

文件编号：Q/WU FLHA19090026R020

版本号：V1.0

受控状态：

分发号：

物质科学公共实验平台

质量管理文件

激光共聚焦显微镜 LSM900

标准操作规程

2023 年 03 月 24 日发布

年 月 日实施

物质科学公共实验平台 发布

物质科学公共实验平台

目录

一、 目的.....	5
二、 范围.....	5
三、 职责.....	5
四、 显微成像实验室安全管理规范.....	5
五、 显微成像设备管理规范.....	6
5.1 激光共聚焦显微镜 LSM900 使用制度.....	6
5.2 预约制度.....	6
5.3 培训考核制度.....	7
5.4 仪器故障报告.....	8
5.5 仪器设备介绍.....	8
六、 常规操作规程.....	10
6.1 开机.....	10
6.2 常规多通道荧光拍摄.....	11
6.3 Z-stack 成像.....	14
6.4 时间序列成像.....	15
6.5 Tile scan 成像.....	16
6.6 Airyscan 成像.....	18
6.7 关机.....	19

物质科学公共实验平台

一、目的

建立激光共聚焦显微镜 LSM900 标准使用操作规程，使其被正确、规范地使用。

二、范围

本规程适用于所有使用激光共聚焦显微镜 LSM900 的用户。

三、职责

- 3.1. 用户：严格按本程序操作，发现异常情况及时汇报实验室技术员。
- 3.2. 实验室技术员：确保操作人员经过相关培训，通过考核，并按本规程进行操作。

四、显微成像实验室安全管理规范

- 4.1. 进入实验室的所有师生应熟悉消防安全基本知识、化学危险品安全知识、用电/用水/用气常识。
- 4.2. 严格遵守显微成像实验室的各项安全管理规范，进入实验室的所有师生应穿鞋套，注意警示标识。
- 4.3. 实验室仪器需经培训考核后方可操作，并严格遵守仪器常规操作流程进行实验，未经考核者严禁使用；严禁未经允许进行非 SOP 中规定的其他操作，或擅自修改仪器、使用非指定部件，或在拆下安全装置的情况下操作仪器。
- 4.4. 严禁在激光共聚焦显微镜操控电脑主机上使用 USB 拷贝数据，严禁私自接入网络。
- 4.5. 用户上机实验必须严格按照操作规程进行，实验室技术员应经常巡视，及时纠正违规操作，消除安全隐患；实验做完后整理好实验相关区域并做好实验记录。
- 4.6. 样品制备、装送样品时必须戴手套，禁止直接用手触摸样品台及样品架。为防止交叉污染，严禁戴手套操作鼠标、键盘，同时严禁戴手套开关门。

- 4.7. 保持实验工作区域整洁，相关工具放置在指定位置；严禁摆放与实验无关的个人物品，严禁在实验室饮食与抽烟。
- 4.8. 严格遵守学校规章制度，有毒废物、试剂、器皿、利器等分类回收。
- 4.9. 实验室人员离开前必须认真检查实验室的电是否关闭，离开时随手关门。
- 4.10. 仪器操作过程中出现设备故障、异响、异味、冒烟等异常现象时，请第一时间联系实验室技术员，不得擅自修理设备。
- 4.11. **夜间 22:00 以后测试，必须两人以上**；因违规操作或其他失误造成安全事故，相关责任人将受到通报批评及相应处罚。

五、显微成像设备管理规范

5.1 激光共聚焦显微镜 LSM900 使用制度

该仪器遵从学校“科研设施与公共仪器中心”对大型仪器设备实行的管理办法和“集中投入、统一管理、开放公用、资源共享”的建设原则，面向校内所有教学、科研单位开放使用；根据使用机时适当收取费用；并在保障校内使用的同时，面向社会开放。

激光共聚焦显微镜 LSM900(以下简称 LSM900)使用方案分为三类：

(1) 培训：用户提出培训申请，技术员安排培训。培训时需用户准备样品并制样，培训内容包括：实验室规章制度说明、LSM900 基本原理、硬件构造及各部分功能、常规样品操作、仪器的标准操作流程、控制软件(Zen)操作、数据处理及测试注意事项。该过程中用户在技术员指导下进行仪器操作并进行数据处理。

