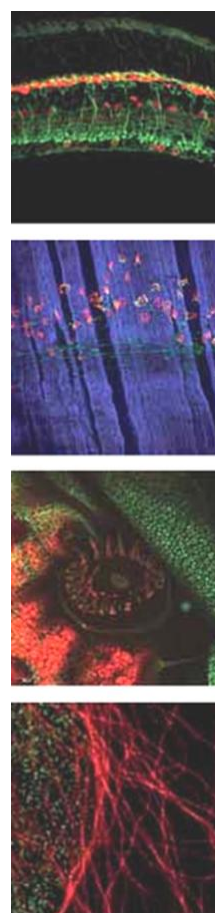


Leica 激光扫描共聚焦显微镜

快速操作手册



制作：广州市妇女儿童医疗中心光学显微镜平台

2025 年

目 录

1、Leica SP8 系统组成图	3
2 系统的使用	5
2.1 开关机顺序	5
2.2 软件界面简介	7
2.3 在显微镜下观察样品	7
2.3.1 选择物镜:	7
2.3.2 明场观察:	8
2.3.3 荧光观察:	8
2.3.4 其他观察方式:	8
2.4 采集共聚焦图像	9
2.4.1 光路设置:	9
2.4.2 选择扫描模式	11
2.4.3 设置扫描参数	11
2.4.4 预览图像	11
2.4.5 采集图像	14
2.5 XYZ 三维扫描 (Z-Stack)	14
2.5.1 设置光路参数, 方法同前。	15
2.5.2 设置 Z 轴范围	15
2.5.3 Z 轴参数调整	15
2.5.4 采图	15
2.5.5 3D 展示	15
2.6 时间序列扫描 (Time series or xyt Scan)	17
2.7 波长扫描 (xyλ Scan)	17
2.8 HyD 检测器	20
2.9 图像文件的保存及输出	21
2.9.1 图像文件的操作:	21
2.9.2 图像文件的输出:	22
2.9.3 图像采集参数的观察及恢复:	23
3 系统的维护	23

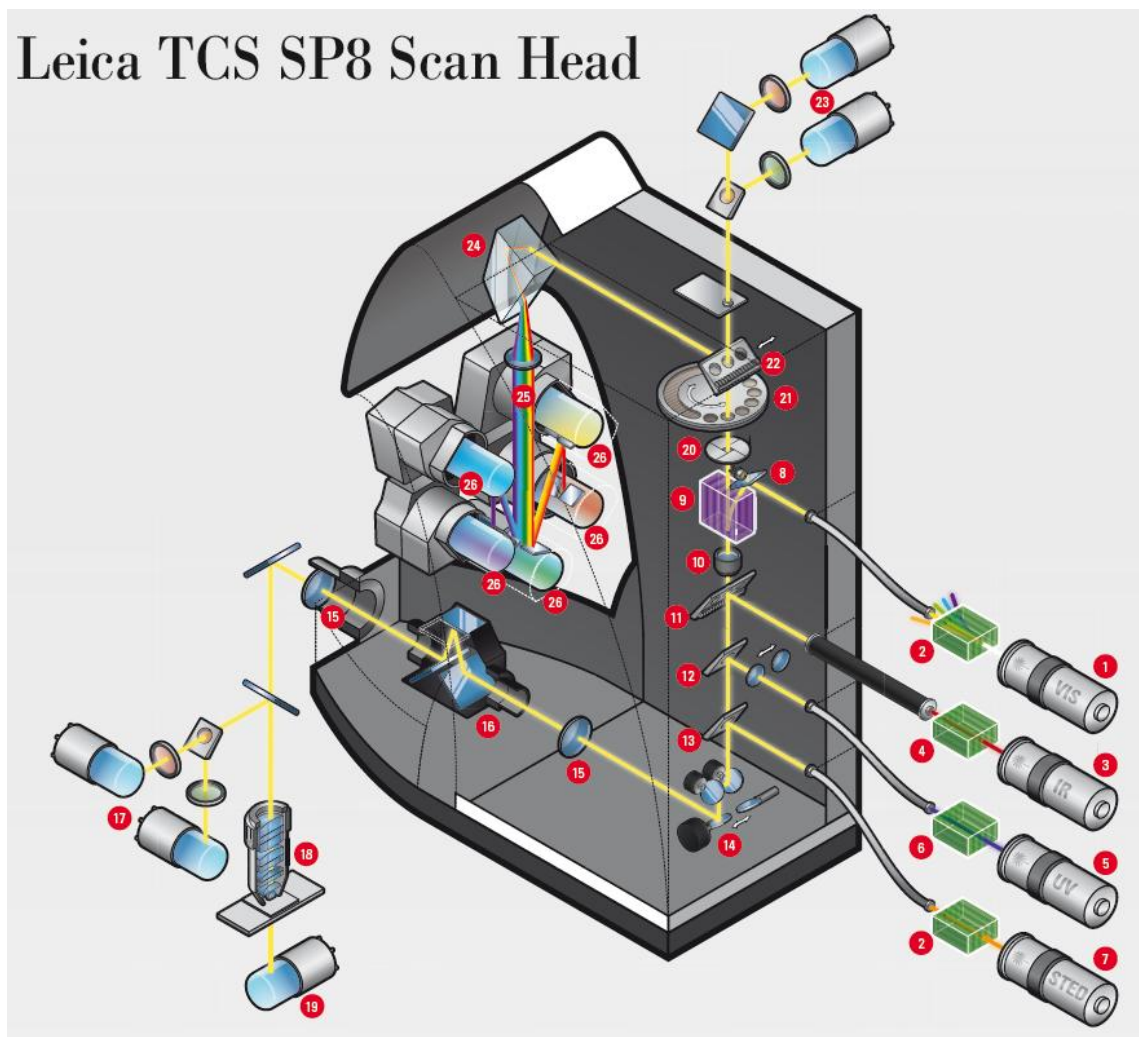


1、Leica SP8 系统组成图



LEICA TCS SP8倒置, 配备灵活型光源组件 (FSU)

Leica TCS SP8 Scan Head



- 1 可见波长激光或白激光
- 2 声光调制器 (AOTF)
- 3 红外激光 (IR) *
- 4 电光调制器
- 5 紫外激光*
- 6 AOTF或直接调制器 (DMOD)
- 7 STED 激光*
- 8 Setlight监控二极管
- 9 AOBS, 及其他选配件
- 10 用于FRAP的光束增强镜*
- 11 红外激光耦合
- 12 与CS2紫外光路耦合的紫外激光
- 13 STED激光耦合
- 14 全视野扫描镜及串行高速扫描镜选件
- 15 UVIS, HIVIS或VISIR的光路镀膜
- 16 扫描视场旋转镜 (Abbe-Konig 旋转) *
- 17 在NND位置上的反射光检测器 (RLD) *
- 18 物镜 (可提供各种选择) *
- 19 在NND位置上的透射光检测器 (TLD) *
- 20 正方型针孔
- 21 Fluorifier盘*
- 22 X1出口接口*
- 23 外置检测器*
- 24 色散棱镜
- 25 分开的荧光光谱
- 26 最多5个光电倍增管或4个HyD检测器

