

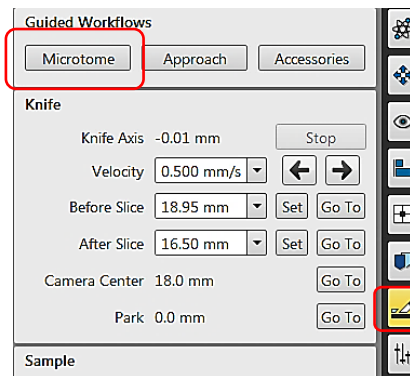
VolumeScope 数据收集流程指南

一、检查电镜状态

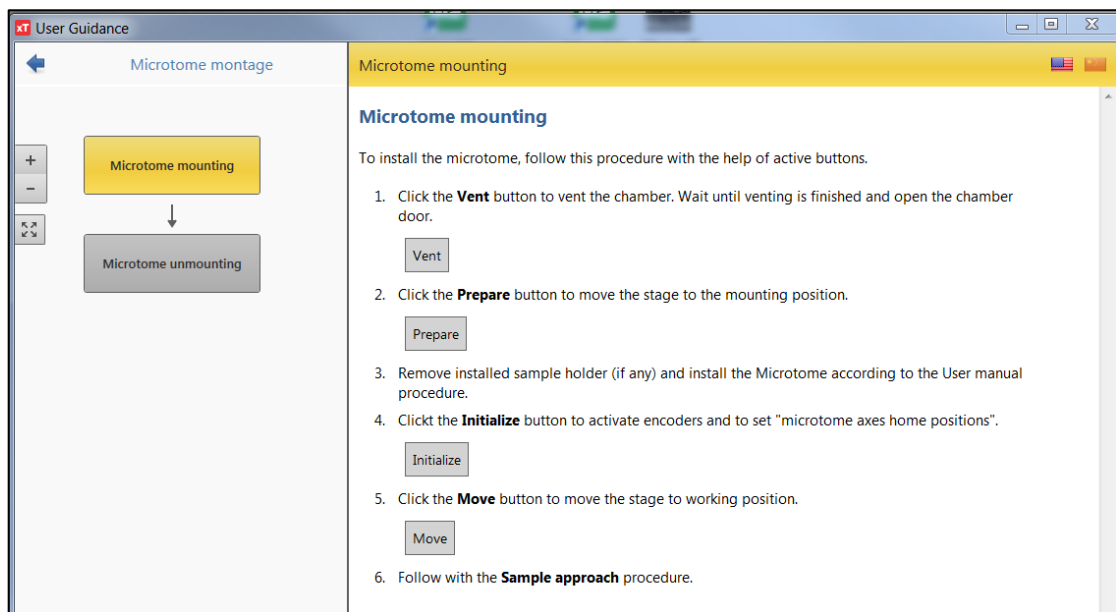
确认 XT UI 是正常运行状态，没有提示报错，样品仓真空良好。

二、装刀台 Microtome mounting

XT UI 右侧的控制页面选择 VolumeScope 选项，刀具图标；Guided Workfolws 点击“**Microtome**”，出现User Guidance；

