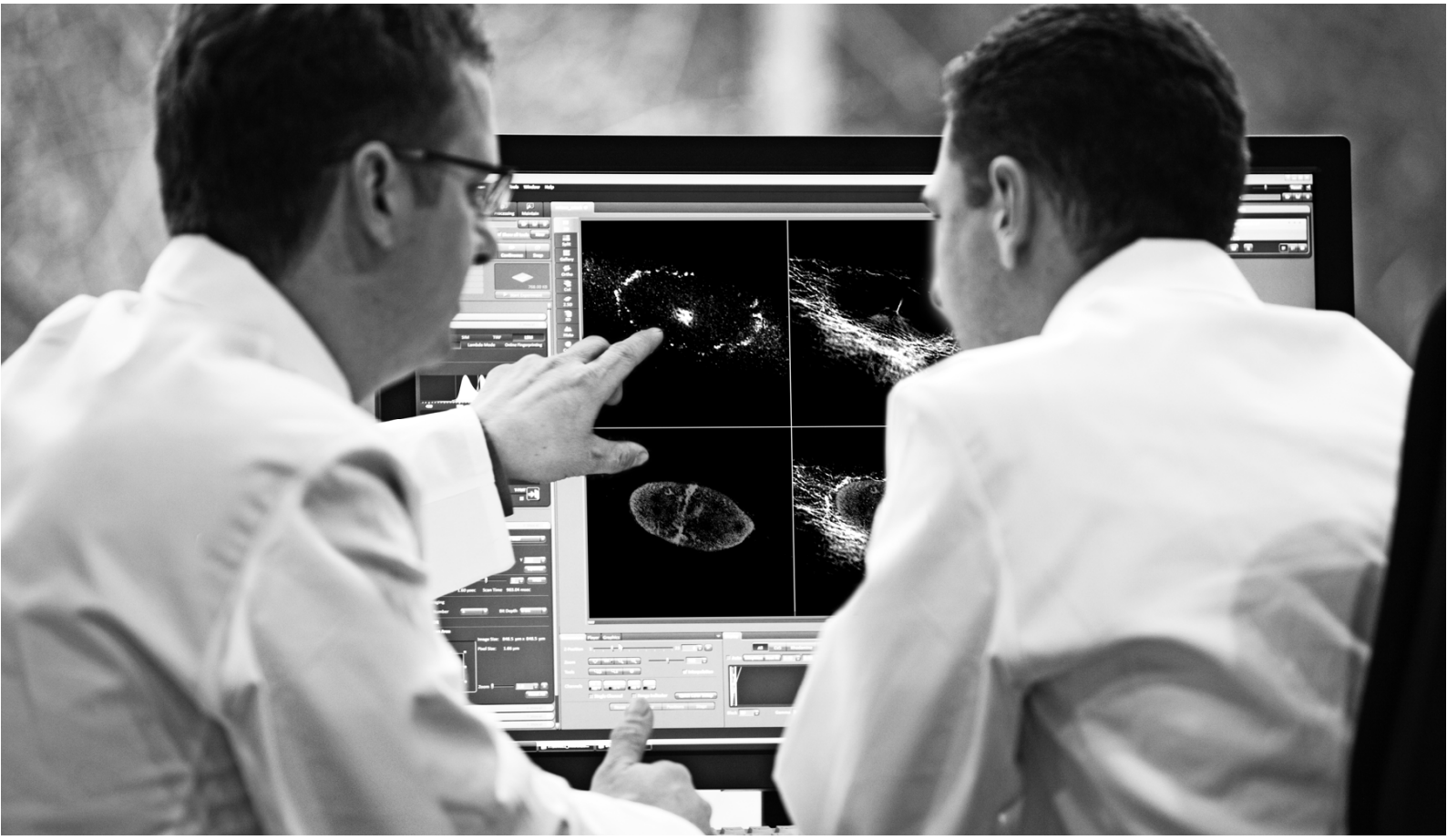
คู่มือการใช้งานสำหรับกล้องจุลทรรศน์

ZEISS Axio Imager M2 with ZEN



ZEISS

RUSHMORE PRECISION

ZEN 3.10 (Blue Edition), 2567

เริ่มต้นการใช้งาน

1. เปิดเครื่องสำรองไฟ
2. เปิดการใช้งานกล้องจุลทรรศน์ เริ่มจาก power supply ของกล้องจุลทรรศน์ > กดเปิดปุ่มเปิดด้านซ้ายมือของผู้ใช้งาน
3. เปิดการใช้งานคอมพิวเตอร์
4. เปิดการใช้งานโปรแกรมโดยการดับเบิ้ลคลิกที่ไอคอน ZEN Pro
5. เลือกเปิดเปิดควบคุมตามตัวอย่างที่ต้องการ

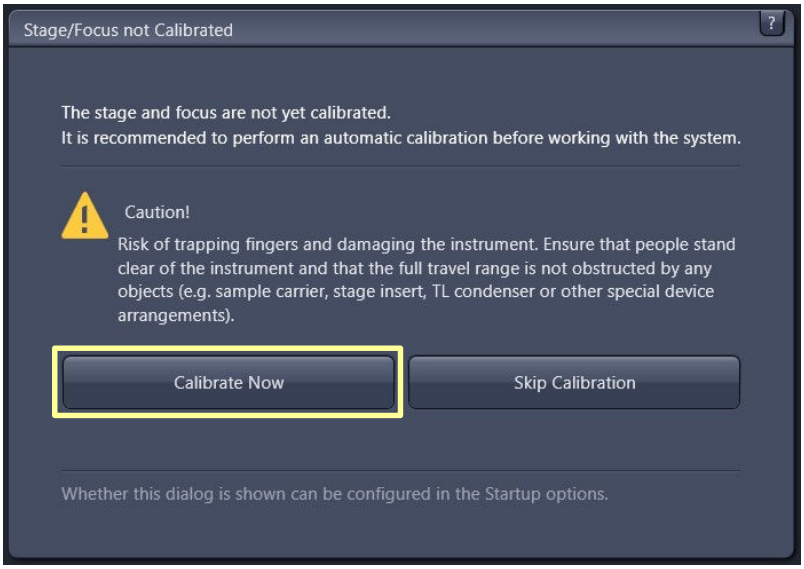
จบการใช้งาน

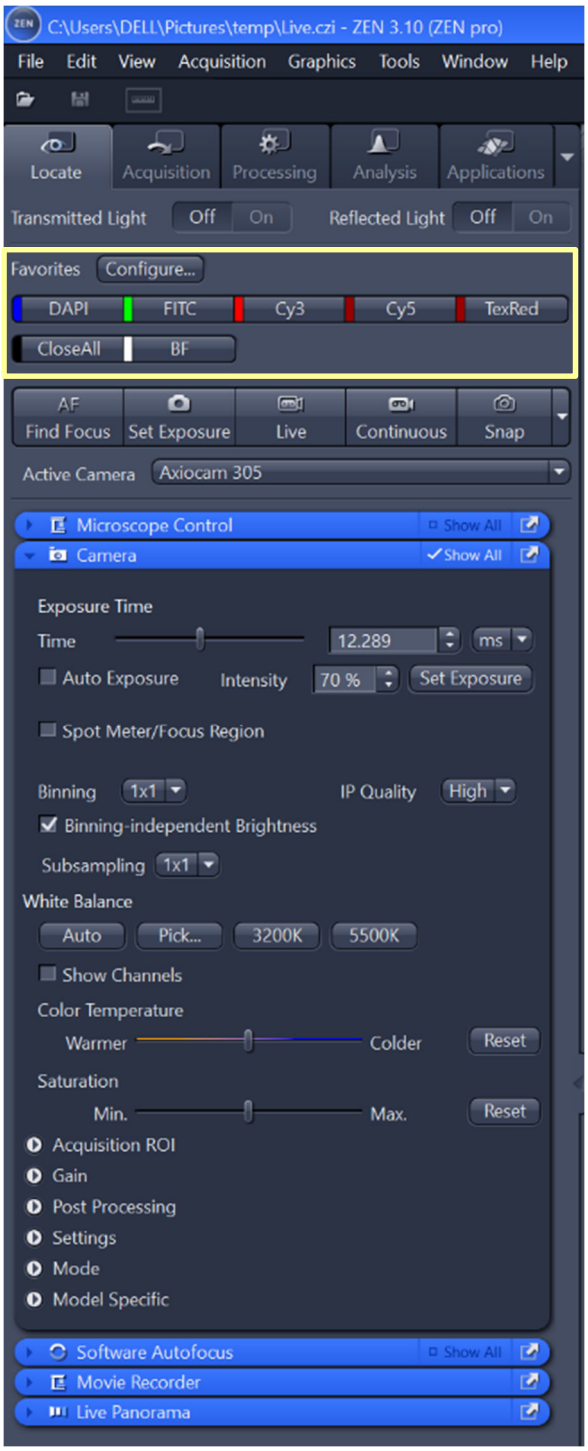
1. เปลี่ยน objective ไปที่หัวต่ำสุด และ แล้วนำ sample ออก (หากใช้งาน oil ให้เช็ดทำความสะอาดหัวเลนส์ด้วยกระดาษเช็ดเลนส์)

