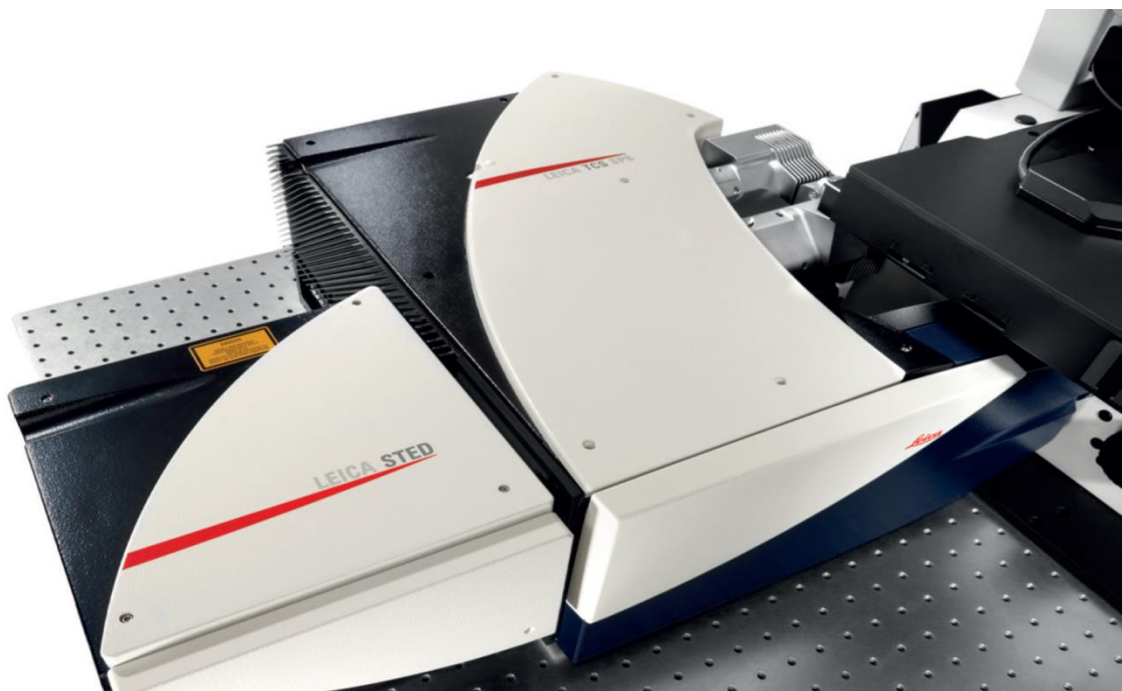


Leica TCS SP8 STED

超高分辨共聚焦显微镜

快速操作手册



制作：徕卡显微系统（上海）贸易有限公司

2015 年 11 月

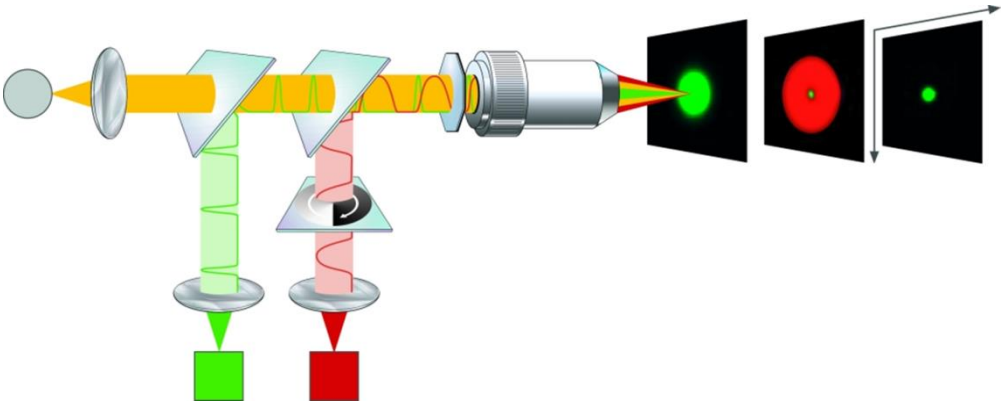


24小时服务热线：400-820-8932

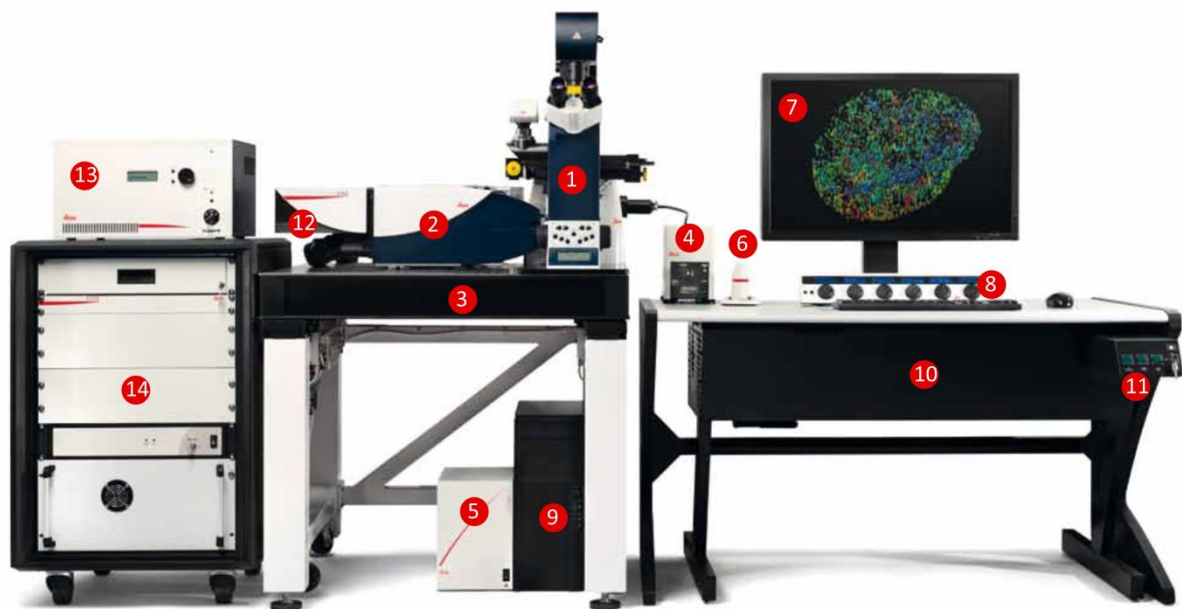


目录

- 封面 1
- [1](#) Leica TCS SP8 STED 超高分辨共聚焦显微系统组成图 4
- 2 系统使用..... 5
 - 2.1 开机顺序 （硬件标号请参考前面的系统组成图） 5
 - 2.2 软件界面简介..... 9
 - 2.3 显微镜下样品观察..... 10
 - 2.4 共聚焦图像采集..... 11
 - 2.5 图像的反卷积处理..... 17
 - 2.6 XYZ 三维扫描（Z-Stack） 21
 - 2.7 时间序列扫描（Timeseries or xyt Scan） 24
 - 2.8 HyD 检测器 25
 - 2.9 图像文件的保存及输出..... 26
 - 2.10 关机 28
- 3 系统的维护 28



Leica TCS SP8 STED 超高分辨共聚焦显微系统组成图





- | | | | | | |
|---|----------|-----------------------|----|-------------|-----------------------|
| 1 | 研究级倒置显微镜 | 有 DMI6000 和 DMi8 两种选择 | 8 | 控制面板 | |
| 2 | 共聚焦扫描头 | | 9 | 电脑主机 | |
| 3 | 防振台 | | 10 | 普通激光光源控制箱 | 有紧凑型和灵活型两种选择 |
| 4 | 荧光激发光源 | | 11 | 电源控制 | |
| 5 | 显微镜控制器 | | 12 | STED 光路模块 | |
| 6 | 遥控手轮 | | 13 | 白激光 | 可选配件 |
| 7 | 显示器 | | 14 | STED 激光及控制箱 | 有 592、660、775 等多种波长选择 |

2 系统使用

2.1 开机顺序（硬件标号请参考前面的系统组成图）

（1）因为灵活型光源组件 FSU 和紧凑型光源组件 CSU 的电源控制 11 不同，请分别按照如下步骤开机：

FSU 系统	CSU 系统
<p>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</p>  <p>注意：显微镜控制器的开关 5 一般是常开的，在打开“PC Microscope”按钮后指示灯应该点亮，如果不亮，请打开其开关。</p>	<p>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 5 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</p> 
之后两个系统的操作一样	

（2）打开白激光开关。（仅适用于配备有白激光的系统）

有些系统白激光开关会串联在 Laser Power 开关后面，打开 Laser Power 后白激光也会一起打开，此时不用再打开。

对于没有串联的系统，需要单独打开白激光开关：将开关钥匙 旋转至 “On” 位置。



(3) 打开 STED 激光开关 14



592nm 激光：先按右侧的黑色按钮打开电源开关（上图右侧红圈内），此时“SHG READY”的指示灯首先变为绿色，很快变为橙色，一段时间后变为绿色长亮，此时可以旋转钥匙至“laser on”的位置启动激光。

775nm 激光：其电源开关在后方，打开之后，再旋转前面板上的钥匙开关（上图左侧红圈内）至“on”的位置即可启动激光。

有些系统 STED 激光开关会串联在 Laser Power 开关后面，打开 Laser Power 后也会一起打开，此时不用再单独打开。

如果所配的 STED 激光器跟此处描述的不同，请根据实际情况参考所配激光器的出厂说明。

(4) 打开荧光激发光源 4

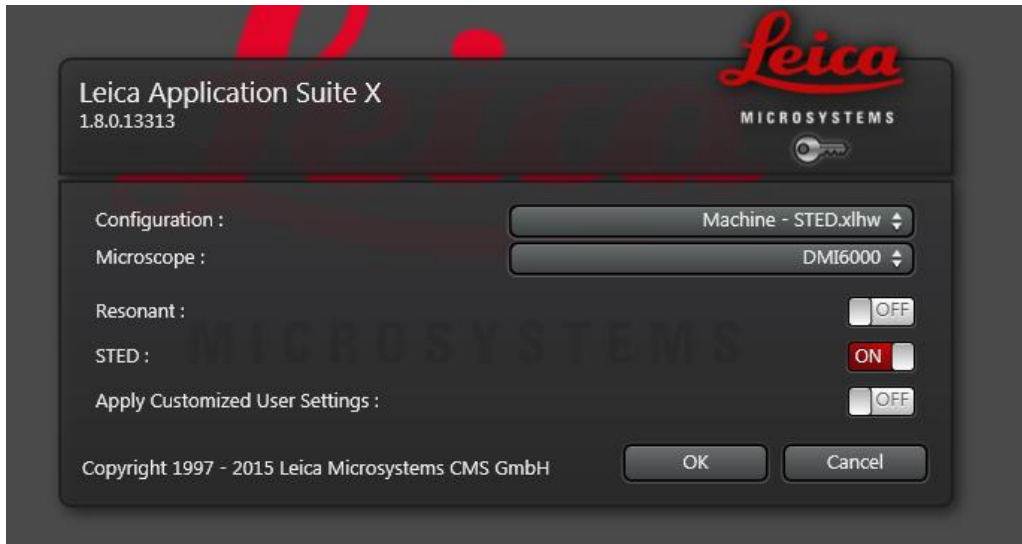
按绿色的 Power 按钮，如下图



(5) 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。



(6) 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；（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）。