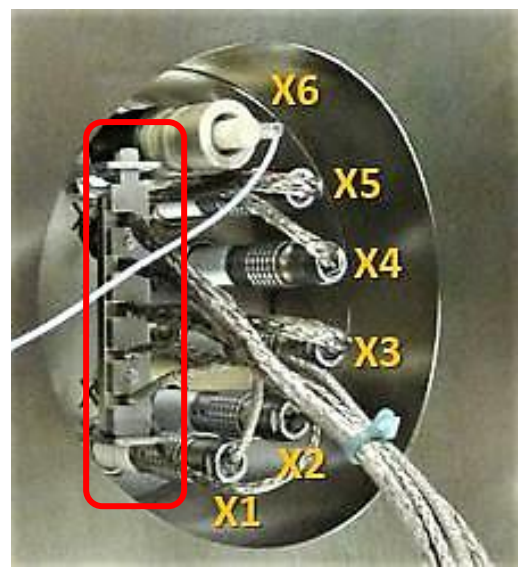
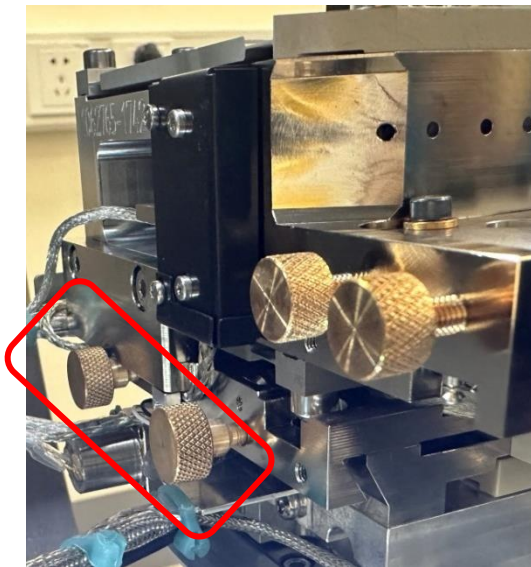
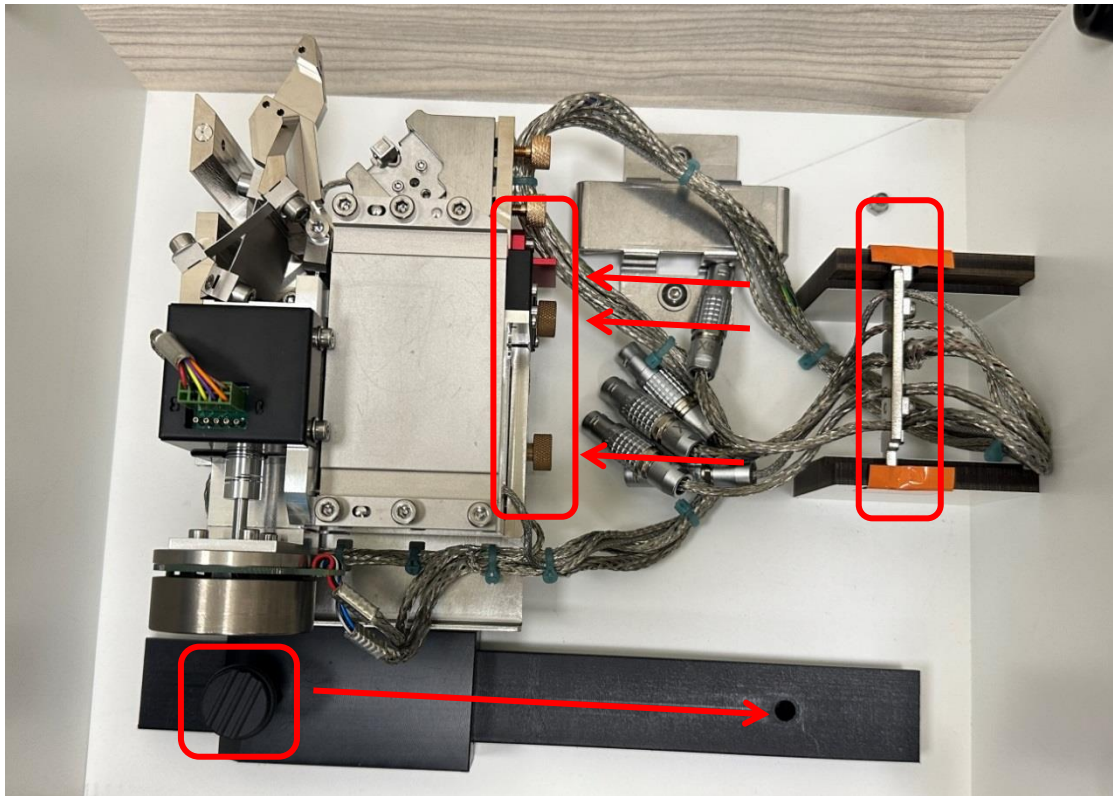


1. “Microtome Mounting” > “Vent” 样品仓泄真空；

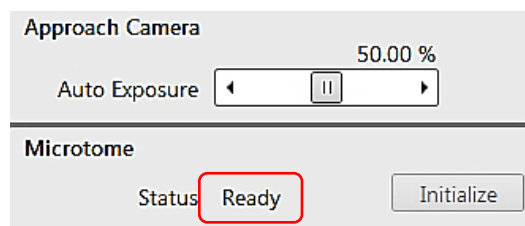


2. 点击“**Prepare**”，移动样品台至安装切片位置，确认stage在Tilt 0°，Rotation 0°；
3. 卸下原装 sample holder，安装切片机：
 - 1) 将固定切片机的黑色定位器提起后从左往右拉，两个黄色固定螺丝旋松，一只手拿好导线，一手托稳切片机，从盒中取出；
 - 2) 切片机侧放在桌面上，取下切片机上的固定器（玫红色）；
 - 3) 将切片机滑至样品台上，用两个黄铜螺丝固定侧面；

