Aquilos 细胞样品手动离子减薄操作指南

1. 准备工作

1) 实验前的系统状态与检查

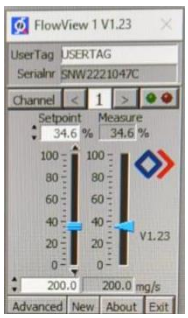
a. 检查样品仓真空，在室温下应低于 $4X10^{-4}$ Pa。

b. 检查物镜极靴状态（外观是否正常）。

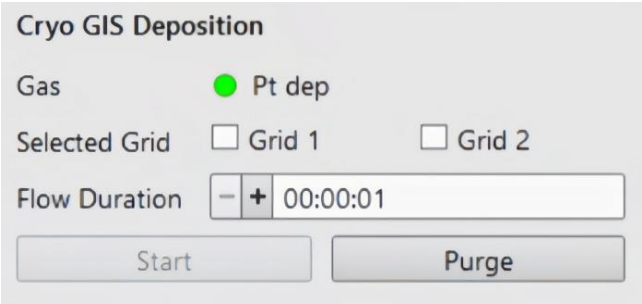
c. 检查样品夹座是否在样品台上，可以通过更新右下角的腔室内部实时图像来确认,如有，需要在常温下 unload。

2) 实验前的系统准备与冷却

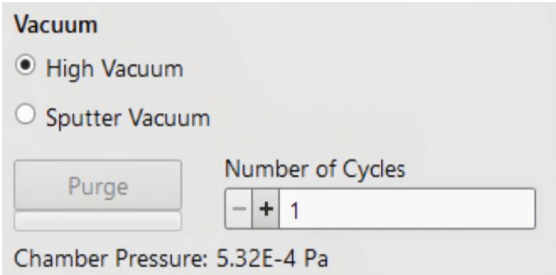
a) 氮气管道 purge：将左侧 Support PC 电脑桌面的 FlowViewer 氮气 I 流速设为 200（同时观察右边数字是否稳定在 200 左右，是则为正常），氮气 Purge 约 30min。



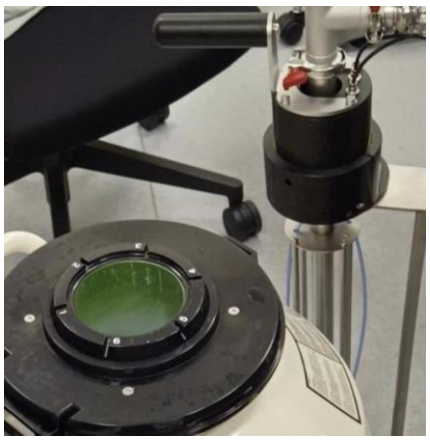
b) GIS 管道 purge：点开❄雪花部分，在 Cryo GIS Deposition 模块将 Flow Duration 改为 30s,点击 purge。

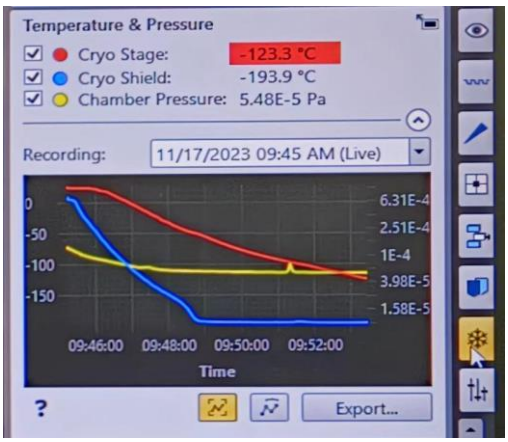


c) 氩气管道 purge：点开电子束部分，在 Vacuum 模块将真空切换至 Sputter Vacuum，此时 chamber pressure 会达到 10Pa，切换完成后，Purge 次数为 2~3 次，点击 Purge 等待 purge 完成改回 High Vacuum 即可。（若不做 Sputter Coating 则跳过此步骤）。