(2) 常规样品自主测试：用户独立制样、装样，样品拍摄并进行数据处理及上传。

(3) 活细胞样品拍摄：暂不开放自主测试,如有需要请联系管理员，与管理员预约时间后共同测试。

该仪器的使用实行预约制度，请使用者根据样品的测试要求在学校“大型仪器共享管理系统”(以下简称大仪共享)进行预约，并按照规定登记预约信息。

5.2 预约制度

为充分利用仪器效能、服务全校科研工作，根据测试内容与时间的不同，显微成像实验室制定了 LSM900 7*24 小时预约制度(活细胞样品拍摄需联系负责的

老师)。根据预约制度可登陆大仪共享网站，建议提前 1 天预约机时。

请严格遵守预约时间使用仪器，以免浪费机时。如需调换时间段，在技术人员同意下可与其他使用者协商。因故不能在预约时间内测试者，请提前 2 小时取消预约并通知技术人员。如无故不遵预约时间，将被取消一个月的预约资格。

预约时段		预约时间/每人	测试内容
工作时间 (周一至周五)	09:00 至 17:30	每人次可预约机时 ≥ 30 min	自主测试
非工作时间 (周一至周五)	18:30 至 次日 8:00	每人次可预约机时 ≥ 30 min	自主测试
非工作时间 (周末及节假日)	09:00 至 次日 8:00	每人次可预约机时 ≥ 30 min	自主测试

- (1) 校内使用者须经过技术员的实验操作培训，考核合格后方可上机使用；
- (2) 实验开始时务必在实验记录本上登记，结束时如实记录仪器状态；
- (3) 严禁擅自处理、拆卸、调整仪器主要部件。使用期间如仪器出现故障，使用者须及时通知技术员，以便尽快维修或报修，隐瞒不报者将被追究责任，加重处理；
- (4) 因人为原因造成仪器故障 (如硬件损坏)，其导师课题组须承担维修费用；
- (5) 不可擅自做除培训操作之外的测试，如有需求请务必联系技术员；
- (6) 数据不允许在仪器电脑中删改，尤其不允许用 U 盘与移动硬盘直接拷贝。
测试数据已实时自动同步到 storage 系统，使用者应根据要求下载原始数据至本地电脑，以保存并做数据处理；实验数据在本实验室电脑中保留 2 个月(暂定，根据情况若硬盘允许数据保存时间延长)；
- (7) 使用者应保持实验区域的卫生清洁，测试完毕请及时带走样品，本实验室不负责保管样品。使用者若违犯以上条例，将酌情给予警告、通报批评、罚款及取消使用资格等惩罚措施。

5.3 培训考核制度

校内教师、研究生均可提出预约申请，由技术员安排时间进行培训，培训分为三部分：

第一部分：由实验室负责人或仪器负责人介绍实验室规章制度、安全管理

规范、仪器设备原理、基本硬件知识，仪器标准操作规程，标准样品测试和相应数据处理。

第三部分：上机培训结束后，培训者需在一周内进行至少一次自主上机预约，在仪器负责人的监督下进行独立操作。

实验室技术员认为培训者达到独立操作水平后，给予培训者授权在相应级别所允许的可操作实验范围内独立使用仪器。如果在各级别因为人为操作错误导致仪器故障者，除按要求承担维修费用之外，给予降级重考惩罚、培训费翻倍。

注意：培训中的第一部分和第二部分需要用户在一周内完成(特殊情况除外)，否则需要重新进行培训；培训通过后用户需保证每两个月至少 1 次的自主上机测试，若超过该时间需要重新联系仪器负责人监督考核，否则将无法预约该仪器设备。

对接受培训人员的核心要求：

(1) 熟悉 LSM900 原理、构造及各部分的功能，严格遵守仪器部件的注意事项，在突然停电时能及时处理仪器并上报，关注仪器各部件有无异常；

(2) 熟练掌握 LSM900 以及数据处理软件 Zen，严格按照标准操作规程操作，防止因人为操作不当造成仪器故障，认真做好 LSM900 的使用及故障记录。

5.4 仪器故障报告

(1) 仪器使用过程中，仪器出现故障及错误提示信息时：应即时通知技术员；

(2) 请在第一时间将故障及错误提示信息截屏，并保存在桌面“Error Report”文件夹，截屏文件命名请按照“导师名-用户名-样品名-故障时间(具体到分钟)”；在《仪器设备使用记录本》的备注栏做简单说明。

