

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)

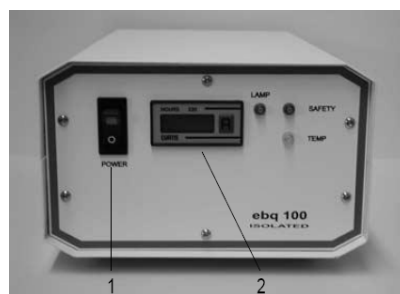


图 1-3 汞灯电源(1.电源开关；2.汞灯使用时间显示)



图 1-4 EL6000 荧光电源(1.电源开关；2.使用时间显示；3.光闸；4.光强控制)

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。

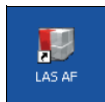


图 1-5 LAS AF 图标

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

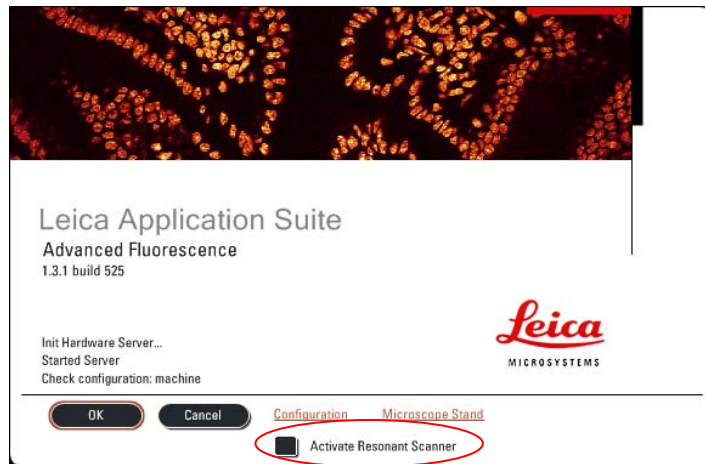


图 1-6 快扫或高分辨成像系统模式

5. 点击“OK”以打开软件。如图 1-7。

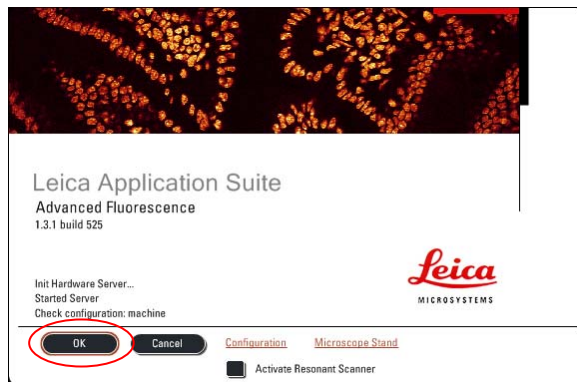


图 1-7 LAS AF 启动界面

系统自检完毕后，显示 LAS AF 基本界面。如图 1-8。

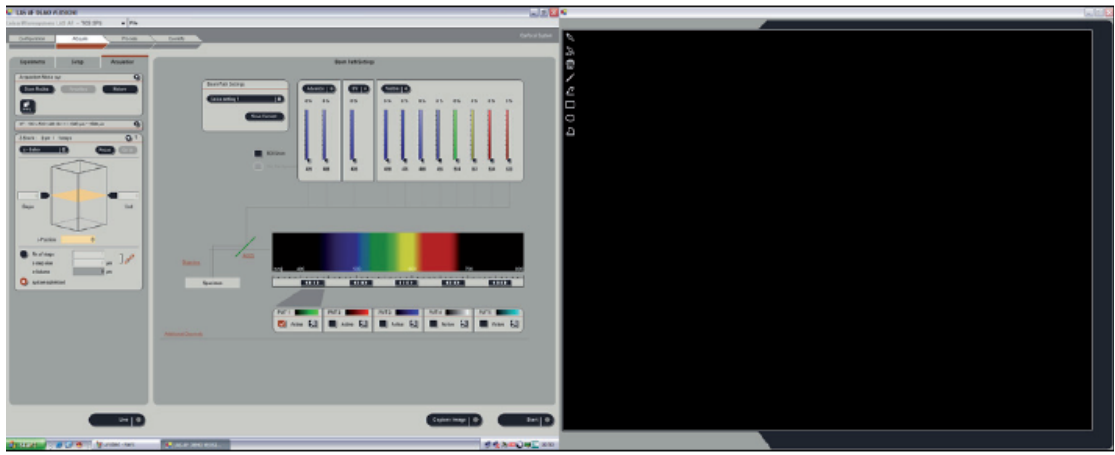


图 1-8 LAS AF 基本界面

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。

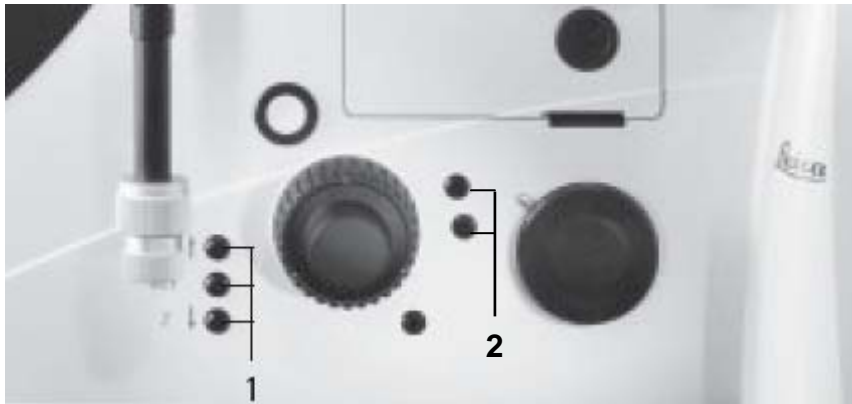


图 2-1 显微镜主机右侧部分(1. 调焦按钮；2. 物镜转换按钮)

