Stellaris 5 Cryo CLEM 操作手册

一. 硬件开启

- 1. 将液氮泵慢慢插入液氮罐, 然后取黑色的液氮输送软管插入液氮泵的端口并拧紧, 如 图 (1)
- 2. 打开激光柜上的扫描头和电脑显微镜的电源,如图 2 中 1
- 3. 打开激光柜上的激光电源,如图 2 中 2
- 4. 拧开激光柜上的激光锁钥匙,如图 2 中 3 ,这样就完成硬件开启过程。





图 2

- 二. 软件开启
 - 1.双击桌面上 LASX 软件,如图 3.



2.硬件自检和显微镜台子初始化过程中依次会弹图 4,5,6 的对话框,分别点 OK-Yes-OK

- 3.当以上步骤完成后就进入常温 STELLARIS 5 界面如图 7,点击红框里的 STELLARIS 5 弹出的下拉菜单里选择 CORAL Cryo 进入冷冻共聚焦模式。
- 4.打开软件里 Cool 键 (如图 8) 控制冷却系统开始工作,黑色液氮软管泵出液氮。
- 5.等黑色管子里泵出的氮气较稳定时将泵出液氮的端口插入显微镜样品台孔里如图 9 先将螺丝往软管方向推到底,然后再拧紧固定管子的螺丝如图 10。



图 7



图 9



图 8



图 10

- 三. 上样
 - 1. 等待图 8 上软件显示冷却温度降到-170 以下,开始上样。
 - 2. 将 cryo transfer shuttle 顺着滑轨平行划进去如图 11, 拉开挡板静止 20 秒左右, 推样 品杆到底, 样品杆旋转到 open, 拉出样品杆, 撤走 shuttle.





图 11



四. 调用预设模版

CORAL Cryo 模式下 experiment-Workflow-File-Load-Desktop-Load- { Scanning Template } auto/bare grid.xml-open,这里需要根据自己的样品选择合适的模版(如图 13)



图 13

bare grid

auto grid

- 五. 拍地图
 - 双击虚拟载网图像中央移动观察区域,切换至 Job,选择 camera RGB-Ref job,使用 Ref 模式,点开 Live,旋转 Z 控制旋钮,调整焦面(若出现右下角亮影如图 14,将左手控 制面板切换到 100%到相机如图 15),若焦面上的样品成像质量差可调荧光激发光强 度(FIM),视场光阑(IL-FId),FIM 与 IL-FId 共同调节照明的"强度+范围"另外可调节 曝光时间,调节原则是成像质量好且不过曝(点热图可查看样品是否有过曝),可切 到需要的荧光通道调参数,调好明场像和荧光像。
 - 2.切换至 Experiment,在 Spiral Scan 下选择 Camera Job, spiral loop count 输入 5 (可适当调整),点击右下角 Spiral 按钮拍摄宽场模式下明场 Overview 图,也可以在感兴趣的荧光通道下做 Spiral,作为初步判断样品质量的依据。
 - 3.使用画图工具圈出 grid 区域(可选择形状),根据 Spiral 结果,点击"+F"手动添加 focus point,一般在模糊的区域和感兴趣的区域加点如图 16。切到感兴趣的荧光通道,在 focus map 里将手动添加的 focus point 逐个调节焦面并点击 set Z 记住每个点的焦面 Z 值,点击 stop。
 - 4. Overview Scan 下选 Camera Job 点 Assign To Overview, 如图 17。点 Overview, 拍摄各个

荧光通道下的 Overview 图片。

5.Localization 下选择 Lamella 在目标位置点击加上 Lamella,并且点击+F , 在此 Lamella 处添加 focus point。



图 14

图 15



图 16



图 17

六. 设置共聚焦参数

点击左下角 Close,点击 Job,选择 confocal job,根据自己的样品染料选则合适的激发光, 拖动 HDY 检测器调整其接受信号范围,接受信号不要接近激发光光源波长范围,半格 为宜,若样品有多色荧光,担心串色,可以点击 Add new setting,每个 setting 可以放 三个激发光,在荧光通道下,fast live,找到 lemella 焦面,若焦面较远,可切换到 camera job 明场下找到焦面再切换到 confocal job,根据荧光屏上呈现的 lemalla 图片质量的情 况调整参数:可调检测器 HDY 的 Gain 值和激发光强度(建议不要太大,一般 2.0 以下, 可 live 看热图,尽量不要过曝),若信号较弱也可通过拉 HDY 接收信号范围进行调整。 另外可根据自身样品拍摄需求选择合适的 Fomate (一般选择 1024x1024), zoom factor,speed,line Accu(较弱信号推荐), line Average (较强信号推荐), Frame Accu,Frame Average (降噪), Z stack (按样品高度选择)如图 18.

