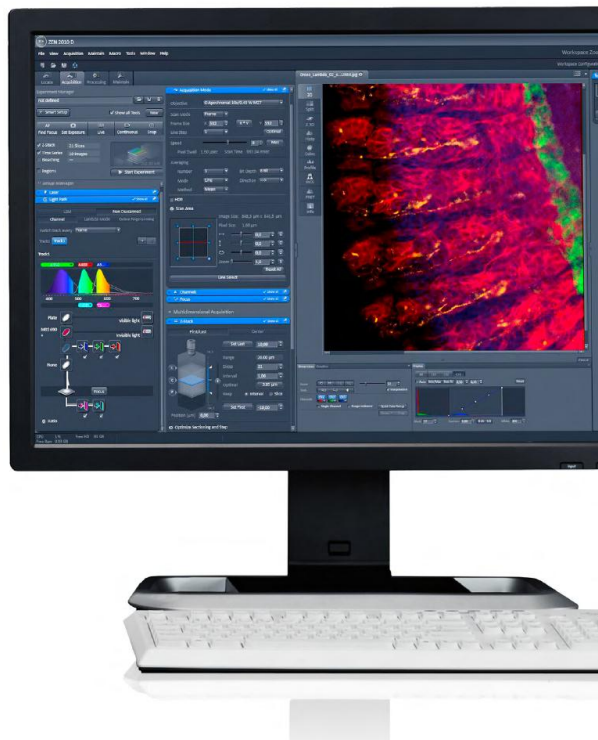




LSM 710/780 简要使用说明

蔡司光学仪器国际贸易有限公司

应用工程师 王玥



We make it visible.

目 录

前言	1
1. 激光共聚焦扫描显微镜的基本工作原理	2
2. 设备概述	4
3. 硬件操作说明	5
3.1. 显微镜常见元件名称	5
3.2. 激光共聚焦扫描显微镜开关机顺序	7
3.2.1. 激光共聚焦扫描显微镜开机顺序	7
3.2.2. 共聚焦扫描显微镜关机顺序	8
3.3. 显微镜的科勒照明	8
3.4. 观察方式	9
3.4.1. 微分干涉差观察	9
3.4.2. 荧光观察	10
3.5. TFT 触摸屏的使用	10
3.5.1. 启动页面	10
3.5.2. Microscope 页面	11
3.6. 显微镜使用时的注意事项	13
4. 软件使用说明	14
4.1. 启动软件	14
4.2. 软件基本界面介绍	14
4.3. 二维图像扫描	17
4.3.1. 目镜下观察样品	17
4.3.2. 图像扫描	19
4.3.3. 二维图像相关的常用视图	28
4.4. 多维图像扫描	39
4.4.1. Z-stack 扫描	40
4.4.2. 时间序列扫描	41
4.4.3. 光漂白实验	42
4.4.4. 图像拼接	44
4.4.5. 多视野扫描	45
4.4.6. 多维图像相关的常用视图	46
4.5. 光谱拆分	56
4.5.1. λ stack 扫描	57
4.5.2. 光谱拆分	58
4.5.3. 在线光谱拆分	61
4.6. 常用图像处理工具	63
4.6.1. 最大灰度投影	63
4.6.2. 彩色编码投影	64
4.6.3. 滤镜功能	65
4.6.4. 图像修正	66
4.6.5. 图像复制	67
4.6.6. 保存图片的亮度与对比度	70

4.6.7.	通道平移	70
4.7.	图像的浏览、保存与输出	71
4.7.1.	图像的保存	71
4.7.2.	图像的浏览	72
4.7.3.	图像的输出	74
5.	安全使用须知	81
5.1.	机身警示标志	81
5.2.	激光安全	83
6.	设备日常清洁保养	84
7.	附录	86
7.1.	Tile 模块	86
7.1.1.	中央视野定义法	87
7.1.2.	边缘视野定义法	87
7.1.3.	不规则边缘定义法	88
7.1.4.	图像拼接处理	90

前言

为方便广大用户在使用 Zeiss LSM710/780 初期，熟悉设备的使用方法，特参照 ZEN 2011 Black Version Operation Manual LSM710/780，编写完成了中文简要使用说明，谨供 Zeiss 用户日常参考使用。

本说明包含了激光共聚焦扫描显微镜基本工作原理，设备概述，硬件操作说明，软件使用说明，安全使用须知和设备日常清洁维护 6 部分。简单介绍了 Zeiss LSM710/780 的常用功能和基本操作，高级软件模块的使用或其他相关问题请参考 ZEN 2011 Black Version Operation Manual 或致电当地应用工程师做进一步咨询。

祝各位用户使用愉快！

1. 激光共聚焦扫描显微镜的基本工作原理

对于传统荧光显微镜来讲，激发光会均匀地投射到整个视野上，激发该区域内的样品发出发射光。使用 CCD 等图像采集设备采集该区域的图像，会同时收集到视野内样品发出的所有发射信号。真正需要关注的来自焦平面的发射信号将被淹没在其他非焦平面的信号当中，而且同一视野内相邻样品之间的发射信号也会相互干扰，因此，最终获取到的图像会比较模糊。特别是对于比较厚的样品来讲，这种现象会更为明显 (Fig. 1)。

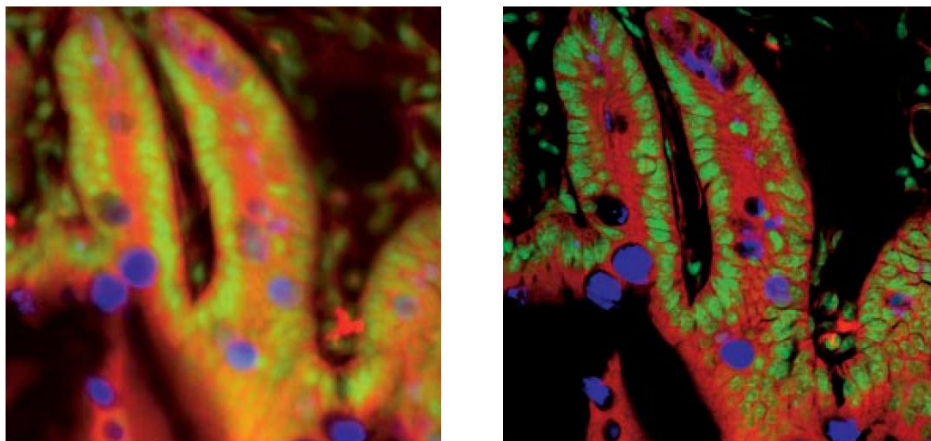


Fig 1 传统荧光显微镜与激光共聚焦扫描显微镜图像对比。左图为传统荧光显微镜图像，右图为激光共聚焦扫描显微镜图像。

激光共聚焦扫描显微镜在传统荧光显微镜的基础上，用极细的激光束（点光源）替代传统的汞灯或长效金属卤素灯（场光源）作为激发光。基于激光良好的汇聚性，激光束激发的样品区域大大缩小，从而减少了同一视野内相邻样品之间的发射信号干扰。此外，激光共聚焦扫描显微镜在检测器前，焦平面的共轭位置加装 Pinhole。由于只有来自焦平面的发射光信号可以在共轭位置汇聚，穿过 Pinhole，而来自非焦平面的发射光信号在共轭位置是发散的，绝大部分被 Pinhole 阻挡，所以检测器只能接收到来自焦平面的发射光信号 (Fig. 2)。这样，激光共聚焦扫描显微镜在很大程度上限制了来自非焦平面的信号干扰，大大增强了图像的信噪比。由于从理论上讲，激光共聚焦扫描显微镜扫描所得的图像只包含了样品焦平面上的发射信号，而不含

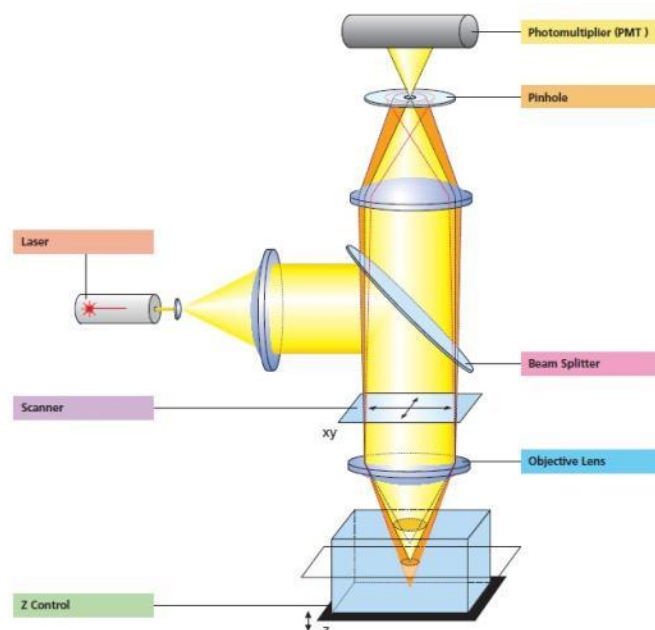


Fig 2 激光共聚焦扫描显微镜光路示意图

有其他平面的发射信号，因此也被称为光学切片。

由于使用激光束对样品进行激发时，只能激发样品上激光汇聚的某一个点。为了最终形成一幅完整的图像，在激光共聚焦扫描显微镜中引入了 **XY** 扫描振镜，满足了逐点逐行扫描焦平面信号的需求。激光共聚焦扫描显微镜通常使用光电倍增管 (**PMT**) 作为检测器。当激光逐点扫描样品时，**PMT** 也逐点获得来自样品焦平面的发射光信号，并将之转化为数字信号传输至计算机，最终合成完整清晰的共聚焦图像。

当载物台沿 **Z** 轴移动时，共轭焦平面随之发生移动，可以再次扫描形成一张新的图像，这样，随着 **Z** 轴的连续移动，就可以得到样品不同层面的连续光学切片图像。根据这些图像，可以对样品进行三维重构，从而获得样品的立体结构信息。

2. 设备概述

激光共聚焦扫描显微镜系统主要由电动荧光显微镜，扫描元件，激光柜，图像处理工作站及其他相关附件组成 (Fig. 3)。

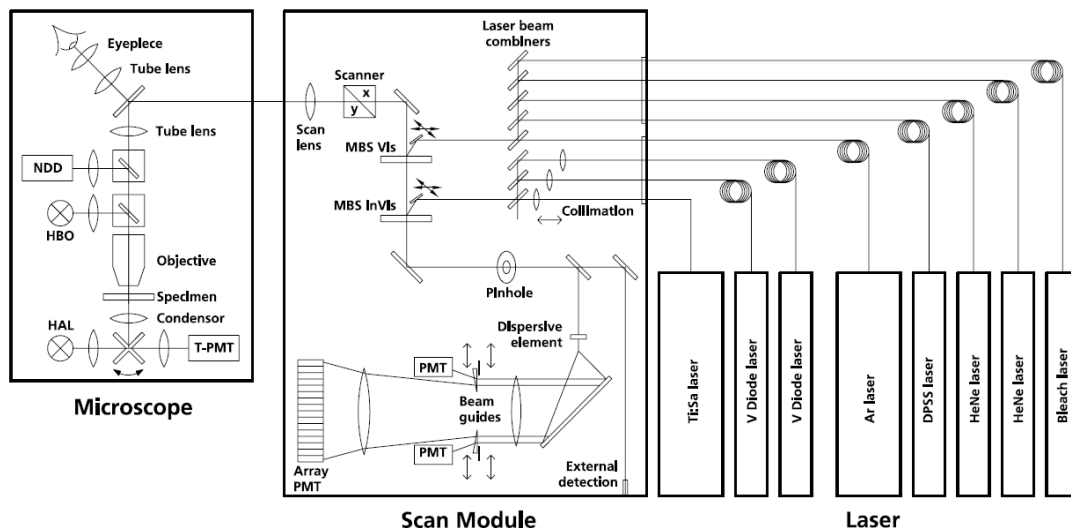


Fig 3 LSM710/780 激光共聚焦扫描显微镜光路示意图（正置显微镜，34 通道检测器）

LSM 710/780 激光共聚焦扫描显微镜系统最多可以接入 8 根激光器，其中可见光五根，有 458 nm/488 nm/514 nm，543 nm/561 nm，594 nm，633 nm 备选；不可见光三根，有 405 nm，445 nm 和 680-1064 nm 连续红外激光备选。用户可以单独控制每根激光器的开关和强度。

在扫描元件中，可见激光和不可见激光的主分光片分开排列，为用户提供了经济灵活的多种选择。可见激光和不可见激光经由各自的主分光片反射，汇聚成一束，由 XY 振镜引导离开扫描元件，通过物镜聚焦到样品上，在样品上逐点逐行进行扫描。用户可以通过软件控制扫描元件灵活设置扫描区域，包括扫描某一指定区域，放大或缩小当前视野等。

样品发出的发射光穿过物镜，返回到扫描元件中。穿过主分光片后，来自焦平面的发射光在 Pinhole 处汇聚，穿过 Pinhole，其他非焦平面的发射光则绝大部分被 Pinhole 屏蔽。用户可以调节 Pinhole 的直径来优化光学切片的厚度。经过 Pinhole 后，焦平面的信号通过光栅形成按波长排列的光束，经由棱镜组投射到不同的检测器上，完成信号的采集。棱镜组的位置可以通过软件自由调节，用以选择收集某一波段的信号。对于常规图像扫描来讲，LSM780 和 34 通道的 LSM710 激光共聚焦扫描显微镜系统最多可以同时收集 10 个荧光通道的信号；如果进行光谱扫描，34 个检测器可同时采集图像，快速完成光谱扫描。

LSM 710/780 激光共聚焦扫描显微镜系统配有独立的透射光检测器，可以在荧光成像的同时采集透射光图像，方便用户使用。

3. 硬件操作说明

3.1. 显微镜常见元件名称

激光共聚焦扫描显微镜系统通常以电动的正置或倒置显微镜配合扫描元件工作。

蔡司科研级电动倒置显微镜 Axio Observer Z1 的各常见元件名称如下图所示 (Fig. 4)。

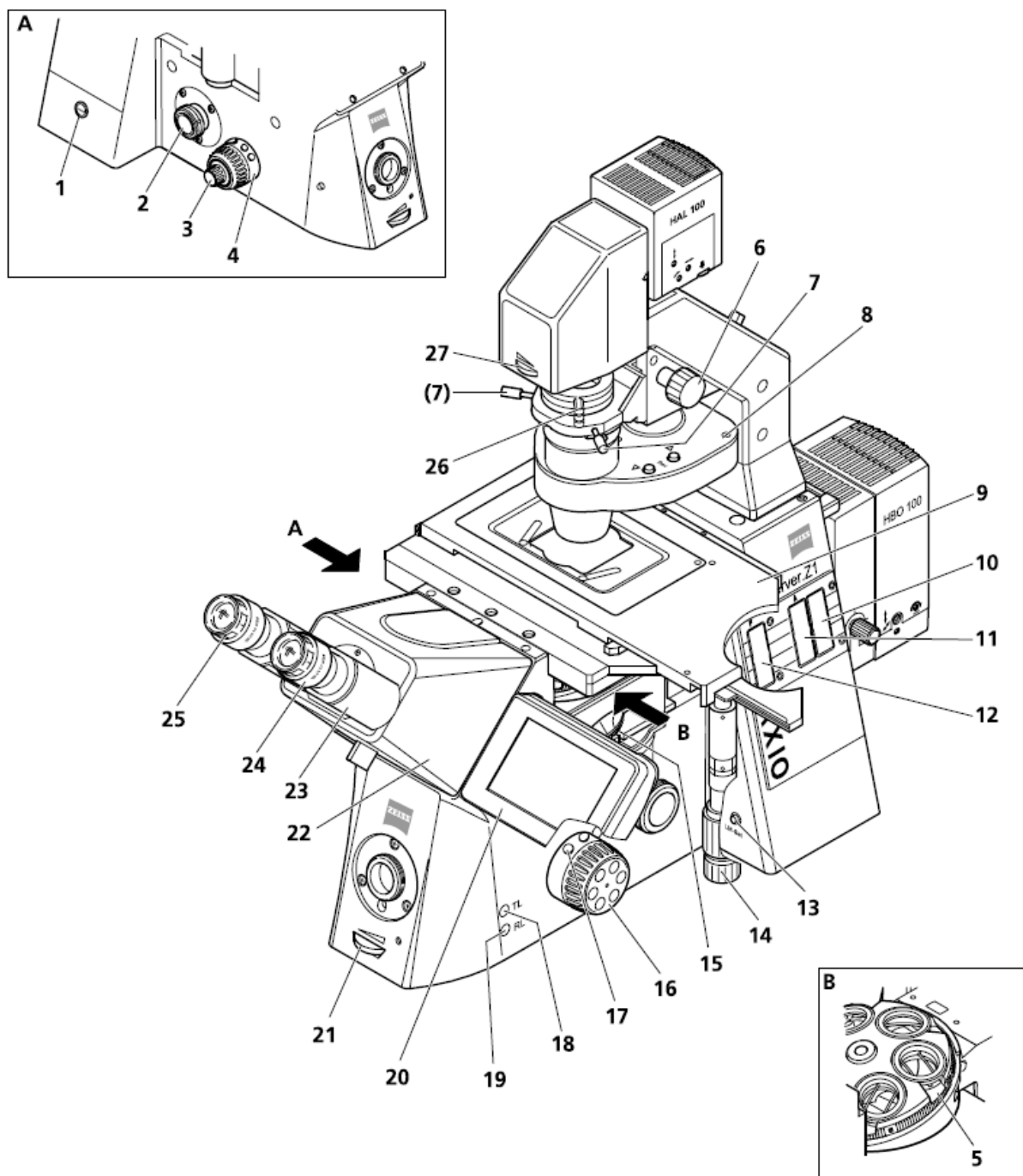


Fig 4 Axio Observer Z1 常见配置元件示意图

- | | | |
|-------------|-------------------|-------------------|
| 1 电源开关 | 10 3孔滤片拉板 | 19 反射光照明shutter开关 |
| 2 左侧照相接口 | 11 荧光衰减器 | 20 TFT显示器 |
| 3 左侧粗/微调焦旋钮 | 12 反射光视场光栏 | 21 卤素灯电压控制器 |
| 4 左侧控制按钮 | 13 光源管理器 | 22 双目观察筒 |
| 5 物镜转盘 | 14 载物台XY轴调节器 | 23 双目观察筒的目镜筒 |
| 6 聚光镜垂直调节旋钮 | 15 反射光模块转盘 | 24 目镜 |
| 7 聚光镜对中螺丝 | 16 右侧粗/微调焦旋钮 | 25 目镜调节环 |
| 8 聚光镜 | 17 右侧控制按钮 | 26 起偏器 |
| 9 显微镜载物台 | 18 透射光照明shutter开关 | 27 透射光视场光栏 |

蔡司科研级电动正置显微镜 Axio Imager Z2 的各常见元件名称如下图所示 (Fig. 5)。

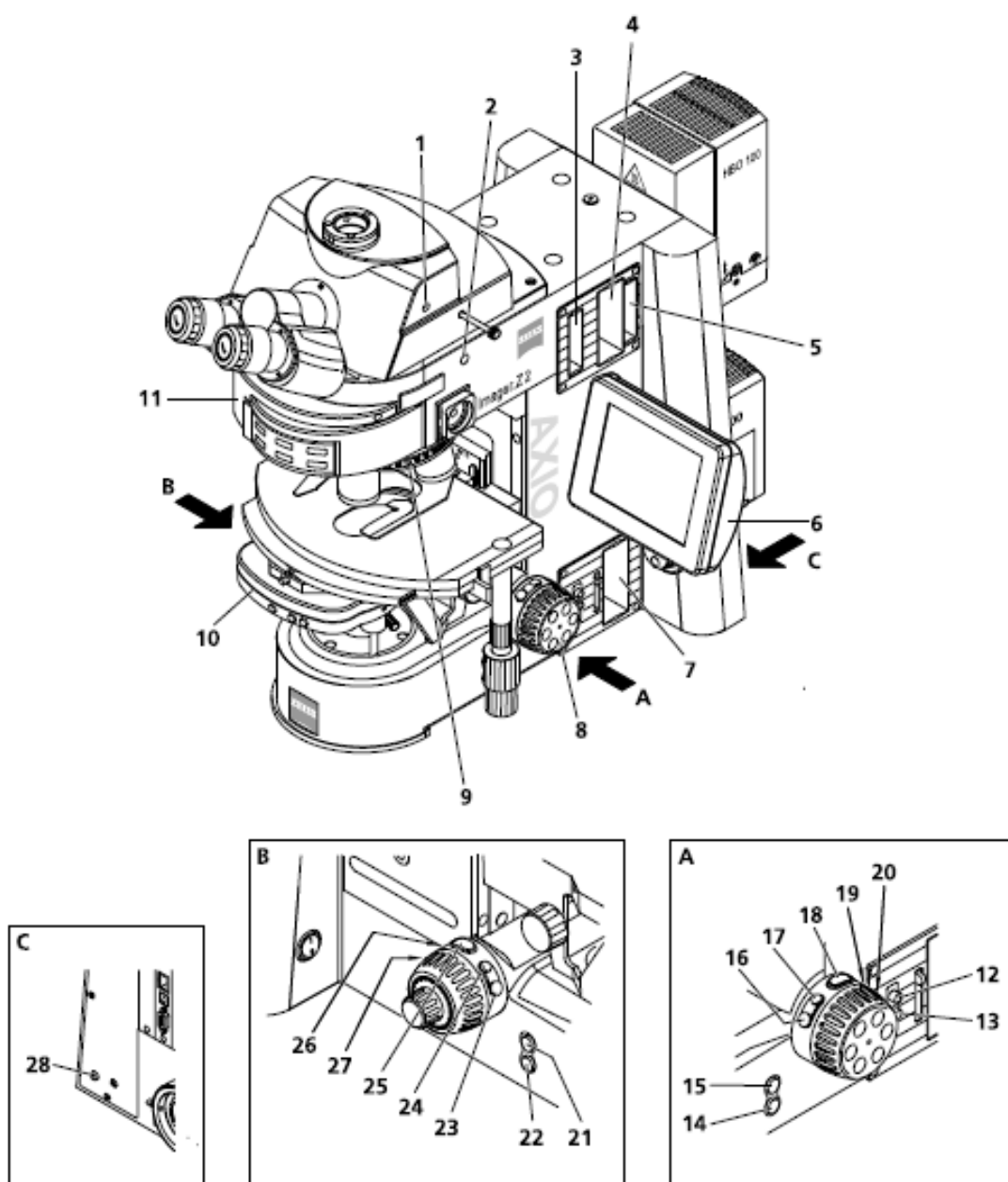


Fig 5 Axio Imager Z2 常见配置元件示意图

1 双目镜筒	11 反射光模块转盘	21 快速降低载物台的按钮
2 左侧照像接口	12 打开透射光shutter的按钮	22 快速升高载物台的按钮
3 反射光视场光栏	13 关闭透射光shutter的按钮	23 按钮
4 反射光滤片轮插口	14 快速降低载物台的按钮	24 按钮
5 荧光衰减器插槽	15 快速升高载物台的按钮	25 按钮
6 TFT显示屏	16 按钮	26 转换反射光模块的按钮
7 透射光滤片轮插口	17 按钮	27 转换反射光模块的按钮
8 粗/微调焦旋钮	18 按钮	28 光强管理按钮
9 物镜转盘	19 转换物镜的按钮	
10 聚光镜	20 转换物镜的按钮	

3.2. 激光共聚焦扫描显微镜开关机顺序

3.2.1. 激光共聚焦扫描显微镜开机顺序

- 打开稳压电源或 UPS。
- 依次打开电源控制板上的三个开关：先打开主开关 **MAIN SWITCH**，然后打开荧光显微镜和电脑的电源开关 **SYSTEMS/PC**，确认电脑和显微镜电源已经接通后，打开扫描头和激光柜的电源开关 **COMPONENTS** (Fig. 6)。将控制板侧面的钥匙拧平至 **laser on** 的位置。
- 打开 **MAIN SWITCH** 后，可以单独打开 **SYSTEM/PC** 电源开关，启动电脑，完成图像处理等后期工作。
- 打开显微镜上配置的所有有独立电源控制的元件的开关，如电动载物台，活细胞培养系统，或完美聚焦。
- 打开显微镜开关
- 打开荧光照明器开关。
- 打开氩离子激光器正面的开关，顺时针旋转钥匙至 “—” (Fig. 7)。此时激光器处于待机状态，此状态通常持续 5 min 左右。5min 后，将激光器扳钮由 “idle power” 扳至 “laser run” 位置，全面启动氩离子激光器，50s 后设备开始满负荷运转。

注意：氩离子激光器在启动后，需要 1h 左右的预热时间才能进入稳定状态。如果氩离子激光器的闲置时间在 1h 以上，可将扳钮拨至 **idle power** 处，保护激光器，延长使用寿命。

- 打开电脑，启动操作系统。待操作系统完全启动后，双击桌面上的软件图标，点击 **Start System** 按钮，启动系统，开始实验。如果只需进行图像处理，则可选择 **image processing** 按钮。

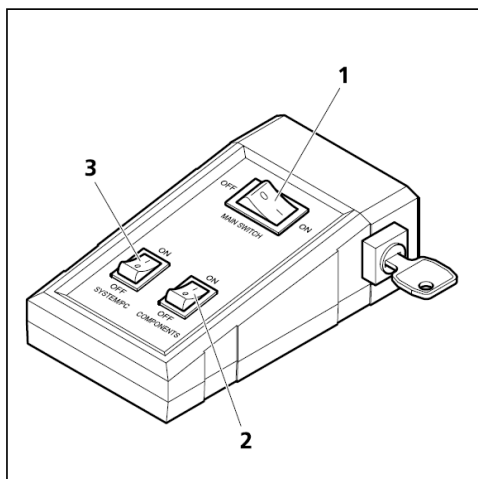


Fig 6 电源控制面板



Fig 7 氦离子激光器开关

3.2.2. 共聚焦扫描显微镜关机顺序

- 保存图像，退出软件。关闭电脑及显示器电源。
- 关闭氦离子激光器：先将扳钮从“laser run”扳到“idle power”状态；再将钥匙逆时针从“—”旋转到“O”状态；等待约 8-10 分钟，激光器风扇停止转动后（切记！），将主开关按钮按到“OFF”。
- 关闭荧光照明器电源。先后关闭显微镜系统电源和扫描载物台等元件的独立电源。
- 在彻底关闭氦离子激光器 5min 后，激光管已经充分冷却，此时，依次关闭电源控制面板上的开关：先关闭扫描头和激光柜的电源 COMPONENTS，然后关闭荧光显微镜和电脑的电源 SYSTEMS/PC，最后关闭主开关 MAIN SWITCH。
- 待灯箱充分冷却后，再放防尘罩。
- 如果长时间（>1 day）不使用，则关闭稳压电源/UPS、墙上总电源。

3.3. 显微镜的科勒照明

科勒照明是一种比较理想的透射光照明方式。透射光照明器的灯丝在通过聚光镜和孔径光栏后，在聚光镜的后焦平面成像，从而使样品获得均匀明亮的照明，且视野不会受到灯丝像的干扰。科勒照明是获得好的透射光图像的基础，如果发现视野内样品的亮度明暗不均或分辨率较差，可考虑重新调节科勒照明。

科勒照明的调节步骤 (Fig. 8)

- 将样本(最好是色彩鲜明的样品)用样品夹固定在载物台上，使用 10X 物镜，聚光镜选择 H 或 BF 位置，反射光模块转盘选择空位，其他附属光学元件，包括起偏器、物镜根部的 DIC 插片，全部拉出光路。照相光路转换到观察状态。旋转粗/微调焦旋钮将样品调节到最清楚的状态，此后不再移动载物台焦平面。

- 将视场光栏调到最小的状态。通过目镜观察视野中的光斑，调节聚光镜一侧的垂直调节旋钮，使光斑呈现为边缘清晰的多边形。此时的聚光镜位置就是最佳照明位置。
- 调节聚光镜的对中螺丝使多边形处于视野的中心，即多边形光斑的各个顶点可以内接于圆形视野。
- 将视场光栏慢慢放大，当多边形正好外切于视场的时候(即看不到多边形的边缘)就是视场光栏的最佳工作位置。在此过程中不再调节显微镜的其他元件。
- 建议激光共聚焦扫描显微镜管理者定期检查科勒照明，以保证显微镜处于正常工作状态中。

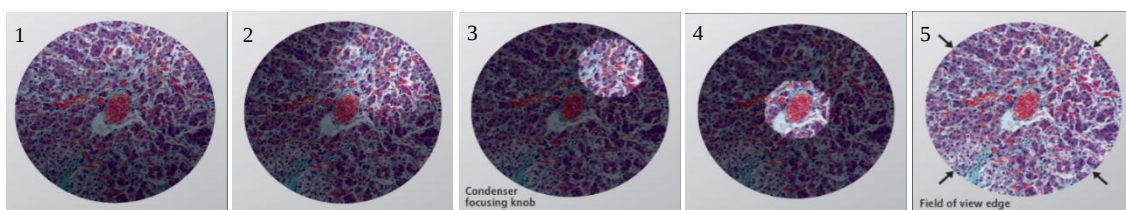


Fig 8 科勒照明的调节

3.4. 观察方式

3.4.1. 微分干涉差观察

微分干涉差 (DIC) 是一种常用的透射光明场观察方式，主要用于观察活细胞等透明样本，其使用方法较为复杂。完成 DIC 观察所必需的元件包括四部分：

起偏器：倒置显微镜位于聚光镜上方，正置显微镜位于聚光镜内。

检偏器：通常位于反射光模块转盘中

两个 DIC 棱镜：一个位于物镜根部，一个位于聚光镜内。

上述元件在观察时都要使用，缺少任何一件，都将对观察效果产生很大的影响。

DIC 观察的具体调节步骤如下：

- 打开透射光照明器，调节电压至较大强度。
- 将起偏器转入光路，将反射光模块转盘转到检偏器的位置。如果起偏器角度可调，调节其角度至与检偏器正交的位置，此时视野中亮度最低。
- 根据物镜根部 DIC 棱镜上的标记，将聚光镜转到 DIC I 或 II 或 III 位置，这一组棱镜需要配套使用。
- 调节粗/微调焦旋钮，目视观察下将物镜尽可能贴近样品。在向反方向调节焦平面的同时，使用目镜观察样品，直至找到清晰的焦平面。
- 此时的观察效果可能不是最好的。可以一边通过目镜观察样品，一边调节物镜根部

DIC 棱镜外侧的金属旋钮，通常在视野比较暗的位置会达到较好的观察效果。

- 如果是全电动显微镜，也可以使用 TFT 触摸屏。在 Control 页面下的 Contrast Manager 中点击 DIC 按钮，显微镜将根据当前物镜将需要的 DIC 光学元件转入光路中。
- 由于双折射物质会影响 DIC 的效果，因此，不能使用塑料制品进行 DIC 观察。

3.4.2. 荧光观察

打开荧光光源和荧光 shutter，关闭透射光 shutter，根据使用的荧光物质在反射光模块转盘中选择相应的荧光模块，聚光镜选择 H/BF 位置，即可正常观察。

通常需要在透射光观察方式下确认样品的位置和焦平面后，再切换至荧光观察方式观察荧光信号的表达。

3.5. TFT 触摸屏的使用

TFT 触摸屏可以控制显微镜部分的常用电动元件，启动页面如下图所示 (Fig. 9):

3.5.1. 启动页面

启动页面的中央部分会显示所有在显微镜启动初始化过程中检出的配置及其状态，包括所有在初始化过程中检测到的程控和电动控制元件。手动或未检出的则会显示“—”。控制元件按照其重要性由上至下排列。

启动页面上的常用按钮包括：

- **Load Position** 按钮：点击此按钮，正置显微镜的载物台会向下移动到负载位置；倒置显微镜则是物镜向下移动。负载位置比工作位置低大约 10 mm，方便用户完成更换样品或滴加镜油等操作。当载物台达到负载位置时，会弹出 **Load Position** 窗口 (Fig. 10)，点击  按钮，载物台返回操作位置。
- **RL Illumination** 按钮：Close 和 Open 按钮用于在荧光光路中关闭或打开反射光 (RL) shutter。注意，如果

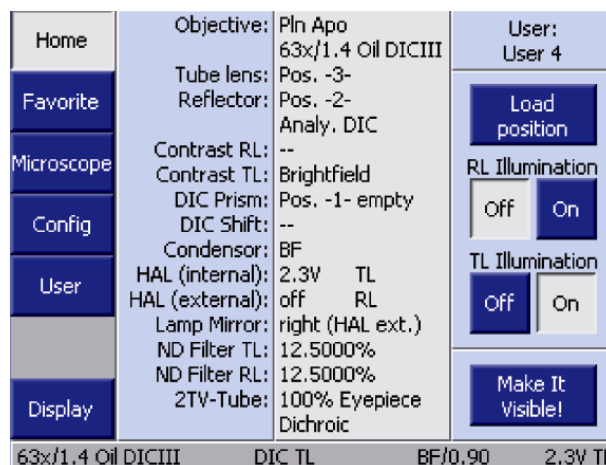


Fig 9 TFT 触摸屏主页

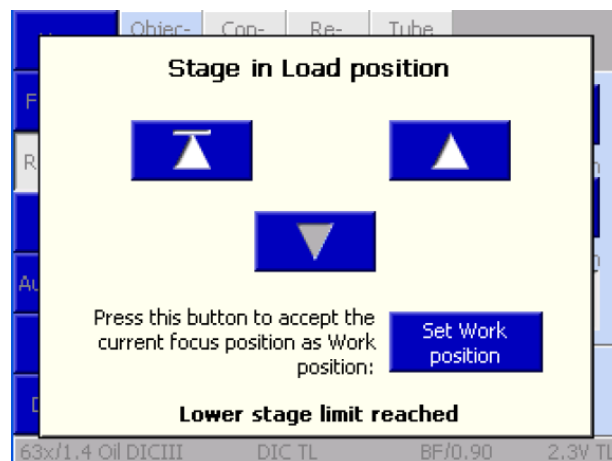


Fig 10 Load Position 按钮

扫描元件安装在显微镜后端口，则无此按钮。

- **TL Illumination 按钮: Close 和 Open** 按钮用于在明场光路中关闭或打开透射光 (TL) shutter。如果明场光路中没有 shutter，点击 Close 按钮将调节透射光照明器的电压至 0。
- **Make it visible! 按钮**：这个按钮可以将显微镜转换到一个基本的观察模式，即透射光照明中等强度 (2.3 V)，视场光栏打开，孔径光栏打开，TL shutter 打开，RL shutter 关闭，所有的透射光中灰滤片转轮转到空白位置 (100%透过)，聚光镜转到明场工作模式，反射光模块转盘转至透射光观察方式位置或空位，光路转换至 100%目镜观察模式。

3.5.2. Microscope 页面

对于正置和倒置显微镜来讲，TFT 触摸屏的启动页面略有不同，但常用控制按钮都在 Microscope 页面中，包括物镜，反射光模块和载物台位置。

3.5.2.1. Revolver/Control 页面

在启动页面左侧点击 **Microscope** 按钮，打开 **Microscope** 页面。正置显微镜会出现 **Revolver** 按钮，而倒置显微镜会出现 **Control** 按钮。点击按钮，可进入相应页面。在 **Revolver/Control** 页面中选择 **Objective** 控制页面 (Fig. 11)，其中会列出显微镜上配置的全部物镜，点击物镜按钮，该物镜会移入光路中。切换物镜时，当前物镜会先降至负载位置，然后将指定物镜移入光路，再回到工作位置。

在 **Revolver/Control** 页面中选择 **Reflector** 控制页面 (Fig. 12)，会列出显微镜上配置的全部反射光模块，点击反射光模块按钮，该模块会移入光路中。

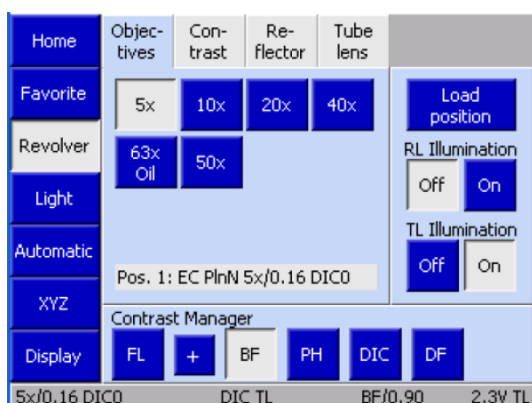


Fig 11 正置显微镜

Microscope->Revolver->Objective 控制页面

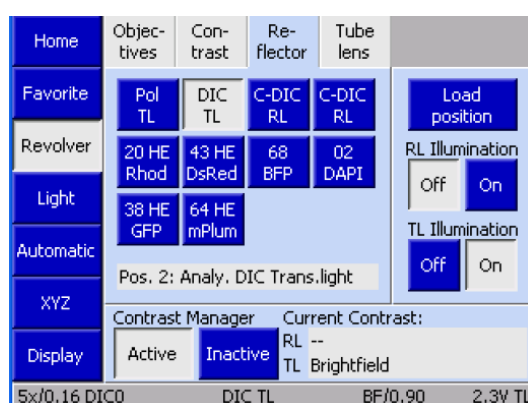


Fig 12 正置显微镜

Microscope->Revolver->Reflector 控制页面

3.5.2.2. XYZ 页面

Microscope 页面下的 XYZ 页面中包含两个控制页：Position 和 Measure。由于触摸

屏只能控制电动元件，根据显微镜所配置的载物台不同，XYZ 页面显示的内容会有所不同。

- 电动载物台：触摸屏可以读取 XY 和 Z 轴坐标。
- 手动载物台：只允许读取 Z 轴聚焦螺旋位置 (XY 控制缺失)，无法使用 Measure 控制页。

Position 控制页面

如果配置了电动载物台和电动 Z 轴，Position 页面中会以毫米为单位显示当前视野的 XYZ 坐标位置 (Fig. 13)。

Set Zero man 按钮：将当前位置设置为原点，且显示坐标为 0。

Set Zero auto 按钮：将载物台移动到端位，设置为原点。

当载物台移动时，会出现如下弹出窗口。"Caution! Remove specimen, before stage moves into end position!"

