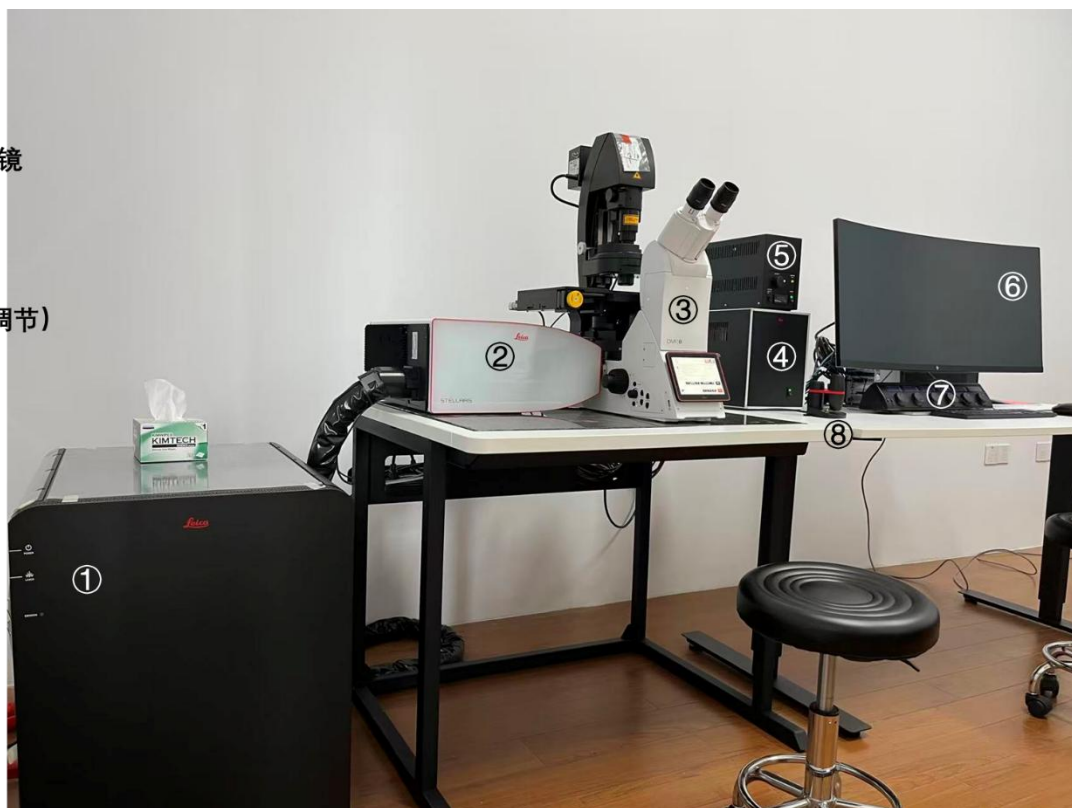


# Leica 激光共聚焦显微镜 STELLARIS 简要操作

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



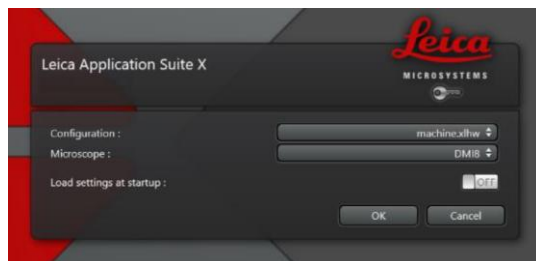
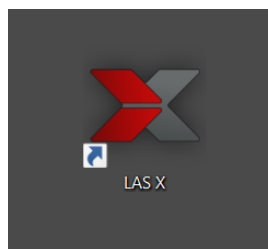
## 一、开机