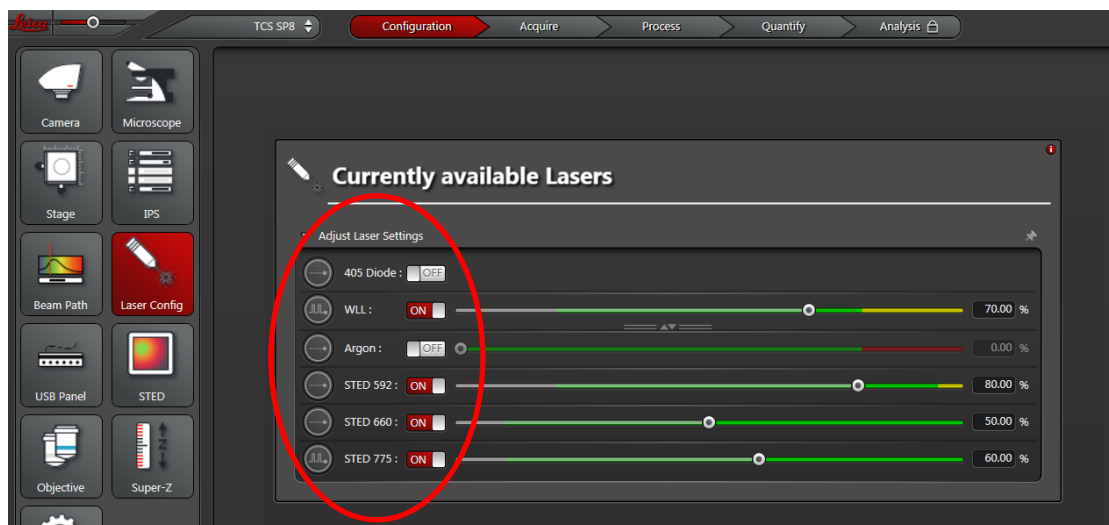
“Microscope”菜单中选择显微镜型号；

将 STED 选项设为“On”状态。

（图中“Resonant”选项为快扫功能，可按需要打开或关闭，只有配备了快扫功能的系统才会显示该选项）。

点击“OK”，软件继续启动。

(7) 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），并拖动右方滑块以调节激光输出功率。

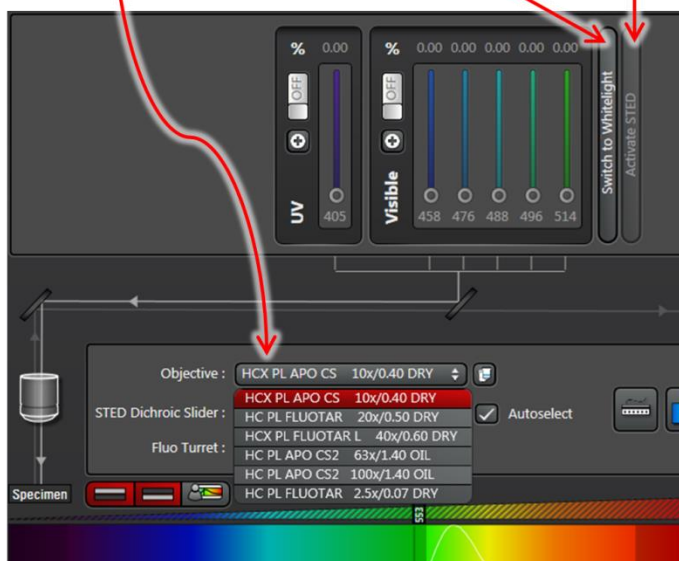


(8)。STED 模式激活

进入软件后，默认是普通共聚焦操作界面，配有白激光的系统可以点击如右图白激光控制栏切换按钮切换到白激光控制栏。

如果当前物镜不是专用的 100X STED 物镜，STED 模式的激活按钮显示为灰色，需要先点开物镜切换下拉框，切换到 100X 物镜之后，才能点击激活 STED 模式按钮，激活 STED 模式。

物镜切换下拉框 激活STED模式按钮
白激光控制栏切换按钮

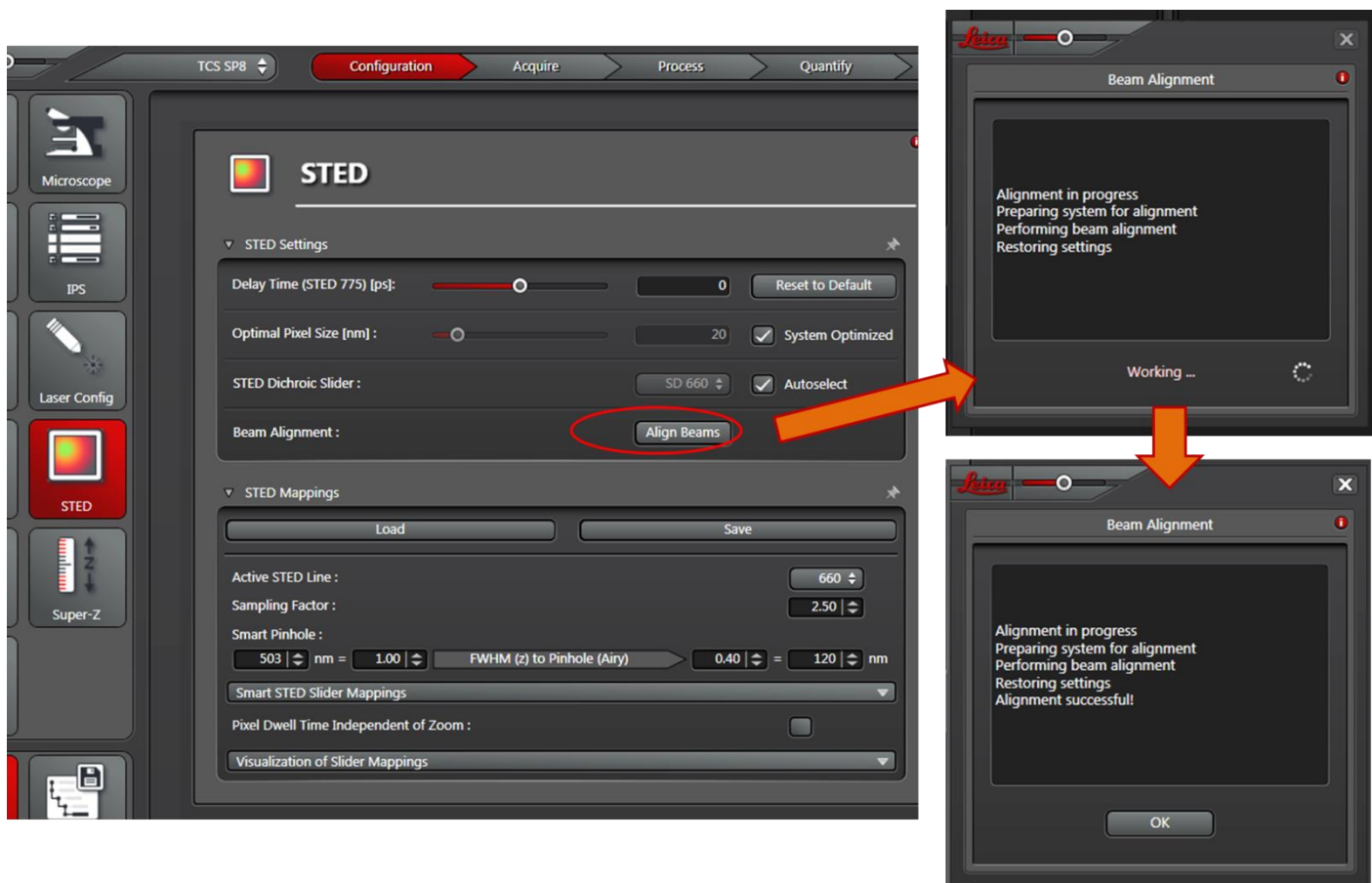


(9) STED 校准

STED 系统每次开机需校准一次，以保证最佳分辨率。校准时需要物镜切换到 100 倍，并且保证 592 STED 激光和至少一条谱线的普通激光开启，不需要放置标本。

点击 Configuration/STED 对话框里的“Align Beams”按钮，系统即开始自动校准，如下图所示，校准完成后显示“Alignment successful!”。

如果出现校准失败的情况，请调用“Load/Save single setting”下拉菜单（参考第 10 页）中“STED Depletion Alignment”设置，重新进行校准。



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 STED 激光控制栏
- 9 白激光控制栏
- 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）

