



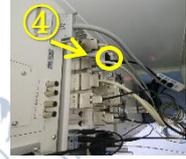
# Nikon 单光子共聚焦 3-311 操作指南

## 一、开机：

①汞灯(等待①的指示灯稳定常亮、不再闪烁后)→②显微镜控制器(②开后快速开③(10s 内))→③显微镜主机→④在仪器后方→⑤钥匙→⑥侧面按钮→⑦电脑→采集软件 NIS-Elements AR，弹窗点击“OK”。

【注意】汞灯①遵循半小时原则（开→关、或关→开，都务必至少间隔半小时以上）。

【提示】非资深用户自己开关机不稳妥者，可联系管理员操作（别害羞不麻烦）。



## 二、镜下找焦：

选择物镜→放置样品→点击软件界面中 Eye Port，待下方 Remove Interlock 红色高亮→操纵手柄选择明场观察（DIC10x/DIC20x+）或荧光观察（DAPI eye /FITC eye /TRITC eye）→调节 Z 轴找到焦面

【放置样品】共聚焦皿正常放置，玻片需倒置（盖玻片 0.17mm 朝下）、卡位如图 。

**禁止使用油镜时直接切换空气镜！如有需要，务必清洁油镜和样品后，再切换！**

【操纵手柄】XY/Z+三箭头（右上角），代表粗调细调。DISP 左右方向按，可调出轴的数值显示。

【注意】禁止带手套触碰显微镜、禁止样品置于隔震台上、禁止频繁开关软件、禁止更改仪器配置信息、禁止更改软件界面。

## 三、预览及参数调节：

1、镜下找到焦后：点击 Eye Port，等待片刻，Remove Interlock 解开。

2、预设参数：

1) 通道设置：荧光 DAPI/FTTC/TRITC/Cy5.5 或明场 TD

	Ch1	Ch2	Ch3	Ch4	TD
	425-475	500-550	570-620	663-738	
Pass 1	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
2	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
3	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
4	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>

【注意】明场 TD，只能求借其他通道的光才能实现成像。而四个通道中，只有 488/561(2/3 通道)愿意借光给 TD，405/640(1/4 通道)不愿意借出。自选跟随哪个通道：Ch Series→Setup，见右图。

【通道参数】先调 Laser，再调 HV。Offset 不建议动，为初始值的加减。

Laser 一般 5%以下就够用；HV 为检测器的放大系数，HV 增大噪点也增加，推荐 120。

2) 分辨率和速度：

预览时建议低参数：Size 像素点→推荐 512；Control →Frame/sec→Fast Mode→推荐 1 秒 1 帧

3) Pinhole（共聚焦的小孔孔隙）：1.2AU。

4) 其他设置：

平均拍摄  2x：系统拍摄了几张图片后的平均信号。

积分拍摄  2x：对信号进行积分处理，信号分布更加细致（LUT 灰度值范围翻倍）。

5) 如需应用上次的设置参数：可打开上次图片(.nd2 格式)，右键 Reuse。

3、点击 Scan 实时观察：

观察过程中，鼠标滚轮微调焦面，预览界面上方  可微调 XY， 自动对比度， 查看是否过曝。

焦面的微调，结合激光强度(Laser+HV)、曝光时间、LUTs 等综合调节，实现视野中零星几个点过曝的清



晰图像为佳。

## 四、拍摄、多维、保存、导出：

1、观察好后：取消预览状态→提高拍摄参数→Capture 拍摄→调整 LUTs→保存

拍摄参数：Size 像素推荐 1024 或 2048、Control by→Frame/sec→推荐 1/2 或 1/8 以上

保存：格式为.nd2、路径为 D 盘→Data→课题组文件夹→自己文件夹→日期文件夹

2、可进一步局部拍摄：

右上方预览框中→拉动边界，设定截取范围→右键确认→Capture 拍摄

下方 Zoom 为倍率信息，ROI 取消后，需将 Zoom 恢复为 1。

3、ND 多维拍摄（建议转盘，拍摄更快）

1) 时间：Interval 间隔多久、Duration 总共多久，Loops 共需拍摄张数

2) XY 多点：

自动追焦设置：首先打开左侧 PFS →选择视野、添加 XY 点→调到最佳焦面→ND 处点击 use PFS→点击数值右侧“<”，生成一个 PFS 数值，便可自动追踪该焦面。（PFS 建议限于空气镜）

3) Z 层扫：Relative 重置，Home 设置中间焦面

4) Large Image 拼大图：需与 XY 连用，以该 XY 点视野为中心进行拼接，重叠区域需至少 10%以上。

【注意】ND 多维需先设置好保存路径再拍摄，拍到后将自动保存。

4、导出

多通道导出：导出图片 File→Save/Export to TIFF Files→勾选 Multiple Files→打开自己文件夹→Feed 添加需要导出的文件→如图根据需求勾选→选好后右下角 Export 导出

时间序列：导出为视频 Save as→mp4/avi

5、其他数据处理：推荐去 Nikon 工作站 3-301 进行。

6、数据传输：请用内网网盘，禁止使用 USB/硬盘/光盘。

## 五、关机或待机：

取下样品→清洁油镜→z 轴降至最低→镜头转到空位/最低倍镜→待机/关机→刷卡下机→登记本登记

【待关机的执行准则】

若随后有其他预约者：在 3 小时内，则待机。超过 3h 后，则关机(但不关①汞灯)。

若随后没有其他预约者：自己是当天最后一位，则关机(也关掉①汞灯)。

总结：也就是说，汞灯每天只开关各一次，即每天第一个人打开，最后一个人关闭，中间过程不动。

【待机】：勿关软件，只保存好自己的图片，刷卡下机便可。

【关机】：⑦先关软件→再关电脑→⑥→⑤→④→③（等待③的灯都灭掉后）→②→①。

【注意】油镜需无水乙醇+擦镜纸，同方向上反复湿擦，务必确保擦干净！

洁净后拍照上传至群里留档。不遵守要求者扣减信用分，扣分按次累加，超过 10 次降资质。

【忘记刷卡下机】请 24h 内上报，超过时限或次数均加收惩罚费。详情可参考 3-311 门口的规范指南。