

一、开机

1. 依次打开电脑桌右侧“PC Microscope”、“Scanner Power”及“Laser Power”三个圆形按钮，然后将“Laser Power”按钮右侧的激光开关钥匙（Laser Emission）顺时针旋转 90 度至“On-1”位置。如图 1-1。记录开机时间。



图 1-1 SP5 系统开关

2. 打开显微镜电源（如图 1-2），及荧光电源。

荧光系统若以汞灯为光源，参照图 1-3；若以金属卤素灯为光源，参照图 1-4。如有必要，记录荧光灯使用时间。



图 1-2 显微镜电源（1.指示灯；2.电源开关）

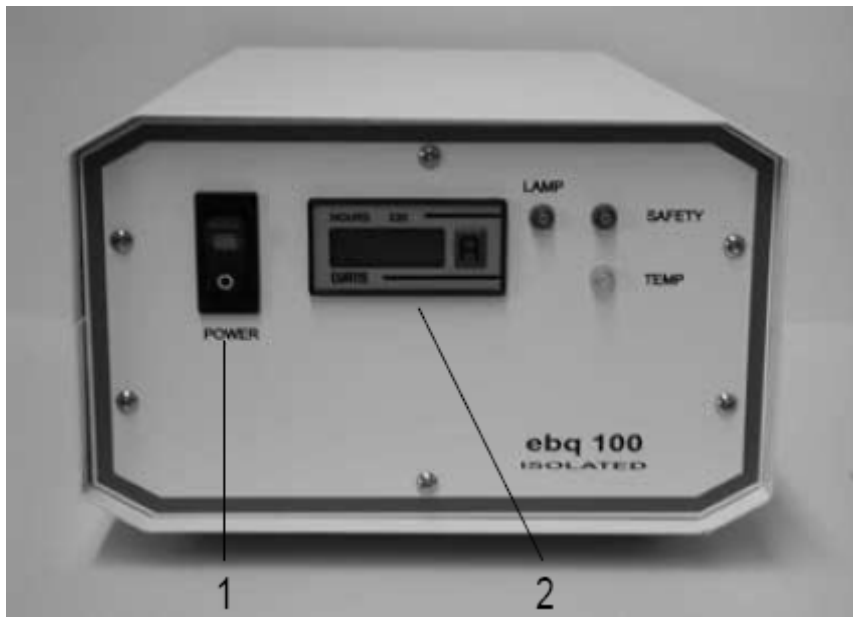


图 1-3 汞灯电源（1.电源开关；2.汞灯使用时间显示）



图 1-4 EL6000 荧光电源（1.电源开关；2.荧光灯使用时间显示；3.shutter；4.荧光强度控制）

3. 双击电脑显示屏桌面上的“LAS AF”图标启动徕卡共聚焦软件。如图 1-5。

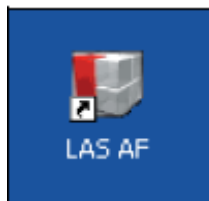


图 1-5 LAS AF 图标

4. 如需使用快扫系统，在“Activate Resonant Scanner”选项前打勾。如图 1-6。