2 系统的使用

2.1 开关机顺序



➤ SP8 开机总原则：1、先硬件后软件；2、先周边后主机；



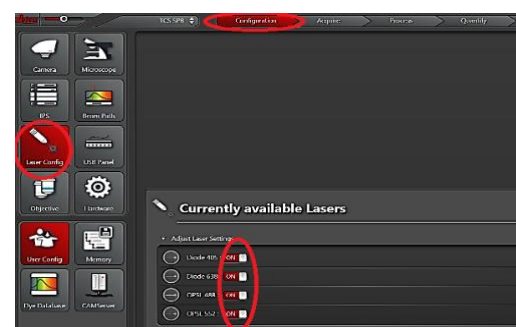
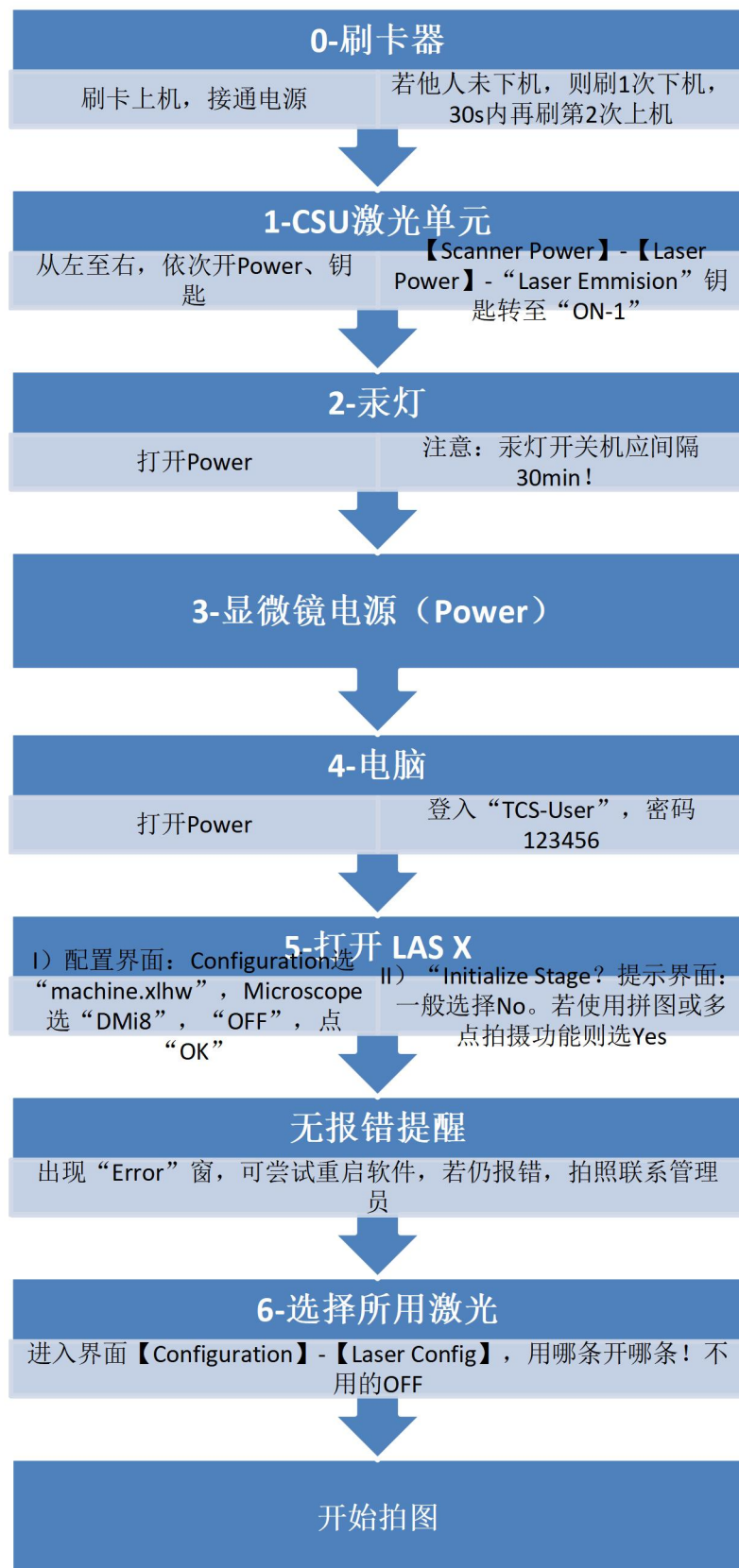
开机注意事项

汞灯注意：开关机间隔一般应 30min；

1. 开汞灯前确认关闭时间，可用手触摸机箱，如发烫或较热，则等待 10-15min，待恢复常温再打开；
2. 如汞灯不出光，请检查 Intensity 非 0 档；

