Version 1.0 2021/11/24

# Leica SP8 LSCM 培训

王璞 Molecular & Cell Biology Lab Institutes of Biomedical Sciences Fudan University

1

### 可见光,光子





光子能量(E) 波长(λ) 光速(c,常数) 普朗克常数(h)

# 点扩散函数 (PSF, Point Spread Function)







XZ 方向



https://en.wikipedia.org/wiki/Point\_spread\_function

荧光



如果不考虑多光子激发,发射光波长一定大于激发光波长





宽场(widefield)荧光显微镜示意图

https://www.olympus-lifescience.com.cn/en/microscope-resource/primer/lightandcolor/fluorointroduction/ http://www.bris.ac.uk/synaptic/research/techniques/widefield.html

# 宽场的缺点: 焦平面之外光的干扰





https://about.illinoisstate.edu/confocal/

# 共聚焦和针孔针孔



https://www.edinst.com/blog/pinhole-confocal-microscope/

### 共聚焦扫描模式: 激光扫描 vs 转盘扫瞄



激光扫描共聚焦显微镜 Laser <u>S</u>canning <u>C</u>onfocal <u>M</u>icroscope Yokogawa Spinning Disk Unit Optical Configuration



http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/articles/spinningdisk/introduction.html

### 激光扫描共聚焦检测器:光强度检测器



滨松PMT广告

- 一般来讲, LSCM使用纯粹的光强传感器: 只感受光强, 不成像, 相当于只有一个像素。
- 光电倍增管 (PMT) 是标配, 也有一些更好 (也更贵) 的光传感器。

https://www.olympus-lifescience.com.cn/en/microscope-resource/primer/techniques/confocal/pmtintro/

# 激光扫描共聚焦检测器: PMT vs HyD



- 本机器配备了两个PMT和一个徕卡的HyD检测器。
- HyD只用于很弱的光的检测,强光会永久性的损坏HyD检测器。

#### 显微镜实验常用荧光材料



注意: 请务必搞清楚你所用的荧光蛋白/荧光基团的<u>准确名称</u>。比如到底是GFP, EGFP, Emerald或者mEmerlad; Fluorecein, FTIC或者Allexafluor488等。很多染料经过稍许修饰可以既有红的又有绿的(比如罗丹明系列的染料颜色可以 从绿色到橙色或红色, 你必须要确定是Rhodamine123, Rhodamine G, Rhodamine Red还是TAMRA)

https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2666386420302794 https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2015/an/c5an00850f

# 荧光材料的常见参数

# ▶吸光和发射光光谱

# ▶荧光强度相关:

- Quantum yield (0 100%)
- 吸光度

# ▶光稳定性(抗淬灭能力)

# ▶ 其它需要考虑的问题:

- 分子量 (permeability)
- 对化学基团而言: 化学性质、溶解度等
- 对荧光蛋白而言:蛋白稳定性、成熟时间、是否形成多聚体

# 关于荧光材料光谱



- 用显微镜前请搞清楚详细的光谱,不要用简单的蓝、绿、红这种描述性名词。
- 现在这台SP8 配置405nm, 488nm, 552nm和638nm四个激光器。确定你的荧光 基团可以被激发。
- 多通道标记时确定不会相互干扰。

光谱可以在paper、网上的数据库或者供应商的说明书等地方找到。个人推荐以下几个网站: https://www.thermofisher.cn/order/fluorescence-spectraviewer#!/ https://www.bdbiosciences.com/en-us/resources/bd-spectrum-viewer https://www.fpbase.org/

# 开机步骤

开机步骤	观察并确认:
打开显微镜电源(标签1)	显微镜上的触摸屏会点亮,并开始初始化(出现进度条) 完成后触摸屏会进入操作界面
打开汞灯(标签2)	汞灯电源点亮 (可能会延迟几秒)
打开扫描模块电(标签3)	按钮点亮
打开激光器电源(标签4)	按钮点亮
打开激光器保险(标签5) (钥匙,顺时针拧90°)	方形黄色指示灯点亮
<del>等待第一步的初始化完成</del> 电脑LAS X程序	电脑的电源在任何时候打开都可以,开程序前请务必确认第一步的初始化已经完成。程序操作见下文。

