

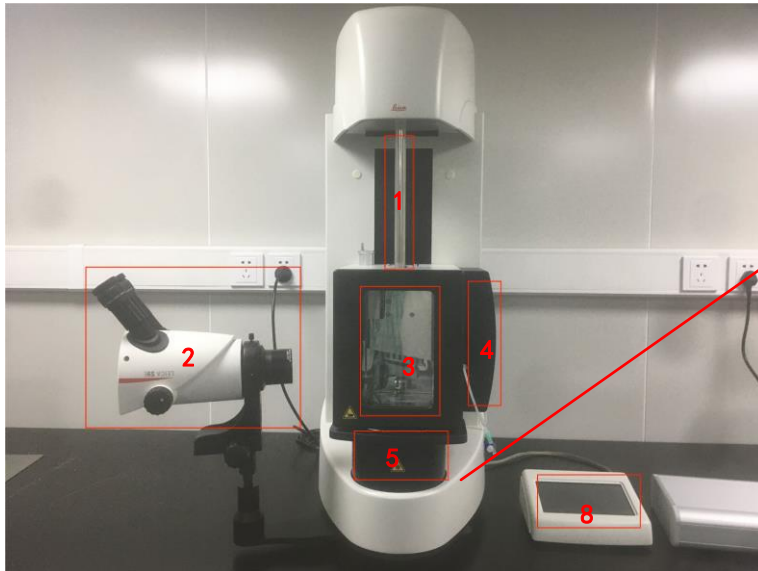
Leica EM GP2 用户操作指南

安全事项

1. 未经培训的用户严禁擅自使用此仪器，如有发现，将根据冷冻电镜中心管理规定办法做出相应处罚。
2. 请先检查仪器、工具有无损坏/异常，如有损坏/异常请及时告知管理员，请勿私自处理。
3. 打液氮时注意安全防护，以免冻伤。
4. 实验过程中请小心使用镊子，以免损坏。**如有损坏，照价赔偿。**

准备工作

1. 实验前请提前准备好液氮、纯水、样品、载网、box。
2. 仪器结构

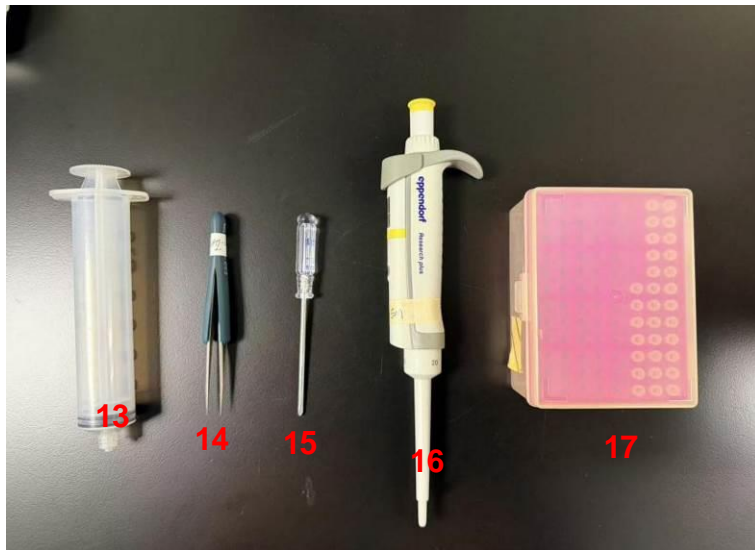


1. 升降杆
2. 显微镜
3. 温度和湿度控制环境室
4. 加湿器箱
5. 冷冻室
6. 乙烷杯槽
7. 低温转移容器
8. 触摸屏

3. 所需耗材及工具



1. 带绝缘涂层专用镊子
2. 滤纸
3. 磁环（2个）固定滤纸
4. 泡沫盖
5. Leica EM GP2专用镊子
6. 冷冻工具
7. 样品盒box
8. 二次制冷剂容器（乙烷）
9. 二次制冷剂容器盖
10. 低温转移容器（放box）
11. 二次制冷剂液化器



