

激光共聚焦显微镜操作规程

一、准备工作

- 打开计算机。依次打开激光器电源、钥匙开关。多线氩离子(458 nm, 488 nm, 514 nm) ON、氦氖绿(543 nm) ON、氦氖红(633 nm) ON。打开汞灯电源开关。
- 登陆 Windows XP 系统。双击快捷方式: FV10-ASW 1.1。User ID: Administrator ; Password: Administrator。注意区分大小写。

二、显微镜镜下观察

1. 微分干涉差观察

- 使用手控面板选择物镜。插入起偏镜。插入微分干涉滑块。
- 点击 FV10-ASW 软件中的图标 。标本聚焦。

2. 荧光观察:

- 使用手控面板选择物镜。
- 打开汞灯的机械快门，拉出 DIC 滑块，点击 FV10-ASW 软件中的图标 。
- 使用手控面板选择荧光滤色片。标本聚焦。

3. 获取单张荧光图像

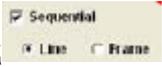
- 点击 FV10-ASW 软件中的按钮 。
- 关闭汞灯快门，点击按钮 ，关闭卤素灯快门。
- 点击染料选择按钮 ，在染料列表中，双击用于观察的荧光染料。点击 Apply 按钮。
- 点击 XY Repeat 按钮开始扫描。调节图像。点击 Stop 按钮停止扫描。
- 选择 AutoHV，并选择扫描速度。
- 点击 XY 按钮取得一幅图像。
- 点击 SeriesDone 按钮，“2D View-LiveImage(x)”2D 界面就出现。
- 保存该幅图像:右图像管理器中显示的图像图标，选择另存为保存该幅图像。(保存为“xml”类型是 FV10-ASW 软件专用的图像格式。)

4. 获得单张（荧光+微分干涉）图像

- 点击 FV10-ASW 软件中的按钮 ，关闭汞灯快门。点击按钮 ，关闭卤素灯快门。
- 点击染料选择按钮，在染料列表中，双击用于观察的荧光染料。点击 Apply 按钮。
- 选择 TD1。
- 点击 XY Repeat 按钮开始扫描。调节绿色(FITC)图像和微分干涉差的图像。点击 Stop 按钮停止扫描。
- 选择 AutoHV，并选择扫描速度。
- 点击 XY 按钮取得一幅图像。
- 点击 SeriesDone 按钮，“2D View-LiveImage(x)”2D 界面就出现。
- 保存该幅图像。

5. 获取3D图像

例: 绿色荧光(FITC)和红色荧光(Rhodamine)双标 (这里介绍线序列扫描取图的过程.)

- a) 点击 FV10-ASW 软件中的按钮 ，关闭汞灯快门。同时，点击按钮 ，关闭卤素灯快门。
- b) 点击染料选择按钮。在染料列表中，双击用于观察的荧光染料。点击 Apply 按钮。
- c) 点击序列扫描,并选择线序列方式 。
- d) 点击 XY Repeat 按钮开始扫描。调节绿色(AlexaFluor488)图像和红色(AlexaFluor546)图像。点击 Stop 按钮停止扫描。确定 Z 轴的上限和下限: 从 AcquisitionSelling 对话框中, 勾选 StepSize, 并输入 StepSize 大小(点击 OP 按钮可以使用推荐的值)。
- e) 点击 XY Repeat 按钮开始扫描。点击  和按钮  上移焦点位置。当图像显示到达上限时, 点击 Set 按钮确定。
- f) 点击  和按钮  下移焦点位置。当图像显示到达下限时, 点击 Set 按钮确定。点击 Stop 按钮停止扫描。
- g) 选择 AutoHV, 并选择扫描速度。选择 Depth 按钮。
- h) 点击 XYZ 按钮取得图像。
- i) 点击 SeriesDone 按钮, “2D View-LiveImage(x)”2D 界面就出现。保存该幅图像

三、图像分析

1. 3D图像的叠加

- a) 双击资源管理器中要选择打开的文件, 出现 2D 界面。

- b) 点击按钮  并选择 。

- c) 要保存此图像, 右击此图像, 选择 Save Display 并命名。

2. 3D 图像的重建

- a) 以一定的角度观察 3D 图像, 点击按钮 ，创建 3D 图像。拖动鼠标以一定的角度观察图像。

- b) 观察 3D 图像的某个横截面, 点击按钮  并选定 ，拖动鼠标观察某个垂直横断面。

- c) 点击按钮 ，创建一个 2D 图像(带文件名)。保存该幅图像。

3.保存图像

- d) 右击图像管理器中显示的图像图标, 选择 Save as, 设置 Save as 类型为 TIFF (或 BMP 和 JPEG 格式) 并保存。如果保存 XY 或者 XYZ 通道合并的图像, 保存前检查要合并的通道并保存。
- e) 保存带有比例尺的图像: 右击该幅图像, 选择 Save Display 并以新的文件名存为 BMP 格式文件。
- f) 保存动态图像: 右击该图像, 选择 Save as AVI 并以新的文件名保存该图像。
- g) 保存到 CD-R: 插入一张 CD-R 光盘, 点击 OK; 选择文件并拖放到 CD-R 的窗口, 点击 "Write these files to CD."; 点击 Next, 开始刻录; 点击 Finish 按钮结束。

四、关闭系统

- a) 选择 File/Exit, 退出 FV10-ASW 软件。
- b) 退出 Windows XP。
- c) 关闭激光器: 依次关闭钥匙、电源开关。多线氩离子(458 nm, 488 nm, 514 nm) OFF、3-2.氦氟绿(543 nm) OFF、3-3.氦氟红(633 nm) OFF。
- d) 关闭汞灯电源。