

MICROSCOPIO DE EPIFLUORESCENCIA

EPI-FLUORESCENT MICROSCOPE



Referencia/Code: HBF001

Manual de uso
Operation manual

Índice de idiomas / Index of languages

Spanish	3
English	19

Spanish

1. Introducción	4
a) Manual de uso.....	4
b) Aplicaciones del microscopio de fluorescencia.....	4
c) Principio del microscopio de fluorescencia.....	4
2. Antes de utilizar el microscopio de epi-fluorescencia	5
a) Lugar de instalación	5
b) Sustitución de las bombillas	5
c) Transporte	5
d) Muestra	6
e) Cuidado y mantenimiento.....	6
f) Desembalaje del equipo.....	6
3. Descripción de las partes del microscopio.....	7
a) Elementos principales	7
b) Tamaño y peso	8
c) Control y ajuste de los elementos del microscopio.	8
d) Parametros y especificaciones del microscopio.	9
e) Módulo de fluorescencia.....	10
f) Características ópticas.....	10
4. Instalación	12
a) Instalación de la caja de luz halógena.....	12
b) Instalación de la lampara de luz halógena	12
c) Instalación de la lampara de mercurio.....	13
d) Instalación del módulo de epi-fluorescencia	14
e) Instalación del cabezal del microscopio.....	14
f) Instalación de los objetivos	14
g) Instalación de los oculares	14
h) Conectar el cable de conexión	14
i) Reemplazar el fusible	15
5. Pasos para la observación	15
a) Uso del microscopio de fluorescencia.....	15
b) Uso de la lampara halógena.....	16
6. Cuidado y mantenimiento.....	17
7. Resolución de problemas	17

1. Introducción

a) Manual de uso

Este manual de uso es para el microscopio de epi-fluorescencia, modelo 158/358. Para asegurarnos una máxima seguridad en el uso del equipo siga las instrucciones cuidadosamente y deje el manual disponible para todos los usuarios del equipo.

b) Aplicaciones del microscopio de fluorescencia

El microscopio de epi-fluorescencia modelo 158/358 tiene 5 longitudes de onda distintas y se utiliza en técnicas de fluorescencia en microscopia incluyendo la tinción de fluorescencia y la inmunofluorescencia.

El método de tinción de fluorescencia puede mostrar distintos componentes dentro de las células especialmente los dos tipos de ácido nucleico (ADN y ARN) y tiene una alta especificidad, por eso esta técnica se utiliza como un buen método citoquímico.

El método de inmunofluorescencia es una técnica combinada de inmunología y de la tinción de fluorescencia, tiene por ello la especificidad de los anticuerpos y la sensibilidad de las técnicas de fluorescencia. Se utiliza mucho en patología y sobre todo en el diagnóstico de enfermedades autoinmunes.

c) Principio del microscopio de fluorescencia

Hay muchas sustancias en la naturaleza que emiten a una determinada longitud de onda mayor (luz fluorescente) cuando son irradiados por una longitud de onda corta o menor (ultravioleta, violeta, azul o verde son los filtros del módulo de fluorescencia, por tanto son las longitudes de onda de excitación) esto se denomina fluorescencia foto inducida. Después de coger una muestra se trata con una tinción fluorescente, esta es excitada con una longitud de onda corta para obtener fluorescencia y se adapta para cada muestra de estudio o investigación.

La tinción de fluorescencia emite luz y por tanto aparece un color que puede ser observado fácilmente con un fondo negro, esta técnica es muy sensible y solo hace falta una pequeña cantidad de luz para detectarla bajo el microscopio. Debido a esto la tinción de fluorescencia se ha desarrollado como un marcador, los anticuerpos son marcados y así tienen una actividad particular, pero también se pueden ver fácilmente al mirar bajo el microscopio fluorescente sin necesidad del ocular. Hace falta un pigmento pero muy diluido. Como resultado este pigmento ayuda a ver órganos e investigar procesos o estructuras funcionales o el proceso de un cambio metabólico.

Además la tinción de fluorescencia es muy fácil, muy rápida y además fácil de realizar en una muestra, especialmente deseable para el trabajo rápido como el diagnóstico de enfermedades infecciosas.

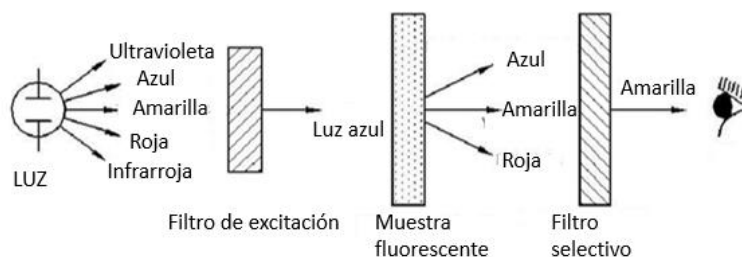


Figura 1. Principio de fluorescencia

La fuente de luz es una lampara de mercurio que genera una luz de excitación (longitud de onda corta) para excitar la muestra.

Filtro de excitación solo pasa la luz de excitación correspondiente para la muestra, el resto de longitudes de onda no son seleccionadas.

Muestra fluorescente, la muestra puede ser teñida con un pigmento fluorescente.

Filtro de barrera, bloquea una determinada longitud de onda emitida por la muestra para hacer la observación más sencilla.

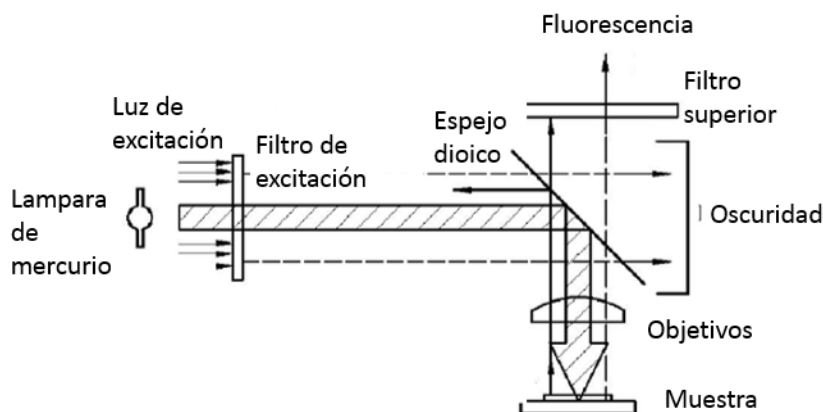


Figura 2. Diagrama de epi-fluorescencia

2. Antes de utilizar el microscopio de epi-fluorescencia

a) Lugar de instalación

- El microscopio tiene que instalarse en una mesa de trabajo firme y estable.
- El microscopio no debe estar expuesto a la luz directa del sol y debe localizarse a 20cm de la pared.
- Cuando se conecta el microscopio a la fuente de alimentación, el botón on/off debe estar en posición on. Por favor ponga atención para hacer una buena conexión de toma de tierra.
- Por favor cubra el microscopio con la funda cuando no se esté utilizando.
- Disposición para el trabajo: elevación máxima 2 metros, temperatura 5-35°C y la humedad relativa <80%.

b) Sustitución de las bombillas

- Cuando reemplace las bombillas, apague la fuente de electricidad y desconecte del enchufe.
- La bombilla solo debe manipularse o cambiarse cuando ya se ha enfriado.

c) Transporte

- El microscopio es un equipo de precisión óptica, por favor manipule el equipo con cuidado evitando golpes o posibles impactos.
- Cuando mueva el microscopio debe cogerlo con las dos manos y por la base del microscopio. No lo coja desde el cabezal.

- El microscopio no debe moverse entre dos zonas de temperaturas muy distintas, en una zona una temperatura baja y en la otra alta porque pueden empañarse los oculares y componentes ópticos del equipo, esto influirá en la visualización de cualquier muestra.

d) Muestra

- Procese la muestra de microscopía de tal manera que realice la técnica apropiada para observarla en el microscopio.
- Prepare todos los materiales y accesorios que necesite: como alcohol, reactivos de éter, gasa, algodón, pinzas y alicates, soplador de aire de goma y otras. La mesa de trabajo debe estar limpia y ordenada, no ponga cosas que no se van a utilizar con el microscopio.

e) Cuidado y mantenimiento

- Cuando vaya a limpiar todos los elementos de cristal, primero tiene que retirar el polvo de la superficie soplando y después ya puede limpiar la superficie con un algodón, limpie con cuidado el aceite o las huellas dactilares de la superficie de la lente con una solución con éter al (70%) y alcohol (30%).
- Cuidado. El alcohol y el éter son líquidos inflamables tienen que utilizarse con cuidado, y recuerde tener bien ventilada la habitación.
- Para limpiar otras partes del microscopio utilice un paño suave y sin pelos, humedézcalo con un poco de limpiador y limpie la superficie.
- Por favor no rompa ninguna parte o elemento del microscopio porque si se dañan puede no funcionar correctamente.

¡¡Cuidado!!

Si el microscopio no es debidamente utilizado como se indica en este manual puede poner en riesgo el equipo y al usuario. Por favor utilice el equipo como se aconseja en este manual.

f) Desembalaje del equipo

Desembale el equipo de la caja de cartón y sus cajas individuales de porexpan.

