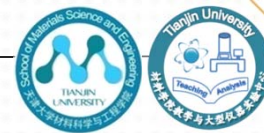


激光扫描共聚焦显微镜 操作培训 (Nikon A1R+)

主讲——马利利
2023.09.01





目录



1. 注意事项
2. 实验室位置
3. 普通操作步骤 (简略)
4. 普通操作步骤 (开机、荧光、明场、共聚焦、3D图、关机步骤)
5. 其他操作 (PFS、浮雕拍摄、大图 (含3D) 拍摄、荧光强度)
6. 常见问题

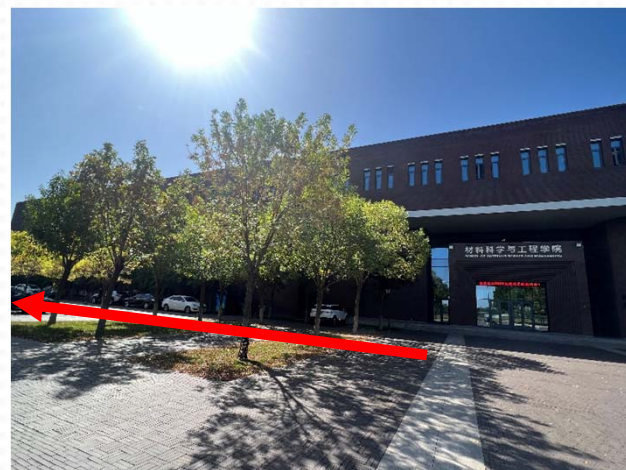
注意事项

1. 经过培训才能单独操作仪器。需要培训可以参加每年9月的集体培训，或者找老师培训考核。**一定要经过考核并确认熟知操作流程再进行拍摄。**
2. 为了方便其他同学的拍摄，共聚焦拍摄的原则是：正常拍摄的前提下，来的时候是什么样，走的时候就要还原成什么样。如果进行了任何设置的调整（在软件本身运行没有问题的情况下），走之前务必记得改为原本的设置，关机前务必确认后面是否还有人预约，避免一天内重复开关机。
3. 软件目前不稳定，所以每次开机都可能出现一些问题。为了尽量避免这种情况，请**连续预约**，避免每天多次开机。
4. 荧光光源（④号开关）在**开启至少40分钟之后才可以关闭**，否则对荧光光源使用寿命有影响。
5. 外面实验室的移液枪等物品属于外面实验室，不属于公共测试平台，请尽量**不要借东西**，借完一定要及时归还。
6. 请尽量在**工作日白天预约，预约要连续**。如果预约到太晚，外面实验室可能已经关门了，而且出现任何问题很难保证及时解决。非工作日外面实验室可能没有开门。
7. 如果因为自行操作导致了仪器的损坏，请跟老师说明情况后**联系工程师说明情况并参与仪器的修理**。
8. 除了本课件的“普通操作步骤”中提到的步骤，**其他的操作，尤其是设置方面的更改，一定要先通知老师**。
9. 如果需要切换镜头，务必**擦拭之前使用过的油镜**。如果被发现没有擦油镜，请**自行过来清理整个显微镜**。
10. 如果拍摄过程中出现任何问题，**一定不要关机**，请直接联系老师。

注意事项

11. 放置仪器的桌子不可以压，拍摄过程中尽量避免碰到，也不要放在上面放样品、镜油。
12. 拍摄前务必确认样品的激发、发射波长。
13. 调焦过程中注意样品的高度，如果样品已经被顶起但是还是没有看清楚，考虑换样品或者重新从低向高调焦，不要一直提高Z轴高度，这样可能损坏显微镜。
14. 测试平台不提供盖玻片载玻片以及共聚焦小皿之类的制样工具，请自备。
15. 同一个样品可能会有多个系统判定的最佳焦距，以细胞真实形貌为主要参考。
16. 如果聚焦后看到的视野与真实情况相差过大，可能看到的是染料杂质，和细胞不在同一个平面，可尝试继续调焦。
17. 不透光样品理论上来说也可以拍荧光图像，但是可能不可以拍明场图像。
18. 如果需要对比不同样品的荧光强度，在确认了初始样品的拍摄参数后，在后续拍摄中不可以再调整各种参数以及LUT。如果是老师值班请提前跟老师说明。
19. 仪器使用完毕后请擦干净镜头上的镜油，并检查镜油是否滴到了仪器其他地方。
20. 拷完数据后数据电脑也要关，数据只能使用格式化的U盘通过数据电脑拷贝。
21. 发表文章中如使用本设备的测试数据，请务必备注仪器型号：Nikon A1R+。

仪器位置



面对31教学楼向左拐



沿着学院外围走至拐角处，右拐



位置：31教学楼126、127实验室内部



右拐约10米后进如图所示的门



如果门没开，可以从31教学楼正门进入，从二楼绕过去

再直走约15米到达127实验室 共聚焦仪器所在位置



仪器介绍

一、仪器介绍：



✓ 功能特点：

定位、定性、定量地检测生物样品分子和离子等成分变化、生理功能改变，对生物组织、细胞及其亚细胞结构进行形态学观察等。

尼康A1R+ 激光扫描共聚焦显微镜 (Nikon A1R+) 是一台全电动倒置显微镜。该显微系统支持明场、DIC、荧光的显微观察方式。主机配备Z轴调焦机构，内置智能型1.5倍变倍镜与智能型博世透镜。配有活细胞系统专用培养装置。

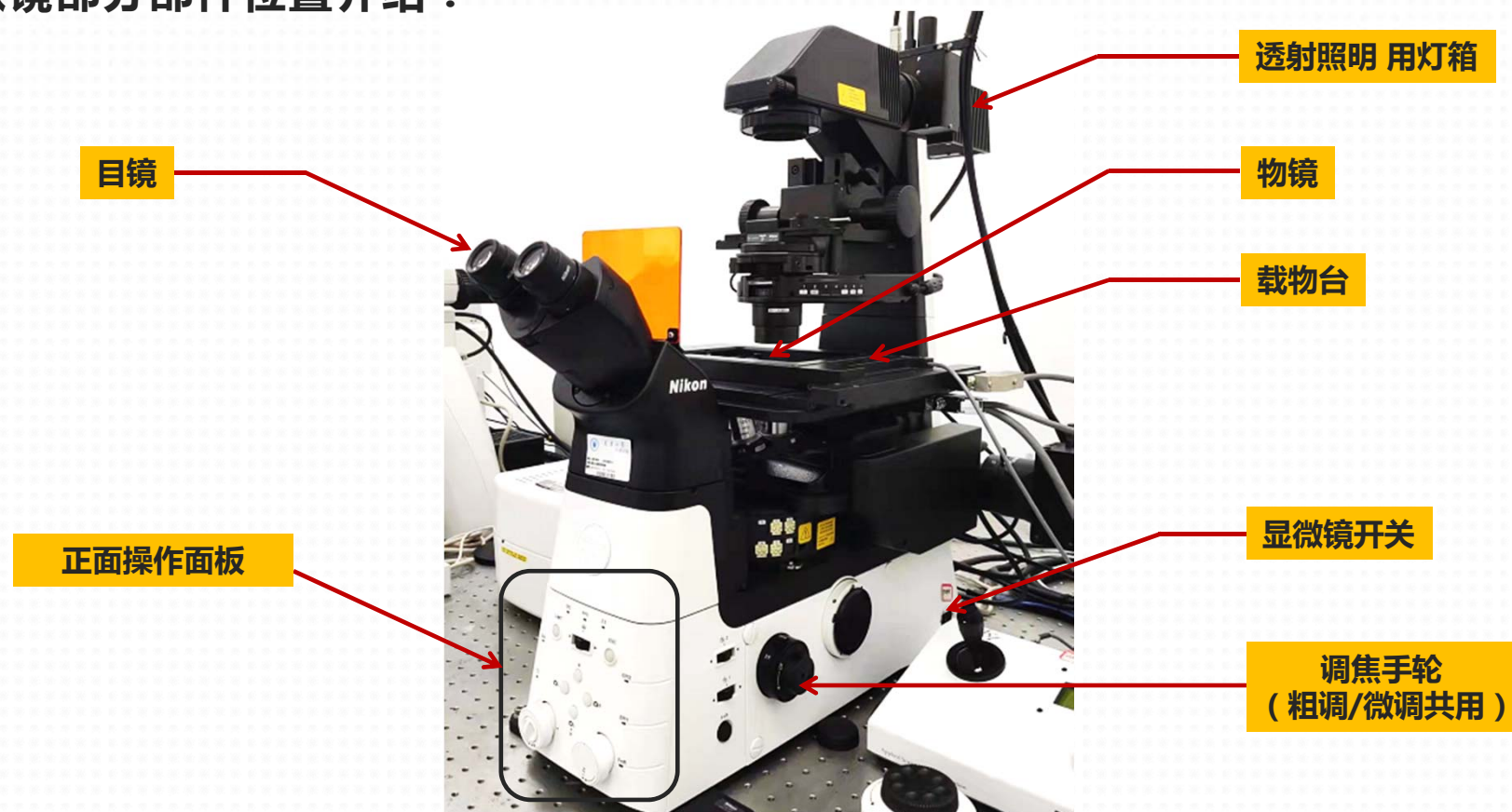
主要有激光光源、汞灯光源、显微镜主机、扫描头、检测器、计算机工作站及活细胞系统组成。

✓ 技术参数：

1. 固体激光器：紫外 (405nm) ；蓝色 (488nm) ；黄色 (514nm) ；绿色 (561nm) ；红色 (638nm)
2. 拍摄模式：高分辨拍摄模式、高速拍摄模式
3. 探测器：PMT+APD混合式磷砷化镓检测器，透射检测器
- 4.物镜：10X/20X/40X/60X/100X

仪器介绍

二、显微镜部分部件位置介绍：



1. 刷卡（不能刷卡联系老师开通）**拍摄步骤（简略）**

1. 刷卡（不能刷卡联系老师开通）
2. 开机：①~⑥开关，每一步之间间隔十秒，待灯光闪烁灯停止后再开下一步（开机切勿太快）
3. 打开软件，选择合适的镜头
4. 放样品（干镜直接放，油镜滴加镜油）
5. 软件上设置需要的光源
6. 选择合适的荧光，调整焦距，找到合适的视野
7. 调整为共聚焦模式，Live模式下实时观测，微调焦距，调整荧光亮度
8. 拍摄图像（注意是否设置有标尺）
9. 保存ND2和TIFF格式图片
10. 换样品或直接重复6~9步骤
11. 拍摄完毕，取出样品，油镜必须使用酒精和擦镜纸擦拭镜头
12. 高度（Z）调整为0，调整至BF模式
13. 关机：⑥~①开关
14. 刷卡，登记

开机操作

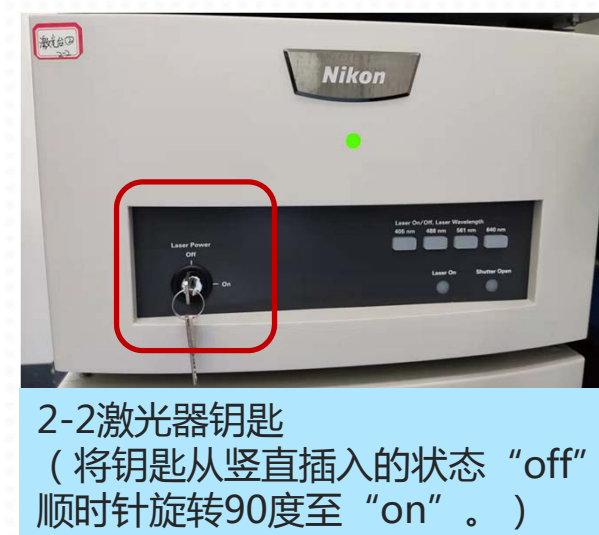
开机顺序（首先刷卡接通电源）：

务必按照顺序进行开机，每个开关打开间隔至少10秒，不可以太快

1、启动计算机工作站，打开显示器开关

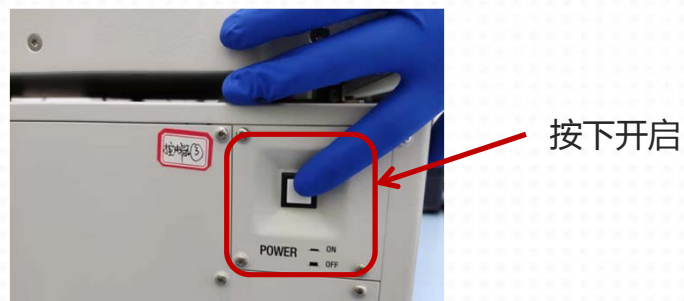


2、打开激光台控制器（顺序打开2个开关2-1、2-2，待全部指示灯亮起）



开机操作

- 3、打开A1R控制器主体侧面上的开关
(注：开关被按下的状态为“on”。)



