增加。
- ・步进[Step Size]: 推荐值为5nm,步进值越小,采集到的图像 数据越准确。

<u>光谱序列扫描(单通道采集)</u>



<u>光谱序列扫描(多通道采集)</u>



开始下列步骤之前,请正确设置单幅图像采集参 数(参见4–5页)。

更换至光谱扫描模式

在[PMT setting]工具窗口中,在 [Mode]
 中选择 "Lambda" 模式 。

选择检测通道

- ② 点击 Dye & Detector Select 按键,打开[Dye & Detector Select]对话窗口。点击 All Clear 按键 清除已选通道。
- ③ 在[Dye & Detector Select]对话窗口,选择 [Channel]分页。在[Detector List]中选择所 需使用的检测通道,点击 Add 按键添加。然后 点击 K 按键确认。
- ④ 勾选所需的激发光波长,打开相应激光器。

设置DM和SDM

- ⑤ 在[Tool Window]菜单栏中选择[Lightpath],打开[Lightpath]工具窗口。
- ⑥ 在[Lightpath]工具窗口中选择[LSMScanner]
 分页。点击 "DM" 按键显示二向分光镜列表。
 选择与第④步所选激发光波长匹配的 "DM"。
- ⑦ 参考图A,检查光路是否正确设置。

设置带宽[Band width]和步进[Step Size]

⑧ 在[PMT Setting]工具窗口中,在[Band width]栏设置带宽,定义光谱序列扫描时每次 采集图像的波长范围,在[Step size]栏设置 步进,定义每次图像采集之间的波长间隔。

```
    【推荐值】:
    ·带宽[Bandwidth]:
推荐值为15nm,如预览图像过暗,适当增加。
    ·步进[Step Size]:
推荐值为5nm,步进值越小,采集得到的图像数据越准确。
```

<u>光谱序列扫描(多通道采集)</u>







Analysis X volume Setting Graph Table Single process Ive processing Post processing Batch Processing Graph Processing Item Processing Ite	 点击 Viewer 按键切换至浏览界面。 在[Tool Window]菜单栏下选择[Analysis], 打开工具窗口。 按下图所示,选择 "Single process",点击 "Post processing" 按键。 Single process Multiple process Live processing Post processing ④ 在[Processing Item]窗口中,选择
Processing Property Basic AdFanced Adfanced Target Channel Mode Mode Mode Mode OrtEl Ope Profile Save Folder OrtEl Ope Folde Save Folder Ope Folde Save Folder OrtEl Ope Folde Save Folder Ope Folde Save Folder	 (spectral Deconvolution), 点击 按键, 移除已有项目。 (金 在[Input/Output setting]窗口, 双击 [Input]栏, 选择需要处理的图像文件。 (金 在[Processing Property]窗口下的[Mode]栏, 选择 "Blind Unmixing"。 (⑦ 在[Number of SpectralDate]栏中, 输入需处理图像中标记的染料的数量. (⑧ 点击 Process 按键开始光谱拆分处理。



Volume Setting Graph Single process Withple process Processing Test Processing Test Single processing Test Processing Test Single processing Test Processing Test Single processing Test Concentration Test Single processing Test Concentration Test Single processing Test Concentration Test Provide Test Single processing Test Single processing Test Single processing Test	 点击 Viewer 按键切换至浏览界面。 在[Tool Window]菜单栏下选择[Analysis], 打开工具窗口。 按下图所示,选择 "Single process",点 击 "Post processing" 按键。 Single process Multiple process Live processing Post processing 在[Processing Item]窗口中,选择 [Spectral Deconvolution],点击 Remove 按键,移除已有项目。 在[Input/Output setting]窗口,双击 [Input]栏,选择需要处理的图像文件。 在[Processing Property]窗口下的[Mode]栏, 选择 "Normal Unmixing"。 在 "!DYEO Dye Profile Load File" 栏,选 取已保存的染料信息文件名称。(参见30页) ※ 制备标记单一染料的样品,获取更加准确的 光谱信息,并保存为文件以供随时调用。 点击 Process 按键开始光谱拆分处理。

<u>Notes</u>

<u>Notes</u>