图 1-6 快扫或高分辨成像系统模式

5. 点击“OK”以打开软件。如图 1-7。打开后显示 LAS AF 基本界面。如图 1-8。



图 1-7 LAS AF 启动界面



图 1-8 LAS AF 基本界面

二、在显微镜下观察样品

1. 选择合适的物镜，可通过显微镜主机右侧的物镜转换按钮，如图 2-1，或软件中的“Objectives”键进行选择，如图 2-2。

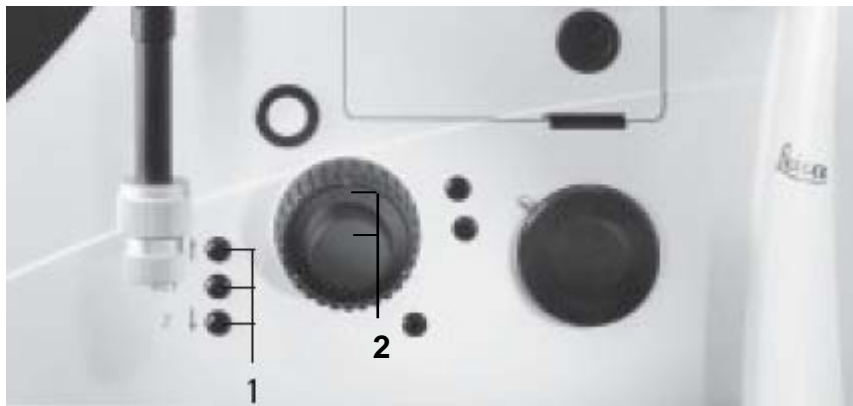


图 2-1 显微镜主机右侧部分（1. 调焦按钮；2. 物镜转换按钮）

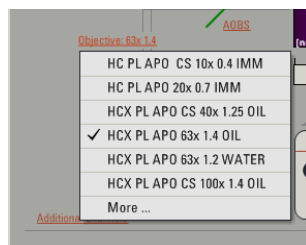
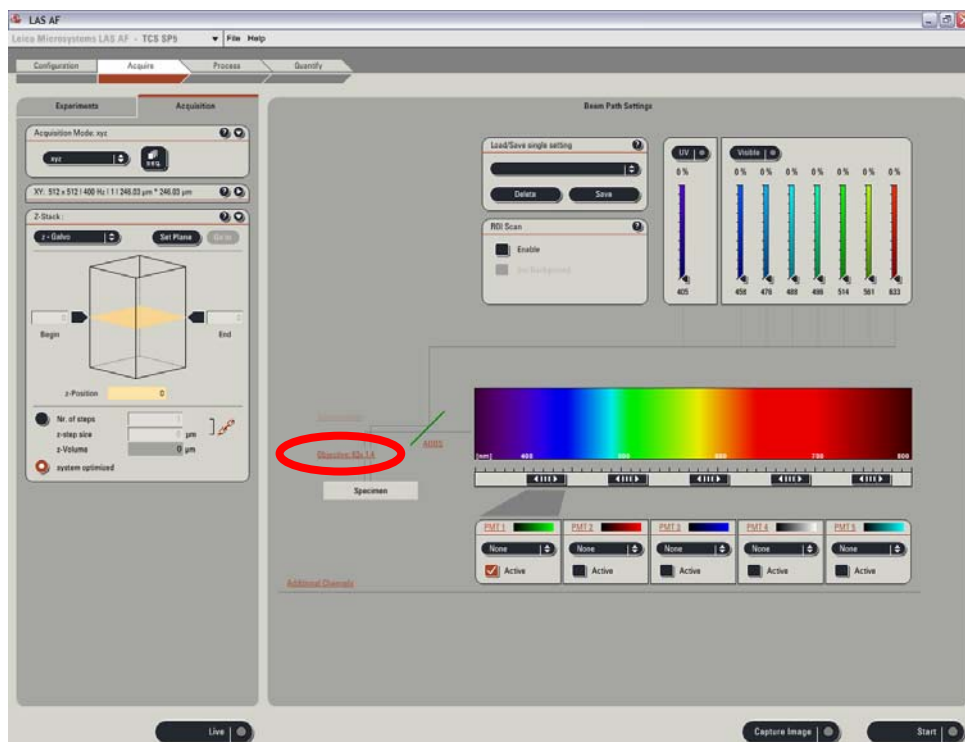


图 2-2 通过软件选择物镜

2. 将样品置于载物台上，在明场条件下选择合适的视野。通过显微镜主机右侧的按钮进行调焦，以及显微镜主机左侧的“INT”功能键调节光强。如图 2-3。

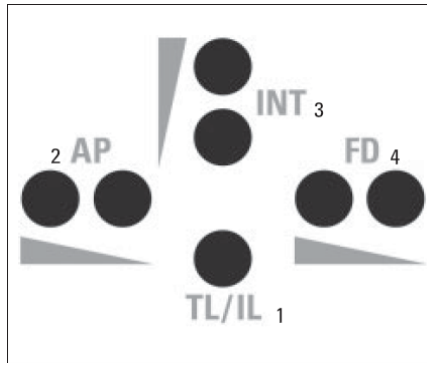


图 2-3 显微镜主机左侧部分功能键

(1. 透射与反射切换按钮；2. 孔径光阑调节按钮；3. 光强调节按钮；4. 视场光阑调节按钮)

