

# 301R IX71 使用手冊

Ver. 2.6

謝馨儀

王盛翰

November 4, 2011

## **前言:**

此使用手冊提供了工科新館 301R 之 Olympus IX71 倒立式顯微鏡之詳細的介紹及使用方法，內容包括有明場、暗場、相位差顯微鏡，雷射、可見光波段光譜儀、TIRF 以及共軛焦顯微鏡。

本實驗室內之所有設備皆屬於國立清華大學微奈米暨生醫光機電及流體系統實驗室曾繁根教授所有。

使用本設備前請務必先閱讀並嚴格遵守使用規則。

# 目錄

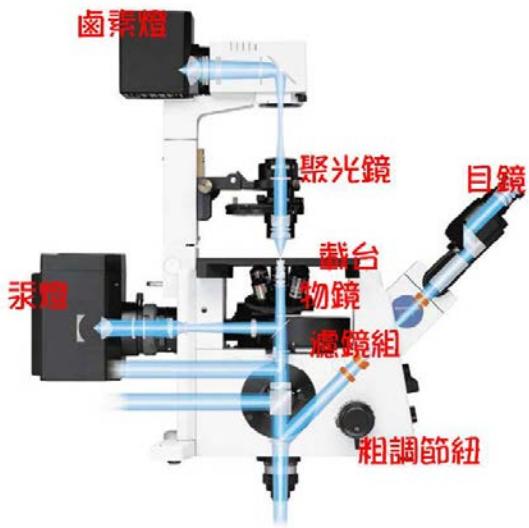
A.	<b>301R 光學系統使用規則</b>	1
B.	<b>301R 光學系統暨元件簡介</b>	2
C.	<b>基本顯微鏡使用(明場光學及螢光顯微鏡)</b>	6
D.	<b>相位差及暗場光學顯微鏡</b>	9
E.	<b>EM 高速CCD (黑白CCD)</b>	13
F.	<b>Pixel-Fly 彩色CCD</b>	15
G.	<b>光譜儀</b>	17
H.	<b>Laser (488 nm/~7 mW、532 nm/~30 mW、638 nm/~11 mW)</b>	24
I.	<b>TIRF</b>	26
J.	<b>共軛焦掃描顯微鏡系統(基本版，手動操控Z軸位置)</b>	31
K.	<b>共軛焦掃描顯微鏡系統(Labview 控制Z軸掃描)</b>	36
附錄一	<b>網路IP設定</b>	41
附錄二	<b>合格使用者清單</b>	42

## A. 301R 光學系統使用規則

1. 儀器開放時段為周一至周五 10：00~22：00。
2. Super-user 開放時段則不受限。但周一至周五 10：00~22：00 其間僅可預約 12 小時，其他時段不受限。
3. 使用前請先預約。若某一時段無人預約且無人使用時，任何使用者可直接使用。若某一時段已有人預約，但遲到 20 分鐘時，視同該預約者自願放棄該時段，任何合格使用者即可以開始使用，無須通知該預約者。
4. 一般使用者一周內可預約時段為 6 小時，每訓練其他使用者一次，可增加預約時段 1 小時，當累積時數達 12 小時，且經管理者評估後可晉升為 super-user。
5. 須經過訓練及通過考核後方可取得使用資格。
6. 實驗室內嚴禁飲食，若有湯湯水水的樣品請小心操作，或將儀器接頭處以防水布覆蓋以避免因湯湯水水使儀器燒壞，若不小心潑灑至儀器接頭或內部時務必通知 super-user，並停止手邊實驗。
7. 合格使用者將發給一片專用之 DVD-RW 或 VCD-RW，檔案燒錄僅能以 DVD 或 VCD 存檔，切勿使用 USB，否則一律停權一個月。假若使電腦中毒，將自電腦重灌可開放重新使用日起停權兩個月。由於電腦中毒會使某些設備無法使用，故請務必遵守。
8. 若超過 3 個月未使用該儀器，將暫時取消其合格使用權，待重新考核後開放其使用權。
9. 該系統附有三台高敏感度 CCD，總價高達 400 萬，極容易受不當操作而損壞或縮短使用壽命，且維修費甚鉅，務必嚴格遵守操作的規定，若因疏忽或使用不當而造成儀器損傷，依程度輕重將報請曾繁根老師處分。

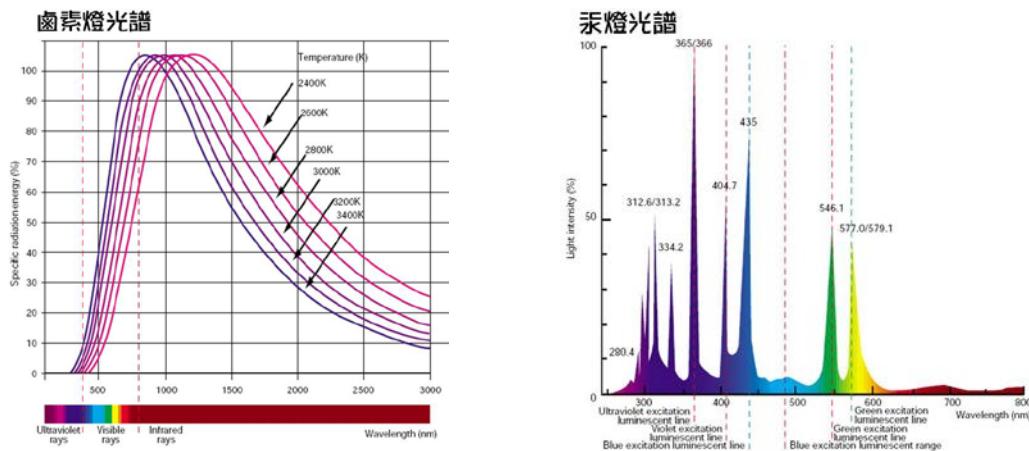
## B. 301R 光學系統暨元件簡介

### 1. Olympus IX71 倒立式顯微鏡



### 2. 光源

- (1) 鹤素燈(Halogen Lamp): 20 w (5-22lm/w) (光譜如左下)
- (2) 水燈(Mercury Lamp): 100 w (~50lm/w) (光譜如右下)



- (3) 雷射光源(Laser): 488 nm 藍光雷射、532nm 綠光雷射及 638 nm 紅光雷射



### 3. 物鏡(Objective Lenses)

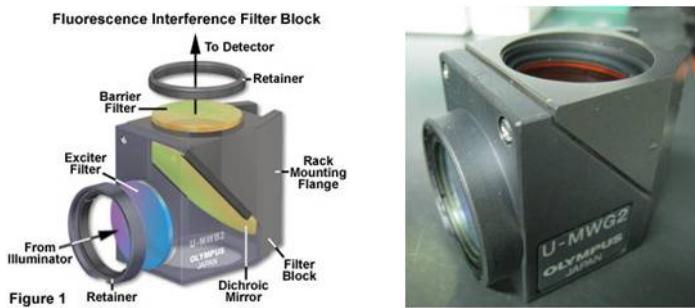


Mag.	1X	2X	4X	10X
Color code	Black	Gray	Red	Yellow
Mag.	20X	40/50X	60X	100X
Color code	Green	Light blue	Dark blue	White

功能	明場光學及 螢光光學	暗場光學	相位差	TIRF	共焦顯微 Confocal system
適用物鏡	除相位差及 TIRF 專用物鏡 外，其他物鏡 皆可使用。	1. 60X NA.:0.65-1.25; WD.:120μm. <u>*fig.1</u> 2. 100X NA.:0.6-1.3; WD.: 200μm. <u>*fig.2</u>	1. 20X ph, N.A.:0.4; W.D.:3.2mm <u>*fig.4</u> 2. 60X ph, N.A.:0.7; W.D.:1.5-2.2mm (adjustable) <u>*fig.5</u>	60X TIRF 專用 物鏡  NA.:1.4; W.D.:100μm <u>*fig.6</u>	1. 60X /NA.:0.65-1.25; WD.: 130μm. <u>*fig.1</u> 2. 100X /NA.:0.6-1.3; WD.:200μm. <u>*fig.2</u> 3. 100X /NA.:1.4; WD.:130μm. <u>*fig.3</u>
備註	N.A.皆調整至 最大值。	需額外加裝暗 場聚光鏡且物 鏡之 N.A. 值皆 須調整至最小 值。	需額外加裝相 位差聚光鏡。	物鏡上有標 示”TIRF”。	物鏡之 N.A. 值皆須調 整至最大值。



#### 4. 濾鏡組(Filter Cube)



No.1: 50/50 beam splitter

No.2: 505 dichroic mirror (DM)

No.3: Blank (No filter)

No.4: Ex. 470-490BP /505DM /Em. 510LP

No.5: Ex. 510-550BP /570DM /Em. 570-640BP

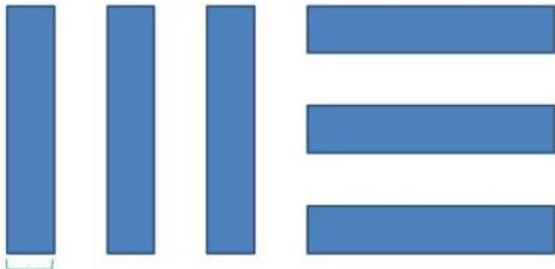
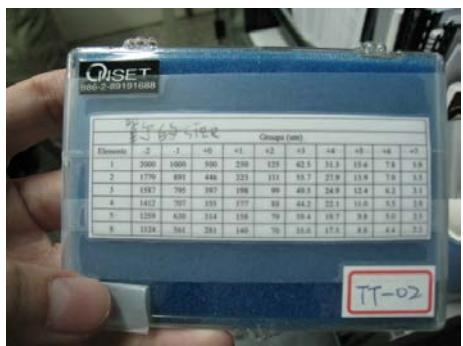
No.6: Ex. 590-650BP /660DM /Em. 667-738BP

