

## 顯微鏡使用 (適用於目鏡觀察時)

### 一. 可見光

#### 1. phase contrast

- # 擺置樣品, 視使用物鏡鏡頭不同滴適量油或水
  - # 光路控制拉桿推至 VIS 位置
  - # 偏光板推向外
  - # 依據鏡頭轉物鏡轉盤 (e.g. 若物鏡為 ph3 鏡頭則轉至 3)
  - # 依物鏡鏡頭選擇物鏡稜鏡(e.g. E or BF)
  - # 調整螢光濾鏡轉盤至 4 (4 為掃描或可見光觀察時用)
  - # 開啓穿透光光源
  - # 調整視野光圈,孔徑光圈全開 (一般均已調在適當位置)
  - # 調整焦距
  - # 觀察
- 注意事項

phase contrast 只用 phase 鏡頭

#### 2. DIC

- # 擺置樣品, 視使用物鏡鏡頭不同滴適量油或水
- # 光路控制拉桿推至 VIS 位置
- # 偏光板推入
- # 依據鏡頭轉物鏡轉盤 (e.g. 若物鏡為 40x 鏡頭則轉至 40/63)
- # 依物鏡鏡頭選擇 (e.g. E or BF)
- # 調整螢光濾鏡轉盤至 4 (4 為掃描或可見光觀察時用)
- # 開啓穿透光光源
- # 調整視野光圈及孔徑光圈 (一般均已調在適當位置)
- # 調整焦距
- # 觀察

#### 3.

### 二. 螢光

#### 1. DAPI or Hoechst

- # 擺置樣品, 視使用物鏡鏡頭不同滴適量油或水
- # 光路控制拉桿推至 VIS 位置
- # 偏光板推入
- # 依據鏡頭轉物鏡轉盤 (e.g. 若物鏡為 ph3 鏡頭則轉至 3)
- # 依物鏡鏡頭選擇 (螢光觀察均為 BF)
- # 依螢光種類調整螢光濾鏡轉盤 (1-3, 4 為掃描或可見光觀察時用)
- # 調整反射/螢光及穿透光光源的切換開關
- # 調整焦距