如果载物台上没有样品，点击 OK 按钮确认信息，或者按 Cancel 按钮停止载物台的移动。

Save Position 按钮：操作人员可以通过下方的位置按钮定义五个视野的坐标位置 (Fig. 14)。方法如下：

- 移动到所需 XYZ 位置；如果想同时记录 Z 轴坐标，勾选 incl. Z 复选框。
- 按下 **Save Position** 按钮，弹出 **Current Positions save as** 窗口。
- 在此窗口中，显示出 5 个按钮供用户选择，如果使用了某个按钮，上面就会显示出感兴趣视野的 XYZ 坐标，否则只显示按钮编号。
- 按下某一按钮保存当前位置。如果这一按钮之前已经被指定了坐标值，则会询问用户是否覆盖原来保存的数据。
- 位置设置好后，点击位置按钮，载物台会自动移动到相应位置。

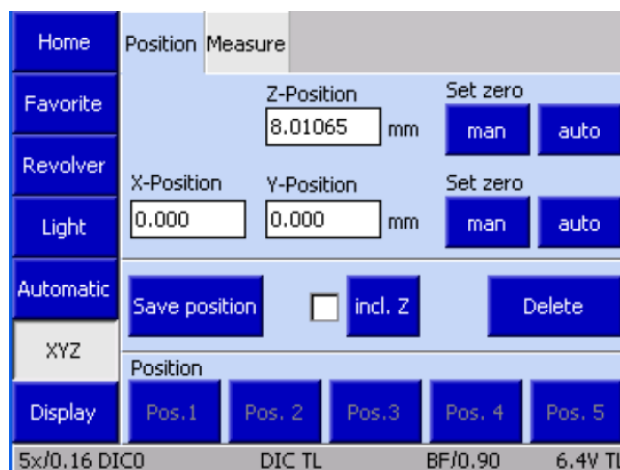


Fig 13 正置显微镜 Microscope->XYZ->Position 控制页面

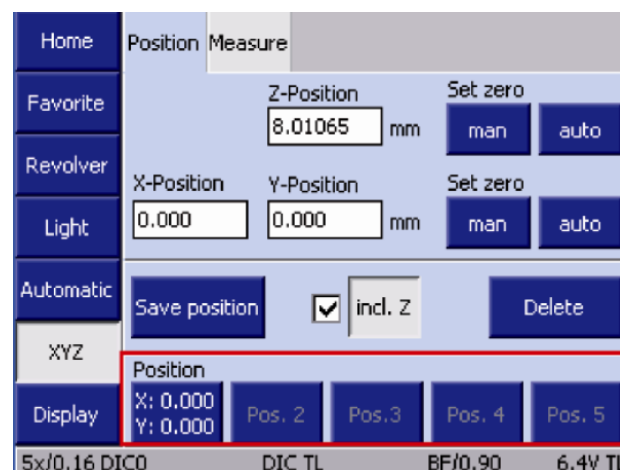


Fig 14 正置显微镜 Microscope->XYZ->Position 控制页面

要删除记录，按下 **Delete** 按钮，选择要删除的位置按钮，点击 **Yes** 按钮确认删除。

设定的坐标位置只可以暂时保存，即一旦显微镜关闭，这些数值将无法再次使用。

Measure 控制页面

如果没有安装电动载物台，不会出现此标签页。

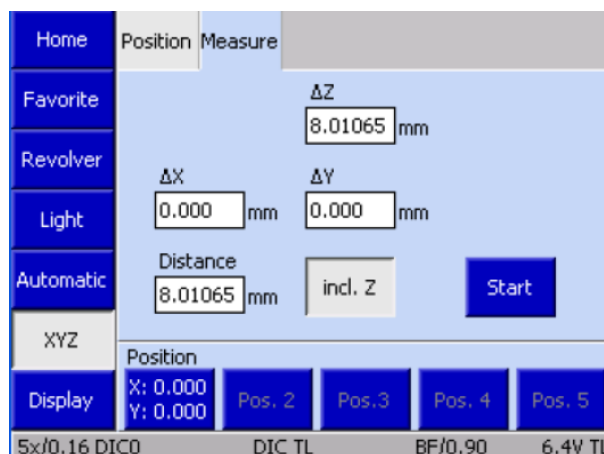


Fig 15 正置显微镜 Microscope->XYZ->Measure 控制页面

通过 **Measure** 控制页面，操作者可以以毫米 (mm) 为单位进行简单的距离测量 (Fig. 15)。如果要测量 Z 轴距离，激活 **incl. Z** 按钮。测量时移动到初始位置，按下 **Start** 按钮，这样显示区域 ΔX , ΔY 和 ΔZ 将被设置为 0。通过目镜观察样品，每次载物台的移动距离均可显示为 ΔX , ΔY 和 ΔZ 。

3.6. 显微镜使用时的注意事项

- 关闭显微镜时卤素灯电压一般应调至最低。
- 转换物镜时，应通过软件或触摸屏控制物镜转盘，不要用手直接转物镜。
- 为保证安全，并尽可能延长荧光光源的使用时间，汞灯电源开/关之间的间隔时间必须大于三十分钟。
- 显微镜的各光学部件应调节到位（如，**DIC** 插片，荧光滤片，物镜等），以免影响显微镜的正常工作。如果未调节到位，那么观察时通常会看到月牙形阴影。
- 使用油镜时应使用专业镜油，不要用其它介质（如香柏油），以免损伤物镜。每次使用完油镜后，需将油镜擦拭干净（物镜及样品）。（正置显微镜，油滴在样品上。倒置显微镜，油直接滴在物镜上。）
- 不要用手直接触摸光学部件的表面（如物镜，荧光模块，目镜等），以免留下手指印，影响观察效果。
- 拆卸全自动显微镜的聚光镜，反射光模块转盘等部件时，应在断电的情况下进行操作。
- 因为各款显微镜的有效工作距离和特性等各有不同，使用前应充分了解所用仪器的特性及观测范围，避免因不恰当的操作，对显微镜及其配件造成损害。
- 调焦时，首先应该是在目视下让物镜尽可能贴近样本，然后在通过目镜观察的同时，向远离样品的方向调节，这样可以充分保证物镜的安全。

4. 软件使用说明

4.1. 启动软件

双击桌面上的图标 ZEN 2011 (Black version)



启动软件，系统弹出软件启动窗口

□ (Fig. 16):

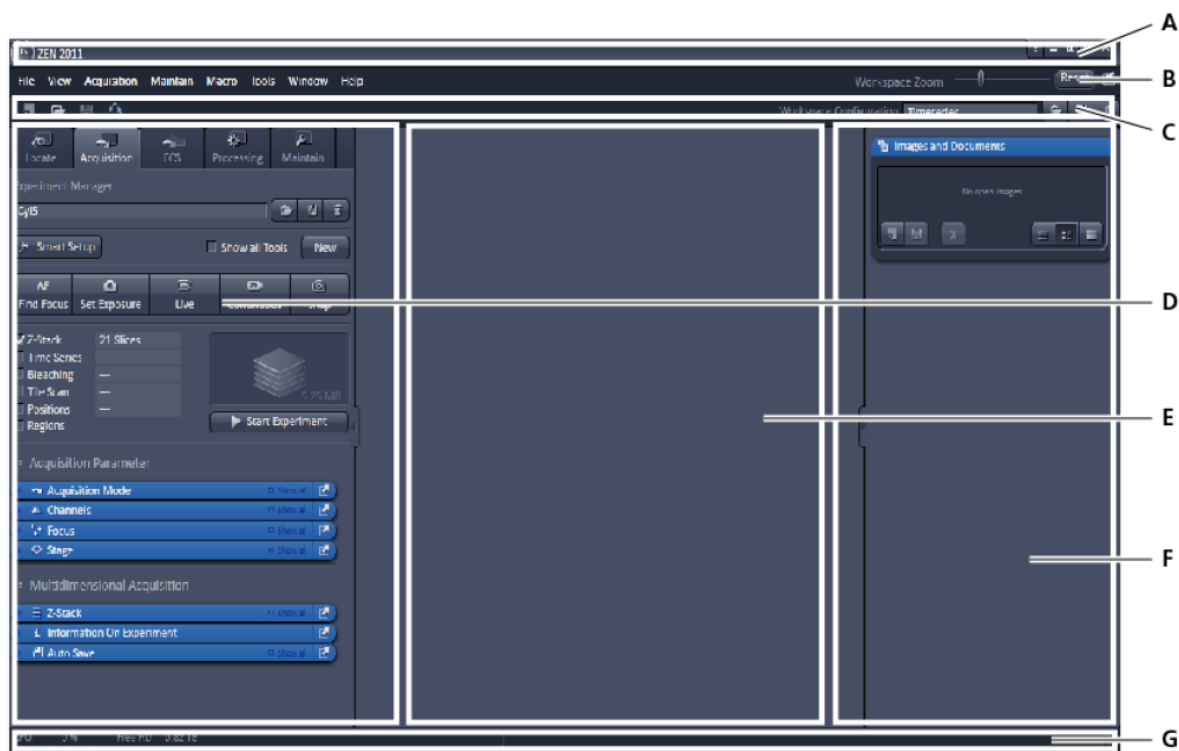


Fig 16 ZEN 2011 (Black version) 启动画面

- 点击**Start System**按钮，激活全部软件模块，完成图像扫描和分析。注意，此时电源控制板上的三个开关必须全部打开，否则软件会因为无法通过自检而报错。
- 点击**Image processing**按钮，只激活图像处理模块，可以完成对已保存图像的后期处理；但不激活图像扫描模块，不能拍摄新的图片。此时，由于不使用扫描元件，电源控制板上的**Component**开关可以不打开。
- 软件启动过程中会进行显微镜及扫描头部分的自检，所以在启动期间，请不要移动物镜或荧光模块等元件，以避免自检时报错。点击**Boot Status**前的三角形按钮，打开隐藏的对话框，可以显示软件启动时的自检过程。

4.2. 软件基本界面介绍

软件启动后，基本界面如下图所示 (Fig. 17):



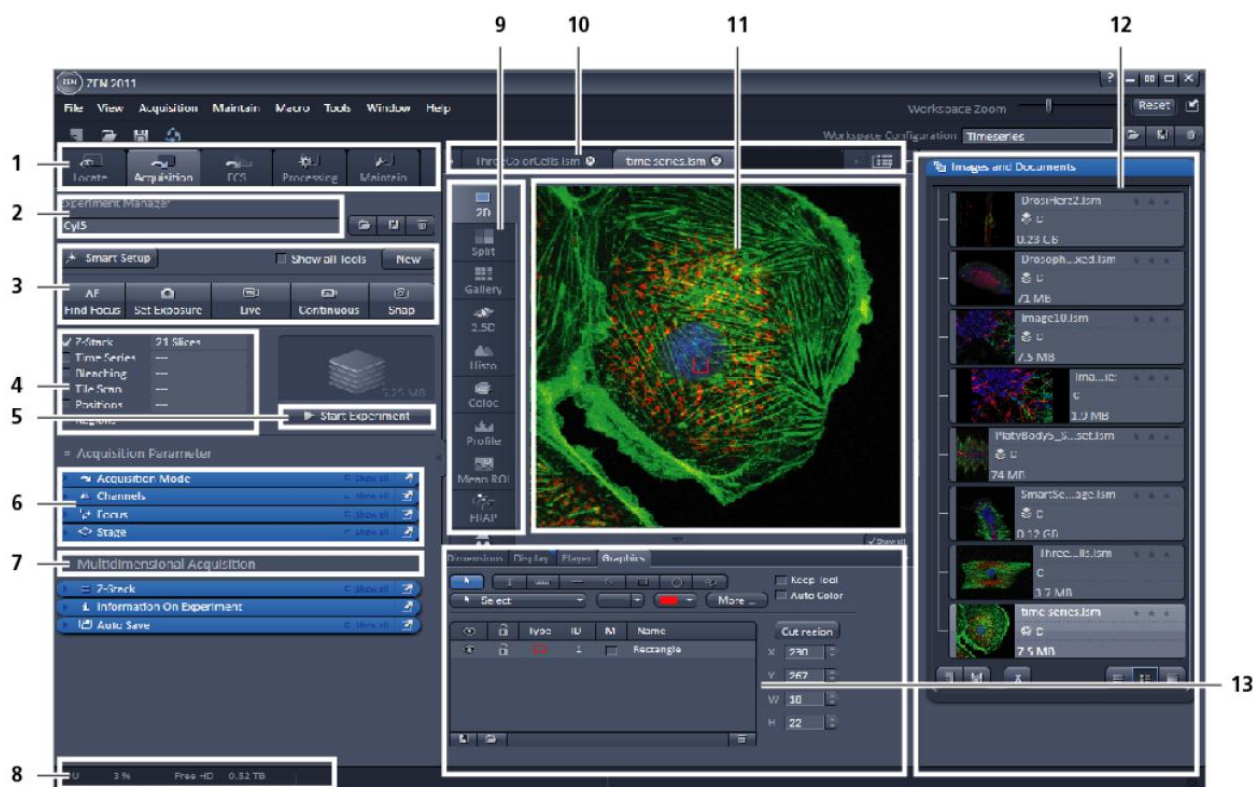
- A 应用栏 Application Bar D 左侧工具栏 Left Tool Area G 状态栏 Status Area
 B 菜单栏 Menu Bar E 中央图像显示区域 Center Screen Area
 C 主工具栏 Main Tool Bar F 右侧工具栏 Right Tool Area

Fig 17 启动后的 ZEN 2011 (Black Version) 主界面

在软件界面左侧的工具栏中，用户可以通过不同主页面，完成与样品观察，拍摄及图像处理相关的操作。

- **Locate**主页面：可以控制显微镜部分的电动元件，方便用户完成样品观察。
- **Acquisition**主页面：包含了扫描图像所需的各种参数设置。
- **FCS**主页面：只在LSM 780和Confocor中出现，用于荧光相关光谱的检测和分析。
- **Processing**主页面：包含了软件提供的图像处理工具；
- **Maintain**主页面：提供了调节Pinhole位置，设置物镜的工具，可以进行简单的系统维护。通常蔡司工作人员会在装机时调整好该主页面的设置，用户通常不需要再进行调节。

扫描生成的图像会显示在软件界面的中间部分 (Fig. 18)。打开图片后，在图像的左侧会出现一系列不同的视图窗口。根据图像内容，可提供各通道的单色图像、灰度直方图、荧光共定位信息，3D 重构图像等不同视图。在打开不同的视图窗口时，图像下方会显示相应的视图控制界面，可以通过其中的参数调节视图的显示方式。如果同时打开多张图像，在中间图像显示区域就会出现多个图像窗口，并在最上方显示图像名称标签，方便用户选择。



- | | | |
|--|--------------------|--------------------------|
| 1 工具主页面 Main Tool Tabs | 6 工具 Tool | 11 显示的图像 Displayed Image |
| 2 设置列表 Configuration | 7 工具组 Tool Group | 12 右侧工具栏 Right Tool Area |
| 3 操作按钮 Action Buttons | 8 状态栏 Status Area | 13 视图控制界面 View control |
| 4 Multidimensional Tool Selection Panel | 9 视图窗口 View Tabs | |
| 5 多维拍摄启动按钮 Starting Multidimensional Experiments | 10 图像页面 Image Tabs | |

Fig 18 打开图像后的 ZEN 2011 (Black Version) 主界面

所有打开的图像会在右侧工具栏中以标签形式显示。用户可以使用该区域下方的功能按钮对选择的图像进行保存或删除。点击  按钮，将右侧工具栏选中的图像保存为默认的CZI格式。点击  按钮，可以删除选中的图像。

图像上方的主工具栏中，在左侧列出了常用功能的快捷按钮，包括新建图像 ，保存图像 ，打开文件夹  和恢复设置 。用户还可使用主工具栏右侧的Workspace configuration保存对软件界面的设置，包括对各工具栏和图像窗口的设置等。点击Workspace configuration输入框右侧的  按钮，可以在弹出的对话框中输入名称以保存当前设置；点击  按钮，则可以在下拉菜单中选择打开预存的设置。点击  按钮，可以删除选中的设置。

图像下方的状态栏会显示当前电脑操作系统的状态，包括CPU使用率，剩余硬盘和缓

存大小等信息 (Fig. 19)。如果电脑缓存占用过多，此处会出现红色或黄色警示。在扫描图像时，状态栏中会出现蓝色进度条，及扫描时间提示；待扫描结束后进度条自动消失。



Fig 19 状态栏中的进度条

4.3. 二维图像扫描

4.3.1. 目镜下观察样品

将样品固定在样品夹上，注意使盖玻片朝向物镜。启动软件，在左侧工具栏点击 Locate，进入相应的主页面，完成目镜下的样品观察。

Locate 页面下的 Ocular 工具栏以图形按钮的方式展示了显微镜部分包含的全部电动元件 (Fig. 20)。下图中为 Axio Observer Z1 的常见配置光路图，根据配置不同，实际显示的光学元件可能会与图中有所区别。

4.3.1.1. 常用操作流程

- 点击 Online 按钮，激活软件对显微镜的控制。开始在软件中配置目视观察光路：
 - 如需在明场下观察样品，点击透射光控制按钮 ，在对话框中点击按钮 On，打开透射光照明器，并用滚动条将光强调节至 3-6 V；点击透射光 shutter 按钮 ，将其打开，图标下方显示 Open；点击聚光镜控制按钮 ，在对话框中使用下拉菜单选择相应的光学元件，如 DIC II 或 DIC III，并用滚动条调节适当的数值孔径 Aperture，对于倒置显微镜，Aperture 可以设置在 0.4 左右；对于正置显微镜，可以设置在 0.7-0.8；点击物镜控制按钮 ，从下拉菜单中选择适当的物镜进行观察。



Fig 20 Locate 主页面中的 Ocular 工具栏

- 如需使用荧光观察样品,在确认荧光照明器启动后,点击反射光控制按钮,在对话框中打开反射光照明器,并调节光强;点击反射光shutter按钮,将其打开;点击灰度滤片按钮,在对话框中使用下拉菜单调节适当的激发光透过率,通常会选择100%,但如果样品荧光容易淬灭,可选择较低的激发光透过率,以保护样品;点击反射光模块控制按钮,根据荧光染料从下拉菜单中选择适当的荧光模块;点击物镜控制按钮,选择适当的物镜进行观察。
- 连通的光路在光路图中以黄色显示,关闭的光路在图中以黑色显示。
- 完成光路设置后,转向显微镜,在目镜下观察样品,并调节至最佳焦平面。
通常会先用低倍物镜找到样品,然后切换到高倍物镜进一步观察。如需换用水镜或油镜,请注意正确滴加相应的介质。调焦时,先在目视下让物镜尽可能贴近样本,然后在通过目镜观察的同时,向远离样品的方向调节,以保证物镜的安全。
- 在目镜下将待扫描区域调节至视野中央,在软件界面中点击Offline按钮,关闭所有shutter,软件不再控制显微镜包含的电动元件,结束观察。准备开始扫描。

4.3.1.2. 设置快捷按钮

目视观察的常用方式可以在Configuration中保存成快捷按钮:

- 依上文所述,在Ocular工具栏中配置好光路,目镜观察确认无误,点击configuration右侧的保存按钮,在弹出的对话框中输入相应名称,点击OK,完成保存。点击按钮,可以删除选中的设置。
- 使用configuration右侧的打开按钮,调用保存好的光路配置。
- 点击Assign按钮,在Buttons下拉菜单中选择任一按钮,在Configuration下拉菜单中选择所需的光路配置,点击Configuration下拉菜单下的Assign按钮,即可将保存好的光路配置设为快捷按钮 (Fig. 21)。最多可以设8个快捷按钮。
- 在以后的操作中,只需在点击Online按钮,激活软件对显微镜的控制后,点击所需的快捷方式按钮,即可设置好光路,进行目视观察。

4.3.1.3. 活细胞培养相关元件的控制

如果配有活细胞培养系统,可以在Incubator工具栏中完成相应的设置 (Fig. 22):

- 在软件启动前,确认活细胞培养系统各控制模块上的电源已经打开,电源控制灯亮起。
- 点击Incubator工具栏中Temperature和Atmosphere前的三角形按钮,在相应的下拉

菜单中输入各通道温度及CO₂浓度的相应参数，

- 待输入框右侧显示的实际温度或CO₂浓度已经达到设置参数，并稳定一段时间后，即可开始实验。



Fig 21 设置快捷按钮



Fig 22 Incubator 工具栏的设置

4.3.2. 图像扫描

结束目视观察后，在Locate主页面中点击Offline按钮，软件自动将光路切换至激光扫描部分。点击Acquisition，打开Acquisition页面，在该主页面中，用户可以完成图像扫描及相应设置。光路转换大约需要3-5s，请待光路转换完成后，再进行下一步操作。

为了保护操作人员免受激光伤害，在打开Acquisition主页面后，共聚焦扫描显微镜将自动切断目镜观察光路，用户只能通过软件界面预览或扫描图像来观察样品。

4.3.2.1. 新建图像文件

由于预览或扫描形成的二维图像无法自动保存，每次预览或扫描形成的图片会覆盖之前形成的图片，所以需要在每次扫描新的图片前新建空白图片。点击操作按钮右上方的New按钮，建立一张空白图片，用于显示预览或扫描形成的图片 (Fig. 23)。

点击主工具栏左侧或右侧工具栏右下角的  按钮，也可新建图片。

4.3.2.2. 光路配置

点击操作按钮左上方的Smart Setup按钮 (Fig. 23)，打开Smart Setup对话框，在Configure your experiment表格中选择待观察样品所使用的荧光物质及伪彩色，据此，软件将自动完成光路配置 (Fig. 24)。

在Dye列表下，点击三角形按钮，打开Dye列表，在Search中输入荧光物质的英文名称，或直接在Dyes列表中查找荧光物质名称。单击选中的荧光物质名称，将其纳入实验设置。

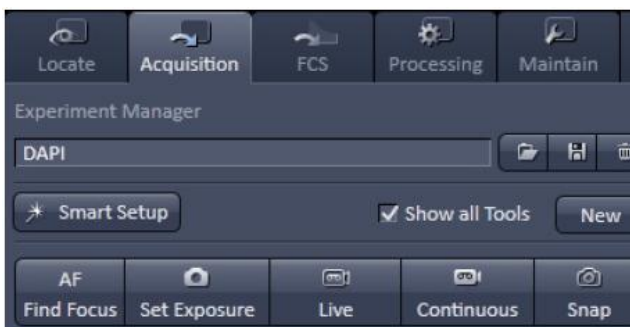


Fig 23 Acquisition 页面中的操作按钮

如果选择多种荧光物质，软件将根据其发射波长自动配置伪彩色。如果只有一种荧光物质，软件则默认显示黑白图像。可以点击Color列表下的三角形按钮，打开Color列表，自定义通道伪彩色。

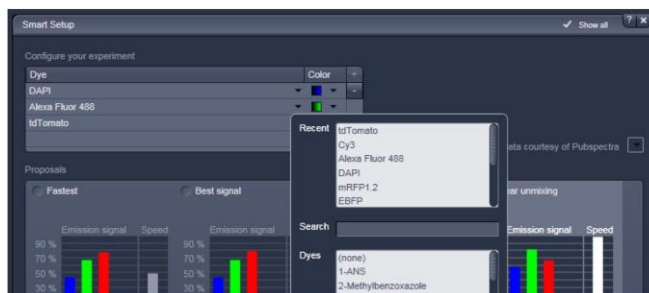


Fig 24 Smart Setup 对话框

Dye列表中包含了目前商品化的绝大多数荧光染料或荧光蛋白，但如果用户使用的荧光物质没有包含在列表中，可以选择激发光谱和发射光谱近似的物质进行替代。

软件提供四种备选扫描模式 (Fig. 25):

Fastest: 在各荧光物质的发射光谱不完全重叠的情况下，同时扫描多种荧光物质，扫描成像速度在各种扫描模式中是最快的，但不同的通道间可能出现信号串扰。

Best Signal: 针对不同荧光物质逐一进行扫描成像，从而尽可能地减少各种荧光物质发射光谱间的串扰，但扫描成像速度会明显降低。

Best Compromise: 综合考虑成像速度和信号质量，同时扫描发射光谱重叠较少的荧光物质，在减少信号串扰的前提下，在一定范围内提高成像速度。

Linear Unmixing: 进行多通道荧光扫描的光路设定，用于简单的光谱拆分。

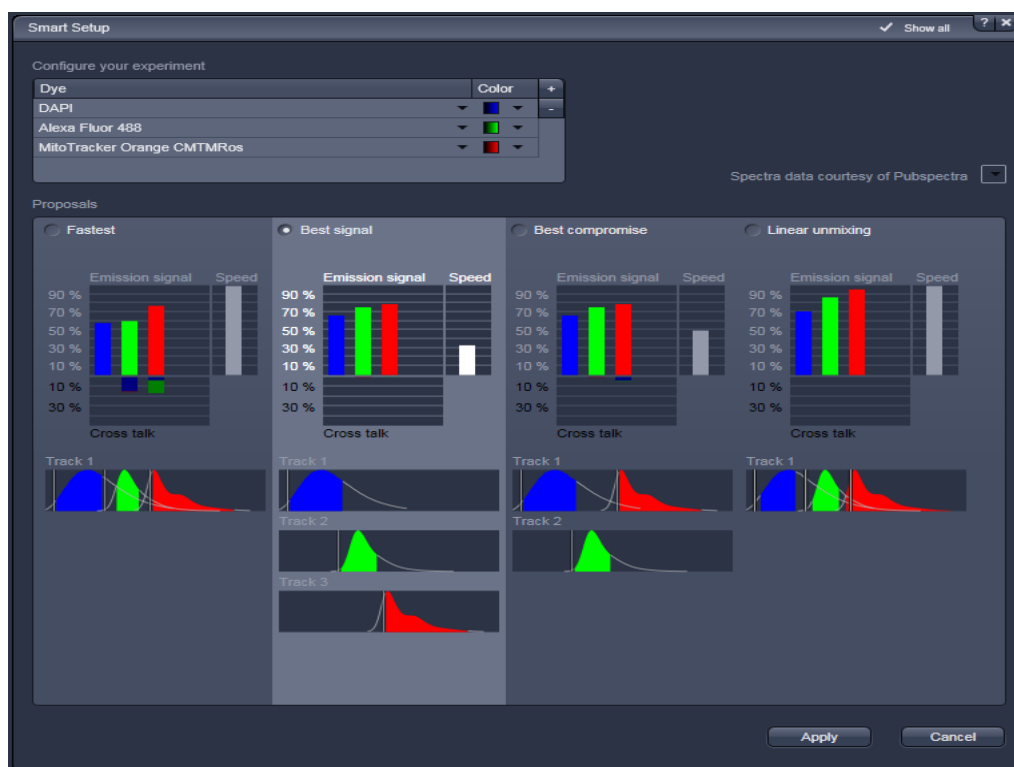


Fig 25 Smart Setup提供的四种扫描模式

针对固定染色样品或静止样本，通常选择Best signal模式，以获取高质量图像；如果需要观察样品的连续动态变化，建议选择Best Compromise或Fastest以提高扫描速度。

选择适当的扫描模式后，点击Apply按钮，软件将自动完成光路配置，包括选择相应的激光，主分光片，检测PMT和信号收集的发射光带宽，并将激光强度调至2.0。

Smart Setup中最多只能选择四种荧光物质进行光路配置。

光路配置通常需要5-10s，请待光路配置完成后，再进行下一步设置。

光路配置完成后，在Acquisition页面Setup Manager工具组下Light Path工具栏的Channel模式中，会出现相应的光路设置。可以在此处对光路配置进行适当微调 (Fig. 26)。

点击Light Path工具栏的蓝色标题行，打开Light Path工具栏。勾选标题行右侧的Show all复选框，显示全部设置参数。在ZEN 2011中，每张图像根据所含荧光物质的数量不同，可能需要一次或几次扫描才能完成，每次扫描即称为Track。对于每个track来讲，可以同时以一种或多种荧光物质进行扫描。在参数设置中，每种荧光物质占用一个Channel。Track中包含了扫描图像所需的全部光路配置和扫描参数。

点击光路待调整的track，使其处于高亮状态，Light Path工具栏中即显示出所选track的光路设置，如Fig. 26中的Track 1即处于选中状态。

点击激光器控制按钮，可以在弹出的对话框中更改配置的激光器和激光强度。波长在可见光范围内的激光在Visible light列表中选择，如488、561、594、633等；波长在不可见光范围内的激光在Invisible light列表中选择，如405。

点击主分光片控制按钮，可以在下拉菜单中更改配置的主分光片。可见激光和不可见激光的主分光片分别处于Visible light和Invisible light光路左侧不同的列表中。应选择名称中含有当

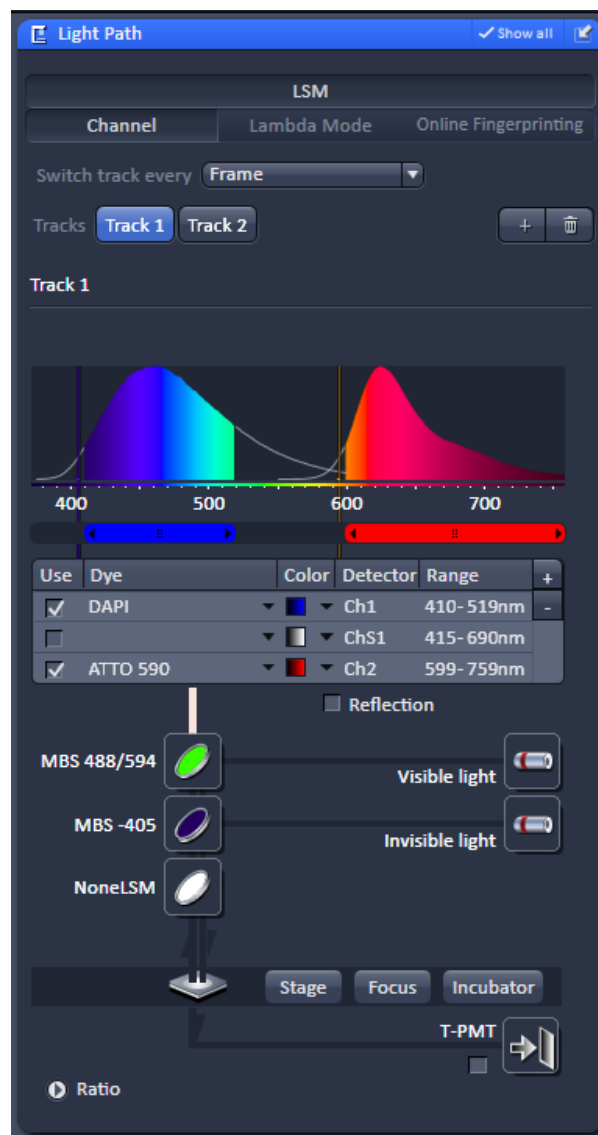


Fig 26 Light Path 工具栏

前使用的所有可见激光或不可见激光波长的主分光片。

在**Detector**列表中，可以更改勾选的检测PMT。其中**ChS**代表32通道检测器，只在**LSM 780**和34通道**LSM 710**中出现。对于3通道**LSM 710**，该位置显示**Ch2**。在**Dye**列表中，可以更改荧光物质名称。更改名称后，**Detector**列表上方的发射光谱也会发生相应变化。在**Color**列表下，可以重新定义通道伪彩色。

调节发射光谱下方滚动条的长度和位置，可以调节检测PMT接收的发射光波长范围。应尽量不采集处于两种荧光物质发射光谱重叠部分的荧光信号。检测器接收的发射光波长范围会在发射光谱中以彩色显示，具体波长范围在**Range**列表中逐一列出，可用于检测是否选择了恰当的发射光信号收集范围。

如果需要同时扫描透射光DIC图像，可在相应的track光路设置图中勾选**T-PMT**复选框。通常不用**405nm**激光进行透射光DIC扫描。

如果需要拍摄反射光图像，则需在主分光片下拉菜单中选择**R80/T20**主分光片，并勾选**Detector**列表下方的**Reflection**复选框，调节检测PMT接受波长的范围使之覆盖激发光波长。注意，此时反射激光直接进入检测PMT，调节通道扫描参数时需格外注意**Gain**值的调节，防止信号过强，保护检测PMT。

软件默认的扫描模式为**Switch track every frame**，即在一个track完成整幅图像的扫描后，自动切换至下一个track完成扫描，直至完成全部扫描 (Fig. 27)。对于活动样品来讲，在这种扫描模式下，可能出现由于在扫描过程中样品发生移动而各通道荧光信号无法完全重叠的现象。此时，可在**Light Path**工具栏中选择**Switch track every line**，即一个track沿X轴方向完成一行扫描后，自动切换至下一个track完成扫描，直至所有track均完成此行扫描后，扫描系统移动至下一行开始第一个track的扫描。如此重复，直至完成全部扫描。这种扫描方式尽可能地降低了扫描时间的差异对不同track的影响，但整个扫描过程中不再进行任何硬件的切换或移动，因而对光路设置有较高的要求。



Fig 27 Switch Track Every Frame/Line

即第一个track中选择的主分光片需要适用于扫描过程所需的全部激光，各track设置的pinhole大小一致，且收集的发射光波长范围没有重叠，但各track使用的激光器及其强度，选用的检测PMT和扫描通道参数是可以独立设定的。

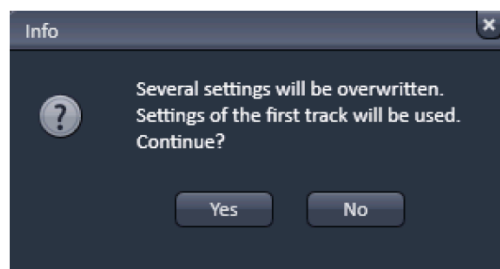


Fig 28 提示确认对话框

在选择Switch track every line后，软件会弹出对话框，提示将根据第一个track的光路设置自动覆盖后续所有track的设置，选择Yes将接受此修改，选择No则仍然使用Switch track every frame扫描模式 (Fig. 28)。

在ZEN 2011中，每张图像最多可含有四个track。对于3通道LSM 710，每个track最多容纳3种荧光物质同时扫描成像；对于LSM 780和34通道LSM710来讲，每个track最多可设置10个channel。由于Smart Setup中只能设置四种荧光物质，在样品中包含多于四种荧光物质的时候，需要手动在Light Path工具栏中添加。点击Tracks按钮右侧的 $+$ 按钮，可以添加新的Track。然后，可以根据前述方法，设计新增Track的光路。点击 $\times$ 按钮，则可以删除选中的Track。点击Range列表右侧的 $+$ 按钮，可以在当前指定的track中增加新的通道。点击 $-$ 按钮，则可以删除指定track中最后一个Channel。

4.3.2.3. 扫描图像参数的设置

完成光路设置后，在Acquisition Parameter工具组的Acquisition Mode工具栏下，进一步设置扫描图像参数。点击Acquisition Mode工具栏的蓝色标题行，打开工具栏。勾选标题行右侧的Show all复选框，显示所有设置参数。Acquisition Mode工具栏下有5个控制区域，可以选择使用的物镜，调节扫描模式、扫描速度、扫描平均值及扫描区域的参数 (Fig. 29)。

Objective控制区域中会自动显示当前选用的物镜。打开下拉菜单，可以自由选择配置物镜，用于图像扫描。

在Scan Mode下拉菜单中选择Frame，完成二维图像扫描；或选择Line进行线扫描（即只扫描图像中的一条线）。

Frame Size为扫描所得图像的分辨率。点击Optimal，软件将自动计算并配置当前扫描设置下最优的图像分辨率。也可以点击X*Y，从下拉菜单中选择固有设置，或直接在X和Y输入框中输入数值，定义分辨率。通常不会设定大于软件计算所得最优分辨率的数值，因为这样会造成大量的冗余像素，而对真正的图像质量没有贡献。

Line Step下拉菜单的默认设置为1，即选择逐行扫描。如果选2，则为隔行扫描，扫描的两行中间通过插值运算补充图像信息，是通过牺牲图像质量来提高扫描速度的方法。

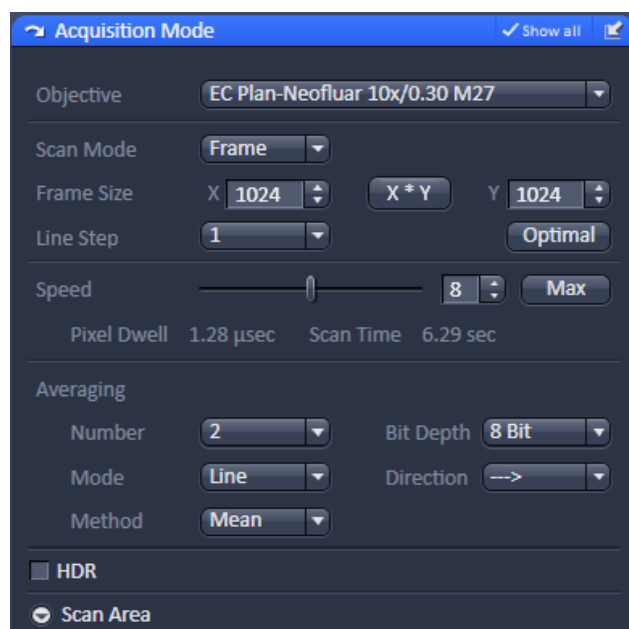


Fig 29 Acquisition Mode 工具栏

在Speed控制区域中可以通过拖动滚动条或直接在输入框中输入数值来设置扫描速度，通常在6-9之间。数值越大，速度越快。扫描速度越慢，在每个像素点上停驻的时间越长，越有助于增强图像质量，但也会加快样品的淬灭；反之，则会降低信噪比，影响图像质量。所以请选择适中的扫描速度。如果需要较高的扫描速度，可以点击输入框右侧的Max按钮，扫描速度会自动调节至当前设置条件下所能达到的最大速度。

Averaging参数的设置是为了通过重复扫描计算平均结果，来降低背景噪音。Number通常设为2或4。平均次数越多，图像对比度越好，越细腻，但成像时间会延长，且一些较弱信号也会被削弱。如果拍摄高速时间序列，建议Average设为1。Mode默认设置为Line，是指在扫描过程中逐线完成多次扫描平均并显示图像。Method默认设置为Mean，即使用平均方法降低背景噪音，对于荧光信号非常弱的图像，也可以选择Sum，即加和。

Bit Depth是指图像灰度的动态范围，通常为8bit。如果需要进行灰度测量，建议选用12bit。

Direction为扫描方向，通常选择→，即单向扫描。软件中也提供了双向扫描的选择，即↔，但通常不会使用。

点击Scan Area左侧的三角形按钮，打开相应控制区域，可以完成对扫描区域的调节 (Fig. 33)。软件默认将扫描区域设置在视野的正中，但也可以根据需要进行调整其位置，角度和大小。最好在预览图像的同时，对扫描区域进行调节以保证其准确性。由于扫描通道参数的设置同样需要在预览图像的条件下完成，所以，通常会先调节通道参数。

4.3.2.4. 扫描通道参数的设置

扫描通道参数全部列于Acquisition Parameter工具组的Channels工具栏中。点击Channels工具栏的蓝色标题行，打开工具栏。勾选标题行右侧的Show all复选框，显示所有设置参数 (Fig. 30)。

在Channels工具栏中勾选一个track，使之处于高亮状态。点击操作按钮中的Live按钮，开始预览。此时Live按钮会自动变成Stop按钮。如果在预览过程中，同时勾选多个track，软件会不停在各个track

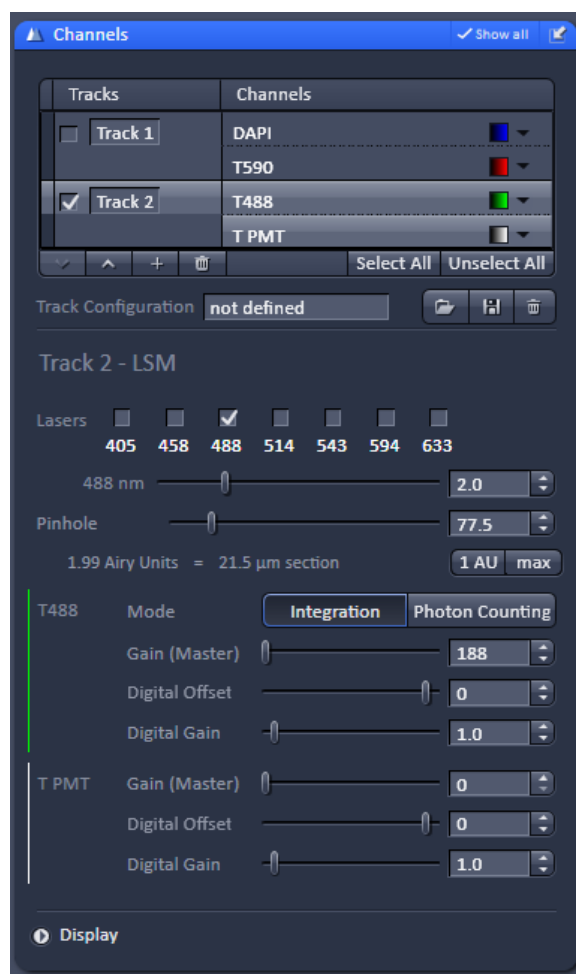


Fig 30 Channels 工具栏

间切换，不便于实时观察参数调节的效果。

开始预览后，首先拖动滚动条将**Gain (Master)**值调大，并适当调节焦平面，找到样品所在的位置。调焦过程中，可能出现荧光逐渐增强的现象，请相应地降低**Gain**值，以避免曝光过度对检测**PMT**的伤害。

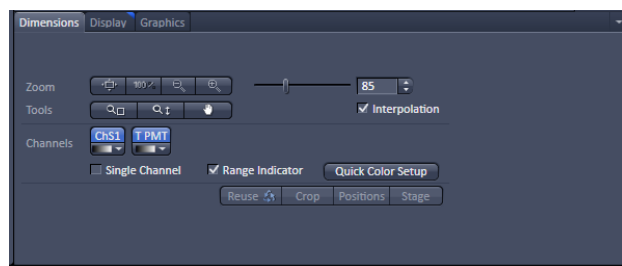


Fig 31 Dimension 视图控制界面

点击Pinhole输入框下方的**1AU**按钮，调节Pinhole直径为**1 AU**，在最大程度上屏蔽非焦平面的信号。

勾选图像下方**Dimension**视图控制界面中的**Range Indicator**，启动曝光强度显示 (Fig. 31)。图像中的红色伪彩代表该像素点达到饱和灰度值，蓝色伪彩代表该像素点的灰度值为**0** (Fig. 32)。

