

Leica Stellaris8 簡易操作手冊



- 依序打開電源 1，2，3。



1. 顯微鏡與電腦的電源
2. 雷射與掃描模組的電源
3. 冷卻系統的電源

- 點開桌面之軟體 LAS-X 捷徑
軟體起始頁面出現後，按下 OK 以正式啟動軟體



- 選取 Configuration 中的 Laser config，開啟雷射：



1. Diode Laser : 405 nm 50mW
2. White light laser system, pulsed laser 440nm-790nm.
(預設為 85%)

- 雷射共軛焦顯微鏡機身-倒立 DMI8



- 鏡頭使用的鏡油務必要正確。本機使用鏡油如下：
一般鏡油(Oil) 甘油(GLY)

Immersion Oil, Type **F**

Glycerine-Solution



-搭配鏡頭種類使用。ex: lens_Oil or lens_GLY

-樣品較厚或含有 **buffer** 的樣品，
建議使用甘油鏡頭並搭配**甘油(GLY)**使用。

-樣品較薄，建議使用一般鏡油之鏡頭，
並搭配**一般鏡油(Oil)**使用。

- 更換樣品時，請輕推這裡。



- 放置樣品於載物台上，先經顯微鏡下鏡檢，使用 Smart Move 裝置後方滾輪(Z 軸)，調整焦距顯微鏡上之焦距，配合移動 X 與 Y 旋鈕，找到適合觀察樣品的位置。確認樣本螢光染色狀況後，再正式使用 Confocal 掃描。



Z 軸：順時針往上移動，逆時針往下移動。
-Z-Wide，調節物鏡升降，調節 Z 軸。

- 拍照條件設定：
於顯微鏡之目鏡檢視完畢，找到樣本後開始使用 LAS-X 軟體，會自動切換為共軛焦模式。可鍵入所需染劑之關鍵字，以套用原廠設定之資料。亦可載入已拍照之檔案，套用其拍照設定。



- 調整激發光白光雷射波長及強度

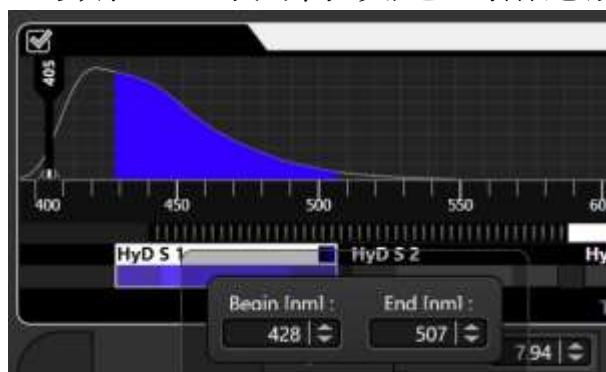


1. 滑鼠直接拖曳即可調整雷射光強弱。亦可雙擊數字，直接輸入欲使用支雷射光強度。
2. 滑鼠選至下方數字，可任意選擇雷射光波長。亦可雙擊數字，直接輸入欲使用支雷射光波長。(440-790nm 雷射波長)

- 調整發散光波長(emission)

感測器收光範圍:

可以直接以滑鼠調整橫欄範圍，也可雙擊直接輸入數值，可自行設定，無濾鏡設計。



- 多色參數設定 (Sequential scan)



