

光谱组

第一部分、实验室安全

1. 不可直视激光，以免损伤眼睛；
2. 使用液氮时，戴防护手套，穿长衣长裤；
3. 操作癌细胞必须戴一次性手套、口罩；
4. 使用外接电化学装置、磁场装置、光学装置等时，须告知工作人员；
5. 非工作时间预约实验，必须经过工作人员严格考核、授权门禁，方可进行实验；
6. 拷贝数据时，只可使用 ftp 传输数据或使用光盘，不可使用 U 盘，以防感染病毒。

第二部分、样品制备

1. 共聚焦显微镜及荧光显微镜

固体样品置于 0.13-0.17mm 厚盖玻片上，如用较厚载玻片，高倍镜下(40 倍以上，包括 40 倍)将无法聚焦样品，样品尽量平整、薄；细胞一般在 confocal 小皿中培养、观察；液体样品可直接滴在盖玻片上或夹在两个盖玻片中间。

2. 紫外可见分光光度计

溶液样品置于两通石英比色皿中；固体粉末样品涂抹在 BaSO₄ 白板中间约 1.5cm 直径圆型区域上，粉末粒度尽量要小，涂抹尽量均匀，否则散射很强，降低光通量；膜类样品视透光情况或直接置于膜样品架上进行透射分析，或通过样品配件用积分球进行漫反射分析。

3. 傅里叶红外光谱仪

如为固体粉末，可与 KBr 研磨，然后压片制样，粉末粒度要小于 2 微米。一般 KBr 与样品比例在 100-200 之间，视具体样品而定；液体样品可直接用 ATR 附件测量，或涂抹在 KBr（水类、醇类样品不可用 KBr）、CaF₂ 盐片上；表面平整的膜类样品视其对红外光的透过情况，直接用透射或 ATR 测量。

4. 显微共焦激光拉曼光谱仪

固体粉末样品可直接放在干净载玻片上，样品稍微分散一些；液体样品可直接滴在载玻片上，或置于合适样品皿中或用毛细管观察。

5. 稳态瞬态荧光光谱仪

稳态和寿命测试：液体样品置于四通石英比色皿中（ $\geq 2\text{ml}$ ）；固体粉末样品首先用一片有凹槽的石英片和另一片石英片夹住，然后用固体样品支架固定；膜类样品可直接在石英片上成膜测定。

量子产率测定：液体样品（ 3ml ）置于四通比色皿中，要求比色皿使用旋塞，比色皿平放时，不会漏液；固体样品须置于直径 11mm 的石英样品槽中，厚度一般不超过 3mm 。

6. 圆二色光谱仪

液体样品置于两通石英比色皿中；固体粉末样品与 KCl 研磨压片后，用 DRCD 附件通过透射或漫反射模式进行测量。

第三部分、上机操作

一、LabRAM HR EVOLUTION 显微共焦激光拉曼光谱仪操作规程

（一）单点拉曼采集

1. 在显微镜下放置样品，点击摄像头、video，打开白光，在 10X 物镜下粗调聚焦样品，然后换成高倍数的物镜微调聚焦（注意：使用 10X 以上镜头都要用微调聚焦）；



2. 点击右上角 stop all，关闭白光；
3. 在 acquisition 菜单的 acquisition parameters 中设置光谱采集范围、累积次数（一般为 2-3 次）、采集时间（一般为 1-60s）、样品名称等；在 Instrument setup 中设置物镜倍数、光栅刻线（一般使用 600 刻线）、激光功率，激光波长，hole 值（最大为 1000，一般为 100 即可）；激光功率、采集时间和样品名称这三个参数需根据实际实验经常调节；
4. 点击采集拉曼谱图（圆型图标）可进行采集；
5. 保存数据为两种格式，LS6 格式和 Txt 格式。

注意：1. 激光功率由小到大调节，功率调大后注意样品形貌是否发生变化，是否烧坏，还要注意谱图信号是否按比例增强。有时功率增大后，样品形貌未发生明显变化，但谱图比例发生变化或平白减少某些峰，表明样品已经与激光发生明显作用，谱图不可用，需要降低功率。

2. 采集时间延长同样可以增强拉曼信号，但谱图收集时间延长，采集时间延长对样品造成损坏要远小于增加激光功率引起的损坏。

（二）Mapping 实验

1. 单点随时间的变化

- a. 白光聚焦样品，点击 stop all，关闭白光；
- b. 在 acquisition---map 区域，选择 t from__to__size__step__，设置 from、to、step 值，size 值会自动算出；

Map					
	From	To	Size	Step	
t	0.00	100.00	11	10.0	<input type="checkbox"/>
Z	-5.00	5.00	101	0.1	<input type="checkbox"/>
Y	-20.25	20.25	41	1.0	<input type="checkbox"/>
X	-22.11	22.11	45	1.0	<input type="checkbox"/>
T	20.00	50.00	4	10.0	<input type="checkbox"/>

- c. 点击**开始 map 采集**，在 **maps** 中显示谱图。

2. 单点随 Z 轴的变化

- a. 白光聚焦样品，点击 stop all，关闭白光；

b. 微调确定样品的两个界面，注意：粗调 Z 轴焦距位置不变，微调 Z 轴焦距位置变化，可将中间界面 Z 焦距值设置为 0；

c. 在 acquisition---map 区域，选择 Z from ___ to ___ size ___ step __，设置 from、to、step 值，size 值会自动算出；

d. 点击**开始 map 采集**，在 **maps** 中显示谱图。

3. 区域采集拉曼谱图

a. 在 acquisition---map 区域，选择 X from_ to_ size__ step__，Y from_ _to___ size__ step__ ；

b. 白光聚焦样品，在左面竖直工具栏中，选择 map 形状，确定扫描区域，点击 **stop all**，关闭白光；

c. 设置 a 项中的 step 值，size 值会自动算出；

d. 点击**开始 map 采集**，在 **maps** 中显示谱图。

注：在 acquisition---map 下面，会显示采集的总点数 total data points 及 Estimated time.

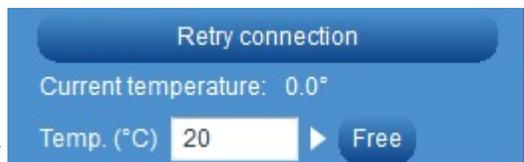
(三) 变温实验 (-196℃-600℃)

1. 依次打开主控制、泵和循环水槽，如只做加热实验，泵可以不打开，只做降温实验，循环水槽可不打开；

2. 点击 acquisition 下面的 Retry connection，确保软件与控温主控制连接；

3. 在 acquisition—linkam 中设置温度

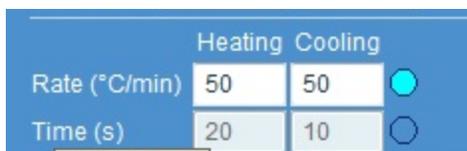
a. 单点温度设置



① 在 中设置，白色框内输入设定温度，回车即可，且选中 always hold temperature；



② 可设置加热或冷却速率，或加热或冷却需要的时间；



- ③ 待 current temperature 达到设定温度，即可采集谱图；
- ④ 如不需加热或降温，可点击 Free，温度会逐渐变成室温。

b. 程序变温（升温或降温速率不变）

- ① 在 acquisition---map 区域，选择 T from__to__size__step__，设置 from、to 和 step 值，size 值会自动算出，同样选中 always hold temperature；
- ② 设置 stabilization time（此时间为温度到达设定温度的稳定时间）；
- ③ 同上设置加热或冷却速率，或加热或冷却需要的时间；
- ④ 点击**开始 map 采集**，在 **maps** 中显示谱图

c. 程序变温（升温或降温速率变化）

- ① 在 acquisition---temperature ramps 区域设置 from_to_Rate_step_hold_，如下图



Rate 可设置变温速率，step 为变温梯度，hold 为温度稳定后的停留时间；

- ② 同选择 always hold temperature
- ③ 点击**开始 map 采集**，在 **maps** 中显示谱图。

注：变温实验结束后，依次关闭泵和主控制，待温度降到室温时，再关循环水槽。

二、FLS980 稳态瞬态荧光光谱仪操作规程

（一）稳态光谱测定

- 1. 样品仓内放样品，掀开样品仓盖；
- 2. 将 $\Delta\lambda$ 调到 0.1 以下之后再样品仓盖上；

3. Source Light Path 选择 Xenon Xe1, 检测器 Visible PMT (或 NIR detector)
4. singal rate 设 Ex、Em 波长, 调节激发、发射 $\Delta\lambda$, 对未知样品发射光子数不可超过一万, Em 波长可以 50nm 的步进移动, 大概锁定最大发射峰位置;
5. λ 下拉菜单选择 Ex、Em 或者 3D;
6. 设置激发光谱或发射光谱范围进行预扫,;

参数的一般设置(荧光较弱情况请联系管理员进行参数更改):

Step 1nm; Dwell time 0.2s; Number of scans 2

确定最大发射峰后可继续调 $\Delta\lambda$ 到合适的光子数再进行扫描, 一般光子数不超过 20 万;

发射范围在 850nm 以内加 Em 校正文件, 超过 850nm 不加 Em 校正文件;

Subtract background 不勾

7. 保存:

File → save as(fs 格式)

File → Export to AscII(Txt 格式) ;

8. 3D scan { 2D
View as 3D plot
View as countor plot ✓

右键 → Extract 单独提取图;

注意: 做发射光谱时, 最小发射波长要大于激发波长至少 20nm;

做激发光谱时, 最大激发波长要小于发射波长至少 20nm。

(二) 荧光寿命测定

1. 注意样品仓内折反镜的位置, 需让出激发光通道;
2. 样品仓内放样品, 掀开样品仓盖;
3. 将 $\Delta\lambda$ 调到 0.1 以下之后再将样品仓盖上;
4. Source Light Path 选择 TCSPC Diode,
Em1 Detector Light Pat 选择 Visible PMT;
5. 输入激光器波长 Ex 和最佳发射波长 Em;

6. 激光器表盘设置(红色转盘): pulse period ≈ 10 倍荧光寿命;
脉冲间隔不能太大, 尽可能小一些, 脉冲间隔小, 能量强; 如果曲线一直单调下降, 再增大脉冲间隔

7. 将激光器衰减片开到最大;

慢慢调大 Em 侧 $\Delta\lambda$, 使得 Em cps 小于 TCSPC Laser Hz 的 2% -3%, 而且发射光子数不要超过 10 万。

8. 测试;

τ \rightarrow Manual

IRF 不勾

time range \leq 激光器表盘 pulse period

Channel 1024/2048

Stop condition peak counts 3000-10000 (一般小于样品发射光子数)

at chan(0) 不勾点击 new 进行测量

9. 尾部拟合;

Zoom in 选择峰尖到衰减曲线平坦

10. 拟合结果分析: Analysis \rightarrow Exp Tail Fit;

给出初始的 τ 值 (一般与横坐标的 1/10 一个数量级), 点击 enter 进行拟合, 拟合系数 $x^2 < 1.3$, 越接近 1 越好(拟合成功几要素: 拟合系数 $x^2 < 1.3$, 拟合曲线与衰减曲线重合, 残差曲线在 0 附近波动、波动范围 ± 5 , 标准偏差小于寿命)。

11. 数据保存;

a. 原始文件和 fit result 最后一张图: file \rightarrow save as(EI time measurement 格式),
file \rightarrow Export to AscII 转换成 txt 格式

b. 拟合结果: copy as txt 粘贴到新建的 txt 文档里保存

12. 如果荧光寿命低于 5 ns, 需做 IRF;

a. 液体样品用硅胶水溶液测 IRF, 固体样品用原有样品测 IRF;

- 1) 测 IRF 时, 记录样品的发射光子数 (cps),
- 2) 衰减片先调到最小,
- 3) Ex 和 Em 均设为激发波长 (Em 为激光器实际波长)

(Em 处如加滤光片, 先取出滤光片)

4) 调节衰减片大小使 Em1 等于原样品的发射光子数

(光子数太大有时还需加中性衰减片)

b. τ 测试;

1) 打开 Manual 界面

2) 勾 IRF \longrightarrow 点 Add \longrightarrow 点 new 进行测试

3) Zoom in 选择拟合范围, 包含两组曲线的峰型直到衰减曲线平坦为止

4) 拟合结果分析: Analysis \longrightarrow Exp. Reconvolution Fit 给出假定的 τ 值,

点击 enter 进行拟合

拟合系数 $x^2 < 1.3$, 越接近 1 越好;

5) 测完 IRF 后, 激光器衰减片关到最小;

13. 数据保存: 同 11。

平均寿命计算公式:

$$(B_1 \tau_1^2 + B_2 \tau_2^2 + \dots) / (B_1 \tau_1 + B_2 \tau_2 + \dots)$$

(三) 磷光寿命测定

1. 注意样品仓内折反镜的位置, 需让出激发光通道;

2. 样品仓内放样品, 掀开样品仓盖;

3. 将 $\Delta\lambda$ 调到 0.1 以下再将样品仓盖上;

4. Source Light Path 选择 Microsecond Lamp $\mu F2$, Em1 Detector Light Path 选择 Visible PMT;

5. set up 可设 μs 灯频率 (0.1-100HZ);

6. 设置 Ex 和 Em 波长 (两个 $\Delta\lambda$ 都可以设置), 调节 $\Delta\lambda$ 使得 Em cps < 3000;

7. τ 测试;

$\tau \longrightarrow$ Manual

IRF 不勾

time range \approx 10 倍磷光寿命

Channel 2000

Stop condition peak counts 3000-10000

at chan(0) 不勾，点击 new 进行测量

8.尾部拟合；

Zoom in 选择峰尖到衰减曲线平坦为止

9.拟合结果分析：Analysis → Exp Tail Fit；

给出初始 τ 值（一般与横坐标的 1/10 一个数量级），点击 enter 进行拟合，拟合系数 $x^2 < 1.3$ ，越接近 1 越好

(拟合成功几要素：拟合系数 $x^2 < 1.3$ ，拟合曲线与衰减曲线重合，残差曲线在 0 附近波动、波动范围 ± 5 ，标准偏差小于寿命)

10.数据保存；

a.原始文件和 fit result 最后一张图：file → save as(EI time measurement 格式)，file → Export to AscII 转换成 txt 格式

b.拟合结果保存：copy as txt 粘贴到新建的 txt 文档里保存。

11.如果磷光寿命小于 $10\mu\text{s}$,需做 IRF；

a.液体样品用硅胶水溶液测 IRF，固体样品使用原有样品测 IRF

测 IRF 时，衰减片先调到最小

Ex 和 Em 均设为激发波长

(Em 处如加滤光片，先取出滤光片)

调节衰减片大小使 Em1 等于原样品的发射光子数

(光子数太大有时需要加中性衰减片)

b. τ 测试；

1) 打开 Manual 界面

2) 勾 IRF → 点 Add → 点击 new 进行测试

3) Zoom in 选中拟合范围，包含两组曲线的峰型直到衰减曲线平坦为止

拟合结果分析：Analysis → Exp. Reconvolution Fit 给出初始的 τ 值，

点击 enter 进行拟合

4) 拟合系数 $x^2 < 1.3$ ，越接近 1 越好；

5) 测完 IRF 后，激光器衰减片关到最小

12. 数据保存：同 10。

(四) 量子产率测定

1. Source Light Path 选择 Xenon Xe1, Em1 Detector Light Path 选择 visible PMT sphere;
2. 将 $\Delta\lambda$ 调到 0.1 以下再将样品仓盖盖上;
3. signal rate \longrightarrow Ex 和 Em 都设成 Ex 波长;
4. 放入背景 (溶液用溶剂, 固体用石英样品皿), 调节 Ex 和 Em 的 $\Delta\lambda$ 使得 **Em1 为 90 多万(不可超过 100 万), Ex $\Delta\lambda$ 为 Em $\Delta\lambda$ 的 10 倍左右;**

5. $\lambda \longrightarrow$ Emission

参数的一般设置(荧光较弱情况请联系管理员进行参数更改):

Emission range 从 Ex 波长减去 20nm 到发射截止

Step 1nm; Dwell time 0.2s; Number of scans 3;

6. 保存背景谱图:

File \longrightarrow save as(fs 格式)

File \longrightarrow Export to AscII(Txt 格式) ;

7. 在石英样品槽中放入样品, 在相同参数下再对样品进行测试, 保存, 然后点击 Join Visible 将两张图叠加;