调节**Gain (Master)** 和**Offset**值，使图像中达到饱和灰度值的点和灰度值为**0**的点都尽可能的少 (Fig. 32)。

Gain (Master): 代表了检测**PMT**的电压,用于调节图像的亮度和对比度,数值越大,检测**PMT**上所负荷的电压越高,图像信号越明亮。但**通常不大于800**,以减少背景噪音,延长检测器寿命。

Digital Offset: 用以调节图像背景,数值越小,背景越暗。但**Offset**在降低背景的同时,会把一些比较弱的信号也当作背景消除掉。

Digital Gain: 对所有信号进行数码放大,包括来自样品的真实信号和环境背景噪音。通常设置为**1**。

如果**Gain**已经调节至**800**,而图像仍然比较暗,可以选择适当调大**pinhole**直径。也可选择适当增大激光强度。

请注意, 目镜下观察荧光信号较差的样品无法通过共聚焦扫描获得高质量图像。

待得到满意的图像对比度后,点击**Stop**按钮,停止预览。逐一勾选**Track**,重复上述操作,调节每一个**Channel**中的通道参数,使各个通道均获得理想的图像。

用户针对每一**track**在**Light Path**工具栏中所设定的光路和**Channels**工具栏中设定的扫描设置,可以逐一保存在**Channels**工具栏的**Track Configuration**中。点击**Track Configuration**输入框右侧的保存按钮,在弹出的对话框中输入名称,点击**OK**完成保存。点击按钮,在下拉菜单中选择所需配置,即可调用保存好的设置。点击按钮,可以在下拉菜单中删除选中的设置。

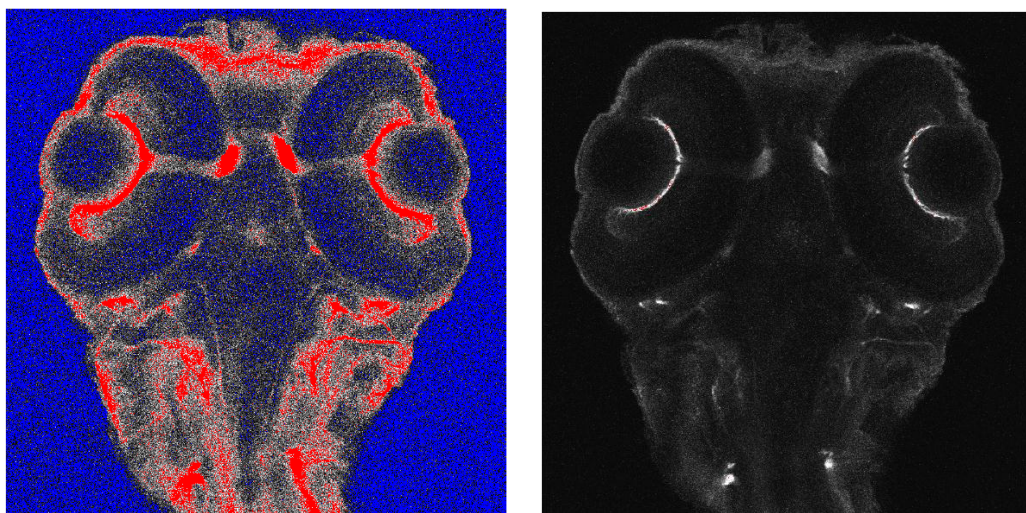


Fig 32 扫描参数调节前后的图像对比。左图为调节前图像，右图为调节后图像。

4.3.2.5. 扫描区域的调节

点击Acquisition Mode工具栏下Scan Area左侧的三角形按钮，打开控制区域 (Fig. 33)。示意图中的黑色区域为实际扫描的范围，将鼠标放在此区域上使其呈蓝色显示，此时用鼠标拖曳此区域可在允许范围内移动扫描位置；将鼠标移动至边框的方形结点上，可以移动边框，从而改变扫描区域的形状和大小；将鼠标移动至右下角的圆形结点上，可以旋转扫描区域至所需的角度，但圆形结点将永远处于图像的右下角位置。

在移动扫描区域时，扫描区域移动或旋转的具体数值会在示意图右侧的输入框中显示出来。也可以直接在输入框中输入数值，或拖曳输入框左侧的滚动条来调节扫描区域的位置和大小。点击输入框右侧的按钮 **C**，**0** 和 **1**，可使按钮所在行恢复初始设置。点击Reset All按钮，则使Scan Area下的全部设置恢复初始设置。

Zoom值代表了扫描系统提供的中间变倍值，ZEN 2011提供了从0.6到40的连续变化范围。数值越大，放大倍数越高，扫描区域越小。但这种中间光学变倍受到物镜分辨率的限制，在Zoom值大于5时，通常为无效放大，即此时Zoom值的增加并不能提高分辨力。

扫描区域的大小和形状会影响图像扫描分辨率和扫描速度，所以，在设置扫描区域后，需要重新点击Frame Size下的Optimal按钮，将图像分辨率调节到当前扫描区域下的最佳设置；并确认扫描速度适中。

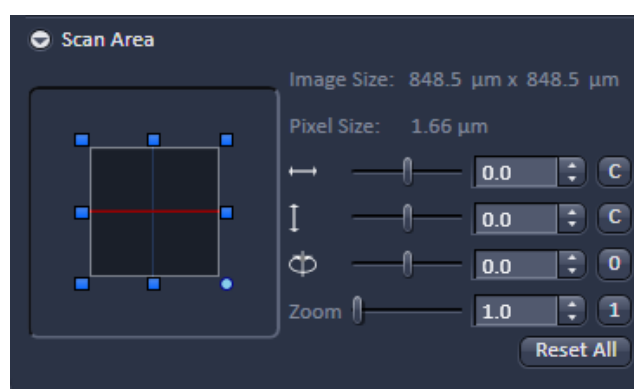


Fig 33 Scan Area 控制区域

4.3.2.6. 图像扫描

完成全部设置后，在Channels工具栏中，确认勾选全部track，点击操作按钮中的

Snap按钮，开始扫描。

开始扫描后，屏幕下方的状态栏中会出现蓝色进度条，指示扫描进度。待扫描结束后，进度条消失，完整的图像出现在图像窗口中。

4.3.2.7. 其他常用按钮

Reuse

对于任一扫描或预览生成的原始图像(*.czi或*.lsm)，在Dimension视图控制界面下方，会激活Reuse按钮 (Fig.

31)。点击此按钮，软件会自动读取扫描该图像时的光路及扫描设置，并应用到当前设置中。

也可使用主工具栏中的按钮，加载当前打开的原始图像的光路及扫描设置。

Crop

对于任一扫描或预览生成的图像，在Dimension视图控制界面下方，会激活Crop按钮 (Fig. 31)。点击此按钮，图像中会出现一红色方框 (Fig. 34)。可用此方框在当前图像中选取扫描区域，软件会自动相应调节Scan Area中的设置，包括扫描位置，角度和Zoom。

将鼠标移动至红色方框的中央，光标会变为手形，此时可用鼠标拖曳方框移动扫描位置；将鼠标移动至方框的顶点位置，光标会显示为，可以拖曳边框调节扫描区域的大小；将鼠标移动至边框上，光标会显示为，可以拖曳边框调节扫描区域的大小；将鼠标移动至中央十字线的框外部分，光标会显示为，可以旋转扫描区域至所需的角度的。

使用Crop方框选好扫描区域后，点击Continue或Snap按钮，即可对选定的扫描区域进行预览或扫描。同样需要注意的是，当使用Crop功能改变扫描区域的大小和形状后，需要重新调整Frame Size和Speed的设置。

Continue

在操作按钮中，点击Continue按钮可以使用当前设定的扫描参数来预览图像。预览时图像效果与实际扫描效果一致，但速度较慢。预览时，Continue按钮会自动变成Stop按钮。点击Stop按钮，即停止预览。

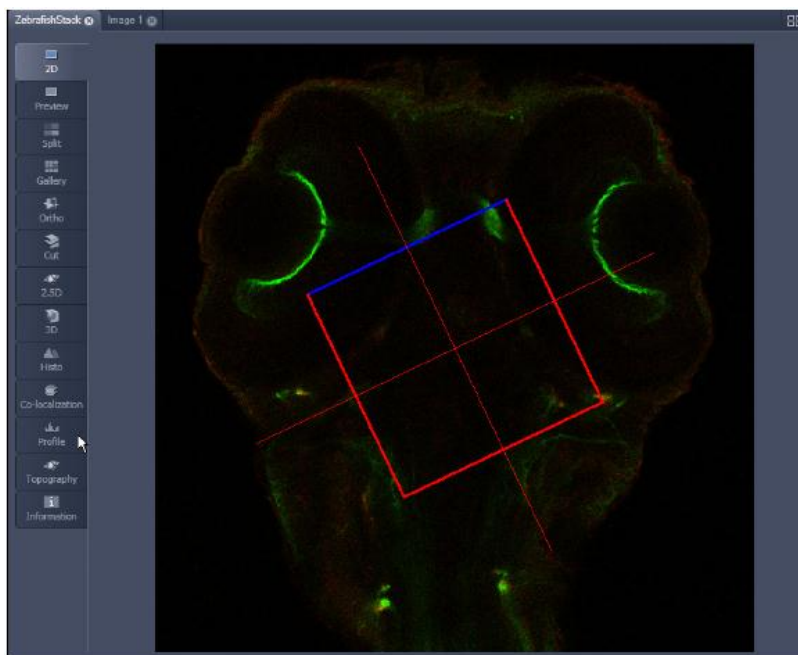


Fig 34 图像中的 Crop 方框

而使用Live按钮进行预览时,软件会使用默认参数进行预览,即图像分辨率512x512,以及系统允许的最快扫描速度。因此,特别是在将扫描区域设置成长方形后,需要使用Continue按钮进行预览。否则,软件会自动把扫描区域调节至512x512。

Set Exposure

点击操作按钮中的Set Exposure按钮,软件会根据当前设定的激光强度和Pinhole直径,自动调节扫描设置中各track的Gain值和Offset值,使图像呈现出适当的对比度。此后,可以在Channels工具栏中对扫描通道参数进一步精细调节。调节过程中,Set Exposure按钮会自动变成Stop按钮。点击Stop按钮,即停止参数调节。调节结束,Stop按钮会自动恢复为Set Exposure按钮。

Find Focus

点击操作按钮中的Find Focus按钮,软件会沿Z轴方向自动扫描一系列图像,选择图像对比度最高的一个Z轴位置作为焦平面,并自动移动至此位置。搜索焦平面的过程中,Find Focus按钮会自动变成Stop按钮。点击Stop按钮,即停止焦面搜索。搜索结束,Stop按钮会自动恢复为Find Focus按钮。

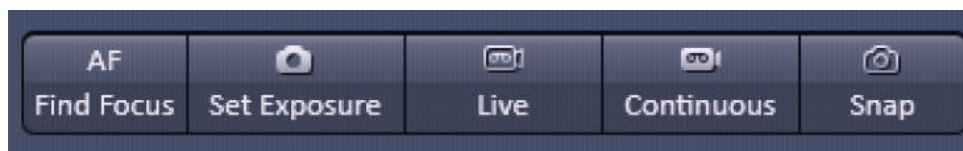


Fig 35 操作按钮

4.3.3. 二维图像相关的常用视图

扫描形成的图像最终显示在软件界面中央的图像窗口中,ZEN 2011可以提供多种视图及相应的视图控制界面,满足用户在观察分析优化图像方面的需求。ZEN 2011在图像窗口的右下角设有Show all复选框。勾选此框,可在视图控制界面中显示全部工具和调节参数;否则,将只显示基本设置。

4.3.3.1. 2D 视图

ZEN 2011默认在2D视图中显示扫描或预览生成的荧光图像。如果为多通道荧光图像,在2D视图中,只显示多通道叠加图像 (Fig. 36)。

在2D视图下,会出现Dimension, Display和Graphic三个基本视图控制界面。这三个视图控制界面在其他视图下也会出现。

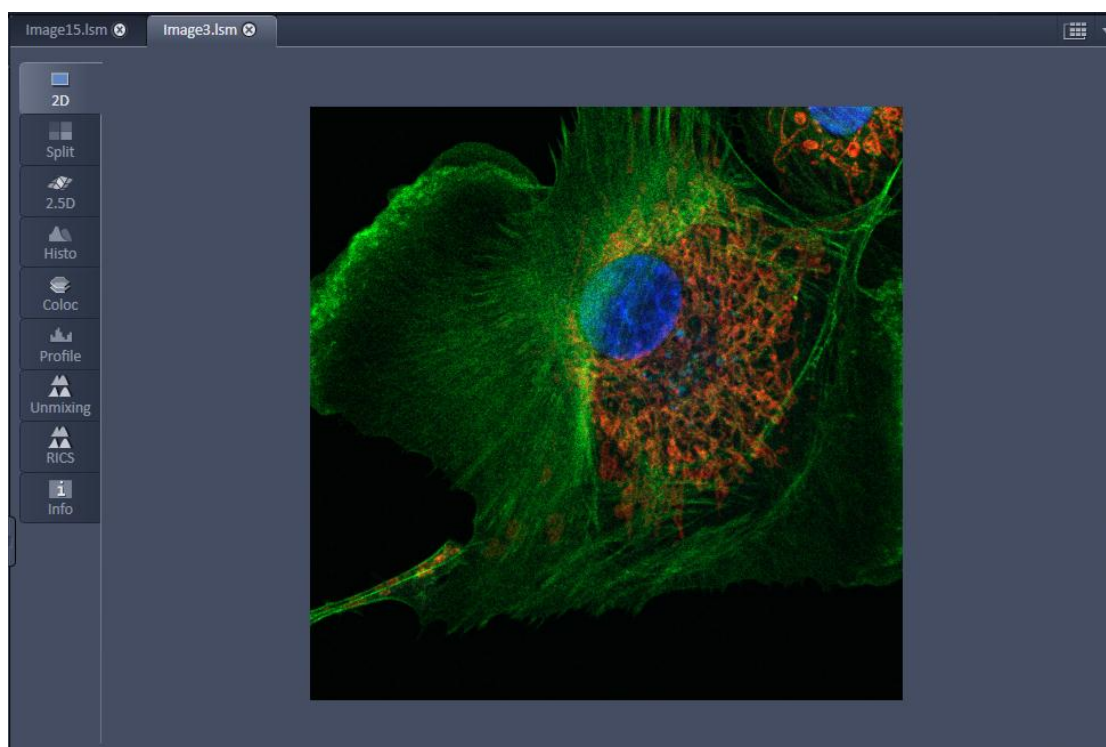


Fig 36 2D视图

Dimension 视图控制界面

Dimension 视图控制界面由上至下分为图像显示比例(Zoom)、图像显示通道(Channels)和常用按钮三个控制区域 (Fig. 37)。

在Zoom控制区域，软件列出了常用的图像显示比例控制工具：



为最适显示比例，根据视图窗口的大小自动调节图像显示比例，以保证整幅图像完整地显示在视图窗口中。



为100%显示图像，即显示图像时，图像中的像素点与显示屏上的像素点一一对应。



分别为缩小和放大图像按钮。也可以拖动按钮右侧的滚动条调节显示比例，或直接在输入框中输入显示比例。



点击此按钮，可以用鼠标在图像中选择感兴趣的区域进行放大。



点击此按钮，光标会变为

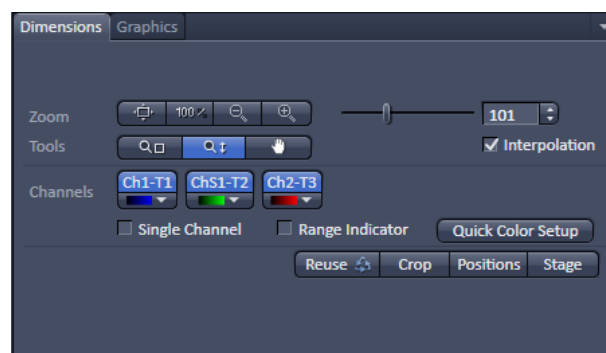


Fig 37 Dimension 视图控制界面

圆形。按下鼠标左键，并前后移动鼠标，可以放大或缩小图像的显示比例。



当图像的显示比例大于最佳显示比例的时候，点击此按钮，光标会以手形显示，可以移动鼠标来移动图像的显示位置。

软件默认勾选Interpolation选项 (Fig. 37)。勾选此选项，在放大图像时，软件会自动对图像中每一个像素点的边缘进行平滑处理，使图像即便在很大的显示比例下也不会出现明显的马赛克现象 (Fig. 38)。

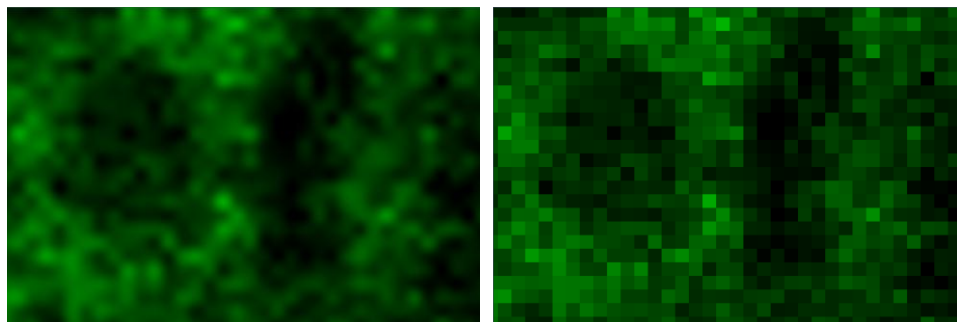


Fig 38 Interpolation选项的作用。左图为勾选Interpolation的图像；右图为未勾选Interpolation的图像

在Channels区，软件列出了图像中包含的各荧光通道及其伪彩色。在此，每个荧光通道都以一对按钮的形式显示。上方为通道名称按钮，下方为伪彩色按钮。在图像中显示的荧光通道，其名称按钮为蓝色高亮显示；点击此按钮，关闭该通道在图像中的显示，按钮也同时变为灰色。再次点击此按钮，则开启通道显示。点击伪彩色按钮，可以打开伪彩色下拉菜单，在其中自定义通道伪彩色；也可以在菜单中选择None，显示黑白图像。如果勾选了Single Channel复选框，则只能选择显示某一通道的图像。

在常用按钮区，软件列出了Reuse和Crop按钮，其功能请参见前文。如果配有电动载物台，软件还会在此处自动增加Position和Stage按钮。点击Position按钮后，用鼠标点击图像中的位置，软件可以自动读取该位置的XYZ坐标，并记入Position列表，用于多视野扫描。点击Stage按钮，图像中心会出现一十字线，用鼠标拖动此十字线，可相应地移动载物台至新的扫描区域，使十字线处于新扫描区域的中心。

Display 视图控制界面

Display视图控制界面中显示了图像的灰度直方图及其调节参数。用户可以对图像显示的灰度进行调节，以优化图像达到更好的显示效果 (Fig. 39)。

灰度直方图以灰度值为X轴，0为最黑；以像素数量为Y轴。曲线反映了图像中所有像素点在不同灰度范围内的分布变化。以荧光图像为例，通常靠近原点的第一个峰极高而锐利，代表了图像中大量存在的暗色背景；随着X轴灰度值的增加，出现了第二个较为平缓的峰，代表了图像中出现的较为明亮的荧光信号。根据样品荧光的亮度和面积不同，第二个峰的位置和高度会相应变化，有时会与第一个峰融合，没有明显界限。

在优化图像时，首先需要将灰度直方图对角线左下角的点向右沿X轴移至第一个峰

和第二个峰形成切迹所对应的位置，此时，软件将使用这一点对应的灰度值为最低灰度值，即0，灰度值低于这一点的像素将显示为黑色，从而减少了图像背景噪音。然后，将对角线右上角的点向左移动至第二个峰结束的位置，此时，软件将使用这一点对应的灰度值

为饱和灰度值，灰度值高于这一点的像素均显示为图像所能达到的最大亮度，因而图像中的荧光信号会变得更明亮。从而增强了图像的对比度。也可在直方图下的**Black**和**White**输入框中输入相应的灰度值来定义最低和饱和灰度值。

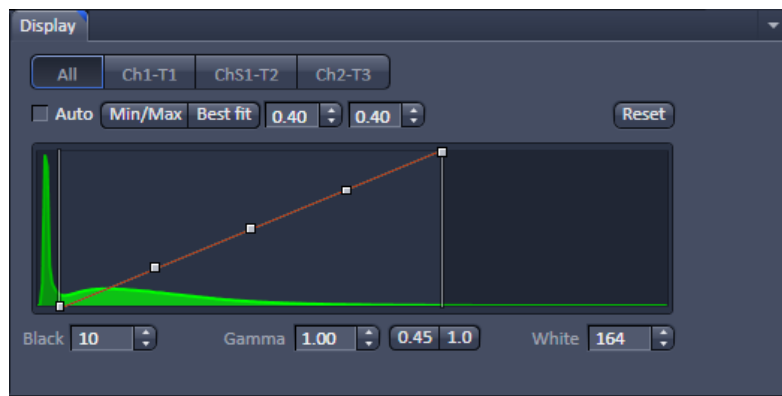


Fig 39 Display 视图控制界面

上下移动对角线左侧第二个点，以改变图像的**Gamma**值。对于荧光图像来讲，通常会向下移动该点，即加大**Gamma**值，进一步去除背景信号。也可以在直方图下的**Gamma**输入框中直接输入**Gamma**值。输入框右侧还提供了**0.45**和**1**两个按钮。**1.0**按钮可用于恢复图像的原始**Gamma**值。**0.45**按钮通常用于透射光图像的灰度调节。

拖动对角线中间的点使整条曲线平行移动，可以增强或降低图像的整体亮度，但不会改变对比度。

如果是多通道荧光图像，灰度直方图中会显示图像中打开的所有荧光通道的数据。可以通过直方图上方的通道名称按钮，选择需要调节对比度的通道单独进行调节；也可以点击**All**按钮，同时调节所有荧光通道的对比度。

在灰度直方图的上方，软件设置了**Min/Max**和**Best fit**快捷按钮，可以迅速调节图像的对比度。点击**Min/Max**按钮，软件会自动将灰度直方图对角线左侧的第一个点调节到荧光信号峰起始的位置，同时将右上角的点调节到荧光信号峰结束的位置。点击**Best fit**按钮，软件将会根据**Best fit**按钮右侧输入框中输入的数值，自动调节灰度直方图对角线的位置。例如，在第一个输入框输入**0.4**，软件将图像中最暗的**0.4%**的像素点全部设为背景；在第二个输入框输入**0.4**，则会将图像中最亮的**0.4%**的像素点设为饱和灰度值。勾选**Auto**复选框，软件将自动根据设置调节图像对比度。

点击灰度直方图右上角的**Reset**按钮，可恢复灰度设置至初始状态。

Graphic 视图控制界面

此视图控制界面中提供了为图像添加比例尺，箭头，文字说明等插入项的工具，并可完成手动测量的设定 (Fig. 40)。

在位于视图控制界面最上方的插入项按钮中，从左至右依次提供了文字说明，比例尺，直线，箭头，矩形，圆形和不规则形状的添加按钮。

在添加不规则形状时，在图像上点击鼠标左键，逐一定义各个拐点，最后点击右键结束，软件可自动闭合曲线成不规则形状。使用选择工具，可以改变插入项的位置和大小。使用选择工具点击感兴趣区域的边框，使之处于选中模式，可用鼠标拖曳其边框，在图像上移动位置；也可用鼠标拖曳其拐点位置，改变插入项的大小。



Fig 40 Graphic 视图控制界面

在Select下拉菜单中，软件提供了更多的插入项选择，包括角度，椭圆，曲线等等。在Select菜单右侧的下拉菜单中，可以分别设定插入项的线条粗细和颜色。点击More按钮，可以编辑插入文字说明的字体和大小等。

勾选Keep Tool复选框，可以在图像中连续添加多个同类的插入项；勾选Auto color，软件会自动给各个插入项加上不同的颜色。

所有插入项都会在列表中逐一显示出来。点击列表中每行插入项信息的列，可以选择是否在图像中显示该插入项；当该列信息显示为时，该插入项在图像中显示，否则，图像中不显示该插入项。点击列，可以锁定该插入项在图像中的位置；当该列信息显示为时，该插入项在图像中的位置固定，否则，可自由移动该插入项在图像中的位置。当勾选M列时，软件会自动测量插入项的周长，角度和面积等信息，并自动显示在图像中。对于插入文本和比例尺，无法使用此复选框。点击列表右下角的按钮，可以删除选中的插入项。点击列表左下角的按钮，在弹出的对话框中输入名称，点击OK完成对整个插入项列表保存。点击按钮，在文件夹中选择所需的列表，即可调用保存好的设置。

列表右侧的输入框，由上至下依次显示了插入项在图像中的位置(X, Y)，长度(W)和高度(H)。点击Cut Region按钮，可以将选中的感兴趣区域中的图像剪切至新的图像中。

4.3.3.2. Split 视图

对于多通道荧光图像，ZEN 2011提供了Split视图，以观察各通道单独的荧光图像

及叠加图像 (Fig. 41)。在设置多通道荧光图像的扫描参数时，可使用此视图，优化各荧光通道的扫描参数。

在此视图下，Dimension视图控制界面中会出现Merged复选框。勾选Merged复选框，软件会自动显示多通道荧光叠加图像；否则，只显示各通道单独的荧光图像。

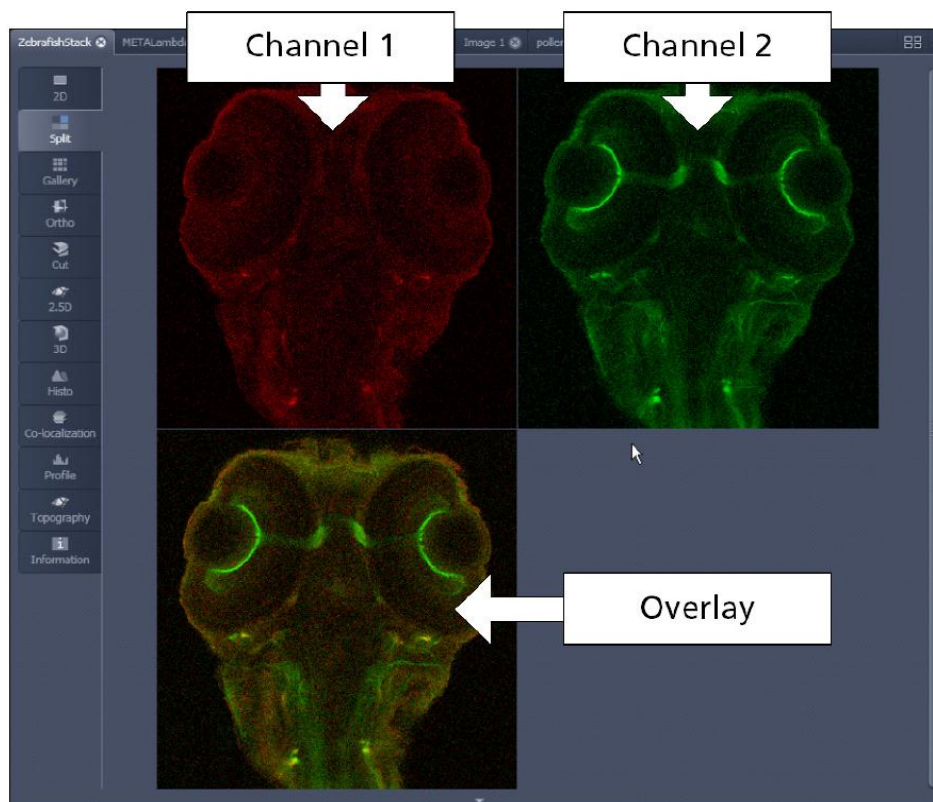


Fig 41 Split视图

4.3.3.3. Histo 视图

在Histo视图中，软件提供了图像的灰度直方图，灰度分布数据表和平均灰度数据表供用户参考 (Fig. 43)。在表格上点击右键，选择Save Table选项，可以将表格中的数据保存为*.txt文件；也可以选择Copy table选项，将表格中的数据直接拷贝至Excel表格当中。

在Histo视图下方设有Histogram视图控制界面，其中列出了Histo视图的设置工具 (Fig. 42)。

用户可以在Histogram视图控制界面最上排的形状工具中，选择适当的形状，如矩形，圆形，多边形等，在图像中选择感兴趣的区域。此时，在Histo界面中即可显示感兴趣区域的灰度直方图，灰度分布数据和平均灰度数据。使用选择工具, 点击感兴趣区域的边框，使其处于选中模式后，可用鼠标拖曳其边框，在图像上移动感兴趣区域的位置；也可用鼠标拖曳感兴趣区域的拐点位置，改变其大小。

如果图像中同时存在多个感兴趣区域，Histo视图中只显示选中区域的数据。

点击选择工具右侧的Delete按钮，可以从图像中删除选中的感兴趣区域。在Delete按钮右侧的下拉菜单中，可以分别设定感兴趣区域边框的线条粗细和颜色。

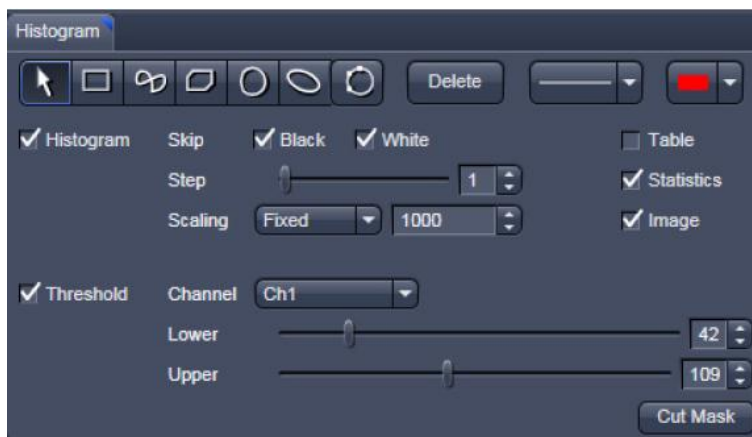


Fig 42 Histo 视图控制界面

在Graphic视图控制界面中选择形状工具定义的感兴趣区域，在Histo视图中同样有效。而在Histogram视图控制界面中定义的感兴趣区域，也同样会出现在Graphic视图控制界面的列表中。

用户可以使用Histogram，Table，Statistics和image复选框，选择是否在Histo视图中显示直方图，灰度分布数据表，平均灰度数据表和图像。

勾选Histogram复选框时，在其右侧会出现一系列参数，用以编辑灰度直方图的格式：

- Skip Black和Skip White复选框：用以选择是否在直方图中忽略灰度值为0或达到饱和和灰度值的像素点。
- 用户可以在Step输入框中输入数值，定义直方图中每一根柱代表的灰度值。数值越大，直方图中每一根柱代表的灰度值范围越宽，直方图越粗糙。也可以用鼠标拖动输入框左侧的滚动条，调节该数值。
- 在Scaling下拉菜单中，用户可以定义Y轴坐标的刻度模式，可选择Maximum，即使用图像中分布最广的灰度范围所含的像素数为Y轴最大刻度；也可以选择fixed，在其右侧的输入框中自定义Y轴最大刻度。

勾选Threshold复选框，可根据各通道的灰度值选择感兴趣区域：

- 在Channel下拉菜单中选择感兴趣的荧光通道。
- 用鼠标拖动Lower滚动条定义灰度阈值下限，软件会自动在图像中将灰度值低于阈值的区域标为蓝色。也可以在滚动条右侧的输入框中直接输入阈值。
- 用鼠标拖动Upper滚动条定义灰度阈值上限，软件会自动在图像中将灰度值高于阈值的区域标为红色。也可以在滚动条右侧的输入框中直接输入阈值。
- 此时，Histo视图中显示的平均灰度数据即为灰度值在定义范围内图像的平均灰度值，即伪彩未覆盖区域的平均灰度值。

- 点击右下角的Cut Mask按钮，可以将符合定义灰度范围的图像剪切至一张新的图像中。

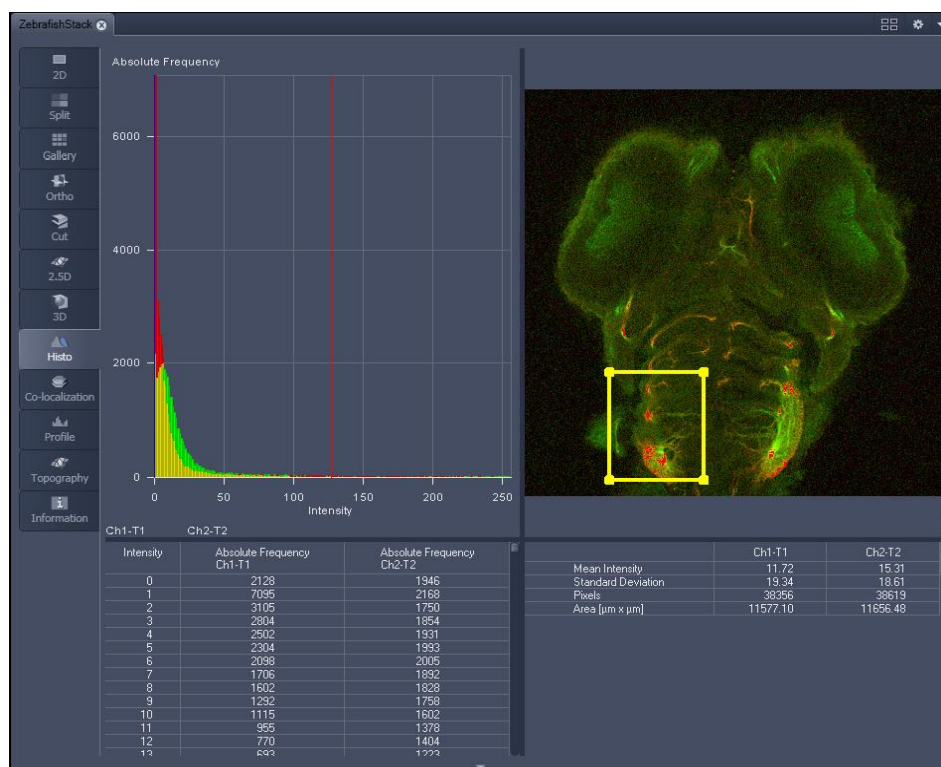


Fig 43 Histo视图

4.3.3.4. Coloc 视图

对于多通道荧光图像，ZEN 2011提供了Coloc视图。在Coloc视图中，用户可以分析多通道荧光图像中某两种荧光的共定位关系。软件可以提供荧光共定位散点图和相关分析数据表格，还可以将荧光信号单独表达的区域和共表达的区域在原始图像中用不同的伪彩标记出来 (Fig. 45)。在表格上点击右键，选择Save Table选项，可以将表格中的数据保存为*.txt文件；也可以选择Copy table选项，将表格中的数据直接拷贝至Excel表格当中。

Coloc视图下方有Co-localization视图控制界面，其中列出了分析荧光共定位所需的工具和参数 (Fig. 44)。

在多通道荧光图像中，每个像素点都含有至少两种荧光信号的灰度值信息(Ch1, Ch2)。进行荧光共定位分析，首先需要选择感兴趣的荧光信号。在Horizontal下拉菜单中选择散点图中X轴所代表的荧光信号，例如Ch1-T1；在Vertical下拉菜单中选择Y轴所代表的荧光信号，例如Ch2-T2。此时，散点图以Ch1和Ch2的灰度值分别作为X轴和Y轴的坐标，从而定义出了像素点在散点图中的位置。即图像中的每个像素点都可以根据自身Ch1和Ch2的灰度值信息，在散点图中找到自己的位置，图像中的像素点与散点图中的点一一对应。

只含有荧光信号Ch1的像素点，在散点图中靠近X轴，位于区域1中；只含有Ch2的像素点靠近Y轴，位于区域2中；区域3中的点为同时含有Ch1和Ch2的像素点，而区域4中的点Ch1和Ch2的灰度值都很低，即背景。

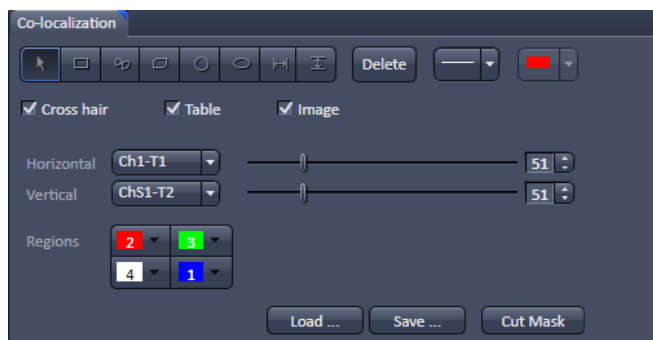


Fig 44 Co-localization 视图控制界面

然后，由于各区域的界限需要人为设置，因此需要定义出图像中哪些像素点只含有单色荧光，以设定散点图中区域1和区域2的范围。

如果图像中有肉眼可识别的只含有Ch1或Ch2信号的区域，可以利用这些区域来定义单通道荧光的阈值。用户可以在Co-localization视图控制界面最上排的形状工具中，选择适当的形状，如矩形，在图像中选择只含有Ch1信号的区域。此时，由于散点图中只显示感兴趣区域中的像素点，所有的点都集中在X轴附近。用鼠标拖曳Vertical下拉菜单右侧的滚动条，调节散点图中十字线横轴的位置，使区域1恰好包含当前散点图中显示的所有点。然后，使用选择工具，将感兴趣区域移动到只含有Ch2信号的区域。同样地，此时散点图中所有的点都集中在Y轴附近。用鼠标拖曳Horizontal下拉菜单右侧的滚动条，调节散点图中十字线纵轴的位置，使区域2恰好包含当前散点图中显示的所有点。这样，Ch1和Ch2单通道荧光的阈值就定义好了。

如果图像中没有容易识别的只含有Ch1或Ch2信号的区域，则建议使用单独标记的对照样品来分别设定两个通道的阈值。

点击选择工具右侧的Delete按钮，从图像中删除选中的感兴趣区域。软件会自动计算出整幅图像的荧光共定位效率。点击Regions右侧的区域按钮，可以开启该区域在图像中的伪彩显示。即用不同伪彩在图像中标记散点图中不同区域内的像素点。启动伪彩显示的区域按钮，边框成高亮显示。点击区域按钮中的黑色三角形按钮，可以打开伪彩色下拉菜单定义各区域不同的伪彩色。

点击控制界面下方的Cut Mask按钮，可以将同时含有Ch1和Ch2信号的区域剪切至一张新的图像中。点击Save按钮，可以保存共定位分析所设置的阈值。点击Load按钮，可以选择加载事先保存的设置。

如果图像中同时存在多个感兴趣区域，Coloc表格中将逐一列出所有感兴趣区域的共定位情况。如果选中其中的某一个感兴趣区域，则Coloc表格中只列出该区域的数据。在Delete按钮右侧的下拉菜单中，可以分别设定感兴趣区域边框的线条粗细和颜色。

用户可以使用Cross hair，Table和image复选框，选择是否在Coloc视图中显示散点

图中的十字线，共定位分析数据表和图像。

需要注意的是，荧光共定位分析对图像扫描参数有严格的要求。首先，要保证用于荧光共定位分析的两种荧光信号之间不存在信号串扰的现象，以保证荧光信号的准确性；其次，扫描通道设置中，需要调节两个荧光通道的Pinhole直径使光学切片厚度一致，以保证像素点大小一致；第三，需要比较荧光共定位效果的各项图片，需要使用相同的扫描参数和阈值设定，从而使共定位结果具有可比性。

