



中国人民大学化学与生命资源学院

SCHOOL OF CHEMISTRY AND LIFE RESOURCES, RENMIN UNIVERSITY OF CHINA

理化分析测试中心

INSTRUMENTAL ANALYSIS CENTER (IAC)

Leica SP8 激光扫描共 聚焦显微镜 操作指南

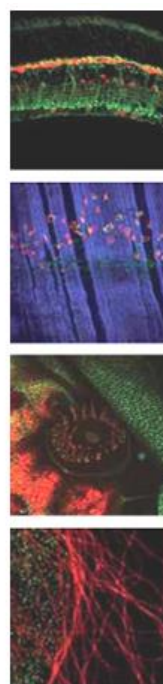
制作团队：刘慧、罗静雯、宋辰昊，王炳铃

指导老师：袁斌

中国人民大学化学与生命资源学院

一、仪器基本信息

Leica SP8 激光扫描共聚焦显微镜



仪器型号：Leica TCS SP8 倒置

生产厂家：徕卡显微系统（上海）贸易有限公司

核心功能：激光共聚焦扫描显微镜(CLSM)是利用光学手段从显微样品中产生切片的一种方法。样品保持完好，切片可以多次重复。共聚焦扫描(TCS)是一种一次只照射和观察一个衍射极限光斑的技术。共聚焦成像的好处是通过去除非焦平面杂信号显著提高对比度。光学切片的 Z 序列(3D 图像堆栈)后续可以渲染为浮雕效果、深度编码地图或 3D 动画。TCS 还可以与多色荧光成像、延时成像、FLIM、FRAP

和 FCS 测量相结合。

关键参数：物镜放大倍数、激光光源与激光波长的选择

放置位置：理工楼 106 实验室

负责人：袁斌老师 15120000730

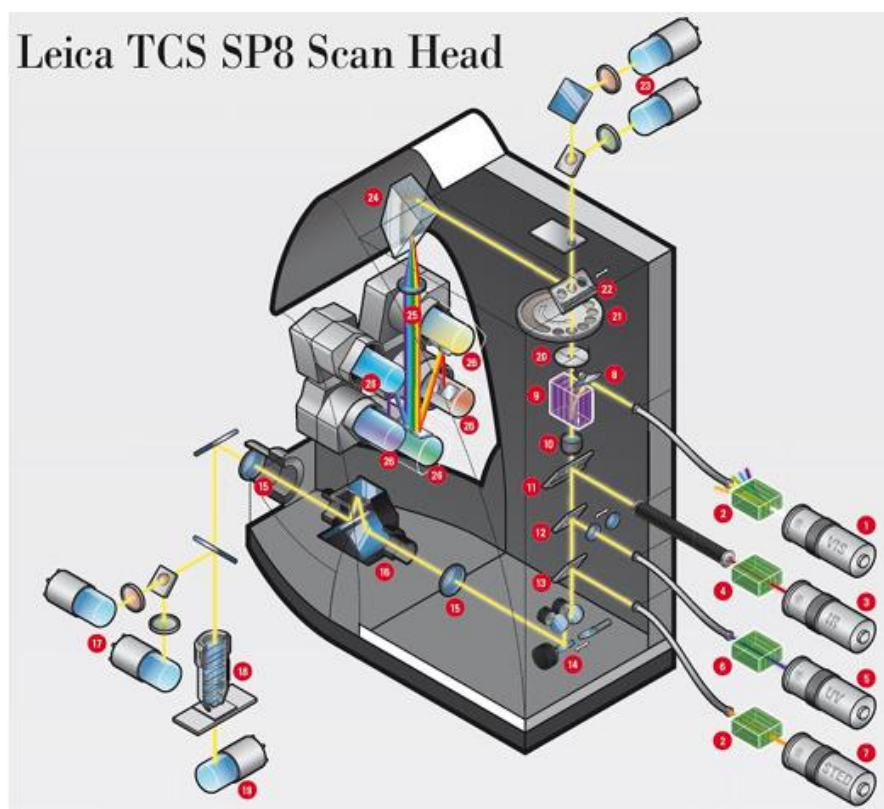
二、操作前工作

了解仪器的基本组成和光路示意图



LEICA TCS SP8倒置，配备灵活型光源组件 (FSU)

光路示意图



- 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 正方形针孔
 - 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
- *选配组件

2.1 人员要求

- 操作人员需完成 Leica 激光扫描共聚焦显微镜的专项培训并通过考核，持“仪器操作资格证”预约使用；
- 在测试前，操作人员需将样品、相关试剂和滴管等放在一旁的实验台上，勿将带有化学试剂的样品等放在仪器的工作台；
- 在操作时不要带手套；

3.1 仪器检查

- 环境条件：温度和湿度：确保实验室环境符合要求（通常是 20-25°C，湿度 < 60%）。环境波动会引起焦点漂移（focus drift），影响长时间实验。
- 防震与清洁：检查台面是否稳固无震动。保持显微镜周围环境清洁，尤其是光学部件附近无灰尘。
- 电源与硬件：主电源：确认显微镜主机、激光器、探测器、计算机等所有设备的电源连接稳定。
- 激光器状态：如果激光器是常开型，检查其状态指示灯是否正常。如果是需要手动开启的激光器，务必遵循正确的启动顺序（通常先开显微镜主电源和计算机，最后再开激光器），关机时顺序相反（先关激光器）。
- 物镜清洁度检查：每次使用前检查对应的物镜镜头是否有灰尘、油渍。

三、标准操作流程

3.1 开机顺序（硬件标号请参考前面的系统组成图）

（1）因为 FSU 和 CSU 硬件的电源控制 ⑬ 不同，请分别按照如下步骤开机：

FUS 系统：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



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。

CSU 系统：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”



之后两个系统的操作一样。

(2) 打开荧光激发光源 ④

(按绿色的 Power 按钮，如右图)



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



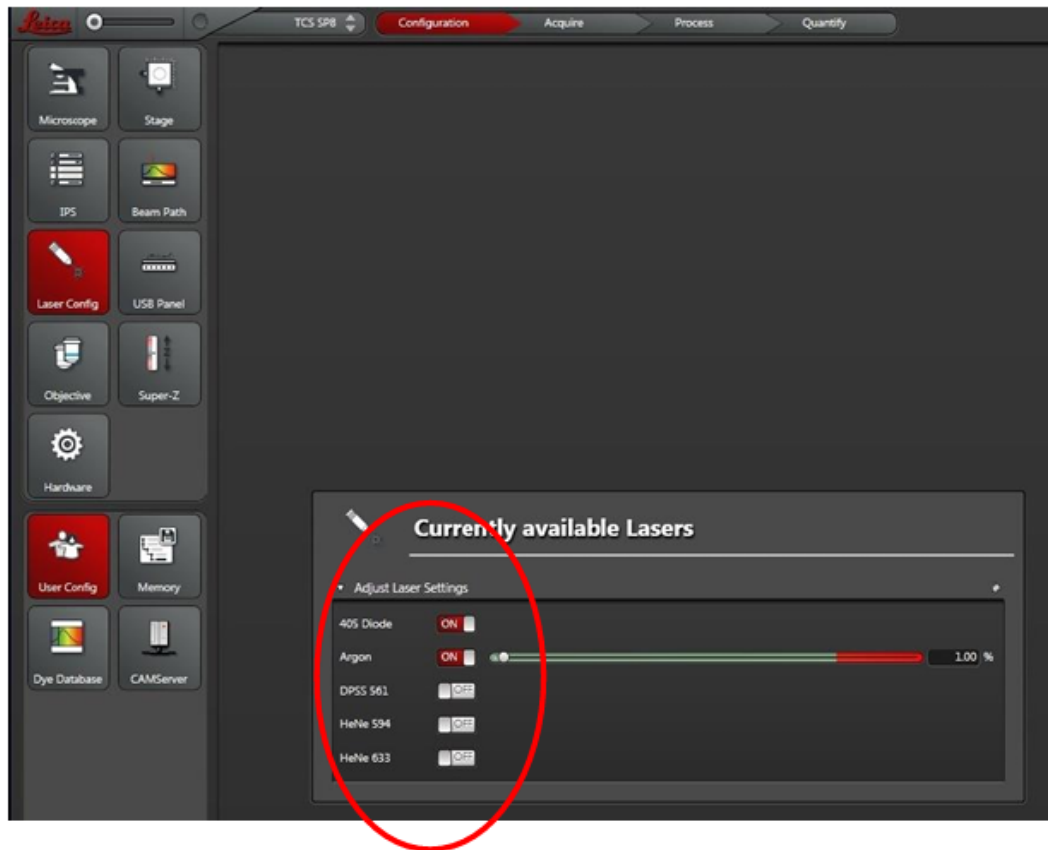
(4) 进入配置选择界面后，在“Configuration”下拉菜单中选择需要的配置；（其中带有“simulator”字样的为模拟方式，该方式不控制显微镜硬件，不能拍摄图像，适合处理数据）“Microscope”菜单中选择显微镜型号；（图中“Resonant”选项为快扫功能，可按需要打开或关闭，只有配备了快扫功能的系统才会显示该选项），点击“OK”，系统继续启动。



