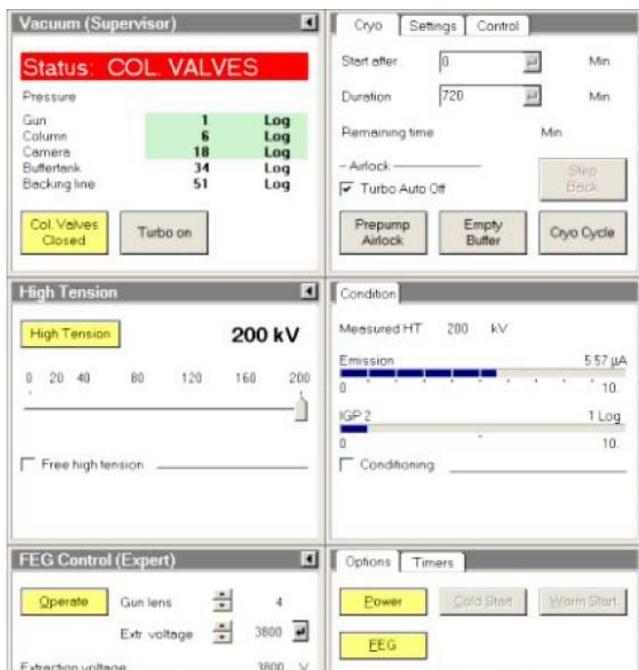


Tecnai G² F20 基本操作步骤

一、 准备步骤

1、检查电镜电压值（是否稳定在 200kV）、真空值(Gun 读数为 1，Column 读数小于 20)、FEG Control 中 Power、FEG、Operate 三个按钮为黄色。如下图所示：



2、向冷阱中加液氮，如右图所示：，电镜在在使用之前需要提前冷却，冷阱冷却镜筒大概需要 1 小时以上。

3、进入电镜控制系统（操作者需要进入自己的 User 账户），检查电脑屏幕右下角托盘中如右图图标是否为绿色（），按顺序启动 TUI（Tecnai User Interface）和 TIA（TEM Image and Analysis）系统。

