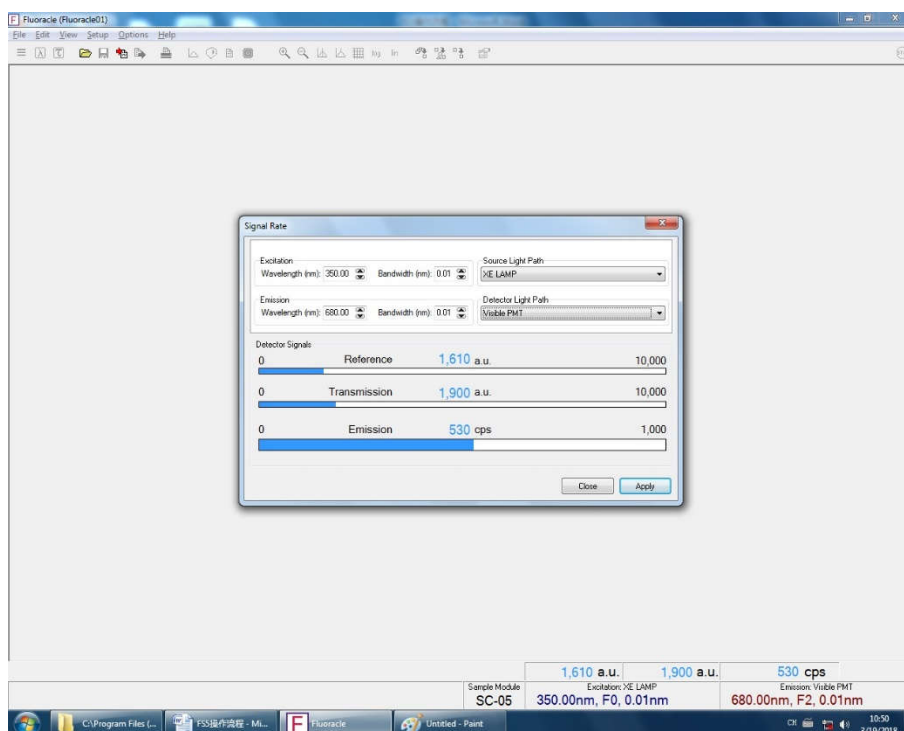


# FS5 操作步骤

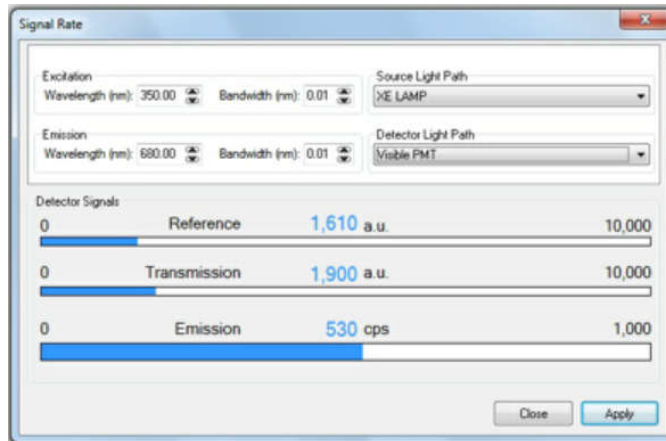
## 一、开机

- 1、 先打开电脑。
- 2、 打开仪器。操作前，最好确认使用什么样品支架，开机之前，先把支架安装好。
- 3、 打开软件 Fluoracle。
- 4、 初始化后，软件跳出 Signal rate 对话框，可以开始操作了。



## 二、信号调节

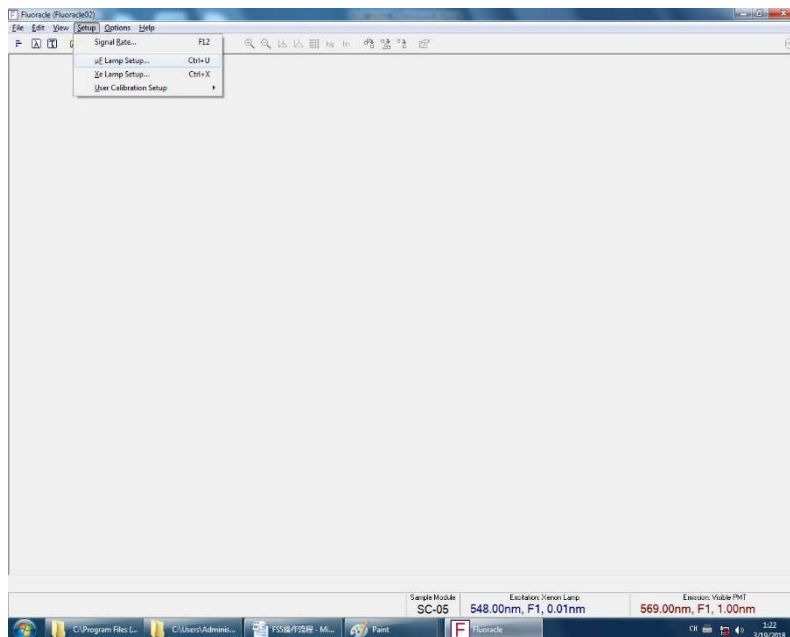
- 1、 在 signal rate 界面调节样品信号。
- 2、 放置样品。
- 3、 在 source of light path 中选择光源，detector of light path 中选择检测器，选完后，将 Ex 和 Em 的 bandwidth（也就是狭缝）调到最小，一般为 0.01 或者 0.02，点击 Apply。