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

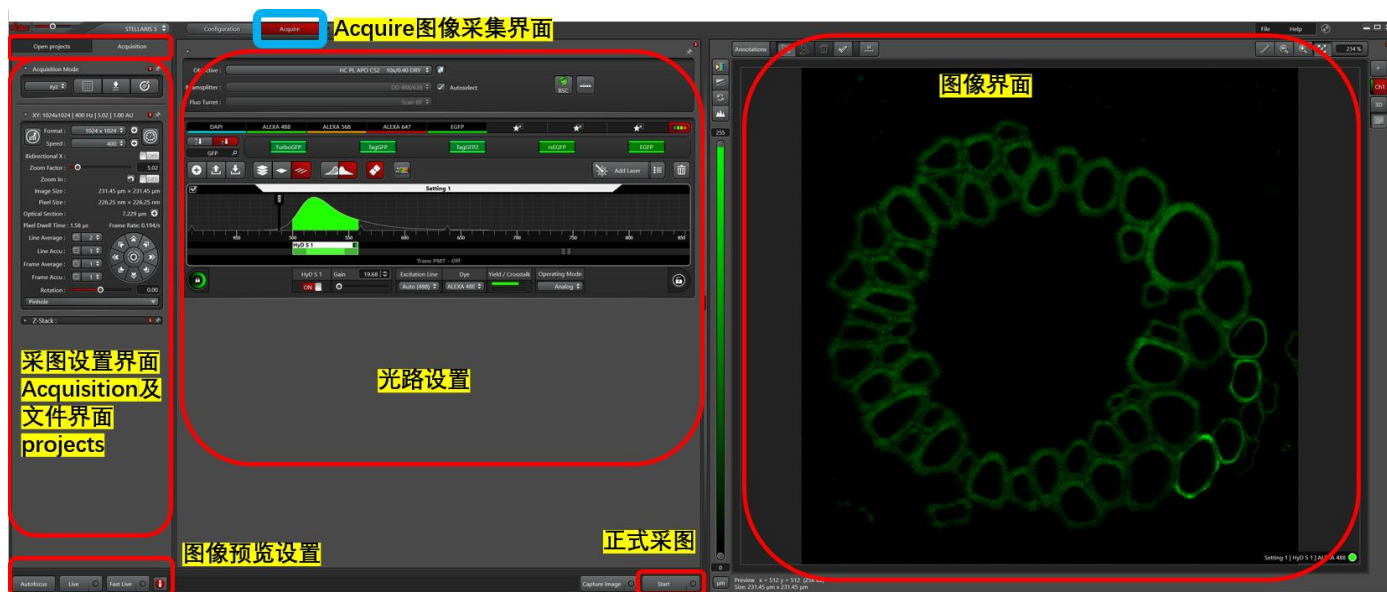
双击电脑桌面上 LAS X 图标启动 LAS X。

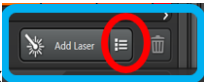



徕卡 LAS X 系统开始运行。

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。