- 4) 按 X1 至 X5 的顺序插入导线，红点对准连接器（9 点钟方向），固定好金属片；



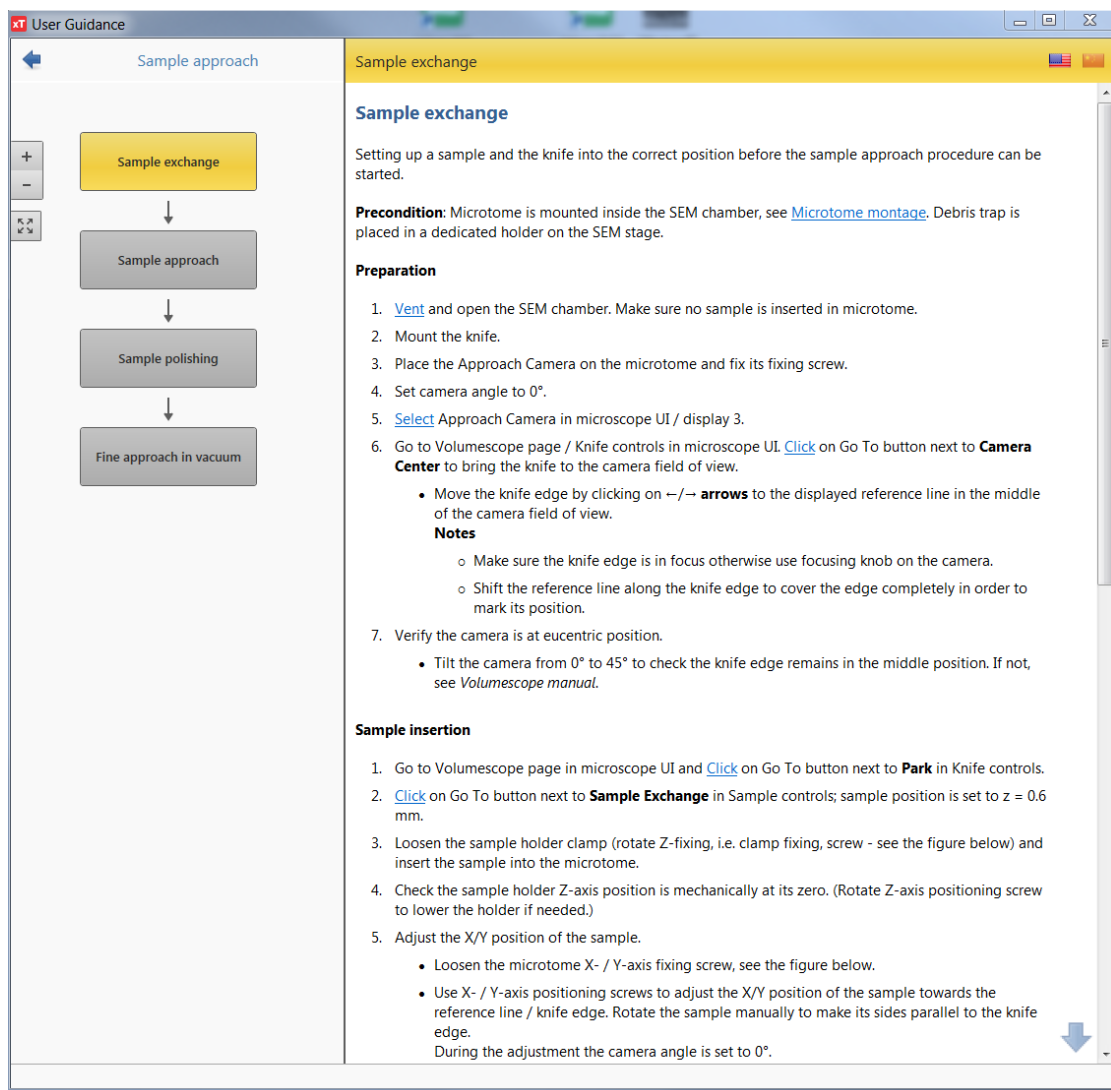
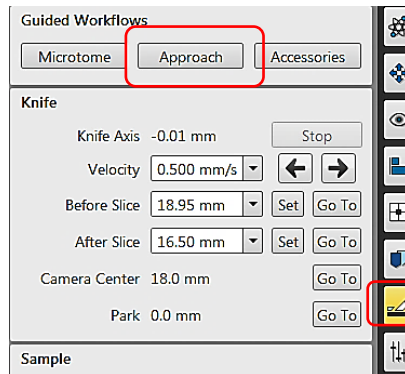
4. 装好切片机后，点击“**Initialize**”，在 UI 界面，如果初始化成功，Microtome 状态应该从 Not home 变为 Ready；