Asegúrese de que tiene todos los elementos del equipo, los elementos que se incluyen son:

- a) Oculares
- b) Cabezal triocular (para poner una cámara)
- c) Módulo de epi-fluorescencia
- d) Lámpara de mercurio
- e) Lámpara halógena
- f) Cuerpo del microscopio
- g) Plataforma de soporte o base del microscopio (gris)
- h) Fuente de alimentación para la lámpara de mercurio
- i) Pantalla de protección naranja
- j) Cables de conexión
- k) Este manual de uso
- l) Accesorios: funda de plástico, un bote de aceite de inmersión, una lámpara de repuesto, filtros (azul, verde y amarillo) de 32 mm de diámetro, 2 cables de conexión y un kit de limpieza 5 en 1.

3. Descripción de las partes del microscopio

a) Elementos principales

En el siguiente esquema se muestran todas las partes principales del microscopio numeradas desde 1 hasta 12.

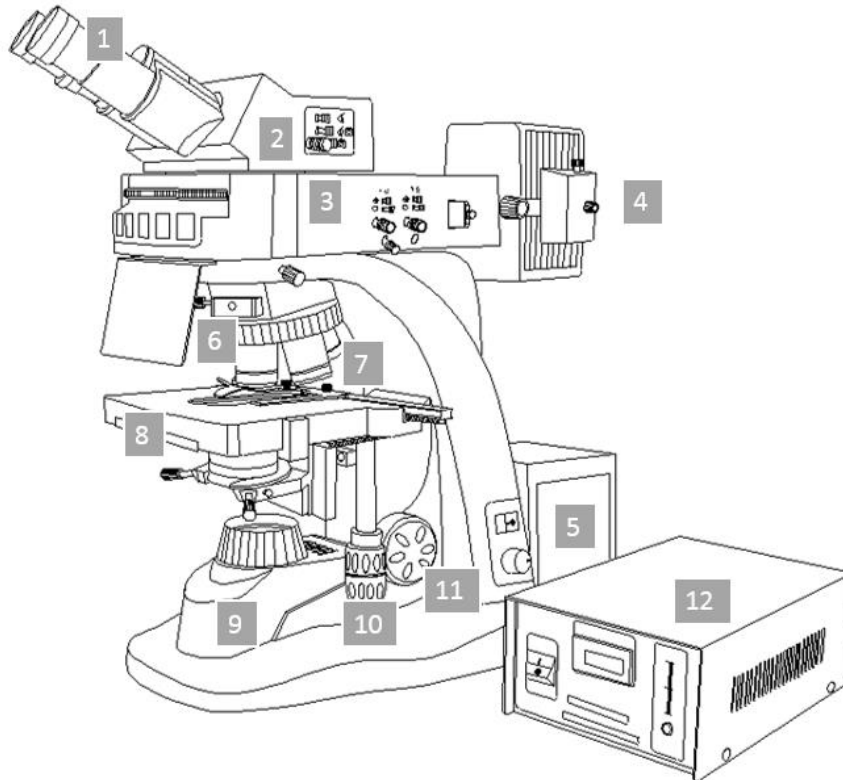


Figura 3: Elementos del microscopio, 1. Oculares 2. Cabezal triocular 3. Módulo de epifluorescencia 4. Lámpara de mercurio 5. Lámpara halógena 6. Revolver 7. Objetivos 8. Platina 9. Cuerpo del microscopio 10. Ajuste XY de la platina 11. Fuente de alimentación de la lámpara de mercurio.



Figura 4. Microscopio

b) Tamaño y peso

El tamaño del microscopio es de 45x24x59 (fondo x ancho x alto). La fuente de alimentación de la lampara de mercurio tiene un tamaño de 24x12x15 (fondo x ancho x alto).

El peso del microscopio es de 14.5 kg y la fuente de alimentación 2.4kg. El peso total del equipo sería de unos 17kg.

c) Control y ajuste de los elementos del microscopio.

En la siguiente figura están los puntos de ajuste principales del microscopio

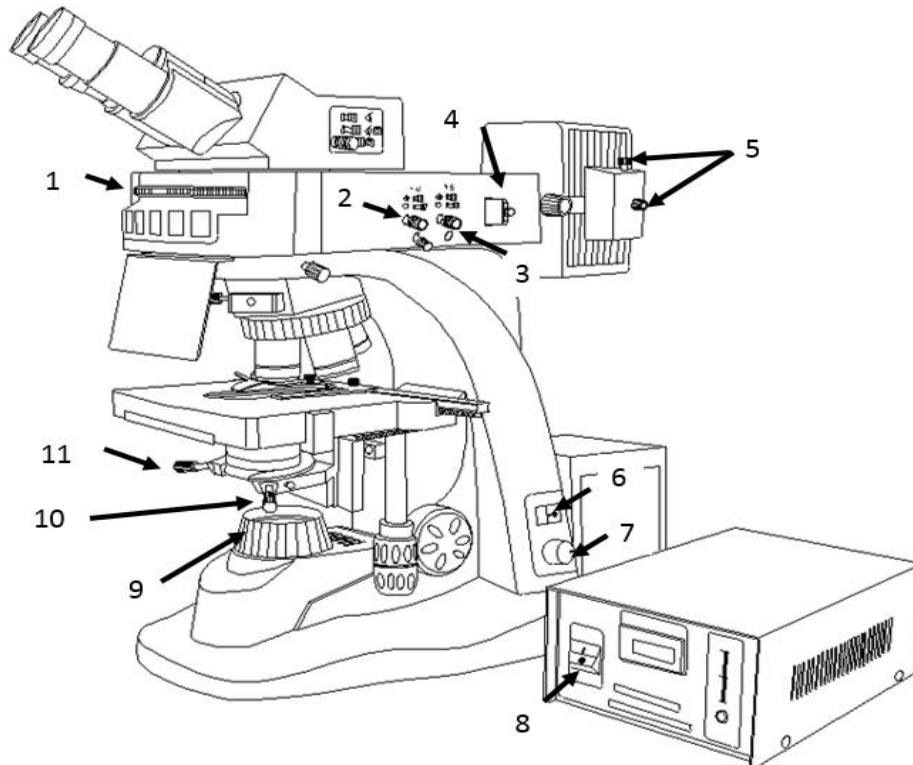


Figura 5. Elementos del microscopio; 1. Disco de fluorescencia 2. Barra de ajuste de diafragma de campo 3. Barra de ajuste de la apertura 4. Placa de válvula de luz 5. Perilla de ajuste del filamento arriba/abajo e izquierda/derecha 6. Luz transmitida 7. Ajuste de brillo 8. Encendido de la lampara de mercurio. 9. Anillo de ajuste del diafragma de campo de la luz transmitida 10. Barra de ajuste para la apertura del diafragma de luz transmitida 11. Tornillo de centrado.

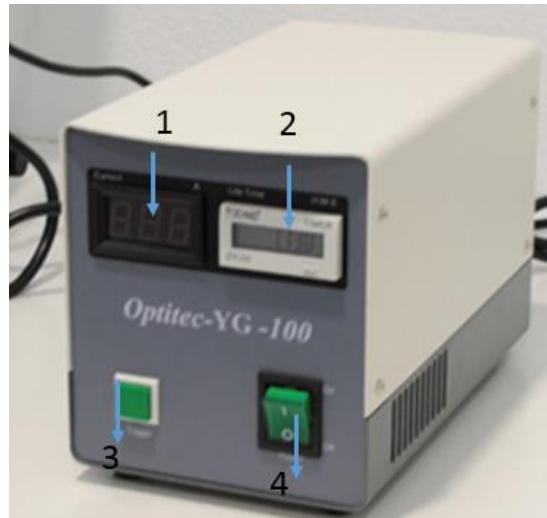


Figura 6: caja de control de la lampara de mercurio: 1. Corriente (A), 2. Vida de uso de la lampara (timer), 3. Botón "Trigger" para cebar la lampara. 4 Botón on/off

La corriente de entrada es de 100-240 V AC para los dos equipos (microscopio y fuente de alimentación o caja de control de la lampara de mercurio) y la frecuencia 50/60Hz.

d) **Parámetros y especificaciones del microscopio.**

- Oculares

Categoría	Aumentos	Diámetro visual de campo(mm)
Ocular	10X	Φ22

- Objetivos

Categoría	Aumentos	Apertura numérica (NA)	Sistema	Distancia de trabajo (mm)
Plano de fluorescencia corregidos al infinito	4X	0.15	Seco	21.6
	10X	0.35		2.9
	40X	0.75		0.6
	100X	0.90		0.62

- Aumentos totales del microscopio

Objetivos	Ocular	Microscopio	Aumentos
4X			40X

10X	10X	1X	100X
40X			400X
100X			1000X

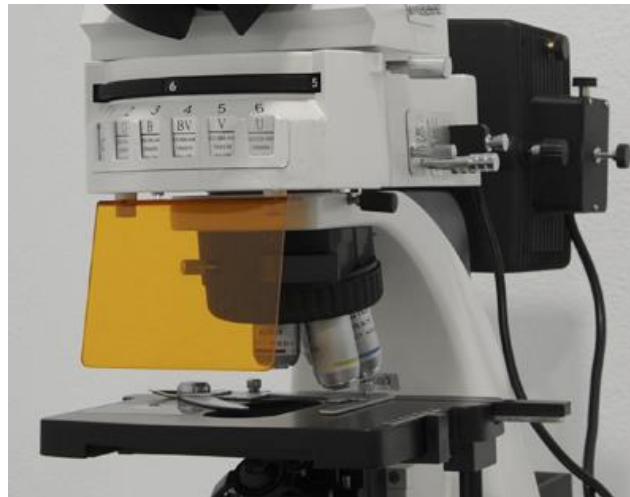


Figura 6: detalle de los objetivos y del disco de fluorescencia.