#### 5. CCD

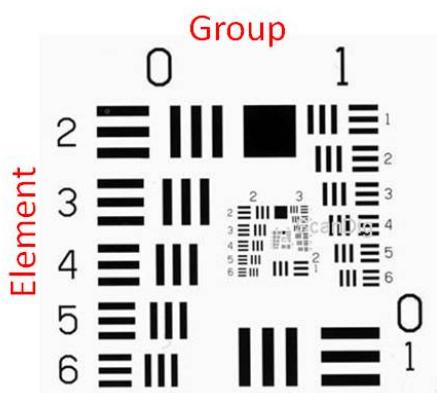


注意: 除 Pixel-Fly 為彩色 CCD 外，其餘皆為黑白 CCD。

## 6. 校正片



參照盒上所示之尺寸



### C. 基本顯微鏡使用(明場光學及螢光顯微鏡)

1. 檢查使用紀錄是否有異常。
2. 開 PC1 (右側電腦)。



3. 開 XYZ stage 控制器，”務必確認 Z 軸 disengaged，若否則切至 disengaged”。



4. 移動樣品的 XY 軸將由 XYZ stage 控制器控制，而 Z 軸由顯微鏡粗細調節輪控制。

注意: 若有異常情況發生(如轉軸有異常聲音，或自行移動)，應立即停止使用並立刻通知 super-user。

5. 若需要汞燈則開汞燈 (需離前一使用者關機後 15 分鐘, 使用 15 分鐘後始得關機)。



6. 若需要 Halogen 則開 Halogen 燈，且調至適當亮度 (燈源上方 filter 需往上掀開)



注意: 若從明場或暗場光學顯微切換至螢光顯微模式，請先將鹵素燈光源關閉。

7. 卸除聚光鏡，若顯微鏡上無聚光鏡則跳過此步驟。
8. 將物鏡往下降後確認不會撞到載台後，旋轉物鏡盤以選擇適當物鏡（物鏡一律放在防潮箱，使用時須自行裝在顯微鏡上）。
9. 使用汞燈時檢查光路上切換是否正確。

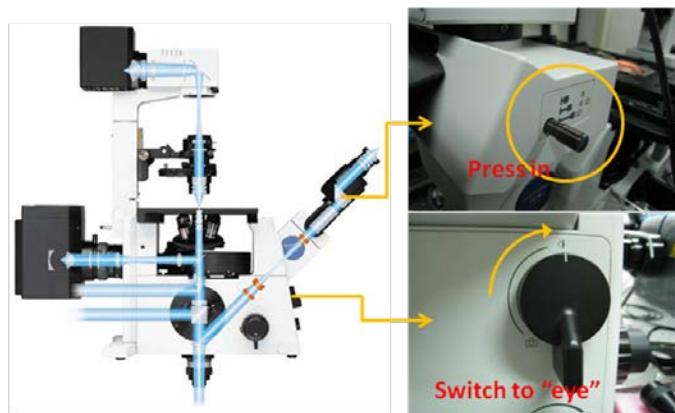


1. ND filter: 調整汞燈出光強度。
2. 光圈: 保持全開。
3. 往上拉，讓汞燈光源能通過。

10. 調整濾鏡組(Filter Cube)(No.1→ 50/50 BS, No.2→DR505 FRET, No.3→ bypass(無任何濾鏡), No.4→ 488 nm ex., No.5→ 532nm ex., No.6→ 638nm ex.)。

參見: B. 301R\_光學系統簡介 - 4. 濾鏡組(Filter Cube)

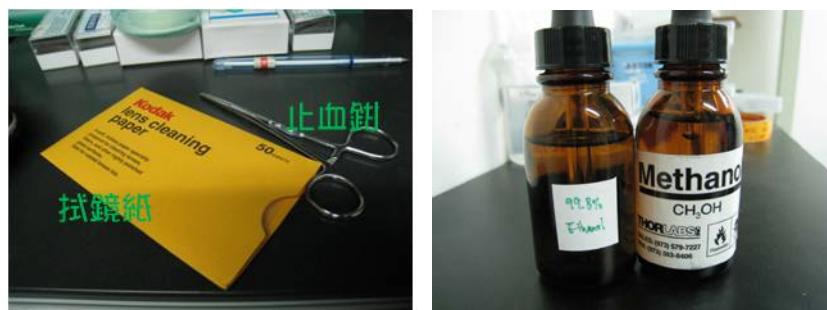
11. 目鏡切換:上方“橫桿”推到底，下方旋盤切至“眼睛”。



12. 將樣品置載台(上下顛倒→蓋玻片需在下面)並用顯微鏡的粗細調節輪調整焦距至看清樣品。
13. 使用 EM 黑白 CCD 或 Pixel-Fly 彩色 CCD 擷取影像或拍攝動態影片。在此，可依照實驗需要選擇使用 EM 黑白 CCD 或 Pixel-Fly 彩色 CCD。

參見: **E. EM CCD** 或 **F. Pixel-Fly CCD**。

14. 實驗中若需長時間不再使用汞燈，務必請先關汞燈，以維持汞燈使用時數。
15. 存取檔案僅可使用 DVD 或 VCD。禁止使用隨身碟。
16. 燒錄完檔案後，關電腦。
17. 關 XYZ stage 控制器電源。
18. 關所有燈源。
19. 降顯微鏡 Z 軸後，拆卸自行裝上去的物鏡。
20. 若使用油鏡，以拭鏡紙及止血鉗(下圖左)沾 1-2 滴甲醇(MeOH)或乙醇(EtOH)擦拭鏡頭，反覆擦到鏡頭乾淨沒有油為止，放回防潮箱(務必小心勿刮傷物鏡)



21. 將 Halogen 光源上掀起的濾鏡扳回原位。



22. 清理桌面上垃圾，並回歸原狀。
23. 填使用紀錄。

#### D. 相位差及暗場光學顯微鏡

1. 檢查使用紀錄是否有異常。
2. 開 PC1 (右側電腦)



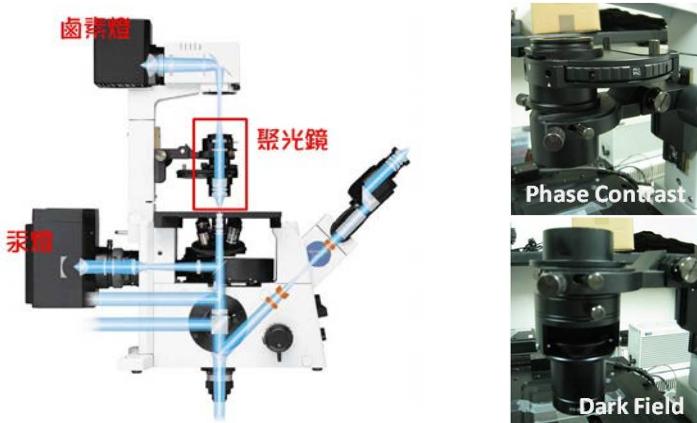
3. 開 XYZ stage，"務必確認 Z 軸 disengaged，若否則切至 disengaged"。



4. 移動樣品的 XY 軸將由 XYZ stage 控制器控制，而 Z 軸由顯微鏡粗細調節輪控制。

注意: 若有異常情況發生(如轉軸有異常聲音，或自行移動)，應立即停止使用並立刻通知 super-user。

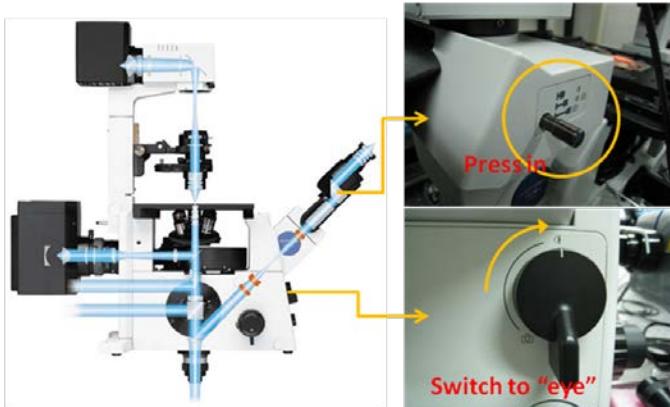
5. 選擇適當的聚光鏡(相位差或暗場光學)，並將其裝載至下圖所示之位置。



6. 若需要鹵素燈則開鹵素燈，且調至適當亮度 (燈源上方 filter 需往上掀開)



- 目鏡切換:上方“橫桿”推到底，下方旋盤切至“眼睛”。



- 將物鏡往下降後確認不會撞到載台後，旋轉物鏡盤以選擇適當物鏡（物鏡一律放在防潮箱，使用時須自行裝在顯微鏡上）。（相位差顯微鏡：可使用 20x ph 或 60x ph 相位差專用物鏡；暗場光學顯微鏡：可使用 100x 油鏡或 60x 油鏡。物鏡皆放置於防潮箱內。）

參見: B.301R \_光學系統簡介 – 3.物鏡(Objective Lenses)

**相位差光學** (使用 20x ph 或 60x ph (可調整物鏡工作距離即所選用之蓋玻片之厚度)物鏡，物鏡皆放置於防潮箱內)

- 選用與所選之物鏡搭配之光圈環。
- 若選用物鏡為 60x ph 物鏡，請先將其蓋玻片厚度旋至 0.17 mm 處；20x ph 則不用。
- 調整 filter cube 至 3 (bypass) 後，目鏡切換至“眼睛”。
- 將樣品以蓋玻片蓋在載玻片上，上下顛倒放置玻片至載台上(如下圖所示)，並利用顯微鏡的粗細調節輪調整焦距至看清樣品。接步驟 19。