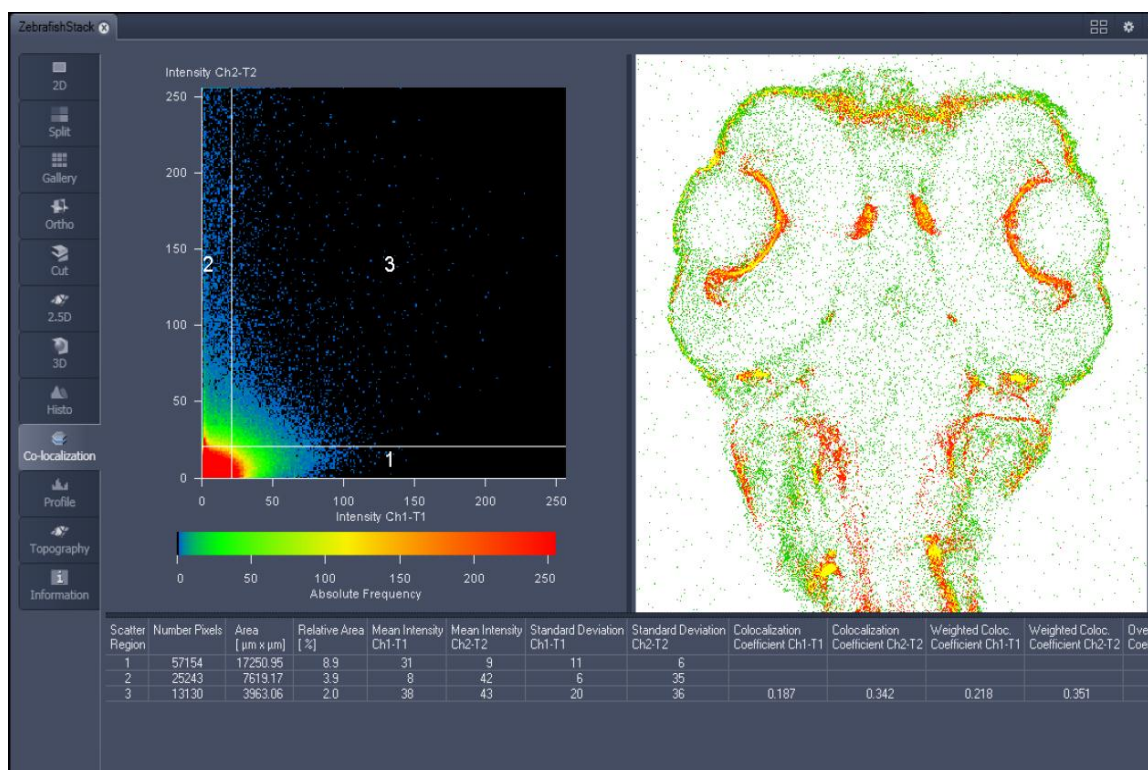


Fig 45 Colocalization 视图

4.3.3.5. Profile 视图

在Profile视图中，可以测量图像中某一直线或曲线上各点之间的灰度值变化 (Fig. 47)。在定义待测量的线段后，软件会自动以曲线图的形式显示该线段上所有通道的荧光灰度值变化，并将具体数据列入表格中。在表格上点击右键，选择Save Table选项，可以将表格中的数据保存为*.txt文件；也可以选择Copy table选项，将表格中的数据直接拷贝至Excel表格当中。

Profile视图下方设有Profile视图控制界面，其中列出了Profile视图的设置工具 (Fig. 46)。

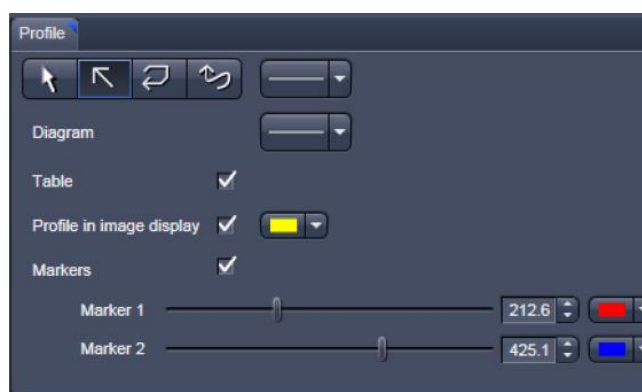


Fig 46 Profile 视图控制界面

软件默认选择直线画图工具。使用此工具，可以在图像中定义任意方向的直线线段。也可以选择多边形画图工具或任意曲线画图工具。选择这两种工具时，均需使用左键点击图像定义各个拐点，使用右键点击图像定义终点。还可以使用选择工具，改变已设定线段的位置和长度。使用选择工具点击线段，使其处于选中模式，可用鼠标拖曳线段的中间部分，在图像上移动其位置；也可用鼠标拖曳线段的端点位置，改变其长度。用户可以在选择工具右侧的下拉菜单中定义线段的粗细。

可以在Table复选框中选择是否在Profile视图中显示灰度数据表。

勾选Profile in image display复选框，Profile灰度值曲线将随着定义线段一起出现在图片中；否则不出现。用户可在此复选框右侧的颜色下拉菜单中选择曲线边框的颜色。

勾选Markers复选框，定义线段上会出现两个不同颜色的点。同时灰度值曲线上会出现两条相应的直线。在曲线图的上方，会以表格方式显示出这两点的灰度值，与原点的距离，及两点间距离和灰度差值。

在Markers复选框下方，可以用鼠标拖动滚动条，调节标记点的位置，在曲线图上方的表格中观察其灰度值变化。也可在输入框中直接输入该点到原点的距离，以定义其位置。在输入框右侧的颜色下拉菜单中，可自定义点的颜色。将鼠标放置在灰度值曲线的相应直线上，拖曳鼠标，也可移动相应的点在线段中的位置。

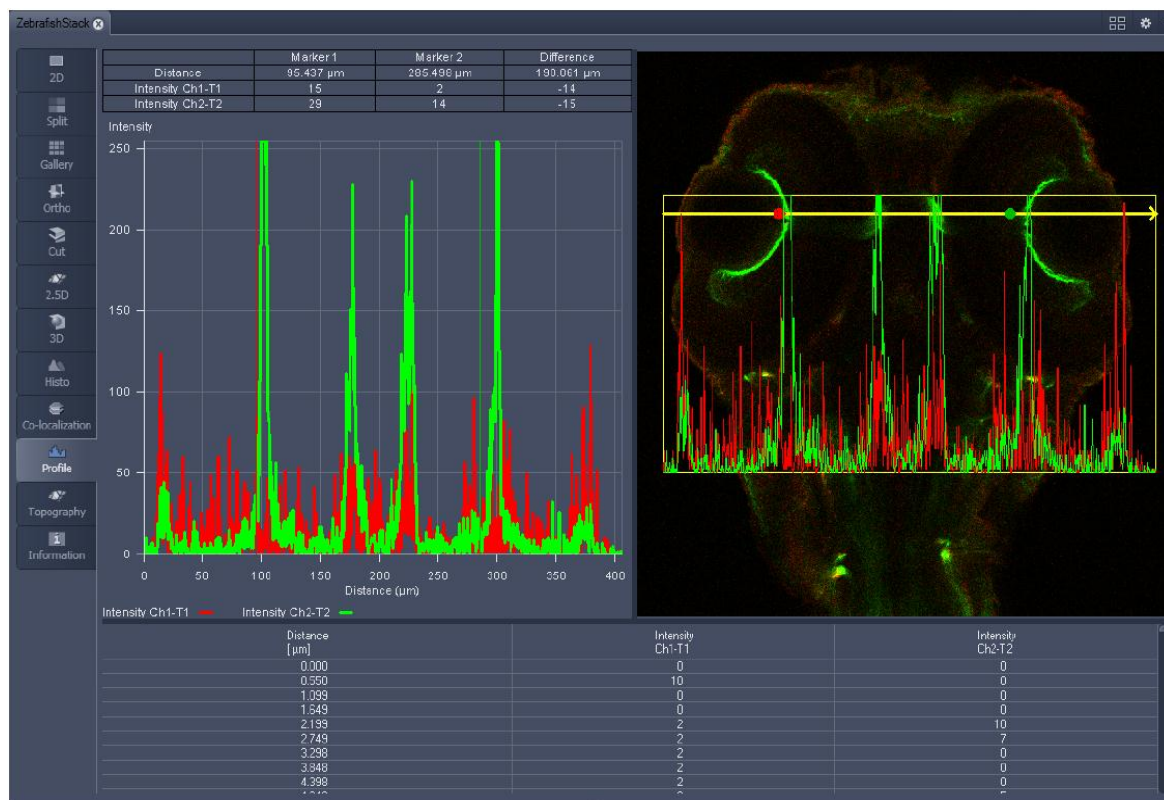


Fig 47 Profile视图

4.3.3.6. Info 视图

在Info视图中，列出了扫描图像时所使用的各种设置参数，如文件名，像素大小，图像分辨率，pinhole大小，物镜种类，扫描速度，Zoom值，Gain值，Offset值，激光波长和强度，主分光片和采集发射光的波长范围等 (Fig. 48)。请注意，这些信息在将该图片直接保存为其他格式的图片后将被删除。

用户还可以在Notes一栏中输入备注信息。

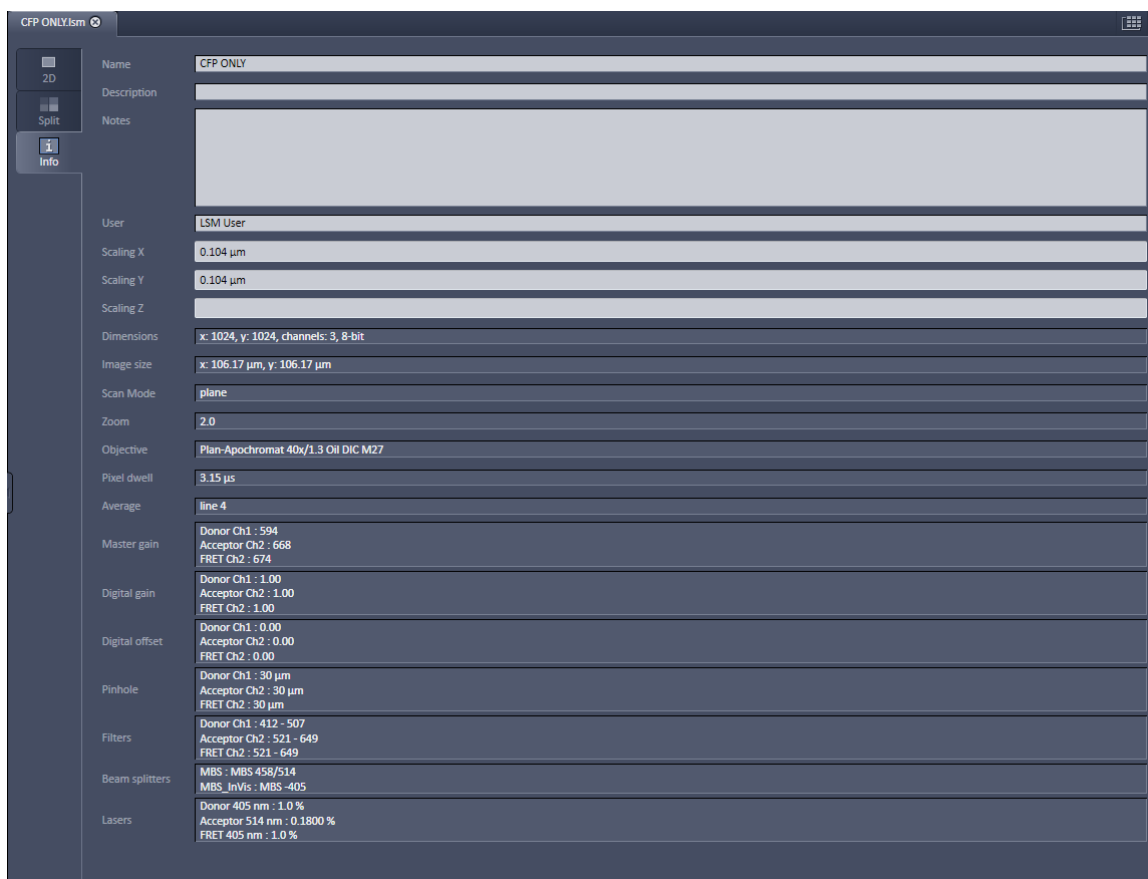


Fig 48 Information视图

4.4. 多维图像扫描

常见的多维图像扫描方式包括三维重构(Z Stack)、时间序列(Time series)、区域扫描(Region)和光漂白(Bleaching)。如果配有电动载物台，则还可以完成大图拼接(Tile scan)和多视野扫描(Position)。

在多维拍摄工具选择界面中勾选所需的拍摄方式，左侧工具栏中会出现相应的设置工具栏，可用以设置相关实验的扫描参数。可以同时选择一种或多种拍摄方式 (Fig. 49)。

设置好的实验可以在Smart Setup按钮上方的Configuration中进行保存并调用。点击  按钮，在弹出的对话框中输入名称，点击OK完成保存。点击  按钮，在下拉菜单中选择所需配置，即可调用保存好的设置。点击  按钮，可以在下拉菜单中删除选中的设置。

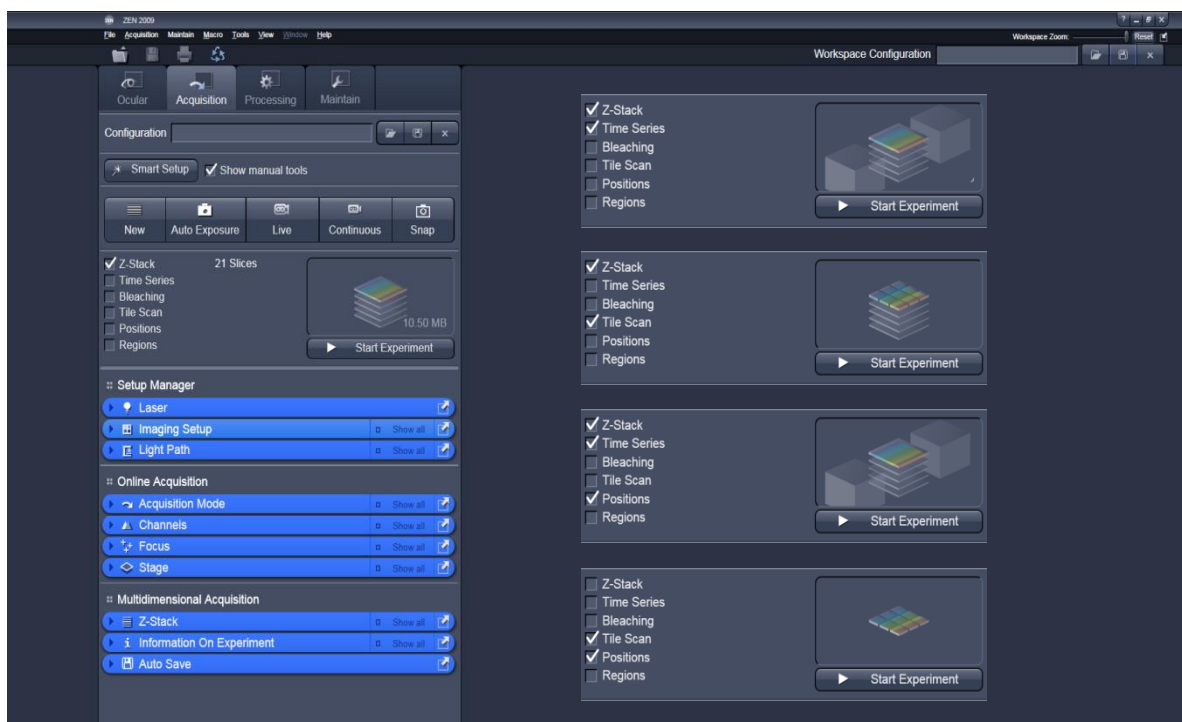


Fig 49 多维图像拍摄工具的选择

4.4.1. Z-stack 扫描

Z-stack扫描可以逐层拍摄在Z轴方向上的一系列样品图片，用于分析样品的三维立体结构，靶分子在样品中不同层面的分布等。

依前述方法，通过Smart Setup对话框设置需要扫描的荧光通道。

在多维拍摄工具选择界面中勾选Z-stack功能。软件会在Multidimensional Acquisition工具组下增加Z-Stack工具栏。点击Z-Stack工具栏的蓝色标题行，打开工具栏 (Fig. 50)。点击Z-stack工具栏的Optimize Sectioning and Step标题左侧的三角形按钮，打开控制区域，点击Optimal按钮，然后点击Match Pinhole按钮，软件将自动调节各track的Pinhole大小，使各Track间的光学切片厚度尽可能接近。注意，Match Pinhole按钮只在采集多通道荧光图像时激活。如果拍摄单通道荧光图像，可忽略此步骤。

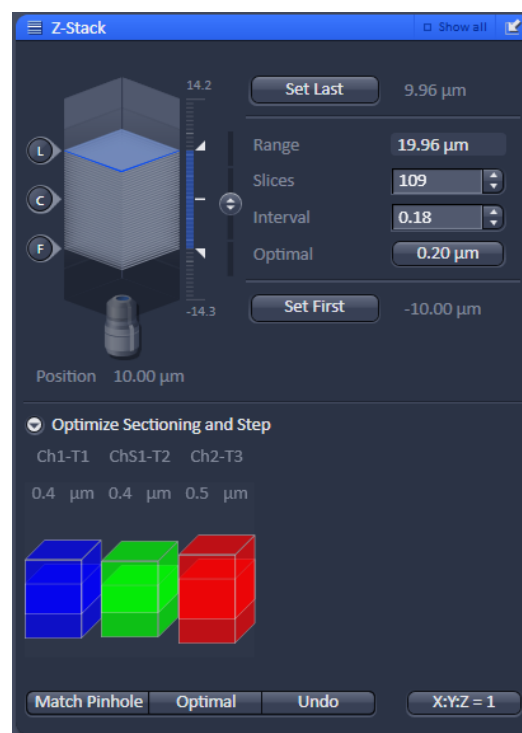


Fig 50 Z-stack 工具栏

依前述方法，在Channels工具栏设置各track的激光强度，Gain值及扫描速度、Frame Size、Average等参数。注意，由于在Z-stack工具栏中已经调节过各Track的Pinhole直径，因此，此时注意不要再更改Pinhole的设置。

在Channels工具栏中选择一个包含感兴趣荧光通道的track进行预览。调节Gain值，找到感兴趣的视野。调节焦平面，根据预览形成的图像选择立体结构开始的Z轴位置，点击Set First按钮，记录此Z轴位置。向反方向调节焦平面，移动至立体结构结束的位置，点击Set Last按钮，读取此焦平面的Z轴位置。

如果为单通道荧光图像，此时需点击Optimal后的数字按钮，软件将根据选用的物镜，激光和Pinhole大小自动把Z轴扫描步进设置为当前扫描参数下的最优步进数值，并计算出需要扫描的图像数量(Slice)。对于多通道荧光图像，此设置在Optimize Sectioning and Step控制区域中已经完成，则可忽略这一步骤。

在确定立体结构的起止位置后，也可在Slices输入框中手动输入所需的数值，软件会根据用户定义的Z轴距离，自动计算出步进(Interval)；反之，输入Interval数值，软件可自动计算出Slice数量。通常自定义的Interval值不会小于软件计算所得最优步进，即Optimal值，因为这样会重复采样，造成大量的冗余图像，而对真正的三维重构质量没有贡献。

确认勾选Channels工具栏中所有Track。点击Z-stack工具栏左上角示意图中的按钮，显微镜会自动移动至Z轴定义范围的中间位置，并拍摄一张图像；点击按钮，显微镜会回到设定的Z轴起始平面，并自动拍摄一张图片；点击按钮，显微镜会回到设定的Z轴结束平面，并拍摄图片。确认起止位置无误后，点击多维拍摄工具选择界面中的Start Experiment按钮，开始实验。扫描过程中，系统会自动按照设定的扫描范围，由靠近物镜的层面逐层向远端移动，完成扫描。同时可以看到Z-stack工具栏示意图中的蓝色层面逐渐由起始位置移动至结束位置。

实验开始后，Start Experiment按钮会变成Stop按钮，点击Stop按钮可以立刻终止实验；点击Stop按钮下的Finish Current Step按钮，软件会在完成当前层面的扫描后结束实验。

4.4.2. 时间序列扫描

时间序列扫描主要用于获取反映样品连续变化的图像信息。

依前述方法，选择感兴趣的焦平面，设置各track的激光强度，Pinhole大小，Gain值及扫描速度、Frame Size、Average等参数。

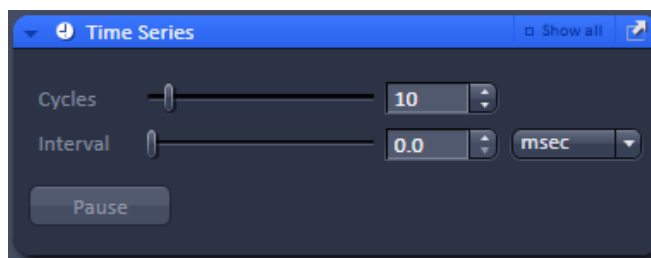


Fig 51 Time Series 工具栏

在多维拍摄工具选择界面中勾选Time Series功能。软件会在Multidimensional Acquisition工具组下增加Time Series工具栏 (Fig. 51)。

打开Time Series工具栏，在Cycles右侧的输入框中直接输入计划拍摄的图片张数。在Interval右侧的输入框中直接输入拍摄两张图片之间的时间间隔，在数字右侧的下拉菜单

中可以选择适当的单位，包括毫秒msec，秒sec，分钟min。

在Interval右侧设置的时间间隔是指相邻两张图片开始拍摄之间的间隔。如果此处设定的时间间隔短于Acquisition Mode工具栏中Speed下的Scan time，软件将在完成一张图像的扫描后，直接扫描下一张。

确认勾选Channels工具栏中所有Track。点击多维拍摄工具选择界面中的Start Experiment按钮，开始实验。

实验开始后，Time Series工具栏中的Pause按钮会变亮。在需要暂停时，可点击此按钮暂停实验。

实验开始后，Start Experiment按钮会变成Stop按钮，点击Stop按钮可以立刻终止实验；点击Stop按钮下的Finish Current Step按钮，会在完成当前时间点的扫描后结束实验。

4.4.3. 光漂白实验

光漂白实验主要用于观察靶分子在细胞内或细胞间的运动或定位信息，如荧光漂白后恢复 (FRAP)，光控蛋白的激活，及荧光共振能量转移等。

依前述方法，选择感兴趣的焦平面，设置各track的激光强度，Pinhole大小，Gain值及扫描速度、Frame Size、Average等参数。

在多维拍摄工具选择界面中勾选Bleaching功能。软件会同时自动选择Region和Time series功能。Region工具栏位于Acquisition Parameter工具组下，Bleaching工具栏位于Multidimensional Acquisition工具组下 (Fig. 52)。

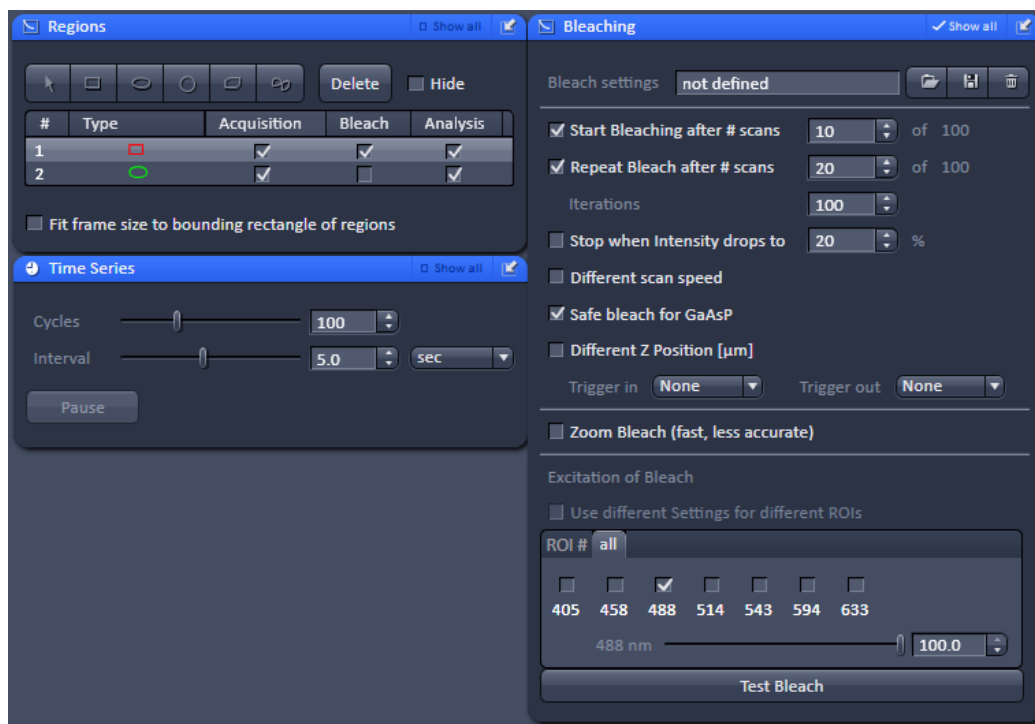


Fig 52 Bleaching, Region 和 Time Series 工具栏

打开Region工具栏，选择适当的形状，如矩形，圆形或不规则形状等，在预览图像中选取所需区域。软件会自动赋予各感兴趣区域不同颜色的边框。在列表中选择某一区域成高亮显示，在图像中该区域的拐点也会被标记出来。在画面中拖拽拐点，可改变感兴趣区域的大小；拖拽其边框，可以移动其位置(Fig. 53)。选中某一区域后，点击Region工具栏中的Delete按钮，可以删除选中的区域。

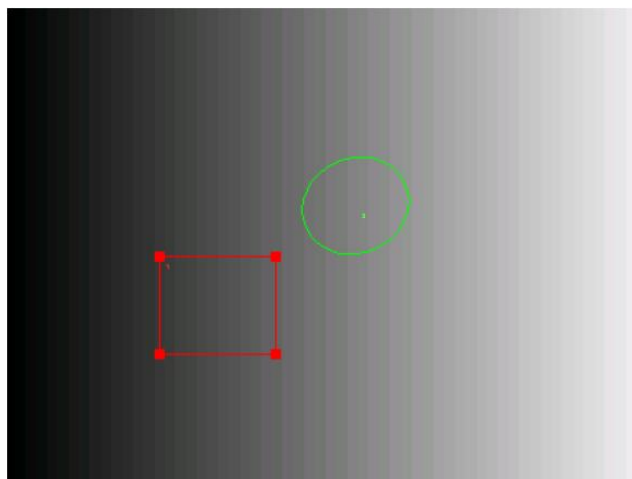


Fig 53 画有两个区域的模拟预览图像。其中，红色区域为选中区域。

在Region列表中勾选准备对此区域进行的处理，包括拍摄(Acquisition)，漂白(Bleaching)和分析(Analysis)。各任务之间可任意组合。如果各区域均不勾选Acquisition，软件将默认扫描整幅图像。

勾选Fit Frame size to bounding rectangle of regions复选框，软件将自动调节扫描区域以适应感兴趣区域的大小。否则，软件默认扫描整幅图像，但只在感兴趣区域内打开激光，收集荧光信号。因此，勾选此选项，可以缩小扫描范围，减少成像时间。如果图像中含多个感兴趣区域，软件将调节扫描区域至恰好包含所有感兴趣区域。

打开Time Series工具栏，根据前述方法，在Time series工具栏中设置时间序列扫描的参数。

打开Bleaching工具栏，设置漂白所需的各类参数。勾选标题行右侧的Show all复选框，显示所有设置参数。

- **Start Bleaching after # scan:** 勾选此选项后，可在输入框中输入准备用作基线对照的图像张数。系统将在扫描指定张数的图像后开始漂白。
- **Repeat Bleach after # scans:** 在输入框中输入二次漂白间间隔的图像张数。如果在整个实验中只准备漂白一次，可不勾选此选项。
- **Iterations:** 在输入框中输入每次漂白过程中对漂白区域重复扫描的次数。
- **Stop when Intensity drops to:** 勾选Repeat Bleach after # scans复选框后，软件会弹出Stop when Intensity drops to 的选择。在此处可以设定需要停止漂白时样品灰度值降低的百分比。
- **Different scan speed:** 选中此选项，可以在输入框中输入漂白时所用的扫描速度；否则，软件默认使用Acquisition Mode工具栏中设置的扫描速度进行漂白。在漂白时使用较低的扫描速度，可以增加激光在每个像素点上停驻的时间，增强漂白效果。

- 为了保护LSM780灵敏的GaAsp检测器，软件默认勾选safe bleach for GaAsp复选框，在漂白过程中关闭GaAsp前的shutter。没有配备GaAsP检测器的LSM710中没有此选项。

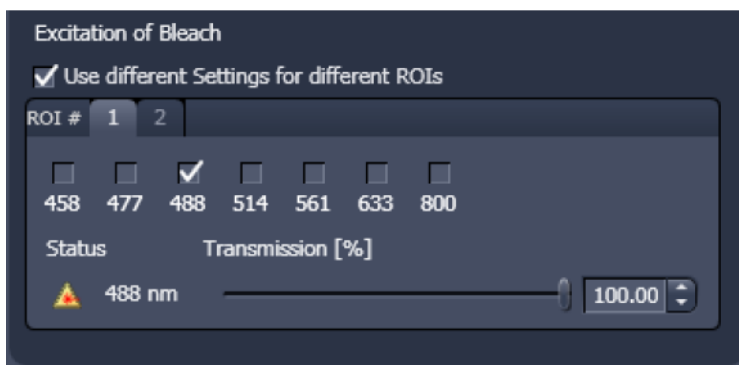


Fig 54 Excitation of Bleach 设置界面

- **Different Z position:** 选择此选项，可以设置不同的漂白和拍摄焦平面。在拍摄焦平面调节好扫描参数后，调节至漂白焦平面，点击此选项后的**Mark Z**按钮，即可记录当前Z轴位置为漂白位置。
- 勾选**Zoom Bleach**复选框，软件将自动调节扫描区域以适应漂白区域的大小，这样可以提高成像速度。

在**Excitation of Bleach** 控制区域下勾选漂白所用的激光器，并调节激光强度 (Fig. 54)。如果有多个区域需要漂白，软件会激活**Use different setting for different ROIs**选项。勾选此选项，**Excitation of Bleach**控制区域下会出现不同的ROI页面，用户可以在其中为不同的感兴趣区域设置不同的漂白激光。

光漂白参数可以在**Bleaching**工具栏最上方的**Bleach Setting**控制区域中保存并调用。点击按钮，在弹出的对话框中输入名称，点击**OK**完成保存。点击按钮，在下拉菜单中选择所需配置，即可调用保存好的设置。点击按钮，可以在下拉菜单中删除选中的设置。

确认勾选**Channels**工具栏中所有**Track**。点击多维图像工具栏中的**Start Experiment**按钮，开始实验。

实验开始后，**Start Experiment**按钮会变成**Stop**按钮，点击**Stop**按钮可以立刻终止实验；点击**Stop**按钮下的**Finish Current Step**按钮，会在完成当前时间点的扫描后结束实验。

4.4.4. 图像拼接

图像拼接功能满足了用户以高分辨率大范围获取样品图像信息的需求，可以将多个视野的图像自动拼接在一起。完成此功能需要电动载物台的配合。

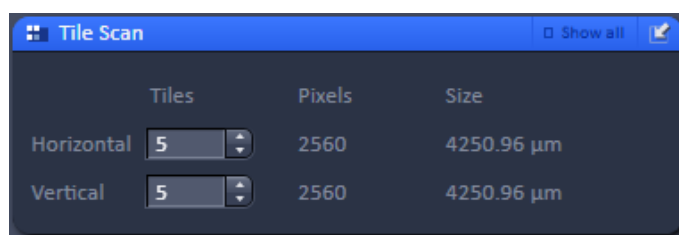


Fig 55 Tile Scan 工具栏

依前述方法，选择感兴趣的焦平面，设置各track的激光强度，Pinhole大小，Gain值

及扫描速度、Frame Size、Average等参数。

在多维拍摄工具选择界面中勾选Tile Scan功能。软件会在Multidimensional Acquisition工具组下增加Tile Scan工具栏 (Fig. 55)。

选择感兴趣Track进行预览，并将视野移动至感兴趣区域的中心。打开Tile Scan工具栏，在Horizontal和Vertical输入框中分别输入在X和Y方向上计划拼接的视野数。

在Channels工具栏中选择所有需要扫描的track，点击多维拍摄工具选择界面中的Start Experiment按钮，开始实验。软件会自动以当前视野为中心，扫描以定义视野数为长和宽的区域。并自动合成成为一张图像。

4.4.5. 多视野扫描

多视野扫描可以自动对多个指定视野进行图像拍摄。完成此功能同样需要电动载物台的配合。

依前述方法，选择感兴趣的焦平面，设置各track的激光强度，Pinhole大小，Gain值及扫描速度、Frame Size、Average等参数。

在多维拍摄工具选择界面中勾选Positions功能，软件会在Multidimensional Acquisition工具组下增加Positions工具栏，可在此工具栏中设置多视野扫描的参数。Position工具栏提供两种扫描方式：Position List和Sample Carrier。Position List通常用于任意视野的设置；Sample Carrier 则专用于多孔培养板上的多视野扫描。

4.4.5.1. Position List 模式

在Position工具栏中选择Position List模式 (Fig. 56)。

通过预览图像寻找感兴趣的视野，调节好焦距后，点击Position列表下的Add按钮，读取当前视野的XYZ坐标，记入Position列表。重复上述操作，记录待扫描的全部视野。

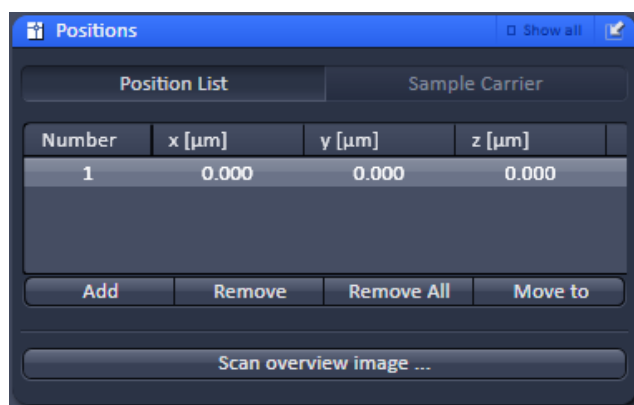


Fig 56 Position 工具栏 Position List 列表

在Channels工具栏中选择所有需要扫描的track，点击多维拍摄工具选择界面中的Start Experiment按钮，开始实验。软件会按照编号顺序逐一扫描Position List中的视野。

如果准备自Position列表中删除某一视野，可选中该视野成高亮状态，点击Remove按钮即可将其删除。点击Remove All按钮，可以删除列表中的全部视野。点击Move to按钮，载物台会自动移动至选中的视野，点击Snap操作按钮，即可单独扫描该视野图像。

4.4.5.2. Sample Carrier 模式

在 Position 工具栏中选择 Sample Carrier 模式，可以对多孔培养板中指定的视野进行扫描 (Fig. 57)。

点击 Properties 按钮，在输入框中输入多孔培养板的参数，包括行数 (Rows Number)，行间距 (Rows Distance)，列数 (Columns Number) 和列间距 (Columns Distance)。设好参数后，软件会自动生成培养板示意图。

使用 Sample Carrier 模式对多孔培养板进行多视野扫描，需要对载物台进行校准。移动载物台，将某一培养孔的中心移至视野正中。点击 Calibrate 按钮，在 Sample Carrier 界面中的孔板模式图上点击相应的孔，即完成校准。

点击培养板模式图中的某一个孔，该孔会显示为蓝色，载物台则自动移动至该孔的中心位置。点击 Snap 操作按钮，即可完成拍摄。

点击 Select 按钮，在培养板模式图上点击待扫描的孔，选中的孔显示为蓝色。软件将逐一记录选中的孔的位置。再次点击选中的孔，则在记录中删除此孔。点击 Select all 按钮，软件会自动选择所有培养孔；点击 Clear all 按钮，将清除所有选中的视野。

在 Channels 工具栏中选择所有需要扫描的 track，点击多维拍摄工具选择界面中的 Start Experiment 按钮，开始实验。软件会按照从左到右，从上到下的顺序逐一扫描选中的培养孔的中心位置。

多孔培养板的设置参数可以在软件中保存。点击 Properties 按钮右侧的  按钮，在弹出的对话框中输入名称，点击 OK 完成保存。点击  按钮，在下拉菜单中选择所需配置，即可调用保存好的设置。点击  按钮，可以在下拉菜单中删除选中的设置。

4.4.6. 多维图像相关的常用视图

多维图像不仅提供了二维荧光图像信息，还提供了其他空间或时间信息。为了更好地观察分析多维图像，ZEN 2011 在二维图像视图的基础上增加了一系列视图，用于

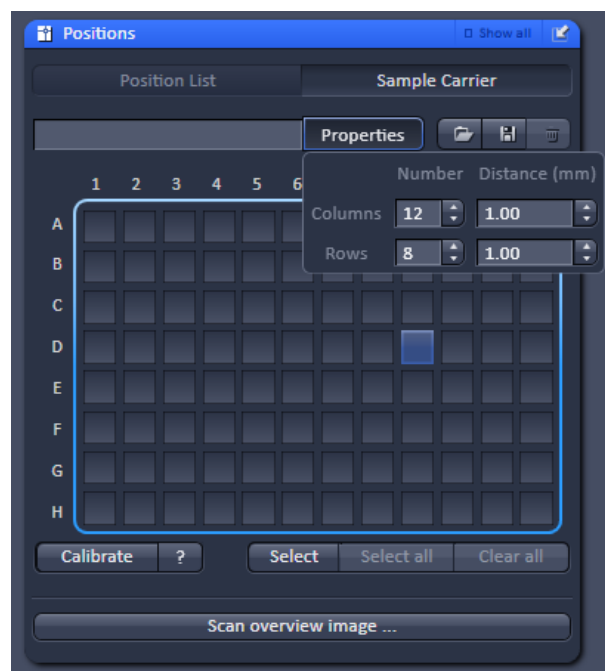


Fig 57 Position 工具栏 Sample Carrier



Fig 58 带有多维图像滚动条的 Dimension 视图控制界面

多维图像的处理与分析。软件在图像窗口的右下角设有**Show all**复选框。勾选此复选框，软件会在视图控制界面中显示全部工具和调节参数；否则，将只显示基本设置。

4.4.6.1. 2D 视图

由于在2D视图中每次只能显示一张二维图像，在显示多维图像时，在Dimension视图控制界面的最上方增加了滚动条 (Fig. 58)。用鼠标拖动滚动条就可以逐一观察多维图像中不同位置或不同时间点的图像。也可以在滚动条右侧的输入框中直接输入感兴趣的图像编号，软件将自动移动至指定的图像。点击输入框右侧的播放键，软件可以在2D视图中自动逐一展示所有位置或时间点的图像。再次点击播放键，即可停止播放。

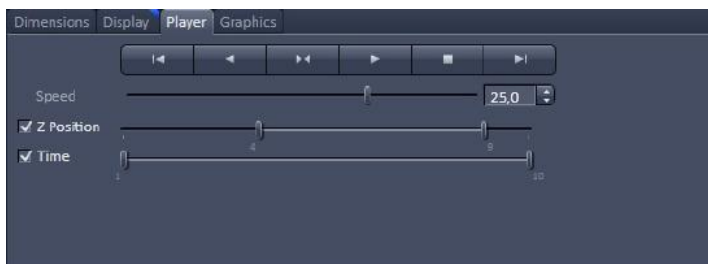


Fig 59 Player 视图控制界面

此外，对于Z-stack和时间序列图像，在2D视图下还特别增设了Player视图控制界面，用于逐帧播放多维图像 (Fig. 59)。在Player视图控制界面最上方的播放按钮中，ZEN 2011提供了前进、后退、停止、移动到第一张、移动到最后一张、和往复播放功能按钮。其中，往复播放是指由前向后播放至最后一张后，自动由后向前后退播放，如此往复，直至用户点击停止按钮。

用户可以拖动Speed滚动条设置播放速度，也可直接在滚动条右侧的输入框中输入数值。输入框中的数字越大，播放速度越快。

Speed滚动条下的滚动条可用于设置播放图片的起止位置。具体的图像编号显示在滚动条下方。

如果多维图像中同时包含Z-stack和时间序列，控制界面中会列出各自的起止位置滚动条供用户设置。用户可通过滚动条左侧的复选框，选择只播放Z-stack图像或只播放时间序列图像。如果同时勾选Z-stack和Time，软件会按照时间点的先后顺序，逐一播放Z-stack图像。

4.4.6.2. Gallery 视图

在Gallery视图中，可以同时显示多维图像中包含的所有图像，并在图像上加注信息 (Fig. 61)。

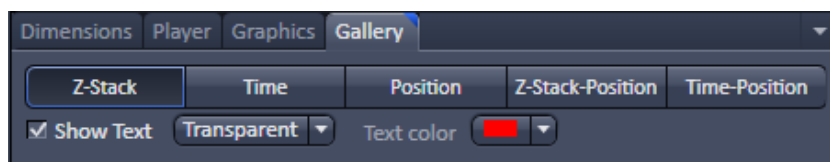


Fig 60 Gallery 视图控制界面

如果图像中同时包含Z-stack和时间序列等多种多维扫描方式，在Gallery视图下方

的Gallery视图控制界面中，ZEN 2011提供了显示设置按钮，可以选择与扫描方式名称对应的按钮，设置同时显示的图像内容 (Fig. 60)。如上图中所示，对于一个包含Z-stack，时间序列和多视野扫描的多维图像来讲，在Gallery视图控制界面中选择Z-stack按钮，Gallery视图中将显示某一时间点，某一视野所拍摄的一组Z-stack图像；而选择Z-stack-position按钮，Gallery视图中显示某一时间点，在所有视野上拍摄的全部Z-stack图像。