- **Longitud del tubo** : ∞
- **Lente** : distancia focal (f) = 200 mm
- **Rango de ajuste de enfoque grueso y fino** : 25 mm
- **Rango de ajuste de enfoque fino** : 0.002 mm
- **Platina mecánica** : tamaño 180x160 mm. Movimiento 76 mm en horizontal , 50 mm en vertical, graduacion 0.1 mm

e) Módulo de fluorescencia

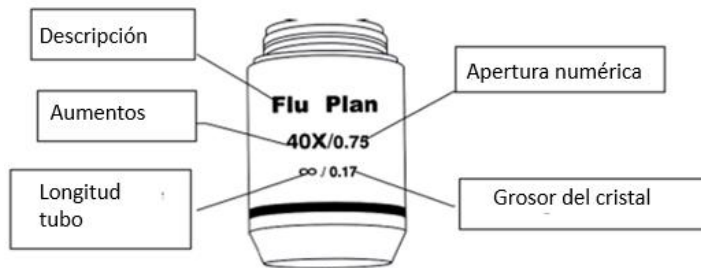
- Los aumentos de este sistema son de 1x
- Modulos de fluorescencia:

G	B	BV	V	U
EX510--560 DM575 BA590	EX450--490 DM505 BA520	EX400--440 DM455 BA470	EX380--420 DM430 BA450	EX330--380 DM400 BA420

- Longitud de onda corta de la lampara de mercurio GCQ100 20V/100W.
- Voltaje de entrada de la fuente de alimentación 220V/AC

f) Características ópticas

Parametros de los objetivos



Las características ópticas son una combinación de los objetivos y el ocular, se muestra en la siguiente tabla.

Características ópticas		4X	10X	40X	100X	
Apertura numérica		0.15	0.35	0.75	0.90	
Longitud del tubo		∞	∞	∞	∞	
Grosor del cubreobjetos		0.17	0.17	0.17	0.17	mm
Circulo de color indicativo del objetivo		Rojo	Amarillo	Azul	Blanco	
Sistema		Seco	Seco	Seco	Seco	
Distancia de trabajo		21.6	2.9	0.6	0.62	mm
Diámetro de campo		$\Phi 6$	$\Phi 2.4$	$\Phi 0.60$	$\Phi 0.24$	mm
Resolución		2.24	0.96	0.45	0.37	micron
10X ocular	Diámetro de campo	$\Phi 22$	$\Phi 22$	$\Phi 22$	$\Phi 22$	mm
	Aumentos totales	40	100	400	1000	veces

4. Instalación

a) Instalación de la caja de luz halógena

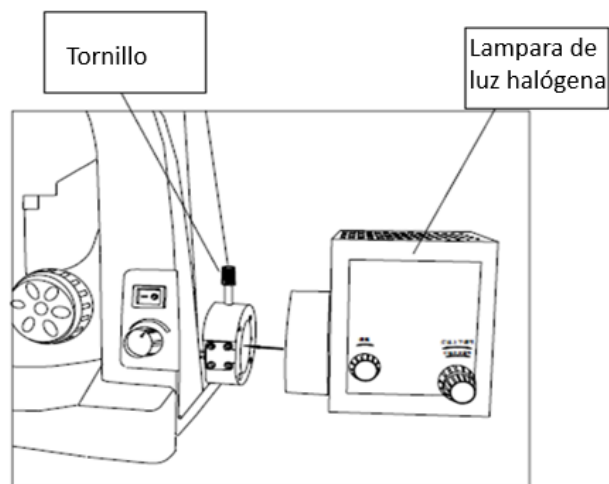


Figura 7: Lámpara de luz halógena

Pasos:

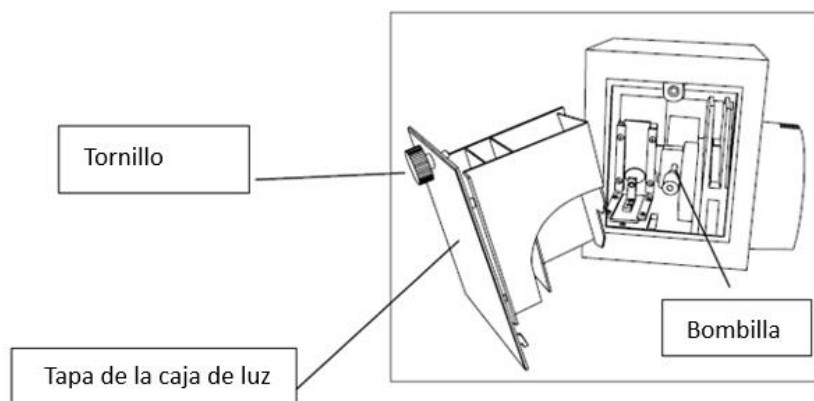
1. Soltar el tornillo situado en la parte trasera del equipo.
2. Insertar la lámpara de luz halógena en el hueco como indica la flecha.
3. Apretar el tornillo para que la caja de luz esté sujeta.

b) Instalación de la lámpara de luz halógena

la iluminación de luz halógena de este equipo tiene una fuente de 12V/50W.

¡Cuidado!

Cuando se vaya a cambiar la bombilla primero tiene que desenchufar el equipo de la corriente y por supuesto esperar a que la bombilla y la caja estén frías

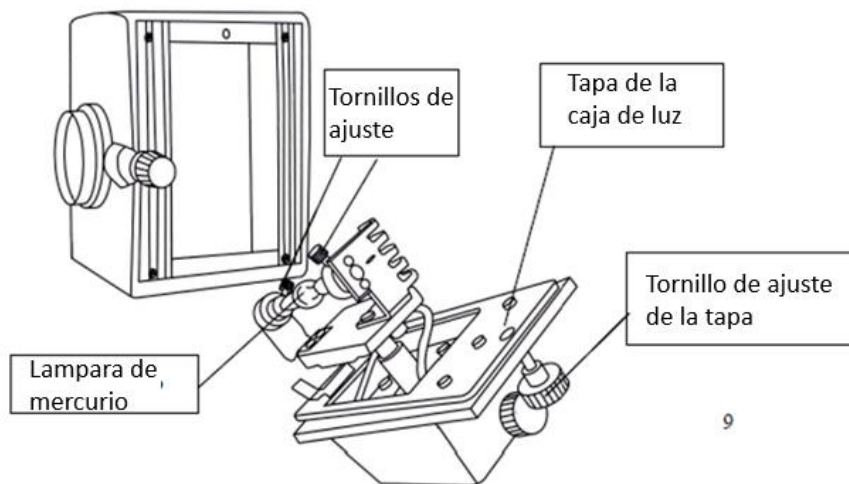


Pasos:

1. Soltar el tornillo que está situado en la parte izquierda del equipo.
2. Retirar la tapa de la caja de luz
3. Lleve guantes o un trapo de algodón para coger las bombillas, inserte la bombilla comprobando que la ha puesto en la posición correcta. No toque la bombilla con los dedos.
4. Instale de nuevo la tapa de la caja
5. Apriete el tornillo para que se quede sujeta.

c) Instalación de la lampara de mercurio

Libere el tornillo situado en la parte derecha de la caja, quite la tapa cuidadosamente porque en ella se sitúa la lampara, retírela y ponga una nueva en caso de que tenga que cambiarla y realice todo tipo de manipulación cuando este frio el equipo, después introduzca la tapa y apriete el tornillo para que quede sujeto.

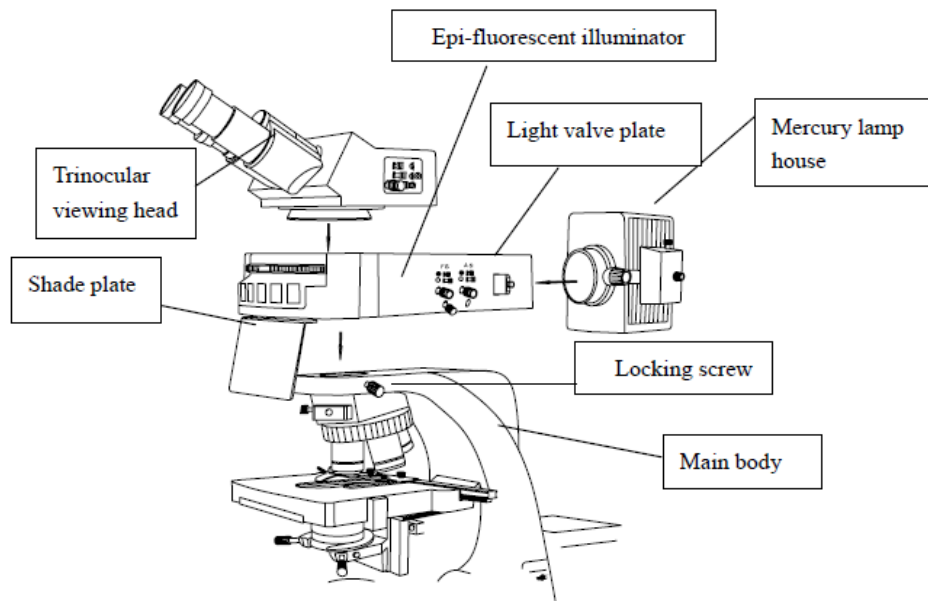


No toque la lampara de mercurio con los dedos cuando vaya a quitarla o reemplazarla, mejor cúbrala con un paño de algodón o lleve guantes cuando vaya a manipular la bombilla.

