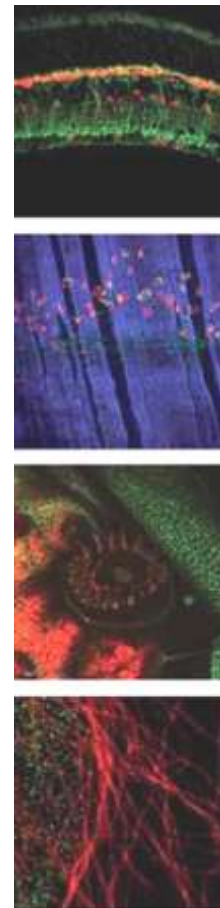


From Eye to Insight



Leica TCS SP8

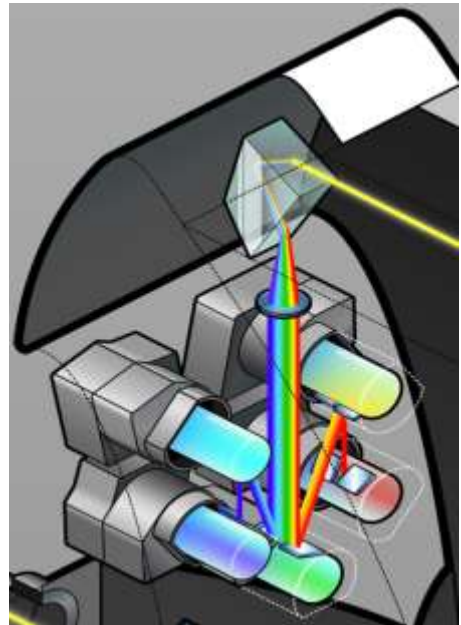
共聚焦显微镜快速操作手册



制作：徕卡显微系统（上海）贸易有限公司

高天龙

2018年4月



目录

.....	1
Leica TCS SP8 共聚焦显微系统组成图.....	3
2 系统使用.....	Error! Bookmark not defined.
2.1 开机顺序（硬件标号请参考前面的系统组成图）.....	4
2.2 软件界面简介.....	5
2.3 显微镜下样品观察.....	6
2.4 共聚焦图像采集.....	7
2.5 XYZ 三维扫描（Z-Stack）.....	11
2.6 时间序列扫描（Timeseries or xyt Scan）.....	13
2.7 HyD 检测器.....	14
2.8 图像文件的保存及输出.....	15
2.9 关机.....	17
3 系统的维护.....	17