5.5 仪器设备介绍

仪器型号：Zeiss LSM900

产地：德国

基本信息：激光共聚焦显微镜主机(包括激光器、光学系统、检测器)及活细胞系统，

仪器主要技术参数：

LSM900 配备有 405nm/488nm/561nm/639nm 四种波长的激光器。

检测器：2 个全光谱型 PMT 荧光检测器，Airyscan2 检测器，透射光检测器 T-PMT。

物镜：2.5x/0.085，10x/0.45，20x/0.8，40x/0.95，63x/1.40il

分辨率：Airyscan 2 检测器（32 通道 GaAsP）可提供高达 120nm 的横向分辨率和 350 nm 的轴向分辨率。

扫描速度：在 512×512 像素下：共聚焦 – 可达 8 fps；Airyscan SR – 可达 4 fps；Multiplex SR-2Y – 8.4 fps；Multiplex SR-4Y – 18.9 fps；Multiplex CO-2Y – 8.3 fps

放置地点：西湖大学云谷校区 E10-132，如下图所示：



Figure 1. LSM900 系统图示

六、常规操作规程

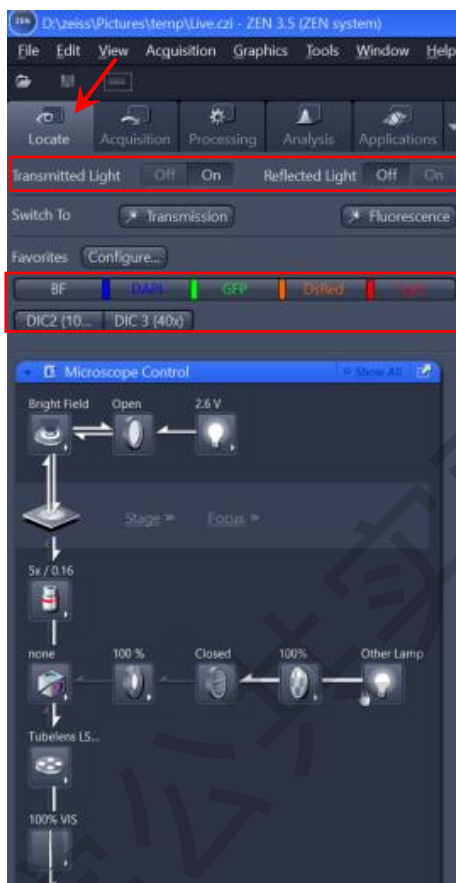
6.1 开机

在每个开关旁边，均贴有标明开机序号的便签。按照图示顺序或便签上的依次打开各个组件的开关，最后打开电脑主机的开关。注意 5 与 8 为常开，一般使用时无需打开和关闭。

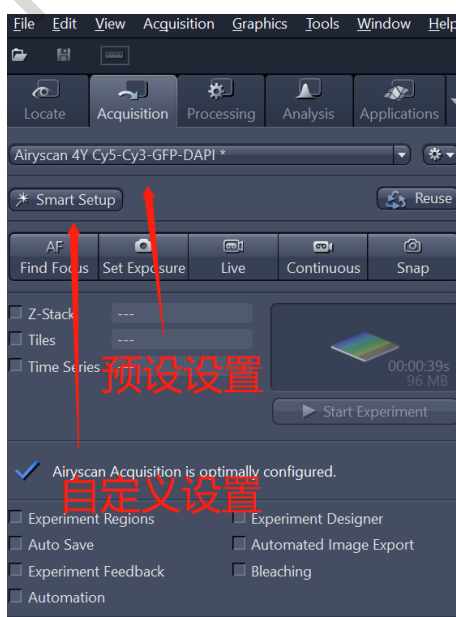


6.2 常规多通道荧光拍摄

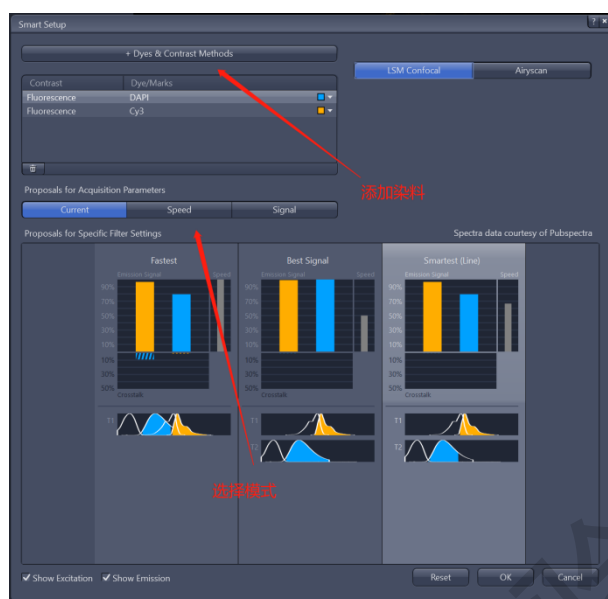
6.2.1 “Locate”窗口下点击快捷键选择明场或荧光光源，目镜下观察找到需要拍摄的样品区域，调整准焦螺旋对焦，把要拍摄的区域放在视野中央。