¡Cuidado!

Cuando vaya a manipular la lampara de mercurio tiene que esperar hasta que este fría y por supuesto desenchufar el equipo de la corriente.

d) Instalación del módulo de epi-fluorescencia



Pasos:

1. Suelte el tornillo de ajuste situado encima del revolver.
2. Instale el módulo de epi-fluorescencia
3. Ajuste el tornillo para que quede bien sujeto.

e) Instalación del cabezal del microscopio.

1. Suelte el tornillo de ajuste del cabezal
2. Ponga el cabezal con los oculares en la posición correcta para la observación.
3. Ajuste de nuevo el tornillo para que el cabezal quede sujeto.

f) Instalación de los objetivos

Empiece la instalación desde las lentes de menor aumento hacia las de mayor aumento, en sentido de las agujas del reloj, asegúrese de que las lentes están instaladas correctamente.

g) Instalación de los oculares

Vienen por separado envueltos para su mayor protección, introdúzcalos en los oculares quitando primero la tapa protectora de color negro que tienen los oculares, asegúrese de que los ha introducido correctamente.

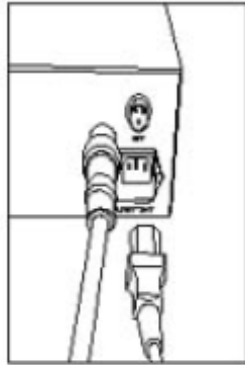
h) Conectar el cable de conexión

Manipule los cables con cuidado evitando forzarlos.

Pasos:

1. Asegurese que el equipo esta apagado
2. Conecte la fuente de alimentación a la lampara de mercurio
3. Inserte primero un enchufe en la fuente
4. Inserte el segundo a la toma de corriente.

Nota: conecte el cable de forma adecuada entre la fuente de alimentación y el equipo.

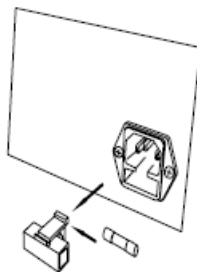


i) Reemplazar el fusible

Antes de reemplazar el fusible, quite la corriente y desenchufe los cables.

Pasos:

1. Retire la tapa que protege el fusible y saque el fusible usado.
2. Inserte el nuevo fusible y cierre la tapa.



Nota: utilice solamente los fusibles específicos para este equipo.

5. Pasos para la observación

a) Uso del microscopio de fluorescencia

1. Apague la fuente de luz transmitida del microscopio, encienda la lampara de mercurio desde la fuente de alimentación para ello primero ponga en on el botón on/off y despues presione el botón "trigger" para cebar la lampara, al principio la corriente será alta de unos 8 A o más y después cuando la lampara se estabilice estará en torno a los 4 A.
2. Espere hasta que la lampara de mercurio brille y despues cierre la válvula.

3. Cuando la lampara este estable abra la válvula.
4. Ponga la muestra en la platina, ajuste con el micrométrico y el macrométrico para enfocar correctamente la muestra, utilice primero los objetivos 4x y 10x para enfocar.
5. Dependiendo del tipo de pigmento o tinción realizada en la muestra tendrá que utilizar un filtro de excitación u otro, para ello gire el disco de fluorescencia eligiendo desde el 2 hasta el 6, en la opción 1 sería utilizado como un microscopio biológico normal. Después de elegir el filtro adecuado ajuste la imagen.
Nota: cierre la válvula de luz cuando no esté utilizando fluorescencia, la muestra no tiene que ser irradiada por la longitud de onda corta durante mucho tiempo sino, la fluorescencia desaparece.
Nota: Por favor no apague y encienda la lampara inmediatamente después, la lampara tiene que estar completamente fría antes de volver a encenderla. Después del uso apague la fuente de alimentación. Cuando este en uso utilice la válvula según desee.
6. Ajuste el diafragma
7. Ajuste el campo del diafragma ajustando los tornillos inferiores para ajustar la imagen.
8. Ajuste la apertura del diafragma.
9. Cubra con un papel el ocular, haga un agujero en el centro y observe a través de este, el tamaño de apertura del diafragma se puede ver. Mueva la apertura del diafragma para regularlo, el tamaño más apropiado es $\frac{3}{4}$ el diámetro del agujero. En este momento, no se disminuye la resolución de la lente pero puede aumentar el contraste para la observación.

Notas:

- Cuando esté usando el equipo no toque la lampara de mercurio para evitar quemarse.
- Para usar el equipo debe instalar la pantalla protectora de color naranja y ver la muestra a través de ella para evitar dañar su vista.
- Si va a detener la observación, cierre la válvula de luz inmediatamente.
- Para insertar el cable manipúlelo desde la clavija evitando dañar el cable.
- Empiece a observar cuando la lampara de mercurio este estable, si se va la corriente o se apaga la fuente de alimentación no encienda inmediatamente, tiene que esperar a que la lampara se enfríe.

b) Uso de la lampara halógena

1. Cierre el diafragma o apague la lampara de mercurio, y encienda la luz halógena, ajuste la intensidad deseada.
2. Ajuste el disco de fluorescencia en la posición "O".
3. Ponga el objetivo 10x.
4. Ponga la muestra sobre la platina.
5. Rote el eje XY situado a la derecha para ajustar la muestra en la posición que desee bajo la luz.
6. Observe primero la muestra con el ocular derecho y luego ya puede ajustar mas finamente para enfocar bien la muestra.
7. Regule la distancia interpupilar.
8. Regule el filamento, quite el ocular para ajustar el filamento hasta que vea un filamento claro en el centro.
9. Inserte el filtro en el campo de luz.
10. Regule el diafragma hasta que sea un poco mayor que el campo.

11. Regule la apertura del diafragma bajo el condensador. Cubra con un papel el ocular, haga un agujero en el centro y observe a través de este, el tamaño de apertura del diafragma se puede ver. Mueva la apertura del diafragma para regularlo, el tamaño más apropiado es $\frac{3}{4}$ el diámetro del agujero. En este momento, no se disminuye la resolución de la lente pero puede aumentar el contraste para la observación

6. Cuidado y mantenimiento

- Cuando vaya a limpiar todos los elementos de cristal, primero tiene que retirar el polvo de la superficie soplando y después ya puede limpiar la superficie con un algodón, limpie con cuidado el aceite o las huellas dactilares de la superficie de la lente con una solución con éter al (70%) y alcohol (30%).
- Cuidado. El alcohol y el éter son líquidos inflamables tienen que utilizarse con cuidado, y recuerde tener bien ventilada la habitación.
- Para limpiar otras partes del microscopio utilice un paño suave y sin pelos, humedézcalo con un poco de limpiador y limpie la superficie.
- Por favor no rompa ninguna parte o elemento del microscopio porque si se dañan puede no funcionar correctamente.
- Cuando no vaya a utilizar el equipo cúbralo con la funda de plástico incluida.

¡¡Cuidado!!

Si el microscopio no es debidamente utilizado como se indica en este manual puede poner en riesgo el equipo y al usuario. Por favor utilice el equipo como se aconseja en este manual.

7. Resolución de problemas

De acuerdo con las distintas técnicas, se pueden encontrar los siguientes problemas elija la solución más adecuada y si no es posible solucionar el problema contacte con nuestro servicio técnico.

Problema	Causa	Solución
No hay iluminación	Se ha fundido la bombilla	Cambio de bombilla
	Se ha fundido el fusible	Cambio de fusible
	Cable no conectado	Compruebe el enchufe
Hay luz pero el campo esta oscuro	El brillo no está ajustado	Ajustar la intensidad
	Apertura del diafragma demasiado pequeña	Ampliar la apertura del diafragma
	Visión de campo demasiado pequeña	Ampliar el campo de visión
Ver suciedad o polvo en el campo de visión.	Suciedad o polvo en los oculares	Limpiar todo

Visibilidad pobre: La imagen no está clara Contraste malo Resolución mala	El objetivo no esta en la posición correcta	Asegúrese de que el objetivo está en la posición correcta.
	Apertura del diafragma insuficiente	Aumentar apertura del diafragma
	Objetivo sucio	Limpie objetivos
	Suciedad en la muestra	Límpiala
Imagen ilegible	La muestra no sube de nivel	Suba la muestra
	Posición incorrecta del objetivo	Asegurese de que el objetivo esta en la posición correcta.
	Luz desviada	Ajuste la fuente de luz y centrela
Intensidad de la luz, brillo, campo de visión pequeño, iluminación variable	Luz desviada	Ajuste la fuente de luz y centrela
La bombilla falla, a veces no ilumina	La bombilla se va a fundir pronto	Cambie la bombilla
	Fallo en la conexión	Compruebe que todo está conectado correctamente
Bombilla quemada de forma inmediata	Se ha utilizado una bombilla que no es la adecuada	Utilize la bombilla adecuada
Después de realizar el enfoque de la muestra se desenfoca rápidamente	Enfoque grueso	Ajuste la tensión con el mango manual
Imágenes no enfocadas	Enfoque inexacto	Regule la posición del enfoque
Enfoque distinto por un ocular y por el otro	Distancia interpupilar no ajustada	Ajuste la distancia interpupilar
	No se han ajustado las dioptrías	Ajuste las dioptrías
	Los oculares izquierdo y derecho no tienen el mismo aumento	Utilize el mismo tipo de ocular para ambos ojos
	Todavía no ha ajustado completamente algún elemento para ver correctamente.	Para enfocar utilice un objetivo de 4x o 10x y enfoque la muestra después concéntrese en un área de interés y cambie de objetivo, una vez ahí ajuste el micrométrico.

