

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,需登录仪器共享系统(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、爽约一次扣信用分20分,1个月内出现3次及以上,扣信用分40分并停用共聚焦权限1个月; "单次预约时段使用率" (使用率=预约时段内上机时长 -> 预约时长\*100%)低于50%或 "延迟上机时间"大于60分钟,一个月内出现2次扣信用分10分,一个月内出现3次扣信用分 15分,以此类推,一个月内出现5次及以上,扣信用分20分并停用共聚焦权限1个月,"单次 预约时段使用率"低于10%按爽约处理。

本设备每两周安排一次统一培训,培训时间在系统"南沙:高分辨率激光共聚焦显微镜 (Zeiss/LSM900 with Airyscan)"预约界面公布;如需培训,请在预约须知中扫码报名。

小程序搜索蔡司显微镜-培训课程-系列课程-添加设备-输入序列号2650001017可学习更多课 程







# 1 按照1-2-3 (钥匙从 "0" 转到 "1" ) -4-5-6-7的顺序依次开启各个部件。







### ZEN

②双击桌面 ZEN 3.4 (blue edition) , 点击 "ZEN system" 启动ZEN (Blue) 软件; ③会弹出校准载物台的提示,可校准也可不校准,可直接"Skip Calibration", 若要校准需确保载物台四周无阻挡物并把物镜降到最低,以防校准过程中物镜 受到碰撞。



### 二、选择合适的样本夹适配器









适配于孔板、100mm培养皿 (由于共聚焦物镜工作距离短,使 用孔板和普通培养皿基本聚不了焦, 建议使用共聚焦皿或玻片)

### 三、正确放置样本夹适配器



### (非常关键, 否则将导致无法聚焦!!!)















1先选择低倍物镜,并把物镜降低;
 2轻轻抬起显微镜上半部分至固定位置,再放置样本;如为玻片样本,需
 盖玻片朝下放置样本;

③放好样本后,再缓缓把显微镜上半部分 复原,注意,一般侧面两条黑线处于对齐 位置,如放置的是比较厚的培养皿,可调 节黑色旋钮使聚光镜稍稍抬高,以免压碎 聚光镜和培养皿;





调此旋钮可调 节聚光镜位置

# 五、移动载物台,目镜下找到目标视野,调焦





ZEINN

BF(彩色明场)、3个荧光通道、DIC-10x&20x(微分干涉相衬, 浮雕效果,搭配10倍和20倍物镜使用); DIC-40x&63x(搭配 40倍和63倍物镜使用)

③目镜下观察,先用低倍物镜找到样本,通过粗准和细准焦螺旋 调好焦距,再转到高倍物镜,把需要拍摄的区域放到视野中央; ④明场或DIC观察时适当调节机身前方旋钮至合适光强;荧光观 察时调节荧光手柄旋钮至合适光强。

请注意:只有63倍物镜是油镜,使用时需要加 镜油,用完请用擦镜纸蘸无水乙醇擦拭物镜, 其他物镜不得加油!!!



明场光源亮度调节旋钮



荧光光源亮度调节手柄



通过触摸屏切换物镜



#### 拍明场,可忽略此提示):

Acquisition

0

当在

1.当用Locate目镜观察明场时,需要将显微镜顶上的黑色旋钮拧到2号位;

2.当用Acquisition获取明场图像时,需要将显微镜顶上的黑色旋钮拧到1号位。



### 六、设置图片自动保存路径(若不设置 则每拍完一张照片需自行手动"另存为")



注:在File Name Preview可看到文件的保

存路径和命名方式

Locate Acquisition Proc	essing Analy	sis Applicatio	ons 🔻
xperiment *			••
* Smart Setup 🗔 Al Sa	mple Finder	🔄 Re	
AF 🖸 Find Focus Set Exposure	📾 t Live Conti	⊡ @ nuous Snap	Ð
Z-Stack Tiles Time Series	æ	11.591 Start Experimen	
Experiment Regions Automated Image Export	Auto Save		
Acquisition Parameter			
Acquisition Mode		Show All	2
▲ Channels		= Show All	
Procus Strategy		= Show All	
Software Autofocus		□ Show All [2	
Multidimensional Acqu	iisition		
i Experiment Informatio	n	2	
Applications			
🖪 Auto Save		= Show All	
Folder C:\Users\Dell\Pictur	×	Œ	
Name New			1
File Name Preview C:\Users\Dell\Pictures\2024	1-04-25\New-0	1.czi	