Leica TCS SP8 共聚焦显微系统组成图



① 研究级倒置显微镜

② 共聚焦扫描头

③ 防振台

④ 荧光激发光源

⑤ 显微镜控制器

⑥ 遥控手轮

⑦ 显示器

⑧ 控制面板

⑨ 键盘

⑩ 鼠标

⑪ 电脑桌

⑫ 激光器箱

⑬ 电源控制

⑭ 电脑主机

2.1 开机顺序（硬件标号请参考前面的系统组成图）

(1) 先按电脑主机上的电源按钮启动电脑，

再打开显微镜控制器 的开关，

然后依次打开 “Scanner Power”、“Laser Power” 两个按钮，

将 “Laser Emission” 上的激光开关钥匙旋至 “On-1

(3) 打开荧光激发光源

按绿色的 Power 按钮，如下图



光源亮度调节旋钮

光闸



Power 按钮

(4) 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。

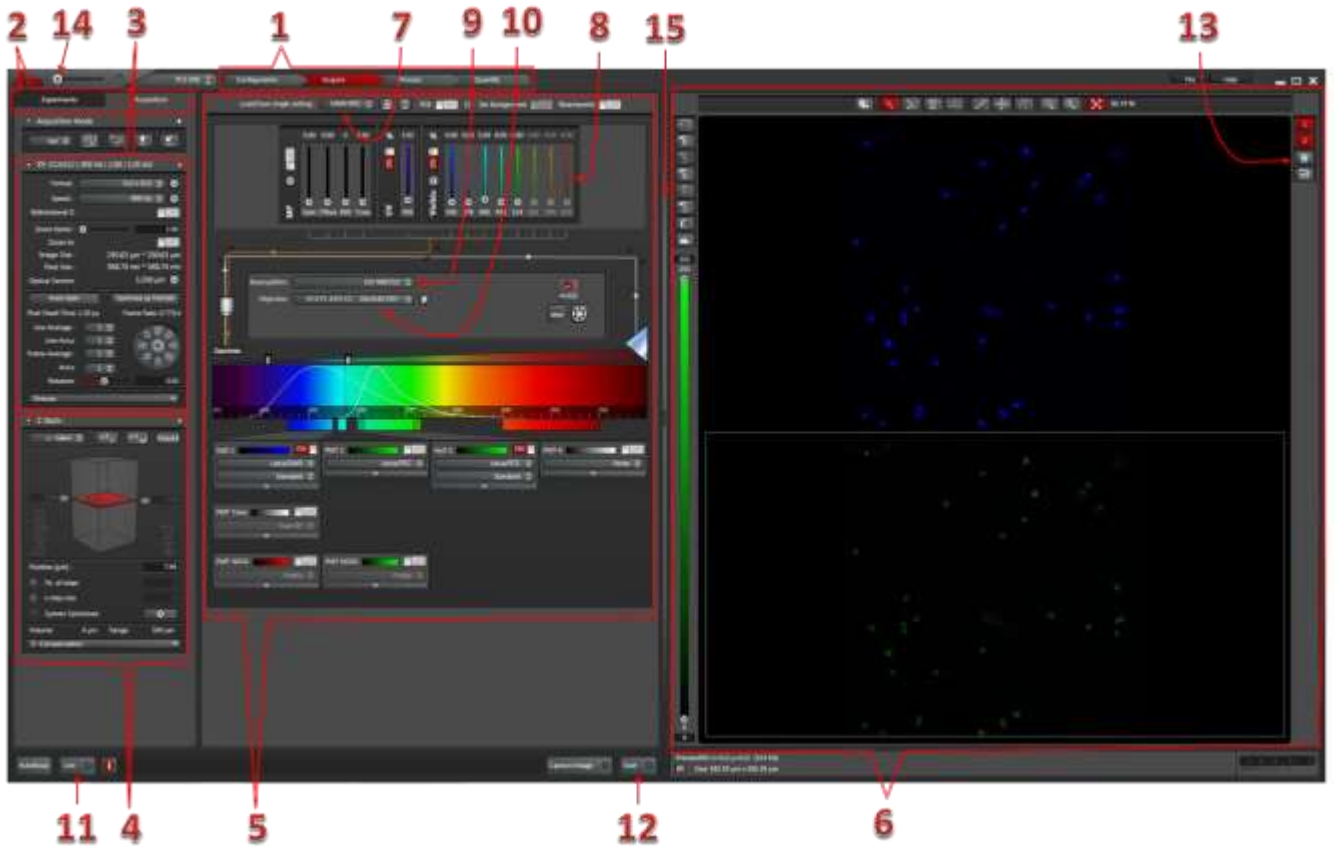


(5) 软件引导一段时间后会停留在配置选择界面：

在 “Configuration” 下拉菜单中选择需要的配置；一般为带有 “Machine” 的选项，不同的系统命名会有所不同，以装机工程师告知的为准。（其中带有 “simulator” 字样的为模拟方式，该方式不控制显微镜硬件，不能拍摄图像，适合处理数据）。



2.2 软件界面简介



- 1 功能界面切换：参数设定（Configuration）、扫描取图（Acquire）、图像处理（Process）、定量测量（Quantify）
- 2 工具和文件管理界面切换：Project 界面下显示当前拍摄和打开的图片，Acquisition 下显示的是当前功能界面的功能按钮和参数
- 3 拍摄参数：包括图像像素 Format、扫描速度 speed、图像放大 Zoom factor、采图平均 Average、针孔调节 Pinhole 等。
- 4 三维扫描工具组，用于设定和显示三维扫描的 Z 轴范围，及其他辅助设定
- 5 光路显示及设置区域，从上向下直观显示了从激发到荧光检测的光路细节和关键设置
- 6 图像显示窗口
- 7 预设光路选择按钮
- 8 激光控制栏
- 9 分光镜选择
- 10 物镜选择按钮
- 11 预览按钮，可用于开始和停止预览
- 12 拍摄图像按钮
- 13 图像显示模式按钮，在使用两个或以上数量通道拍摄多色图像时，用于显示所有通道或者叠加后的图像
- 14 界面缩放调节滑块，左右拖动可以调节界面项目的显示比例
- 15 界面调整栏，左右拖动可调整光路设置区域与图形显示窗口的范围

2.3 显微镜下样品观察 (DMi8)

2.3.1 选择物镜: 配有触摸屏的电动主机, 可通过触摸屏界面选择物镜 (右图)。

点击按钮显微镜即可自动切换到相应物镜, 在干/油镜之间转换时需要点击两次按钮才可完成切换。

2.3.2 明场观察: 先将样品置于载物台上。

按钮操作: 按显微镜左侧的明场-荧光通道切换按钮 (TL/Fluor) 切换明场光路 (如右图)。TL 边上的黄色指示灯亮代表明场光路打开。按明场-荧光照明开关按钮打开照明光源。旋转明场-荧光亮度调节旋钮调节照明亮度。

触摸屏操作: 点击下方左图所示的 BF 按钮即可切换到明场光路, 点击 TL-Shutter 按钮打开明场照明光源。

在明场条件下选择合适的视野。通过调焦按钮或旋钮调节至合适的 z 轴平面。

如果是电动载物台, 需通过遥控手轮调节载物台的运动以选择合适的视野 (如下方右图)。



调焦旋钮

电动载物台X方向调节旋钮

电动载物台Y方向调节旋钮

2.3.3 荧光观察:

按钮操作: 与明场观察操作类似, Fluor 边上的黄色指示灯亮时代表荧光光路打开。开关及亮度调节跟明场一样。

触摸屏操作: 点击右图所示的 FLUO 按钮即可切换到荧光光路, 点击 TL-Shutter 按钮打开荧光激发光闸。点击下方的 FLUO-Filtercubes 各个按钮可切换到相应的荧光滤块, 观察不同颜色的荧光。

2.3.4 观察完毕后, 及时关闭荧光光闸以保护样品



2.4 共聚焦图像采集

2.4.1 光路设置：



单色拍照

选择“Load/Save single setting”下拉菜单中已有的设置，激光波长及其输出功率、分光镜、检测波长范围、检测器 gain 及 offset 都会自动设置，包含几种最常用的荧光染料。

多色拍照：

点击“SEQ”按钮激活 Sequential Scan 功能，左下方出现 Sequential Scan 窗口，点击“Load”按钮，在新出现的对话框里选择符合自己标本荧光的设置文件，



2.4.2 选择扫描模式

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, $xy\lambda$, xyzt, $xyz\lambda$, $xyz\lambda t$ 等。

2.4.3 设置扫描参数

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）。

平均：用于降低图像噪点。分为线平均（Line average）和面平均（Frame average），一般 smart gain 的值越高，average 也需要相应增高。