按“+”可新增其他波長設定。

- 掃描樣品時，選取之 Format



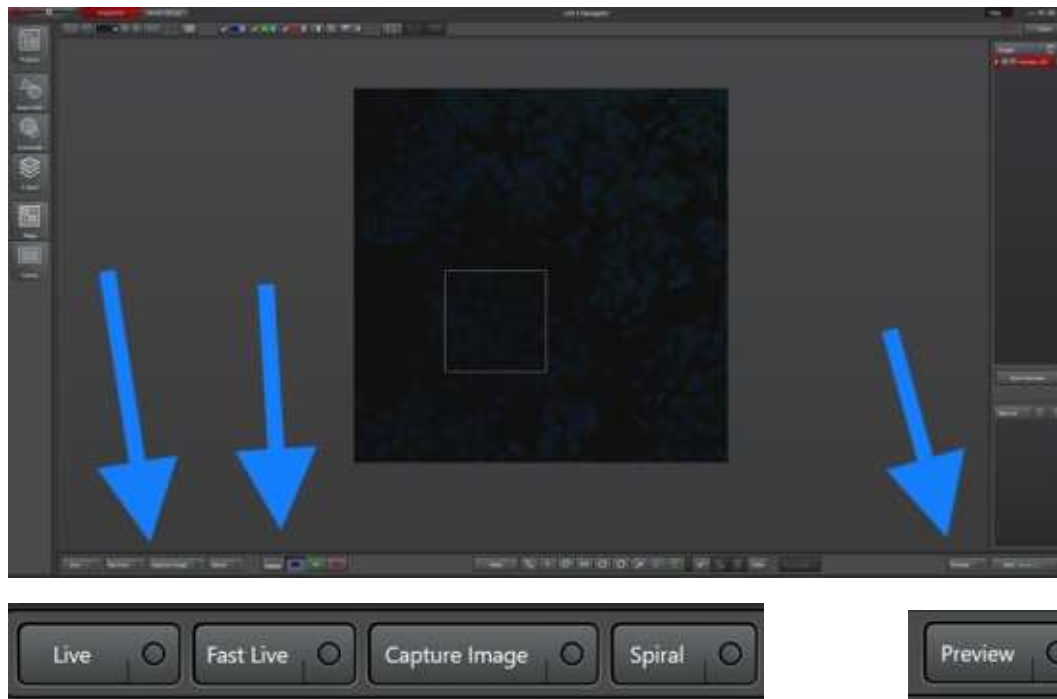
Fast Live:已較小的 Format 快速預覽影像。

(256*256)

Live: 已拍照設定 Format 與 Speed，預覽影像。

(512*512) or (1024*1024)

- 可先利用 Las-X Navigator 預覽影像。
使用滑鼠滾輪控制放大、縮小，配合 spiral 使用，
選取要觀察的區域。



- 使用 Panel Box 之旋鈕調整

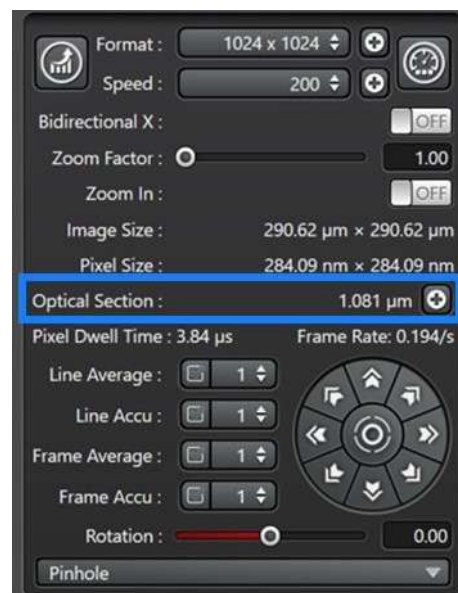


常使用設定為:

1. Gain 值調整 (建議<80%)
2. Laser 強度調整 (建議<50%)
4. Pinhole 大小調整
5. Zoom 放大倍率
6. Z-Position 調整樣品座高度
-Z-Galvo，使用 Super Z，進行
精細的 Z 軸調節。

- 3D-xyz 光學切層掃描設定

若想掃描多層平面時，於Live狀態下，轉動control panel(旋鈕6)，並同時檢視影像，先往一方向調整至樣本的頂端時，按下Begin記錄起始位置，再往反方向調整至樣本的另一端，再按下End記錄結束位置。



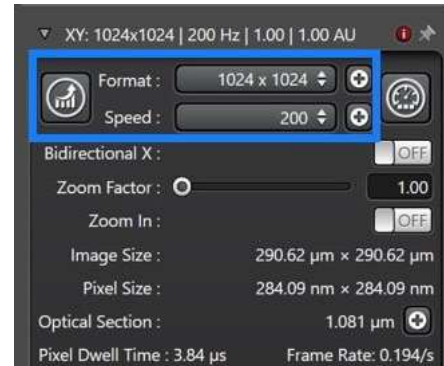
Z Size: 為起始至結束位置之距離。

Number of steps: 自行決定欲分為幾層進行掃描。

Z-steps size: 決定每隔多少距離進行掃描

System Optimize: 為軟體自行運算之參數。

- Acquisition 掃描時設定
 預覽模式設定為: Format: 512*512; Speed: 400
 掃描模式設定為: Format: 1024*1024; Speed: 200