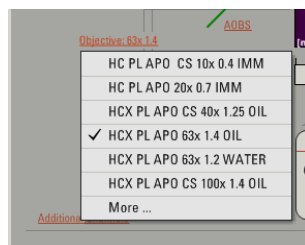


图 2-2 通过软件选择物镜

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调焦按钮或旋钮调节至合适的 z 轴平面，通过显微镜主机左侧的“INT”功能键调节光强。如图 2-3。

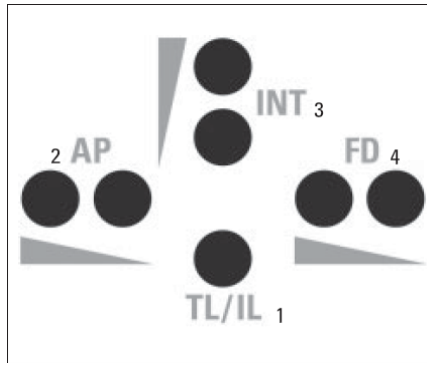


图 2-3 显微镜主机左侧部分功能键 (1.透射与反射切换；2.孔径光阑调节；3.光强调节；4.视场光阑调节)

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。

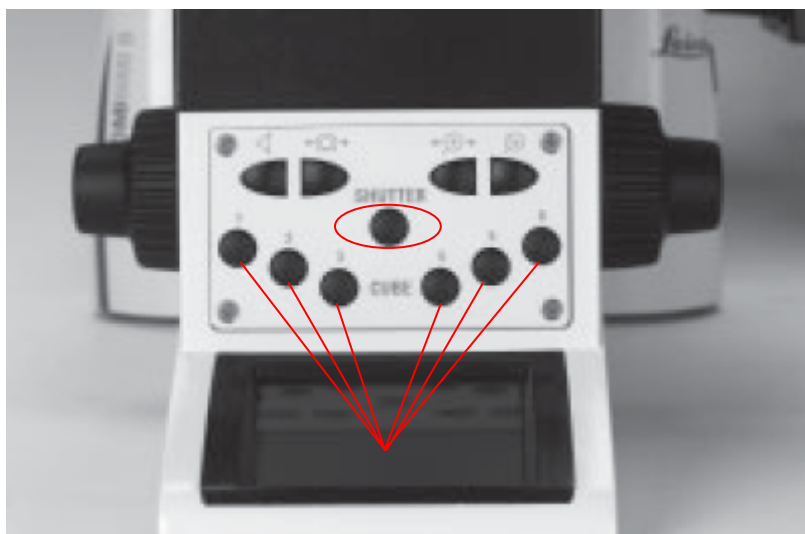


图 2-4 显微镜前面板 (红线所示为荧光滤块选择按钮，红色椭圆所示为荧光光闸按钮)

4. 观察完毕后，按显微镜前面板上的“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。

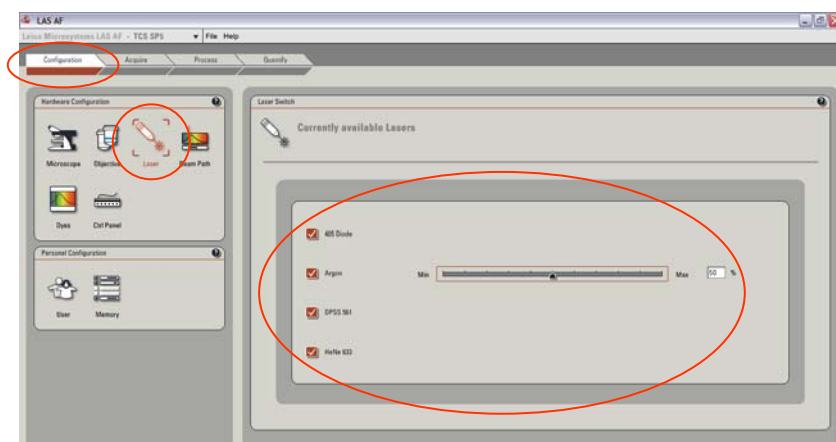


图 3-1 激光的选择

表 3-1 常用激光及其波长

| 激光 | 波长 |
|-----------|--------------------------|
| 405 Diode | 405 nm |
| Argon | 458,476,488,(496),514 nm |
| HeNe 543 | 543 nm |
| DPSS 561 | 561 nm |
| HeNe 633 | 633 nm |

2. 点击“Aquire”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 gain 及 offset)，常用的荧光染料都已包含在内。选择某一设置后，可按样品的实际情况对参数进行优化(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。