# 觀察

## 2. FITC

# 擺置樣品，視使用物鏡鏡頭不同滴適量油或水

# 光路控制拉桿推至 VIS 位置

# 偏光板推入

# 依據鏡頭轉物鏡轉盤 (e.g. 若物鏡為 ph3 鏡頭則轉至 3)

# 依物鏡鏡頭選擇 (螢光觀察均為 BF)

# 依螢光種類調整螢光濾鏡轉盤 (1-3, 4 為掃描或可見光觀察時用)

# 調整反射/螢光及穿透光光源的切換開關

# 調整焦距

# 觀察

## 3. TRITC, Cy3 or Cy5

# 擺置樣品，視使用物鏡鏡頭不同滴適量油或水

# 光路控制拉桿推至 VIS 位置

# 偏光板推入

# 依據鏡頭轉物鏡轉盤 (e.g. 若物鏡為 ph3 鏡頭則轉至 3)

# 依物鏡鏡頭選擇 (螢光觀察均為 BF)

# 依螢光種類調整螢光濾鏡轉盤 (1-3, 4 為掃描或可見光觀察時用)

# 調整反射/螢光及穿透光光源的切換開關

# 調整焦距

# 觀察

## 一、開關機流程：

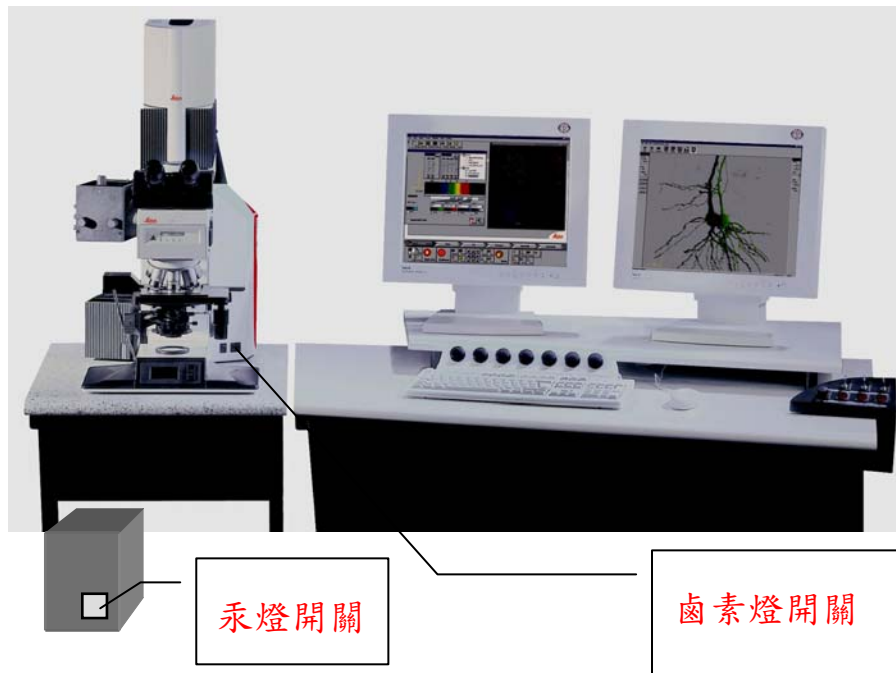
### 開機：

在進行開機前，先將冷卻機隔間的窗戶打開（上下都要開），目的要讓冷卻機所產生的熱氣往外排放。

### 開機步驟：

1. 打開顯微鏡光源→穿透光用鹵素燈以及螢光燈用汞燈（如圖一）

圖一



2. 開啟 UV-雷射：

先將 AOTF 的電源打開（在桌子後面，紅色小鐵盒，如圖二），再將 UV 燈電源供應器的開關扳至 ON，此時“current limit”的燈號會亮起來，等有“嗶”一聲時會熄掉，再將鑰匙轉至 ON，若沒有熄掉，將旋鈕往順時鐘調轉至燈熄掉（如圖三）。

圖二

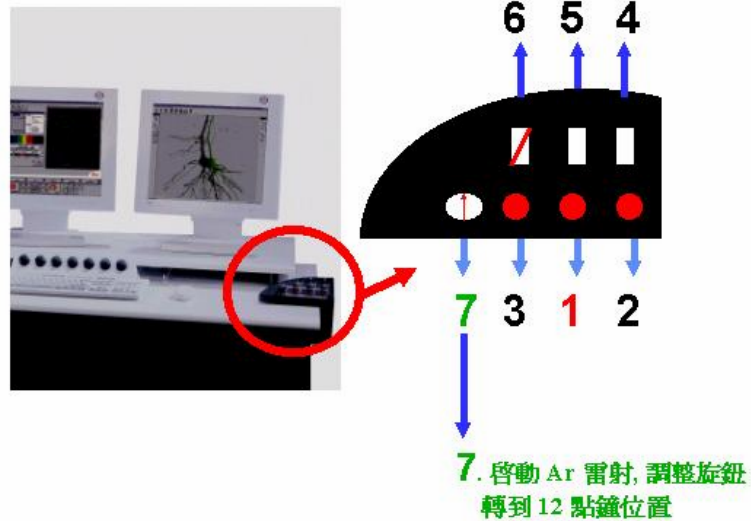


圖三

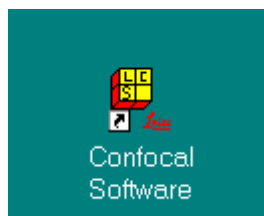


3. 按照圖四的順序將共扼焦系統之電源打開：  
scanner-掃描器電源→電腦電源→Ar 雷射電源→HE-Ne 雷射  
(Red)電源(鑰匙往右扳下)→He-Ne 雷射(Green)電源(鑰匙往右  
扳下)→啟動 Ar 雷射(鑰匙往右扳下)→啟動 Ar 雷射，調整旋  
鈕轉到 12 點鐘方向。

圖四



4. 啟動軟體：  
電腦開機後，會出現一對話框，如對話框所提示按下  
Ctrl-Alt-Del 以進入系統；成功進入系統後，便可以開啟共扼  
焦操作軟體，點選桌面上軟體程式之捷徑即可，如下圖所示：



軟體開啟後，會出現一對話框，選取“personal”這個選項再點“Start”後即可使用程式。

進入程式時，電腦會進行與顯微鏡之間的連線，所以要先設定顯微鏡的載物台的移動上限值

→顯微鏡鏡座底部的小畫面應該是顯示“SET?”的字樣(如圖五)，動一下調節輪將玻片台往上移動一下，再按住鏡座小畫面旁的按鈕(有上下兩個，按上面的)，過一會畫面便顯示“T”的圖示，此時便將移動上限值設定完成。