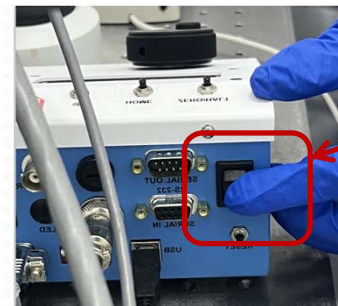
- 4、打开荧光光源（汞灯）
(注：待 LAMP指示灯变成黄色，方可进行下一步，荧光灯开启40 min以上方可关闭。)



LAMP指示灯（上方），开启后“黄色”，待黄灯不再闪烁后进行下一步，且荧光光源开启时间不得少于40分钟

电源指示灯（下方），开启后“绿色”

- 5、打开载物台控制器



开关在载物台控制器的背面

开机操作

6、打开打开倒置电动显微镜

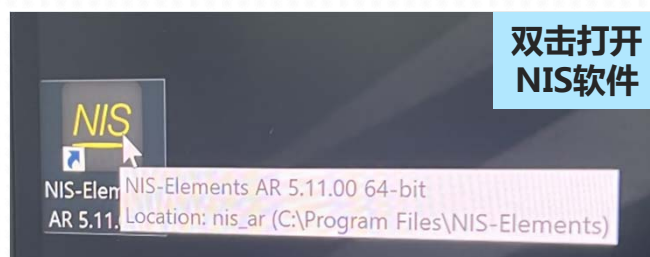


显微镜
开关

显微镜启动后指示灯状态



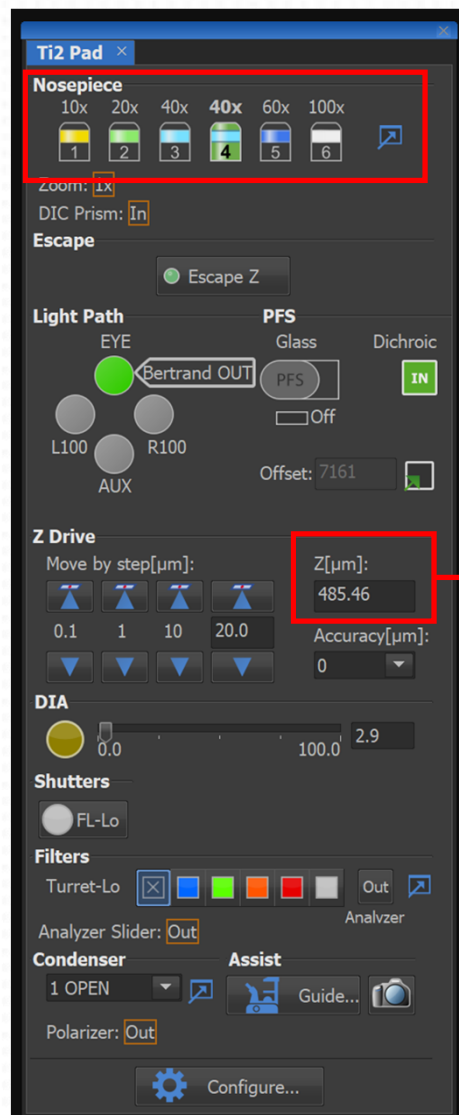
7、打开NIS软件



开机总结：尼康A1R+ 激光扫描共聚焦显微镜开启顺序为①主机—②激光台（2个开关2-1，2-2）—③控制器（左侧）—④荧光光源—⑤载物台控制器—⑥显微镜。

注意：大家一定严格按照开机顺序开机，每一步都要等开启稳定后，再进行下一步。最后待各部件都稳定后再打开NIS软件。

选择镜头



选择合适的镜头



干镜

油镜



镜头高度

一般使用盖玻片载玻片进行拍摄时高度为4000~5000 μm，可先调整至4000 μm

切换镜头前，将Z调整至485.46或0

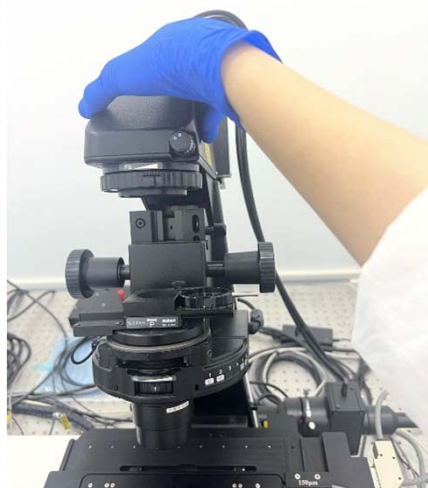
如果选择油镜进行拍摄，需要在镜头上滴加1~2滴镜油（勿滴过多以防流出镜头）

放样品

目前该仪器支持**盖玻片载玻片**、**共聚焦小皿**、以及**孔板**的拍摄。注意，共聚焦小皿以及孔板需要使用**共聚焦特制的**，普通孔板不能进行拍摄。**如果需要拍摄孔板，需要更换孔板适配器。**

样品的制备：如使用盖玻片载玻片进行拍摄，可将液体滴加**4 μL** 在载玻片上，盖上盖玻片进行拍摄。若滴加液体过多，则有盖玻片脱落的风险。**注意，拍摄时盖玻片是朝下放置的。**

样品的放置：

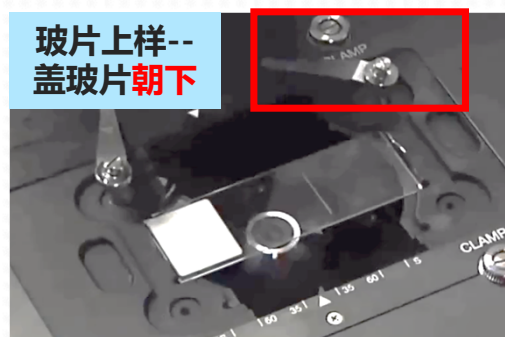


扶如图所示的位置将明场光源抬起，注意**不要碰到其他任何按键**

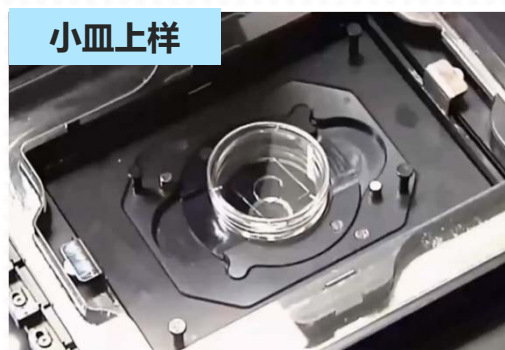


调整载物台到合适的宽度，放置盖玻片或者共聚焦小皿

不要用这个压载玻片



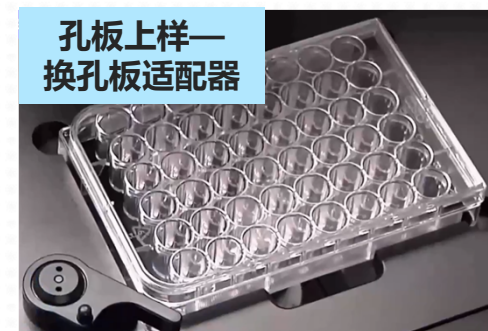
玻片上样--
盖玻片朝下



小皿上样



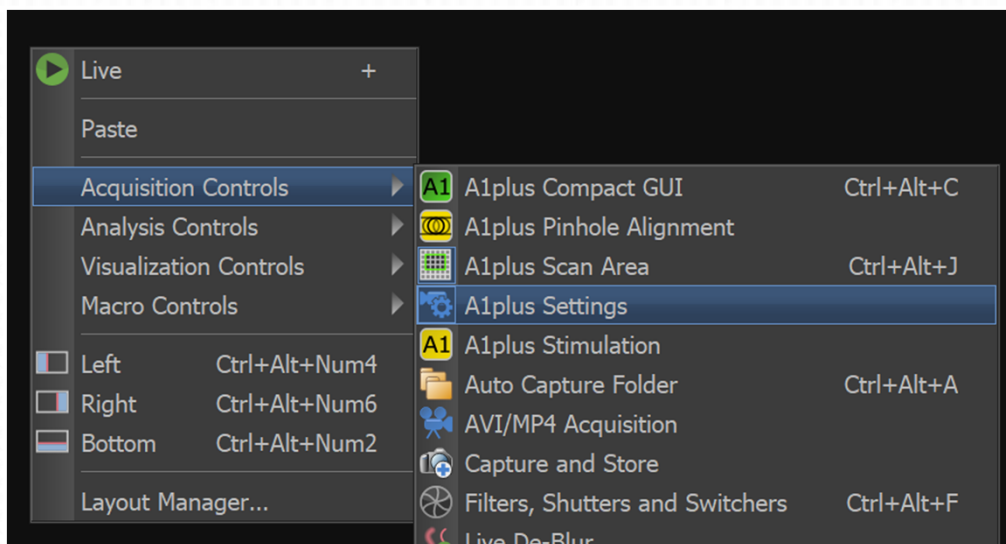
孔板适配器



孔板上样—
换孔板适配器

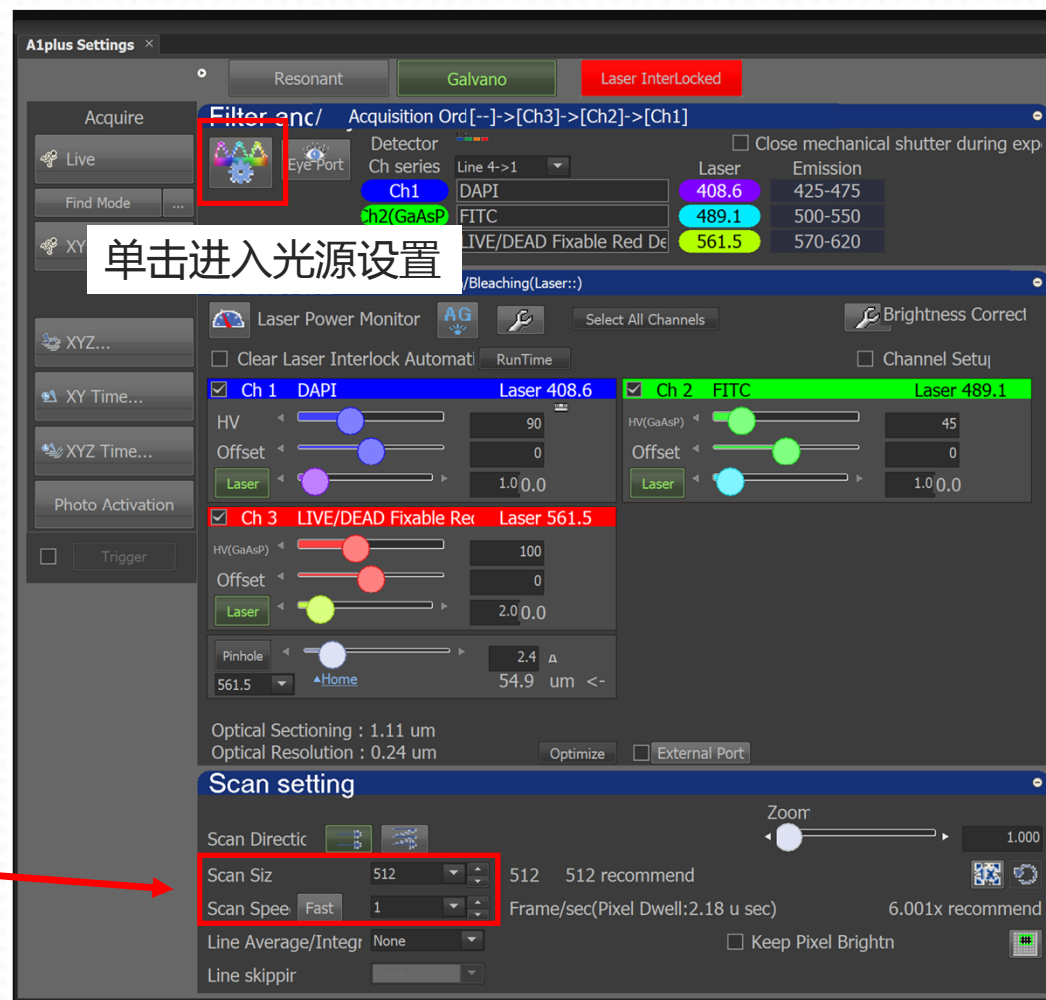
将孔板右上侧直入孔板适配器，拉开孔板固定压扣确认孔板平稳放入适配器后松开压扣，完成孔板上样。