### 七、选择染料



A、Fastest:拍摄速度最快,发射波长接近 的荧光染料间存在串色现象;

B、Best signal: 拍摄速度最慢; 基本避免 了发射荧光的串色;

C、Smartest (Line): 结合上述两者优势, 减少串色的同时拍摄速度较快, 但是光路中 硬件设置不能改变。

固定样本推荐使用Best signal、变化较快的样本推荐使用Smartest或者Fastest



# 八、预览、对焦



①点击 🔜 进行预览,在Channels下选择要预览的染料行,此行将高亮显示; ②点击荧光强度动态范围的Min/Max,将自动框住最暗至最亮的荧光强度范围, 使图片凸显出来,方便调焦;

③按住Ctrl+鼠标滚轮可对焦距进行微调,并不断点击Min/Max,直至调到最亮的焦面,可按需选择调焦的速度;





按需选择调焦的速度

### 九、主要成像参数设置

①拖动 488mm 一 2008 ③ 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; "High Intensity Laser Range":不勾选最小激光值能达到0.01%, 但最高值分别只能达到3.5% (405),4.5% (488)和5% (561、640),勾选后激光值能达到100%,但最小值不能 低于0.2%;

② "Pinhole"一般设置为1AU,增大Pinhole可以提高图像亮度,但会增加非焦面信息;减少Pinhole可以增加景深,但是会减少图像亮度;

③ "Master Gain" 增加可以增加图像亮度,但是也会提高背景噪音,一般建议设置500-800V;

④不建议调节Digital Offset和Digital Gain, 一般Digital Offset默认设置为0%, Digital Gain默认设置为1.0%。

Tools

注意:调节图片拍摄参数使图片的荧光强度 落在动态范围内,否则图片将过曝,可将预 览图片下方的 Dimensions 下 ✔ Range Indicator 打勾,此时图片过曝的地方将以红色指示, 一般情况下建议有一两点过曝即可)







### 九、主要成像参数设置

漂白越多;一般可设置在7; E、Direction:一般建议设置单向,双向扫描可以减少 扫描时间;

F、Averaging:增加averaging次数可以减少背景噪音,但会增加扫描时间;一般建议2x或4x。



ZEINN

# 十、明场、DIC使用

1、在荧光成像同时,如需借助白光成像进行细胞定位,则 ①选中将488或561激光器作为激发光的通道; ②勾选T-PMT (明场) 检测器, 将与①选中的通道共用同

一根激光器;

③无需再调节激光强度,通过调节Master Gain值使图像达 到合适亮度,一般300V左右;

2、贴壁细胞或细胞爬片的细胞成像对比度较低,进行明场 成像时,可以使用DIC: 搭配10倍和20

倍物镜使用

①在软件 界面,选择观测模式: BF DAPI GFP Rhodamin DIC-10x&... DIC-40x8... \_ \_ 搭配40倍和63倍物镜使用 ②将滑杆划到右侧; ③在软件 ~ ~ 界面, 点击

④一边旋转所用物镜下DIC插件的旋钮,一边调节Master Gain值使图像获得合适立体感和亮度。(一般之前使用的

人调过,都会在比较合适的位置,就不用再调了)







✓ Show All



① 在要拍的通道前 🗹 🌆 🖬 打勾, AF488 若要改变拍摄的先后顺序,选中染料行, © Snap 完成拍图; ② 点击 ③ 在图片下方的Graphics工具栏中,选 择添加比例尺,在图像上选中添加好的 比例尺点击右键,选择Format Graphical Elements,可以更改线条颜 色, 字体大小等注释格式。