圖五

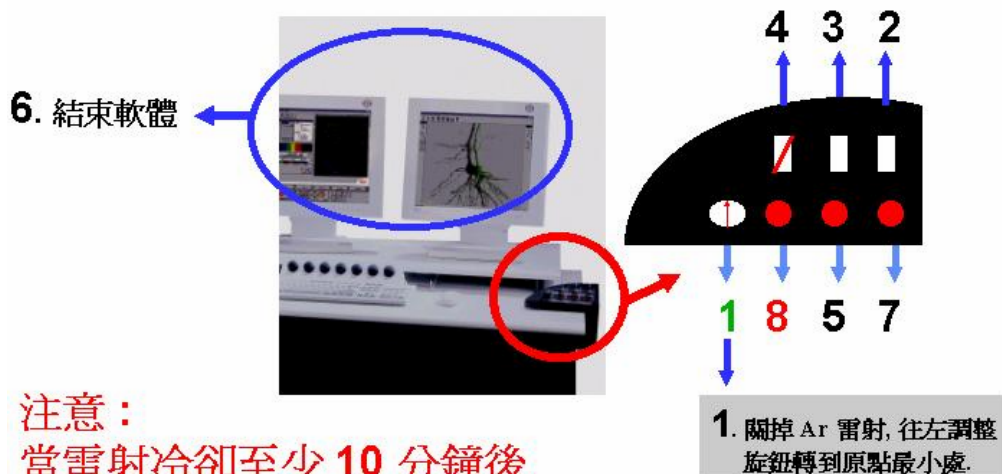


關機：

按照下列順序關機：

1. 關 UV-雷射燈源：將電源供應器上的鑰匙轉至 OFF，再將開關扳至 OFF 即可，最後再將後方的 AOTF 關掉。
2. 關汞燈燈源、鹵素燈源。
3. 關共扼焦系統電源，照圖六順序關機：

圖六



注意：

當雷射冷卻至少 10 分鐘後  
再關掉 [8] 位置的電源 (風扇)

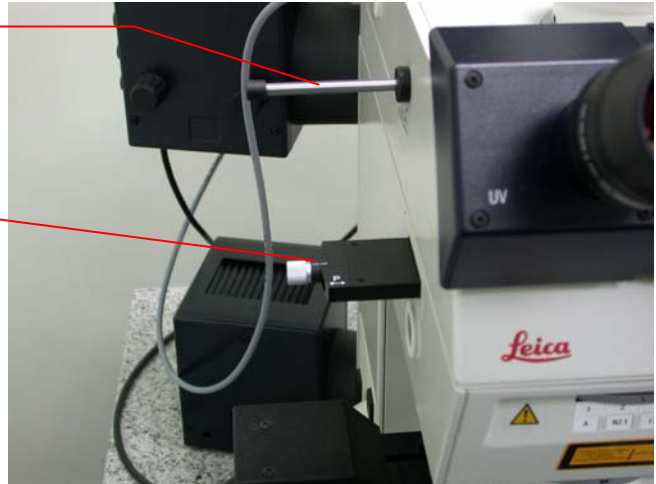
## 二、LCS 基本操作：

### 顯微鏡操作：

(一) ”Vis”與”Scan”之間的轉換：Vis 及一般在顯微鏡觀察的模式，要得到更清晰的影像時，必須切換至 Scan 的模式，步驟如下：

1. 將光路控制拉桿往外拉

2. 偏光板往外拉



3. 螢光濾鏡轉盤轉至”4”

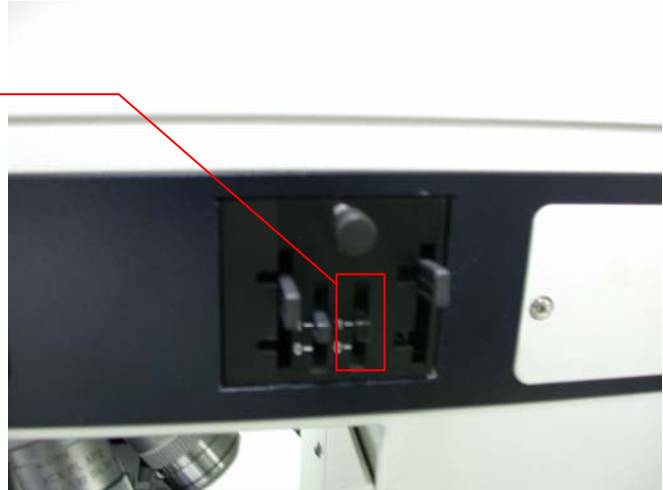
4. 稜鏡轉盤轉至”BF”



5. 將 Tube lens 轉到”UV-Scan”的位置



6.將汞燈柵門往下切  
換至”0”的位置



7.最後記得要將此處的開  
關切換至”Scan”字樣出  
現的位置



(二) 顯微鏡觀察：細分為螢光觀察、一般可見光觀察，包含  
DIC image 及 phase。

螢光觀察：1.光路控制拉桿往內推至”VIS”的位置

2. 偏光板往外拉

3. 螢光濾鏡轉盤依據樣本所染的螢光轉至適合之位置

4. 稜鏡轉盤轉至”BF”