5. 点击“Move”，将样品台移动到工作位置。

三、装样品/换样品 Sample exchange

Guided Workfolws 点击“Approach”>“sample exchange”



User Guidance

Sample approach

Sample exchange

Sample approach

Sample polishing

Fine approach in vacuum

Sample exchange

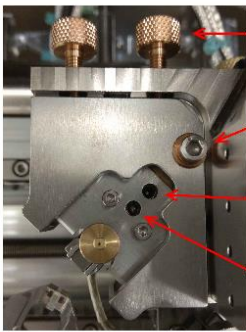
reference line / knife edge. Rotate the sample manually to make its sides parallel to the knife edge. During the adjustment the camera angle is set to 0°.

- Tighten the X- / Y-axis fixing screw.

6. Set the sample to the eucentric position.

- Tilt the camera from 0° to 45° to check the sample position. A shift of the block-face in relation to the reference line indicates the sample position is off.
- Adjust the sample Z-position using Z-axis positioning screw in such a way that the sample is at the eucentric position.
- Tighten Z-fixing screw.

7. [Click](#) on Go To button next to **Park Sample** in Sample controls.



X- / Y-axis positioning screws

X- / Y-axis fixing screw

Z-fixing screw

Z-axis positioning screw

Microtome: sample positioning and fixing screws.

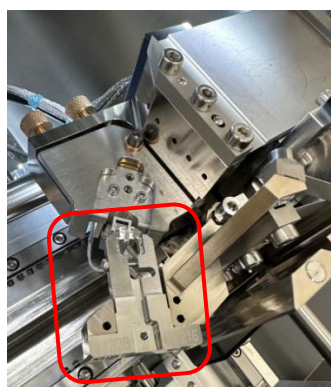
Cutting window

1. Set the camera angle to 0°.
2. Go to Volumescope page / Knife controls in microscope UI. Define cutting window, i.e. Before/After Slice position.
 - [Click](#) on Go To button next to **Before Slice**. Move the knife edge by clicking on ←/→ arrow to a position before the edge of the sample block.
 - [Click](#) on Set button next to **Before Slice**.
 - Similarly repeat the procedure as above to define **After Slice** position.
3. [Click](#) on Go To button next to **Park** in Knife Controls to park the knife.

See [Volumescope manual](#), Sample Exchange for more details.

➤ 准备

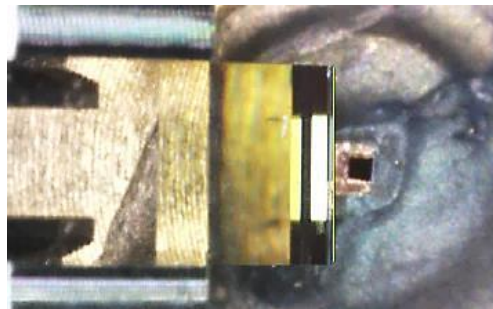
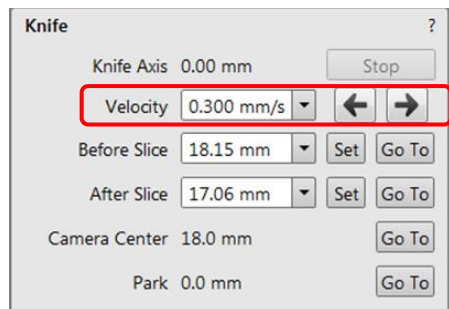
1. 确认样品仓 **Vent**, 切片机上无样品;
2. 体视镜下检查钻石刀是否完好干净, 并安装 (切记捏好扶稳, 不碰刀刃, 轻拿轻放!);