2. ปิดโปรแกรม (รอจนกว่าไอคอน ที่แถบเมนูด้านขวาล่างหายไป) > ปิดคอมพิวเตอร์ > ปิดกล้องจุลทรรศน์ **>** ปิด power supply ของกล้องจุลทรรศน์

เริ่มการใช้งานโปรแกรม ZEN

เมื่อเริ่มการทำงานกับโปรแกรม ZEN แล้ว โปรแกรมจะตรวจหาอุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ต่อกับระบบกล้องจุลทรรศน์ และขอให้ผู้ใช้ทำการ calibrate แท่นวางตัวอย่างดังแสดงในรูปด้านล่าง คลิกคำว่า **Calibrate Now**





Locate mode: เลือกตำแหน่งที่สนใจของตัวอย่างผ่านเลนส์ตาหรือกล้องดิจิทัล

หลังจากโปรแกรมพร้อมใช้งานแล้วจะเข้าสู่โหมด Locate โดยอัตโนมัติ ทั้งนี้ สามาเลือกว่าจะมองผ่านเลนส์ตาพร้อมกล้องสีหรือจะสลับไปที่กล้องขาว-ดำ สำหรับการถ่ายตัวอย่าง FL

<u>ปุ่ม Favorites สำหรับเลือกเทคนิคที่ต้องการใช้งาน</u>

DAPI: สีย้อมฟลูออเรสเซนซ์ในช่วง emission สีน้ำเงิน ได้แก่ DAPI, Hoechst 33342, Alexa Fluor 405 หรือสีอื่นที่ใกล้เคียงกัน

FITC: สีย้อมฟลูออเรสเซนซ์ในช่วง emission สีเขียว ได้แก่ FITC, GFP, eGFP, Alexa Fluor 488 หรือสีอื่นที่ใกล้เคียงกัน

Cy3: สีย้อมฟลูออเรสเซนซ์ในช่วง emission สีส้มแดง ได้แก่ Cy3, TRITC, Alexa Fluor 555 หรือสีอื่นที่ใกล้เคียงกัน

Cy5: สีย้อมฟลูออเรสเซนซ์ในช่วง emission สี far red ได้แก่ Cy5, APC, Alexa Fluor 647 หรือสีอื่นที่ใกล้เคียงกัน

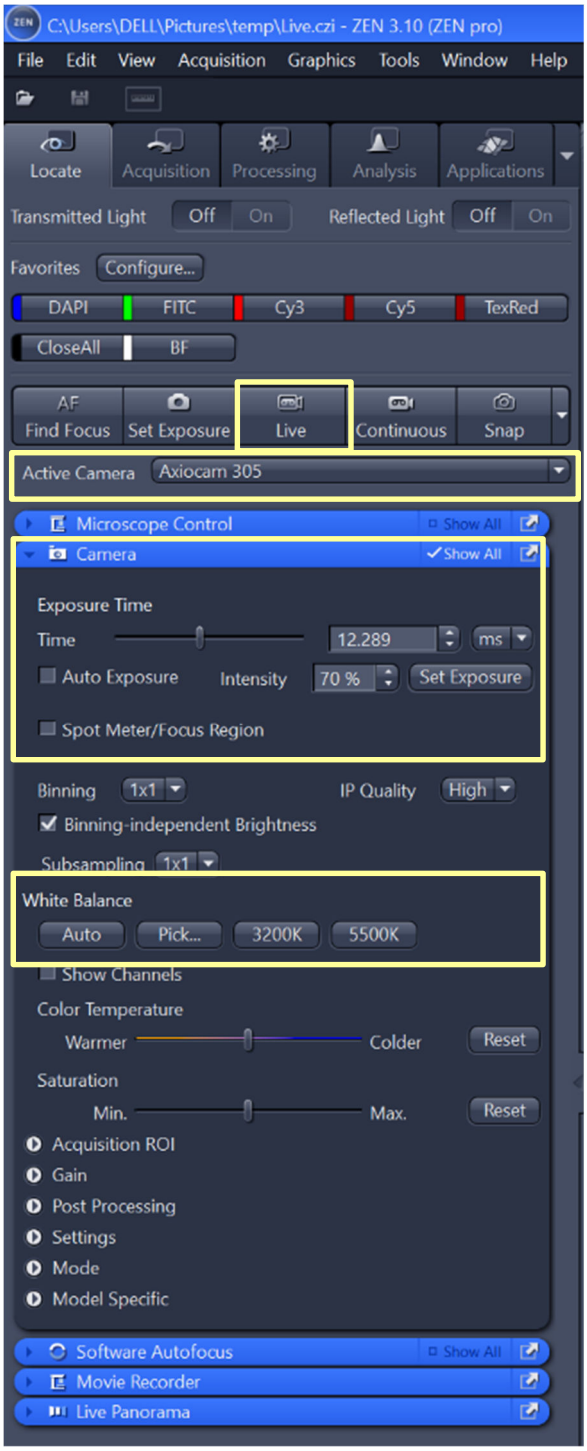
TexRed: สีย้อมฟลูออเรสเซนซ์ในช่วง emission สีแดง ได้แก่ MitoTracker RED FM/CMXRos, txRed, mCherry, Cy3.5 หรือสีอื่นที่ใกล้เคียงกัน

BF: Brightfield

สามารถเปลี่ยนเลนส์วัตถุที่ใช้เก็บภาพโดยเลือกจาก ด้านซ้ายมือ หรือหน้าต่าง **Microscope** ด้านขวามือ

เมื่อเสร็จแล้วให้ปิดทางเดินแสงทั้งหมดโดยเลือกที่ **Close All**

การพรีวิวภาพและการเก็บภาพจากกล้องดิจิตอล



1. เลือกกล้องให้เหมาะกับการใช้งานที่ Active Camera : Axiocam305 สำหรับภาพสีและดันดันก้านสีเงินที่หัวกล้องด้านขวามือไปสุด (จะยังมองเห็นภาพที่ตาไปพร้อมกันด้วย)
Axiocam807 สำหรับภาพขาว - ดำ และดึงก้านสีเงินที่หัวกล้องไปจนสุด

2. เลือกปุ่ม Live เพื่อแสดงภาพ

3. สามารถปรับความสว่างของไฟและภาพ (Exposure Time) ผ่านหน้าต่าง Camera และหากถ้าเป็นกล้องสีให้ปรับ white balance สำหรับการปรับโทนสีของภาพด้วยปุ่ม Auto หรือ Pick

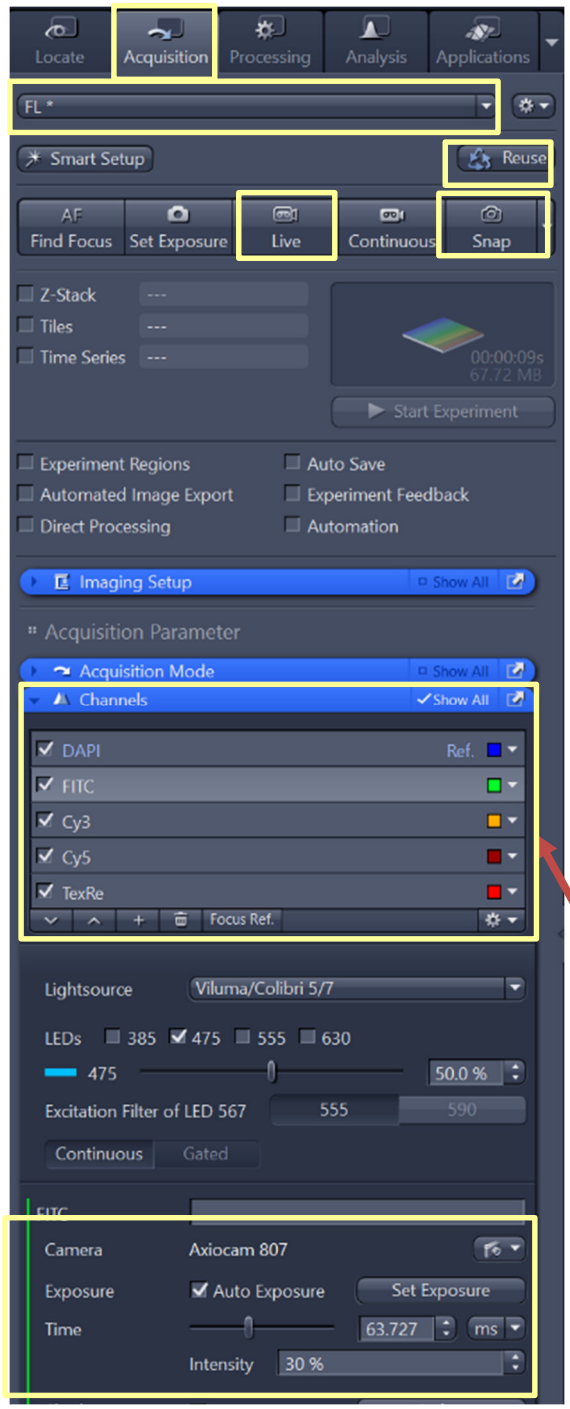
4.ภาพที่แสดงสามารถเก็บภาพไว้ได้โดยเลือก **Snap** และบันทึกภาพ โดยเลือกภาพที่ต้องการบันทึก > File > Save as with option > ตั้งชื่อไฟล์และเลือกfile type ซึ่งหากถ้าไม่เลือก จะเป็นไฟล์ .CZI