5. 將 Tube lens 轉到”Vis”的位置

6. 將汞燈柵門往上切換至”1”的位置

7. 如同上述步驟 7 的開關，切換至”Vis”字樣出現的位置

DIC image：樣本必須是在玻片上，若是在 culture dish 上是無法觀察  
的。

1.光路控制拉桿往內推至”VIS”的位置

2. 偏光板往內推送
3. 螢光濾鏡轉盤轉至”4”
4. 陵鏡轉盤轉隨著鏡頭標示做更換，例如下圖紅框中位置所示字樣為”E”，變將陵鏡轉盤轉至”E”

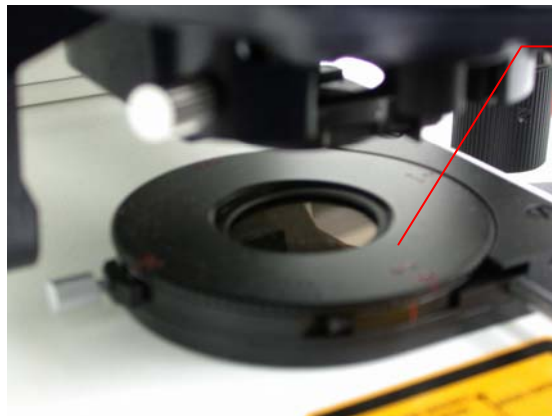


5. 依據鏡頭的倍率，如上圖黃框的位置，切換光柵轉盤（如下圖）至適合的位置，例如鏡頭為 40X，便將光柵轉盤轉至”40/63”



光柵轉盤

6. 將第二片偏光板轉進，如下圖



偏光板，往逆時鐘方向推進

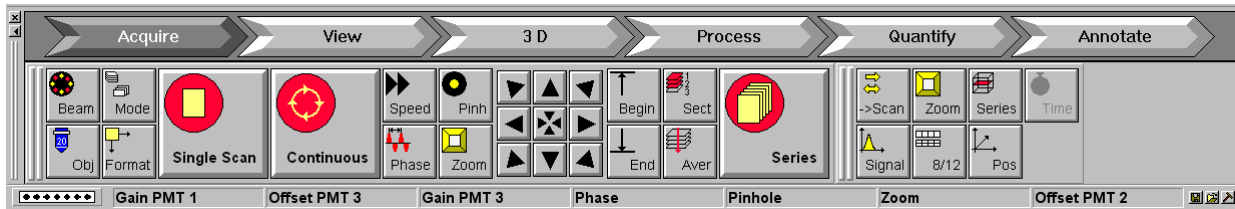


Phase：如同一般相位差顯微鏡，觀察時依據鏡頭上的標示，將光柵轉盤轉至適當的位置，如下圖中紅框顯示為”PH 3”，則將轉盤轉至”3”。要使用 phase 觀察時，要將觀察 DIC 所需之物件移開，包括上下各一片的偏光板以及稜鏡轉盤轉至”BF”。