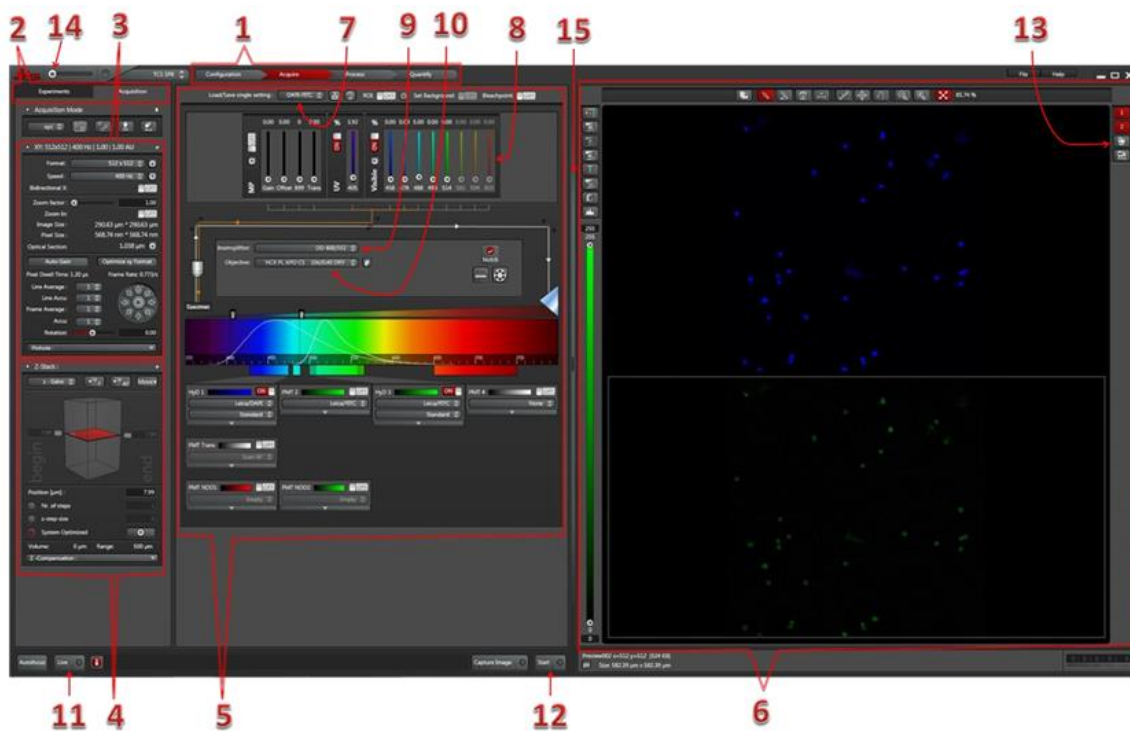
(5) 在“Initialize Stage”提示界面选择是否初始化载物台（如果选择“**No**”，则 Tile scan、Mark&Find 和 Matrix 功能不能使用）。注意：如果配置的是手动载物台，则不会跳出该提示界面。



(6) 系统自检完后，进入 LAS AF 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），Argon 激光还需拖动右方滑块以调节激光输出功率。



3.2 软件页面介绍



- 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：Experiments 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
- 7 预设光路选择按钮
- 8 激光控制栏
- 9 分光镜选择按钮
- 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 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
- 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

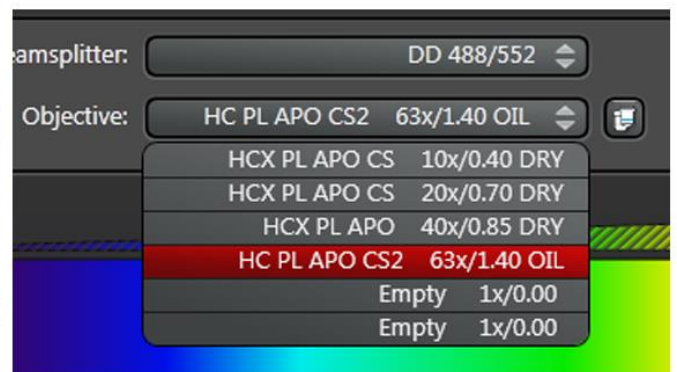
3.2.1 在显微镜下观察样品

3.2.1.1 选择物镜：可通过显微镜主机右侧的物镜转换按钮，或软件中的“Objectives”按钮进行选择（如下图）。（在显微镜设置软件 Leica AF Hardware Configurator 中可设定最下方的红圈中的按钮为干/油镜转换，在干/油镜之间切换时需要先按一下此按钮才能完成转换）



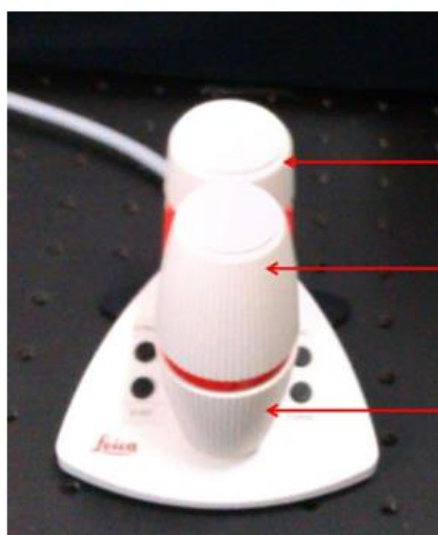
快速调焦按钮

物镜转换按钮

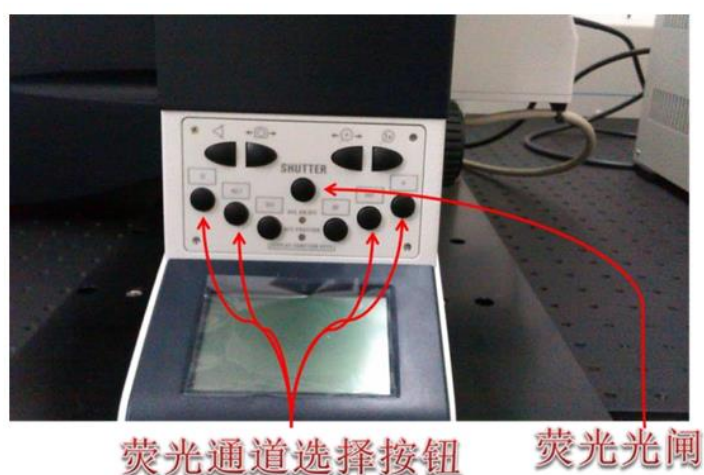


3.2.1.2 明场观察：将样品置于载物台上，按显微镜左侧的 TL/IL 按钮打开明场光路（如右图）（因显微镜所处状态不同，有时候需要按两次才能打开），在明场条件下选择合适的视野。通过调焦按钮或旋钮

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。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(如下图)。



3.2.1.3 按显微镜前面板的荧光滤块选择按钮切换至荧光观察光路(如右图所示),其上的标注与荧光颜色的对应关系为: I3 绿色, N2.1--红色, A—蓝色, 有些配置的显微镜按钮对应的荧光颜色可能会有所不同,请以实际情况为准。再按荧光光闸按钮



