第一部分 安全须知

一、仪器关机问题

1. 当天最后一位使用者必须软件硬件全关，刷卡下机。若失约或其他个人因素造成仪器未关常开过夜，则取消独立操作资格，资深用户将降为普通用户，普通用户将降为未授权用户，且三个月内不予独立资格考核。
2. 当天倒数第二位使用者需留意最后一位使用者的预约时间和状态，如果使用结束时，最后一位使用还没来，需电话或微信群内提醒。
3. 实验结束，请务必查看终端有无下一位使用者。遵循开关机规则。

二、数据拷贝问题

1. 数据上传网站服务器或平台专用移动硬盘（使用前后格式化）。
2. 不得擅自删除其他人数据，如果硬盘数据已满，请联系仪器管理员。

三、成像分平台环境问题：

1. 所有显微镜禁止戴手套操作。
2. 每个成像房间内空调常开且制冷 22°C 不变，勿因个人冷暖随意更改温度。
3. 每个成像房间内除湿机请勿随意开关，保持 40-60% 的空气湿度。
4. 实验结束，带走自己的样本试剂等，清理桌面，保持干净。
5. 禁止在成像分平台内饮食。
6. 成像房间最后一位离开，需关好门窗和灯，不关空调和除湿机。

四、其他注意事项

1. 镜油不同，请勿混用。
2. 独立操作资格不能借给别人使用，一旦发现严肃处理。
3. 汞灯的开关机间隔不能少于 30 分钟。

以上问题未遵守者，给予警告处罚，情节严重者禁用仪器。

第二部分 理论考试题库

1. 荧光显微镜是如何利用荧光分子进行成像的？

参考答案：

荧光显微镜的激发光光源将处于基态的荧光分子从基态激发至激发态，处于激发态的荧光分子不稳定，可以通过释放光子的方式回到基态，这些释放的光子作为发射光可以被荧光显微镜的检测器捕获，从而获知样品中荧光分子的数量和位置。

2. 简述激光共聚焦显微镜的工作原理和功能，转盘与点扫共聚焦最大的区别是什么？

参考答案：

激光共聚焦以激光为照明光源，通过扫描振镜对标本进行点照明、点扫描，焦平面产生的荧光信号通过共聚焦针孔被探测器检测，而非焦平面的信号被针孔阻挡，从而形成样品的光学切片，激光共聚焦图像由于屏蔽了焦点平面以外信号的干扰，因此具有很高的图像信噪比和清晰度。

转盘共聚焦的转盘上有多个孔可以同时投射多点物象到面阵相机，因此转盘可以实现多点成像，而点扫描相机需要逐点扫描，所以转盘共聚焦有更快的成像速度。

3. 在使用高倍镜时发现找不到物象，有哪些可能的原因以及解决措施

参考答案：

(1) 焦平面没找对，解决措施是调节物镜高度直到找到物象，但是调节时要注意防止物镜直接顶到玻片（或者各种 chamber）。

(2) 玻片放反，高倍镜工作距仅有数百微米，载玻片过厚，所以无论如何高倍镜的焦平面都无法对准样品本身。

(3) 其他答案合理即可，如果解决不了需要第一时间联系仪器管理员

4. 相比低倍镜成像，高倍镜成像对培养皿和玻片有何特殊要求又为何有此要求？

参考答案：

特殊要求主要是培养皿底部要很薄，一般用于高倍镜成像的培养皿底为 0.17mm 左右。这主要是因为高倍镜工作距往往只有一二百微米，培养皿或者玻片太厚的话物镜工作距不够，焦平面升不

到样品处。

5. 共聚焦显微镜的针孔 pinhole 有什么作用？设置要求？

参考答案：

屏蔽非焦平面信号，影响光切厚度。一般情况。针孔大小为 1AU。

6. 物镜的主要种类有哪些？切换镜头有什么注意事项？

参考答案：

建议先将物镜高度降到最低之后再切换物镜；若切换前使用的是油镜，切换镜头前应先将油镜和样品擦干净后再切换，不可以直接带着镜油从油镜切换到空气镜。

7. 如何清洁物镜，物镜清洁试剂的选择？

参考答案：

对于油镜：先擦除物镜上的镜油，往一个方向轻轻擦拭干净，再换一张新的擦镜纸，光滑的一面蘸取无水乙醇，往一个方向轻轻擦拭干净一遍，再用擦镜纸光滑的一面往一个方向擦拭。

对于空气镜：用棉签蘸取无水乙醇往一个方向轻轻擦拭。

8. 请根据瑞利判据粗略计算本台尼康转盘共聚焦搭载的 60X/1.42 Oil lens 分别在 405nm 和 488nm 波长的激发光下的横向理论极限分辨率是多少？

参考答案

$$\sigma = \frac{\lambda}{2 \times Na} = \frac{488nm}{2 \times 1.42} \approx 172nm$$

同理，405nm 激光作为激发光时，分辨率约为 143nm

9. 物镜镜头上的不同数值都代表着什么，比如：60X/1.42; Oil; WD 0.15?

参考答案：60X 是物镜的放大倍数，1.42 是镜头开口率即 NA 值，Oil 是指该物镜是油浸物镜，WD 0.15 是指 working distance 为 0.15mm。

10. 在使用高倍镜时发现找不到物象，有哪些可能的原因以及解决措施

参考答案：

1. 焦平面没找对，解决措施是调节物镜高度直到找到物象，但是调节时要注意防止物镜直接顶到玻片（或者各种 chamber）。
2. 玻片放反，高倍镜工作距仅有数百微米，载玻片过厚，所以无论如何高倍镜的焦平面都无法对准样品本身。
3. 其他答案合理即可，如果解决不了需要第一时间联系仪器管理员

11. 请罗列使用平台尼康转盘共聚焦硬件方面的各种注意事项

参考答案：

1. 开机时注意电脑主机和硬件的开关顺序，等相机初始化好后再开电脑主机。
2. PIEZO 不可以受压，需要保持 PIEZO 附近的干燥，及时擦干洒的东西。
3. incubator 的盖子不可以受竖直重压，只能横向推开。
4. 切换物镜前降低镜头和擦镜油等。
5. 不要压气浮防震台。
6. 不要单独开关除了两个插排总开关、电脑主机开关和 incubator 以外的任何硬件开关。
7. 其他答案合理即可。 如果不确定是否涉及不规范操作，第一时间联系仪器管理员咨询。