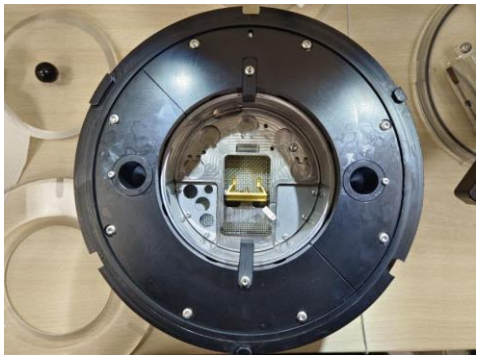
d) 电镜降温（降温之前真空要达到 4×10^{-4}Pa）：将热交换器缓慢插入装满液氮的液氮罐中，并观察温度变化，15min 后，样品台和冷阱的温度应稳定在 180℃以下，同时冷冻后的真空应好于 8×10^{-5}Pa。





2. 样品装载

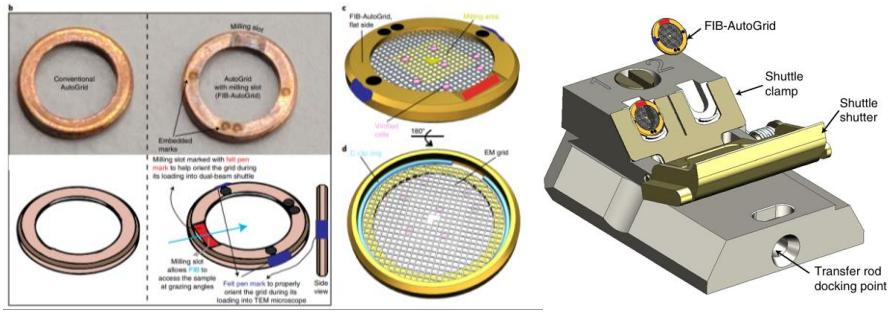
1) Loading station 预冷：预冷前需保证所有用到的工具干燥干净，首先将干净的液氮倒入中间的腔室中，然后再借助漏斗将液氮倒入外部隔热层。在此过程中将塑料盖盖在上样台上，防止水汽进入。



2) AutoGrid 组装：可以使用常规 clip ring，也可以使用 FIB 专用 clip ring，尽量在离子束 90° 方向标记明显的颜色，尤其是侧面标记，尽量清晰，方便后续 TEM 上样时正确辨认方向。
   a) 在 O 圈上做标记，一个蓝色，一个红色，两个标记之间为 90º（侧面也要画上标记）。
   b) 将 C 环卡到 C 环笔中备用
   c) 将 标记好的 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，将带有标记的面朝下。用预冷好的镊子将 Grid 从盒子里取出，正面（有细胞/

样品的那一面）朝下放入 O 环中，用预冷好的 C 环将 Grid 卡住，组装成 Autogrid。

3) Autogrid 装载至 Shuttle：使用扁平螺丝刀 Shuttle 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（关闭为上紧下松，反之亦然），将组装好的 Autogrid 放置到 Shuttle 中。Shuttle 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。旋转 Shuttle，使其倾斜到竖直位置，以便于样品传输杆摄取样品夹座。



4) Shuttle load 至电镜：上样前确认真空值好于 8×10^{-5}方可上样。

a) 将 loading station 的塑料盖取下，用气闸盖替换放置，此时样品杆应置于此盖上并保持真空状态，气闸滑动阀应处于关闭位置。

b) 点击 Vent→打开 1 号门→解锁样品杆→下滑样品杆→锁住 shuttle→上滑样品杆→锁住样品杆→关闭 1 号门。

c) 点击 Pump（变为快闪为真空抽好）→关闭 2 号门→点击 Vent→打开两侧机械锁取下样品杆。

d) 样品杆装到电镜侧门并机械锁紧→点击 P（可长按听到泵的声音，抽观察腔室真空）→打开 3 号门（听见“啪”的一声时开门）→打开 2 号门→解锁样品杆（手扶样品杆，防止被真空快速吸进去）→推进样品杆至底部→解锁 shuttle→拉回样品杆→锁定样品杆→关闭 3 号门（2 号门保持长开）

注意：

① 将样品上到电镜过程要迅速，防止样品升温导致的样品晶化；

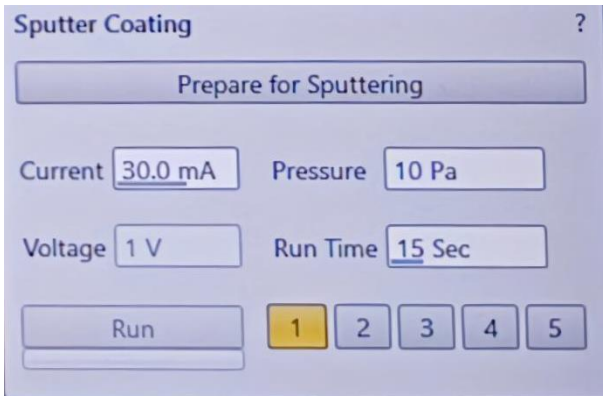
② 在上样品和下样品时要注意 shuttle 是否放上和取下，需紧盯电脑屏幕的 CCD 窗口，观察 Shuttle 是否被稳定且准确的放进和取出；