(SHUTTER) 打开荧光,进行样品的荧光观察。

3.2.1.4 观察完毕后，按显微镜前面板上的“SHUTTER”按钮以保护样品。

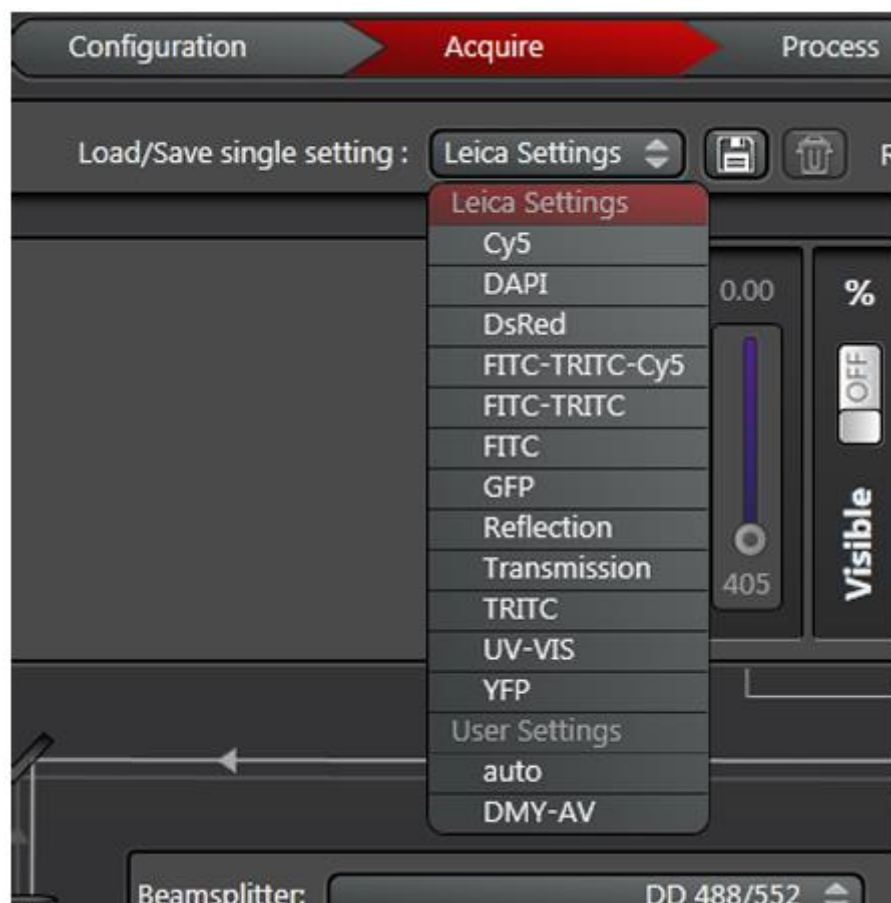
3.3 采集共聚焦图像

3.3.1 光路设置：

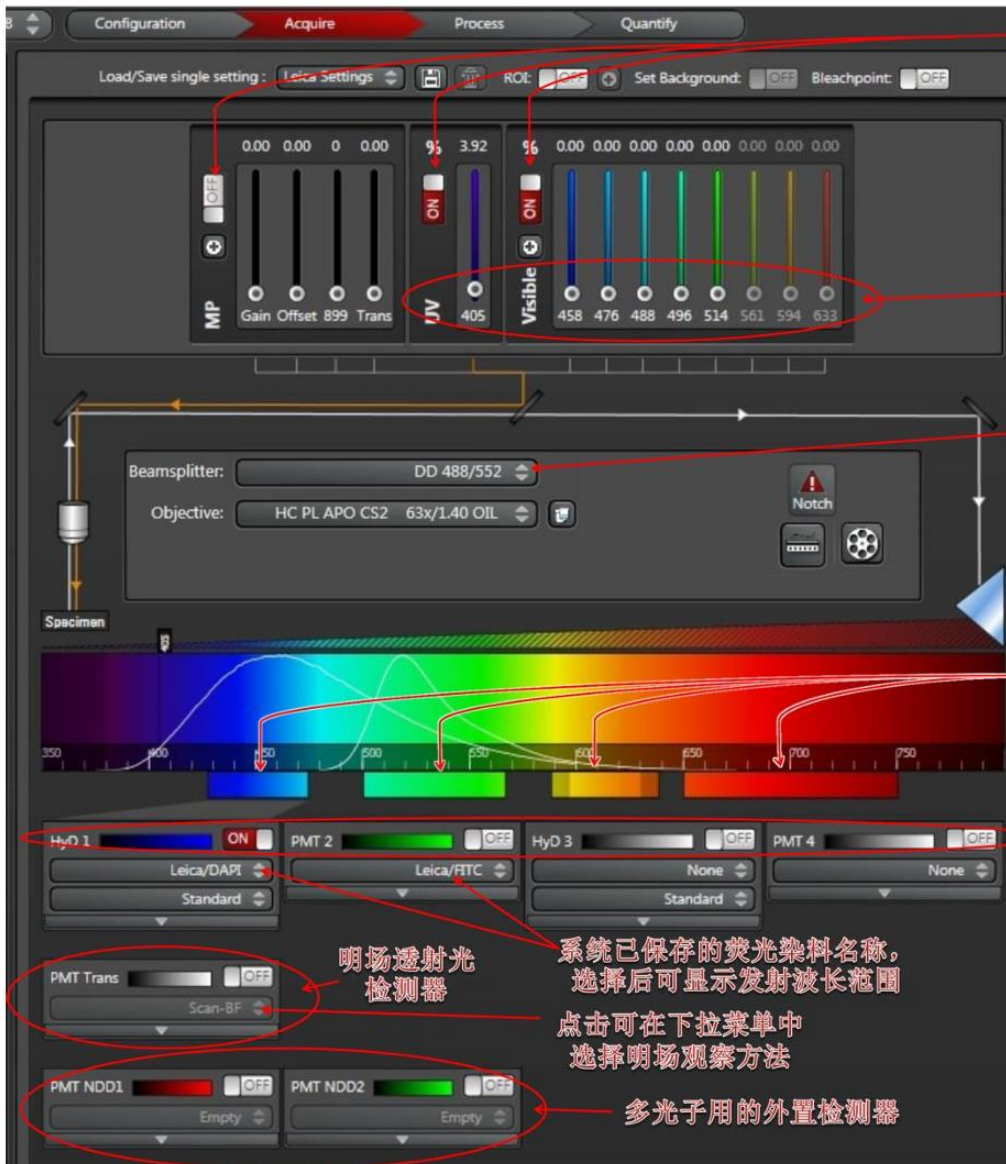
调用已有的设置：选择“Load/Save single setting”下拉菜单中已有的设置，激光波长及其输出功率、分光镜、检测波长范围、检测器 gain 及 offset 都会自动设置，包含几种最常用

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。如下图。



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。



可选择的激光光源
(ON 开, OFF 关)

调节激光输出功率
的滑块

分光镜选择按钮

调节各检测器检测范围
的滑块
(双击可显示和输入
波长范围数值)

检测器所用伪彩
和检测器开关
(单击可改变当前选项)

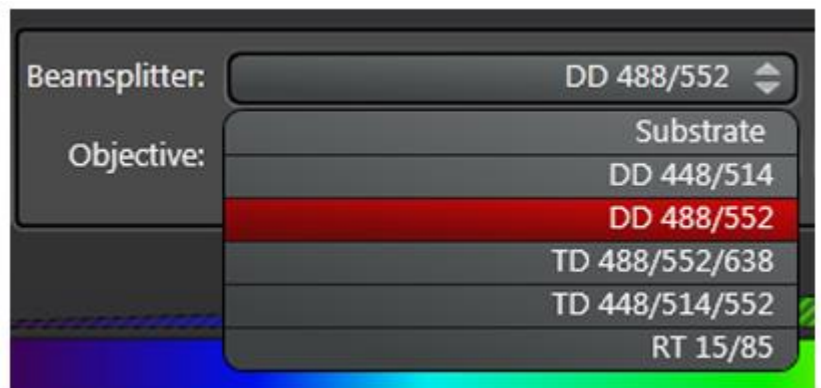
明场透射光
检测器

系统已保存的荧光染料名称,
选择后可显示发射波长范围

点击可在下拉菜单中
选择明场观察方法

多光子用的外置检测器

分光镜选择原则：根据所用激光波长来选择合适的分光镜。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。③ 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% 的荧光能量，一般在进行光谱扫描的时候选用。

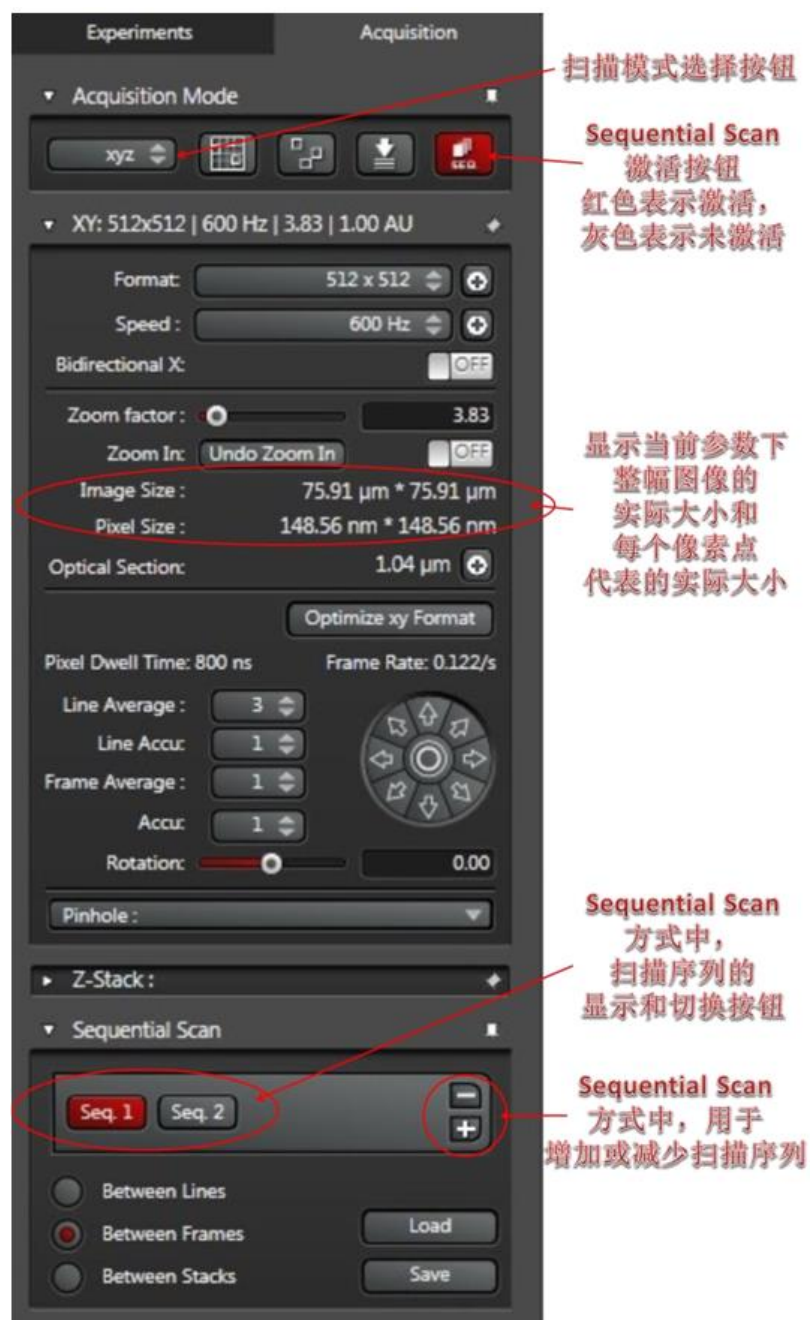
Sequential Scan: 若染料的发射光谱有重叠，为减少串色，成像时每种染料要单独激发，或者说，每次只用一种激发光激发，并只检测一种染料。可用 Sequential Scan 来实现。（如右图）激活 Sequential Scan 功能，可在下面的 Seq 中分别设置各个染料的激发和检测光路。

3.1.2 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。

3.1.3 设置扫描参数

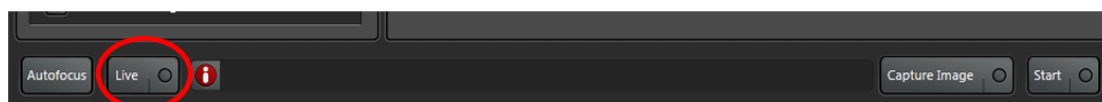
包括分辨率（format）、扫描速度（speed）、针孔大小（pinhole）、线平均（line average）、面平均（frame average）、累加（accumulation）



