

# 國立清華大學共軛焦顯微鏡系統管理規範

## User Guidelines for Confocal Microscope System



### 連絡資訊

儀器指導教授：湯學成 教授

TEL：(03) 5715131 Ext.42465

E-MAIL：sctang@life.nthu.edu.tw

儀器管理員：周亞賢 小姐

TEL：(03) 5715131 Ext.35764

E-MAIL：cms\_nscric@my.nthu.edu.tw

管理員代理：蕭輔廷 博士

TEL：(03) 5715131 Ext.35764

儀器地點：國立清華大學生命科學二館 540 室、640 室



國立清華大學  
NATIONAL TSING HUA UNIVERSITY

## 目錄

- 一、儀器規格
- 二、收費規定
- 三、服務時段
- 四、預約規定
- 五、樣品規定
- 六、認證考核
- 七、使用規定
- 八、違規辦法

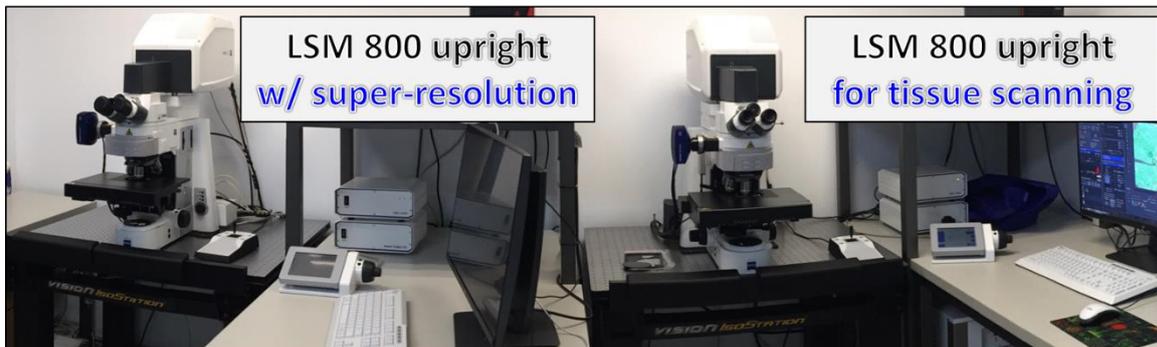
## Confocal Imaging Core at Tsing Hua Life Science

Supported by NSTC & Tsing Hua University

國科會與清華大學支持成立貴重儀器中心



With cell/tissue culture setup



2017 Confocal imaging core in Tsing Hua University, Taiwan, 24M NTD

LSII Room 540 & 640



國立清華大學  
NATIONAL TSING HUA UNIVERSITY

## 一、 儀器規格

### 正立式共軛焦顯微鏡 LSM 800

LSM 800 upright confocal microscope for tissue scanning

- 10 倍 (air) | 20 倍 (air) Plan-Apochromat DIC 物鏡
- Laser : 405 nm/488 nm/561 nm/640 nm
- Confocal 感測器 PMT x2
- 電動載物台

### 超解析正立式共軛焦顯微鏡 LSM 800

LSM 800 upright confocal microscope with super-resolution (Airyscan)

- 10 倍 (air) | 20 倍 (air) | 40 倍 (oil) | 63 倍 (oil) Plan-Apochromat DIC 物鏡
- Laser : 405 nm/488 nm/561 nm/640 nm
- Confocal 感測器 PMT x2
- Airyscan 感測器 x1
- 電動載物台

### 倒立式共軛焦顯微鏡 LSM 800

LSM 800 Inverted confocal microscope with cage Incubator

- 10 倍 (air) | 20 倍 (air) | 40 倍 (oil) | 63 倍 (oil) Plan-Apochromat DIC 物鏡
- Laser : 405 nm/488 nm/561 nm/640 nm
- Confocal 感測器 PMT x2
- Cage Incubator x1 (CO<sub>2</sub> 與加濕器暫不開放)
- 電動載物台
- 長時間攝影自動追焦系統

### 全內反射螢光顯微鏡

Total internal reflection fluorescent microscope (TIRF)

- 10 倍 (air) | 20 倍 (air) | 40 倍 (oil) | 63 倍 (oil) Plan-Apochromat DIC 物鏡
- 100 倍 (oil)  $\alpha$  Plan-Apochromat DIC 物鏡
- Laser : 405 nm/488 nm/561 nm/638 nm
- Carl Zeiss Laser TIRF 3 System
- DAPI、GFP、GFP/mRFP/Alexa633 TIRF 螢光濾片
- 高速 sCMOS 螢光專用相機 128FPS/ 2.3Mpixels
- Cage Incubator x1 (CO<sub>2</sub> 與加濕器暫不開放), POCmini-2 re-usable chamber
- 電動載物台
- 長時間攝影自動追焦系統