8. Analysis \longrightarrow QY

Sample Emission 样品

Sample Scatter 样品

Ref Scatter 背景

Ref Emission 背景

\longrightarrow Next \longrightarrow select Scatter Range 选择激发光范围

\longrightarrow Next \longrightarrow select Emission Range 选择荧光发射范围

\longrightarrow Next 请记录 QY 的数值。

注意事项:

- a. 溶液用纯溶剂做空白;
- b. 溶液样品要用旋口塞密封, 确保平放后不漏液;
- c. 固体样品空白用石英样品槽;

d. 液体样品朝左，固体样品朝右（用不同的支架）。

（五）时间分辨光谱测定（TRES）（光源为脉冲光源，检测器为 Visible PMT）

1. 在做 TRES 之前，先在特定 Ex 波长和 Em 波长下做荧光寿命或磷光寿命曲线，确定参数：如激光脉冲周期、Ex 波长、Em 波长、 $\Delta\lambda$ 、channel 数等，使用相同参数进行时间分辨测定；

2. τ 下拉菜单

选择 TRES \rightarrow emission 或 excitation；

3. 设置 Time set up 和 sample set up

Time set up 设定 Time range channel (1024 或 2048)

Stop condition times 选择时间停止（如 20s 一张图）

设定 Ex 波长、Em 波长范围、step, 比如 Ex 380nm, Em 500-800nm, step 10nm；

4. 点击 start 开始测定，数据即为不同发射波长下的寿命曲线；

5. Analysis \rightarrow TRES Data slicing

设置 start time、stop time 及 slices 数，可将 TRES 曲线分成不同时间段的发射光谱曲线（横坐标发射波长范围，纵坐标光子数）；

6. 通过 View as 3D plot, View as countor plot 可对数据进一步分析；

◇ TRES 曲线通过不同时刻各个发射波长下的光子数可用于分辨稳态光谱中，哪个发射峰属于荧光峰，哪个峰属于磷光峰

◇ TRES 曲线也可分离出不同时间段的稳态光谱，如希望得到的稳态光谱是光源激发后 5 μ s 后的光谱。

（六）kinetics 测定（光源为 Xe 灯，检测器 visible PMT）

1. signal rate 设 Ex、Em, 调 $\Delta\lambda$

使得 **Ref < 400,000, Em1 < 20,000**

2. τ 下拉菜单

选择 Kinetics 测试

3. sample set up 设定 Ex 和 Em 波长；

设定 scan time 如 300s+180s Time resolution 如 5s

选择 shutter Timed \odot

如：open shutter after 0s for 180s (设定具体时间)

Xe 灯照射 **180s**, shutter 关闭 **Xe** 灯, 收集样品发射的光子数随时间的变化, 时间范围为 **300s**

4. 点击 start, 开始测量;

5. 数据分析;

Data → crop range, 可剪切一段时间范围 (如 185s-300s)

Analysis → Exp Tail Fit

◇ 动力学的测定实际上就是在 **Ex** 和 **Em** 固定的情况下, **Xe** 灯照射样品一段时间后, 分析光子数在长时间范围内随时间的变化, 可分析长寿命样品或余晖样品。

(七) 变温实验操作规程

1. 提前一天对外部真空腔抽真空, 时间超 8h;

2. 加液氮 3~5L;

3. 将变温装置放入仪器内, 将 sensor 插头连接;

4. 打开变温白色控制盒, 先开后面开关, 再开前面开关, 然后再开 **F980** 软件;

5. Option → sample holder configuration → Cryostat (on)
stabilization 为 3~10s

在 set up 中的 temperature set up 设置温度, 先设为 298K (对溶液)

6. 待温度升到室温后, 放样品, 溶液、固体或薄膜样品;

7. 样品腔抽真空 (约 10 分钟, 需开阀、关阀);

8. 通过针阀调液氮流量 (关闭后转一两圈);

9. 设置目标温度, 如做液体样品, 每隔 30K 进行降温, 以防冻裂比色皿;

10. 设置激发、发射波长和狭缝大小, 左右调整低温恒温器的位置, 使得荧光发射信号最大;

11. 实验结束, 先升到室温, 保持 10min, 再取样品。

变温装置关机①先关 **F980** 软件

②关变温控制前面开关, 再关后面开关

③拔出 Sensor 插头

④取出变温装置

（八）近红外检测操作规程

1. 提前 2~3h 抽完液氮后打开近红外 HV-1，先开 power，再开 H.V. on；
2. 常规 PMT 暗噪声 100~200
近红外暗噪声约 25000~40000 个
3. 常规磷光寿命测试时，光子数小于 3000，
近红外磷光寿命测试时，激发发射带宽 $\Delta\lambda$ 开到最小，记录暗噪声数 a，然后开大 $\Delta\lambda$ ，光子数为 a+3000 即可；
4. 实验结束，关 HV-1
先关 H.V. on \longrightarrow off，然后关 power
从液氮罐拔管，半小时后再关泵

（九）校正文件使用方法

1. 校正文件所在位置：
C:/program data/Edinburgh instruments/F980/correction
校正文件在带宽为 1nm 左右时完成
Signal rate 选择检测器时，校正文件已选
2. 校正文件的选择：
Option/correction files
有四个校正文件，常规测试校正、近红外测试校正、常规积分球测试校正 (spectrum nano)，近红外积分球测试校正
3. 在进行发射光谱测试时，可以加 Em 校正，也可以不加，如不加 Em 校正，可通过软件对发射光谱进行校正；
Analysis \longrightarrow correction，选中 correct with Emcorrection file

（十）近红外激光器使用方法

1. 980nm、808nm 激光功率较高，约 2W，发射光子数几千几万即可，否则激光功率高易烧坏样品；
2. 黑色为控制盒，可调激光功率，先开开关、再开钥匙；
白色为脉宽控制盒，无开关，PH1 开 \longrightarrow power 亮，白色控制盒可选择连续和脉冲激光，可调脉宽，脉宽越宽，能量越强；

3. 样品仓盖打开时，白色控制盒灯灭，黑色控制盒激光功率为 0.00。但如果想看激光是否打到样品上，可将白色控制盒的 interlock override 按下，laser 红灯亮；

(寿命测试 $>10\mu\text{s}$ ，频率范围 0.1~1000HZ，频率可在 setup 的 μF lamp setup 里面设置)

4. 固体支架放置与原来不一样，呈对称关系，用黑纸或挡板将 Xe 灯激发透镜挡住；
5. 近红外激光器和微秒闪光灯不可同时用。

关 980、808 激光器（黑色控制盒）

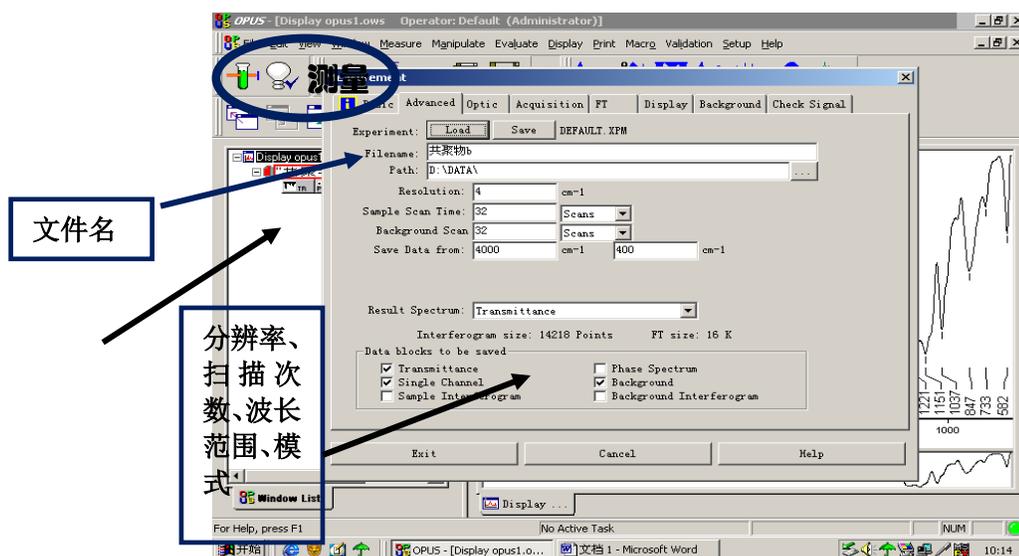
①先将功率调到 0

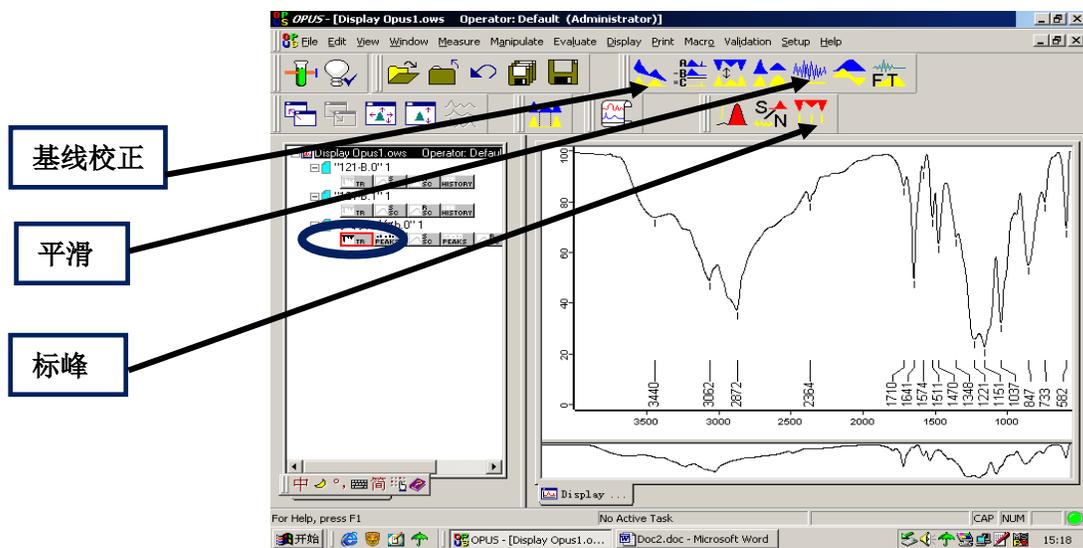
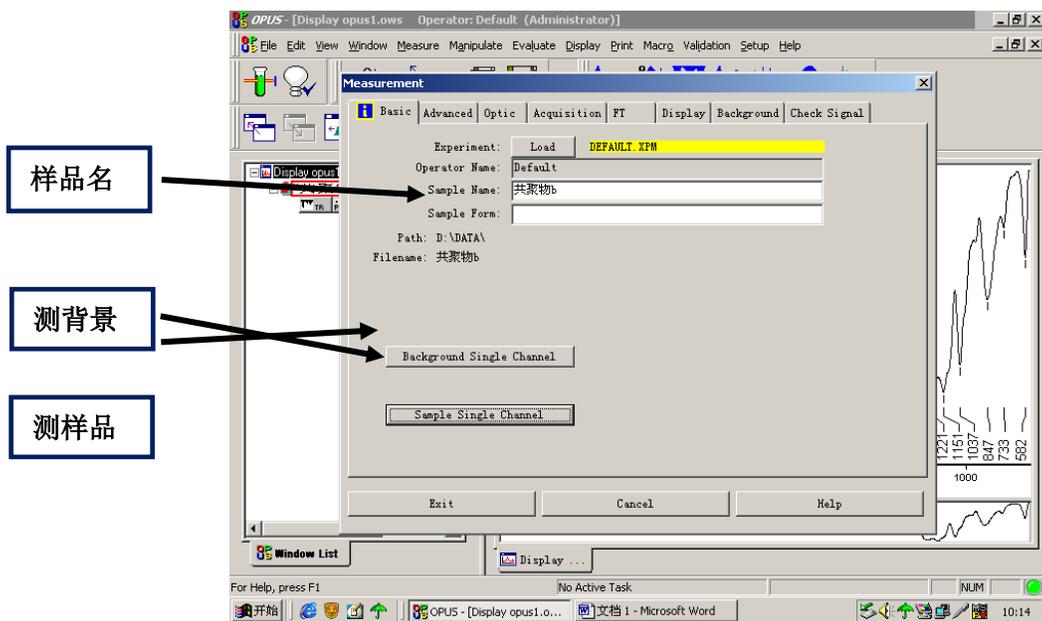
②关钥匙 on \longrightarrow off

③关开关

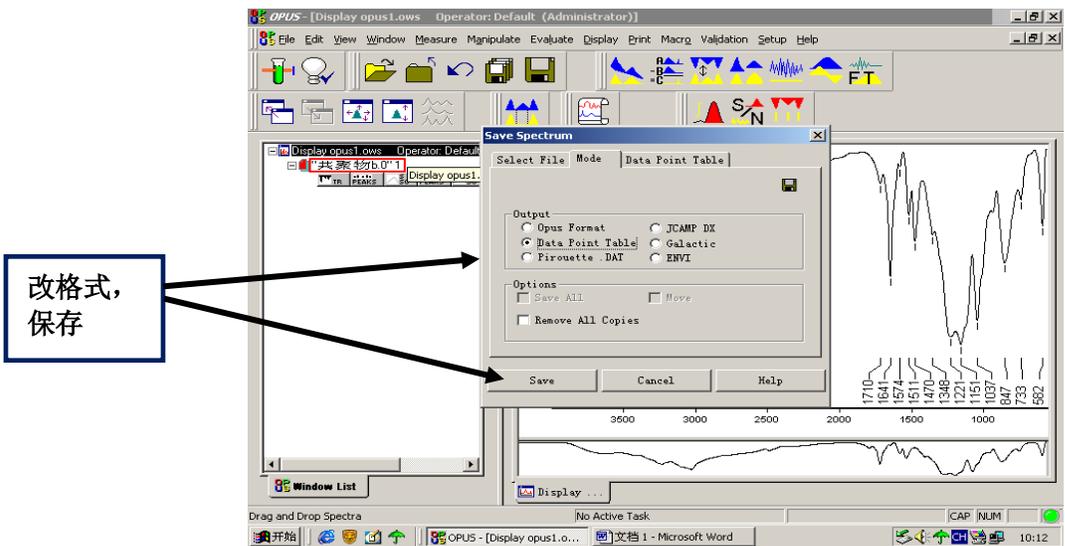
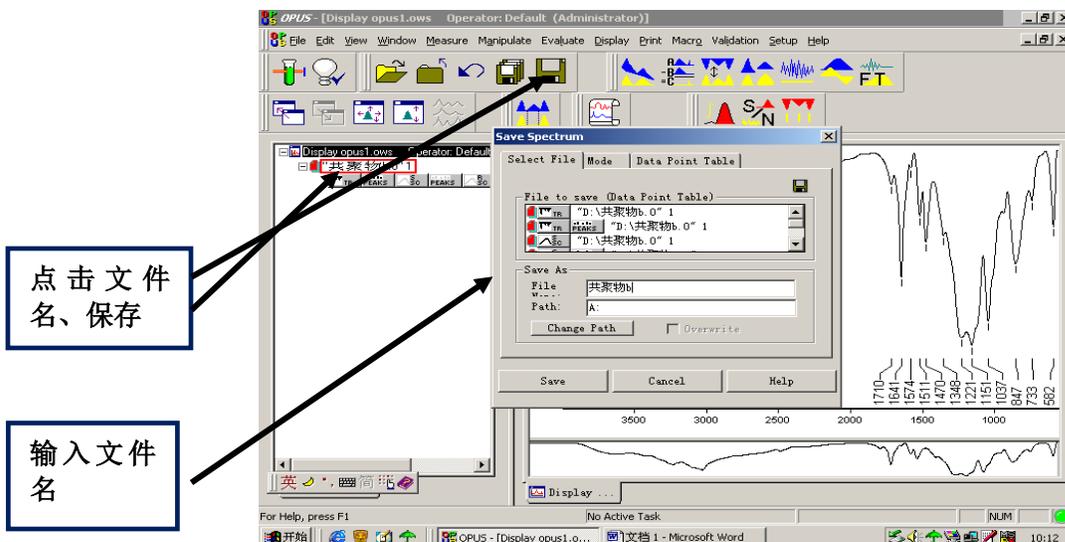
三、 TENSOR-27 傅立叶红外光谱仪操作规程