程序设置



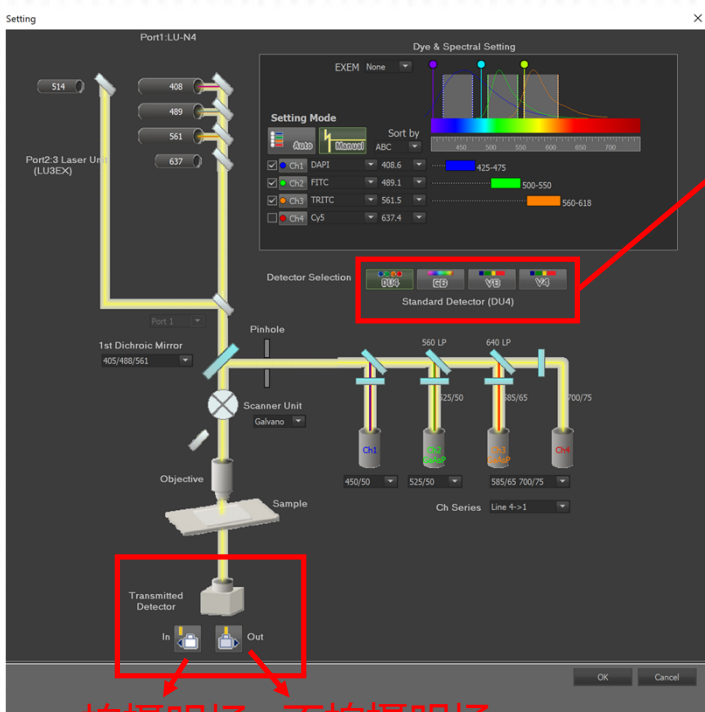
右键空白处选择A1 plus settings

预览时Scan size可设定为512
 Scan speed设定为1
 拍摄时Scan size可设定为1024
 Scan speed自动设定为0.5
 这样预览速度较快，并且拍摄时清晰度较高



程序设置

单击后出现如下图所示光源设置界面

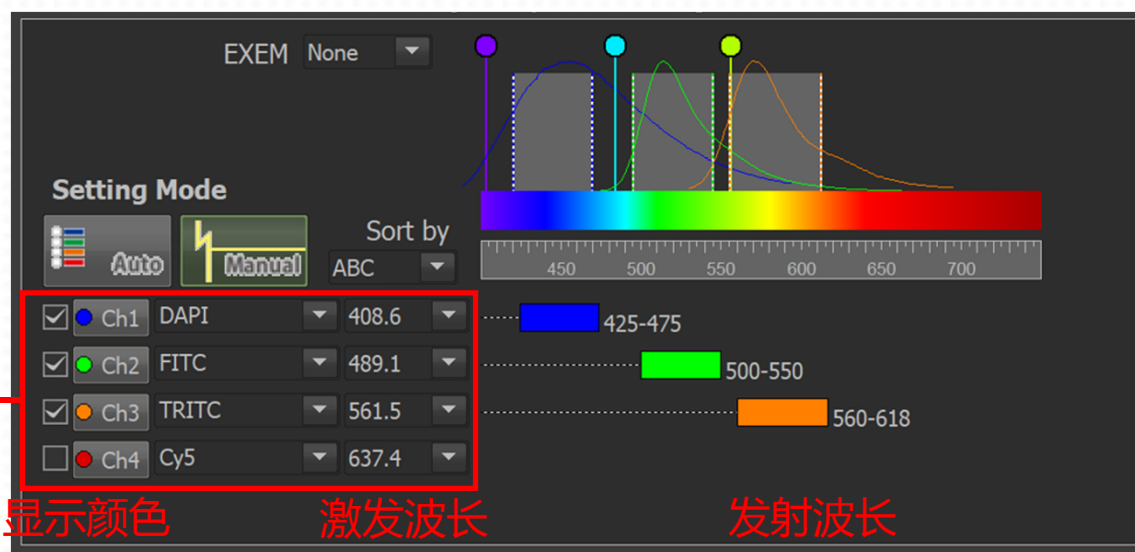


拍摄明场 不拍摄明场

3. 如果需要明场拍摄，点击In



1. 选择拍摄通路，一般常用DU4通路



显示颜色

激发波长

发射波长

染料名称

2. 选择需要的荧光光源

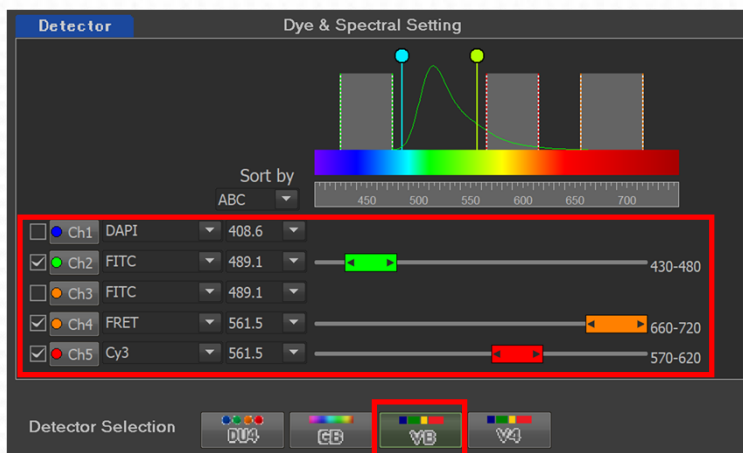
默认有如图四种染料：DAPI，FITC，TRITC，Cy5

注意染料的激发和发射波长

一般情况下为Auto模式，即颜色、名称、波长均不能更改（图上为Manual模式），若拍摄时如上图不符，可以单击Manual按照上图进行调整。

程序设置

如果这四种染料均不符合拍摄的需求，可以选择VB模式拍摄

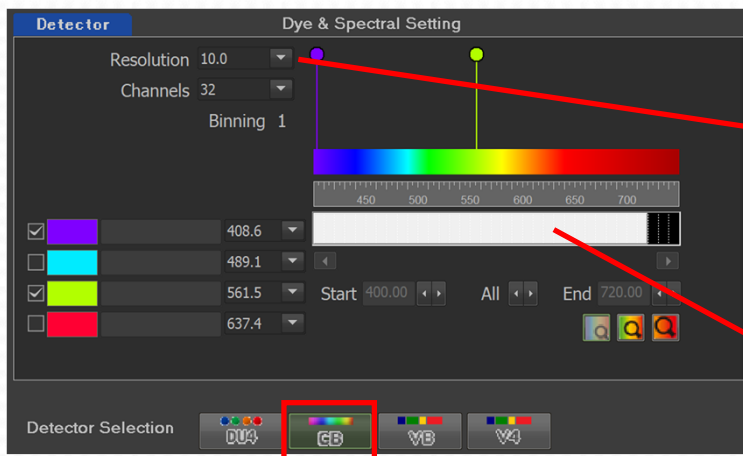


该模式下，显示颜色、染料名称、发射波长、激发波长均能更改。

注意，显示颜色指的是共聚焦模式下最终成像的颜色，可以不是真实颜色，拍摄人员可以根据自己照片的需求进行更改。

提示，在首次使用VB时记得拍照留存此次拍摄参数。

如果仅知道激发波长，不知道发射波长，可以选择GB模式拍摄

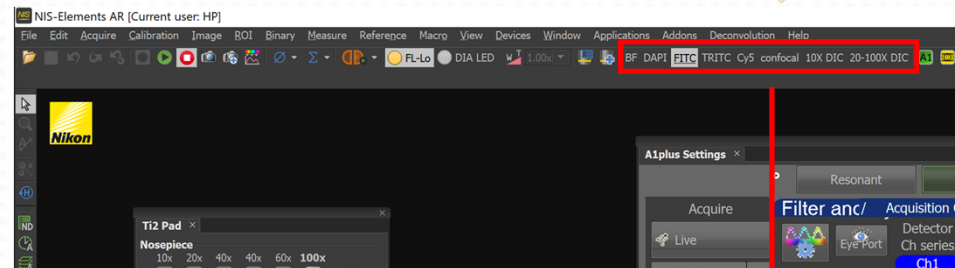


(如图所示为间隔10 nm)

选择激发波长后，每间隔一定波长进行拍摄，以找到材料发光的范围

拖动选择需要扫描的范围，在下面的“start”和“end”处有显示具体范围

荧光模式



明场模式 荧光模式 共聚焦模式

找样品时可以选择**明场模式**或**荧光模式**。如果材料**荧光较明显**，且荧光激发波长和以上四种染料对应的激发波长相近，则选择合适的荧光模式找需要的视野。如果没有相符合的荧光光源，可以选择明场模式找样品。

