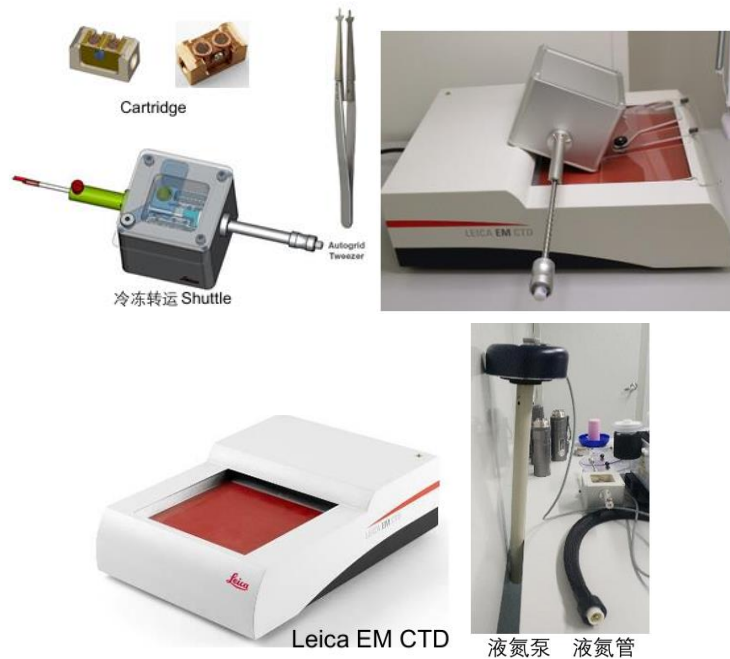


Leica Cryo-CLEM 冷冻荧光显微镜操作指南

有任何不懂的问题请咨询管理员！

1. 开机前准备

- 1) 检查液氮杜瓦瓶是否干净、干燥，液氮灌注（25L 液氮可以使用 24h 左右）。
- 2) 所有用到的工具如：鸭嘴镊（Autogrid Tweezer）、夹具（Cartridge）、冷冻转运 Shuttle 以及其他可能用到的用于液氮操作的小工具，置于 Leica EM CTD 上烘干 15min 以上。
- 3) 液氮泵和液氮管常温风吹 10min 以上，并保持干燥。
- 4) 提前打开除湿机。



2. 开机

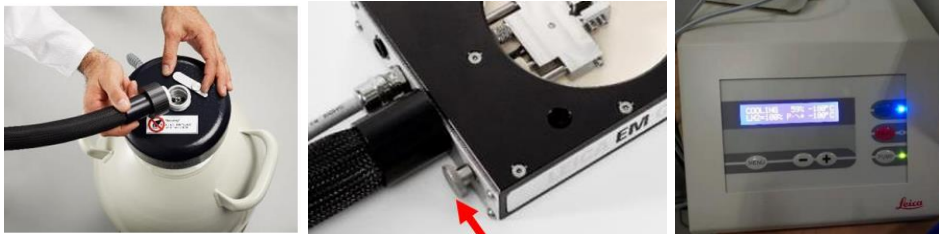
依次打开 1 光源、2 显微镜控制器、3 相机、4 触控屏、5 温度控制器并点击 heat 烘干载物台，

所有硬件打开后再打开 6 电脑及 LAS X 软件。



3. 预冷载物台

- 1) Heat 载物台 20min 后，将液氮泵的连接线端口链接至温度控制器背面相应的插口，液氮管的一端链接液氮泵顶端并拧紧黑色螺圈，另一端插入载物台，固定螺丝向显微镜方向推到底并拧紧。
- 2) 将物镜降低至距离载物台 2mm 左右。点击温度控制器 cool，液氮泵开始泵液氮降温，降温至温度稳定在 -185°C 以下（5-10min），开始准备加载样品。



4. 样品装载

- 1) 样品放进样品传送梭：如图所示，在样品转移梭内加液氮，液氮面在底部金属网附近稳定沸腾为宜。液氮不能加高于左侧传送杆的小孔，否则液氮会溢出。样品转移梭液氮稳定后，冷却结束，此时可以加载铜网，推动红色箭头所指滑块，固定住 Cartridge。以 Autogrids 为例，鸭嘴镊应完整覆盖 O/C 环的边缘，镊子不要碰到载网，以免损伤样品。镊子两脚厚薄不同，薄的一侧朝下，夹住 Autogrid 后，**1** 轻轻压住下方的铜片，**2** 将 Autogrid 向下贴到凹槽里，**3** 顺着 Autogrid 平面，松开镊子平行将镊子抽出。加载好 Autogrid 后用镊子轻碰 Autogrid 边缘，保证铜网放平、卡紧。