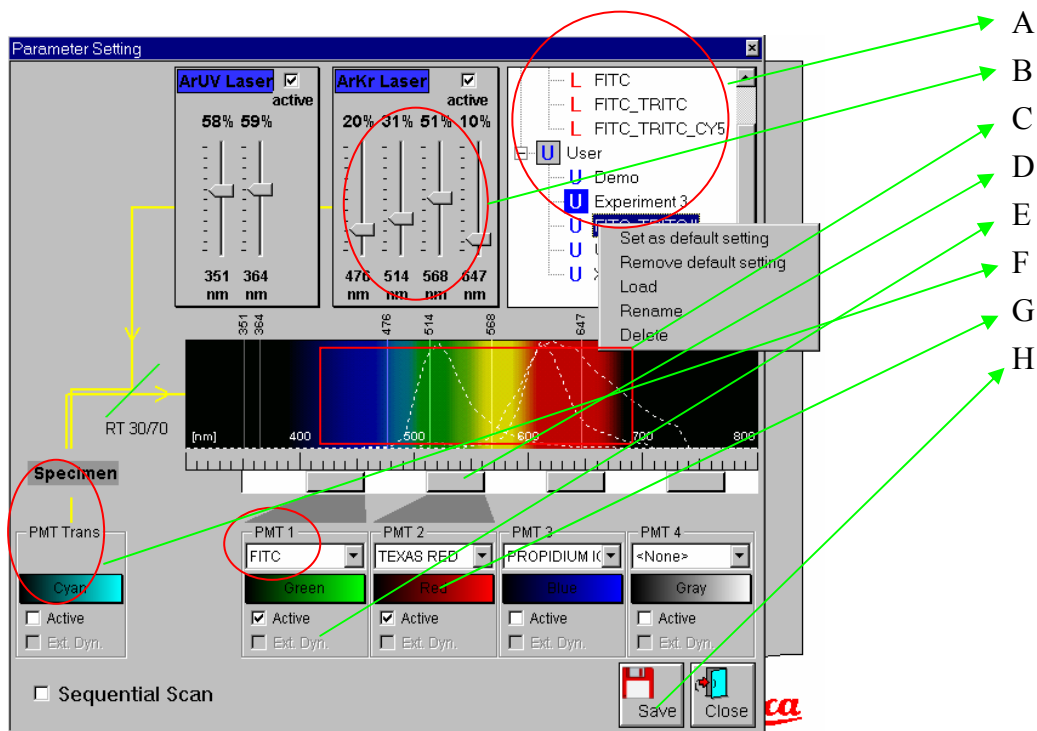


軟體基本操作（Single Scan）：

(一)初步掃描分析：進入軟體後，可看見如下圖所示之控制區。



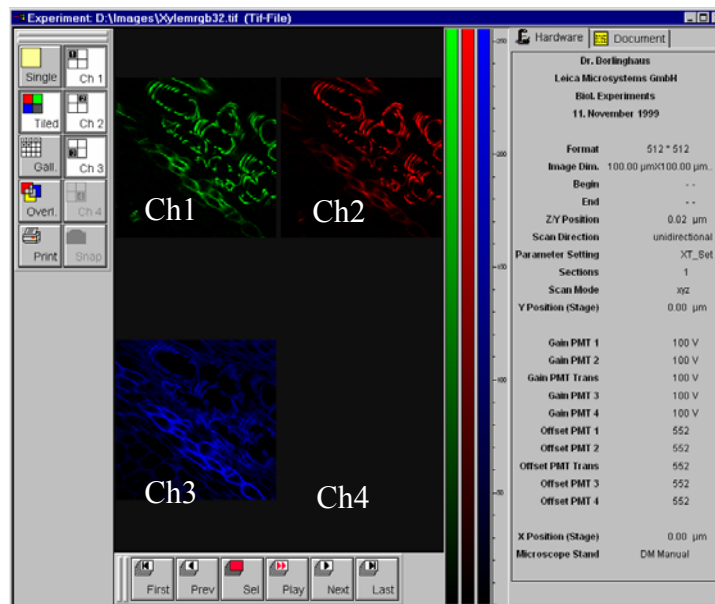
1.先點選”Acquire”，再點選”Beam”，之後會出現一”Parameter Setting”的視窗，如下圖：



各項重要欄位說明如下：

A：此區域是顯示電腦中已有的設定檔案，其中紅色 L 標記的是系統預設值，通常都是選用預設值檔案即可，例如樣本有 FITC 及 TRITC 兩種螢光物質，就選擇檔案中的”L FITC\_TRITC”即可，此時系統就會自動將雷射開啟至適當的強度以及調整適當的光譜範圍。另外藍色 U 標記的是使用者的設定值，可由使用者自行修改存檔（預設值則是無法修改存檔）

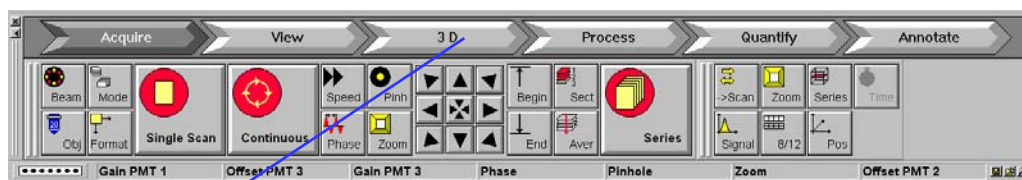
- B：顯示所開啟的雷射波長及強度，可視情況做調整。
- C：紅色框框中，藍、綠、黃及紅線各是標示出雷射激發波長，而虛線則是螢光釋放波長。
- D：光譜範圍調整區，可依照需求作調整。
- E：將”Active”勾選，即是選用螢光感測用 PMT。
- F：穿透光感測用 PMT。
- G：由於掃描所得之圖片是黑白的，所以必須要套色才能更明顯顯現出樣本的螢光分佈，可以點選此區進行套色，一般第一次掃描時，為了得到正確的螢光亮度，會先選擇”Glow(O)”，訊號若太強的區域就會顯現藍色，此時調整 PMT 的大小或是雷射的強度，直到圖像中所有的藍色區域剛剛好不見為止，此時訊號強度較為適當。
- H：以上所有的設定值設定完畢後，若常需使用類似之設定值，可點選此鈕進行存檔，存檔後就可以在 A 區的”User”中看到檔案，下一次工作時點選該檔案即可進入自己所設定之狀態。
- 2.以上設定完成後，即可點選控制區中的”Singal Scan”，進行掃描。得到的結果會出現在右邊的螢幕（影像調控視窗）上，如下圖。