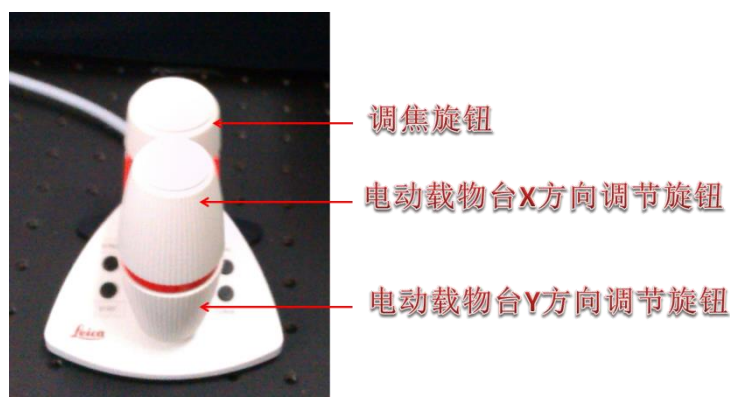
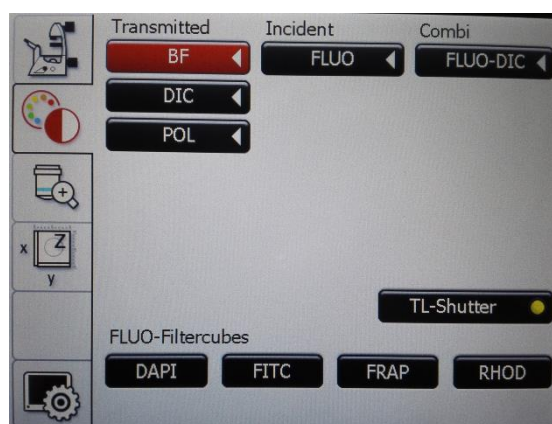
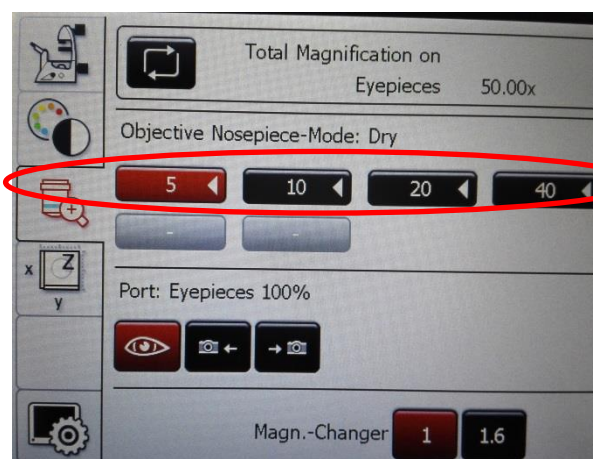
2.3.1 选择物镜：配有触摸屏的电动主机，可通过触摸屏界面选择物镜（右图）。点击按钮显微镜即可自动切换到相应物镜，在干/油镜之间转换时需要点击两次按钮才可完成切换。

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）。

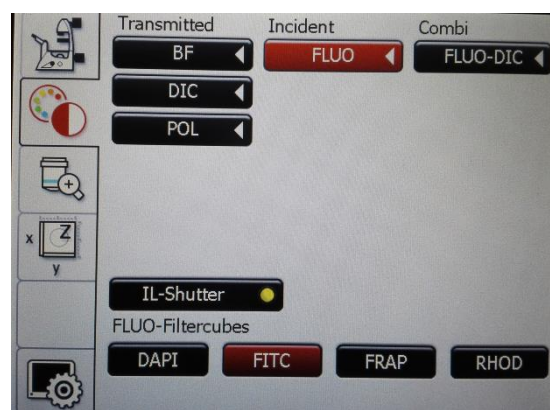


2.3.3 荧光观察：

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

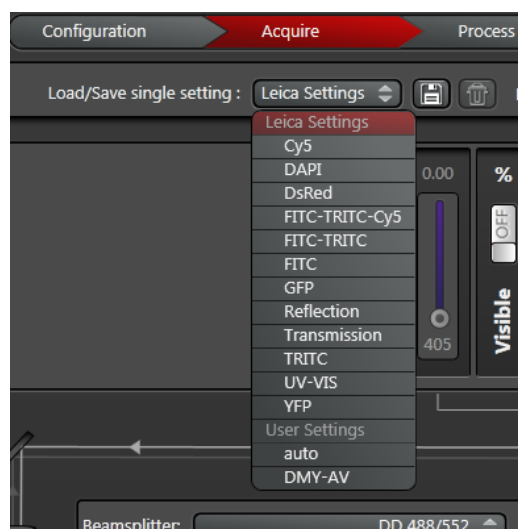


2.4 共聚焦图像采集

2.4.1 光路设置:

调用已有的光路设置：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。（右图）

修改已有设置：可改变所选激光、调节激光输出功率、改变所选检测器、调节检测器检测范围、调节检测器的 **gain** 或 **offset** 等。如下图。



可选择的激光光源
(ON 开, OFF 关)

激光输出功率
调节滑块

STED Z轴方向激光
功率调节滑块

STED参数警示图标
红色叹号表示拍摄参数
尚未满足超高分辨要求

各检测器检测范围
调节滑块
(彩色的表示该检测器已打开,
灰色表示检测器处于关闭状态)
(双击可显示和输入
波长范围数值)

系统已保存的荧光染料名称，
选择后可显示发射波长范围

明场透射光 检测器

检测通道伪彩选择和检测器开关

门控 (Gating) 检测开关 及门控检测时间窗设定

自由设置光路：多数情况下，您需要根据自己样品的荧光光谱参数，精心设置光路，以达到最佳的成像效果。以下给出几条建议：

① 激发光波长选择：
应参照荧光素的激发光谱，选择最接近激发光谱峰值的激光谱线。

② 检测范围设定：

需要参照荧光素的发射光谱，覆盖荧光素的最大发射峰，同时，检测波长范围应大于已经设定的激发谱线至少 **4~5nm**，且小于 **STED 谱线** 至少 **10~15nm**，如果样品还有波长更长的荧光，检测波长范围还应小于长波荧光的发射范围。

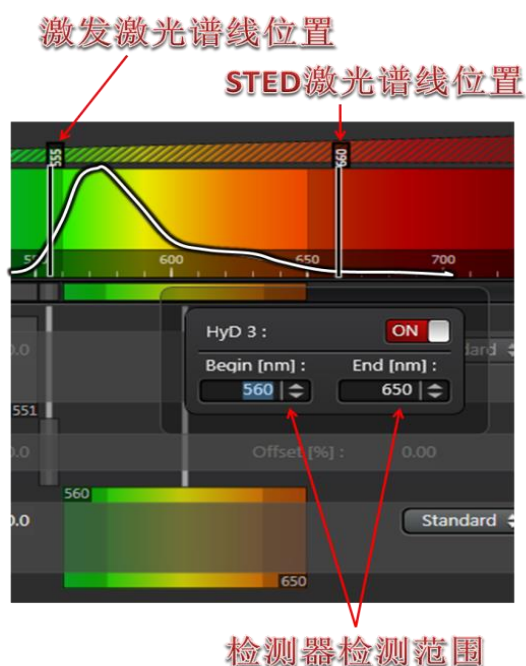
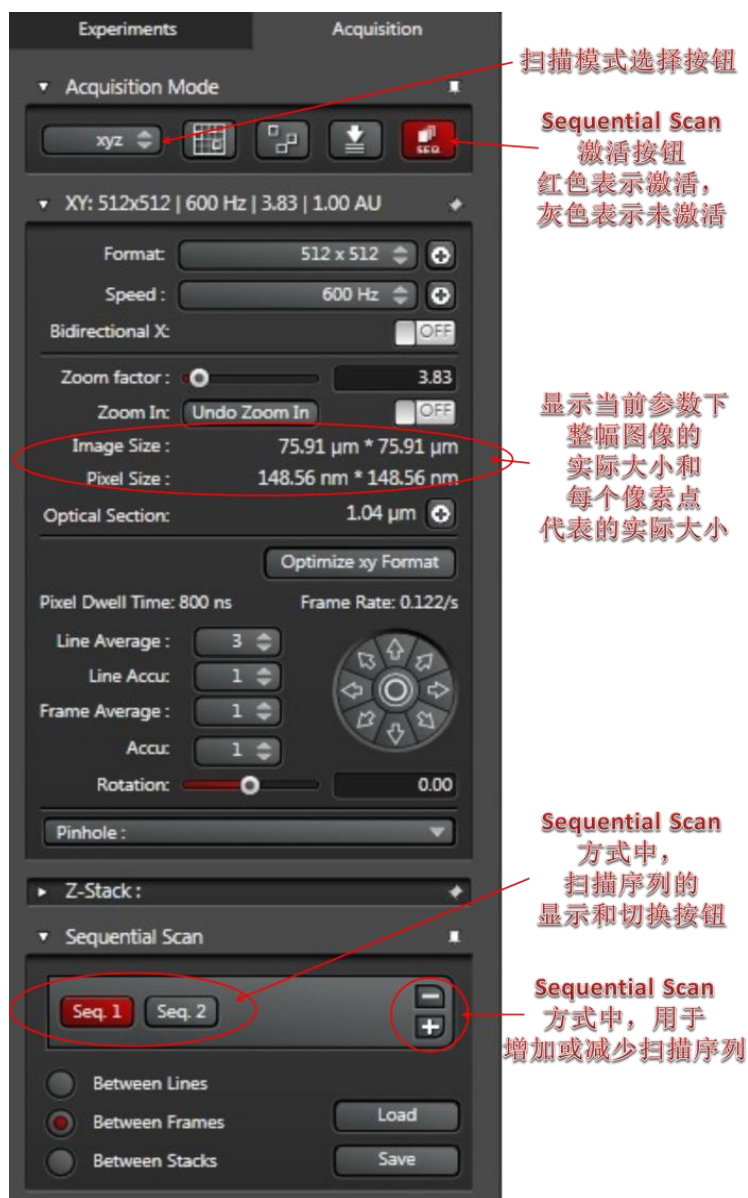
③ Sequential Scan:

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。（右图）激活

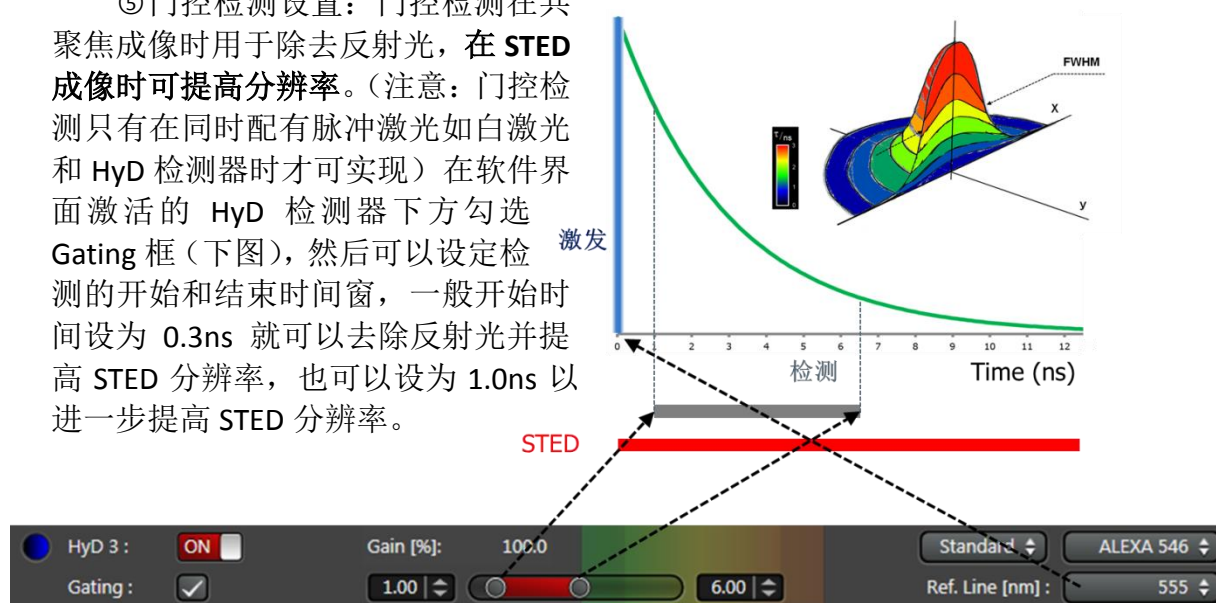
Sequential Scan 功能，可在下面的 Seq 中分别设置各个染料的激发和检测光路。STED 成像时，通常也需要启用 Sequential Scan，在同一视野分别采集共聚焦和 STED 的图像作为对照。