二、准备样品

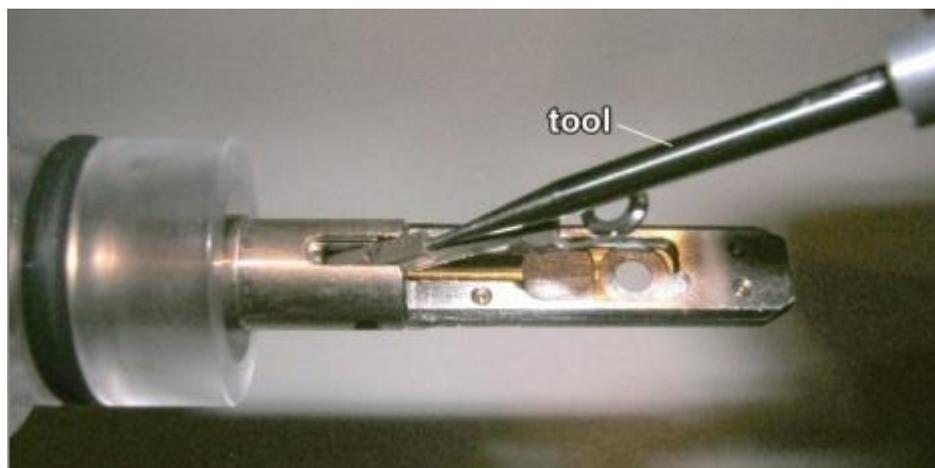
1、常规常温样品准备

(1)制备带有样品的铜网。

(2)按下图将样品铜网固定在样品杆上



取出上图红色箭头处的工具



使用该工具将样品杆末端的弹簧夹掀起，用镊子把样品铜网放入样品杆中，使用工具将样品杆末端的弹簧夹放下。

2、冷冻样品准备

(1)准备好冷冻样品铜网

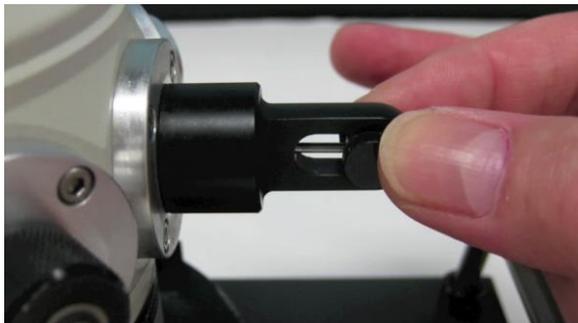
(2)按下图操作将铜网放进冷冻传输架（注：冷冻传输架的使用需要做好记录）



放冷冻样品铜网到冷冻传输架之前，需在传输架的杜瓦瓶中和传输台中加满液氮，提前冷却冷冻传输架（连上控温仪器，将温度稳定在-170度左右）



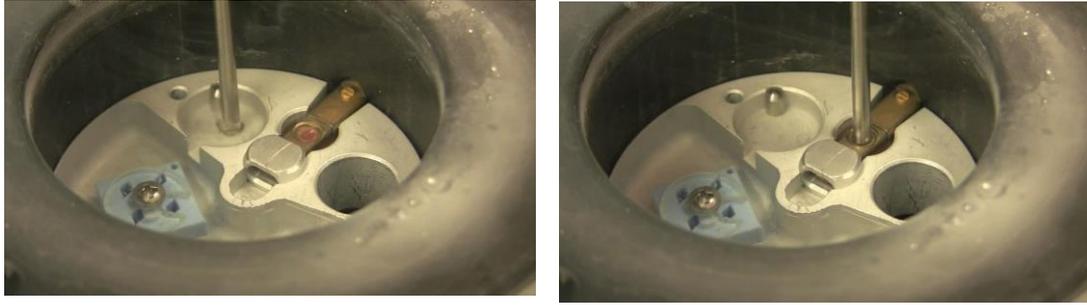
提前在液氮中冷却好任何会接触到冷冻样品铜网的镊子、加样杆等。



打开防污染装置，用加样杆取下固定铜网用的固定环（谨防丢失）。



用提前冷却好的镊子仔细小心的将样品铜网从铜网盒里面取出放在冷冻传输架上。

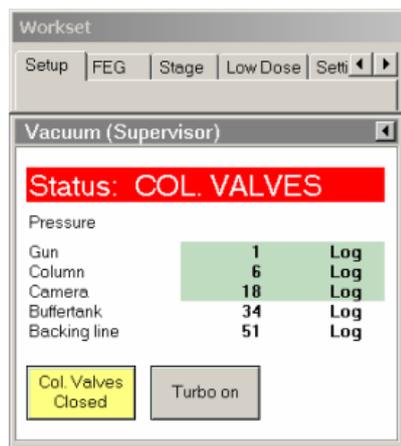


用加样杆将固定环固定在冷冻传输架上的铜网上方（注：固定好后，需要检查固定环有没有固定牢固，做法是用镊子轻轻拨动几下固定环，若固定环不会脱落，则已固定牢固），盖上冷冻传输架的防污染装置。