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。

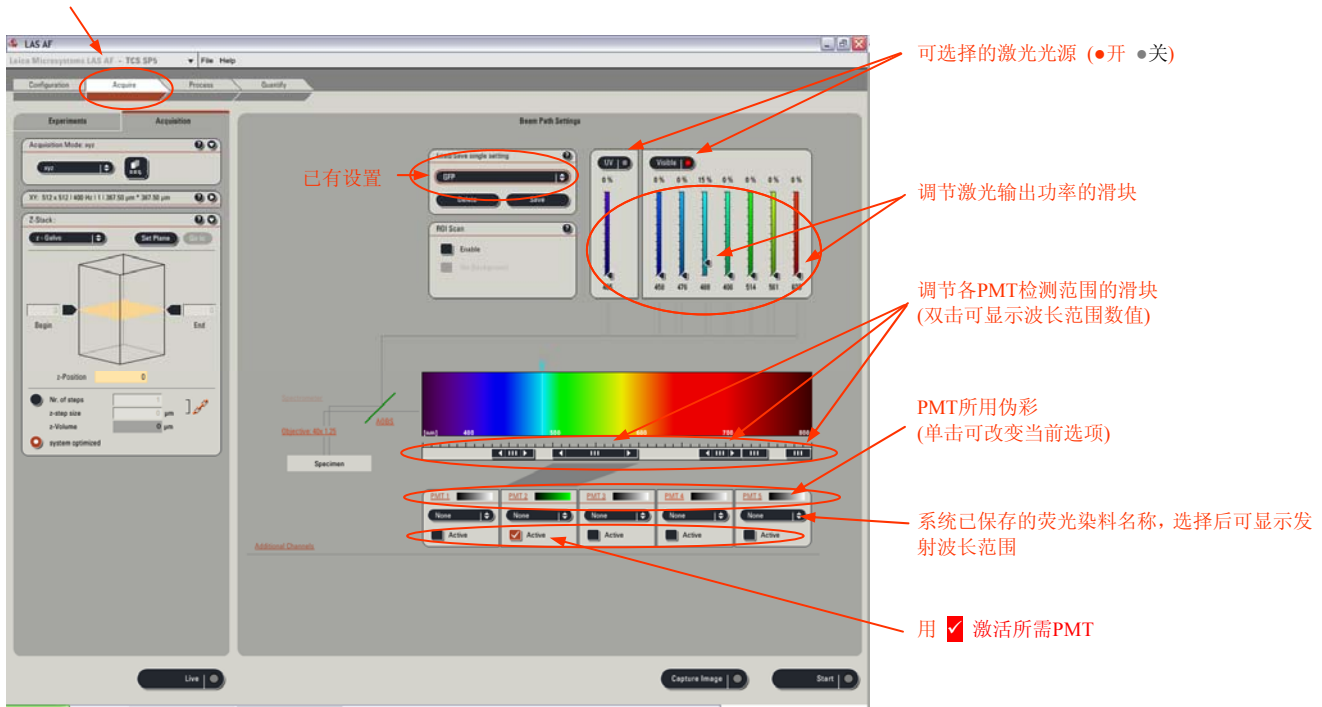


图 3-2 光路设置

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。

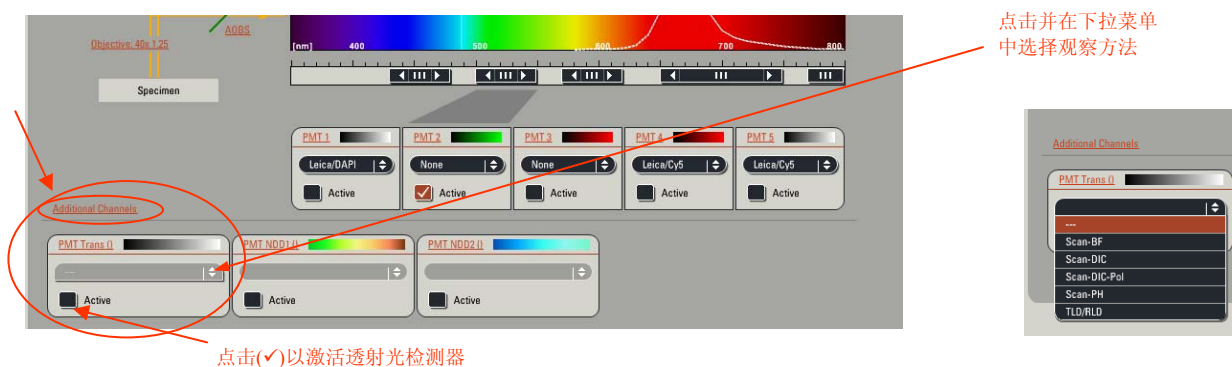


图 3-3 透射光观察方法及检测器

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(format)、扫描速度(speed)、针孔大小(pinhole size)、线平均(line average)、面平均(frame average)、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，所获取的图像文件越大，采图所需时间也越长。

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 X)来达到更高速度，这时可能需要进行相位校准(Phase correction)。