3. 按“TL/IL”功能键转换至荧光观察方法，通过显微镜前面板的按钮选择合适的荧光滤块，进行样品的荧光观察。如图 2-4。

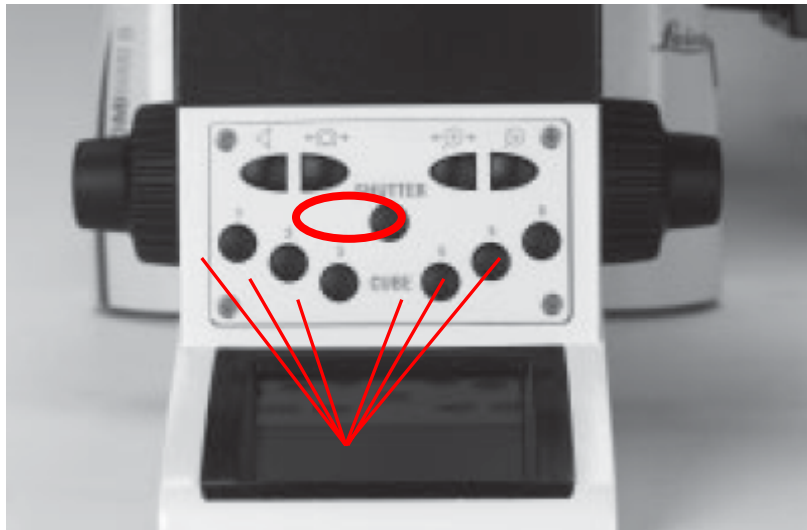


图 2-4 显微镜前面板（红线所示为荧光滤块选择按钮，红色椭圆所示为荧光 shutter 按钮）

4. 观察完毕后，按显微镜前面板上的荧光“SHUTTER”键以保护样品。如图 2-4。

三、采集共聚焦图像

1. 点击工具栏下方的“Configuration”，再点击“Laser”，用 打开所需激光。如需使用 Ar 离子激光，拖动滑块调节激光输出功率。如图 3-1。

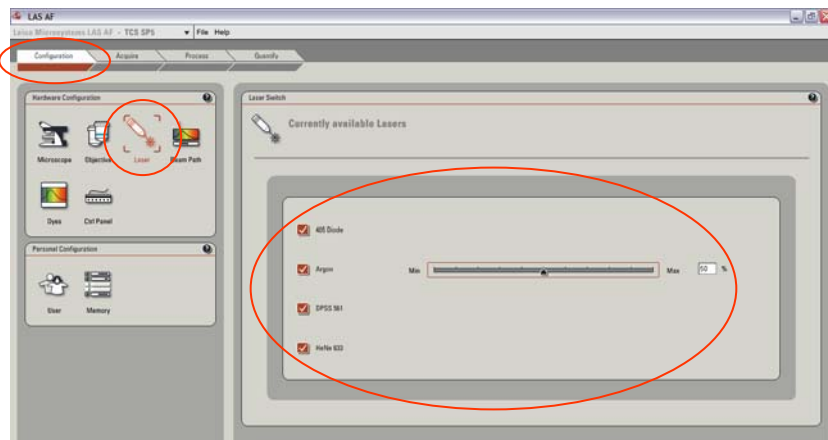


图 3-1 激光的选择

表 3-1 常用激光及其激发波长

激光	激发波长
405 Diode	405 nm
Argon	458,476,488,514 nm
HeNe 543	543 nm
DPSS 561	561 nm
HeNe 633	633 nm

2. 点击“Acquire”进行光路设置。

调用已有的设置：选择“Load/Save single setting”下拉菜单中已有的设置（激光及其输出功率、分光镜、检测波长范围、PMT 的 gain 及 offset），常用的荧光染料都已包含在内。选择某一设置后，可按样品的实际需要参数进行优化（如后述），并以新的名称保存。

