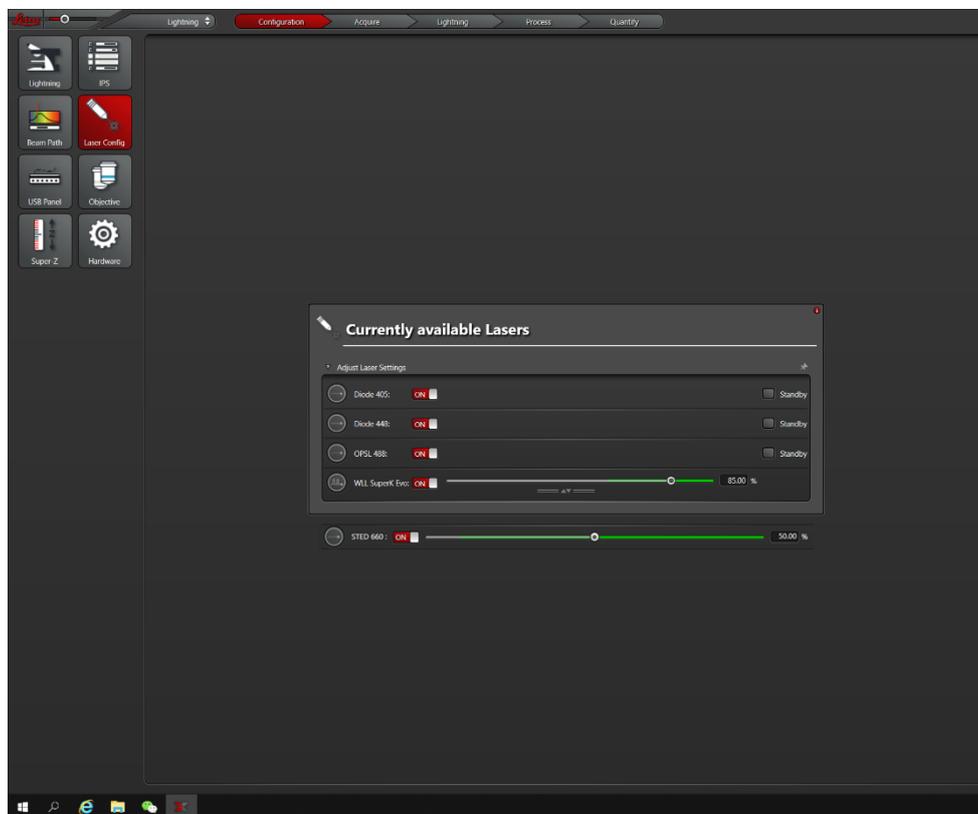


2、电脑进入操作系统界面后，双击电脑桌面“LAS X”图标启动共聚焦操作软件。

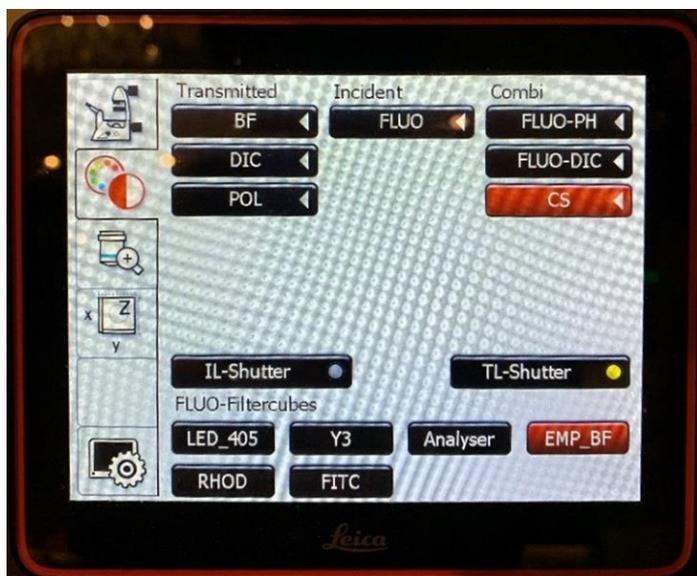
3、系统自检完后，进入 LAS X 操作界面，点击界面最上方“Configuration”按钮进入配置界面→点击左边“Laser Config”按钮→打开所需激光（OFF→ON）