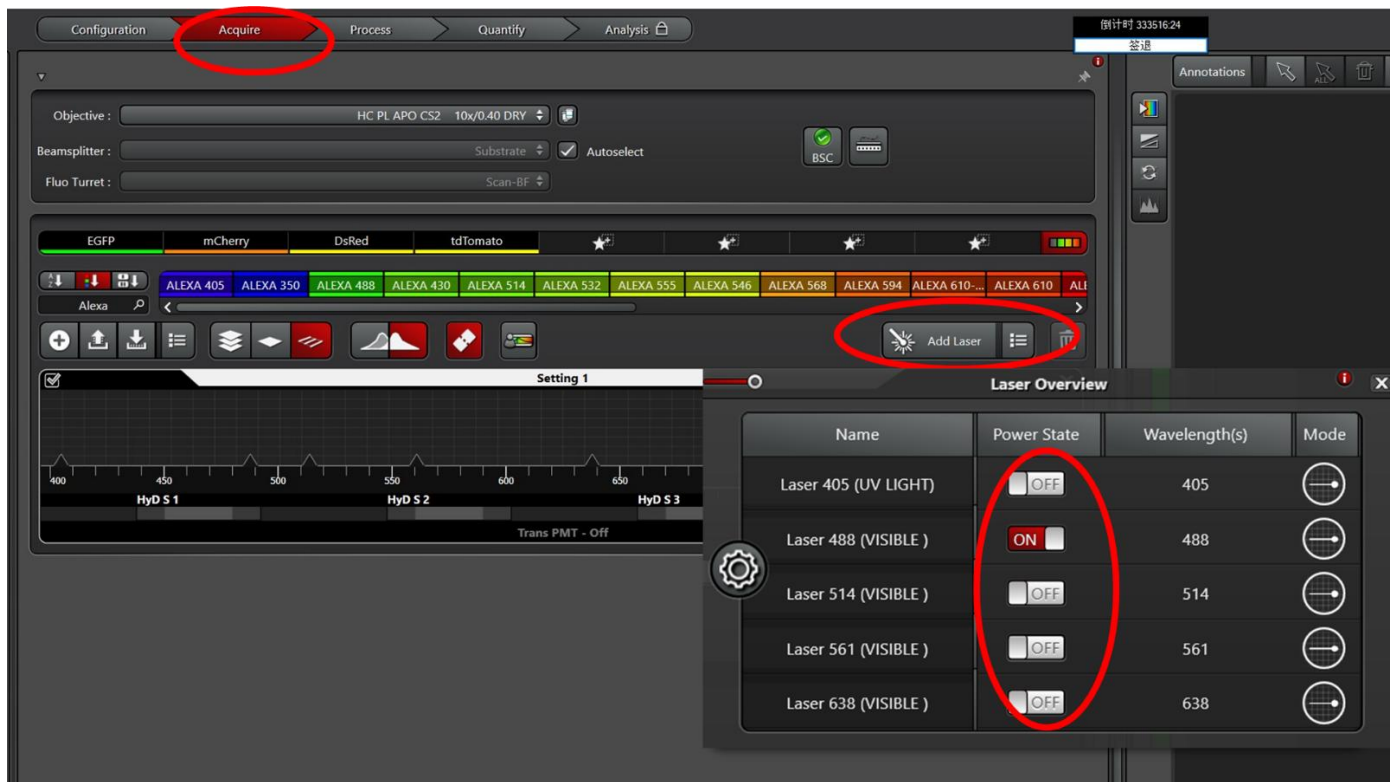
**405nm** 一般用来激发 DAPI 等细胞核染料。

**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，取放样品时堆放显微镜立柱

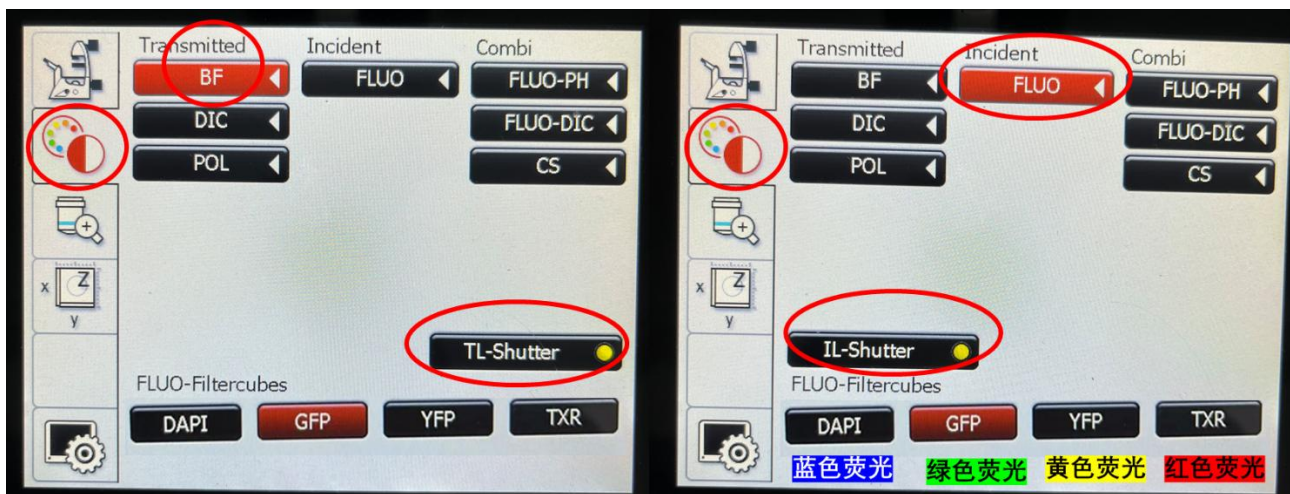
红圈圈出部位。

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）**



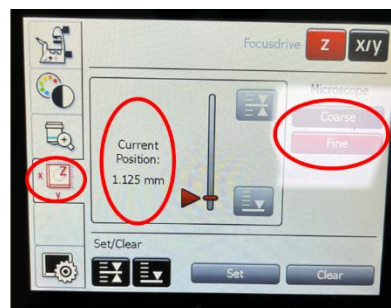
物镜的切换可以在显微镜触摸屏也可以在软件进行。

**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。

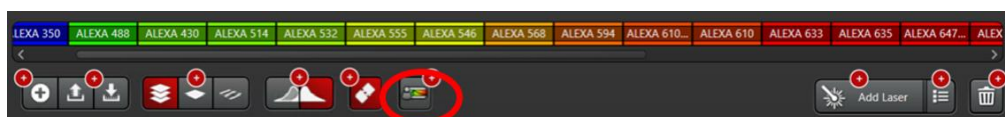



XYZ（即视野前后、左右、焦距）的调节可以通过左图的smartmove来调节。前面两个管xy（快慢由左侧两个黑色按钮切换）。后面一个管调焦（粗调细调由右侧两个黑色按钮切换）。也可以在触摸屏中切换。Coarse粗调，fine细调。