下面介绍荧光模式找视野

1. 单击需要的荧光，如FITC，随后在目镜处观察，打开荧光灯开关，调整焦距，进行对焦。

使用油镜时镜油与玻璃片会有直接接触
如果材料荧光易淬灭，可调整荧光灯亮度。



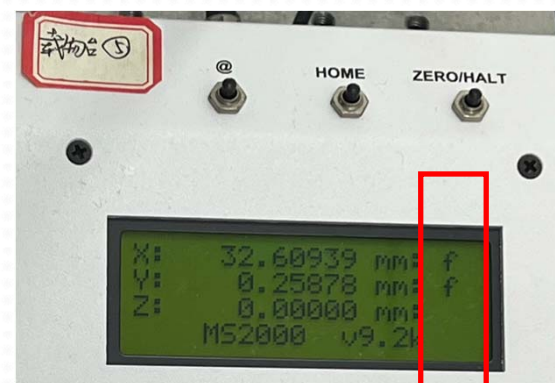
荧光灯强度切换按钮（左减 / 右增）

荧光手柄



2. 转动准焦螺旋进行对焦，如果调整至最佳焦距处，仪器会发出“哒哒”的声音。

3. 转动控制器选择需要的视野。按控制器上的按钮可以切换视野转动的速度。



视野转动的速度有f和s两种
显微观察时一般为s模式，
上样时如果需要改变载物台的位置可以选择f模式

明场模式



1. 在光源设置时选择明场后，点击上图所示BF模式



2. A1 plus setting中找到如图所示窗口，点击OUT，随后可以看到明场白灯亮起，可以进行对焦。对焦完毕后点击IN才能正常进行明场的拍摄

共聚焦模式

4. 实时观察窗口，进行亮度等调整，可以转动鼠标滚轮微调焦距

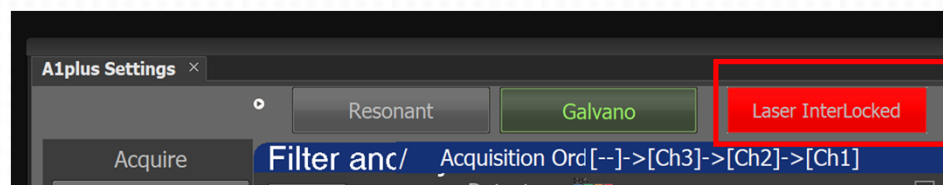


明场模式

荧光模式

共聚焦模式

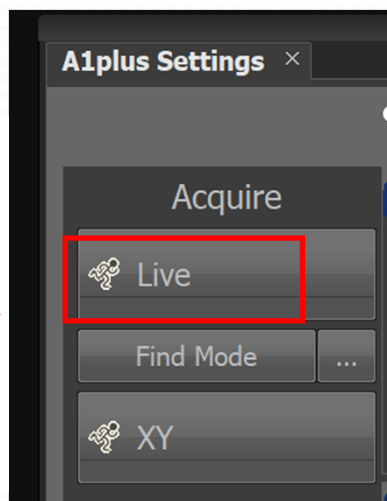
1. 点击上图confocal进入共聚焦模式



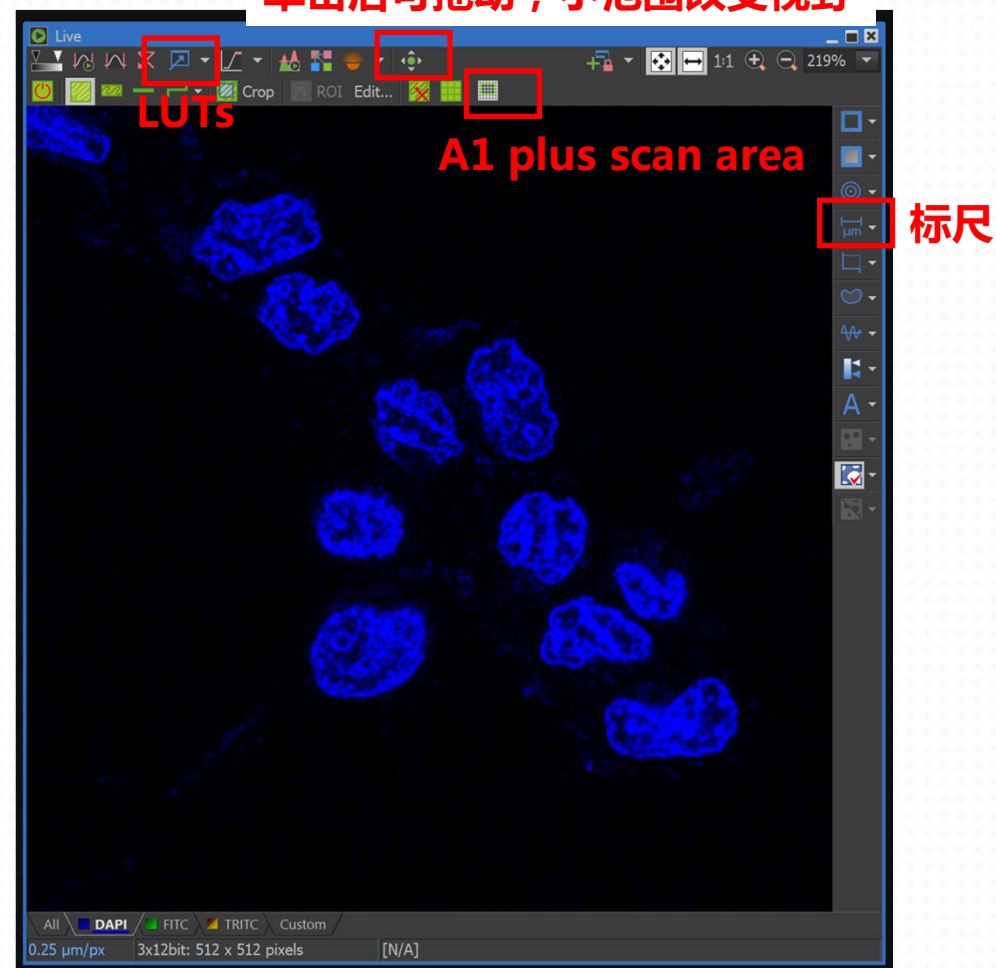
2. 点击红色的激光锁

3. 点击Live进行实时观察
此时可以听到仪器发出运行的声音

如果没有声音但是有图像，
请检查A1 plus scan
area中zoom的倍数是否
为1，详见下文

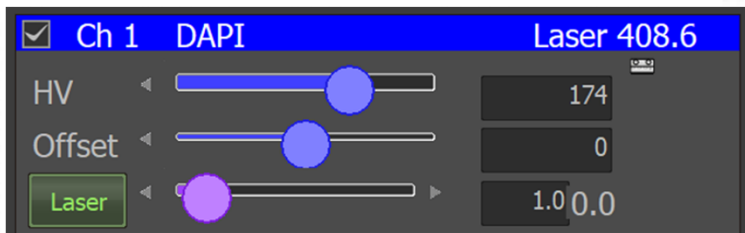


单击后可拖动，小范围改变视野



共聚焦模式

4. 实时观察窗口，进行亮度等调整。
每个光源的亮度要分别调整



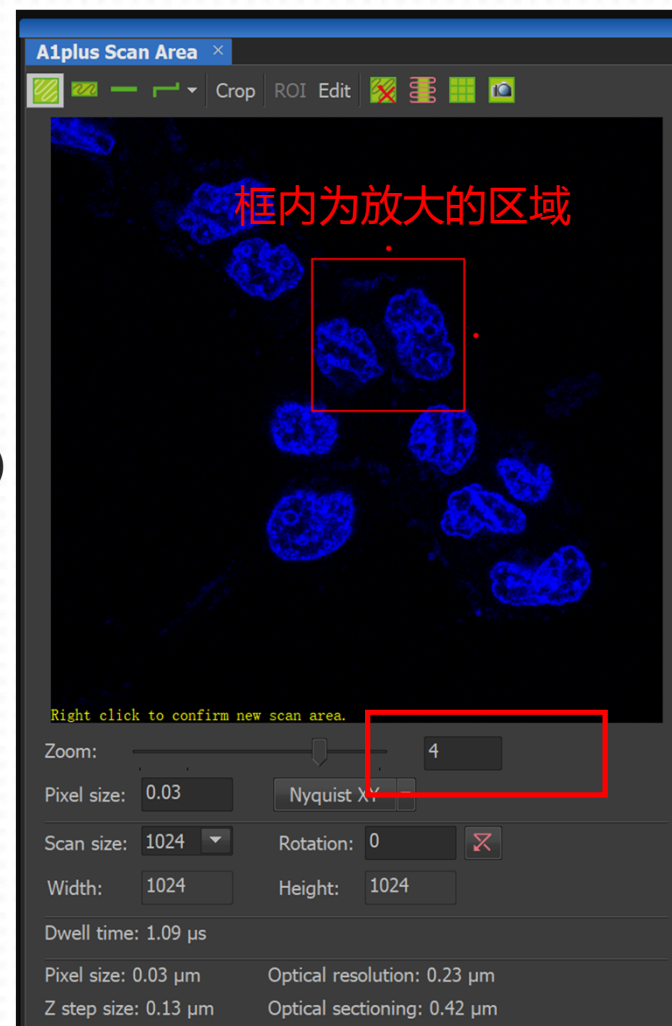
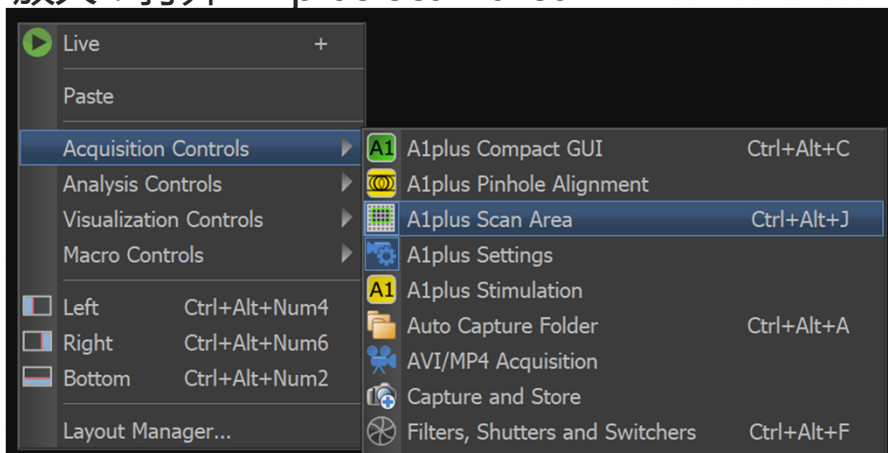
HV：调整荧光亮度

Offset：调整背景噪音亮度（一般为0）

Laser：调整激光强度（优先调整HV）（该值一般为5以下）

5. 特殊操作：放大、调整背景噪音

放大：打开A1 plus scan area



选择放大的倍数，选择放大区域，单击右键
拍摄完毕后要改为1。

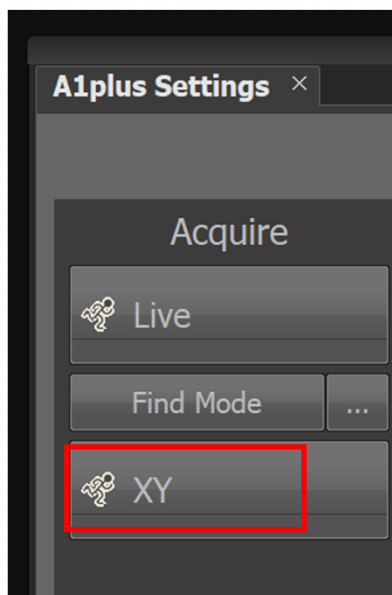
注意：该局部放大功能不会比原图更加清楚，因为物镜倍数是没有改变的。

调整背景噪音
打开LUTs模式（见前两页）
上下拖动斜线，可以改变背景噪音大小。



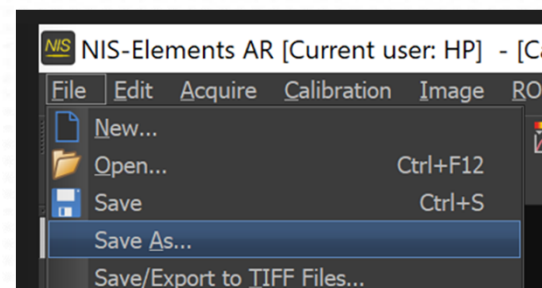
共聚焦模式

6. 拍摄，点击XY



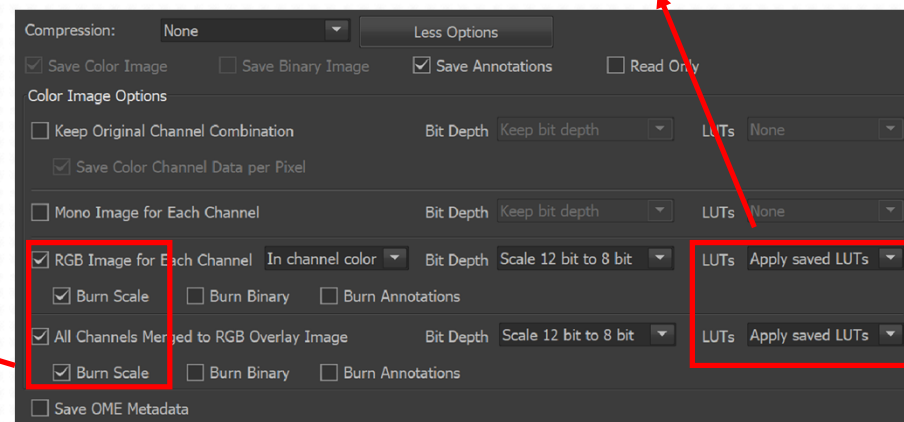
勾选后图片才有标尺
若未勾选，即使live中有标尺，最终图片中也没有。（一般无需修改只做检查用）

7. 保存



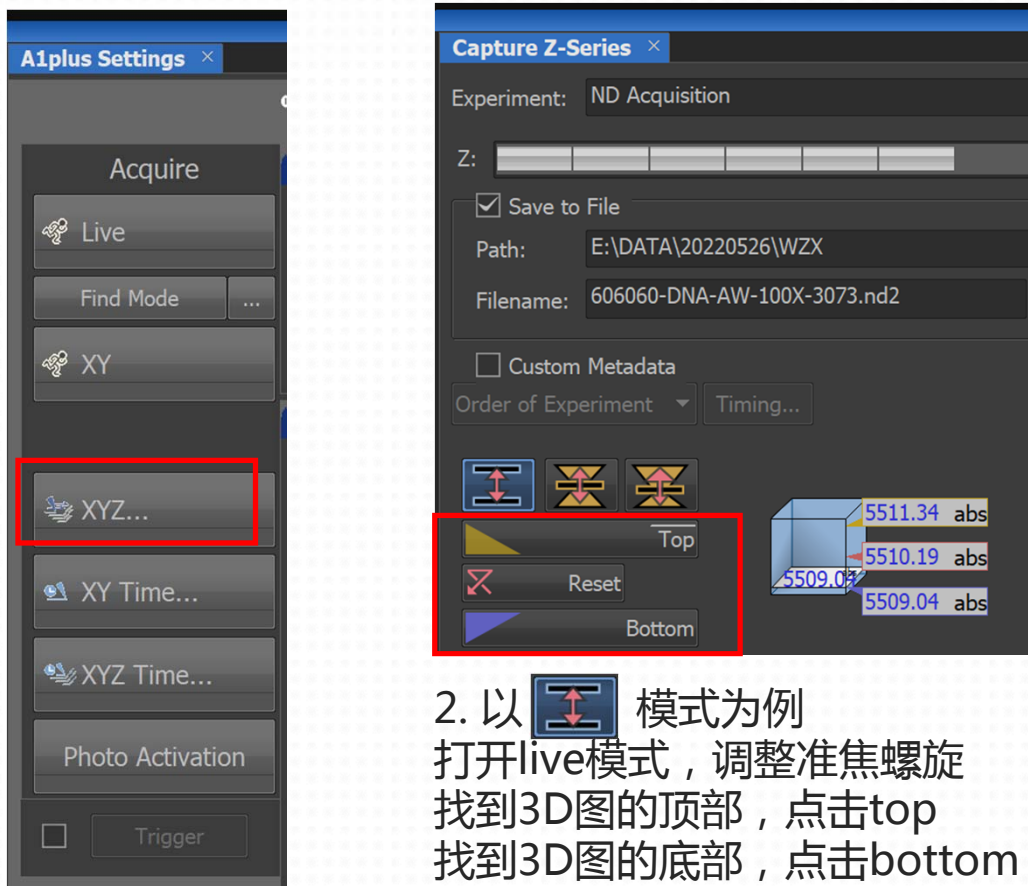
保存至桌面“Data”文件夹
新建当天日期文件夹，再新建学生名字文件夹
分别保存 **ND2 Image File Format (*.nd2)**
和 **Tagged Image Format (*.tif;*.tiff)** 格式。