4、如需 STED 功能，还需打开特定 STED 激光器



三、图像采集

1、显微镜镜下观察样品、寻找拍摄目标。可通过显微镜前的触摸屏对物镜切换、观察方式切换等进行控制，如下图所示：



- BF: 明场观察方式
- DIC: 微分干涉观察方式
- FLUO: 荧光观察方式
- IL-SHUTTER: 荧光光源光闸
- TL-SHUTTER: 明场光源光闸
- FLUO-Filter cubes: 荧光观察下滤色块切换



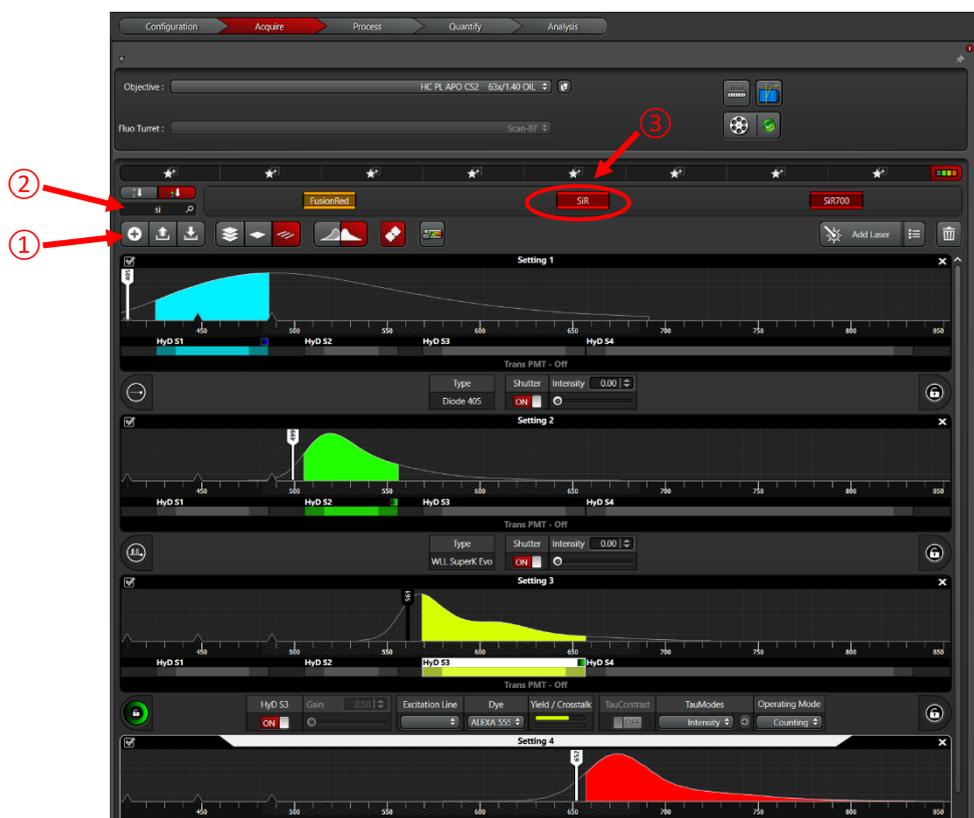
- 物镜切换，放大倍率前有水滴状的为需要添加观察介质（水/油）的物镜，在与干镜（无水滴状）的物镜之间切换时，需要点击两次该物镜按钮。



- 可通过 Smart Move 进行载物台 XY 方向及焦面调节。

2、在软件 ImageCompass 界面中设置拍摄光路及参数

方法一：



① 设置拍摄序列。点击“+”添加拍摄序列，通常来讲，需要拍摄几种颜色的标记物则添加相应数目的 setting，如图所示，拍摄 4 种标记物，则添加 4 个 setting。也可根据荧光标记物的发光范围，将两个发射光谱相隔较远的通道设置 在同一个 setting 中。

② 检索荧光标记物。在检索框中输入染料名称。

③ 选择相对应的染料，按下鼠标并将其拖拽至下方的 setting 中，软件会自动设置相对于的激发光谱和检测波段，如下图所示。多色荧光标记拍摄则重复该动作至设置完成。