6.2.2 进入“Acquisition”界面；选择之前保存好的光路设置 或者新建光路设置 “Smart Setup”



“smart setup”中选择染料名称， 并选择拍摄方式后， 点击“OK”三种拍摄方式：



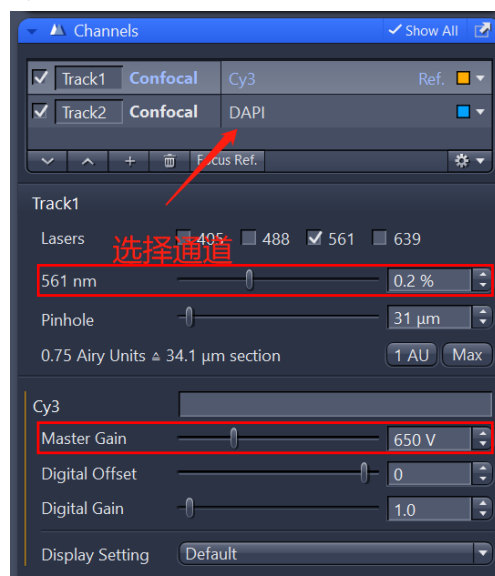
Fastest 拍摄速度最快，发射波长接近的荧光染料间存在串色现象；

Best signal 拍摄速度最慢，但是基本避免了发射荧光的串色，效果最好；

Smartest (Line) 结合上述两者优势，减少串色的同时拍摄速度较快，但是光路中硬件设置不能改变。

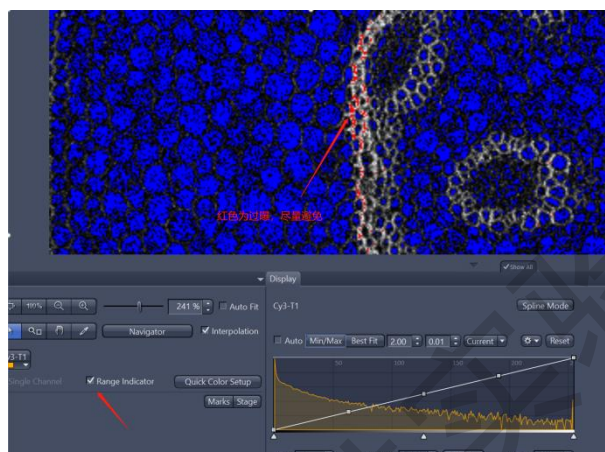
我们推荐固定样本推荐使用 **Best signal**、变化较快的样本推荐使用 **Smartest** 或者 **Faster**。

在“live”下设置 **Channels** 中对每个 **track** 进行单独设置，首先选中该 **track**(选中 **track** 高亮)；然后调整激光强度“**Laser**”，针孔大小“**Pinhole**”，检测器“**Gain**”值等。



“Pinhole”一般设置为 1AU，增大 Pinhole 可以提高图像亮度，但会增加非焦面信息；减少 Pinhole 有利于提升分辨率，但是会减少图像亮度；

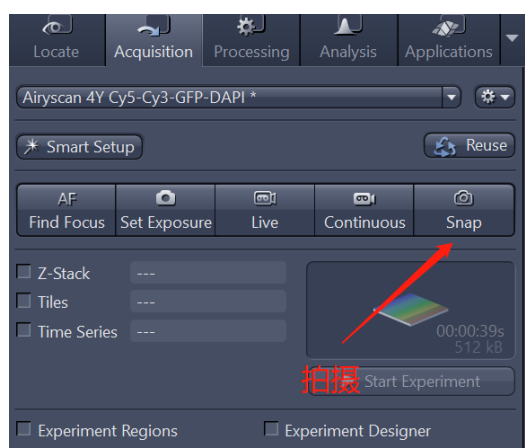
“Gain”和“Digital Gain”增加可以增加图像亮度，但是也会提高背景噪音。LSM 模式 Gain 值推荐 500~700V，Airyscan 模式 Gain 值推荐 700~900V。设置原则保证图像不要过曝，尽量减少背景噪音：在 live 下选择“Range Indicator”可以显示出曝光程度（红色区域为过曝）；