2.4.4 预览图像

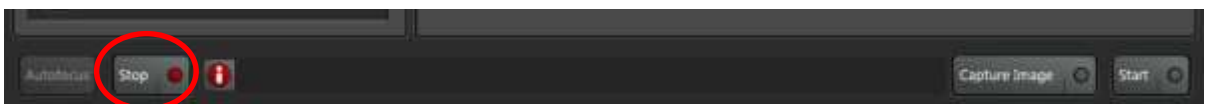
可调节 format 至 512×512 ，speed 至 **600Hz** 以获得较快的刷新频率。

预览应达到以下目的：①找到最适合观察的焦平面；②使图像亮度围达到最佳。

点击软件 Acquire 界面左下方的“**Live**”按钮以预览图像（下图），图像将显示在右侧的显示屏上。



预览开始后，“**Live**”按钮变为“**Stop**”，点击“**Stop**”按钮可停止预览。



注意：一旦预览开始，激光即开始照射样品，为减少对样品的伤害，应快速操作，尽量减少预览的时间，

可通过调节控制面板的“**Z Position**”旋钮找到最适合观察的焦平面（如下图）；或者调节遥控手轮或显微镜镜体上的调焦旋钮（见第 9 页图）。



通过调节激光输出功率（见第 10 页图）和 Smart Gain（见上图）来使图像亮度合适。

参数的调整原则：

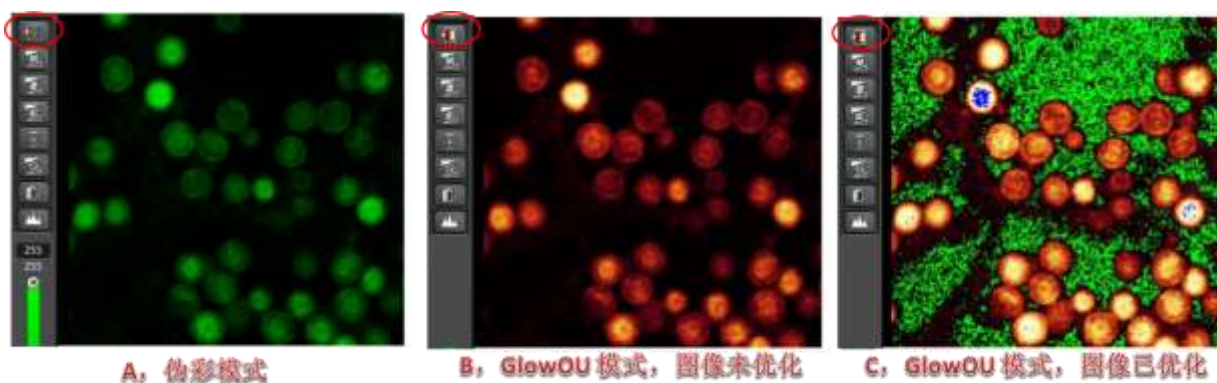
(1) Smart Gain 的调节：增大则信号和噪音都增强，减小则信号和噪音均减小。一般情况下，PMT 检测器 Gain 值的正常范围为 500—1100，HyD 检测器 Gain 值的正常范围为 10%~500%。

(2) Smart Offset 的调节：可扣除 PMT 检测器的背景噪音 (HyD 检测器不需要)，但标本信号也有一定程度的扣除。原则上，在保证图像质量的前提下，Digital Offset 值越接近于 0 越好，多数情况下的经验值是 -0.3 左右。

(3) 另外，对于每个通道，需要灵活调节激光的强度：激光强度越高，则信号越强，同时标本更容易被漂白或淬灭。当 PMT gain 值高于 800 或 HyD gain 值大于 150% 时荧光图片亮度还是不够时，可以考虑适当增加激光强度。在做活细胞或者多层成像时，应尽量减少激光强度，原则上，在保证图像质量的前提下，激光强度越低越好。

图像亮度动态范围的判断方法：

理想的荧光图像中应该只有少数像素点达到饱和，可通过位于图像左侧的 LUT 按钮进行观察。LUT 按钮 (下图红圈) 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，，而灰度值为 0 的像素点显示为绿色。调节 Smart Gain 使图像中仅少数像素点呈蓝色，调节 Smart Offset 来降低图像的背景。荧光图像 Smart Offset 的默认值为 0%，通常应将其调为负值以使图像背景呈绿色。下图中 B 图亮度及背景值设置均未达最优化值，调节 Smart Gain 和 Smart Offset 后，达到 C 图中的效果，小部分信号呈蓝色，而背景呈绿色。



对于 HyD 检测器，其背景噪声很低，无需通过调节 Smart offset 来降低背景。

如果启用了 Sequential Scan，应该在分别点击每个扫描序列切换按钮 (Seq)，分别在预览状态调整图像亮度。

2.4.5 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”按钮采集图像。对于序列扫描，或多维图像扫描，单击“Start”按钮进行图像采集。（见下图）在此之前应改变扫描分辨率、扫描速度、线/面平均次数等扫描参数，以保证采集到精细的图像