3. 安装 Approach Camera 外置相机至切片机上, 旋紧固定螺丝 fixing screw, 将 2 个 USB 接口 (顶灯和底灯) 插入电脑主机 (有时安装过程会中断切片机的通信, 可再次点击“Initialize”);

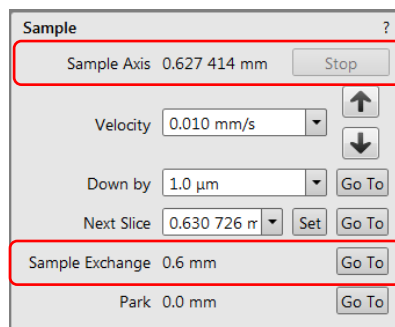


4. 调整相机 0°，即垂直样品方向；
5. 选择 UI 窗口 display 3 为外置相机显示界面；
6. 进刀，对相机高度。点击 Velocity 旁边的箭头“←/→”将刀刃移动到相机视野的中间，通过调节相机身上的对焦旋钮，确保刀刃锋聚焦。移动刀刃锋接近绿色基准线，以标记刀的位置；
7. 将相机从 0°倾斜到 45°，如果相机在 eucentric height，刀刃应该始终保持在基准参考线位置；若刀刃位置较基准参考线发生较大偏移，则需要重新调整相机高度（联系管理员）。

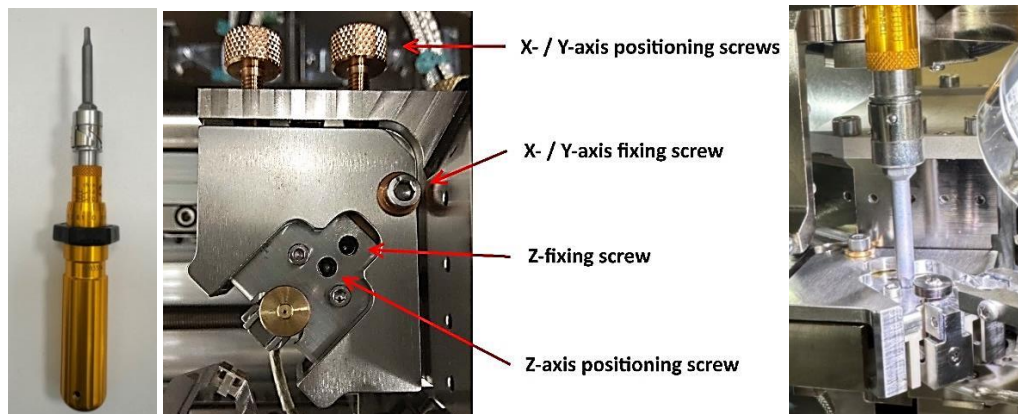


➤ 插入样品 Sample insertion

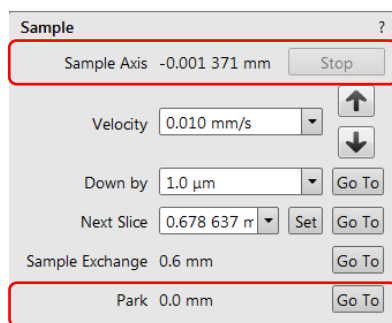
1. 将刀移动到 **Park** 位置，即更换样品前收刀；
2. **Go to Sample Exchange**，样品 Z 轴升至 **z = 0.6 mm** 的位置；



3. 使用扭力螺丝刀松开 z 轴定位螺钉 **Z-fixing**（逆时针拧 2-3 圈），轻拨开固定夹器，插入样品；
4. 通过 z 轴定位螺钉 **Z-axis position** 将机械杠杆置零（逆时针拧到螺丝接近顶部），轻微将样品钉子往下压到最低，拧上 **Z-fixing** 约 80%，此时可以手动旋转样品以便调整样品短边平行于刀刃，调整结束后，锁紧 **Z-fixing**（顺时针至出现“啪”声音）；