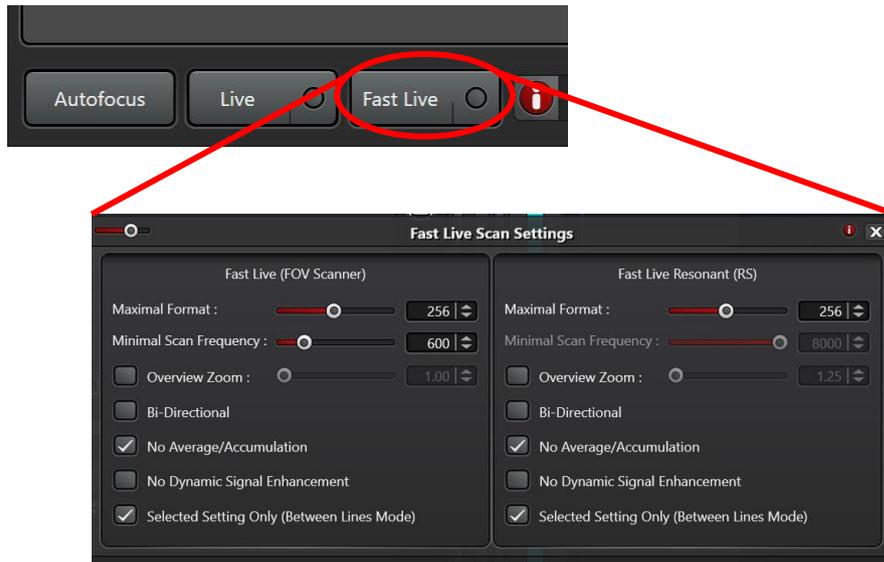


方法二：

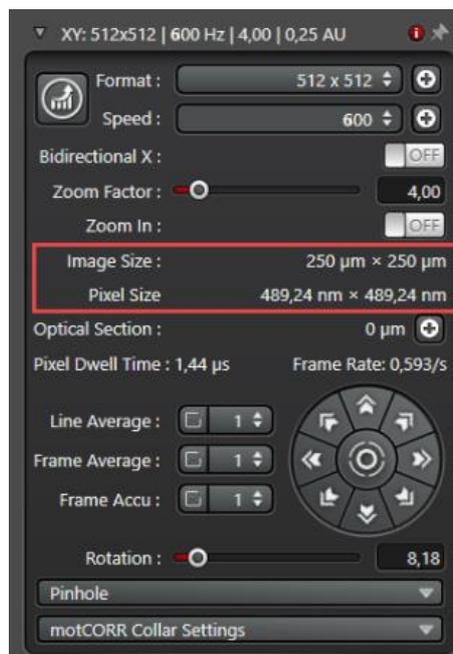
使用 Dye assistant 进行多色成像设置，如下图所示：



3、预览、调节参数及拍摄



- 点击“Fast live”进行图像预览，点击该按钮右侧的圆点可进入“Fast live”的参数设置界面，可设置预览时扫描分辨率（Format），扫描速度（Frequency）等。
- 在预览的状态下，选中某一个 Setting，对该序列中的图像通过调节 Control panel 中的 Smart Gain, Smart Intensity 等设置拍摄参数。
- 在下图窗口中，Format 选择 1024x1024 或更高的扫描分辨率；Speed 处选择 400 或者更慢的扫描速度。
- 点击软件下方 Start，进行图像拍摄。



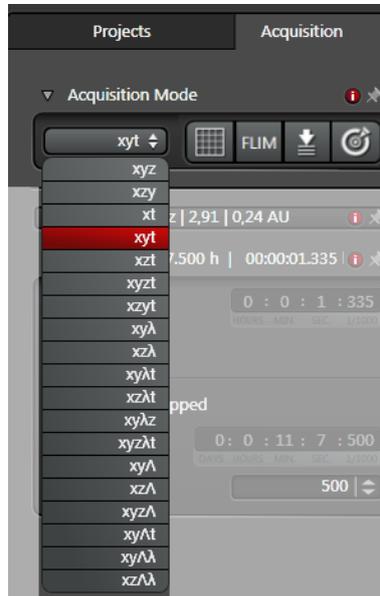
四、Z 轴层切

- 1、XYZ 扫描模式为默认采图模式。
- 2、设置采图参数，方法同前。
- 3、点击“Live”进行图像预览。用 Control panel 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。
- 4、点击“Stop”终止图像预览。
- 5、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。