注: 机器上相应按钮附近会贴有标记顺序的贴纸

# 请等待显微镜初始化完成后再打开LAS X软件



初始化(出现进度条)



操作菜单出现表示初始化已完成

#### LAS X 软件初始化

# LAS X软件打开后会读条,然后显示下方窗口



#### 点OK, 会出现初始化进度条, 耐心等待读条完毕, 期间不要操作显微镜

# 关机步骤

关机步骤	观察并确认:
拷贝拍摄的数据	文件存在,大小正确
如果使用过油镜, 请 <mark>务必</mark> 擦镜头	擦镜指南见下一张PPT
切换镜头至10X, 物镜位置放到最低	
关闭LAS X程序中的激光发射	激光光源相关的地方全部切换成OFF
关闭LAS X程序 等待LAS X程序关闭 关闭激光器保险(标签5,钥匙) 关闭激光器电源(标签4) 关闭扫描模块电源(标签3) 关闭显微镜电源(标签1)	会出现进度条,需要大概几分钟时间
<u>确认汞灯以开启超过半小时</u> 关闭汞灯(标签2)	如果不够半小时,请等够半小时再关闭
罩上显微镜罩,关电脑	

#### 油镜,点油,擦镜



- 只有63X的是油镜,其它的镜头严禁点油(油镜的制造工艺决定了镜 头本身是防液体渗漏的,非油镜就不好说了)
- 油镜只接受封装或者液体不会渗漏的样品。35mm玻璃底的平皿可以 直接拍摄。玻片请拍摄前用指甲油(或者其它合适封片方法)封好。
  不允许用油镜拍摄未封装的玻片。
- 如果使用过油镜,请在结束使用后务必擦干净。
- 点油可以点在镜头上,或者玻片上。
- 擦镜请使用擦镜纸(卫生纸、纸巾、Kimwipe都不是擦镜纸) 1. 撕一小块擦镜纸,把镜油擦掉 2. 撕一小块擦镜纸,倒上一点酒精,擦镜头(镜油溶于酒精) 3. 撕一小块擦镜纸,把残余的酒精擦掉

• 实验室提供镜油和擦镜纸。如果快用完了,请联系张金叶备货。

• 擦镜产生的垃圾请及时清理。

### 显微镜操作



其它所有按钮的操作都可以在触摸屏上完成,而且使用频率不高。因此推荐在触摸屏上操作。

# 显微镜操作





#### 载物台控制 (触摸屏版,不推荐)



# 显微镜操作

	明场 宽场荧光 (肉眼看白光) (肉眼看荧光)
Image: Series Seri	Transmitted   Incident   Combi     BF   E   E     POL   CS     POL      H聚焦扫描   去 软件会自动切换、一般不需要在触摸屏上操作     L   I     V   I
	RHOD_LP