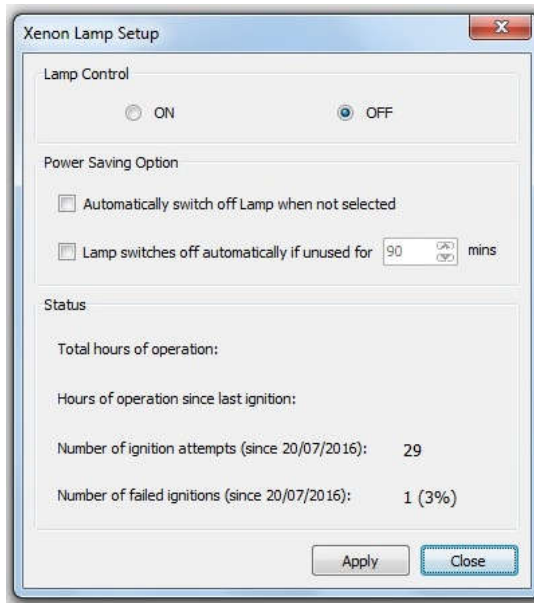


- 4、 输入对应的 Ex 和 Em 波长，调节 Ex 和 Em 狭缝，将 Emission 的信号调到合适值。
- 5、 固体样品，需要调节样品槽的位置，调节信号强弱。
- 6、 Reference 为参比检测器的信号值，一般不能超过 4,000,000。  
Transmission 为吸收检测器的信号值，一般不能超过 2,000,000。