③ 样品杆要确认推到底，观察 CCD 窗口。

3. 样品检查及减薄前准备

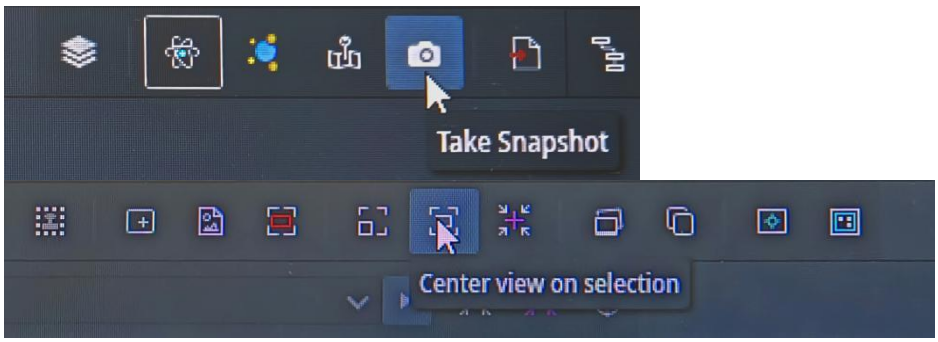
1) Grid 检查及高分辨成像
   a) 系统“wake up”打开电子束和离子束，也可通过激活电子束和离子束页面，点击 Beam On 打开。
   b) 打开❄冷冻模块，在 Shuttle Controls 中点击 Grid1 或 Grid2➞Go to Mapping position (stage tilt 45°)去到电子束垂直观察位置。（检查样品是否合格，若不合适则重新换样）。

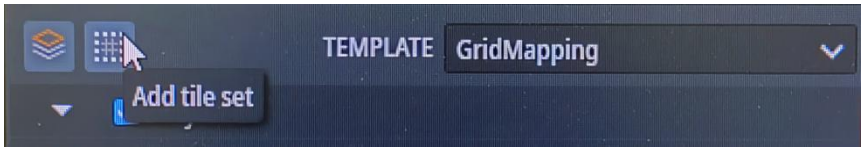
   c) Sputter Coating（可选做）：在 Sputter Coating 模块中点击 Prepare for Sputtering 等待真空达到预设要求且样品台到达预设位置，选择模板 1（可根据自己需求调整各个参数值），点击 Run 开始进行 sputter，此过程需观察 CCD 窗口是否样品表面有亮光，有亮光代表 sputter 正常进行，结束后点击 Recover from Sputtering 恢复（真空和位置恢复）。（不做 Sputter Coating 省略此步骤，在做之前可以将氮气气流调整至 220，避免在 sputter 过程中升温，结束后再重新调回 200）。



   d) 打开 Maps 软件，在电子束下聚焦清楚样品并将视野覆盖整个载网，点击 Take

Snapshot 拍摄 Grid 全景图，点击 Center view on selection 将图像在软件中放大至合适倍数；为进一步看清样品，选择添加 Tile set 拍摄更高分辨率的图像并拼接成 Montage，方便后续选取切割位置。