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，所获取图像的光切厚度也会随之增加。

平均：用于降低背景噪音。分为线平均(Line average)和面平均(Frame average)，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 的电压值(Smart gain)及偏移值(Smart 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(即灰度值为 255),可通过位于图像左侧的 LUT 按钮  进行观察。在进行三维层切时,应先调焦至最亮层面,使其图像中少数像素点达到饱和即可。LUT 按钮可在 LUT (即指定的荧光颜色,也称伪彩)、“Glow Over Under (GlowOU)”和灰度图三档之间切换。在 GlowOU 模式中,灰度值为 255 的像素点显示为蓝色,而灰度值为 0 的像素点显示为绿色。调节 PMT 电压值使图像中仅少数像素点呈蓝色。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。通过调节 PMT 偏移值来降低图像的背景。荧光图像 PMT 偏移的默认值为 0%,通常应将其调为负值以使图像背景呈绿色。调节过程中不应使其大于 0%。图 3-8b 亮度及背景值设置均未达最优化值,调节 PMT 电压值及偏移值后,达到图 3-8c 中的效果,部分信号呈蓝色,而背景呈绿色。

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,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。

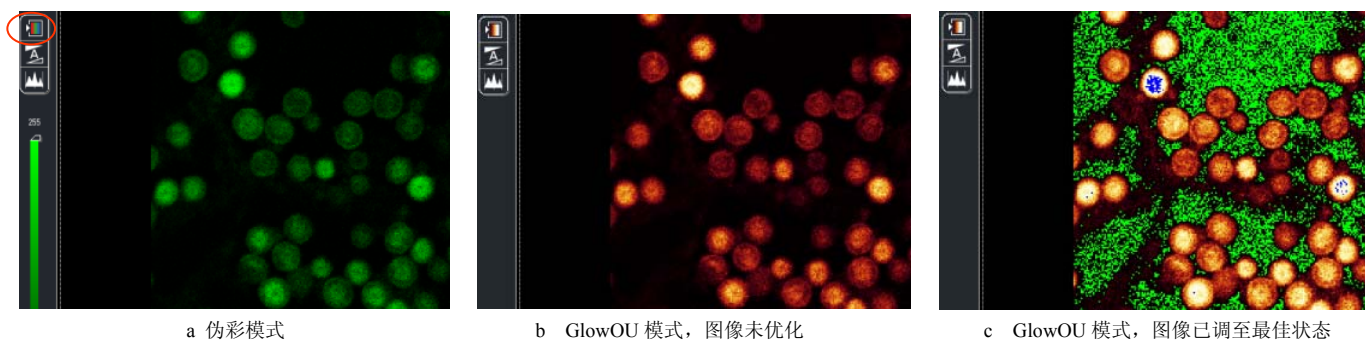


图 3-8 调节 PMT 电压值及偏移值前后的图像

对于双重或多重染色的样品,可选择同时扫描或序列扫描的方式。

如果两种或多种荧光探针的强度相当且交叉激发不严重,则可通过调节激光功率、PMT 电压值和接收波长范围来避免串色。下面以 GFP 和 Cy3 双染为例来介绍双通道同时扫描时如何有效避免串色。

- 1) 只用 488nm 激光激发,用 2 个 PMT 同时接收荧光信号,范围可设为 500-530nm(GFP 通道)及 560-600nm(Cy3 通道)。在可获得良好 GFP 信号的前提下,尽量降低 488nm 激光的功率,从而减少串色到 Cy3 通道内的 GFP 信号,同时调低 560-600nm 的 PMT 电压值至 Cy3 通道几乎看不到光信号为止。
- 2) 打开 543nm 激光并逐渐增加其功率直至获得满意的 Cy3 通道图像,此时该通道接收到的信号完全为 543nm 激光激发 Cy3 的结果。注意,在此过程中不要改变 PMT 的电压值。
- 3) 对于三重染色样品,在调整好两个较短波长通道后,再继续调节最长波长通道的激光功率、PMT 电压值和接收波长范围。

若荧光探针强度不平衡,且短波长光明显强于长波长光,则需使用序列扫描,或在采图完毕后使用 Process→Dye Separation 进行串色分离。

在同一激发波长能激发两种染料的情况下,必需使用”Dye Separation”进行串色分离。

8. 采集图像

对于单通道染色，或多通道染色同时扫描，单击“Capture Image”采集图像。对于序列扫描，或多维图像扫描，单击“Start”进行图像采集。如图 3-9。在此之前可改变扫描分辨率、线/面平均次数等扫描参数。



图 3-9 采集图像

通常情况下，预览图像时选择 512×512 的分辨率、400Hz 的扫描线速度。

而采集图像时，为充分利用物镜的分辨能力，根据 Nyquist 采样原则，像素点大小(Pixel Size)应为物镜侧向分辨率(即 xy 平面分辨率)的 2/5~1/2。物镜分辨率可从 Configuration→Objective 界面读取。获取较好图像(像素点大小达侧向分辨率的 1/2)及最佳图像(像素点大小达侧向分辨率的 2/5)所需的扫描分辨率见表 3-2，从表中可知，与高倍物镜相比，低倍物镜需要更高的扫描分辨率，如 8k×8k 的分辨率用于 10×物镜采图非常有用。