修改已有设置：可改变所选激光、调节激光输出功率、改变分光镜、改变所选 PMT、调节 PMT 检测范围、调节 PMT 的 gain 或 offset 等。如图 3-2。

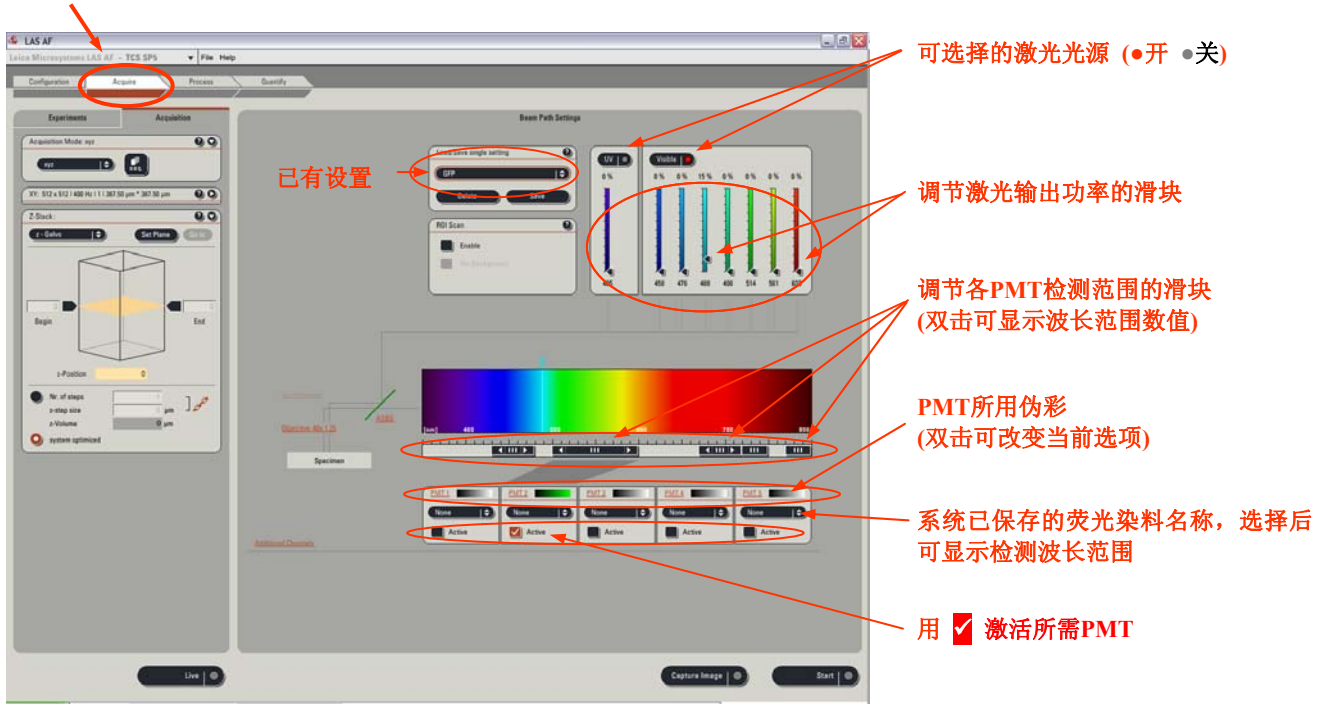


图 3-2 光路设置

建立新的设置：也可从零开始建立新的设置。如图 3-2，选择所需激光及其功率、适宜的分光镜、PMT 及检测波长范围。

对于双重或多重染色的样品，可选择同时采图或序列采图的方式。推荐使用后者，因其可避免染料交叉激发和串色导致的结果不准确。

进行序列扫描前，需分别设置每一通道的采图参数。

3. 透射光检测器的选择

单击“Additional Channels”以显示透射光检测器（“PMT Trans”），选择观察方法（BF、DIC 等）。如图 3-3。

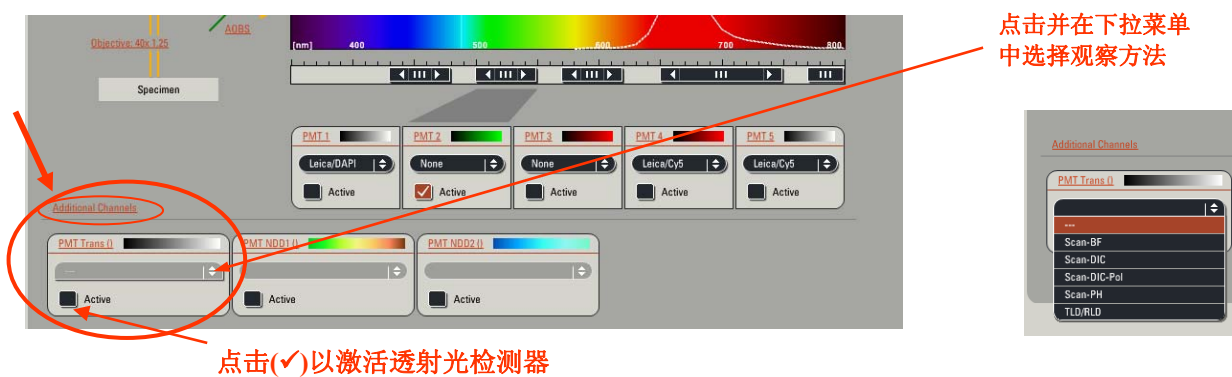


图 3-3 透射光观察方法及检测器

4. 选择扫描模式

在“Acquire”菜单栏的“Acquisition”中选择扫描模式（“Acquisition Mode”），如图 3-4。

默认模式为 xyz 扫描，是最常用的扫描模式，可用于 xy 扫描和 z 轴层切（xyz 扫描）。

还可按样品扫描需要在下拉菜单中选择由 x, y, z, t（时间）以及 λ（波长）组合而成的多维扫描模式，如 xzy, xyt, xyλ, xyzt, xyzλ, xyzλt 等。



图 3-4 扫描模式

5. 设置扫描参数

在“Acquire”菜单栏的“Acquisition”中设置扫描参数，包括分辨率 pixel format、扫描速度（scanning speed）、针孔大小（pinhole size）、线平均（line averaging）、面平均（frame averaging）、累加（accumulation）及放大倍数（zoom）等。如图 3-5。