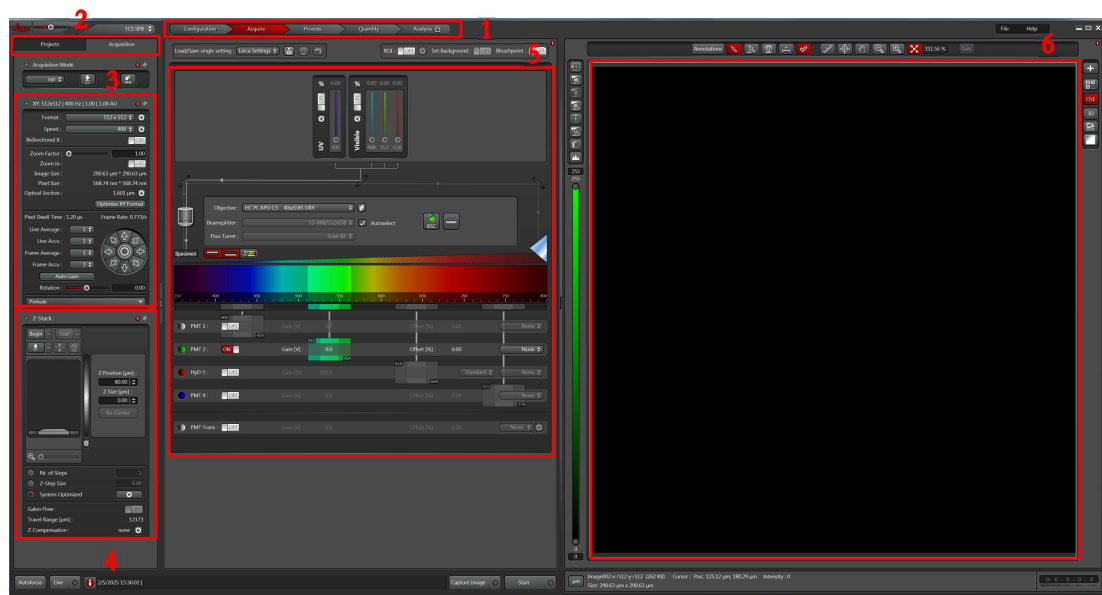
关机注意事项

- 1、物镜切换至 10X（或 5X/空位）；
- 2、若使用油镜，则按操作步骤擦拭油镜；（非油镜一般勿自行擦拭）
- 3、实验结束登记，盖上防尘罩。



- 关机顺序 与开机顺序相反，即关【软件】→【电脑】→【显微镜主机】→【汞灯】→【CSU 激光单元】（从右至左）→【刷卡下机】

2.2 软件界面简介

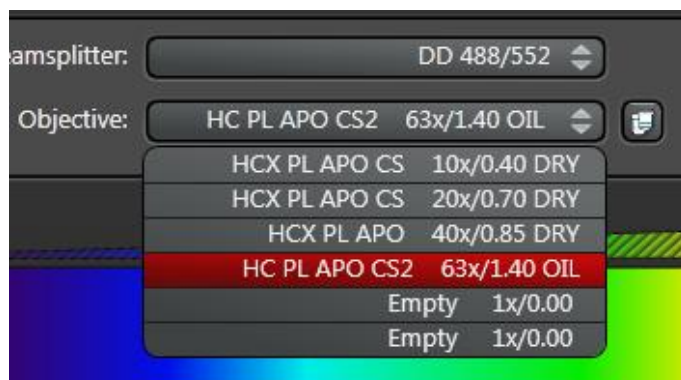


- 1 功能界面切换：参数设定（Configuration）、扫描取图（Acquire）、图像处理（Process）、定量测量（Quantify）
- 2 工具和文件管理界面切换：Projects 界面下显示当前拍摄和打开的图片，Acquisition 下显示的是当前功能界面的功能按钮和参数
- 3 拍摄参数：包括图像像素 Format、扫描速度 speed、图像放大 Zoom factor、视野旋转 Rotation 等。
- 4 三维扫描工具组，用于设定和显示三维扫描的 Z 轴范围，及其他辅助设定
- 5 光路显示及设置区域，从上向下直观显示了从激发到荧光检测的光路细节和关键设置
- 6 图像显示窗口

2.3 在显微镜下观察样品

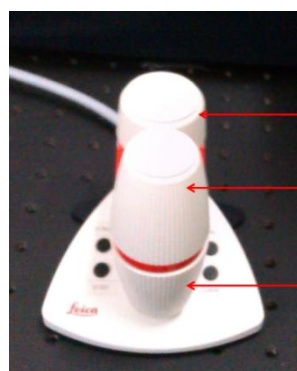
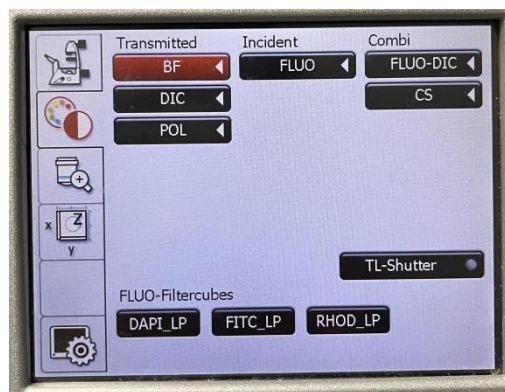
2.3.1 选择物镜：

可通过显微镜主机物镜切换界面进行物镜转换，或软件中的“Objectives”按钮进行选择（如下图）。



2.3.2 明场观察：

将样品置于载物台上，按显微镜主机面板上的 BF 选择明场观察，按 TL-Shutter 打开明场光路（如右图），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，通过显微镜主机左侧的“INT”功能键调节光强。本系统配备电动载物台，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）。



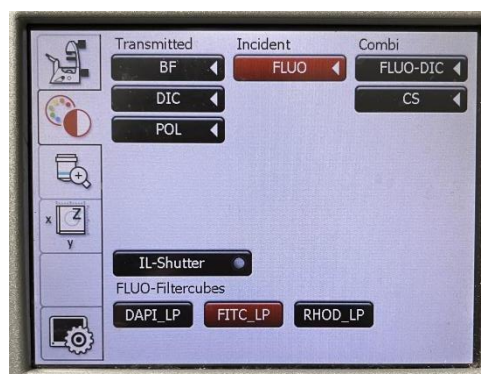
调焦旋钮

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：

按显微镜主机面板的 FLUO 选择按钮切换至荧光观察光路（如右图所示），再按荧光光闸按钮（SHUTTER）打开荧光，进行样品的荧光观察。通过选择 Filtercubes



进行不同通道的荧光观察，DAPI_LP 是蓝色通道，FITC_LP 是绿色通道，RHOD_LP 是红色通道。观察完毕后，按显微镜前面板上的“SHUTTER”按钮以保护样品。

2.3.4 其他观察方式：

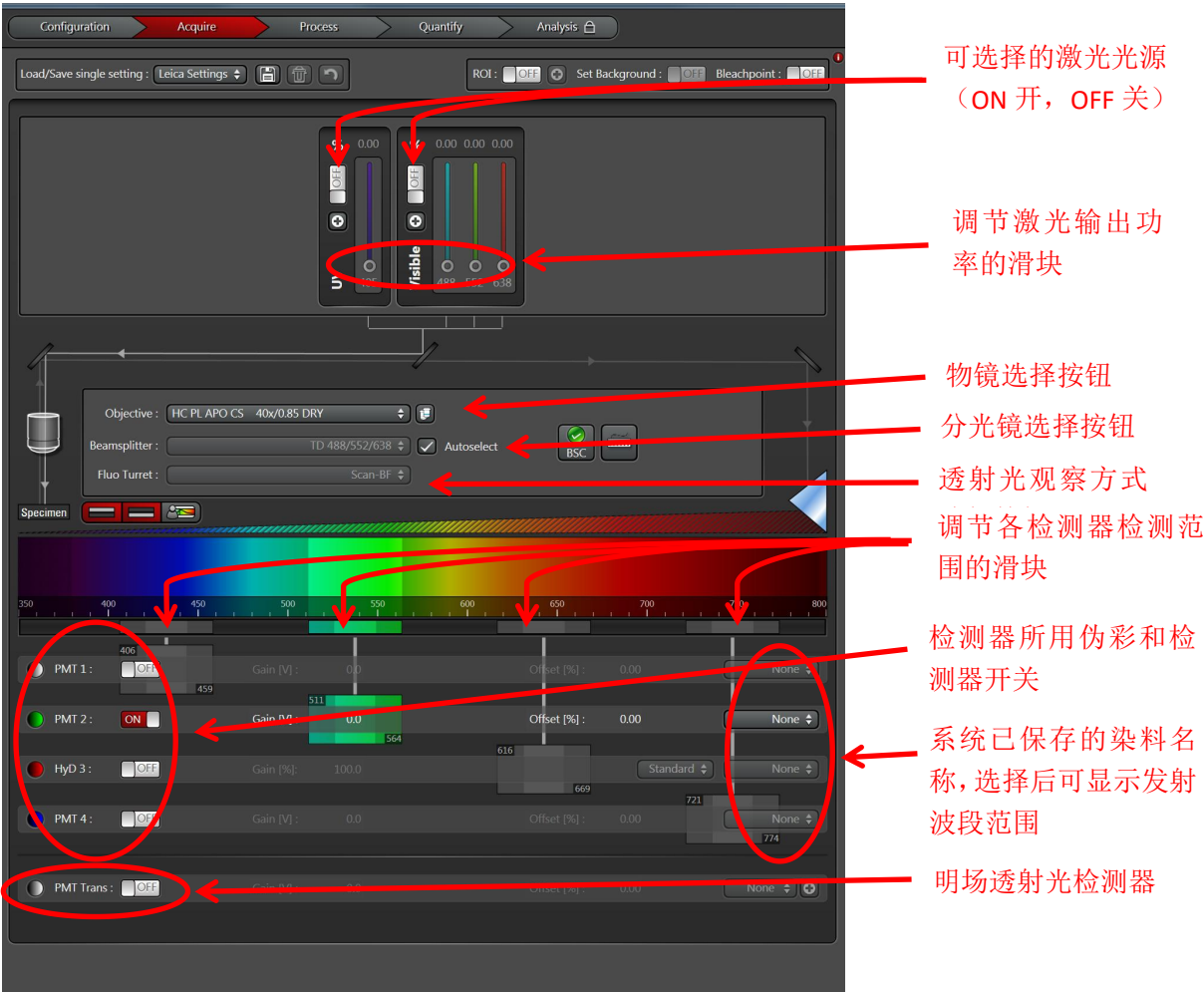
根据样品的形式，选择 DIC（微分干涉）、POL（偏光）两种观察方式，DIC 通常用于透明的细胞或组织，成像效果呈现浮雕立体结构，POL 常用于具有双折