像素点大小可在采图参数设置界面获得，如图 3-10。像素点随扫描分辨率增大和放大倍数(zoom)增加而减小，获取最佳图像所需的放大倍数见表 3.3。

表 3-2 获取较好及最佳图像所需扫描分辨率

| 物镜 | 侧向分辨率 (nm) | 1/2 侧向分辨率 (nm) A | 2/5 侧向分辨率 (nm) B | 视野(μm) C | 较好图像所需扫描分辨率 (zoom=1) D | 最佳图像所需扫描分辨率 (zoom=1) E |
|--------------|------------|------------------|------------------|----------|------------------------|------------------------|
| 10×/0.4 | 488 | 244 | 195.2 | 1550 | 6352 | 7941 |
| 20×/0.7 | 279 | 139.5 | 111.6 | 775 | 5556 | 6944 |
| 40×/0.85 | 230 | 115 | 92 | 387.5 | 3370 | 4212 |
| 40×oil/1.25 | 156 | 78 | 62.4 | 387.5 | 4968 | 6210 |
| 63×oil/1.40 | 139 | 69.5 | 55.6 | 246 | 3540 | 4425 |
| 100×oil/1.40 | 139 | 69.5 | 55.6 | 155 | 2230 | 2788 |
| 20×water/1.0 | 195 | 97.5 | 78 | 601 | 6164 | 7705 |
| 20×BABB/0.95 | 205 | 102.5 | 82 | 601 | 5863 | 7329 |

注：1. 侧向分辨率计算公式 $FWHM_{xy} = \frac{0.4\lambda}{n \cdot \sin \alpha}$ ，其中 $\lambda=488\text{nm}$ ， $n \cdot \sin \alpha = \text{NA}$ ，即物镜的数值孔径。
2. 扫描分辨率计算 $D=C/A$ ； $E=C/B$

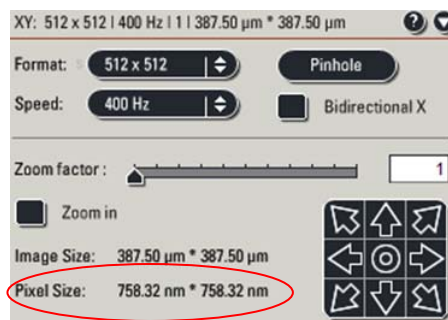


图 3-10 像素点大小

表 3-3 获取最佳图像所需的放大倍数

| 物镜 | 512×512 | 1024×1024 | 2048×2048 | 4096×4096 | 6144×6144 | 8192×8192 |
|--------------|---------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 10×/0.4 | 12.40 | 6.20 | 3.10 | 1.60 | 1.00 | 1.00 |
| 20×/0.7 | 10.90 | 5.40 | 2.70 | 1.40 | 1.00 | 1.00 |
| 40×/0.85 | 6.60 | 3.30 | 1.70 | 1.00 | 0.60 | 0.40 |
| 40×oil/1.25 | 9.70 | 4.90 | 2.40 | 1.20 | 1.00 | 0.60 |
| 63×oil/1.40 | 6.90 | 3.50 | 1.70 | 1.00 | 0.60 | 0.40 |
| 100×oil/1.40 | 4.30 | 2.20 | 1.10 | 0.60 | 0.40 | 0.30 |
| 20×water/1.0 | 12.00 | 6.00 | 3.00 | 1.50 | 1.00 | 1.00 |
| 20×BABB/0.95 | 11.50 | 5.70 | 2.90 | 1.40 | 1.00 | 1.00 |

因此，建议按照表 3-4 设置参数，以获取高质量图像。

表 3-4 部分采图参数的建议值

| 物镜 | 扫描分辨率 | 扫描线速度(Hz) | 放大倍数(zoom) |
|-------------|-----------|-----------|------------|
| 10×/0.4 | 2048×2048 | 100 | 3 |
| 20×/0.7 | 1024×1024 | 200 | 5 |
| 40×/0.85 | 1024×1024 | 200 | 3 |
| 63×oil/1.40 | 1024×1024 | 200 | 3 |

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”……)。

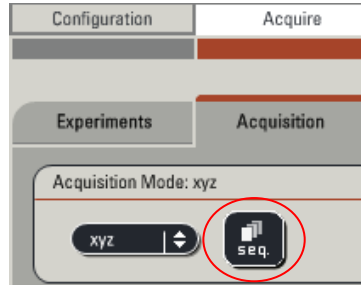


图 4-1 序列扫描按钮

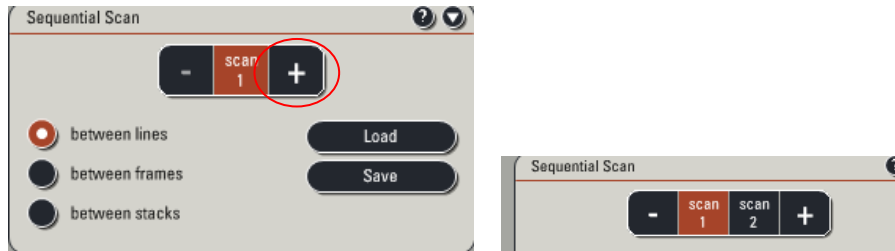
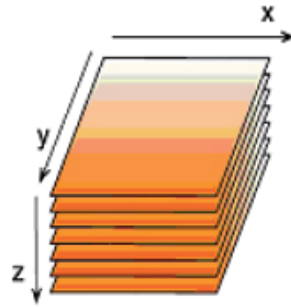