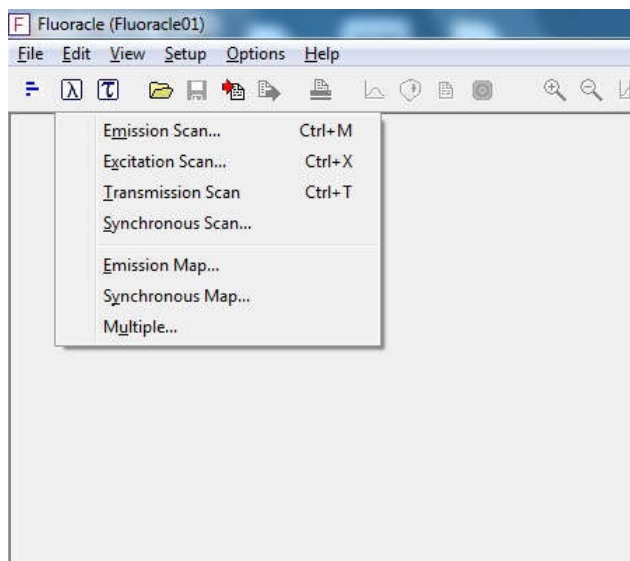
### 三、测试光谱

- 1、 在 setup 中，选择 Xe lamp。点击 On，不用点击 Apply，氙灯点亮。一般需要预热 20min 左右。

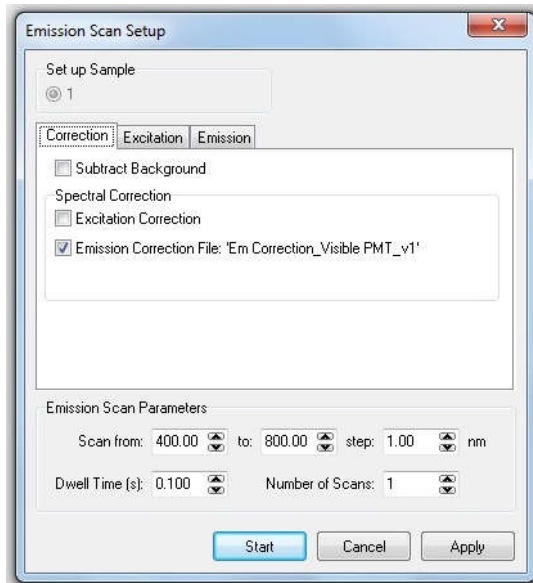




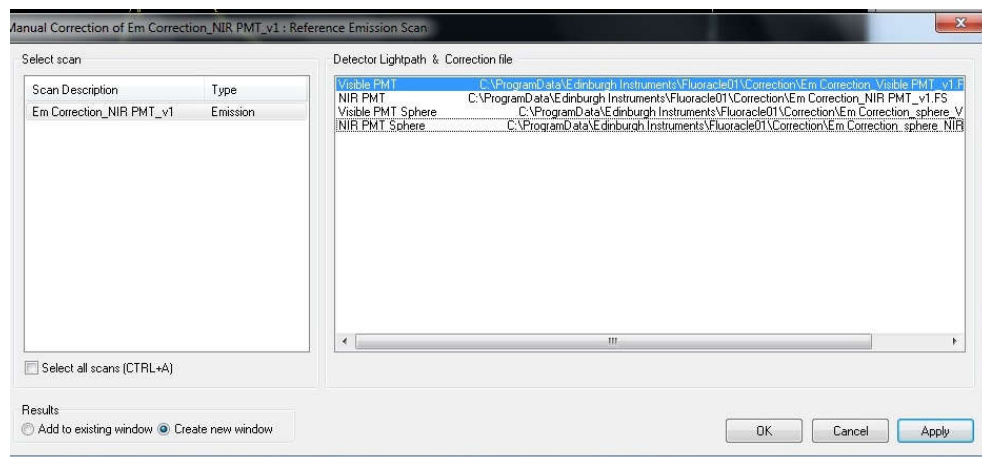
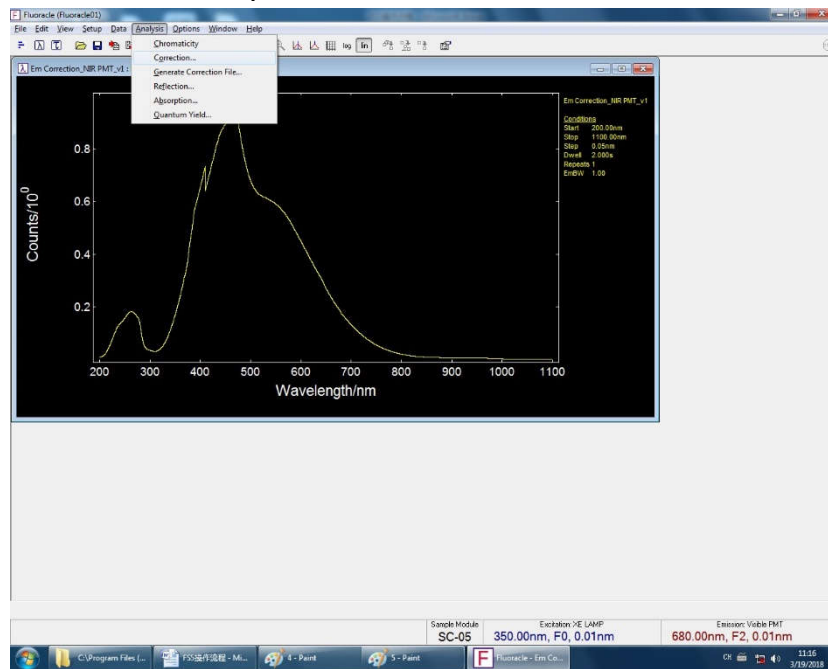
- 2、 signal rate 中选择 Xe Lamp， 检测器选择 redPMT(200~900nm)或者 NIR PMT(600~1700nm)。
- 3、 输入波长， 调试狭缝， Emission 信号不能超过 1,000,000cps。
- 4、 关闭 signal rate， 点击 “λ” ， 选择测试方法。



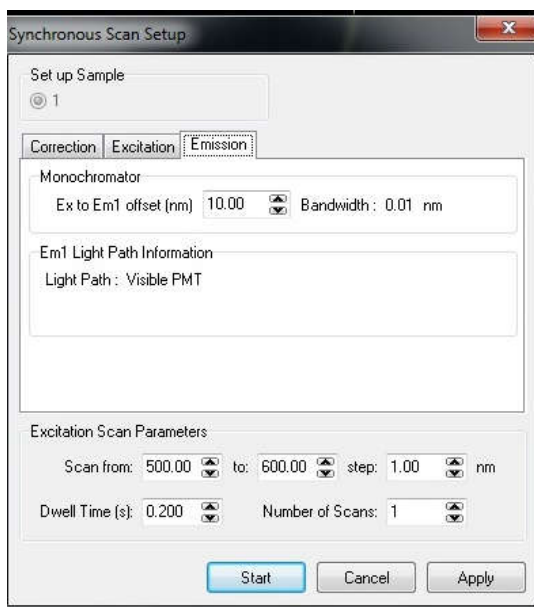
- 5、 Emission scan
- 6、 Correction， 校正文件， 建议勾选 “Excitation correction” ， 已扣除激发光源的波动； “Emission correction file” ， 勾上后， 扫描的谱图自动扣除校正文件； 也可以不勾选， 在数据处理时再加载上校正文件。  
Scan \_\_\_ from\_\_\_ ， 设置波长起始； step 设置步径， 一般为 0.5、 1nm， 越大扫描越快； dwell time， 积分时间， 一般设置 0.1~0.5s， 越大峰值越高； number of scans， 扫描次数， 最终的谱图是多次扫描的叠加。