### 十二、应用之前图片的拍摄参数



Locate Acquisition Processing Analysis Analysis		Aive.czi 🛛 Snap-5539.czi* 🖉 🌽 Snap-55	40.czi* 😣 🥜 Snap-5541	.czi* 🛛 🌽	
Locate Acquisition Processing Analysis Applications		FOR MORE AND A CONTRACT OF	Image Size (Scaled)	319.45 um x 319.45 um	
Experiment25 *	* Acquisition Parameter	1	Bit Depth	8 Bit	
* Smart Setup 🖸 Al Sample Finder	- Acquisition Mode Show All	20	Image Center Position	X: 1.72 mm, Y: -607.60 µm	
	LSM		Stage Position	X: 1.72 mm, Y: -607.60 µm	
AF 🙆 🔤 🚳	France	Split	ROI Center Offset	X: 0.00 µm, Y: 0.00 µm	
Find Focus Set Exposure Live Continuous Snap		III MARCHAN CAN HA			
7.Stack		Gallery	Acquisition Information		
Tiles	O Scan Area	49	Acquisition Start	10/28/2024 4:25:23 PM	
Time Series	Image Size 219.5 um x 219.5 um Pixel Size 0.21 um				
		Drofile		Plan-Apochromat 20x/0.8 M27	
	Frame Size 1024 px - × 1024 px - Presets *			Track 1	Track 2
Experiment Persions	Sampling 0.5 x Confocal	Histo	Reflector		
Automated Image Export			Contrast Method		
Automation	Frame Time 10.13 s Pixel Time 1.03 µs	Colocal.	Pinhole		
	Scan Speed 7 Max	*	Laser Wavelength		
E Imaging Setup ✓Show All	Direction		Laser Blanking		
			Scan Mode		
Standard	Line Step		Scan Zoom		
Track1 Track2	Averaging None 2x 4x 8x 16x	1	Rotation		
Confocal Confocal	Mode Repeat per Line Repeat per Fra		Pixel Time		
<u> </u>	Method Mean Intensity Sum Intensity		Frame Time		
The sector of th			LSM Scan Speed		
	Bits per Pixel		Scan Direction	Unidirectional	Unidirectional
	👻 🕰 Channels 🖌 Show All 📝		Line Step		
			Averaging		
	✓ Track1 Contocal AF555 Ref.	1		Channel 1 Channel 2	Channel 3
	T-PMT •		Channel Name	AF555-T1 T-PMT-T1	AF488-T2
00 500 600 700	✓ Track2 Confocal AF488	1	Channel Description		
	Pocus Ret.		Dye Name		
F488: SP 545 Ch3: No Filter	High Intensity Laser Range		Channel Color		
· ·	Track2		Excitation Wavelength		
			Emission Wavelength		
🗸 AF488 🝷 📘 🗲 AF488 410 nm - 546 nm	Lasers 405 🗹 488 561 640		Effective NA		
💷 🔻 🔤 👻 Ch2 550 nm - 560 nm	488 nm 0.2 %		Detection Wavelength		
Ch3 560 nm - 700 nm	Pinhole –) 24 µm 🕄		Imaging Device		
□ ▼ ■ ▼ T-PMT 400 nm - 400 nm	1.00 Airy Units A 1.1 um section				
			Detector Type	GaAsP-PMT Multialkali-PM	
	Alexa Fluor 488		Detector Gain		
	Master Gain 576 V 🗘		Detector Offset		

打开之前拍摄图片的czi格式文件, Info记录了拍摄的参数, 点击Reuse即可将该参数 应用到本次的拍摄。 十三、图片导出





②在 \_\_\_\_\_ 手动选择要导出的图片;

③选择导出图片格式和导出图片质量尺寸;

④选择导出图片是否包括单通道图像、叠加图像和图像上的 注释;

⑤选择导出位置和是否创建文件夹,在Prefix输入文件夹的



⑥点击 🔬 .



#### 图片批量导出





#### 图片批量导出

\*





Use	input Foider	as Output Folder Naming.	3				Copy Parameters Paste Parameters Check All
s	Consistenc	File Name	Size	Method	Output Name	Output Storage Path	
2)		C:\Users\ZCCHQIAO\DownI	6.36 MB	Image Export	III. CONSISTENCE AND CONSISTENCE	C:\Users\ZCCHQIAO\Downloads\FRET	
2	4.1	C:\Use s\ZCCHQIAO\Downi	1.67 MB	Image Export		C:\Users\ZCCHQIAO\Downloads\FRET	
2	1	C:\Users\ZCCHQU.U\Dow\L	29.15 MB	Image Export		C:\Users\ZCCHQIAO\Downloads\FRET	
?	1 N 1	C:\Users\ZCCHQIA )\Dov nl	1.99 MB	Image Export		C:\Users\ZCCHQIAO\Downloads\FRET	
?		C:\Users\ZCCHQIA )\Dov nl	1.78 MB	Image Export		C:\Users\ZCCHQIAO\Downloads\FRET	
2		C:\Users\ZCCHQIA )\Dov nl	6.42 MB	Image Export		C:\Users\ZCCHQIAO\Downloads\FRET	
2		C\Users\ZCCHOIAD\Downl	1.85 MB	Image Export		C\Users\7CCHOIAO\Downloads\FRFT	