English

1. INTRODUCTION	20
a) Manual use	20
b) Application of fluorescent microscope	20
c) Principle of fluorescent microscopy	20
2. BEFORE USE THE EPI-FLUORESCENCE MICROSCOPE	21
a) Place of installation	21
b) Replacing the light bulbs	21
c) Transport	22
d) Sample specimen	22
e) Unpacking the equipment	22
3. DESCRIPTION OF EACH PART OF MICROSCOPE	23
a) Principal elements	23
b) Size and weight	24
c) Control and adjust of microscope elements	24
d) Basic parameters and specifications of the microscope	26
e) Specifications of fluorescent device	27
f) Optical performance and characteristics	27
4. INSTALLATION	28
a) Installation of lamp house	28
b) Installation of halogen lamps	29
c) Installation of mercury lamp house	30
d) Installation of mercury lamp	30
e) Installation of epi-fluorescent illuminator	31
f) Installation of microscope head	31
g) Objective installation	31
h) Eyepiece installation	31
i) Connecting the power cable	31
j) Replacing the fuse	32
5. OBSERVATION STEPS	32
a) The use of fluorescent microscope	32
b) The use of down illumination	33
6. Safeguard and maintenance	34
7. TROUBLESHOOTING GUIDE	35

1. INTRODUCTION

a) Manual use

This operation manual is for 158/358 five wave band Epi-fluorescent microscope. To ensure safety, get the optimal performance and make you fully familiar with the usage of this microscope, we recommend that you should read this handbook carefully before operation.

b) Application of fluorescent microscope

Five wave band Epi-fluorescent microscope model 158/358 is used in fluorescent microscopy techniques, including the fluorescence staining and immunofluorescence.

Fluorescence staining method can show the different components inside the cells specially the two kinds of nucleic acid (DNA and RNA), and it has a stronger specificity, so this technique is treated as a good cytochemical method.

Immunofluorescence is a method which is combined with the technique of immunology and fluorescent staining; it has immune specificity and the sensitivity of fluorescence methods. It is widely used in the field of iatrolgy, pathology and auto-immune disease diagnosis.

c) Principle of fluorescent microscopy

There are many substances in nature that emit longer wavelength light (fluorescent light) when they are irradiated by shorten wavelength light (UV, purple, blue or green light); this is called photo-induced fluorescence. After collected specimen is treated with fluorescent staining, it is excited with short wavelength light to obtain fluorescence and adapt for the research of collected specimen.

Fluorescence dye emits light thus appearing color that can be observed in a dark background; this technique is very sensitive and can be perceived with only a little of light under the microscope. This is why fluorescent dye has become a complex marker, it makes the marked antibody not only have particular activity, but also be seen by naked eye under the fluorescent microscope. Only a extremely diluted pigment of fluorescent staining is required. As a result, it provides a widely use for observing live organs and researching the process and micro-structure functional organs and the process of a certain metabolic change.

In addition, the fluorescent staining operation is very simple, short time, and easy to make specimen, specially suitable for quick work, such as the rapid diagnosis of infectious diseases.

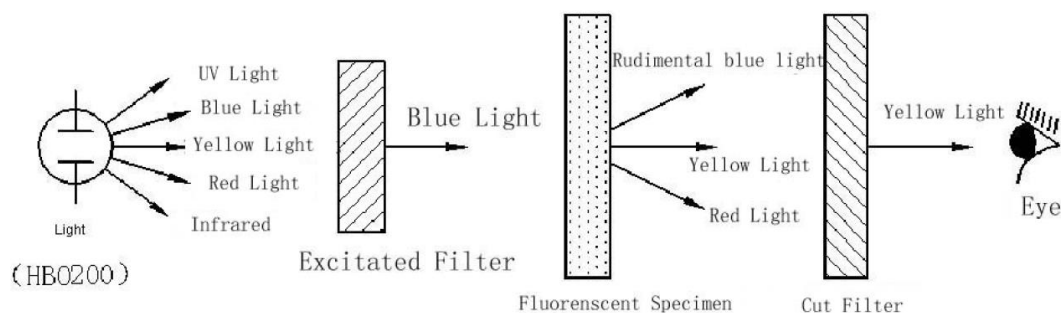


Figure 1: The principle of excitation fluorescence.

The light source: super high pressure mercury lamp which provides strong enough exciting light (shorter wavelength light) for excitation of fluorescent specimen.

Exciting filter: only pass the excitation light of corresponding specimen, the rest of light is cut off.

Fluorescent specimen: the specimen dyed with the fluorescent pigment.

Cut filter: blocks the excitation lights through the specimen and make observation easier.

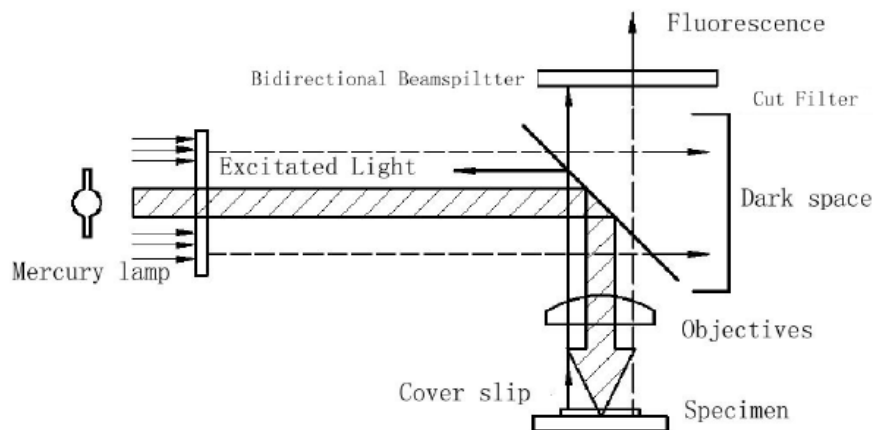


Figure 2: Diagram of epi-fluorescence

2. BEFORE USE THE EPI-FLUORESCENCE MICROSCOPE

a) Place of installation

- Microscope must be placed on a firm and flat desktop or working table.
- Microscope must not be placed under direct sunlight and also keep it away from the wall 20 cm.
- When connecting microscope with power supply, turn the main switch to "off" position, make sure the inlet voltage must be in compliance with label marked on the microscope, then plug into the electrical outlet. Please pay attention to make good earth connection; otherwise, it would influence the electrical safety and instrument performance.
- Please cover the microscope with dustcover when it is not in use
- Operating environment: the highest elevation is 2 meters. The ambient temperature is 5-35°C. the relative humidity <80%

b) Replacing the light bulbs

- When replacing the light bulbs, shut off the main switch and pull the power plug out from the electrical socket; never pull power cord directly with hand by force.
- The bulb in light cabin can be replaced after it is cool.

c) Transport

- Microscope is a precision optical instrument, please operate carefully and avoid any type of sharp shock or impact.
- When moving microscope, you should hold both the arm of main body and base of microscope with 2 hands. Holding the microscope from the viewing head is prohibited.
- The microscope cannot be moved from a low-temperature environment into a high-temperature environment suddenly since the optical components would go moldy; that would cause the image not be focused sharply and influence the observation.

d) Sample specimen

- Process the collected sample with professional and technical treatment, and make the prepared specimen for microscope observation.
- Preparing a number of materials and appliances: such as alcohol, ether reagents, gauze, cotton, tweezers and pliers, rubber air blower, and so on. Desktop should be clean and tidy, don't put things nothing to do with work.

Warning !

If the microscope is not operated as specified by this manual, it may be hazardous to the safety of the users and may damage the equipment. Please always operate microscope in accordance with this handbook.

e) Unpacking the equipment

Unpack the equipment carefully, open the box and then the individual packages with porexpan protection.

Make sure that your equipment is complete, the elements included are:

- a) Eyepieces
- b) Trinocular viewing head (the third one for camera)
- c) Epi-fluorescent illumination
- d) Mercury lamp
- e) Down lamp house (halogen).
- f) Microscope body
- g) Microscope platform (grey)
- h) Mercury lamp power control box
- i) Protective screen (orange)
- j) Connection cables
- k) Filter
- l) This user's manual
- m) Accessories: plastic holster, 1 dipping oil bottle, 1 spare lamp, filters (blue, green yellow) 32mm diameter, 2 connection cables, cleaning kit 5 in 1.

3. DESCRIPTION OF EACH PART OF MICROSCOPE

a) Principal elements

In the next scheme there are all the important elements of the microscope numerated from 1 to 12.