图 3-5 扫描参数的设置

分辨率：默认值为 512×512。也可选择更低或更高分辨率。分辨率越高，所获取的图像文件也越大。

扫描速度：默认值为 400Hz。活细胞或运动的样品成像可能需要更快的速度。可选择双向扫描（“bidirectional scanning”）来达到更高速度，这时可能需要进行相位（“Phase”）调节。

针孔大小：默认值为 1Airy。如果样品的荧光非常弱，可通过增大针孔直径来增加信号强度，但所获取图像不是真正的共聚焦图像。

平均：用于降低背景噪音。分为“Line averaging”（线平均）和“Frame averaging”（面平均），线平均较快。可在下拉菜单中选择平均的次数。两种平均方式可结合使用。

累加：仅用于荧光非常弱的样品。

6. 预览图像

点击“Live”以设定的扫描参数预览图像，图像将显示在右侧的显示屏上。如图 3-6 及 1-8。




图 3-6 预览图像

7. 优化扫描参数

预览图像时，调节 z 轴位置找到最适合观察的焦平面，并调节 PMT 的电压 (PMT gain) 及偏移 (PMT offset)，或激光输出功率使图像达到最佳。可通过控制面板上相应旋钮调节以上参数。如图 3-7。



图 3-7 控制面板

理想的荧光图像中应该只有少数像素点达到饱和(即灰阶为 255)，可通过位于图像左侧的 LUT 按钮  进行观察。LUT 按钮可在 LUT (即指定的荧光颜色)、“Glow Over Under (GlowOU)”和灰度图三档之间切换。在 GlowOU 中，灰阶为 255 的像素点显示为蓝色，而灰阶为 0 的像素点显示为绿色。调节 PMT 的电压使图像中仅少数像素点显示蓝色。应使用较低的激光输出功率和较高的 PMT 电压值，这有助于保护样品免受光漂白的影响。可通过调节 PMT 的偏移值来降低图像的背景。荧光图像 PMT 偏移的默认值为 0%，且调节过程中不应使其大于 0%。