在 Acquisition Mode 下还有其他可调参数，使用者可根据自己样品的情况进行调节：

- A、通过 scan area 选择扫描区域或通过“Crop Area”选择扫描区域；
- B、设置 Scan Speed：扫描速度越慢，信噪比越好，但光漂白越多；
- C、Averaging：增加 averaging 次数可以减少噪音，但会增加扫描时间；
- D、Direction：双向扫描可以减少扫描时间；
- E、Frame Size：一般选择 512×512，图像越大分辨率提高，但扫描时间越长

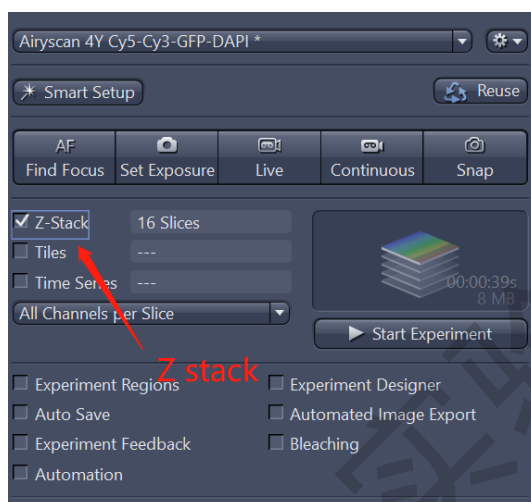
6.2.3 选择需要成像的 track，单击“Snap”；获得一张多通道图像。右击图像标签，图像保存为“czi”格式



6.3 Z-stack 成像

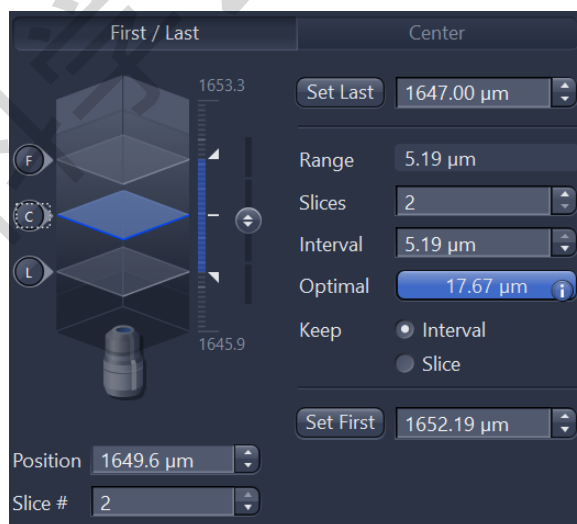
Z-Stack 即为 3D 成像，共有两种模式，主要使用“First/Last”模式，通过上下边界决定 3D 成像的 Z 轴范围；另一种是“Center”模式，主要通过设定 Z 轴的中间位置和 3D 厚度来决定成像范围。

勾选“Z-stack”。



(1) First/Last

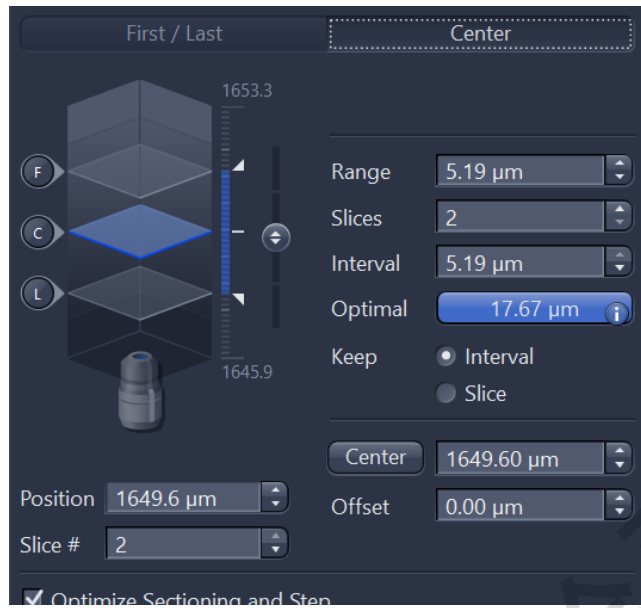
在“First/Last”模式下，选择 z 轴扫描范围：在 Live 预览状态下，调整焦平面设置起始“Set First”和结束“Set Last”位置，单击“Optimal”后的“*.um”按钮来设置最佳间隔；



