

Leica 激光共聚焦显微镜 STELLARIS 简要操作

2025

Leica STELLARIS 系统组成

- ①共聚焦主控制箱
- ②共聚焦扫描头
- ③全自动倒置荧光显微镜
- ④显微镜控制箱
- ⑤荧光光源
- ⑥工作站
- ⑦控制面板
- ⑧SmartMove (XYZ调节)
- ⑨冷却装置



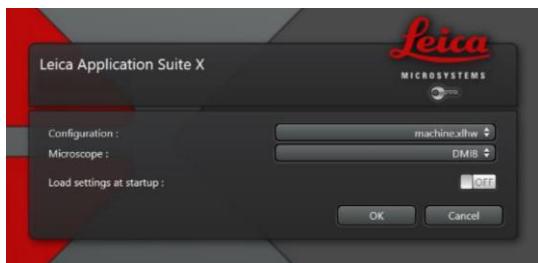
一、开机

开机顺序：打开电脑和共聚焦主控制箱①“POWER”按钮、
(之后稍等一会儿，等显微镜和电脑开好) → 共聚焦主控
制箱“LASER”按钮→将“Emission”上的激光开关钥匙旋至
“ON”。



二、启动徕卡 LAS X，开始共聚焦实验

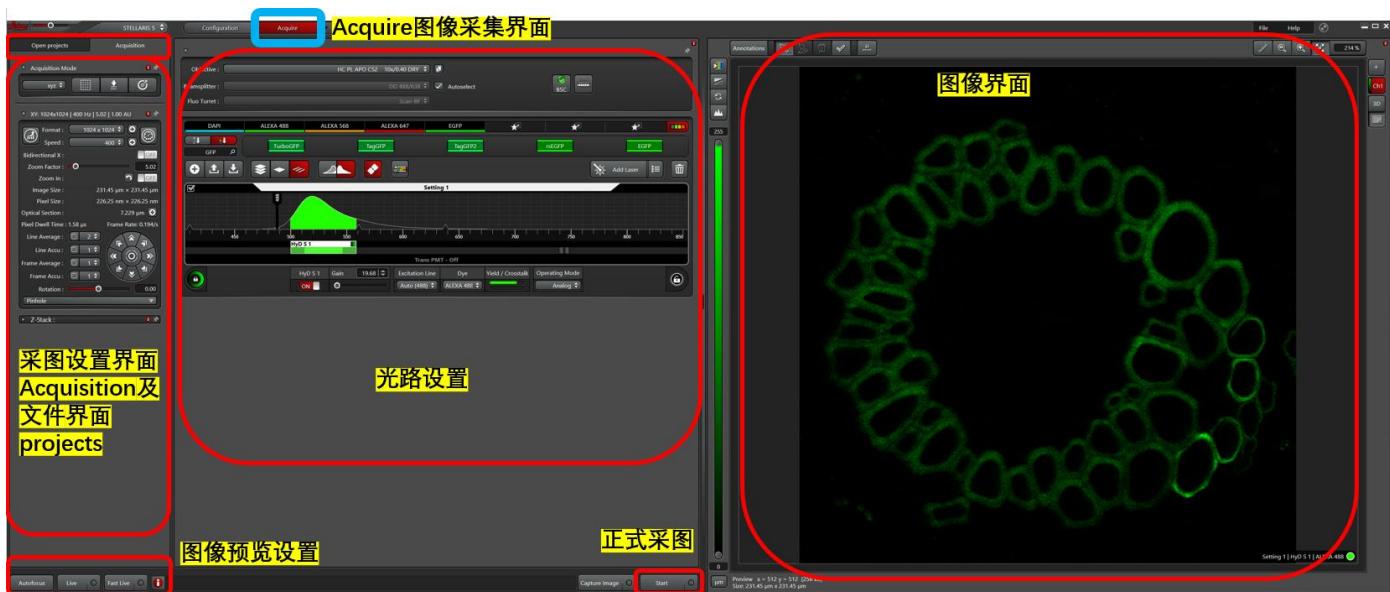
双击电脑桌面上 LAS X 图标启动 LAS X。



徕卡 LAS X 系统开始运行。

Configuration 选择 machine, Microscope 选择 DMI8 点击 OK。

系统初始化完成进入 LAS X 界面。默认 Acquire 界面，即共聚焦采图界面。



在 Acquire 界面选择 中的 即打开激光器开关控制界面 laser overview，根据样品标记情况将需要的激光谱线打到 on。

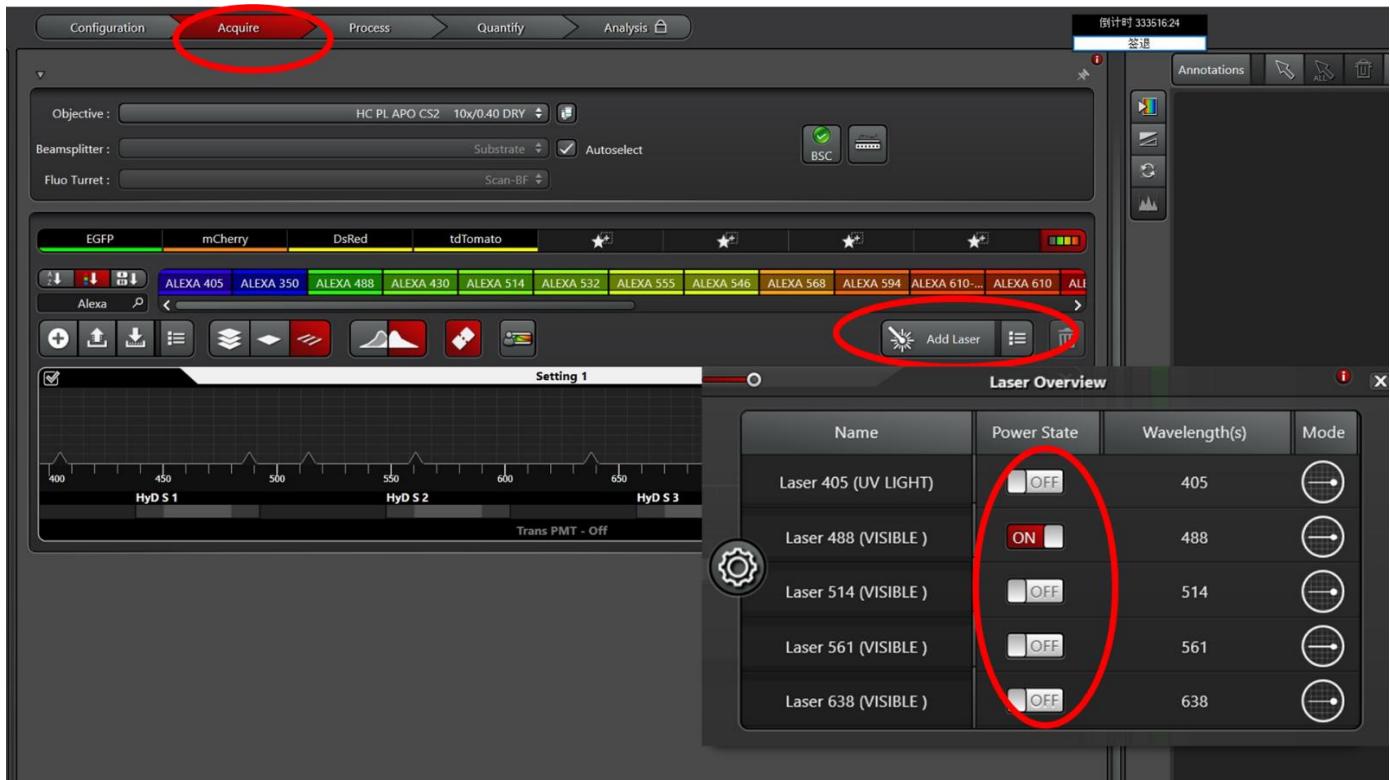
405nm 一般用来激发 DAPI 等细胞核染料。