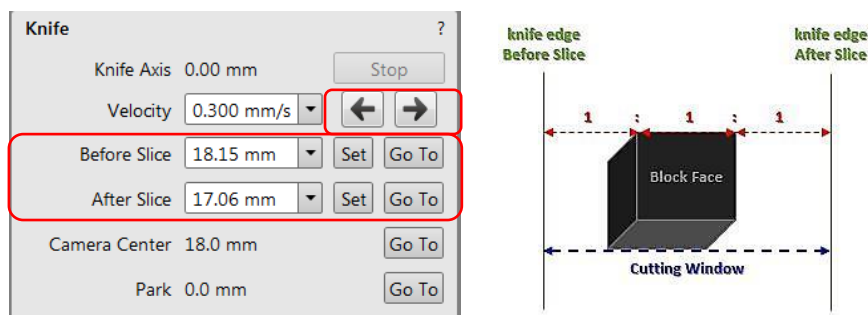


5. 调节样品 XY 位置。先松开 X/Y 固定螺钉 **X-/Y-axis fixing**（逆时针拧 1-2 圈），利用 X/Y 定位螺钉 **X-/Y-axis positioning**（侧面黄铜螺丝）调整样品位置处于绿色参考线（刀刃位置）右侧，并根据刀刃状况调整样品 Y 方向位置；随后拧紧 **X-/Y-axis fixing**；（此步骤调整时需在 camera 0°下观察样品位置）；设置样品 Eucenric position。倾斜相机从 0°到 45°，调整 **Z-axis position** 使样品块的左侧边缘缓慢靠近绿线（**顺时针慢拧，留一点点缝隙**），随后完全拧紧 **Z-fixing**；（由于 **Z-fixing** 拧紧后有残留的向左移动，因此调整 **Z-axis position** 时要在刀刃和样品之间留出约 2 μm 的空间）；
6. 将样品回到 **Park** 位置，确认 **sample axis 归零**，旋转 Approach camera 确认样品左侧边缘未超过绿色参考线（刀刃位置）。



➤ 确认窗口 **Cutting window**

1. 设置 Approach camera 角度为 0°；
2. 在 UI 界面中的 Knife 窗口，通过设置 “**Before Slice**” 切片前和 “**After Slice**” 切片后位置来定义切片窗口。通过“←/→” 移动刀刃，在样品左右各留一个块的距离，位置确定好后点击 Set；
3. 将刀移动到 **Park** 位置。



四、样品对刀 Sample approach

User Guidance

Sample approach

Sample exchange

↓

Sample approach

↓

Sample polishing

↓

Fine approach in vacuum

Sample approach

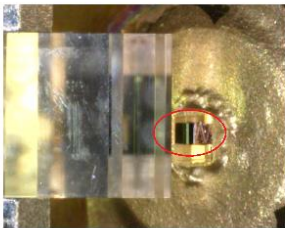
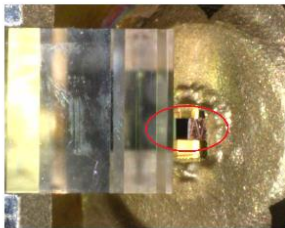
- Set the camera angle to about 30° or 40°.

Note: The scale on the camera tool delimits the range from 20° to 50°; one longer notch represents 10°.
- Turn the backlight at the side of the camera tool to the predefined position to illuminate the sample surface.
- Go to Volumescope page / Knife in microscope UI. [Click](#) on Go To button next to **Before Slice**.
- [Switch off](#) the camera light by clicking on a green icon in Approach Camera window in microscope UI.
 - Optionally, you may start the approach with the camera light on, and switch it off when being close to the knife, see below.
- Move the knife and adjust the camera tilt manually by a few degrees to see the light reflection on the sample surface clearly.
- Go to Volumescope page / Sample in microscope UI. Gradually move the sample towards the knife by clicking on **arrow 1**.
 - Start with the sample velocity of 0.05 mm/s. When being closer to the knife decrease it to 0.01 mm/s to control the knife distance precisely.

Notes

- The light reflection of the knife edge on the sample surface is a measure of the distance between the knife and sample surface, see the figure below. Find the position where the reflection has almost disappeared.
- Check the sample surface is parallel to the knife by moving the knife over the block-face during the approach. Watch the distance between the knife edge and the reflection line along its length. Sample tilt is manifested as a change in the distance.

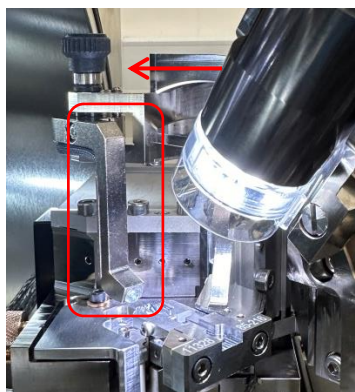
- Stop with the approach when the backlight reflection has almost disappeared.
- Click on [Set](#) button next to the **Next Slice** window.