射性的样品，例如：淀粉粒、染色体、骨骼、牙齿、胆固醇等。通过显微镜主机界面进行不同观察方式的切换。

2.4 采集共聚焦图像

2.4.1 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。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。（如右图）



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。

建立新的设置：也可从零开始建立新的设置。选择所需激光及其功率、适宜的分光镜、检测器及检测波长范围。

分光镜选择原则：根据所用激光波长来选择合适的分光镜（如果配备的是 AOBS 声光可调分光器，可以忽略下文中所有有关分光镜的设置调节）。



① 405 激光选择 Substrate；②其他可见波长的激光根据其波长选择分光镜，如 488 激光可选择 DD488/552、TD488/552/638 分光镜。③RT 15/85 分光镜所有波长激光都可用，但是会损失 85%的激光能量和 15%的荧光信号，当现有分光镜无法满足当前激光谱线组合时选用。

Sequential Scan:若染料的发射光谱有重叠，为减少串色，成像时每种染料要单独激发，或者说，每次只用一种激发光激发，并只检测一种染料。可用 Sequential Scan 来实现。（如右图）激活 Sequential Scan 功能，可在下面的 Seq 中分别设置各个染料的激发和检测光路。



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 λ , xyzt, xyz λ , xyz λ t 等。

2.4.3 设置扫描参数

包括分辨率（format）、扫描速度（speed）、针孔大小（pinhole）、线平均（line average）、面平均（frame average）、累加（accumulation）及放大倍数（Zoom）等。（如右图）

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）。

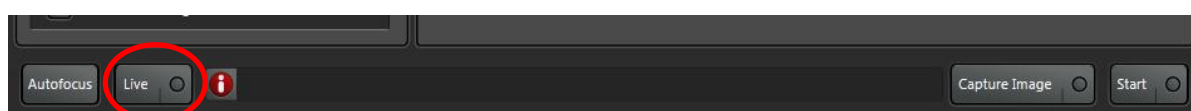
针孔大小：默认值为 1AU。如果增大针孔直径，可增加信号强度，但是所获取图像的共聚焦效果会降低，光切厚度也会随之增加。

平均：用于降低背景噪音。分为线平均（Line average）和面平均（Frame average），可在下拉菜单中选择平均的次数。

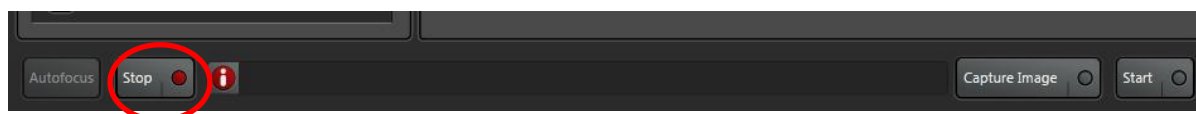
累加：仅用于荧光非常弱的样品

2.4.4 预览图像

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。

建议：点击 Live 按钮之前，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使图像亮度动态范围达到最佳。

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。



图像亮度动态范围可通过调节激光输出功率、Smart Gain 和 Smart Offset（见上图）。

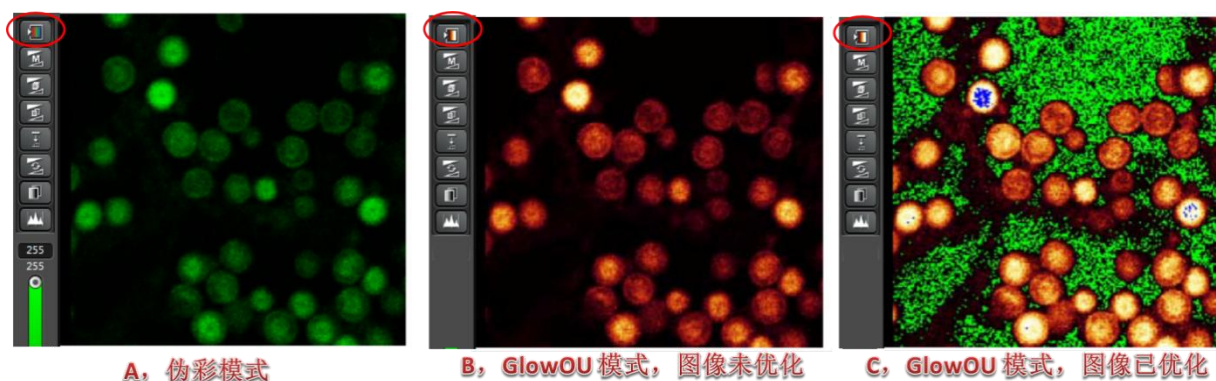
参数的调整原则：

- (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，Gain 值的正常范围为 500—900；
- (2) Smart Offset 的调节：可扣除背景噪音，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；
- (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 100%时荧光图片亮度还是不够时，可以考虑适当增加激光强度。在做活细胞或者光切时，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，灰度值达到饱和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，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 Gain来降低背景。

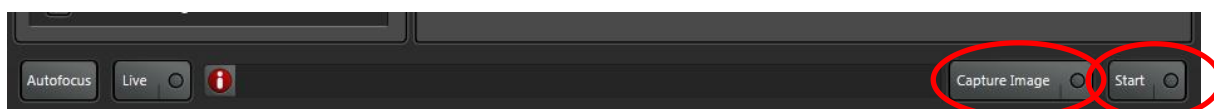
对透射光图像，同样可以调节透射光PMT 的电压和偏移值来进行优化，有时可将Smart Offset调至高于0%以增加对比度。