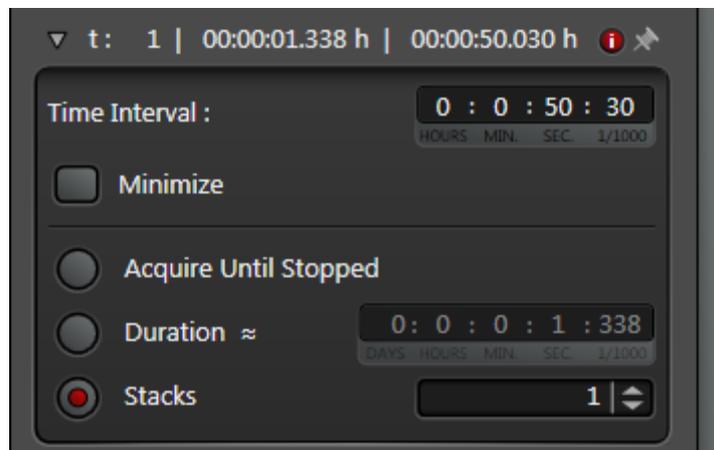
五、时间序列成像：

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。



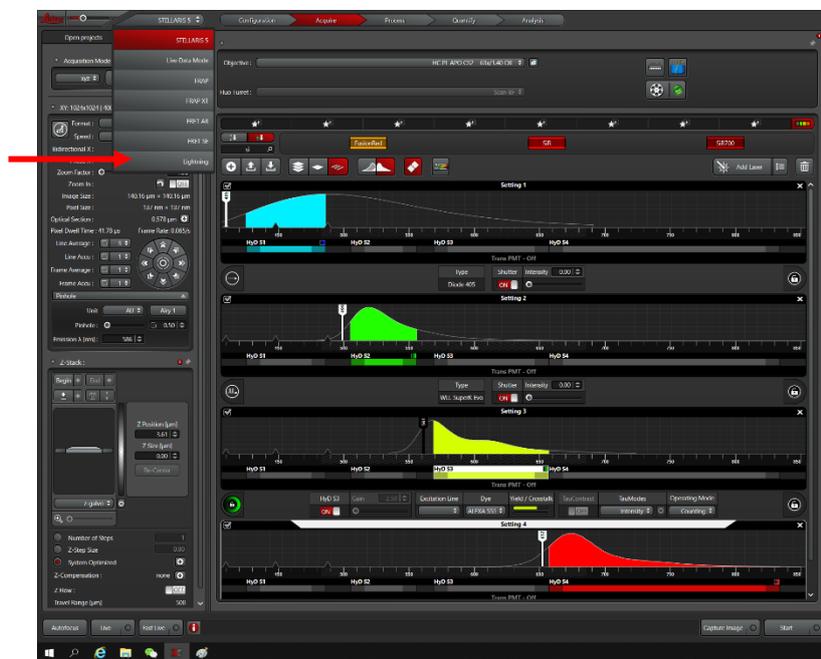
2、设置光路参数，方法同前。

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”。按采图需要选择“Acquire until stopped”、“Duration”或“Frames”。“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。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。



六、LIGHTNING 超高分辨率成像

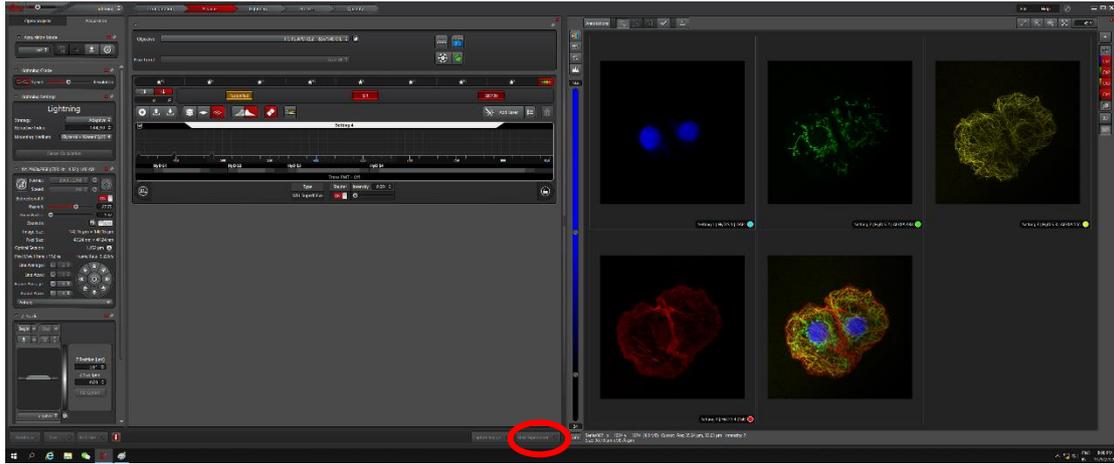
在“Acquire”界面下，在左上角处点击“STELLARIS”，在下拉菜单中选择LIGHTNING，如下图所示：