对透射光图像，同样可以调节透射光 PMT 的电压和偏移值来进行优化。但有时可将偏移值调至高于 0% 以增加对比度。

图像调至满意后，单击“Stop”终止预览过程。

8. 采集图像

单击“Capture Image”采集图像，如图 3-8。在此之前可改变分辨率、线/面平均次数等扫描参数。通常情况下，预览图像时选择 512×512 的分辨率，而采集图像时可增加至 1024×1024。



图 3-8 采集图像

四、序列扫描

如果样品采用两种或以上荧光染料标记，为避免串色对实验结果的影响，可采用序列扫描的方式。

1. 单击“Acquisition”中的“seq”按钮，如图 4-1，软件界面中将出现如图 4-2 的序列扫描菜单，可通过“Scan 1”右侧的“+”添加更多的扫描序列（“Scan 2”，“Scan 3”……）。

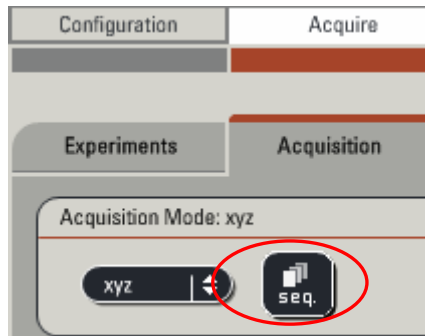


图 4-1 序列扫描按钮

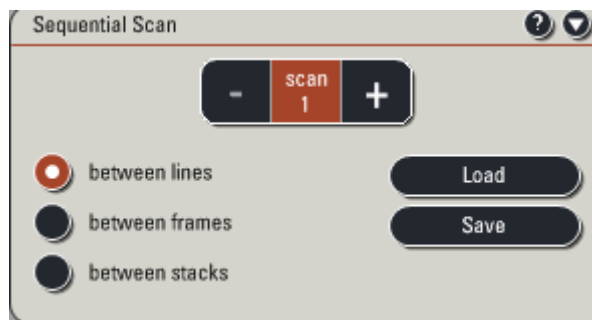
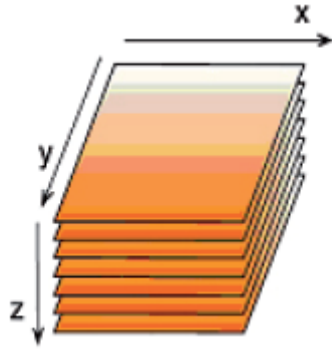


图 4-2 序列扫描菜单

2. 调用所需的单一采图设置，预览并优化参数至满意后，点击“Scan 1”将参数定义至第一扫描序列。
3. 同法定义“Scan 2”及更多的序列。
4. 扫描顺序“between lines”适合大多数的应用，特别是活细胞成像。
5. 调整分辨率、线/面平均次数等扫描参数后，点击“Start”进行序列图像的采集。
6. 可保存序列扫描的设置以便将来调用。

五、z 轴层切 (xyz 扫描)