Acquisition Mode: การเก็บภาพ Multichannel, Z-stack, Tiles, Time- laps

การเก็บภาพฟลูออเรสเซนซ์ (FL)

ไปที่แท็ป Acquisition เลือกการตั้งค่าการถ่ายภาพจาก experiment ที่ถูกกำหนดไว้แล้วผ่านรายชื่อใน Experiment Manager หรือดึงค่าที่เคยตั้งไว้จากไฟล์ czi ด้วยปุ่ม *Reuse*

เมื่อเลือกโหมดในการเก็บภาพแล้ว หน้าต่างต่าง ๆ จะแสดงค่าในการเก็บภาพดังนี้



Acquisition Parameter: Channels

1. เลือก channel ที่ต้องการถ่ายภาพ ✓ในช่องสีที่ต้องการถ่ายภาพ

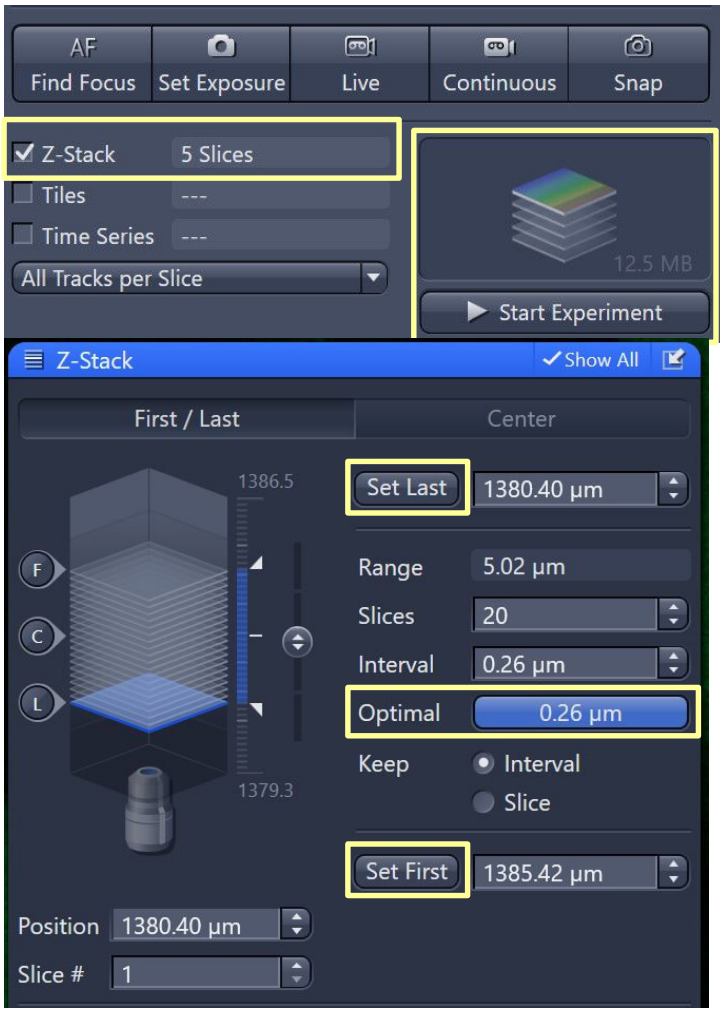
2. เลือกช่วงสีที่ต้องการมองภาพ Live view ด้วยการคลิ๊กซ้ายในช่องสีที่ต้องการ เช่น ต้องการดูภาพช่วงแสงสีเขียว ให้กดที่ FITC จะมีสีเทาขึ้นที่ช่องของ FITC และกดปุ่ม **Live** ที่มุมบนซ้ายของหน้าจอเพื่อแสดงภาพ

3. โปรแกรมสามารถปรับค่าการเปิดหน้ากล้องได้อย่างอัตโนมัติโดยการกด ✓ **Auto Exposure** หรือพิมพ์ค่าที่คงที่ในช่องตัวเลขใน Time โดยสามารถปรับแยกกันได้ทุกช่วงสี

4. และปรับค่าเสร็จแล้วให้กด **Stop** และเลือก **Snap เพื่อเก็บภาพ** ซึ่งภาพที่ได้จะเป็นการรวมทุกสีที่มีการ ✓ ไว้

Sample : หากเลือกตามในรูปภาพจะได้ภาพทั้งหมด 5 ช่วงคลื่นในภาพเดียว

การเก็บภาพแบบ Z-Stack (การเก็บภาพตัวอย่างแบบหลายชั้น)

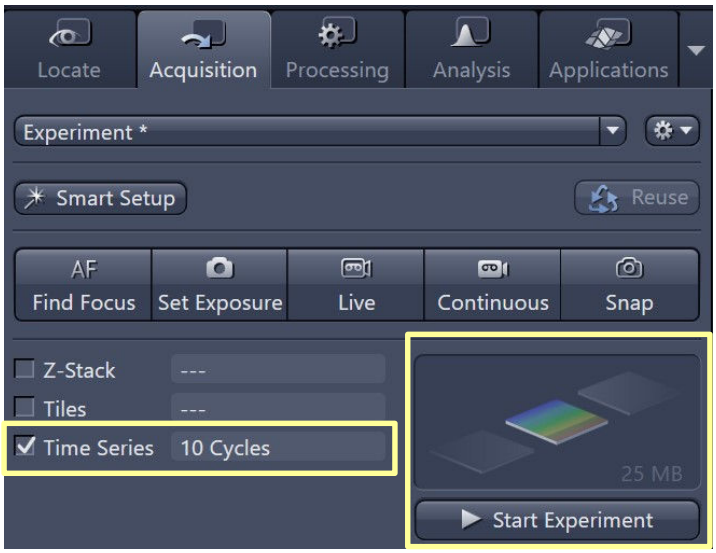


เมื่อเลือกโหมด **Z-Stack** ดังภาพทางซ้ายมือ การตั้งค่าในการถ่ายภาพ Z-stack จะขยายขึ้นมาอัตโนมัติ

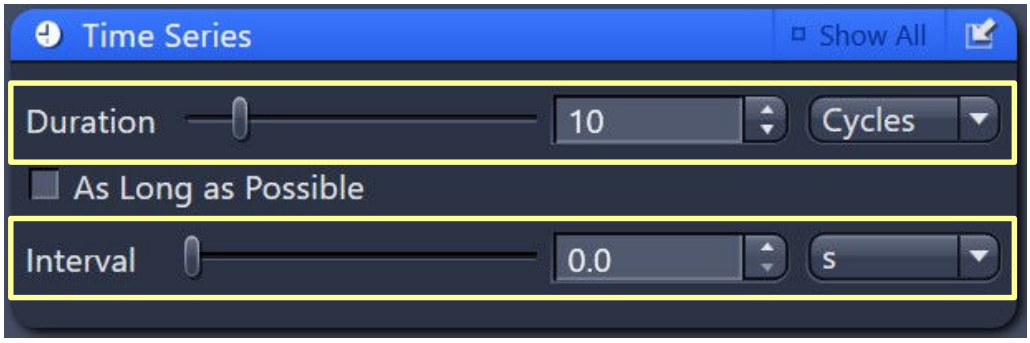
1. เลือกการถ่ายภาพแบบ Z-stack จากการกำหนดตำแหน่งบนสุดและล่างสุด (**First/Last**) สำหรับตัวอย่างที่ไม่ทราบความหนาที่แน่นอน โดยกด **Live** เพื่อแสดงภาพบนหน้าจอ
2. หมุนโฟกัสไปที่ตำแหน่งบนสุด จากนั้นกด **Set First** เพื่อบันทึกตำแหน่ง
3. จากนั้นหมุนโฟกัสไปในทิศทางตรงข้าม จากนั้นกด **Set Last** เพื่อบันทึกตำแหน่ง
4. เลือก **Optimal** โปรแกรมจะทำการคำนวณจำนวนชั้นให้โดยอัตโนมัติซึ่งจะปรับตามความเหมาะสมหรือ จะเลือกความหนาเองในช่อง interval

เมื่อเสร็จแล้วหยุดภาพโดยกดที่ **Stop** และเริ่มเก็บภาพ Z-Stack เมื่อกดที่ **Start Experiment**

การเก็บภาพแบบ time series



เมื่อเลือกโหมด **Time Series** ดังภาพทางซ้ายมือ การตั้งค่าในการถ่ายภาพแบบ time series จะขยายขึ้นมาอัตโนมัติ ทั้งนี้ สามารถเก็บภาพฟลูออเรสเซนส์หลายสีและ Z-Stack ร่วมกับการเก็บภาพ time series ได้