7、选择其中一个文件设置导出文件参数

8、此处设置导出文件格式,和单个文件导出参数设置类似



🖌 Use	input Folder	as Output Folder 📃 Naming	D				9	Copy Parameters	Paste Parameters	Check All	Run Selected
S	Consisten	File Name	Size	Method	Output Name	Output Storage Path					F
3		C:\Users\ZCCHQIAO\DownI	6.36 MB	Image Export	2.	C:\Users\ZCCHQIAO\Downloads\FRET					
2		C:\Users\ZCCHQIAO\DownI	1.67 MB	Image Export		C:\Users\ZCCHQIAO\Downloads\FRET					
(7)		C:\Users\ZCCHQIAO\DownI	29.15 MB	Image Export		C:\Users\ZCCHQIAO\Downloads\FRET					
2	18 8	C:\Users\ZCCHQIAO\DownI	1.99 MB	Image Export		C:\Users\ZCCHQIAO\Downloads\FRET					
		C:\Users\ZCCHQIAO\DownI	1.78 MB	Image Export		C:\Users\ZCCHQIAO\Downloads\FRET					
2		C:\Users\ZCCHQIAO\DownI	6.42 MB	Image Export		C:\Users\ZCCHQIAO\Downloads\FRET					
	18	C:\Users\ZCCHQIAO\DownI	1.85 MB	Image Export		C:\Users\ZCCHQIAO\Downloads\FRET					
_	✓ + Add	I – Remove 🗴 Remove All							1	/ Load List	Save List

#### 9、设置好参数后选择"复制参数";

	Vise Input Folder as Output Folder 🔤 Naming) 12	Copy Paran et rs Paste Parameters Check All Run Selected
Apply 3	S Consistent File Name Size Method Output Name Output Storage P	sth
	👔 👎 C\Users\ZCCHQIAO\Downl 6.36 MB Image Export C\Users\ZCCHQIA	O\Downloads\FRET
Show All	😮 🏮 🖷 C\Users\ZCCHQIAO\DownI 1.67 MB Image Export C\Users\ZCCHQIA	O\Downloads\FRET
	👔 🚦 🖷 C:\Users\ZCCHQIAO\Downi 29.15 MB Image Export C:\Users\ZCCHQIA	O\Downloads\FRET
	C:\Users\ZCCHQIAO\Downi 1.99 MB Image Export C:\Users\ZCCHQIA	
	CAUSers/ZCCHQIAO/DownI, 1.78 MB Image Export CAUSers/ZCCHQIA	O\Downloads\FRET
	C\Users\ZCCHQIAO\DownI 6.42 MB image Export C\Users\ZCCHQIA	O\Downloads\FRET
	C\Users\ZCCHQIAO\DownI 1.85 MB Image Export C\Users\ZCCHQIA	O\Downloads\FRET
	A V + Add Kemove III Kemove All	🖉 Load List 🕅 Save List

- 10、选择所有文件(Ctrl+A);
- 11、"粘贴参数";
- 12、默认导出到原始文件的位置处,也可以手动更改;
- 13、点击"应用"



#### First/Last模式-通过上下边界决定3D成像的Z轴范围



②在 "First/Last"模式下,选择z轴扫描范围:在Live状态下,按住Ctrl+鼠标滚轮调节z轴, 分别设置起始 "Set First"和结束 "Set Last"位置,单击 "Optimal"设置最佳间隔;
③按需选择 "All Tracks per Slice" (每层所有通道扫完再扫下一层,成像速度较慢)或 "Full Z-Stack per Track" (每个通道扫完整个z轴再换下一个通道,成像速度较快,但是这个方法 不适合快速变化的样品)
④单击 "Start Experiment"



Center模式-主要通过设定Z轴的中间位置和3D厚度来决定成像范围。



①选择Z-stack;

② center模式下, Live下按住Ctrl+鼠标滚轮调节到成像的中间位置, 单击"center", 然后 设置需要层扫的层数 Slices, 并单击"optimal";

③按需选择"All Tracks per Slice"(每层所有通道扫完再扫下一层,成像速度较慢)或"Full Z-Stack per Track"(每个通道扫完整个z轴再换下一个通道,成像速度较快,但是这个方法不适合快速变化的样品)

④单击 "Start Experiment"