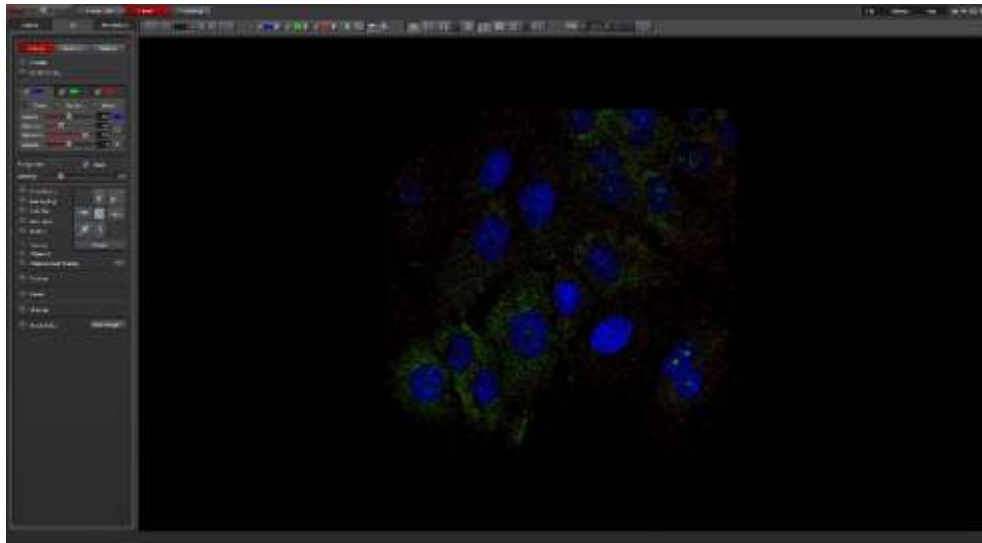
- 若有需要提升影像對比，可在調整 Line Average
 若有需要提升影像強度，可在調整 Line Accu



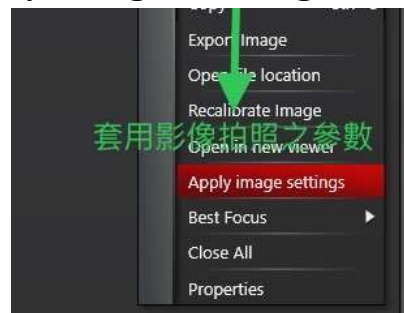
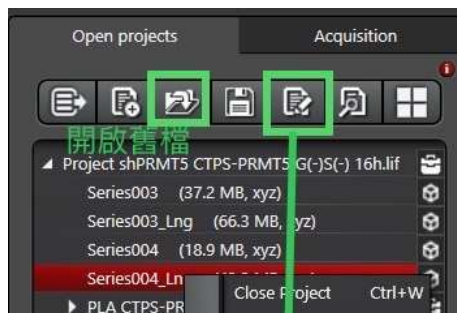
- 參數設定完成後按 **START** 則可取得序列影像



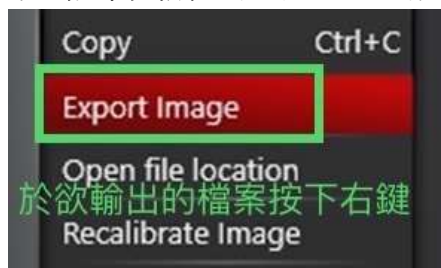
- 完成 XYZ 掃描之影像，可使用 3D 模組進行立體影像重建



- 可套用已儲存影像檔案設定參數。
選取檔案，按右鍵選"Apply image settings"套用。



- 將影像輸出為 TIFF 檔



完成按下 close 即可。



- 關機程序:
若實驗已完成。首先小心清潔使用過的油鏡與甘油鏡頭 2-3 次。關閉雷射與軟體，再關閉電腦。
接續關閉 3，2，1 開關。



- Superresolution 影像擷取 – Lightning 功能
在 Process 中選取 Lightning，選取要套用之影像檔
進行影像優化。優化後之影像特性如下：
-影像會變成 16 bit 格式。
-影像解析度達 120 nm(XY 軸)，350nm(Z 軸)

● **TauSense 偵測技術**(TauContrast , TauGating , TauSeperation)