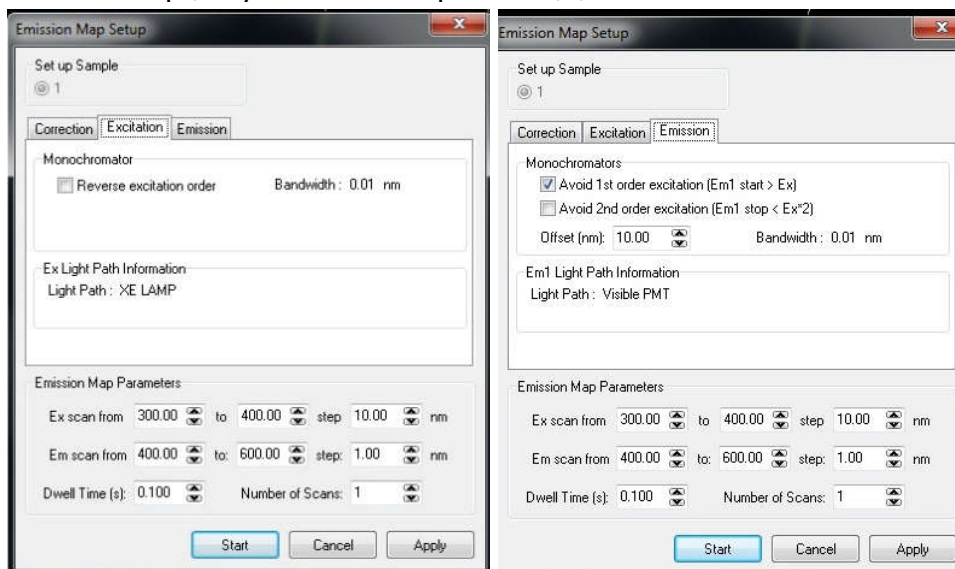
- 7、 设置完成后，点击 start，开始测试。
- 8、 加载校正文件：在 Analysis 中的 correction 中，选择需要加载的校正文件。

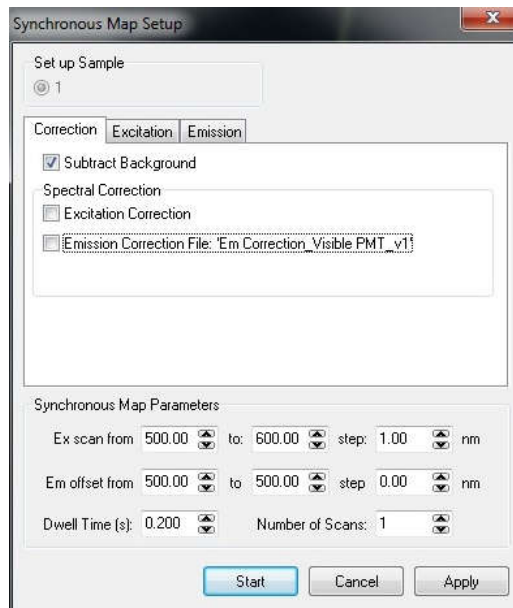


- 9、 注意：狭缝只能在 signal rate 中设置。
- 10、 Excitation scan 和 Emission scan 一样。
- 11、 Transmission scan, 测试吸收光谱。需要测试空白溶液。测试完成后, 样品和空白谱线合并, 点击 Analysis 中的 Absorption 转换成吸光度 Abs。
- 12、 Synchronous scan, 同步扫描。激发和发射同时变化, 波长起始是 Ex 侧波长, 需要设置 Offset。