#### Match Pinhole



多通道荧光拍摄Z-stack需要考 虑光切厚度不一致的问题: 1、可以通过点击"Match Pinhole" 自动调节不同track 的针孔使光切厚度相似; \*这种方法的缺点在于可能会使 长波长的针孔过于小,不利于 弱荧光成像。

Optimize Sec Ch2-T1 Ch 0.7 μm 52.3 %	ctioning and Ste S1-T2 Ch1-T3 0.7 μm 0.7 μ 49.9 % 50.9	p 3 um 9 %
Match Pinhole	Optimal	Undo



#### Match Pinhole



2、通过手动调节针孔到 一致,可以保证荧光强 度的同时,保证光切厚 度一致。

👻 🛝 Channels			🗸 Show all 🛛 🙋
Tracks	Channells		
Track 1	A568		
Track 2	A488		<b>—</b> •
Track 3	A405		<b></b>
✓ · · + ů		Expand All	Collapse All
Track Configuration no	t defined		🖹 🖬 🐨
Track 1 - LSM			
Lasers			
405 458 48	88 514 561	633	
🛕 561 nm ———	1		2.0 🗘
Pinhole —			61.0
1.00 Airy Units ≜	0.9 μm section		1 AU max
🔺 488 nm ———	1		2.0 🗘
Pinhole —			61.0
1.18 Airy Units ≙	0.9 µm section		1 AU max
405 nm			20
Ninhala 0			
Pinnole			01.0
1.39 Airy Units ≙ 0	).9 μm section		1 AU max



最大密度投影

①在Z-stack文件选择 "Ortho"页面 ②勾选"Maximum Intensity Projection" 前方复选框 ③选择"X-Y Plane" ④点击"Create" ⑤选中蓝色矩形框,按 "Delete"删除。





#### 三维图像特定角度截图

①在Z-stack文件选择
 "3D"页面
 ②用鼠标把图像调整至
 合适角度
 ③选择隐藏或显示辅助

信息,从左至右依次为: 网格、坐标轴和标尺 ④点击"Create Image"





三维图像视频生成

①在Z-stack文件选择"3D"页面;
 ②在Series栏目下, Render Series
 选择"Position List";
 ③选择隐藏或显示辅助信息,从左
 至右依次为:网格、坐标轴和标尺;
 ④用鼠标把图像调整至几个合适角
 度,分别点击Add;

⑤可先点击"Preview"预览下效果, 效果可以的话就可以点击"Apply" 生成视频;

⑥可在Player栏目下调节播放速度 (FPS),并在导出视频(与导出图 片方法类似)时, Mapping选择 Fixed Duration,设置成相应的fps。





#### ①选择"Tiles";

Tiles

②在"Tiles"栏目下,点<</li>
击"Show viewer";
③确保图片下方"Tiles"
栏目选中"Separate

Container";

④点击"Live";

⑤ - ⑦使用合适的形状在坐

标图上圈出拼图区域。

Lacate		Tiles - Advanced Setup 💿 Snap-977.czł* 💿 🥜	III CD ↔ - (ve.cs ⊙)
Locate Acquisition Processing Analysis Applications Experiments Simart Setup CO Ats Find Focus Set 8 posure The Series The Series Start Experiment Contracus Start Experiment Start E	# Acquisition Parameter   Acquisition Mode Show Al   Charmels Show Al   To coas Stategy Show Al   Software Autolocus Show Al   Multidimensional Acquisition   The Regions   The Regions   The Regions   Verify Tile Regions   Verify Ti	These Advanced Setup ● Snap-977.cd <sup>®</sup> ● Draw Tile Regions directly onto your sample p Preview 1970 - 1100	
	Properties Tile Regions: No selection		And
	X Y Set Current Z	Zoom	Increase in Triles View



Add Multiple Support Point

①建立好拼图范围后选择

"Focus Surface and Support Points"

②设定好需要分布的支持点的行列数量后点击"Distribute", 拼图区域上出现黄色小圆点,代表支持点,可以手动调节这些点的具体位置。

③选择"Verify",对选好的 support points进行焦距校正;