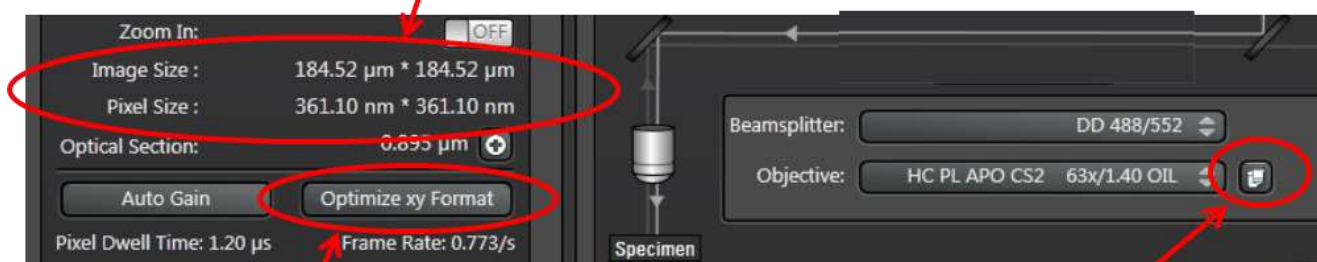


扫描分辨率（Format）的设置原则：

通常情况下，采集图像时，为充分利用系统的分辨能力，可直接点击“Optimize xy Format”按钮（如下图），由系统自动设置最佳分辨率。

普通共聚焦采图时，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 $2/5 \sim 1/2$ 。物镜分辨极限可点击物镜参数表按钮从弹出的界面读取，像素点大小（Pixel Size）可在采图参数设置界面获得。像素点大小随扫描分辨率增大和放大倍数（zoom）增加而减小。与高倍物

图像视野的大小和像素点大小



点击自动设置最适扫描分辨率

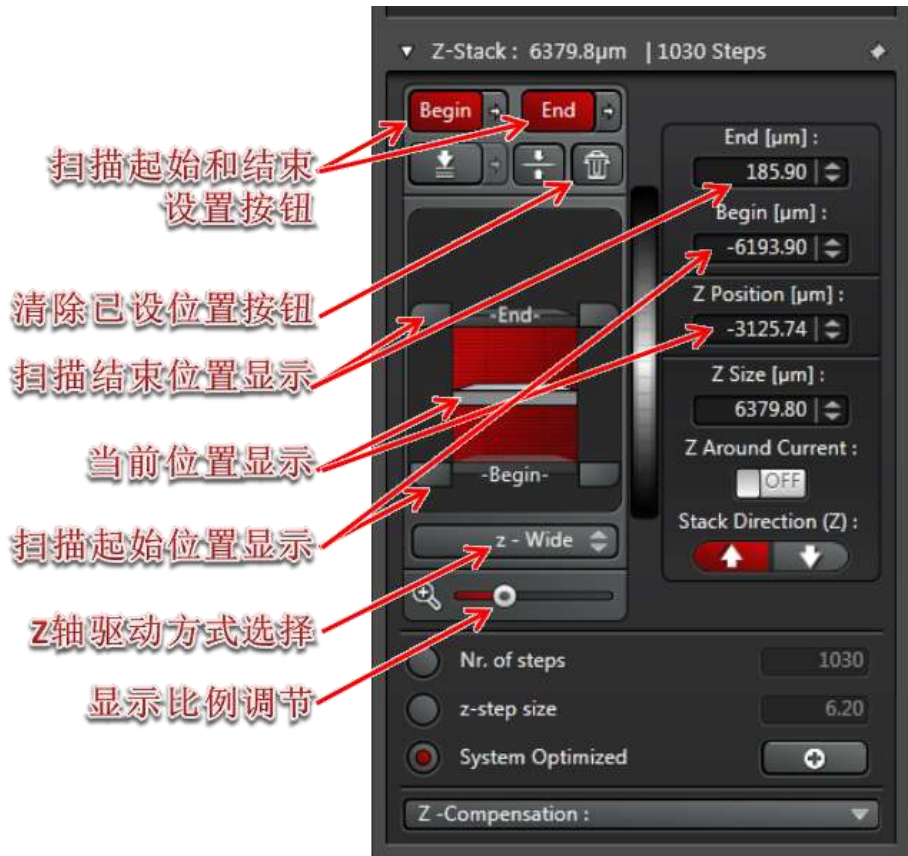
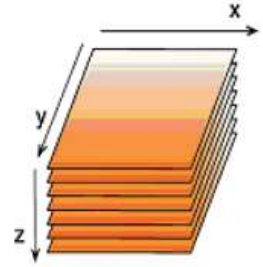
物镜参数表按钮

镜相比，低倍物镜需要更高的扫描分辨率。

2.5 XYZ 三维扫描 (Z-Stack)

xyz 扫描模式为默认采图模式，设定Z轴后可以扫描多个层面，得到样品的三维信息，适合观察样品中目标的空间分布。

Z-Stack的设置界面如下图所示。



2.5.1 选择Z轴驱动方式

根据不同的系统配置，可以点击Z轴驱动方式按钮选择“z-Galvo”或者“z-Wide”方式：

“z-Wide”：使用显微镜固有的Z轴调节方式，倒置显微镜调节物镜的升降，正置显微镜调节载物台的升降，可通过显微镜镜体的调焦旋钮和遥控手轮的调焦旋钮控制。

“z-Galvo”：使用选配的SuperZ进行精细的Z轴调节，只能通过控制面板的“Z Position”旋钮控制。

2.5.2 设置光路参数，方法同前。

2.5.3 设置Z轴范围

点击“Live”进行图像预览，调节z轴至层切所需的起点，点击扫描起始设置按钮定义层切起点，调节z轴至层切所需的终点，点击扫描结束设置按钮定义层切终点，点击“Stop”终止图像预览。

2.5.4 Z轴参数调整

定义了Z轴的起始和终止点之后，接下来需要定义层切数目。

Z-stack对话框中分别有：“z-step size”（相邻两个层切面的间距）和“Nr. of steps”（层切数目），选中时，即可以根据需要设置；第三项为系统的优化值（“system optimized”），选中时系统会根据物镜参数、波长等计算出Z轴分辨率，然后将层切数设定为最优值。