488 一般用来激发 GFP、Alexa488 等绿色荧光蛋白和荧光染料。

514 一般用来激发 YFP、Alexa514 等黄色荧光蛋白和荧光染料。

561 一般用来激发 DsRed、Alexa555、Alexa568 等红色荧光蛋白和荧光染料。

638 一般用来激发 Alexa633、Alexa647、Cy5 等近红色荧光染料和荧光蛋白。



1、显微镜目镜下找好视野并调好焦距

将样品（盖玻片朝下）放在样片夹上，取放样品时推放显微镜立柱

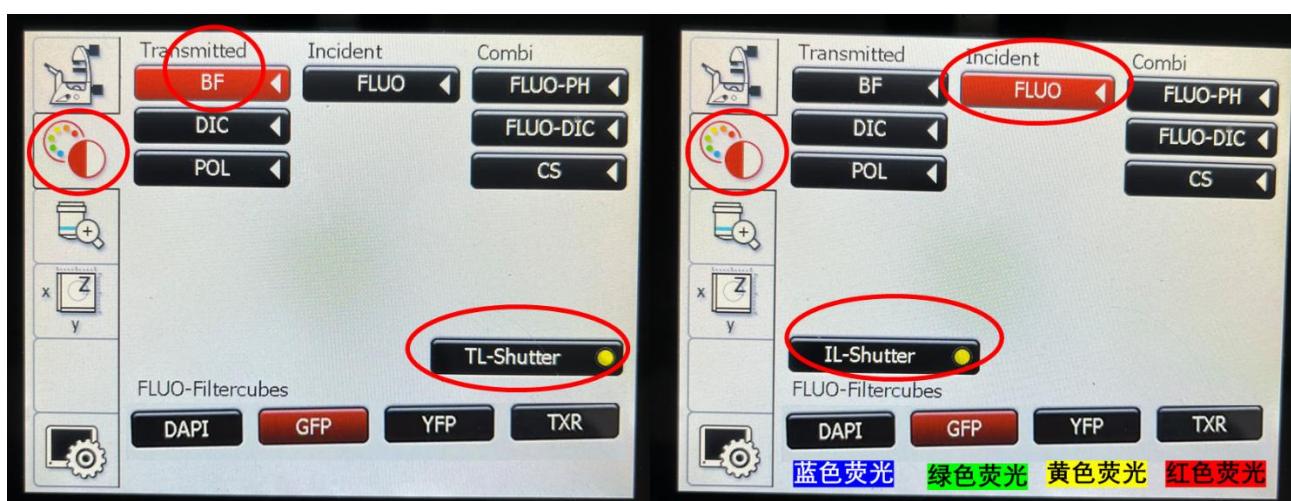
红圈圈出部位。

建议先用低倍物镜找到视野及焦距。



在显微镜触摸屏上点击 切换为明场 BF 或者荧光模式 FLUO

(选择对应滤色块，如 GFP 等) 寻找样品：



荧光模式对应的荧光挡板 **IL-Shutter**, 及明场对应的挡板 **TL-Shutter** 只有点亮才会出光。

光强的调节可以在触摸屏的显微镜图标  下通过 FIM (荧光) 或者 intensity (明场) 的+-号图标, 或者 **显微镜左侧小黑旋钮控制**, 荧光建议从 10%开始根据样品亮度慢慢调高以便于保护样品。

(显微镜图标下最下面一排平时不动)



物镜的切换可以在显微镜触摸屏也可以在软件进行。

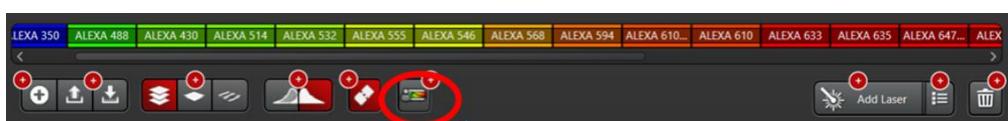
在干镜、油镜间进行切换时一定要先把玻片和物镜上的油擦净, 之后再切换。油镜使用配套镜油。

