

# 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 同學

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

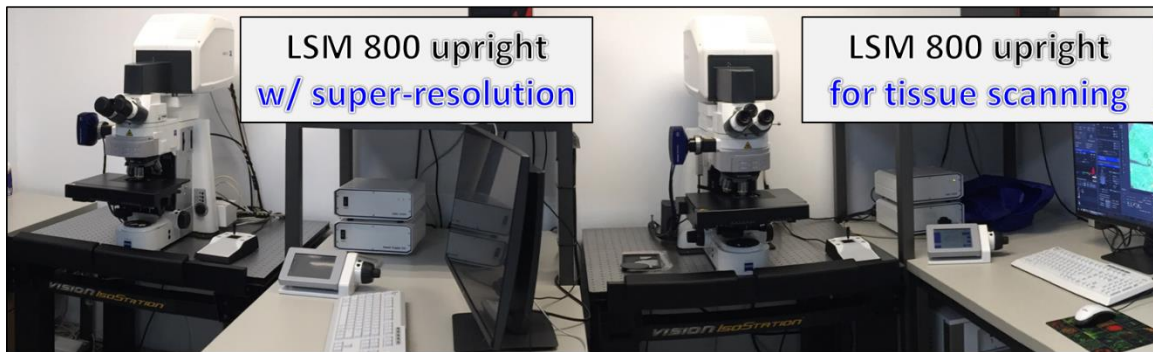
- 一、儀器規格
- 二、收費規定
- 三、服務時段
- 四、預約規定
- 五、樣品規定
- 六、認證考核
- 七、使用規定
- 八、違規辦法

## Confocal Imaging Core at Tsing Hua Life Science

Supported by MOST & Tsing Hua University  
科技部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，日間一個時段為 2 小時/夜間一個時段為 3 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 (科技部計畫)		非計畫付費 (非科技部計畫)	
一般使用者	750 元/每時段	一般使用者	4,000 元/每時段
技術員協同操作	1,600 元/每時段	技術員協同操作	4,000 元/每時段
計畫共同參與者	500 元/每時段		
夜間使用者	500 元/每時段		

## 三、服務時段

1. 工作日之 9:00 至 17:30 止為日間時段，每次以 2 小時為一單位開放申請。
2. 每週一至五 18:00 後至隔日 9:00 為夜間時段，開放須使用超過 2 小時以上者申請，每次以 3 小時為單位。
3. 偕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）
4. 使用夜間時段者，須經單位負責人及儀器管理教師簽署夜間使用同意書，並且擁有獨立完成日間時段操作達 10 次者方可申請使用。
5. 例假日及國定假日不對外開放。

平日日間		平日夜間	
時段	時間	時段	時間
時段一	09:00 ~ 11:00	時段一	18:00 ~ 21:00
時段二	11:00 ~ 13:00	時段二	21:00 ~ 00:00
		時段三	00:00 ~ 03:00
時段三	13:30 ~ 15:30	時段四	03:00 ~ 06:00
時段四	15:30 ~ 17:30	時段五	06:00 ~ 09:00



#### 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「科技部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。

##### 技術員偕同操作

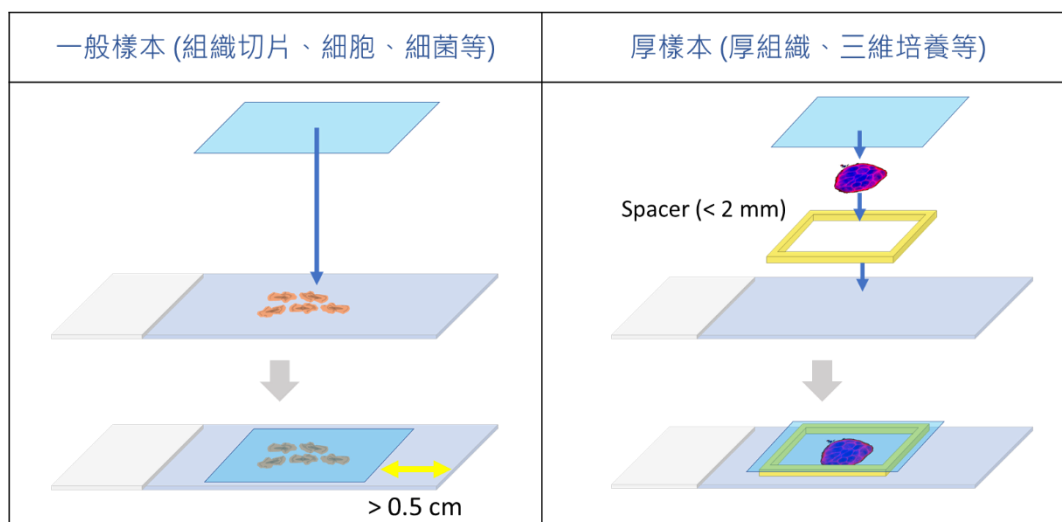
1. 偕同操作服務時段為每週三下午時段三至時段四（13:30-15:30、15:30-17:30）。
2. 不可於實驗當日取消預約，逾時或未到者仍會按照預約時段收費。
3. 偕同操作由管理員為使用者操作儀器。
4. 預約偕同操作者，須提前 1 至 2 週親自聯絡管理員安排服務時段，未連絡管理員自行由系統預約者，恕無法提供服務。
5. 聯絡管理員時請一併告知樣本資訊：樣本名稱/型態（厚度）/螢光名稱。  
舉例 1：Mouse colon / immunofluorescence staining slide (5 $\mu$ m) / DAPI, Alexa 488, Cy5  
舉例 2：細胞 / 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。