④ STED 激光的选择：

STED 激光的谱线应落在荧光素发射光谱的尾部（右图），以发挥 Depletion 作用，实现超高分辨。 STED 激光功率越高，分辨率提高的效果就越明显。



⑤ 门控检测设置：门控检测在共聚焦成像时用于除去反射光，在 **STED 成像时可提高分辨率**。（注意：门控检测只有在同时配有脉冲激光如白激光和 HyD 检测器时才可实现）在软件界面激活的 HyD 检测器下方勾选 **Gating** 框（下图），然后可以设定检测的开始和结束时间窗，一般开始时间设为 **0.3ns** 就可以去除反射光并提高 STED 分辨率，也可以设为 **1.0ns** 以进一步提高 STED 分辨率。



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 , xyz t , xyz λ , xyz λt** 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。

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**)。

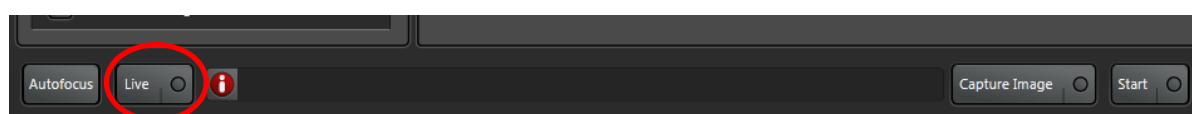
针孔大小：默认值为 **1AU**。如果增大针孔直径，可增加信号强度，但是所获取图像的共聚焦效果会降低，光切厚度也会随之增加。

平均：用于降低图像噪点。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。

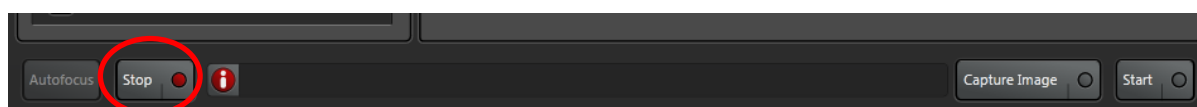
累加：用于荧光非常弱的样品或者启用 HyD 检测器的 **Counting** 模式时。

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，并且 STED 激光最好处于关闭状态。

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（见第 9 页图）。



图像亮度动态范围可通过调节激光输出功率（见第 10 页图）、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，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，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，小部分信号呈蓝色，而背景呈绿色。



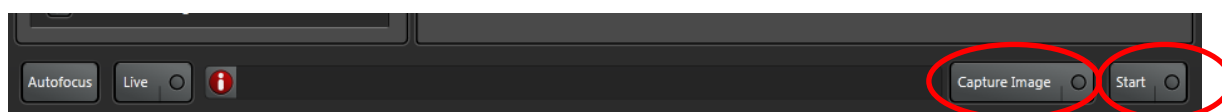
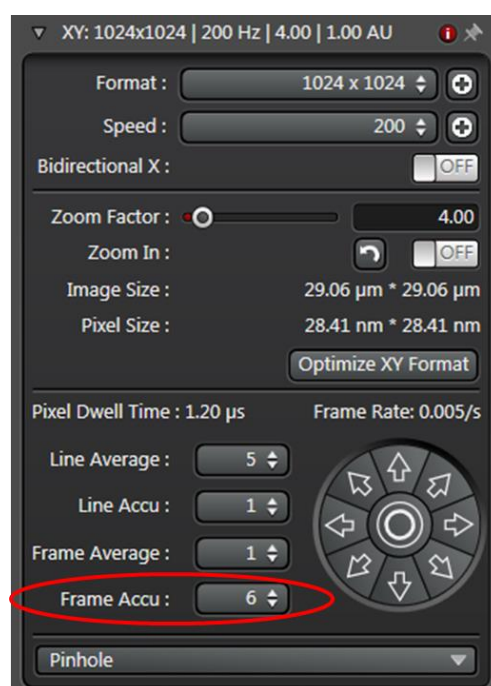
对于HyD检测器，其背景噪声很低，无需通过调节Smart offset来降低背景。

如果启用了Sequential Scan，在应该在每个扫描序列（Seq）分别通过预览来调整图像亮度。

STED图像一般不进行预览，在共聚焦图像预览完毕后，打开Sequential Scan，增加一个扫描序列，然后在新增加的扫描序列中打开STED激光并设定到一定功率，也可以同时启用Gating。开启STED激光和Gating之后检测到的信号会变弱，应适当增加激发激光功率、提高检测器Gain、增加Accumulation次数来保证图像亮度。

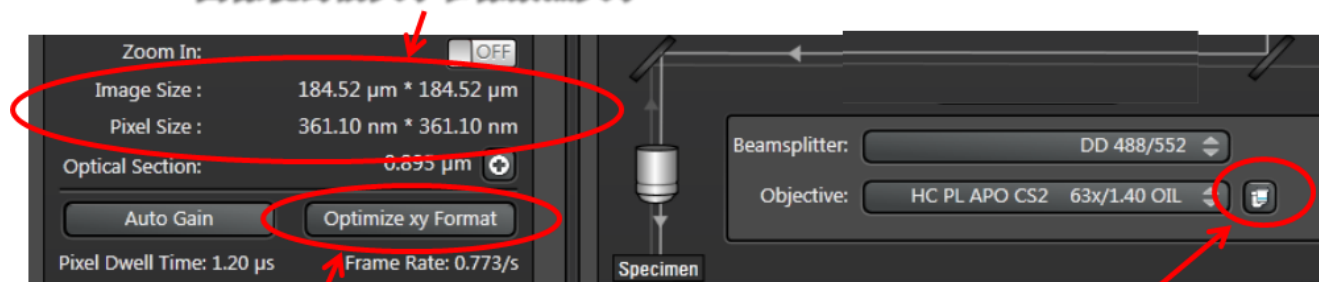
2.4.5 采集图像

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



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。

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

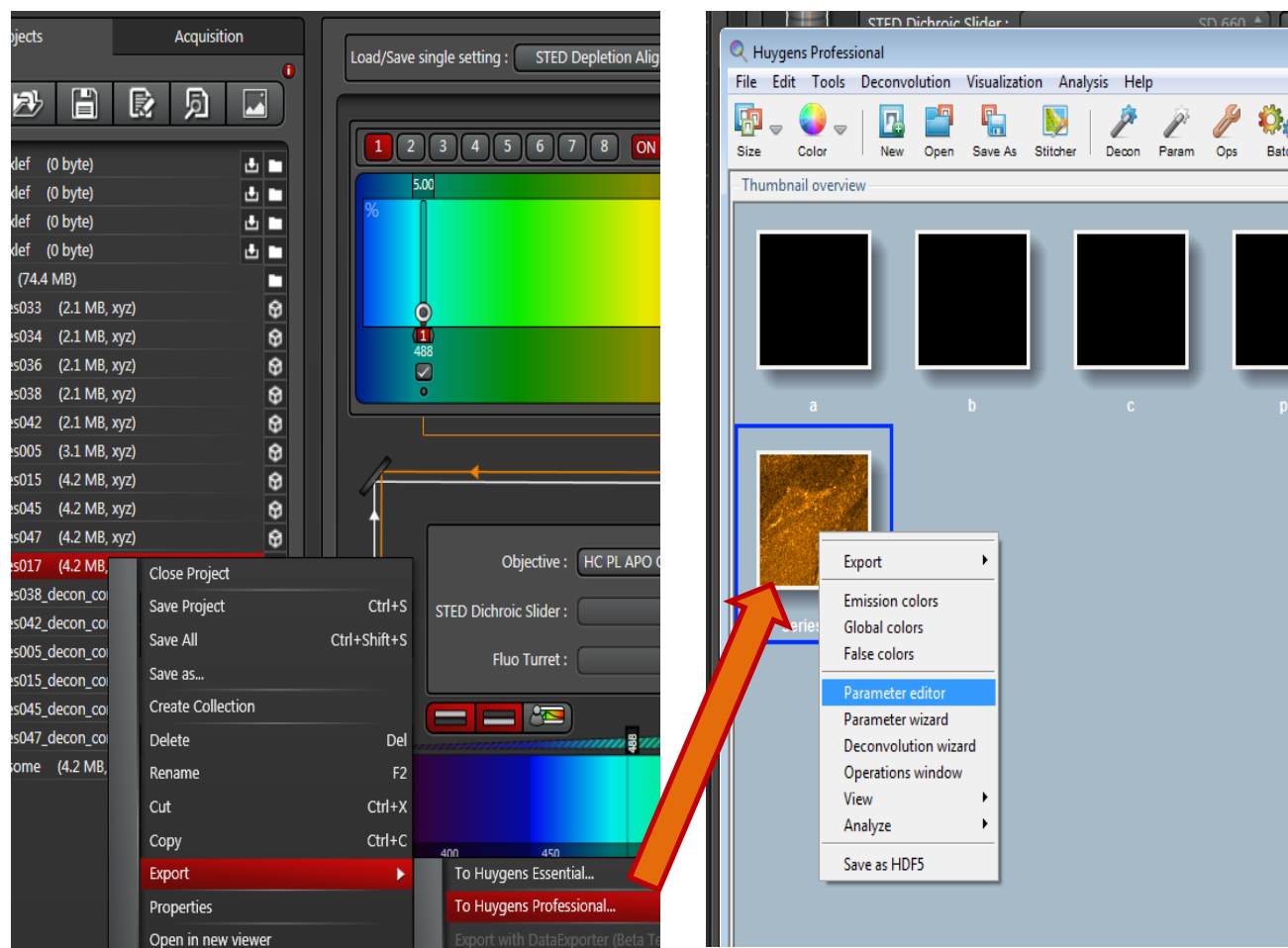
普通共聚焦采图时，根据Nyquist 采样原则，像素点大小（Pixel Size）应为物镜侧向分辨率（即xy平面分辨率）的 $2/5 \sim 1/2$ 。物镜分辨极限可点击物镜参数表按钮从弹出的界面读取，像素点大小（Pixel Size）可在采图参数设置界面获得。像素点大小随扫描分辨率增大和放大倍数（zoom）增加而减小。与高倍物镜相比，低倍物镜需要更高的扫描分辨率。