使用完后, 油镜用擦镜纸擦去油再用擦镜纸沾湿无水乙醇清洁。



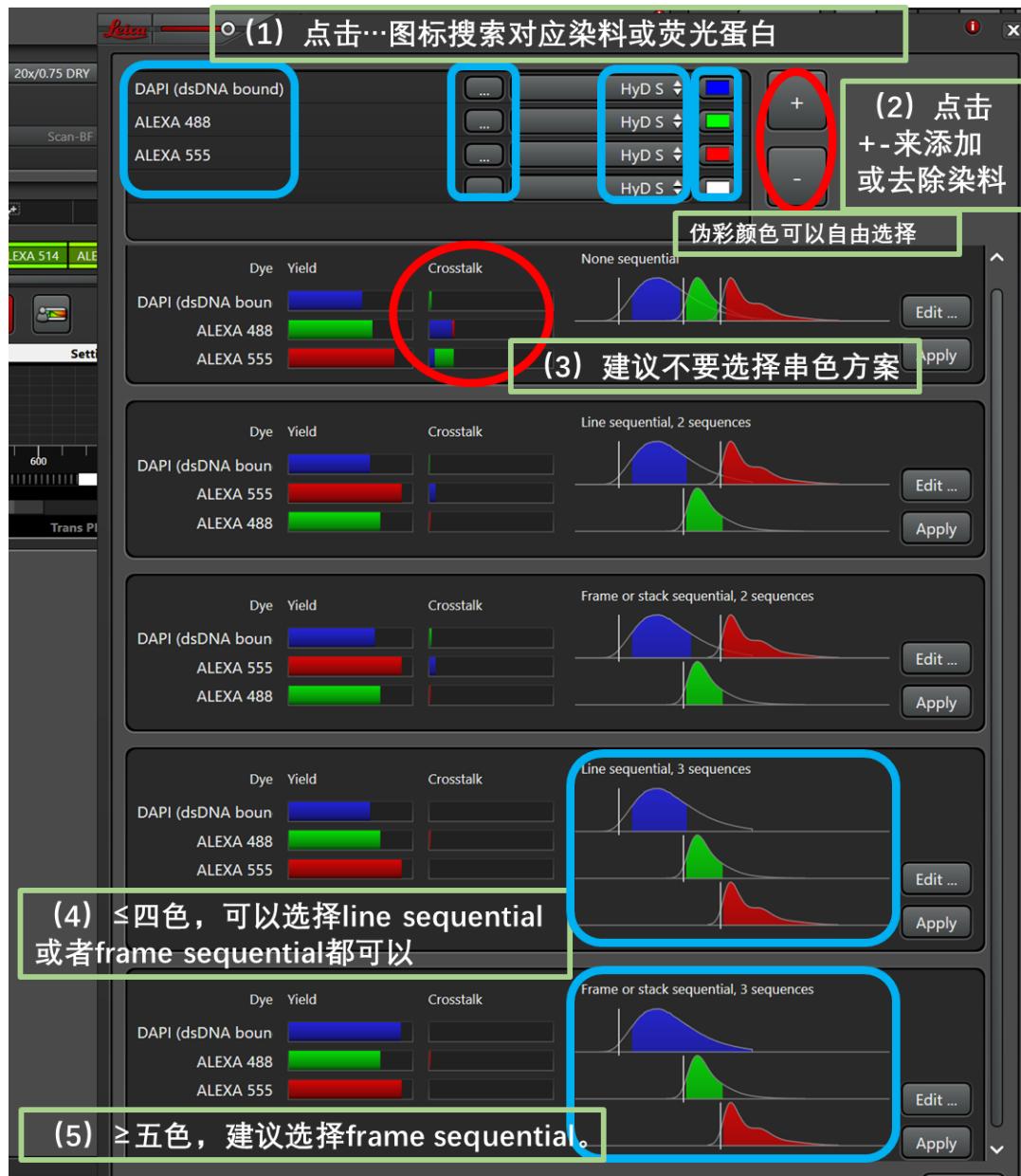
2、共聚焦图像光路设置

光路设置:

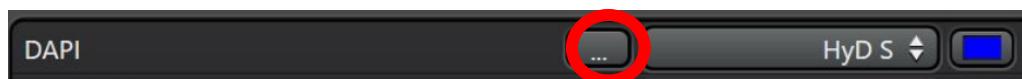


使用 Dye assistant  进行多色成像设置, 进入对应对话框, 选择所用染料, 通过+增加染料。下方则会出现各种采图方案, 需要哪种方案就点击对应的 apply。

≤4 色时选择 line sequential 或者 frame sequential 方案。≥5 色时选择 frame sequential 方案。如下图所示：



(1) 点击...图标搜索所用染料或者荧光蛋白。



(2) 依次添加新的染料或者荧光蛋白。

(3) 选择没有串色 crosstalk 的模板。Line sequential 预览时多色同时出来。frame or stack sequential 模板预览时，只显示选中通道，start 之后多色依次自动拍。