1. 测试及谱图处理：



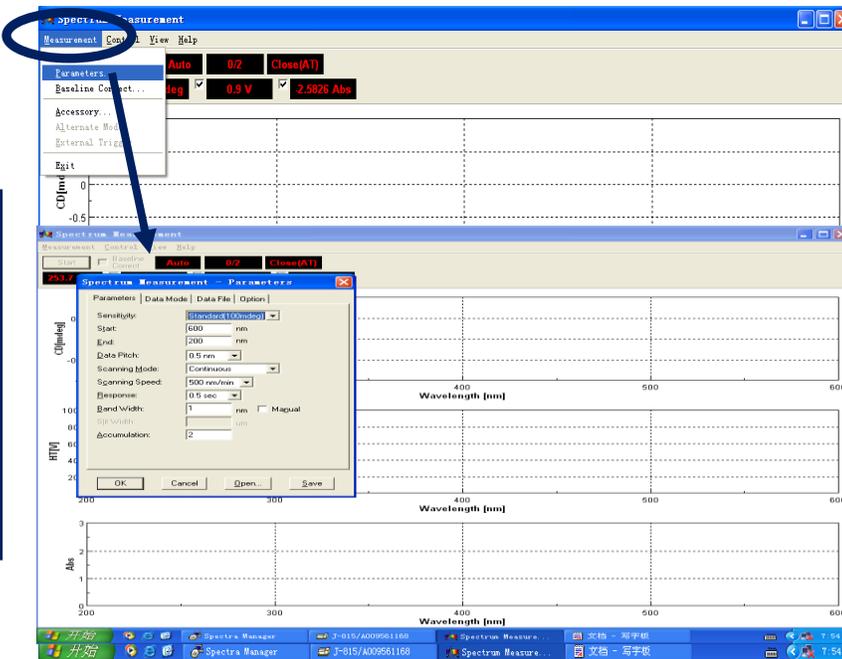
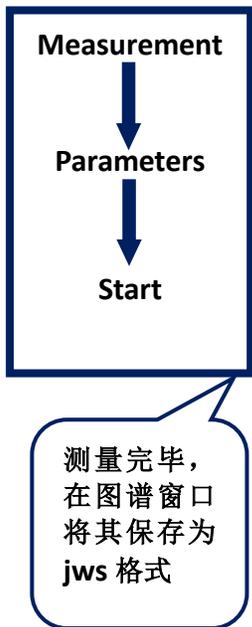


2 数据转换

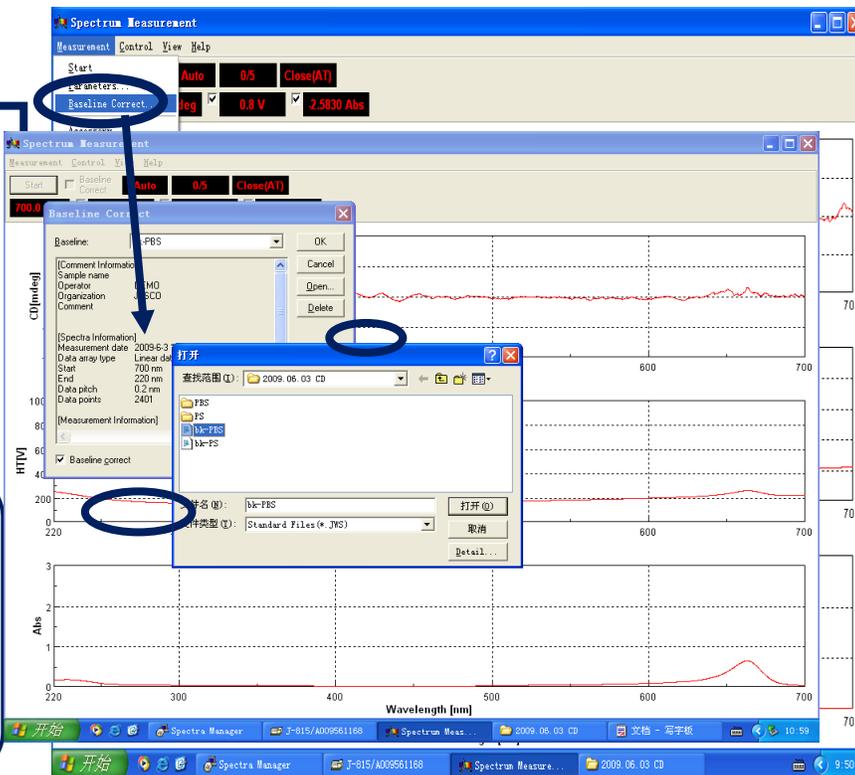
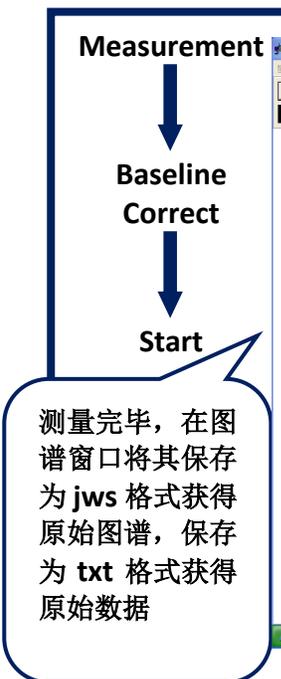


四、J-815 圆二色光谱仪操作规程

1.测基线



2.测样品

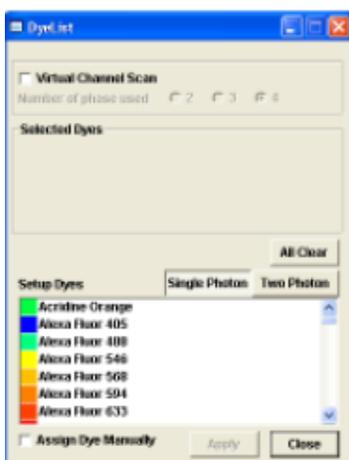


五、激光扫描共聚焦显微镜操作规程

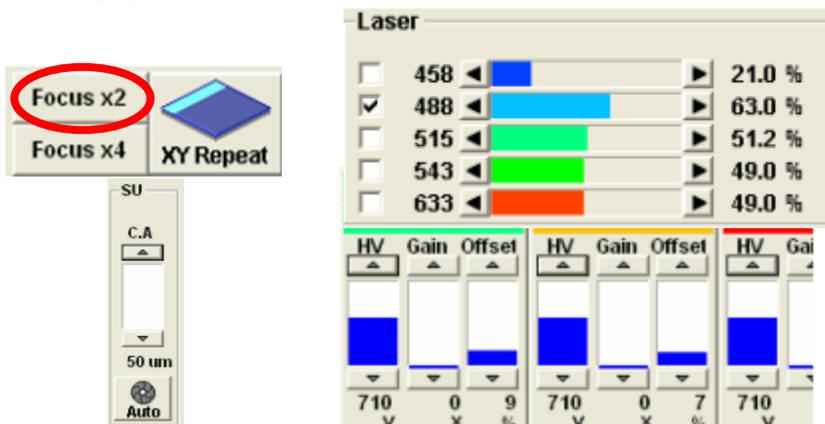
(一) 普通 XY 成像

1. 选择合适的物镜，共配置 6 个物镜，4×、10×、20×、40×为干镜，可随意切换，60×和 100×为油镜，滴油后不能切换其他镜头；
2. 调焦找样品，调焦旋钮下方绿色按钮切换粗调 (coarse) 和微调 (fine)，样品焦面位置：盖玻片 200-500 μm，confocal 皿 600-1000 μm；

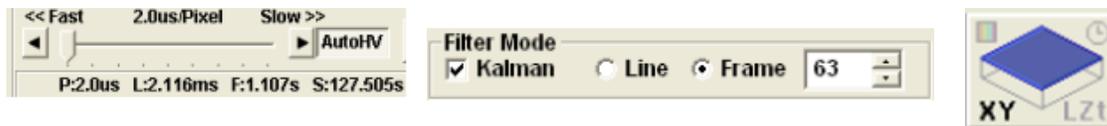
3. 选择染料，点击  弹出荧光染料选择窗口，双击选择所需激发波长→Apply;



4. 勾选 TD1 透射光通道观察样品形貌；
5. 确认光路，点击  按钮，根据样品的发射波长设置合适的波长范围；
6. 使用两个以上激光时要勾选序列选项 Sequential，避免激光串色；
7. 点“Focus×2”按钮对样品进行预扫，调节激光器输出功率、PMT 检测器参数和针孔大小得到合适的荧光强度，按“Ctrl+H”可切换至 Hi-Low 模式，出现红色则表示荧光超标；



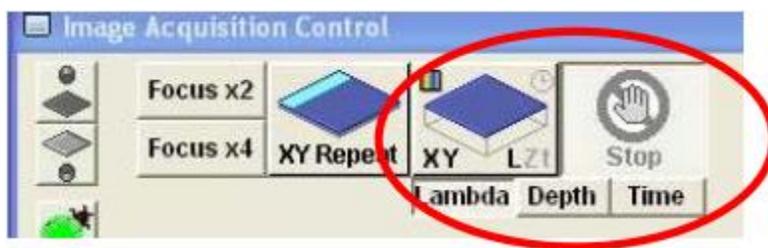
- 点“RepeatStop”按钮停止预扫，设置停留时间（一般 4 或 8 $\mu\text{s}/\text{Pixel}$ ）和 Kalman 重复扫描次数（一般 2-3 次），以得到较好的成像质量，点“XY”进行成像；



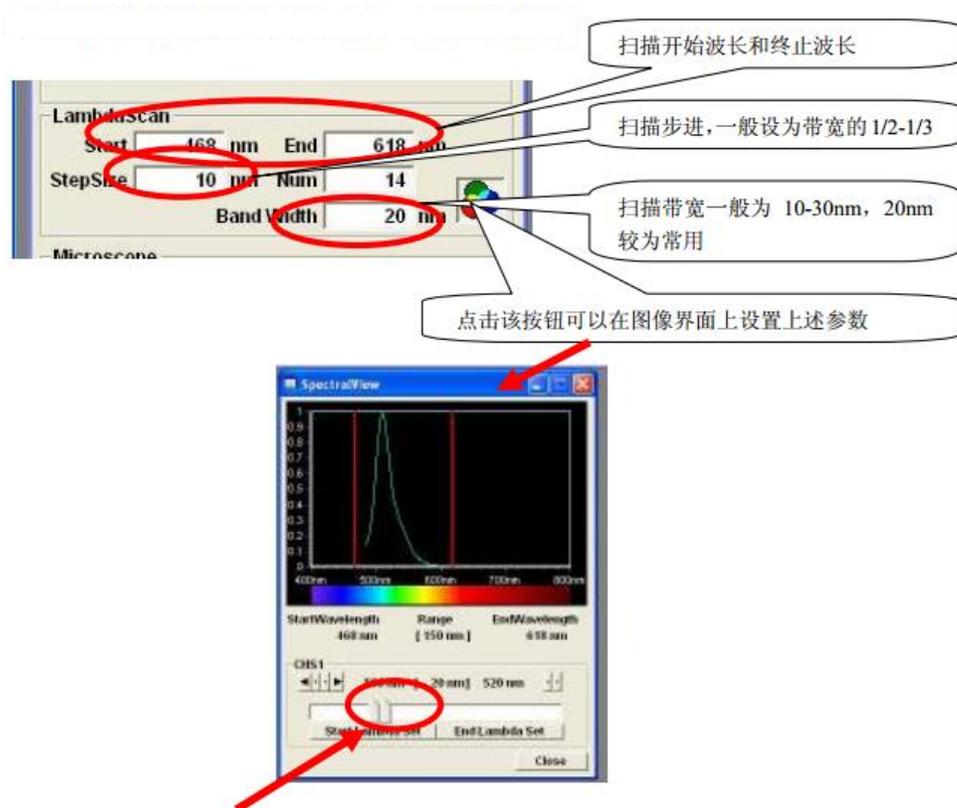
- 图像保存，直接关闭“2D View”窗口，“Save & Close”保存，文件格式 “.oib”。

（二）光谱扫描

- 首先进行普通扫描，选取合适的视野；
- 选择 “Lambda” 波长扫描；



- 在波长扫描界面中设置合适的波长范围、带宽和步进；



4. 边预扫边用鼠标来回拖动检察各波长段的荧光强度，使最大发射处荧光强度不超标；



5. 点击  进行波长扫描；



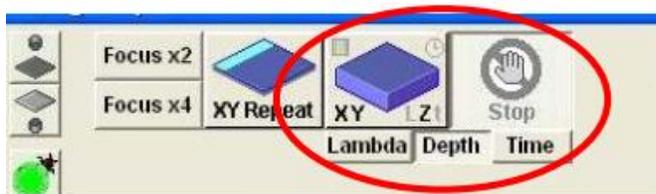
6. 得到图像后，点击  按钮选择目标区域，点“series analysis”得到光谱谱线。



(三) 三维成像

1. 首先进行普通扫描，选取合适的视野；

2. 选择“Depth”深度扫描；



3. 在 Z 扫描界面中设置合适的上、下表面和扫描间隔；



4. 点击  按钮就行深度扫描；

5. 获得图像后，点击图像显示模式按钮可以在下面选项中选择三维显示模式查看各层切面情况；



6. 也可以点击三维重建按钮来展示三维重建效果。



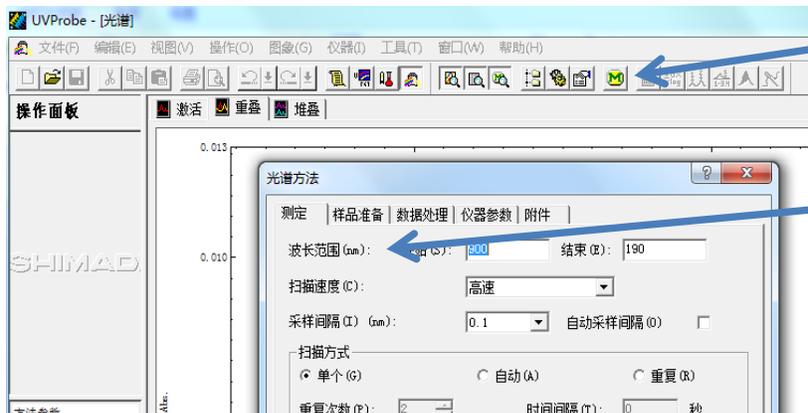
六、IX83 倒置荧光显微镜操作规程

- 1.选择合适的物镜，共配置 6 个物镜，2.5×、10×、20×、40×为干镜，可随意切换，60×、100×为油镜，滴油后不能切换其他镜头，选择镜头后点击软件上相应镜头图标，匹配标尺。
- 2.切换触摸屏右上角相机和眼睛模式，使样品可以在显示器显示或在目镜中观察。
- 3.点击“实时观察”，打开 CCD 检测器；
- 4.透明样品点击“DIC”，在白光下调焦；对于不透明的样品，点击“FL1”，用汞灯做光源，再调焦找样品。大旋钮为粗调，小旋钮为微调；先粗调使 Z 值在 5000 左右，再微调使样品清晰。调焦过程中要注意 Z 值不能超过 6000。
- 5.调节曝光时间，使图像亮度合适；
6. 点击“白平衡”图标，再点击图像空白区域，对图像颜色进行校正，荧光通道下的图像要点击“黑平衡”校正图像颜色；
7. 点击“拍照”按钮，得到样品形貌图像；
8. 点击触摸屏“FL1”，切换到汞灯观察荧光图像，选择合适的滤光片，调节曝光时间使亮度合适，点击拍照；
9. 点“文件”→“全部关闭”→“保存”，选择路径保存。
10. 选中“实时观察”下的录像框，可以录制视频，保存 avi 格式。