- 13、 Emission Map 和 Synchronous Map, 3D 谱图。

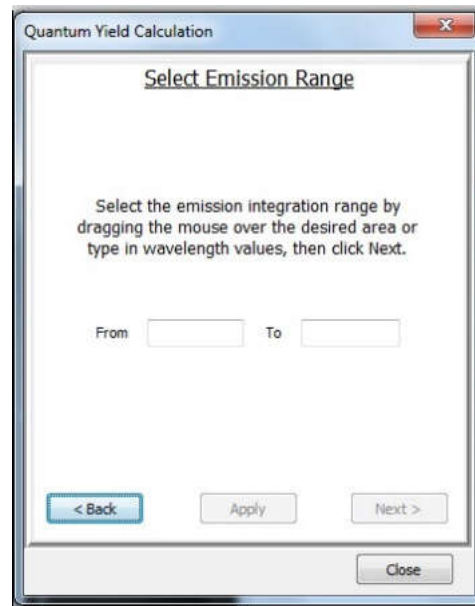
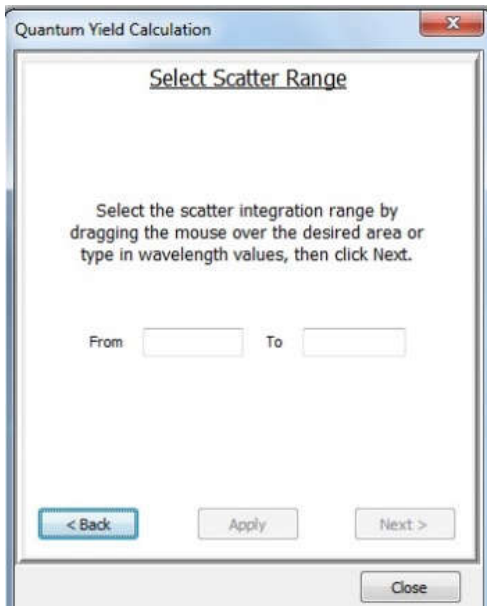
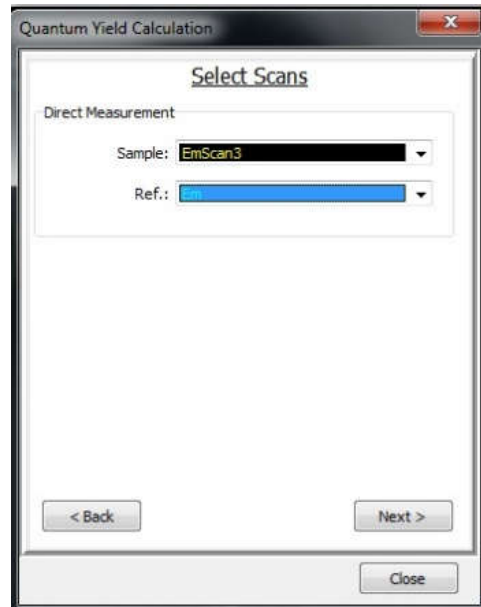
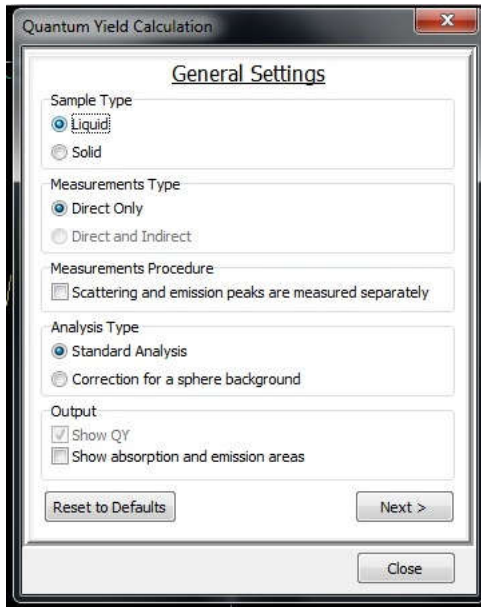




14、 Multiply scan，多次扫描。重复扫描，每次扫描的图，可以单独保存。

#### 四、量子产率测试

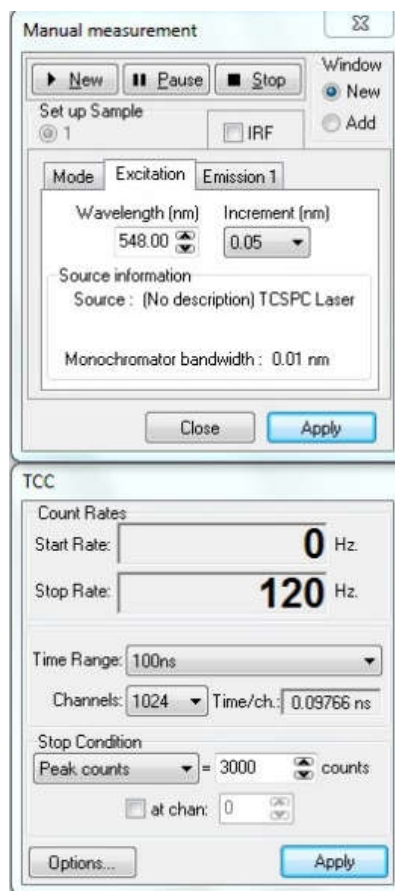
- 1、 样品支架换成积分球。
- 2、 测试之前，需要知道样品的激发波长，发射波长，和发射峰的终止波长。
- 3、 在积分球中，安装相应的液体或者固体支架。
- 4、 光源选择 Xe lamp，检测器需要选择 red PMT sphere 或者 NIR PMT sphere。
- 5、 测试空白曲线，液体用液体的空白溶剂，固体用积分球自带的空白样品。
- 6、 光源选择 Xe 灯，Ex 和 Em 设置成样品的激发波长，调节 Ex 和 Em 狭缝，使得 Emission 信号值达到最大，1,000,000cps，同时需要保证 Ex 狭缝是 Em 狭缝的 10 倍。
- 7、 Emission scan，勾选 Ex 和 Em 校正文件，勾选 Subtract background。开始波长为激发波长减去 20nm，终止波长为样品发射峰的终止波长。
- 8、 扫描完成，放置样品，不更改任何的条件，扫描。
- 9、 将散射曲线和样品曲线合并，点击 Analysis 中的 Quantum Yield，进行量子产率计算。