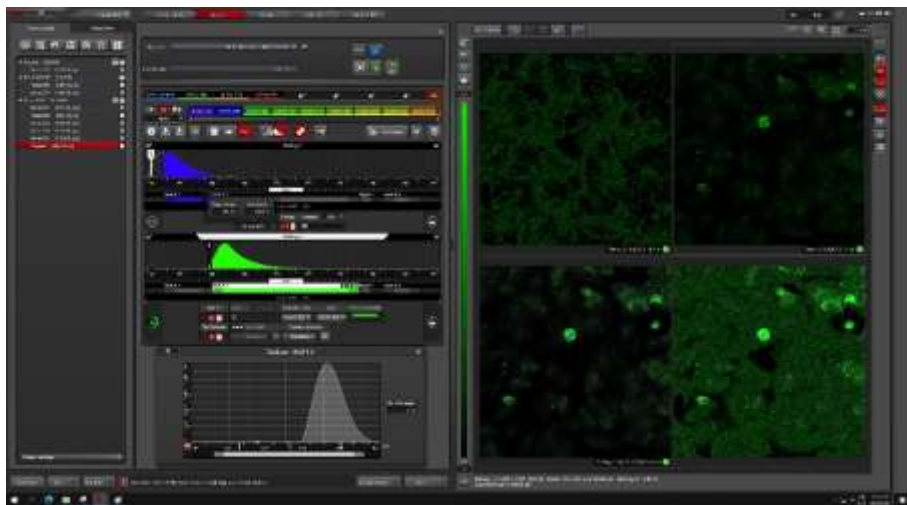
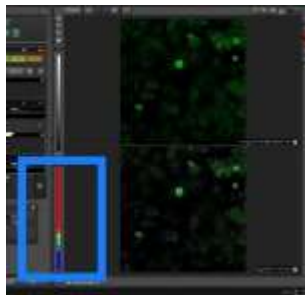
-Tau Contrast:

同一張影像可看到不同 life time 長短。

點選白光 HyD detector，起動 Tau Contrast，選取欲使用 Tau Modes 選項。

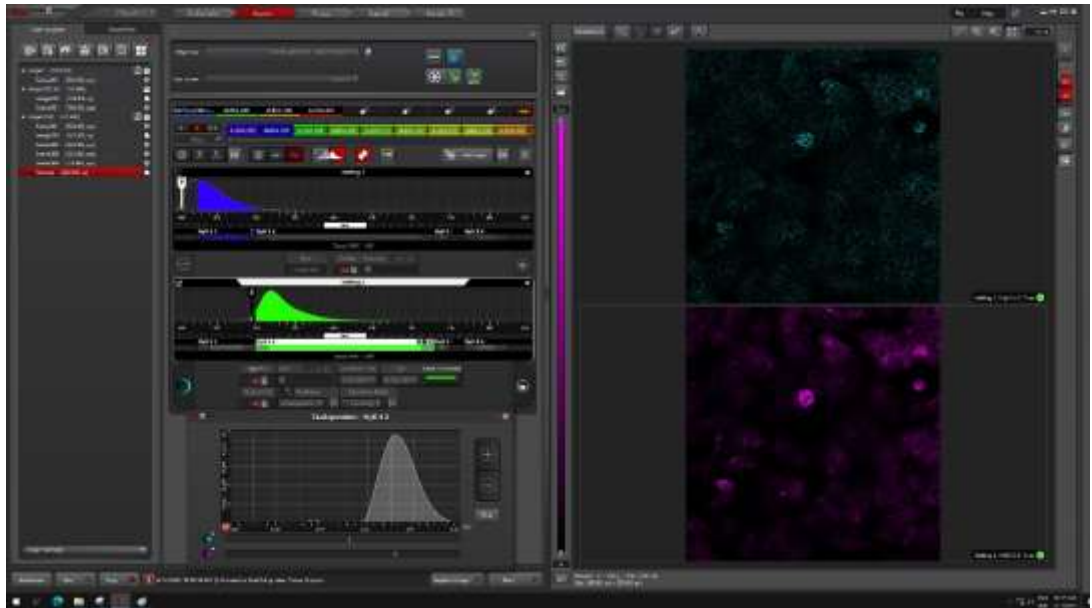


-Color bar 顏色藍至紅，表示 life time 由短至長。



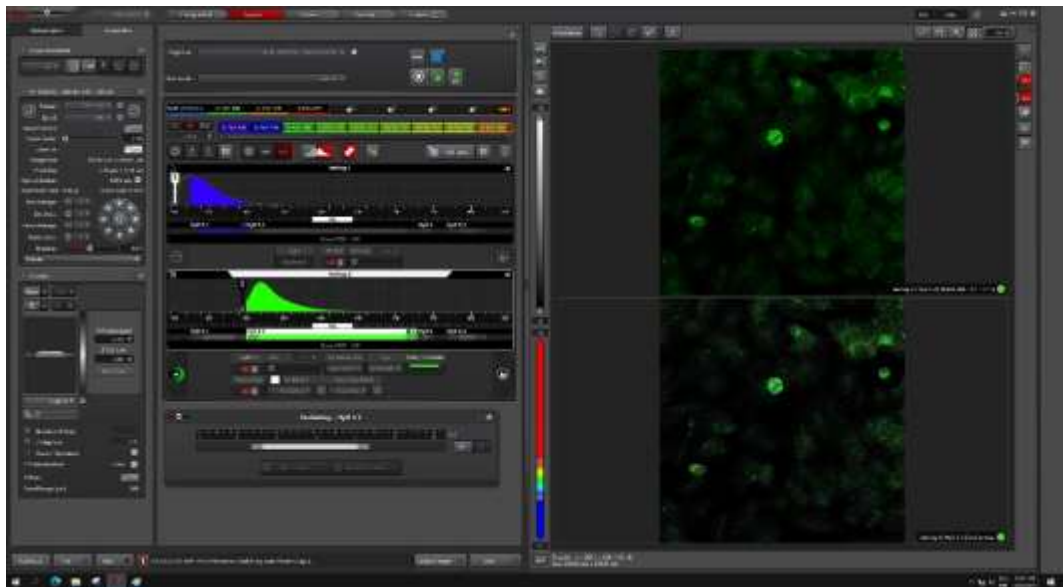
-Tau Separation:

軟體可自行 find 分開不同 life time 時間的影像。
0-12.5 ns (脈衝白光雷射為 80 MHz)。



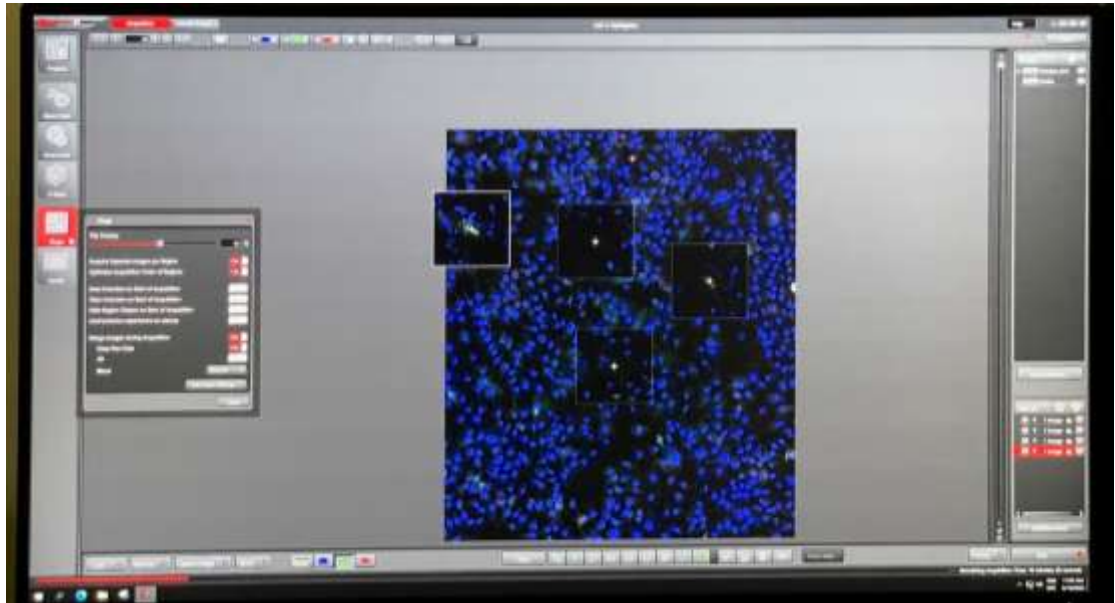
-Tau Gating:

去掉不需要的 life time 時間影像，即選取需要的 life time 時間影像。

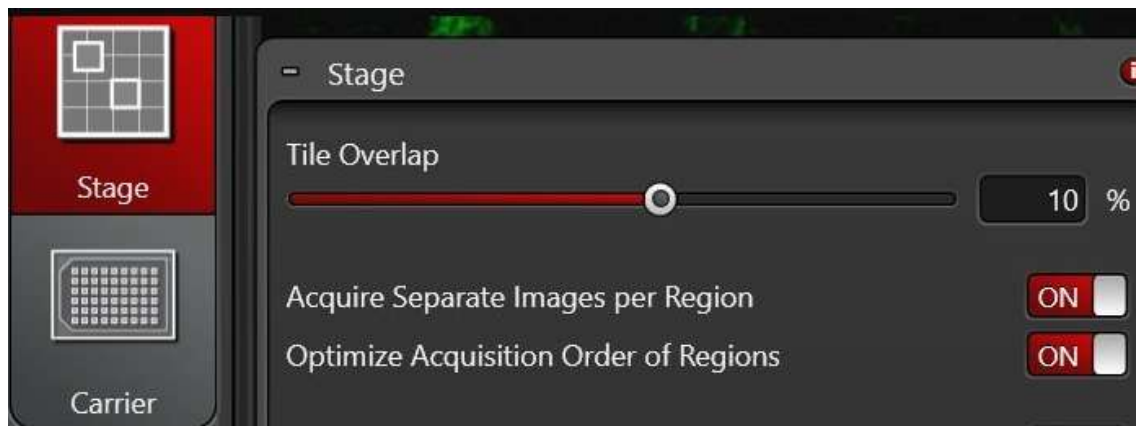


一般會先做 Tau Separation，再做 Tau Gating。

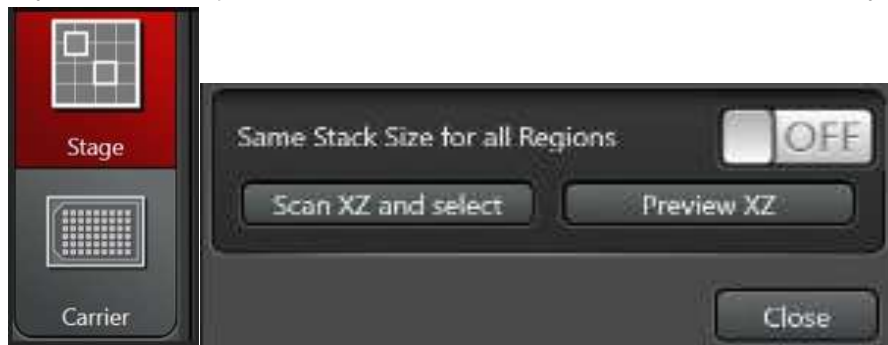
- 標記多點位置並進行 Z-stack 掃描
- 首先標記多點位置，並依照最佳路徑進行掃描。



於 Las-X Navigato 中，選取有興趣的區域並點“mark”，可選取多個位置。在 Stage 視窗中的圖中，左邊視窗第二項“on” (Optimize Acquisition Order of Regions)，表示依照最佳路徑進行掃描(非依序進行掃描)



- 而後依序進行定義多點不同 Z-stack 設定(如下圖)。
先確認 Same Stack Size for all Region 為 OFF 狀態。
(不然全部多點標記區域 Z-stack 設定將都一樣)



- 首先於視窗右下方 Task list 中選取 Area 1，並點 Z-stack 定義 Begin 與 End 後，再回到 Task list 中下方點選一下 Redefine Stack。依序 Area 2 定義完 Z-stack，至 Task list 中下方點選 Redefine Stack。



- 多點標記與 Z-stack 都設定完成時，即可由預覽模式 (512*512; Speed: 400)更改為掃描模式(1024*1024; Speed: 200)並進行掃圖。

- 設定自動對焦模式：於 Acquisition Mode 中選取



-建議使用 **A**daptive **F**ocus **C**ontrol(AFC)