注意事项

- 1 物镜位置不要高于 6000 μm ，防止镜头碰到样品，损伤镜头。
- 2 切换荧光时先点击“FL1”，再选择滤光片。
- 3 换样品时手不要碰到聚光镜。

七、UV2600 紫外可见分光光度计操作规程



1、点击大写 M 设置方法；

2、设置波长范围，普通测试最大范围 190nm-900nm，积分球测试最大范围 220nm-

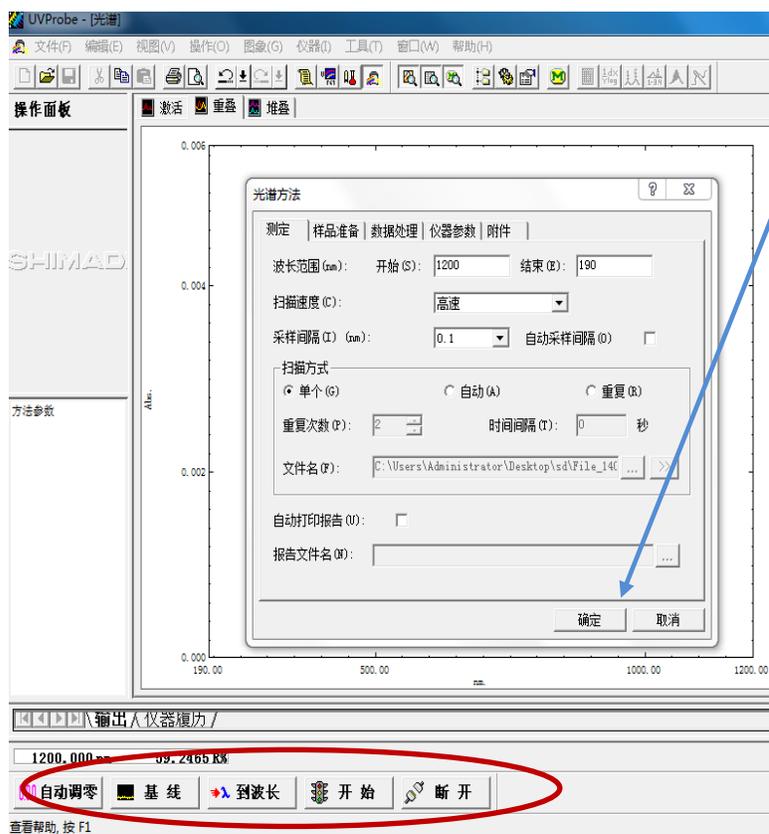
3、点击仪器参



普通测试参数设置



积分球测试参数设置

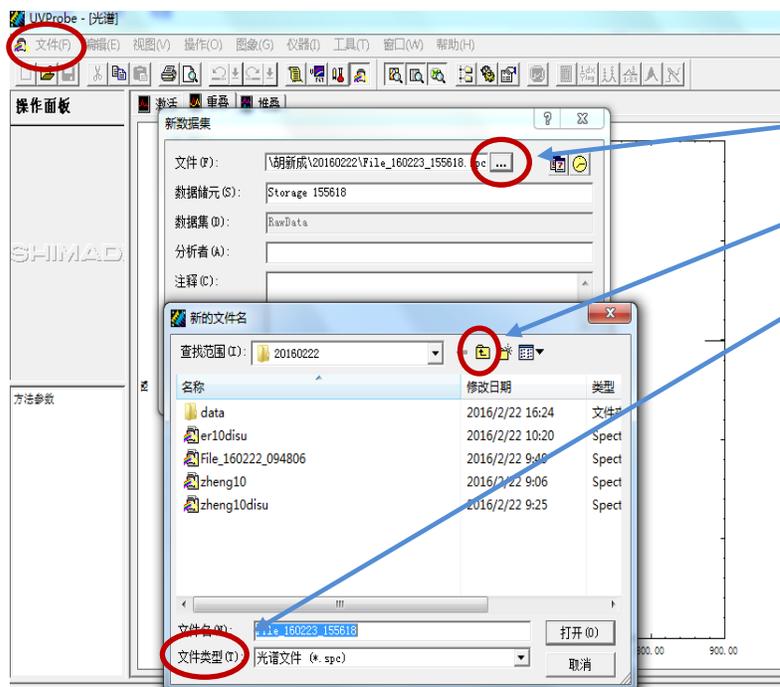


4、参数设置完毕，点击确定等待仪器反应完毕后方可打开样品仓盖

5、将两个比色皿装入背景溶液后放入仪器内，点击基线，积分球测试放置两个 BaSO₄ 白板；

6、点击到波长 500nm 点击自动调

8、打开样品仓盖将外通道背景换成待测样品，点击开始；



9、文件保存：
测试完毕，仪器会自动跳出新数据集对话框，点击**三点按钮**，选择自己的文件夹并输入文件名，
10、文件格式转换：点击**文件**，将文件类型改为数据打

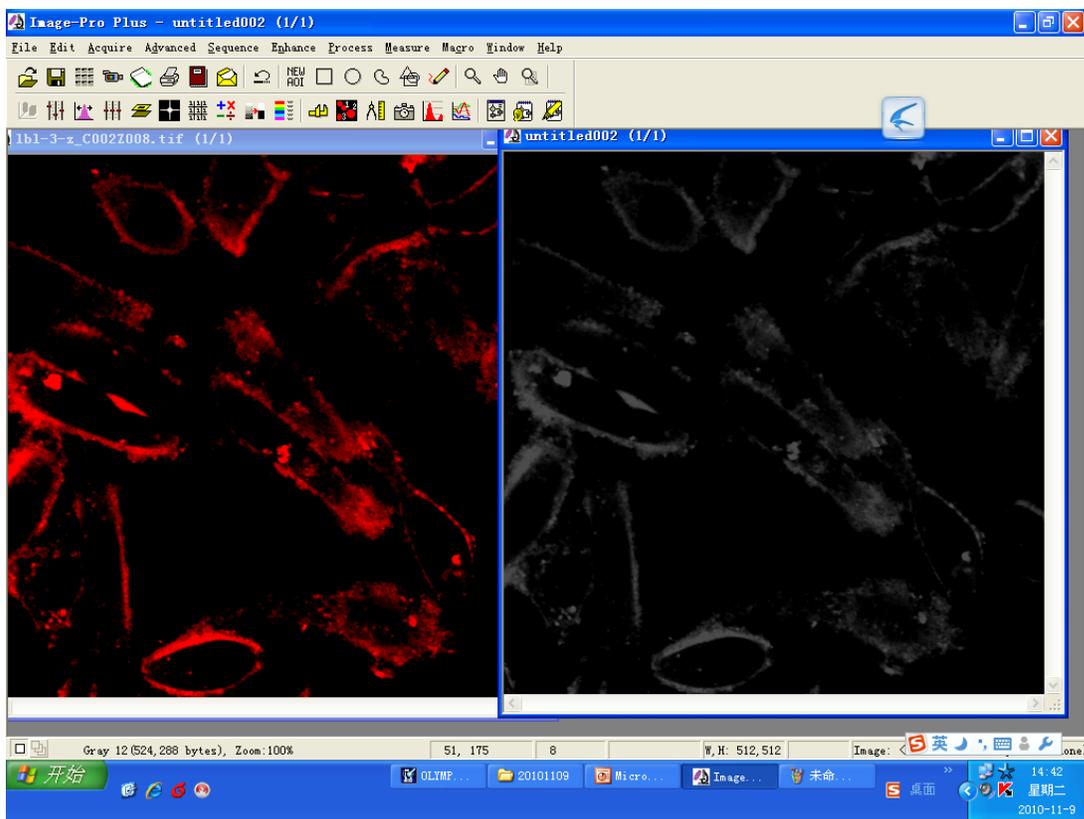
第四部分、数据处理

一、Image pro plus (IPP) 图像处理软件的应用

(一) 分析整幅图片或感兴趣区域 (ROI) 的荧光强度

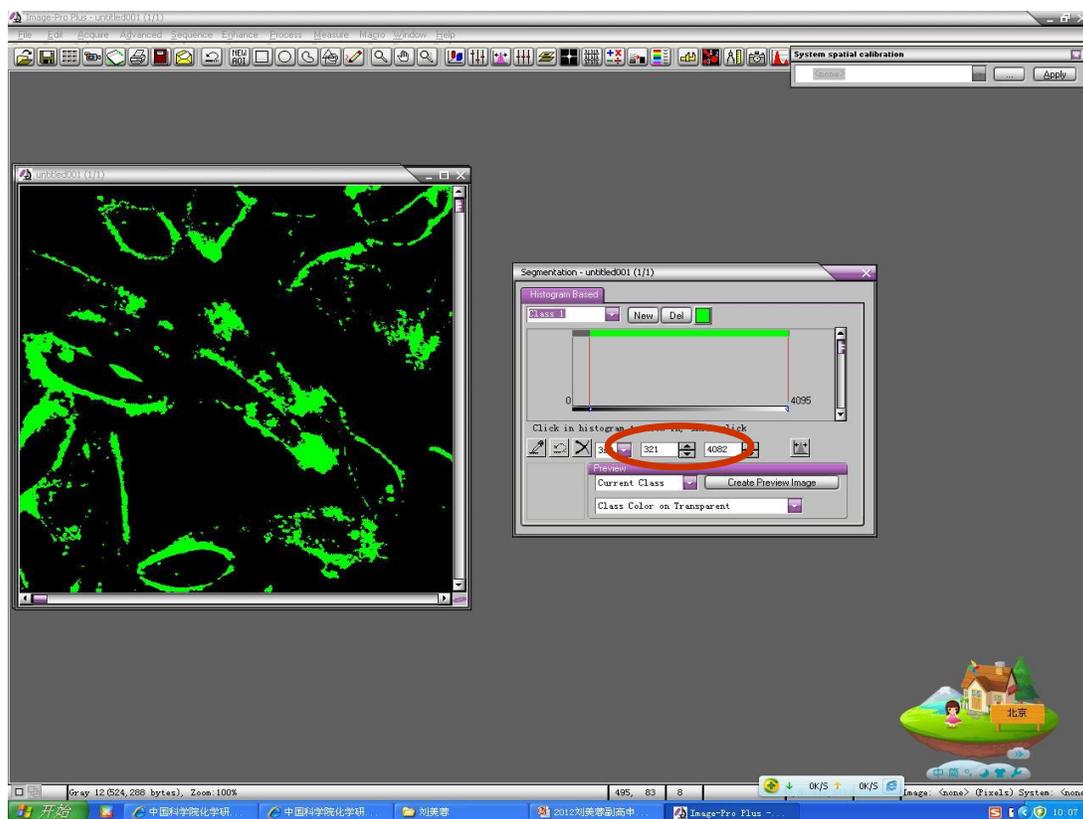
共聚焦自带的软件可以进行荧光强度的测量，可测量一个点，一条线，或一个区域的强度。但比较两幅图的平均荧光强度，手动操作起来就非常不方便。IPP 软件通过荧光强度阈值范围的选择，可自动测量一幅图的平均荧光强度。

先将一幅图 (TIFF 格式) 转化为灰度格式。因为共聚焦图像颜色是 12 位的，也就是最大强度值为 4095 ($2^{12}-1$)，因此将原图转化成 12 位的灰度格式。然后通过选择荧光强度的阈值范围，定义我们要进行荧光强度计算的对象的范围；然后选择测量对象为 area 和 IOD。通过选择合适的面积范围，可缩小要计算的对象范围，可把一些小的杂质，或太大的不是我们想要的东西除掉。然后通过统计就可以得到 SUM(area) 和 SUM(IOD)，SUM(IOD) 除以 SUM(area) 就可得我们定义对象的平均荧光强度。

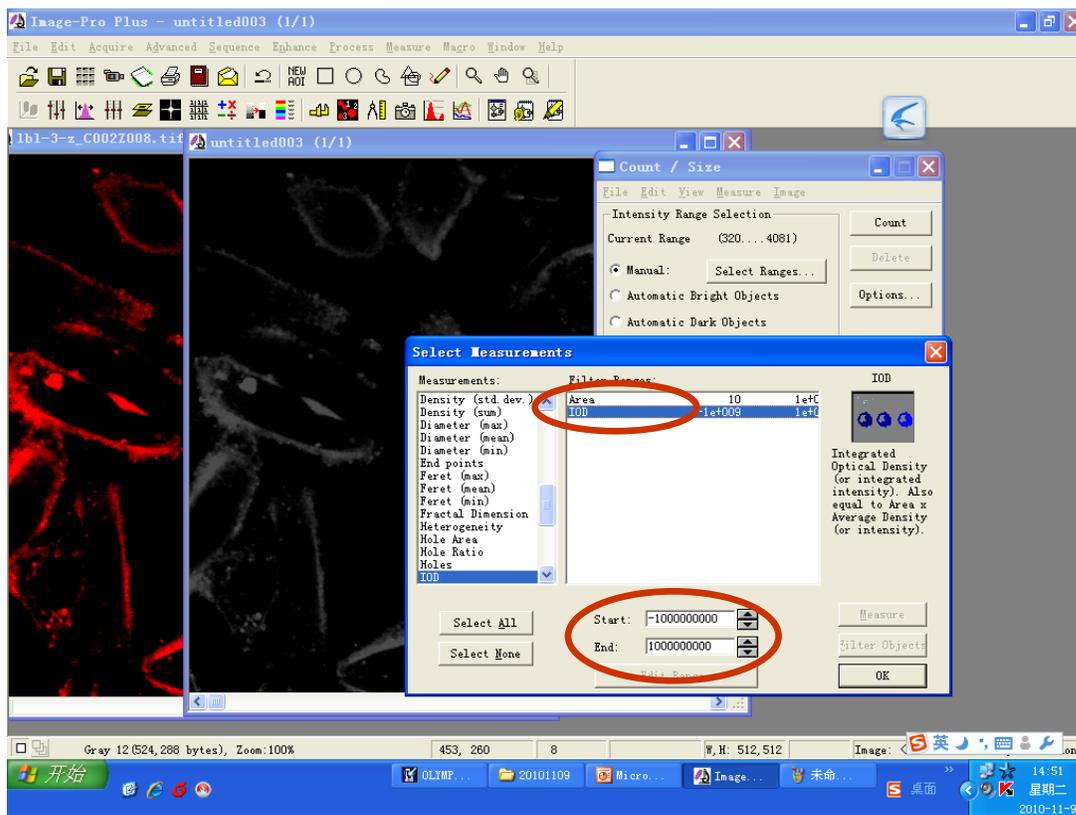


1.

