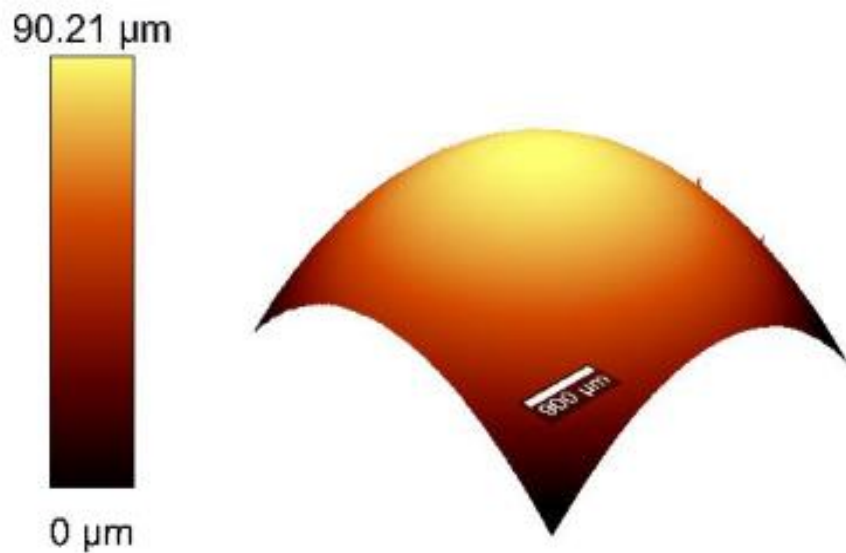


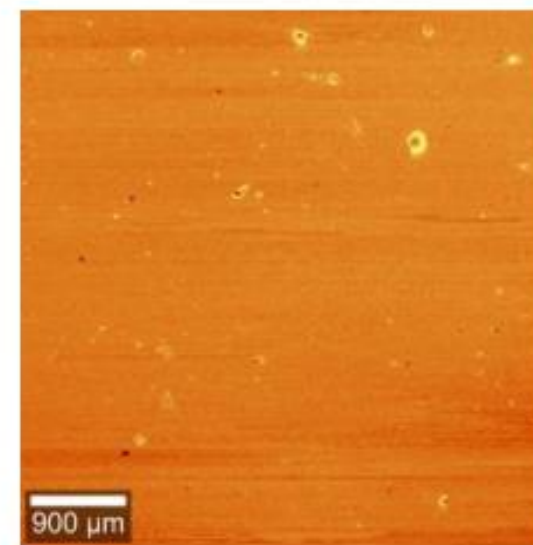
TrueSurface 3



样品轮廓图 (TS)



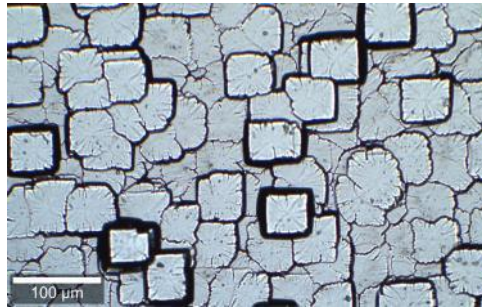
普通共聚焦拉曼成像



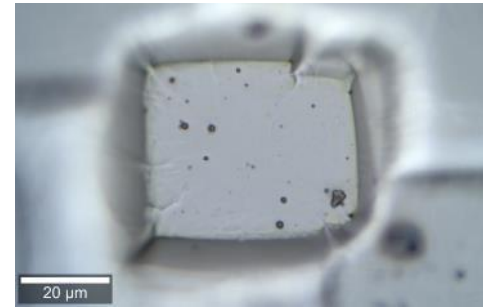
共聚焦拉曼成像+TS

物镜选择（关键）

- 1、只适用于20x及以上物镜；
- 2、对于锐利边缘或者倾斜角很大的区域，建议使用数值孔径NA较大物镜(高倍物镜)；因为低倍物镜(NA较小)的信号收集范围较小，不容易收集锐利边缘或者倾斜角很大的区域的光反射反馈信号；



20x/0.5 NA



100x/0.9 NA

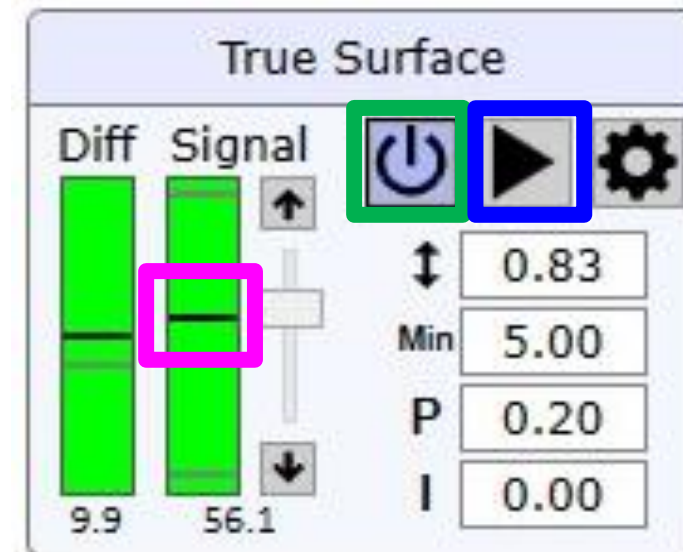
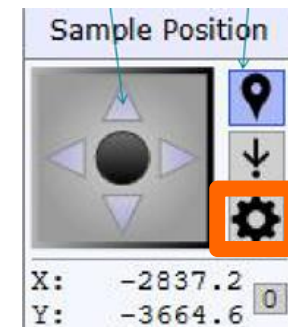
- 3、样品表面粗造度是决定物镜的关键，因为景深外的反馈信号很难被物镜收集到，因此不同粗造度需匹配合适景深（数值孔径NA）的物镜。物镜放大倍数越小，其景深适用于更粗造的表面，反之，倍数大的物镜适用于粗造度小的表面。