反射光选择任意激光,检测器推至激光正下放,并缩短 HDY 检测器接受范围,一小格为宜,设置反射激光强度 0.01-0.02。



图 18

- 七. 拍摄共聚焦荧光图
 - 1. 样品高度差较大,每个 lamella 单独设置各自的 Z-stack,手动拍摄荧光照片: 在设置好参数后直接点击 Start Record 开始拍摄三维 Map.
 - 样品高度差别不大,添加所有 lamella,并找到各自焦面,所有 lamella 设置相同的 Z-stack 后切换至 Experiment,选择 Lamella Scan,选择 confocal job,点击 assign to all lamella,右下角 点击 Lamella 如图 19,在弹出的对话框里输入 Project 名不宜过长,开始拍摄。点击右侧 3D 可观看拍摄的三维图如图 20,并可以调节参数,使图片质量达到最佳。



图 19

八. 保存数据

拍摄完成后 job-open project,选中所有图片 save as- TIF-Extended Leica File(*.xlef)-save。 最后 merge overviewer: 切换至 Job,选择 camera job-Acquisition-LAS X Navigator,点击 左上方 Mosaic Merge,在左侧 Project 选择 Overview 数据,点击右下角 Merge 按钮,得 到拼图数据, merged 图右击,选择 Export image,弹出的 Export as...下选择 File option-Destination Folder -save,这样就完成了拼图保存。

九. 拍摄 lightling 图(选做)

上方 Job 添加按钮,点击 New Lightning Job,右键 Lighting job 选择 Show Lightning Wizard,确认 Lightning 和 Confocal 参数。左上点击 Lightning 按钮,下拉选择 Coral Cryo.切换至 Experiment,选择 Localization Manager,点击 Lamella,根据 Overview 结果,在图上添加 Lamellar point,选择 "+F",在每个 Lamella point 处添加 focus point,并手动设定 Z position.选择 Lamella Scan,选择 Lighting job,点击 assign to all lamella,右下角点击 Lamella Scan,输入 Project 名,点击 OK 开始拍摄。保存数据类似步骤七,在左侧 Project 选择 Lightning 数据进行保存。



图 20

- 十. 关机
 - 1. 确认数据存好后,在软件里先关掉激光,如图 21,点击 Add Laser 右边的 open Laser overview,将弹出的对话框里的激光关掉。
 - 2.将样品回收。
 - 3.长按 Home 升高样品台.
 - 4.关掉 Las x 软件,关电脑,然后关硬件,顺序从下到上如图 22,
 - 5.按控温系统的 heat 按钮进行样品台加热,等待 20 分钟左右氮气输送软化后将其管取下 并挂在墙上避免管子还在冷冻状态被拉扯弯折等导致管子破裂。

Camera Job never delete 🖉 Camera Job Confocal Job				
HC PL APO 50x/0.90 I TD 488/561	DRY 🗘 🕞 1638 👽 🔲 Autoselect	-	= 😳 📀	
*		*	*	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
ALEXA 546 ALEXA 568	ALEXA 594 ALEXA 610 ALEXA 610	ALEXA 633 ALEXA 635 ALEXA 647	ALEXA 647 ALEXA 660 ALEXA 680-	- ALEXA 680 ALEXA 680 ALEXA 700 ALEX
				Add Laser
	Setting 1	Laser Overview	U X	×
		Name Power State	Wavelength(s) Mode	
		Diode 405 (UV LIGHT)	405 😔	
ebo		OPSL 488 (VISIBLE)	488 🕞 🖵	ada sad
HyD S2		OBIS 561 (VISIBLE)	561	
Туре	Shutter Intensity 2	Diode 638 (VISIBLE)		
OBIS 561				
	Setting 2		The subscription of the su	×
600	· · · · · · · · ·	700	1 20 1 1	ado 1 1 1 1 850
Holi and the second				
Туре	Shutter Intensity 0.02			a
OPSL 488			The second second second	
	Setting 3			X

图 21