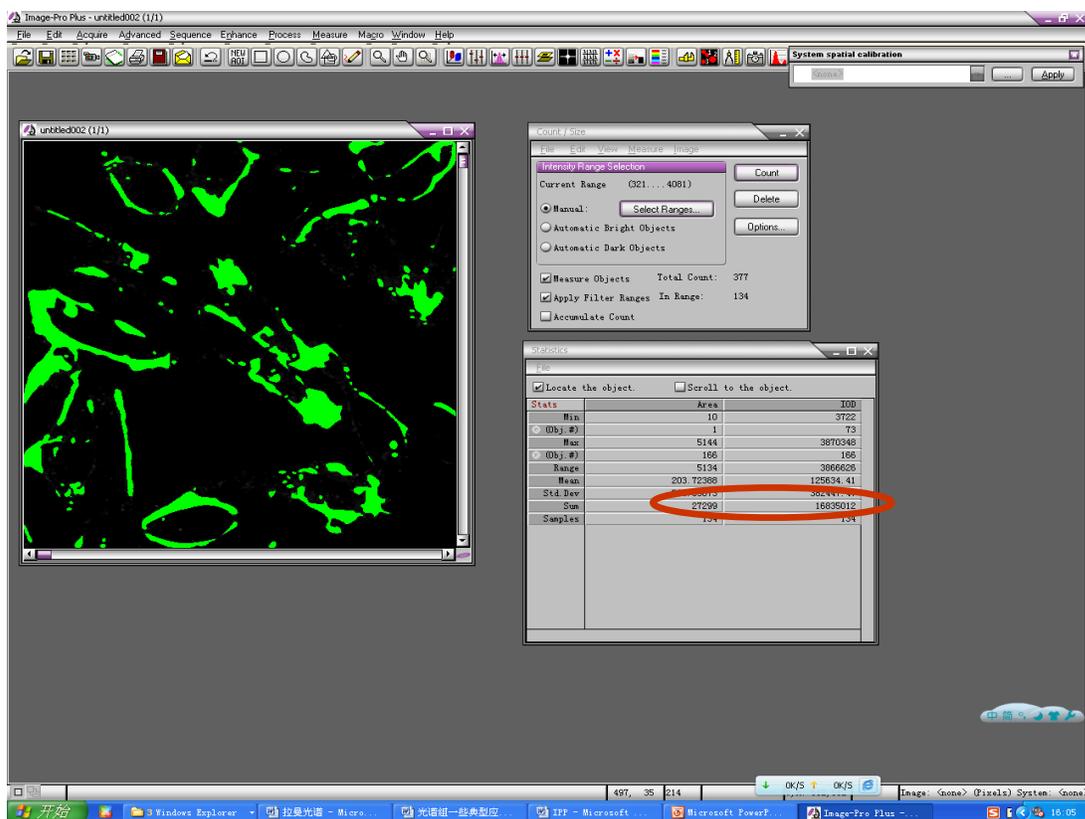
将原图转化为 12 位的灰度图



2. 选择合适的荧光强度阈值定义要计算荧光强度的对象



3. 选择测量对象为 area 和 IOD，可选择 area 的范围，进一步定义操作对象的范围

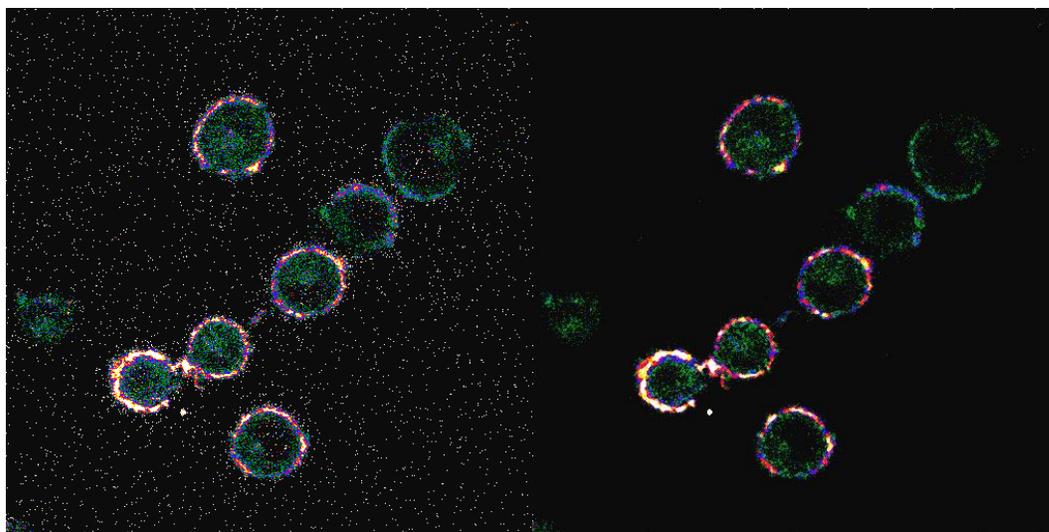


4. 统计得到 SUM(area)和 SUM(IOD)，计算平均荧光强度 $SUM(IOD)/SUM(area)$

(二) 图像的处理

IPP 软件中有很多滤镜可以处理图像，process — filters — (enhancement, edge, morphological, kernels, special) 每一种滤镜有其具体的作用。

下面图中，左图为处理前的 ratio 图片，背景部分白色斑点很多。用 enhancement 下面的 Despeckle 可将斑点去除，右图为处理后的图片。



IPP 软件还有很多非常实用的功能，ftp 上有 IPP 软件安装文件及使用说明。详情可见所 ftp://incoming1/分析测试中心资料/光谱组/共聚焦。

二、共聚焦 Ratio 法在 pH 荧光探针方面的应用

分析测试中心共聚焦最多可同时采集三个荧光通道。两个荧光通道的荧光强度可做 Ratio 值，用于分析 pH 值、金属离子浓度等引起的荧光强度比值的变化。

碳纳米点上修饰两种不同荧光染料（异硫氰酸酯荧光素和罗丹明）(DLCD)，可形成一种可调式比率型 pH 荧光探针，用于整个活细胞内 pH 的分布及其波动的定量检测。下图为 Ratio 法在 pH 荧光探针应用方面的举例。

图1为Hela细胞在pH6-8范围的荧光图。第一行为FITC通道（激发波长488nm，发射波长510-550nm）；第二行为RBITC通道（激发波长488nm，发射波长570-610nm）；第三行为微分干涉差图(DIC)；第四行为FITC通道与RBITC通道的荧光强度比值图(ch1/ch2)，即Ratio图，不同的颜色代表不同的比值，绿色表示Ratio值低，黄色表示Ratio值高，如图2颜色标尺所示。由图1可看出随着pH值的增加，FITC通道荧光强度增加，而RBITC通道荧光强度基本不变，两个通道的荧光强度比值增加。

图3为一幅Ratio图的Ratio值频率分布，即每个Ratio值对应的像素数，这样我们就可以知道一幅Ratio图中，每个Ratio值的权重或像素与Ratio值的对应关系。

Ratio值与像素数的对应关系有excel数据，因数据太多不做展示。通过origin可

算出一幅Ratio图的平均Ratio值及误差bar(平均值±标准偏差)。当颜色标尺相同时，一种颜色对应一个Ratio值，一幅图的平均Ratio值又对应细胞的一个pH值。这样，就可以做出pH-Ratio曲线。

图4 a) 显示了pH—Ratio图及误差bar，在pH6-8范围内，成线性，图b)-f)为负载有碳纳米点的Hela细胞的Ratio图。图a为未经处理的完整细胞，图b)-f)为用不同的氧化还原剂处理后的Ratio图，有的颜色变蓝，有的基本没变。可看出不同的氧化还原剂处理细胞后，细胞内pH值有的发生变化，有的没发生变化。这样我们就可以很清楚地用Ratio图颜色的变化来判断pH值的变化。

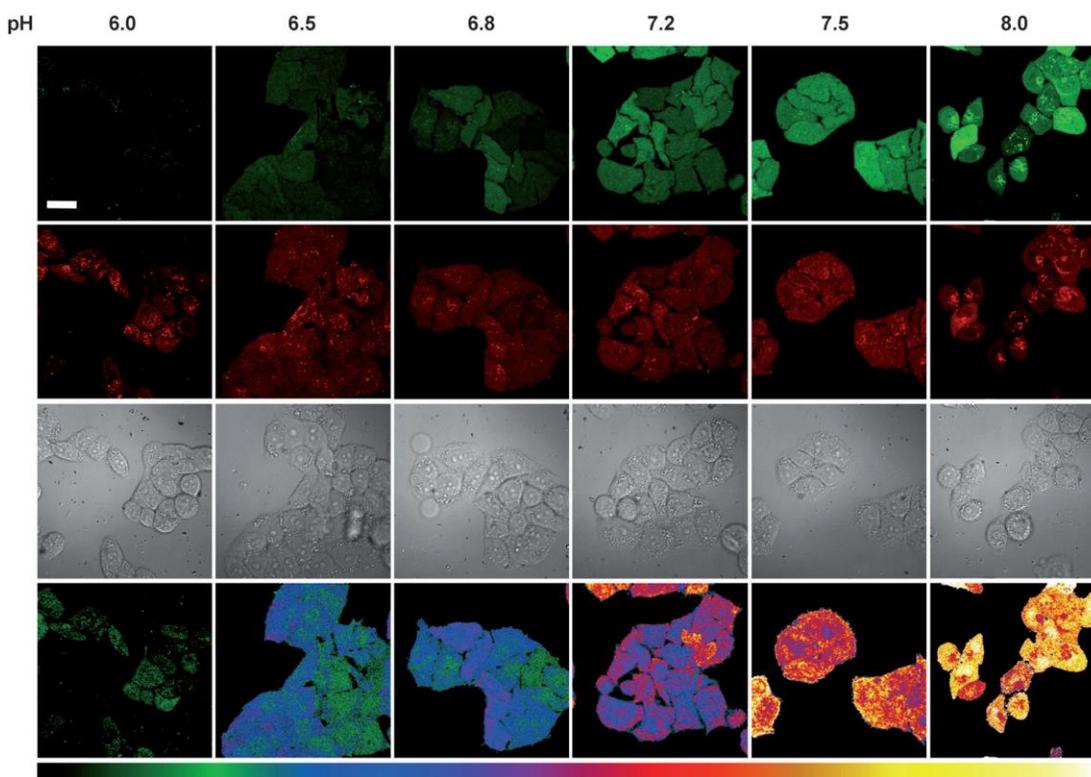


Fig.1 Fluorescent images of HeLa cells clamped at pH 6.0, 6.5, 6.8, 7.2, 7.5, and 8.0, respectively. The images of the first row (FITC channel) and second row (RBITC channel) were collected in the ranges of 510–550 nm and 570–610 nm, respectively. The third row shows the corresponding differential interference contrast images. The images of the fourth row (the Ratio channel) were generated by Olympus software (FV10-ASW); the bottom color strip represents the pseudocolor change with pH. Scale bar, 20 μm .

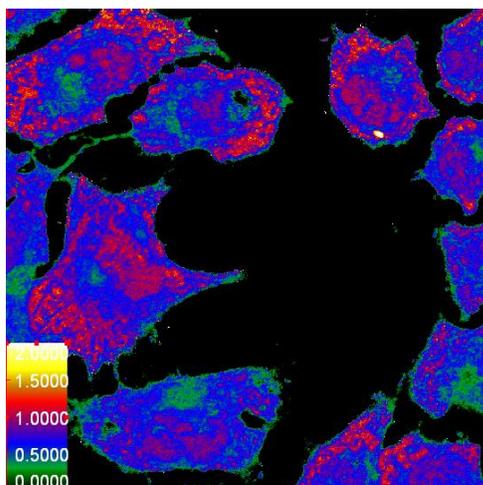


Fig.2 Ratio channel, different color represents different Ratio value. Green indicates lower Ratio value, yellow indicates higher Ratio value.

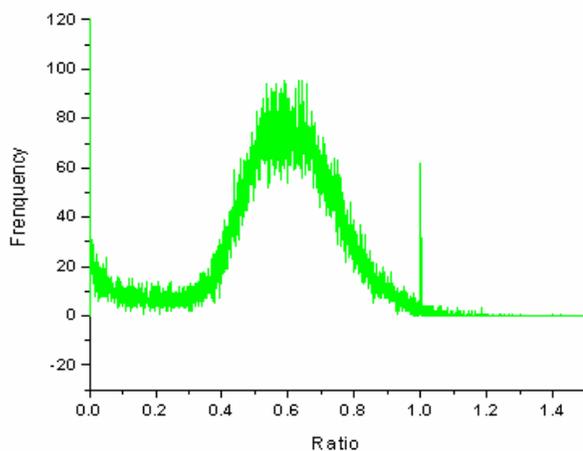


Fig.3. The relationship between ratio value and pixel number. The pixel number at every ratio value can be obtained.

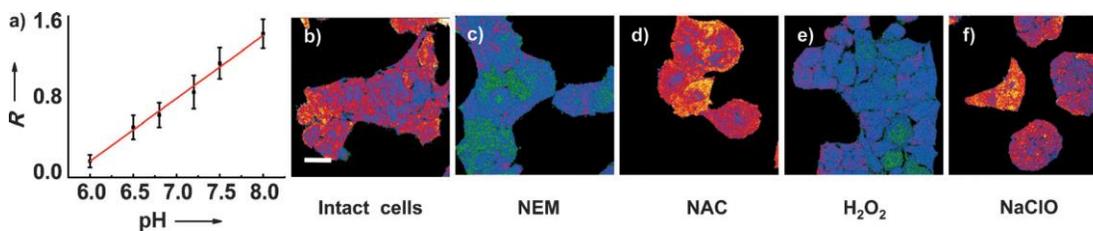


Fig.4 a) Intracellular pH calibration curve of DLCDs. R indicates the pseudo Ratio generated by Olympus software (FV10-ASW). b) - f) Ratiometric images of DLCD-loaded HeLa cells in PBS (pH

7.4): b) intact cells, and cells treated with c) 1 mM NEM, d) 1 mM NAC, e) 100 μ M H₂O₂, or f) 100 μ M NaClO for 1 h. Scale bar: 20 μ m.

参考文献Angew. Chem. Int. Ed. 2012, 51, 6432-6435

三、共聚焦图像的共定位分析

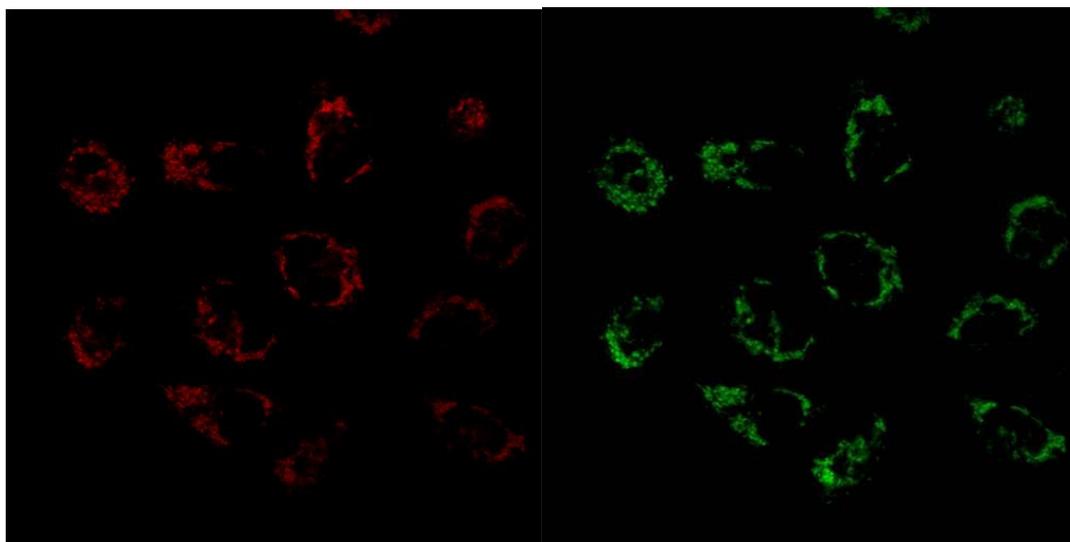
共定位，在生物表述上是这样定义的：两个或多个不同的分子位于样品上同一个物理位置。对显微镜中看到的组织切片、单个细胞或亚细胞器官，共定位意味着不同的分子连接到同一个受体上；在数字图像方面，这个术语指的是不同荧光分子发射的颜色分享图像中的同一个像素。因此，在一个样品中两个荧光探针的共定位，比如发绿光的Alexa Fluor 488，发橘红色光的Cy3，在图像中就是由含有红色和绿色两者贡献的像素所示（经常产生各种各样的橘色和黄色）。