LIGHTNING 界面：

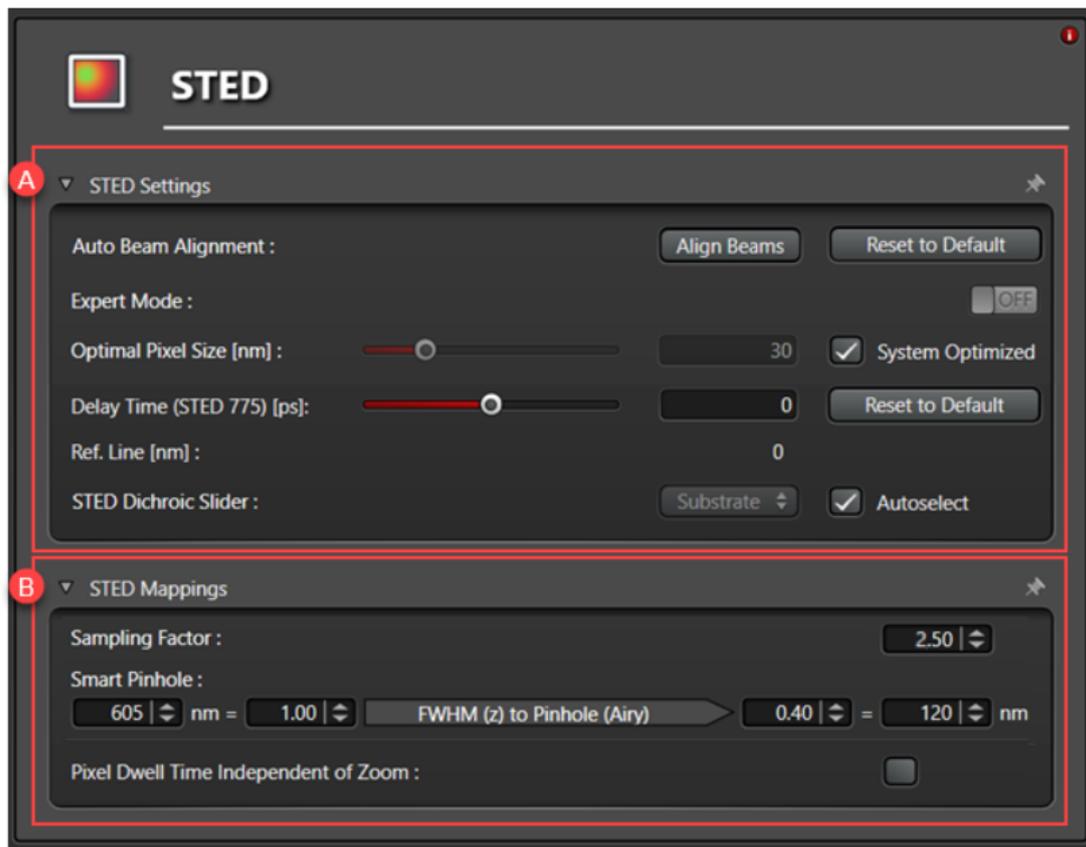


- A 框中，如想获得高分辨率图像，则向右拖动；如想以更快的速度采集，则向左拖动。
- B 框中，在 Mounting medium 处选择样品的封片剂。
- 设置光路参数，方法同前。
- 点击 Start experiment 进行图像采集



七、STED 成像

打开 STED 激光器后，在 Configuration 里 STED 模块进入自动校准程序



点击 Align Beams 进入 STED 和可见光自动校准程序，等待系统提示 Align Beams Successful 表示校准成功，回到 Acquire 界面就行通道设置。

STED 模式通道设置，使用 ImageCompass 设置 STED 光路，调节 STED 激光 Intensity，一般情况设置 STED 激光初始 Intensity 60%，AOTF Intensity 10-50%，依据成像结果实时调整 AOTF Intensity。