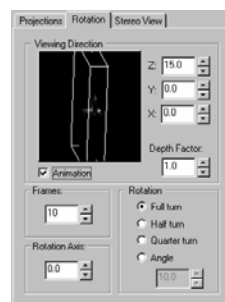
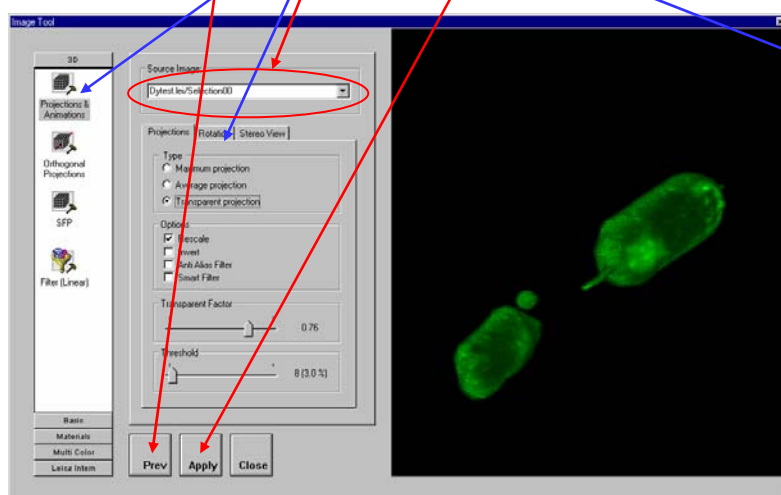
- 3.影像調控視窗預設值是只顯示一個掃描結果畫面，如欲觀察兩種以上的螢光，則需增加其他畫面，方法是點選調控視窗左側之選擇鍵 Ch1~3，數字代表畫面的數目；另有一個選擇鍵為 Overl.，功能是将 CH1~3 進行疊合，並將結果顯示在第四個畫面（右下角）。



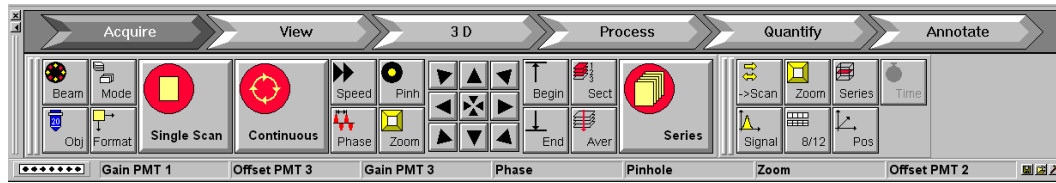
## 製作



1. 點選3D,再點選Projection & Animation
2. 開啓連續掃描檔
3. 設定各個參數
4. 點選Prev察看結果
5. 若結果滿意即可點選Apply,並將結果存檔