Tile set 拍照参数可根据要求自行设置，设置好后可以保存成 Template，后续可以直接调用，推荐的参数如下，

Tile 参数示例：

Tile 数量： 5×7 （覆盖感兴趣区域即可）

Tile 画幅宽度： 600 um

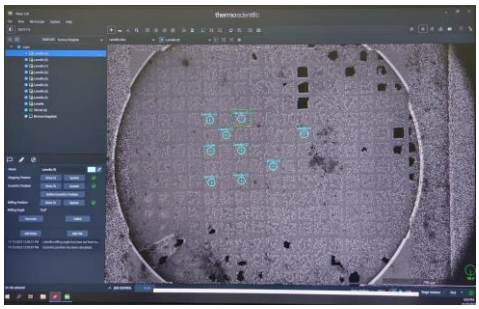
总面积：2.76 um

分辨率：1536×1024

驻留时间：1us

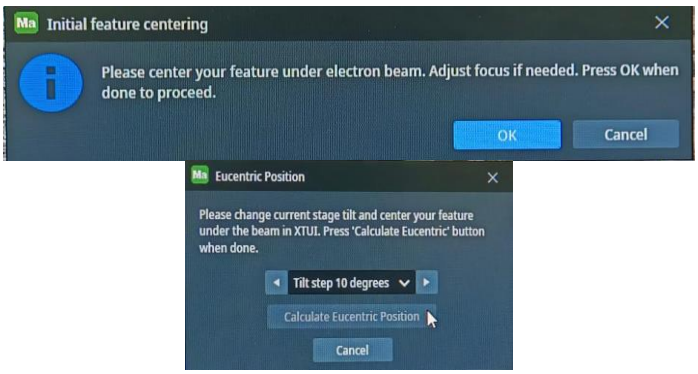
2) 细胞定位及 eucenric 高度（离子束电子束共焦点）调整:

a) 在 Maps 拼接图像中，找到细胞并右键单击，点击 Add Lamella Site Here 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 Lamella，便出现 3 个位置，即 Mapping/Eucentric/Milling Position。 （样品尽量选择 grid 的中间 6-7 个 square 位置，避免后续减薄或 TEM 数据收集时被 O 环遮挡）

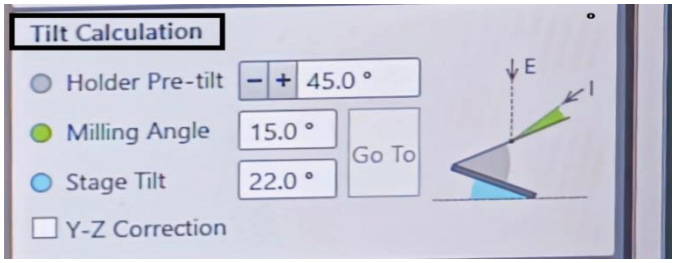


b) Calculate Euthentric Position: 选中 Lamella,点击 Mapping Position 的 Drive to 去到该样品的位置，点击的 Calculate, 屏幕出现 Initial feature centering 提示框，在电子束下找到样品位置，在样品上找一个标记点并聚焦清楚，点击 OK, 屏幕出现 Eccentric Position 提示框，点击左边箭头（此时千万不要点击右边剪头，防止撞击光阑），样品台回撤 10º，在电子束下双击重新回到样品标记点并进行聚焦

（此步骤重复 2～3 次，次数越多越精准），点击 Calculate Eucentric Position，计算并存储高度值后，点击 drive to eucentric position，确认 WD 为 6.7mm 左右则正确，若偏差太大，可进一步进行 refine。



c) Store angle:UI 中打开冷冻模块❄，在 Tilt Calculation 中设置 milling angle 并点击 Go To，确认离子束窗口下可以看到目标物即可，Maps 中点击 Milling Position 的 Store Angle 即可设置 milling Position。

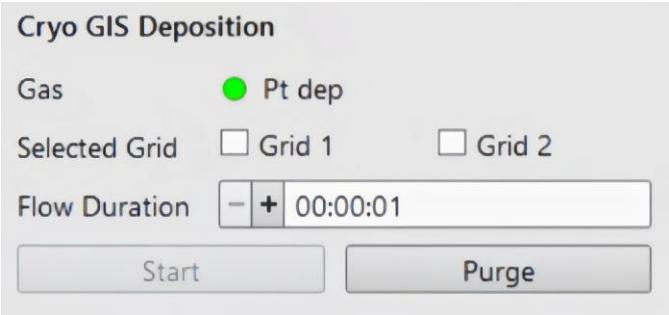


d) 重复 a-c 步骤将所选的细胞全部调到正确高度。（调好高度后切记不要双击屏幕移动样品台）若要移动可通过 image shift 进行。

3) GIS 气体保护层涂覆: 此过程是为了在样品表面涂敷保护层，避免样品在减薄过程中受到离子束灼伤。这步建议在 Maps 选点并调整高度之后。GIS 参数需要优化，因为每个 Aquilos 都不尽相同。同一台设备沉积厚度可以通过调整沉积时间来控制沉积厚度。GIS 合适的沉积厚度有利于样品减薄。

a) 在电子束窗口内聚焦清楚并点击“link”，确认样品的 WD（工作距离）。

b) 点开❄冷冻模块，在 Cryo GIS Deposition 中根据需求选择 Grid1 或 Grid2，时间设为 10s～15s（根据样品调整），点击 Start，观察 CCD 窗口可以看到 GIS 自动进针后倒计时开始，此时 chamber 真空略有下降，待倒计时结束时 GIS 自动退针，退针完成代表喷镀完成，此时观察 SEM 窗口可发现样品立体像减弱，衬度也有少许变化，代表 GIS 涂敷成功。