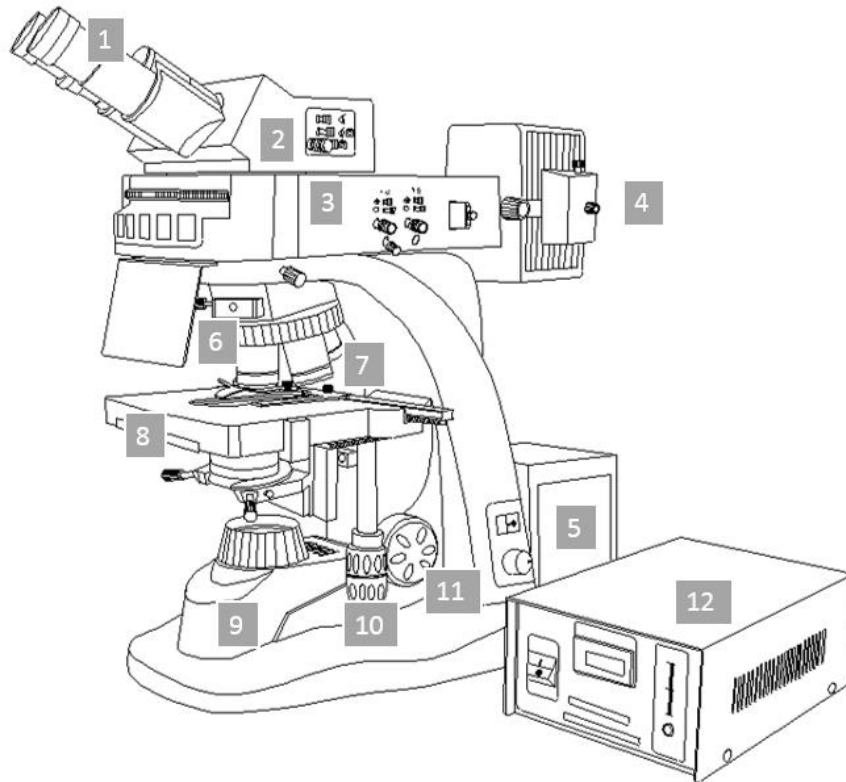


Figure 3: Microscope elements; 1. Eyepieces 2. Trinocular viewing head 3. Epi-fluorescent illumination 4. Mercury lamp 5. Down lamp house 6. Nosepiece 7. Objectives 8. Stage 9. Microscope body 10. XY coaxial adjusting knob 11. Coarse and fine focusing adjusting knob 12. Mercury lamp power control box.



Figure 4: Microscope photograph

b) Size and weight

The microscope size is 45x24x59 (LxWxH). The mercury lamp control box size is 24x13x15 (LxWxH).

The weight of the microscope is 14.5 kg and the mercury control box is 2.4kg. The total weight of the equipment is 17 kg approximately with all the package.

c) Control and adjust of microscope elements

In the next figure there are the principal points to adjust the equipment to our work.

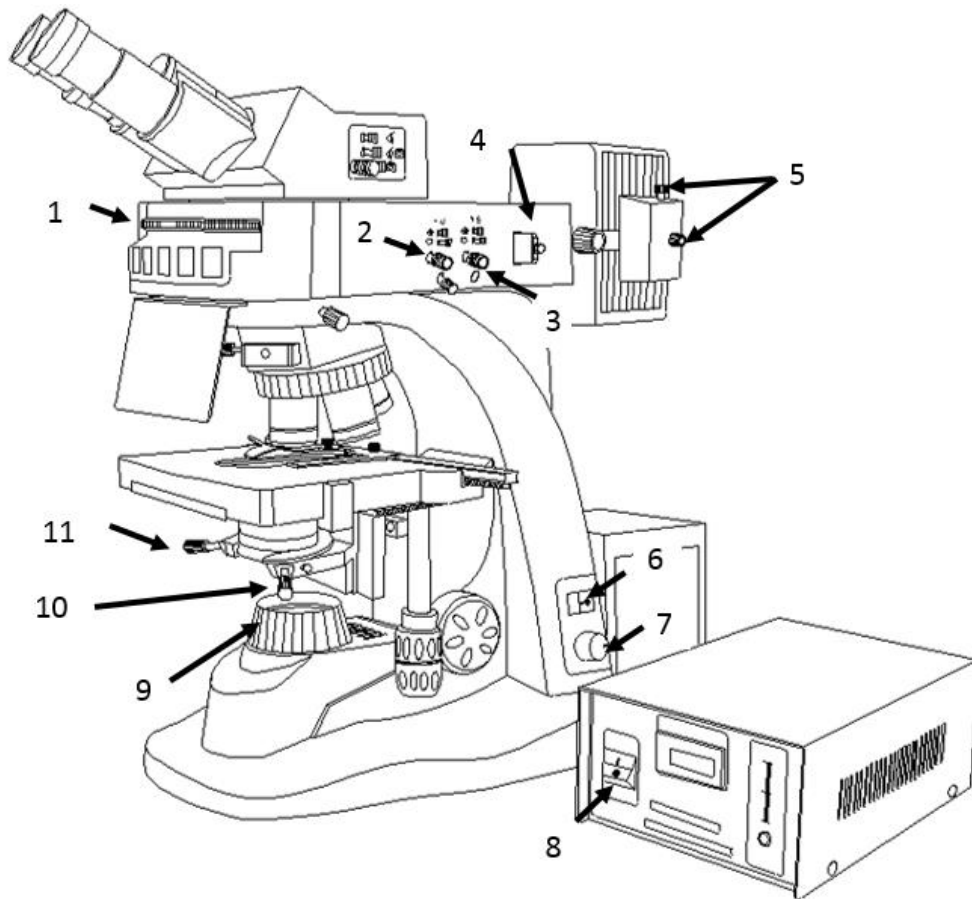


Figure 5: Microscope elements; 1. Fluorescent group switch disc 2. Field (stop) diaphragm adjusting rod 3. Aperture stop (diaphragm) adjusting rod 4. Light valve plate 5. Filament adjusting knob for upper/down and left/right 6. Transmitted light power switch 7. Brightness adjustment knob 8. Mercury lamp power switch 9. Transmitted light field diaphragm adjusting ring 10. Transmitted light aperture diaphragm adjusting rod 11. Centering screw

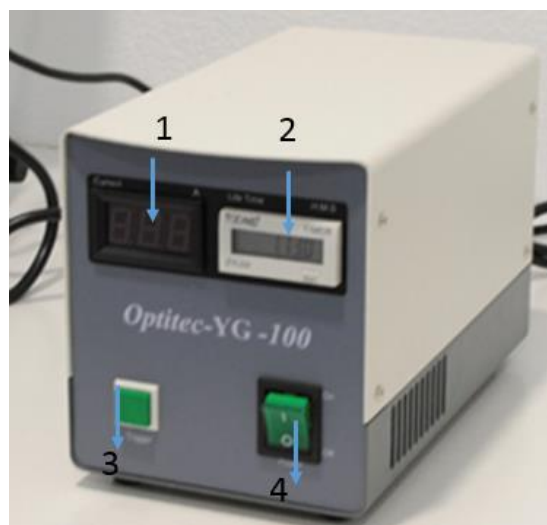


Figure 6: Mercury lamp power control box: 1. Current (A), 2. Life time (timer), 3. Trigger 4. On / off

The input current is 100-240 V AC for both equipments (microscope and box) and 50/60 Hz.

d) Basic parameters and specifications of the microscope

○ Eyepieces:

Category	Magnification	Visual field diameter(mm)
Super wide field plan eyepiece	10X	Φ 22

○ Objectives :

Category	Magnification	Numerical Aperture (NA)	System	Working Distance (mm)
Plan infinite big N.A. fluorescent objectives	4X	0.15	dry	21.6
	10X	0.35		2.9
	40X	0.75		0.6
	100X	0.90		0.62

○ Total magnification of microscope :

Objective	Eyepiece	Microscope tube	Magnification
4X	10X	1X	40X
10X			100X
40X			400X
100X			1000X



Figure 6: Detail of the objectives and fluorescent disk.

