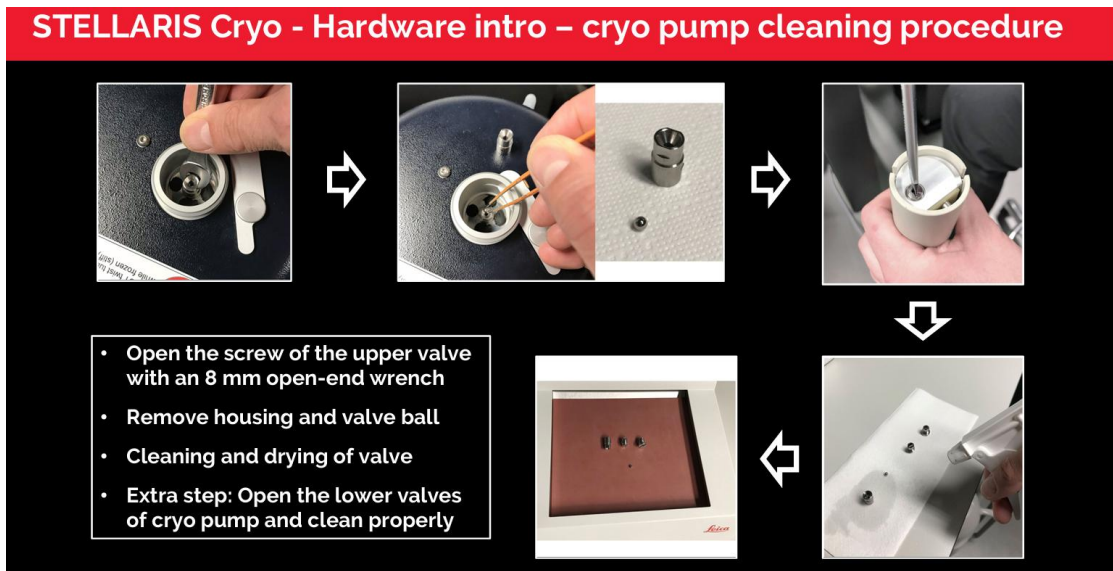


Stellaris 5 Cryo CLEM 操作手册

✦ 清洁低温泵（Cryo Pump），流程如下：

1. 用 8mm 开口扳手拧开上阀螺丝。
2. 取出阀座外壳与阀球。
3. 打开低温泵下阀，拧下两个下阀螺丝。
4. 用蘸有无水乙醇的无尘布擦拭阀球（擦拭后及时放置于安全处，防止遗失）；用无尘气吹扫阀座外壳及两个下阀，确保彻底清洁干燥后，按原位安装复位。



一. 硬件开启

1. 打开温控器电源（如图 1 红色箭头指示），将液氮泵缓慢插入液氮罐，再取黑色液氮输送软管插入液氮泵端口并拧紧（如图 1 红框所示）。
2. 打开激光柜上的扫描头和电脑显微镜电源（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）。
5. 检查冷却器电源是否开启，若冷却器报警红灯闪烁，需及时添加冷却液（如图 3：拧开箭头所指盖子，将图 3 红框中白色瓶子内的冷却液加入适量，直至红色报警解除）。
6. 检查光镜主机控制器电源（图 4）及光镜控制器（图 5）是否开启。
7. 打开荧光光源电源开关（如图 6）。