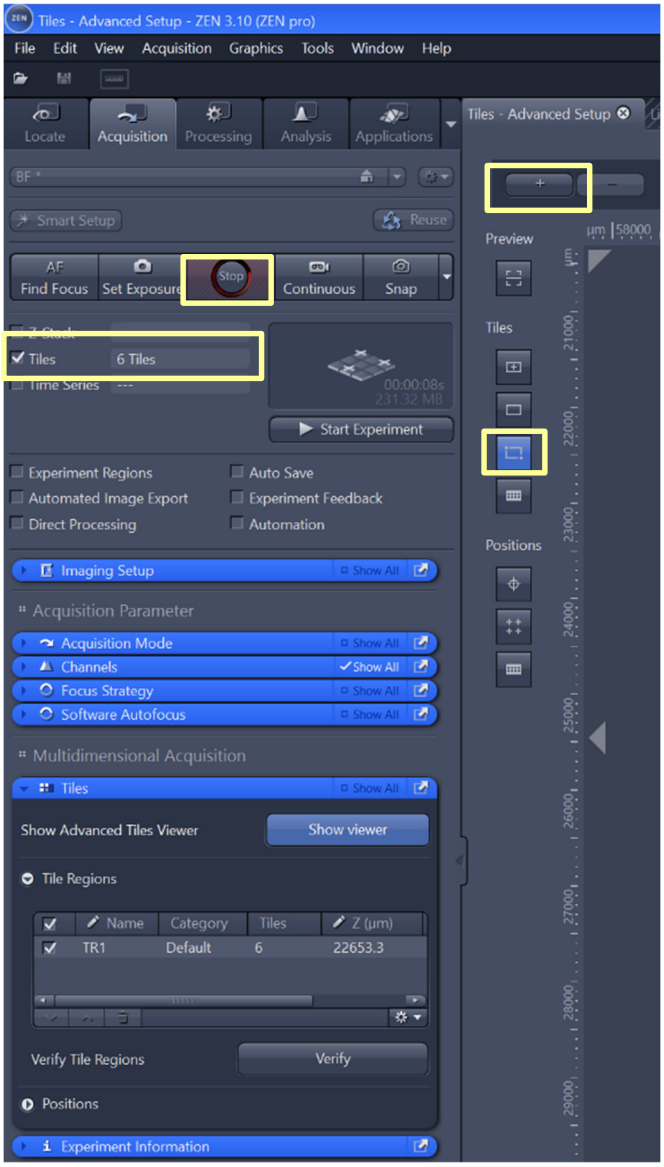


Duration: เป็นการกำหนดระยะเวลาในการเก็บภาพทั้งหมด โดยสามารถกำหนดได้เป็นรอบ (cycles) หรือเวลา (หน่วยเป็นมิลลิวินาที วินาที นาที ชั่วโมง หรือวัน) หากไม่กำหนด cycles สามารถหยุดการทดลองได้เองผ่านการเลือก As Long as Possible

Interval: เป็นการกำหนดระยะห่างระหว่างการเก็บภาพในช่วงเวลาที่กำหนด (หน่วยเป็นมิลลิวินาที วินาที นาที ชั่วโมง หรือวัน)

เริ่มเก็บภาพ time series โดยคลิก **Start Experiment**

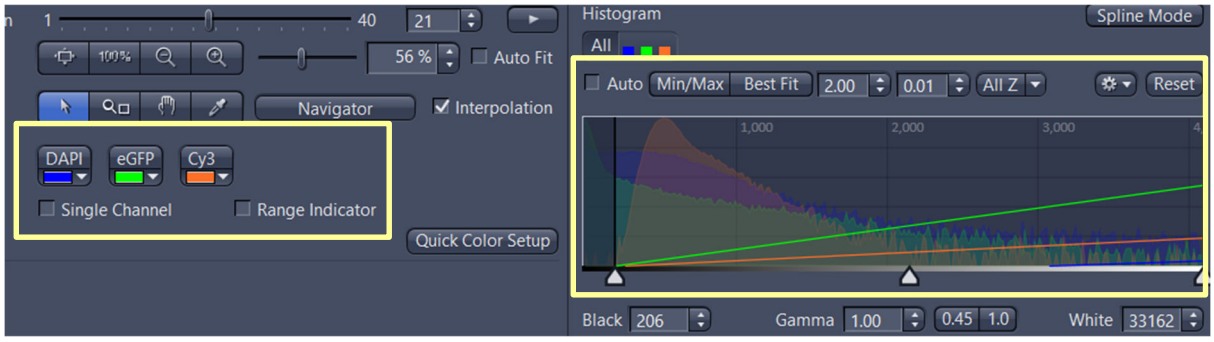
Acquisition Mode: การเก็บภาพ Tiles (การเก็บภาพตัวอย่างขนาดใหญ่)



1. เมื่อเลือกโหมด **Tiles** ดังภาพทางซ้ายมือ การตั้งค่าในการถ่ายภาพ Tiles จะขยายขึ้นมาอัตโนมัติ
2. กด Show viewer เพื่อเริ่มทำการเลือกพื้นที่ที่ต้องการถ่าย ซึ่งจะมีหน้าต่าง Tiles – Advance Setup แสดงขึ้นมาที่ด้านขวา และกด Live เพื่อดูภาพปัจจุบัน
3. เลือกโหมดในการเก็บ Tiles ในโหมดที่ 3 (X,Y) เลื่อนไปที่มุมบนสุดที่ที่ต้องการและกดปุ่ม + เพื่อบอกจุดเริ่มต้นในการเก็บ แล้วเลื่อนไปตามมุมต่างๆ กดปุ่ม + ไปเรื่อยๆจนครบพื้นที่ที่ต้องการ
4. เมื่อเสร็จแล้วหยุดภาพโดยกดที่ **Stop** และเริ่มเก็บภาพ เมื่อกดที่ **Start Experiment**

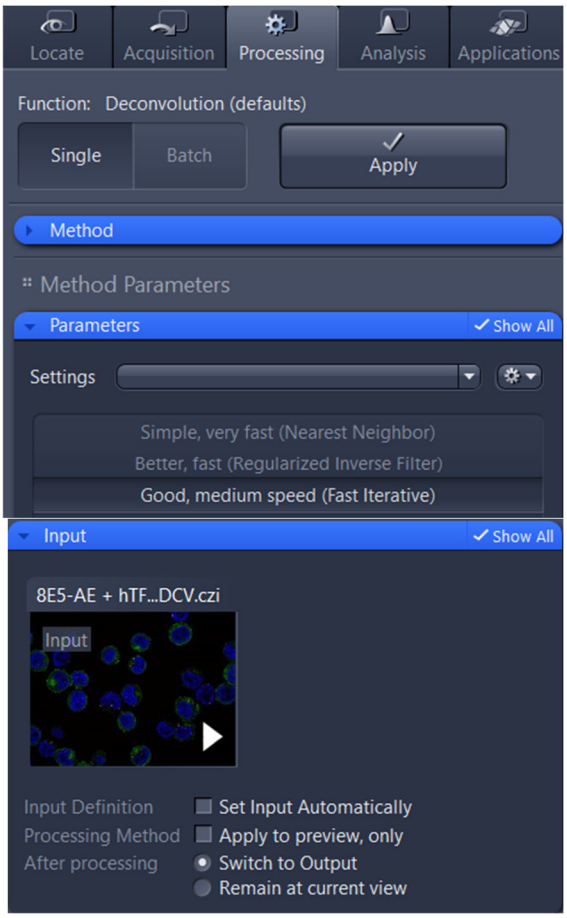
Image Processing Mode: การปรับภาพหลังถ่าย

- **การปรับกราฟ Histogram** (ค่าสี RGB) เพื่อปรับสีของภาพสามารถเลื่อนในแถบ histogram ที่อยู่ด้านล่างของภาพ



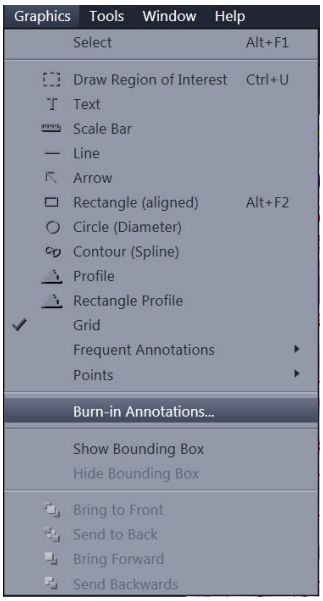
โดยหากเป็นภาพ FL จะสามารถปรับแต่ละ channel ด้วยการเลือก Single Channel เลือกกดแต่ละสีในภาพ แล้วจึงค่อยปรับกราฟ เสร็จแล้วติ๊กออกจะได้ภาพที่มีครบทุก channel ดังเดิม

- **การปรับภาพ Deconvolution (ใช้สำหรับภาพ FL)**



1. ไปที่แทบ Processing เลือก method เป็น Deconvolution
2. เลือก input ที่ต้องการ
3. ปรับ Parameters ตามต้องการซึ่งจะให้ผลและเวลาในการประมวลผลที่ต่างกัน
4. เลือก Apply เพื่อดำเนินการ ซึ่งจะมีภาพใหม่แสดงขึ้นมาในแท็ปภาพสุดท้าย

Image Analysis Mode: การวัดเบื้องต้น (วัดขนาด, ใส่ scale bar)