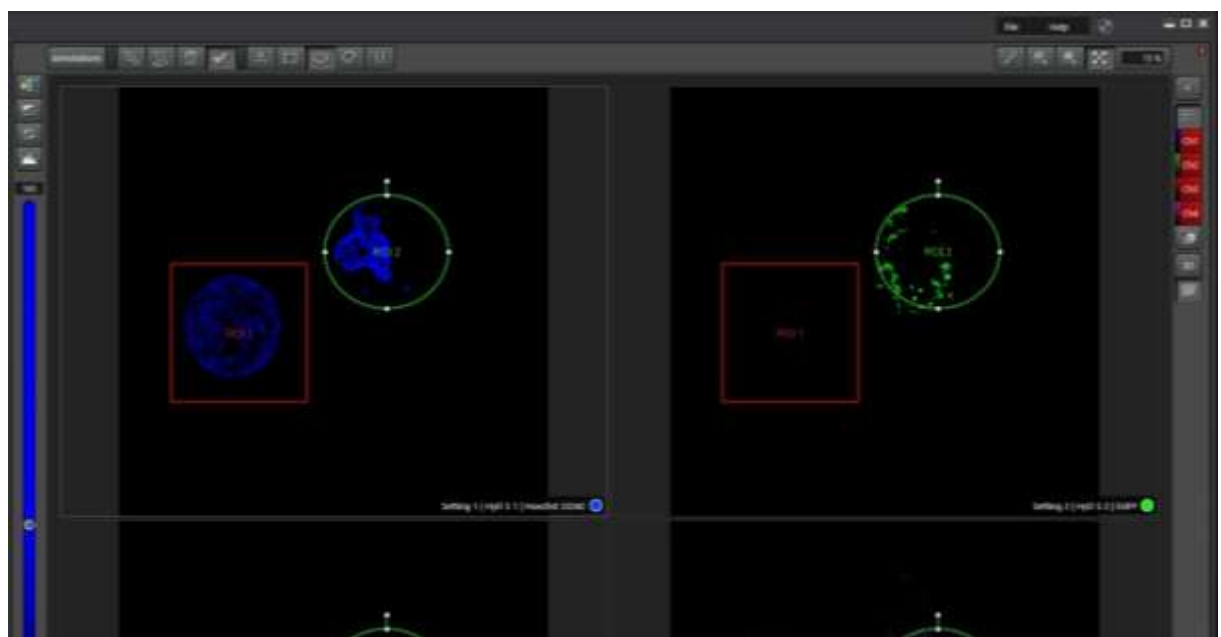
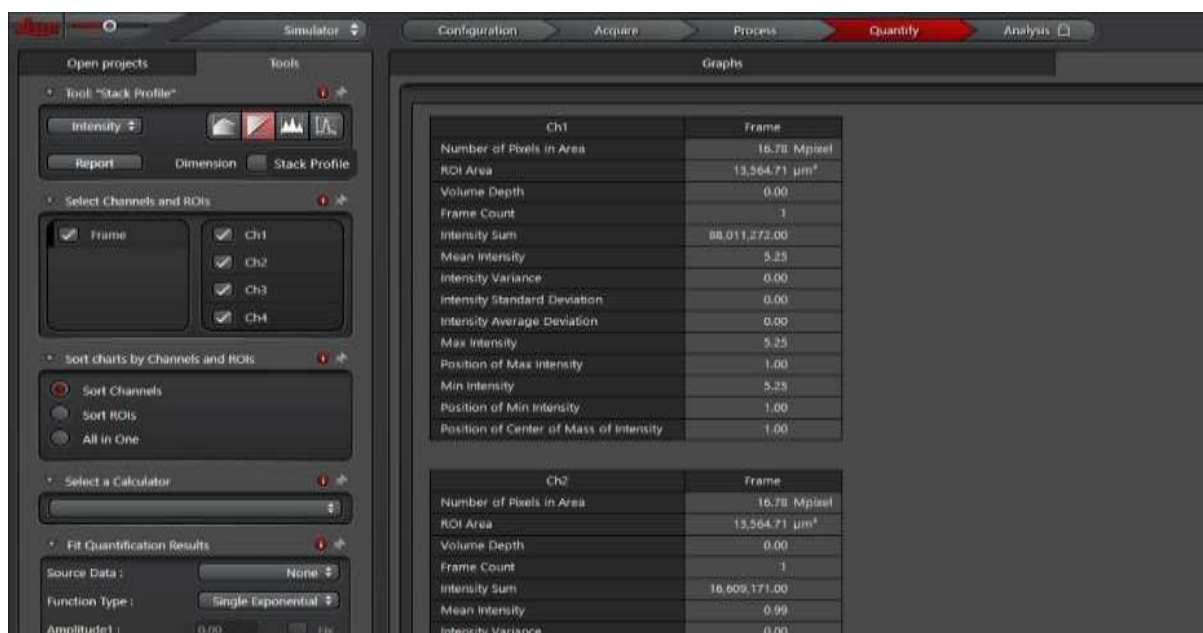


並選取 On demand mode (依照不同需求設定)

螢光強度定量分析(Stack Profile):

