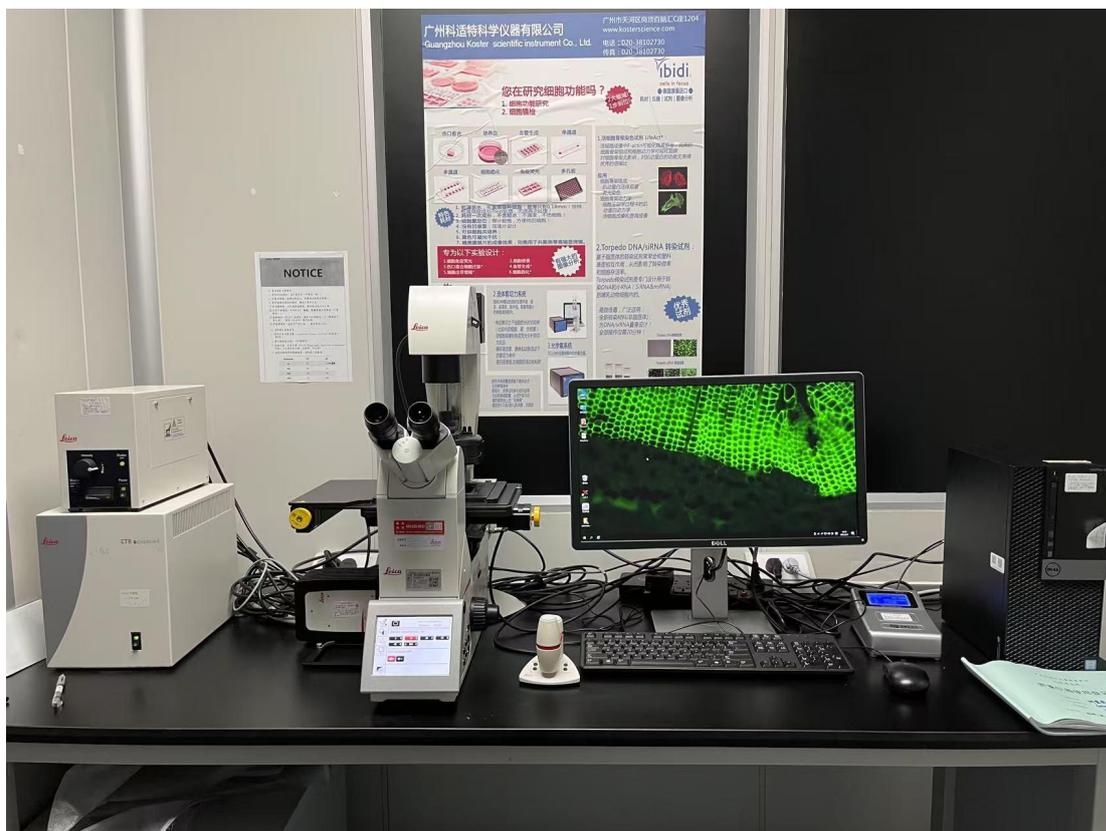


Leica DMI8 全自动倒置荧光显微镜

快速操作手册



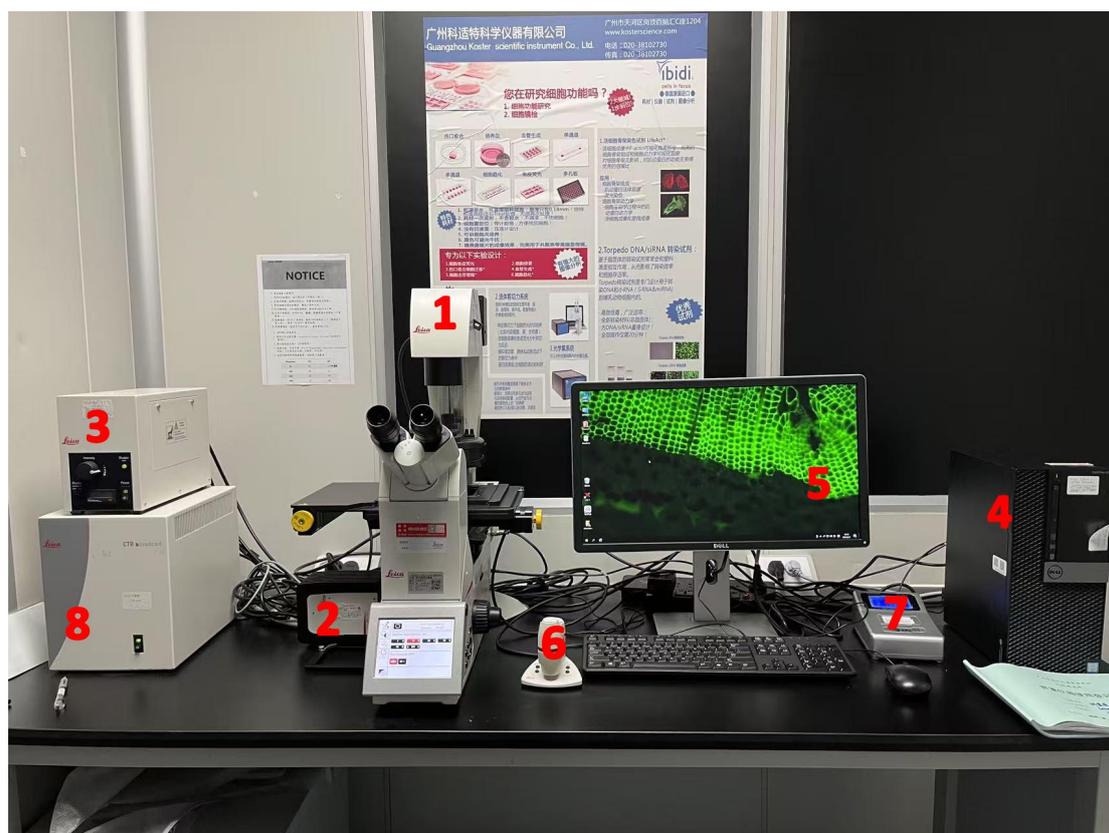
制作：广州市妇女儿童医疗中心光学显微镜平台

2025 年

目 录

1、 Leica DMI8 系统组成图	3
2、 系统的使用	3
2.1 开关机顺序	3
2.2 软件界面简介	6
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:	7
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	8
2.4.1 光路设置:	8
2.4.5 采集图像	12
2.5 XYZ 三维扫描 (Z-Stack)	12
2.5.1 设置光路参数, 方法同前。	12
2.5.2 设置 Z 轴范围	12
2.5.3 Z 轴参数调整	12
2.5.4 采图	13
2.5.5 3D 展示	13
2.6 时间序列扫描 (Time series or xyt Scan)	13
2.7 大视野拼图	14
2.8 图像文件的保存及输出	16
2.8.1 图像文件的操作:	16
2.8.2 图像文件的输出:	17
2.8.3 图像采集参数的观察及恢复:	18
3 系统的维护	19

1、Leica DMI8 系统组成图



1. 显微镜主机	5. 显示器
2. 相机	6. Smart move
3. 荧光照明光源（汞灯）	7. 刷卡器
4. 电脑主机	8. 显微镜主机控制电源

2、系统的使用

2.1 开关机顺序

➤ 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;

(1) 刷卡上机:

已有该仪器权限的实验人员根据自己的预约时间,在刷卡器上刷卡上机;

(2) 打开荧光激发光源:

如右图,如观察荧光样品,则按 power 按钮;如进行透射光观察,则不需打开荧光激发光源;

(3) 打开显微镜主机:

如右图,打开显微镜主机电源开关;



(4) 打开电脑及软件:

打开电脑主机电源并进入操作系统界面,双击电脑桌面“LAS X”图标启动操作软件;



(5) 软件配置选择:

进入配置选择界面后,在“Configuration”下拉菜单中选择需要的配置,正置显微镜选择 DefaultDynamic...配置;(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);“Choose Configuration:”菜单中选择“Standard



Configuration”；图中“Load settings at startup:”选项为从头开始加载设置，在这里选择 OFF 即可，最后点击“OK”，系统继续启动。