**~** 通过人眼观测请激活这个按钮

# 通过目镜观测明场 (白光) 或宽场荧光







打开shutter(推荐使用实体按钮) 通过显微镜侧面的旋钮调节光强



通过显微镜侧面的旋钮调节激发光强 为了防止荧光淬灭,请养成随时保持shutter关闭的好习惯

## LAS X 软件界面



# 显微镜光路示意图



传感器开关、增益

### LAS X 软件界面: 激光光源



#### 光路示意图



## 拍摄通道波长的选择

当前设置下激发光的谱线位置



目前这个窗口的选择范围是420nm到479nm

- 通过菜单可以选择大部分常见的荧光材料的发射光光谱
- 窗口覆盖荧光材料的发射光的范围越大,信号越强。
- 三个窗口的选择范围无法交叉。
- 请务必保证选择的波长范围离最近的激发光差距至少10nm以上。由于激发光本身也会经过反射或 ٠ 者折射等方式进入发射光的光路,必通过波长选择器屏蔽掉所有的激发光,保证传感器只检测发。 射光,否则会接收到大量背景。(10nm的距离是考虑到波长选择器的效率问题,在窗口的边缘并 不能完全屏蔽掉发射光)
- 以上面这个图为例,PMT1的窗口的左侧是405nm的激发光,距离窗口左边缘420nm差距10nm以 ٠ 上. 合格; 窗口右侧(479nm)距离488nm的激发光偏近。

# PMT的操作



- PMT的默认标准电压是800V。
- 增大电压会增加信号,降低会减小信号。
- PMT电压过大时可能会出现背景。请尽量避免出现这种情况。如果非要使用,可以调节右边的Offset来扣除背景(不推荐)

# HyD的操作



- Hybrid Detector (HyD) 是专门针对弱光信号设计的传感器,极易被强光损坏。有时候一个过曝可以永久摧毁这个传感器,按照2021年底的价格维修大约需要二十万人民币。除非你的样品 信号非常弱,否则不要使用HyD。这就跟白天不需要拿一个夜视仪观察周围一样,完全没有必要。PMT可以应付至少95%以上的情况。
- 使用HyD在开始扫描前请务必检查波长选择,不要让激发光照到HyD(极容易过曝)。对应的 激光器的输出建议从0开始逐渐增加,尽量不要超过5。
- HyD调节信号的增益显示的是百分比,而不是电压。增益越高信号越强,默认是100。
- HyD有三种工作模式:标准模式,光子计数模式(适用于信号非常非常低的情况,一般要配合 accumulation使用)和BrightR模式(会有一个非线性的增益,放大弱光)



Standard和BrightR模式下的增益曲线



# TLD的操作

• Transmission light detector (TLD) 在confocal模式里相当于明场(白光)。用法跟PMT类似, 一般电压比较低, 在300-400V左右。



# 多荧光通道拍照:分布扫描 (Sequential Scan)



- 如果你的样品标记了1个以上的荧光基团或者需要对多个通道进行 拍照,请务必<u>不要</u>同时开启多个传感器和激光光源,这样会导致 某个通道的信号泄漏到另外的通道去。
- 唯一正确的方法是使用分布扫描(sequential scan),即设置一 个多步骤的程序,每个步骤单独针对每个荧光基团进行光路的配置。

点击SEQ按钮开启Sequential Scan。点击后扫描设置里会多出一个 Sequential Scan的模块

每个Seq.1.2...代表一个扫描的光路设置参数。系统会按照顺序对每个独立的设置参数下拍摄的图像进行采集。在选择某个Seq设置的情况下(比如现 在选择的Seq2)单击右边的加号可以添加一个和当前设置一样的设置

请<mark>优先使用Between Frames的模式</mark>(即在整张图之间切换不同的Seq设 置)。在该模式下,激光器、波长选择器和传感器通道可以自由设置。 Between Frames模式下,请使用Live调整每个通道,然后单击Start进行拍摄。

Between Lines模式(即在每一行换行之前切换不同的Seq设置)。由于切换过于迅速,波长选择器无法自由设置,并且只能拍摄最多三个通道。不推荐。

#### Sequential Scan示例



405激发 420-479发射 传感器PMT1 电压959.2

	% S
Seq. 1 Seq. 2 Seq. 3 Seq. 4	8
Between Lines	0
Between Frames Load	ight
Between Stacks Save	