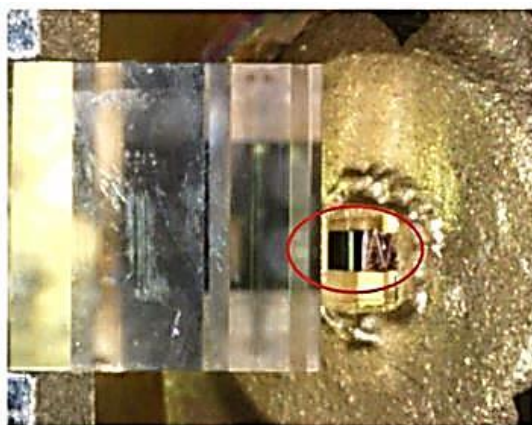
Sample is far (left) / close (right) to the knife during the approach.

See [Volumescope manual](#), Sample Approach for more details.

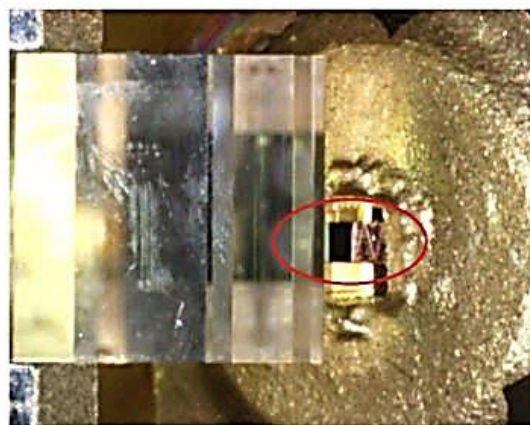
- 设置 Approach camera 至 30 ~ 40°左右（为了方便后续找反光带）；
- 将 Approach camera 的底灯移动到样品处（逆时针旋转），照亮样品表面；
- 在 UI 界面 Knife 窗口，点击 **Go to** 到 **Before Slice** 位置，进刀；
- 通过在 UI 中单击摄像机窗口（display 3）中的绿色图标，关闭顶灯，或直接点击步骤中的 **switch off**；

Approach
Camera OnApproach
Camera Off

5. 通过“←/→”移动刀，先看清样品上表面左右边界，然后手动调整 Approach camera 倾斜角度，直到找到一个角度能够清晰看到样品表面上的反光条（找最右的一条）；
6. 通过 Sample 窗口的“↑/↓”调整样品高度，使得样品逐渐靠近钻石刀；
 - 开始时样品上升速度可用 0.05 mm/s，逐渐靠近后改小为 0.01 mm/s；
 - 刀刃在样品表面刀刃的反光带随两者之间的距离减小而变窄变细；
 - 当反光带超出样品表面边界时，可以通过“←/→”调整刀的位置，使得反光带保持在样品表面；
 - 只要还能看到反光带，说明样品表面还未接触到刀刃；
 - 如果反光带不平行于刀刃，请小心，因为这表明块体表面不平整（高的区域比低的区域更接近刀刃；因此，反射更窄）。
7. 不断调节样品高度和刀的位置，使得反光带接近消失（此时 sample axis 应接近 0.6 mm）；