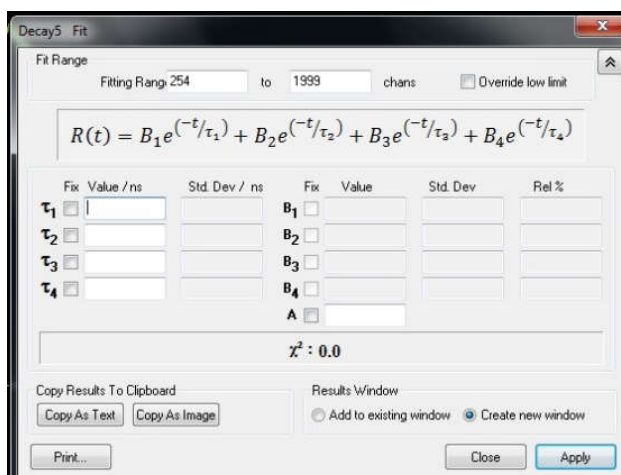
## 五、测试纳秒级寿命 (50ps~ns)

- 1、 安装适用的激光器，先将激光器的衰减片 (optical power) 调到最小。
- 2、 打开激光器的钥匙，laser ready 的红灯会闪烁，闪烁完成后，点击 laser on/off 按钮，打开激光。设置激光器的脉冲时间。脉冲时间需大于测试寿命的 10 倍到 20 倍。
- 3、 在 signal rate 中选择 External Laser (TCSPC laser)，光源根据 Em 波长，选择常规检测器或者近红外检测器。Em 狭缝调节最小。Ex 狭缝设置无效。
- 4、 将吸收检测器用挡光板挡住。

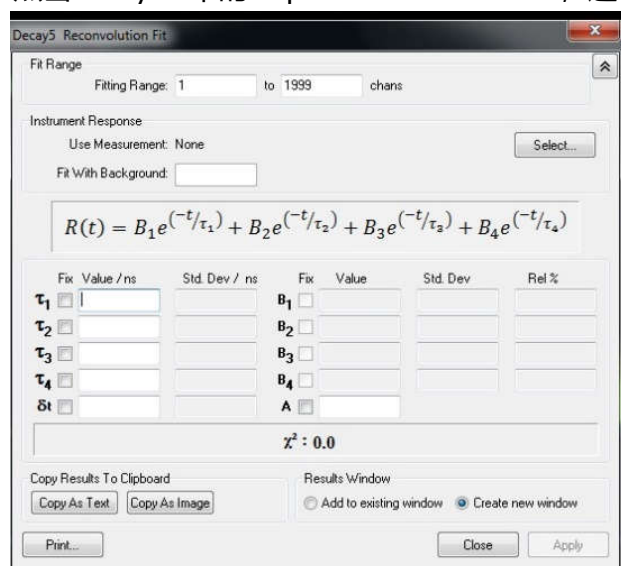
- 5、 放入样品，调节衰减片和 Em 狭缝来调节 Emission 信号，信号不能超过激光器频率的 5%。Reference 显示的是激光器的频率。
- 6、 关闭 signal rate，点击 “ $\tau$ ” 中的 manual，主要设置的是 time range 和 stop condition 的 peak counts。Time range 需要小于激光器的脉冲时间 (pulse period) ，大于寿命的 10 倍到 20 倍；如果样品的荧光信号弱，peak counts 设置小一些，反之，设置大一些，peak counts 一般设置在 3,000~10,000。



- 7、 设置完成后，点击 new。
- 8、 扫描完成后，点击 analysis 中的 Exp. Tail fit...，在 1 中输入估计的寿命值，点击 apply。相关系数  $X^2$  在 1.0~1.3 之间为宜。Fitting range 是设置拟合范围的，可以稍作修改。



- 9、拟合完成后，建议保存原始谱图和结果谱图。
- 10、如果寿命小于 10ns，建议做 IRF。
- 11、液体使用 Ludox 溶液，固体使用样品本身。将 Em 波长设置成激光器的波长，狭缝不变，调节激光器衰减片，使得 Emission 信号达到激光频率的 5%。
- 12、关闭 signal rate，点击“τ”中的 manual，勾选上 IRF 和 Add，点击 New，刚才寿命曲线上会测试 IRF 曲线。
- 13、测试完成后，点击 Analysis 中的 Exp Reconvolution Fit...，进行拟合。

