

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