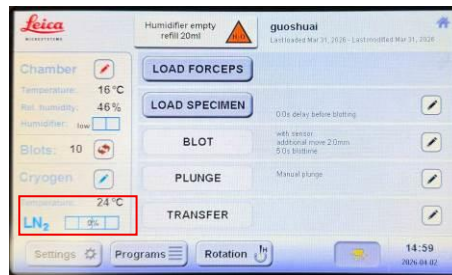
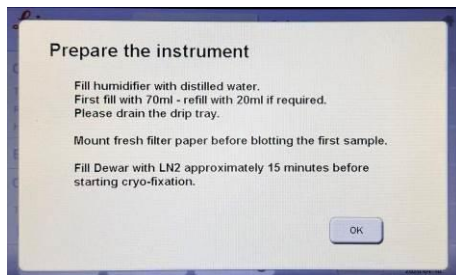
- 12. 乙烷
- 13. 注射器
- 14. 尖头镊子
- 15. 螺丝刀
- 16. 移液枪
- 17. 枪头

开机操作

1. 打开仪器背后右侧的开关按钮，控制屏幕亮起，点击屏幕设备开始初始化。



2. 开机后仪器会出现提示（加纯水、液氮、滤纸）。



- 添加纯水。**将准备好的纯水用注射器通过连接管加入到水槽中，先加70ml，后有需要再加20ml即可，加满后页面会有提示。



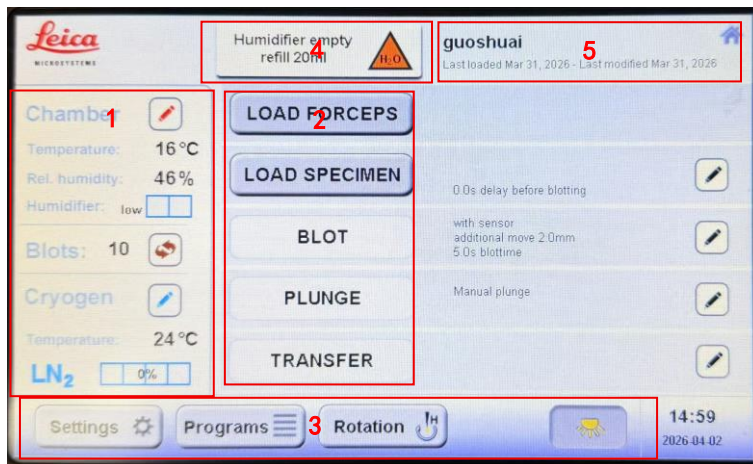
加滤纸。打开玻璃窗，用带绝缘涂层专用镊子夹取一片滤纸和一片磁铁片，手不要碰到滤纸吸附样品的位置。



加液氮。显示屏上会有数字显示液氮量及实时温度，乙烷杯槽和低温转移容器中都需要添加液氮，等待乙烷杯槽中的液氮挥发完再进行一次添加，待液氮、温度稳定（液氮达到100%，温度为-180℃）。放入乙烷杯，后续根据屏幕提示补加即可。

注：主屏幕显示如下

- 1) 显示环境、滤纸和制冷剂的状态面板；参数，在实际值和设定值之间定期交替；
- 2) 冷冻步骤的控制步骤，工作流程可以按顺序激活；
- 3) 功能键，可调用特殊屏幕或功能，例如开关灯、镊子旋转、打开程序等；
- 4) 警告和错误消息；
- 5) 当前程序的名称和状态；



设置参数操作

1. 参数设置

1.1 Environment环境参数设置

点击小铅笔图案进入设置；

Chamber Temperature/humidity: 环境室温度湿度设定（根据样品所需参数设置）。Actual: 为实际参数值；Set为设置参数值；on/off开关温度和湿度控制；

Windowheater: 加热样品仓门防止水汽影响观察，25℃以上自动开启，一般70%–100%左右都可以；

Cryogen Temperature: 二次冷冻剂温度设定。温度最好设置为尽量低，又能使其保持液态（乙烷熔点 -183°C ，通常可设 -180 至 -182°C ）；