2.5.5 采图

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。

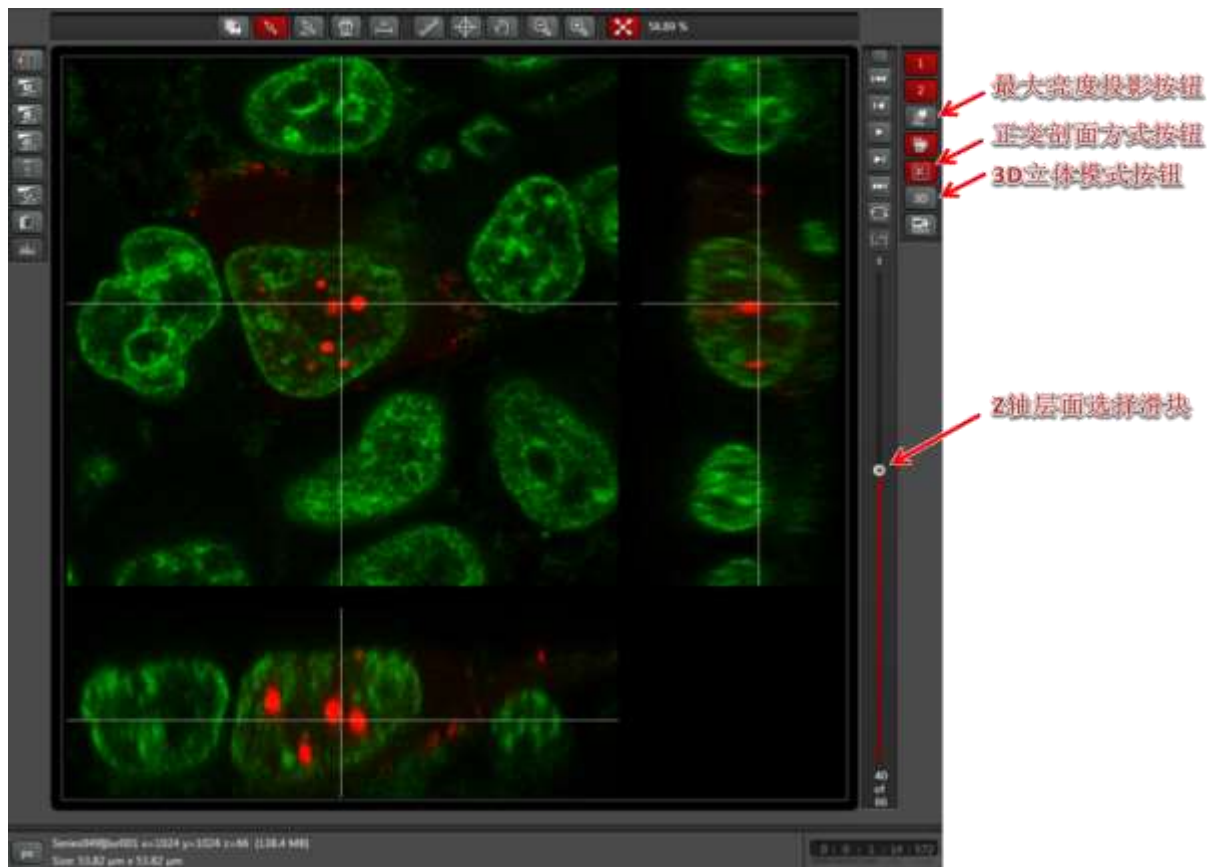
采图完毕后，点击清除已设位置按钮，使Z轴位置重新处于未定义状态，以免影响下次采图。

2.5.6 3D展示

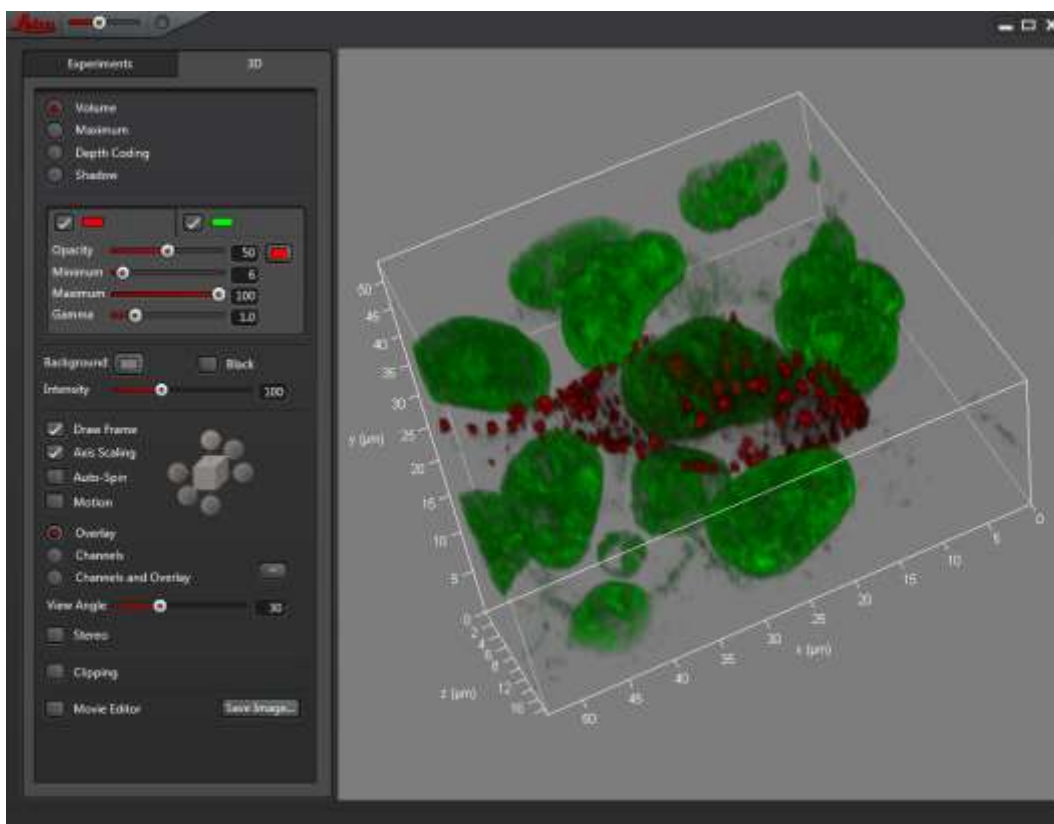
拍摄完3D图像之后，在图像显示窗口右侧会多出3个用于3D图像显示的按钮：

最大亮度投影按钮（Maximum projection）：将所有Z平面的图像信息选取最亮的点集中显示在一层，相当于将多层图像压成一层，多用于集中显示跨越多个层面的结构信息。