STED采图时，像素点大小（Pixel Size）应根据当前STED采集参数设定，可以设为当前分辨极限的 $1/3$ 或更小。

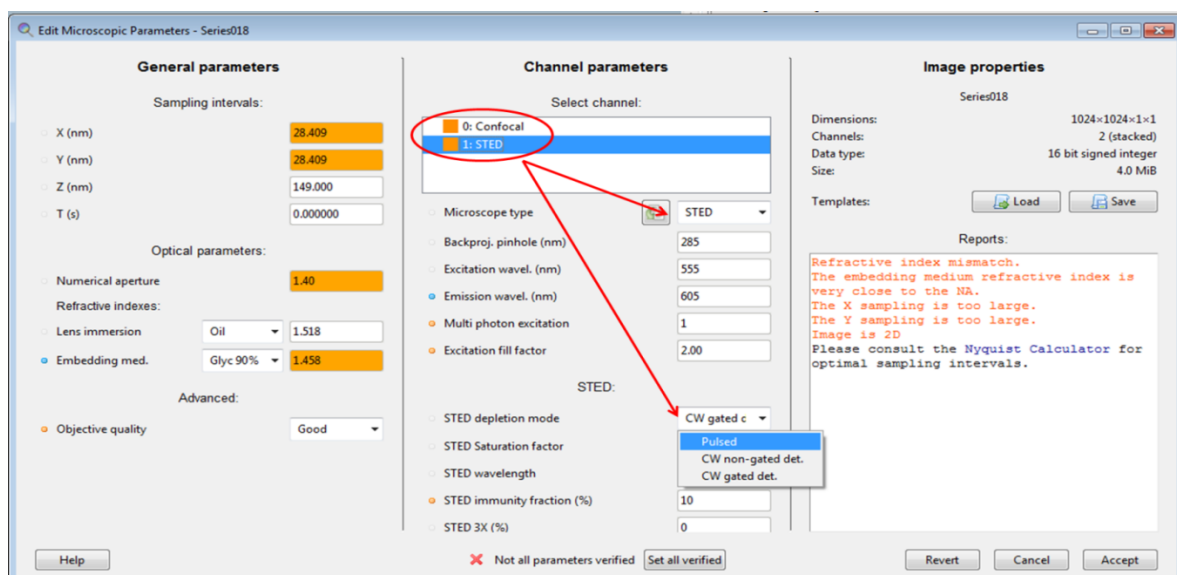
2.5 图像的反卷积处理

共聚焦和STED采集的图像如果经过反卷积（deconvolution）处理，可以大幅度降低噪点，提高信噪比，使图像看起来更清晰，从而显示更多细节。

徕卡系统整合的是Huygens反卷积软件，在LAS X软件采图后，在Project模块里选中需要处理的图像，点击鼠标右键，在弹出的菜单中依次选择**Export/To Huygens Professional...**，图像和相关的拍摄参数即被导出到Huygens软件，然后Huygens软件自动打开，在软件里可以看到刚刚导入的图像。

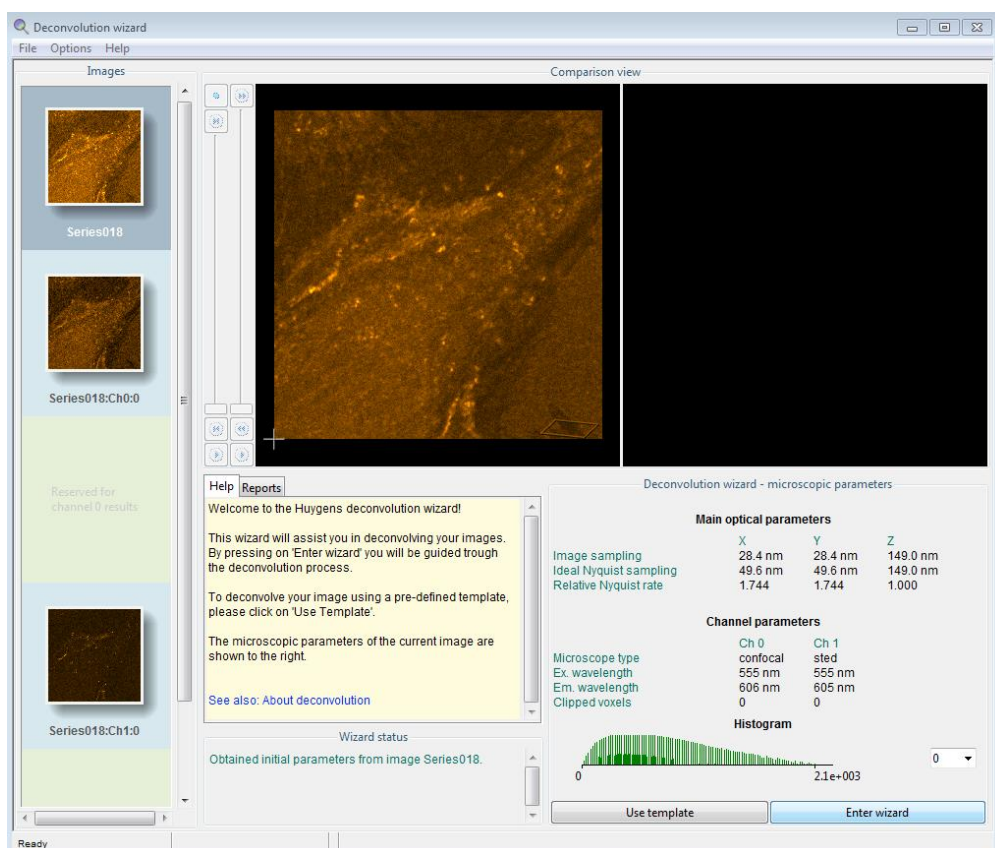


反卷积前，最好先检查一下图像的拍摄参数，以确保准确。在图像上点击右键，选择“Parameter editor”，在打开的对话框中，分别点击“Select channel”下面的各个通道，重点检查对应的“Microscope type”和“STED depletion mode”是否正确。

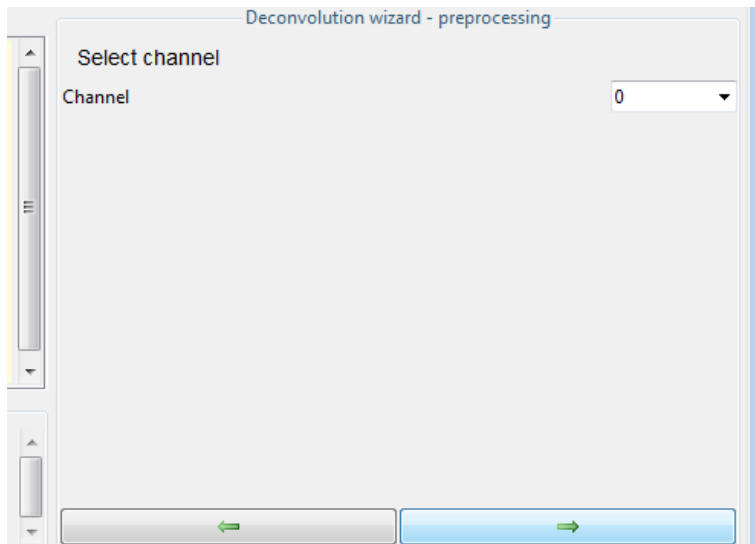


普通的共聚焦通道，“Microscope type”应为“confocal”，STED通道“Microscope type”应为“STED”，使用脉冲激光并启用门控功能时，“STED depletion mode”应为“Pulsed”，使用非脉冲激光时，选择“CW....”的两个相应选项。检查完毕后，点击“Accept”按钮关闭对话框。

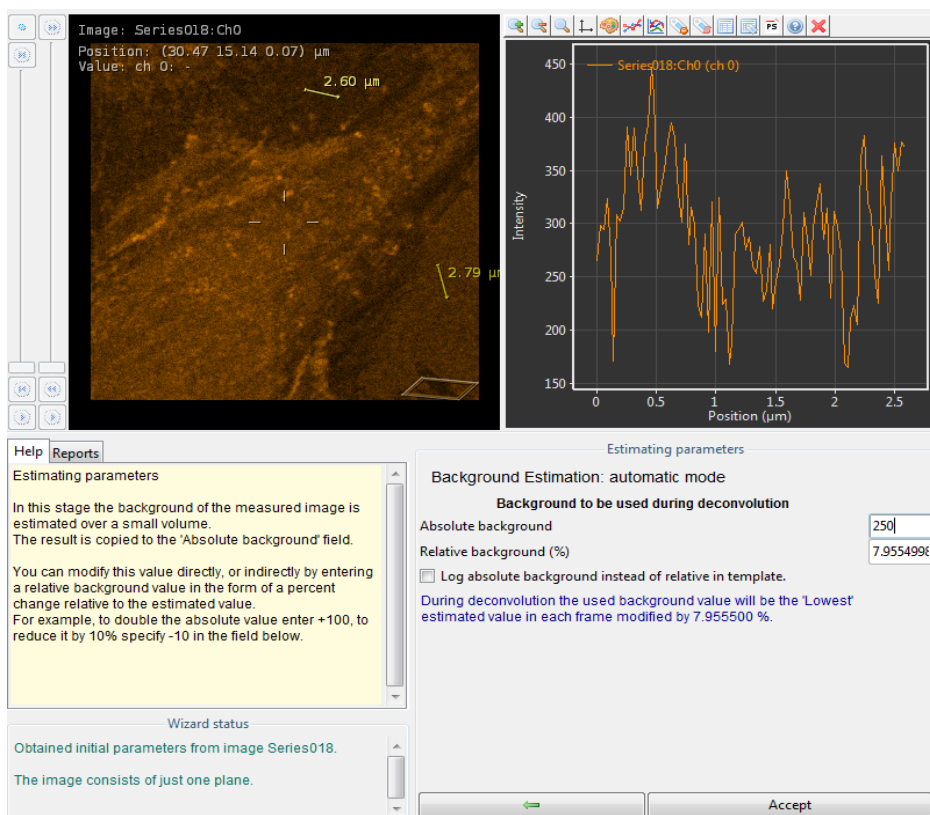
再次Huygens软件主界面的图像上点击右键，选择“Deconvolution wizard”启动反卷积流程：