## 2、共聚焦图像光路设置

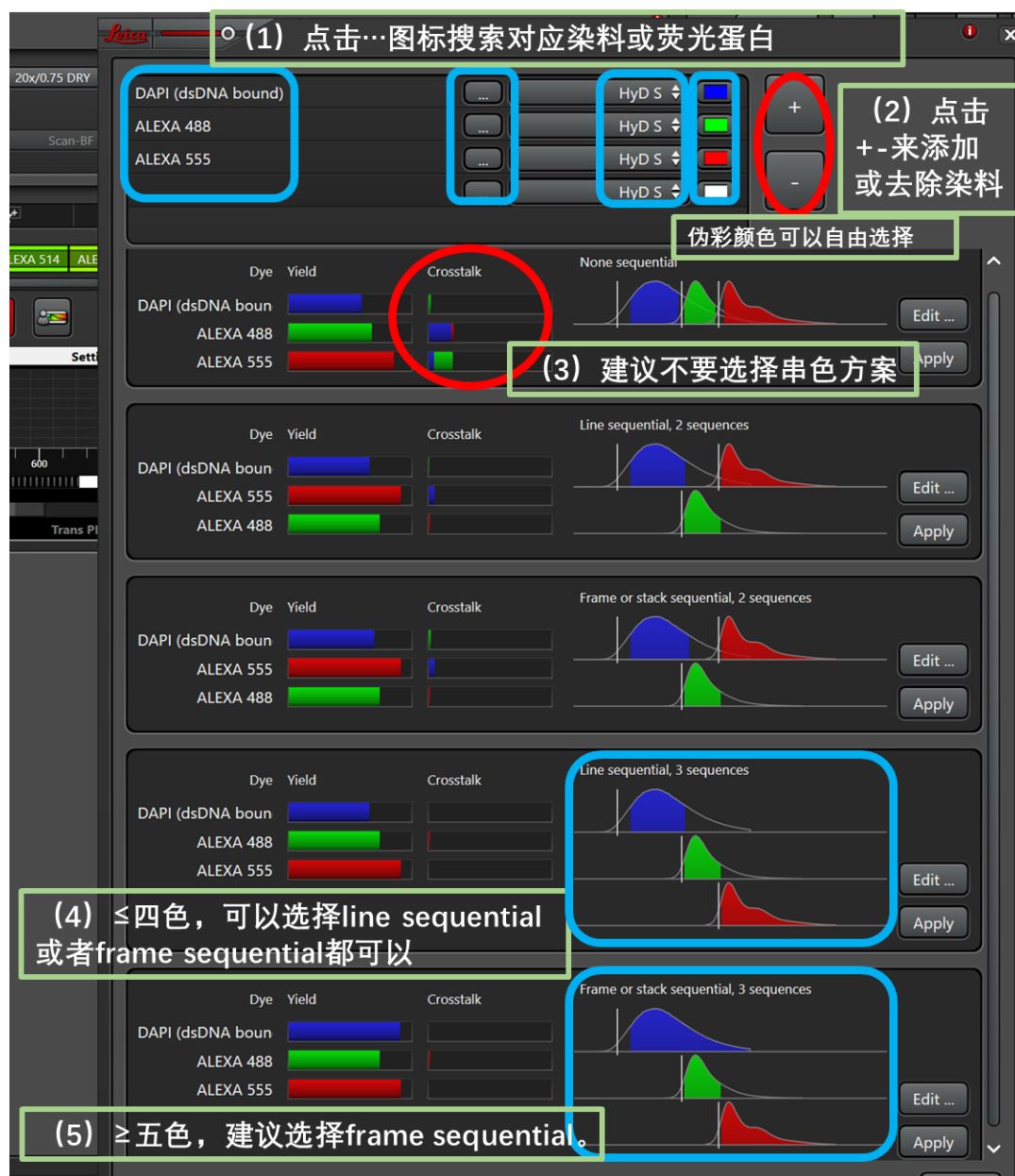
光路设置:



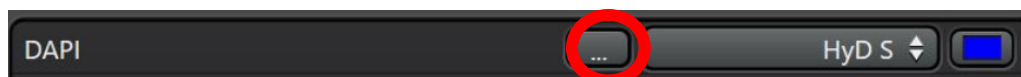
使用 Dye assistant  进行多色成像设置，进入对应对话框，选择所用染料，通过+增加染料。