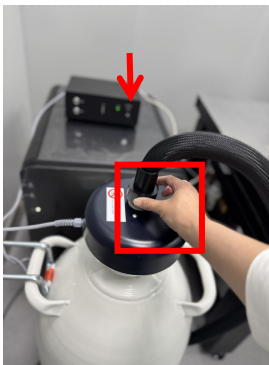


图 1

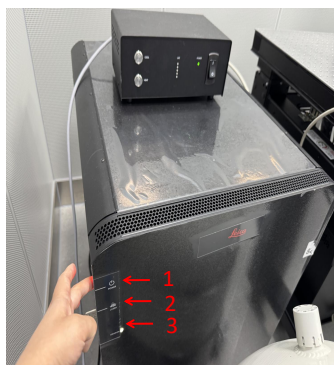


图 2



图 3



图 4



图 5



图 6

二. 软件开启

1. 双击桌面上 LASX 软件（如图 7）。
2. 硬件自检和显微镜台子初始化过程中依次会弹图 8,9,10 的对话框，分别点 OK-Yes-OK。

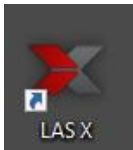


图 7

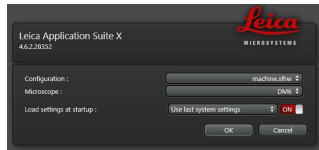


图 8



图 9

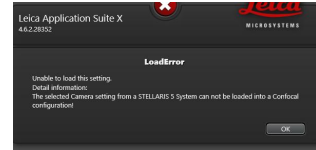


图 10

3. 当完成以上步骤后，即可进入常温版 STELLARIS 5 操作界面（如图 11），点击红框内的 STELLARIS 选项，在弹出的下拉菜单中选择 CORAL Cryo，切换至冷冻共聚焦模式（如图 12）。
4. 开启温度日志记录：点击 Workflow 栏目下 Cryo Pump 右侧红框内的齿轮图标，进入控制器设置（Controller Setting），勾选「write temperature to file」选项（如图 13）。
5. 按下温控器 Cool 键，启动冷却系统（如图 14）。待液氮软管氮气输出稳定后，将出气端口接入显微镜样品台孔洞（如图 15）：先将固定螺丝向软管方向推至底端，再锁紧螺丝完成管路固定（如图 16）。

