1. 开机建议顺序:

① STEDYCON背部电源、② standby灯亮后,前部旋钮拧到ON、③Nikon显微镜控制器、④ piezo载物台、⑤ LED灯、⑥电脑



- 2. 选择合适物镜,STED成像需使用100x物镜。
- 3. 确定物镜干净、加镜油、放样(盖片朝下或使用薄底培养皿)。





- **5**. 通过粗调焦,把物镜上升到镜油粘到样品处。 (熟练用户可以直接跳过6-8,从步骤15开始找样品)
- 6. 把光路切换到眼睛,选择对应滤光块(在触控器显示屏上可看到),打开LED光和 显微镜光闸。





- 7. 通过目镜、向上细调焦Z,移动XY载物台,用肉眼找到样品。
- 8. 关闭LED,把光路切换到相机L,滤光块选择空位。

9. 打开桌面上STEDYCON快捷方式



- 9. 点击"Start New Session"开始实验。
- 10. 输入实验名、样品名、放大倍数、物镜NA (如100X NA1.45),从长波长到短波长选择对应染料和展示颜色 (如没有完全一致染料,请选近似),点击"Let's Go"。



11. 进入操作界面



12. 默认情况下,预览和拍照的图像自动保存到STEDYCON主控制器内,如果想更改,可以点掉高亮的Auto图标,但请注意需手动点击"save image"保存图像。

- 14. 选一个或多个通道,点Overview旁的连续预览按钮预览扫描整个视野。(overview默认全视野、快速、共聚焦扫描)。
- 15. 把鼠标移动到调节Z轴的白色竖线上,滚动鼠标滚轮来精调焦面; (如果这一步开始找样品,可以边扫描边边快速调焦,当发现非常 明亮线时,在此处慢慢反复微调直到找到荧光样品)。



- **16**. 调节激光功率,使图像有很好的信噪比,并注意所关注的区域尽量 不要过饱和。
- 17. 点击STOP或Overview结束预览。
- 18. 在图像上,用鼠标左键画出一个右击选择固定大小的感兴趣区域。 (STED分辨率极高,建议选择区域尽量小)。
- 19. 点击Acquire旁的连续拍摄按钮,精调焦面和通道的激光功率。如果 是多通道图像,逐个调节每个通道的激光功率。



- 20. 勾选STED,并点击激活STED设置。
- **21.** 节STED下的激发光的功率(一般约为Confocal下的通道激光功率的 5-10倍),和分辨率(分辨率越高,损耗光激光功率越高)。
- 22. 点击"Acquire"获得Confocal和STED图像。
- 23. 通过点击Confocal和STED(不是勾选或勾掉),分别查看图像。
- 24. 点击界面左上角的 🖾 图标激活看图窗口。





- 25. 在看图窗口内可以做下载到本地电脑或删除图像等操作,并可以输 出图像为PDF或PNG格式等。
- 26. 下载到本地的原图格式为obf,可以使用ImageJ或Huygens等软件打开。
- 27. 操作结束后,点击"Finish Session"结束实验,并逆序关机。