更改LUT后的设置




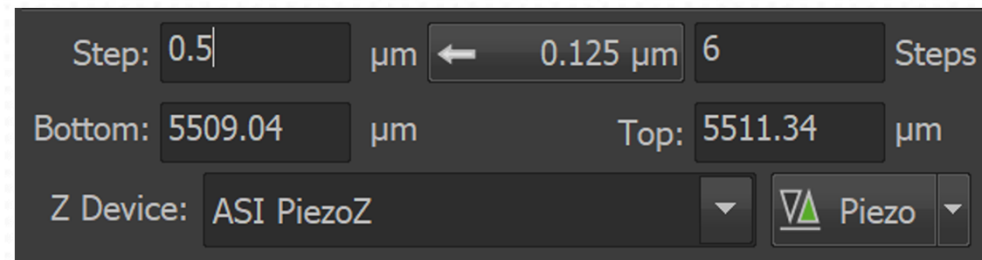
3D图拍摄

在找到视野并调整好亮度后进行3D图拍摄
该模式下首先会拍摄一定Z值范围内的一组共聚焦图像

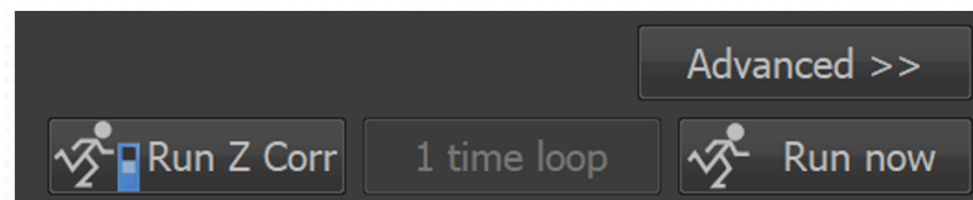


1. 点击XYZ

2. 以  模式为例
打开live模式，调整准焦螺旋
找到3D图的顶部，点击top
找到3D图的底部，点击bottom
也可以手动输入top和bottom的Z值

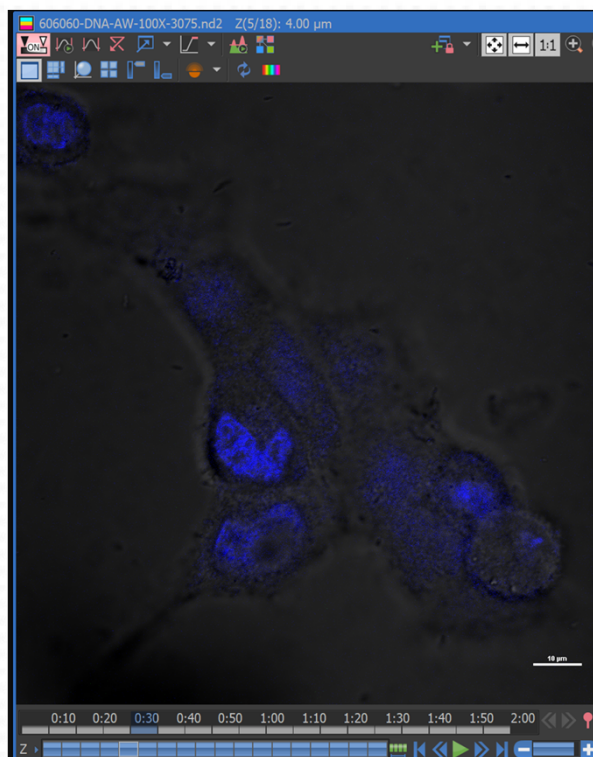


3. 输入step值，即每一张图之间间隔的Z值，或者直接输入需要多少个steps

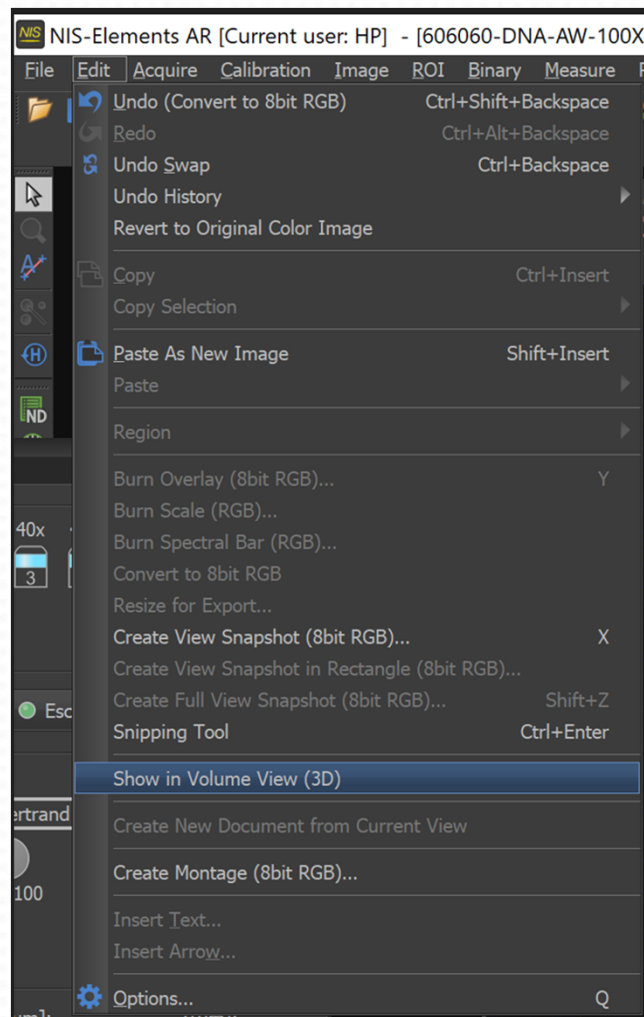


4. 点击 Run now

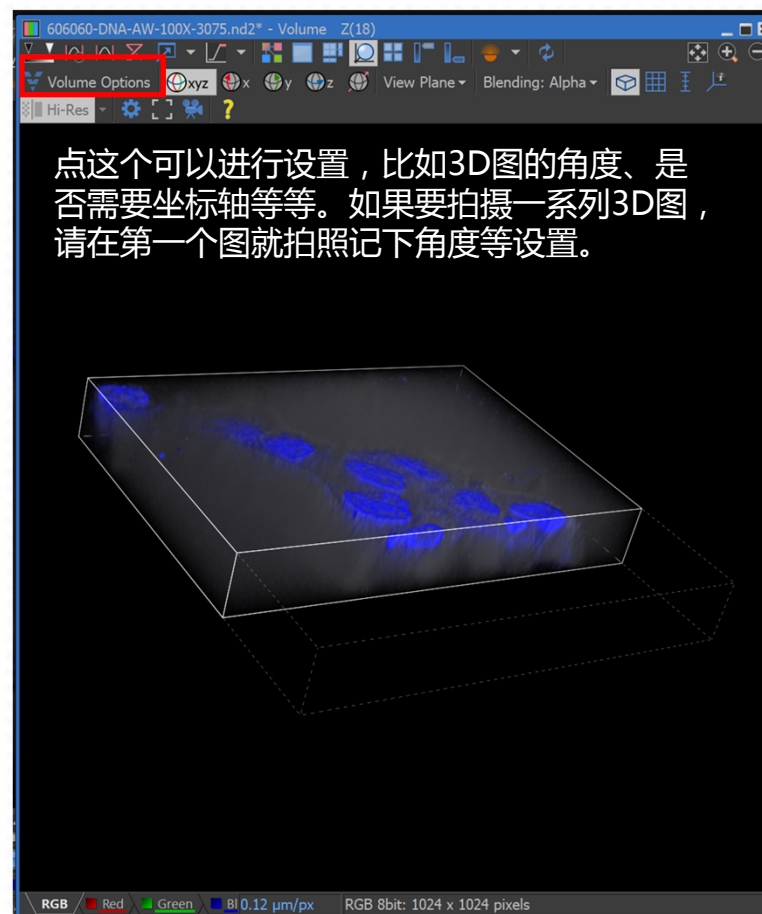
3D图拍摄



5. 得到一系列平面共聚焦图像
保存单个图：选择图片，按住 alt，拖出来，保存

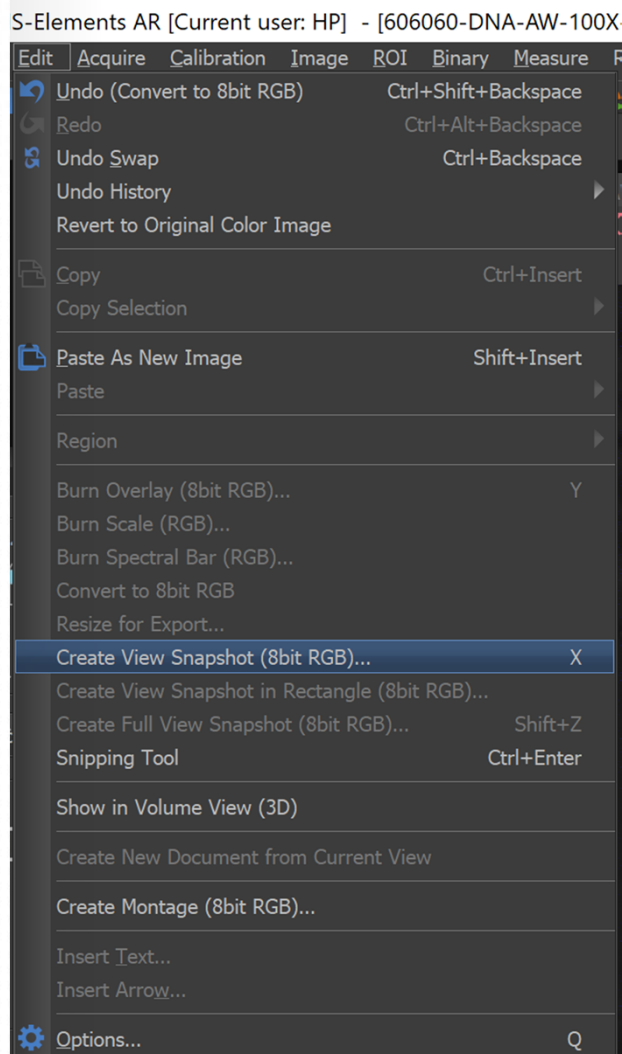


6. 得到3D图像



7. 可以改变3D图的角度，左键+ctrl拖动边缘可以得到截面

3D图拍摄



8. 点击create view snapshot (8bit RGB)

