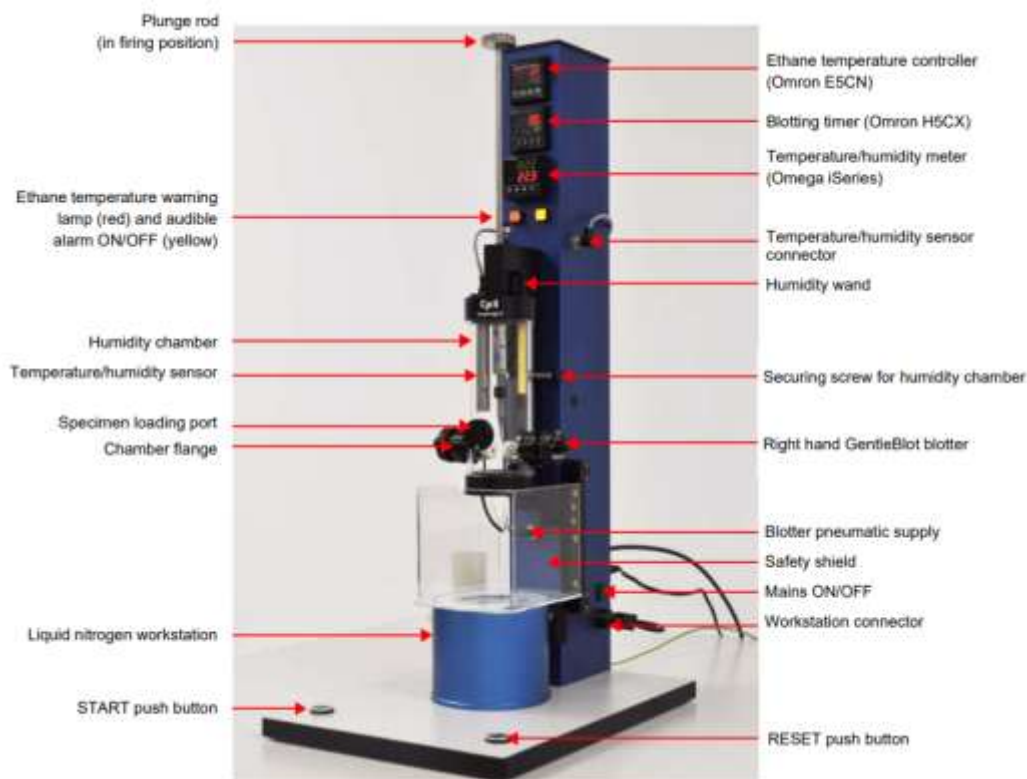


《Gatan Cryo-Plunge 3 (CP3) 操作流程》

一、儀器簡介

Gatan CP3 是一款半自動化的冷凍樣品製備儀器（構造如下），主要用於冷凍穿透式電子顯微鏡（Cryo-EM）樣品的製備。其特色包括：

- **GentleBlot Blotting 技術**：可調整壓力的雙面 blotter 吸附系統，適用於脆弱樣品的處理。
- **濕度控制腔室**：防止樣品在吸附過程中乾燥。



二、操作流程

(一)、CP3 預冷前置作業：

1. **開啟電源**：確認儀器電源開啟，並連接乾燥的壓縮氮氣，壓力設定在 70 psi (4.8 bar)。
2. **液態氮預冷**：在 working station 及乙烷槽中加入液態氮，冷卻至穩定狀態（約需 20 分鐘），觀察 CP3 乙烷槽溫度是否達 -176°C。

3.濕度平衡：將浸泡過熱水的海綿棒放入濕度腔室，待相對濕度達 90%後再始加乙烷。實驗過程中若濕度有下降趨勢可以將海棉棒取出來重新浸泡熱水，但須等到濕度平衡後再開始 plunging。

4.添加乙烷：開啟乙烷鋼瓶開關並調整出氣量，將乙烷添加裝置的排氣 tip 抵在槽底部，一開始可以先將管內空氣排掉，再透過減壓閥裝置將乙烷氣體冷凝成液態，以少量、緩慢的方式添加液態乙烷至乙烷槽 (4 mL)，等到液態乙烷穩定達一定高度 (如達乙烷槽 1/3)，可以加速乙烷補充；補滿槽內即可停止，勿讓乙烷溢出至 working station。由於乙烷為易燃氣體，為了安全起見，補充乙烷過程中可以將冷凍房開一個小縫，讓房間不要完全密閉。添加完乙烷後會升溫，之後需補充液態氮讓溫度控制在約-176°C (待乙烷槽口周圍出現結冰情況便可開始準備凍樣)。

(二)、濾紙吸附與冷凍(Blotting and Plunge-Freezing):

1.裝載 blotter：使用裝載台依序放上 pin、濾紙、塑膠片，再以 blotter 按壓固定，確保濾紙平整及固定完成。圓形濾紙可以自行裁剪 595 濾紙再以圓規於圓形濾紙中央戳洞。



2.CP3 鑷子夾取銅網及滴樣：樣品銅網經過親水性處理 (glow-discharge)後，再以 CP3 專用鑷子 (plunge tweezer)夾取銅網，裝載到 plunge rod 上後，打開濕度腔開口並滴上樣品 (4 μ L) 反應 1 分鐘。

3.Blotting：設定吸附時間 (約 3.5 秒)，蓋上安全罩至 working station 上方，按下「RESET」後再按「START」開始進行樣品吸附及瞬間冷凍。

4.樣品轉移：將 Plunge-Freezing 後的樣品快速轉移至銅網保存盒 (全程都在液態氮溫度下)，避免樣品升溫產生冰汙染。若不需要立刻觀察樣品時，可將銅網保存盒放入 PP 試管再轉移至液態氮保存桶存放。

三、安全注意事項

- **氣體處理：**乙烷為易燃氣體，操作時需在通風良好的環境中進行，並遠離火源。
- **個人防護：**操作液態氮與乙烷時，可佩戴防護手套與護目鏡。