单击“Start Experiment”开始拍摄。

(2) Center

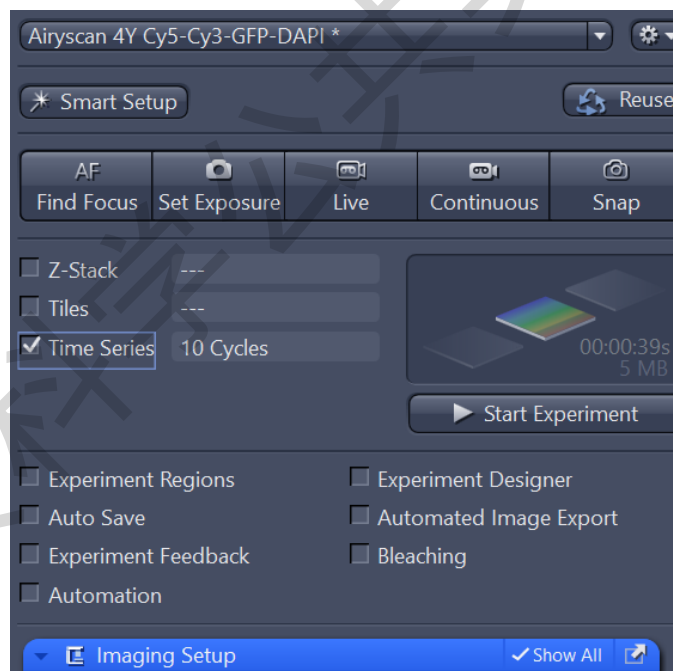
Center 模式下，live 下选择成像的中间位置，单击“Center”，然后设置需要层扫的层数 Slices，并单击“Optimal”；



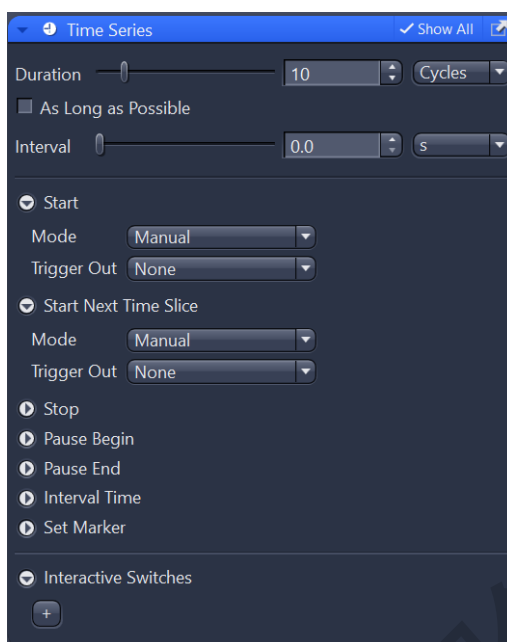
单击“Start Experiment”开始拍摄。

6.4 时间序列成像

勾选“Time Series”；

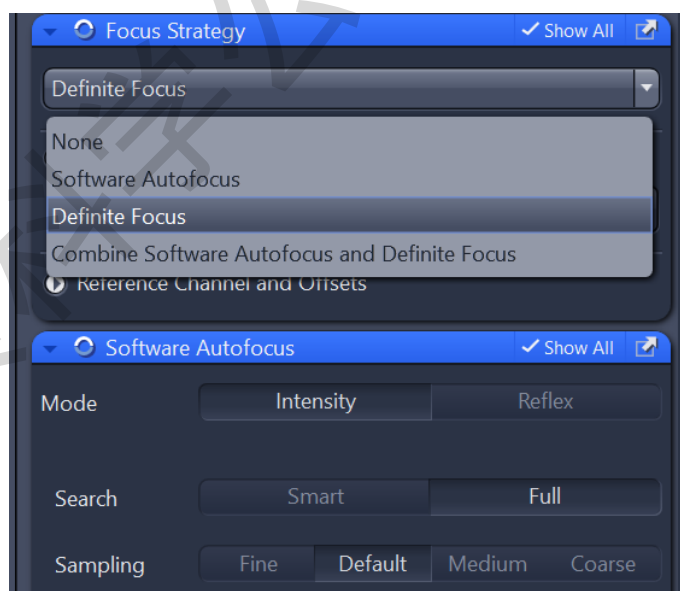


根据使用者需要更改拍摄要持续的时间，如循环数 `cycles` 或者其他具体时间；注意循环之间的间隔 `Interval`；`Interval` 指的是两次循环开始时间的间隔，因此 `Interval` 包含了上一个循环的拍摄时间；