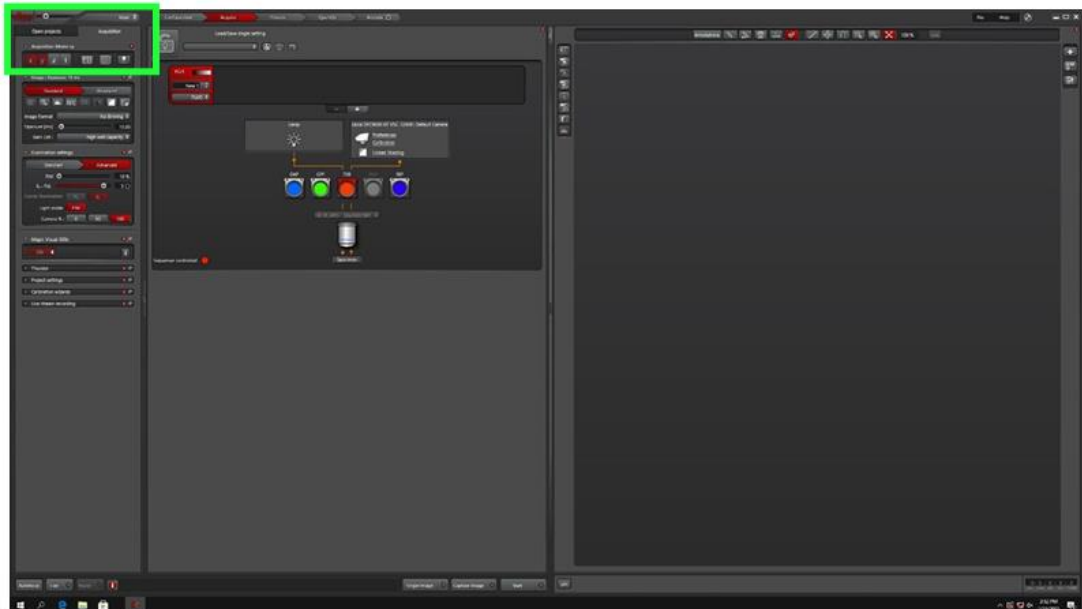
- 2) 传送样品至载物台：首先样品转移梭的抓杆抓住 Cartridge。如图所示，将杆顺时针旋转至 O(Open)状态时，推动抓杆插进 Cartridge 孔，逆时针旋转至 C(Closed)状态,锁住 Cartridge。将样品转移梭转移到载物台，平行推入黑色滑道。打开 Slider 和 Shutter 等两分钟，使冷的氮气进入样品转移梭，保证样品转移时温度一致。物镜上调至少 2mm，推动抓杆到底，逆时针旋转至 O(open)状态释放 Cartridge，样品加载完成。将物镜降下至距离样品 1mm 左右，使用细准焦螺旋，找样品焦面，光镜观察。