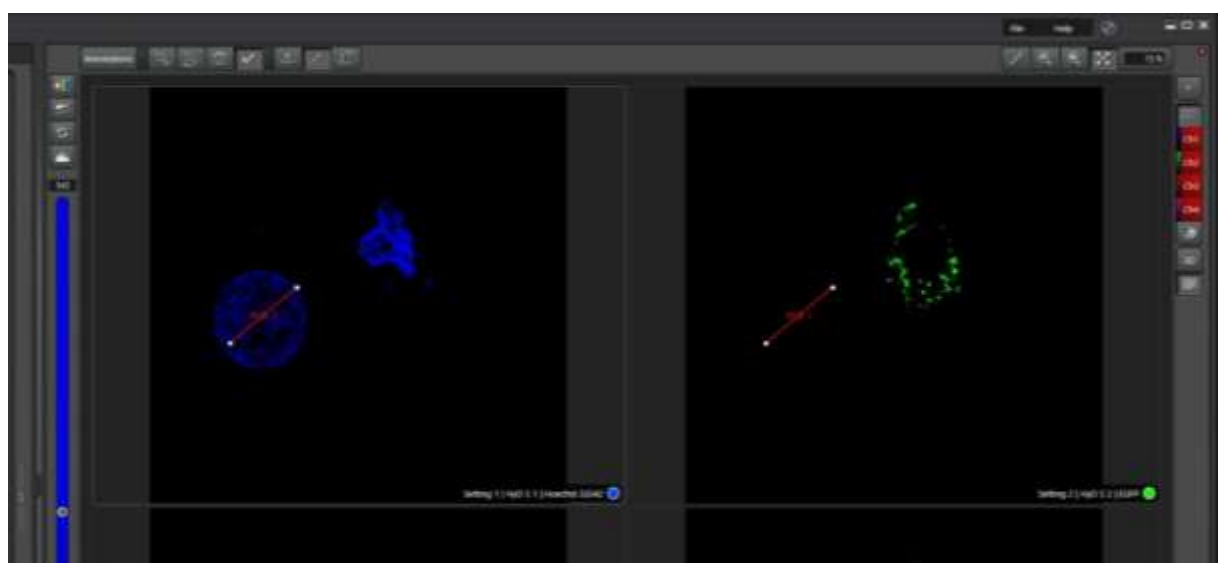
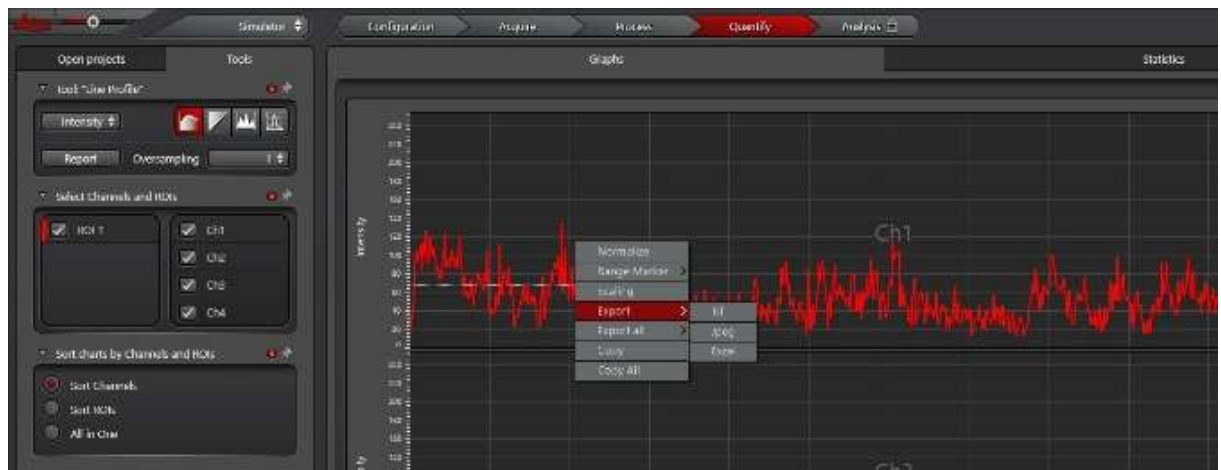
首先點擊 Quantify，接著選擇第 2 個按鈕 (Stack Profile)，然後點擊 Statistics。左側表格會顯示框選區域的平均螢光強度值、區域面積等參數。在表格處右鍵點擊，即可將數據以 EXCEL 格式匯出。

可使用 ROI 工具對需要分析的區域進行框選。



螢光分佈分析(Line Profile):

進行螢光分佈分析時，首先點擊 Quantify，接著選擇第 1 個按鈕 (Line Profile)，利用線性工具對需要分析的區域進行劃線（直線或折線），然後點擊 Graphs 查看。左側圖表會顯示所劃線上的螢光分佈情況，多色螢光圖像可用於分析是否存在共分佈現象。在表格處右鍵點擊，即可將數據以 tif、jpeg 或 Excel 格式匯出。在圖片中右鍵選擇 Snapshot 或 Snapshot All 可保存包含劃線的圖像。



截圖(Crop):

LAS X 分析軟體可進行裁剪截圖：首先點擊 **Process**，選擇 **Crop** 功能按鈕，然後使用 **ROI** 工具對需要截取的區域進行框選，最後直接點擊 **Apply** 即可在 **Project** 中生成裁剪後的圖像。對於多通道數據，可取消不需要通道的加亮顯示；Z stack 或 Timelapse 數據中也可以截取其中所需的圖像。