勾选Show text复选框，可以在Gallery视图中加注图像拍摄的维度信息，如时间点、Z轴位置等。在Show text下拉菜单中，可以编辑注释信息的显示方式。Underneath为在图像下显示注释信息；Transparent为在图像中显示注释信息。选择Transparent模式，软件还会自动弹出颜色下拉菜单，以编辑注释信息的字体颜色。

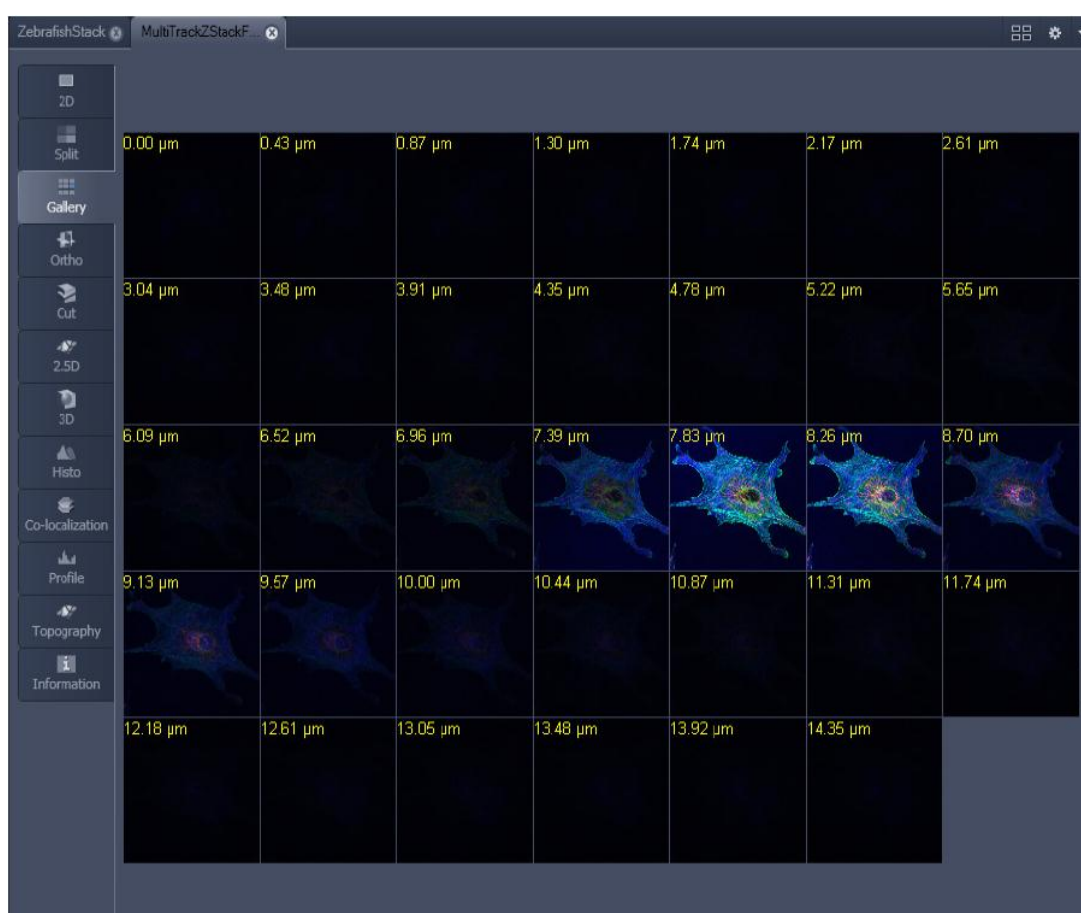


Fig 61 Gallery视图

4.4.6.3. Ortho 视图

Ortho视图是专门为Z-stack图像设置的视图之一 (Fig. 62)。在此视图中，Z-stack图像以三维正交方式显示。

图像窗口正中显示的是Z-stack图像中XY切面的图像，以蓝色边框标记；XY切面的上方为XZ切面的图像，以绿色边框标记；XY切面的右侧为YZ切面的图像，以红色边框标记。XY切面在XZ和YZ切面上的投影，以蓝色直线标记；XZ切面在XY和YZ切面上的投

影，以红色直线标记；而YZ切面在其他两个切面上的投影以绿色直线标记。

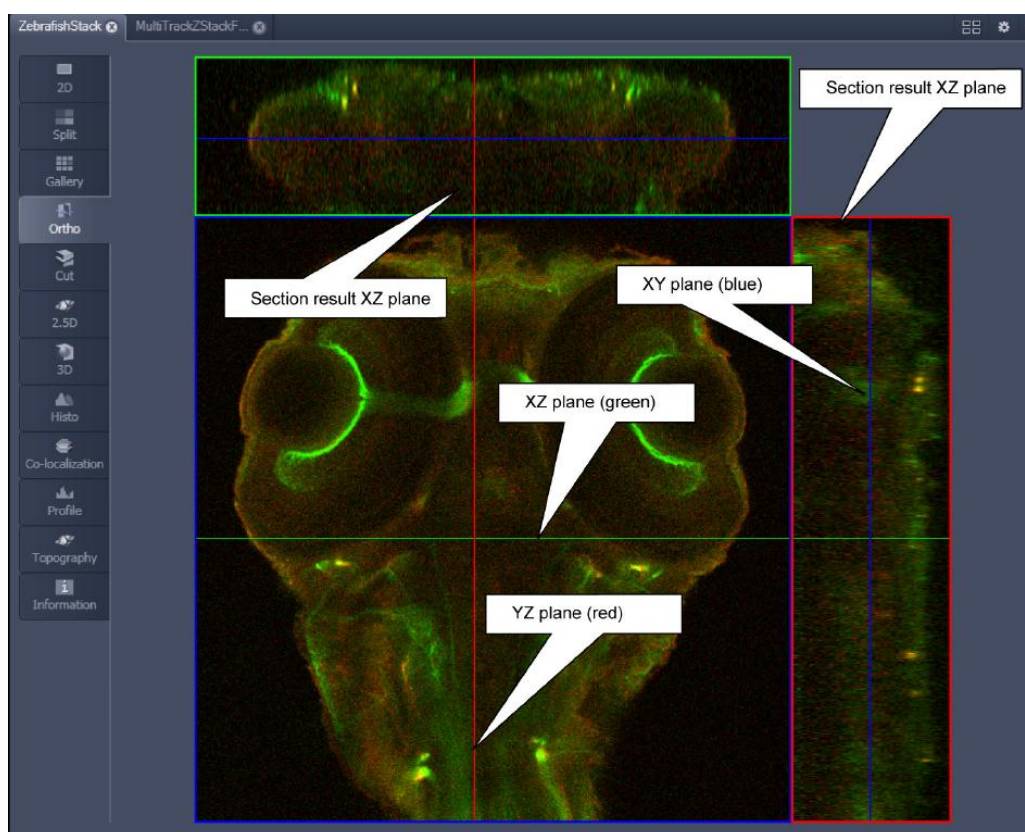


Fig 62 Ortho视图

在图像中移动某一切面的投影直线，则可观察该切面图像信息沿第三轴变化的情况。例如，移动XZ切面的绿色投影直线时，可以观察Y轴上不同XZ切面的图像信息。如用鼠标拖曳投影直线的交叉点，则可同时移动两个切面的位置，观察其变化。

切面位置的移动，还可以通过Ortho视图控制界面中的各轴向滚动条来完成 (Fig. 63)。拖动X position滚动条，即可观察YZ切面图像随X轴变化而发生的改变。也可在滚动条后的输入框中直接输入数字，来设定感兴趣的观察位置。或点击Mid按钮，将YZ切面置于X轴的中间位置。

在Ortho视图中，还提供了简单的三维测量工具。首先，勾选3D distance复选框，使用滚动条移动各切面的位置，在XY切面上显示出第一个点，并将XZ和YZ切面投影直线的交叉点移动到该位置；然后，点击Mark，软件读取第一个点的三维坐标数据，并将其定义为原点；最后，使用相同的方法，在XY切面上显示出另一个点，并将XZ和YZ切面投影直线的交叉点移动到该位置。此时，图像中会出现黄色线段，代表测量的距离，具体测量数据则自动出现在Mark按钮右侧。

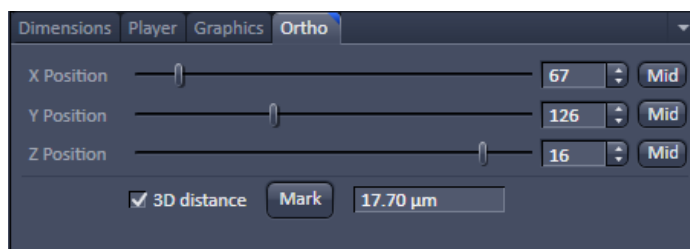


Fig 63 Ortho 视图控制界面

4.4.6.4. 3D 视图

3D视图是最常用于观察和分析Z-stack图像的视图 (Fig. 64)。其中提供了多种三维重构模式及相关设置参数，满足了用户深入分析Z-stack图像的要求。

3D视图在图像窗口设置了多个功能按钮来辅助图像观察。在图像窗口的左侧边框上，用鼠标拖动上方的滚动条，可调节三维图像显示的比例，向上拖动为放大图像，反之为缩小图像。点击按钮，选择旋转图像观察模式。点击按钮，光标会变为圆形。按下鼠标左键，并前后移动鼠标，可以放大或缩小图像。点击按钮，光标会变为手形，此时，可以用鼠标拖动图像来移动其显示位置。用鼠标拖动下方的滚动条，可以使图像绕X轴旋转，向上拖动为顺时针旋转，向下拖动为逆时针旋转。

在视图下方的边框上，也有两个滚动条。拖动左侧的滚动条，可以使图像绕Y轴旋转。而拖动右侧的滚动条，可以使图像绕中心水平旋转。二者均为向左拖为逆时针旋转，向右为顺时针旋转。点击按钮，软件会在3D图像周围显示白色边框。点击按钮，软件会用不同的颜色标记XYZ方向的图像边框。点击按钮，软件会显示带刻度的XYZ坐标。点击，图像会自动回复初始显示状态。点击后，用鼠标拖曳图像，图像会自动沿鼠标拖动的方向旋转。

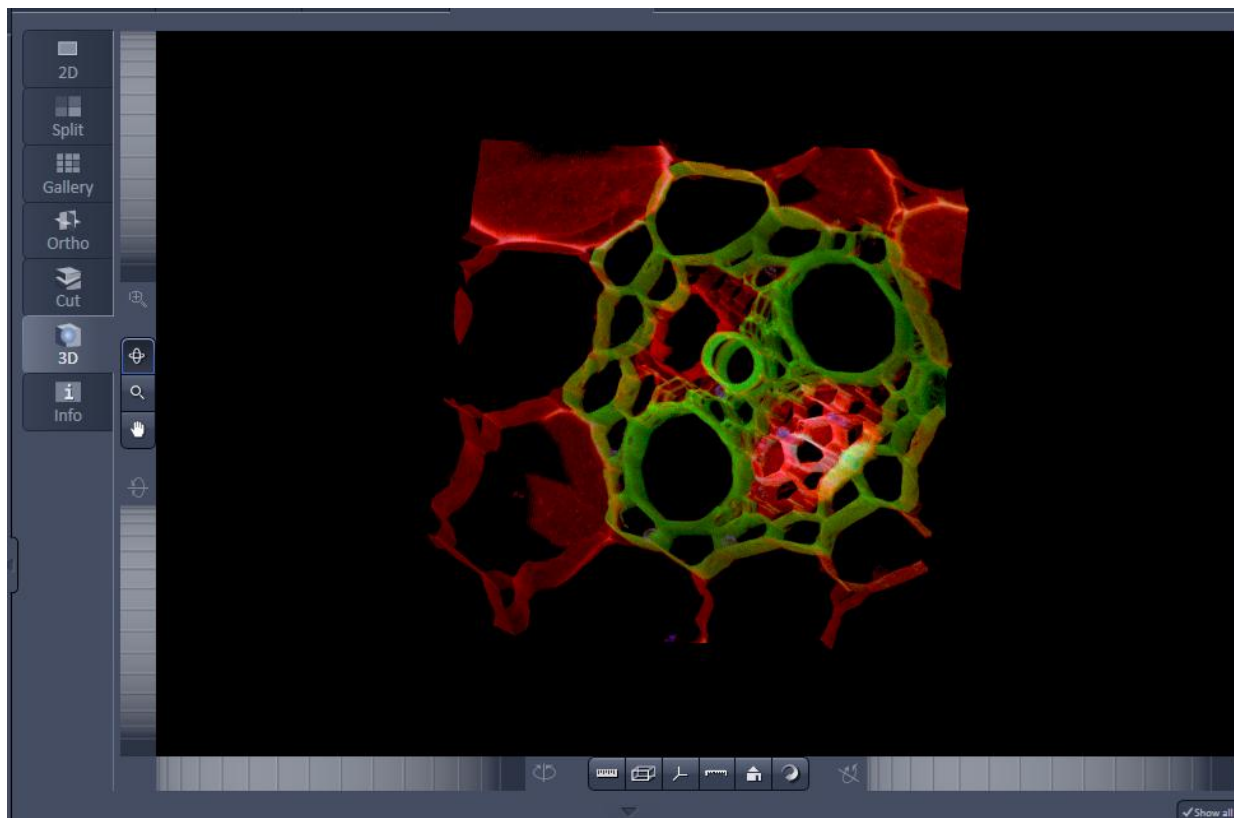


Fig 64 3D视图

与其他视图不同,3D视图下会增加多个视图控制界面,包括3D,Appearance和Series。3D视图控制界面中提供了三维重构模式的选择按钮。在确定三维重构模式后,Appearance视图控制界面中会出现相应的显示调节参数,而Series视图控制界面则提供了将旋转观察3D图像的过程输出为视频的设置。

3D视图控制界面

在3D视图控制界面中,ZEN 2011提供了四种不同的三维重构模式 (Fig. 66)。即Shadow, Transparency, Maximum和Surface。在三维重构模式按钮的下方,有precise滚动条,可以调节三维重构的精密程度。越靠近precise一侧,重构越细腻;反之,重构图像会变得粗糙。选择好感兴趣的重构模式,并使用图像窗口边框上的功能按钮将图像调节至感兴趣的观察角度,点击Create image按钮,软件将根据3D视图中显示的图像生成一张新的图像。

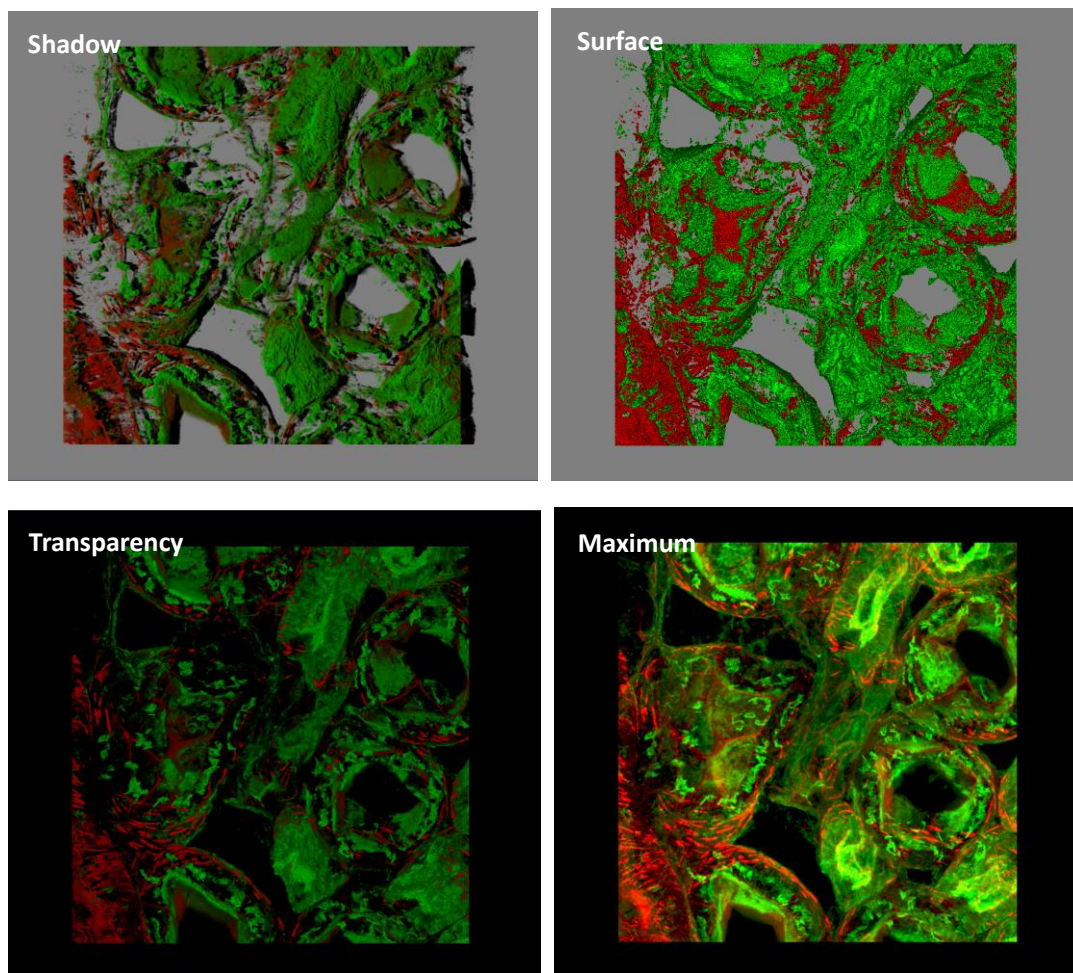


Fig 65 4种不同三维重建模式的比较。

Shadow模式是一种利用投影来衬托图像立体感的三维重构方式 (Fig. 65)。在这种模式下,软件虚拟光源从左前方照射到样本上,从而在3D图像中相应地增加阴影,以衬托图像的立体感。这是唯一一种不能旋转观察的三维重构模式,因而,图像窗口边框上的功能按钮将部分消失。

Surface模式下，软件会使用比较有颗粒感的渲染方法来重构样本的表面结构，使图像看起来更有质感，对样品的表面结构有较好的强调作用 (Fig. 65)。由于上述两种重构方式对样品的表面结构有较好的重现作用，常用于材料样品的三维重构。

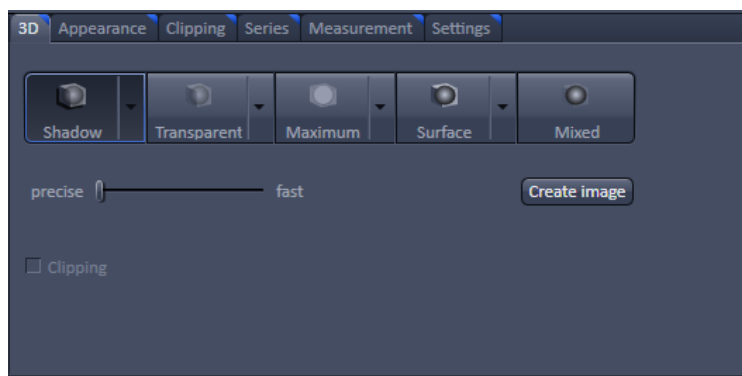


Fig 66 3D 视图控制界面

Transparency模式形成的3D图像具有一定的透明度，因而适用于分析样品的三维结构关系 (Fig. 65)。而Maximum模式则只显示投射轴向上最亮的像素点，因而这种模式下的3D图像有较好的对比度 (Fig. 65)。这两种方法常用于生物样品的三维重构。

Appearance视图控制界面

Appearance视图控制界面中，依据不同重构模式的特性，ZEN 2011提供了不同的调节参数 (Fig. 67)。常用的参数包括以下几种：

Transparency界面可以定义3D图像的灰度显示阈值等参数。其中，Threshold滚动条设置的是纳入三维重构图像的灰度下限，即灰度低于此阈值的影像信息在三维重构过程中会被认为是背景。如果图像信号较弱，则阈值应相应降低；反之，阈值可有所增加。Maximum滚动条定义了三维重构图像中颜色

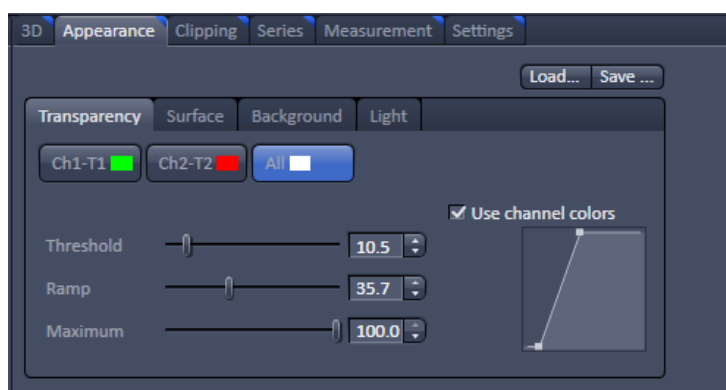


Fig 67 Appearance 控制界面

的透明度。而Ramp滚动条定义了重构图像中颜色从完全透明到完全不透明的变化速度。Ramp值越小，色彩过渡越快；反之，色彩过渡则会变得细腻。ZEN 2011将这三个参数综合显示为界面右下角的示意图。调节示意图中斜线左下起点的X轴位置，为调节Threshold数值；调节斜线的斜率为调节Ramp值；调节斜线右上起点的Y轴位置，为调节Maximum值。在Transparency界面的最上方，ZEN 2011设有荧光通道按钮，可根据通道名称选择某一荧光通道进行调节，也可以选择All按钮，调节所有通道的显示参数。

Background界面中，可以通过Background color下拉菜单选择3D图像背景的颜色。

Light界面中，可以通过Brightness滚动条，调节3D图像整体的亮度。

对于Shadow和Surface重构模式，软件在Appearance控制界面中专门提供了Surface界面，对重构图像的表面显示形式进行设置。对于Shadow模式，可以通过该界面中的Roughness滚动条设置图像表面的颗粒度。需要注意的是，在图像灰度过饱和时，这一设置可能使图像失真。对于Surface模式，则可以通过Ambient，Specular和Shininess滚动条来分别调节样品重构表面的亮度，对比度和光泽度。

点击Save按钮，可以保存Appearance界面中的设置。点击Load按钮，可以加载之前预存的设置。

Series视图控制界面

在确定了重构模式和显示参数后，可以在Series视图控制界面中，将旋转观察三维图像的过程转换为动画模式，以便更好地展示样品的三维结构。

在Series视图控制界面的Render series下拉菜单中，提供了三种旋转图像的方式，分别为绕X轴旋转(Turn around X)，绕Y轴旋转(Turn around Y)和自定义起止位置(Start and end)。在确定旋转模式后，在Total frames输入框中输入视频展示所需的帧数。也可以直接点击输入框右侧的数字按钮来迅速输入帧数。

当选择Turn around X或Y旋转模式时，软件默认为旋转重构图像180° (Fig. 68)。在Total frames输入框下方的Difference angle输入框中输入旋转图像的角度步进，在First angle输入框中输入旋转的起始角度。此时，视频展示的范围为以First angle角度为起点，以Different angle角度为步进，旋转Total frame次所覆盖的区域。如果点击Panorama按钮，软件将保持Total frames不变，自动在360°范围内平均分布各帧图像。

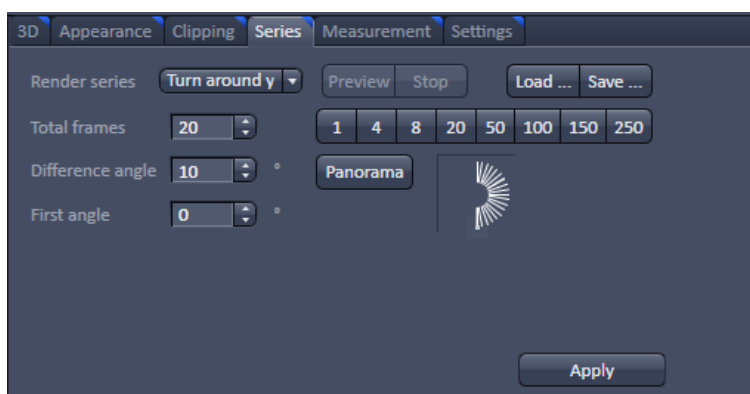


Fig 68 Series 控制界面

当选择Start and end模式时，软件会在Total frames下方显示定义起止位置的XYZ滚动条和定义图像显示比例的Distance滚动条 (Fig. 69)。在确认Total frames数值后，在Start界面中，调节XYZ和Distance滚动条使图像转动至感兴趣的起始位置；使用相同方法，在End界面中定

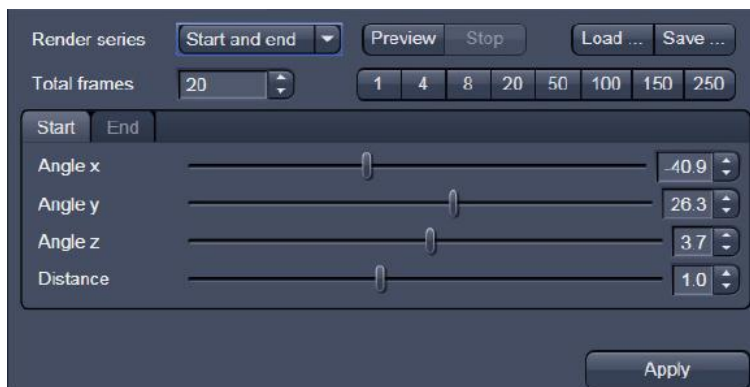


Fig 69 选择 Start and end 模式的 Series 控制界面

义结束位置即可。选择Start and end模式时，Preview按钮会自动激活。可以在设置好起止位置后，点击此按钮预览动画，以确认是否需要对其起止位置的设定做进一步的修改。在预览过程中，Stop按钮会激活，可点击此按钮停止视频预览。

点击Apply按钮，软件会生成一个带有render series后缀名的图像文件，包含了旋转3D图像的每一帧视频，将此文件输出为*.avi文件，即可用常规视频播放软件正常播放。

点击Save按钮，可以保存Series界面中的设置。点击Load按钮，可以加载之前预存的设置。

4.4.6.5. Mean ROI 视图

对于任一含有时间序列信息的多维图像，ZEN 2011会显示Mean ROI视图，用以分析感兴趣区域内的平均荧光灰度值或面积随时间变化的趋势 (Fig. 70)。在Mean ROI视图中，不仅会显示感兴趣区域中平均灰度值或面积随时间变化的曲线，还用表格列出了各时间点的平均灰度或面积数据。在表格上点击右键，选择Save Table选项，可以将表格中的数据保存为*.txt文件；也可以选择Copy table选项，将表格中的数据直接拷贝至Excel表格当中。

如果是光漂白实验，激光漂白样品的时间点也会在变化曲线的时间轴上以绿色标记标记出来。

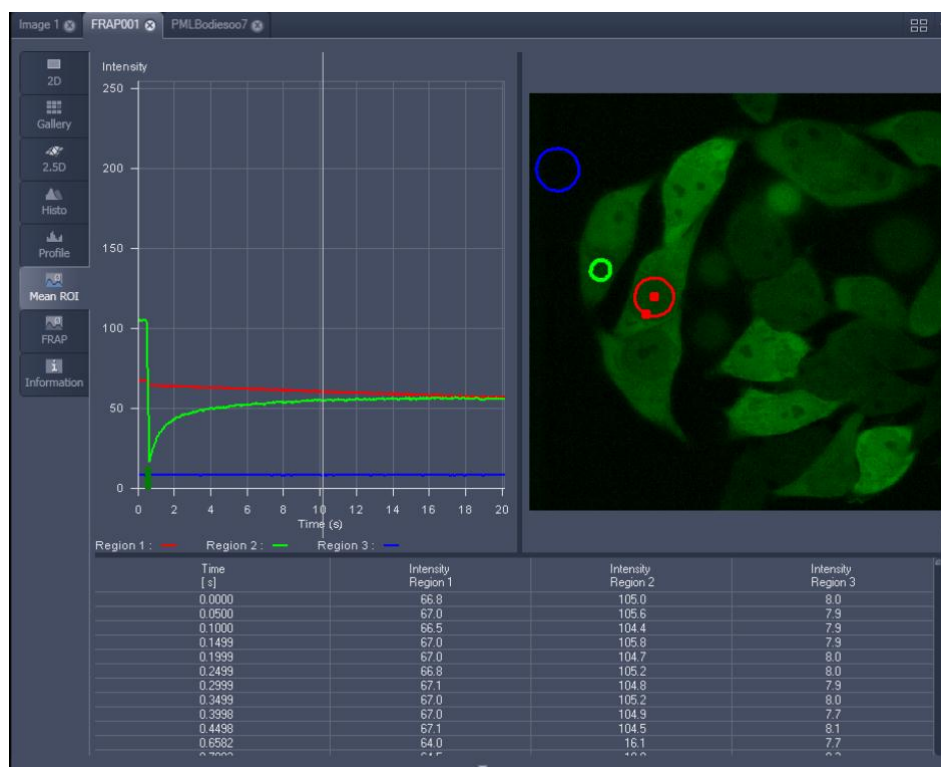


Fig 70 Mean ROI视图

用户可以在Mean ROI视图控制界面最上排的形状工具中，选择适当的形状，如矩

形，圆形，多边形等，在图像中选择感兴趣的区域 (Fig. 71)。此时，在Mean ROI视图中即可显示感兴趣区域的平均灰度或面积随时间变化的曲线和具体数据表格。

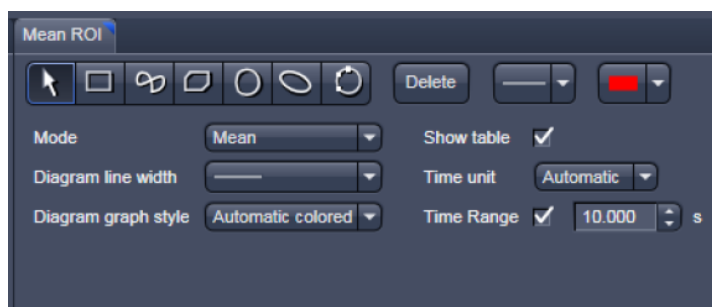


Fig 71 Mean ROI 视图控制界面

使用选择工具，可以改变感兴趣区域的位置和大小。使用选择工具点击感兴趣区域的边框，使其处于选中模式，可用鼠标拖曳其边框，在图像上移动感兴趣区域的位置；也可用鼠标拖曳感兴趣区域的拐点位置，改变其大小。点击选择工具右侧的Delete按钮，可以从图像中删除选中的感兴趣区域。在Delete按钮右侧的下拉菜单中，可以分别设定感兴趣区域边框的线条粗细和颜色。

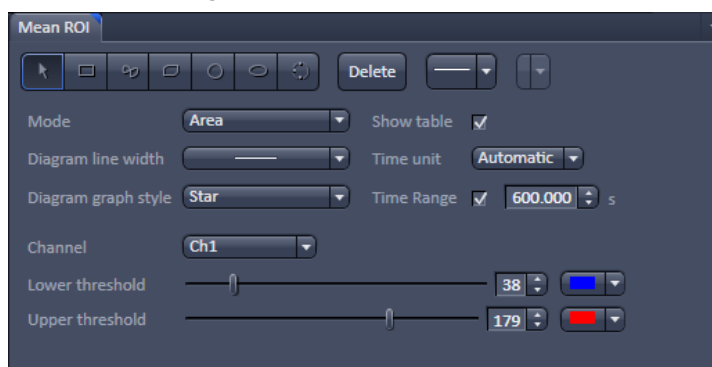


Fig 72 选择 Area 模式的 Mean ROI 视图控制界面

在Mode下拉菜单中选择Mean选项，在Mean ROI视图中显示灰度时间曲线。选择Area选项，则显示符合设定灰度阈值的感兴趣区域的面积随时间变化的曲线。表格中数据也相应变为面积变化数据。灰度阈值可使用Mean ROI视图控制界面下方的Lower和Upper滚动条设置 (Fig. 72)。

在Mode下拉菜单中选择Area选项，在Mean ROI视图控制界面下方会出现Channel下拉菜单，以及Lower和Upper滚动条。此时，感兴趣区域的设置方法与Histogram视图控制界面中设置阈值类似。首先，在Channel下拉菜单中选择感兴趣的荧光通道。然后，用鼠标拖动Lower滚动条定义灰度阈值下限，软件会自动在图像中将灰度值低于阈值的区域标为蓝色。再用鼠标拖动Upper滚动条定义灰度阈值上限，软件会自动在图像中将灰度值高于阈值的区域标为红色。灰度阈值设定好后，即可观察感兴趣区域（图像中未被伪彩覆盖的区域）的面积随时间的变化。

在Dimension视图控制界面中点击图像播放按钮，可以看到曲线上的指示直线随图像播放移动至不同的时间点，指示出当前时间点感兴趣区域的平均灰度或面积。

Mode下拉菜单下方的Diagram line width下拉菜单中可以编辑灰度时间曲线或面积时间曲线的粗细；Diagram graph style下拉菜单中可以选择曲线的显示模式，如彩色、黑白等。

勾选Show table复选框，Mean ROI视图中会出现感兴趣区域的平均灰度值或面积随

时间变化的表格；否则，只显示变化曲线。在**Show table**复选框下方，可以使用**Time unit**下拉菜单选择变化曲线中时间轴的单位；勾选**Time Range**复选框，可以在输入框中设定感兴趣的时间范围，即可缩短时间轴，突出显示感兴趣时间段内的平均灰度变化。

如果图像中同时存在多个感兴趣区域，**Mean ROI**视图中将逐一列出所有感兴趣区域的平均灰度值或面积变化情况。

4.5. 光谱拆分

如果不得不选用发射光谱比较接近的荧光物质，或样品的自发荧光光谱与选用的荧光物质有重叠，使用常规的**Channel**模式无法从根本上解决各通道间信号串扰的问题，因而可能出现假阳性结果。此时，可使用光谱拆分的方法，根据图像中各类荧光信号不同的发射波长谱线，将其从多通道荧光图像中拆分出来。

为了对荧光图像进行光谱拆分，需要在扫描过程中收集样本在不同可见光波长范围内发出的荧光强度信息，以获得样本发射光在可见光范围内的灰度分布曲线，即进行 λ stack扫描(**Fig. 73**)。之后软件才能根据相关设置完成光谱拆分。用户可以自定义发射光的收集范围和每张图片覆盖的发射光带宽。对于**34通道LSM710**或**LSM780**来讲，最多可以使用**34**个通道同时进行 λ stack扫描，波长收集范围覆盖了绝大部分可见光波长范围。

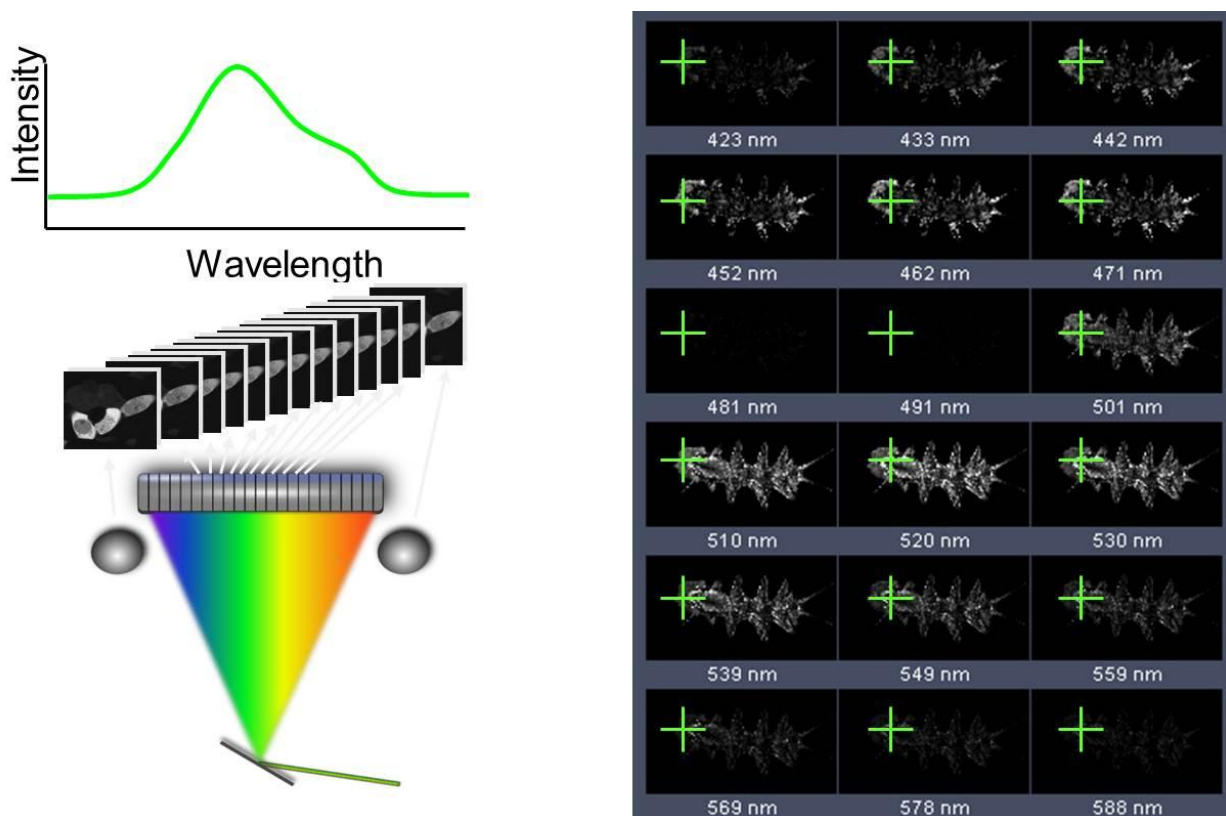


Fig. 73 λ stack扫描

4.5.1. λ stack 扫描

依前所述，通过目镜观察样本，找到感兴趣的视野，并以前述方法通过预览，确定样品焦平面。在Acquisition主页面的Light Path工具栏中选择Lambda mode模式进行光路设置 (Fig. 74)。

点击激光器控制按钮，在弹出的对话框中选择样品中各荧光物质的激发光，并使用相应滚动条调节激光强度。

点击主分光片控制按钮，选择适当的主分光片。可见激光和不可见激光的主分光片分别处于Visible light和Invisible light光路左侧不同的列表中。应选择名称中含有本次扫描使用的所有可见激光或不可见激光波长的主分光片。

在Lambda mode扫描模式中，软件默认使用位于中间的检测PMT收集信号。即对于LSM780和34通道的LSM710为ChS，对于2通道或3通道LSM710是Ch2。

调节发射光谱下方滚动条的长度，可以调节检测PMT接收的发射光波长范围，接收波长的具体范围在下方Range列表中列出。如果不确定样品的发射波长范围，可将滚动条尽量拉长，至Range列表中的数值不再变化，即达到最大检测范围。Resolution列表中，可以选择每张 λ stack图像所覆盖的发射光波长带宽。对于2通道或3通道LSM710来讲，软件默认带宽为10nm；对于LSM780和34通道的LSM710来讲，软件默认使用同时使用32通道检测PMT时所能达到的最小波长范围。如果选择小于这一数值的带宽，会得到更细腻的发射光谱曲线，但扫描时间将延长，而且，由于每张 λ stack图像仅覆盖极窄的发射光带宽，很难获得明亮的图像，影响拆分的准确性。反之，