- **Mechanical tube length** : ∞
- **Microscope tube lens** : Focal length (f) = 200 mm
- **Coarse and fine focusing adjustment range** : 25 mm
- **The entire fine focusing adjustment division value** : 0.002 mm
- **Mechanical stage** : Size 180x160 mm. Move 76 mm horizontal, 50 mm vertical, graduation 0.1 mm

e) Specifications of fluorescent device

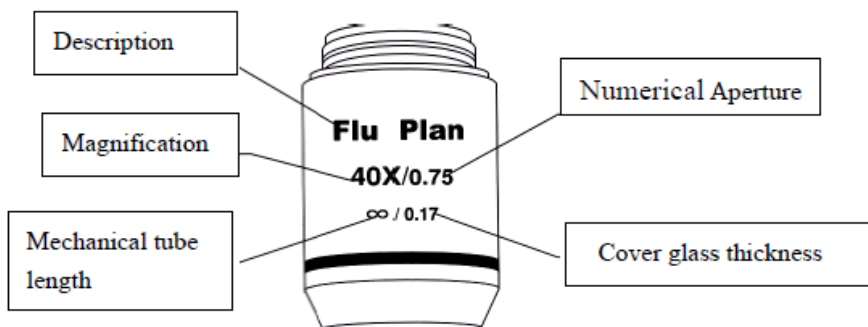
- The magnification of device system is 1X
- Fluorescent modules

G	B	BV	V	U
EX510--560 DM575 BA590	EX450--490 DM505 BA520	EX400--440 DM455 BA470	EX380--420 DM430 BA450	EX330--380 DM400 BA420

- Short wavelength global mercury lamp GCQ100 20V/100W.
- Input voltage of power supply box: 220 V/AC

f) Optical performance and characteristics

Structural features and performance parameters marked on the objective lens, see below



The optical characteristics combination of eyepiece and objectives listed in the following table

Optical characteristics		4X	10X	40X	100X	Remark
Numerical Aperture		0.15	0.35	0.75	0.90	
Mechanical tube length		∞	∞	∞	∞	
Thickness of cover slip		0.17	0.17	0.17	0.17	mm
Color circle mark		Red	Yellow	Blue	White	
System		Dry	Dry	Dry	Dry	
Working distance		21.6	2.9	0.6	0.62	mm
Viewing field diameter		Φ 6	Φ 2.4	Φ 0.60	Φ 0.24	mm
Resolution		2.24	0.96	0.45	0.37	micron
10X Eyepiece	viewing field diameter	Φ 22	Φ 22	Φ 22	Φ 22	mm
	Total magnification	40	100	400	1000	times

4. INSTALLATION

a) Installation of lamp house

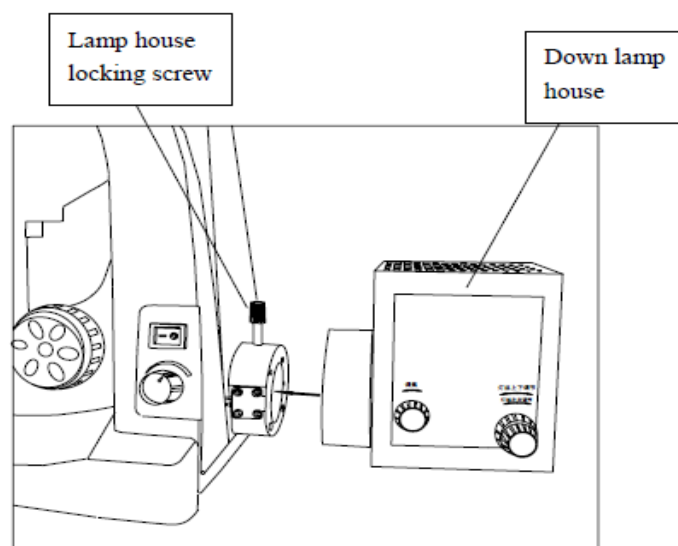


Figure 7: Lamp house

Steps:

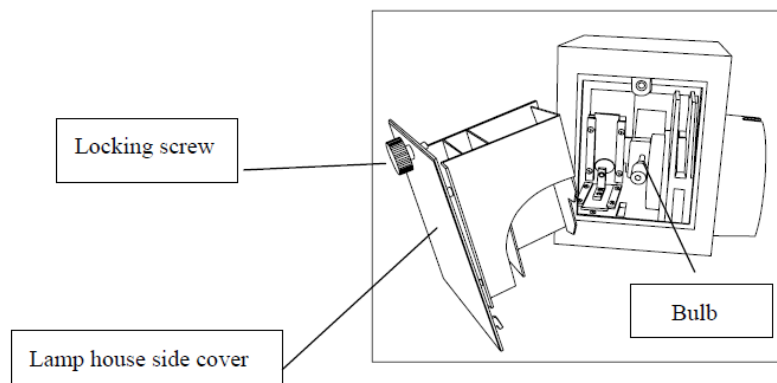
1. Release the lamp house locking screw
2. Insert into lamp house as the direction of the arrow
3. Lock and tighten the locking screw

b) Installation of halogen lamps

The down illumination light source of this microscope is 12V/50W bulb.

Warning!!

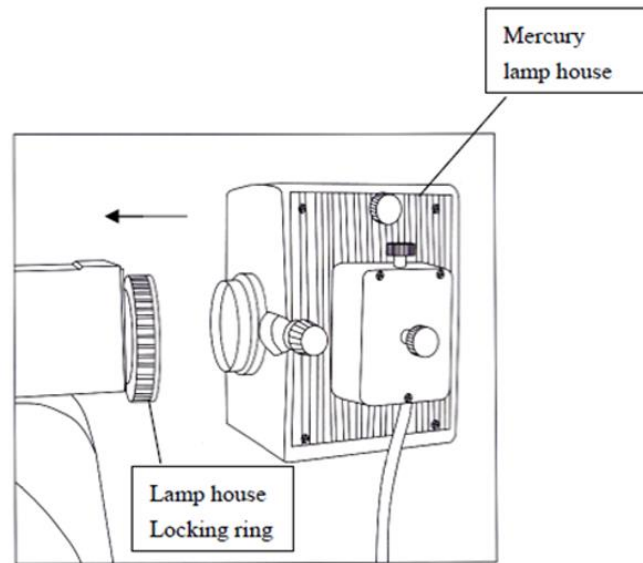
Whenever replacing the bulb, first turn off the main switch and wait for complete cool of light bulb, the lamp socket and house.



Steps:

1. Release the locking screw (left side of the box)
2. Remove the lamp house side cover
3. Wear gloves or a piece of gauze to hold bulbs; insert the bulb pins into lamp holders and make sure the pins are inserted completely.
Do not touch bulb with our fingers; if occasionally fingerprint is left on the light bulb, use a soft cloth to clean
4. Install the side cover of the lamp house
5. Tighten the locking screw

c) Installation of mercury lamp house

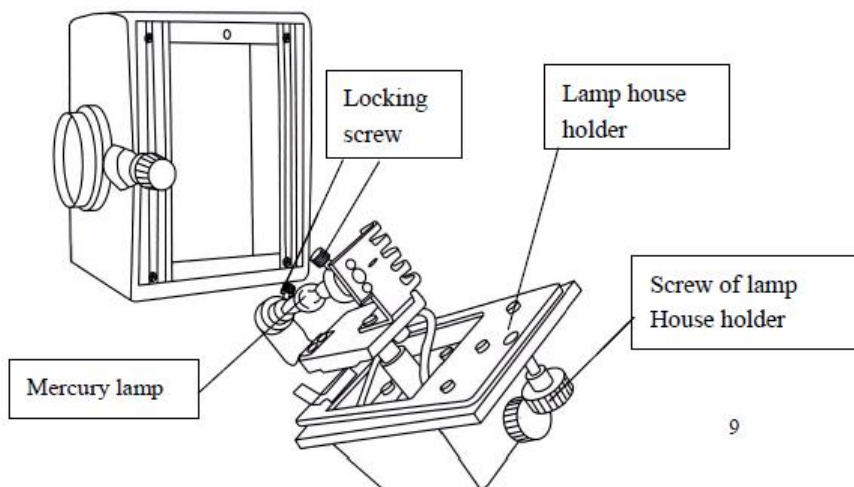


Steps:

1. Release the lamp house locking ring
2. Insert into lamp house as per the direction of the arrow
3. Lock and tighten the locking ring

d) Installation of mercury lamp

release the screw of lamp house holder and remove the lamp house holder carefully, release the locking screw with screwdriver and put into the lamp tube (please note the positive and negative pole of lamp tube), tighten the locking screw, then put the lamp house holder into the lamp house and tighten the screw of lamp house holder. Please be careful in operation and don't damage the lamp tube.



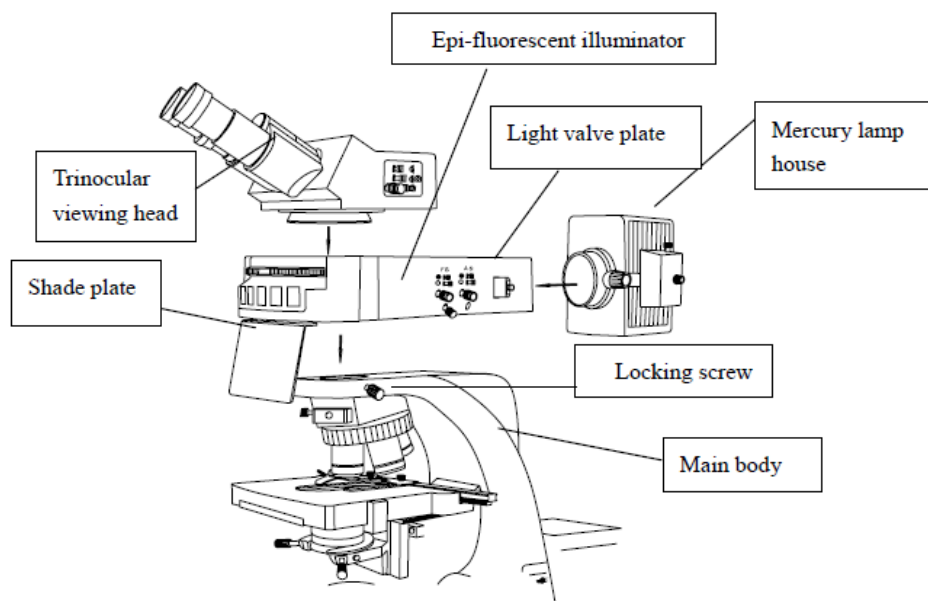
9

Do not touch Mercury lamp tube with bare fingers when replacing the mercury lamp (cover the whole glass tube with a cotton cloth or wear gloves when changing the mercury lamp).