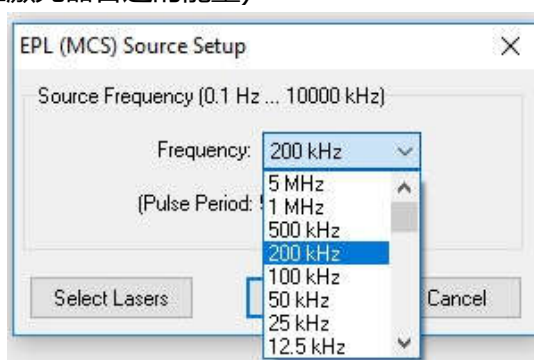


- 14、Multiply 是多次重复测试。
- 15、TRES，是不同波长（Ex 或者 Em）下的寿命，结果是 3D 图。

## 六、测试 100ns~1s 之间的寿命

一般来讲 ns 级寿命用的是 EPL/EPLED 或者纳秒灯，μs 级寿命用的是微秒灯。但是出于两者临界处（100ns~10μs），往往两者都测试结果拟合不成功或者不准确。因此此区间，可以用 EPL/EPLED 或者 VPL 作为光源。

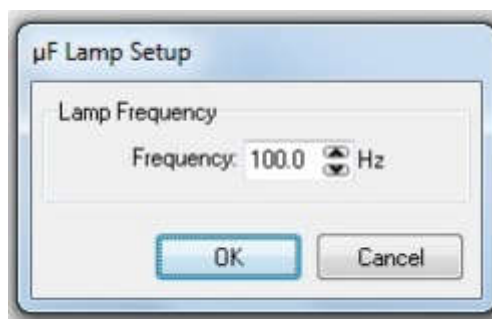
- 1、 TRIG OUT 不插信号线, 中间 INTERLOCK 插上连接线 (三针), POWER 口连上电源线。
- 2、 EPL/EPLED 激光器上的 pulse period 的指针, 指向 TRIGGER INPUT; VPL 激光器上选择合适的 pulse width (脉宽)。
- 3、 打开 signal rate, 光源选上 EPL /VPL MCS。
- 4、 盖上样品仓盖 (一定要合上仓盖)。
- 5、 右拧激光器钥匙, 灯 ready 灯闪烁后稳定, 打开激光器。
- 6、 在 setup 的 EPL (MCS) source setup 里面, 选上适当的频率(VPL 的脉冲频率, 大概在 VPL 激光器脉宽频率的 2%左右; 如果 VPL 上的 “Laser on” 红灯灭了, 说明频率或者脉宽选择不合适。脉宽越大, 激光器能量越大; 既要保证脉宽小一些, 又要保证激光器合适的能量)



- 7、 光源选择 EPL MCS 或者 VPL。检测器选择 Visible PMT 或者 NIR PMT。
- 8、 调节信号, Emission 信号检测器噪声基础上, 2000~3000cps。
- 9、 测试设置和纳秒级寿命一样。

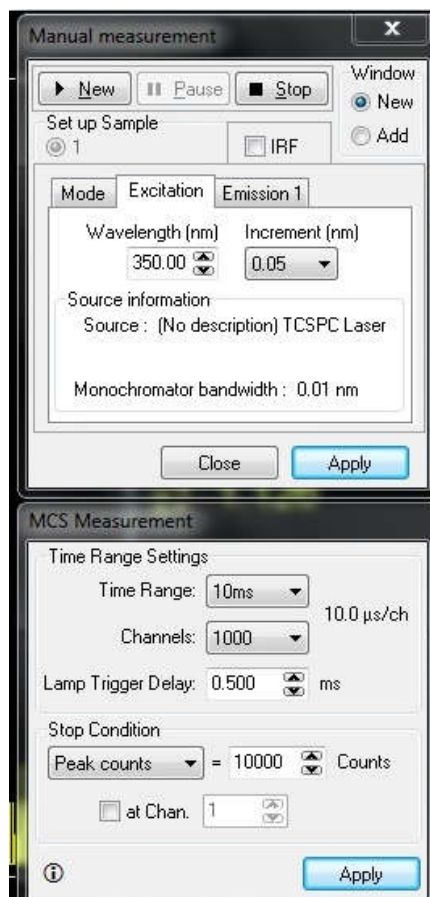
#### 七、微秒寿命的测试 (10 $\mu$ s~1s)