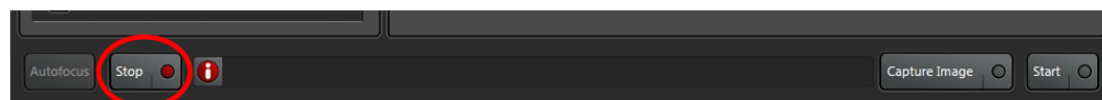
及放大倍数（Zoom）等。（如右图） 分辨率：默认值为 512×512 。也可选择更低或更高分辨率。分辨率越高，所获取的图像文件越大，采图所需时间也越长。扫描速度：默认值为 400Hz。活细胞或运动的样品成像可能需要更快的速度。可选择双向扫描（Bidirectional X）来达到更高速度，这时可能需要进行相位校准（Phase correction）。针孔大小：默认值为 1AU。如果增大针孔直径，可增加信号强度，但是所获取图像的共聚焦效果会降低，光切厚度也会随之增加。平均：用于降低背景噪音。分为线平均（Line average）和面平均（Frame average），可在下拉菜单中选择平均的次数。累加：仅用于荧光非常弱的样品。

3.1.4 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（见第 11 页图）。



图像亮度动态范围可通过调节激光输出功率（见第 12 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，Gain 值的正常范围为 500—1000；

（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。



A, 伪彩模式

B, GlowOU 模式, 图像未优化

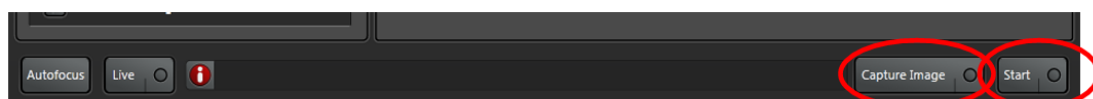
C, GlowOU 模式, 图像已优化

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，应该在每个扫描序列 (Seq) 分别通过预览来调整图像亮度。

3.1.5 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：

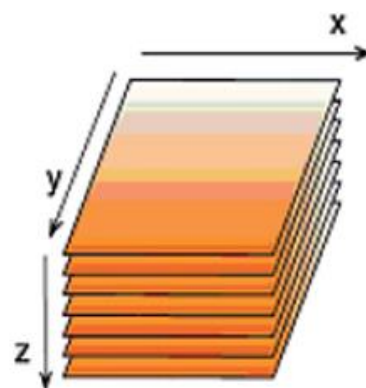
通常情况下，采集图像时，为充分利用物镜的分辨能力，可直接点击“Optimize xy Format”按钮（如下图），由系统自动设置最佳分辨率。



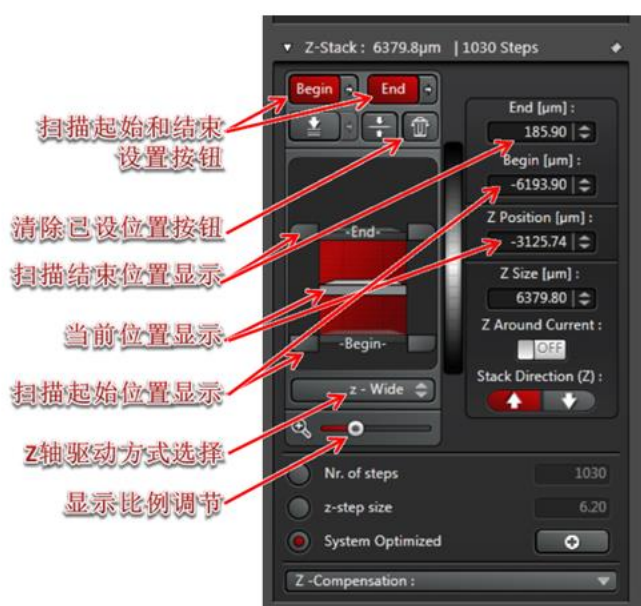
根据 Nyquist 采样原则，像素点大小（Pixel Size）应为物镜侧向分辨率（即 xy 平面分辨率）的 $2/5 \sim 1/2$ 。物镜分辨率可点击物镜参数表按钮从弹出的界面读取，像素点大小可在采图参数设置界面获得。像素点随扫描分辨率增大和放大倍数（zoom）增加而减小。与高倍物镜相比，低倍物镜需要更高的扫描分辨率。

3.2 XYZ 三维扫描（Z-Stack）

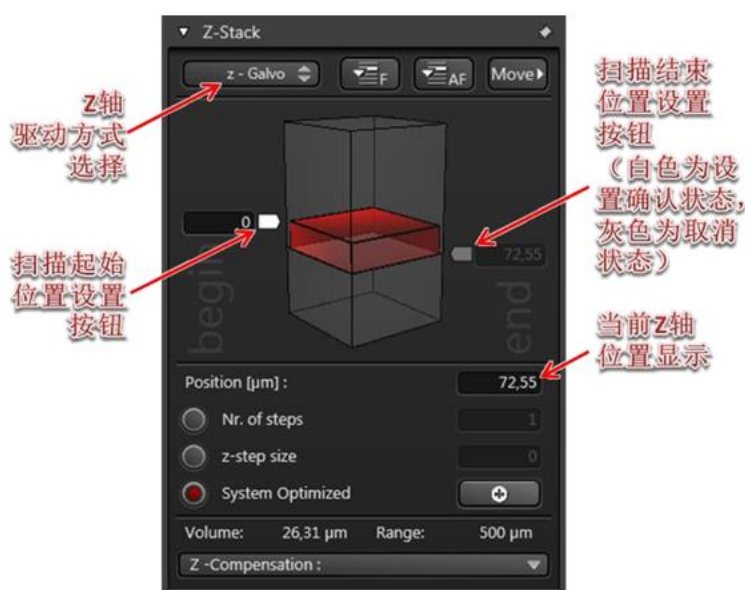
xyz 扫描模式为默认采图模式，加上 Z 轴扫描多个层面，



适合观察样品中目标的空间分布。现有的 LAS AF 软件 3.0 和 3.1 版本 Z-Stack 的设置界面不同（如下图所示），但是基本采图流程类似。



LAS AF 3.1 Z-Stack设置界面



LAS AF 3.0 Z-Stack设置界面

3.2.1 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。

3.2.2 设置光路参数，方法同前。

3.2.3 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。

3.2.4 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。

3.2.5 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，3.1 版本的点击清除已设位置按钮，3.0 版本的分别点击扫描起