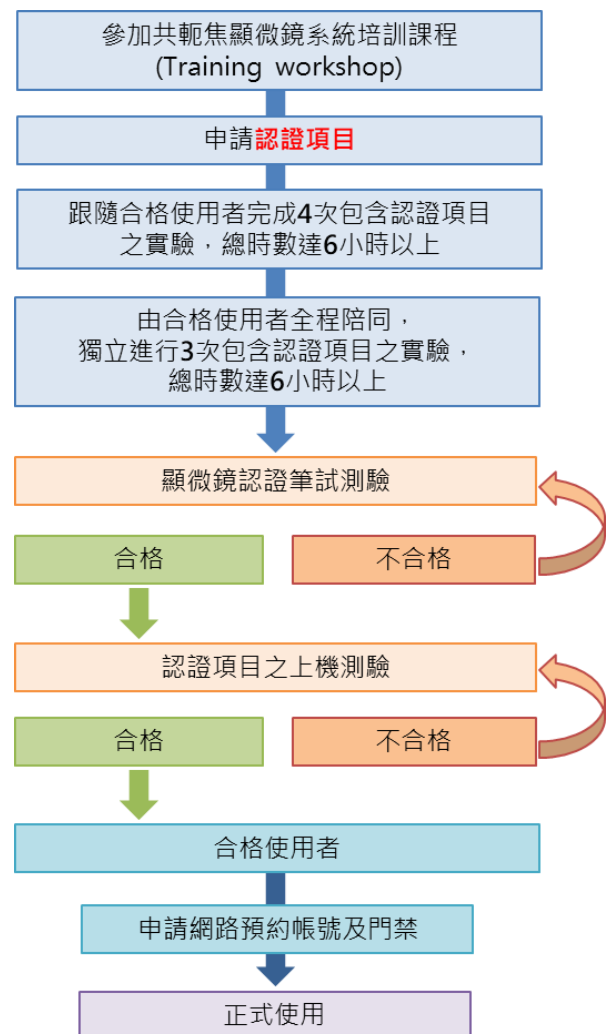
### II. 全內反射螢光顯微鏡

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. 申請科技部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）

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）

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並通報管理員，夜間時段請立刻發送電子郵件通知管理員。

### 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. 夜間時段不開放培訓。
2. 不開放未獨立完成日間時段操作達 10 次者使用。
3. 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。
4. 進出共軛焦顯微鏡室之非常規人員（見習、實習、偕同操作或陪同實驗）需填寫「出入登記表」。
5. 偕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：

感謝您使用本儀器的服務，若是本儀器對您發表著作或畢業論文確實有相當之助益，誠摯希望您考慮將我們列名為『誌謝者』（本中心計畫編號：MOST 110-2731-M-007-001），對於本儀器未來於科技部評選及經費補助申請審查，都會有很大的幫助。請將發表的著作之刊載的期刊、年份、卷數、頁數及著作題目 E-MAIL 給我們（寄給各實驗室儀器管理員），無限感激。

1. 請在研究著作的致謝中提及我們的儀器與服務，或是將我們列名為『誌謝者』。

範例：

We thank the technical support from Ms. Ya-Hsien Chou at the confocal imaging core in National Tsing Hua University (sponsored by MOST 110-2731-M-007-001).

2. 請將發表著作之刊載的期刊及著作題目 e-mail 給管理員周小姐。  
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。