% 5.29	% 0.00 0.00 0.00
8	B
٥	0
ight	**

#### 通道2

488激发 501-561发射 传感器PMT1 电压774.0



#### 通道3

488激发 598-658发射 传感器PMT1 电压723.0





通道4

638激发 651-690发射 传感器PMT1 电压604.8

		%	0.0
Seq. 1 Seq. 2 Seq. 3	Seq. 4	z	
Between Lines			
Between Frames	Load	ž	
Between Stacks	Save	leil /	c
		3	40



5.81 0.00 0.00

%

NO

0











在Between frame模式下,激光器输出、传感器和波长选择都是可调的

# Sequential Scan示例

#### 上图设置下的拍摄结果



# LAS X 软件界面: 扫描相关

扫描像素

〔可以输入数值

扫描速度



## LAS X 软件界面: 双向扫描



从物理上移动扫描振镜需要时间。默认情况下显微镜只进行从左往右的扫描。双向扫描 可以节约扫描时间,但是从左往右扫描和从右往左扫描有可能出现同步问题,导致图像 重影(偶数行和奇数行错位)。可以通过调整Phase X使错位的图像归位。

**如果你不进行大批量、长时间的扫描,建议关闭。**这样永远不会出现错位的问题。

# LAS X 软件界面: 双向扫描



### 双向扫描: 偶数行和奇数行错位

正确图像

# Z-stack Z轴扫描







**()** 🖈

+

0

OFF

12080

## Z-stack Z轴扫描



# XY轴扫描,图像拼接



#### 1. 点亮这个按钮,选项里会出现Stage

2. 移动X Y, 多次单击Mark Positions标记你想扫描的区域。系统会按照所有标记的位置, 生成一个矩形的区域包括所有标记的点。虽然理论上来讲标记你样品的左上和右下两个点就够了, 但是你可以多次选择, 保证扫描区域的每个边缘都被标记。

3. 点击Start开始XY扫描。如果拍摄大量图片,适当运用双向扫描可以节约大量时间。

4. 点击垃圾桶清楚XY轴扫描设置

# 图像拼接



# 文件储存



点击open projects,可以预览所有已经拍摄过的图像,或者打开原来拍摄过的文件(不推荐用本电脑进行图像处理)。本次拍摄的图像一般存在于Project.lif下。

每次点过Start或者Capture Image按钮之后获取的图像都会以一个独立的名字出现。如果你怕弄混了,推荐拍摄完之后马上改名(右键rename)。

,每次Live之后获取的图像都会存在这个Preview文件里

存储和拷贝推荐右键Project.lif-> Save Project,将整个Project存成徕卡的.lif格式。 LAS X用于分析的版本可以免费从徕卡的网站上下载,本机桌面的快捷方式里也 有一个安装包你们可以拷贝走。.lif格式也可以直接被装过BioFormat插件的 ImageJ(比如Fiji)直接打开。

文件名右键,点Export可以输出为常见的图像格式(比如TIF或者JPG)

#### 图像显示设置

- 这儿只提供非常基础的图像处理知识。
- SP8 LSCM生成的是一个8 bit的单色图像(也就是每个像素用0-255之间的数表示信号的强弱,越大则 越亮, 255一般意味着过曝)

#### 点击这个按钮, 会在三种显示模式里进行切换



拍摄模式(便于判断无信号和过曝) 0,绿色 255,蓝色 1-254,火焰色渐变







自定义模式

#### 双击LUT的色条可以自行设置 别的模式下双击该位置不会有任何反应







#### 图像显示设置

拍照后生成图像的默认显示可以通过双击通道前的这个点来自行设置 ///

505								
400	450	500	550	600	650	' 700	750	800
420	-							TT
🕕 РИТ 1:	ON	Gain [V] :	959.2		Offset [%] :	0.00		DAPI 🗢
	479							779
🥑 РИТ 2 :	OFF							None 🗘
								788
НуД 3 :	OFF						Standard 🗘	None 🗘
								800

 请在保证拍摄质量的前提下,尽量不要占用机器的时间进行图片处理工作。你大可以拷回去 用任何你愿意的方法去处理数据。