- 1、 Setup 中选择  $\mu$ F lamp, 选择微秒灯的频率。脉冲时间=1/频率, 大于寿命的 10~20 倍。



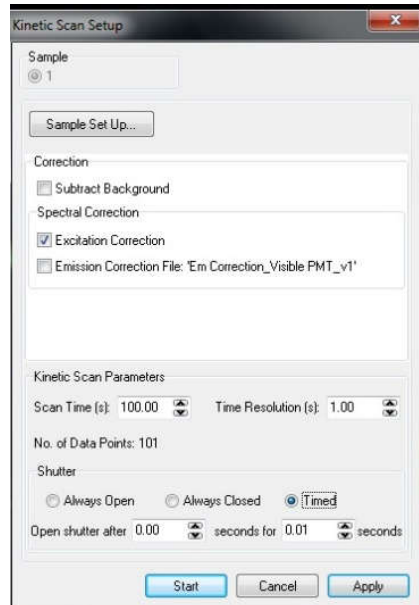
- 2、 光源选择 microsecond flashlamp ( $\mu$ F lamp)。检测器选择 Visible PMT 或者 NIR PMT。
- 3、 调节信号, Emission 信号检测器噪声基础上, 2000~3000cps。
- 4、 测试设置和纳秒级寿命一样。

- 5、 如果寿命小于  $50\mu\text{s}$ , 则需要测试 IRF。方法和纳秒级一样, 样品选用 Ludox (液体) 或者固体本身, Emission 信号不超过 1000cps



## 七、长寿命测试 (几百 ms 到几 s)

- 1、 光源选用 Xe lamp。
- 2、 选择 “ $\tau$ ” 中的 kinetic scan。
- 3、 Shutter 选择 “timed”, 设置三段时间。起始时间: open shutter after \_\_\_\_, 激发时间 (照射时间): open shutter for \_\_\_\_ seconds, 衰减时间: Scan time。
- 4、 测试完, 选定曲线的衰减区域, 点击 Analysis 中的 Exp Tail Fit..., 进行拟合计算。

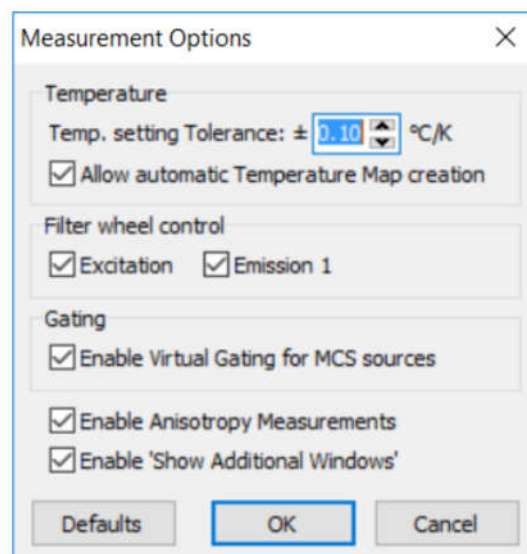


## 八、门控的测试

虚拟门控 (仅限 Fluracle 软件)

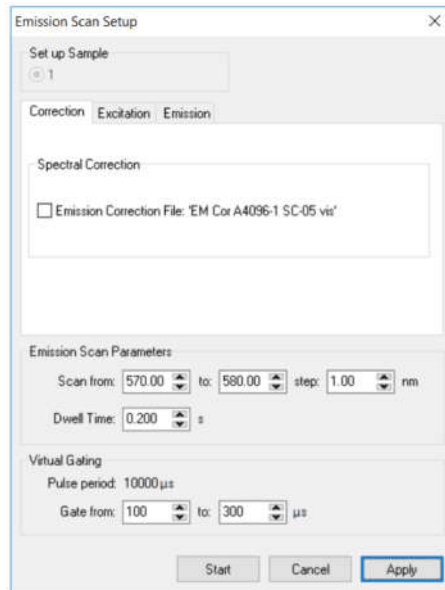
只能用于做稳态光谱，一般用微妙灯做光源，除去短寿命的荧光。

1、在 Options 里面的 measurement options 里面，勾上 Gating, Enable Virtual Gating for MCS sources。



2、光源选上微妙灯，Emission 信号不宜太大。

3、在 Emission scan 里，Virtual gating，第一个格用来滤掉短寿命荧光，一般设置为  $50\mu\text{s}\sim 100\mu\text{s}$ ，第二个格用来记录长寿命的荧光，设置小于微妙灯脉冲时间。



## 九、滤光片的使用

高通滤光片：一般放在样品后面。Emission 扫描时波长大于激发波长，小于发射峰起始；Excitation 扫描时，波长小于发射波长，大于激发峰的结束点。

带通滤光片：一般放在样品前面，用来过滤激发光，范围要包括激发光。

低通滤光片：一般用于上转换测试，放在样品后面。仪器不能自动滤掉 1/2、1/4 倍频，如果需要，要加滤光片。小于激发波长，大于发射结束。

## 十、数据保存

数据可以保存为原始文件、ASC II 文件和图片文件。