*โหมดนี้สามารถใช้งานใน ZEN lite

เลือกภาพที่ต้องการวัด เข้าไปที่ **Graphics** จะมีเครื่องมือในการวัดต่างๆ เช่น

การเลือกพื้นที่ ROI, การใส่ข้อความ, การใช้ scale bar

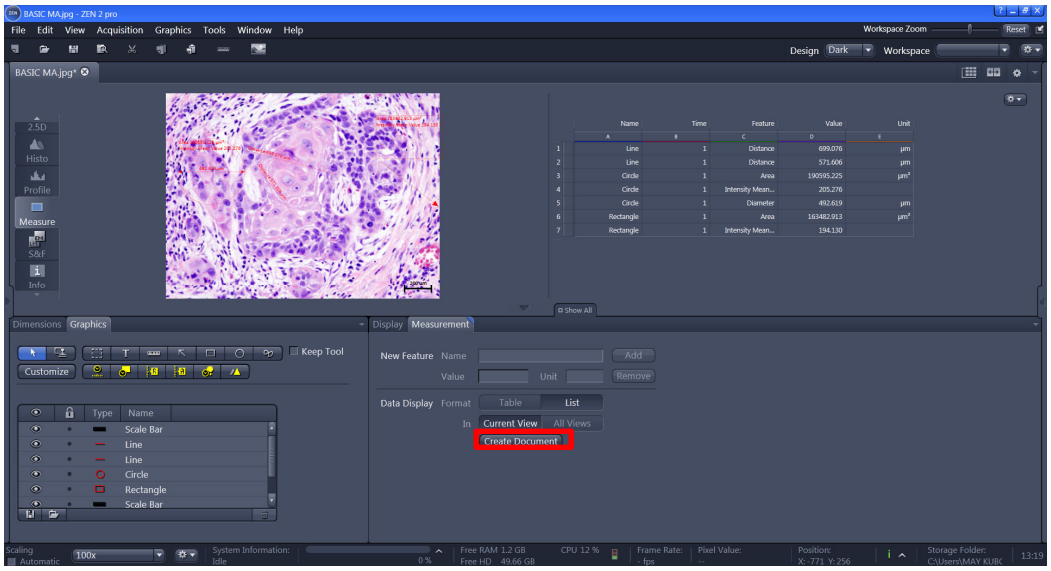
การวัดระยะ, การใส่ลูกศร, การวัดขนาดสี่เหลี่ยม วงกลม เป็นต้น

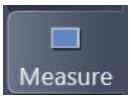
สามารถใส่ค่าต่างๆได้ โดยไปที่ **Frequent Annotations**

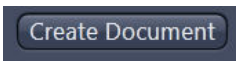
ซึ่งจะมี เวลาการถ่าย , ตำแหน่ง focus และ ค่า Exposure time เป็นต้น

*หาก save รูปเป็นไฟล์รูปทั่วไป แล้วไม่มีค่า scale bar หรือ ค่าmeasure ในภาพนั้นให้กดที่ **Burn-in Annotations** เพื่อทำการ merge เข้ากับ scale bar หรือ ค่าmeasure

สำหรับการ **Export Table**

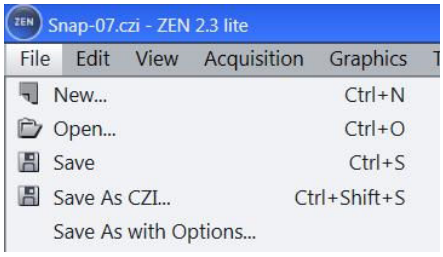


1.ไปที่ 

จากนั้นใน tap **Measurement** คลิกที่ 

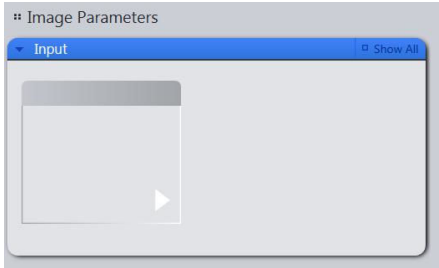
2.จะขึ้นเป็นตาราง หากต้องการจะ save ตารางไปที่ **File** > **Save As** (สามารถ save file ได้ 3 รูปแบบคือ .czt, .csv และ .xml)

การบันทึกไฟล์ภาพ

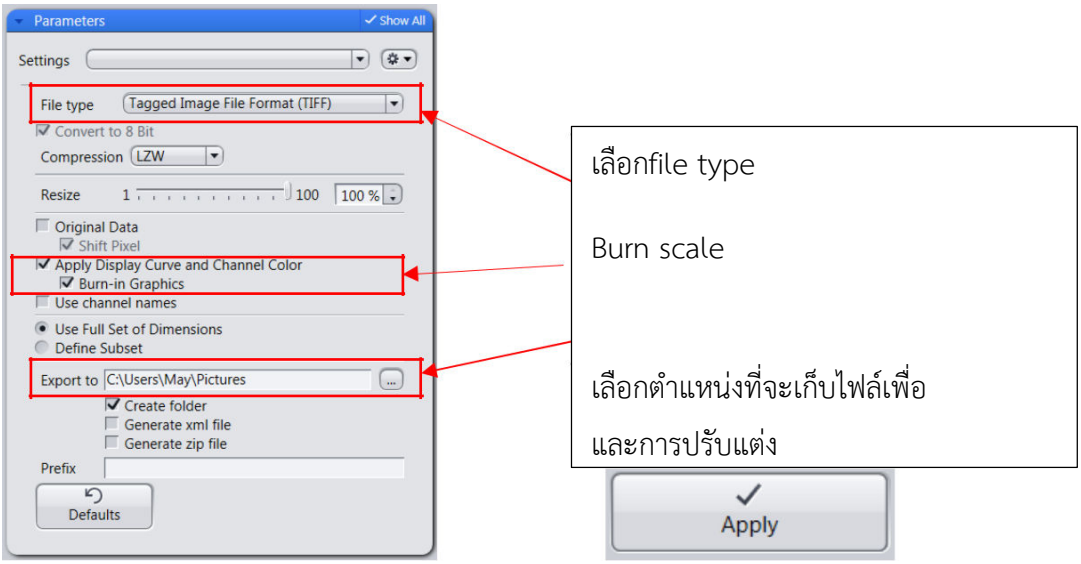


1.การบันทึกภาพ ไปที่File Save จะเป็นการ**save** file นามสกุล CZI. หรือsave ซ้ำไฟล์เดิม **Save As CZI** จะเป็นการsave file นามสกุล CZI. หรือ **Save As with Options** เพื่อเลือกเซฟในนามสลุกอื่น

2.หากต้องการExport เป็นไฟล์ภาพนามสกุลอื่น

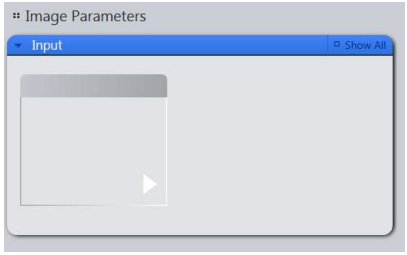


ไปที่**File** > **Export/Import** > **Export** เลือก input image

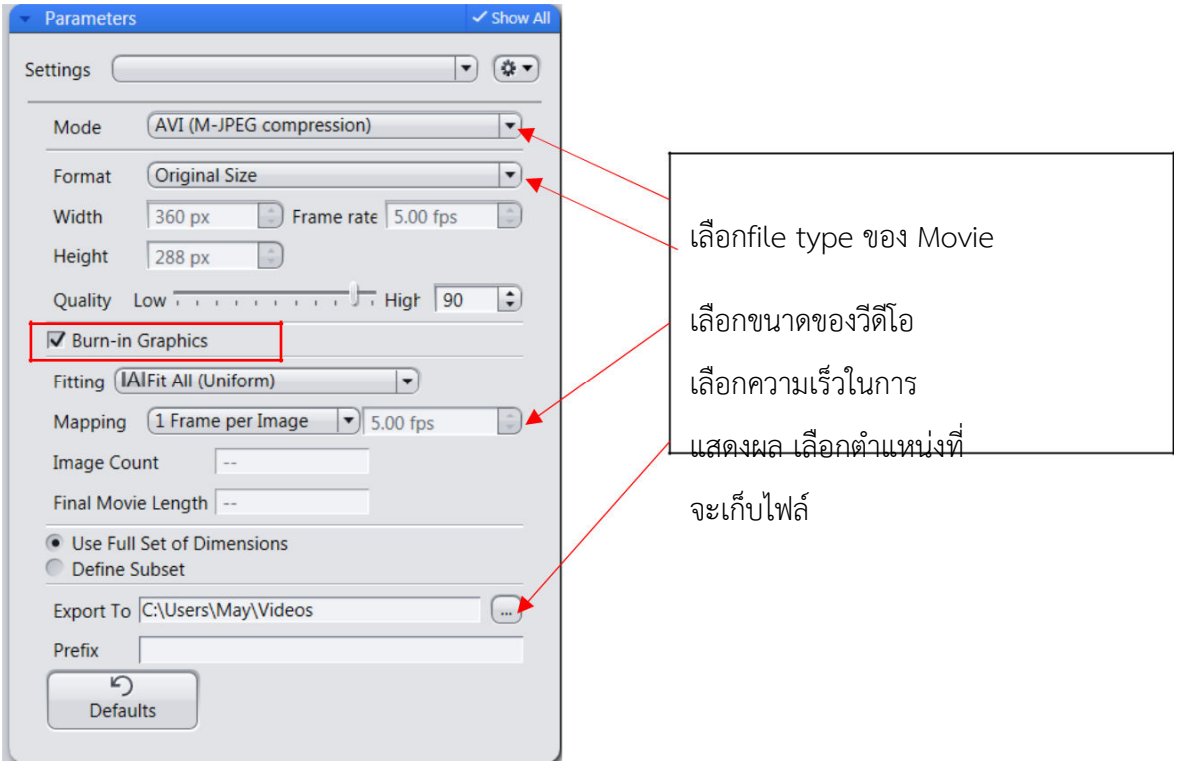


การบันทึกไฟล์วีดีโอ

1. ไปที่**File** > **Export/Import** > **Movie Export** เลือก input image



2.