由于长时间拍摄时间序列可能出现 z 轴漂移的问题（如玻璃器皿的热胀冷缩），所以常常需要结合自动对焦来保证长时间拍摄中不失焦：我们推荐使用 Definite Focus 来稳定焦距：

在预览下找到需要稳定的焦面位置后，在“Focus Strategy”里选择“Definite Focus”。

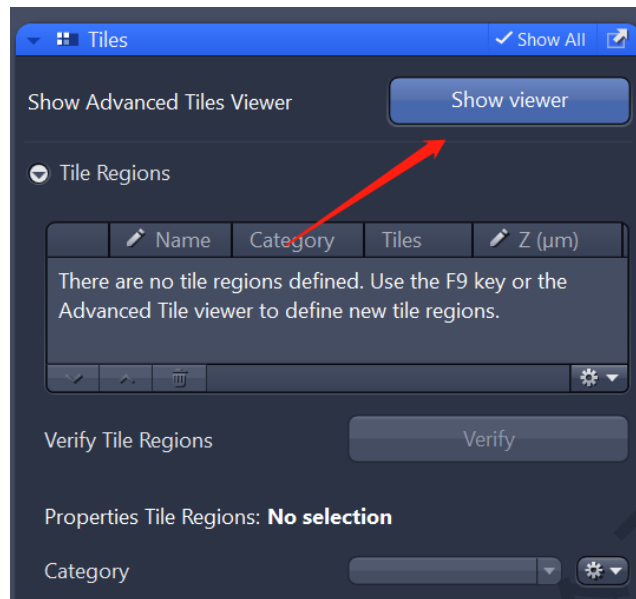


点击“Start Experiment”开始拍摄。

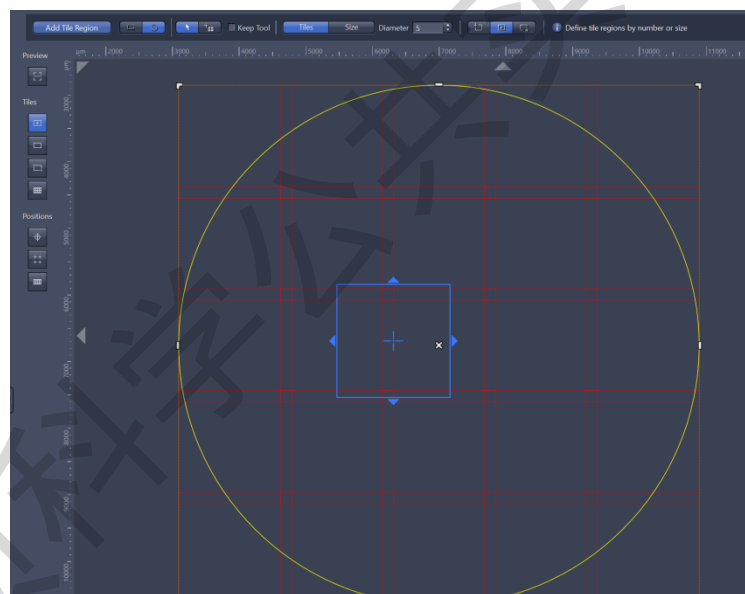
6.5 Tile scan 成像

勾选“Tiles”；

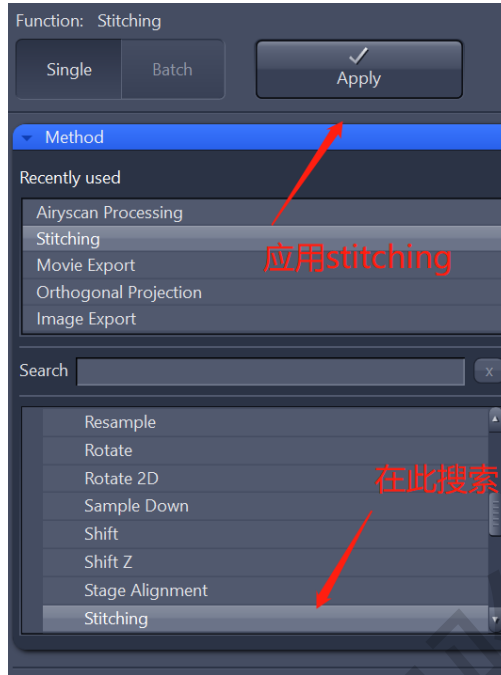
点击 Show viewer



开启“Live”预览，点击“+”和 Add Tile region，在方框里拖动鼠标，将要拼图的范围添加到拼图区域中。然后点击“Start Experiment”开始拍摄。



