

## 在 Grid 上制备 Lamella

### 一、实验前的系统状态检查与登记

1. 检查并记录样品仓真空，在室温下应低于  $4 \times 10^{-4}$  Pa。
2. 检查并记录电流值。
3. 检查并记录物镜极靴状态（外观是否正常）。
4. 检查样品夹座是否在样品台上，可以通过更新右下角的腔室内部实时图像来确认。



### 二、实验前的系统准备、冷却操作

1. 冷却管道冲洗，此步骤一般无需操作，气相阀门处于长期开启状态。（打开辅助间内的气相阀门，在室温下确保样品台和冷阱的冷却管道用  $>2\text{L/min}$  流量（或流量控制器的黑色浮标到 5）的氮气冲洗至少 30 min。）
2. 氩气及 GIS 管线冲洗。在室温下，用 5 个循环的 Sputter purge 冲洗氩气管线；打开 GIS 阀门 2 分钟，清洗 GIS 管线。注意！：GIS 阀门打开后，仓室压力应至少增加三倍。清洗后关闭 GIS 气流，等待压力恢复再继续后续操作。注意氩气阀门需开启。
3. 确保黑色上样台和气闸盖用氮气冲洗至少 30 min，确保上样系统干燥无水汽。打开样品准备控制器上的“Purge”按钮，使用氮气气流干燥、清洁所有部件。镊子和其他工具都放在加热板上或除湿机的置物篮内，以保持干燥。
4. 样品传输杆在结束实验后，必须保持连接在 Aquilos 的 Quickloader 或上样台的气闸盖上，并保持真空。
5. 将热交换器插入液氮罐中，等待 15 min。15min 后，样品台和冷阱的温度应稳定在  $-180^\circ\text{C}$  以下。氮气流量太高，可能会导致样品台振动，流量太低无法维持温度。
6. 最终冷冻温度时，仓室压力（真空值）应低于  $8 \times 10^{-5}$  Pa。

### 三、上样

1. 准备大约 4L 容量的纯净液氮。确保冷冻样品已准备好。上样台应已用氮气冲洗，保持干

燥清洁。

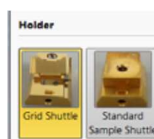
2. 将空样品夹座放入黑色上样台的基座中，并转动旋转锁锁住样品夹，防止其向上倾翻。
3. 关闭"Purge"，停止氮气气流。
4. 首先将干净的液氮倒入上样台中间的腔室中，然后再借助漏斗将液氮倒入外部隔热层。在此过程中将塑料盖盖在上样台上，防止水汽进入。
5. 使用冷却好的镊子将样品盒转移到上样台液氮里。
6. 将 CryoFIB 专用 Autogrid 的 O 环放入 Autogrid 组装工具中，注意能够卡住 Grid 的面即 C 环面朝上，将带有铣削凹槽的面朝下。
7. 用预冷好的扁头镊子将 Grid 从盒子里取出，放入 O 环中，注意将有细胞/样品的那一面朝下放置。用预冷好的 C 环将 Grid 卡住，组装成 Autogrid。
8. 使用扁平螺丝刀转动 CryoFIB 样品夹座顶部的螺丝，打开夹片。打开位置及关闭位置可通过螺丝下方的夹片开口变大来识别。
9. 将组装好的 Autogrid 放置到样品夹座中。夹座有 1,2 号位置，可一次放置两个 AutoGrid。Autogrid 的朝向：需将铣削凹槽面朝外，同时垂直朝上放置（铣削凹槽面位于 12 点钟方向）。此凹槽可实现较低的铣削角度。放置完毕后，旋转螺丝锁紧 Autogrid。
  - 可以预先用记号笔在 O 环上做标记，以便于在液氮环境中进行方位辨认。
10. 旋转 CryoFIB 样品夹座，使其倾斜到竖直位置，以便于样品传输杆摄取样品夹座。
11. 将上样台的塑料盖取下，用气闸盖替换放置。气闸滑动阀应处于关闭位置。关闭冷冻传输杆上的阀，并通过按"Vent"将其从 QuickLoader 取下。将传输杆放在气闸盖上，用位于两侧的黑色夹子将其固定牢固。按下控制器上的"Pump"。泵抽气 20 秒后，"Pump"按钮闪烁速度变快，表示可以打开传输杆上的阀。确保传输杆阀被打开，按"Vent"并等待闪烁的"Vent"按钮消失，上样台会自动切换到"Close"。
12. 打开气闸盖上的滑动阀。将传输杆顶部的锁拧到 Open，然后将滑杆降至液氮里的样品夹座，松开滑杆，以便夹住并锁定样品夹座。将样品拔出到传输杆中并锁定滑杆。立即关闭气闸盖上的滑动阀。
13. 按下"Pump"，当 20 秒后"Pump"按钮快速闪烁时，关闭传输杆的阀。确保阀门上的金属杆已经完全插入到尽头并锁紧。
14. 按下"Vent"来给气阀通气，以便于传输杆能够迅速从气闸盖上取下。通气 3 秒后即可取下传输杆。将传输杆放置在 Quickloader 上。按 Quickloader 上的"Pump"按钮（需要长按 2-3 秒）。真空需要几秒钟才能到达设定点。此时，OK 指示灯将亮起。大约 5-10 秒后，你将听到"咔嗒"声，表示闸阀已解锁。此时可以打开 Aquilos 的闸阀。