3. จากนั้นกด

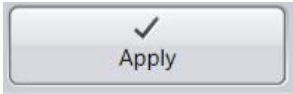
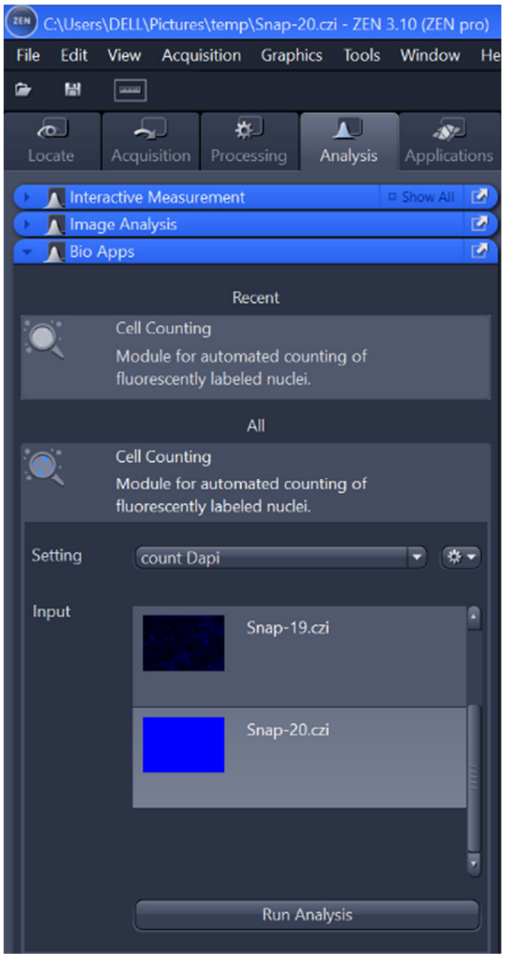


Image Analysis Mode: การนับ Cell แบบ automatic ด้วย Ai



1. ไปที่ Analysis เลือก Bio Apps เลือก Cell Counting
2. เลือก Setting ที่ต้องการ
3. เลือกภาพที่ต้องการนับcell แท็ป input
4. กด Run Analysis เพื่อเริ่มการนับิ เมื่อเรียบร้อย

โปรแกรมจะแสดงผลการนับและตารางการนับ ที่แท็ป Bioapp ของรูปภาพ

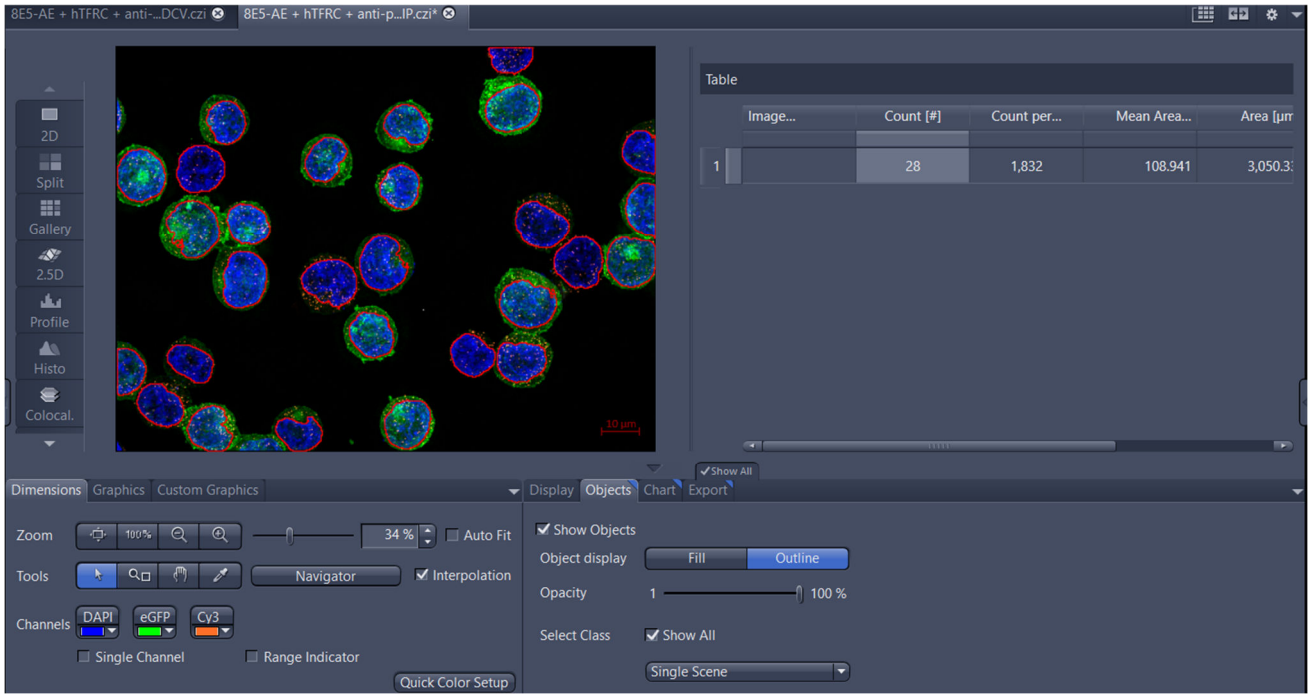
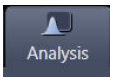
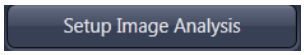
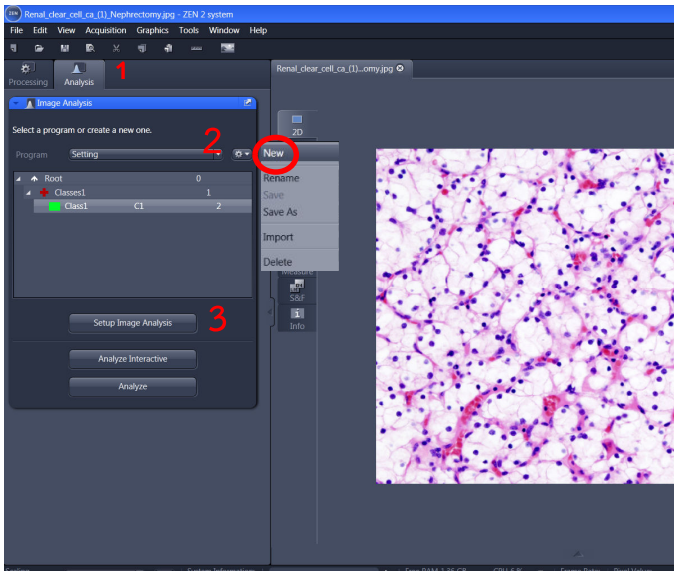


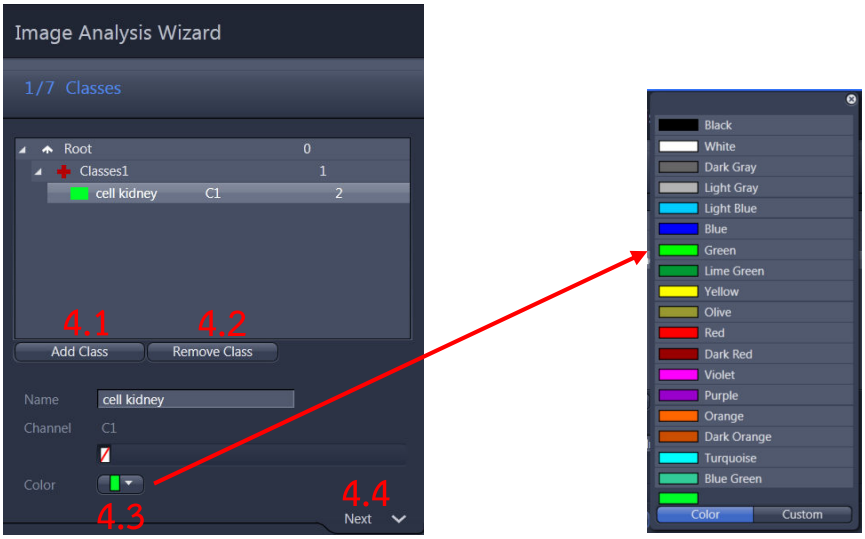
Image Analysis Mode: การวัดแบบอัตโนมัติแบบสร้างขั้นตอนเอง

1. เมื่อทำการเก็บภาพเรียบร้อยแล้ว ไปที่แท็ป 

2. เลือก **New** เพื่อตั้งชื่อตัวอย่างที่จะนำมาวิเคราะห์
3. คลิกที่ 



4. โปรแกรมจะแสดงหน้าต่างการตั้งค่าสำหรับการแบ่งกลุ่มในการนับตัวอย่าง (Classes)
    - 4.1 สามารถเพิ่มกลุ่มในการนับตัวอย่างโดยการกด **Add Class**
    - 4.2 สามารถลบกลุ่มในการนับตัวอย่างโดยการกด **Remove Class**
    - 4.3 สามารถกำหนดสีของกลุ่มโดยการเลือกสีที่ปุ่ม **Color**
    - 4.4 เลือก **Next** เพื่อเข้าสู่ขั้นตอนถัดไป