三、插入样品杆

1、 常温常规样品杆

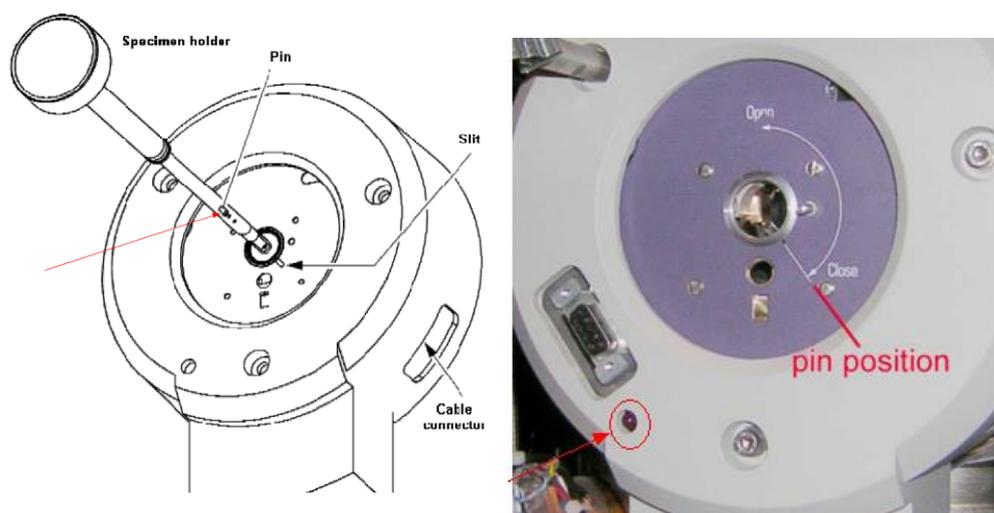
- (1) 检查如下图中的镜筒阀是否关闭，黄色（Col.Valves Closed）表示关闭。



- (2) 如果上图中的涡轮分子泵按钮(Turbo on)为灰色，则需要手动点击启动涡轮分子泵。之后，按钮颜色会从灰色变为橙色，最后后会变为黄色，表示分子泵已启动。

- (3) 将样品末端的细小针尖（下图中红色箭头所示位置）对准样品台

上的细缝（五点钟位置），插入样品杆。预抽循环将会自动开始，请等待直至样品台上红色指示灯熄灭。下图箭头所示红灯熄灭后，将样品杆逆时针旋转至少十二点钟位置，然后小心缓缓将样品放入。



4.继续插入样品杆。

3.逆时针旋转直至自然停止。

2.抽真空，等待约 2 分钟。

1.插入样品杆

(4) 关闭分子泵（点击 Turbo on,按钮有黄色变为灰色）检查设置页中镜筒真空读数,即 Column 值是否为 20 以下，若在 20 以下，即可打开

镜筒阀，点击“Col.Valves Closed”按钮，此时 V4 和 V7 阀会打开，即可开始观察样品。

2、冷冻样品杆

(1) 点击 Setup→Cryo→Setting→Airlock pump time 设定为 40 秒-60



秒。

(2) Stage² → 点击 set alpha(-65 度), Compustage 会逆时针旋转-65 度，等待直至控制台上红色指示灯熄灭，

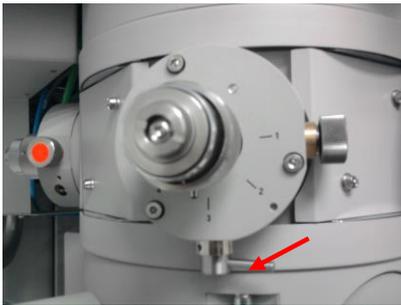
水平插入冷冻样品杆（杜瓦瓶口朝上方）→顺时针旋转，再插入一点点（注：此步若没插对，分子泵会抽大气，会有尖锐的报警声响起，需要迅速的将样品杆稍转一下插入）→抽真空→抽真空结束后，一边点 set alpha 一边将样品杆逆时针旋转插入（注：要在 compustage 转动的同时迅速的转动样品杆插入，否则测会漏真空）。

(3) 关闭分子泵（点击 Turbo on,按钮有黄色变为灰色）检查设置页中镜筒真空读数,即 Column 值是否为 20 以下，若在 20 以下，可打开镜筒阀，点击“Col.Valves Closed”按钮，此时 V4 和 V7 阀会打开，即可开始观察样品。