## 二、 收費規定

- 預約以時段為單位，**一個時段為 2 小時**。
- 培訓時段（見習與實習）和上機測驗時數，皆依照收費標準收取費用。

計畫付費 (國科會計畫)		非計畫付費 (非國科會計畫)	
一般使用者	1,000 元/每時段	一般使用者	4,000 元/每時段
技術員協同操作	3,000 元/每時段	技術員協同操作	4,000 元/每時段
計畫共同參與者	750 元/每時段		

## 三、 服務時段

1. 每週一至五工作日之 9:00 至 17:30 止，每次以 2 小時為一單位開放申請。
2. 協同操作服務時段為每週三，下午時段三至時段四（13:30-15:30、15:30-17:30）。
3. 例假日及國定假日不對外開放。

平日日間	
時段	時間
時段一	09:00 ~ 11:00
時段二	11:00 ~ 13:00
時段三	13:30 ~ 15:30
時段四	15:30 ~ 17:30



#### 四、 預約規定

##### 使用者自行操作

1. 使用者須通過本儀器的認證流程方可自行操作。
2. 使用者須由「國家科學及技術委員會基礎研究核心設施預約服務管理系統」進行線上預約自行操作之時段。
3. 預約者須為使用者本人或其單位負責人。
4. 不可於實驗當日取消預約，逾時或未到者仍會按照預約時段收費。
5. 收費均自預約時間起算，提前操作或超過預約時間以每時段為單位加計費用。
6. 操作超過預約時間且有後續使用者時，須立刻移交使用權。
7. 門禁卡不得出借他人使用。

##### 技術員協同操作

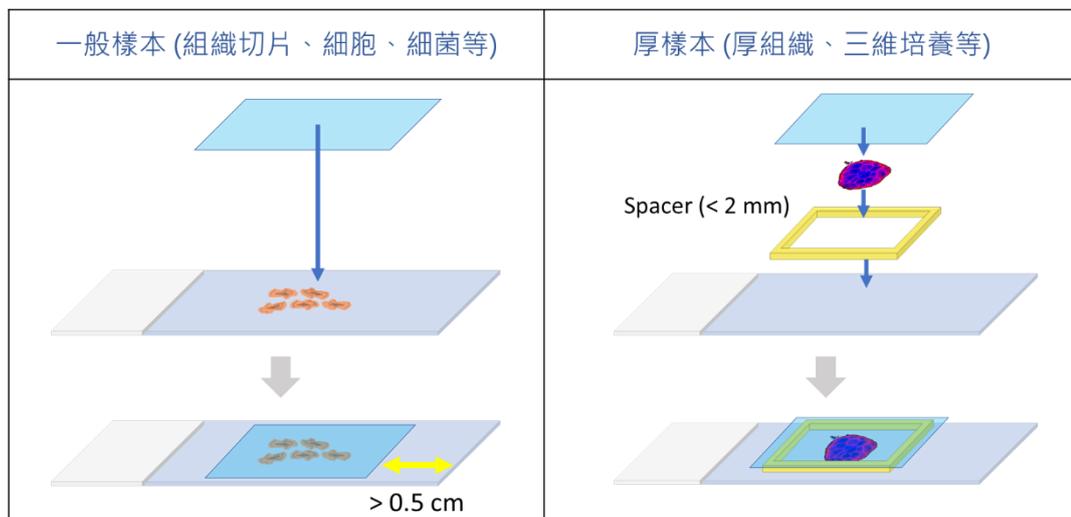
1. 協同操作服務時段為每週三，下午時段三至時段四（13:30-15:30、15:30-17:30）。
2. 不可於實驗當日取消預約，逾時或未到者仍會按照預約時段收費。
3. 協同操作由管理員為使用者操作儀器。
4. 預約協同操作者，須提前 1 至 2 週親自聯絡管理員安排服務時段，未連絡管理員自行由系統預約者，恕無法提供服務。
5. 聯絡管理員時請一併告知樣本資訊：樣本名稱/型態（厚度）/螢光名稱。  
舉例 1：Mouse colon / immunofluorescence staining slide (5 $\mu$ m) / DAPI, Alexa 488, Cy5  
舉例 2：細胞 / 3 公分玻璃底培養皿 / FITC, Cy3, Cy5  
舉例 3：細菌(E. coli) / 高分子膠體材料(polymer gel) 200 $\mu$ m / DAPI (E. coli), Ex=490nm  
Em=600nm (polymer)