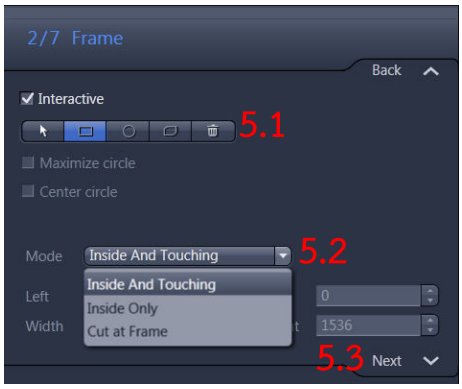


5. เลือกบริเวณของตัวอย่างที่ต้องการนำมาวิเคราะห์

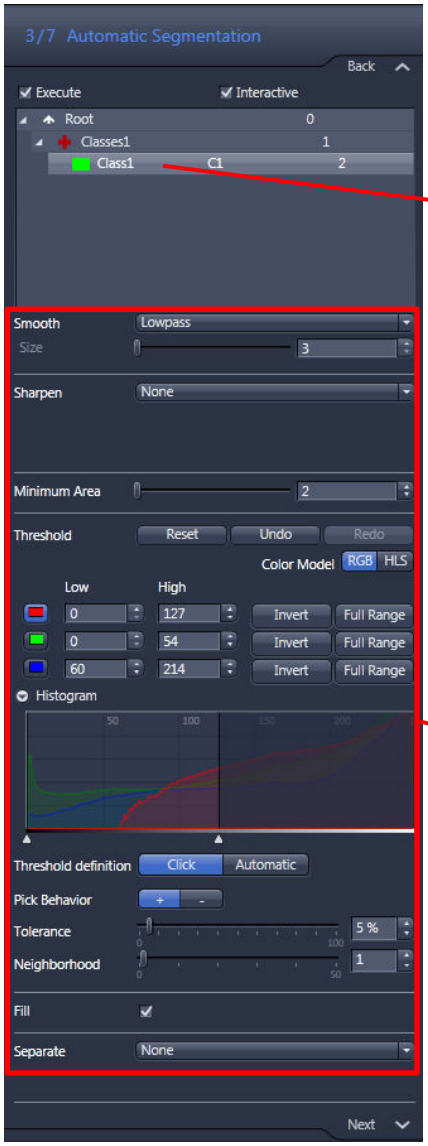
   5.1 เลือกเครื่องมือในการกำหนดพื้นที่ ที่จะนำมาใช้ในการวิเคราะห์

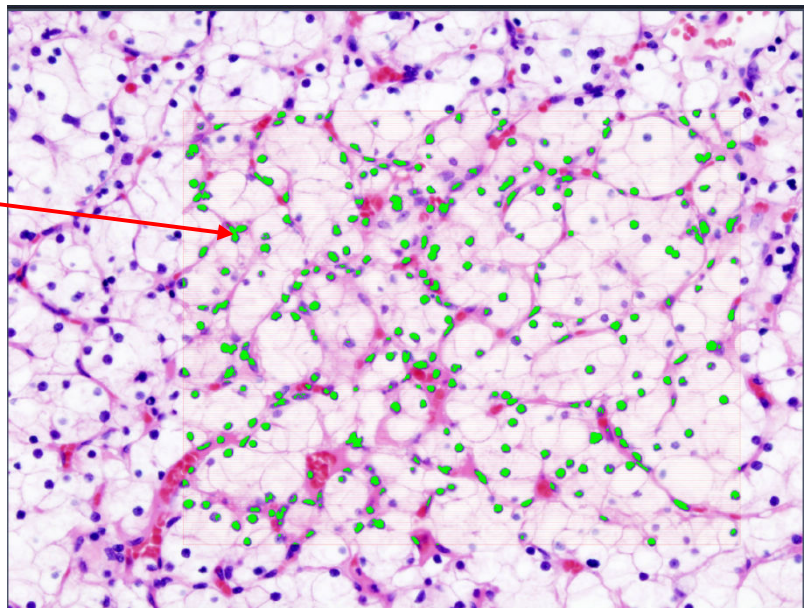
   5.2 เลือกโหมดที่ใช้กำหนดบริเวณที่ใช้ในการวิเคราะห์

   5.3 เลือก Next เพื่อเข้าสู่ขั้นตอนถัดไป



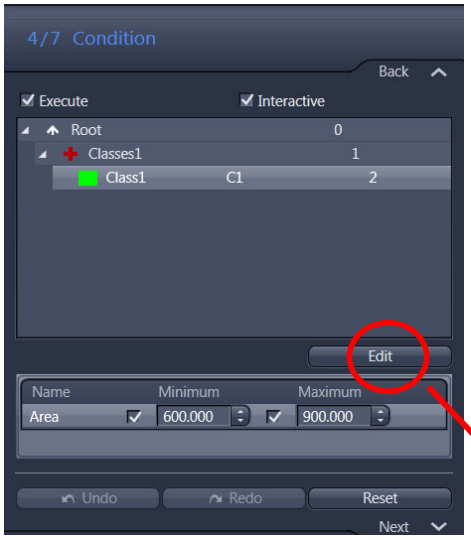
6. แสดงขั้นตอนการกำหนดบริเวณพื้นที่ของตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ สามารถทำได้โดยเลือกไปที่ตัวอย่างที่สนใจจะวัด และสามารถใช้ฟังก์ชั่นสำหรับการปรับการตั้งค่าในการวิเคราะห์ภาพได้ จากนั้นกด **Next**

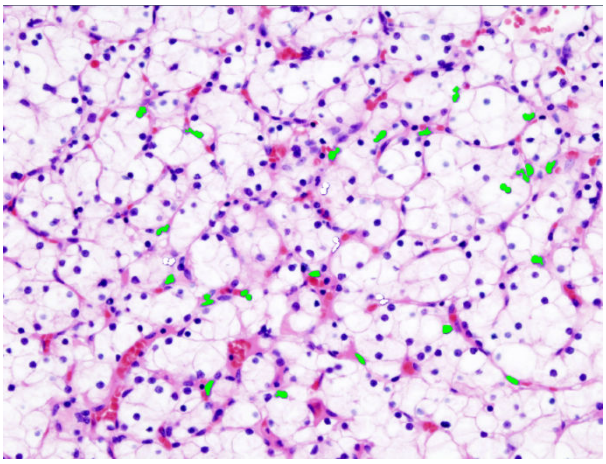


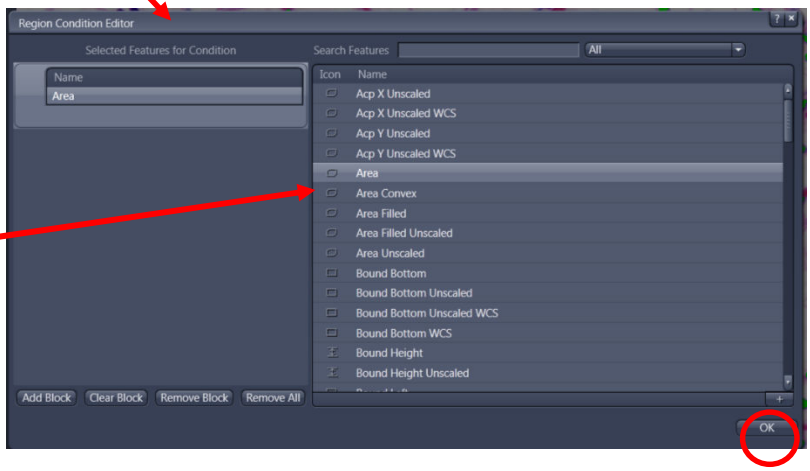


ฟังก์ชั่นสำหรับการปรับตั้ง
ค่าในการวิเคราะห์ภาพ

7. กำหนด Condition ของตัวอย่างได้ โดยเลือก **Edit** โดยโปรแกรมจะแสดงหน้าต่าง Condition parameter ต่างๆที่สามารถนำมาวิเคราะห์ตัวอย่างได้ สามารถเลือกได้โดยการดับเบิลคลิก จากนั้นกด **OK** แล้วกด **Next**