四、电镜观察

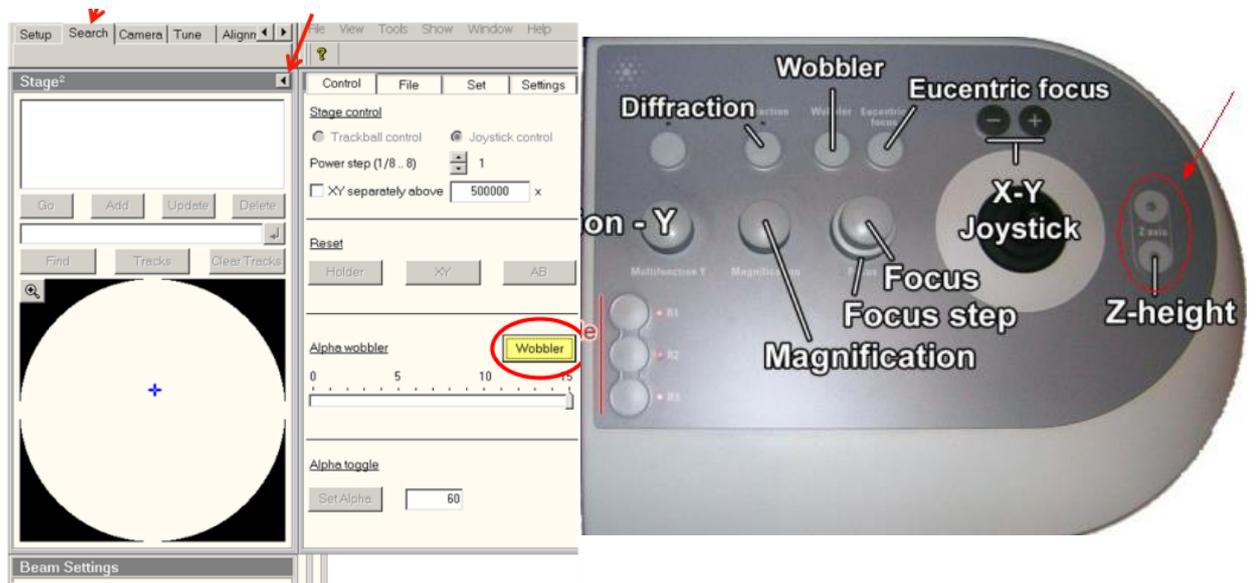
1、常温电镜观察

(1) 低倍模式（如 LM170x 左右），将物镜光阑退出（下图箭头所示，往右是退出物镜光阑，往左是插入物镜光阑），浏览整个铜网，选择合适的 square,移到视野中央。



(2) 将放大倍数调大，调到 M 2000x 左右，调 Z-high.

寻找样品中一特定物体作为参照物，激活 Alpha Wobbler,调节 Z 轴按钮使荧光屏上的目标物近似不动，



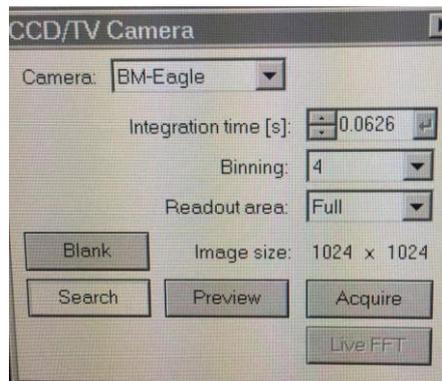
(3)、根据样品实际需要，调放大倍数和欠焦量，进行拍照。

(4) 调光斑大小，合适的光斑大小如下图所示：



(5) 拍照，用 CCD/TV Camera 功能，具体操作如下：

a. Search 可实时在 CCD 上观察样品，由于 CCD 反应延迟，一般 Search 功能下的参数配置如下：



b. Search 下找到目标物后，直接点击 Acquire，拍照。Acquire 功能下的参数配置如下：



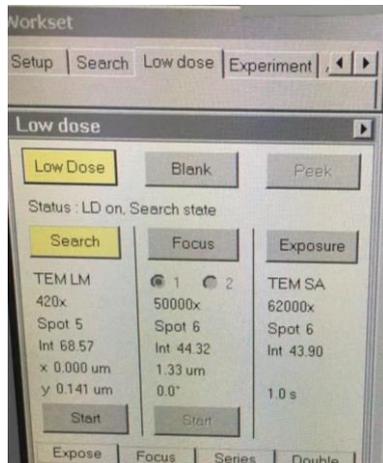
(6) 存储图片

TIA 软件只能一张一张存储图片，具体操作步骤如下：

鼠标箭头放在图片上，右击，点击 **Export data**，选择存储路径和文件夹，选择图片格式，点击 **save**，图片即保存成功。（注：不要选择 16bit 的 tif 格式，16bit tif 格式图片在普通电脑无法打开）。