A Channels	Show All			.µm			50000	
			Preview					
Focus Strategy	✓ Show All							
Software Autofocus	✓ Show All		8					
idimensional Acquisition		1	Tiles	ñ.				
	✓ Show All		-		-	Contrast of		
gions			±				31.00	
tions				°. -				
nple Carrier			:		195			
us Surface and Support Points				hàt I	1000			
s surface and support round				:				
Lieu nie Regions.		1	Positions	-				
d Single Support Point								
			•	-				
Current Desition Cont	ter of Tile Region							
Current Position Cen				1940				
Current Position Cen			++	3				
dd Multiple Support Points			++	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·				
dd Multiple Support Points			+++ ====					
Id Multiple Support Points	Distribute		+++					
dd Multiple Support Points ethod Generic olumns 3 3 Rows 3 3	Distribute		+++ 					
dd Multiple Support Points lethod Generic olumns 3 Rows 3 Auto-Distribute for New Tile Regions	Distribute		***					
dd Multiple Support Points lethod Generic olumns 3 Rows 3 Auto-Distribute for New Tile Regions Local (per Tile Region) Global (on Carrie	Distribute							
dd Multiple Support Points tethod Generic olumns 3 Rows 3 Auto-Distribute for New Tile Regions Local (per Tile Region) Global (on Carrie support Points of Selected Tile Region: T	Distribute er) IR1			- 1 Abota 1 1 Abota 1 1 Abota				
d Multiple Support Points thod Generic Jumns 3 Rows 3 A Auto-Distribute for New Tile Regions cal (per Tile Region) Global (on Carrie pport Points of Selected Tile Region: T	Distribute er) IR1 Z (um)			Podočić I · · · · I podoči		×-		
Current Position Cent d Multiple Support Points thod Generic umns 3	Distribute er) [R1 ✔ Z (µm) [905.9 µm					×-		
d Multiple Support Points thod Generic • umns 3 • Rows 3 • Auto-Distribute for New Tile Regions cal (per Tile Region) Global (on Carrie pport Points of Selected Tile Region: T • X (µm) • Y (µm) • 54729.8 µm 47139.9 µm 1	Distribute er) IR1 ✓ Z (µm) 1905.9 µm 1905.9 µm							
Multiple Support Points hod Generic mns 3 € Rows 3 € uto-Distribute for New Tile Regions tal (per Tile Region) Global (on Carrie port Points of Selected Tile Region: T ✓ X (µm) ✓ Y (µm) ✓ 54729.8 µm 47139.9 µm 1 55617.5 µm 47139.9 µm 1	Distribute er) <b>[R1</b> <b>i</b> Z (μm) 1905.9 μm 1905.9 μm					<u>.</u>		
Current Position Cent I Multiple Support Points hod Generic umns 3	Distribute er) R1 2 (μm) 1905.9 μm 1905.9 μm 1905.9 μm							
t Multiple Support Points ind Generic	Distribute er) <b>R1</b> <b>7</b> Z (μm) 1905.9 μm 1905.9 μm 1905.9 μm			- double 1 Ionoble 1 Ionoble 1				
Current Position Central Cent	Distribute er) fR1 ✓ Z (µm) 1905.9 µm 1905.9 µm 1905.9 µm 1905.9 µm							
Current Position         Cen           Id Multiple Support Points         ethod         Generic           itumns         3         Rows         3           Auto-Distribute for New Tile Regions         action         action           pocal (per Tile Region)         Global (on Carrie           upport Points of Selected Tile Region: T         Y (µm)         Y           5 54729.8 µm         47139.9 µm         1           5 5517.5 µm         47139.9 µm         1           5 5517.5 µm         47633.0 µm         1           5 5517.5 µm         47633.0 µm         1           5 5517.5 µm         47633.0 µm         1	Distribute er) fR1 ✓ Z (µm) 1905.9 µm 1905.9 µm 1905.9 µm 1905.9 µm 1905.9 µm					*		
d Multiple Support Points thod Generic umns 3	Distribute er) [R1 2 (μm) 1905.9 μm 1905.9 μm 1905.9 μm 1905.9 μm 1905.9 μm 1905.9 μm					2.		
d Multiple Support Points thod Generic umns 3	Distribute er) <b>IR1</b> <b>Z</b> (µm) 1905.9 µm 1905.9 µm 1905.9 µm 1905.9 µm 1905.9 µm 1905.9 µm							1
Multiple Support Points           nod         Generic           mns         3         Rows         3           uto-Distribute for New Tile Regions         al (per Tile Region)         Global (on Carrier)           port Points of Selected Tile Region:         T         >           54729.8 µm         47139.9 µm         1           54729.8 µm         47139.9 µm         1           54729.8 µm         47633.0 µm         1           5517.5 µm         47633.0 µm         1           55617.5 µm         48126.1 µm         1           55617.5 µm         48126.1 µm         1	Distribute er) TR1 * Z (μm) 1905.9 μm 1905.9 μm 1905.9 μm 1905.9 μm 1905.9 μm 1905.9 μm							
Multiple Support Points           nod         Generic           mns         3         Rows         3           uto-Distribute for New Tile Regions         al (per Tile Region)         Global (on Carrie port Points of Selected Tile Region: T           2         X (µm)         ✓ Y (µm)         ✓           54729.8 µm         47139.9 µm         1           55173.6 µm         47633.0 µm         1           55173.6 µm         47633.0 µm         1           55175.8 µm         48126.1 µm         1           55173.6 µm         48126.1 µm         1           55173.6 µm         48126.1 µm         1	Distribute er) TR1 ✓ Z (µm) 1905.9 µm 1905.9 µm 1905.9 µm 1905.9 µm 1905.9 µm 1905.9 µm					*		· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·







