

多模态结构光超分辨智能显微镜

操作要点

一、开机

1. 按 **1~4** 顺序开机。每开一个电源，停顿 3~5s。
2. 拍活细胞：①先检查加湿瓶中的水是否足够。②将二氧化碳瓶蓝色阀拧松开启，确认 CO₂ 供气是否正常（压力表读数 **0.2** 左右）。再按 **1-5** 顺序开机。

注意：活细胞装置需提前 **30min** 开启，待温控器绿灯常亮，保证温度、CO₂、湿度稳定。

3. 待显微镜初始化完成后，刷卡解锁，打开电脑桌面软件 VSIM2.3。

二、镜下调焦

1. 按 PFS 键（机身正前方）切换到 20 倍镜，将物镜对准载物台中心位置，放入样本固定后，调至焦面，然后按 ESC（物镜下降），取出样本，切换到 100 倍镜。
2. 在镜头上滴油，放回样本，按 ESC（物镜上升），注意此时将操纵杆的 XYZ 轴速度减小，防止刚蹭物镜。在 100 倍镜下找焦。（玻底皿焦面参考 Z Position: 3000 左右）
3. 可通过机身右侧第二个滑块切换通道观察。观察结束，及时按荧光强度调节器的圆形黑色旋钮关闭光源。

三、拍摄

1. 先在软件界面左上角 Experiment 点“+”创建实验，再在右上方 File List 模块设置样品名称（Storage Prefix），数据保存路径（Storage Folder），读取路径（File Name）可直接复制 Storage Folder。数据请保存在 D 盘“Experiment Data”文件夹下。
2. Imaging Mode 模块选择模态，2D 为单张模式，3D 为层扫。
3. Laser 模块调节激光功率：Run（上）> Live（下）。
4. 点击 Live 调整焦面，点 Snap 检查曝光，灰度值 65535 为过曝，有效

信噪比需高于 1000，推荐达到 5000-7000。点击 Run 拍摄图片。

5. 刚拍完的的图像可通过点击 refresh 显示，在 Reconstruction 模块可勾选 Auto, Start Processing 进行快捷重建（文件后缀“.RC”），去背景后产生最终效果图（后缀“.RC.bg”）。

6. 3D 模式（Z 轴层扫）：通常选择 3D SIM 模式。

(1) 可选择 Start/End 模式设置 Z 轴层扫间距, Z 轴间隔选择最低值(Delta Pos) 的倍数。中心模式 (Center) 需选定中心焦平面并设置拍摄厚度，系统会以中心为基准上下均匀扫描。此模式需注意细胞结构通常不均匀。

(2) 生成的图片右键 Animation 可做简单渲染，可手动添加关键帧自定义旋转，点击 export, 输出格式为 AVI 等。可自定义帧数和帧率。

注意：扫描层数需大于 7 层才能保证 3D 重建质量。如需要时间序列一致性，可勾选 Interleave Scan 交叉扫描模式，实现通道交替扫描。

7. 长时程拍摄（需锁焦）：在 Experiment 模块，设置 Cycle Count 和 Cycle Time。

8. 叠加明场：Sequence 模式（左上角），实现不同焦面独立设置。选择不同模式和通道后，点 Add。对每个通道确认焦面后在 Z Stack 模块点击点“+”，然后点击通道对应的 Stack 添加此焦面。

注意：①拍不同焦面需取消 Current Position 选项，保持 Focus off 状态。

②打开 Sequence 后只能在该面板里选择激光，不可在 Laser 面板里点选激光。

9. 多点长时程拍摄（Multi ROI）：需锁焦。先加第一个点，在 Sequence 区加通道，再加第二个点。拍摄前需点 Go To 逐个检查位点焦面，可点击刷新（右侧），通过 Snap 确认曝光强度，可设置每个位点不同的曝光强度。将 Cycle Count 数量设为 1，运行后观察实际耗时，将 Cycle Time 设置为单个 cycle 时间+10 秒为最佳，以避免连拍。

注意：单次拍摄不过 60 个位点。建议采用 Z 字形位点布局以减少跑焦风险。

10. 快速预览（Image Map）：快速定位目标区域。打开后点击左上角第一个图标，Fields 输入目的视野大小。选取中心视野，点击 Snap Large

Image，即可快速扫描得到大视野图。点左上角第二个图标选点，点 Go to，实现镜头自动定位。

注意：系统不保存该图像数据。

11. 拼图 (Scan Image)：Center 模式指选定中心位点（以中心点的 Z 轴为基准扫描）后点 set，Fields 指定大小范围，Overlap 重叠比例设置：>15%，Stitching 拼图算法选择：基于细胞特征的算法（推荐）。勾选 Reconstruction 后输出重建的拼接图，不勾则输出原始图。系统将自动保存每张扫描图的完整信息。Boundary 模式为选择多个位点后，系统自动计算最优布局。Z 轴以最后一个点为基准。

12. 图像处理软件 (SIM Image)：后台重建软件可独立运行，不影响拍摄进程，适用于长时程数据重建。

(1) 点击 Set data folder 打开数据文件夹。数据文件夹点 Refresh 可实时显示已拍摄的原始图片。

(2) 重建参数选择

Denoise：去噪 WF Deconv：宽场去卷积

SIM Deconv：勾了去卷积才能勾选

不勾选任何只做简单重建（无去噪/去背景），右键点 set 可设置详细参数，新手建议勾选 AUTO。

(3) 处理完成后显示笑脸图标，需等待进程结束方可操作界面。

(4) 选中文件后点击 Get WF Image 或回车键显示图片。

注意：参数调整仅影响显示效果，实际数据需通过 ImageJ 保存修改。

四、关机

1. 先关软件，然后按 4-1 顺序关闭电源。活细胞按 5-1 关机，并将二氧化碳瓶蓝色阀门**拧紧关闭**。

2. 请用无尘擦镜布清洁油镜：①先吸去油滴，②再蘸无水乙醇擦拭至少三遍。

3. **关机打卡：拍摄擦拭干净后的油镜照片发到群内。**刷卡下机。