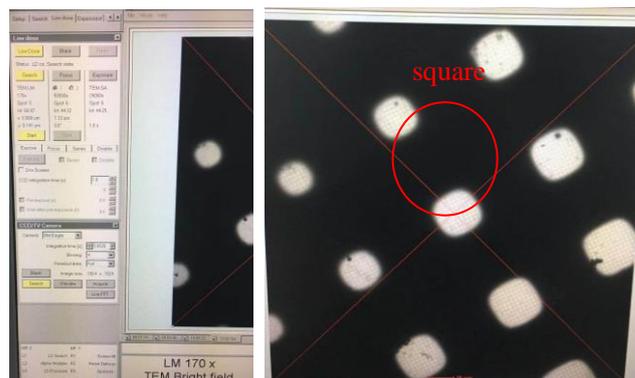
2、冷冻电镜观察

(1) 点击 **low dose**→**low dose**, **low dose** 功能启动后如下图所示：



Low dose 功能下有三个观察样品的模式，如上图所示，分别是 **Search**、**Focus** 和 **Exposure**，其中 **Search** 是找样品模式，**Focus** 是聚焦模式，**Exposure** 是曝光拍照模式，根据实验需要，三个模式可以设置不同的放大倍数，**Spot size** 和光斑大小，具体操作步骤如下：

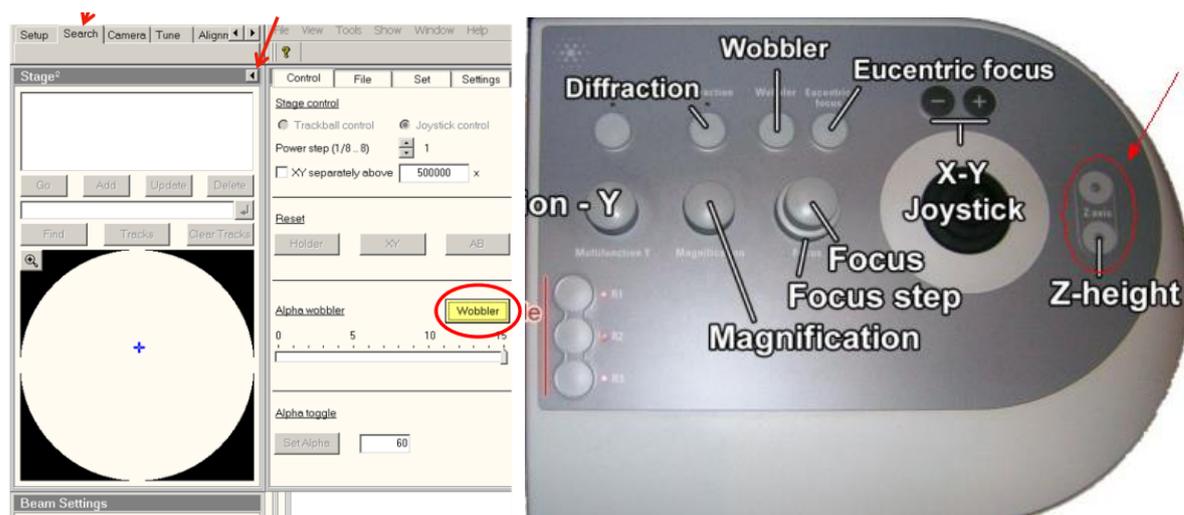
(2) **Search** 模式下，先低倍模式（如 **LM170x** 左右），将物镜光阑退出，浏览整个铜网，选择合适的 **square**, 移到视野中央。



(3) 将放大倍数调大，调到 M 3000x 左右，在大欠焦下（约 -200 μm ）拍一张照片看一下冰的状态是否合适。

(4) 如果冰的状态合适，调 Z-high.