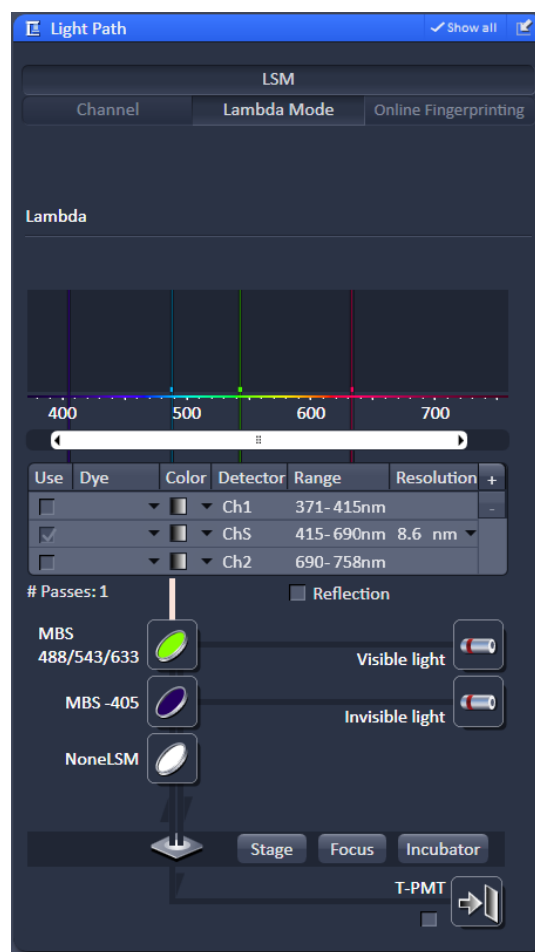


Fig 74. Lambda 扫描模式

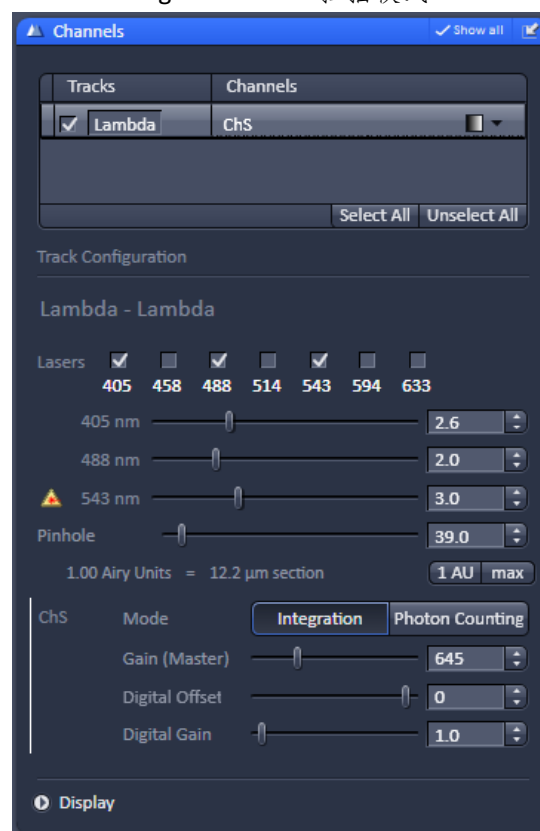


Fig 75 Lambda 模式下的 Channels 工具栏

发射光谱曲线会比较粗糙，但更容易获得明亮清晰的图像用于光谱拆分。

光路设置完成后，则可依前所述，在Acquisition Parameter工具组下的Channels工具栏和Acquisition Mode工具栏中完成扫描参数的设置 (Fig. 75)。由于光谱拆分是依据图像的灰度值完成的，所以达到饱和灰度值的像素点在分析中是没有意义的。因此，一定要根据Range Indicator设置适当的扫描参数，使图像中没有达到饱和灰度值的点。

扫描参数设置完成后，点击操作按钮中的Snap按钮，开始扫描图像。

使用*.czi格式保存扫描好的图像，用于光谱拆分。

4.5.2. 光谱拆分

打开 λ stack图像或任意多通道荧光图像时，在图像显示区域会出现Unmixing视图窗口(Fig. 76)。窗口中将显示图像，该图像完成光谱拆分后各荧光物质的发射光谱曲线及其在每张 λ stack图像上的实际灰度数值。如需保存灰度数据，可在表格上点击右键，选择Save Table选项，可以将表格中的数据保存为*.txt文件；也可以选择Copy table选项，将表格中的数据直接拷贝至Excel表格当中。

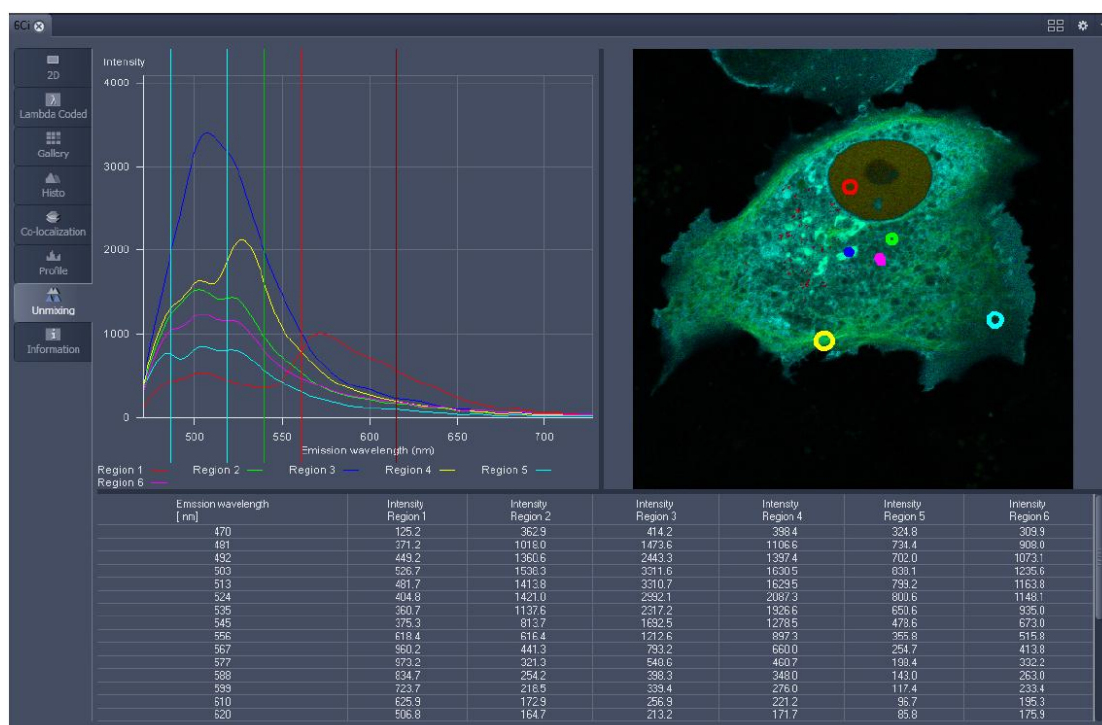


Fig 76 Unmixing视图

光谱拆分的参数设置位于Unmixing视图下方的Unmixing视图控制界面中 (Fig. 77)。软件提供了三种光谱拆分的方法：

4.5.2.1. 自动拆分

打开 λ stack图像或任意多通道荧光图像，在Unmixing视图下的Unmixing视图控制界面中点击Auto find/ACE按钮，在弹出的对话框中输入图像中所含的荧光物质数量，

点击OK按钮确认 (Fig. 78)。软件会在Unmixing视图中自动生成各荧光物质的光谱曲线及其在每张 λ stack图像上的实际灰度数值。在Unmixing视图控制界面的Dye列表中会出现代表各荧光物质的名称ACE_n，并根据波长自动赋予该荧光物质伪彩；在Color列表中点击黑色三角形按钮，可以在下拉菜单中自定义该荧光物质的颜色。点击Linear Unmixing按钮即可完成拆分。软件会根据拆分结果生成新的荧光图像。在新的图像中，软件会根据Unmixing视图控制界面Color列表中的设置，为各种荧光物质加上伪彩。

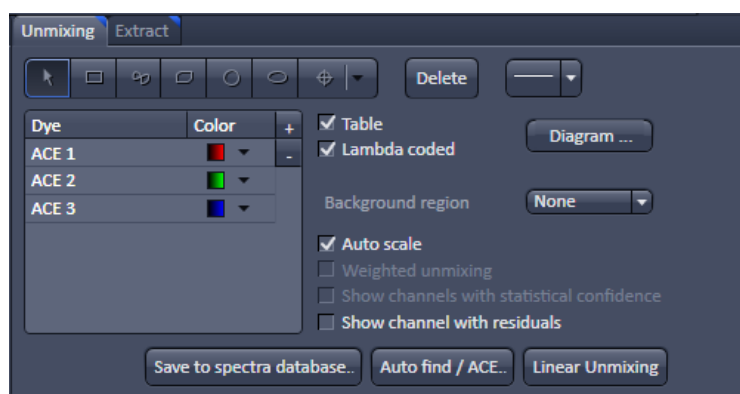


Fig 77 Unmixing 控制界面

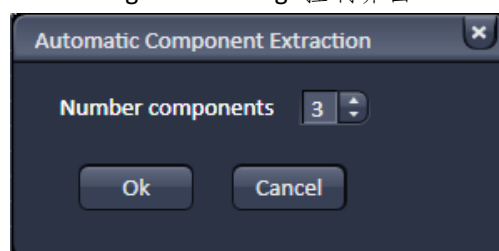


Fig 78 自动拆分对话框

点击Save to spectra database按钮，打开保存光谱曲线对话框，可以将从图像中拆分出的发射光谱曲线逐一保存在光谱数据库中 (Fig. 79)。首先，在对话框左侧的列表中选择某一待保存的荧光物质发射谱线。然后，在对话框中间的保存路径栏中指定保存文件夹。点击路径栏下方的New folder按钮，新建文件夹，在新建文件夹右侧的输入框中自定义文件夹名称。最后，在对话框右侧信息列表的Name输入框中自定义待保存荧光物质发射谱线的名称，在Comments输入框中输入补充信息，点击对话框右下角的Save按钮即完成保存。点击New folder按钮旁边的Rename，Delete，Cut，Copy和Paste按钮，可分别对文件夹及其中保存的光谱曲线完成重命名，删除，剪切，复制和粘贴操作。保存各荧光物质发射谱线后，点击Close按钮关闭对话框。保存的光谱曲线可以作为参考谱线，用于拆分含有相同荧光物质的其他图像，或完成在线光谱拆分。

在没有准备只含有单色荧光物质的对照样品时，可以使用自动拆分。但如果各荧光物质的发射光谱有比较大的重叠，软件在自动拆分时很难识别各荧光物质发射谱线之间的差异，因而可能会导致拆分错误。

4.5.2.2. 手动拆分

如果每种荧光物质在图像中都有肉眼可以识别的单独表达的区域，可以使用手动拆分。

打开 λ stack图像或任意多通道荧光图像，在Unmixing视图下选择Unmixing视图控制界面中的选择工具，点击图像中某一荧光物质单独表达的区域，图像中会出现彩

色十字线以标记选定的位置。在Unmixing视图控制界面的Dye列表中会出现代表此荧光物质的Region 1，并自动赋予该荧光物质伪彩；可以在Color列表中点击黑色三角形按钮，在下拉菜单中自定义该荧光物质的颜色。在Unmixing视图中，也会出现该区域所含荧光物质的发射谱线和相应的灰度值。可在图像中移动十字线，选择发射谱线峰形最明显的区域。

再次点击选择工具，选择另一荧光物质单独表达的区域。重复此操作，直至选择出图像中各种荧光物质的发射谱线。点击Linear Unmixing按钮即可完成拆分。软件会根据拆分结果生成新的荧光图像。在新的图像中，软件会根据Unmixing视图控制界面Color列表中的设置，为各种荧光物质加上伪彩。

点击Save to spectra database 按钮，打开保存光谱曲线对话框，同样可以将从原始图像中拆分出的发射光谱曲线逐一保存在光谱数据库中，作为参考谱线，用于拆分含有相同荧光物质的其他图像，或完成在线光谱拆分 (Fig. 79)。

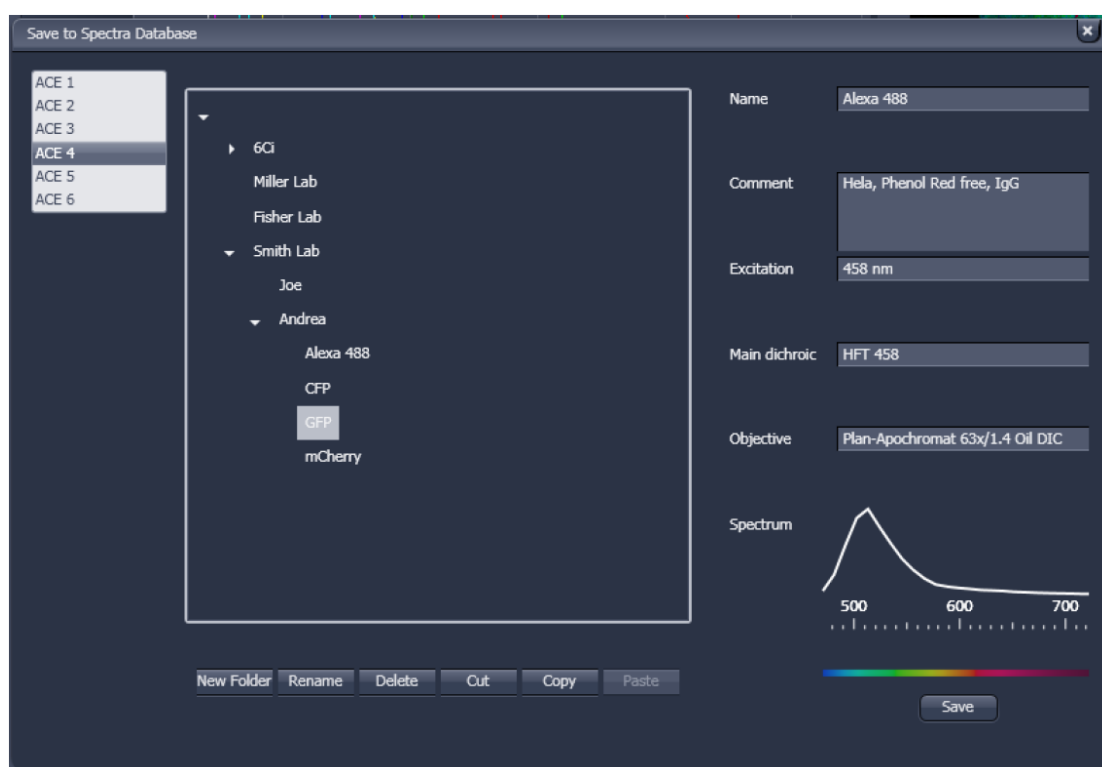


Fig 79 保存光谱曲线对话框

4.5.2.3. 使用参考发射谱线进行拆分

如果事先存有相关荧光物质的参考谱线，可根据参考谱线对 λ stack图像或多通道荧光图像进行光谱拆分。与前两种方法相比，这种方法获得的拆分结果更为准确。

打开 λ stack图像或任意多通道荧光图像，在Unmixing视图下Unmixing视图控制界面的Dye列表中，点击列表右上角的“+”按钮，在列表中加入新的荧光物质。点击新增行Dye列表下的黑色三角形按钮，在下拉菜单中选择参考谱线。可以在Color列表中

点击黑色三角形按钮，在下拉菜单中自定义该荧光物质的颜色。此时，Unmixing视图中会出现该荧光物质的发射谱线及其在每张 λ stack图像中的灰度值。重复上述操作，直至将图像中所含有的全部荧光物质发射谱线均载入到Dye列表中。点击Linear Unmixing按钮即可完成拆分。软件会根据拆分结果生成新的荧光图像。在新的图像中，软件会根据Unmixing视图控制界面Color列表中的设置，为各种荧光物质加上伪彩 (Fig. 80)。

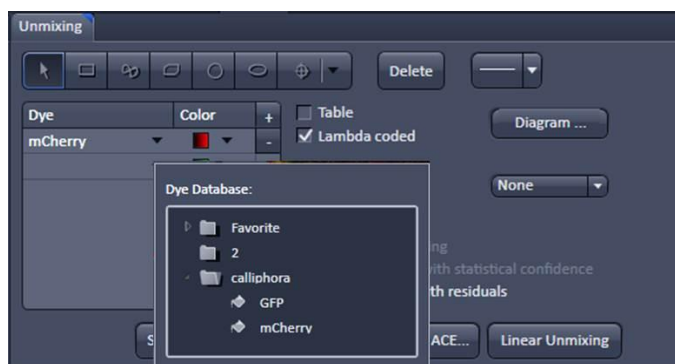


Fig. 80 使用参考谱线进行光谱拆分

最好使用只含有单色荧光物质的对照样品，通过自动拆分的方法，提取参考发射谱线，以保证发射谱线的准确性。在样品制备过程中，需注意对照样品和实际样品处理条件的一致性，以保证获取准确的拆分结果。

4.5.2.4. Unmixing 视图控制界面中的其他设置

- Delete按钮：可删除图像中选中的区域。
- Table复选框：勾选后，可用列表显示各荧光物质在每张 λ stack图像中的灰度值。
- Lambda Coded复选框：勾选后，会以彩色模式显示图像。
- Diagram下拉菜单：可以在其中编辑发射光谱曲线的线条，颜色，平滑度等。
- Background Region下拉菜单：可在下拉菜单中选择某一指定区域为背景，在完成光谱拆分时，该区域代表的荧光信号将在新图像中作为背景出现，变为黑色。
- Auto Scale复选框：勾选后，在完成光谱拆分时，软件会自动在新图像中将各通道荧光的强度调节至基本一致的水平。所以，如果需要在光谱拆分后测量荧光灰度值，就不能勾选此选项。
- Display Channel with Residual复选框：勾选后，在完成光谱拆分时，软件会自动在新图像中增加一个通道，将原始图像中无法根据参考谱线拆分的信号归入这一通道。因此，这一通道的信号越明亮，就代表着无法拆分的信号越多，光谱拆分的准确性越低；此时，应改变光谱拆分的策略，选择其他预存的参考谱线，或在图像中选择其他区域提取参考发射谱线进行拆分。反之，这一通道的信号越暗，代表光谱拆分的准确性越高，光谱拆分获得的多通道荧光图像越可靠。

4.5.3. 在线光谱拆分

在线光谱拆分是一种在光谱扫描光路设置中引入荧光物质参考发射谱线，从而直接

获得光谱拆分图像的扫描方式。

完成在线光谱拆分，首先需要使用前述方法，通过扫描只含有单色荧光物质的对照样品，获得准确的荧光物质参考发射谱线，并保存在数据库中。

之后，通过目镜观察待检测样本，找到感兴趣的视野。并通过预览，确定焦平面。在Light Path工具栏中选择Online Figureprinting模式进行光路设置 (Fig. 81)。

点击激光器控制按钮，在弹出的对话框中选择样品中各荧光物质的激发光，并使用相应滚动条调节激光强度。

点击主分光片控制按钮，选择适当的主分光片。可见光和不可见光的激光器与主分光片分别位于Visible light和Invisible light光路中。请注意选择使用。

与在Lambda mode模式中一样，此处软件默认使用位于中间的检测PMT收集信号。即对于LSM780和34通道的LSM710为ChS，对于2通道或3通道LSM710是Ch2。

点击Detector列表右上角的“+”按钮，在列表中添加新的Detector，直至与样品中所含的荧光物质数量相当。注意，最多不能超过8种荧光物质。

点击Dye列表中的黑色三角按钮，在下拉菜单中选择预存的荧光物质参考发射谱线。之后，点击Color列表中的黑色三角按钮，为该荧光物质添加伪彩。

调节发射光谱下方滚动条的长度，以调节检测PMT接收的发射光波长范围。在Resolution列表中，可以选择每张 λ stack图像所覆盖的发射光带宽。对于2通道或3通道LSM710来讲，软件默认带宽为10nm；对于LSM780和34通道的LSM710来讲，软件默认使用同时使用32通道检测PMT时所能达到的最小波长范围。

光路设置完成后，则可依前所述，在Acquisition Parameter工具组下的Channels工具



Fig 81 Light Path 工具栏 Online Figureprinting 模式

栏和Acquisition Mode工具栏中完成扫描参数的设置。注意，一定要根据Range Indicator设置适当的扫描参数，使图像中没有达到饱和灰度值的点。

扫描参数设置完成后，点击操作按钮中的Snap按钮，开始扫描图像。图像扫描结束后，软件会根据参考发射谱线自动完成光谱拆分，生成多通道荧光图像，替代原始的 λ stack图像。

4.6. 常用图像处理工具

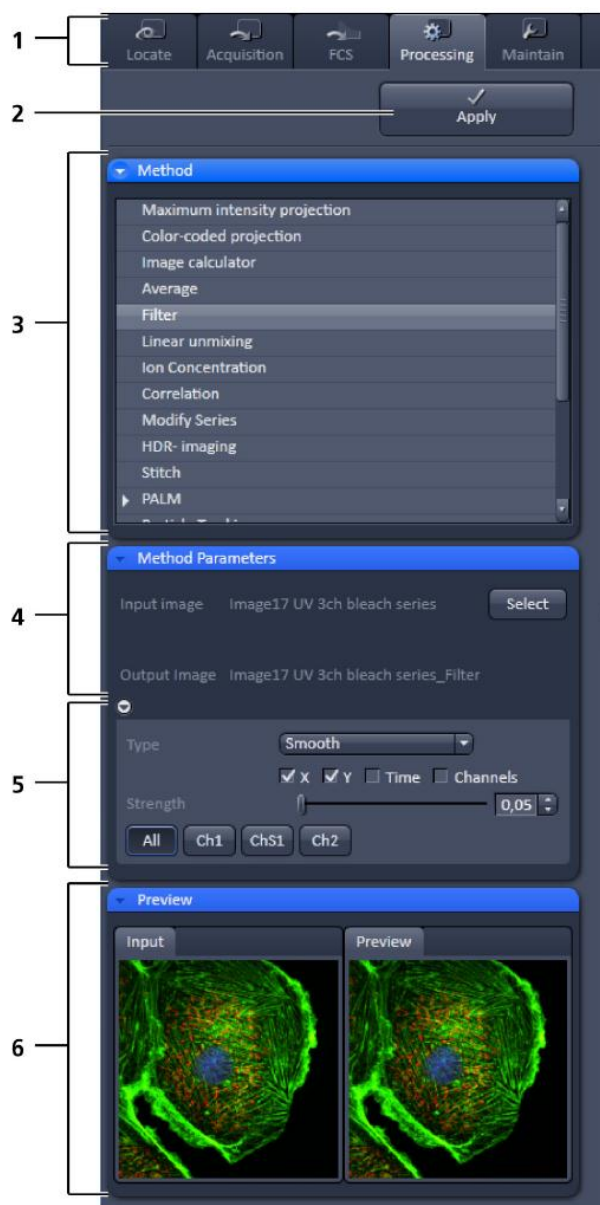
ZEN 2011在Processing主页面中提供了一些图像处理工具，可以对图像进行简单的后期处理 (Fig. 82)。与Locate和Acquisition主页面不同，此主页面在ZEN 2011 Lite中也可以使用。

下面将简单介绍Processing主页面所提供的图像处理工具中比较常用的几种。

4.6.1. 最大灰度投影

如果需要将Z-stack图像或时间序列图像中的所有信息整合到一张图像当中，可以使用最大灰度投影。此功能也可用于把不同通道的荧光信号整合到一个通道当中 (Fig. 83)。

- 打开需要完成最大灰度投影处理的图像。
- 在Processing主页面的图像处理工具列表中选择 Maximum intensity projection功能。
- 在图像选择界面中点击Select按钮，导入当前图像窗口中打开的图像，其文件名自动出现在Input image右侧。



- | | | | |
|---|------------|---|--------|
| 1 | 工具页面 | 2 | 应用按钮 |
| 3 | 图像处理工具列表 | 4 | 图像选择界面 |
| 5 | 图像处理参数设置界面 | 6 | 预览窗口 |

Fig 82 Processing 主页面

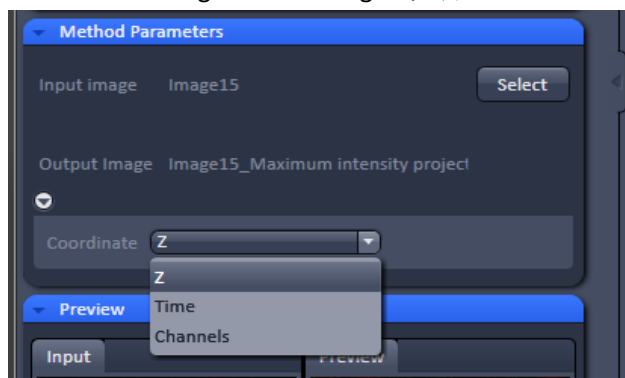


Fig 83 最大灰度投影参数设置

- 点击**Output image**下方的三角形按钮，打开图像处理参数设置界面，在**Coordinate**下拉菜单中选择需要投影的维度。如选择**Z**选项，软件将自动比较**Z**轴方向上具有相同**XY**坐标的所有像素点，选择其中最亮的一个像素点，根据其**XY**坐标投影到新图像的相应位置上。如此反复，直至完成整幅图像的投影。选定投影的维度后，软件会在预览窗口中生成预览图像，供用户参考。
- 点击**Apply**按钮，软件会完成灰度投影，并根据投影结果，生成一张新的图像。

需要注意的是，导入的图像不同，**Coordinate**下拉菜单中的选项也会有所差异。例如，如果导入一张二维多通道荧光图像，**Coordinate**下拉菜单中只显示**Channels**选项。

4.6.2. 彩色编码投影

彩色编码投影在最大灰度投影的基础上，增加了用不同的颜色代表指定维度上不同信息的功能。例如，可以用冷色调代表**Z**轴上处于较深位置的图像，而用暖色调代表**Z**轴上处于较浅位置的图像 (Fig. 84)。

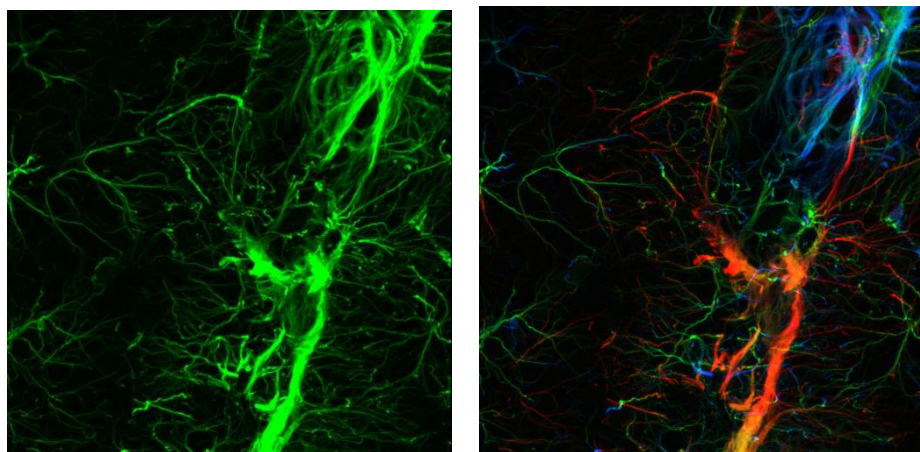


Fig 84 最大灰度投影与彩色编码投影，左图为最大灰度投影所得图像，右图为用彩色编码 **Z** 轴信息后所得彩色编码投影图像。

- 打开需要完成彩色编码投影处理的图像。
- 在 **Processing** 主页面的图像处理工具列表中选择 **Color Coded Projection** 功能。
- 在图像选择界面中点击 **Select** 按钮，导入当前图像窗口中打开的图像，其文件名自动出现在 **Input image** 右侧 (Fig. 85)。
- 点击 **Output image** 下方的三角形按钮，打开图像处理参数设置界

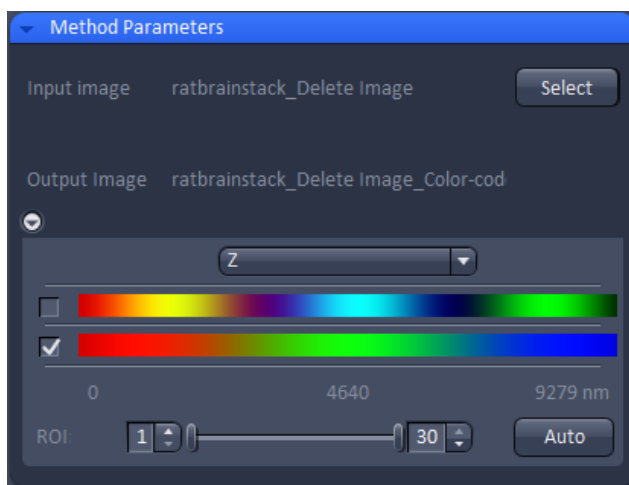


Fig 85 彩色编码投影参数设置

面，在下拉菜单中选择需要投影的维度。如**Z**选项，软件将自动比较**Z**轴方向上具有相同**XY**坐标的所有像素点，选择其中最亮的一个像素点，根据其**XY**坐标投影到新图像的相应位置上。如此反复，直至完成整幅图像的投影。

- 在下拉菜单下方的复选框中勾选不同的彩色编码模式，用不同的颜色代表不同的维度信息。如果下拉菜单中选择了**Z**选项，那么，在生成的图像中，不同的颜色将代表不同的**Z**轴深度信息；如果选择**Time**，则代表了不同的时间点信息。
- 拖动彩色编码模式下方的**ROI**滚动条，选择投影的维度范围，即可以指定原始图像中的某一些连续图片进行投影。也可以在输入框中直接输入感兴趣图片的编码，作为投影范围的起止位置。如点击**Auto**按钮，软件将默认选择全部图片用于彩色编码投影。
- 选定投影的参数后，软件会在预览窗口中生成预览图像，供用户参考。
- 点击**Apply**按钮，软件会完成投影，并根据投影结果，生成一张新的图像。

需要注意的是，导入的图像不同，下拉菜单中的选项也会有所差异。而且，与最大灰度投影不同，彩色编码投影不能处理二维多通道荧光图像。

4.6.3. 滤镜功能

与Photoshop等图像处理软件类似，ZEN 2011也提供了以下一系列滤镜功能，用于后期图像处理：

中值滤镜 (Median)	在指定区域内，以相邻像素点的中间灰度值替换中央像素点的灰度值，从而起到降低图像噪音的作用。
平滑 (Smooth)	以相邻像素点的加权平均灰度值替换中央像素点的灰度值，从而起到弱化边缘，降低图像噪音的作用。
锐化 (Sharpen)	在平滑的基础上进行逆运算，可以使图像的边缘以及细节变得清晰。
带宽滤镜 (Band)	按照指定位置和宽度，滤掉固定频率的噪音信号。多用于去除图像中的周期性扰动。
渐变滤镜 (Gradient)	用灰度强弱的渐变来强调图像的边缘信息。

具体操作步骤如下：

- 打开需要处理的图像。
- 在Processing主页面的图像处理工具列表中选择**Filter**功能。
- 在图像选择界面中点击**Select**按钮，导入当前图像窗口中打开的图像，其文件名自

动出现在Input image右侧 (Fig. 86)。

- 点击Output image下方的三角形按钮，打开图像处理参数设置界面，在Type下拉菜单中选择适当的滤镜功能，选择待处理的通道，并完成相关设置。
- 点击Apply按钮，软件会完成滤镜处理，并将结果生成一张新的图像。

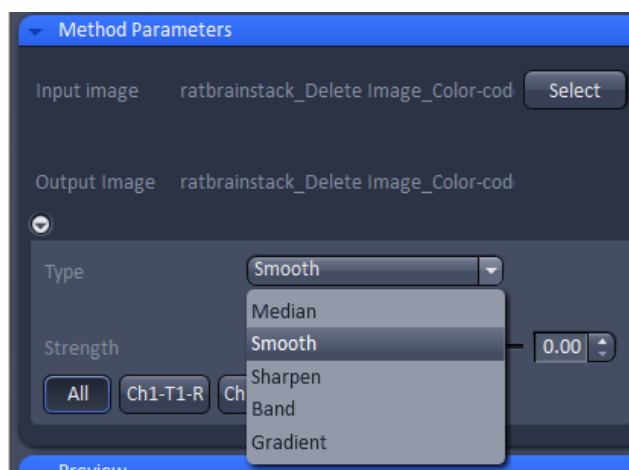


Fig 86 Filter Type 下拉菜单选项

4.6.4. 图像修正

ZEN 2011提供了以下功能，用以修正图片中的维度等信息：

图像维度转换 (Convert dimension)	转换图像维度，例如，将Z-stack图像转换为时间序列图像。
联结图像 (Concatenate image)	把两个时间序列图像文件连接成一个时间序列图像文件。
旋转图像 (Rotate image)	按照指定方向和角度旋转图像。
生成镜像图像 (Mirror image)	按照指定轴向生成镜像图像。
反转图像 (Reverse Z stack/ time)	反转Z-stack图像或时间序列图像。在新生成的图像中，原始图像中的图片将按照逆序排列。
修改图像步进 (Modify Z/time step)	根据需要，修改原始图像中Z-stack图片各层之间的距离或时间序列图像各张之间的时间间隔信息。
转化为光谱扫描图片 (Convert to lambda)	将Z-stack图像或时间序列图像转变为光谱扫描图片，可定义光谱图像覆盖的发射光范围和每张图片代表的发射光带宽。
修改拍摄时间 (Modify acquisition date)	修改原始图像的拍摄时间。
修改通道名称 (Modify channel names)	修改原始图像的通道名称。

具体操作步骤如下：

- 打开需要处理的图像。
- 在Processing主页面的图像处理工具列表中选择Modify Series功能。
- 在图像选择界面中点击Select按钮，导入当前图像窗口中打开的图像，其文件名自动出现在Input image右侧 (Fig. 87)。

- 点击Output image下方的三角形按钮，打开图像处理参数设置界面，在Modify Mode下拉菜单中选择适当的图像处理模式，并完成相关设置。
- 点击Apply按钮，软件会完成滤镜处理，并将结果生成一张新的图像。
- 注意，导入包含不同维度信息的图片，Modify Mode下拉菜单中出现的选项会略有不同。

4.6.5. 图像复制

在图像处理工具列表中点击Copy功能左侧的三角形箭头，打开下拉菜单，可见ZEN 2011提供了四种图像复制工具。

4.6.5.1. 通道复制

如果需要将某张图像中的某一通道，添加到另一张图像中，可以选用通道复制功能。

例如，如果要将图像A中的Ch1添加到图像B中，则需要按照以下步骤操作 (Fig. 88)。

- 在Processing主页面图像处理工具列表中选择Copy下拉菜单中的Copy Channel功能。
- 打开图像A。在图像选择界面中，点击Input image右侧的Select按钮，在其下方的Channel下拉菜单中，选择Ch1通道。
- 打开图像B。在图像选择界面中，点击Output image右侧的Select按钮，在其下方的Channel下拉菜单中，选择New Channel。注意New Channel后缀的图像动态范围，应与图像A的图像动态范围一致。

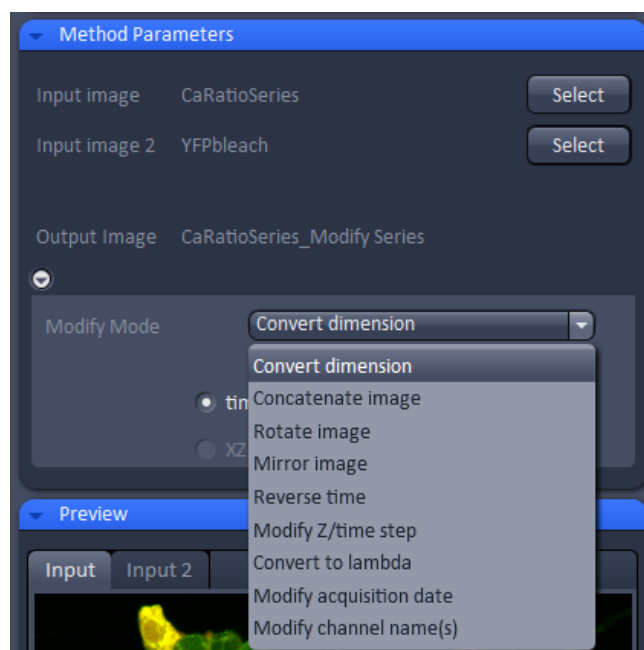


Fig 87 Modify Series 下拉菜单选项

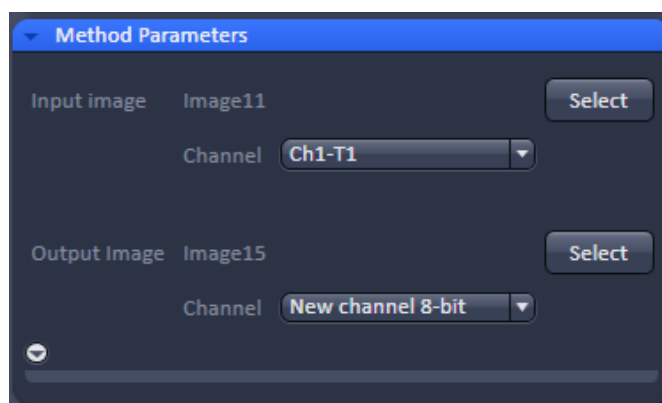


Fig 88 Copy Channel – Copy Channel 界面

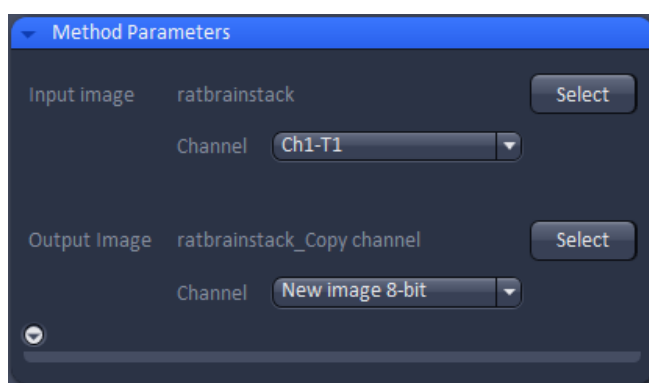


Fig 89 Copy Channel – Copy image 界面

- 点击Apply按钮，图像A中的Ch1即添加到图像B当中。
也可以用此功能，将多通道图像中的某一通道图像提取出来 (Fig. 89)。
- 在Processing主页面图像处理工具列表中选择Copy下拉菜单中的Copy Channel功能。
- 打开图像A。在图像选择界面中，点击Input image右侧的Select按钮，在其下方的Channel下拉菜单中，选择感兴趣的Ch1通道。
- 点击Output image右侧的Select按钮，在其下方的Channel下拉菜单中，选择New image。
- 点击Apply按钮，即可提取图像A中的Ch1成为一张新的图像。

4.6.5.2. 图像备份

使用图像备份功能，可以备份选中的图像 (Fig. 90)。

- 打开需要备份的图像。
- 在Processing主页面图像处理工具列表中选择Copy下拉菜单中的Duplication功能。
- 在图像选择界面中点击Select按钮，导入当前图像窗口中打开的图像，其文件名自动出现在Input image右侧。
- 点击Apply按钮，ZEN 2011即可备份选定的图像。

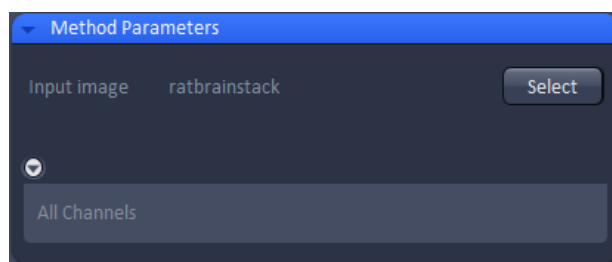


Fig 90 Duplication 图像选择界面

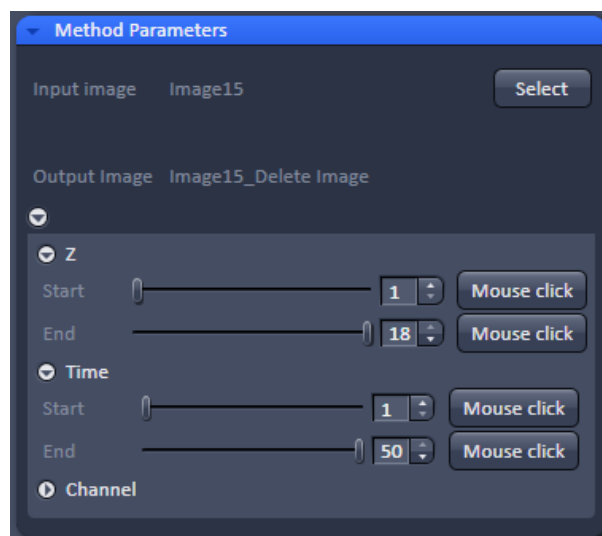


Fig 91 Delete image 图像选择及参数设置界面

4.6.5.3. 删除图片

如果需要删除多维图像中的某些图片，可以使用删除图片功能。此功能也可以删除多通道荧光图像中某些通道 (Fig. 91)。

- 打开指定图像。
- 在Processing主页面的图像处理工具列表中选择Copy下拉菜单中的Delete image功能。
- 在图像选择界面中点击Select按钮，导入当前图像窗口中打开的图像，其文件名自动出现在Input image右侧。