配置完成之后，进入“initialize stage?”提示界面，若使用拼图或多点拍摄功能选择“Yes”，否则选择“No”。



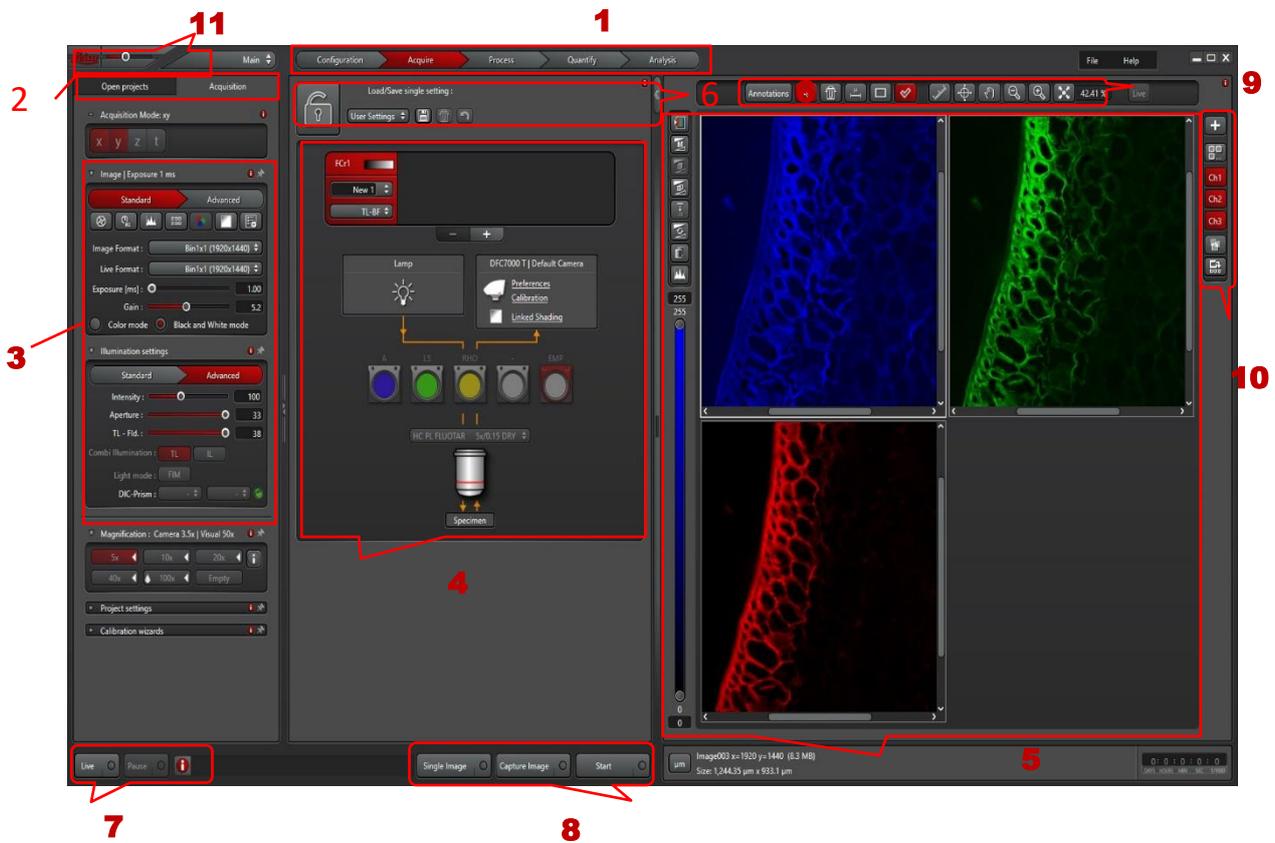
(6) 系统自检完后，进入 LAS X 操作界面。

➤ 关机顺序 与开机顺序相反，即关【软件】→【电脑】→【显微镜主机】→【汞灯】→【刷卡下机】

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。

2.2 软件界面简介

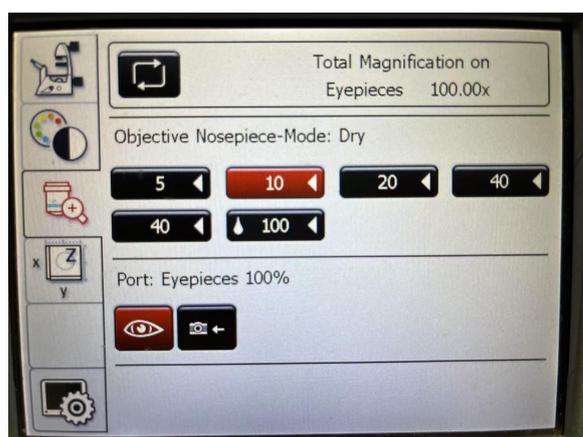


- 1** 功能界面切换：参数设定（Configuration）、扫描取图（Acquire）、图像处理（Process）、定量测量（Quantify）
- 2** 工具和文件管理界面切换：Open Projects 界面下显示当前拍摄和打开的图片，Acquisition 下显示的是当前功能界面的功能按钮和参数
- 3** 拍摄参数：包括图像像素 Format、曝光时间 Exposure、增益 Gain、光照强度 Intensity、孔径光阑 AP、视场光阑 FD 等。
- 4** 光路显示及设置区域，从上向下直观显示了荧光光路/白光光路的细节和关键设置
- 5** 图像显示窗口
- 6** 预设光路选择按钮
- 7** 预览按钮，可用于开始和停止预览
- 8** 拍摄图像按钮
- 9** 工具栏选择框
- 10** 叠加图像显示按钮，在使用两个或以上数量通道拍摄多色图像时，用于显示所有通道叠加后的图像
- 11** 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

2.3 在显微镜下观察样品

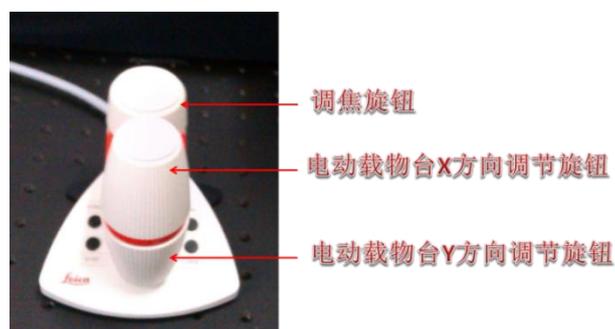
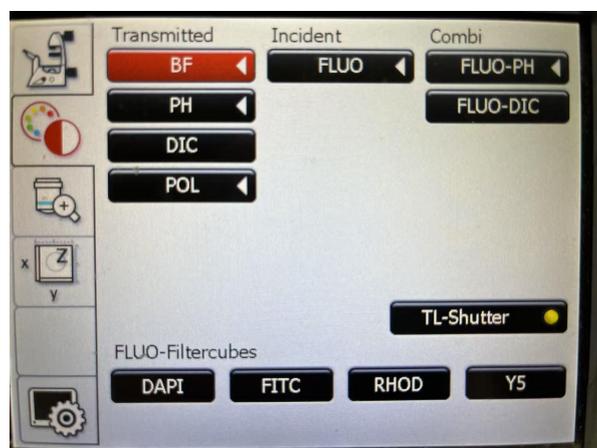
2.3.1 选择物镜：

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“Magnification”界面进行选择物镜的切换（如下图）。