**暗場光學** (使用 60x 油鏡或 100x 油鏡(皆可調整 N.A.值)，物鏡皆放置於防潮箱內)

- 調整物鏡之 N.A. 值至最小值(60x: 0.65; 100x: 0.6)後，將鏡油滴在物鏡上(約一到兩滴)。
- 調整 filter cube 至 3 (bypass) 後，目鏡切換至“眼睛”。
- 在物鏡上滴上適量的鏡油(約 1-2 滴)，再將樣品以蓋玻片蓋在載玻片上，上下顛倒放置玻片至載台上(如下圖所示)。



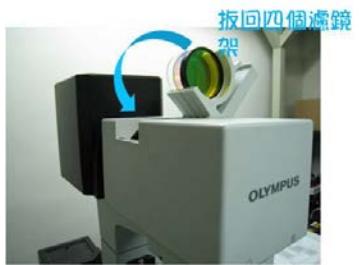
16. 緩緩升起 Z 軸至物鏡剛好頂到樣品，再將聚光鏡降低至離樣品約 0.5~1cm 處。
17. 用顯微鏡的細調節輪緩慢降低物鏡高度至看清樣品(若看不清楚可試著調整聚光鏡上下各 0.5cm 左右，以不撞到樣品為原則)。
18. 中間若需切換至螢光激發，則依照所用樣品之螢光範圍調整濾片組至 No.4-No.6，且將物鏡的 N.A. 值調至最大。

注意: 若從明場或暗場光學顯微切換至螢光顯微模式，請先將鹵素燈光源關閉。

19. 切換 DF 與螢光模式常常容易搞錯或漏掉步驟，則可能傷害到 CCD 或眼睛，務必再三確認。  
 (相位差模式: cube No.3/ 其 N.A. 值皆為固定；暗場光學: cube No. 3/ N.A. 值皆調至最小值；螢光模式: cube No. 4-6，千萬不可停在 cube 1-3，儀器會燒壞掉/ N.A. 值皆調至最大值。)
20. 使用 EM 黑白 CCD 或 Pixel-Fly 彩色 CCD 擷取影像或拍攝動態影片。在此，可依照實驗需要選擇使用 EM 黑白 CCD 或 Pixel-Fly 彩色 CCD。
- 參見: E. EM CCD 或 F. Pixel-Fly CCD。
21. 實驗中若需長時間不再使用汞燈，務必請先關汞燈，以維持汞燈使用時數。
22. 存取檔案僅可使用 DVD 或 VCD。禁止使用隨身碟。
23. 燒錄完檔案後，關電腦。
24. 關 XYZ stage 控制器電源。
25. 關所有燈源。
26. 拆卸聚光鏡並放回防潮箱內。
27. 降顯微鏡 Z 軸後，拆卸自行裝上去的物鏡。
28. 若使用油鏡，以拭鏡紙及止血鉗(下圖左)沾 1-2 滴甲醇(MeOH)或乙醇(EtOH)擦拭鏡頭，反覆擦到鏡頭乾淨沒有油為止，放回防潮箱(務必小心勿刮傷物鏡)



29. 將鹵素燈光源上掀起的濾鏡扳回原位。

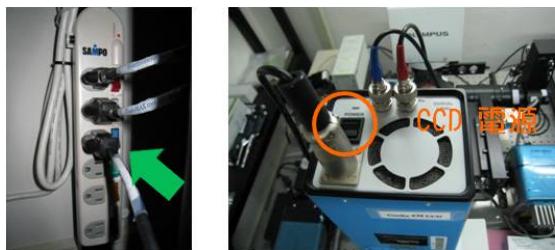


30. 清理桌面上垃圾，並回歸原狀。

31. 填使用紀錄。

## E. EM 高速 CCD (黑白 CCD)

1. 將 EM CCD 裝至顯微鏡上。
2. 開啟延長線電源(下圖左，上面數來第三個)及 CCD 電源(下圖右)。



3. 在 PC1 桌面上滑鼠點擊“CamWare”。
4. 將橫桿拉出，以便讓光進入 EM CCD。



5. 點擊 開啟 EM CCD 畫面(黑白)視窗。



6. 參數設定，點擊 。

(1) Timing: Exposure time: 0.1 msec. (若曝光時間小於 1 秒，請選擇“short exposure time”；若大於 1 秒，則選擇“long exposure time”.) 曝光時間通常都從 **0.1 msec.** 開始往上增加，且每次增加不超過上次曝光時間之五倍。

(2) Analog mode: gain=2. Gain 值則按照 **2→5→10→20→50** 往上加，最大值為 **50**.

(3) Binning: horiz. →1, vert.→1

(4) Camera mode: video.

(5) Trigger mode: intern.



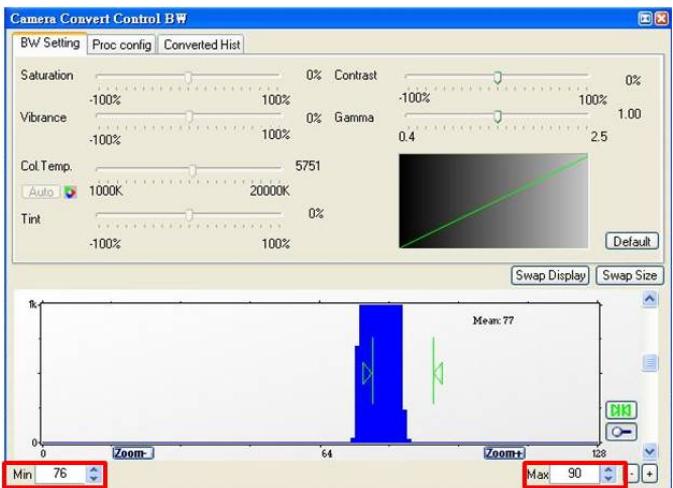
7. 點擊 預覽。



8. 若影像不夠清楚，可點擊 ，會出現以下畫面，可調整 max. 及 min.(紅色框起處)，直到你



想要的影像對比為止；或可直接點擊 自動調整。



9. 點擊 拍照(單一張，須按 往回跳一張)。

10. 儲存圖片：File→export, export as 8-bit.tif (單張)。



11. 若需錄影,點擊 開始記錄, 停止紀錄, 播放所記錄之影片。

12. 儲存成影片或多張連續圖片 File→export record, 選 8-bit.avi 輸出成.avi 影片檔或 8-bit.tif 輸出成連續多張.tif 圖片檔。

13. 選擇你所要存置的資料夾並儲存資料。

14. 若不再需要使用汞燈, 請先關閉汞燈, 以延長期使用期限。

15. 將“CamWare”之參數調回原始值：

(1) Timing: Exposure time: 0.1 msec.

(2) Analog mode: gain=2

16. 關閉“CamWare”視窗→ 關閉 EM CCD 電源→關閉延長線電源。

## F. Pixel-Fly 彩色 CCD

1. 將 Pixel-Fly 裝至顯微鏡上。
2. 插上 Pixel-Fly 傳輸線(同時也是電源線)。



3. 在 PC1 桌面上滑鼠點擊” CamWare” 。
4. 將橫桿拉出，以便讓光進入 EM CCD 。

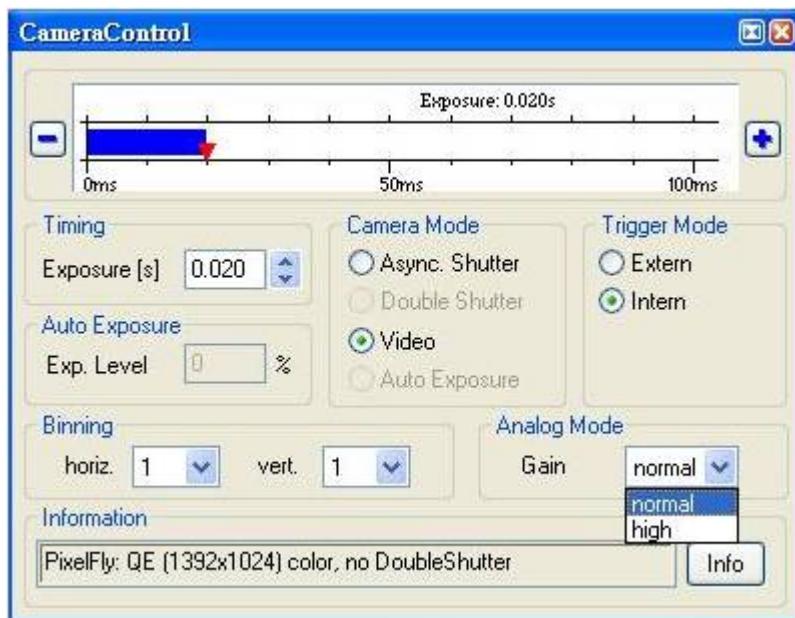


5. 點擊 開啟黑白畫面視窗或點擊 開啟彩色畫面視窗。



6. 參數設定，點 。

- (1) Timing: Exposure time: 0.1 msec. (若曝光時間小於 1 秒，請選擇“short exposure time”；若大於 1 秒，則選擇“long exposure time” ). 曝光時間通常都從 **0.1 msec.** 開始往上增加，且每次增加不超過上次曝光時間之五倍。
- (2) Analog mode: gain=normal. Pixel-Fly 之 **Gain** 值僅有”**normal**”及”**high**”兩種模式，若影像對比一直不明顯，則再選用”**high**” **Gain** 值。
- (3) Binning: horiz. →1, vert.→1
- (4) Camera mode: video.
- (5) Trigger mode: intern.



