

TE2000U 基本使用笔记

Jerry Ling

2025 年 10 月 7 日

A1043 有两台科研级的尼康倒置显微镜，进门右手边 (TE2000U) 是组里最常用的荧光 TIRF (全内反射) 配置，示意图如下。本笔记针对 A1043 的一般使用者，包括基本成像光路、如何正确地上样测试和日常维护，以避免初用者踩坑，并让仪器维持一个可持续的状态。目前更换光纤、调整光路、更换 (不是切换) 二相色镜/滤镜、更换双通道都需要授权进行，如有需要可联系张老师学习操作，有关文档另作整理。关于光学间本身和进入前后的注意事项，参考 *Clean Room Basics & Rules* 和 *Clean Room Checklist*。

光路描述和原理

激发光路

- 耦合进光纤的激光 (B1) 经过**光纤准直器 (Fiber Collimator)** (图1) 变成一束较小的平行光 (其调节方法见另一篇笔记)。
- 而后经过一组由两个透镜构成的 **telescope 型扩束器**，扩束为更大直径的准直光。第一面凹透镜负责扩大光斑，第二面凸透镜负责将其转化为平行光，因而两片透镜间距须恰好为焦距之差 (即凸透镜焦点恰好落在凹透镜焦点上)。两个透镜可通过其笼架上的旋钮微调 x-y 位置，使得光线垂直地通过其轴心，否则将影响后续光路 (请勿随意调整)。
- 经过 telescope 扩束器的光束即随距离尺寸几乎不变的平行光。这样再经过一面较长焦距的透镜 (400mm，即图2中的 49639 INK)、被**二相色镜 (dichroic mirror)** 反射后即可将激光较好地汇聚在物镜的**后焦面 (Back Focal Plane)** 上 (图2中 B2)。

物镜后焦面事件

- 后焦面上聚焦的激光经过物镜变成平行光对样本进行照明。当聚焦点在后焦面正中心时，出射光亦在正中心垂直出射，称为**落射照明 (epi-illumination)**。此时在物镜口可看到对称分布的一圈圈的圆光斑。

Fiber Optic Collimators

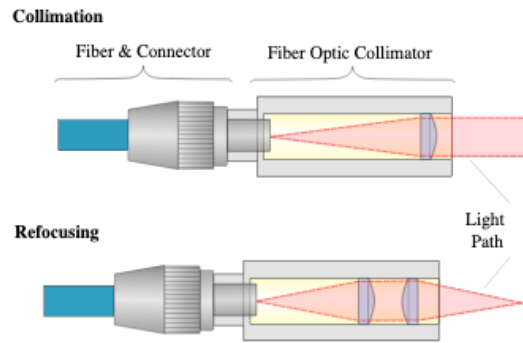


图 1: 光纤准直器

- 若后焦面上汇聚的点不在中心，那么出射光将按一个角度照亮样品；当角度大于介质-样品界面的临界角时，发生全内反射 (TIRF)，反射光 (即图2中返回的红线) 重新聚焦在后焦面对称的位置。
- 可以通过调整 telescope 中的凸透镜 (见图中所示) 的旋钮来控制入射点的位置 (本质上是控制光线的角度)。由于左右方向比较稳定，建议只调整上下方向来控制 TIRF。可以观察物镜出口光斑位置来判断是否发生 TIRF，当光斑大部分“潜入”物镜即可认为样品由倏逝波照明，即照明强度随 z 轴指数衰减。请勿随意调整其他的旋钮。