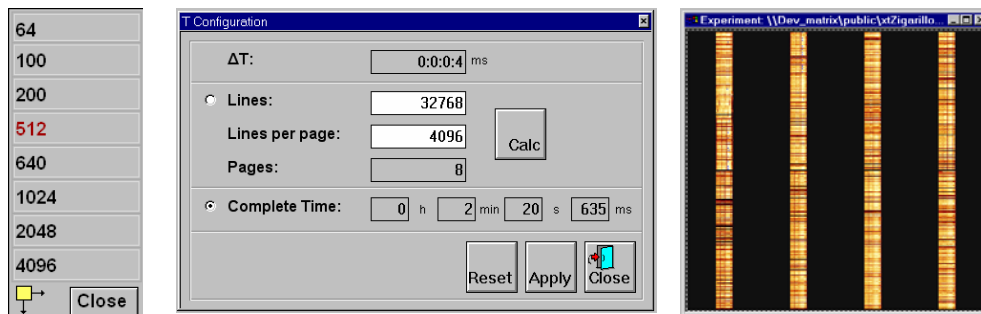


## Timelapse / 長時間掃描記錄

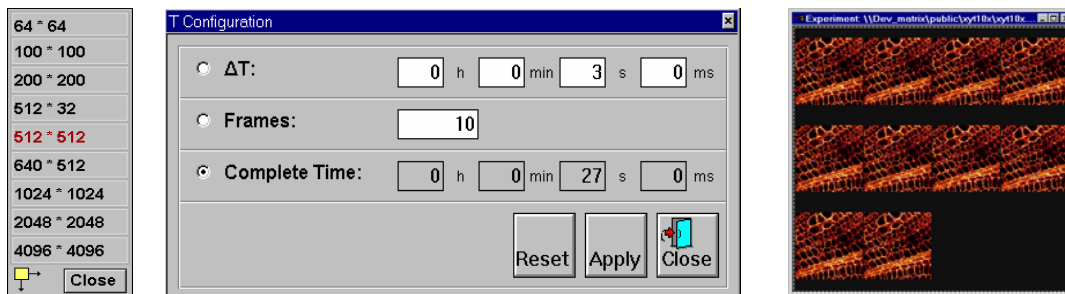


- ◆ 點選 Mode,再點選有 t 參數之選項目
- ◆ 依據所選之選項設定所須之參數,點選 Apply

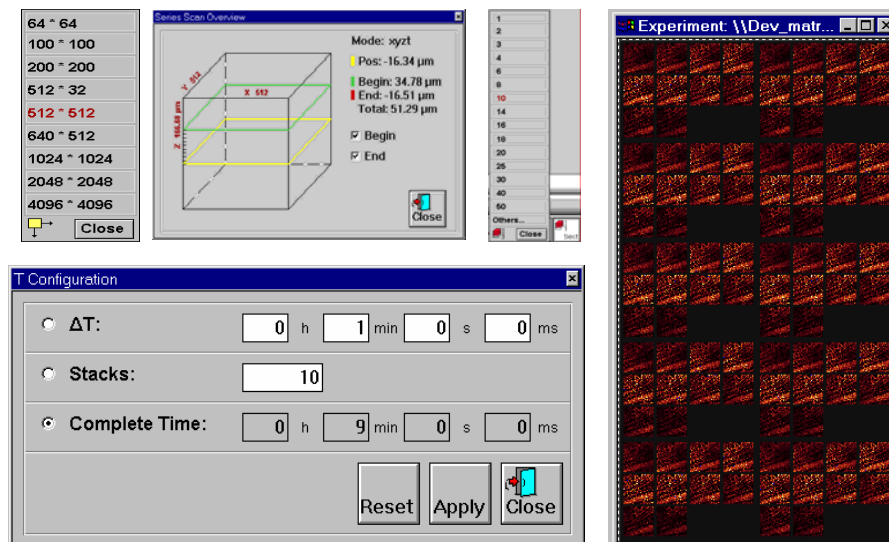
### Line-Mode „xt“ Configuration



### Stack-Mode „xyt“ Configuration



### Stack-Mode „xyzt“ Configuration

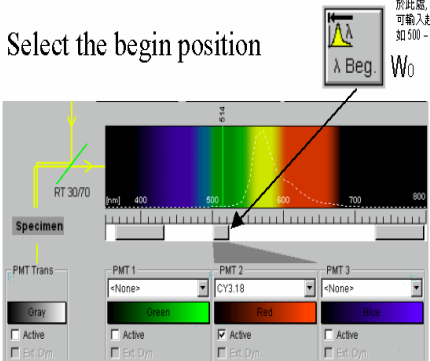
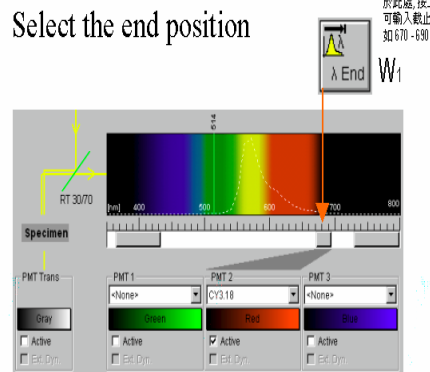


# 如何去除 cross talk

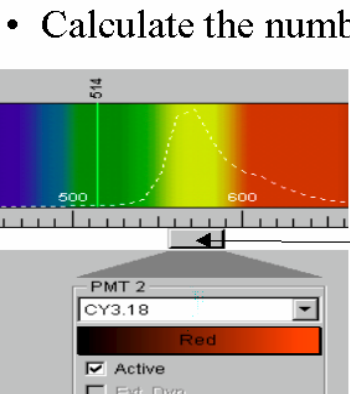
## 1. $\lambda$ scanning (Lambda Scanning)