始和结束位置设置按钮，使其变为灰色，使 Z 轴位置重新处于未定义状态，以免

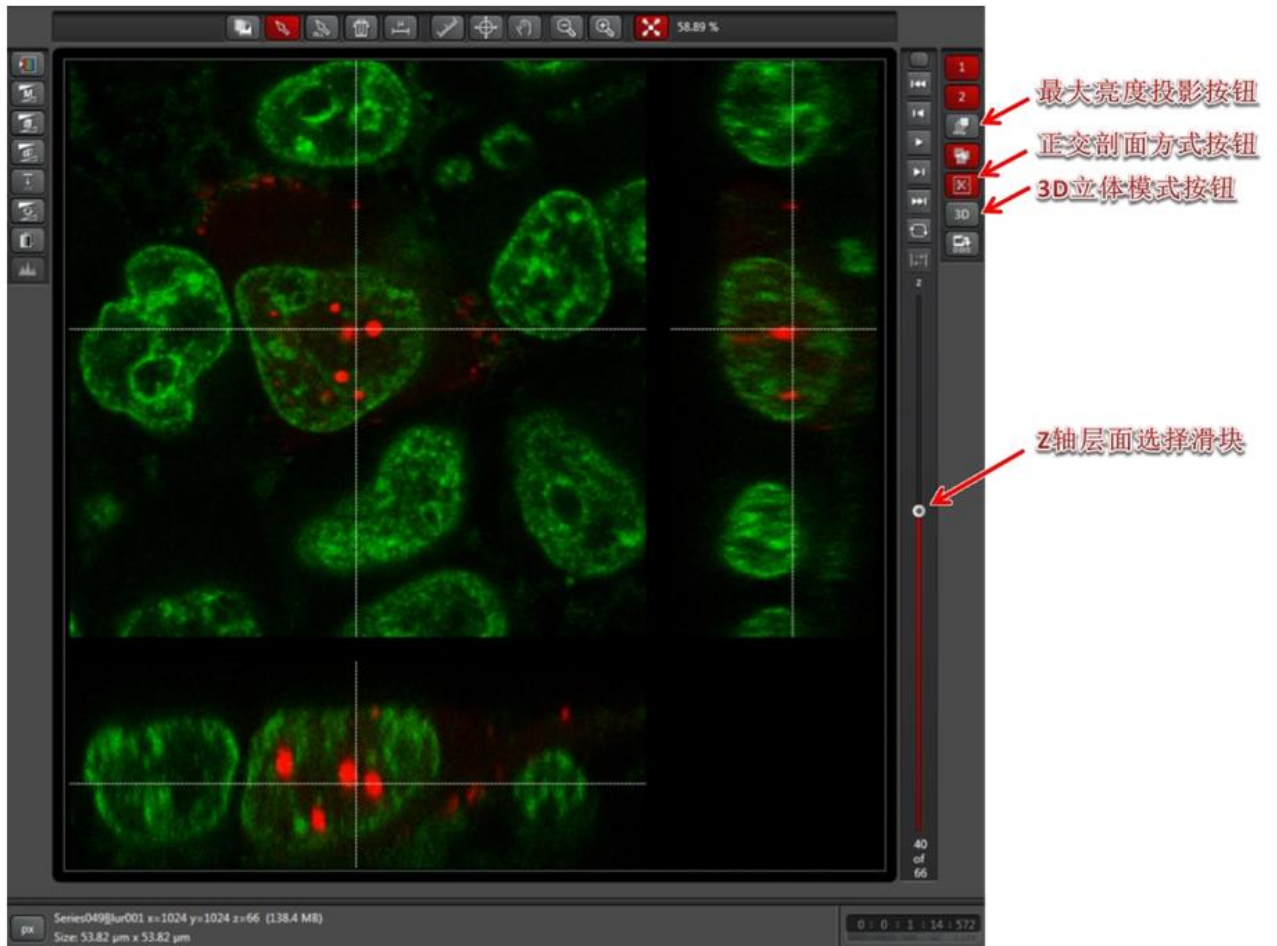
影响下次采图。

3.2.6 3D 展示

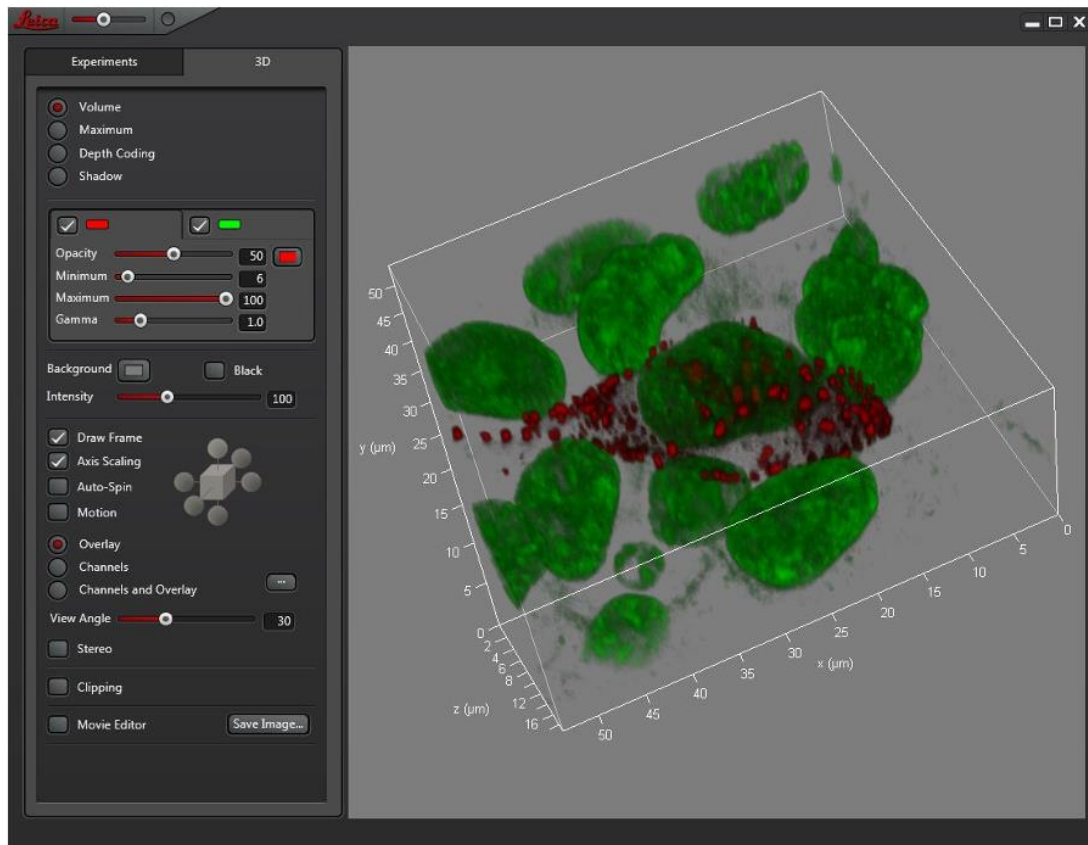
拍摄完 3D 图像之后，在图像显示窗口右侧会多出 3 个用于 3D 图像显示的按钮：最大亮度投影按钮（Maximum projection）：将所有 Z 平面的图像信息选取最亮的点集中显示在一层，相当于将多层图像压成一层，多用于集中显示跨越多个层面的结构信息。正交剖面方式按钮

（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。



3.3 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。

3.3.1 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。

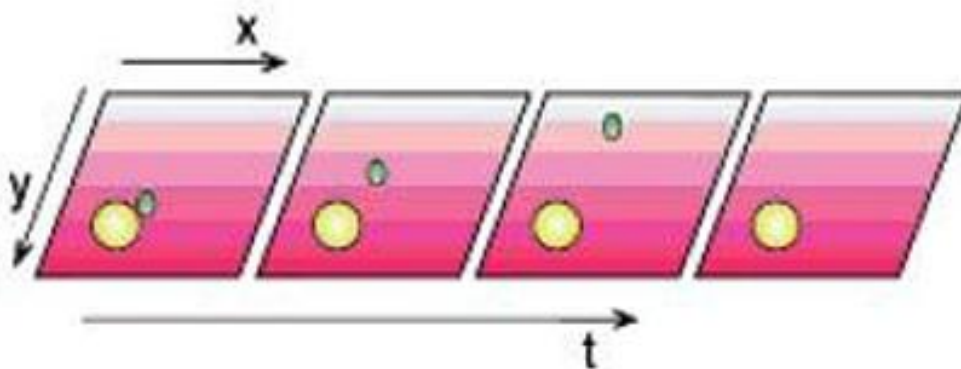
3.3.2 设置光路参数，方法同前。

3.3.3 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”。

3.3.4 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。

3.3.5 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。



Experiments Acquisition

▼ Acquisition Mode ◆

xyt ◆

XY: 512x512 | 333 Hz | 1.00 | 0.69 AU ◆

▼ t: 10 | 00:00:20.270 h | 00:00:02.027 h ◆

Time Interval: 0 : 0 : 2 : 27
HOURS MIN. SEC. 1/1000

Minimize

Acquire Until Stopped

Duration 0 : 0 : 0 : 20 : 270
DAYS HOURS MIN. SEC. 1/1000

Frames 10 ◆

3.4 波长扫描 (xyλ Scan)

波长扫描常用于自发荧光或新染料发射

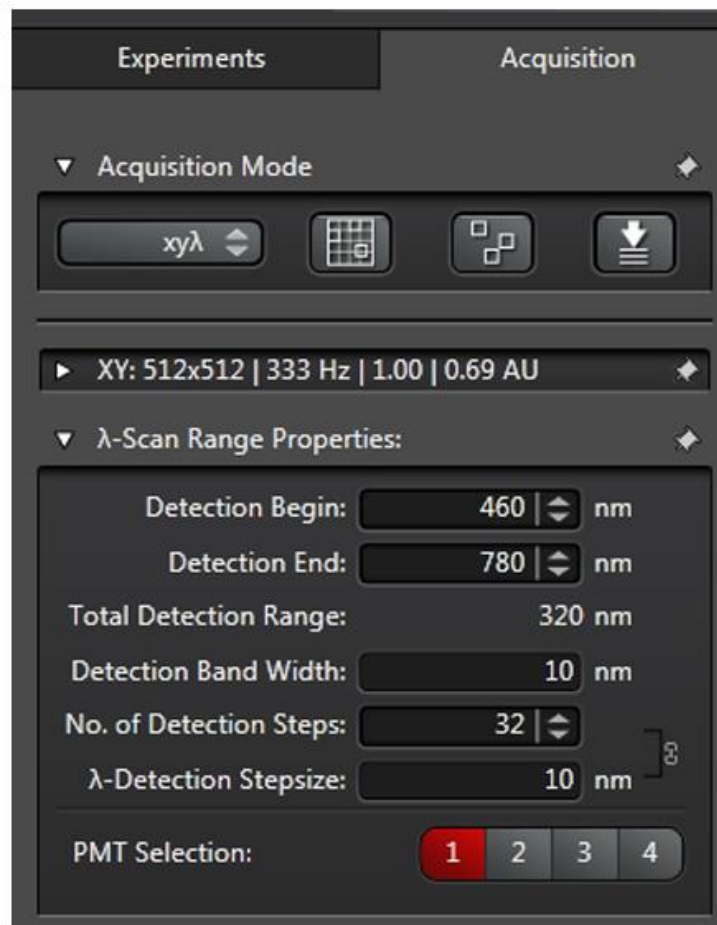
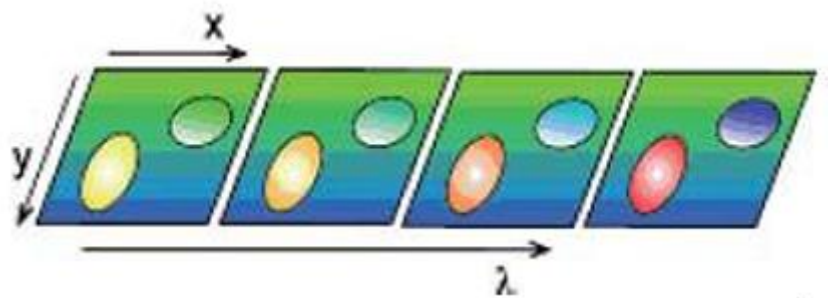
光谱的检测，如果有串色严重的标本需要进行“Spectrum Dye Separation”，必须