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。

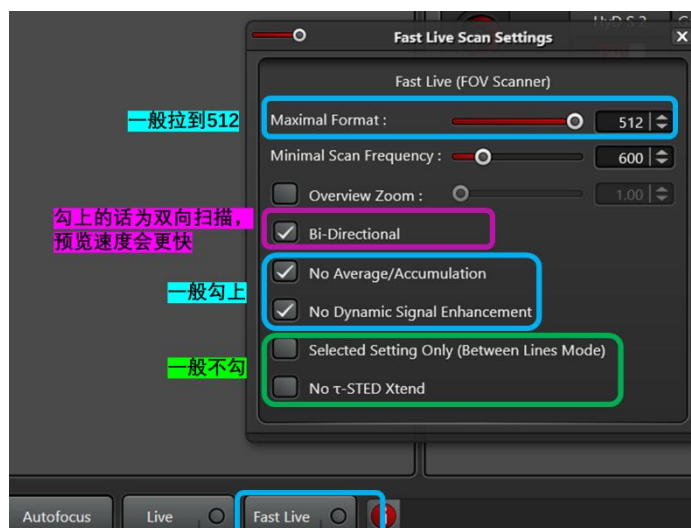
## 注意：


- 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）

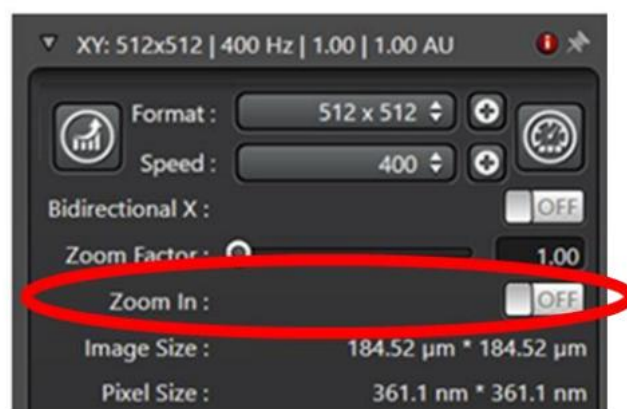
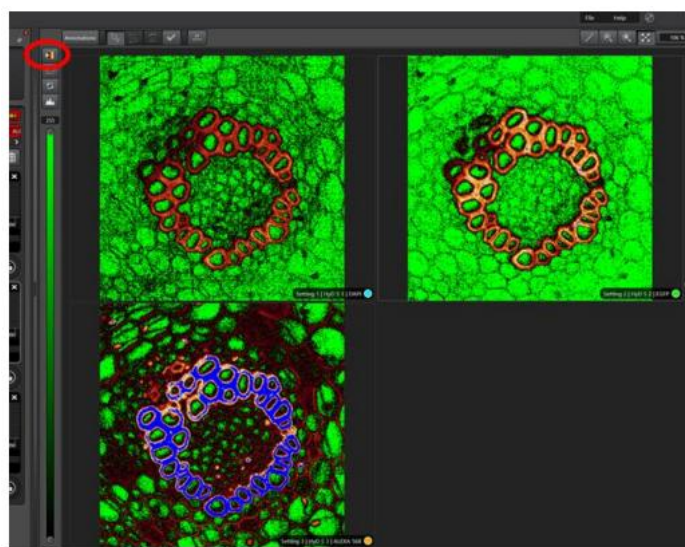


## 3、预览、调节参数及拍摄

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。

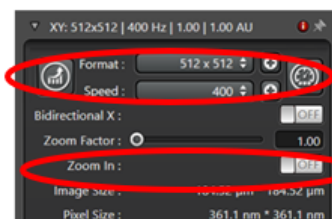


控制面板依次为：1、检测器 gain（建议设为 **50**），2、激发光强度（平时建议不要超过 **20%**），3、Rotation（旋转，-100~+100 度），4、pinhole（共聚焦基本保持 **1AU** 不动），5、zoom，6、z position 调焦





## 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。

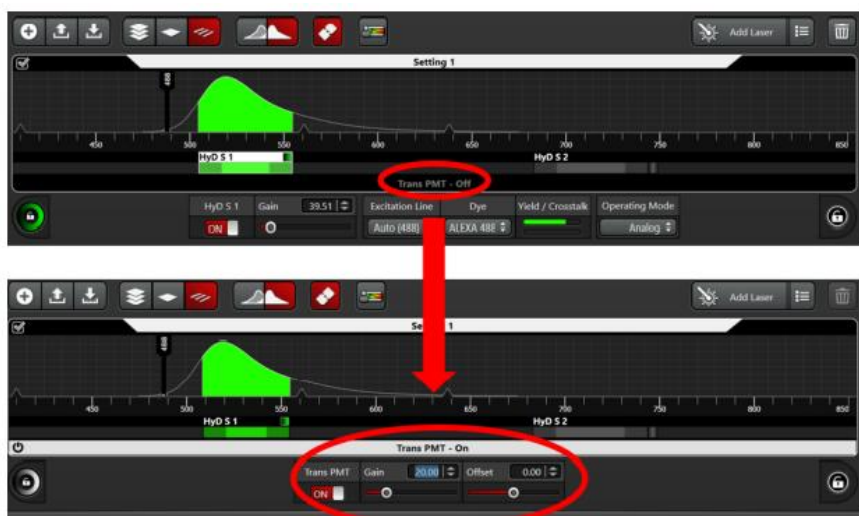
accumulation 为累加，荧光信号太弱时可以使用，通过多次累加让图像更亮，一般建议使用 line accu，视样品情况 2~4 次即可。

