

# 1、 徕卡 SP8 STED 3X 超高分辨率显微镜操作规程

## 1.1 开机程序

1.1.1 依次打开 PC Microscope、Scanner Power、Laser Power 三个按钮，将 Laser Emission 上的激光开关钥匙旋至 On-1

1.1.2 打开 EL6000 荧光光源，打开 STED 电源

1.1.3 双击电脑桌面 LAS X 图标，启动共聚焦操作软件，进入配置选择界面后，激活 STED 选项，点击 OK，软件进行系统自检；

1.1.4 系统自检完后，进入 LAS X 操作界面，点击界面最上方 Configuration 按钮进入 Laser Config 界面→打开所需激发激光和对应的 STED 激光( OFF→ON )，Argon 和 STED 激光还需拖动右方滑块以调节激光输出初始功率；

1.1.5 将文件切换至 100x STED 物镜，在 Configuration 中的 STED 界面下，点击 Align Beams，当提示框中出现 Alignment successful 后，点击 OK

## 1.2 xy 二维及 xyz 三维图像扫描程序

1.2.1 选择 100x STED 物镜，在目镜下采用相应的滤块，通过 smart move 找好样品的焦距和感兴趣视野

1.2.2 采用默认的 xyz 扫描模式，可用于 xy 二维单张扫描（未设置 z-stack 参数时）和 xyz 三维层切扫描（设置 z-stack 参数时）

1.2.3 设置好激发激光百分比、发射光接受范围（如 GFP 采用 488nm 激光，发射光接受范围 500-550nm）、HyD 检测器增益（一般设为 100%），针孔大小（一般为 1AU），

平均次数 ( 3-4 次 );

1.2.4 调节 format 至 512×512 , 点击 Live 活图预览 , 调至合适的成像焦面 , 通过改变激光百分比将图像调至合适亮度 , 设置 zoom 放大倍数 ( 一般 > 4 倍 ); ;

1.2.5 打开对应的 STED 激光( 一般而言 绿色荧光使用 592nm , 红色荧光使用 660nm , 近红外荧光使用 775nm ), 调至合适的百分比

1.2.6 激活 HyD 的 Gating 功能 , 选择对应的激光谱线 , 将时间窗口调至合适的范围 ( 如 1.5-12ns , 起始时间越延后 , 分辨率越高 , 但是信号也会越弱 )

1.2.7 调节 format 至 1024×1024 , 点击 Capture Image 进行单张二维图片的拍摄

1.2.8 若需进行三维扫描 , 在 Live 活图预览时 , 设置好 z-stack 中的 begin 和 end 的 z 轴位点 , 以及 z 轴层切的步进 , 然后激活 z-donut , 将合适的 STED 激光能量导入 z-donut 方向 , 调节 format 至 1024×1024 , 点击 Start 进行逐层扫描

1.2.9 点击 Save 图标 , 将文件保存至目标文件夹

### 1.3 图像及电影文件输出

1.3.1 在 Project 界面下 , 点击 Open 打开 .lif 后缀的原始文件 , 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文件 ( QuickTime、.avi、MPEG-4、WMV 等 )

1.3.2 选择 As Tiff 或 As JPEG , 可选择输出路径、所需标尺及位置等 , 确定, 点击 OK , 即可将图像输出至指定路径

1.3.3 若输出电影文件时 ( QuickTime、.avi、MPEG-4、WMV 等 ) , 设置好播放帧率及文件压缩百分比 , 将文件输出值指定路径

## 1.4 关机程序

1.4.1 保存已采集的图像。

1.4.2 在 LAS X 软件 Configuration→Laser Config 界面关闭所有激光

1.4.3 关闭 LAS X 软件

1.4.4 将 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，等待约 5 分钟风扇停止后，关闭 Laser Power 按钮

1.4.5 关闭 Scanner Power 按钮

1.4.6 关闭 EL6000 荧光光源

1.4.7 使用无水乙醇清洁油镜镜头，将物镜转至最低倍数

1.4.8 关闭电脑后，关闭 PC Microscope 按钮

1.4.9 做好仪器使用记录