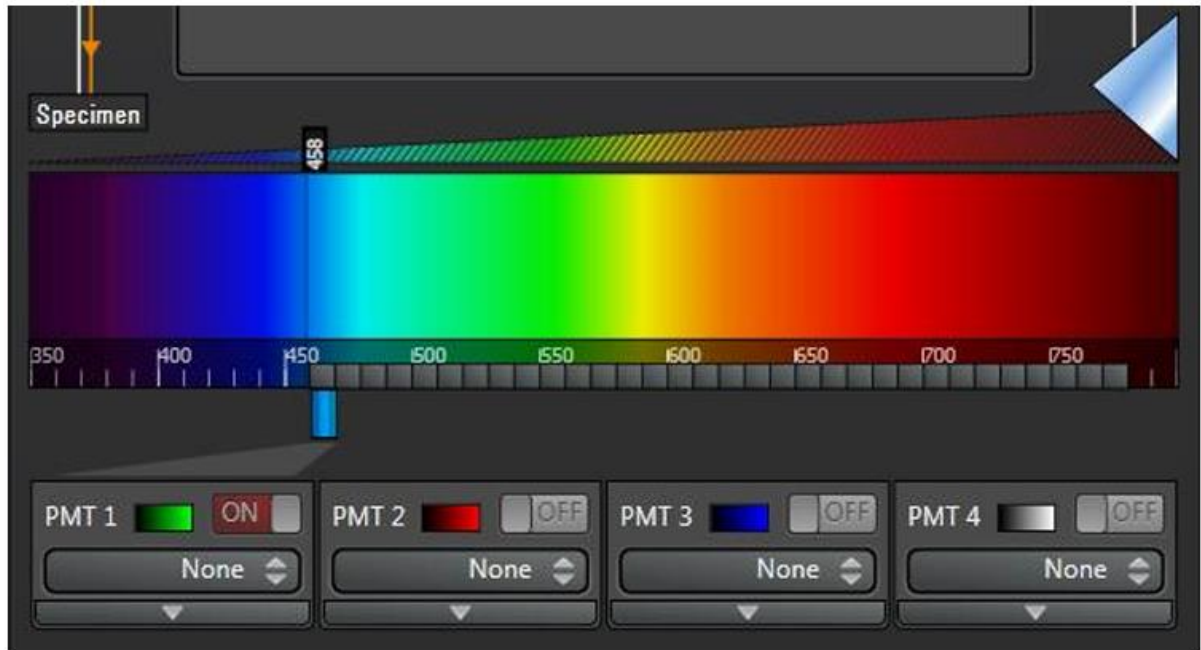
进行波长扫描。

3.4.1 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：





3.4.2 选择合适的激发光和分光镜，分光镜一般选择 RT 15/85。

3.4.3 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。

3.4.4 定义“Detection Band Width”（接收的带宽），通常为 10nm。如果图像较暗，可以增加带宽，但是光谱数据的精度会降低。

3.4.5 定义“**No. of Detection steps**”

（采集的帧数）或“ λ -Detection Stepsize”

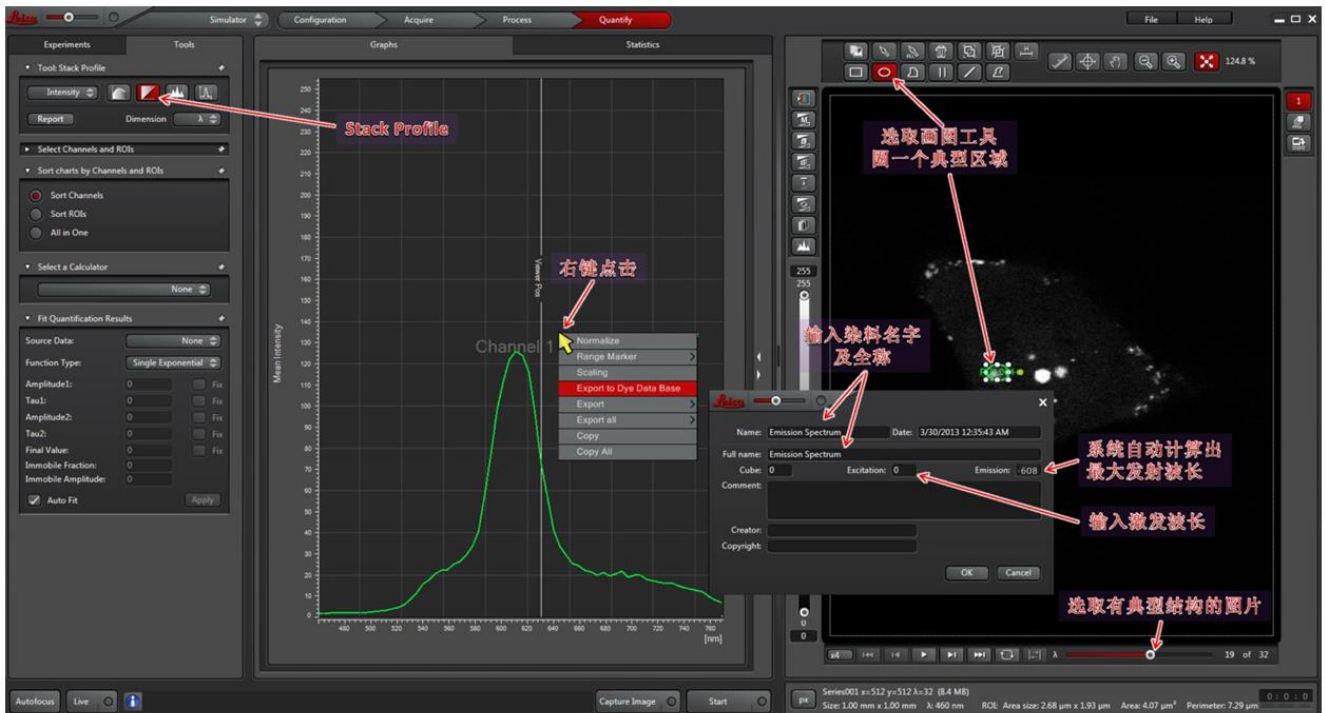
（波长步进）。波长步进不应大于接收带宽。

3.4.6 选择所用 PMT 检测器（或 HyD 检测器）。

3.4.7 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。

3.4.8 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。

3.5 HyD 检测器

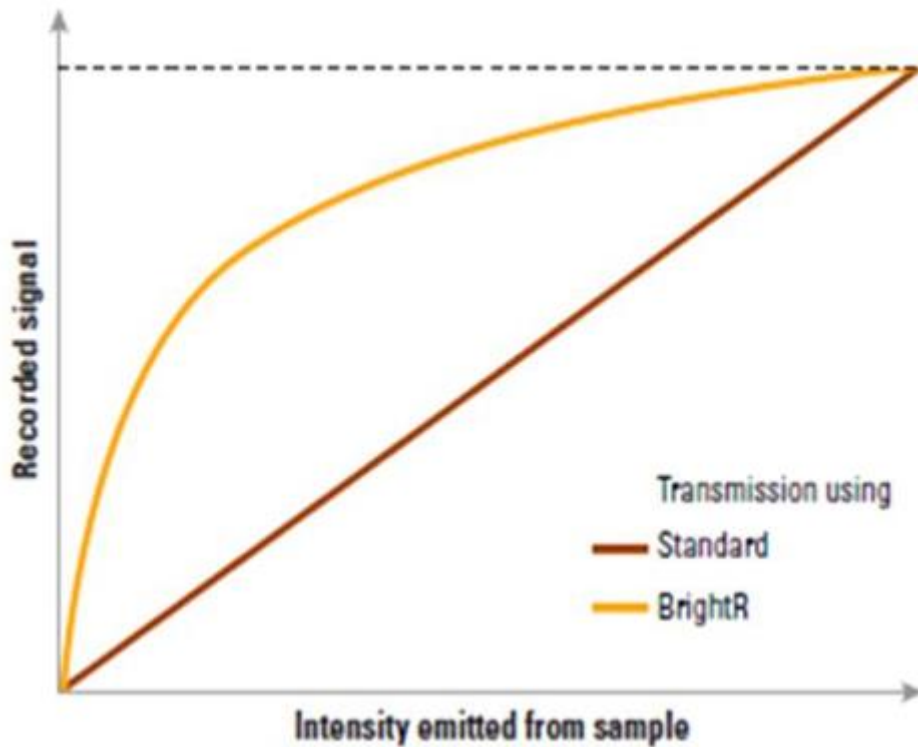
HyD 检测器是高性能的检测器，比 PMT 更灵敏响应速度更快，并且有更多的功能。HyD 检测器有三种操作模式可供选择：

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：





Too high light intensity detected on detector
HyD 3

To prevent damage of the detector, the operating high voltage has been switched off.

Please reduce light intensity and restart the scan process.