下面是具体的分析过程：

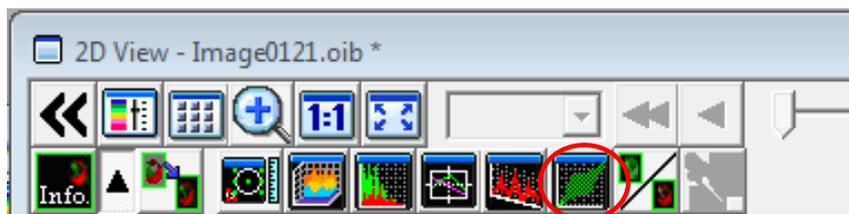


1. 点击染料列表图标，选择两种染料，采集样品的荧光图像。

2. 打开样品双通道荧光图像。

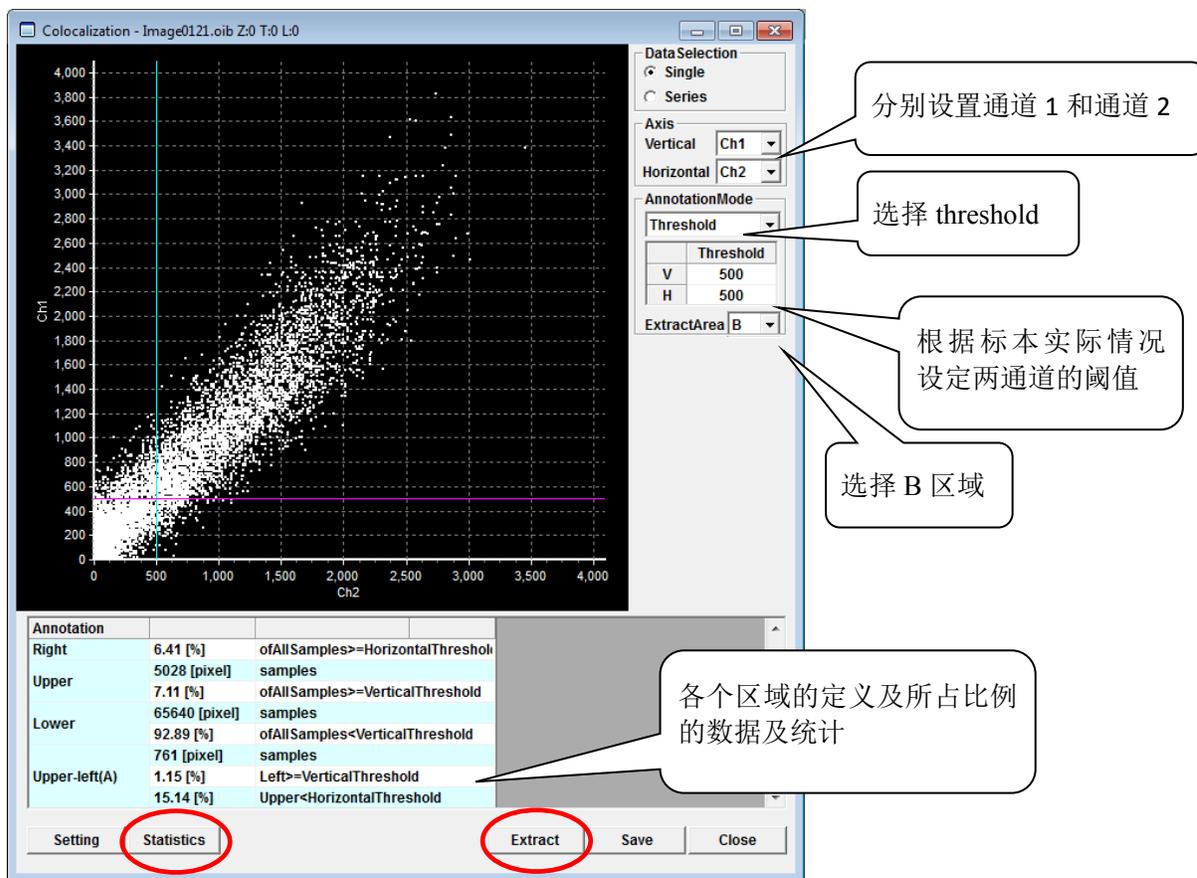


3. 点击下图中的共定位分析按钮。



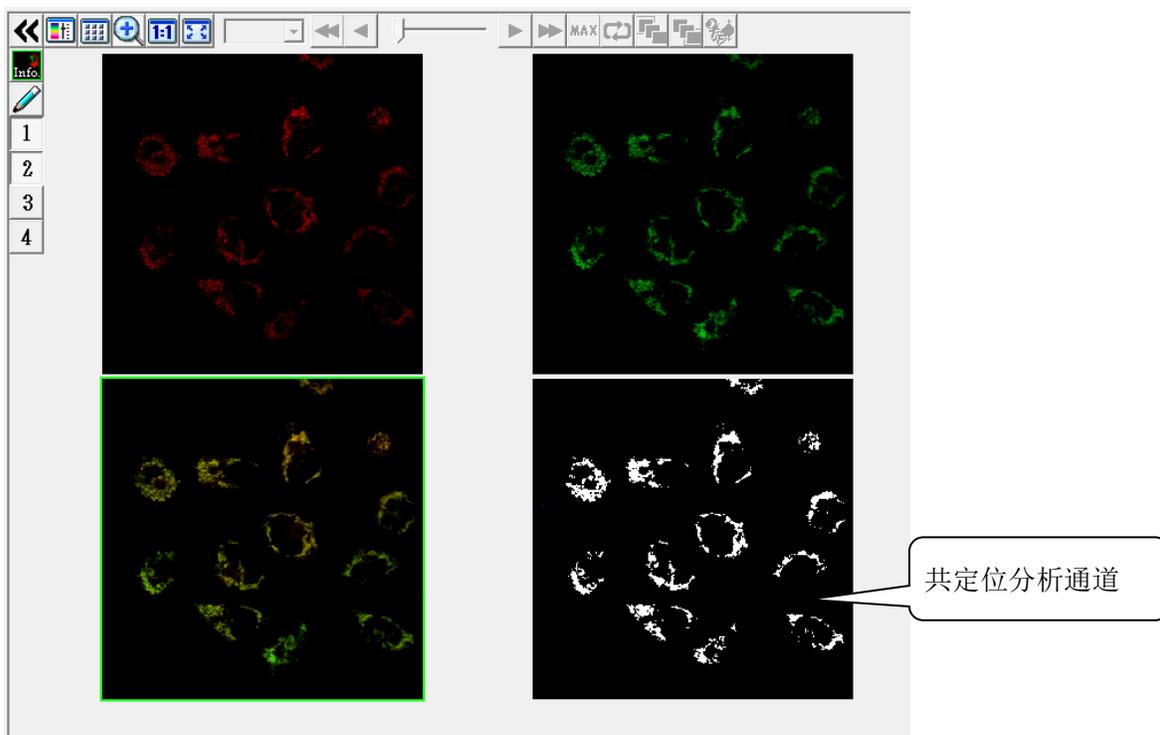
4.弹出共定位分析窗口，对参数进行如下设置：

共定位分析常用散点图表示共定位的程度，散点图越接近对角线说明共定位程度越高。



阈值的设定：根据样品实际情况选择合适的阈值，阈值的设定要排除背景信号。

5. 点击上图 Extract 后，获得如下共聚焦图，图中第四通道为共定位分析通道，其中三通道中黄色和橙色区域及四通道中的白色区域均表示共定位的位置，共定位图像可以通过右击→save display 保存；



6. 数据分析：点击上图红色标注的“statistics”按钮，出现下列数据。

Correlation Statistics							
Statistics by Region							
ROI	Area (pixels^2)	Pearson's Coeff.	Overlap	Overlap Index 1	Overlap Index 2	Coloc. Index 1	Coloc. Index 2
1	70668	0.96451	0.96689	1.0374	0.90118	0.97396	0.88202

Thresh. 200 Thresh. 200

Save Close

Pearson's 系数及 Overlap 系数通常用于分析共定位程度，数值越接近 1，说明图像共定位程度越好。

第五部分、测试注意事项

(一) 激光扫描共聚焦显微镜及荧光显微镜

1. 每次切换物镜时务必先将其落至最低位置，每次实验结束后，务必将物镜落至最低位置，然后切换到 4 倍物镜处。
2. 实验完毕后将汞灯手动光闸关闭，即由空心圈转至实心圈，使用时开机后再将

其打开。

3. 调节焦距时,注意微粗调的转换,并且注意观察显示器操作界面上焦距的数值,防止物镜调得过高压碎样品,损伤物镜镜头。一般样品焦平面在正负 1000 μm 以内。
4. 用镜头液擦拭镜头时,向同一个方向擦拭,不要来回擦,用力要轻。

(二) 稳态瞬态荧光光谱仪

1. 做 IRF 之前,务必先将衰减片调到最小(荧光寿命)或者将 Iris 调到最小(磷光寿命),再盖样品舱盖;
2. 做稳态光谱时,对于未知样品务必先将激发和发射 $\Delta \lambda$ 先设为 0.1 以下,再盖样品舱盖;
3. 对未知样品,如不知道最大发射峰,发射光子数尽量少些,比如几千、几万即可,以防在最大发射处光子数超过 100 万,损坏 PMT.
4. 做固体样品或浓溶液的发射光谱时,为了降低杂散光,激发处加带通滤光片,滤光片范围要包括激发波长,发射处加截止滤光片。
5. 做近红外发射光谱时(900-1700nm),须提前两个小时对检测器用液氮制冷,以降低红外检测噪音。
6. 做变温实验(77K-300K)和近红外实验时,自备液氮,约 5L 左右。

(三) 显微共焦激光拉曼光谱仪

1. 激光功率由小到大逐渐调节,以防烧坏样品;
2. 调焦找样品时,先在 10 倍物镜下粗调聚焦样品,然后换高倍物镜微调找样品;
3. 换样品时,先切换到 10X 镜头下,抬高镜头再取放样品;
4. 实验完成后,镜头需放在 10X 镜头下;
5. 100X 和 74X 镜头工作距离短,距离样品很近,需特别注意其安全。

(四) 紫外可见分光光度计

1. 玻璃在紫外区有吸收,因此测定样品在紫外区的吸收时应使用石英比色皿。
2. 液体体积以比色皿的 2/3 为宜,使用挥发性溶剂时应盖住比色皿。
3. 做标准曲线时,要按浓度由小到大的顺序测定,用待测溶液多次润洗比色皿,

以免改变待测溶液浓度导致测量不准确。

4. 测定固体样品时，样品粒径要尽量小，降低其散射光，也便于涂抹在硫酸钡白板上，涂抹后的表面要光滑平整。

5. 样品涂抹的量不能过多或过少，以反射率不小于 20%为宜；样品过多则吸光太多，检测到的反射光通量太少，样品过少则吸光太少，样品的反射率随波长差异太小，信噪比差。

（五）圆二色光谱仪

1. 氙灯有石英外壳，如在空气中操作，高温会产生大量臭氧，对光学镜组产生损害，因此需用氮气对光路进行吹扫；当光波长低于 195nm 时，空气中氧气会吸收辐射，因此对氮气流量有以下要求：

测量到 200nm 3-5L/min

测量到 185nm 5-15L/min

测量到 180nm 15-20L/min

低于 180nm 大于 20L/min

2. 测量时，比色皿需盖好盖子，以免溶剂挥发污染样品仓。

（六）傅里叶红外光谱仪

1. 样品纯度应大于 98%，或者符合商业规格，这样才便于与纯化合物的标准光谱或商业光谱进行对照，多组份试样应预先用分馏、萃取、重结晶或色谱法进行分离提纯，否则各组份光谱互相重叠，难以解析。

2. 样品不应含水（结晶水或游离水），水有红外吸收，与羟基峰干扰，而且会侵蚀吸收池的盐窗，所用试样应当经过干燥处理。

3. 样品浓度和厚度要适当使最强吸收透光度在 10~20%之间。

4. 可做液体或糊状物的原位红外光谱（600-4000 cm^{-1} ），pH 值要求 5-9 之间，事先准备 1L 左右液氮，并提前电话联系。

第六部分、常见问题及解决

（一）FV1000 激光扫描共聚焦显微镜

1. 激光共聚焦 DIC 通道的光源是什么？

DIC 通道的光源是激光，用的是透射光检测装置，只有透光的样品才可看到。

2. 荧光和白光是反射光还是透射光？

用汞灯和激光激发发射的荧光都是反射光，卤素灯照明看到的光是透射光，不透明物体，卤素灯看不到。

3. 共聚焦荧光通道的颜色是实际颜色吗？

不是，是伪彩色，光电倍增管只检测强度信息，不检测颜色信息。颜色可以随意更改。不过可通过发射波长的范围，判断大概为什么颜色。

4. 彩色 CCD 看到的是实际颜色吗？

是实际颜色，用 RGB 进行了还原，但显示器显示颜色与目镜中看到的稍有差异。

5. 激光激发肯定比汞灯激发荧光强吗？

不一定，首先激光是单色光，如 488nm，而汞灯下，有一定宽度的波长范围，如 470-495nm，激发波长不一样，得到图片的效果不一样；其次，激光下采集荧光用共聚焦模式，样品层切得比较薄，而汞灯下用普通模式采集图片，样品层切得比较厚。因此看弱荧光，经常是激光不如汞灯下看得更好。

6. 共聚焦拍照与普通荧光显微镜拍照有什么不同？

共聚焦用激光做光源，光电倍增管做检测器，逐点扫描，对应每个像素其能量比较高；普通荧光显微镜用汞灯做光源，汞灯虽然总功率高，但属于场照明，对应每个像素的能量不一定有激光高。共聚焦有针孔，可以排除焦平面上焦点以外及非焦平面杂散光的影响，因此空间分辨率提高，但因为是逐点扫描，采集较慢，一张图每个像素并不是同一时间采集的，时间分辨率不高；CCD 拍照每个像素点为同一时间信息。

7. 显微镜最重要的部件是什么？

是物镜，物镜数值孔径 (N.A.) 越大，其分辨率越高。普通光镜 ΔR (分辨率) = $0.61 \lambda / N.A.$ ；共聚焦 $\Delta R = 0.51 \lambda / N.A.$ ， λ 为激发光波长。相同倍数的物镜，其 N.A. 值越大，荧光透过的越多，与 N.A. 平方成正比；N.A. 值越大，焦深越小，也就是看到的样品层越薄。

8. 放大倍率怎么计算？

如果从目镜观察，观察倍率 (M) = 物镜倍率 X 目镜倍率。

显示器观察，视频系统 (M) = (显示器对角线/CCD 对角线) X 接口倍率 X 物镜

倍率。

共聚焦图片的放大倍率，与像素分辨率、每个像素的大小、及图像的实际大小相关。

$M = \text{图像的实际大小} / (\text{像素分辨率} \times \text{每个像素的大小})$

9. 为什么油镜比干镜分辨率高？

倒置的荧光显微镜，对干镜，激光透过物镜进入盖玻片，在物镜和盖玻片之间会有空气，激光从物镜进入空气，也就是从光密介质进入光疏介质，光会偏离法线，使得光斑变大，分辨率降低；对于油镜，浸油的折射率与玻璃、物镜一样，因此激光从物镜进入浸油到达盖玻片，光斑大小基本不变，因此用油镜分辨率要高。

（二）FLS980 稳态瞬态荧光光谱仪

1. 对于固体样品或浓溶液如何加滤光片？

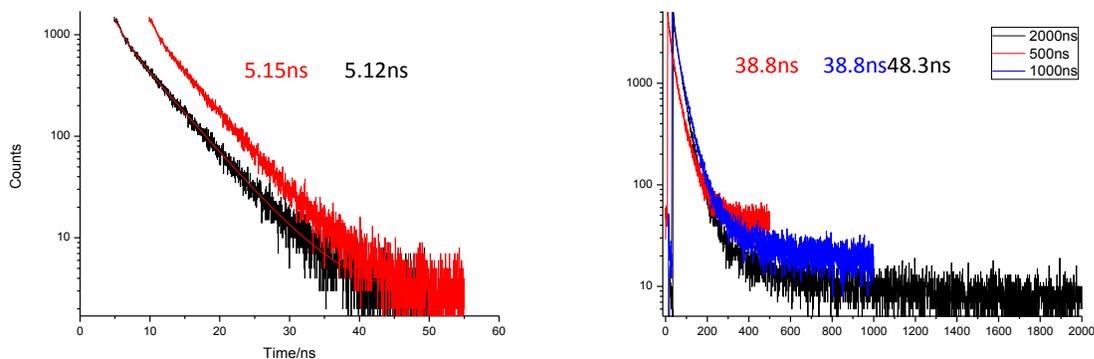
做固体样品或浓溶液的发射光谱时，为了降低杂散光，激发处加带通滤光片，滤光片范围要包括激发波长，带宽越窄越好；发射处加截止滤光片，一般比激发波长长 20nm 以上，比如 320 激发加 340nm 以上的滤光片，收集的发射波长范围，从截止滤光片加 20nm 开始，比如加 340nm 截止滤光片，从 360nm 开始收集发射波长。

2. 激发、发射带宽如何设置？

激发、发射带宽最大可设置为 20nm。一般来说激发、发射带宽越大，收集的荧光信号越强，但杂散光也越强。尤其对于发射带宽，要尽量小，以避免杂散光影响，一般要小于激发带宽。

3. 寿命曲线拟合得到的寿命与脉冲光触发延迟时间有关吗？

没有关系，只是相当于整个寿命曲线在横坐标上平移而已。但寿命曲线必须衰减结束，才可以得到正确的寿命值，如寿命曲线一直在单调下降，则没有衰减结束，拟合得到的寿命偏短。



4. 为什么要做 IRF?

使用 EPL 皮秒脉冲激光器，寿命低于 5ns 须做 IRF；使用微秒闪光灯，寿命低于 $10\ \mu\text{s}$ 须做 IRF. IRF (instrument response function) 就是样品把激发光散射到检测器需要的时间函数，因为光源有一定的脉冲宽度、检测器对光子有一定的响应时间，还有计时抖动等。如寿命很短，需要把这部分时间通过去卷积的方式扣除。

5. 相对量子产率和绝对量子产率区别?