如果启用了Sequential Scan，在应该在每个扫描序列（Seq）分别通过预览来

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）在此之前可改变扫描分辨率、线/面平均次数等扫描参数。



扫描分辨率的设置原则：

通常情况下，采集图像时，为充分利用物镜的分辨能力，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。

根据Nyquist 采样原则，像素点尺寸（Pixel Size）应为物镜侧向分辨率（即xy 平面分辨率）的2/5~1/2。物镜分辨率可点击物镜参数表按钮从弹出的界面读取，像素点大小可在采图参数设置界面获得。像素点尺寸随扫描分辨率增大和放大倍数（zoom）增加而减小。与高倍物镜相比，低倍物镜需要更高的扫描分辨率。



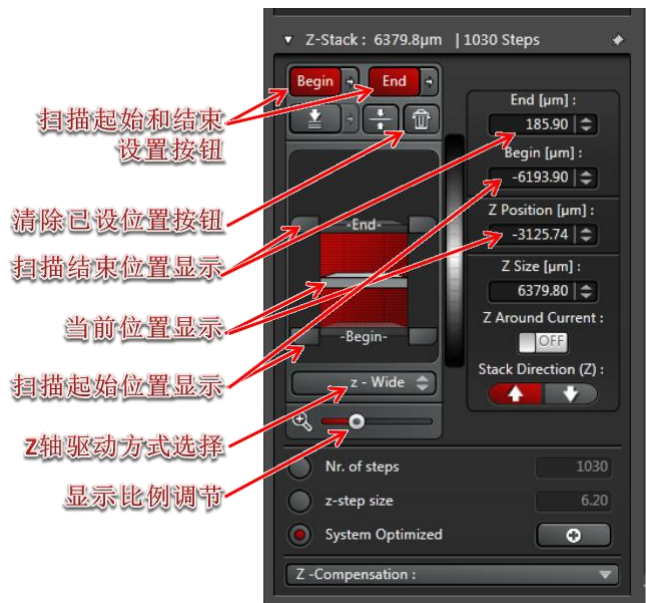
2.5 XYZ三维扫描（Z-Stack）

xyz 扫描模式为默认采图模式，加上Z轴扫描多个层面，适合观察样品中目标的空间分布。

2.5.1 设置光路参数，方法同前。

2.5.2 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，激活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，再激活扫描结束设置按钮定义层切终点，点击“Stop”终止图像预览。