## 五、 樣品規定

### I. 共軛焦顯微鏡

1. 務必使用 0.17 mm (No.1.5)規格之玻璃蓋玻片(glass coverslip)或同規格之玻璃底培養皿(glass bottom dish)上機。
2. 載玻片尺寸 25.4mmx76.2mm (1"x3")厚度:1mm-1.2mm。
3. 上機前請先確定樣品已確實封片，並確認樣品具螢光表現；若因樣本自身因素導致無法服務，仍會按照預約時數收費。
4. 封片規定：



- 蓋玻片與載玻片底部須預留0.5公分，封片時不得封至與載玻片齊平，以免卡住載物台夾具。
- 邊緣須以封片膠密封，不得使內部液體滲出。
- 樣本與墊片厚度不得大於2mm。
- 使用墊片墊高蓋玻片者，須將墊片周邊以封片膠密封，不得使內部液體滲出。

5. 樣品玻片請於上機前自行於實驗室清潔乾淨，不得有鏡油或是封片膠殘留於蓋玻片表面。
6. 具有下列性質之樣本不適用於本儀器：無機材料、完全不透明、激發/發散波長不明、發散波長小於 400nm 或大於 700nm、厚度大於 2000  $\mu\text{m}$ 。
7. Cage incubator 目前僅提供溫度控制，CO<sub>2</sub> 與加濕器暫不開放。

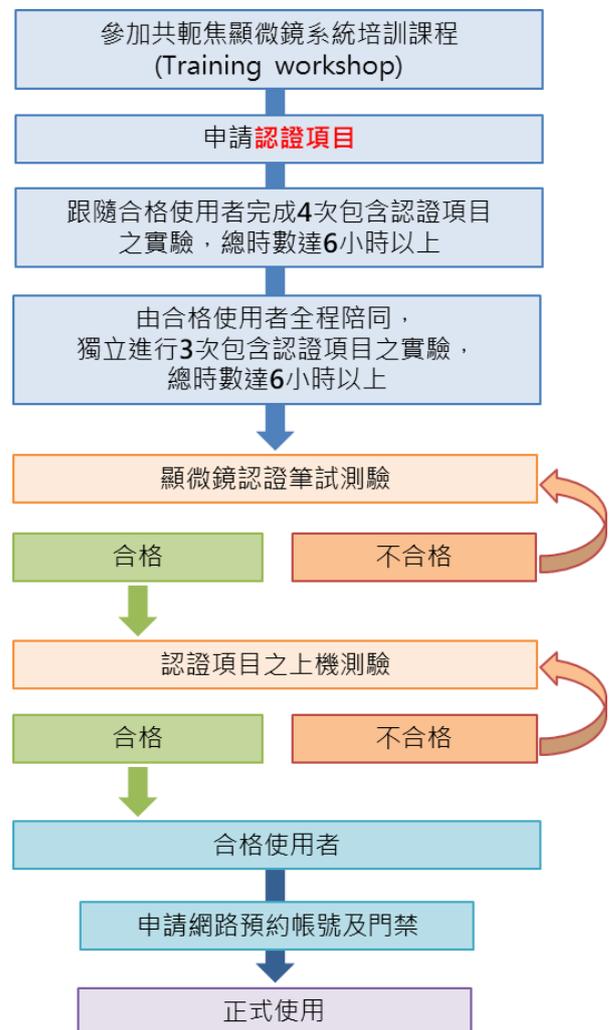
### II. 全內反射螢光顯微鏡

1. 基本規定同共軛焦顯微鏡。
2. 使用 TIRF 功能時，上機樣品請自行準備大小為直徑 30mm 的圓形蓋玻片，向管理員借用 POCmini-2 re-usable chamber 進行上機。
3. 使用 TIRF 功能時，100 倍 (oil)  $\alpha$  Plan-Apochromat DIC 物鏡建議搭配折射率 1.66 以上的蓋玻片。

## 六、 認證考核

### 考核流程

1. 參加共軛焦顯微鏡系統培訓課程（原廠工程師解說課程）。
2. 向管理員申請培訓**認證項目**（填寫共軛焦顯微鏡系統認證申請表暨同意書）。
3. **見習**：跟隨合格使用者完成4次包含認證項目之實驗，總見習時數達6小時以上。
4. **實習**：由合格使用者全程陪同，獨立進行3次包含認證項目之實驗，總實習時數達6小時以上。
5. 完成見習與實習後與管理員預約筆試測驗，共有3次筆試機會（未通過須重新培訓）。
6. 通過**筆試測驗**後，始得與管理員預約認證項目之上機測驗，未通過者1週後才能重新申請測驗（建議多練習）直到通過為止。
7. 每位學員共有2次**上機測驗**的機會。首次未通過者1週後才能重新申請測驗（建議再練習）。
8. 申請國科會預約系統帳號及開通共軛焦顯微鏡室門禁。
9. 正式使用。