100x Objektiv: +/-4 µm
50x Objektiv: +/-16 µm
20x Objektiv: +/-100 µm

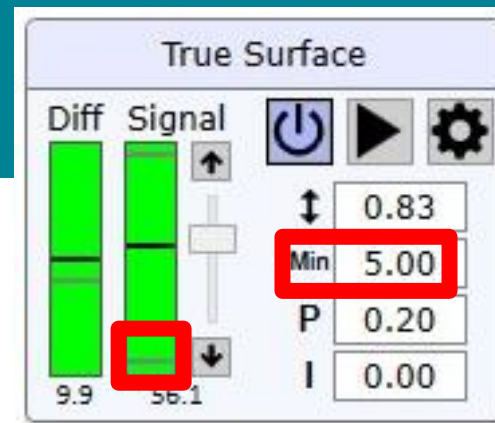
- 因此，低倍物镜适用于粗造或者台阶差较大的表面，高倍物镜适用于粗造度小或者锐利边缘或者倾斜角很大的区域。

TrueSurface 3 操作步骤

- 1、根据采谱/成像区域的粗造度（非大范围的高度差）选择合适的物镜，并将**S的范围**调节到合适数值（推荐物镜工作距离的1/3，切记结束之后恢复到默认值100um）；
- 2、聚焦到采谱成像区域大概的中间高度位置，该位置尽量平滑；
- 3、将S设置成0；
- 4、激活TS**开关**，并点击**开始按钮**；
- 5、将**信号强度(Signal)棒**调节至中间位置(~50%，对于成像，建议在成像区域多试几个位置，确保大部分位置的信号棒位置在中间)，将P值调节为0.5；
- 6、打开激光光斑，调至0.1mw，观察光斑是否聚焦且最小；
- 7、如果不是最小，通过键盘上下键调节“Focus Shift”（竖直双箭头）的数值，直至光斑达到最小，该参数可以使用；
- 8、移动到其它不同位置，观察TS是否一直聚焦（光斑保持最小），同时注意信号强度(Signal)棒的变化；
- 9、在进行成像前，建议打开”Oscilloscope”，再次调节“Focus Shift”数值，将关注的拉曼信号峰调节到最大；
- 10、进行采谱/成像。



注意事项（如果TS效果不好，参考以下进行调节和优化）



1、考虑物镜是否选择合适；

2、P值是否合适：

- 1)、P值越大，聚焦反馈越快，更适合粗造的表面，但是过大会产生共振，显微镜会出现噪声；
- 2)、一般地，建议P值范围设置为0.2~0.6之间；
- 3)、如果成像速度较快，比如0.05s，需要较快的聚焦反馈速度，可以使用较大的P值，比如0.6甚至更大，但是需要注意共振现象；如果成像速度较慢，比如1s甚至更久，可以选用较小的P值，比如0.2-0.3。

4、I值：一般为0，如果是粗造度非常小、平滑的倾斜/弯曲样品，可以设置为0.01~0.02；

5、**最低信号强度(Min)：**

- 1)、如果信号强度棒低于最低信号强度（即没有收集到足够的反馈信号，会变红），为了保护物镜，反馈会自动停止，直到反馈信号恢复；
- 2)、与此同时，在遇到空洞或者粗造度超出物镜景深的位置时，由于收集不到有效信号，反馈已停止，不会导致整个TS的失败，直到正常区域时，TS又恢复反馈；
- 3)、对于一般的表面，设置5即可，对于有深孔或者样品边缘时，设置大一些(比如12~20)，以减少TS失败概率。

6、“Min. Time for Retrace [s]” (Large area scan / Image Scan)，由于成像返程过程，TS也会一直运行，为了提高TS成功率，对于大范围(比如>100um)的成像，建议设置成1.5-2s，甚至更大；对于较小的成像0.5-1s就可以。

其它注意事项

- 1、TS利用独立的反馈光进行Z轴的反馈调节，某些颜色较深（比如黑色）的样品可能会吸收该反馈光，导致TS运行失败；
- 2、对于非常透明的样品，由于反馈光无法反射回来，导致收集到的信号低于最低信号强度(Min)，也会导致TS无法反馈；
- 3、TS反馈光可能会对某些不耐热样品造成影响，需提前进行观察（但此现象很少见）。