OK

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

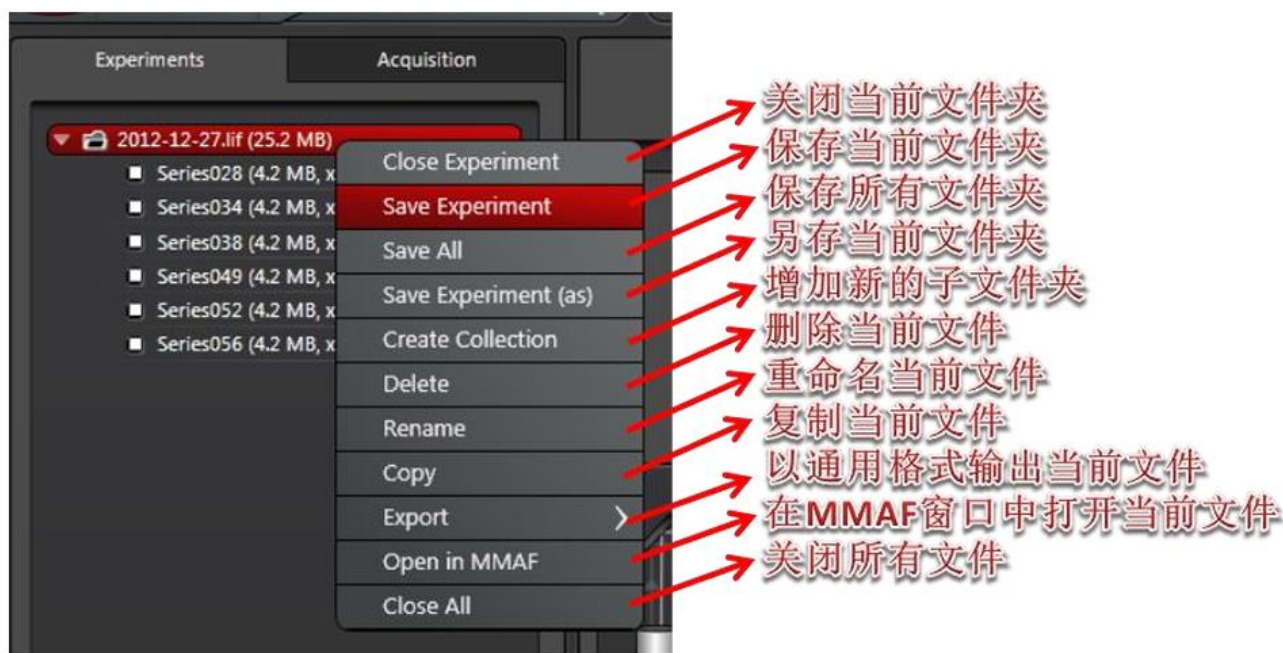
特别注意：

- 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。

3.6 图像文件的保存及输出

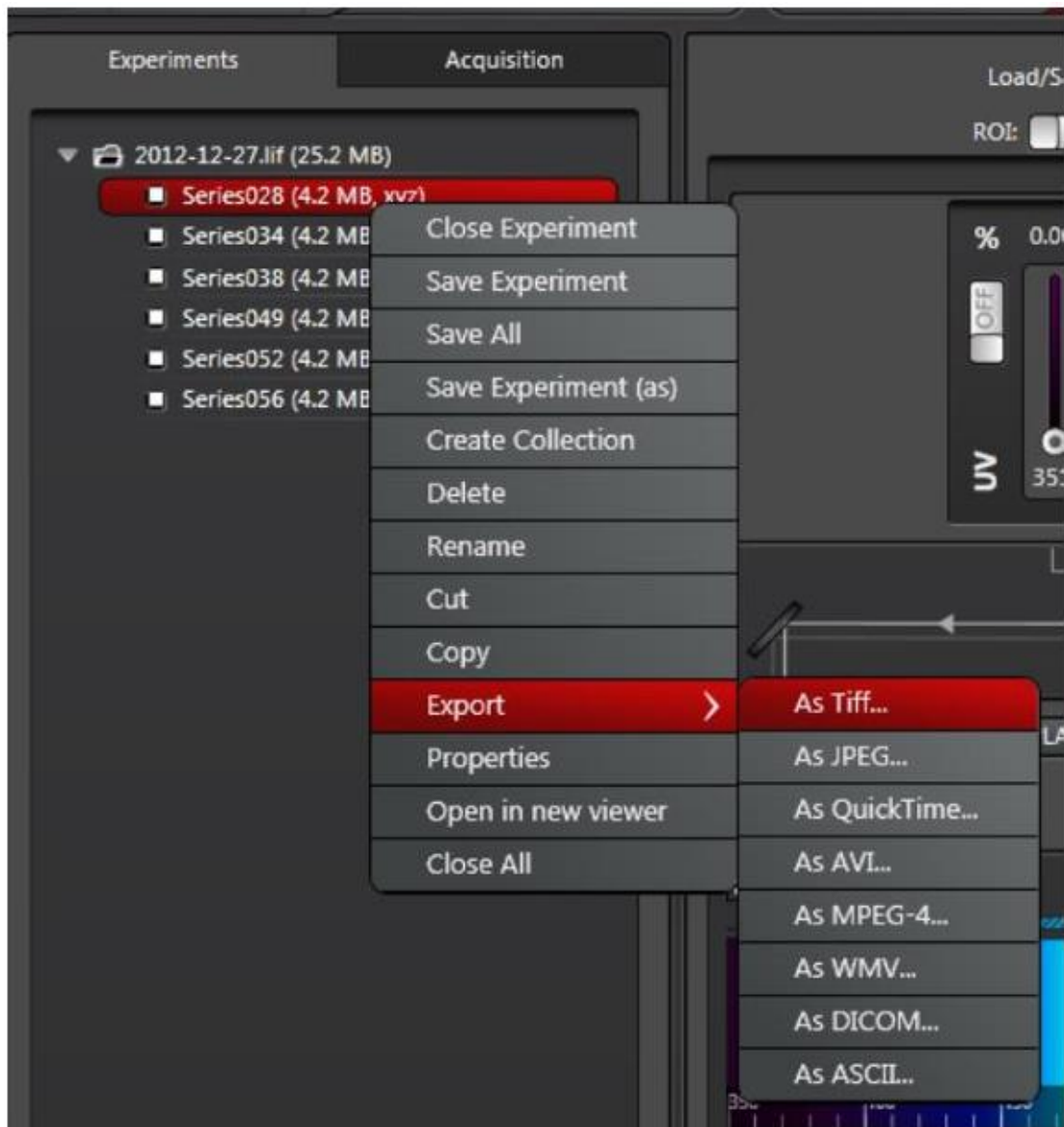
3.6.1 图像文件的操作：

“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。

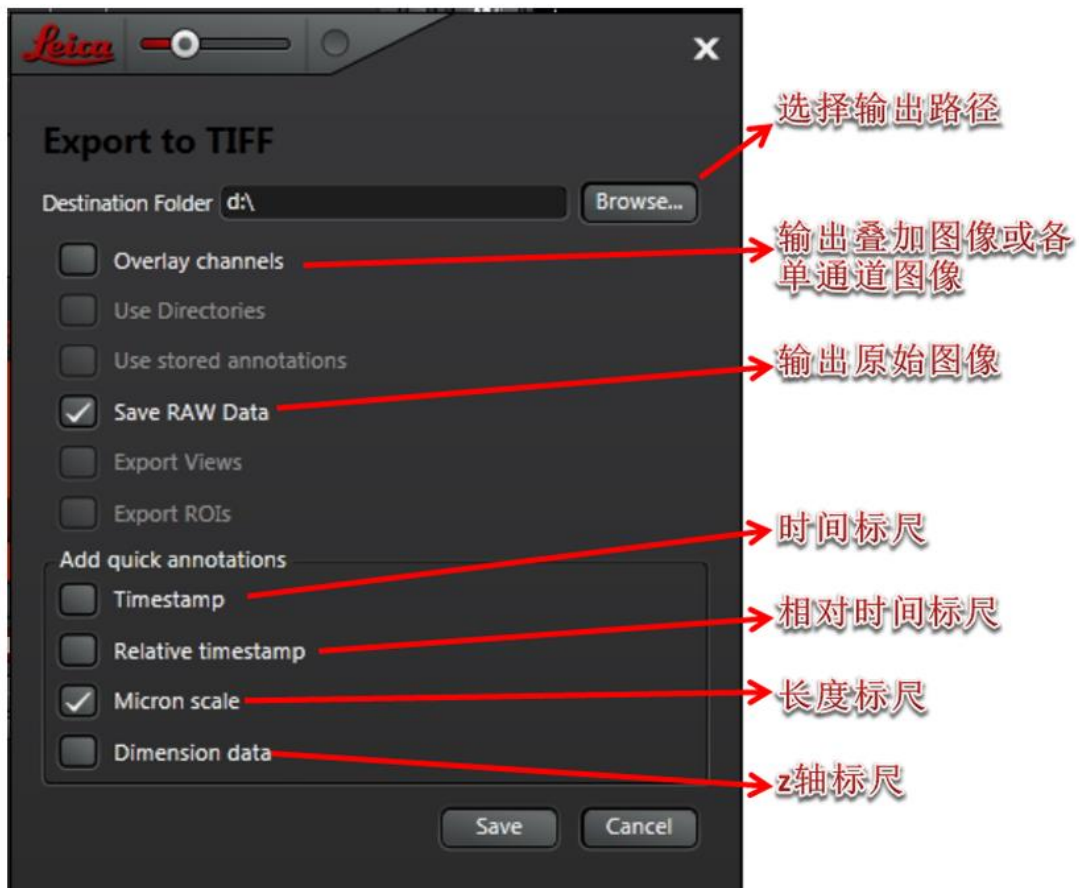


选择“Save Experiment”即可将当前文件夹下的所有图片保存为一个文件，文件保存格式为*.lif 原始文件，只能通过 Leica LAS AF、LAS AF Lite 或其他专业图像数据处理软件打开。