- 点击**Output image**下方的三角形按钮，打开图像处理参数设置界面。选择含有待删除图片的维度，如**Z**，**Time**或**Channel**。
- 点击指定维度左侧的三角形按钮，打开具体参数列表。通过**Start**和**End**滚动条设置删除范围的起止位置。也可以使用**Gallery**视图，点击**Start**滚动条右侧的**Mouse click**按钮，在**Gallery**视图中点击删除范围的起始图片；再点击**End**滚动条右侧的**Mouse Click**按钮，在**Gallery**视图中点击删除范围的结束图片。软件将自动读取点击图片的编号，作为删除范围的起止位置。
- 点击**Apply**按钮，软件会将剩余的图像保存在一张新图像当中。

需要注意的是，导入的图像不同，参数设置界面中显示的维度也会有所差异。

4.6.5.4. 选取图片

与删除图片功能相反，选取图片功能可以将多维图像中的某些图片选取出来，形成一个新的图像文件。此功能也可以用于提取多通道荧光图像中某些通道，或二维图像中的某一部分 (Fig. 92)。

- 打开指定图像。
- 在**Processing**主页面的图像处理工具列表中选择**Copy**下拉菜单中的**Subset**功能。
- 在图像选择界面中点击**Select**按钮，导入当前图像窗口中打开的图像，其文件名自动出现在**Input image**右侧。
- 点击**Output image**下方的三角形按钮，打开图像处理参数设置界面。选择需要选取的维度，如**X**，**Y**，**Z**，**Time**或**Channel**。
- 点击指定维度左侧的三角形按钮，打开具体参数列表。通过**Start**和**End**滚动条设置选取图片范围的起止位置。通过**Step**滚动条设置选取图片的步进。例如，**Step**为**1**时，软件将在指定起止范围内选取连续图片；**Step**为**2**时，软件将在指定起止范围内间隔选取图片。
- 对于**X**，**Y**维度，可以打开**2D**视图，在相应维度下，点击**Start**滚动条右

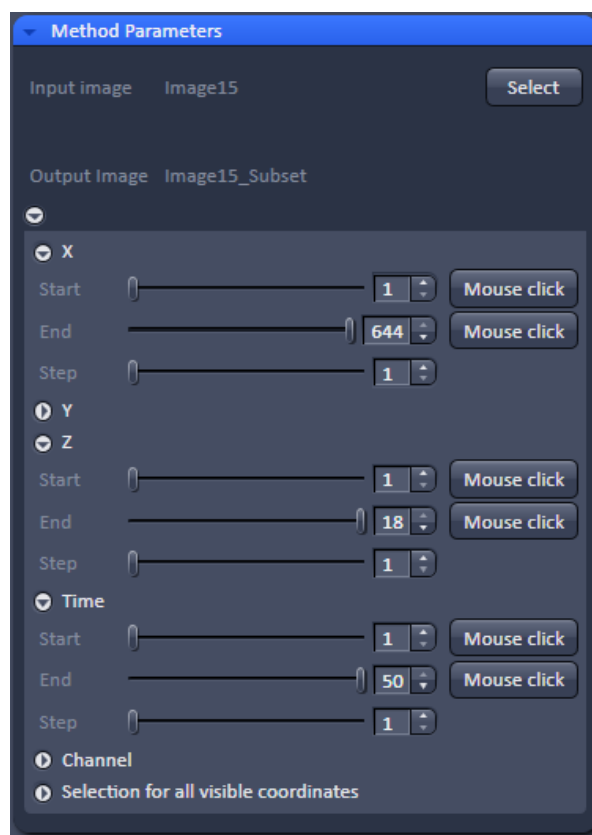


Fig 92 Subset 图像选择及参数设置界面

侧的Mouse click按钮，在图像上点击选取区域X轴或Y轴方向的起始位置；再点击End滚动条右侧的Mouse Click按钮，在图像上点击选取区域X轴或Y轴方向的结束位置。软件将自动读取指定坐标，定义选取图像区域。

- 对于Z，Time和Channel等维度，则可以打开Gallery视图，点击Start滚动条右侧的Mouse click按钮，在Gallery视图中，点击选取范围的起始图片；再点击End滚动条右侧的Mouse Click按钮，在Gallery视图中点击选取范围的结束图片。软件将自动读取点击图片的编号，作为选取图片范围的起止位置。
- 点击Apply按钮，软件会将选取出的图片保存在一张新图像当中。

需要注意的是，导入的图像不同，参数设置界面中显示的维度也会有所差异。

4.6.6. 保存图片的亮度与对比度

对于*.czi图像文件来说，通过调节灰度直方图优化图像显示后，软件仍然会保存图像的原始灰度数据。在使用ZEN Black输出原始图像时，也会依照原始灰度输出图像，而不是优化后的图像。因此，如果需要输出经过优化显示的图像，需要在图像输出前，使用保存图片的亮度与对比度功能。

- 打开一张调节好灰度和对比度的图像。
- 在Processing主页面的图像处理工具列表中选择Adjust下拉菜单中的Burn in Brightness and Contrast功能。
- 在图像选择界面中点击Select按钮，导入当前图像窗口中打开的图像，其文件名自动出现在Input image右侧。
- 点击Apply按钮，软件会根据优化显示的图像生成一张新的图像。

注意，由于经过Burn in Brightness and Contrast处理的图片，其原始灰度值已经发生改变，这些图像不能用于任何与灰度有关的分析！（Fig. 93）

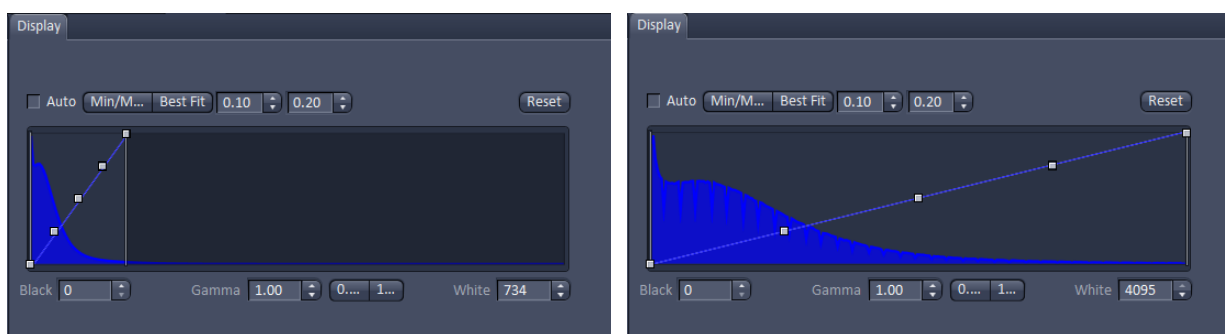


Fig 93 Burn in Brightness and Contrast 处理前后的图像灰度直方图，左图为处理前图像的灰度直方图，右图为处理后图像的灰度直方图

4.6.7. 通道平移

如果在扫描多通道荧光图像的过程中，由于样品的移动而造成各通道荧光之间无法

很好地叠加，可以在原始图像中，使用通道平移功能对某一通道的荧光信号进行移动，使其与其他通道能够叠加形成正常的图像 (Fig. 95)。

- 打开一张含有错位荧光信号的多通道荧光图像。
- 在Processing主页面的图像处理工具列表中选择Adjust下拉菜单中的Channel shift功能。

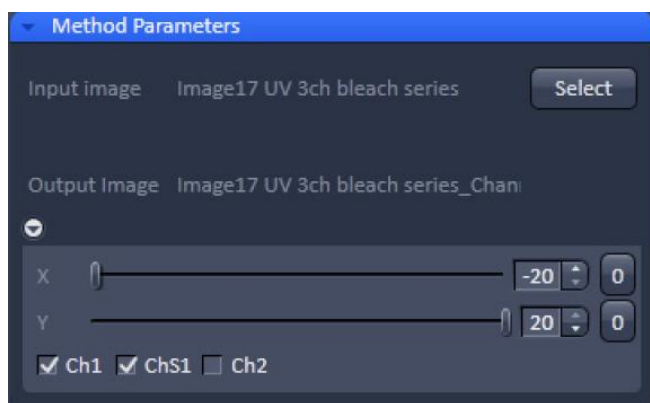


Fig 94 Channel Shift 图像选择及参数设置界面

- 在图像选择界面中点击Select按钮，导入当前图像窗口中打开的图像，其文件名自动出现在Input image右侧 (Fig. 94)。
- 点击Output image下方的三角形按钮，打开图像处理参数设置界面。在界面下方，勾选需要移动的通道名称。
- 拖动X和Y滚动条，移动勾选通道在图像中的位置。根据Preview视图中右侧的图像判断此通道是否移动到了合适的位置。
- 设置好X和Y的移动距离后，点击Apply按钮，软件会根据设置生成一张新的图像。

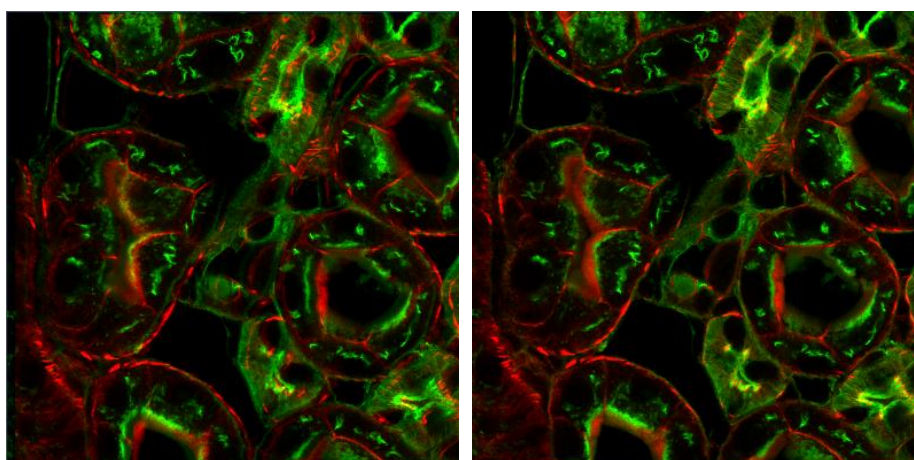


Fig 95 经过Channel Shift处理的图像。左侧为待处理的图像，右侧为处理好的图像。

4.7. 图像的浏览、保存与输出

4.7.1. 图像的保存

图像扫描完成后，不仅会显示在软件界面中央的图像显示区域，在右侧工具栏中，也会生成一个新的标签，并以图形标记在标签的右下角，提示此图像尚未保存。在标签中还会显示图像文件的大小和扫描方式，例如，标记代表多通道荧光图像，标记代表Z-stack图像，标记代表时间序列图像。

点击主工具栏中的  按钮，可以保存当前图像窗口中打开的图像。在右侧工具栏中选中该图像标签成高亮状态，点击右侧工具栏左下角的  按钮，也可将图像保存为默认的CZI格式 (Fig. 96)。

注意，对于二维图像而言，如果忘记保存图像而第二次扫描的时候直接点击了Live按钮，新生成的图像会覆盖未保存的图像。

点击右侧工具栏左下角的  按钮，可以删除在右侧工具栏中选中的图像。

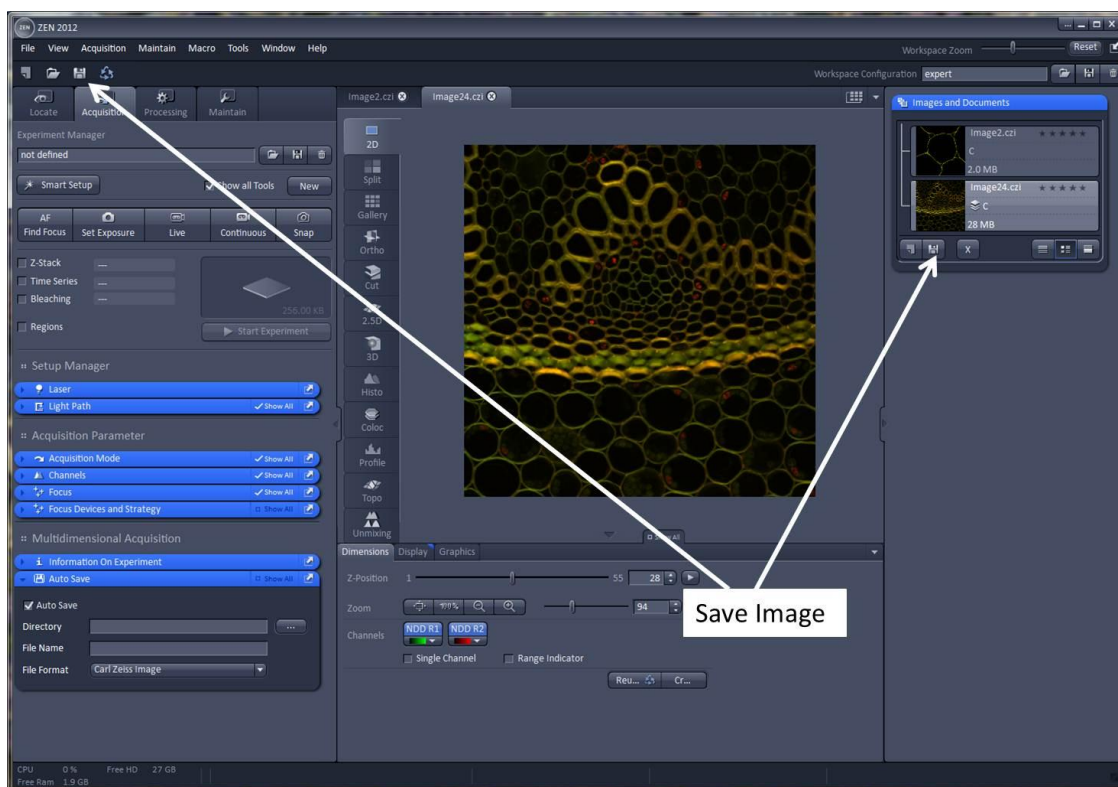


Fig 96 保存图像

4.7.2. 图像的浏览

为了方便用户浏览查找图像，在菜单栏File菜单下，ZEN 2011 提供了New file browser功能供用户使用。

点击File菜单中的New file browser功能，ZEN 2011会打开ZEN文件浏览器 (Fig. 97)。在浏览器的左侧，显示了文件的存储路径，而右侧则可显示指定文件夹中的图像文件。ZEN文件浏览器提供了三种图像文件展示方式：Gallery模式可以显示图像文件的缩略图；Form模式可以显示某一图像文件的具体信息；Table模式则以表格方式列出了图像的名称，拍摄时间，扫描方式等信息。ZEN 2011默认使用Gallery模式显示图像。

在ZEN文件浏览器中找到感兴趣的图像，双击图像即可打开该图像。点击浏览器左下角的Load按钮，也可以打开选中的图像。点击Load按钮右侧的Reuse按钮，可以在ZEN 2011中加载指定图像的扫描参数，用于新图像的扫描。在浏览器的下方还提供了Cut, Copy, Paste和Delete按钮，用于剪切，复制，粘贴和删除图像。

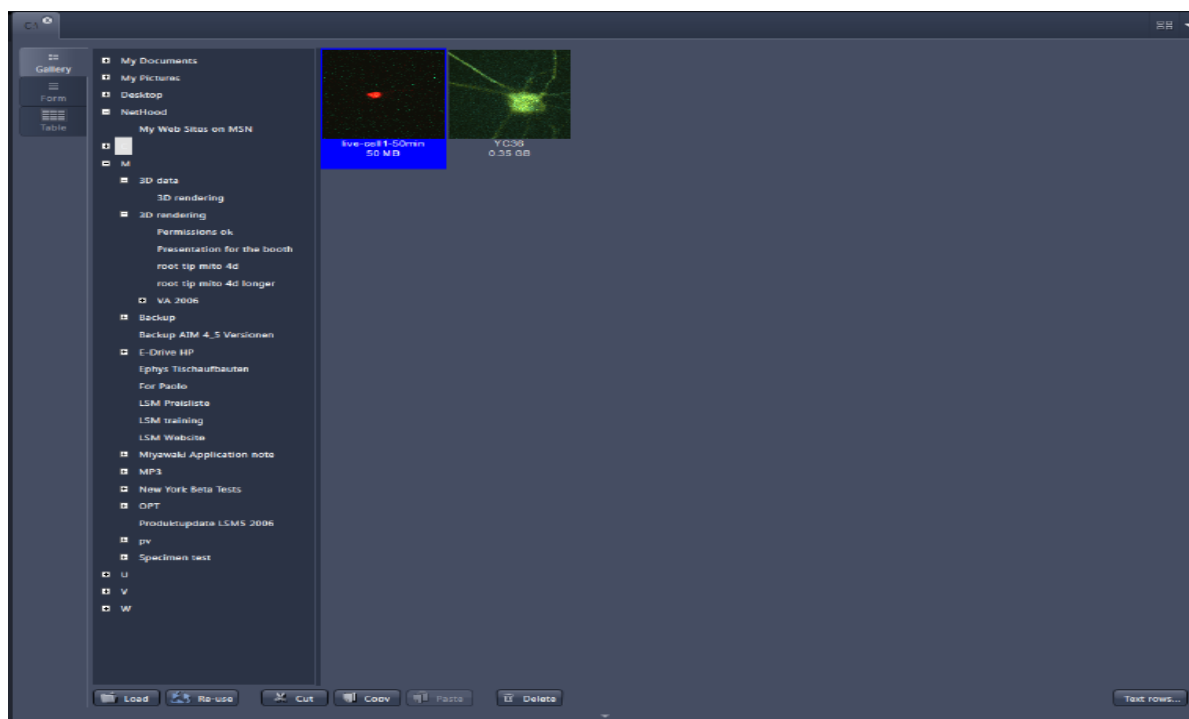


Fig 97 ZEN图像浏览器

ZEN 2011默认使用1 Container，即在图像显示区域只显示一幅图像。如果需要比较已经打开的多幅图像，可以点击菜单栏View菜单下的2 Container或3 Container。如果选择2 Container，软件界面中间的图像显示区域将可以同时容纳2个图像窗口，用鼠标将待比较图像上方的名称标签拖入新增图像窗口中，即可并排显示两幅图像 (Fig. 98)。同样的，选择3 Container可以同时显示3幅图像。

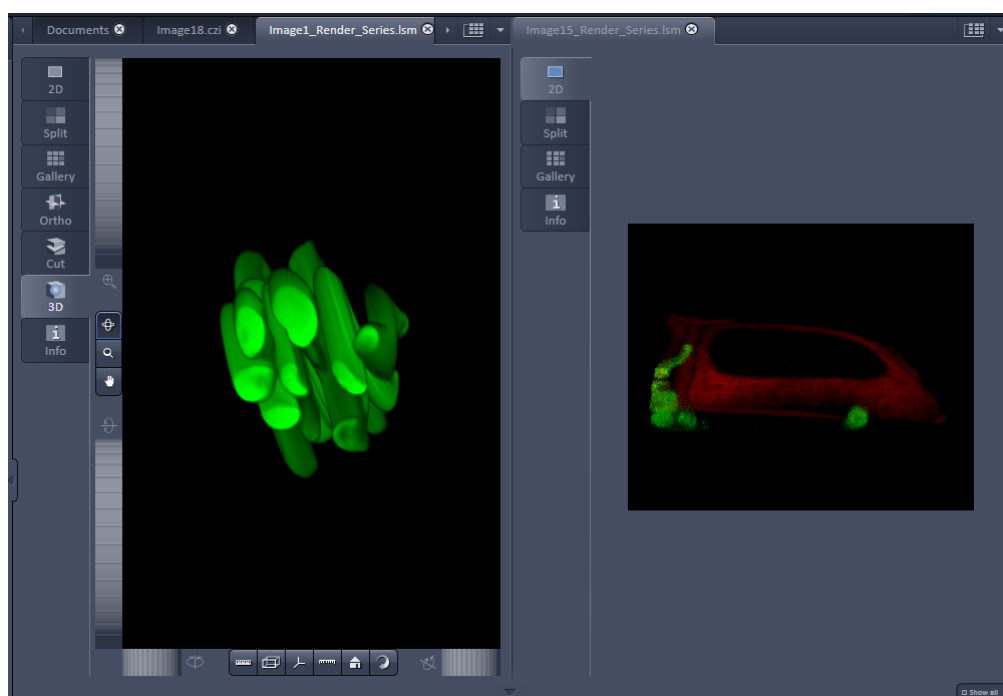


Fig 98 2 Container图像显示区域

4.7.3. 图像的輸出

4.7.3.1. ZEN 2011 (Black Version) 图像輸出

点击菜单栏中File菜单下的Export选项，打开Export对话框 (Fig. 99)。

在Format下拉菜单中选择所需的图片格式，如TIF, JPEG等。如需输出为视频文件，则选择Video for Windows格式。

在Data下拉菜单中选择源文件格式 (Fig. 100)。通常会选择Raw data，即原始数据格式。然后在Channels右侧的复选框中选择RGB-image选项，并定义红绿蓝三原色所对应的荧光通道，即可输出一张彩色图像。选择Palette-image选项，则可选择多通道荧光图像中的某一通道，将其单独输出为图像。注意，由于在RGB-image功能中只能定义三个通道，因而如果多通道荧光图像中含有3个以上的荧光通道，就需要选择Full resolution image window格式。如果需要将图片中的比例尺等插入项一同输出，也需要选择Full resolution image window格式。

如果需要输出多维图像中的每一张图片，需要在输出图像时选择带有Series后缀的源文件格式，即可将原始文件中的每一张图片单独输出成独立的图像文件 (Fig. 100)。例如，输出Z-Stack文件时选择Raw data-Series格式，软件会将每一个Z轴层面的图片都单独输出成独立的图像文件。如果需要输出视频文件，同样应当选择带有Series后缀的源文件格式。反之，如果只选择输出三维图像中的某一张，可在2D视图中打开待输出的图片，选择带有single plane后缀的源文件格式输出即可。

如果需要输出整个视图窗口，可以在打开该视图后，选择contents of image window格式输出。

点击Select file name and save..., 在弹出的对话框中选择保存输出图像的文件夹和文件名，即可将*.czi文件输出成常见图片格式。

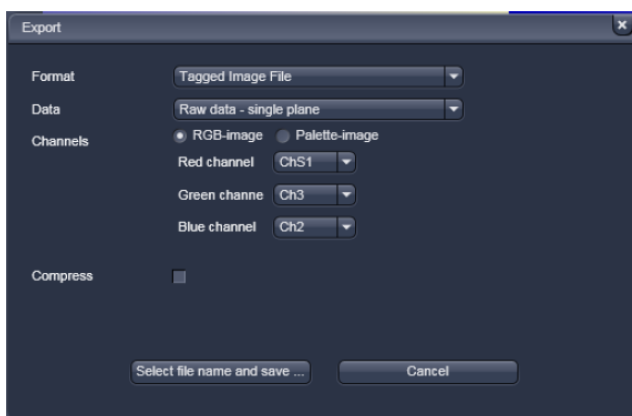


Fig 99 Export 对话框



Fig 100 各种源文件格式

4.7.3.2. ZEN 2011 (Blue Version) 图像輸出

对于多通道荧光图像来讲，ZEN Black Version无法同时输出合成图像和各单通道图像，为此，此处简单介绍Blue Version的输出功能，作为补充。

双击桌面上的图标 ZEN 2011 (Blue version) ，启动软件，系统弹出软件启动窗

口。点击Image processing按钮,激活图像处理模块,对已保存图像进行处理 (Fig. 101)。由于ZEN 2011 (Blue Version) 不能控制扫描元件成像,因而只能用于共聚焦扫描图片的输出等图像处理工作。

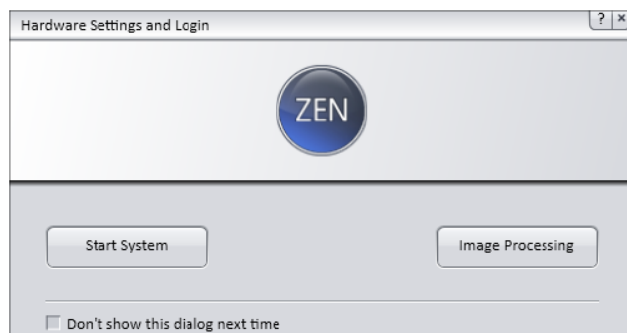


Fig 101 ZEN 2011 (Blue version) 启动画面

单张图像文件的输出

打开ZEN 2011 (Blue Version), 进入Processing主页面, 在Method工具栏中选择Export/Import下拉菜单中的Single File Export功能, 完成单张图像文件的输出 (Fig. 102)。

ZEN 2011默认加载当前图像窗口中显示的图像进行输出。如果需要选择其他图像, 可以打开Input工具栏, 点击缩略图右下角的白色三角形按钮, 打开图像列表, 在已经打开的图像中选择感兴趣的图像进行输出 (Fig. 103)。

Parameters工具栏包含了图像输出所需的相关参数 (Fig. 104)。勾选工具栏右上角的Show all复选框, 显示全部设置参数。ZEN 2011 (Blue Version)在Filetype下拉菜单中提供了JPEG, TIFF, BMP, PNG和HDP五种常见图像格式供用户选择。Filetype下拉菜单下的Quality滚动条用于设置输出图像的质量。通常会将滑块设定在靠近High的一端, 即选择输出高质量图像。软件默认设置为95。最大值为100, 即按照原始信息输出图像, 不进行任何压缩。也可以直接在滚动条右侧的输入框中输入数值。

如果选择输出TIFF, PNG或HDP图像, 软件会自动增加Convert to 8bit复选框。勾选此复选框, 可以在输出图像时将16bit

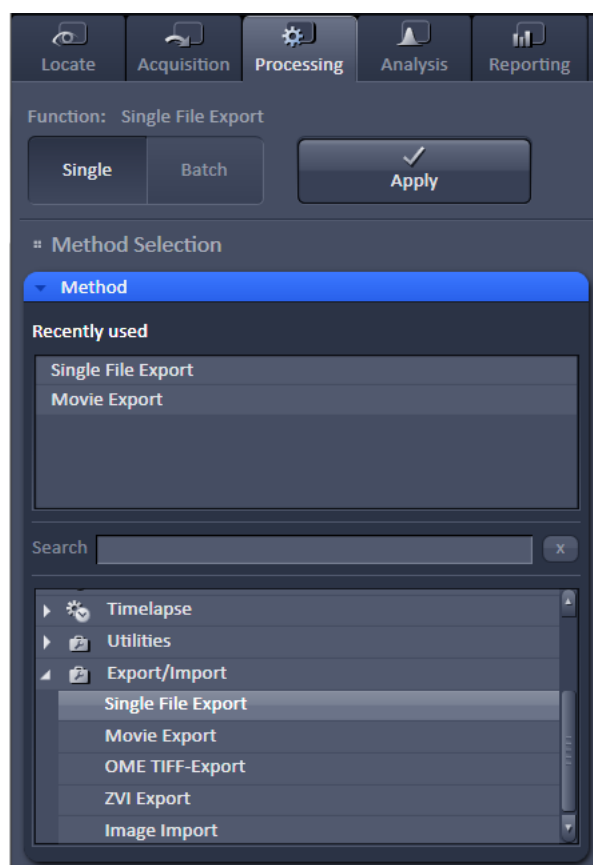


Fig 102 ZEN 2011 (Blue Version) Processing 主页面 Method 工具栏

或12bit图像压缩为8bit。如果是48bit彩色图像,则被压缩至24bit。

ZEN 2011 默认使用原始图像分辨率输出图像。如果用户选择缩小图像的分辨率进行输出,可以通过**Resize**滚动条上的滑块进行调节,也可以直接在滚动条右侧的输入框中直接输入输出分辨率相对于原始分辨率的比例。

ZEN 2011 默认勾选 **Apply Display Curve and Channel Color** 复选框,根据用户自定义的通道颜色和图像对比度输出。勾选 **Burn-in Graphics** 复选框,图片上插入的比例尺等插入项即可与图片整合在一起进行输出;否则,软件将只输出图像,而图像上的比例尺等插入项将被删除。

如果用户选择输出原始图像而不保存任何修改,则需勾选 **Original Data** 复选框。注意,由于共聚焦扫描所得图像均为黑白图像,所有的荧光伪彩均为软件定义所得,因此,选择**Original Data**输出的图像均为黑白图片。

如果待输出图像为多通道图像,软件会自动在**Burn-in Graphics**复选框下增加**Merged Channels Image**和**Individual Channel Images**复选框。勾选前者,软件直接输出多通道叠加的图像;勾选后者,则将每一个通道分别输出为独立的图像文件。用户可以同时勾选二者,选择同时输出叠加图像和单通道图像。

在**Export to**输入框中,用户可以自定义保存输出图像的文件夹,也可以点击输入框右侧的按钮,打开浏览文件夹对话框,在文件夹路径列表中选择输出文件夹,保存输出图像。勾选**Create folder**复选框,可以在指定的输出文件夹下,为每个图像建立单独的输出文件夹,保存输出图像。勾选**Generate xml file**复选框,可以将共聚焦扫描图像文件中所含的各种信息,如光路设置,扫描参数等,输出至Excel文件中。勾选

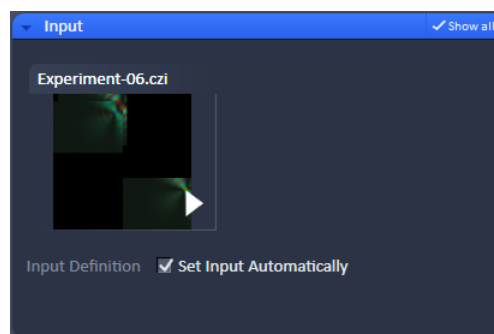


Fig 103 Input 工具栏

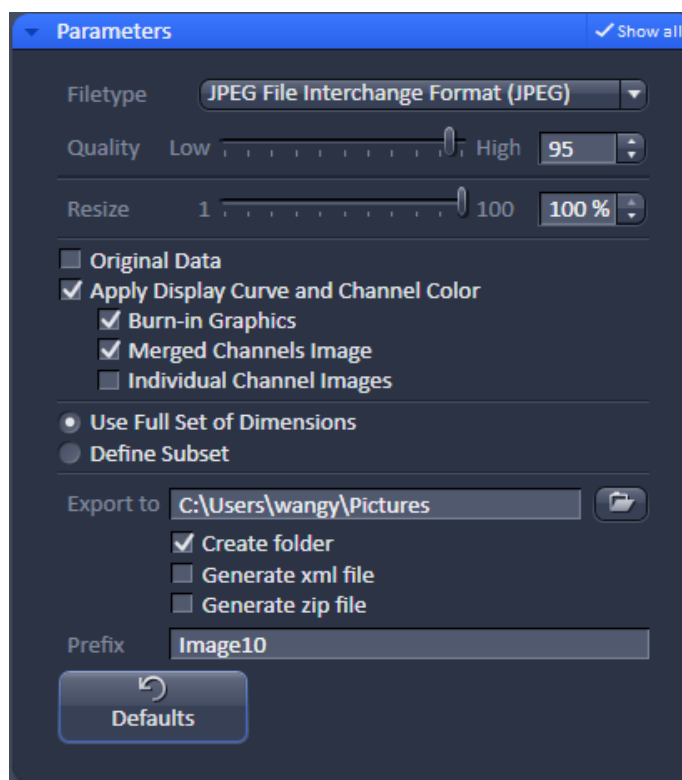


Fig 104 Parameters 工具栏

Generate zip file复选框，软件则会生成一个压缩文件夹，其中包含输出图像和含有原始文件信息的Excel文件。ZEN 2011默认使用原始文件名来命名输出图像。用户也可以在**Prefix**输入框中自定义输出图像的文件名。

在**Parameters**工具栏的左下角有**Defaults**按钮。点击此按钮，软件将使用默认参数输出图像。即JPEG格式，原始分辨率，图像质量压缩至95%，按照自定义通道颜色和对比度输出，包含所有插入项，只输出多通道叠加图像，以原始文件名命名，输出文件夹位于图片库中。

对于多维图像来讲，如果选择输出某一部分图片，则需选择使用**Define Subset**功能 (Fig. 105)。此时，软件会自动增加各维度的下拉菜单，可以在其中指定需要输出的图片。

增加的下拉菜单会根据图像所含的维度不同而不同。例如，某个含有**Z-Stack**，多视野的多通道时间序列图像，软件会在**Define Subset**复选框下列出**Channels**，**Z-Position**，**Time**，**Scene**和**Tiles**五个下拉菜单；而对于一个多通道时间序列图像来讲，**Z-Position**和**Scene**下拉菜单将不会出现。

在**Channels**下拉菜单中，图像文件中所含的所有通道会以按钮方式逐一列出。点击需要关闭的通道，通道名称下的彩色按钮会折叠起来，输出图像中将不会包含此通道的图片。

对于**Z-Position**，**Time**和**Scene**下拉菜单，软件会提供**Extract**下拉菜单。**Extract Single**选项用于输出某一张图片，用户可以使用滚动条来选择图片，也可以直接在滚动条右侧的输入框中输入图片编号进行定义。或点击  按钮，软件将自动读取当前图像窗口中打开图片的编号。**Extract Range**选项用于输出一系列连续的图片，用户可以定义输出图片范围在指定维度中的起止位置，方法与选择单张图片输出时相同。**Extract Multiple**选项用于输出指定维度中某些不连续的图片，用户可以在输入框中输入各待输出图片的编号，以逗号隔开，如“1,3,7”，软件将输出指定维度中的第1，3，7张图片；如果需要输出第一至七张图片，则需输入“1-7”；

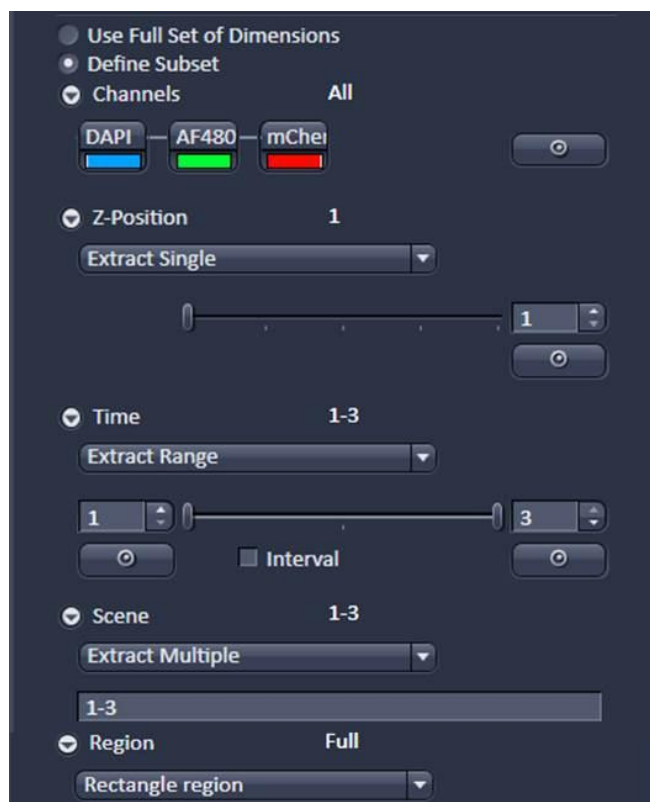


Fig 105 多维度图像输出范围参数设置

如输入“1-7:2”，则在第一至七张图片范围内，间隔输出图片，即输出第1, 3, 5, 7张图片。如果导入二维多通道荧光图像，还将出现Region下拉菜单。软件默认选择Full，即输出整幅图像。如果选择Rectangle region选项，可用鼠标在图像中框选感兴趣区域，进行输出。

视频输出

打开ZEN 2011 (Blue Version)，进入Processing主页面，在Method工具栏中选择Export/Import下拉菜单中的Moive Export功能，完成视频输出 (Fig. 106)。

ZEN 2011默认加载当前图像窗口显示的图像进行输出。如果需要选择其他图像，可以打开Input工具栏，点击缩略图右下角的白色三角形按钮，打开图像列表，在已经打开的图像中选择感兴趣的图像进行输出 (Fig. 103)。

Parameters工具栏包含了图像输出所需的相关参数 (Fig. 107)。勾选工具栏右上角的Show all复选框，显示全部设置参数。ZEN 2011 (Blue Version)在Mode下拉菜单中提供了AVI和WMF二种常见视频格式供用户选择。在Format下拉菜单中，用户可以选择输出视频文件的分辨率。软件默认使用原始文件的图片分辨率，即Original Size进行输出。

在选择AVI (M-JPEG)视频格式时，Format下将出现Quality滚动条，用于设置输出视频的质量。通常会将滑块设定在靠近High的一端，即选择输出高质量图像。软件默认设置为90。最大值为100，即按照原始信息输出视频，不进行任何压缩。也可以直接在滚动条右侧的输入框中输入数值。

ZEN 2011默认勾选Burn-in Graphics复选框，图片上插入的比例尺等插入项即可与图片整合在一起进行输出；否则，软件将只输出图片，而图片上的比例尺等插入项将被删

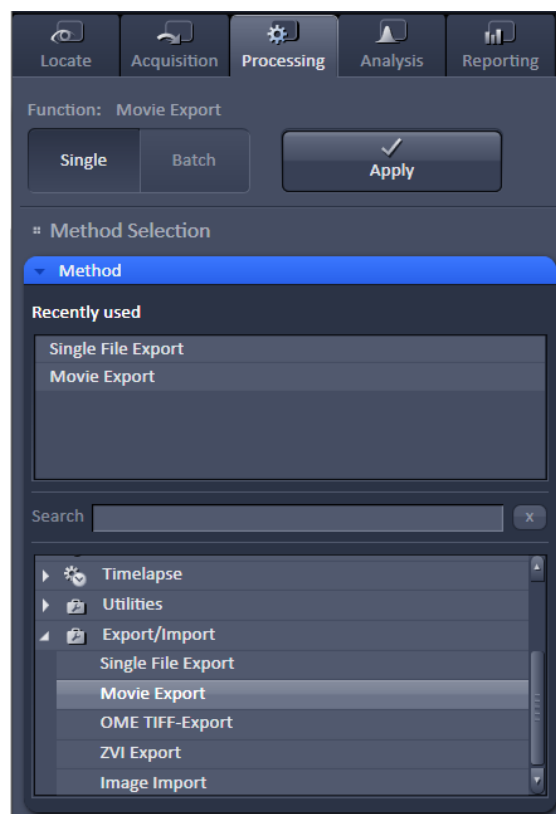


Fig 106 ZEN 2011 (Blue Version) Processing 主页面 Method 工具栏

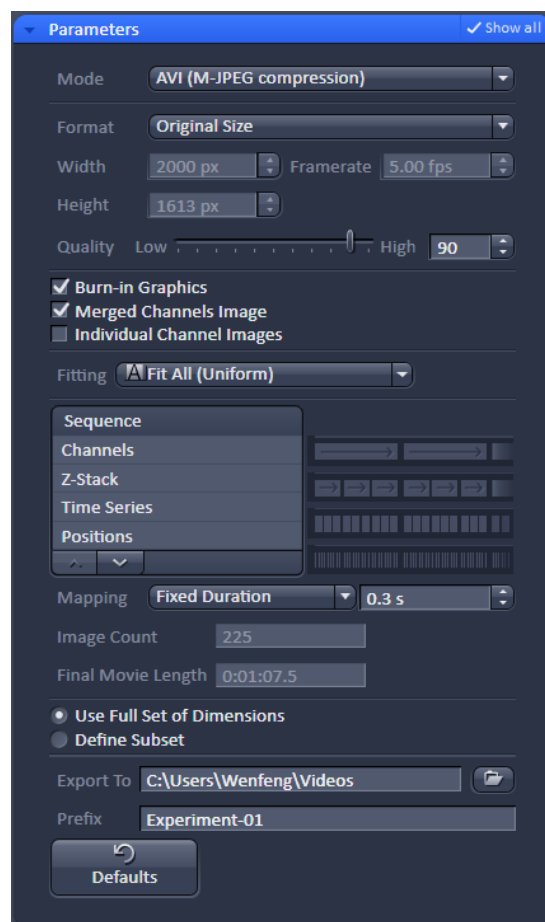


Fig 107 Parameters 工具栏

除。

如果待输出图像为多通道图像，软件会自动在 **Burn-in Graphics** 复选框下增加 **Merged Channels Image** 和 **Individual Channel Images** 复选框。勾选前者，软件直接输出多通道叠加视频；勾选后者，则将每一个通道分别输出为独立的视频文件。此时，通常只勾选 **Merged Channels Image** 选项。