5. LAS X 软件

1) 点击图标打开 LASX 软件，运行至如图步骤，点击 OK。打开软件界面如下图，

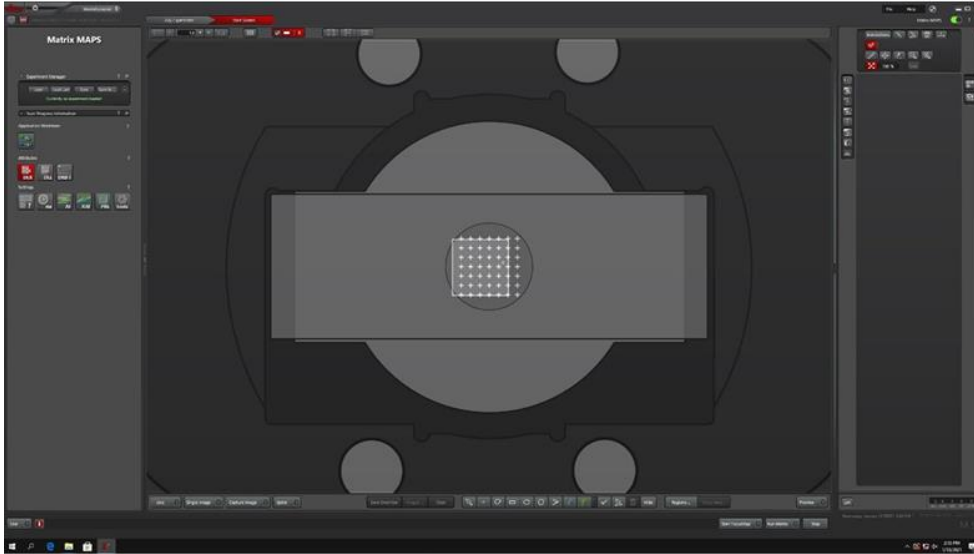


2) 左上角，点击 main 右侧的箭头，点击选择 MatrixScreener 进入。

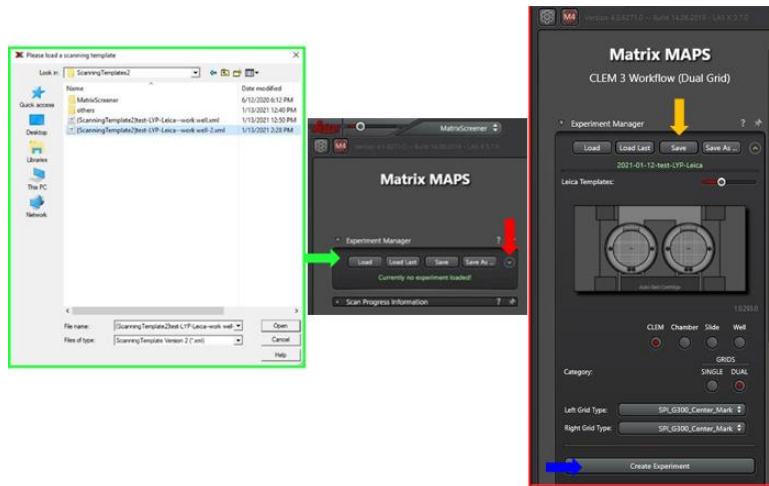
3) 选择 Matrix MAPS+CLEM, 点击图标进入。



4) 进入以后界面如图：



5) 点击 load 选择之前的 experiment，或者点击下拉箭头新建 experiment。根据需要选择 CLEM、Grid、DUAL、并选择相应的 Grid Type。点击 Create Experiment 新建 experiment，并点击上方 Save。