正交剖面方式按钮（Orthogonal section）：分别以XY、YZ、XZ三个方向显示指定位置的剖面信息，如下图，多用于观察结构在3D空间内的定位。



3D立体模式按钮（Open in 3D viewer）：打开3D可视化模块，以直观方式展示3D结构，如下图，该模块功能强大，有多种参数可以调整显示方式，亦可以将所观察到的图像输出成视频。



2.6 时间序列扫描（Timeseries or xyt Scan）

时间序列扫描多用于活细胞成像，记录动态过程。

2.6.1 在“Acquire”菜单栏的“Acquisition”中选择xyt 扫描模式后，将出现xyt 扫描菜单，如右图。

2.6.2 设置光路参数，方法同前。

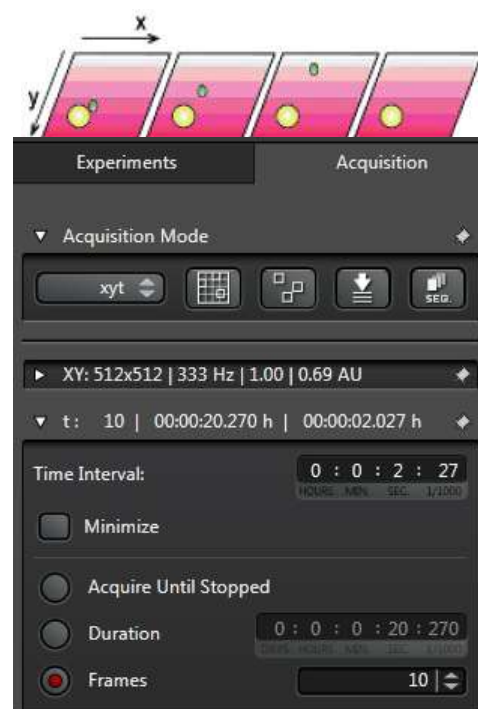
2.6.3 定义“Time Interval”，即采集相邻两帧图像所需的时间间隔，也可选择最小值“Minimize”。

2.6.4 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。



2.6.5 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。

2.7 HyD 检测器

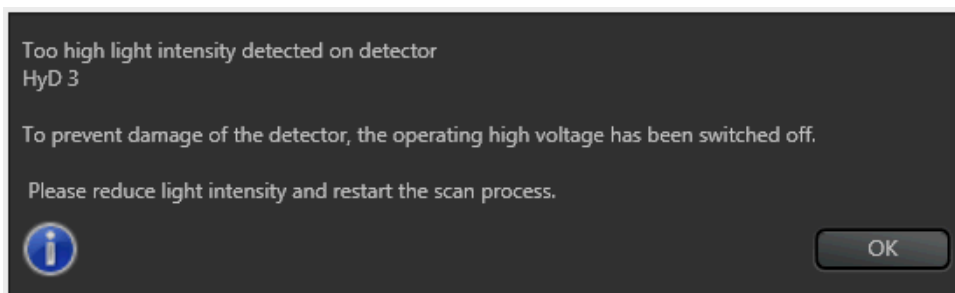
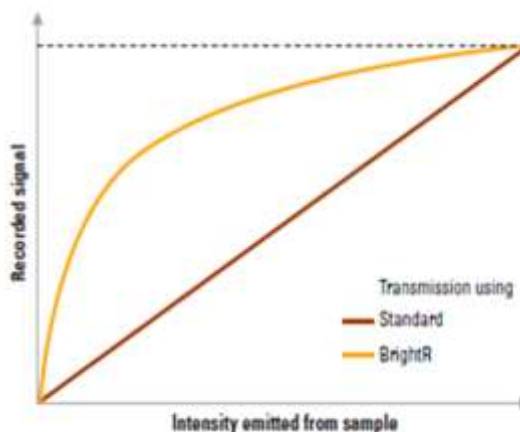
HyD检测器是高性能的检测器，比PMT更灵敏响应速度更快，并且有更多的功能。HyD检测器有三种操作模式可供选择：

Standard: 标准模式，跟PMT一样，检测到的信号直接显示为图像，可通过调节SmartGain来调节图像亮度。

Counting: 光子计数模式，以每个像素点所检测到的光子数显示为该像素点的亮度，此时检测器的Gain为一个定值，通过长时间的检测使图像显现出来。常用于非常弱的荧光样本的成像。使用此模式采图时，需使用累加（accumulation）功能来使采集到的图像达到合适的亮度。

BrightR: 如果视野中有非常亮的结构，但是又需要将较暗的结构显示出来时，适合用此模式，此模式会在较为暗的部分使用稍多一些的动态范围，如右图。

注意：HyD检测器非常灵敏，如果收集到过强的光信号会影响其寿命，系统有一个安全机制对此进行保护，如果信号过强，会先有声音报警，如果操作者未采取措施，会自动关闭检测器，同时弹出如下的提示窗口：