随后可以按照正常步骤保存3D图

注意，3D图一般都会显示为red, green, blue三种通路，“RGB”通路下为你需要的图片。

**拍摄完毕之后可以回到荧光模式找该样品其他视野进行拍摄
也可以换样品**

注意，油镜换样品可能需要重新滴加镜油

关机操作

1. Z高度设置为0
2. 调整至BF模式



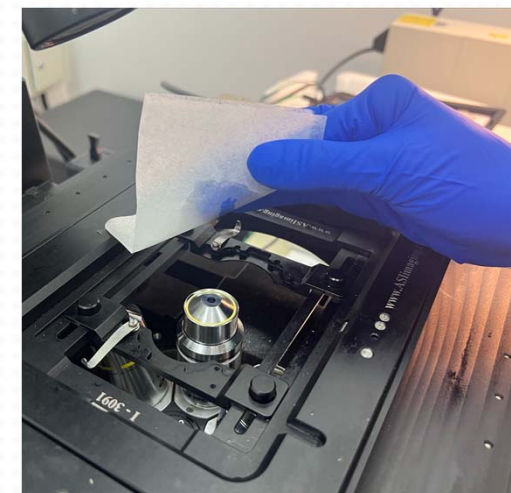
3. 拿下样品，油镜需要用酒精擦镜头



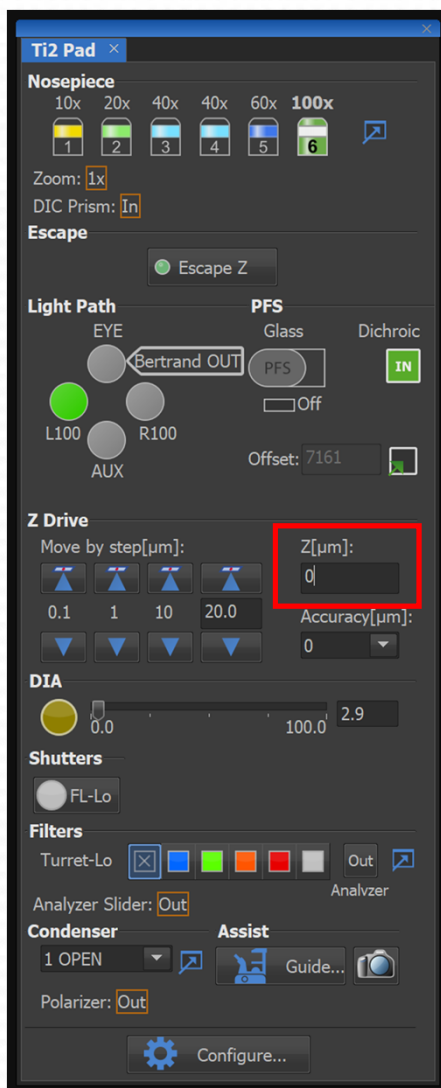
①撕一张擦镜纸



②对折后滴加酒精



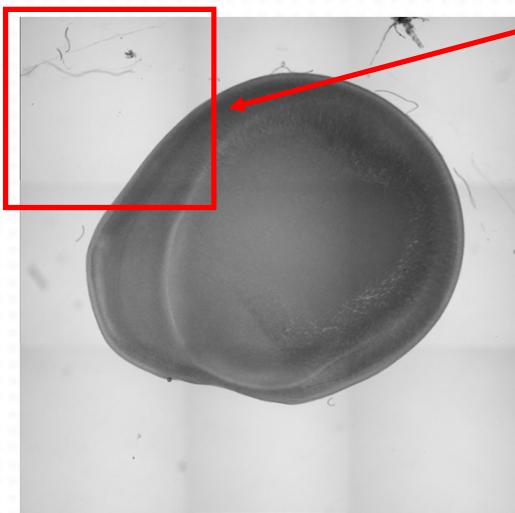
③用指腹由外向内打圈擦拭镜头



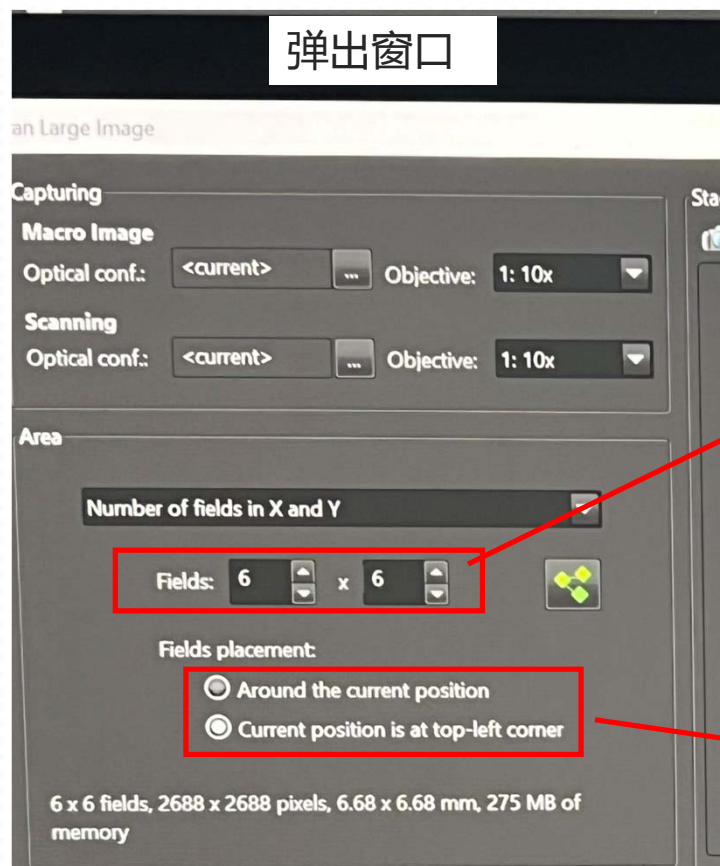
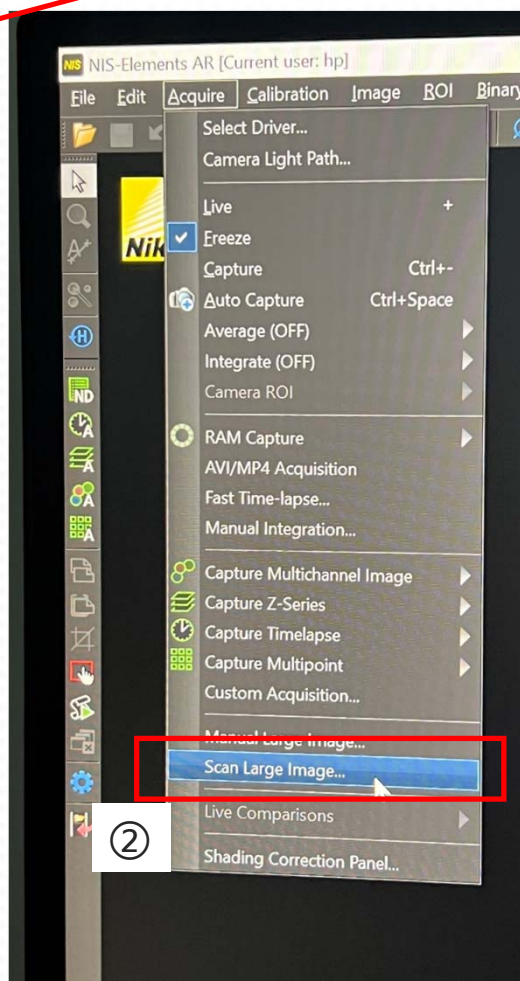
大图拍摄

大图就是多个小图拼在一起的大图，可以用于拍摄非常大的样品，也可以拍大3D图。

①首先在显微镜视野下找到大图**左上角视野**，并通过共聚焦调整亮度至最佳效果。保持这个视野的位置（共聚焦模式）。



示例图，可以看到是由九个小图拼成的大图。
原材料为肉眼可见微米级，半径大约5 mm。
明场图的拼接痕迹会更明显，荧光图看起来更自然。

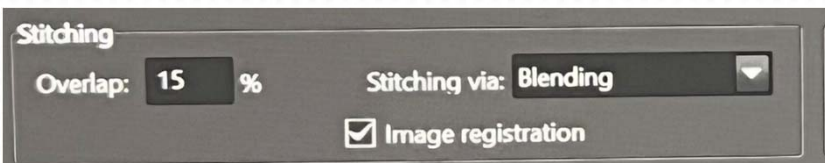


弹出窗口

拍摄的图大小，即由几个原本大小的图拼成，可以多尝试几个参数

当前视野在大图中的位置，一般为左上

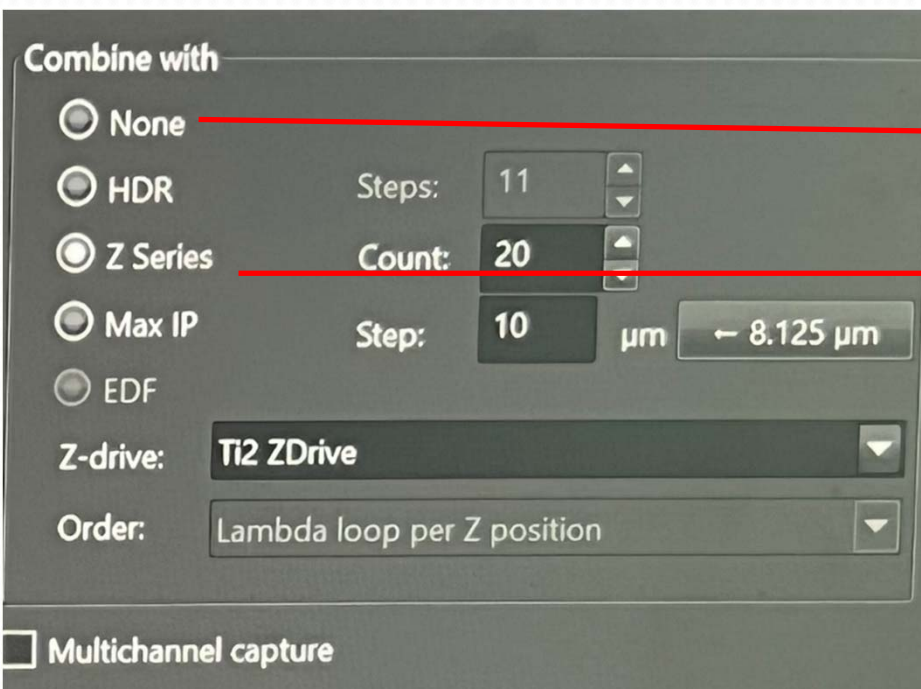
大图拍摄



小图中连接部分的重合率，最小为15%



设置完后点scan进行拍摄
注意，拍摄时是**共聚焦模式**
拍完后按照常规步骤进行保存即可



拍2D图选这个

拍3D图选这个

Step指的是每一层之间间隔的高度，一般大图尺寸较大，间隔不需要太小，微米级别即可

Count指的是拍多少张

拍的高度跨度越大，拍摄时间越久

PFS模式

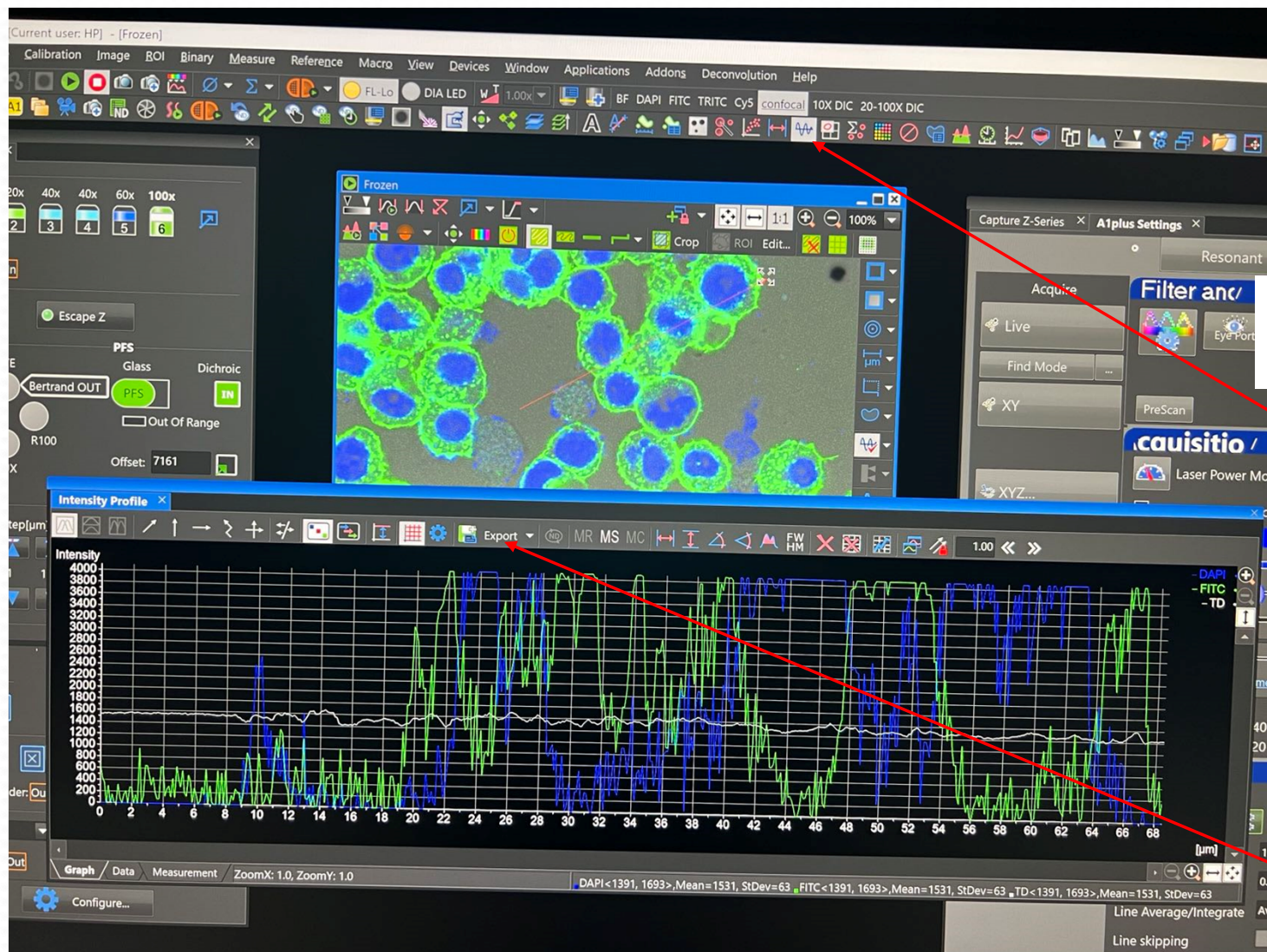
PFS模式可以锁定焦距，比如拍摄液体中的细胞，锁定之后即使细胞上下漂浮，仪器也能自动追踪最佳焦距。
(使用完记得恢复原来设置)