2.5.3 Z轴参数调整

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。

2.5.4 采图

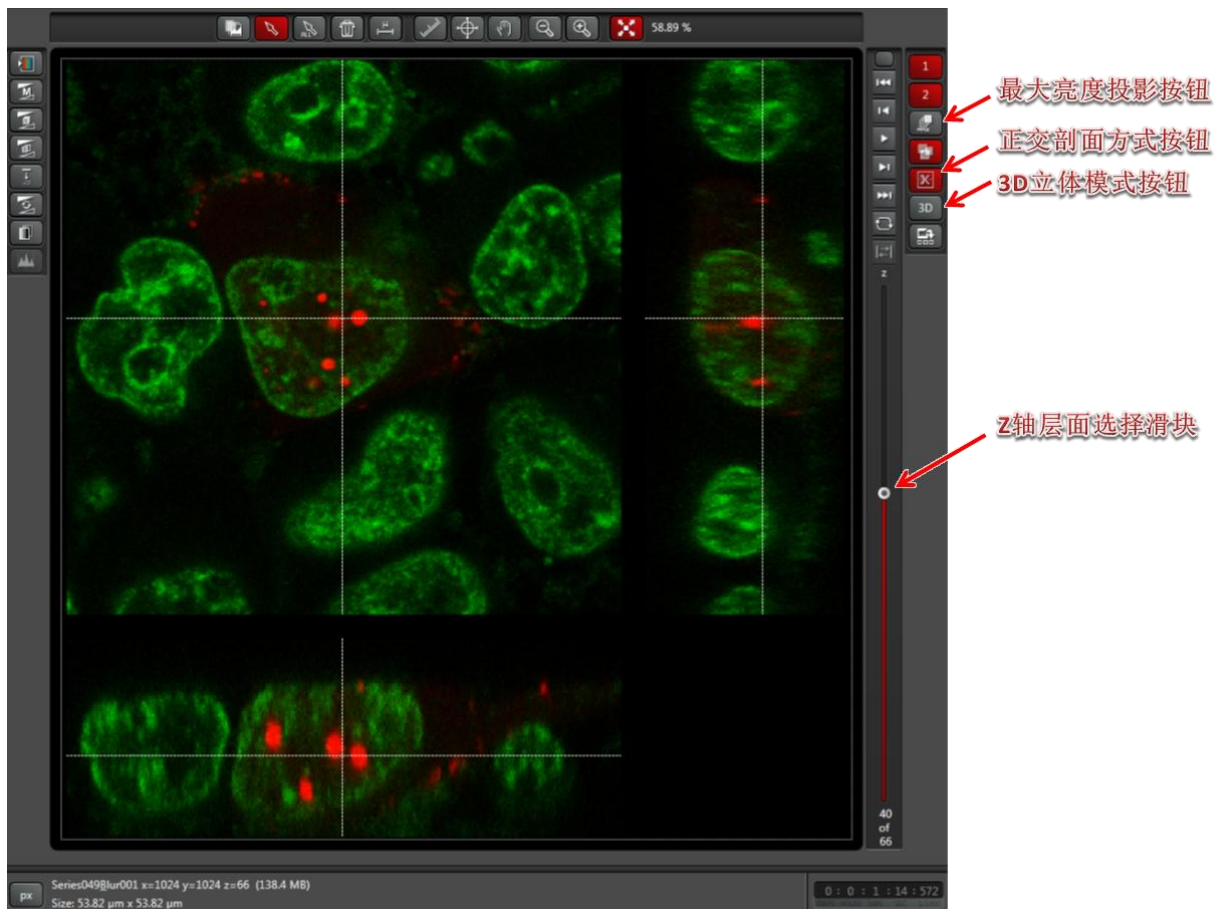
选择合适的分辨率和扫描线速度，点击” Start” 进行xyz 图像的采集。

2.5.5 3D展示

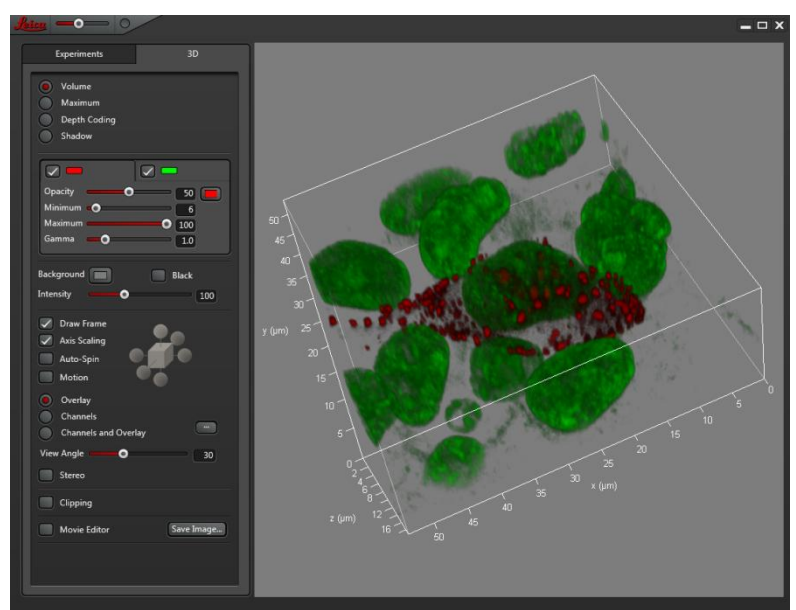
拍摄完3D图像之后，在图像显示窗口右侧会多出3个用于3D图像显示的按钮：

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。

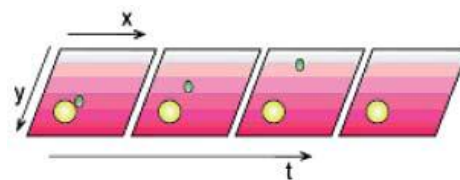


3D立体模式按钮（Open in 3D viewer）：打开3D可视化模块，以直观方式展示3D结构，如右图，该模块功能强大，有多种参数可以调整显示方式，亦可以将所观察到的图像输出成视频。



2.6 时间序列扫描 (Time series or xyt Scan)

时间序列扫描多用于活细胞成像，记录动态过程。

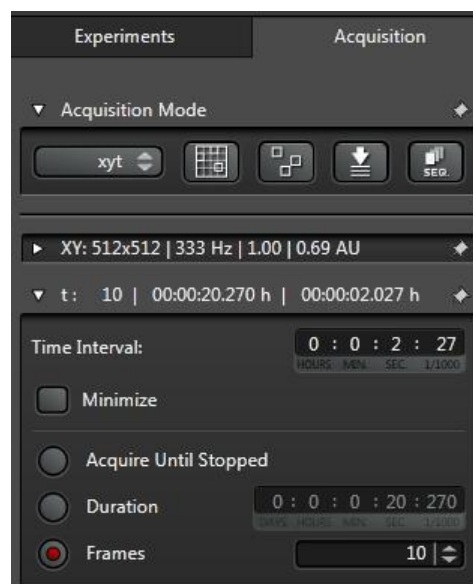


2.6.1 在“Acquire”菜单栏的“Acquisition”中选择xyt 扫描模式后，将出现xyt 扫描菜单，如右图。

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”。

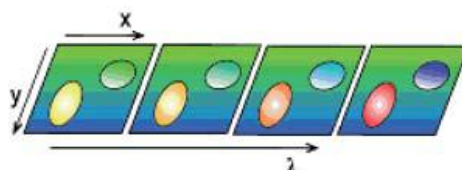


若选择“Acquire until stopped”，则图像将持续采集，直至手动终止。

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。

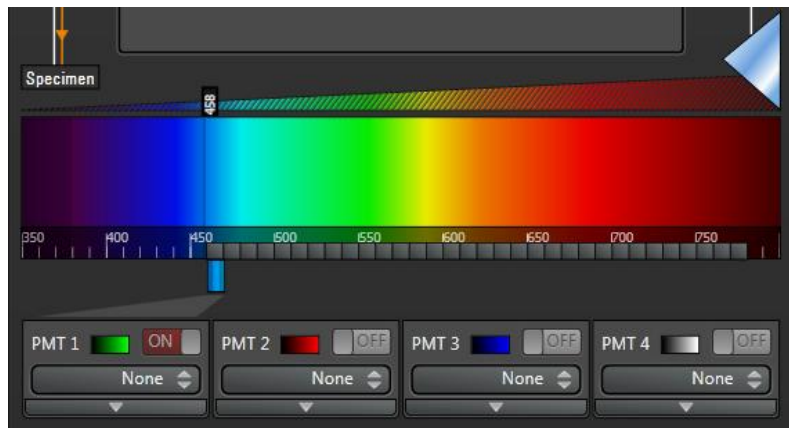
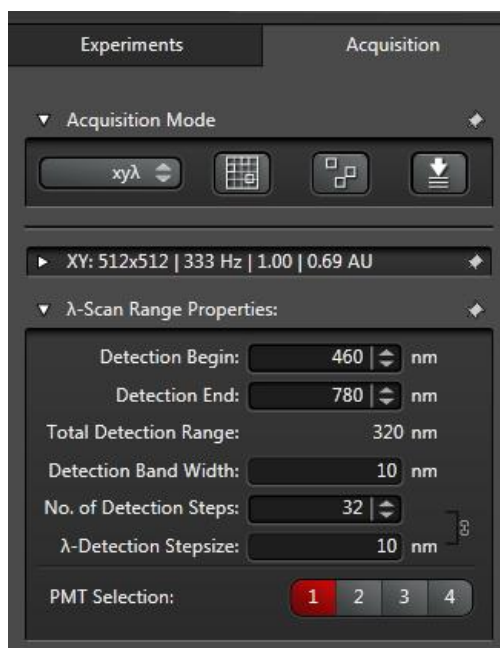


2.7 波长扫描 (xyλ Scan)