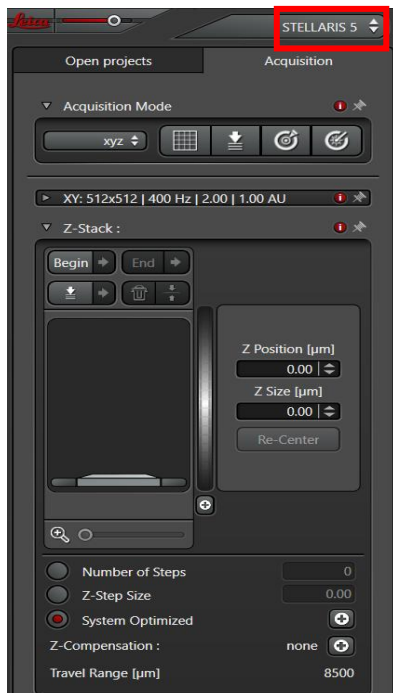


图 11

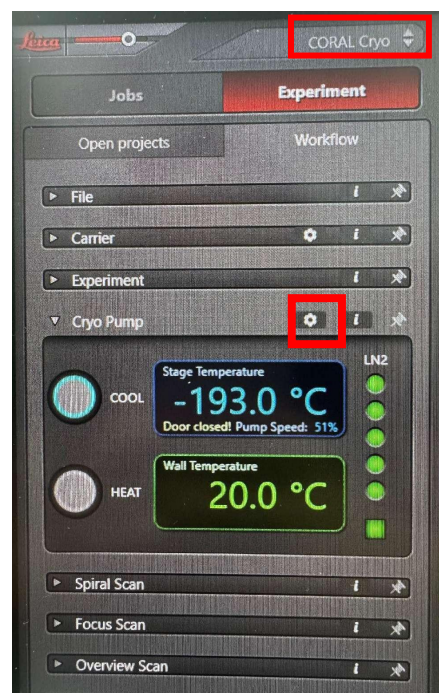


图 12

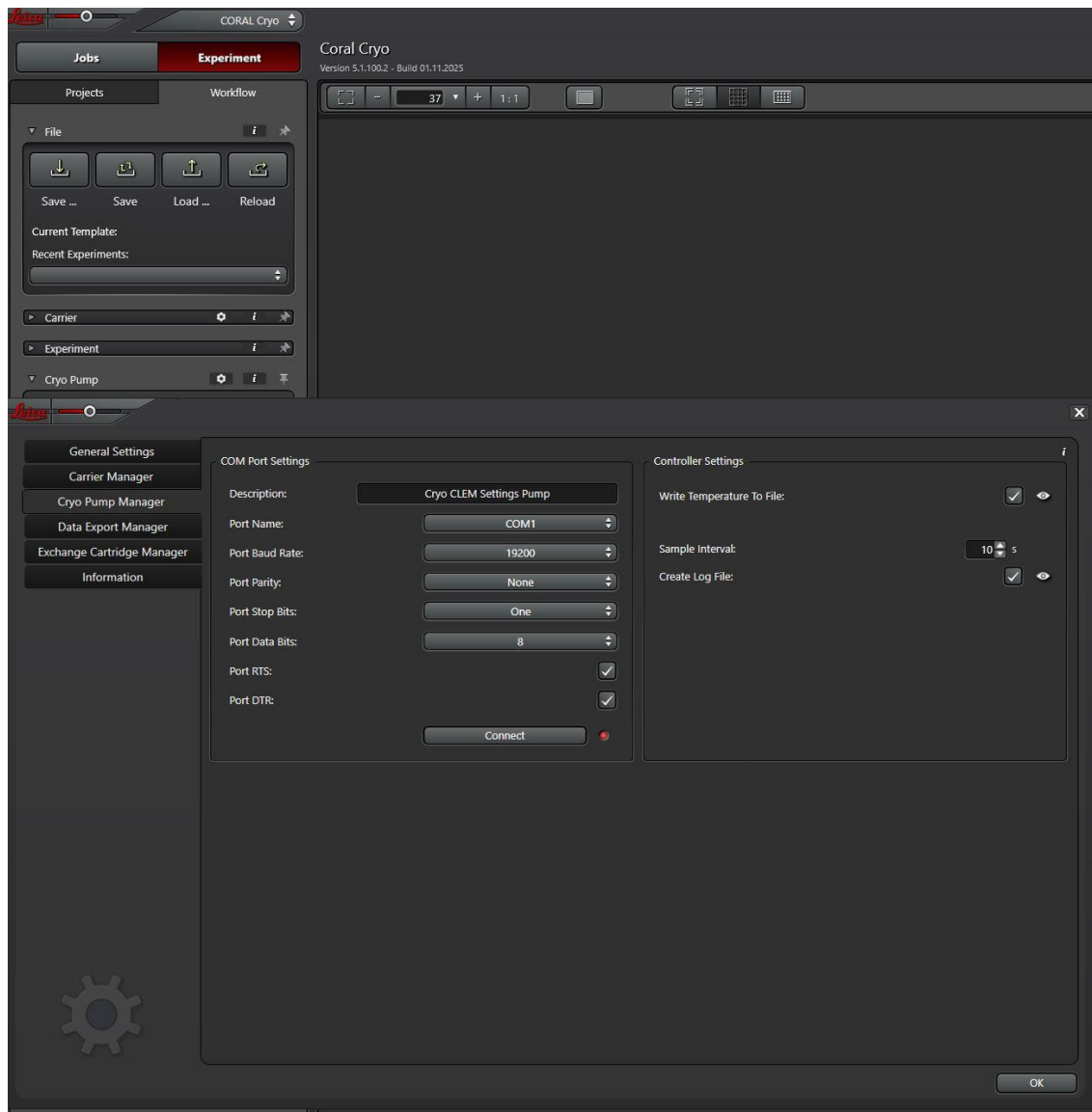


图 13



图 14



图 15



图 16

三. 上样

1. 待软件显示冷却温度稳定维持在 -190°C 以下并保持半小时以上，方可进行上样操作。
2. 将冷冻传输载具（cryo transfer shuttle）沿滑轨平稳平行推入（如图 17），拉开挡板静置约 20 秒；随后将样品杆推至底部，旋转样品杆至开启档位（如同 18），抽出样品杆，取下传输载具即可。