点击 apply。稍等几秒光路会自动预设好。可以使用预设好的，也可以根据实际样品微调一下。

注意：

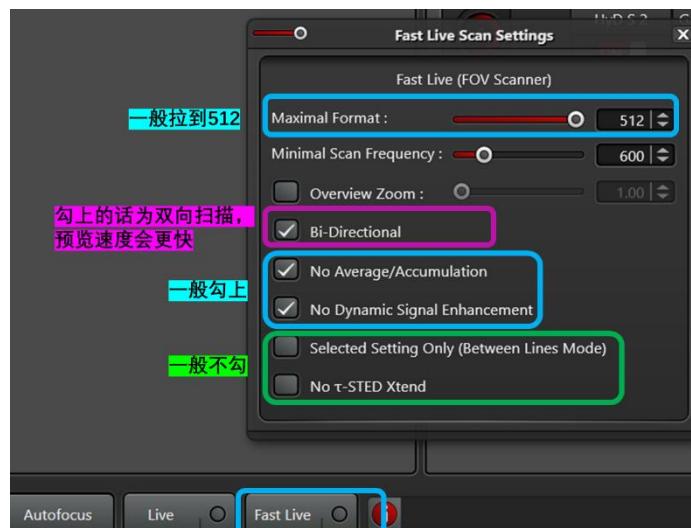
1、预设好光路后微调一下检测范围，一般建议离激发光 10nm 开始接收（模板默认是离激发光 5nm），如 488 激发，则从 498 开始，接收结束位置也可以稍缩短一点，收到主峰就可以了，没必要收尾巴。

2、HyD S 检测器默认采图模式 operating mode 为 analog，gain 设为 50。当 operating mode 选择 counting 模式时则 gain 不可调。（有些版本软件采图模式默认为 counting，可以改为 analog 模式）