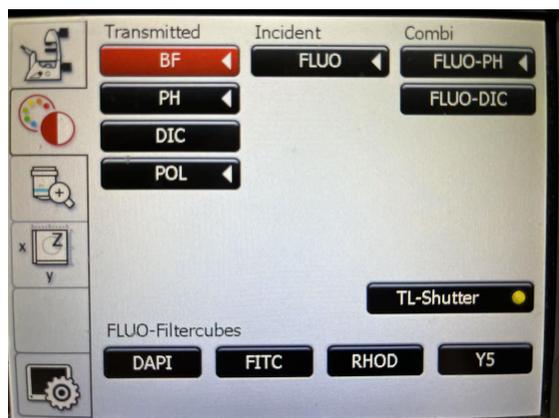
2.3.2 明场观察：

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）。



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 是蓝色通道，FITC 是绿色



通道，RHOD 是红色通道，Y5 是近红外通道。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 PH（相差）、DIC（微分干涉）、POL（偏光）三种观察方式，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，选择观察的方式，曝光时间、增益 Gain、光强大小、视场光阑、孔径光阑等自动进行调用。选择某一设置后，可按样品的实际情况对参数进行优化，并以新的名称另外保存。（如右图）

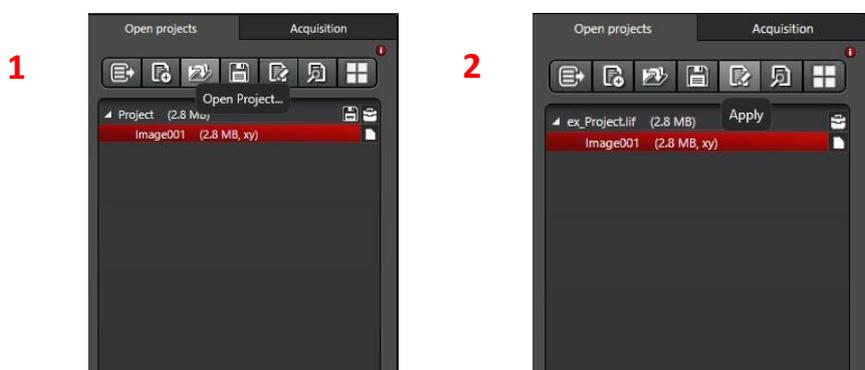
修改已有设置：可根据图像质量对曝光时间、增益



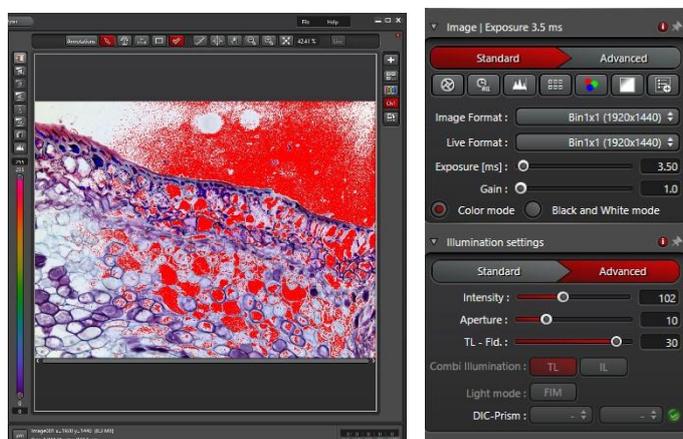
Gain、光强大小等参数进行优化，若需要保存该设置可点击 Save，输入新名称进行保存。

建立新的设置：也可从零开始建立新的设置。选择合适的曝光时间、增益 Gain 及光强大小进行保存即可。

调用已采集的图像参数：在“Open projects”菜单下选择“Open ptoject...”按钮，根据提示打开已采集的图像，点“Apply”按钮即可调用该图像的参数设置。



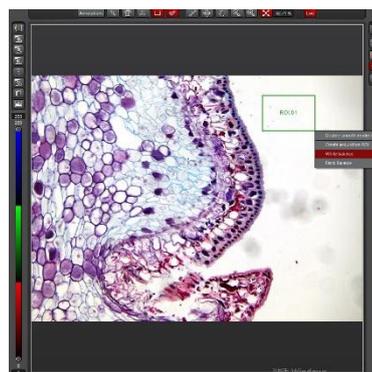
明场图像调节原则：采集明场图像时，保证所采集的图像亮度适中，清晰度最高。选择 under/over exposure 按钮显示当前图像是否过曝，红色点表示该像素已经过曝，明场图像不过曝的标准：过曝点（红点）存在但不会覆盖样品信号。



调节参数原则：Intensity：光强大小，首先在镜下将光强调节到合适的亮度，切换到相机模式后不再改变光强大小；Exposure：曝光时间，相机拍摄图像所需的时间，增大或减小曝光时间使过曝点（红点）存在但不会覆盖样品信号；Gain：增益，信号放大的作用，增大则信号和噪音都增