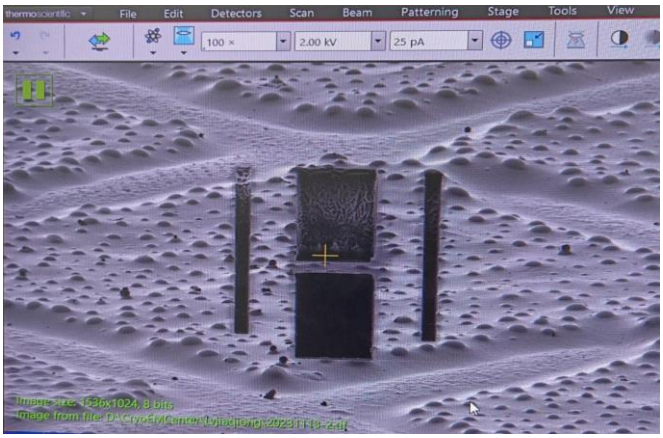
4) Sputter Coating（可选做），参考上述步骤。

4. 样品减薄

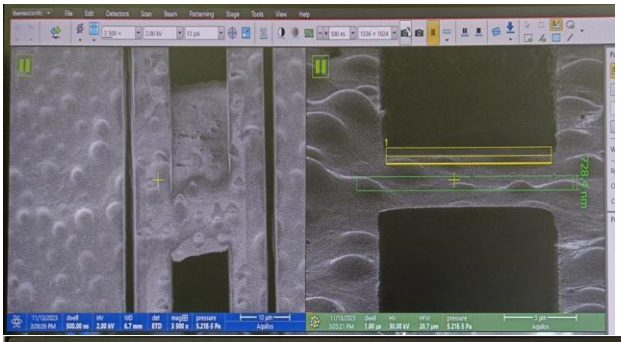
样品减薄遵从离子束束流从大到小的原则，共分为粗修和精修两部分，样品厚度越薄束流应越小，理论 Lamella 目标厚度小于 200nm,在不切破的前提下，越薄越好。

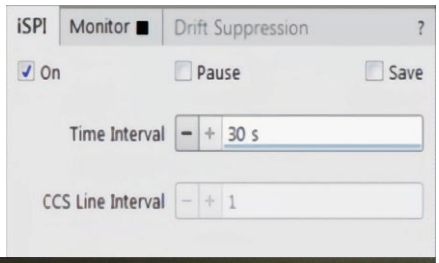
a) Rough milling: Rough milling 是用相对大束流将目标切片两侧挖空，避免后续倾转到高角度时遮挡切片。在 Maps 中，单击其中一个 Lamella 位置，然后选择 Go to milling position，上下均采用 rectangle 工具，方向均朝向目标切片，中间保留 3-5um 样品，将上下两侧挖空，可使用 3nA 或 1nA 束流，宽度尽量不超过 14um 或不超过细胞的 3/4；后续依次减小束流并进行上下表面轮流减薄，直至 Lamella 厚度约 700nm 左右，可使用 rectangle 或 Cleaning Cross Section 工具（使用 CCS 时 Z 一般设置为 Lamella 长度的 1/3 即可），宽度依次减小 0.3-0.5um 左右，最终切片两端成阶梯状。