7. 點擊 預覽。



8. 點擊 拍照(單一張，須往回跳一張)。

9. 儲存圖片：File→export, export as 8-bit.tif (單張)。



10. 若需錄影,點擊 開始記錄, 停止紀錄, 播放所記錄之影片。

11. 儲存成影片或多張連續圖片 File→export record, 選 8-bit.avi 輸出成.avi 影片檔或 8-bit.tif 輸出成連續多張.tif 圖片檔。

12. 選擇你所要存置的資料夾並儲存資料。

13. 若不再需要使用汞燈，請先關閉汞燈，以延長期使用期限。

14. 將“CamWare”之參數調回原始值：

(1) Timing: Exposure time: 0.1 msec.

(2) Analog mode: gain=normal.

15. 關閉“CamWare”視窗→ 移除傳輸(電源)線。

## G. 光譜儀

1. 檢查使用紀錄是否有異常。
2. 開 PC1 & PC2 。



3. 利用遠端連線(在 PC1 桌面上點“NE301.RDP”)連至 PC2，密碼 35807。 (若無法登入則等 5-10 分鐘再試，關機亦須由遠端控制關機，不可直接關閉電源。)
4. 開 XYZ stage，”務必確認 Z 軸 disengaged，若否則切至 disengaged”。



5. 移動 sample 的 XY 軸將由 XYZ stage 控制，而 Z 軸由顯微鏡粗細調節輪控制。

注意: 若有異常情況發生(如轉軸有異常聲音，或自行移動)，應立即停止使用並立刻通知 super-user 。

6. 若需要汞燈則開汞燈(需離前一使用者關機後 15 分鐘, 使用 15 分鐘後始得關機)。



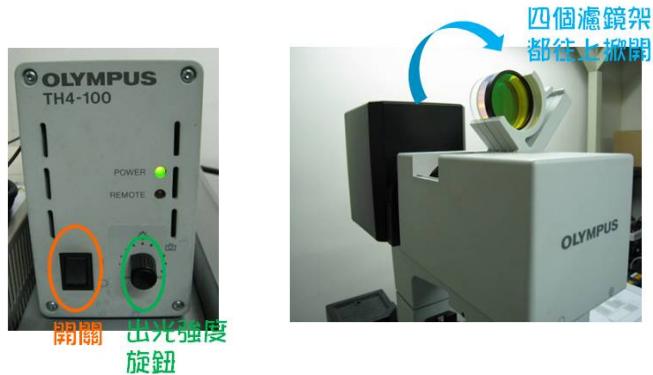
7. 開光譜儀延長線電源(兩個)，接著”務必依序開地上冷卻液主機(左圖)→光譜電源(中)→CCD 電源(右圖)”。



- 若需要則裝上聚光鏡。

參見: **D. 相位差及暗場光學顯微鏡**

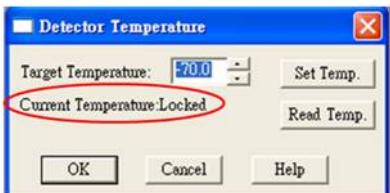
- 若需要鹵素燈則開鹵素燈，且調至適當亮度（燈源上方 filter 需往上掀開）。



- 物鏡往下降後確認不會撞到載台後，旋轉物鏡盤以選擇適當物鏡（物鏡一律放在防潮箱，使用時須自行裝在顯微鏡上）。
- 調整濾鏡組(Filter Cube)(No.3→ bypass(無任何濾鏡), No.4→ 488 nm ex., No.5→ 532nm ex., No.6→ 638nm ex.)。

參見: **B. 301R\_光學系統簡介 - 4.濾鏡組(Filter Cube)**

- 目鏡下方旋鈕轉至”眼睛圖案”且橫桿左推至底。
- 將樣品放置在載台上。
- 用顯微鏡的粗細調節輪調整焦距至看清樣品。
- 開 Winspec 光譜儀軟體(在 PC2 桌面)。
- 選擇 Setup→Detect Temp. 等待溫度到-70C 後關掉視窗(中間不可操作)。



### 影像擷取

- 點選控制列 Spectrograph→Move→選擇 1200 Mirror。選擇 0 nm。
- 光譜儀橫桿下推→影像擷取(此時pinhole孔徑大小為 1 cm<sup>2</sup>，亦即可擷取的影像大小為 1 cm<sup>2</sup>。)

19. 目鏡下方旋鈕務必確認在"眼睛圖樣"時，先取 background ( Acquisition→Acquire Background)。
20. 目鏡下方旋鈕轉至"相機圖案"。



## 21. 參數設定

Acquisition→Experimental Setup, 或快捷鍵 。

- (1) →ADC→Read out 選擇 Normal。
- (2) →Main , Gain 值 : 0 ; Exposure time : 0.1 msec.

同一片 sample 拍照的第一個參數"務必"由 0.1 msec 開始往上加，每次增加不可超過 5X 曝光時間。

- (3) 設定完畢後，按"acquire"拍照，或快捷鍵 。



注意: 此台 CCD 因無保護裝置，務必注意影像不可過曝。樣品區域差異很大時，需特別緩慢移動樣品。掃不同光波段時也須降曝光時間降低至 0.1 msec 再慢慢往上加。

22. 調至適當參數後，僅可存靜態影像，無動態拍攝功能。
23. 儲存影像檔：File→save as,另存成.tif(8 bit)影像檔。

## 光譜擷取

24. 若需看光譜，先將所要看的區域移至影像正中央，光譜儀橫桿上拉→光譜擷取(此時pinhole孔徑大小為 1 mm<sup>2</sup>)。
25. 點選控制列 Spectrograph→Move→選擇 600 BLZ。選取樣品之螢光波段(此光譜儀適用波長範圍

為 400~700 nm)。

## 26. 參數設定

Acquisition→Experimental Setup, 或快捷鍵 。

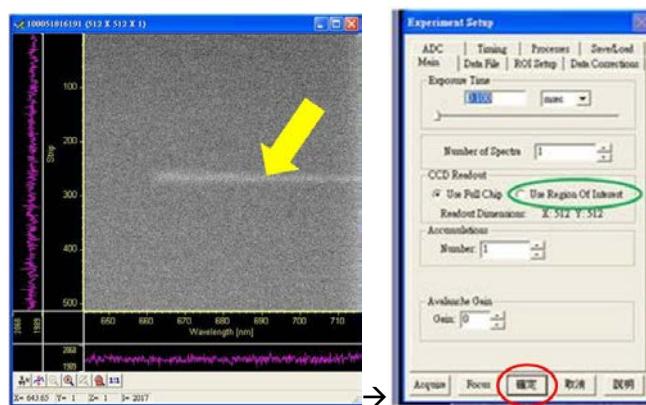
- (1) →ADC→Read out 選擇"multiple gain"。
- (2) →Main, Gain 值 : 0
- (3) Exposure time : 0.1 msec.

注意: 同一片 sample 拍照的第一個參數"務必"由 0.1 msec 開始往上加，每次增加不可超過 5X 曝光時間。若曝光時間已達 1 sec 仍無影像，始可增加 gain 值(開始為 500->1000，然後逐次上加(+500)，最大到 3000)。

- (4) 設定完畢後，按"acquire"拍照，或快捷鍵 。

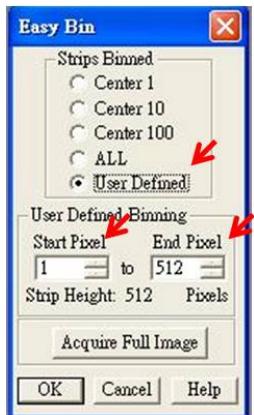


- (5) 拍完後，將滑鼠移至影像，接著按右鍵→New...→Graph.確定 counts 沒有超過 6,000。
- (6) 若影像已有出現明顯的亮線(見左下圖)，點 acquisition→選"Use Region of Interest"(見右下圖)後按確定。



- (7) 接著點 acquisition→選"Easy Bin..."。
- (8) 選"User Defined"，並利用"Start Pixel"及"End Pixel"圈選亮線位置(會出現紅色框框)，點

OK(見下圖)。



(9) 設定完畢後，再按一次”acquire”擷取光譜，或快捷鍵 。

(10) 當點選”multiple gain”後光譜可能會變相反，此時請點 setup→ hardware →Display →Reverse，之後再重拍一次光譜即可。

#### 簡易操作提示：

若即使曝光時間以及 gain 值皆已調至最小值(0.1 msec.及 0)，但訊號強度仍然一直大於 60,000counts 的話(通常是因為系統過熱)，請嘗試以下步驟。

(1) 檢查冷卻水系統之水管，確認冷卻水是否有在流動，或是檢查水管接頭處(見下圖)是否有鬆脫。



(2) 若系統仍持續過熱，請試著重設軟體系統，步驟如下：

- ① Setup→Hardware→Controller/Camera→Launch Camera Detection Wizard→確定→下一步(N)→下一步(N)→下一步(N)→完成.
- ② Setup→Hardware→Cleans→Load Default Values→是(Y)→確定→關閉視窗.
- ③ 從步驟 24.再重試一次。

注意: 此台 CCD 因無保護裝置，務必注意影像不可過曝。樣品區域差異很大時，需特別緩慢移動樣品。掃不同光波段時也須降曝光時間降低至 0.1 msec 再慢慢往上加。

簡易操作提示：

同一 Sample (以下步驟停在訊號強度 count 約在 2,000~3,000 處，就已達到足夠的實驗 data) :

0.1 msec~1 sec -> 不開 gain 值，5X 慢慢往上加曝光時間

1 sec -> 停在 1 sec，開 gain 值，ADC→Read out-> multiple gain→Main，

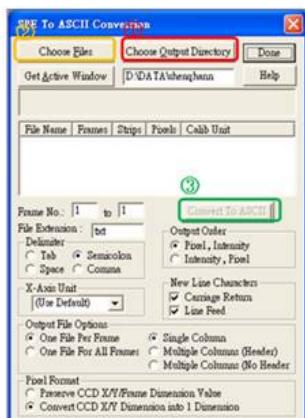
Gain 值->500 ->1000 ->1500 ->2000 -> 2500 -> 3000

1 sec ~ 1 min -> Gain 固定在 3000，曝光時間 2-3X 慢慢往上加

1 min(Gain=3000) -> 尋求 Superuser 幫助，請勿再自行增加曝光時間。

27. 輸出成.txt 檔：點 Tool→convert to ACSII

(1) →Choose output directory 選擇欲存檔位置，→choose files 選擇欲轉檔之檔案。



注意: 此軟體有自動儲存成“SPE Files (\*.SPE\*)”的功能，所以 choose file 請至 C:/program files/PI acton/WinSpec 選取你所要轉存的檔案即可。

(2) 按下 convert to ACSII 之按鍵即可。

(3) 等顯示 done 後便可關閉視窗。

28. 實驗中若需長時間不再使用汞燈，務必請先關汞燈，以維持汞燈使用時數。

29. 存取檔案僅可使用 DVD 或 VCD。禁止使用隨身碟。

30. 將“Winspec”參數調回原始值

(1) Exposure time: 0.1 msec.