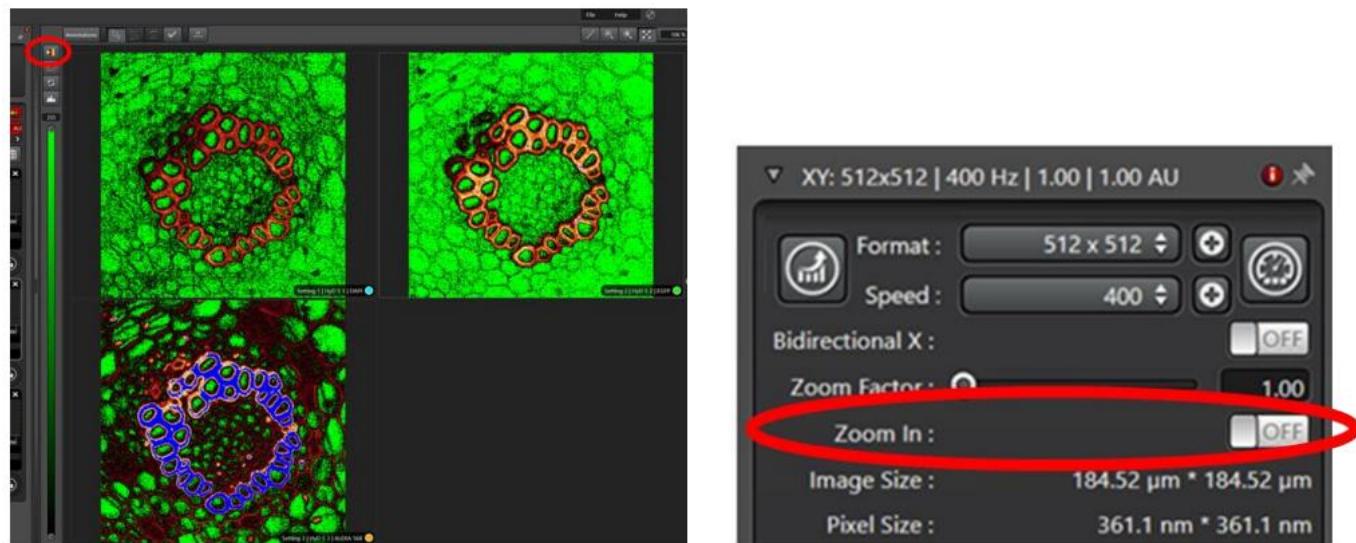


3、预览、调节参数及拍摄

快速预览设置。点击软件界面左下角 fast live 按钮右侧的圆点  可进入“Fast live”的参数设置界面。



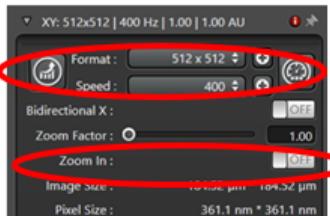
1) 优化参数。点击 **fast live**, 进一步聚焦、调节视野, 通过调节 Control panel 中的 Smart Gain (检测器增益, 尽量控制在 50 左右, 范围建议 20~100), Smart Intensity (激光功率, 尽量不超过 20%) 等设置参数。尽量不要过曝。点击图像左上角  显示蓝色即为过曝, 背景显示为绿色。如下图第三张为严重过曝, 建议降低对应激发光的 intensity。第二张有一点过曝, 若不做定量分析也可接受, 此时可以降低对应激发光的 intensity 或者 HyD S 的 gain 使图像不再过曝。可以通过 zoom in 选定需要拍摄的区域, 鼠标把 zoom in 点成 on, 之后鼠标会变成+, 在图中圈出需要区域, 单击鼠标确定即可。或者在 zoom factor 中输入放大倍数, 或者使用控制面板的 zoom。



控制面板依次为：1、检测器 gain (建议设为 50), 2、激发光强度 (平时建议不要超过 20%), 3、Rotation (旋转, -100~+100 度), 4、pinhole (共聚焦基本保持 1AU 不动), 5、zoom, 6、z position 调焦



2) 正式采图设置。



此处设置正式采图格式，一般 1024×1024 或者 2048×2048 ，speed为400或者200。