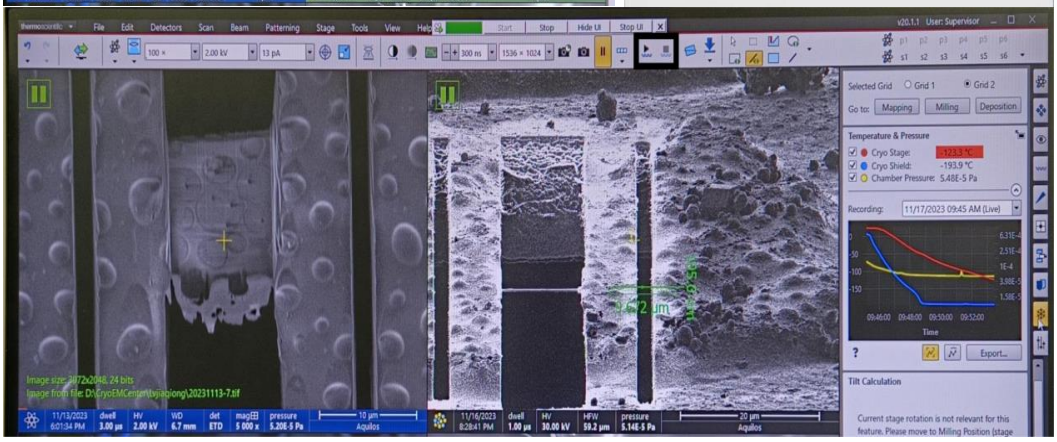
b) Stress Relief Cuts：在 Lamella 左右两侧各切一个切口释放环境张力，避免张力传递至 Lamella 导致 Lamella 损坏。应力槽距离目标切片 5-7um，可使用 rectangle 工具，束流选择 3nA 或 1nA，将切片两侧碳膜切穿即可。应力槽完成后 I-beam 图像如下图所示，单个 Lamella 完成后依次进行下一个位点的切割，直至所有位点全部减薄至 700nm 并做好应力槽。



c) Fine milling：完成所有 Lamella 位点粗切后，在 Maps 中返回第一个位点进行精修，可使用 CCS 工具，上下表面轮流精修，直至减薄至 200nm 以下或出现裂痕无法进行进一步减薄，在精修过程中，可以利用电子束定时刷新观察切片状态，出现裂缝时应立即停止减薄。







d) 所有样品精修结束后，准备 unload 之前，可选做 Sputter Coating,在 Lamella 表面镀一层 Pt 原子，增加 Lamella 导电性，减弱在数据收集过程中的 charging 现象及 beam induced motion。具体步骤参照上述，推荐参数 current 15mA,Pressure 10Pa,Time 7s。

总结：

Rectangle，3/1nA,3um

CCS/ Rectangle，1/0.5nA，1.5um

CCS/ Rectangle，0.5/0.3nA，700nm

CCS， 0.1nA，500nm

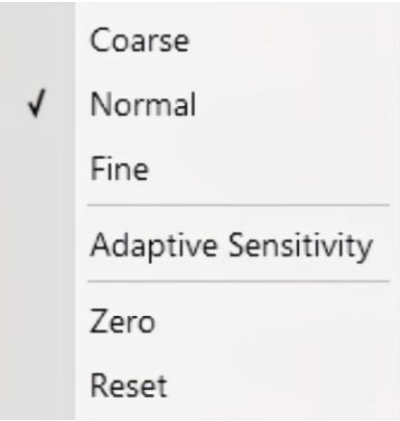
CCS， 50pA，200nm

5. 样品回收

a) 样品减薄结束后，将系统 sleep，同时将电子束及离子束的 beam shift 归零，以及对系统所作的其他更改均需删除，保证页面处于标准状态。

b)

c)

d) 

e) 预冷 Loading station；

f) 开始下样时，按下 Quickloader 上的 Pump 按钮；

g) 打开 Aquilos 门阀，插入传输杆，抓住 shuttle 并收回锁住。样品进入传输杆后，关闭杆阀，然后关闭 Aquilos 闸阀；

h) 按下 Vent，并将传输杆取下；

i) 将杆拿到 Loading station，将其放在气闸盖上。使用黑色夹具将杆连接到气闸盖上；

j) 按下 Pump，等待 Pump 快速闪烁，打开传输杆阀；

k) 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；

l) 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；

m) 将气闸盖与传输杆一起拆下，然后更换上干燥的塑料盖;

n) 将样品夹座翻转到水平位置并将其锁定;

o) 将 Autogrid 移到盒子中，以便接下来 TEM 上样；

p) 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，调整氮气流速为 20，用常温氮气将 stage 和 shield 升温；

q) 填写并记录 Logbook；

r) 收拾并整理实验桌面，带好随身物品，关灯关门离开实验室。

注意：

a) 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;

b) 倾倒 Loading station 液氮时，检查冷冻台中无任何东西。