3.6.2 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。

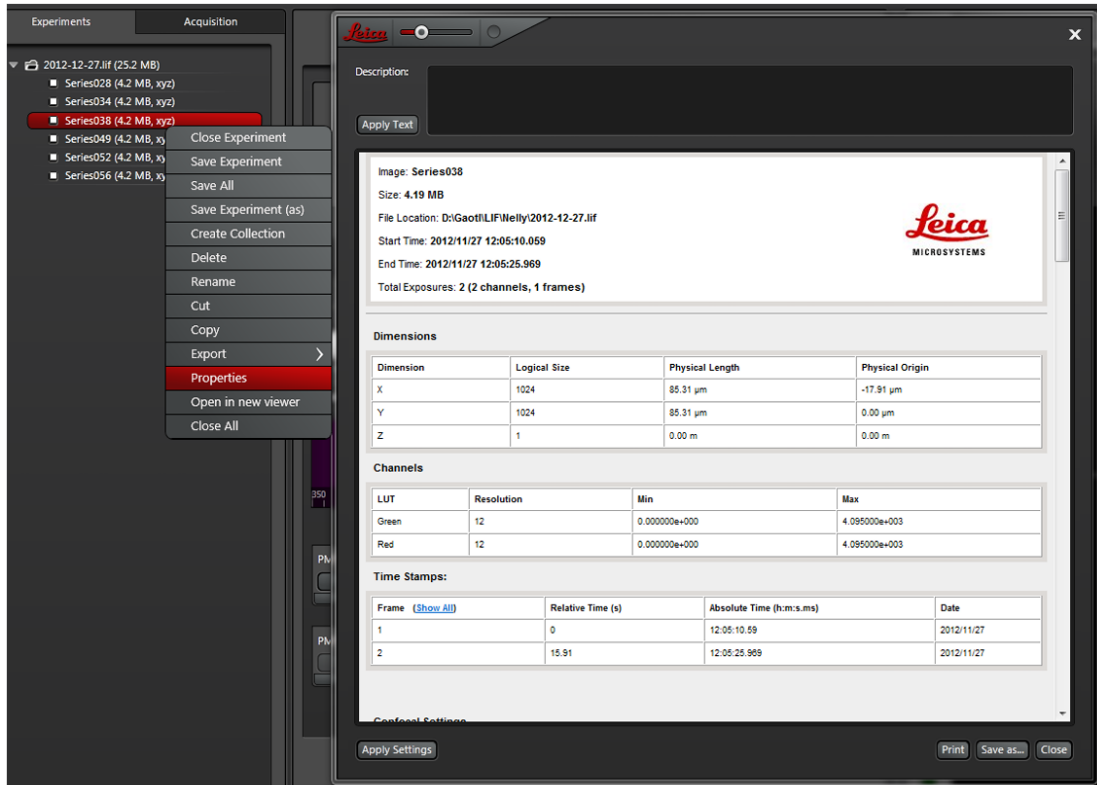


选择” As Tiff” 或” As JPEG”，出现如下图的对话框，可选择输出路径、所需标尺及位置等。确定后，点击” OK”，即可将图像输出至指定路径。



3.6.3 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 8-5。



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。

3.7 关机

- (1) 保存已采集的图像。
- (2) 在 LAS AF 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 AF 软件。
- (6) 将电脑桌右侧 “Laser Power” 按钮右侧的激光开关钥匙

(Laser Emission) 逆时针旋转 90 度至 “On-0” 位置。

(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) 风扇停止后 (关闭激光开关钥匙约 5 分钟后)，关闭 “Laser Power” 按钮。(CSU 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。

四、数据处理

(1) 图像的导出和比例尺的添加参照上述 3.6 图像文件的保存与输出；

(2) 采用光盘拷数据，勿用 u 盘等有病毒风险的存储设备。

五、常见故障处理

以下是 SP8 常见的故障类型、可能原因及用户可进行的初步处理步骤。

(1) 软件与连接故障

故障现象：软件无法启动、无法识别硬件、控制命令无响应。

1、 软件启动报错或卡死

处理步骤：重启计算机，这是解决临时软件冲突的最有效方法。

检查许可证：确认软件许可证 (License) 未过期。

以管理员身份运行：右键点击软件图标，选择“以管理员身份运行”。

2、 硬件未连接或无法识别

处理步骤：检查所有电源和线缆，确保显微镜主机、激光器、扫描器、计算机等所有设备的电源线、数据线（特别是连接到电脑的 USB 或网线）均已插紧。

重启整个系统：执行完整的关机顺序，等待几分钟后，再按开机顺序启动。

检查硬件控制盒：查看机箱后的硬件控制盒指示灯是否正常。

3、 激光与光路故障

故障现象：激光打不开、激光强度不稳定、特定通道无信号。

（1）激光器无法开启或报错

处理步骤：检查钥匙和互锁：确认激光器钥匙开关处于“On”位置，检查所有安全互锁（如显微镜房间门）是否关闭。

查看激光器状态：观察激光器本体上的状态指示灯。红灯或闪烁通常表示错误（如过热、电源故障）。

重启激光器：关闭激光器电源，等待 5-10 分钟让其完全冷却，再重新开启。

注意：激光器有高压，切勿自行维修。

（2）信号微弱或无信号

处理步骤：检查样品和物镜，确认样品有荧光，物镜是否选择正确且干净，浸没介质是否正确。

检查光路设置：透射光路，确认激光是否正确导入到扫描头。

检测光路：在软件中检查“配置”或“检测”设置，确保相应的检测通道已启用，分光镜（Dichroic）和滤光片设置正确。

针孔：确认针孔（Pinhole）是否打开且设置为合适大小（如 1 Airy Unit）。

针孔完全关闭会导致无信号。

调整参数：适当增加激光功率和探测器增益（HV）。但需注意，高功率会加速荧光淬灭。

4、 图像质量故障

故障现象：图像模糊、有噪声、有条纹、不均匀。

（1）图像模糊，分辨率下降

处理步骤：清洁光学元件，特别是物镜的前透镜，用专用的镜头纸和清洁液轻轻擦拭。

盖玻片厚度：确认样品使用的盖玻片为标准厚度（通常为 0.17mm）。不匹配的厚度会引入球差。

重新对齐针孔：这是关键步骤。使用明亮样品，在 Z 轴方向扫描，找到信号最强的位置，确保针孔处于最佳对准状态。

（2）图像有大量噪声（信噪比差）

处理步骤：优化采集参数，增加线或帧平均（Averaging）次数是降低噪声最有效的方法。

调整增益与偏移：在信号不过曝的前提下，适当提高增益（Gain），并设置合适的偏移（Offset）以去除背景噪声。

降低扫描速度：增加像素驻留时间（Pixel Dwell Time）可以收集更多光子，提高信噪比。

（3）图像有条纹或阴影

处理步骤：激光强度不稳定，如果条纹是随机出现的，可能是激光器本身不稳定，需联系工程师。

扫描线不同步：调整扫描速度，避免使用极限速度。尝试使用“线性扫描”模式而非“共振扫描”模式。

灰尘或污渍：如果阴影位置固定，可能是检测器路径上有灰尘。运行软件中的“均匀性校正”（Flat-field correction）功能（如果可用）。

5、机械与硬件故障

故障现象：Z轴移动失灵、焦距漂移、按钮无响应。

（1）焦距漂移（Focus Drift）

处理步骤：热稳定性，确保系统已预热至少 30-60 分钟。环境温度波动是漂移的主因。

样品固定：确保样品和载物台稳固。

软件补偿：在长时间活细胞成像时，使用软件的“自动对焦”功能定期校正。

（2）Z轴电机不工作或发出噪音

处理步骤：检查机械限位，是否已移动到极限位置。

重启系统：有时软件控制错误可通过重启解决。

切勿强行移动：如果电机卡死，立即停止操作并联系工程师。

六、注意事项

1、安全注意事项

(1) 激光安全：绝对禁止直视激光路径：即使激光不可见（如红外激光），其强度也足以对视网膜造成永久性损伤。

佩戴防护眼镜：了解所用激光的波长，并佩戴相应波长的激光防护眼镜。

注意漫反射光：高功率激光照射到样品表面会产生漫反射，同样有风险。确保光路外壳紧闭。

(2) 电气与化学安全：规范操作：避免在设备周围洒水，手部潮湿时勿操作控制器。

小心有毒试剂：许多荧光染料有毒性。操作样品时戴手套，并在通风橱中配制染料溶液。

2、样品制备注意事项

(1) 盖玻片厚度：必须使用标准厚度（通常为 0.17mm）的盖玻片。Leica 的高数值孔径（NA）物镜是针对此厚度校正的。使用不匹配的盖玻片会引入严重的球差， **drastically** 降低图像质量和分辨率。

(2) 样品厚度与平整度：样品不宜过厚，且表面应平整，以确保在整个扫描区域内都能保持聚焦。

3、设备操作注意事项

(1) 开机顺序！参考标准操作流程 3.1

(2) 物镜的保护：先看后动！移动样品台时，始终从侧面观察物镜

与样品的距离，绝对避免物镜撞到样品或载玻片。

正确使用浸没液：油镜：使用专用浸油。使用后，务必用专用镜头纸从侧向轻轻擦拭油镜上的残油。切勿让浸油干燥在物镜上。

水镜/甘油镜：使用正确介质，防止结晶。

清洁：每次使用前后都检查物镜是否清洁。使用专用的镜头纸和镜头清洁液（或乙醇乙醚混合液）轻轻擦拭。

（3）激光器保护

预热与散热：开启激光器后，让其预热 15-30 分钟，使输出功率稳定。

关闭激光器后，不要立即关闭总电源，确保其散热风扇工作完毕。

避免频繁开关：在短时间内避免反复开关激光器。

4、图像采集注意事项

（1）参数优先性原则

先低倍后高倍：先用低倍物镜找到视野，再切换到高倍物镜。

低功率优先：从最低激光功率开始，逐步增加至获得足够信噪比，以最大限度减少光毒性和光漂白。

增益设置：优先调整激光功率，其次再调高探测器增益（HV）。过高的增益会引入噪声。

（2）防止焦点漂移

热平衡：将样品放在载物台上后，等待 10-15 分钟，让系统热平衡，再进行长时间或 Z-栈扫描。

（3）数据管理

定期备份：实验数据庞大，需定期备份到其他存储设备或服务器。

规范命名:对图像文件进行清晰、规范的命名,便于日后查找和分析。

七、维护与保养

(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 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。