在 **Fitting** 下拉菜单下方的播放顺序列表中，用户可以选择在视频中优先播放的维度。例如，在 **Fig. 107** 中，输出视频将按顺序播放每一视野的时间序列文件，在每一个时间点上，将播放 **Z-stack** 的每一层面图像。即 **Z-stack** 的优先级别高于时间序列。如果选中列表中的 **Z-stack** 选项，点击  按钮，将其移动至 **Time Series** 选项下方，在输出视频中按顺序播放每一视野的 **Z-stack** 图像，在 **Z-stack** 的每一层面将播放该层面的时间序列图像。

在 **Mapping** 下拉菜单中，**ZEN 2011** 默认选择 **1 frame per image** 选项。在输出视频时，各张图像之间没有时间间隔。建议选择 **Fixed Duration** 选项。在下拉菜单右侧的输入框中输入各张图像之间的时间间隔。软件将自动根据 **Image Count** 输入框中读取的图像数量，计算视频时长，并显示在 **Final Movie Length** 输入框中。

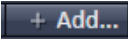
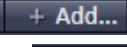
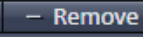
在 **Export to** 输入框中，用户可以自定义保存输出视频的文件夹，也可以点击输入框右侧的  按钮，打开浏览文件夹对话框，在文件夹路径列表中选择输出文件夹，保存输出视频。**ZEN 2011** 默认使用原始文件名来命名输出视频。用户也可以在 **Prefix** 输入框中自定义输出图像的文件名。

在 **Parameters** 工具栏的左下角有 **Defaults** 按钮。点击此按钮，软件将使用默认参数输出视频。即 **AVI (M-JPEG)** 格式，原始分辨率，图像质量压缩至 **90%**，包含所有插入项，只包含多通道叠加图像，各张图像之间没有时间间隔，以原始文件名命名，输出文件夹位于视频库中。

对于多维图像来讲，如果选择输出某一部分图片，则需使用 **Define Subset** 功能 (**Fig. 105**)。此时，软件会自动增加各维度的下拉菜单，可以在其中指定需要输出的图片。其界面与单张图像文件输出时一致。

图像文件的批处理输出

打开 **ZEN 2011 (Blue Version)**，进入 **Processing** 主页面，点击 **Batch** 按钮，在 **Batch Method** 工具栏中选择 **Single File Export** 功能或 **Moive Export** 功能 (**Fig. 108**)。

在软件界面中央的文件列表的左下角，点击  按钮，在弹出的 **Add File** 对话框中选择全部待输出的图像，将其加载至文件列表中。在  按钮两侧，还有  和  按钮，用以调节指定文件在输出程序中的顺序；以及  和  **Remove All** 按钮，可以删除指定图像，或删除列表中的全部图像文件。在文件列表的右下角，

Save List... 按钮可以用于保存文件列表；而 **Load List...** 按钮则用于加载预先保存的文件列表。

在文件列表中选择待输出的文件，使其呈高亮显示。在 **Parameters** 工具栏中完成输出参数的设定，其界面与单张图像文件输出以及视频输出时一致，在此不再赘述。如果下一文件的输出参数与前一文件相同，可以在选中第一个文件后，点击文件列表右上角的 **Copy Parameters** 按钮，然后选中下一个文件，点击 **Paste Parameters** 按钮，将上次设定的文件输出参数复制到当前文件中。逐一设定列表中所有待输出图像的输参数。

勾选文件列表左上角的 **Use Input Folder as Output Folder** 复选框，输出图像将自动保存至原始图像的文件夹中。也可以点击右侧的 **Browse...** 按钮，选择目标文件夹保存输出图像。点击 **Naming...** 按钮，可以修改输出图像的名称。

点击列表左侧的 **Run Batch** 按钮，运行批处理程序，依次输出列表中选中的全部文件。也可以点击文件列表右上角的 **Run Selected** 按钮，输出某张选中的图像。

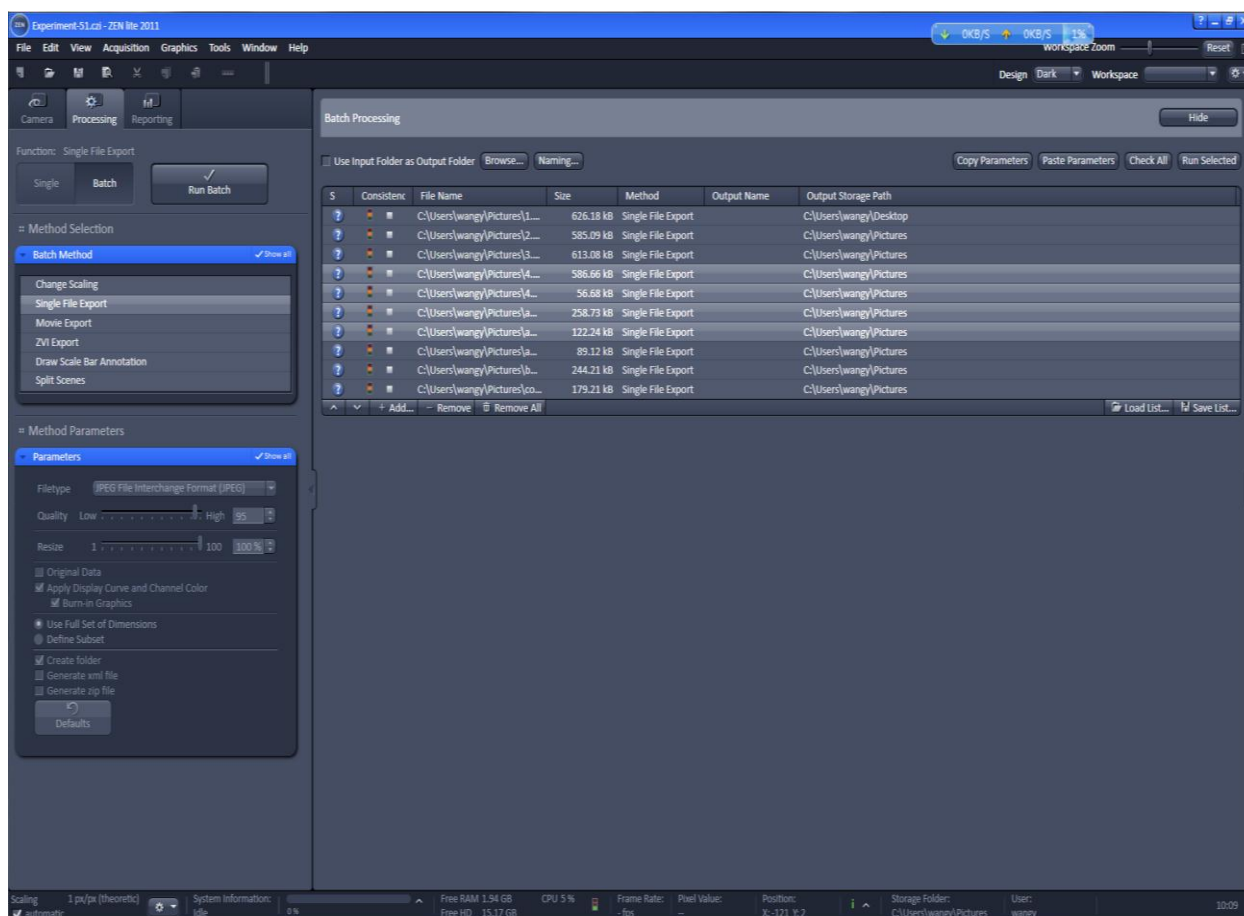


Fig 108 图像文件批处理输出

5. 安全使用须知

在正常使用条件下，激光共聚焦扫描显微镜是安全的！但由于在使用中涉及电、激光等危险因素，不当操作可能会导致使用者受伤。因此，请用户详细了解以下安全使用相关内容，并在操作过程中严格按照安全使用注意事项操作。

5.1. 机身警示标志

为了避免用户由于误操作而伤害到自身或设备，激光共聚焦扫描显微镜上通常会贴有一系列警示标志，如下图所示 (Fig. 109-110)：

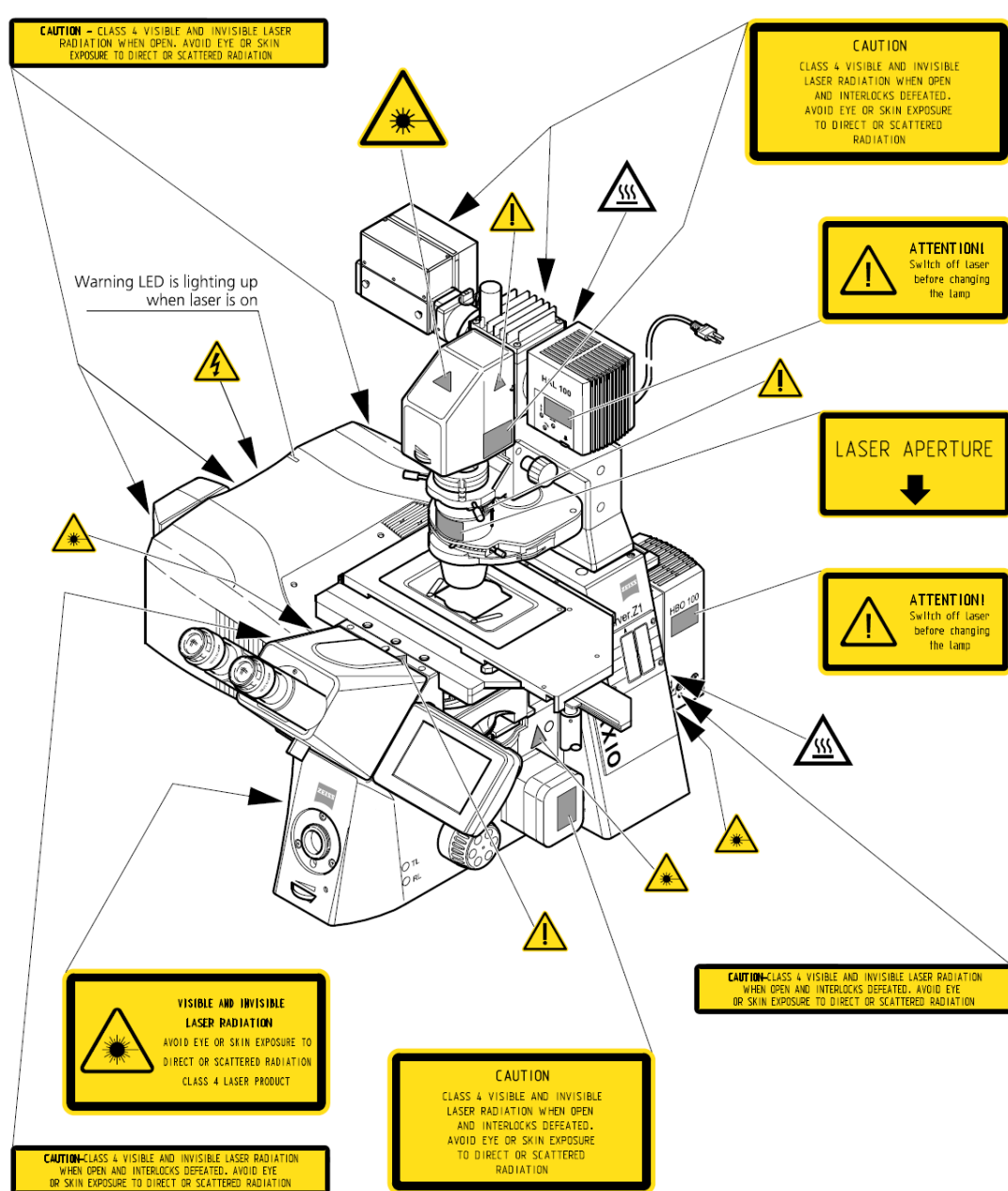


Fig 109 Observer Z1 + LSM 710/780 机身常见警示标志

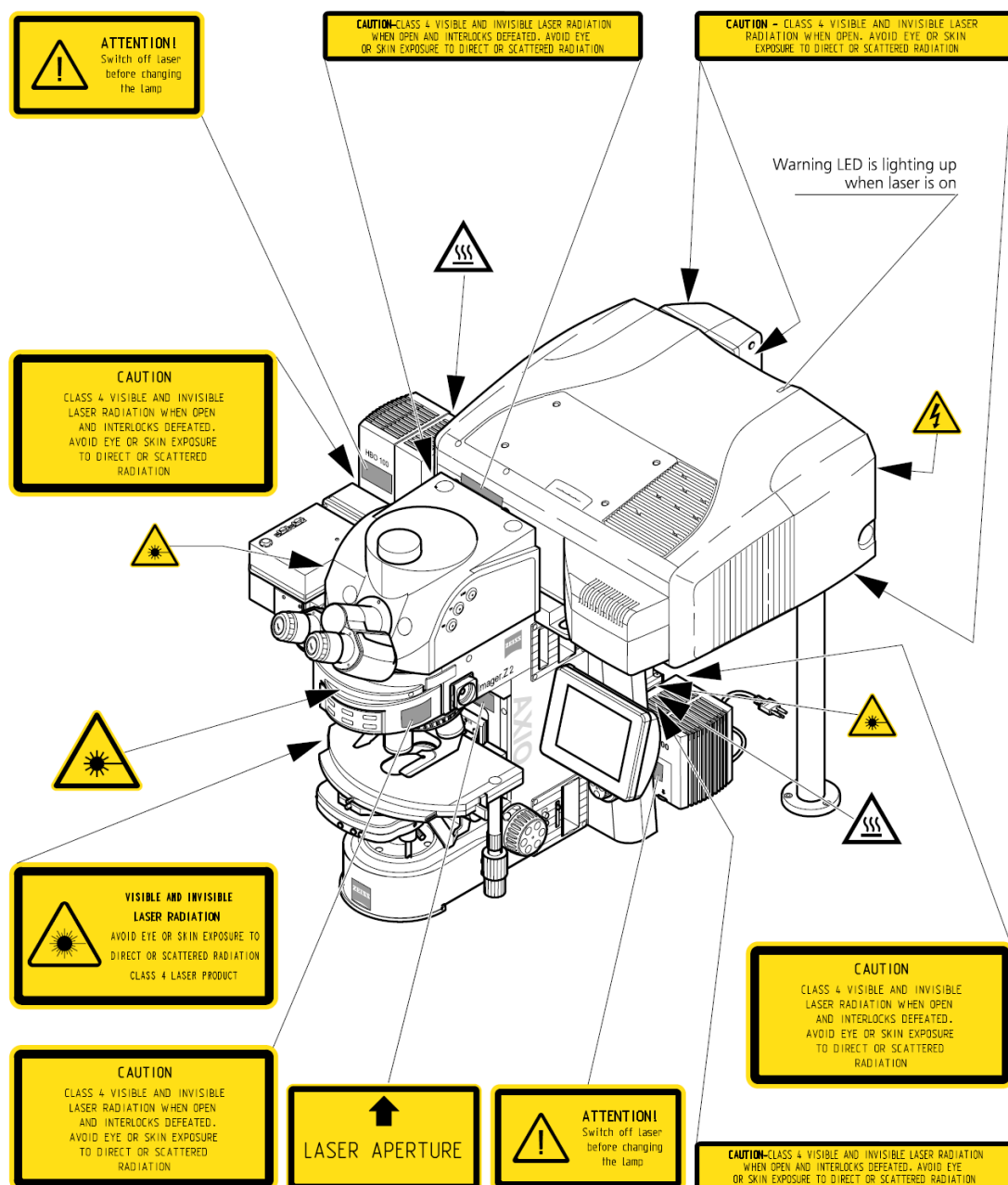


Fig 110. Axio Imager Z2 + LSM710/780 机身常见警示标志

其中的符号含义如下：



提示误操作可能会伤害到用户或设备。



提示在扫描图片过程中，打开此处光路，可能会产生激光伤害。



提示高压电危险！



提示打开机箱前，请将系统彻底断电。



提示高温表面！



提示紫外线辐射危险！



提示小心挤压手指！



箭头指向扫描图像时激光可能逸出的地方。

5.2. 激光安全

激光与普通光源不同，其亮度高、方向性好，能量密度大等特殊性质，可能对使用者的人身安全构成威胁。LSM710/780 所配常规激光器均属于 3B 级激光。全功率激光光束直接入眼或照射皮肤会造成视网膜或皮肤的损伤，光滑表面，如手表，戒指，或镊子等，造成的镜面反射同样会对人体造成类似伤害。但粗糙表面，如擦镜纸，造成的弥散反射通常是安全的。

如果配有双光子激光器，则属于 4 级激光。不仅直接暴露在全功率激光光束或镜面反射光中会对眼睛和皮肤造成损害，还可能引燃易燃物，如纸张，棉花等。

安全使用注意事项包括：

- 所有操作人员都应知悉激光安全使用注意事项。
- 在安装激光共聚焦扫描显微镜的实验室内，张贴明显的警示标志。
- 不要直接或间接直视激光光束，包括正在扫描的样品！
- 移除光路附近所有不必要的光滑表面。
- 不要自行打开或拆卸显微镜。
- 确保物镜转盘所有空位上的盖子都是盖好的。
- 不要在扫描过程中直接将手置于光路中。
- 扫描时，不要将易燃物品放置在光路中，如擦镜纸或棉签。

如果有强光入眼，请保持冷静。闭目 4-5 分钟后，如果视力没有完全恢复，请向管理人员报告，并到医院咨询眼科医生进行专业检查。

6. 设备日常清洁保养

激光共聚焦扫描显微镜是极为精密的光学仪器，正确而适当的清洁保养能够使设备长期处于最佳工作状态，为成像质量提供了保证。而灰尘，污渍或碎屑会严重影响成像质量。在下图中，可以看到污渍和未及时清理的镜油对图像的破坏 (Fig. 111)。可见，定期清洁养护显微镜是十分必要的。

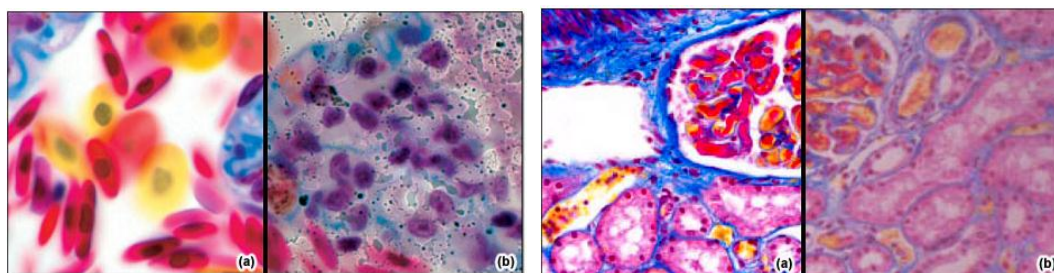


Fig 111 污渍和未及时清理的镜油对图像质量的影响

激光共聚焦扫描显微镜对工作环境也有一定的要求。长期在高温潮湿的环境中使用，会影响光学系统和供电系统的性能，影响使用效果。工作环境基本要求如下：

工作温度	22℃ ± 3℃
保存温度	-20 — 55℃
预热时间	1 小时；如需高精度图像或长时程观察，则需 3 小时。
工作湿度	30℃ 时小于 65%
工作海拔	不超过 2000 米
散热	4 千瓦

设备的日常清洁保养工作包括：

- 请定期打扫实验室，保证工作环境清洁。
- 每天工作完成后，请用防尘罩遮盖显微镜及扫描头。
- 需要使用介质（油，水或甘油）的物镜每次使用后应及时彻底清洁。清洁时先用擦镜纸吸干液体，再用脱脂长绒棉卷在医用棉签上，蘸取少量无水乙醇呈螺旋状由内而外擦拭三次。第一次一定不要用力，以后每次逐渐加力。每次需使用新的棉签，且擦拭方向必须一致 (Fig. 112)。
- 定期对显微镜表面镜片，包括物镜，目镜和聚光镜，以及载物台表面和机架表面进行

彻底清洁。具体步骤如下：

- 用吸耳球由上而下地清除附着在设备表面的灰尘及其它微小异物。
- 对于金属部件，油漆及塑料部件上的手指印或油污，可用软布沾水或中性洗涤剂擦拭，然后用较干的干净软布把表面擦干净。或用专门的清洁剂进行擦拭。
- 依照前述清洁方法，由上而下用棉签蘸取少量无水乙醇逐一清洁物镜，目镜和聚光镜等表面镜片。

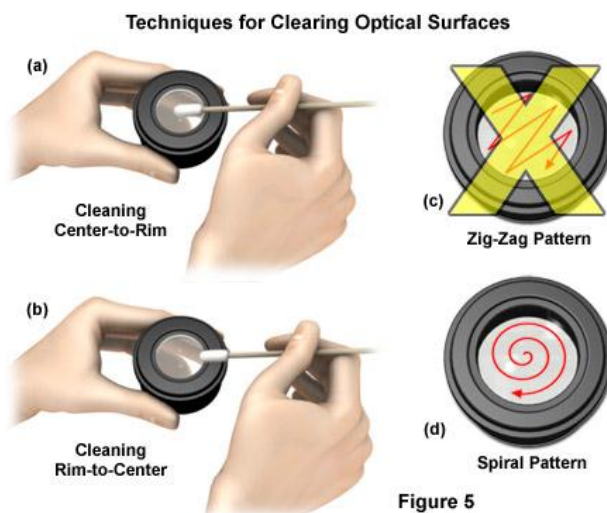


Fig 112 清洁物镜的方法

- 如果发现其他镜片或仪器内部有污染物，请联系 zeiss 工程师解决。
- 全国联保售后维修服务热线 400-6800-720。

7. 附录

7.1. Tile 模块

Tile模块满足了用户以高分辨率大范围获取样品图像信息的需求，可以将多个视野的图像自动拼接在一起。与图像拼接的基本功能相比，此模块在扫描区域的设置上更为灵活方便。完成此功能同样需要电动载物台的配合。

在多维拍摄工具选择界面中勾选Tile Scan功能。软件会在Multidimensional Acquisition工具组下增加Tile Scan工具栏。其基本参数设置与图像拼接的基本功能界面相同。勾选Tile Scan工具栏中右上角的Show all复选框，软件将启动高级参数设置界面。此时，工具栏的上方提供了Centered grid，Bounding grid和Convex hull三种不同的拼接模式。在工具栏中间靠右的位置，软件以方格代表视野，展示了虚拟的扫描区域 (Fig. 113)。扫描区域模拟图的左侧包含了以下参数：

- **Overlap** 输入框：在此输入框中可以定义各视野之间的重叠范围。一定范围的重叠可以帮助软件更准确地拼接相邻的视野，但过高的 **Overlap** 值会增加扫描一定区域所需的视野数，延长完成图像拼接的时间。常用设置为5%。设置 **Overlap** 值后，右侧以方格代表的虚拟视野也会呈现出相应的重叠区域。

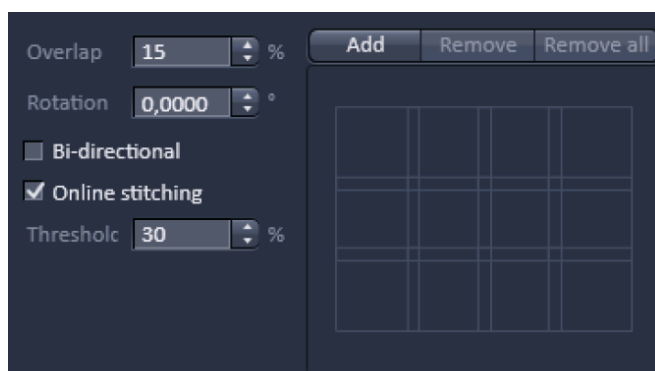


Fig 113. Tile Scan 通用参数设置

- **Rotation** 输入框：此参数用于校准载物台在 **XY** 方向上移动所产生的偏差。在系统安装时，软件会自动校准生成这一参数。通常用户不需自行设置。
- **Bi-directional** 复选框：勾选此复选框，视野的移动方向将由从左至右的单向移动，变为双向移动，即先从左至右扫描，然后移动至下一行，从右至左扫描。
- **Online stitching** 复选框：在输入 **Overlap** 参数后，软件会自动激活 **Online stitching** 复选框。勾选此复选框，软件将在完成整个指定区域的扫描后，自动拼接各视野图像。用户可以在复选框下的 **Threshold** 输入框中定义拼接图像时软件需要比较计算的范围。

在Tile Scan工具栏的最下方，ZEN 2011提供了Scan Overview Image...按钮。点击此按钮，可打开Scan Overview Image对话框，方便用户以较低的放大倍率扫描样品的整体情况，从而进一步确定感兴趣的扫描区域。

首先需要依前述方法，以最低倍数的物镜进行预览，选择对比度最佳的焦平面，设置

各track的激光强度, Pinhole大小, Gain值及扫描速度、Frame Size、Average等参数。

然后, 通过预览将视野移动至样品中心。打开Tile Scan工具栏, 点击Scan Overview Image...按钮, 在Scan Overview Image对话框的Horizontal和Vertical输入框中分别输入在X和Y方向上计划拼接的视野数。软件会默认在Objective下拉菜单中选择使用放大倍率最低的物镜, 以及最小的Zoom值。点击Scan按钮, 软件将以当前视野为中心, 扫描以指定视野数为长和宽的区域 (Fig. 114)。

在扫描结束后, 用户可以在2D视图中浏览图像, 寻找感兴趣的扫描区域。点击2D视图下Dimension视图控制界面下方的Stage按钮, 在图像中点击感兴趣的区域, 载物台将自动移动至该区域。用户即可进行感兴趣区域的扫描设定。

7.1.1. 中央视野定义法

使用此方法, 用户可以以指定视野为中心, 进行一定范围内的图像拼接。

首先需要依前述方法, 选择适当的放大倍率, 对比度最佳的焦平面, 设置各track的激光强度, Pinhole大小, Gain值及扫描速度、Frame Size、Average等参数。

然后, 选择感兴趣的Track进行预览, 并将视野移动至感兴趣区域的中心。打开Tile Scan工具栏, 在Centered Grid界面下, 在工具栏上方的Horizontal和Vertical输入框中分别输入在X和Y方向上计划拼接的视野数 (Fig. 115)。在Channels工具栏中选择所有需要扫描的track, 点击多维拍摄工具选择界面中的Start Experiment按钮, 开始实验。软件会自动以当前视野为中心, 扫描以指定视野数为长和宽的区域。

7.1.2. 边缘视野定义法

使用此方法, 用户可以定义扫描区域的边界, 软件将根据用户所定义的扫描边界, 设定矩形扫描区域, 并自动计算所需的视野数。

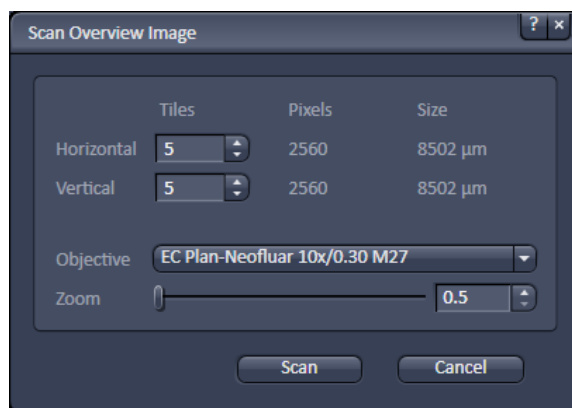


Fig 114 Scan Overview Image 对话框

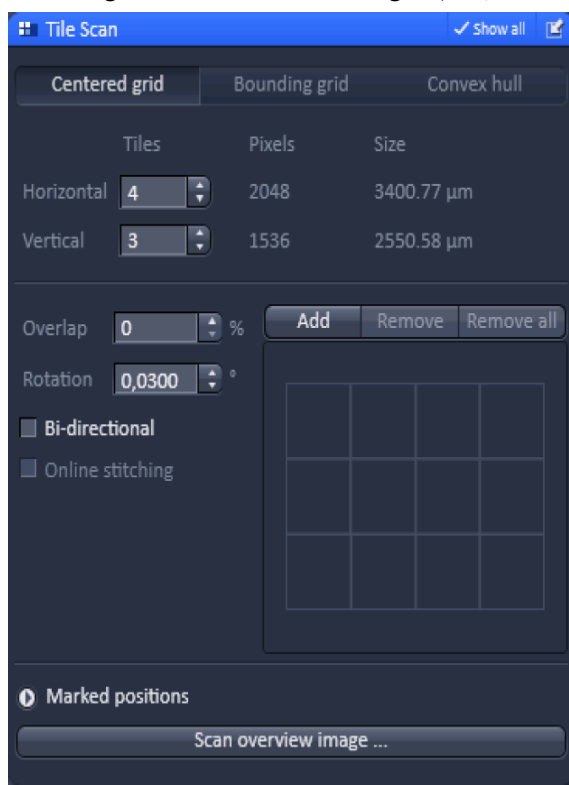


Fig 115 Centered grid 拼接模式

首先需要依前述方法，选择适当的放大倍率，对比度最佳的焦平面，设置各track的激光强度，Pinhole大小，Gain值及扫描速度、Frame Size、Average等参数。

然后，选择感兴趣的Track进行预览，并将视野移动至感兴趣区域的边缘位置。打开Tile Scan工具栏，在Bounding Grid界面下，点击虚拟扫描区域左上角的Add按钮，将当前视野添加至工具栏下方的Marked position列表中。同时，在虚拟扫描区域当中，加载的视野位置将以加粗的灰色方框标记出来 (Fig. 116)。

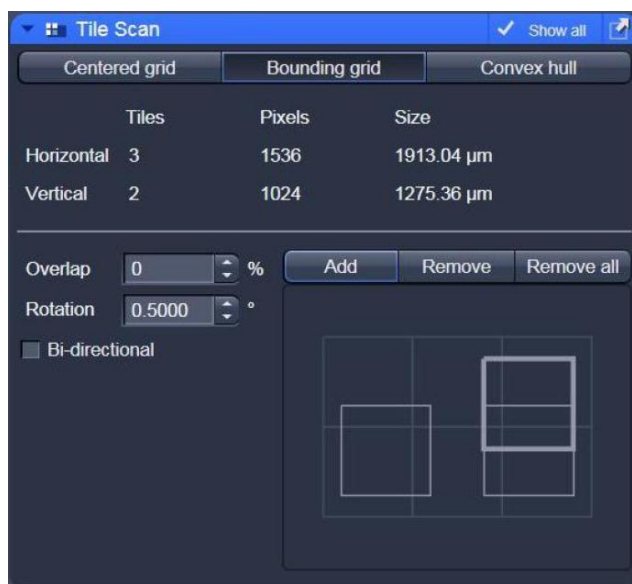


Fig 116 Bounding grid 拼接模式

Number	x [μm]	y [μm]
1	17.000	-10.000
2	12.000	-17.000

Fig 117 Marked position 列表

注意，应首先定义上下左右四个方向上距离感兴趣区域中心点最远的边缘视野。由于软件将自动设置矩形扫描区域使之恰好覆盖所有定义的边缘视野，对于不规则样品来说，如果有某一边缘视野到区域中心的距离比设定的任一视野都远，那么这一视野则会落在软件设定的扫描区域之外，从而导致图像信息的丢失。

此外，在选择边缘视野时，感兴趣区域的边缘应完整暴露在预览图像当中，以保证所设定的范围覆盖了整个感兴趣区域。

完成扫描区域边缘的定义后，在Channels工具栏中选择所有需要扫描的track，点击多维拍摄工具选择界面中的Start Experiment按钮，开始实验。软件会自动扫描指定区域。

点击虚拟扫描区域上方的Remove按钮，可以删除Marked positions列表中选定的视野；点击Remove all按钮，则会删除整个列表。点击Marked positions列表右下方的Save按钮，可以将视野位置列表保存至指定文件夹当中。而Load按钮用于加载预先保存的视野位置列表 (Fig. 117)。

7.1.3. 不规则边缘定义法

使用此方法，用户可以定义扫描区域的边界，软件将根据用户所定义的扫描边界，设定形状不规则的扫描区域，并自动计算所需的视野数。

首先需要依前述方法，选择适当的放大倍率，对比度最佳的焦平面，设置各track的激光强度，Pinhole大小，Gain值及扫描速度、Frame Size、Average等参数。

然后，选择感兴趣的Track进行预览，并将视野移动至感兴趣区域的边缘位置。打开Tile Scan工具栏，在Convex hull界面下，点击虚拟扫描区域左上角的Add按钮，将当前视野添加至工具栏下方的Marked position列表中。同时在虚拟扫描区域当中，加载的视野位置将以加粗的灰色方框标记出来 (Fig. 118)。

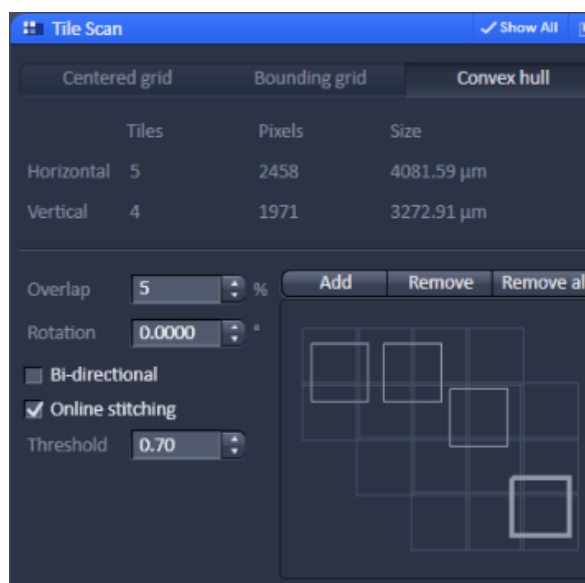


Fig 118 Convex hull 拼接模式

与之前的边缘视野定义法不同，在这种图像拼接方式中，软件将根据用户所设置的边缘视野，确定一个恰好覆盖所有选定边缘视野的不规则形状，以减少对不规则样品周围背景的扫描，因此应尽量将感兴趣区域边缘上的每一个拐点都选入Marked positions列表当中 (Fig. 119)。

此外，在选择边缘视野时，感兴趣区域的边缘应完整暴露在预览图像当中，以保证所设定的范围覆盖了整个感兴趣区域。

完成扫描区域边缘的定义后，在Channels工具栏中选择所有需要扫描的track，点击多维拍摄工具选择界面中的Start Experiment按钮，开始实验。软件会自动扫描指定区域。

点击虚拟扫描区域上方的Remove按钮，可以删除Marked positions列表中选定的视野；点击Remove all按钮，则会删除整个列表。点击Marked positions列表右下方的Save按钮，可以将视野位置列表保存至指定文件夹当中。而Load按钮用于加载预先保存的视野位置列表。

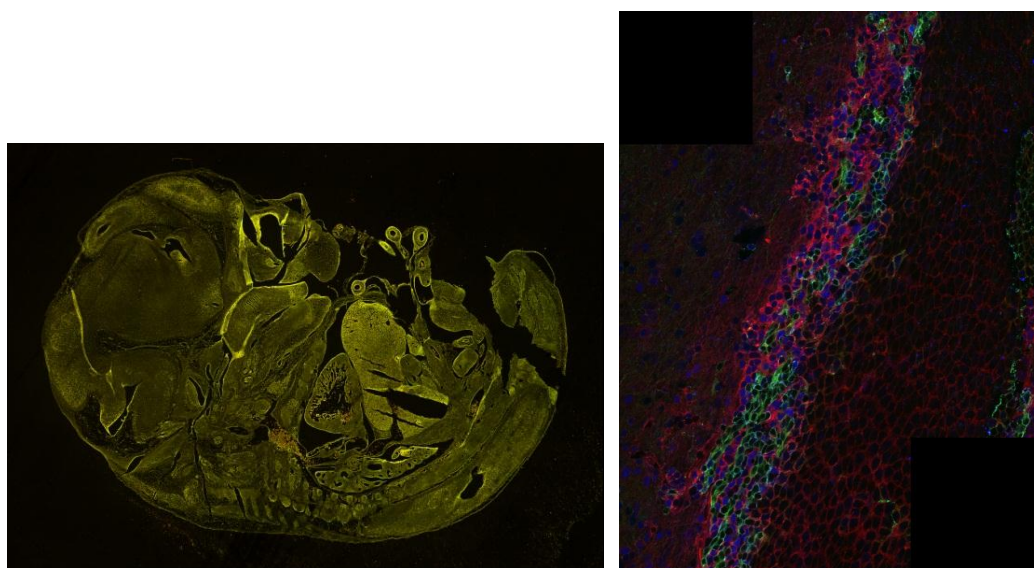


Fig 119 Bounding grid和Convex hull拼接图像的区别

7.1.4. 图像拼接处理

如果使用Tile Scan功能扫描图像时设定的Overlap为0，那么在扫描的同时软件无法对图像进行校准拼接，需要在完成图像扫描后，在Processing主页面中使用Stitch功能，完成对图像的比对校准拼接。

- 打开需要完成图像拼接处理的图像。
- 在Processing主页面的图像处理工具列表中选择Stitch功能。
- 在图像选择界面中点击Select按钮，导入当前图像窗口中打开的图像，其文件名自动出现在Input image右侧 (Fig. 120)。

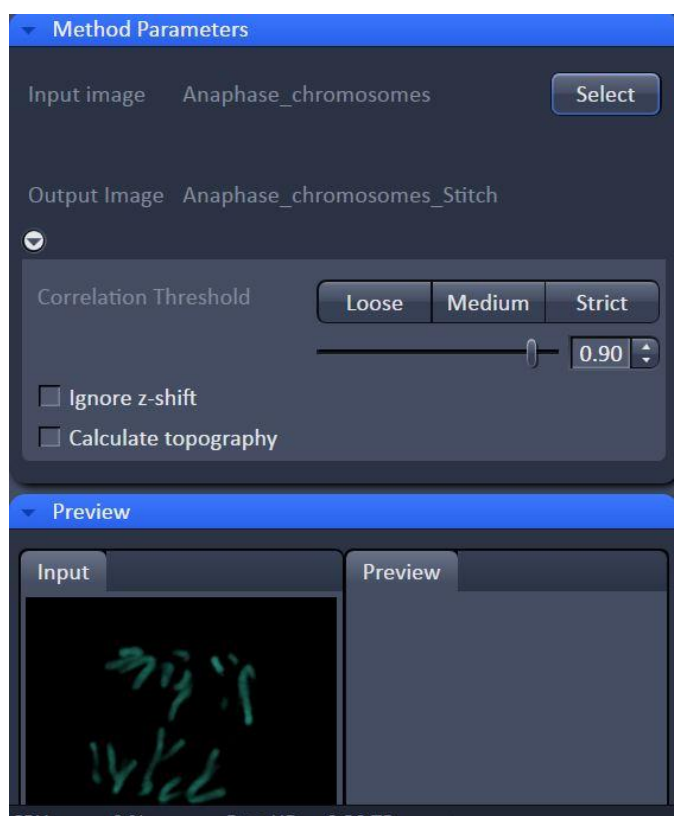


Fig 120 Stitch 参数设置界面

- 点击Output image下方的三角形按钮，打开图像处理参数设置界面。用户可以点击Correlation Thresholds参数右侧的按钮，设定软件比对相邻图片边缘相似度时的精确程度。Loose选项为精确度较低，Medium选项为中等精确度，Strict选项为高精确度。也可以直接拖曳选项按钮下的滚动条，或在滚动条右侧的输入框中直接输入数值，来定义精确程度。0为精确度最低，1为精确度最高。
- 如果导入的图像为Z-stack图像拼接，软件会自动弹出Ignore Z Correction复选框。勾选此复选框，软件将在拼接算法中去除对Z-stack图像的校准。对于部分图像来讲，反而可以获得最佳的拼接效果。
- 软件会在预览窗口中生成预览图像，供用户参考。
- 点击Apply按钮，软件会完成图像拼接，并将拼接结果生成一张新的图像。