图 4-2 序列扫描菜单

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。

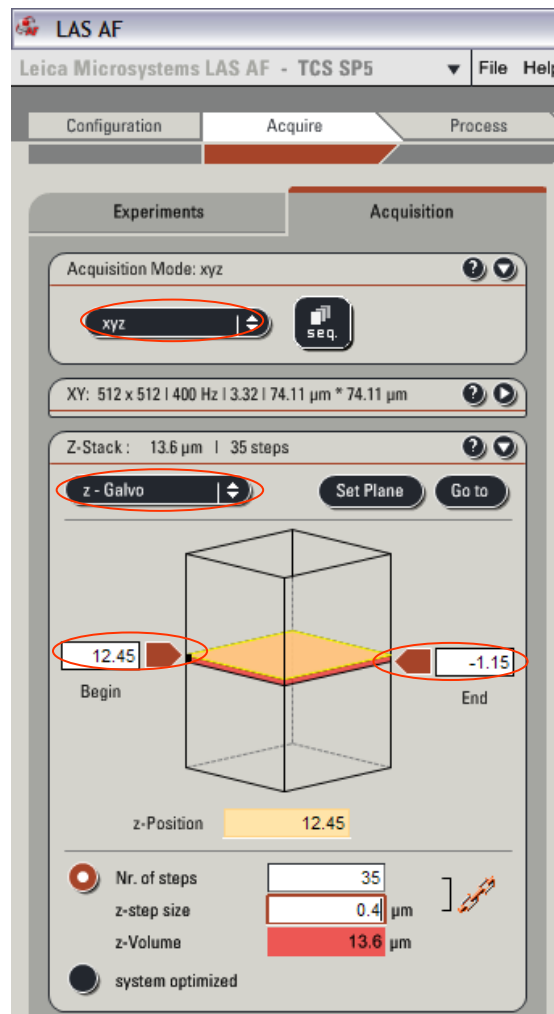
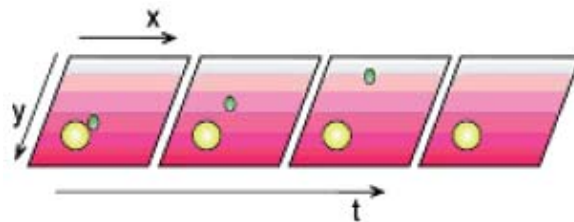


图 5-1 xyz 扫描

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”，用物镜进行 z 轴调节，调至最亮层面。
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(箭头变为红色表示已定义)；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. 选择合适的分辨率和扫描线速度，点击“Start”进行 xyz 图像的采集。
8. 采图完毕后，应点击“Begin”和“End”上方的红色箭头，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. 选择合适的分辨率和扫描线速度，点击“Start”进行时间序列图像的采集。

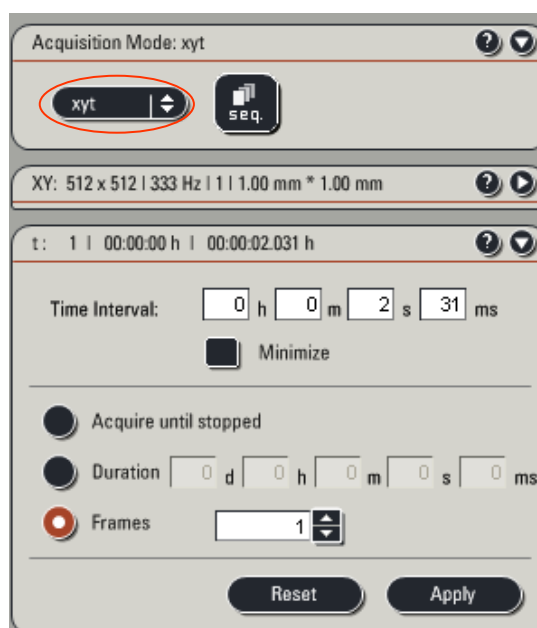
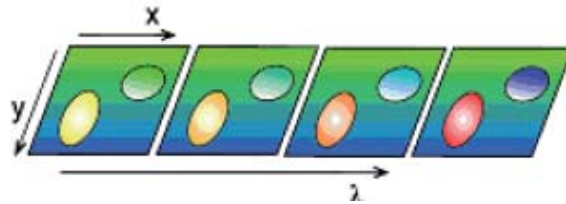


图 6-1 时间序列扫描

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. 选择合适的分辨率和扫描线速度，点击“Start”进行波长图像的采集。