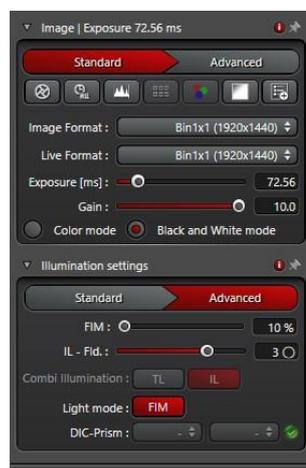
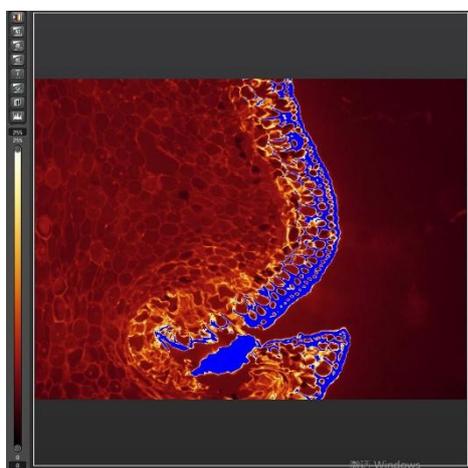
强，减小则信号和噪音均减小。

调节参数之后，观察软件图像与镜下图像之间是否存在色差，如存在色差则需进行白平衡处理。选择工具栏中矩形框工具，在图像空白处画一个矩形框，右键选择“White balance”即可。



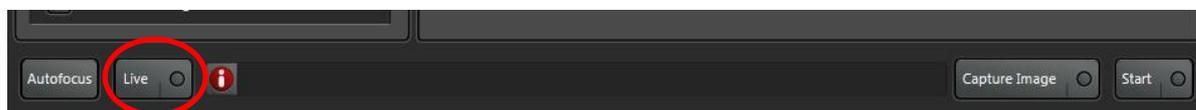
荧光图像调节原则：采集荧光图像时，同样保证所采集的图像亮度适中，清晰度最高。选择 under/over exposure 按钮显示当前图像是否过曝，蓝色点表示该图像此像素点过曝，绿色点表示此像素点过暗。荧光图像不过曝的标准：过曝点（蓝点）刚好消失不见，绿点可存在。调节参数原则：Intensity：光强大小，对于每个通道，需要灵活调节荧光的强度，荧光强度越高，则信号越强，同时标本更容易被漂白或淬灭，当曝光时间大于 900ms 时荧光图片亮度还是不够，可以考虑适当增加荧光强度；Exposure：曝光时间，相机拍摄图像所需的时间，增大或减小曝光时间使过曝点（蓝点）刚好消失不见，曝光时间在 100~900ms 最好，太小捕捉不到荧光信号，太大造成拖影现象；Gain：增益，信号放大的作用，增大则信号和噪音都增强，减小则信号和噪音均减小，Gain 对信号的影响取决于相机的质量。荧光图像中 Gain 对背景噪音的影响较小，一般将 Gain 调节到最大

值。



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。



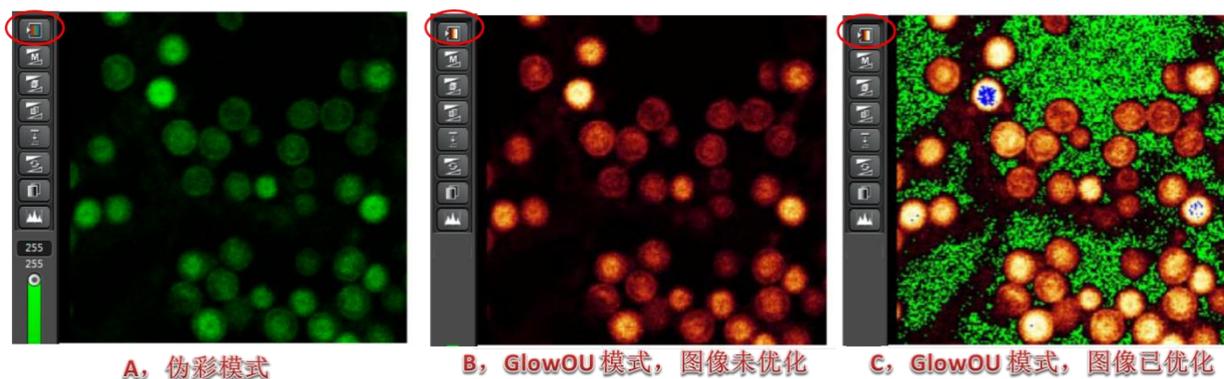
预览开始后，“Live”按钮变为“Stop”，点击“Stop”按钮可停止预览。



注意：一旦预览开始，荧光光源开始照射样品，为减少对样品的伤害，应快速操作，尽量减少预览的时间。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。

图像亮度动态范围的判断方法：

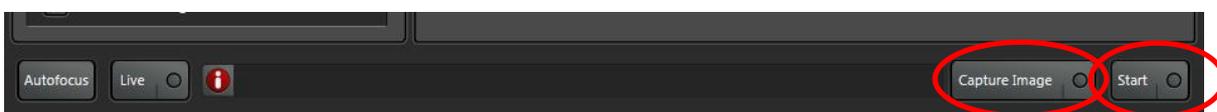
理想的荧光图像中应该只有少数像素点达到饱和，可通过位于图像左侧的 LUT 按钮进行观察。LUT 按钮（下图红圈）可在 LUT（即指定的荧光颜色，也称伪彩）、“Glow Over Under（GlowOU）”和灰度图三档之间切换。在 GlowOU 模式中，灰度值达到饱和的像素点显示为蓝色，而灰度值为 0 的像素点显示为绿色。调节 Exposure 的大小使图像中仅少数像素点呈蓝色，下图中 B 图亮度及背景值设置均未达最优化值，调节 Exposure 后，达到 C 图中的效果，部分信号呈蓝色，而背景呈绿色。对于荧光图像，其背景噪声较低，一般不需要调节 Gain 值，将 Gain 值调节到最大即可。