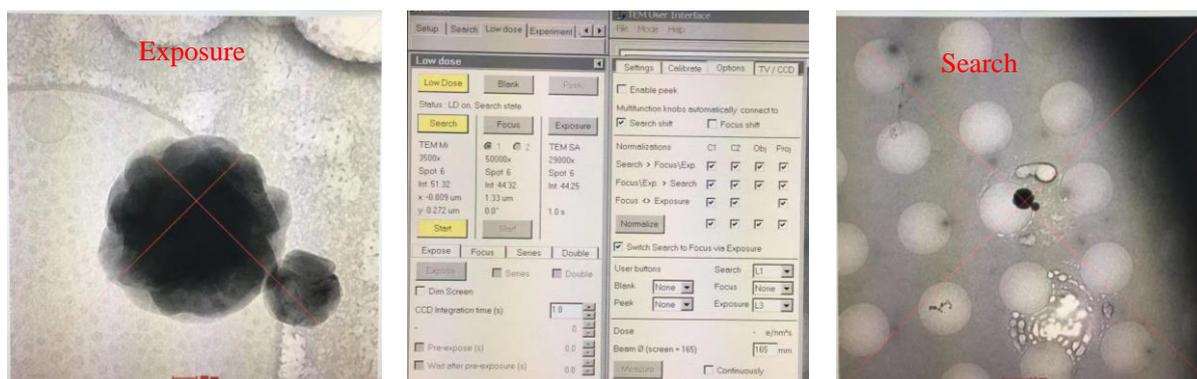
寻找样品中一特定物体作为参照物，激活 Alpha Wobbler,调节 Z 轴按钮使荧光屏上的目标物近似不动，如下图所示：



(5) 切换到 Exposure 模式，选择合适的放大倍数，按下控制面板上的 Eucentric focus（将物镜电流归到固定值下），进行调机。

(6) Search 和 Exposure 模式下位置居中校准

先在 Exposure 下移动样品台选择一参照物移到视野中央，再切换到 Search 下，点击 low dose \rightarrow option \rightarrow search shift, 调节 MF X/Y, 将参照物移到视眼中央。反复几次，直到 search 和 Exposure 下中心位置目标物是一样。



(7) Search 和 Exposure 模式下光斑位置居中校准

Search 下用左侧控制面板轨迹球将光斑移到荧光屏中央位置，切换到 Exposure, Direct alignment → Beam shift, 调节 MF X/Y, 将光斑移到视眼中央，如此反复几次，直到光斑位置不会发生偏移。

(8) 在 Exposure 模式下，找一个有碳膜的位置，调合适的欠焦量。

(9) Search 下将要拍的视野移到中心，切换到 Exposure 下，直接拍照。

(10) 存储图片，方法与常温电镜观察一样。

五、结束操作

- 1、关镜筒阀门，拔出样品杆，取出样品后，镜筒插上样品堵头
- 2、是同一天内还有人预约操作电镜，将冷阱液氮补满，并在记录本上登记。冷阱内的液氮可以维持 3-4 小时，若下一个使用者在 3 小时之后来使用，上一个使用者将冷阱补满液氮后，需要通知管理员或下一个使用者下一次需要补液氮的时间。
- 3、同一天内若无人预约使用，则关闭灯丝和高压，取下冷阱，点击 setup>Vacuum>Cryo>cryo cycle, TF20 电镜的 cryo cycle 的时间一般是 7 分钟后开始，持续 600 分钟。

六、其他注意事项

- 1、电镜操作要严格遵守电镜操作规范，严格遵守中心的各项规章制度。

- 2、电镜操作时，如若发生故障，及时通知管理员，并在记录本上详细描述故障表现和故障发生时间。
- 3、电镜操作时，网上预约者、实际操作者和记录本上的登记者，三者要完全一致。
- 4、电镜操作过程中遇到任何问题请及时联系管理员。