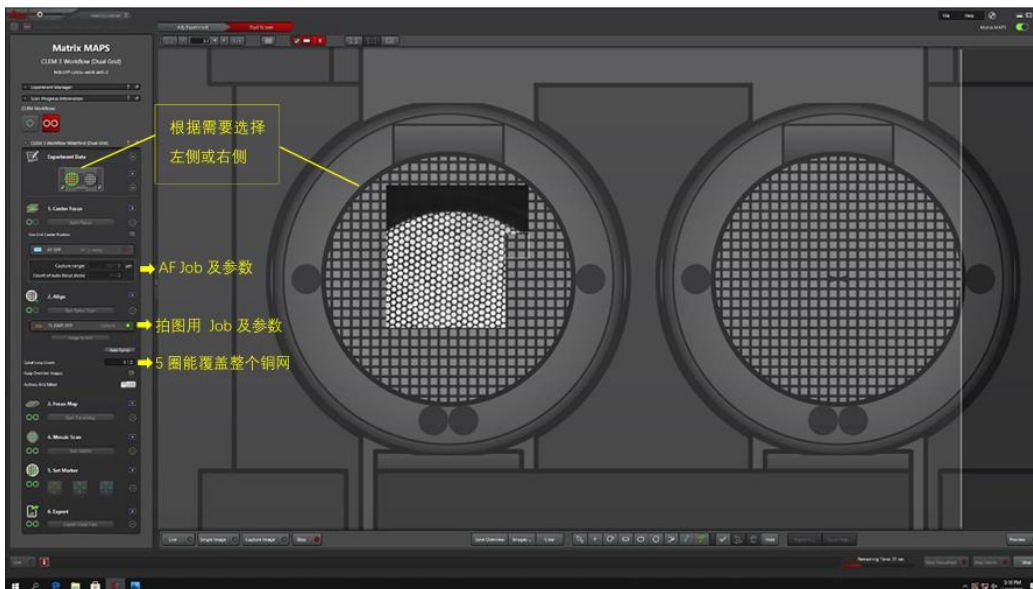
6) 设置好以后，Start Screen 界面如图：



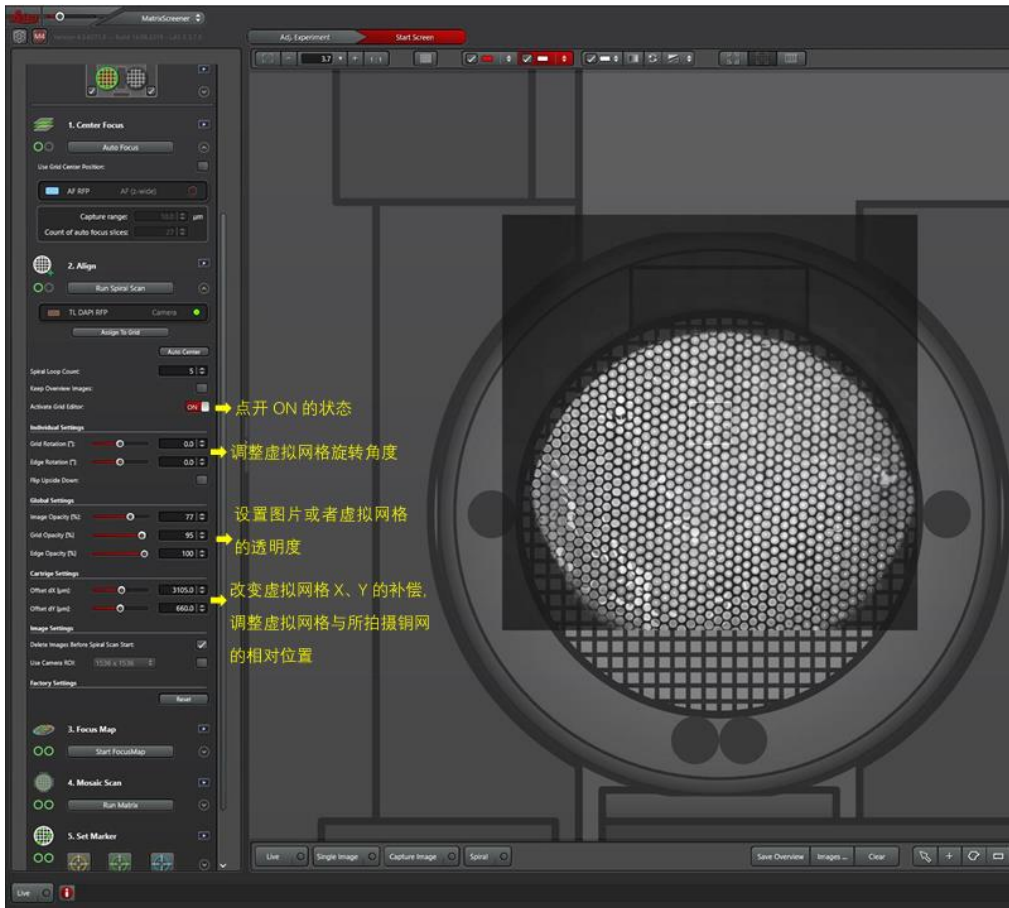
- 7) 进入 Adj.Experiment 界面设置拍摄参数。Adj.Experiment 里一般有两个 Job，一个 AF (AutoFocus) 用于自动对焦；一个是拍摄图片，切记选择正确的通道。Job 和通道的名字都可以根据需要重命名。不同的 Job 之间的参数在拍摄的时候互不干扰。如果 load 之前的 experiment 则 Job 数和之前的设置有关。AF Job 和拍摄 Job 如下图所示，可根据需要设置相关参数。