对透射光图像，同样可以调节透射光的 exposure 和 gain 来进行优化，在 GlowOU 模式中，灰度值达到饱和的像素点显示为红色，而灰度值为 0 的像素点显示为蓝色。调节 Exposure 和 gain 的大小使图像中空白区域像素点呈红色。

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。



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。

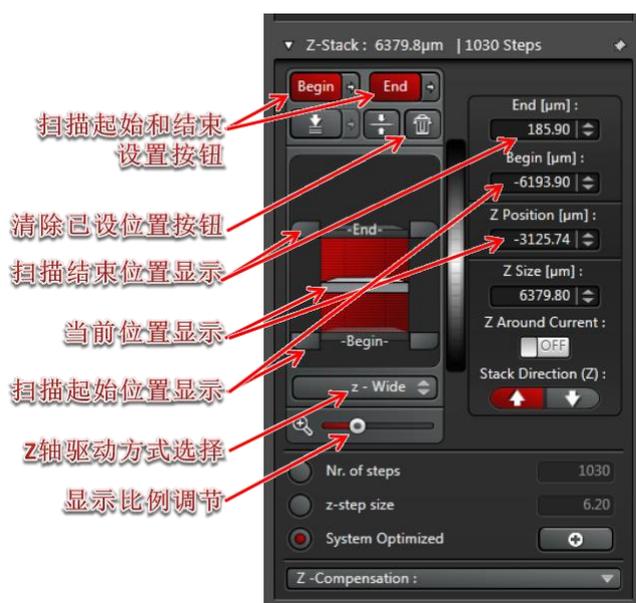
2.5.2 设置Z轴范围

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。

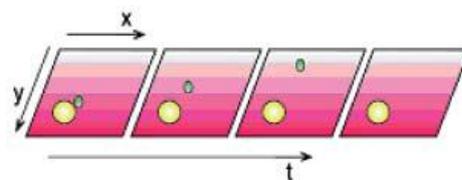
2.5.5 3D展示

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。

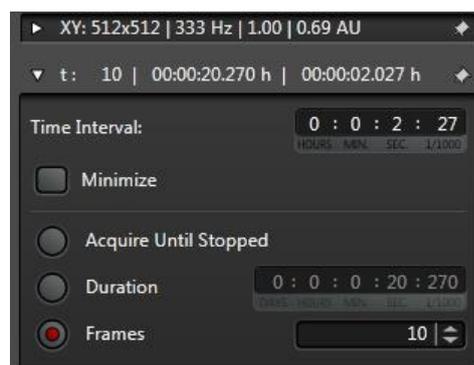
正交剖面方式按钮 (Orthogonal section)：分别以XY、YZ、XZ三个方向显示指定位置的剖面信息，如下图，多用于观察结构在3D空间内的定位。

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 大视野拼图

2.7.1 在“Acquire”菜单栏的“Acquisition”中选择“Tilscan”扫描模式后，将出现“Tilscan”扫描菜单，如右图；

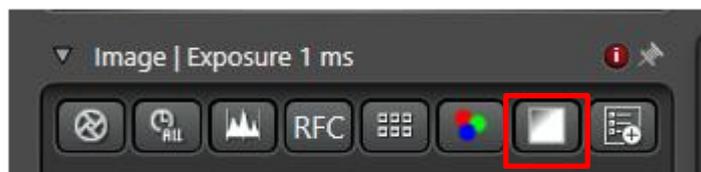
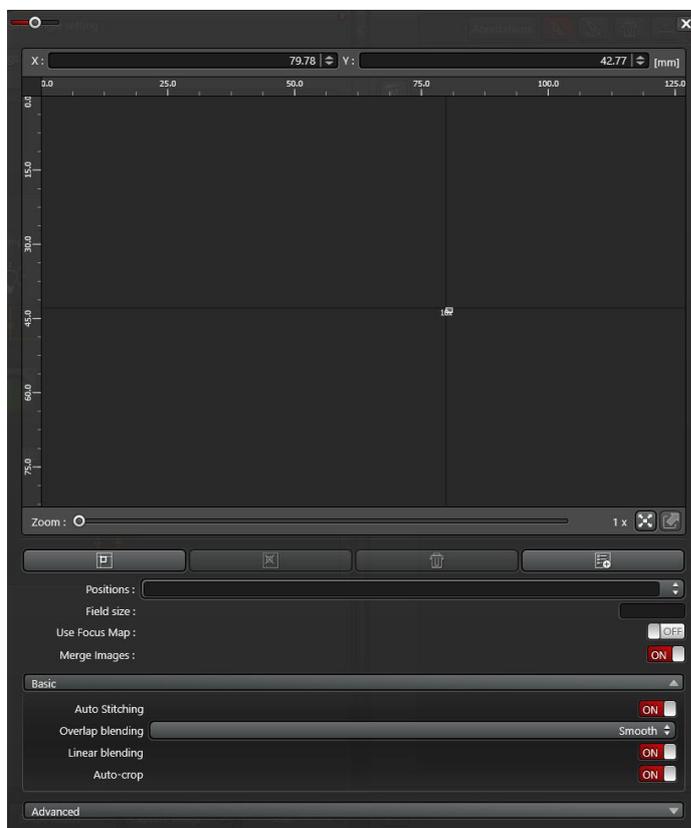
2.7.2 点击“live”，移动控制手柄寻找样本的边界位置，每找到一个边界点进行标记，点击“Mark position”按钮，直至找到需要拍摄的全部视野，点击“Start”系统根据标记的位点进行拍摄