Cryogen GN2 flow: 设置越大，冷仓里温度越安全，冷气高度越高，相应地液氮消耗越快。建议至少70%，一般设100%。

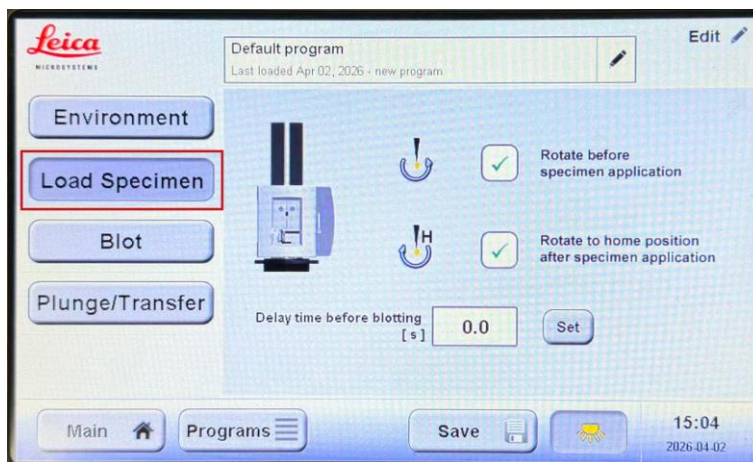


1.2 Load Specimen加样参数设置

Rotate before specimen application: 加样前是否进行镊子旋转（180度）；

Rotateto home position after specimen application: 加样后/滤纸吸附前是否将镊子旋转home位置；

Delay time before blotting: 滤纸吸附前的等待时间，点击Set进行设置。



安装镊子时Home都是朝前的，假如载网正面朝左（如上图所示）：

两个都不选则在左侧载网正面加样，左面滤纸在载网正面吸附；

只选第一个则在右侧载网正面加样，左面滤纸在载网的背面吸附；

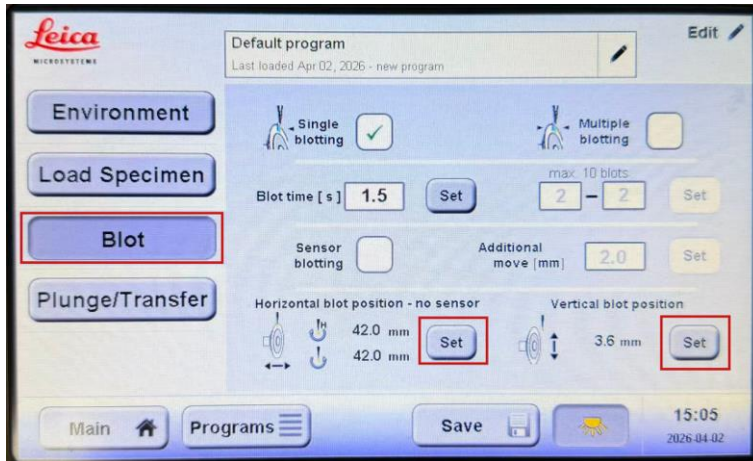
两个都选则在右侧载网正面加样，左侧滤纸在载网的正面吸附；

注意：实验前想好加样习惯和实验需要的滤纸吸附方向进行设置。

1.3 Blot吸取样品参数设置（需装夹有载网的镊子进行设置）

当sensor blotting未选勾时为Single Blotting without Sensor模式，选勾时为Single Blotting with Sensor模式（传感器辅助单次吸附）。

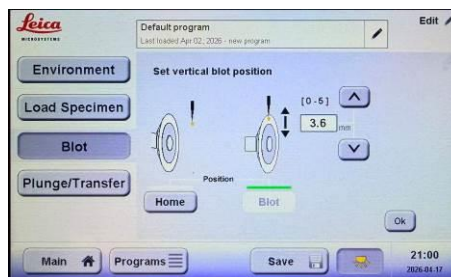
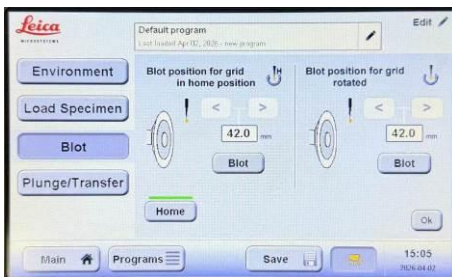
1.3.1 Single Blotting without Sensor