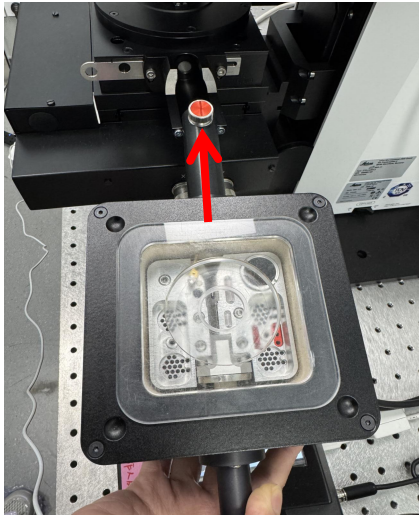


图 17



图 18

四. 调用预设模版

在 CORAL Cryo 模式下，依次点击：Experiment-Workflow-File-Load-Desktop，选择对应模板文件 auto/bare grid.xml 并打开（如图 19）。需根据样品类型自行选择：裸网样品（如图 20）选用 bare grid 模板，卡环样品（如图 21）选用 auto grid 模板。

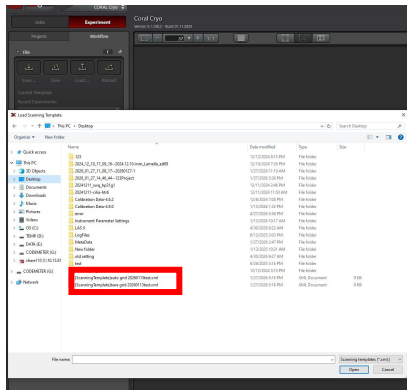


图 19

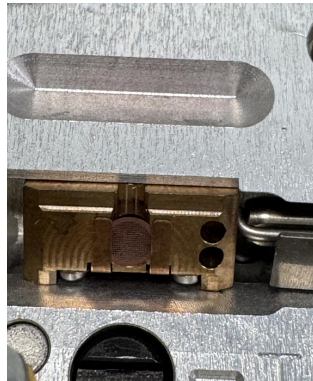


图 20 (bare grid)

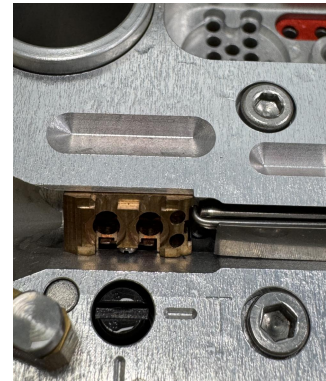


图 21 (auto grid)

五. 拍地图

1. 双击虚拟载网图像中心，移动观测视野。切换至 Job 界面，选择 camera RGB-Ref job，启用 Ref 模式并勾选明场通道，点击左下角 Live 按钮。在右侧视图左侧功能栏开启 Auto Scale。通过粗调焦旋钮将镜头快速移动至 8mm 位置；若画面右下角出现亮光干扰（如图 23），需将左侧控制面板切换为 100% 相机模式（如图 24）。再使用细调焦旋钮缓慢下调镜头，直至图像清晰。若样品成像效果不佳，可调整荧光激发光强度（FIM）、视场光阑（IL-Fid）。FIM 与 IL-Fid 配合调节照明强度与范围，同时可优化曝光时间，调节标准为成像清晰、无过曝（可通过热图查看过曝情况）。按需切换荧光通道，分别完成明场与荧光参数设置。
2. 切换至 Experiment 界面，在 Spiral Scan 中选择 Camera Job，spiral loop count 设置为 5（可按需调整），点击右下角 Spiral 按钮，采集宽场明场全景图。也可在目标荧光通道下进行 Spiral 扫描，用于初步判断样品整体状态。若 Spiral 图像拼接异常，可按如下路径修正：Jobs → Camera → Preferences → C-Mount Adapter → 1（如图 22）。
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 25。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.在 Overview Scan 界面下，选择 Camera Job，点击 Assign To Overview（如图 26）；随后点击 Overview，依次拍摄各荧光通道对应的 Overview 图片。