Zoom in为放大，点成on之后用鼠标圈出想要区域。



average 为平均，目的为提高图像信噪比，一般建议使用 line average, 2~3 次即可。

accumulation 为累加，荧光信号太弱时可以使用，通过多次累加让图像更亮，一般建议使用 line accu，视样品情况 2~4 次即可。

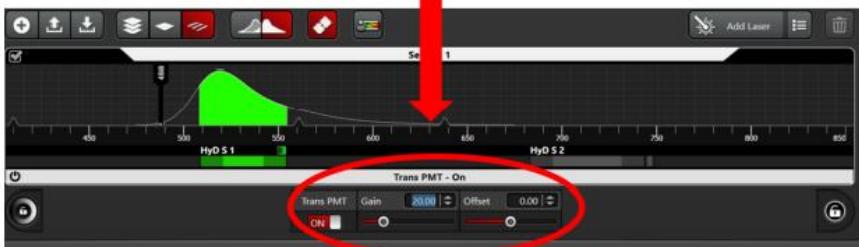
方向盘为 zoom 放大时微调位置。

点击软件中部下方 capture image 或者 Start，进行图像拍摄。Capture image 为拍摄当前时刻当前焦平面的图像，若是拍摄 3D 数据、动态数据、拼图等等全部点击 start 拍摄。也可以全部直接点

击 start 拍摄。



4、明场采图设置

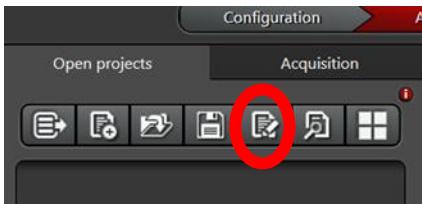


在进行绿色、红色荧光等采图时如果需要明场 BF，可以在其中任一可见光通道增加明场。点击 Trans PMT-off，出来明场检测器对话框，点击 on，gain 一般预设为 20-30，fast live 后根据图像亮度再微调。若只需要明场，那可以把对应的荧光检测器 HyD S 关了

5、数据保存

实验做完后，保存需要的图像。选中需要保存的 project 右键 save as，格式为 leica image file，

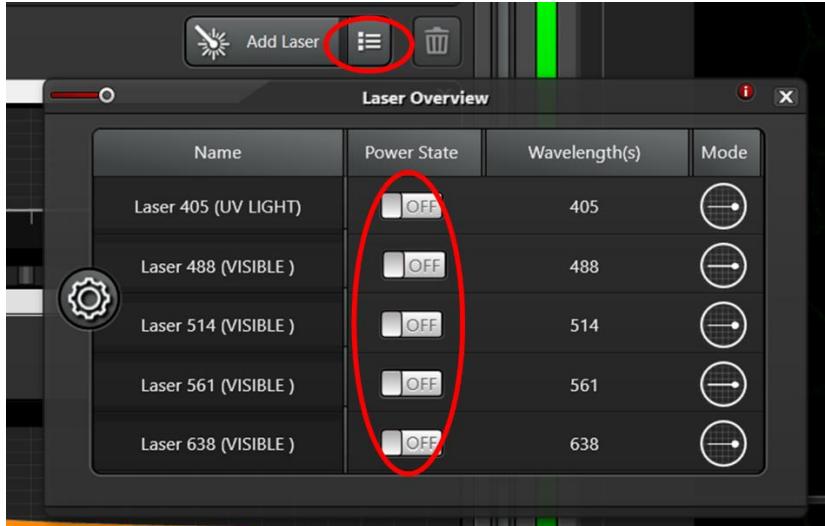
保存好后文件后缀为 lif, 该文件包含所有采图信息。之后可以 open 该文件夹选中对应图像点击 apply 图标应用该图像的光路设置。