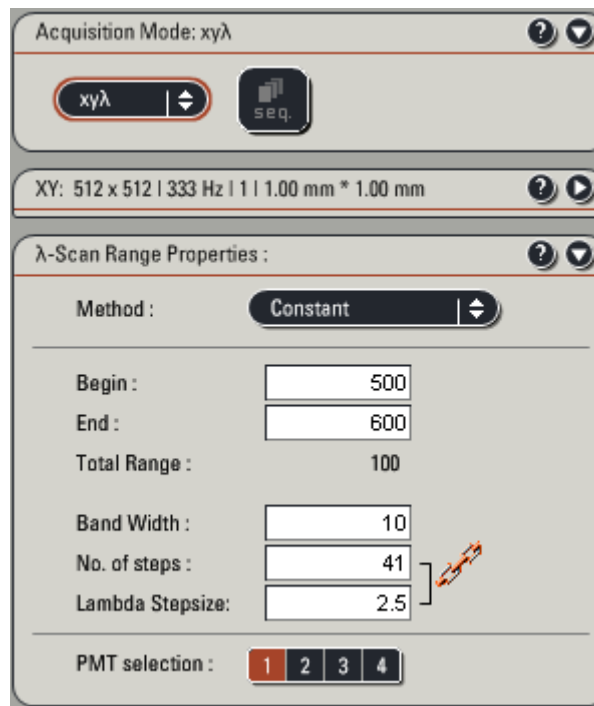


图 7-1 波长扫描

8. 扫描结束后，可保存发射光谱信息。操作路径为：

Process→Tools→Dye Separation→Spectral，在所采图像中选择有信号的区域，点击”Save Current Spectrum”，即可将当前的发射光谱信息保存至系统数据库中。

八、图像文件的保存及输出

1. 图像文件的操作：“Acquire”的”Experiment”下显示采集的所有图像文件名称，右键点击图像文件名，可进行多种操作。如图 8-1。

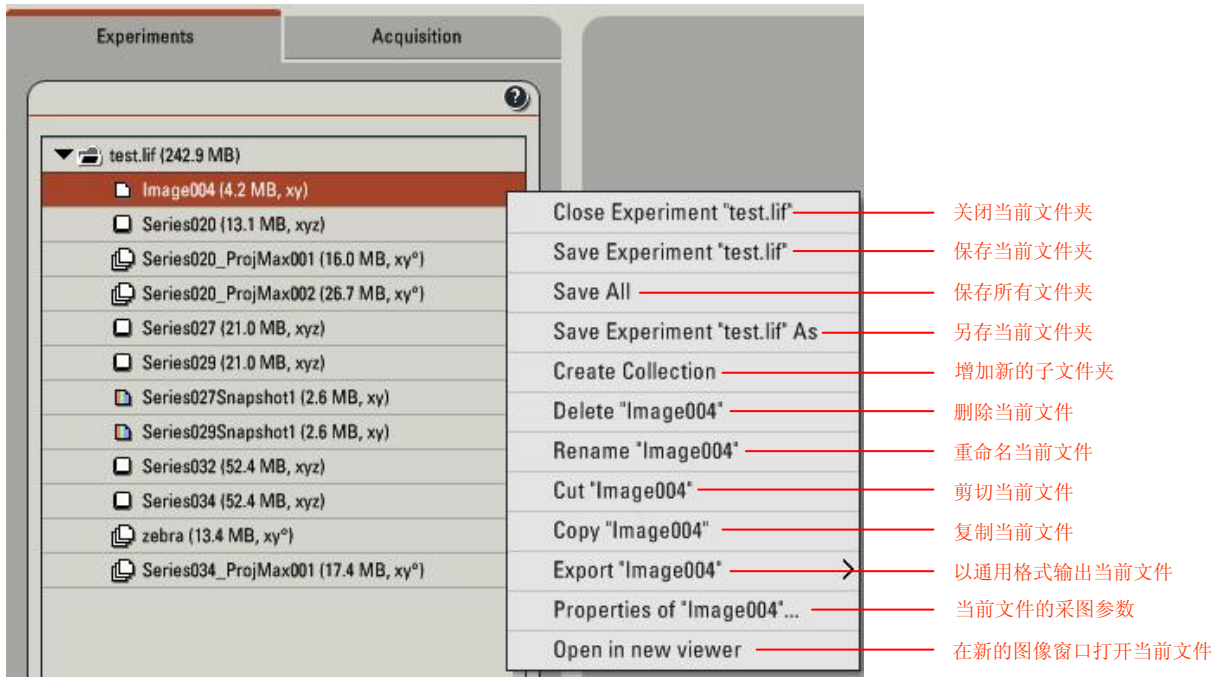


图 8-1 图像文件的操作

文件保存格式为.lif 原始文件，只能通过 Leica LAS AF 或 LAS AF Lite 软件打开。

2. 图像文件的输出：右键点击图像文件名，选择”Export”进行图像输出，可输出成图片(.tiff 或.jpeg)，三维或多维图像还可输出成电影(.avi)。如图 8-2。所得文件可用其他图像浏览软件打开。