相对量子产率用普通荧光光谱仪可以测定，但仅限于液体，而且需要有已知量子产率的标准物（与待测样品光谱相似）；绝对量子产率直接通过光致发光光子数除以样品吸收的光子数得到，不限样品类型，固体、液体，薄膜都可以，不需要繁冗的测量，测量更加准确。

6. 校正文件如何使用?

PMT 检测器对各个波长光响应不同，各个光学组件包括光栅、透镜等对各个波长光透过率不同，做发射光谱时，需加发射校正文件对检测器及整个光路进行校正；但在检测器响应范围两端，校正文件的使用要谨慎；因氙灯在各个波长下能量不同，因此做激发光谱时，需加参比检测器校正以便对氙灯能量实时校正。

(三) 显微共焦激光拉曼光谱仪

1. 如何选择激发波长?

光谱实验室的显微共焦激光拉曼光谱仪配有 4 个激发波长，325nm、532nm、633nm、785nm。拉曼散射强度与激光波长的四次方成反比，波长越长拉曼散射光越弱。一般样品用 532nm 激光即可，但如果 532nm 激光激发样品荧光很强，埋没了拉曼峰；可改变激发波长为 633nm 和 785nm。原因是激发波长改变后，拉曼峰位置不变，

荧光峰位置会发生变化（横坐标为 Raman shift）。但 785nm 激发拉曼信号经常较弱。325nm 激发波长虽短，但其拉曼信号却较弱，主要原因是 325nm 激光波长短，穿透样品的深度很浅，激光与样品作用的量就很少，因此拉曼信号就较弱。对单晶硅来说，532nm 的穿透深度约 800nm，但 325nm 穿透深度仅约 10nm 左右。激光穿透样品的深度与激发波长与样品的吸光系数有关。但 325nm 波长在规避荧光方面非常有优势，拉曼光跟激发光距离很近，对 325nm，如拉曼散射范围 200-4000 cm^{-1} (Raman shift)，实际波长范围 327-373nm。因为荧光经常在可见光范围，因此使用 325nm 激光，荧光一般不会影响拉曼。但需要样品拉曼信号要强，而且对 325nm 激光的稳定性要好。因 325nm 激光穿透深度比较浅，特别适合分析核壳结构样品。

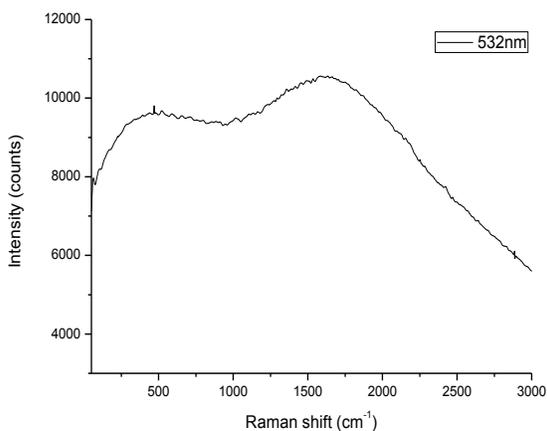


图 1.1 532nm 激发，50X 物镜

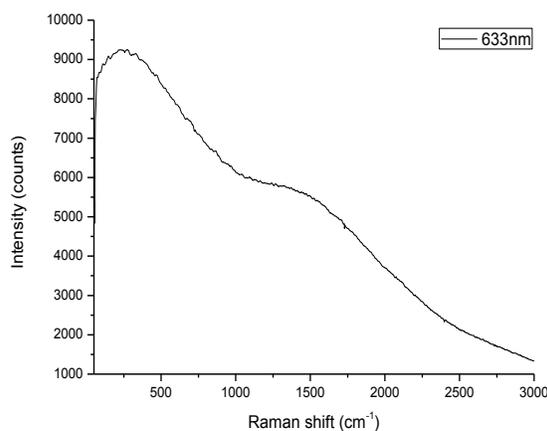


图 1.2 633nm 激发，50X 物镜

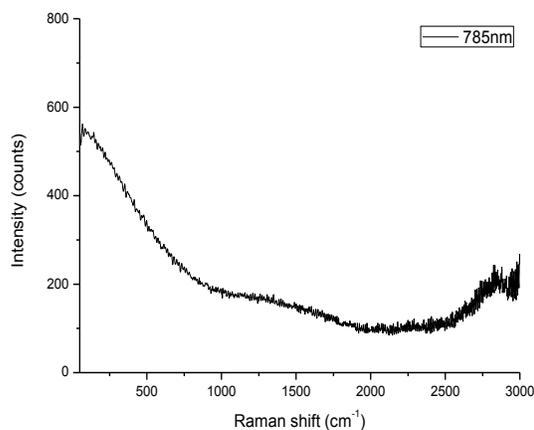


图 1.3 785nm 激发，50X 物镜

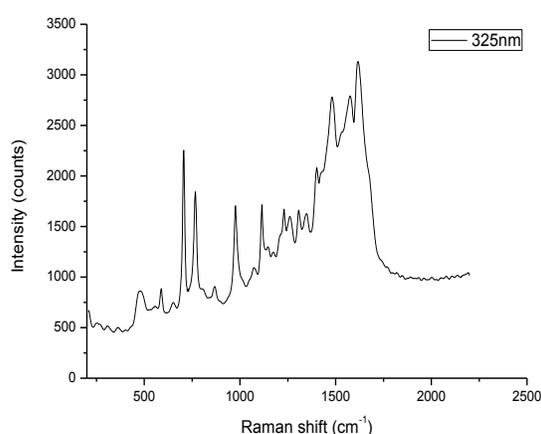


图 1.4 325nm 激光激发，74X 物镜

样品 C_3N_4 （来自宋卫国老师组）在 532nm, 633nm, 785nm 激发都有荧光干扰，无法检测到拉曼信号；785nm 满功率激发，但信号依旧很弱；325nm 激发效果就很好，显示出样品特征拉曼峰。

2. 如何选择物镜倍数?

同一激发波长，物镜倍数越大，光斑越小，空间分辨率越高，功率密度（单位面积上的功率大小）越大，物镜收集信号角度越大，因此拉曼信号越强、信噪比越好。但物镜倍数越大，视野、景深越小，样品表面的不平更为显著；而且黑色样品在高倍物镜下光通量小，不容易观察到样品，还需视具体情况而定。

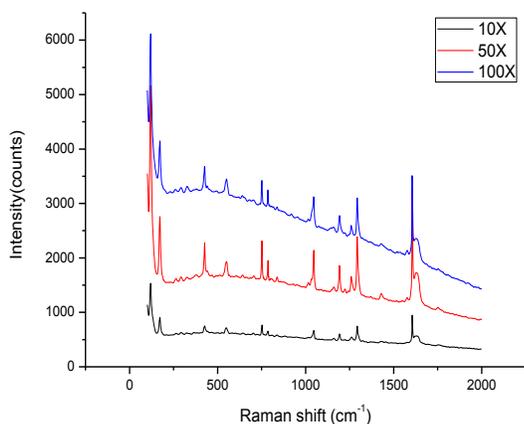


图 2.1 阿司匹林的拉曼谱图

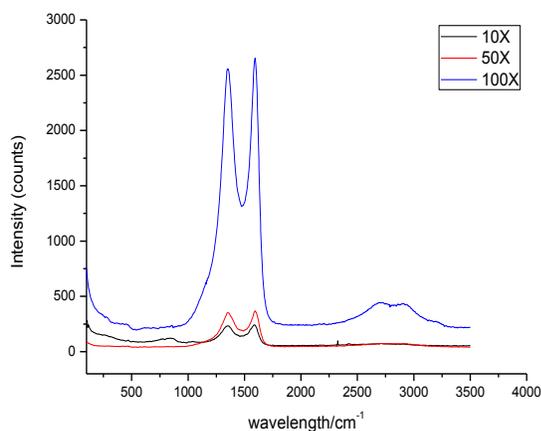


图 2.2 碳纤维的拉曼谱图

3. 如何设置激光功率及采集时间?

拉曼散射的强度与入射光的电场强度 E^2 成正比。因此，强拉曼信号产生的关键是增大在样品上的电场强度，即激发光的功率密度。但在进行拉曼测试时，激光功率需从小到大调节。什么时候激光功率最优呢？逐渐增大功率，显微镜下样品没有被激光打坏，且拉曼谱图峰位、半峰宽、峰强比例等没有显著变化时，激光功率的最大值就是最优激发功率，需要反复实验。有时，激光功率增大后，显微镜下样品形态没有发生显著变化，但拉曼峰位、半峰宽、峰强比例发生明显变化，或者明显多出一些峰或少了一些峰，那样品实际上已经被打坏，必须降低激光功率和采集时间。

拉曼采集时间加长，拉曼信号会增强，但需费更长的时间。增加采集时间比增加

功率对样品的损伤要小很多。

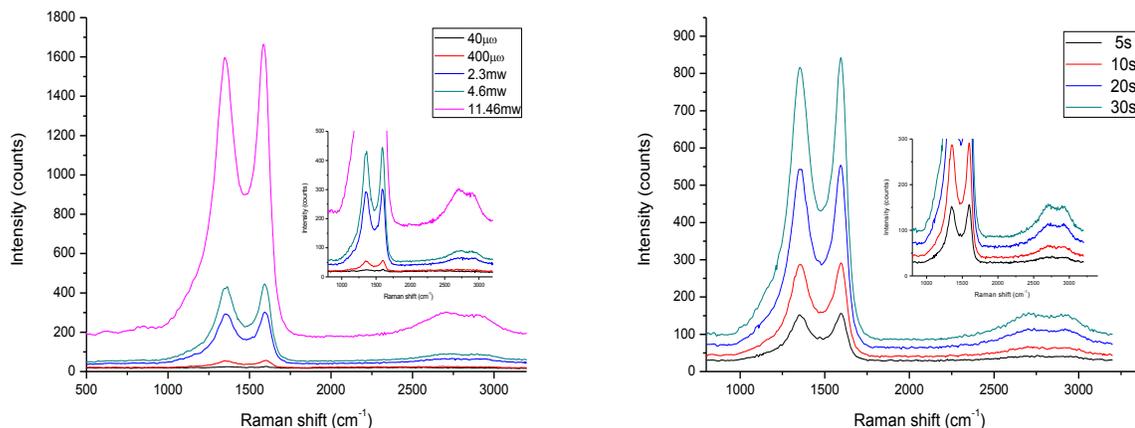
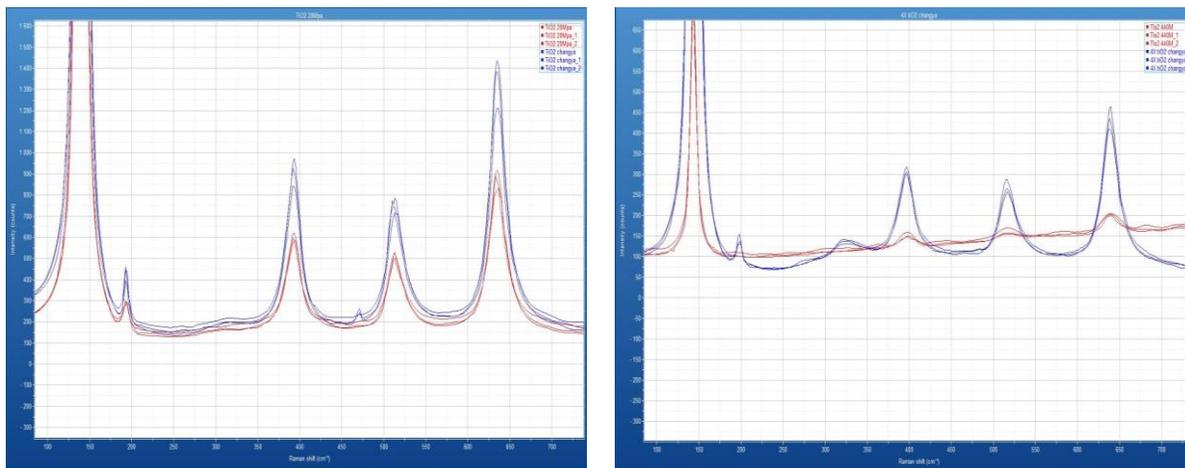


图 3.1 碳纤维在不同激光功率下的拉曼谱图 图 3.2 碳纤维在不同采集时间下的拉曼谱图

4. 样品加压后对拉曼测试有影响吗？

拉曼测试一般不需要专门制备样品。样品经过加压后，拉曼峰强显著变弱，峰变宽。拉曼峰变宽原因是：加压后粒子碰撞加剧，碰撞加大了粒子的跃迁概率，这等于粒子寿命 Δt 的缩短和能级宽度 ΔE 的展宽（依据测不准原理），从而使光谱线出现了压力展宽。拉曼谱图变宽的程度跟压力大小有关，当压力非常大，有上万个大气压时，拉曼峰会消失。