(2) gain value: 0.

(3) ADC→Read out → Normal

(4) 關閉 “Winspec”。

31. 關 CCD 電源→光譜儀電源→冷卻水電源→延長線開關(x2)。(順序不可亂，否則可能當機或燒壞 CCD)。



32. 燒錄完檔案後，關 PC2 電腦(將滑鼠移到螢幕下方藍色的工作列按右鍵→工作管理員(K)→關機(U)→關機(U)→確定)
33. PC1 關機。
34. 關 XYZ stage 控制器電源。
35. 關所有燈源。
36. 降顯微鏡 Z 軸後，拆卸自行裝上去的物鏡。
37. 若使用油鏡，以拭淨紙沾一滴甲醇擦拭鏡頭後，放回防潮箱(務必小心勿刮傷物鏡)。
38. 將鹵素燈光源上掀起的濾鏡扳回原位。



39. 清理桌面上垃圾，並回歸原狀。
40. 填寫使用紀錄。

## H. Laser (488 nm/~7 mW、532 nm/~30 mW、638 nm/~11 mW)

1. 檢查使用紀錄，離前一人關閉雷射後 20 分鐘再開。
2. 先確認 combiner 上 shutter 全關。(右下圖)
3. 將旋鈕皆調整至 0 使得每隻雷射之出光強度皆為 0，開需使用之 laser。(左下圖)



4. 488 nm 藍光雷射：先開電源待 1 分鐘之後轉 key (下圖左)。
5. 532 nm 綠光雷射：先開電源待 1 分鐘之後轉 key (下圖中)。
6. 638 nm 紅光雷射：先確認前方兩個開關皆往上之後，再開電源即可 (下圖右)。



7. 開所需要之 laser 之 shutter，再順時針調整 switch 至所需之 power (建議小於或等於 20%)。



8. 打開雷射光路上之所有 shutters.(如下圖所示)。



9. 關機：

- (1) Switch 皆調成 0。
- (2) Shutter 全關。
- (3) 488 nm 藍光雷射：先轉 key，等風扇不再發出極大噪音後才能關(約 5-10 分鐘)。

532 nm 綠光雷射：先轉 key，待 1 分鐘(降溫)再關 power。

638 nm 紅光雷射：直接關 power 即可(因其冷卻系統較好)。

10. 填寫使用紀錄。

注意: 眼睛切勿直視 fiber 出口處，且 fiber 及其兩端接頭處，切勿凹折、撞擊.....。

## I. TIRF

1. 檢查使用紀錄是否有異常。
2. 開 PC1 (右側電腦)。



3. 開 XYZ stage , "務必確認 Z 軸 disengaged , 若否則切至 disengaged"



4. 移動樣品的 XY 軸將由 XYZ stage 控制器控制，而 Z 軸由顯微鏡粗細調節輪控制

注意: 若有異常情況發生(如轉軸有異常聲音，或自行移動)，應立即停止使用並立刻通知 super-user 。

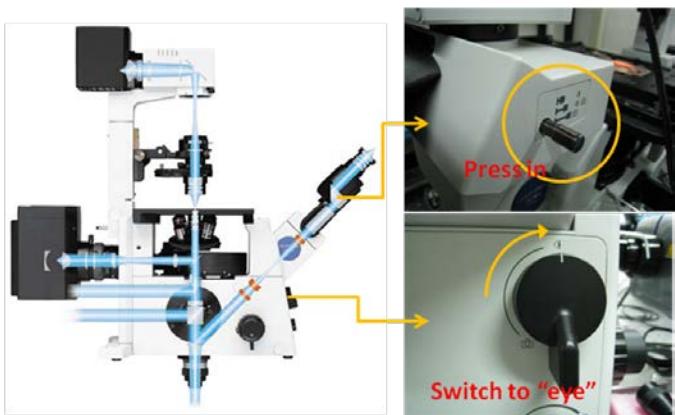
5. 開 Laser.

參見: H. Laser

6. 將顯微鏡 Z 軸往下旋轉後確認不會撞到載台後，裝載 60X TIRF 專用物鏡 (油鏡一律放在防潮箱，使用前務必清潔鏡頭)，並將物鏡上的環轉至蓋玻片厚度的刻度(一般為 0.17 mm)。
7. 調整 filter cube 至 (No.4 → 488nm laser、No.5 → 532nm laser、No.6 → 638nm laser)(使用前請先拆下 cube 上 excitation 的濾片(見下圖)，並使用噴氣球清潔濾鏡)



8. 目鏡切換:上方“橫桿”推到底，下方旋盤切至“眼睛”。



9. 將光路轉到雷射光源。(汞燈與雷射光源之切換橫桿下壓，見下圖)



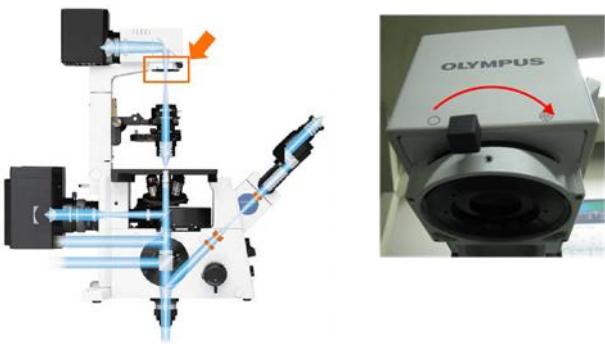
10. 開 laser shutter → 調 laser 強度。



11. 打開 TIRF 的 shutter(轉 key)。



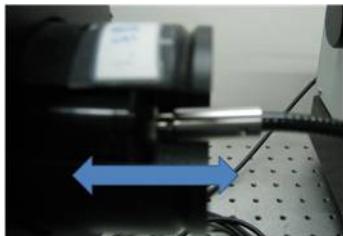
12. 並將鹵素燈出口的光圈關到最小(見下圖)。



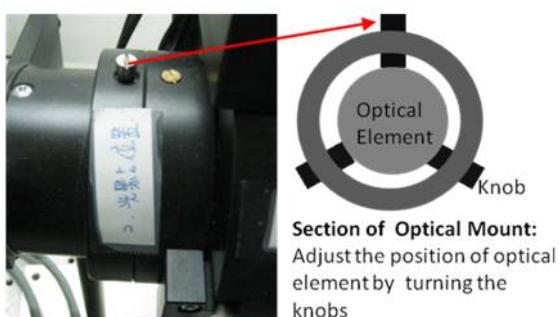
13. 將 TIRF 調節輪之旋鈕轉至原點後(見下圖)。



14. 調整光纖之前後位置，令光點聚到最小(見下圖)。



15. 微調光學制具(Optical Mount)之旋鈕將雷射光點打至光圈正中央。



16. 關 shutter 擋住雷射光源。

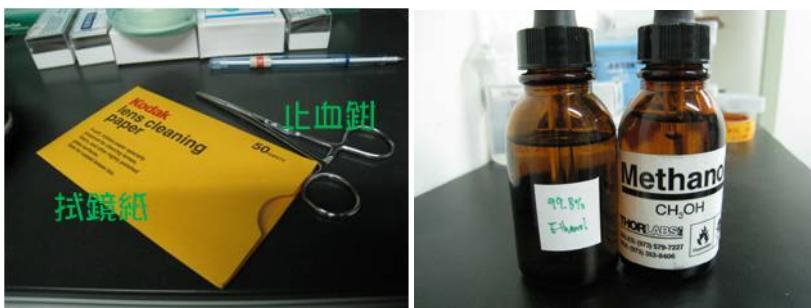
17. 開鹵素燈，且調至適當亮度 (燈源上方 filter 需往上掀開)。



18. 在物鏡上滴上適量的鏡油(約 1-2 滴)，再將樣品以蓋玻片蓋在載玻片上，上下顛倒放置玻片至載台上(如下圖所示)。



19. 緩緩升起 Z 軸至物鏡接觸到樣品，再利用細調節輪慢慢調整至焦平面以可以看清楚樣品為主(可先對焦在蓋玻片上之異物)。
20. 關鹵素燈，開啟雷射 shutter。
21. 調整 TIRF 調節輪，使得雷射光點突然消失。
22. 微調焦平面至可看見樣品螢光最強處。
23. 使用 EM 黑白 CCD 或 Pixel-Fly 彩色 CCD 撷取影像或拍攝動態影片。在此，可依照實驗需要選擇使用 EM 黑白 CCD 或 Pixel-Fly 彩色 CCD。
- 參見: **E. EM CCD** 或 **F. Pixel-Fly CCD**。
24. 存取檔案僅可使用 DVD 或 VCD。禁止使用隨身碟。
25. 關雷射。
- 參見: **H. Laser**
26. 燒錄完檔案後，關 PC1。
27. 關 XYZ stage 控制器電源。
28. 關所有燈源。
29. 降顯微鏡 Z 軸後，拆卸自行裝上去的物鏡。
30. 若使用油鏡，以拭鏡紙及止血鉗(下圖左)沾 1-2 滴甲醇(MeOH)或乙醇(EtOH)擦拭鏡頭，反覆擦到鏡頭乾淨沒有油為止，放回防潮箱(務必小心勿刮傷物鏡)。