Blot time: 滤纸吸附时长，点击Set进行设置；

Horizontal blot position-no sensor: 滤纸吸附时相对载网的左右位置，注意滤纸吸附时镊子位置，点击Set可进行设置；

Vertical blot position: 滤纸吸附时相对载网的上下位置，点击Set可进行设置。



1.3.2 Single Blotting with Sensor（一般不使用）

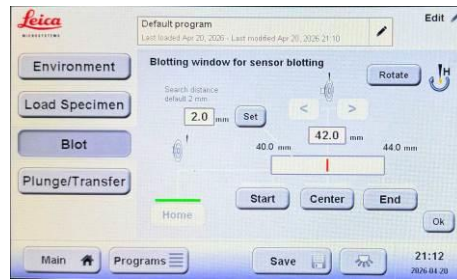
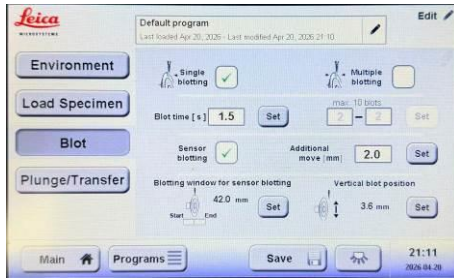
传感器辅助单次吸附只能在**有样品的那一面**进行吸附时传感器才能感受到液滴，且进行位置测试或者设置时需要先加同样体积的液滴，上样量一般不少于**3ul**。

Blot time: 滤纸吸附时长，点击Set进行设置；

Additional move: 传感器在感应到液滴后，滤纸再靠近载网的距离，即最后的Blot end的位置，注意加样量越大，距离要设的越大，但不可超过载网边缘，避免载网变形，点击set可进行设置；

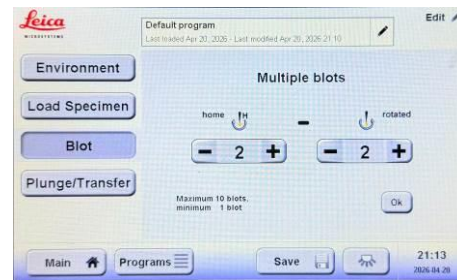
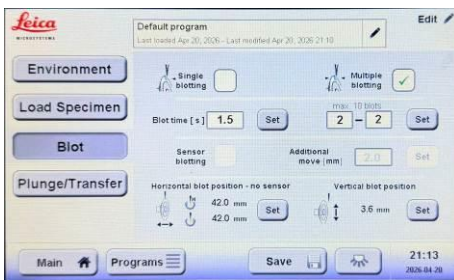
Blotting window for sensor blotting: 传感器搜寻范围，一般前后2mm，共4mm的范围足够使用，Center的位置建议设为铜网与滤纸刚刚接触的位置；

Vertical blot position: 滤纸吸附时相对载网的上下位置，点击set可进行设置；



1.3.3 multiple blotting多次吸附参数设置

multiple blotting选勾，可分别设置home位和rotated位置的吸附次数，点击set可进行设置。



1.4 Plunge/Transfer参数设置

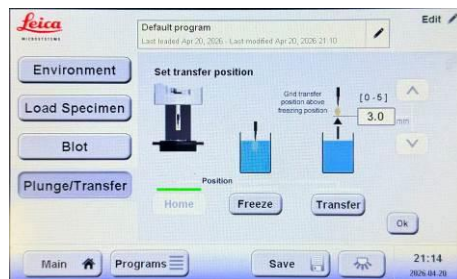
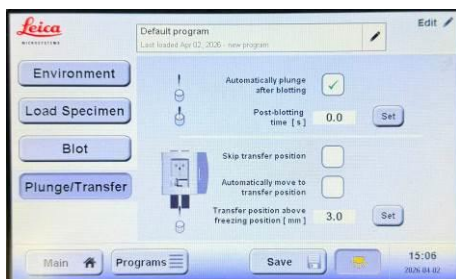
Automatically plunge after blotting: 滤纸吸附完后自动投入冷冻剂，建议选勾；

post-blotting time: 吸附后/投入前等待时间一般设为0，避免样品干燥变形；

Skip transfer position: 跳过移动到转移位的步骤（若打勾，制样时勿点击Transfer）；

Automatically move to transfer position: 投入后自动移动到转移位（一般不使用）；

Transfer position above freezing position: 转移位的设定，与冷冻位置的高度差；设置时观察液体乙烷的高度，不要将载网转移位高于乙烷的高度。