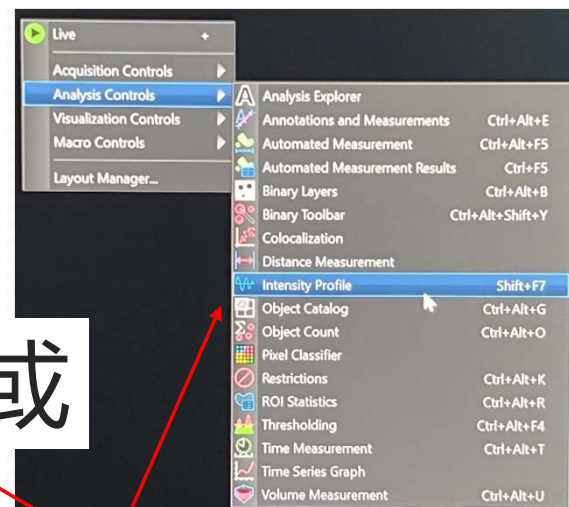
锁定后如果需要调焦，转动红框中的部位进行调焦。

荧光强度

方法1



或

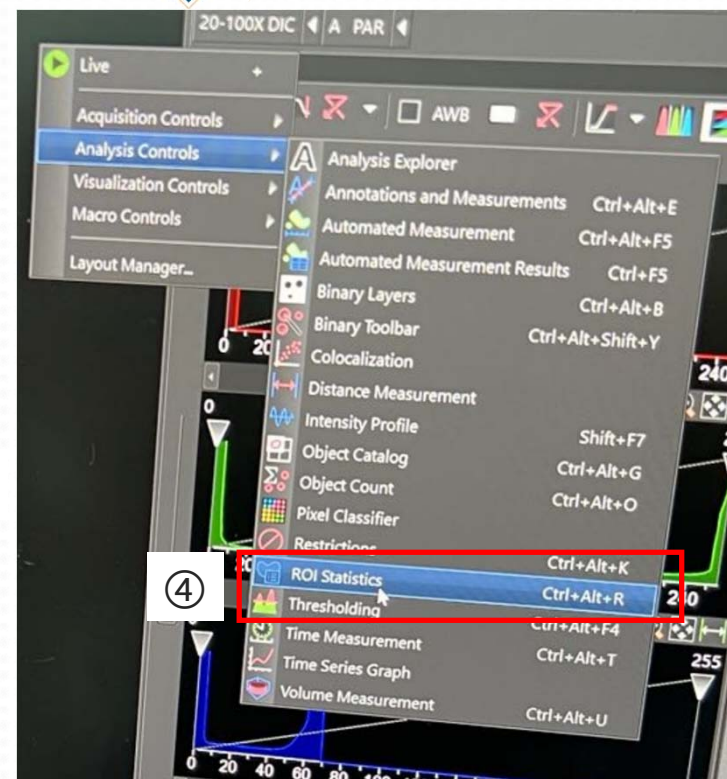
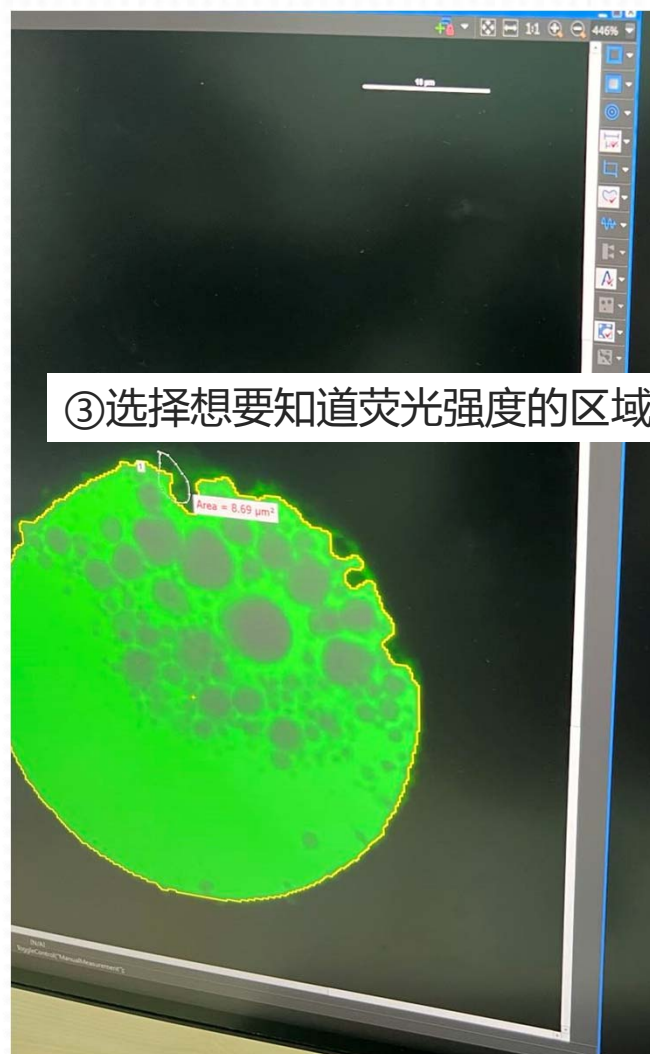
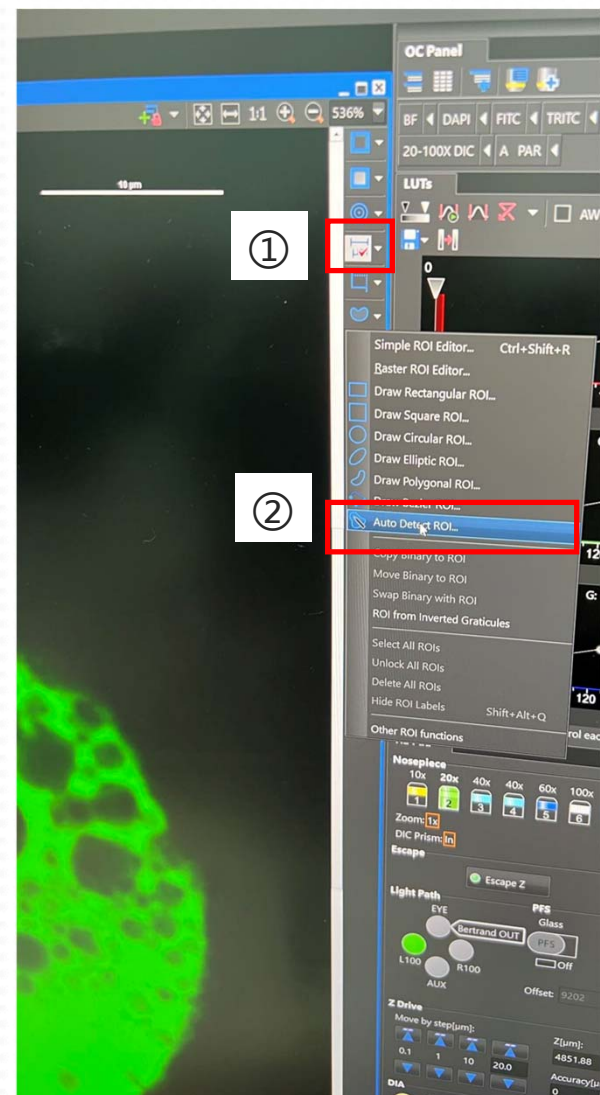