Warning!!

Whenever replacing the mercury lamp tube, you have to wait for the complete cool of lamp house and pull out the power plug.

e) Installation of epi-fluorescent illuminator



Steps:

1. Release the locking screw
2. Install the epi-fluorescent illuminator
3. Tighten the locking screw

f) Installation of microscope head

Steps:

1. Fully release the fixing screw of microscope head
2. Rotate observation tubes of microscope toward front
3. Tighten the locking screw to fix the microscope head

g) Objective installation

Mount into the nosepiece the objective lenses from low magnification to high magnification, in clockwise direction; make sure that the mounted objective lenses are firmly tightened.

h) Eyepiece installation

Take off dustproof covers from eyepieces and insert eyepieces into the eyepiece tube; make sure the eyepieces are properly inserted.

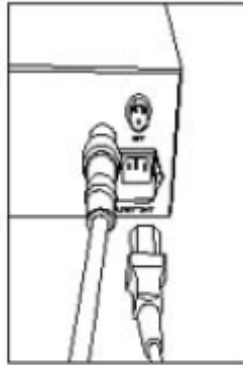
i) Connecting the power cable

Winding and bending easily damage power cable, do not pull strongly by force

Steps:

1. Make sure that main switch is off
2. Connect power control box and mercury lamp house
3. Insert one plug of power cable into the socket
4. Then insert the other plug of power cable into the power outlet

Note: connect the power cable properly and ensure that the earth cable is connected correctly between power supply and instrument.

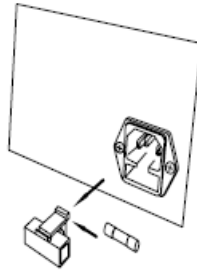


j) Replacing the fuse

Before replacing the fuse, turn off the main switch and unplug the power cables.

Steps:

1. Pull out the fuse holder and take out the used fuse
2. Insert the new fuse



Note: use only specified rate fuse

5. OBSERVATION STEPS

a) The use of fluorescent microscope

1. Shut off the microscope transmitted light source, turn on the switch of mercury lamp power control box, first press on/off button and then press on trigger button to switch on the lamp, the current will be first 8A and then it will be decreasing until 4A more or less.

2. Wait for mercury lamp shining after starting, then close the light valve plate.
3. When the mercury lamp shines fully, open the light valve plate.
4. Place the fluorescent specimen (which is dyed by fluorescent pigment) on the stage, then adjust focus to get image of fluorescent specimen by using the objective 4x or 10x first.
5. As required depending on the fluorescent specimen pigment, choose the corresponding fluorescent light filter group (rotating fluorescent group switch disc from 2 to 6) and adjust fine focusing knob to get the image of fluorescent specimen in dark background through eyepieces.

Note: please close the light valve when you don't need to observe fluorescence; the specimen should not be irradiated for long time by short wavelength light, otherwise, the fluorescence will be faded.

Note: please don't turn on and shut off the mercury lamp in short time, the lamp must be fully shined for a while after starting. After use and shut off the power supply, please don't turn the lamp on again immediately, wait at least until the lamp is completely cooled. When it is in use, open or close the mercury lamp light source by inserting and removing the light valve.

6. Adjusting the field diaphragm
7. Adjusting the field diaphragm center adjusting screw makes the field diaphragm image move to the field center. Pull the field diaphragm adjusting rod to make the field diaphragm a little bigger than field of view.
8. Adjusting the aperture diaphragm
9. Take off one of the eyepieces and cover with a paper the top of the eyepiece tube; make a small hole in the center and observe through the hole with the eye, the size of aperture diaphragm (polygon) can be seen inside. Move the aperture diaphragm adjusting rod to regulate it, the most appropriate size is about $\frac{3}{4}$ de diameter of the back focusing ground of objective lens (circular hole). At this time, it does not diminish the resolution of objective lens, but you can increase the contrast and make brightness of eyeshot suitable for observation of eyes.

Notes



- When using, don't touch the mercury lamp house to avoid burning skin
- In operation, the anti-uv shade plate (orange screen) must be installed, so as to avoid damage in eyes.
- Interrupt the operation, close light valve plate immediately
- To insert and pull the power cable, it must be held by the plug, don't pull the power cable.
- Start observing once the mercury lamp is fully shined. If the power supply is shut off, please don't turn on the lamp again immediately; wait until it is completely cooled.

b) The use of down illumination

1. Close the diaphragm plate or shut off the mercury lamp power, turn the transmitted light power switch on, and adjust the brightness through light intensity adjusting knob.

2. Set the fluorescent group switch disc at the neutral gear position "O".
3. Rotate the nosepiece and place 10X objective in the light path.
4. Place the samples on the stage.
5. Rotate XY coaxial hand wheel to move the sample into the light path.
6. Observe with the right eye through the right eyepiece and turn coarse focusing knob to focus the sample; then adjust fine focusing knob to get a clear and sharp image.
7. Observe with the right eye through the left eyepiece and move the diopter adjusting ring to make image clear in the left eyepiece. At this time, the image in both eyepieces is in focus and clear
8. Regulate the eyepiece interpupillary distance.
9. Regulate filament center: remove one eyepiece and adjust filament focusing knobs and filament upper/down, left/right adjusting knob until a clear filament image is observed in the middle of the back focusing ground of objective lens
10. Observe with different magnification objectives and adjust the light intensity to the required level. Since objectives are guaranteed the parfocal accuracy, to get a clear image it is just necessary to adjust the fine focusing knob.
11. Insert the selected light filter into light path.
12. Regulate field diaphragm on the base until the field diaphragm is a little bigger than field of view.
13. Regulate aperture diaphragm under condenser; take off one of the eyepieces and cover with a paper the top of the eyepiece tube; make a small hole in the center and observe through the hole with the eye, the size of aperture diaphragm (polygon) can be seen inside. Move the aperture diaphragm adjusting rod to regulate it, the most appropriate size is about $\frac{3}{4}$ diameter of the back focusing ground of objective lens (circular hole). At this time, it does not diminish the resolution of objective lens, but you can increase the contrast, and make brightness the eyeshot suitable for observation of eyes.

6. Safeguard and maintenance

- When cleaning all glass components, first blow the dust off the surface and then gently clean with gauze; please wipe off oil or fingerprints carefully on the lens surface with a few ether (70%) and alcohol (30%) mixed solution (dip the gauze or absorbent cotton moistened with this organic solvent).
- Warning! As ether and alcohol are flammable liquids, they must be used with care; pay attention not to make these chemicals close to the fire and EDM (electrical discharge machining) source, such as switch operation in the electronic equipment. Remember to use these chemicals only in a well-ventilated room.
- To clean other parts of microscopes use a soft hairless cloth; dip a small amount of neutral cleaning agents and then wipe off the dirt.
- Please don't break down any part of the microscope, which will damage the microscope and lead to low function of performance.

Warning !

If the microscope is not operated as specified by this manual, it may be hazardous to the safety of the users and may damage the equipment. Please always operate microscope in accordance with this handbook.

7. TROUBLESHOOTING GUIDE

According to different operation method, through it is not a fault, but will not give full performance of the microscope. After the issue is occurred, please find out the reason further.

Phenomenon	Causation	Disposal
No illumination	Bulb burn out	Change bulb
	Fuse burn out	Change fuse
	power cable not connected	Check the power connector
There's Light, but viewing field is dark	Brightness is not adjusted	Adjust light intensity knob
	Aperture diaphragm shrink too small	Enlarge the aperture diaphragm
	Viewing field diaphragm shrink too small	Enlarge the viewing field Stop (diaphragm)
See dirt or dust in the viewing field	Some dirt and dust on the eyepieces and specimen	Clean all
Poor visibility : Image is not obvious The contrast is bad Resolution is bad	Incorrect objective position in the optical path	To ensure the objective position is correct
	Aperture diaphragm shrink too small	Enlarge the aperture stop (diaphragm)
	Group of objective dirty	Clean objectives
	Dirt and dust on the specimen	Clean it
Image illegible	Sample didn't level up	Level up the sample
	Incorrect objective position in the optical path	To sure the objective position correct
	Light source center deflected	Adjust center of light source
Light intensity turns to high level, brightness field of view little changed, uneven lighting	Light source center deflected	Adjust center of light source
Bulb Sometimes lighting, sometimes dark	Light bulb about to burn out	Change bulb
	Pins of bulb not connected	Check connecting
Light bulb burned immediately	Use wrong bulb	Use specified bulb

Stage automatically decline or after fine adjusting, rapidly defocus	Coarse focusing adjusting tension is not enough	Adjusting tension hand wheel
Images not focused to sharp position and when coarse focusing, the stage can not be adjusted upward	Coarse focusing stop is inaccurate	Coarse focusing stop position regulating
Field of view is observed differently under left and right eye	Pupillary distance adjusting incorrectly	Adjust the pupillary distance
	Diopter adjusting incorrectly	Adjust diopter
	Eyepiece of left and right side is in different magnification	Use the same rate eyepiece
	You have not accommodated to the microscope's observation yet	Observation from the eyepiece, look at the entire field of view prior to concentrated in specimen area. Before observe, looking upward or beyond would also be useful.