31. 將鹵素燈光源上掀起的濾鏡扳回原位。



32. 將濾鏡組的 Excitation Filter 裝回去，並鎖回顯微鏡上。



33. 清理桌面上垃圾，並回歸原狀

34. 填使用紀錄

## J. 共軛焦掃描顯微鏡系統(基本版，手動操控 Z 軸位置)

1. 檢查使用紀錄是否有異常。
2. 開 PC1 & PC2，並利用遠端連線(在 PC1 桌面上點“NE301.RDP”)連至 PC2，密碼 35807。 (若無法登入則等 5-10 分鐘再試，關機亦須由遠端控制關機，不可直接關閉電源。)



(PC2 在光學桌下面)

3. 開 XYZ stage，”務必確認 Z 軸 disengaged，若否則切至 disengaged”。



4. 移動 sample 的 XY 軸將由 XYZ stage 控制，而 Z 軸由顯微鏡粗細調節輪控制。

注意: 若有異常情況發生(如轉軸有異常聲音，或自行移動)，應立即停止使用並立刻通知 super-user。

5. 將物鏡盤往下降後確認不會撞到載台後，裝載適當之物鏡(物鏡一律放在防潮箱，使用時須自行裝在顯微鏡上，可使用 100x 油鏡或 60x 油鏡)，

參見: **B.301R\_光學系統簡介 – 3.物鏡(Objective Lenses)**

6. 將樣品上下顛倒放置於載台上(載玻片在上，蓋玻片在下，如下圖所示)。



7. 利用明場、螢光、暗場或是相位差顯微找到樣品之焦平面。

參見: **C.基本顯微鏡使用.....或 D.相位差及暗場光學顯微鏡**

8. 先確認所有 shutter 都為關閉的且各 laser 之輸出功率為 0 情況下，開啟所需之 laser。

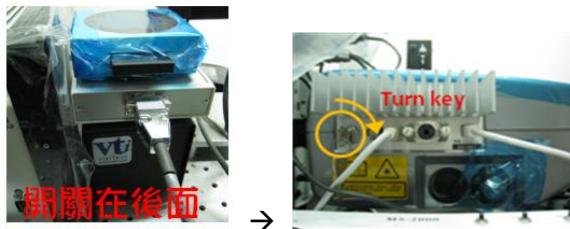
參見: **H.Laser**

9. 將 laser 之光纖拔起(下圖左)插入到共軛焦掃描顯微系統(下圖右)



注意: 眼睛切勿直視 fiber 出口處，且 fiber 及其兩端接頭處，切勿凹折、撞擊.....。

10. 開共軛焦掃描顯微系統之 control(顯微鏡後方)然後將 key 往右轉，打開 confocal 之 shutter。



11. 先開"VTI confocal"掃描系統控制軟體(在 PC2 桌面)。

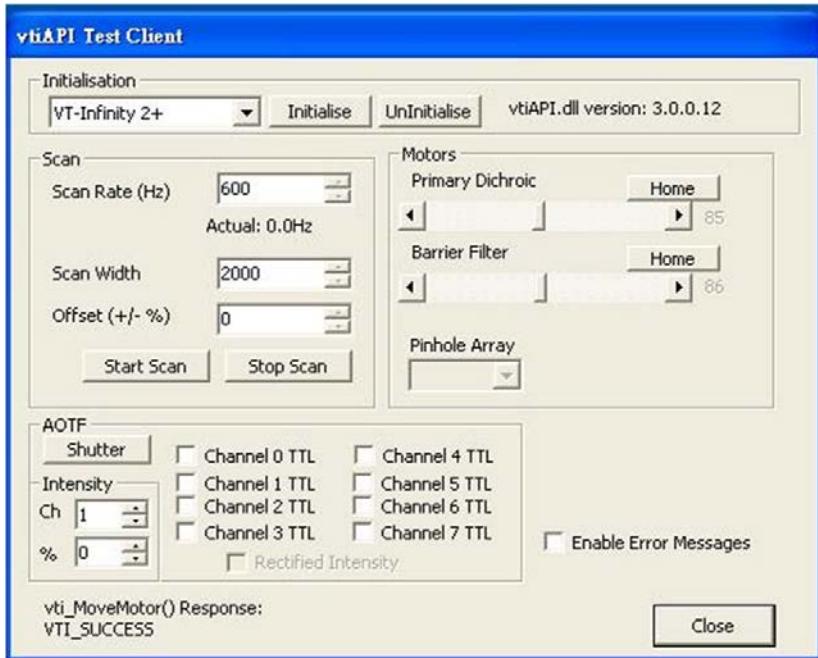
## 12. VTI confocal 參數設定(參考下圖)

- Initialisation: 選"VT-Infinity V2+"→按"initialize"。
- Scan Rate (Hz): 600 Hz。
- Scan Width: 2000 (unit:  $\mu\text{m}$ )。
- 依照所選用之 Laser 調整掃描系統內之濾鏡→Motors。如下表所示。

	Dichronic	BF
<b>488 nm</b>	<b>130</b>	<b>122</b>
<b>532 nm</b>	<b>85</b>	<b>86</b>
<b>638 nm</b>	<b>40</b>	<b>50</b>

注意: 調 filter 之數值非常重要，差一點都不行。

- (5) 按"Start Scan"開始掃描。



13. 開 iCCD(不可同時開 Cooke EMCCD)



14. 回到 PC1 桌面，點 "Camware" 開啟 iCCD 控制軟體。



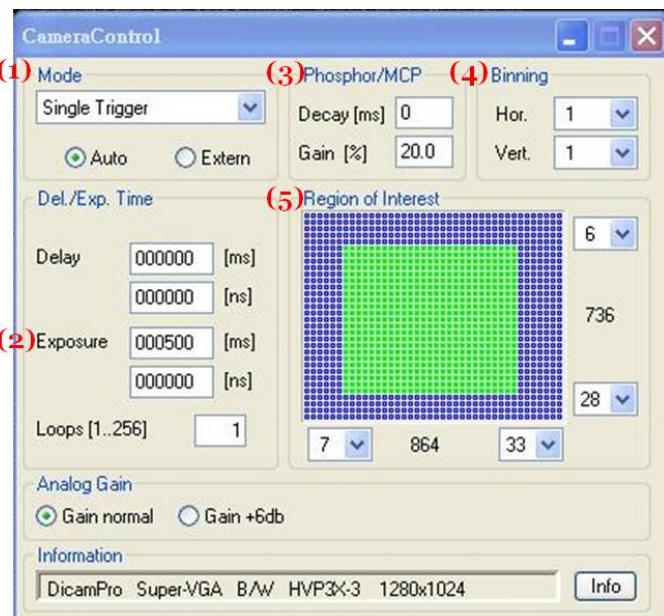
15. 點擊  開啟黑白畫面視窗(此 iCCD 僅能拍攝黑白影像)。

16. Camware 參數設定，點 。

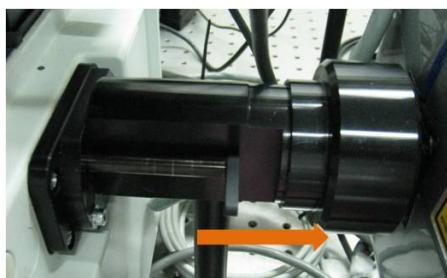
- (1) Mode → Single Trigger。
- (2) Del./Exp. Time → Exposure: 10 ms。
- (3) Gain [%]: 0。

注意: 同一個樣品拍照的第一個曝光時間”務必”由 10 m sec. , gain=0%開始往上加，每次增加 10%，最大 50%。

- (4) Binning : Hor.→1 ; Vert.→1。
- (5) Region of Interest: 橫 8-32/直 8-27。



17. 將 confocal 之 switch 拉出(見下圖)以將光路切至 confocal。



18. 開所需之 laser 之 shutter，調整 laser 輸出功率(由 1.5%開始)

19. Cube 轉到 1 (50/50 BS)

參見: **B. 301R\_光學系統簡介 - 4.濾鏡組(Filter Cube)**

20. 再確認步驟 12. laser 與 filter 是否吻合。

21. 拍攝方法與 Cooke EM CCD 及 Pixel-FlyCCD 方法相同，但 gain 值不可超過 50%。

參見: **E. EM CCD 或 F. Pixel-Fly CCD**。

22. 關閉 Laser。

參見: **H.Laser**

23. 儲存檔案只能用燒錄輸出，不可使用 USB

24. 回到 PC2 回復” VTI confocal”之原始值：

- (1) 點”Stop Scan”。
- (2) 按”Uninitialize”。
- (3) 按”Close”關閉”VTI Confocal”軟體。

25. 關 PC2 電腦(將滑鼠移到螢幕下方藍色的工作列按右鍵→工作管理員(K)→關機(U)→關機(U)→確定)