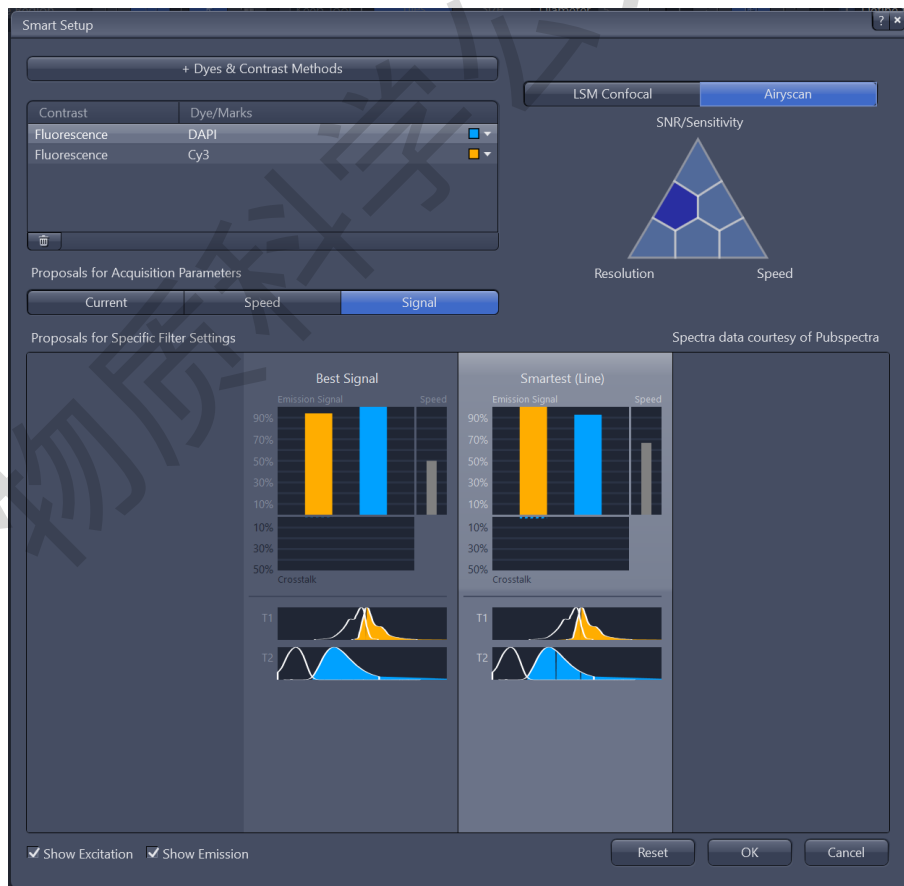
由于 Tile scan 是由图片拼接而成，拼接处可能存在问题，因此常需要 Stitching 算法对其进行修正，在 Processing 界面下搜索 Stitching，并点击 Apply 进行图像处理。



6.6 Airyscan 成像

点击“Smart Setup”，选择需要的染料；

点击“Airyscan”在右上方的三角中选择不同的 Airyscan 模式，例如左下角“Resolution”代表 Airyscan 的 SR 模式，右下角代表 Airyscan 的快速模式。



选择“Best Signal”或“Smartest”模式；类似前述共聚焦中的原则，Smartest 相对于 Best Signal 会尽可能提高拍摄速度，但是要注意可能发生的串色问题。

可调参数

设置激光大小“Laser”，检测器“Master Gain”和“Digital Gain” *注意不能过曝，而且也不要试图占满整个 Display 的动态范围。

“Scan Area”扫描区域居中，选择最快扫描速度，“Crop Area”不要小于 1.7，双向扫描，“Averaging”选择“None”

如果有参数设置不能满足达到 Airyscan 最高分辨率，软件会有相应提示，根据提示更改参数后可以二维图像拍摄（Snap）或者多维图像拍摄（Strat Experiment）

注意通过 Airyscan 获得的结果必须在 Processing 中通过 Airyscan Processing 进行图像处理后方可使用。如果是 z-stack 图像，请选择“3D Processing”



6.7 关机

按便签上的次序，**倒序**关闭各个组件的开关。注意 5 与 8 为常开，一般情况下无需关闭。