2.7.3 打开“Merge images”，在拍摄完每个视野的图片之后进行大图拼接，打开“Auto stitching”，每个视野图片在拼接过程中自动矫正拼缝；

阴影校正：

当拼接的大图每个小图四周有阴影存在时，需要做阴影校正。校正步骤如下：

1、在“Acquire”菜单栏的“Acquisition”点击Linked Shading按钮，调出阴影校正模块；



2、点击“Wizard”

根据提示步骤进行阴影校正准备（如右图）；① 点击“Store XYZ position”记录当前视野的XYZ位置，②移动载物台至空白位置或直接移开玻片，③将Z轴往低位调节使离焦，④调节曝光至合适参数；



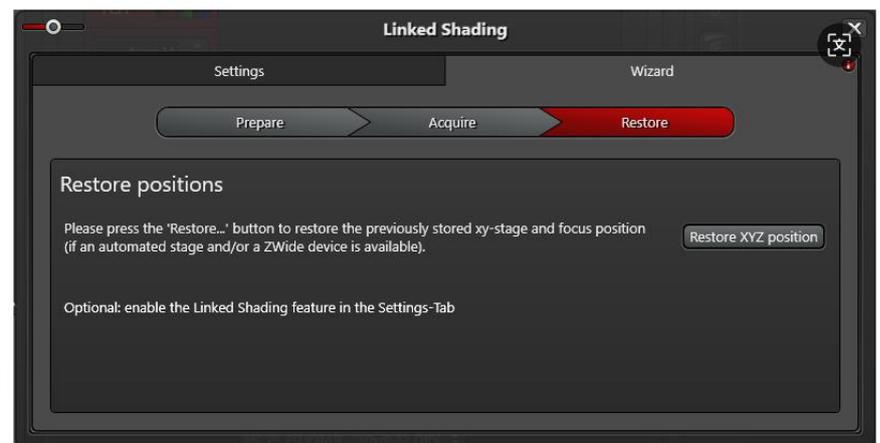
3、点击“Acquire”

按钮开始进行阴影校正，选择当前的观察方式，相机型号及对应物镜，点击“Single Reference”进行校正；



4、点击“Restore”