徕卡离线版软件可以打开该文件进行导图及定量分析。

6、关机顺序

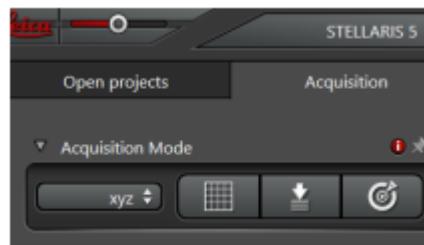
- 1) 保存好数据之后，在 Acquire 界面选择 ，打开激光器开关控制界面 laser overview，将所有激光谱线打到 off。



- 2) 关软件。
- 3) 采集好的数据使用光盘刻录，以免电脑中毒。
- 4) 如果使用过油镜需要用无水乙醇和擦镜纸来清洁。
- 5) 在显微镜触摸屏上将物镜切换到最低倍物镜，通过调焦旋钮将物镜转到最低。
- 6) 依次将“Emission”上的激光开关钥匙旋至“off”，关闭“LASER”按钮，“POWER”按钮。
- 7) 关电脑 shut down。

◆ 三维图像 z-stack 的获取

设置好光路、找好视野和焦距之后，如需做三维图像，使用默认的 xyz 模式。在界面左侧下方有 z-stack。



- 点击 **fast Live**，进行图像预览
 - 通过调节调焦旋钮找到所需的层切起始和结束位置。
预览图像会随着 z 位置变化而变化。
 - 调节 z 轴至层切起点，点击 **Begin** 按钮设置好起始位置
 - 再调节 z 轴至层切终点，点击 **End** 按钮设置好结束位置。
- 下面三选一
- **Nr. of steps** 可以输入层数
 - **z-step size** 可以输入每层步距（单位为 μm ）
 - **System Optimized**（系统推荐值，建议参考该值）

设置好后，点击 **Start** 开始图像采集。

◆ 时间序列采图

在 "Acquisition" 中选择 xyt 扫描模式后，将出现 xyt 扫描菜单，可进行时间序列图像采集的设置。



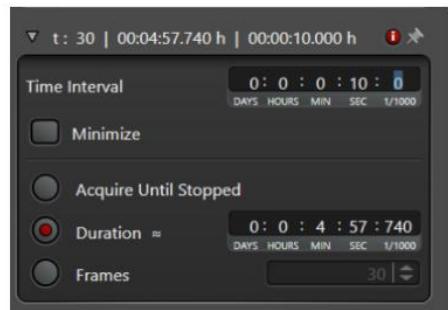
Time Interval (采集相邻两帧图像的时间间隔) 可以在输入框中定义 (定义的时间间隔大于 Minimize 值)。