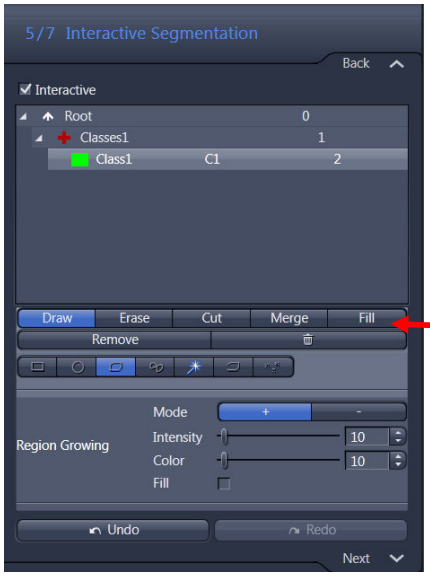






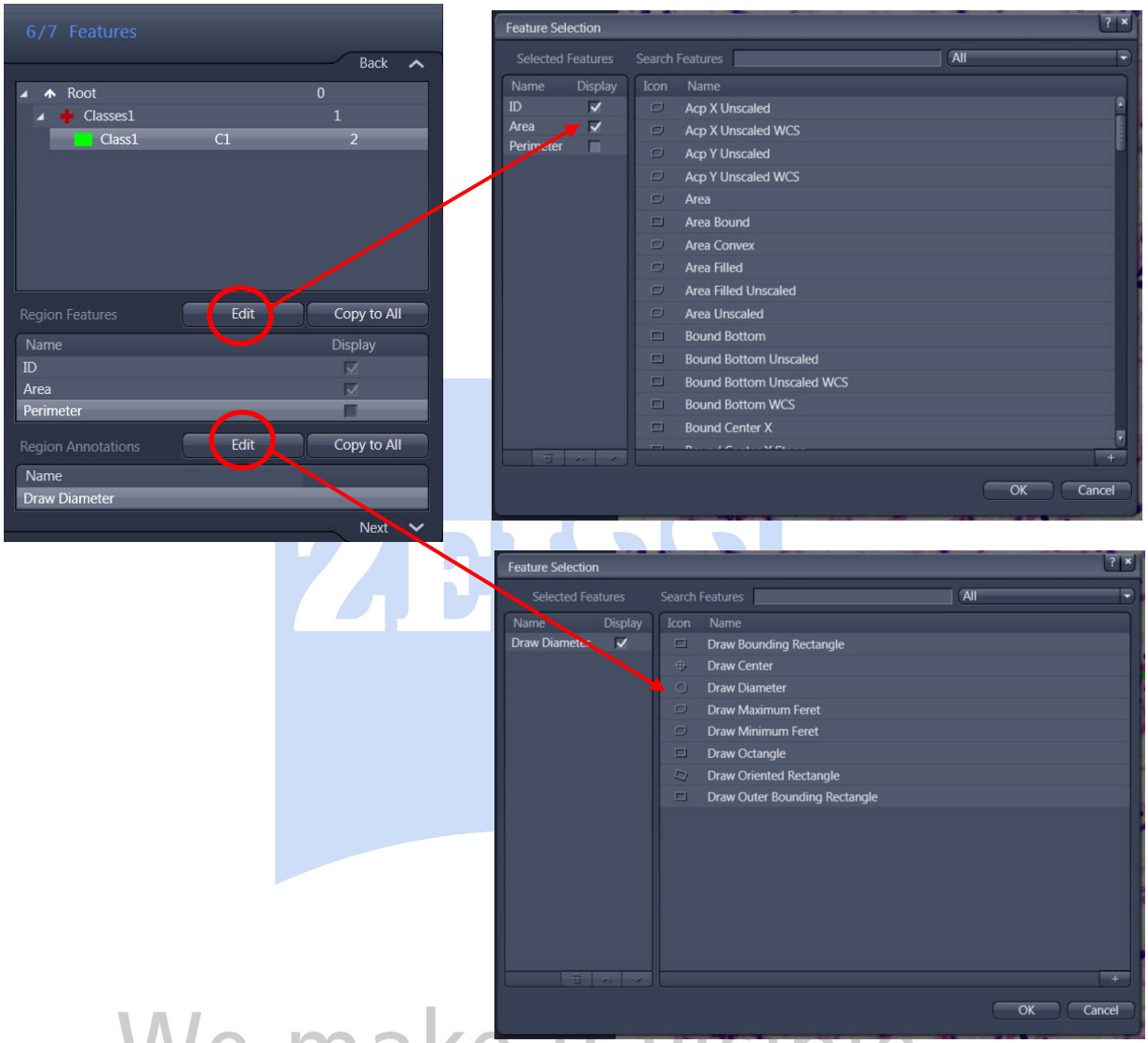
Condition parameter

8. สามารถแก้ไขการตั้งค่าของตัวอย่างได้จากแทบเครื่องมือ เช่น การแยกตัวอย่าง ลบตัวอย่าง เป็นต้น จากนั้นกด **Next**



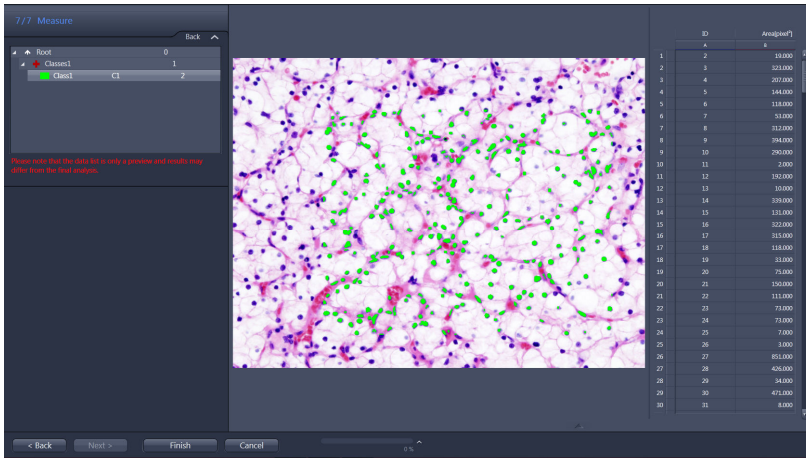
แถบเครื่องมือ

9. สามารถปรับตั้งค่า parameter ในการวิเคราะห์และแสดงผลตัวอย่างได้ จากนั้นกด **Next**

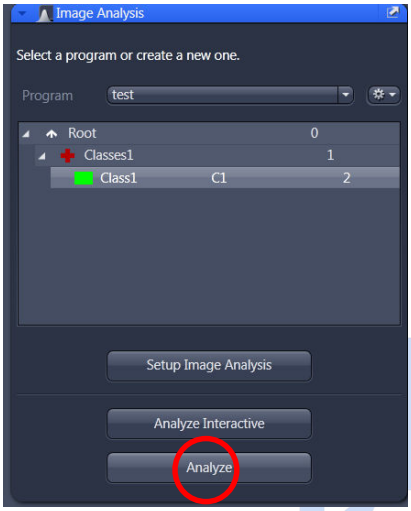


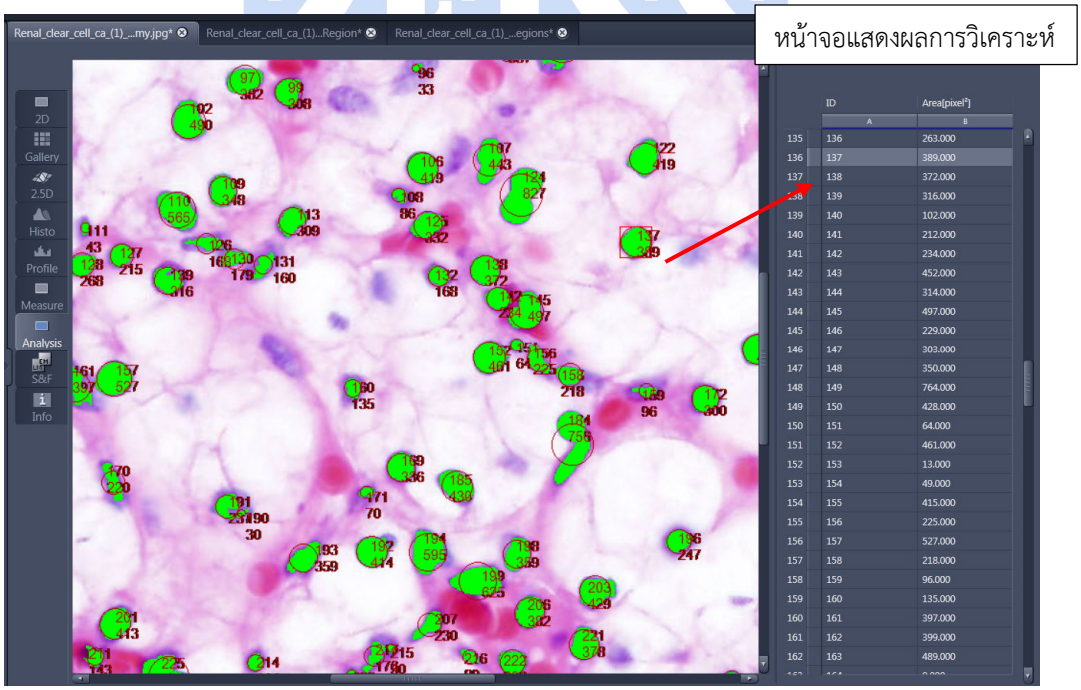
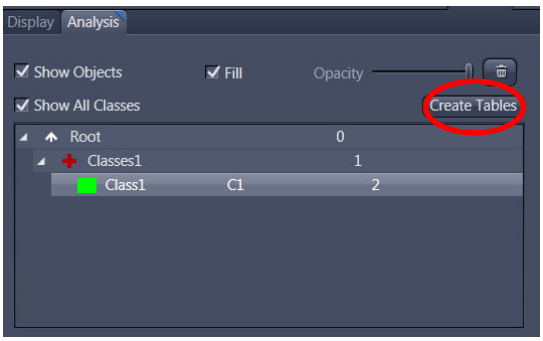
We make it visible.

10. โปรแกรมจะแสดงผลการวิเคราะห์ จากนั้นกด **Finish**



11. ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างหลังจากการตั้งค่า จากข้อ 1-10 โดยการกด **Analyze** โปรแกรมจะแสดงผลการวิเคราะห์ออกมา





12. สามารถแสดงผลเป็นตาราง และผลสรุปการนับจำนวนโดยการกด **Create Tables**