### 注意事項

- 種子員為該單位（實驗室）初次使用本儀器所推派的學員，直接向管理員學習儀器操作，須支付培訓費用。
- 通過認證之合格使用者，使得開始培訓該單位（實驗室）成員，若需要協助培訓其他單位（實驗室）之人員請先與管理員聯繫。
- 管理員或合格使用者得依照受訓者的熟練程度，適度增加培訓時數。
- 未能通過考核，種子員請更換人選，一般學員重新培訓。
- 操作者通過認證項目之上機測驗後，須於一個月內自行預約儀器操作增加熟練度，若未執行者須重新進行認證項目之上機測驗。
- 操作者需新增認證項目時（學習新功能），必須由已通過該項目檢核之合格使用者帶領，重新進行該認證項目之培訓，並由管理員考核後使得操作。

認證項目

- 共軛焦顯微鏡 LSM 800 認證項目（各功能須分別申請，將提供表單勾選）  
負責教師：湯學成老師、王慧菁老師

Upright confocal microscope LSM 800	Upright confocal microscope LSM 800 with Airyscan	Inverted confocal microscope LSM 800
	Use of 40x/63x immersion objective (oil)	Use of 40x/63x immersion objective (oil)
XY	XY	XY
XYZ	XYZ	XYZ
Tile scan	Tile scan	Tile scan
Time lapse	Time lapse	Time lapse
		Live-cell incubation
FM mode (CCD)	FM mode (CCD)	FM mode (CCD)
	Airyscan	
Others	Others	Others

舉例：欲使用倒立式共軛焦顯微鏡LSM 800拍攝高倍活細胞三維影像，須申請培訓Inverted confocal microscope LSM 800之Use of 40x/63x immersion objective (oil)、XYZ與Live-cell incubation認證項目。

- 全內反射螢光顯微鏡認證項目（各功能須分別申請，將提供表單勾選）  
負責教師：湯學成老師、鄭惠春老師

Axio Observer with TIRF	Axio Observer fluorescence microscope
Use of 40x/63x/100x immersion objective (oil)	Use of 40x/63x immersion objective (oil)
XY	XY
Tile scan	Tile scan
TIRF	
Time lapse	Time lapse
Live-cell incubation	Live-cell incubation
Others	Others



## 七、 使用規定

### I. 共軛焦顯微鏡室

1. 共軛焦顯微鏡室內禁止飲食及攜帶飲料食物（包含水），進入室內請換室內拖鞋。
2. 儀器使用前/後填寫儀器使用登記表，確實記錄使用時間、溫溼度（23°C，RH 50-55%）。
3. 具感染性樣品上機前必須事先提出申請，操作時須置於全密閉容器內方可進入共軛焦顯微鏡實驗室，且上機全程禁止戴手套操作。
4. 實驗結束後需整理桌面，樣品、器具及實驗廢棄物不可置於共軛焦顯微鏡室內。
5. 若須關閉/開啟室內日光燈，請先徵詢在場使用者。
6. 使用時發現儀器問題或前一位使用者操作不當，需在登記表註明問題並通知管理員。
7. 共軛焦顯微鏡室內皆有裝設閉路監視器，貴重物品請隨身攜帶與保管。
8. 當發生停電時，不斷電系統會發出警示聲（連續嗶嗶聲），此時需立刻停止拍攝並執行關機程序及通報管理員。

### II. 金屬鹵素燈及雷射

1. 每一位使用者在離開前，理論上需將所有電源關閉（工作站除外）。當管理員在桌上放置勿關機標語時，代表下個時段還有使用者。
2. 若前/後一時段有其他使用者，請提前與前/後一位協調是否需要關閉雷射/金屬鹵素燈。
3. 金屬鹵素燈必須冷卻 15 分鐘以上才可以再度開啟。若未等待金屬鹵素燈完全冷卻立刻開啟電源，視為一次操作不當。
4. 使用完全金屬鹵素燈必須把減光擋板關至最小位置。