波长扫描常用于自发荧光或新染料发射

光谱的检测，如果有串色严重的标本需要进行“Spectral Dye Separation”，必须进行波长扫描。

2.7.1 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，同时检测通道变为如下方式：



2.7.2 选择合适的激发光和分光镜。

2.7.3 定义“Detection Begin”（需检测的发射谱起点）和“Detection End”（需检测的发射谱终点）。起点所在波长应大于激发波长。

2.7.4 定义“Detection Band Width”（接收的带宽），最小检测带宽为5nm。

如果图像较暗，可以增加带宽，但是光谱数据的精度会降低。

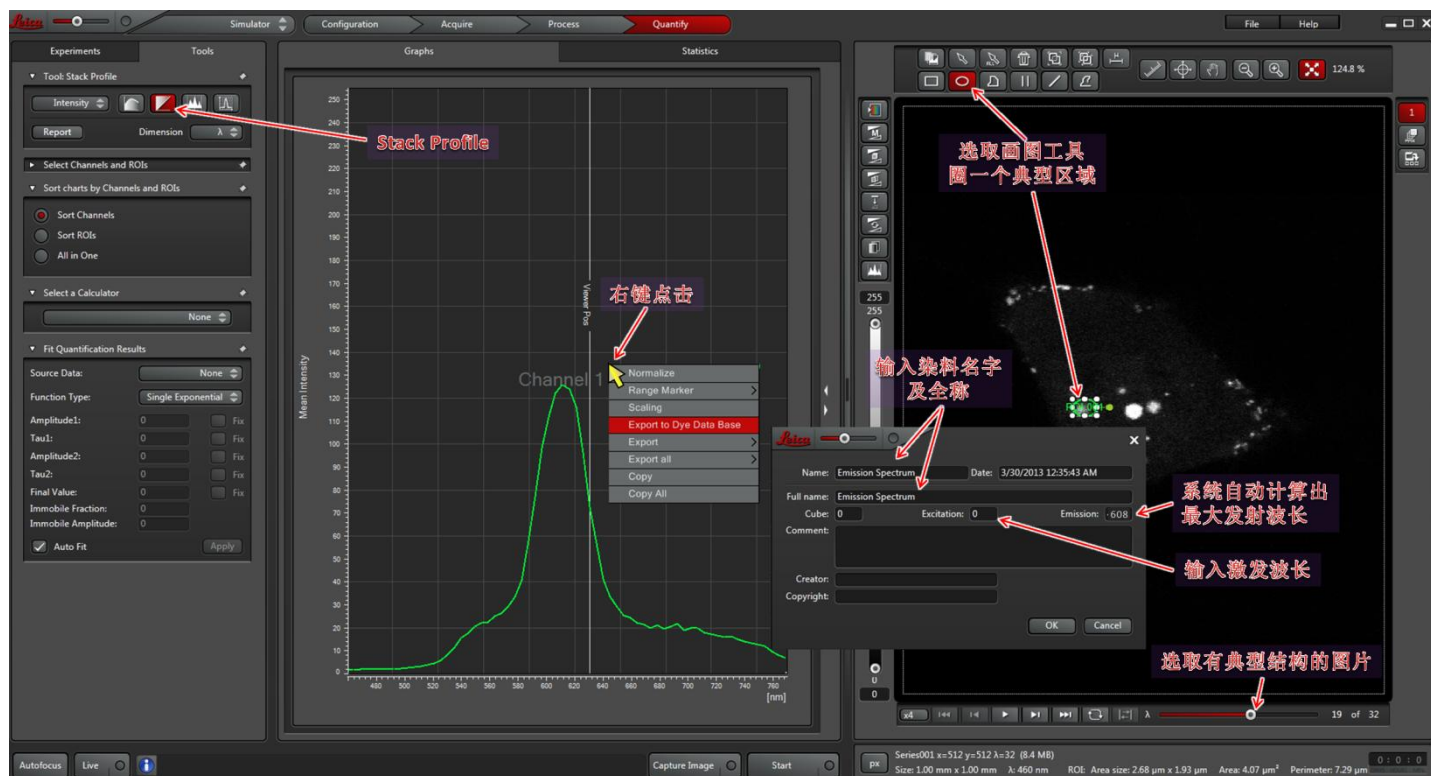
2.7.5 定义“No. of Detection steps”（采集的帧数）或“λ-Detection Stepsize”（波长步进）。波长步进不应大于接收带宽。

2.7.6 选择所用PMT检测器（或HyD检测器）。

2.7.7 选择合适的分辨率和扫描速度，点击“Start”进行发射波长图像的采集。

2.7.8 扫描结束后，可保存发射光谱信息。操作路径为：

“Quantify→Tools→Stack Profile”，如下图：



在图像窗口的右下角，拖动波长 λ 滑块，显示的图像会随之变化，选取有典型结构的一张；

在图像窗口上方选项画图工具，圈一个典型区域，中间的Graphs窗口即显示出该区域的发射光亮度随波长变化的曲线（上图中的绿色曲线）；

在上图所示位置点击鼠标右键，弹出的选项中有一个“Export to Dye Data Base”的选项，点击，弹出命名新染料的对话框；

输入染料名称、激发波长（最大发射波长系统会自动计算出，也可以自己修改）、备注信息等，点击“OK”，新染料数据即被存入系统的染料数据库。

可以通过“Configuration/Dye Database”去查看，加入数据库的染料可用于以后采图的参考。

2.8 HyD检测器

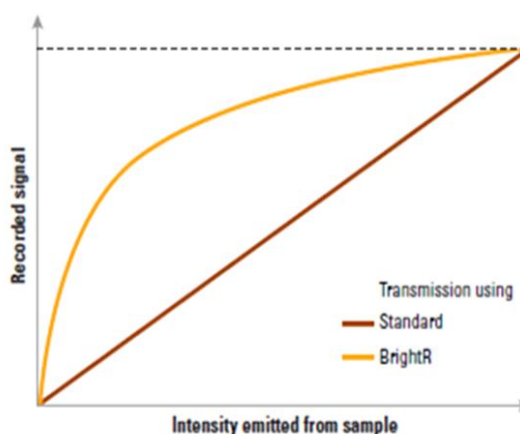
HyD检测器是高性能的检测器，比PMT更灵敏响应速度更快并且有更多的功能。HyD检测器有三种操作模式可供选择：

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。

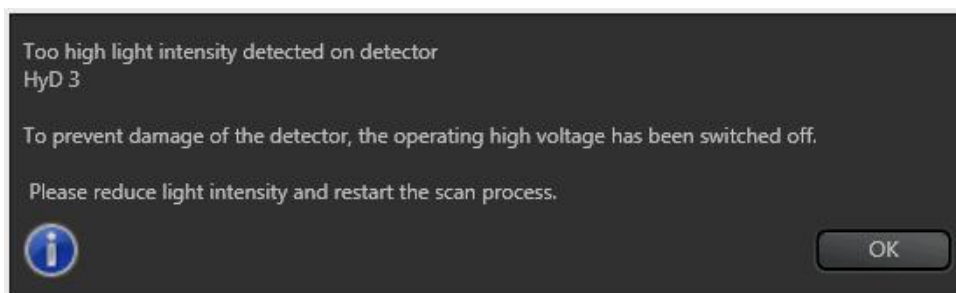


Counting：光子计数模式，以每个像素点所检测到的光子数显示为该像素点的亮度，此时检测器的Gain为一个定值，通过长时间的检测使图像显现出来。常用于非常弱的荧光样本的成像。使用此模式采图时，需使用累加（accumulation）功能来使采集到的图像达到合适的亮度。