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



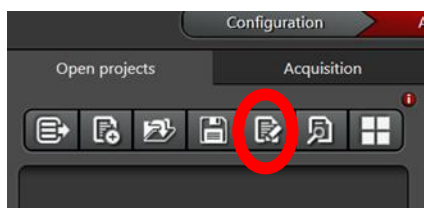
在进行绿色、红色荧光等采图时如果需要明场 BF，可以在其中任一可见光通道增加明场。点击 Trans PMT-off，出来明场检测器对话框，点击 on，gain 一般预设 20-30，fast live 后根据图像亮度再微调。若只需要明场，那可以把对应的荧光检测器 HyD S 关了

## 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，



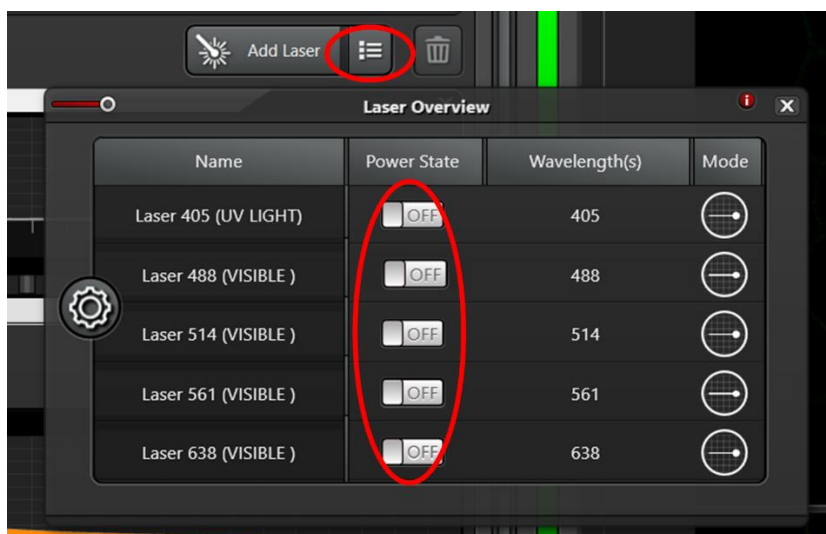
保存好后文件后缀为 lif，该文件包含所有采图信息。之后可以 open 该文件夹选中对应图像点击 apply 图标应用该图像的光路设置。



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

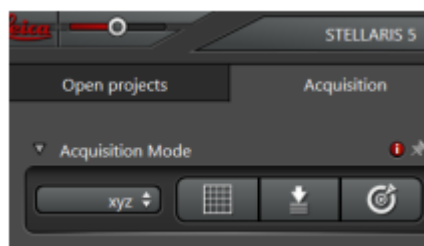
- 1) 保存好数据之后，在 Acquire 界面选择 ，打开激光器开关控制界面 laser overview，将所有激光谱线打到 **off**。



- 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。

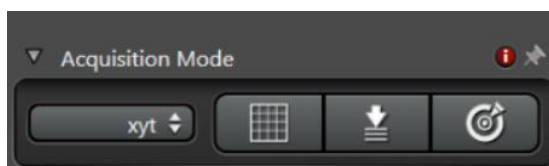
下面三选一

- **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。



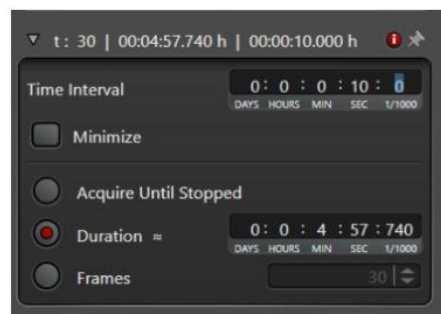
Time Interval（采集相邻两帧图像的时间间隔）可以在输入框中定义（定义的时间间隔大于 Minimize 值）。