20MPa 和常压比较，532nm 440MPa 和常压比较，532nm

图 4.1 TiO_2 样品在常压和加压下的拉曼谱图比较，红色为高压，蓝色为常压样品来自宋延林老师组

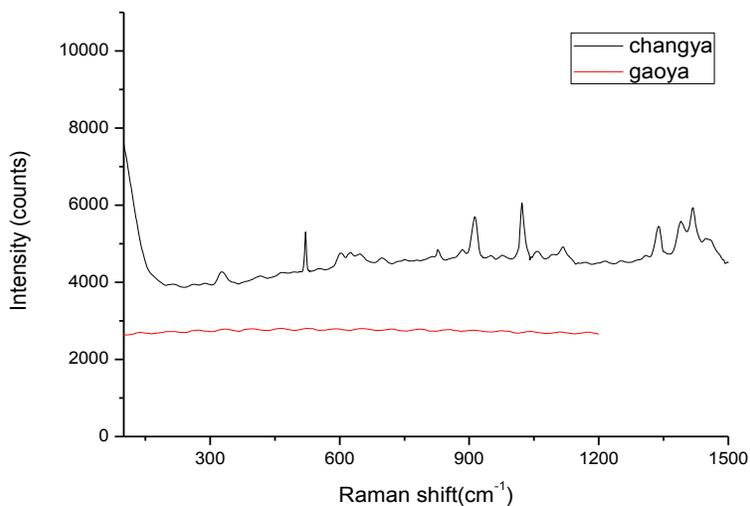


图 4.2 离子液体在常压和高压下的拉曼谱图比较

633nm 激光激发，黑色为常压，红色为高压，高压约 10 万个大气压，
样品来自张军老师组

(四) UV2600 紫外可见分光光度计常见问题

1. UV2600 测试波长范围是什么？

普通测试 190–900 nm，积分球测试 220–1400 nm

2. 吸光度最大可做到多少？

最大 5Abs

3. 可以测量光学带隙和雾度吗？

可以，光学带隙可直接通过紫外可见吸收光谱得到；雾度可通过设置积分球光路测得。

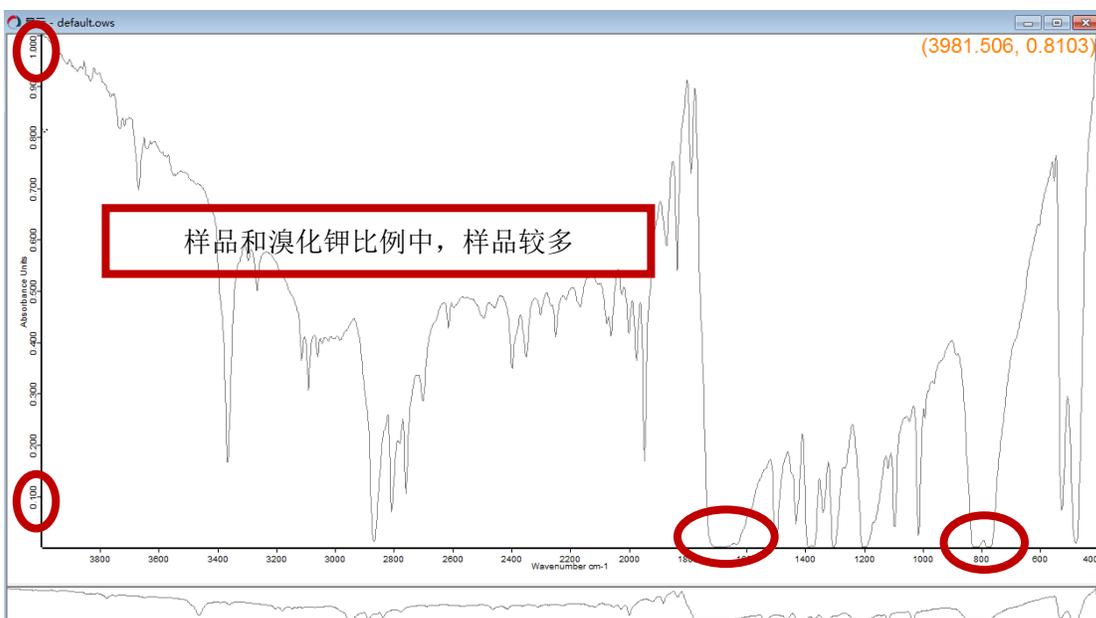
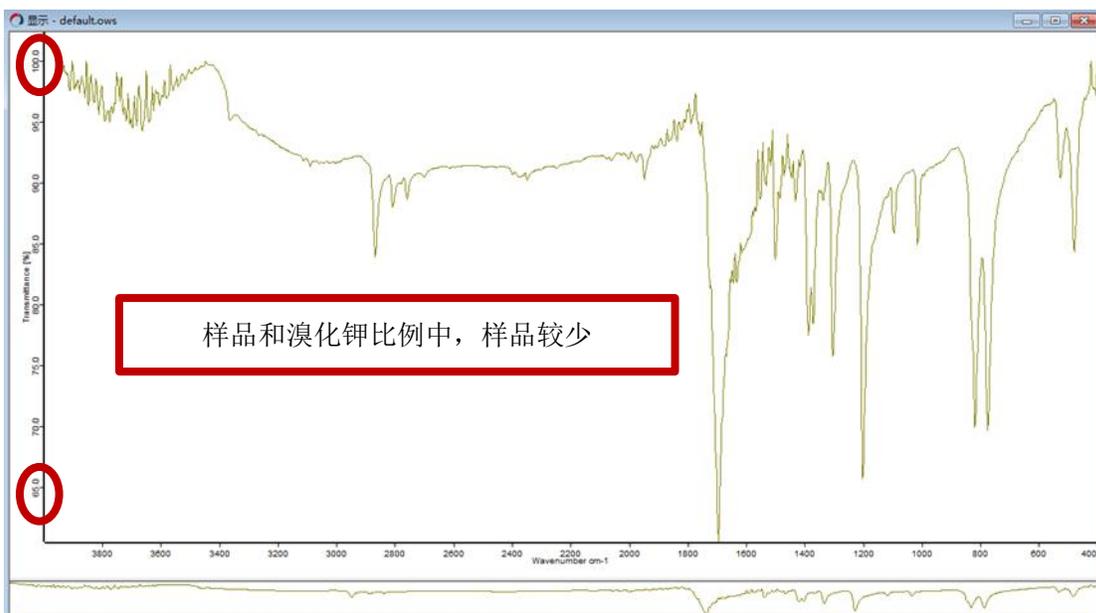
4. 可以测定固体粉末的吸光度吗？

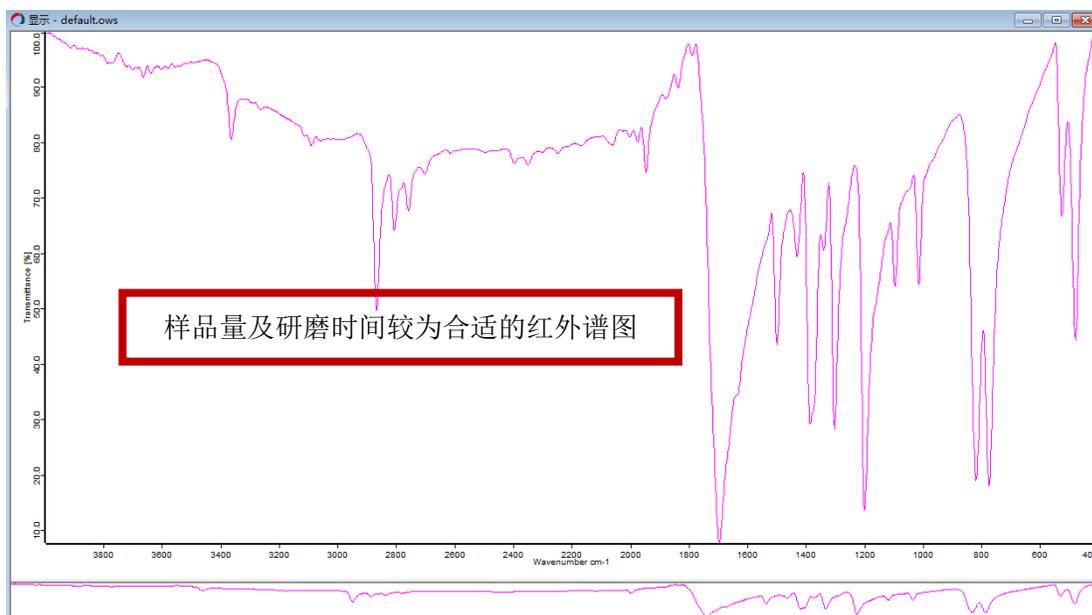
可以，通过紫外积分球附件可以测试固体粉末、块体、薄膜等的反射率，然后可转换为吸收或透射谱图。

(五) 傅立叶红外光谱仪

1. 一般红外透过率多大比较合适？

透射图中一般最大峰强度在 10%–20%之间，如小于 10%，表明透过率太低，样品太多；如大于 20%，表明透过率较高，样品较少。





2. 颗粒度大小会影响红外谱图质量吗？

红外样品研磨中，粒度要小于 2 微米，以降低散射光影响，粒度越小散射越弱，红外基线越平，信噪比越高；研磨时间不够，使得颗粒度较大，信噪比差

3. KBr 盐片和 CaF₂ 盐片有什么作用？

做流体类样品时，可将液体或糊状物直接涂在 KBr 盐片或 CaF₂ 盐片上，水和醇类会溶解 KBr 盐片，不能涂抹在 KBr 盐片，可以涂在 CaF₂ 盐片上；使用 KBr 盐片，光谱范围 400–4000 cm⁻¹，CaF₂ 盐片光谱范围 1000–4000 cm⁻¹。

第六部分、光谱组管理规章

（一）人员管理

（1）工作人员遵循在岗制度，自觉遵守统一的作息时间，按时上下班、不迟到、不早退，不擅离岗位，认真履行各自的岗位职责。具体内容可参考化学所《严格职工考勤制度的若干规定》。

（2）测试人员操作仪器必须穿工作服，实验室内要保持卫生清洁，仪器周围不乱放杂物。

（3）测试人员在实验过程中不可擅离仪器，不可大声交谈或看手机视频。

（4）为了确保分析结果的准确性和保证仪器的稳定性，工作人员必须定期校准和

维护好仪器，并做好仪器维护和保养记录。

(5) 实验完毕，及时清理实验台和实验用具；离开实验室前，尤其节假日应认真检查水、电、气和正在使用的仪器设备，关好门窗、确认电器设备安全后方可离去。

(6) 实验室应井然有序，物品摆放整齐、合理，并有固定位置。禁止在实验室内吸烟、进餐、会客、喧哗，或作为娱乐场所，不得存放无关个人用品、仪器等。

(7) 作为直接面向师生测试服务的窗口部门，应树立良好的精神面貌，主动了解前沿科技，加强专业领域知识学习，进一步提升专业技术、测试技能和服务支撑能力。上班期间，严禁工作人员玩手机、玩游戏及利用微信、QQ等通讯工具从事与工作无关的内容。

(8) 无论哪位工作人员，如果“接私活”情况属实，不管金额大小，劝退处理；如果情况严重，根据化学所相关管理规定，直接开除。

(二) 仪器管理

(1) 仪器实施 AB 岗负责制度，一人主管一人协管，如果主管人请假，协管人负责该仪器的正常测试。

(2) 参考《良好实验室规范》，建立每台仪器的档案，并备有样品制备、上机操作方法、数据处理、样品测试注意事项等实施细则。

(3) 所有仪器不得随意搬动、拆卸和改装，仪器设备未经同意，不得外借。

(4) 仪器设备及房间应保持清洁卫生，所有仪器设备应做到定期检查、维护保养，并详细记录。

(5) 建立完善的培训考核制度，并严格按照仪器操作规程进行；操作人员必须经工作人员严格考核并授权后，方可在非工作时间独立操作仪器。

(6) 设备维修，应建立详细维修台账，记录内容应包括维修日期、仪器维修故障、维修申请、更换配件费用、工程师工时费用和维修后效果等资料，同时把报销发票及合同复印保存（电子版也可以）。

(7) 考虑到电脑存储容量，每台仪器测试数据可保存 2 年；实验数据测试人员要及时拷贝。

(8) 非工作时间，仪器仅对具有操作资格的人员开放。如果实验过程中遇到仪器

故障，为确保仪器的安全，请实验室人员立即停止实验，并将仪器使用情况及时反映给工作人员。

(三) 预约及培训服务管理

光谱组仪器必须通过网上进行预约。

在中国科学院仪器设备共享管理平台进行网上预约 (<http://samp.cas.cn>)，预约时请选择测试仪器、测试项目、样品个数、测试时间、测试人员及导师姓名，联系方式（手机号）。预约完成后才可以上机测试。

取消预约需提前一天在网上申请，否则按照正常测试收费。对于不遵守实验室相关规定的师生，中心有权拒绝其样品测试。

仪器负责人需例行检查仪器运行状态，如发现问题导致设备不能正常测试服务，应第一时间通知预约人，并在中心网站或实验室贴出通知。

光谱组仪器实行集中培训、一对一培训和视频培训相结合的方式。

(1) 待培训的操作人员，有责任和义务告知其导师，填写分析测试中心制订的相关表格和承诺书等；导师有责任和义务配合中心实验室的各项管理制度。

(2) 待培训的操作人员，需服从工作人员的培训要求和考核安排，需遵守中心实验室的各项规章制度和安全须知，若有违规，将直接取消其培训资格。

(3) 完成培训的操作人员必须按照具体仪器的操作规程进行操作，对仪器使用过程中出现的异常问题进行详细记录。

(四) 实验室安全

1. 消防安全

每个实验室必须配备多个灭火器，灭火器材应放置于干燥、阴凉、易取用的地方。每个实验室粘贴相关的消防安全标识。确定消防安全监督员，定期对实验室的消防安全进行检查，并将检查情况登记在表格中，检查内容包括：

(1) 各种消防标识：安装是否牢固，定位是否准确，整体有无损坏，清扫表面灰尘等；

(2) 各种灭火器：瓶体是否完好，固定是否牢靠，保险栓是否完好，气体压力是否在规定范围等；

(3) 要定期检查实验室线路有无老化、电器使用是否规范，发现问题及时整改；

定期检查消防设备，在消防设备使用期限到临之前，及时更换消防器械。

2. 气瓶安全

气瓶的放置地点，不得靠近热源和明火，应保持气瓶瓶体干燥；每个实验室的气瓶应该配有手推车，或者将其锁链固定于墙面上，以确保安全；所有钢瓶压力降低到安全范围，能放在角落就放在角落，危险钢瓶严禁进入实验室，可以接钢管引入，如果必须要放在实验室，可以购买防爆气瓶柜；经常使用的危险钢瓶，可以多次购买，按需采购。定期检查钢瓶和减压阀年限和质量。

3. 液氮安全

液氮罐要存放在通风良好的阴凉处，不要在太阳光下直晒。由于其制造精密及其固有特性，无论在使用或存放时，液氮罐均不准倾斜、横放、倒置、堆压、相互撞击或与其他物件碰撞，要做到轻拿轻放并始终保持直立。

(五) 实验室化学药品安全

(1) 易燃化学品宜放于通风良好的试剂柜中，室内禁止吸烟、点火及使用电热器，应配备适当的灭火设备。

(2) 危险化学品不应放在高处，以避免取用时容器坠落发生意外，应尽量存放在接近地面处。

(3) 定期检查所储存的化学品。发现化学品标签模糊不清或脱落，应立即更换。发现试剂变质、泄露等迹象，要及时处理。

(4) 在处理具有刺激性的化学品时，应在通风橱进行，并带防护手套。

(5) 对废气、废物、废液不得随意排放或丢弃，须按有关规定进行处置。

(六) 实验室突发事件应急处理预案

1. 火灾应急处理预案

(1) 对于初起火灾，由各实验室消防安全员及时切断电源；在保证安全的前提下灭火。根据火情不同原因，可采取隔离法、冷却法、窒息法，火灾现场人员要在第一时间内临近所有灭火器，集中使用对准火点进行灭火。如果火势过大无法扑灭，则设法隔离火源，防止火势蔓延，等待专业消防人员来灭火。

(2) 做好人员疏散工作：火灾时，现场指挥人员应保持镇静，稳定好人员情绪，维护好现场秩序，组织有序疏散，防止惊慌造成挤伤、踩伤等事故；火灾时，一

且人体身上着火，切忌不能奔跑。如旁边有水，立即用水浇洒全身，或用湿毯子等压灭火焰，着火人也可就地倒下打滚，把身上的火焰压灭。

(3) 做好物资疏散工作：在保证人身安全的前提下，首先疏散可能扩大火灾和有爆炸危险的物资，例如起火点附近的液化气罐、化学实验室易爆和有毒物品，以及堵塞通道使灭火行动受阻的物资；然后疏散性质重要、价值昂贵的物资。例如机密文件、档案资料、仪器设备以及价值贵重的物资。

(4) 出现伤员时，应及时组织安排人员将伤员送至医院进行急救或联系 120 护送伤员去医院救治。

(5) 消防车到来后，由消防负责人负责引导消防人员到起火点，并积极协助灭火。

(6) 划出警戒范围，严禁无关人员进入着火现场，以防发生不必要的伤亡，同时也为火灾消灭后的调查起火原因提供有力证据。

2. 实验室中毒应急处理预案

(1) 实验中若感觉咽喉灼痛、嘴唇脱色或发绀，胃部痉挛或恶心呕吐等症状时，则可能是中毒所致。首先将中毒者转移到安全地带，解开领扣，使其呼吸通畅，让中毒者呼吸到新鲜空气，立即送医院治疗，不得延误。

(2) 吸入刺激性气体中毒者，应立即将患者转移离开中毒现场，给予 2%~5% 碳酸氢钠溶液雾化吸入、吸氧。气管痉挛者应酌情给解痉药物雾化吸入。应急人员一般应配置过滤式防毒面罩、防毒服装、防毒手套等。

3. 触电应急处理预案

触电急救的原则是在现场采取积极措施保护伤员生命。

(1) 首先要使触电者迅速脱离电源，越快越好，触电者未脱离电源前，救护人员不准用手直接接触及伤员。如电源较近，可直接切断电源开关；若电源开关较远，可用干燥的木棍，竹竿等挑开触电者身上的电线或带电设备；可用几层干燥的衣服将手包住，或者站在干燥的木板上，拉触电者的衣服，使其脱离电源。

(2) 触电者脱离电源后，应视其神志是否清醒，神志清醒者，应使其就地躺平，严密观察，暂时不要站立或走动；如神志不清，应就地仰面躺平，且确保气道通畅，并于 5 秒时间间隔呼叫伤员或轻拍其肩膀，以判定伤员是否意识丧失。禁止摇动伤员头部呼叫伤员。

(3) 抢救的伤员应立即就地坚持用人工肺复苏法正确抢救，并设法联系所医务室接替救治。

4. 实验室化学灼伤应急处理预案

(1) 强酸、强碱及一些具有强烈的刺激性和腐蚀化学试剂发生化学灼伤时，应用大量流动清水冲洗，再分别用低浓度的(2%~5%)弱碱(强酸引起的)、弱酸(强碱引起的)进行中和。处理后，再依据情况而定，作下一步处理。

(2) 溅入眼内时，在现场立即就近用大量清水或生理盐水彻底冲洗。每一实验室楼层内备有专用洗眼水龙头。冲洗时，眼睛置于水龙头上方，水向上冲洗眼睛，时间应不少于 15 分钟，切不可因疼痛而紧闭眼睛。处理后，再送眼科医院治疗。

5. 重要电话

所消防电话：82617200（监控室电话）

所综合处电话：62553350

所医务室电话：62554195

光谱组长电话：62566250

光谱组安全员电话：62566250

消防电话：120

报警电话：110