5.在 Localization 界面下，选择 Lamella 模式，在目标位置点击添加 Lamella；随后点击「+F」，在该 Lamella 区域添加焦点（focus point）。

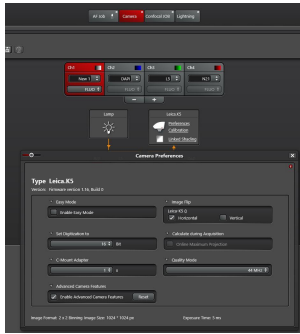


图 22

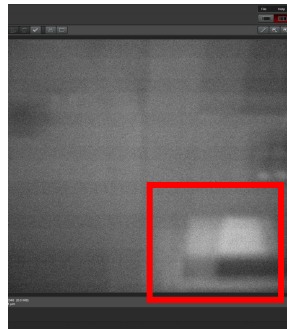


图 23

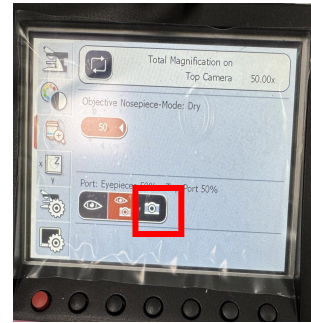


图 24

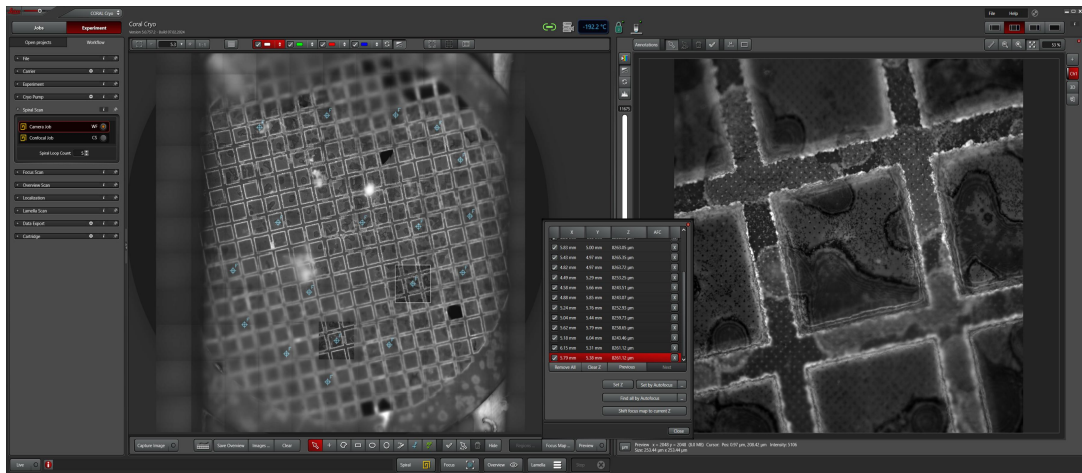


图 25

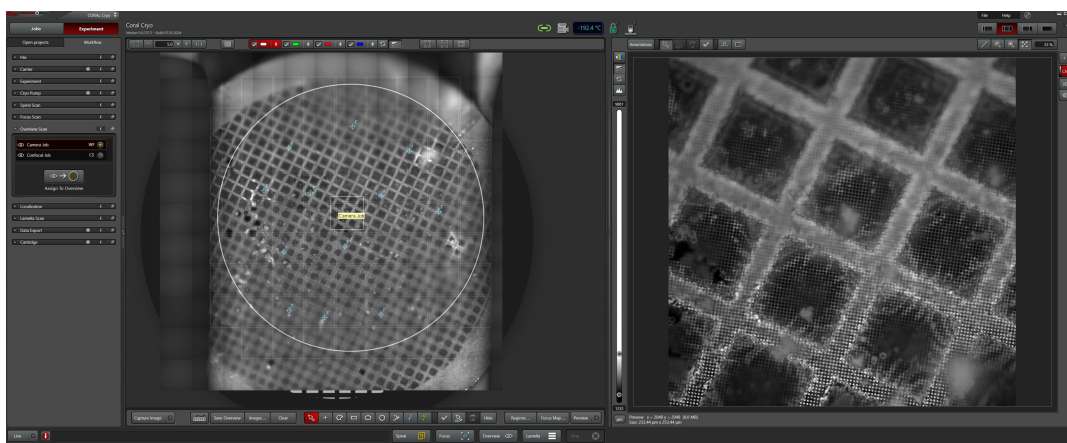


图 26

六. 设置共聚焦参数

1. 点击左下角 Close，切换至 Job 界面，选择 confocal job。根据样品染料类型，选择合适的激发光；拖动 HDY 检测器，调整其信号接收范围，接收信号需与激发光光源

- 波长范围保持距离，以半格为宜。
2. 若样品为多色荧光、担心串色，可点击 **Add new setting**，每个 **setting** 可添加 3 个激发光。切换至荧光通道，开启 **fast live**，找到 **Lamella** 焦面；若焦面距离较远，可先切换至 **camera job** 明场模式找到焦面，再切换回 **confocal job**。
 3. 根据荧光屏上 **Lamella** 图像质量调整参数：可调节 **HDY** 检测器的 **Gain** 值及激发光强度（建议不超过 2.0，可通过 **live** 模式查看热图，避免样品过曝）；若信号较弱，可通过调整 **HDY** 接收信号范围优化。
 4. 根据样品拍摄需求，选择合适的参数设置（如图 27）：**Fomate**（推荐 1024x1024）、**zoom factor**、**speed**；信号较弱时推荐选择 **line Accu**，信号较强时推荐选择 **line Average**；可通过 **Frame Accu**、**Frame Average** 进行降噪，根据样品高度选择 **Z stack**。反射光设置：选择任意激光，将检测器推至激光正下方，缩短 **HDY** 检测器接收范围（以一小格为宜），并将反射激光强度设置为 0.01-0.02。