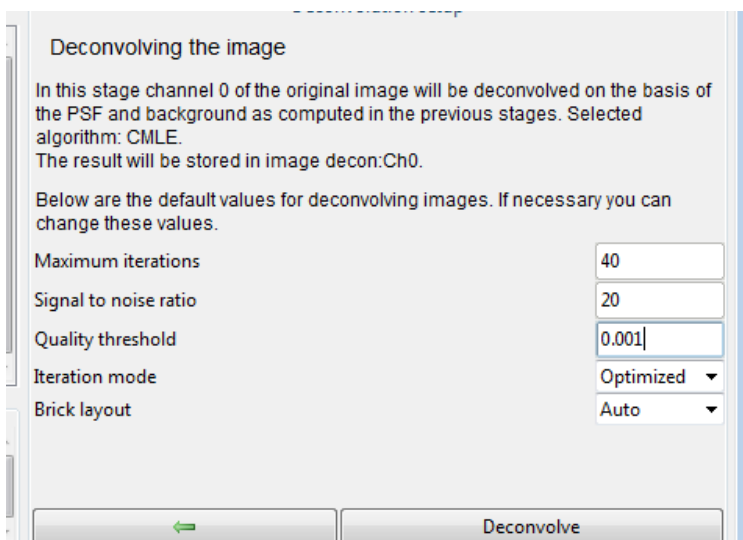
① 在弹出的对话框中点击“Enter wizard”进入下一步



②通道选择界面，点击右方向按钮进入下一步



③背景值计算界面，
可以接受系统推荐值，也可以自己在图上背景位置拉一条线，根据右侧曲线显示的值来确定背景值，然后输入“Absolute background”框。
之后点击“Accept”进入下一步

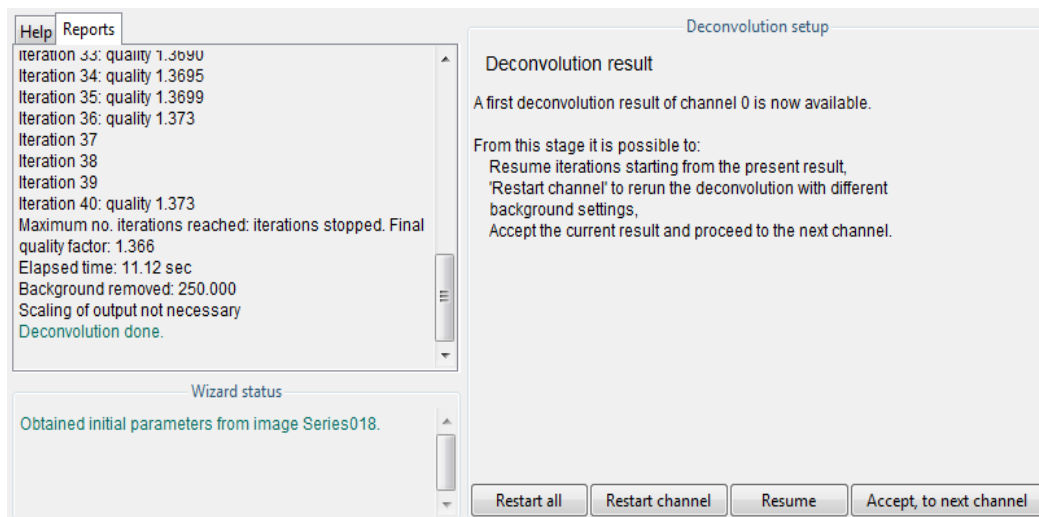


④反卷积启动界面，其中需要注意的是：

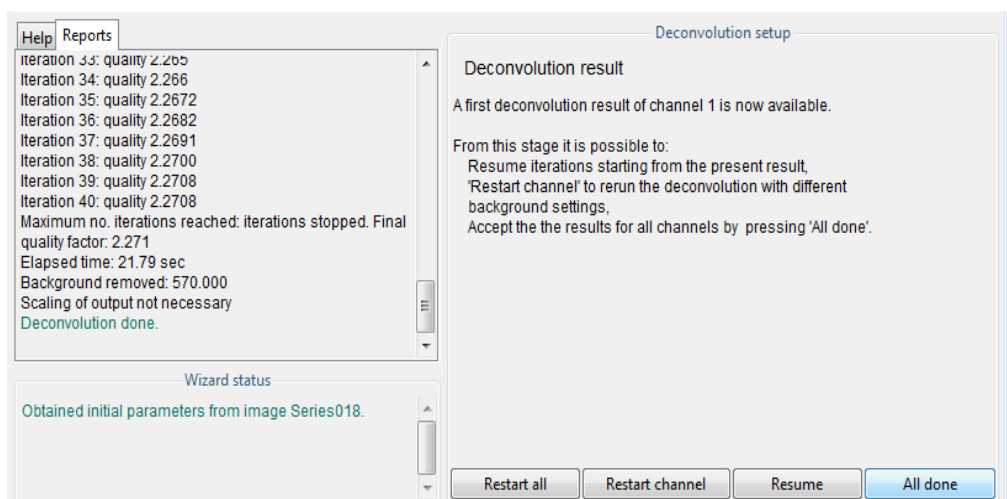
“Maximum iterations”设置的是反卷积图像在达到标准前的最大重复计算次数。一般设置在 20~40 左右。

“Quality threshold”设置的是软件判断最近两次处理图像改善程度的标准，改善程度低于此标准时，反卷积停止，否则就继续进行直到达到上面设置的最大重复计算次数。可设置为 0.01~0.0001 左右。

点击“Deconvolution”启动反卷积计算。

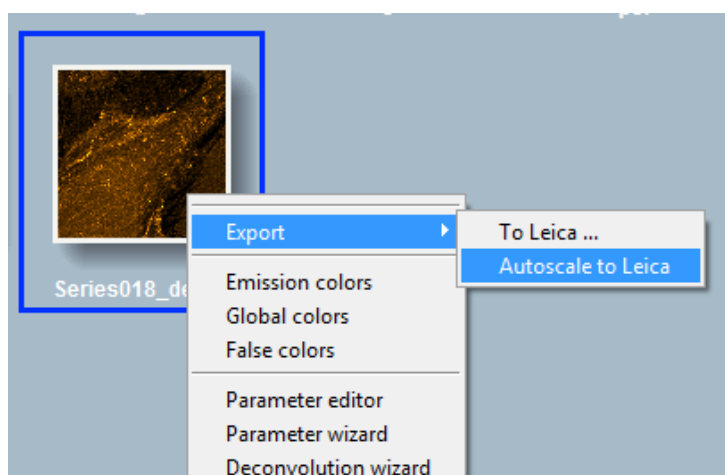


⑤第一通道反卷积完成界面，点击“Accept to next channel”可进入步骤②界面，按照同样步骤进行第二通道的反卷积计算。



⑥所有通道反卷积完成界面，点击“All done”结束整个流程。

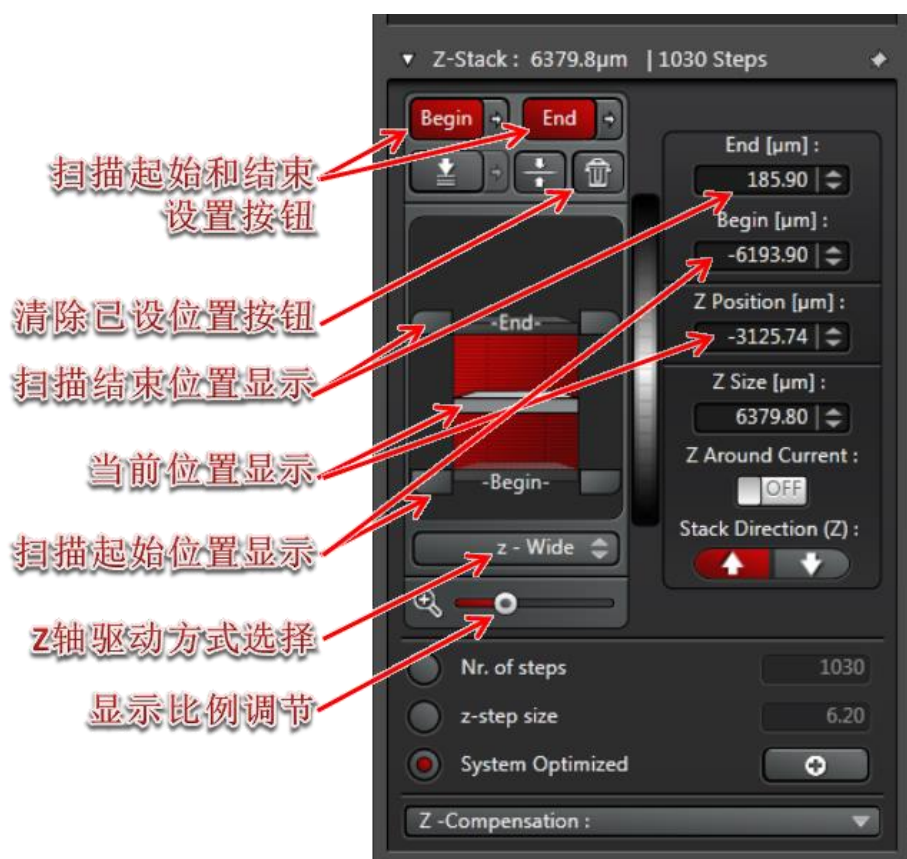
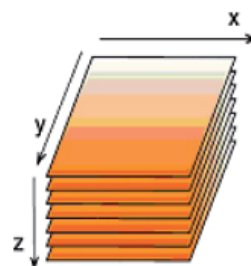
在Huygens软件主界面可以看到计算得到的图像，在图像上点击右键，选择“Export/Autoscale to Leica”即可将图像导回LAS X软件。