3D STED 设置

如果希望在 Z 轴方向提高分辨率，可以启用 STED 3D 功能。

在 STED 激光控制栏可以设置 STED 激光管的 Z 轴分量（左下图左侧一栏），同时在 PSF 示意图中则可以实时显示当前参数下估算的 PSF 形状（右下图，该对话框在 z-stack 设置界面上方，默认处于隐藏状态，可点击展开）。

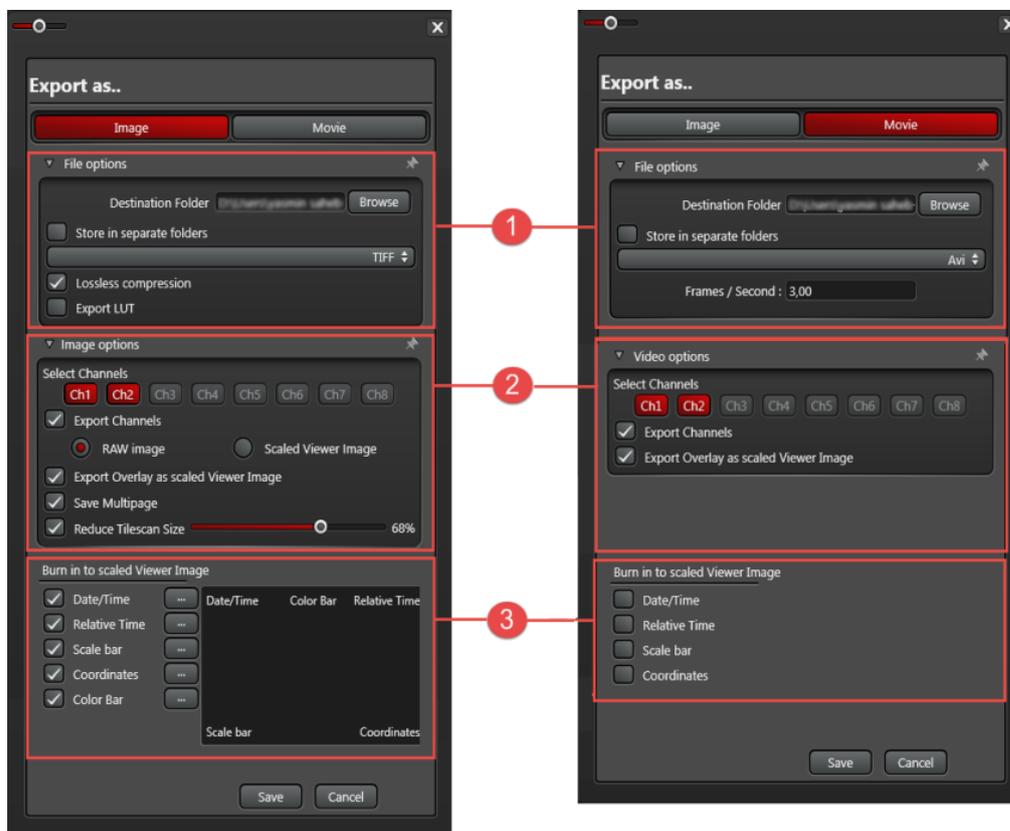


八、保存图像及导出

1. 图像文件的操作：“Acquire”的“Open projects”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。点击“save project”，原始文件保存格式为.lif，只能通过 Leica X 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)。



九、关机

- 保存已采集的图像。
- 在 LAS X 软件“Configuration” → “Laser Config”界面关闭所有激光。
- 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。
- 关闭 LAS X 软件。
- 关闭电脑。
- 在共聚焦控制单元处，先将钥匙旋转至“off”。
- 关闭“Laser”和“Power”开关。

十、系统维护：

- 保持室温为 18-25℃，相对湿度 40-60%，尽量保证室内环境的清洁。
- 严格遵守激光器的开、关流程。
- 若使用过油镜，需用蘸有无水乙醇的擦镜纸清洁此物镜；若使用过水镜，也需用干擦镜纸轻轻吸干上面的水渍。
- 关机前，尽量将当前物镜转换为低倍物镜并调至最低位，可最大程度保护物镜。
- 输出数据时，使用光盘刻录数据而非移动存储设备可更好的防止电脑中毒。
- 避免空调直接对着显微镜吹风。
- 拍摄图像时，应避免震动、环境光线等的干扰。