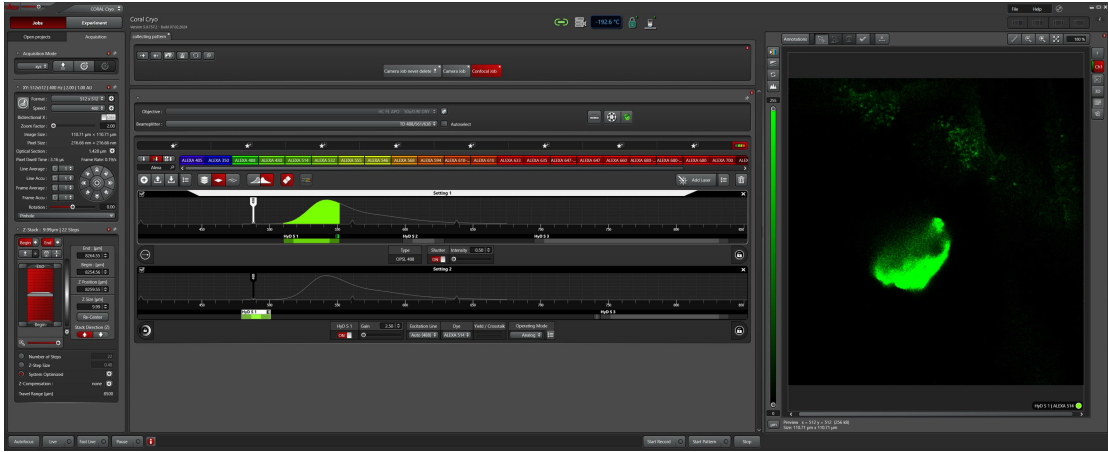


图 27

七. 拍摄共聚焦荧光图

根据样品高度差异，分两种情况拍摄荧光照片，具体操作如下：

1. 若样品高度差较大：为每个 **Lamella** 单独设置对应的 **Z-stack**；扫描 **Z** 方向距离需大于样品厚度。**Step** 可根据需要设定。最后拖动放大镜按钮，确定当前滑块位置为 **Z-Stack** 中间位置。切换至 **Experiment** 选项卡，点击 **Lamella Scan**，选择 **Confocal Job**，在 **Focus Map** 选择 **Lamella** 处加焦点，使用共聚焦进行焦面设置。参数设置完成后，点击 **Start Record**，开始拍摄三维 **Map**。
2. 若样品高度差别不大：先添加所有 **Lamella** 并找到各自焦面，为所有 **Lamella** 设置相同的 **Z-stack**；拖动放大镜按钮，确定当前滑块位置为 **Z-Stack** 中间位置。随后切换至 **Experiment** 界面，选择 **Lamella Scan**，选 **confocal job**，点击 **assign to all lamella**，点击右下角 **Lamella**（如图 28）；在弹出的对话框中输入 **Project** 名称（建议简洁），启动拍摄。拍摄完成后，点击右侧 **3D** 选项可查看三维图像（如图 29），并可调节参数以优化图像质量。

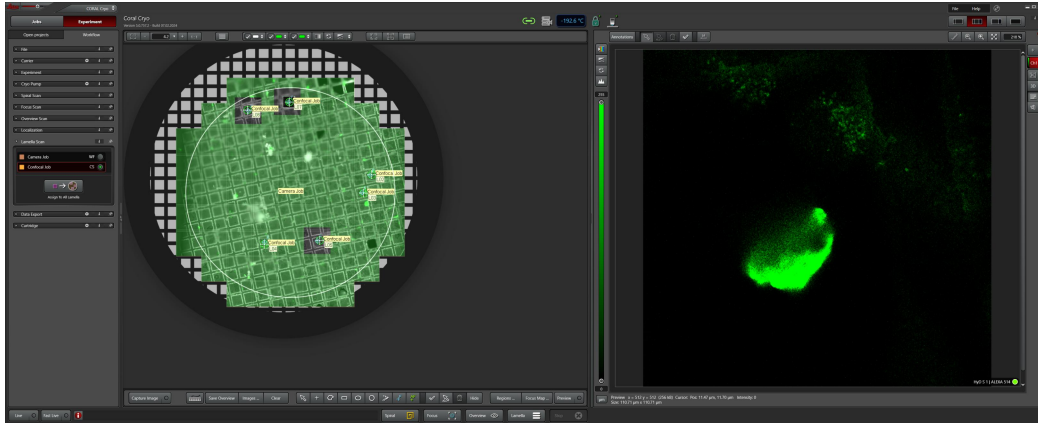


图 28

八. 保存数据

拍摄完成后，进入 Job → Open Project，选中所有图像，执行 Save as → TIF → Extended Leica File (*.xlef) → Save。

最后进行全景图合并 (Merge Overview)：切换至 Job，选择 camera job → Acquisition → LAS X Navigator，点击左上方 Mosaic Merge；在左侧 Project 栏中选择 Overview 数据，点击右下角 Merge 生成拼图。右键单击合并后的图像，选择 Export image，在弹出的窗口中设置 File option → Destination Folder，完成保存。

请将数据转移至 share110 共享盘 (密码贴于电脑下方)，再到电镜操作间 3 号 300 kV 左侧的共享电脑进行数据拷贝。

九. 拍摄 Lightning 图 (选做)

切换至 Job 选项卡，点击左上角 “+>” 新建 New Lightning Job。右键单击 Lightning job，选择 Show Lightning Wizard，确认 Lightning 与 Confocal 参数。点击左上角 Lightning 按钮，在下拉菜单中选择 Coral Cryo。