此时应点击“Stop”停止预览，降低激光功率，调低SmartGain值，重新预览。

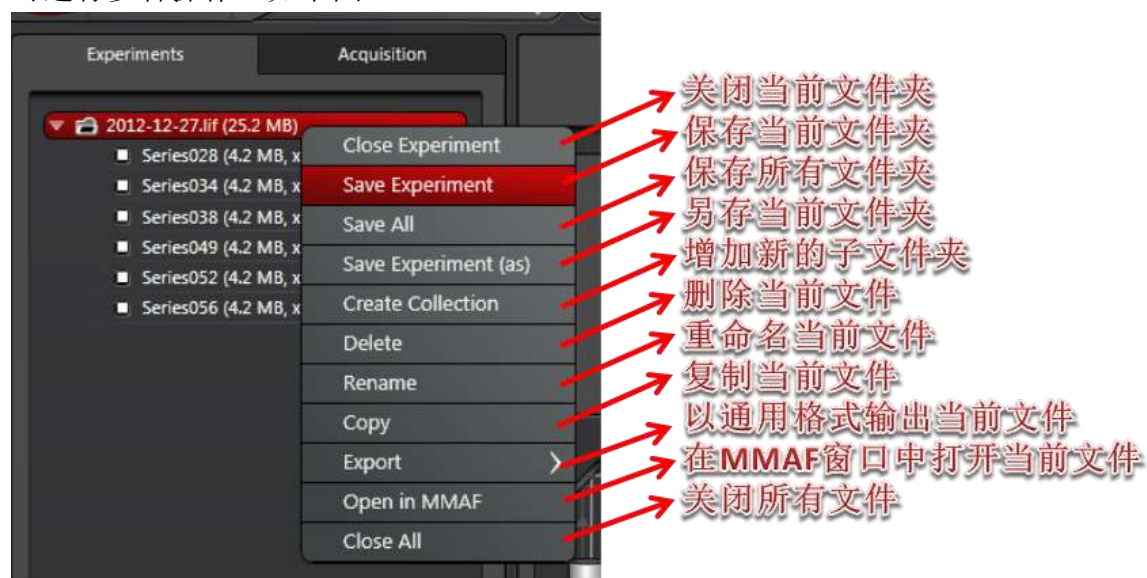
特别注意：

- ①使用HyD成像时，一开始激光功率不要设置太高，应从低开始慢慢增加；
- ②不要用HyD检测反射光，因为一般情况下，反射光亮度要大大强于荧光。

2.8 图像文件的保存及输出

2.8.1 图像文件的操作：

“Acquire”的”Experiment”或“Project”下显示采集的所有图像文件名，默认本次开机后采集的所有图像都放在一个文件夹下，右键点击文件名，可进行多种操作。如下图：



选择“Save Experiment”或“save Project”即可将当前文件夹下的所有图片保存为一个文件，文件保存格式为*.lif 原始文件，只能通过Leica LAS X或其他专业图像数据处理软件打开。