点这个，然后在图上画一条线，可以得到这条线上的荧光强度，如下图所示

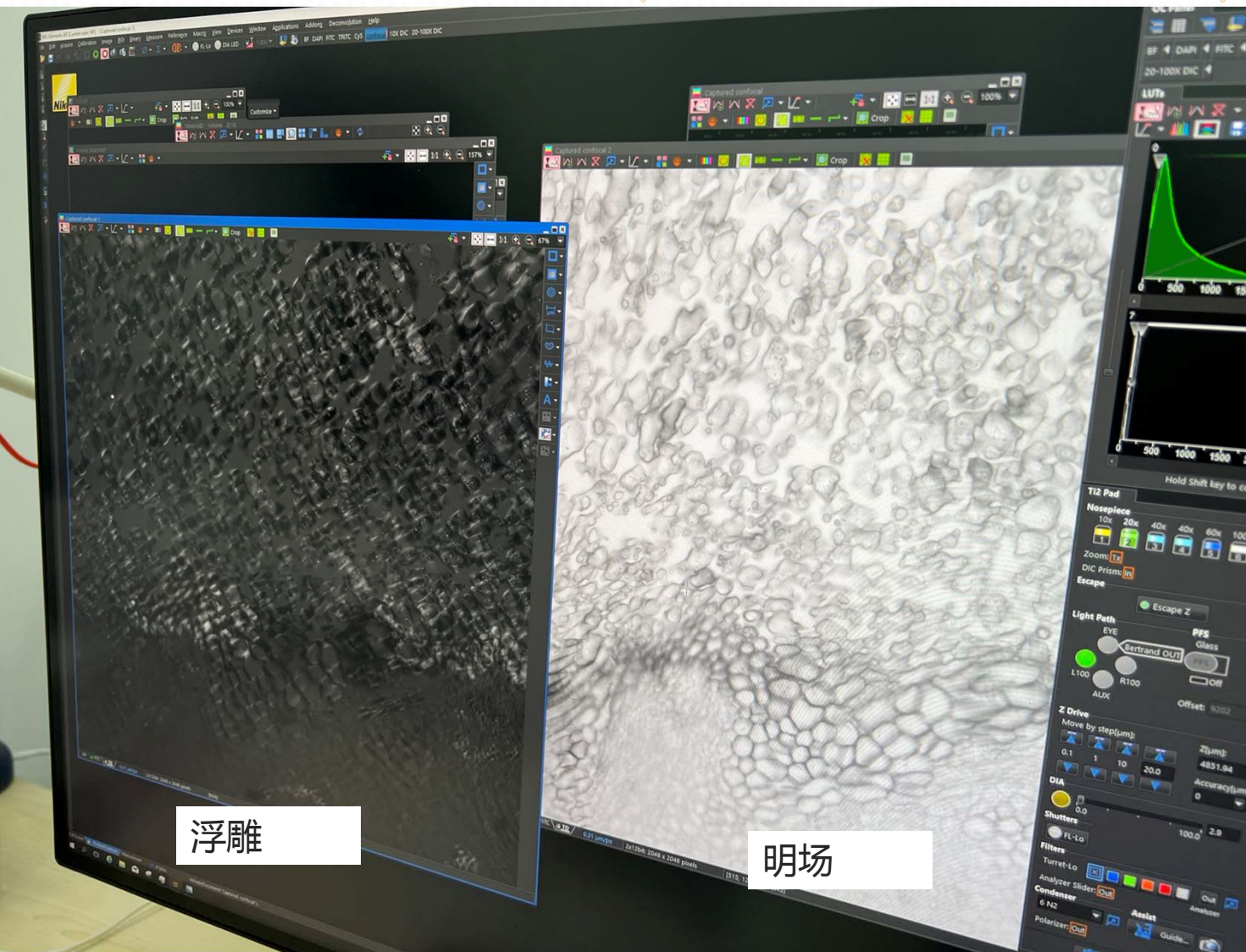
导出数据

荧光强度

方法2



浮雕拍摄



浮雕

明场



推动至下图所示位置即可

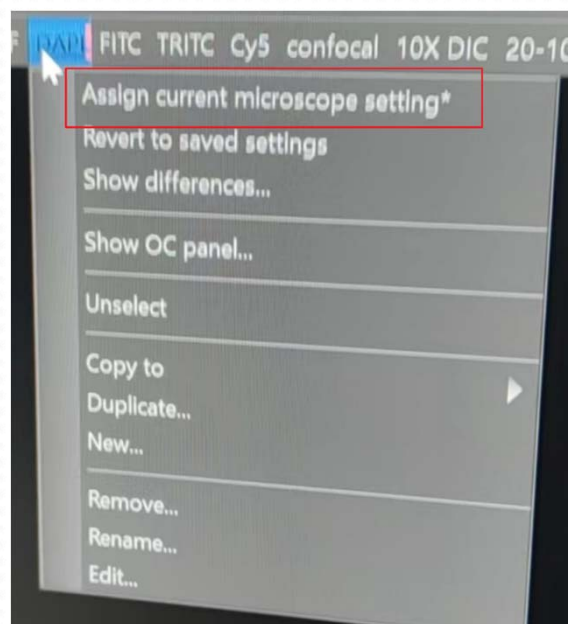
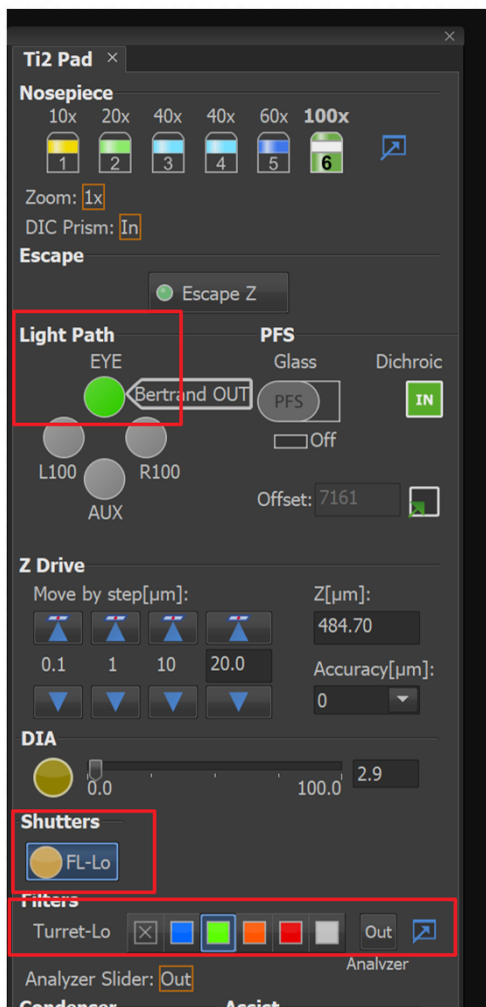


拍完记得推回原来的位置!!!

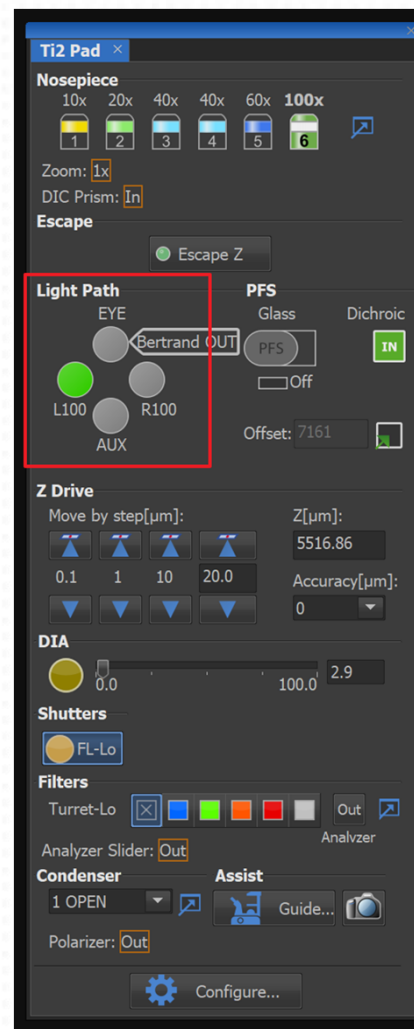
常见问题

1. 荧光没有光、共聚焦模式的激光锁关不掉（这两个问题一般同时出现）

①以FITC下的设置为例
左图所示为正常设置
请检查红框下的三个地方是否与图上一致
调整成和图上一样的设置
按照光源选择对应的filter



②修改完设置后荧光开关后面会出现感叹号
选择如图所示的选项，感叹号消失。
将四种荧光全都进行上述修改

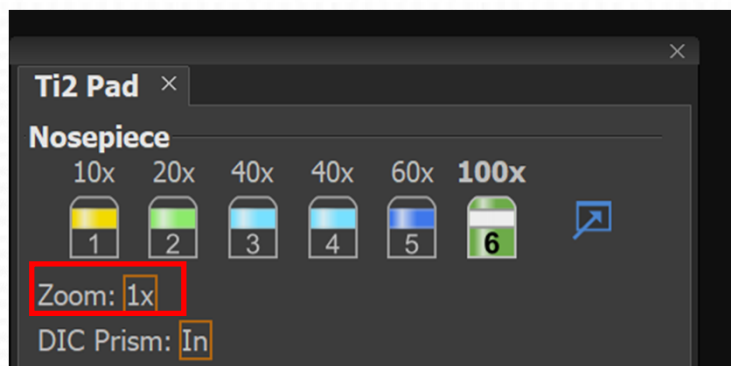


③左图所示为激光模式下的正常设置
注意红框的设置
更改设置后按照同样需要取消感叹号

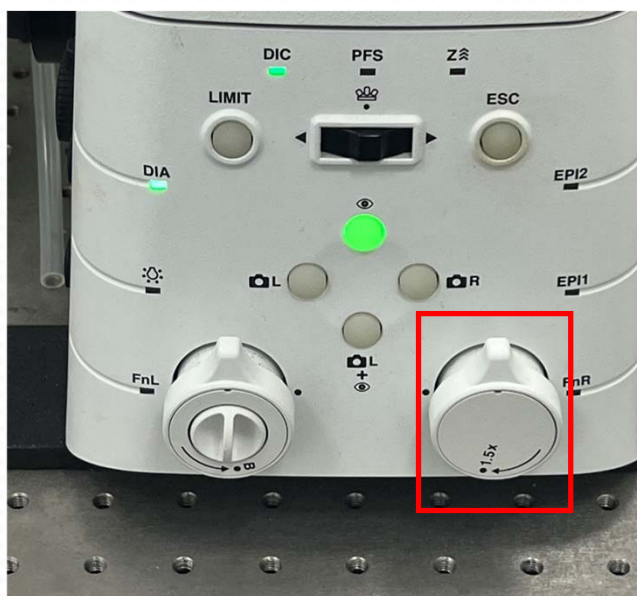
常见问题

2. 放大倍数有问题

就是在前文提到的A1 plus scan area中的zoom也是1的情况下放大倍数还是有问题



即红框处不是1x



解决方法：转红框中的旋钮至如图所示位置

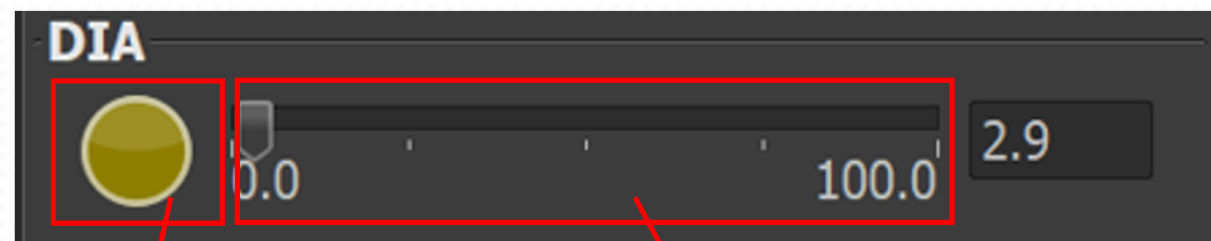
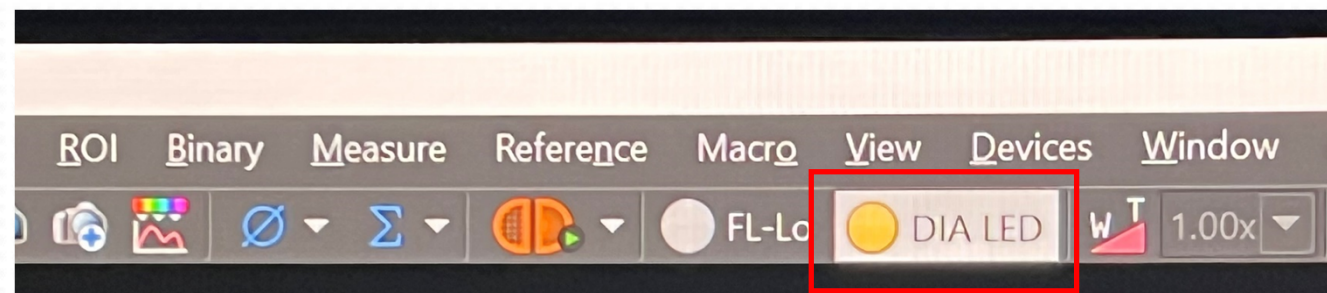
常见问题

3. 明场不亮

①检查是否为“o”朝上



②检查红框内是否为选中状态



DIA LED (与上图效果相同)
(图上为未勾选状态)

明场光源亮度

选中后取消BF旁边的感叹号

注意，仅在明场显示不出来的情况下可以作如上更改，并通知老师
如果一切拍摄正常，请不要改这些设置！！！！

常见问题

4. 荧光下可以看到样品但是激光模式下看不到
可能原因：

1) 仪器有问题：调整LUT后连背景噪音都没有，完全没显示；或者肉眼不可见有激光打下来
检查所有设置、开关，上报管理员。

2) 仪器没有问题：调整LUT后能看到背景噪音，也可以看到有激光打下来
可能的原因：

① 激发和发射波长不对应。荧光能看到说明激发波长应该没问题，但是发射波长有问题。可以重新确认发射波长，或者使用“GB”模式，测试发射波长范围。

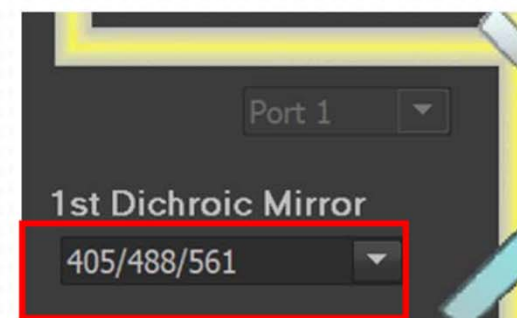
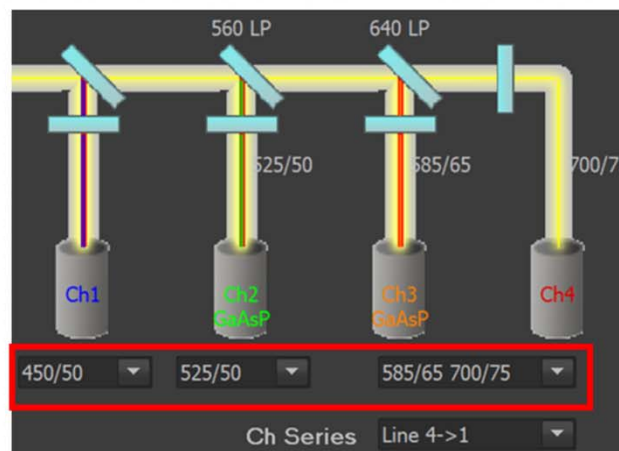
② 检查设置，仅选择需要的激光，不要勾选不需要的激光。

③ 检查DU4或VB的设置（激发波长、发射波长、染料名字）

3) 仅DU4模式下没有显示，尤其是除了DAPI之外的三种光源
调整为Manual模式

按照右图修改，尤其是两种红光的光源，可以分别尝试
585和595波长

注意，在2023年2月维修过后较少出现这个问题，
调试前请先咨询老师。



常见问题

5. 在拍摄**很长**时间（至少40分钟）之后荧光光源熄灭，或者荧光模式下没有光
荧光光源（④号开关）过热，关闭⑥⑤④开关，等待15分钟以上，待荧光光源温度降低后，再重新打开④⑤⑥开关进行拍摄。
6. 软件打开时报错
开机过快或者开机顺序不对，按顺序关机后重新开机。
7. 样品调焦困难
可能原因：样品没有放平、镜油不够、载玻片没有倒置、染色失败等等。

T H A N K S

