

# Aquilos 在 Grid 上制备 Lamella

## 一、 准备系统和冷却

1. 检查样品仓真空，在室温下应低于  $4 \times 10^{-4}$  Pa。
2. 确保样品台和冷阱的冷却管用  $>2\text{L}/\text{min}$  氮气冲洗至少两个小时。
3. 确保黑色上样台和气闸盖用氮气冲洗至少 2 小时：打开样品准备控制器上的“Purge”按钮，打开氮气气流，从而干燥所有部件。镊子和其他工具都放在加热板上，以保持干燥。
4. 传输杆应保持连接在 Aquilos 的 Quickloader 上，并保持真空。
5. 如果前一天未使用 LoVac，则用 5 个循环的 Sputter purge 来清洗氩气管线。
6. 确保样品夹座不在样品台上（可以通过更新左下角的 NavCam 图像来确认）。
7. 打开 GIS 阀门 2 分钟，在室温下清洗 GIS 管线。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，然后再继续。
8. 在将热交换器插入液氮之前，将样品台和冷阱的流量设置为  $5\text{L}/\text{min}$ 。
9. 将热交换器插入液氮罐中，等待 15 分钟，并将流量控制器上的流量调整到  $7-8\text{L}/\text{min}$ 。再过 15 分钟，样品台和冷阱的温度应稳定在  $-180^\circ\text{C}$  以下。如果氮气流速高于  $8\text{L}/\text{min}$ ，可能会导致样品台振动。
10. 最终冷冻温度时，仓室压力应低于  $8 \times 10^{-5}$  Pa。

### 视频 1 - 将热交换器插入液氮

## 二、 上样

1. 准备大约 4L 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，防止湿气进入

### 视频 2 - 上样台加液氮

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，注意带有铣销凹槽的面朝下，能够卡住 Grid 的面朝上。
7. 用预冷好的镊子将 Grid 从盒子里取出，放入 O 环中，注意将有细胞的那一面朝下放置。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。

10. Autogrid 的朝向，需将铣削凹槽面朝外，同时垂直朝上放置。此凹槽可实现较低的铣削角度。因此，它需要正确放置。
11. 旋转螺丝锁紧 Autogrid。关闭位置可通过螺丝下方的夹片开口变小来识别。
12. 旋转 CryoFIB 样品夹座，使其倾斜到竖直位置。

### 视频 3 - 将样品装载到样品夹座中

13. 从上样台上取下塑料盖，用气闸盖替换放置。气闸滑动阀处于关闭位置。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”。
14. 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，以便夹住样品夹座。将样品拔出到传输杆中并锁定滑杆。立即关闭滑动阀。
15. 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。
16. 按下“Vent”来给气阀通气，3 秒后取下传输杆。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“咔嚓”声，表示闸阀已解锁。此时可以打开 Aquilos 的闸阀。
17. 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。
18. 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。
19. 通过按下和旋转滑轨上的按钮来松开传输杆，收回杆并将其锁定。
20. 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。

### 视频 4 - 将样品夹座装入样品仓

## 三、 Grid 成像

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旋转调整到 180 度（Shift+F12）。
3. 点击 xT UI 中 Grid 1 或 2 的 mapping 位置。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 μm
总面积	2.76 μm
分辨率	1536×1024
驻点时间	1 μs

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。

#### 四、 溅射覆盖 Grid (Sputter Coating)

为了使样品具有导电性：

1. 选择溅射所需的电流和时间。在开始切割前涂覆整个细胞一般用的设置是 20-30 mA, 10 Pa 15 秒。（参数可以使用溅射控制框底部的数字按钮进行存储和调用）。
2. 如果需要，Purge 循环是可选的，设置所需的 Purge 次数。
3. 为了切换到溅射真空点击“Prepare for sputtering”。
4. 一旦真空变为溅射真空，溅射器插入后，按“Run”以启动溅射。
5. 结束后按“Recover from sputtering”以返回到高真空。
6. 涂覆后的样品，电荷累积较少，具有更强的导热性和导电性，因此在涂覆后更容易进行成像。

视频 5 - 溅射涂层

#### 五、 定位细胞

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。

#### 视频 6 - 在 Maps 中设置 Lamella 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。

1. 在“Cryo”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。
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。

#### 视频 7 - GIS 沉积

### 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  $\mu$ 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  $\mu$ m 时降低至 300 pA，在 2  $\mu$ m 时降低 100pA，在 1  $\mu$ m 时降低 50 pA 1  $\mu$ m-0.5  $\mu$ m。
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。

#### 视频 8 - 初步铣削

## 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。

### 视频 9 - 最终抛光

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
  - a) 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）
  - b) 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 10℃ 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。

## 视频 10 - 下样

### 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。可通过将 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。