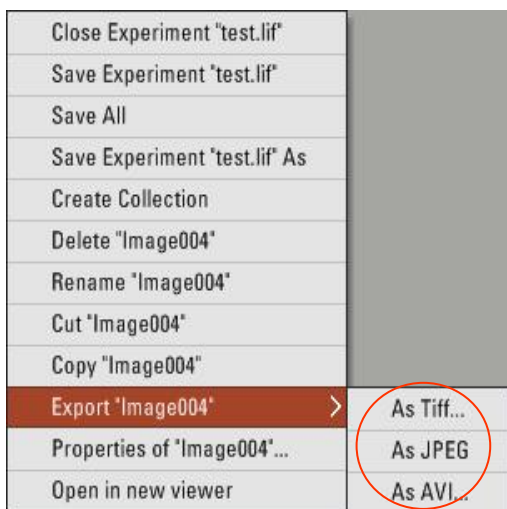


图 8-2 图像文件输出成通用格式

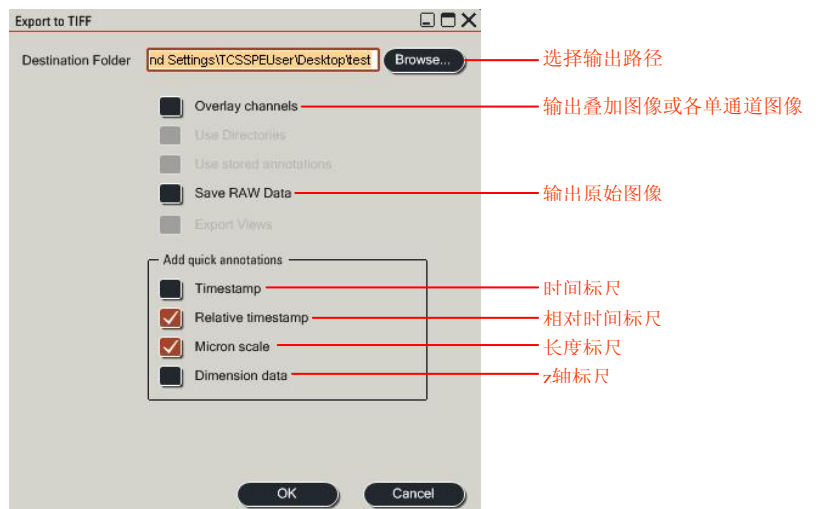


图 8-3 文件输出成图片

选择”As Tiff”或”As JPEG”，出现如图 8-3 的对话框，可选择输出路径、所需标尺及位置等。确定后，点击”OK”，即可将图像输出至指定路径。

选择”As AVI”，出现如图 8-4 的对话框，除可选择路径、标尺等参数外，还可设定 avi 电影的播放速度(Frame/sec)，以及是否进行压缩(Use compression)。

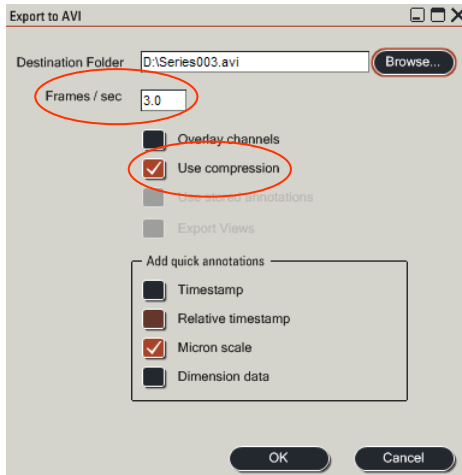


图 8-4 文件输出成电影

3. 图像采集参数的观察及恢复：右键点击图像文件名，选择”Properties of...”，即显示该图像采集时的所有参数设置信息，如图 8-5。

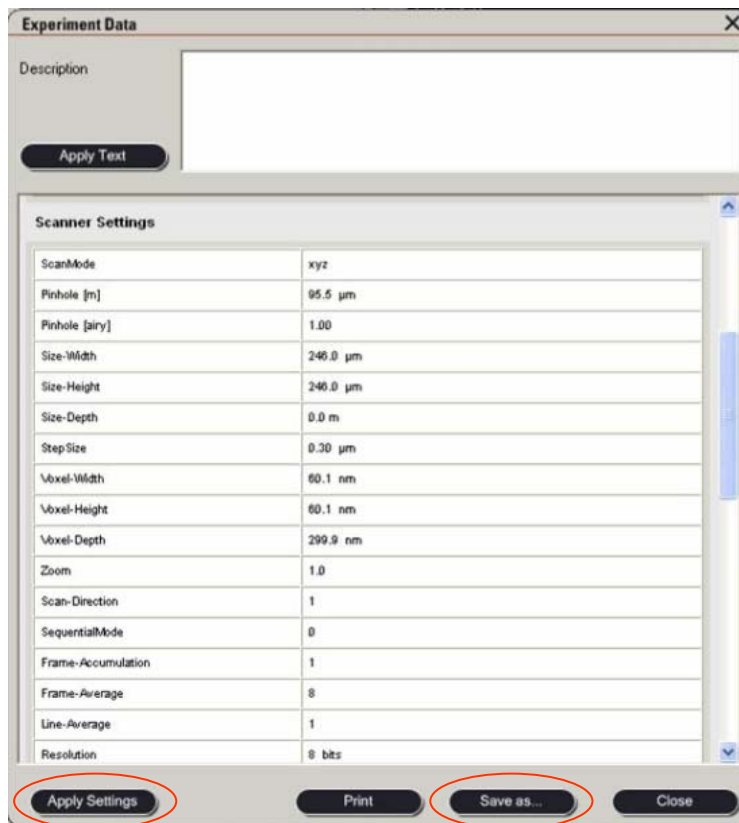


图 8-5 采图参数

点击”Apply Settings”，即可恢复该图像采集时的参数设置。点击”Save as...”，可将所有参数信息输出成.xml 文件并存至指定路径。

九、关机

1. 保存已采集的图像。
2. 关闭显微镜荧光电源。
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，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 5 分钟后)，关闭“Laser Power”按钮。记录关机时间、仪器状况等信息。