#### Support Point



Without support point

Manual support point



#### Verify Support Points

Set Z & Move to Next

🔔 Not all points have been verified.

Verify	y Tile Regions	s/Positions			? ×
	Name	Z (µm)	Tile Region	Array	
<b></b>	SP	-1293.2	TR1		
	SP	-1292.2	TR1		
	SP	-1292.2	TR1		
	SP	-1292.2	TR1		
	SP	-1292.2	TR1		
	SP	-1292.2	TR1		
	SP	-1292.2	TR1		
	SP	-1292.2	TR1		
	SP	-1292.2	TR1		
					* ▼
	None manual adjustr	nent	Select Verification	Helper Metho	od
	Nove to Curre	ent Point	Current Stag	e X/Y = Cu	rrent Point

Include Z when Moving to Points

Close

Current Z -1292.2 µm

④选择None (Manual adjustment) 手动校正,在预览模式"Live"下,双击第一个SP(Support Point),点击"Move to Current Point",进行手动调焦后,点击"Set Z & Move to Next",随后对后续SP进行逐个校正;校正好的SP前面会打绿勾,全部校正好后点击"Close"。

#### Definite Focus Verify Support Points



⑤校正所有SP后,选择适合的"Interpolation Degree";样品表面越不平整需要Interpolation Degree越高,选择的SP数量超过Interpolation Degree需要的最小值可以增加计算的可靠程度。

ZDINN

22 SP

![](_page_31_Figure_4.jpeg)

4 SP

One SP

#### Definite Focus Verify Support Points

👻 🧿 Focus Strategy	✓ Show A					
Focus Strategy Wizard						
Optimize this fo	ocus strategy					
Use Z Values/ Focus Surface defined in Tiles Setup						
Initial Definition for Z Values/ Focu	s Surface					
By Tiles Setup						
Z Values/ Focus Surface						
Local (per Region/Position)	Global (Carrier based	l)				
Adapt Z Values/ Focus Surface	e					

⑥随后在"Focus Strategy"工具栏中确定如上图所示选项:对焦方法为

"Use Focus Surface/Z Values Defined by Tiles Setup", Focus Surface的方法为"Local (per Region/Position); ⑦上述设置结束后,点击"Start Experiment"拼图

![](_page_33_Picture_1.jpeg)

#### **Option**

 Options
 Tile Overlap 10 %
 Stage Travel Optimization Travel in Tile Regions
 Tile Regions/Positions
 Sort by Y, then X
 Use Stage Speed from Stage Control
 Use Stage Acceleration from Stage Control
 Move Focus to Load Position Between Regions/Positions
 Split Scenes into Separate Files
 Image Pyramid During Acquisition "Option"中几个关键参数:
1、"Tile Overlap"代表图片边缘互相重叠百分比,一般默认10%;
2、"Travel in Tile Regions"代表拼图时的方向: "Comb":单方向拼图;
"Meander":双向拼图; "Spiral":
螺旋形从中向外拼图。

![](_page_33_Figure_5.jpeg)

![](_page_34_Picture_0.jpeg)

#### Stitching

拼图结束后需要进行图片处理消除拼图中的接缝:

- ①在软件 界面, Method 栏目下选择stitching;
- ②在 **Liput** 手动选择要进行处理的图片;
- ③选择New Output;
- ④勾选Fuse Tiles;
- 5选择Yes-Best-Best。