15. 让真空平衡几秒钟，以利用真空清除残留的污染物，然后打开传输杆阀。
16. 打开传输杆顶端的锁，将样品夹座送入 Aquilos 样品台。滑杆的长度使得刚好能把样品完全插入样品台。
17. 通过按下和旋转滑轨上的按钮来松开传输杆，收回杆前可以将杆继续往样品仓室推送一下，在拉回，然后将滑轨上的按钮锁定。
18. 关闭 Aquilos 侧门阀，并保持传输杆连在 Quickloader 上。传输杆将保持在真空，为实验结束时下样做准备。观察右下角实时红外图像，确保样品夹座正确地放置在样品台上。

#### 四、Grid 成像

(如需获取更多有关 Maps 软件标准功能的更多信息，请阅读 Maps 的用户手册。)

1. 如果有需要，可首先拍摄刷新 NavCam 图像("Stage"->"Take NavCam Photo")。
2. 将电子束和离子束的扫描均旋转调整到 180 度 (Shift+F12)。
3. 点击 xT UI 中 Grid 1 或 2 的 mapping 位置，注意在此之前，请检查软件中对样品 holder 类型的选择，需确认选择的是“Grid Shuttle”。此位置与电子束垂直。Mapping 位置默认为 45 度样品台倾转。
4. 选择合适的电子束电压、驻点时间和电流。默认值值为 2kV 与 13 pA 和大约 1-5  $\mu$ s 的驻点时间。
5. 打开 Maps 软件。添加具有适当分辨率的单张照片和/或创建覆盖 Grid 区域的拼接图 Tile。



Tile 参数示例:

Tile	5×7
Tile 横向宽度	600 $\mu$ m
总面积	2.76 $\mu$ m
分辨率	1536×1024
驻点时间	1 $\mu$ s

6. 一旦获取了拼接图，你就有了一组样品台坐标。如果需要，此时可以导入光镜数据来做光电关联。具体请参阅此流程的 Maps 手册。

#### 五、定位细胞

方法一（不使用 Maps 软件，推荐）:

1. 在电子像界面选取待制备的 Lamella 位点，并将坐标信息添加在 UI 软件的位置界面内。
2. 样品位置添加完毕后（后续还可以再增加），按顺序调整并确定每个样品的切削位置。将样品移至电子像视野中心，并将其工作距离（work distance）调整至 7 mm，样品台的倾斜角度 tilt 设置范围为-15° 至 -18°，确保其在能够被准确切削的情况下处于最小的倾斜角度。用 10pA 的弱电流强度快扫一张离子像，如样品在离子像下的位置与电子像位置不一致，则通过调整样品台距离/工作距离将离子像中的样品调整至中心（与电子像保持一致）。更新当前样品位置。

3. 将离子像的工作距离手动输入数值“19”，在此设置下离子像处于正焦状态，无需再手动进行焦距的调整。
4. 依次对所选样品位置进行切削角度及位置的设置。

方法二（使用 Maps 软件）：

1. 在 Maps 拼接图像中，找到细胞并右键单击，选择创建 Lamella 位点以基于图像添加位置。这会在 Maps 添加一个标记，一旦添加，即可设置共心高度位置。
2. 首先单击计算共心高度位置（Calculate eucentric position）。确保细胞位于图像中心，然后按弹出对话框指示操作：倾转样品台，移动停止后单击并居中细胞。重复此操作，超过 30° 可使结果更加精准。
3. 然后单击计算共心高度位置，并存储该值。
4. 现在去到共心高度位置，如果需要，你可以使用优化位置来进一步优化。
5. 接下来转到离子束成像并查看细胞。可能需要 beam shift 校正共射点的相对位置（即使得细胞在电子束和离子束图像都居中）。
6. 降低样品台倾斜度到 15-18°，以便能拍摄到细胞。达到合适的角度后，将此角度存储为 Maps 的铣削角度。
7. 重复此过程，直到在两个 Grid 上添加所有的细胞位点。

## 六、GIS 涂覆样品

这一步可以在 Maps 预览之前或之后。同样，也可以在在溅射之前或之后。**GIS 参数需要优化，因为每个 Aquilos 都不尽相同。沉积厚度可以通过调整样品/针距离来调整，同样，沉积时间也可以调整来控制沉积厚度。用户如需调整针距，必须与管理员进行沟通，严禁自行更改数值。**

1. 在“Cryo TEM Preparations”选项卡中，选择 Grid 1，然后在“Maps”中“Microscope”中的“GIS Deposition”点击，然后按照说明操作。或直接在 UI 界面内，对 GIS 的 needle 进行设置操作。
2. 检查 GIS 状态是 Warm，然后点击 Open flow。
3. 计时所需的秒数（标准为 5-10 秒之间），然后关闭并收回针头。
4. 对 Grid 2 重复上述操作。不要忘记收回针头。
5. 返回 Lamella 位点，并检查涂层厚度和质量。