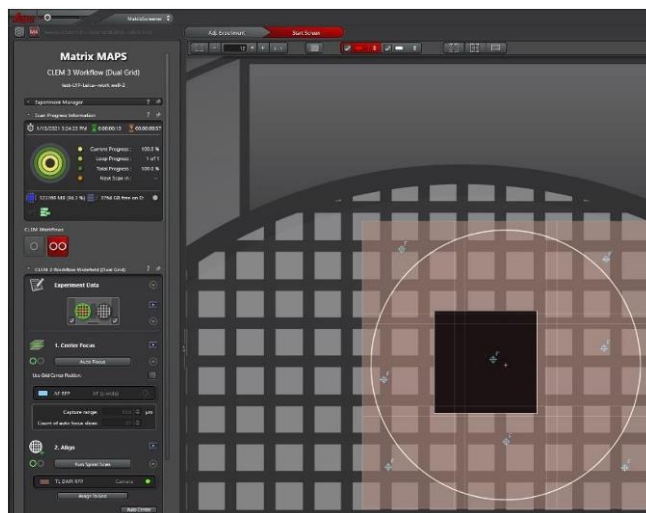
- 8) 回到 StartScreen 界面。



- 9) 先用明场通道，点击 Run Spiral Scan，扫出整个铜网。



- 10) 对好虚拟网格以后, 用样品荧光通道 RunSpiral 找出感兴趣区域。先在左侧 work flow 里 Run Spiral scan。通过软件下方的框选工具, 选择要拍摄区域。软件下方设置 Focus 点, 自动或者手动 set Z。