z 轴层切用于观察样品中目标的空间分布。

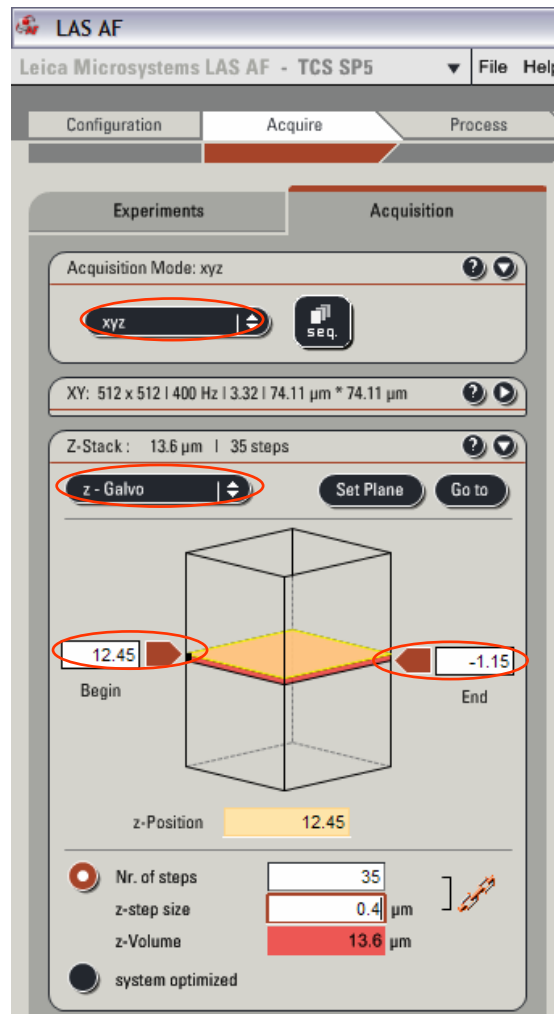


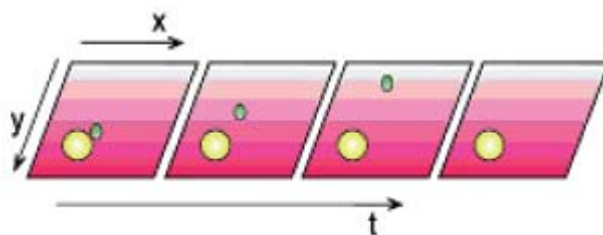
图 5-1 xyz 扫描

1. xyz 扫描模式为默认采图模式。如图 5-1。
2. 选择“z-Galvo”，用 SuperZ 进行 z 轴调节；或“z-Wide”，用显微镜物台进行 z 轴调节。
3. 设置采图参数，方法同前。
4. 点击“Live”进行图像预览。用控制面板的“Z-Position”旋钮调节 z 轴至层切所需的起点，点击“Begin”上方的黑色箭头定义层切起点（箭头变为棕色表示已定义）；调节 z 轴至层切所需的终点，点击“End”上方的黑色箭头定义

层切终点。

5. 点击“Stop”终止图像预览。
6. 此时 xyz 层切菜单中显示的“z-step size”（相邻两个光切面的间距）和“Nr. of steps”（层切数目）为系统的优化值（“system optimized”）。也可点击“Nr. of steps”左侧的按钮，然后对相邻光切面间距或层切数目进行自定义。
7. 点击“Start”进行 xyz 图像的采集。
8. 采图完毕后，应点击“Begin”和“End”上方的棕色箭头，使其变为黑色，重新处于未定义状态。

六、时间序列扫描 (xyt 扫描)



时间序列扫描多用于活细胞成像，记录动态过程。

1. 在“Acquire”菜单栏的“Acquisition”中选择 xyt 扫描模式后，将出现 xyt 扫描菜单，如图 6-1。
2. 设置采图参数，方法同前。
3. 定义“Time Interval”，即采集相邻两帧图像所需的时间间隔，也可选择最小值“Minimize”。
4. 按采图需要选择“Acquire until stopped”、“Duration”或“Frames”。
若选择“Acquire until stopped”，则图像将持续采集，直至手动终止。
若选择“Duration”，可定义采图所需的总时间。
若选择“Frames”，可定义所需的图像帧数。
5. 点击“Apply”确定。
6. 点击“Start”进行时间序列图像的采集。

