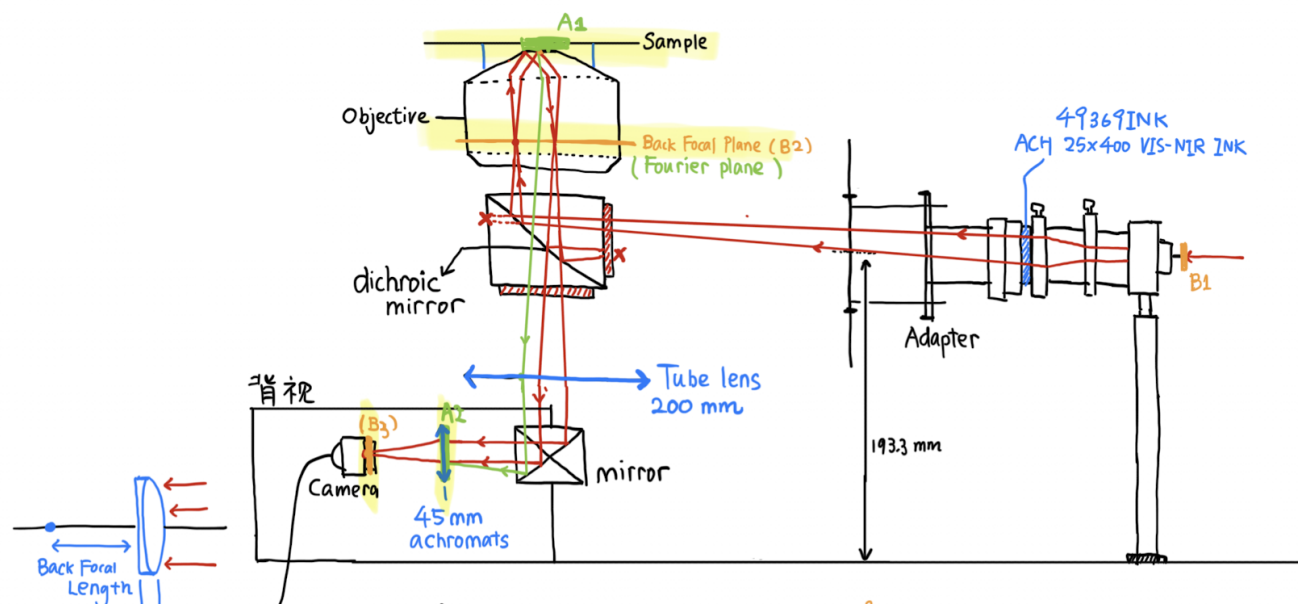


TE2000U 基本使用 Notes

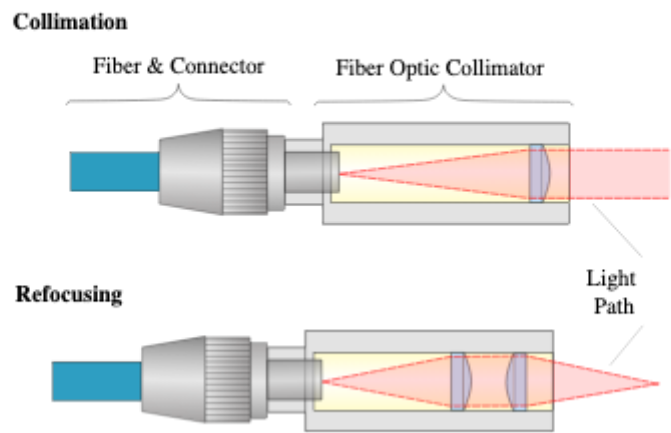
1043有两台科研级的尼康倒置显微镜，进门右手边(TE2000U)是组里最常用的荧光TIRF（全内反射）配置，示意图如下。本笔记针对1043的一般使用者，包括基本成像光路、如何正确地上样测试和日常维护，以避免初学者踩坑，并让仪器维持一个可持续的状态。目前更换光纤、调整光路、更换(不是切换)二相色镜/滤镜、更换双通道都需要授权进行，如有需要可联系张老师学习操作。关于光学间本身和进入前后的注意事项，参考*Clean Room Basics & Rules*和*Clean Room Checklist*。



光路描述和原理

- 激发光路
 - 耦合进光纤的激光经过**光纤准直器(Fiber Collimator)**变成一束较小的平行光(其调节方法见另一

Fiber Optic Collimators



篇笔记)

光纤准直器

- 而后经过一组由两个透镜(先经过一个凹透镜后经过一个凸透镜，两片透镜间距恰好为焦距之差，即凹透镜焦点恰好落在凸透镜焦点上)构成的**telescope型扩束器**扩束为直径约14mm的准直光。两个透镜可以通过其笼架上的旋钮微调x-y位置，应尽量保证光线垂直地通过其轴心，否则将影响后续光路。

- 准直后的光束应该随z轴尺寸几乎不变，这样经过一面较长焦距的透镜(400mm)、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(图中B2)。
- 物镜后焦面事件
 - 后焦面上的点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)**。
 - 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(即第二面带旋钮的透镜)的旋钮来控制入射点的位置。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隐逝波照明，即照明强度随z轴指数衰减。
- 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反射掉，只透过前者以观察荧光。
 - 出射光重新经过物镜，则前焦面上发出的光变成平行光，在物镜后焦面(B2)处成一个**fourier变换像**，因而这个面也被称为**fourier面**。
 - 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(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**拧到听到弹簧声音**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*Adjustment_of_fiber*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首先需要与前面的不见共轴。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：先保证准直和平行光、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
 - 如需测试，先开相机，打开计算机上的控制软件。EMCCD需要冷却来降低噪声，须待相机冷却完成(左下角进度变绿)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。更换光纤需要通知老师学习，详情请参考另一篇笔记。
 - 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)。TE2000U机械结构比较古老，切换时候需注意听到click声音代表切换成功。否则，采集图像时会过曝严重，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，详情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)，避免对激发光路施加机械冲击以防止光路歪轴。
- 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损伤，应格外当心。如有必要可使用激光防护眼镜。
- 上样
 - 上样前务必确保物镜下降到安全的高度，以避免碰伤物镜。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。
 - 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。
 - 尽量避免在显微镜上加溶液，以防溶液与镜油混合而导致无法正常成像。
 - 确保胶带**压平密封**。若胶带明显发白，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，
- 维护
 - 实验结束记得关闭软件、相机和激光器，否则将消耗使用寿命。
 - 光纤脆弱，绝不可强行拉拽。应小心避免勾连缠绕。
 - 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，确保擦完后玻璃**表面光亮无油渍**。油渍残留会造成折射率不均而劣化成像，照明光斑也会形态诡异。
 - 避免过量加油，多次加油后必须吸掉重加。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。

代办

- 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