切换至 Experiment，打开 Localization Manager，点击 Lamella，根据 Overview 结果在图中添加 Lamella point；点击 “+F”，为每个 Lamella point 添加 focus point，并手动设置 Z position。

选择 Lamella Scan，选用 Lightning job，点击 assign to all lamella，再点击右下角 Lamella Scan；输入项目名称 (名称不宜过长，否则会报错，系统可生成随机编码)，点击 OK 开始拍摄。

拍摄结束后，点击左侧 Open Projects，右键单击 Lamella scan，选择 Save As；在弹出窗口中选择 TIF 格式并保存，可前往对应文件夹查看。数据保存方法参照步骤七，在左侧 Project 中选择 Lightning 数据完成保存。

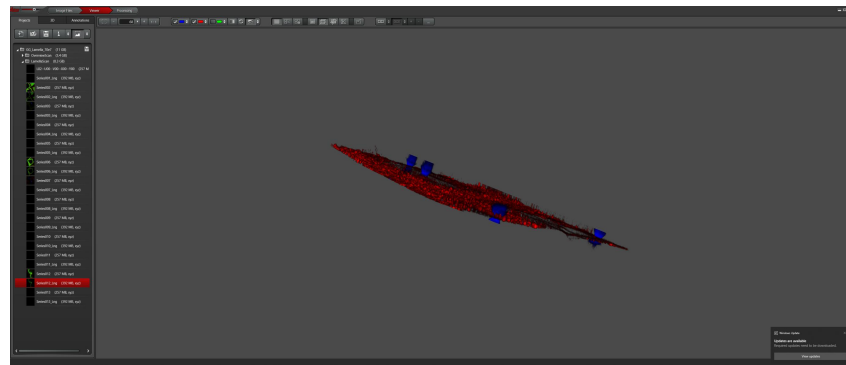


图 29

十. 关机

- 1.拍摄结束后，将样品从冷冻转移台回收至传输梭，完成样品回收。
- 2.长按 Home 键，升高样品台。
- 3.确认数据已妥善保存，在 Confocal Job 中点击 Add Laser 右侧的 Open Laser Overview，在弹出的对话框中关闭所有激光（如图 30）。
- 4.关闭 LAS X 软件及电脑。
- 5.关闭桌面荧光光源电源（如图 6），再按自下而上的顺序关闭激光柜（如图 31）。
- 6.按下温控系统 Heat 键加热样品台，等待约 20 分钟；待 Heat 红灯熄灭后，关闭温控器电源（图 31 红框）。
- 7.待氮气输送管回温软化后，拧下管路并悬挂于除湿器上方墙面；拔出液氮泵，同样悬挂于除湿器上方墙面（如图 33）。注意：严禁在管路冷冻状态下拉扯、弯折，防止破裂。
- 8.将上样梭放置于除湿机上晾干（如图 32）。注意：避免穿梭杆长期受力，延长使用寿命。
- 9.若液氮罐内余量较少或存有冰晶，请倒出剩余液氮并倒立放置晾干（如图 34）；若液氮余量充足且洁净，盖上蓝色盖子存放（如图 35），防止冰污染。注意：若发现液氮罐因放置过久已产生冰污染，须清空液氮并更换已晾干的液氮罐。



图 30



图 31

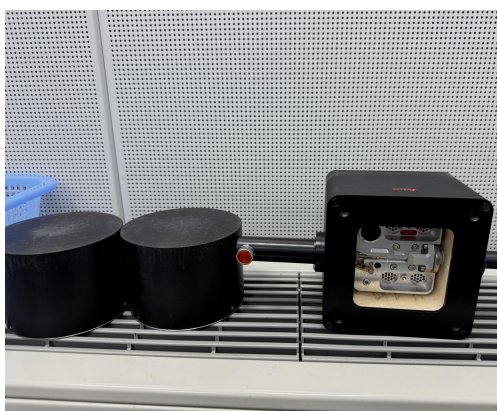


图 32



图 33



图 34



图 35