2.6 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。



2.6.1 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。

2.6.2 设置光路参数，方法同前。

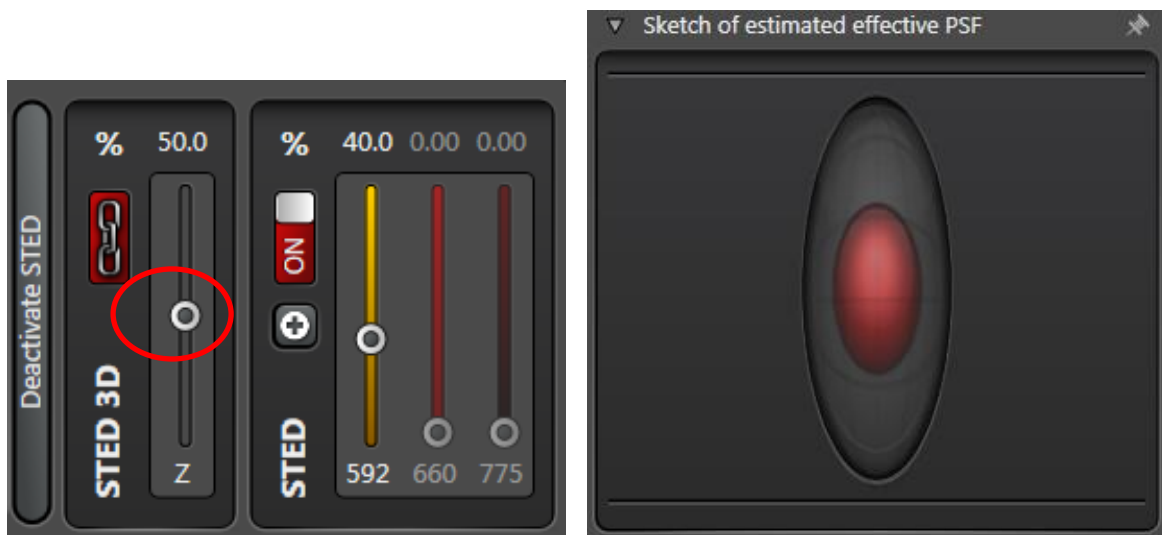
2.6.3 设置Z轴范围

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。

2.6.4 STED 3D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）。



2.6.5 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。

2.6.4 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。

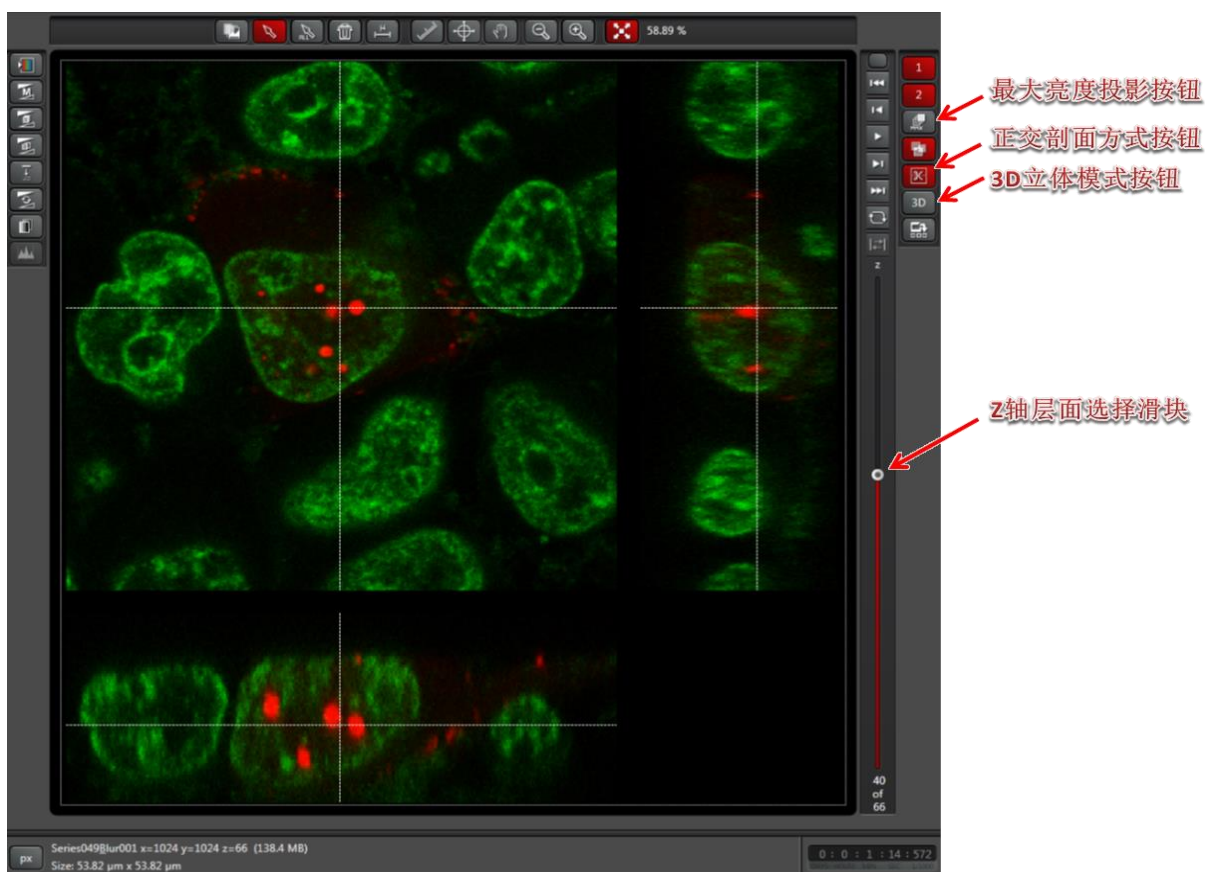
采图完毕后，点击清除已设位置按钮，使Z轴位置重新处于未定义状态，以免影响下次采图。

2.6.5 3D展示

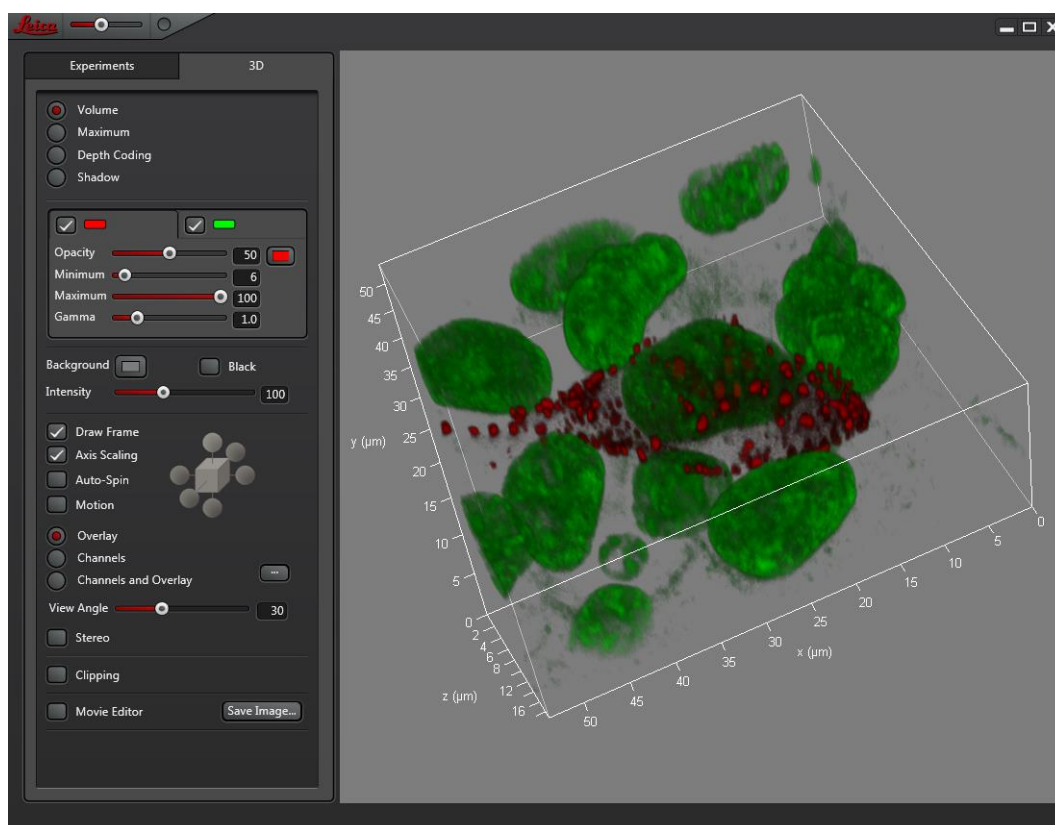
拍摄完3D图像之后，在图像显示窗口右侧会多出3个用于3D图像显示的按钮：

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。



2.7 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”。

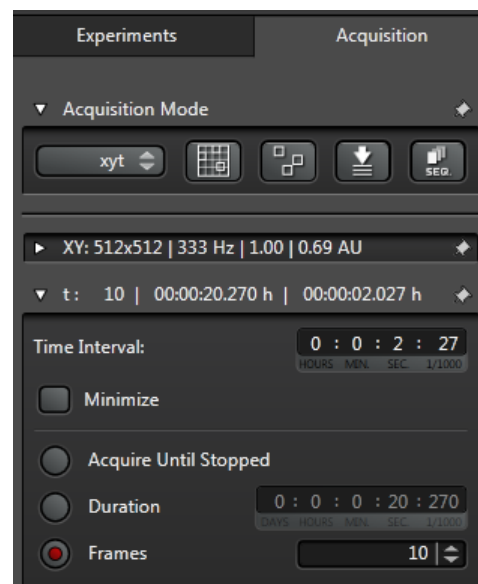
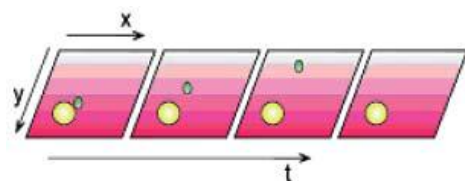
2.6.4 按采图需要选择“Acquire until stopped”、“Duration”或“Frames”。

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。



2.8 HyD 检测器

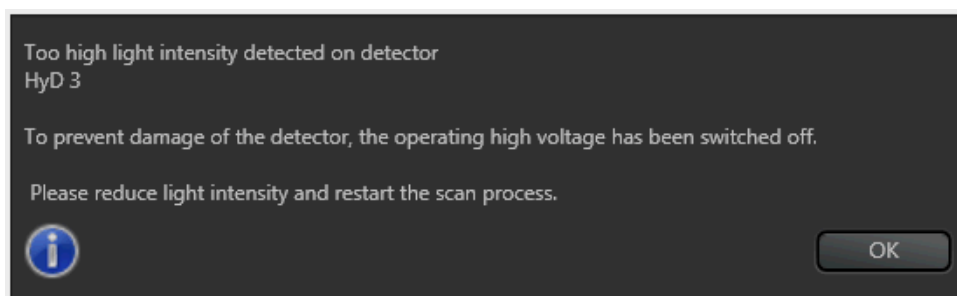
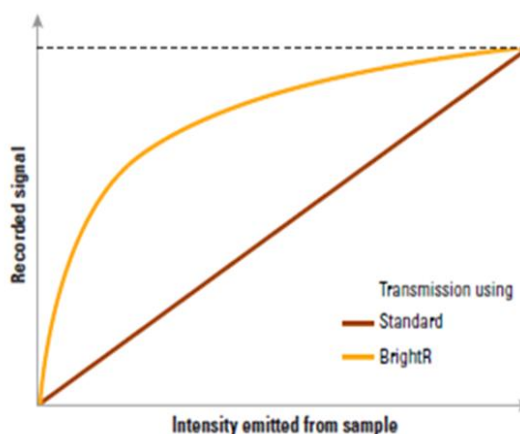
HyD检测器是高性能的检测器，比PMT更灵敏响应速度更快，并且有更多的功能。HyD检测器有三种操作模式可供选择：