26. 到 PC1：將 camware 之參數調回原始值

- (1) Mode → Single Trigger。

(2) Del./Exp. Time → Exposure: 10 ms 。

(3) Gain [%]: 0 。

27. 關閉"CamWare"軟體

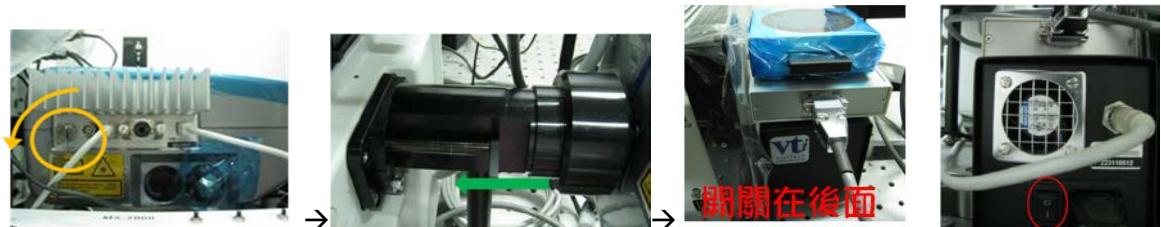
28. 關 iCCD 。

29. 關 PC1 。

30. 關 XYZ stage 控制器電源。

31. 將光纖裝回 TIRF，將 confocal 之光纖接處以藍膠貼住。

32. 轉 key(逆時針)後，將 shutter 推進去並關閉掃描系統(Scanning System)的電源。(見下圖。)



33. 降顯微鏡 Z 軸後，拆卸自行裝上去的物鏡

34. 使用完油鏡，以拭鏡紙及止血鉗(下圖左)沾 1-2 滴甲醇(MeOH)或乙醇(EtOH)擦拭鏡頭，反覆擦到鏡頭乾淨沒有油為止，放回防潮箱(務必小心勿刮傷物鏡)



35. 清理桌面上垃圾，並回歸原狀。

36. 填使用紀錄。

## K. 共軛焦掃描顯微鏡系統(Labview 控制 Z 軸掃描)

1. 檢查使用紀錄是否有異常。
2. 開 PC1 & PC2，並利用遠端連線(在 PC1 桌面上點“NE301.RDP”)連至 PC2，密碼 35807。 (若無法登入則等 5-10 分鐘再試，關機亦須由遠端控制關機，不可直接關閉電源。)



(PC2 在光學桌下面)

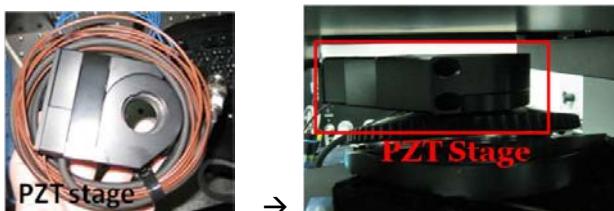
3. 開 XYZ stage，”務必確認 Z 軸 disengaged，若否則切至 disengaged”。



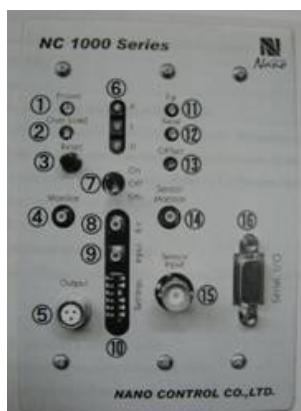
4. 移動 sample 的 XY 軸將由 XYZ stage 控制，而 Z 軸由顯微鏡粗細調節輪控制。

注意: 若有異常情況發生(如轉軸有異常聲音，或自行移動)，應立即停止使用並立刻通知 super-user。

5. 移除顯微鏡上所有物鏡後，安裝 PZT Stage 在物鏡載台上。(如下圖所示)



6. 開啟訊號放大器(NC 1000 Series)控制電源。(開關在後面)



7. 將 PZT Stage 上兩條訊號線，接至 PC1 上的 DAQ 控制盒(接至 AO 0 & AI 0)



8. 將物鏡盤往下降到底後，在 PZT Stage 上裝載適當之物鏡(物鏡一律放在防潮箱，使用時須自行裝在顯微鏡上，可使用 **100x** 油鏡或 **60x** 油鏡)，

參見: **B.301R\_光學系統簡介 – 3.物鏡(Objective Lenses)**

9. 將樣品上下顛倒放置於載台上(載玻片在上，蓋玻片在下，如下圖所示)。



10. 利用明場、螢光、暗場或是相位差顯微找到樣品之焦平面。

參見: **C.基本顯微鏡使用.....或 D.相位差及暗場光學顯微鏡**

11. 先確認所有 shutter 都為關閉的且各 laser 之輸出功率為 0 情況下，開啟所需之 laser 。

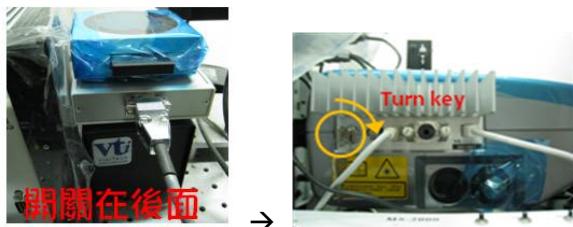
參見: **H.Laser**

12. 將 laser 之光纖拔起(下圖左)插入到共軛焦掃描顯微系統(下圖右)



注意: 眼睛切勿直視 fiber 出口處，且 fiber 及其兩端接頭處，切勿凹折、撞擊.....。

13. 開共軛焦掃描顯微系統之 control(顯微鏡後方)然後將 key 往右轉，打開 confocal 之 shutter 。



14. 先開"VTI confocal"掃描系統控制軟體(在 PC2 桌面)。

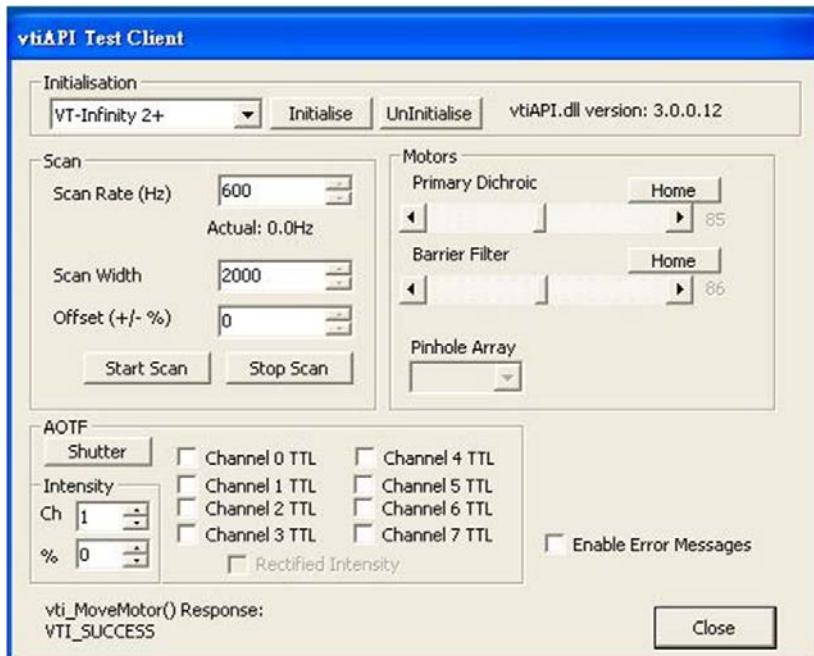
15. **VTI confocal** 參數設定(參考下圖)

- (1) Initialisation: 選”VT-Infinity V2+”→按”initialize”。
- (2) Scan Rate (Hz): 600 Hz。
- (3) Scan Width: 2000 (unit:  $\mu\text{m}$ )。
- (4) 依照所選用之 Laser 調整掃描系統內之濾鏡→Motors。如下表所示。

	<b>Dichronic</b>	<b>BF</b>
<b>488 nm</b>	<b>130</b>	<b>122</b>
<b>532 nm</b>	<b>85</b>	<b>86</b>
<b>638 nm</b>	<b>40</b>	<b>50</b>

注意: 調 filter 之數值非常重要，差一點都不行。

- (5) 按”Start Scan”開始掃描。



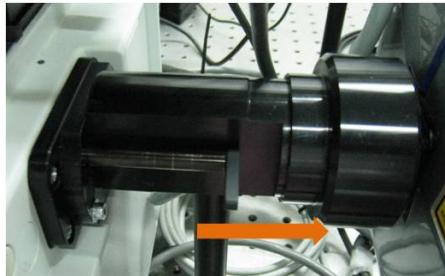
#### 16. 開 iCCD(不可同時開 Cooke EMCCD)



#### 17. 開啟 DAQ 控制盒之電源(開關在後面)。



18. 將 confocal 之 switch 拉出(見下圖)以將光路切至 confocal。



19. 開所需之 laser 之 shutter，調整 laser 輸出功率(建議由 1.5%~20%開始)

20. Cube 轉到 1 (50/50 BS)

參見: **B. 301R\_光學系統簡介 - 4.濾鏡組(Filter Cube)**

21. 再確認步驟 12. laser 與 filter 是否吻合。

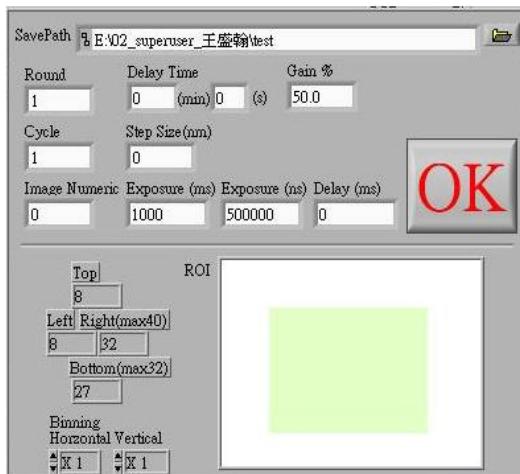
22. PC1 電腦螢幕打開 Labview 程式，先按 讓程式執行。

23. 點擊 設定參數:同一片 sample 拍照的第一個參數由 300 msec, gain=0%。掃描區域：

**橫 8-32/直 8-27, binning : 1x1**。調整畫面左方的強度，將上方的調整值調至 500~1000 左右，讓使用者覺得對比剛好即可。假若 sample 強度仍不足，再增加雷射強度、曝光時間、Gain、Binning。Gain 值每次增加 10%，最大只能用到 50%)