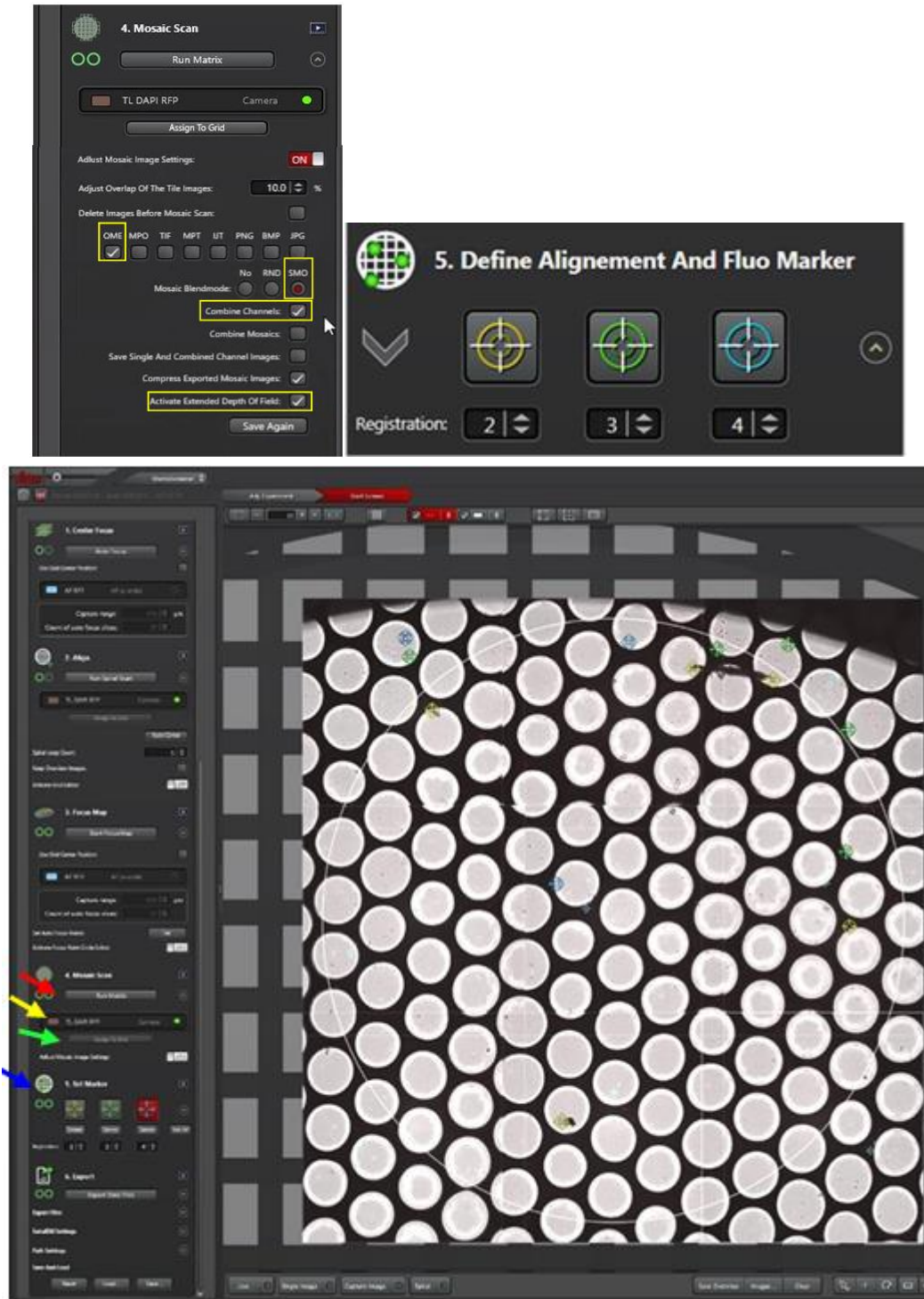
11) 手动设置焦点如图，点击 FocusMap 出现焦点位置窗口：



12) 自动设置焦点有两种方式：一是通过 FocusMap 里 Set by Autofocus 和 Find remaining by Autofocus。点击相应按钮右侧“...”可以调整找焦精度；二是通过右侧 CLEM workflow 里 Focus Map。显示前面 AutoFocus Job 设置的找焦参数。点击 Start FocusMap 会按照前面 AutoFocus Job 里的条件自动找焦点。

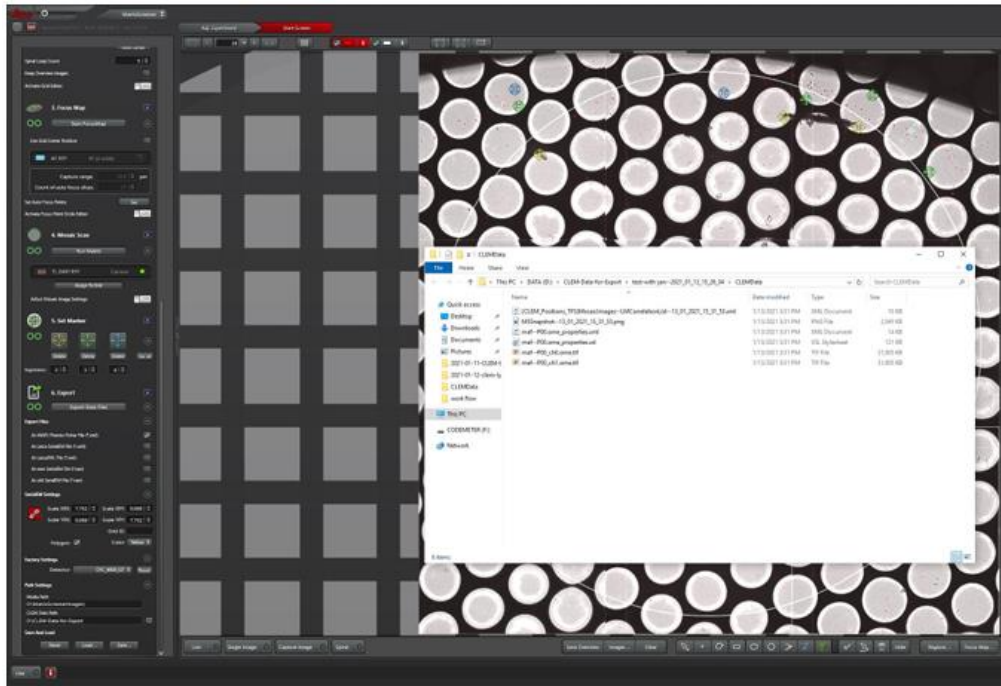


13) Run Matrix 下打开 Adjust Overlap of the Tile Images。根据设置 Mosaic 参数，如图所示，黄色框内一般为必选项。RunMatrix 下选择拍摄用的 job（此例 Job 为 TL DAPI RFP），点击 Assign To Grid。点击 Run Matrix，耐心等待拍完，期间不要做任何操作，以免干扰软件正常运行。拍摄完成后，在 Set Marker 下用黄色点标记铜网特征点方便定位，绿色及蓝色点标记样品感兴趣的位置。



6. 文件导出

- 1) 导出 SerialEM 文件，按如图所示设置参数，点击 Export Data Files 导出文件。



7. 关机

- 1) 关闭软件
- 2) 物镜通过 Z 轴调到最高位置
- 3) 取出样品
- 4) 关闭相机
- 5) 撤去液氮
- 6) 点击温度控制器的 Heat，将载物台烘干 2h 以后，再关闭温度控制器
- 7) 关闭光源
- 8) 关闭触屏开关
- 9) 关闭显微镜控制器
- 10) 排空液氮罐、倒扣干燥
- 11) 烘干样品转移梭及其它用过的小工具