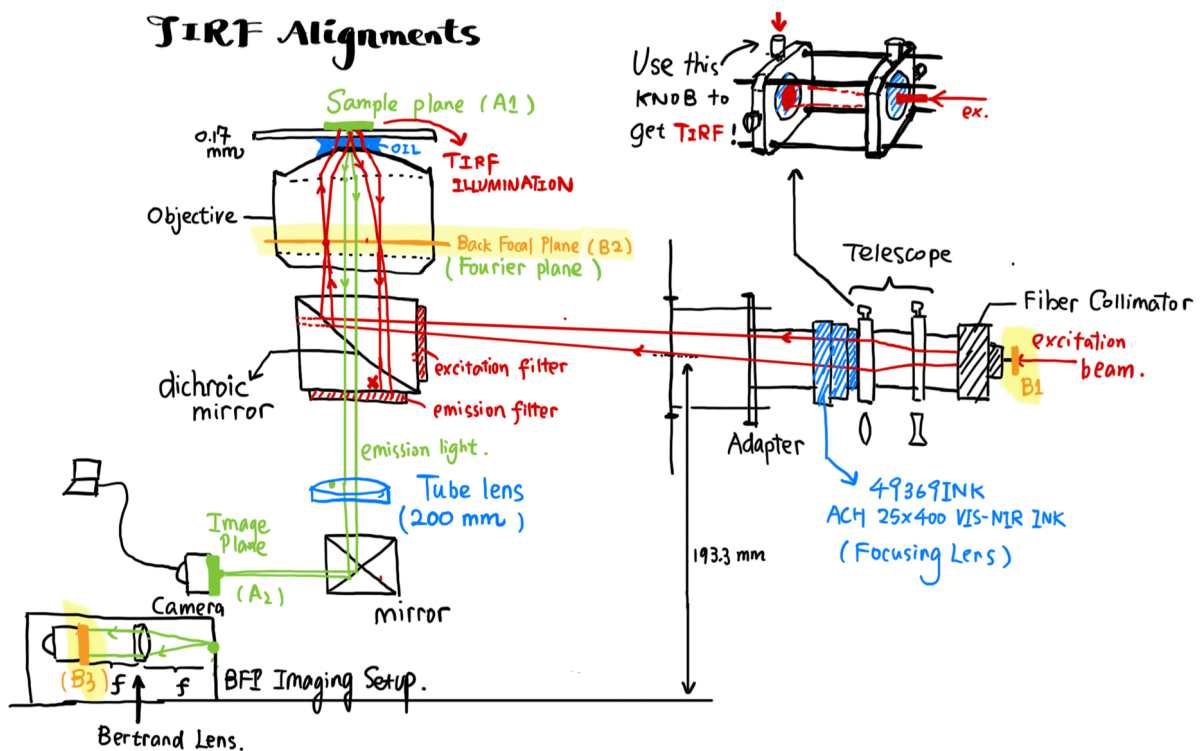


图 2: TE2000U 光路图

出射光路

- 出射光中包含样品发出的荧光、入射光被反射后形成的反射光、入射光与样品作用后发出的散射光。后两类一般会被二相色镜和**出射滤镜 (emission filter)** 去除，只透过前者以观察荧光。(二相色镜对不同波长的光有选择性地反射/透射)
- 出射光重新经过物镜，则物镜前焦面上点源发出的光变成平行光；而在物镜后焦面 (**B2**) 处恰成一个 **fourier 变换像**，因而这个面也被称为 **fourier 面** (换言之，这个面上的光场分布恰是焦面上光场分布的 **fourier 变换**)。为观察之，可在像面后一个焦距的位置用一个伯特兰透镜 (**Bertrand Lens**) 对像再进行一次 **fourier 变换** (图2中左下角，**BFP Imaging Setup**)。
- 平行光穿过二相色镜后再经过一个**镜筒透镜 (Tube Lens, 200nm)** 被重新汇聚在**像面 (Imaging Plane, A2)** 上。这个像面一般在显微镜 side port 出口的几厘米左右。在此面上放置相机即可对焦面成像。
- 出射光经过 **Tube lens** 后再经过反射镜转到侧口。显微镜右侧旋钮可以切换出射光光路到左侧或右侧 port，注意须**拧到听到 click 声音**以切换。

搭建正确的激发光路 (optional/了解即可)

1. 检查光纤耦合器出来的光斑是否对称，如果不对称则说明激光不准直，可按另一篇笔记内容小心调整 xy 旋钮。
2. **telescope** 的两个镜子首先要准直地放大光斑。应看到对称的光斑、且光斑大小应随距离变化不大。这样说明两面镜子与激光同轴且间距正确。
3. **focusing lens** 首先需要与前面的部件共轴。然后可通过**笼式系统 (cage system)** 调整其位置以将激发光汇聚到物镜后焦面。
4. 当 4 面透镜都同轴且放置在正确的距离上时，即达成落射照明后，方可按照前述方法调整到 **TIRF** 照明。
5. 由于物镜后焦面基本上与 **Tube lens** 前焦面重合，后焦面发出的光像面 (**A2**) 处可看作平行光，因而再放一个凸透镜即可对后焦面成像。当发生 **TIRF** 时候，反射光应在圆形后焦面的边缘处。

整体的调整思路是：先保证落射照明 (**epi**，平行光激发)、再达成 **TIRF**。改变角度更好的方法是整体移动 **excitation** 部分，而非调整一面镜子的位置 (这可能会让光线倾斜过多而损失一些光)。一旦调整到较好状态，尽量不要去调整 **telescope** 的位置以避免偏轴等复杂问题。