如果 Minimize 被激活了, 则图像采集时会按照最短时间间隔来执行。

选择 Acquire until Stopped 则实验没有明确的结束时间, 图像将持续采集直至点击 stop 来终止。

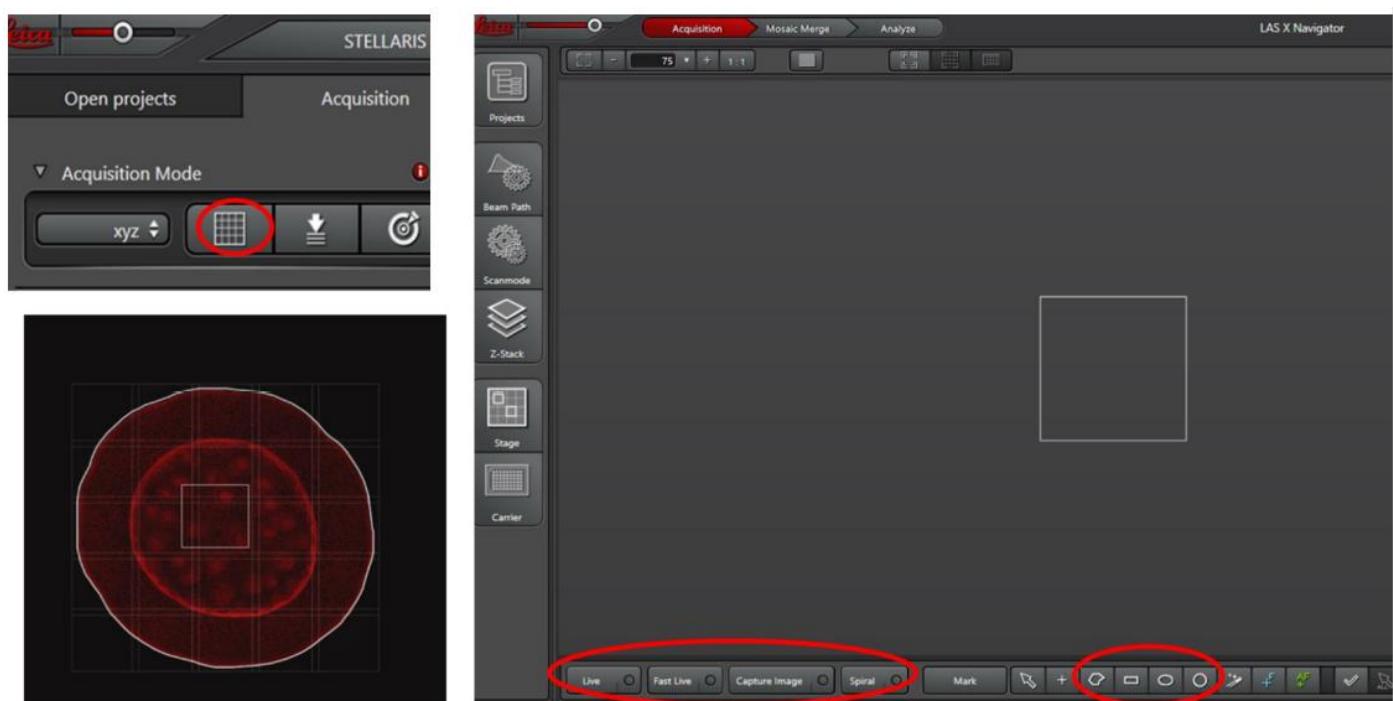
选择 Duration, 可定义采图总时间, 最常用。

选择 frames 则可定义所需的图像采集帧数

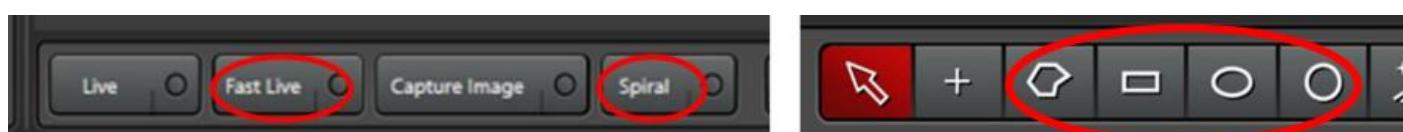


◆ 视野拼图 LAS X Navigator

设置好各通道条件, 点击拼图图标 , 进入 Navigator 界面。一般拼图实验建议先用低倍物镜进行预扫快速确定拼图范围。



点击左下角 fast live 进行预览, 可以在目镜下移到样品较中间位置, 之后点击 spiral 进行螺旋预拼图, 螺旋出需要的视野后点击 stop。之后使用不规则形状、矩形、椭圆、圆形及魔术棒等工具圈出正式需要拼图的区域。如果需要更高放大倍数, 可以换成更高倍数物镜, 如 20 倍干镜。切换物镜后需要 fast live 微调好焦距。



软件界面左侧上方 preview 为预览的数据，下方 task list 为任务栏，需要正式拼图的 task 前打上勾即可。设置好后，点击 Start 图标开始图像采集。采图完成后 project 里面，tilescan 后缀为 xys 的即为原始未拼接数据。带 merged 为拼图数据



◆ LIGHTNING 超高分辨率成像

在“Acquire”界面下，在左上角处点击“STELLARIS”，在下拉菜单中选择 LIGHTNING，进入 LIGHTNING 界面：



- 1) A 框中，如想获得高分辨率图像，则向右拖动；如想以更快的速度采集，则向左拖动。
- 2) B 框中，在 Mounting medium 处选择样品的封片剂。
- 3) 设置光路参数，方法同前。
- 4) 点击 **Start experiment** 进行图像采