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。

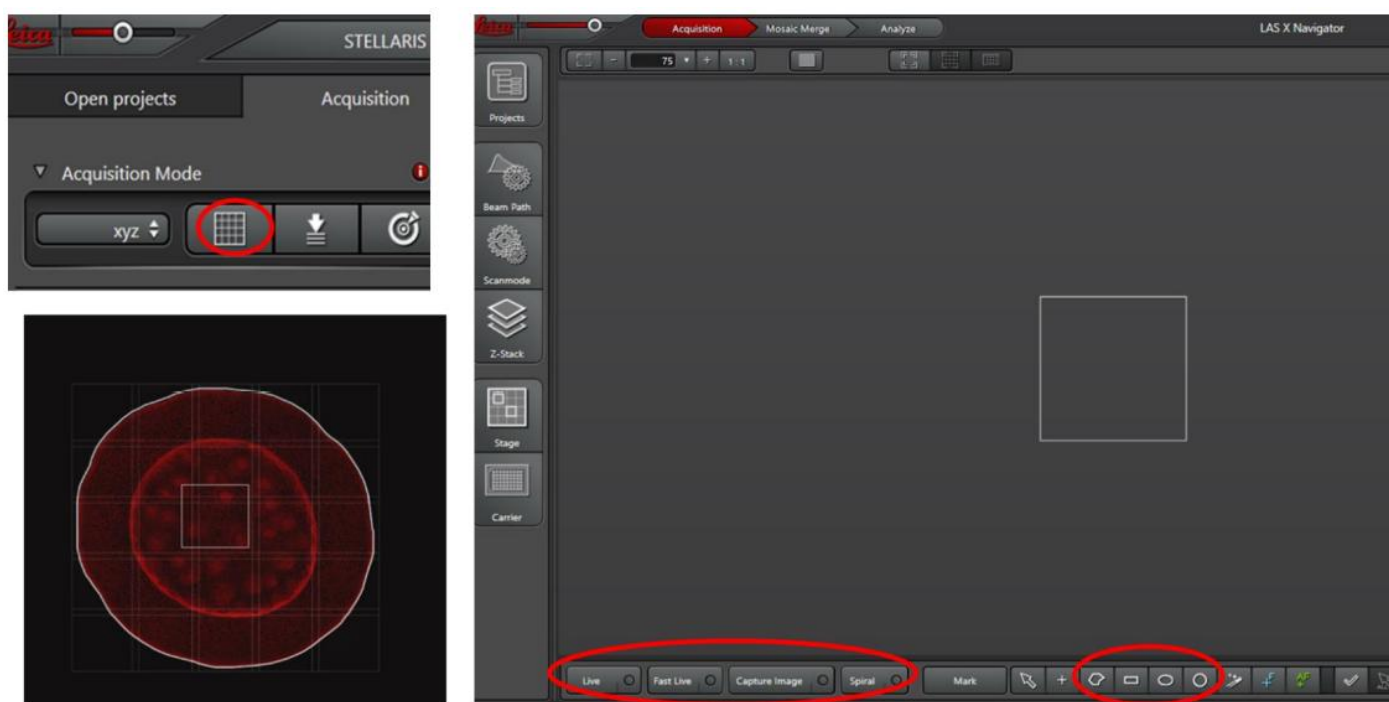
选择 Duration，可定义采图总时间，最常用。

选择 frames 则可定义所需的图像采集帧数

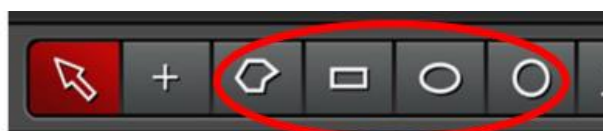


## ◆ 视野拼图 LAS X Navigator

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