回到最开始记录的视野；



5、阴影校正完成后，点击“Setting”按钮回到激活界面，将“Activate Linked Shading”勾选上，此

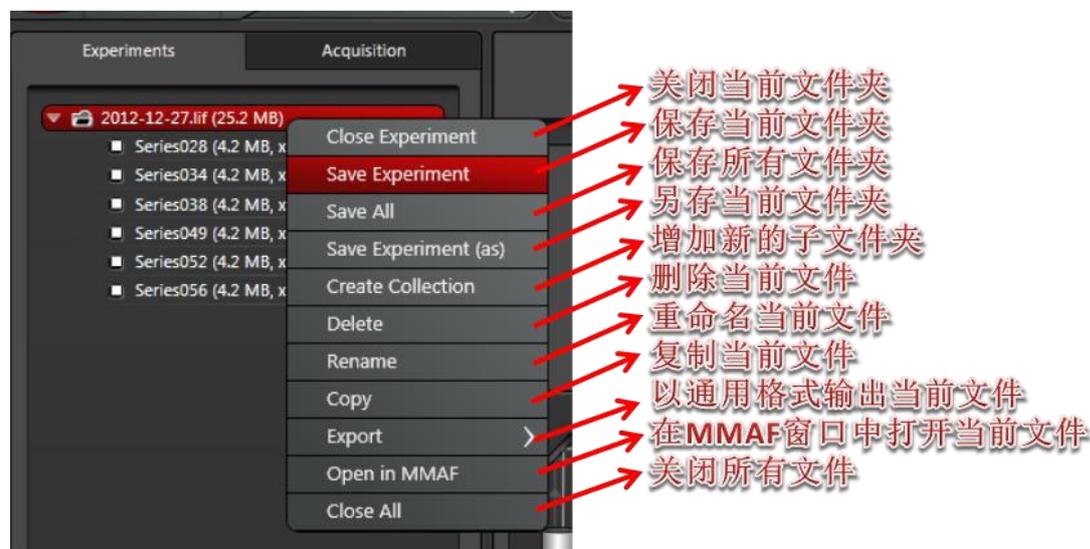


时“Linked shading”按钮变绿，证明阴影校正成功，如果“Linked shading”变红，则说明阴影校正失败，需重新做校正。

2.8 图像文件的保存及输出

2.8.1 图像文件的操作：

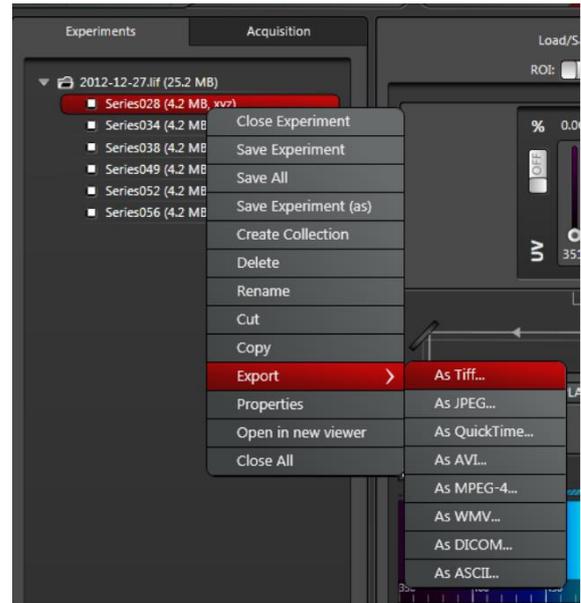
“Acquire”的“Experiment”下显示采集的所有图像文件名称，默认本次开机后采集的所有图像都放在一个文件夹下，右键点击文件名，可进行多种操作。如下图：



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。

2.8.2 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。



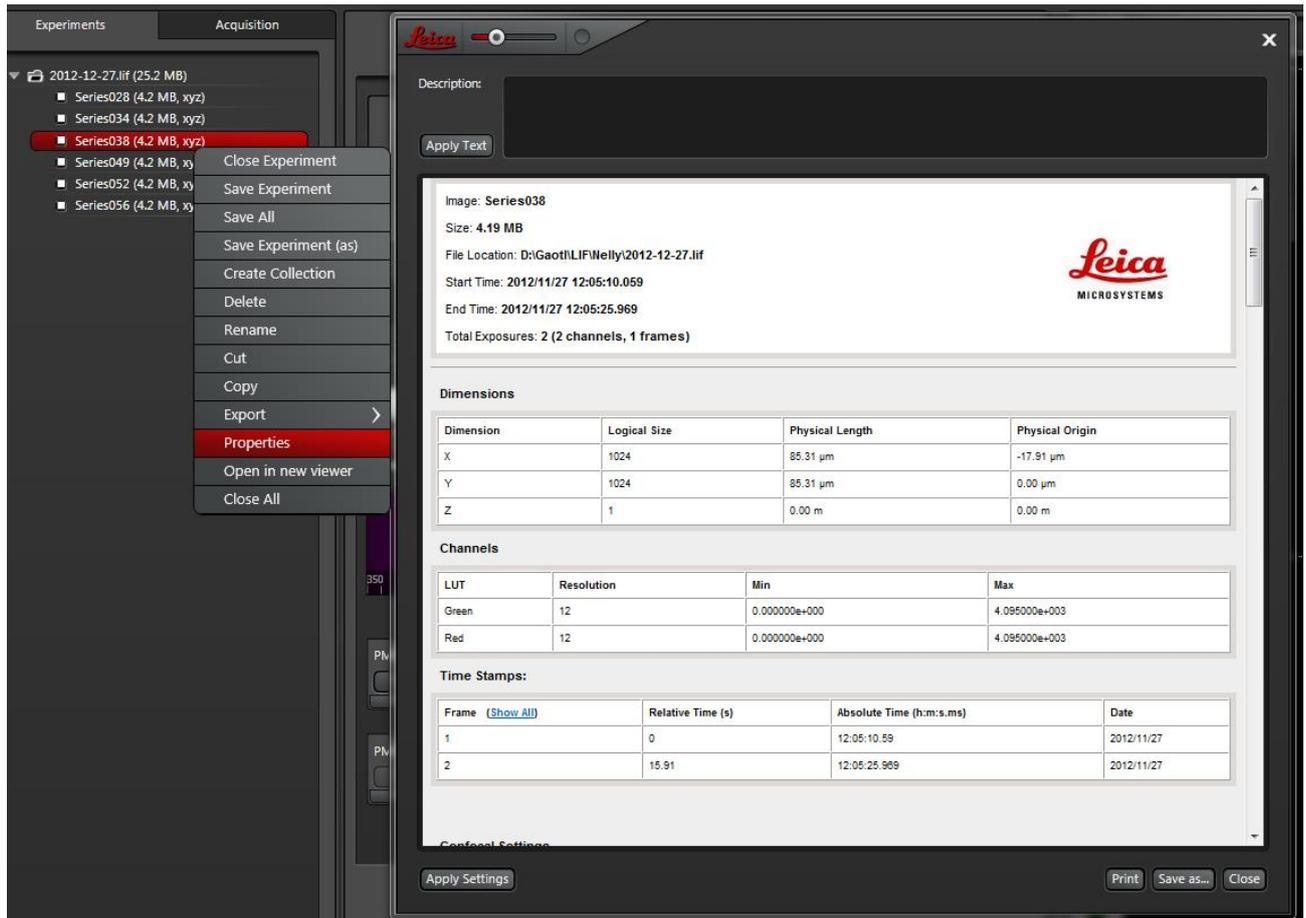
选择” As Tiff” 或” As JPEG”，出现如下图的对话框，可选择输出路径、所需标尺及位置等。确定后，点击” OK”，即可将图像输出至指定路径。



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。