# 選擇要測試的螢光物質吸光範圍 (e.g. FITC)

#  $\lambda$  beg. 500nm;  $\lambda$  End 700nm

- Select the begin position 
- Select the end position 

# 在此波長範圍內, 選擇要掃描幾次 ( $\lambda$  Step)

- Calculate the number of slices 

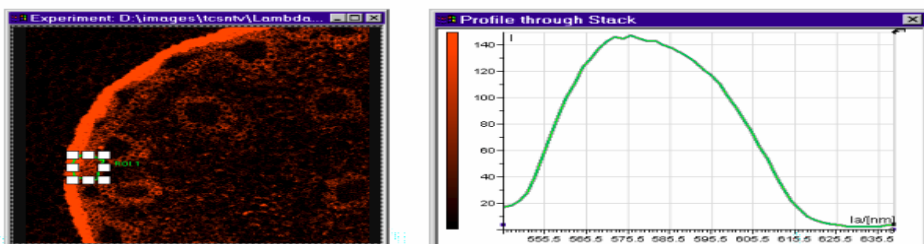
$$N = \frac{W_1 - W_0}{\Delta W}$$

完成波長設定後, 再按一下 [Series] 即可開始掃描

# 分析

選擇 Quantify Pr (Z), 知道最高吸收波長落於何處, 可作為選取吸收波長範圍之依據

### • Quantify the resulting image

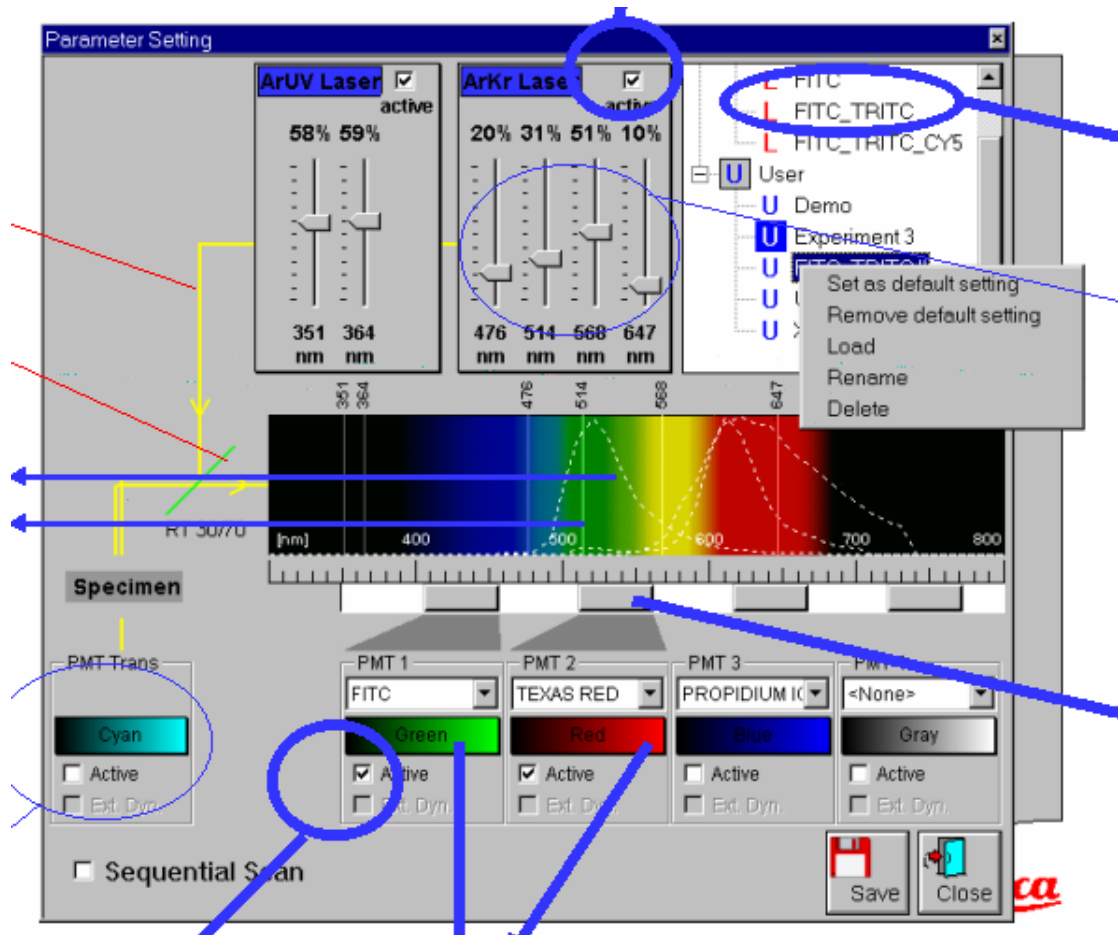


# 注意事項

此功能一次僅能做單一波長校正

## 2. Sequential Scan

- # 利用  $\lambda$  scan 訂出最佳吸收波長後，將 condition 儲存
- # 勾選 Sequential Scan 選項
- # 將儲存的 condition 檔依需要拖曳至下方
- # 選擇 between frames
- # 點選 series 按鍵開始 scan



- Activate the button **<series>** in order to start the lambda scan procedure