此外，如果需要，还可以添加额外的溅射金属层，以减少 GIS 的电荷累积。

如果 GIS 涂层较厚或速率难以控制，请尝试在使用前 Purge GIS。要执行此操作首先将样品台移动到装载位置，并在不插入针的情况下打开 GIS。保持打开状态 30 秒，然后返回到沉积位置。

## 七、粗切

1. 在 Maps 中，单击其中一个 Lamella 位置，然后选择移动到铣削位置。
2. 确保目标细胞在视野中心，并更新 Maps 位置。如果需要，还可进行离子光束偏移，使细胞同时在电子束和离子束的中心。
3. 下一步，添加 2 个矩形铣削模式。确保上方铣削方向从上到下，下方的从下到上。
4. 在 Cryo 标签中，同时选中矩形 1 和 2 矩形框以测量层厚（此后可以通过直接输入新值来调整厚度）。

5. 选择平行铣削策略。
6. 通常从约 1nA-500 pA 的离子束电流开始，铣削宽度不超过 3/4 细胞宽度 (3-5  $\mu\text{m}$ )，以确保 Lamella 的稳定性。
7. 通过输入值或直接将矩形框靠近来逐渐减小厚度，并逐步减小宽度。同时降低铣削电流，通常在 3  $\mu\text{m}$  时降低至 300 pA，在 2  $\mu\text{m}$  时降低 100pA，在 1  $\mu\text{m}$  时降低 50 pA。
8. 以 500 nm 最终厚度完成粗切割。
9. 完成第一个位点后，依次粗切下一个位点。

## 八、精细铣削/抛光

1. 完成所有 Lamella 位点粗切后，在 Maps 中返回第一个位点。
  2. 从 50pA 开始，使用矩形框将 Lamella 切到 300nm。
  3. 将电流降至 30 或 10pA，并抛光至最终所需厚度，通常约为 200nm。
  4. 最终抛光可以通过 Cross Cleaning section 矩形框，以达到最佳效果。
- 在铣削和抛光过程中，可以使用 iSPI 进行电子束成像监控铣削。污染物最终将生长在 Lamella 上。快速抛光 Lamella，确保它最后的厚度符合要求。
5. 在结束时，如需要可再次进行溅射导电镀层。此层有助于在 TEM 中样品导电，通常用于 Volta 相位板。通常用 7-15 mA 的铂金涂覆，10 Pa 5-10 秒，然后返回到高真空。此层应旨在达到 2-5nm 厚。

## 九、下样

1. 当开始最后的抛光时，可以同时开始冷却上样台备用。将气闸盖（滑动阀关闭）放在上样台底座上。关闭“Purge”。
2. 开始下样时，按下 Quickloader 上的“Pump”按钮。
3. 打开 Aquilos 门阀，插入传输杆，抓住样品夹座并收回。样品进入传输杆后，关闭杆阀，然后关闭 Aquilos 闸阀。
4. 按下 Vent，并将传输杆取下。
5. 将杆拿到上样台，将其放在气闸盖上。使用黑色夹具将杆连接到气闸盖上。
6. 按下“Pump”，等待 Pump 快速闪烁，打开传输杆阀。
7. 按下“Vent”。3 秒后，控制器从“Vent”切换到“Close”。然后打开位于气闸盖上的滑动阀，并立即将滑杆降至液氮里的上样台座。
8. 松开样品并将滑杆收回。将滑杆锁定在顶部位置。关闭滑动阀。
9. 将气闸盖与传输杆一起拆下，然后更换上干燥的塑料盖。
10. 将样品夹座翻转到水平位置并将其锁定。
11. 将 Autogrid 移到盒子中，以便接下来 TEM 上样。
12. 结束后，需将空样品夹座妥善处理，因为上面覆盖的 GIS 层在室温下挥发出有毒气体，可以将空的样品夹座装回 Aquilos 样品台（待 Aquilos 恢复室温后残留的 GIS 化合物将在真空中挥发）；或在通风橱里，将样品夹座放在专用的烘烤箱中，过夜烘烤，保证 GIS 化合物充分挥发

13. 将热交换器从液氮罐里拔出，放回架子上。保持氮气气流打开，等样品台和冷阱温度上升到 20°C 以上后，可以关闭氮气。下次实验前，打开氮气气流两个小时吹干管线里的水汽。

#### **十、将 Autogrid 装进配有 Autoloader TEM 的上样台**

在将 AutoGrid 放入 Cassette 时，Autogrid 必须旋转 90 度。即将 CryoFIB Autogrid 上铣削凹槽转到水平方向来实现。这步的目的是在 TEM 拍 Tomo 时样品台转轴与 Lamella 的切割方向垂直，从而样品在转动时 Lamella 不会被两边未切割的材料遮挡。