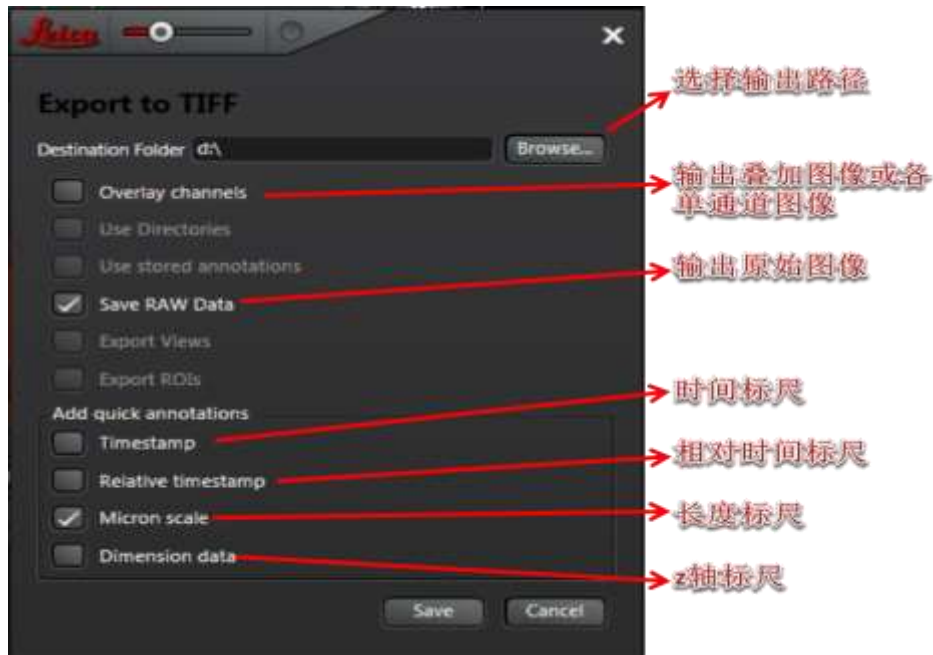
2.8.2 图像文件的输出：

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

（QuickTime、.avi、MPEG-4、WMV等）。如右图。所得文件可用普通图像浏览软件打开。

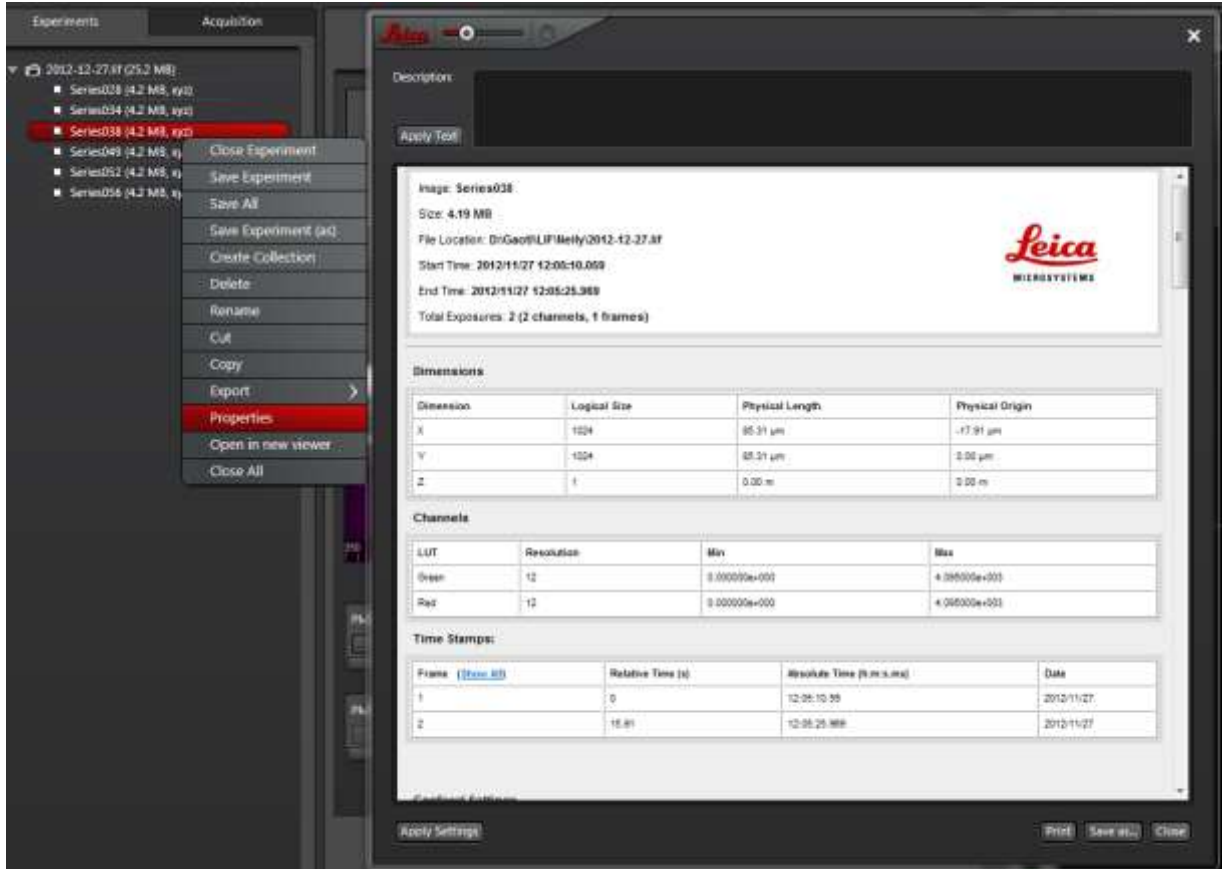


选择” As Tiff” 或” As JPEG”，出现如下图的对话框，可选择输出路径、所需标尺及位置等。确定后，点击” OK”，即可将图像输出至指定路径。



2.8.3 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，如下图。



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。

2.9 关机

- (1) 保存已采集的图像。
- (2) 在LAS X软件Configuration” → “Laser Config” 界面关闭所有激光。
- (3) 关闭显微镜荧光电源。
- (4) 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。
- (5) 关闭LAS X 软件。
- (6) 先关闭STED激光的开关，再关闭电脑桌右侧 “Laser Power” 按钮右侧的激光开关钥匙（Laser Emission）。
- (7) 关闭 “Scanner Power” 按钮。
- (8) 在电脑上进行图像数据的输出。
- (9) 关闭电脑后，关闭 “PC Microscope” 按钮（CSU系统需关闭显微镜控制器开关）。
- (10) 如果配有氩离子激光器，需等风扇停止后（关闭激光开关钥匙约5分钟后），关闭 “Laser Power” 按钮。没有氩离子激光器的系统可直接关闭 “Laser Power” 按钮，无需等待风扇停止。记录关机时间、仪器状况等信息。

3 系统的维护

- (1) 保持室温为21℃左右，相对湿度20-60%，尽量保证室内环境的清洁。
- (2) 严格遵守激光器的开、关流程。
- (3) 如荧光光源为汞灯，则打开电源后需等10-15min方可使用；如荧光光源为金属卤素灯，则打开电源后可直接使用。无论哪种灯作为光源，打开后20min以上才能关闭。
- (4) 如需用到 “Mark and Find”、“Tile Scan”、“Matrix” 等要求载物台精确定位的功能时，在启动软件后选择进行载物台初始化，否则也可不做初始化。在初始化过程中，载物台会向四周运动，因此需保证周围没有物品阻碍其运动。
- (5) 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。
- (6) 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。
- (7) 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。
- (8) 避免空调直接对着显微镜吹风。
- (9) 拍摄图像时，应避免震动、环境光线、手机信号等的干扰。


Leica

MICROSYSTEMS



任何技术问题，欢迎致电
24小时服务热线：400-650-6632

了解LEICA SP8 的更多详细操作说明

点击软件界面上的“”圆形按钮打开帮助系统。

了解 TCS SP8 的更多信息

关于 SP8应用、技术、软件及 TCS SP8 平台的更多信息，请参见 SP8 产品页面。

www.leica-microsystems.com/sp8

徠卡科学论坛：生命科学新主题及相关主题的跨学科信息交流平台

徠卡科学论坛创立于2005年，迅速发展成为国际跨学科平台，探讨与生命科学主题密切相关的新颖科学见解和知识。查找关于所有科学探讨和教育活动的更多信息。

www.leica-microsystems.com/events/leica-scientific-forum