正确的上样和日常使用规范

日常测试过程中，需要注意显微镜使用规范和日常维护，以确保测到有意义的数据以及仪器的可持续使用：

光路

- 如需使用显微镜，在确保相机安装正确、未有暴露机械快门的情况下，打开相机电源。打开计算机上的控制软件 (Solis, software for Andor EMCCD)。EMCCD 需要冷却至-70 度来降低噪声，请务必等候约 5 分钟至左下角温度指示色块**由红变蓝**，再开始采集数据。关于相机的使用和控制软件细节使用请参见另一篇笔记。
- 光纤需要拧好，不要过松或过紧 (finger tight)。更换光纤需要通知老师学习，详请参考另一篇笔记。
- 检查是否使用了 1.5x 增距镜。
- 进光前**检查二相色镜**是否正确 (须在出射光路中滤掉激发光)。切换时候需注意听到 click 声音代表切换成功。否则，使用错误的二向色镜采集图像时极有可能会过曝严重，此时须**立刻关闭采集**以保护相机。更换二相色镜，需要通知老师学习，详请参考另一篇笔记和视频。
- 调整光斑达成 TIRF 的过程中避免不必要的调整 (见上文)。此外，请注意避免对激发光路施加机械冲击以防止光路歪轴，比如身体不要依靠或者撞击光学平台；不要在黑暗中快速移动肢体。
- 眼睛**不可直视激光**。眼睛与光路不可处于同一水平高度。可代用档光片或纸片观察激光光斑是否正常。尤其注意近红外波段的激光不可见但仍会造成眼部永久损伤，应格外当心。调整光路时务必使用合适的**防护眼镜**。
- 如需更换物镜，请务必确保其下降到安全高度，否则将刮伤物镜。

上样

- 上样前请务必确保物镜下降到安全的高度，以避免碰伤物镜。下降过程请避免使用粗调旋钮，使用微调 knob 的时候请务必耐心慢慢旋转，避免内部齿轮磨损。上油要**避免气泡**，更不要摔落镜油瓶。如油瓶中气泡很多，需要 degas。气泡将带来明显的衍射条纹、并随着样品台移动变化。可尝试移动样品台来赶走气泡。
- 上样的板子不能过长或过短，以免不对称 (翘起) 或掉落样品架。coverglass 务必使用 24*30 或 24*32 #1.5 (H)，并且组装在 25*75 slide 正中央。24*40 一定无法使用，24*50 或者 24*60 在对称组装下可以使用。如果严重偏离对称，或者 coverglass 刚好长 40mm 与样品架开口 (40mm) 一样大小将导致样品无法正确安装。

- 尽量避免于样品安装在样品架上时进行 injection（向 channel 内注射以孵育或清洗），以防溶液与镜油混合而导致无法正常成像。
- 确保双面胶（3M）**压平密封**。若其明显发白，说明溶液有渗漏，最好重新制样以避免无效数据或溶液漏进镜油。
- 找焦面不可大幅调整高度，否则有可能撞伤物镜。若发现高度过头可重新调低找焦。
- 水平调整样品台时切不可幅度过大，否则其边沿可能撞到物镜。找焦或者换 channel 时要注意出射激光走向，建议挡住激光再靠近观察。

维护

- 实验结束记得关闭软件、相机和激光器。先关闭 solis 软件，再关闭相机电源。软件非正常关闭，或者顺序颠倒将导致相机再次启动时 setup 参数丢失，或进入 multitrack 光谱采集模式。激光器关闭一般遵循：先关电流，然后等若干分钟再关电源的流程。做细胞实验的同学记得关闭明场照明的卤素灯电源。
- 光纤脆弱，不可用力拉拽。注意光纤收纳的最小半径（一般 $\geq 10\text{cm}$ ），过小半径将损坏光纤。
- 物镜上的油须擦净。外圈的油可用纸巾 (Kimwipe) **吸走**，而不宜大范围地涂抹。玻璃的部份则必须使用**擦镜纸**以避免纤维划伤表面，可用止血钳夹住一截对折数次的擦镜纸转圈擦拭，注意擦过一次后要换到清洁的部份再擦，以及止血钳金属的部份不要刮到物镜。确保擦完后玻璃**表面光亮无油渍**，若有油渍残留会造成折射率不均而劣化成像，照明光斑也会形态异常。
- 避免过量加油，多次加油后必须吸掉重加。吸油，擦油时务必小心，动作幅度不要过大过快，以免将油挤出物镜储油槽，或者溅射到物镜以外，如位移台，转盘等关键部位。绝不可让油满溢到物镜壁上，因为油会损害下游部件。若已流出，立刻擦掉；若已流到螺口则需要通知老师处理。
- 结束后记得在记录本上登记本次实验。

待办

- 相机使用规范
- 更换滤镜/二相色镜方法规范
- 光纤更换和调整方法规范
- 双通道测试
- 增加一些图片：光路、Filter Cube、软件界面、调 tifr 图片、光斑图片