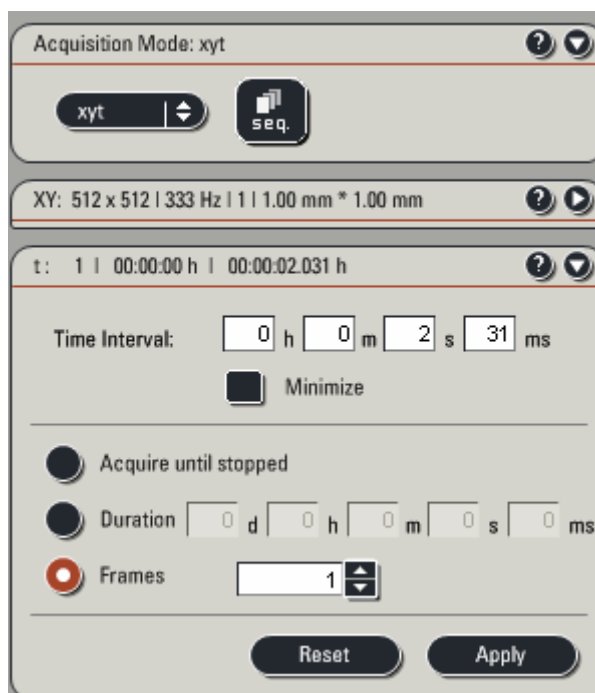
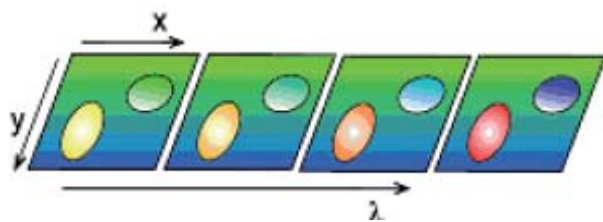


图 6-1 时间序列扫描

七、波长扫描 (xyλ 扫描)



波长扫描常用于自发荧光或新染料发射光谱的检测。

1. 选择激发光，方法同前。
2. 在“Acquire”菜单栏的“Acquisition”中选择 xyλ 扫描模式后，将出现波长扫描菜单，如图 7-1。
3. 定义“Begin”（需检测的发射谱起点）和“End”（需检测的发射谱终点）。起点所在波长应大于激发波长。
4. 定义“Band Width”（接收的带宽），通常为 10nm。
5. 定义“No. of steps”（采集的帧数）或“Lambda Stepsize”（波长步进）。波长步进不应大于接收带宽。
6. 选择所用 PMT。
7. 点击“Start”进行波长图像的采集。

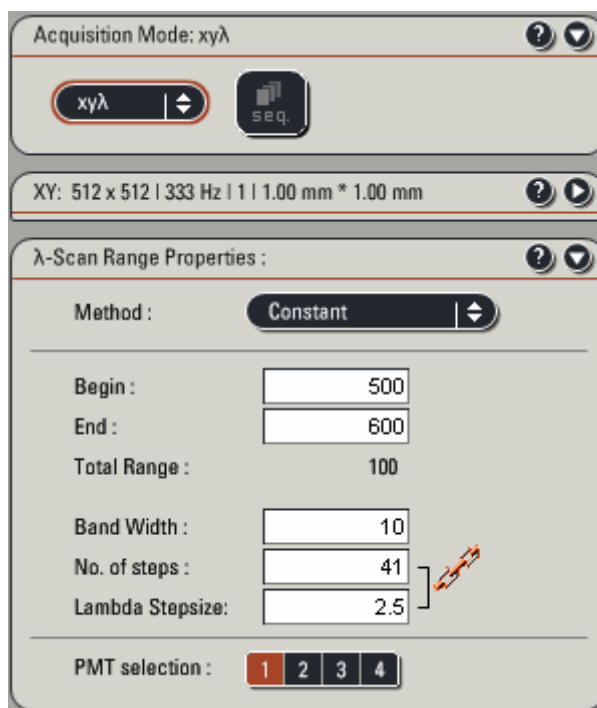


图 7-1 波长扫描

八、关机

1. 保存已采集的图像。
2. 关闭显微镜汞灯电源。
3. 若使用过油镜，需用无水乙醚与无水乙醇混合液（体积比 7：3）或无水乙醇清洁镜头。
4. 关闭 LAS AF 软件。
5. 将电脑桌右侧“Laser Power”按钮右侧的激光开关钥匙（Laser Emission）逆时针旋转 90 度至“On-0”位置。
6. 关闭“Scanner Power”按钮。
7. 在电脑上进行图像数据的输出。注意：使用空白光盘刻录，而不得使用任何其他形式的移动存储介质。
8. 关闭电脑后，关闭“PC Microscope”按钮。
9. 风扇停止后（关闭激光开关钥匙约 15 分钟后），关闭“Laser Power”按钮。记录关机时间、仪器状况等信息。

徕卡仪器有限公司

市场部

王怡净

jennifer.wong@leica-microsystems.com