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；

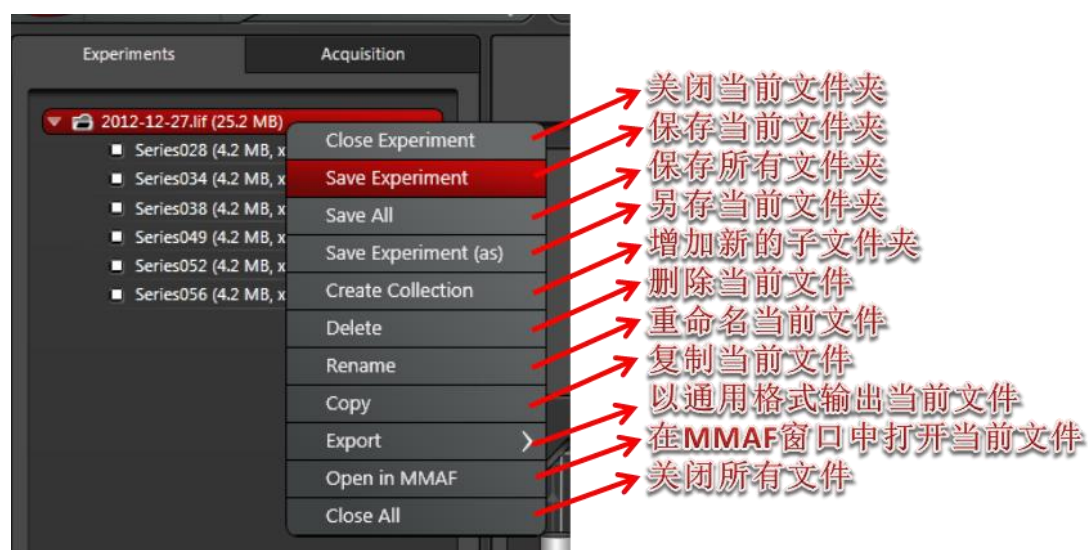
②不要用HyD检测反射光，因为一般情况下，反射光亮度要大大强于荧光。

2.9 图像文件的保存及输出

2.9.1 图像文件的操作：

“Acquire”的”Experiment”下显示采集的所有图像文件名称，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。

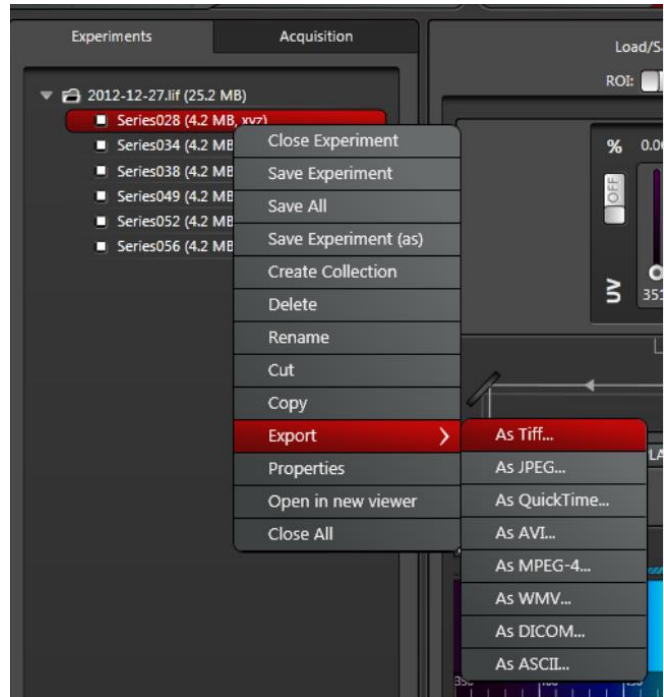
如下图：



选择“Save Experiment”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 AF、LAS AF Lite 或其他专业图像数据处理软件打开。

2.9.2 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。

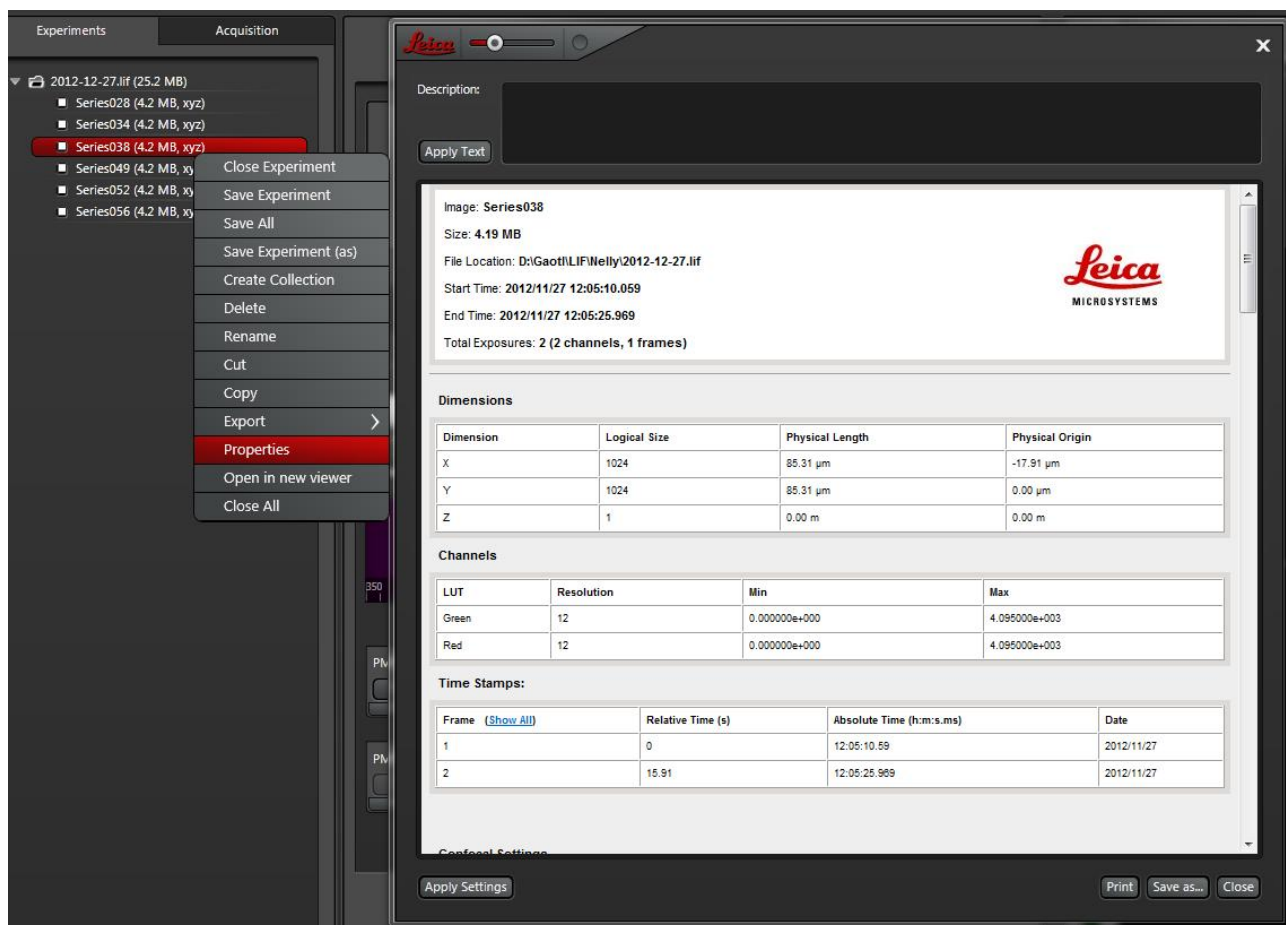


选择” As Tiff” 或” As JPEG”，出现如下图的对话框，可选择输出路径、所需标尺及位置等。确定后，点击” OK”，即可将图像输出至指定路径。



2.9.3 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。



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。

3 系统的维护

- (1) 保持室温为18-25℃，相对湿度40-60%，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30min

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。