24. Preview 參數確定後，按 OK

25. 點擊 ，輸入適當的 Round/Cycle/Numeric number、delay time (>10 sec)、Step size (50-5,000 nm)，及檔案存取位置(點擊 選擇資料夾位置後，選 current folder)，最後按 OK。



26. 掃完檔案後，系統會自動存取 8 bit、12 bit、掃描參數在資料夾裡，僅需按確認即可。

27. 關閉 LabView。

28. 關閉 Laser。

參見: **H.Laser**

29. 儲存檔案只能用燒錄輸出，不可使用 USB。

30. 回到 PC2 回復”**VTI confocal**”之原始值：

甲、點”Stop Scan”。

乙、按”Uninitialize”。

丙、按”Close”關閉”**VTI Confocal**”軟體。

31. 關 PC2 電腦(將滑鼠移到螢幕下方藍色的工作列按右鍵→工作管理員(K)→關機(U)→關機(U)→確定)

32. 關 iCCD 及訊號放大器。

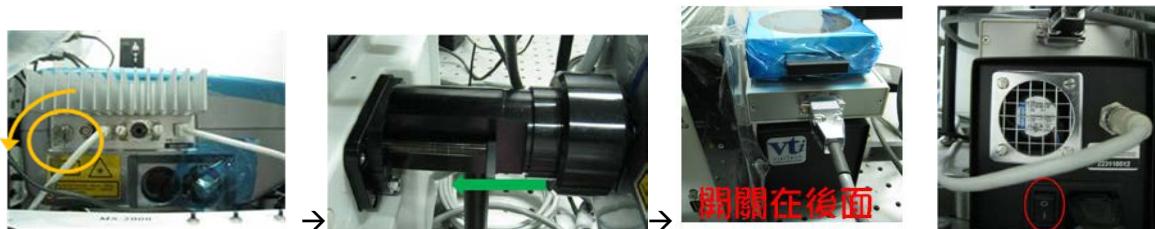
33. 關 DAQ 控制盒電源並將連接的訊號線拆卸。

34. 關 PC1。

35. 關 XYZ stage 控制器電源。

36. 將光纖裝回 TIRF，將 confocal 之光纖接處以藍膠貼住。

37. 轉 key(逆時針)後，將 shutter 推進去並關閉掃描系統(Scanning System)的電源。(見下圖。)



38. 降顯微鏡 Z 軸後，拆卸自行裝上去的物鏡及 PZT Stage。

39. 使用完油鏡，以拭鏡紙及止血鉗(下圖左)沾 1-2 滴甲醇(MeOH)或乙醇(EtOH)擦拭鏡頭，反覆擦到鏡頭乾淨沒有油為止，放回防潮箱(務必小心勿刮傷物鏡)



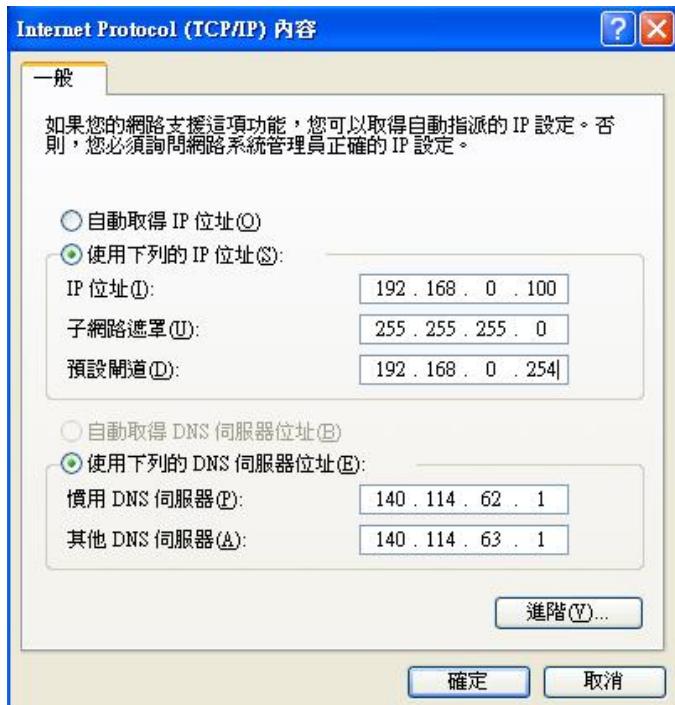
40. 清理桌面上垃圾，並回歸原狀。

41. 填使用紀錄。

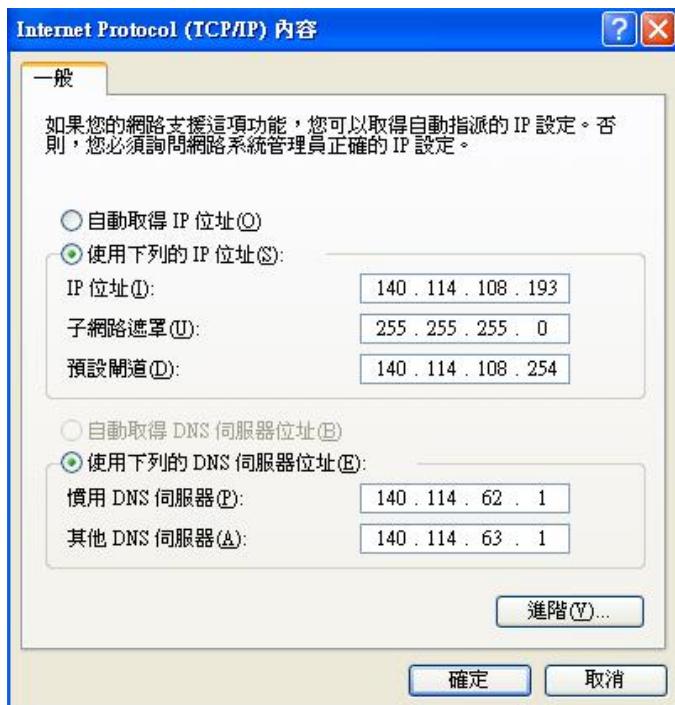
## 附錄一 網路 IP 設定

PC1 IP 位址設定：

2. 內部網路(遠端控制 PC2，PC1 接白色網路線)



3. 外部網路(可連接外部網路，PC1 接綠色網路線)



PC2 IP 位址：

192.168.1.100

附錄二 合格使用者清單

權限 level	一般時 段可預 約上限	姓名 name	合格項目						訓練其他使用者 (填日期與被訓 練者)
			明視野暨 螢光顯微 鏡  Bright Field and Fluoresce nce	暗視野 Dark Field	Laser	TIRF	Spectrome ter	Confocal system	
Chief Superuser	12 hr.	王盛翰	V	V	V	V	V	V(auto Z)	NONE
			分機:02-27823212#893 手機:0911205217 e-mail: <a href="mailto:hedgren-ix@hotmail.com">hedgren-ix@hotmail.com</a>						
Superuser	12 hr.	謝馨儀	V	V	V	V	V	V(auto Z)	NONE
			分機:35833 手機:0931250137 e-mail: <a href="mailto:d9735803@oz.nthu.edu.tw">d9735803@oz.nthu.edu.tw</a>						
Superuser	12 hr.	王政輝						V(auto Z)	NONE
			分機:35807 手機:0986335855 e-mail: <a href="mailto:abcd5855tw@yahoo.com.tw">abcd5855tw@yahoo.com.tw</a>						
Superuser									
			分機: 手機: e-mail:						
user	6 hr.	蕭建隆	V	V	V			V(auto Z)	
			分機:02-27898000#53 手機:0911314438 e-mail: <a href="mailto:jlxiao@gate.sinica.edu.tw">jlxiao@gate.sinica.edu.tw</a>						
user	8 hr.	陳宗儒	V		V	V		V	
			分機:34306 手機:0922760091 e-mail: <a href="mailto:peterchen810@gmail.com">peterchen810@gmail.com</a>						
user	6 hr.	Tuhin	V		V	V		V	
			分機:34306 手機:0975314941 e-mail: <a href="mailto:santra.tuhin@gmail.com">santra.tuhin@gmail.com</a>						
user	6 hr.	黃蘊慈	V		V	V		V(auto Z)	
			分機:42685 手機:0921213943 e-mail: <a href="mailto:d924216@oz.nthu.edu.tw">d924216@oz.nthu.edu.tw</a>						
user	6 hr.	莊媖涓	V	V	V	V		V(auto Z)	
			分機:35833 手機: 0933029011 e-mail: <a href="mailto:aler_injuan@hotmail.com">aler_injuan@hotmail.com</a>						
user	6 hr.	Judy					V		
			分機: 34306 手機:0975144901 e-mail: <a href="mailto:jmobliosca@yahoo.com">jmobliosca@yahoo.com</a>						
user	6 hr.	Hang	V	V	V	V	V		
			分機: 34298 手機:0918236454 e-mail: <a href="mailto:d947129@oz.nthu.edu.tw">d947129@oz.nthu.edu.tw</a>						
user									
			分機: 手機: e-mail:						
user									
			分機: 手機: e-mail:						