### III. 鏡頭

1. 禁止任意拆物鏡。
2. 變換倍率時需依序更換鏡頭，不得由低倍物鏡直接切換至高倍物鏡。
3. 切勿添加過量鏡油造成溢流，添加一次鏡油可拍攝 3 至 4 片樣本，發生溢流時需立刻通知管理員。
4. 使用油鏡後請以先拭鏡紙吸取鏡油，再以儀器室內的棉花棒沾絕對酒精，將鏡頭殘留的油份清理乾淨。
5. 上機前若發現鏡頭已被汙染，請立刻告知管理員。
6. 低倍鏡不慎沾染鏡油時請主動告知管理員。
7. 在登記本備註欄註明該次上機使用過的物鏡倍率。
8. 拭鏡紙使用後請直接丟入一旁配置的垃圾桶，避免鏡油沾染桌面以保持桌面和儀器的整潔。
9. 隱匿操作失誤未向管理員呈報者記違規一次，並直接通報單位負責人。

#### IV. 顯微鏡機身

1. 防塵罩請罩至目鏡即可，切勿蓋住共軛焦模組。
2. 使用完畢後請將視野切換旋鈕與拉桿回復至原位。
3. 不慎使鏡頭壓碎玻片或撞擊載物臺，立刻停止拍攝不要移動機身，並通知管理人員以利鏡頭檢查與玻璃碎片排除。
4. 系統當機（雷射無輸出、載物臺無做動、軟體無反應或異常），立刻停止拍攝不要移動機身並通知管理人員協助排除。
5. 有任何問題包含撞鏡頭、壓破樣品、操作不當等等，都須通知管理員協助處理，並且記錄於登記本附註。
6. 隱匿操作失誤未向管理員呈報者記違規一次，並直接通報單位負責人。

#### V. 軟體設定

1. 為確保所有使用者皆能順利進行實驗，禁止更改任何顯微鏡操作軟體內之預設設定。
2. 使用者請利用既有的檔案，以 Reuse 功能重新讀取設定檔。
3. 若因實驗設計需求，欲進行更動儀器設定之測試，請告知管理員並徵求儀器管理教師同意，並由原廠工程師陪同，在不損害儀器之前提進行測試，通過測試後方可由管理員認可之人員操作使用。

#### VI. 資料傳輸

1. 禁止直接在共軛焦顯微鏡主控電腦端使用 USB 裝置傳輸資料。
2. 檔案一律傳到離線工作站輸出，使用工作站請確實填寫使用紀錄，並以安全之 USB 裝置存取資料，使工作站中毒者視為操作不當並須支付維修費用。
3. 離線工作站不得自行更改軟體預設設定或安裝軟體。
4. 管理員將不定期公告並移除公用工作站內的資料。
5. 每次實驗後，立即將自己的實驗資料備份。

#### VII. 人員相關規定

1. 夜間時段不開放。
2. 合格使用者在教學後，需讓接受培訓者於登記本上附註欄簽名，並記錄見習/實習的時數以利核對。
3. 進出共軛焦顯微鏡室之非常規人員（見習、實習、協同操作或陪同實驗）需填寫「出入登記表」。
4. 協同操作或陪同實驗之人員禁止操作儀器。



## VIII. 致謝

本校貴儀中心公告如下：

感謝您使用本中心儀器的服務，若是使用之儀器對您發表著作或畢業論文有相當之助益，誠摯希望您能將中心儀器列名為『致謝者』（本校基礎研究核心設施共同使用服務計畫\_國科會計畫編號：NSTC 114-2740-M-007-001 -），對於中心儀器未來於國科會評選及經費補助申請審查，無疑是對技術員最大的肯定與對中心的支持。請將列名致謝發表著作之刊載期刊、年份、卷數、頁數及著作題目 E-MAIL 給使用儀器之管理員，無限感激。

致謝範例如下：

The authors are grateful for the support from the confocal imaging core in National Tsing Hua University, Taiwan, which is sponsored by the National Science and Technology Council (NSTC 114-2740-M-007-001 -)

We thank the technical support from Ms. Ya-Hsien Chou at the confocal imaging core in National Tsing Hua University.

請將發表著作之刊載的期刊及著作題目 E-mail 給技術員周亞賢小姐。  
cms\_nscric@my.nthu.edu.tw



國立清華大學  
NATIONAL TSING HUA UNIVERSITY

## 八、 違規辦法

1. 第一次違規將會以警告方式通知使用者與其單位負責人。
  2. 若發生第二次違規，使用者停權一個月。
  3. 若發生第三次違規，使用者永久取消使用權。
- 違規記錄以年度作單位計算。
  - 造成儀器損壞者，停止使用權一個月，再次造成損壞則永遠禁止使用。
  - 發生違規之使用者除以上所述之處罰外，所屬單位需負責相關儀器維修費用與責任。