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。

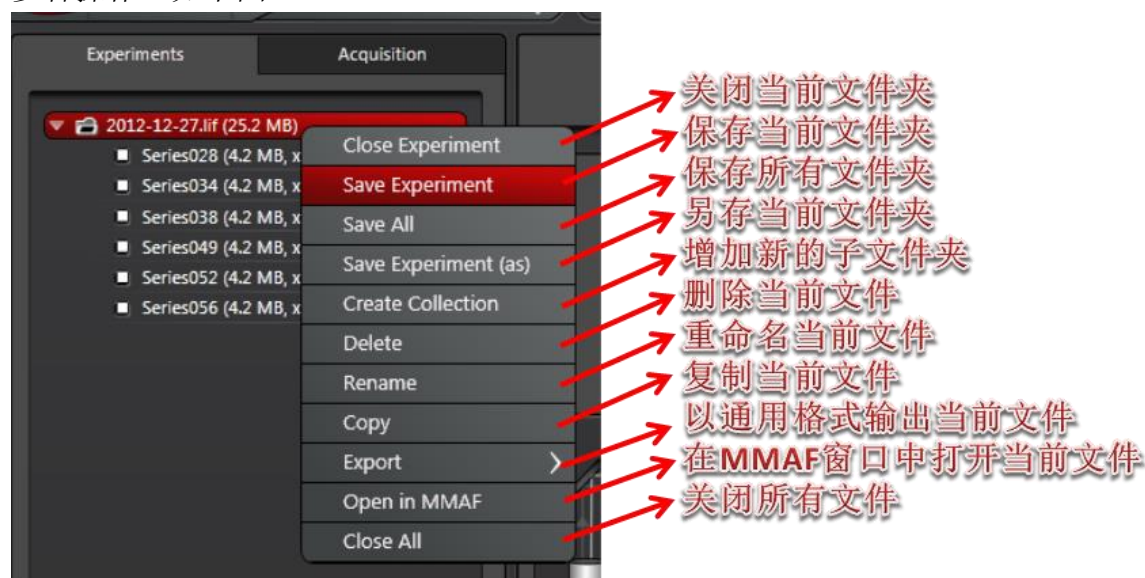
特别注意：

- 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：

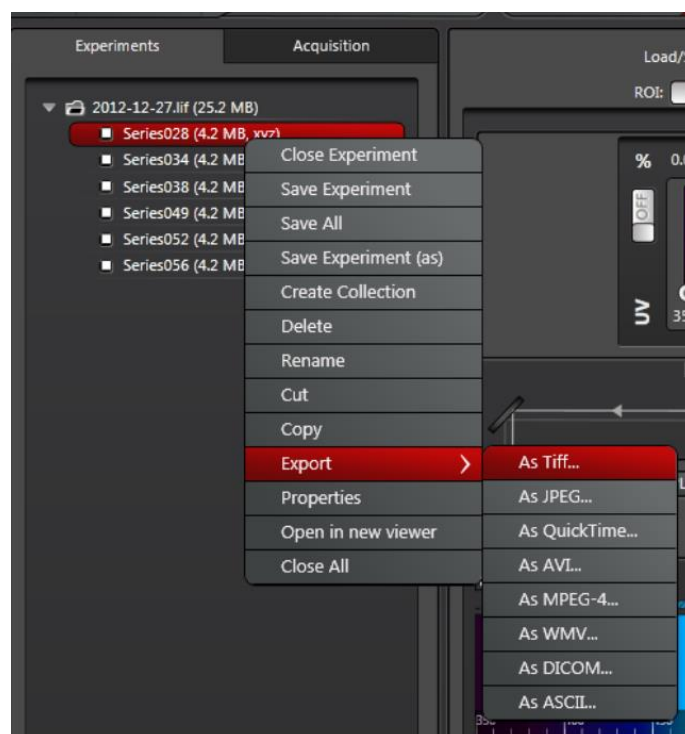
“Acquire”的”Experiment”或“Project”下显示采集的所有图像文件名称，默认本次开机后采集的所有图像都放在一个文件夹下，右键点击文件名，可进行多种操作。如下图：



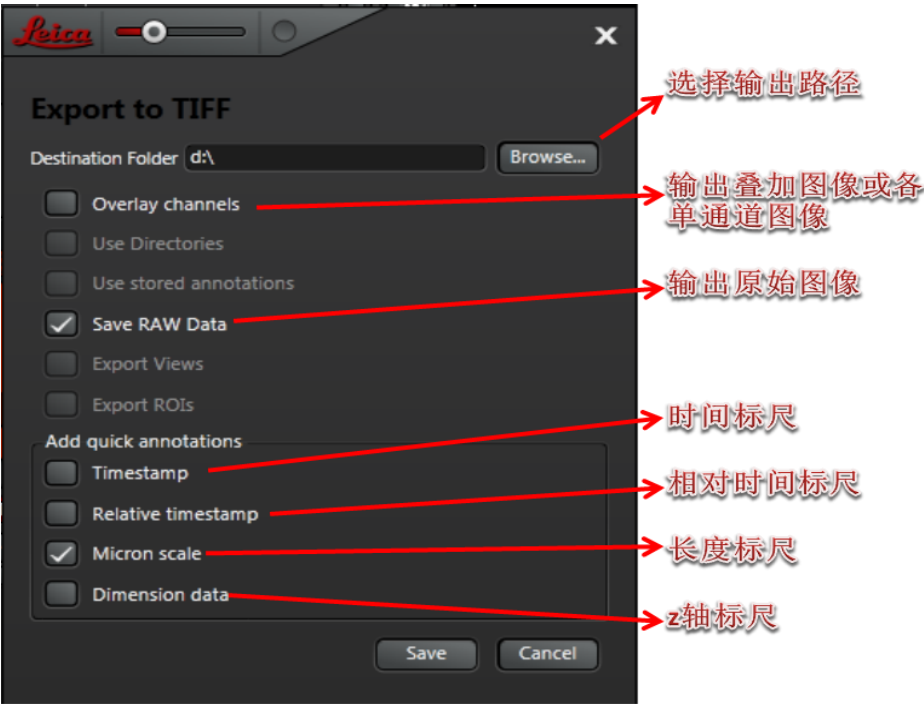
选择“Save Experiment”或“save Project”即可将当前文件夹下的所有图片保存为一个文件，文件保存格式为*.lif 原始文件，只能通过Leica LAS X或其他专业图像数据处理软件打开。

2.9.2 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。

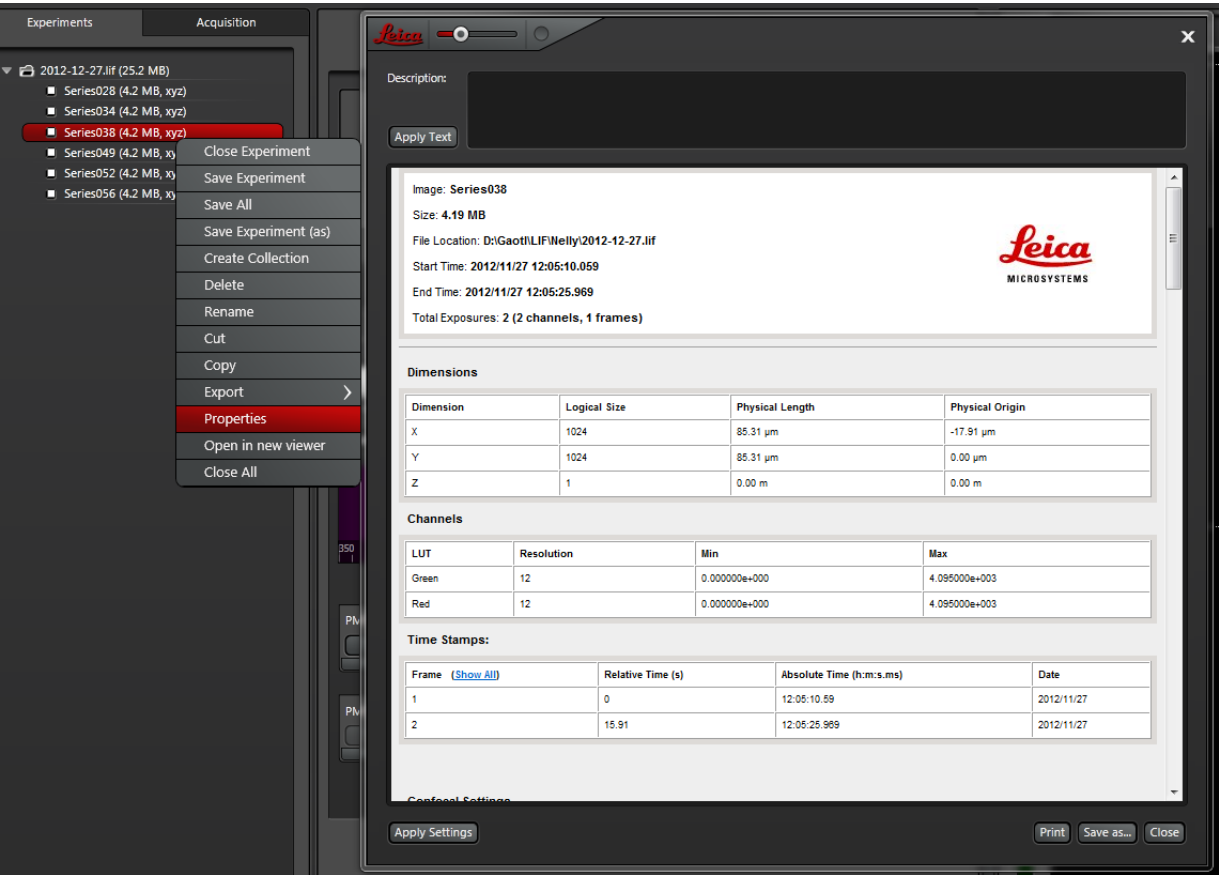


选择” As Tiff” 或” As JPEG”，出现如下图的对话框，可选择输出路径、所需标尺及位置等。确定后，点击” OK”，即可将图像输出至指定路径。



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。

2.10 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。



了解LEICA SP8 STED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 SP STED的更多信息

关于 STED -X、其应用、技术、软件及 TCS SP 平台的更多信息，请参见 STED -X 产品页面。

www.leica-microsystems.com/sted-x

徕卡科学论坛：生命科学新主题及相关主题的跨学科信息交流平台

徕卡科学论坛创立于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



24小时服务热线：400-820-8932