![](_page_34_Picture_8.jpeg)

![](_page_34_Picture_9.jpeg)

![](_page_34_Picture_10.jpeg)

# 十六、AI Sample Finder

![](_page_35_Picture_1.jpeg)

![](_page_35_Figure_2.jpeg)

![](_page_35_Picture_3.jpeg)

# 十六、AI Sample Finder

⑧选择荧光染料;
⑨鼠标左键点击选中预览通道,并在前方√
(选中的通道将高亮显示);
⑪点击"Live";
11.点击"Preview Scan",使用2.5倍物镜
进行拍摄得到预览图;
12.点击"Finish";
13.点击"OK"。

![](_page_36_Picture_2.jpeg)

![](_page_36_Picture_3.jpeg)

![](_page_37_Picture_1.jpeg)

![](_page_37_Picture_2.jpeg)

![](_page_37_Figure_3.jpeg)

①点击 "Smart Setup" ,选择需要的染料; ②点击"Airyscan"; ③在下方的三角中选择不同的Airyscan模式 ,例如左下角 "Resolution" 代表Airyscan 的SR模式,分辨率更好,右下角 "Speed" 代表Airyscan的快速模式, 拍摄速度更快。 不选择系统默认SR模式。 ④选择 "Best Signal" 或 "Smartest" 模式 ; 类似前述共聚焦中的原则, Smartest相对 于Best Singal可提高拍摄速度,但是要注意 可能发生的串色问题。

调节激光强度, 0.20 % • 激光越强,信号强度越高;但是也越容易发生淬灭; "High Intensity Laser Range": 不勾选最小激光值 能达到0.01%,但最高值分别只能达到3.5%(405), 4.5% (488) 和5% (561、640) , 勾选后激光值能达 到100%,但最小值不能低于0.2%; Track3 ⑥ Master Gain" 增加可以增加图像亮度,但是也会提 高背景噪音,一般建议设置500-1000V;

⑦不建议调节Digital Gain, 一般Digital Gain默认设置 为1.0%。

注意:调节图片拍摄参数使图片的荧光强度落 在动态范围内, 否则图片将过曝, Airyscan模 式不用要求占满整个Display的动态范围。

(5) 拖动

![](_page_38_Figure_4.jpeg)

![](_page_38_Picture_5.jpeg)

// I I K K

ZEISS

- ⑧ 在Acquisition Mode下主要设置如下参数:
- A、Scan area扫描区域居中;
- B、"Sampling"选中"SR"
- C、Scan Speed:选择最快
- D、Averaging: 选择 "None"
- ⑨ 如果有参数设置不能满足达到Airyscan 最高分辨率,软件会有相应提示,根据提示更改参数后可以进行二维图像拍摄 (Snap)或者多维图像拍摄 (Strat Experiment)

![](_page_39_Picture_8.jpeg)

![](_page_39_Picture_9.jpeg)

![](_page_40_Picture_1.jpeg)

①拍摄完的图片还需进行一步处理:
1.在软件 死面, 死面 栏目下选择
Airyscan Processing;
2.在 予动选择要处理的图片;
3.如果是z-stack图像,请选择 "3D Processing";
2D图像可以勾选 "2D SR Processing"进一步提高分辨率;

![](_page_40_Picture_3.jpeg)

ο

![](_page_40_Picture_4.jpeg)

![](_page_40_Picture_5.jpeg)

### 十八、关机

![](_page_41_Picture_1.jpeg)

![](_page_41_Picture_2.jpeg)

①关机前请将物镜切换至最低倍镜,并把物镜z轴降到最低; ②关掉软件,等待屏幕中间shutting down的提示消失; ③关掉电脑;

④按顺序依次关闭7-6-5-4-3 (钥匙从 "1" 转到 "0" ) -2-1。

![](_page_41_Picture_5.jpeg)

#### 提示:蔡司激光共聚焦显微镜离线软件,仪器共享系统说明文档有下载链接; 更多数据处理方法,可关注"蔡司显微镜"小程序,进入生命科学研究-生物制药-云课堂,观看"显微图像的处理与分析"视频。

![](_page_42_Picture_1.jpeg)

ZEINN

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 任何疑惑,欢迎发邮件给杨佩佩老师(<u>136817071@qq.com</u>)进行指正,谢谢!<mark>本指南为</mark> <mark>精准平台所有,未经允许,请勿转载</mark>!