样品制备

1. 液化冷冻剂

待冷冻室温度接近设置温度且稳定后，将冷冻剂液化器套在乙烷杯（注意保持乙烷杯干燥）上，乙烷气瓶气头放入液化器接口处；或不用冷冻剂液化器，直接将乙烷气瓶气头放入乙烷杯中液化。

注：乙烷气瓶使用方法：打开乙烷阀门，先逆时针打开乙烷罐一级阀门，再按照 + - 指示打开二级阀门，小气流将气头放入乙烷杯（冷冻液化器接口处）；当乙烷开始液化将气流变大加满，加满后将气流变小并拔出；关闭二级阀，关闭一级阀；再打开二级阀将管道中气体放出并关闭。（注意一定记得放出管道中残留气体，避免下一个用户使用时出现危险）

乙烷液化过程中低温转移容器（放box）可盖上低温转移容器盖，防止被污染。中间若发现液氮量少，需进行添加，添加时可盖上二次制冷剂容器盖防止液氮进入液化乙烷中，**添加液氮完毕一定要把二次制冷剂容器盖拿下来，以免镊子戳到造成损坏。如有损坏，照价赔偿。**



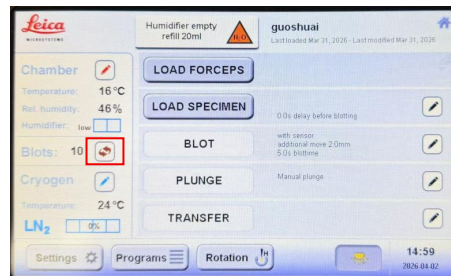
2. 冷冻样品

点击Main进入主界面，点击LOAD FORCEPS，安装夹取好载网的镊子，接着点击LOAD SPECIMEN，选择合适的移液枪与枪头，吸取样品，打开加样仓门（左右两侧均有加样仓门，根据前面Load Specimen设置选择哪侧加样）滴加样品在载网上。点击BLOT吸取样品，再点击PLUNGE快速投入，镊子杆伸下之后点击TRANSFER（根据前面Transfer选择操作，请勿重复操作），小心取下镊子，并快速转移至液氮box中。

四个grid处理完成后，螺丝刀拧紧后可用镊子进行转移。如要继续处理样品，可在保温杯/泡沫碗中加满液氮，将处理好的box放在保温杯/泡沫碗中，再放入新的box至低温转移容器中，开始新一轮处理。注意液氮量，及时进行添加。

3. 更换滤纸

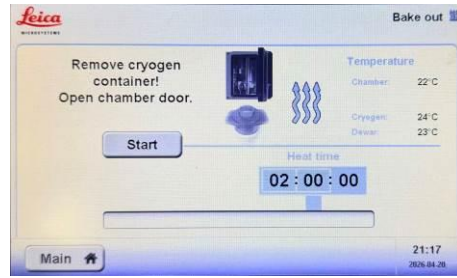
一片滤纸最多吸附10次，用完后仪器会提醒更换滤纸，更换滤纸后点击循环图标进行恢复。



关机操作

在主界面点击Setting→Bake out，**根据提示**取出滤纸、打开环境室门、移开体式镜、吸出多余纯水（**注意要吸干净**），选择加热时间两小时以上，点击Start；工具收回工具箱；待bake out结束后，点击仪器后开关按钮进行关机。





冷冻制样结束后注意事项

1. **废液处理**：将实验剩余乙烷和液氮倒入制样间地上的白色矩形泡沫盒内，若还剩余很多干净液氮，将液氮倒回液氮罐中。
2. **清洁台面**：将实验台面收拾打扫干净。实验完成后将所用中心的工具整理好放回原处；实验过程中产生的垃圾丢入黄色专用垃圾桶中。
3. **登记**：在logbook上对本次实验进行登记，登记时注意logbook上印字是否为EM GP2，确认为EM GP2后再进行登记。
4. **EM GP2专用工具箱管理**：实验结束后对仪器工具箱工具进行检查，若有损坏和缺失及时联系管理员，按情况进行赔偿。（若有损坏或缺失却不上报管理员，追究到责任人后，将进行账号锁禁和全额赔偿）
5. **系统账单结算**：实验结束后登录预约系统进行账单提交，按实际时间结算，其中按照实验中所使用耗材进行耗材费用结算（如载网、box、液氮）。（注意每使用一次都要提交1 L /20元的液氮耗材费用）