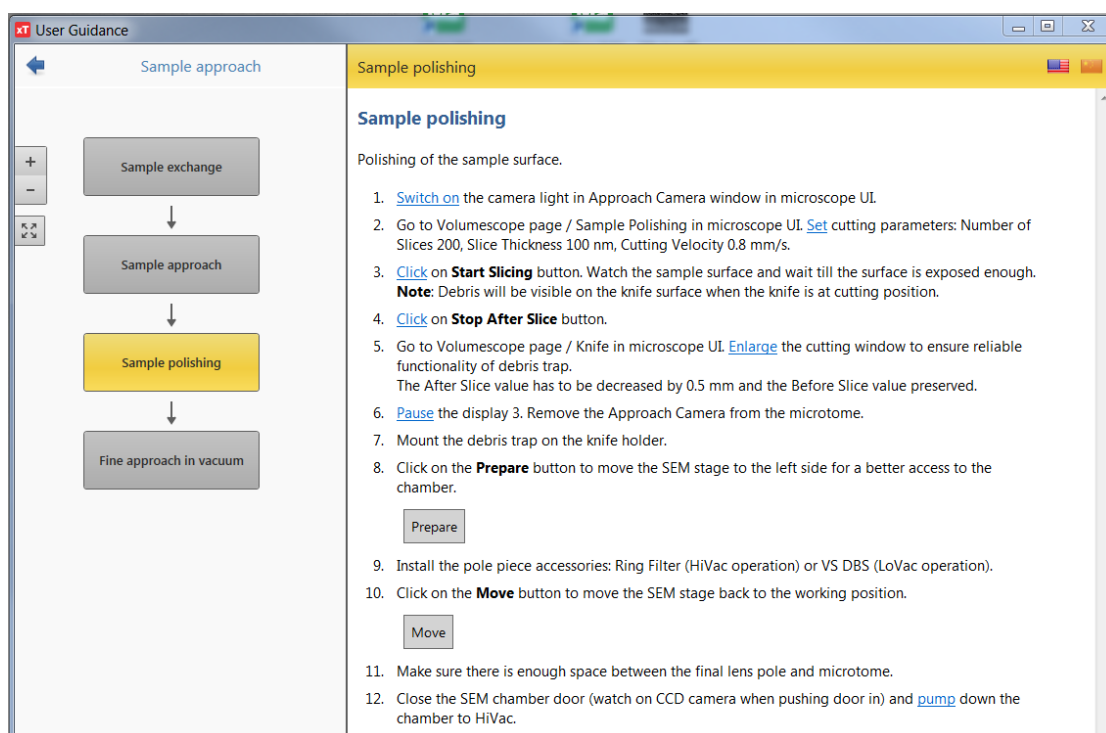
reflection away from the knife edge



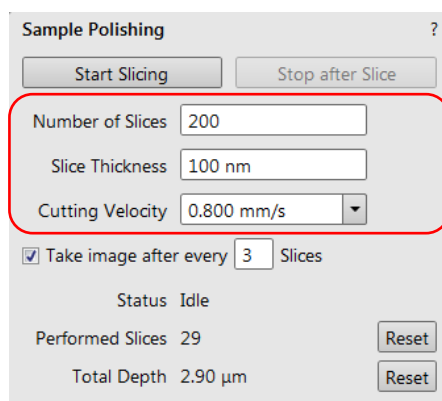
reflection close to the knife edge

8. 点击 Set 设置 Next Slice 窗口（当前高度 Sample Axis + Thickness = Next Slice）。

五、样品粗修 sample polishing



1. 打开 Approach camera 顶灯，移开底灯；
2. 在UI界面中的 **Sample Polishing** 窗口，设置切片参数：
Number of Slices = 200, Slice Thickness = 100 nm, Cutting Velocity = 0.8 mm/s.
切片厚度不超过200 nm，开始前可将 Performed Slices 和 total Depth 清零，即点击Reset。



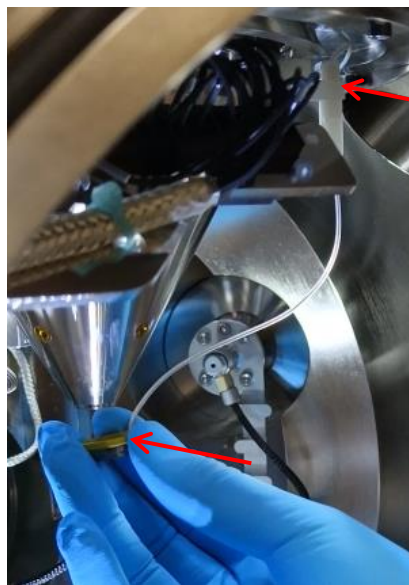
3. 点击“**Start Slicing**”按钮，直到表面充分暴露（当切到样品表面时，刀刃上会有碎屑。如果样品表面不平整，则继续切割直至一片完整的碎片被收集）；
4. 切到完整样品表面时停止，点击“**Stop After Slice**”；
5. 在UI界面中 Knife 窗口，Enlarge 会把 after slice 减去0.5 mm（即往右），确保 debris trap 的使用；
6. 暂停 display 3 窗口，卸下 Approach camera；
7. 安装 debris trap 至刀架上（**两个手指轻捏，不要用力按压钻石刀刃处**）；



8. 点击 Prepare, 样品台移至左侧;
9. 安装 Ring Filter (高真空) 或 VS DBS (低真空);



Ring Filter

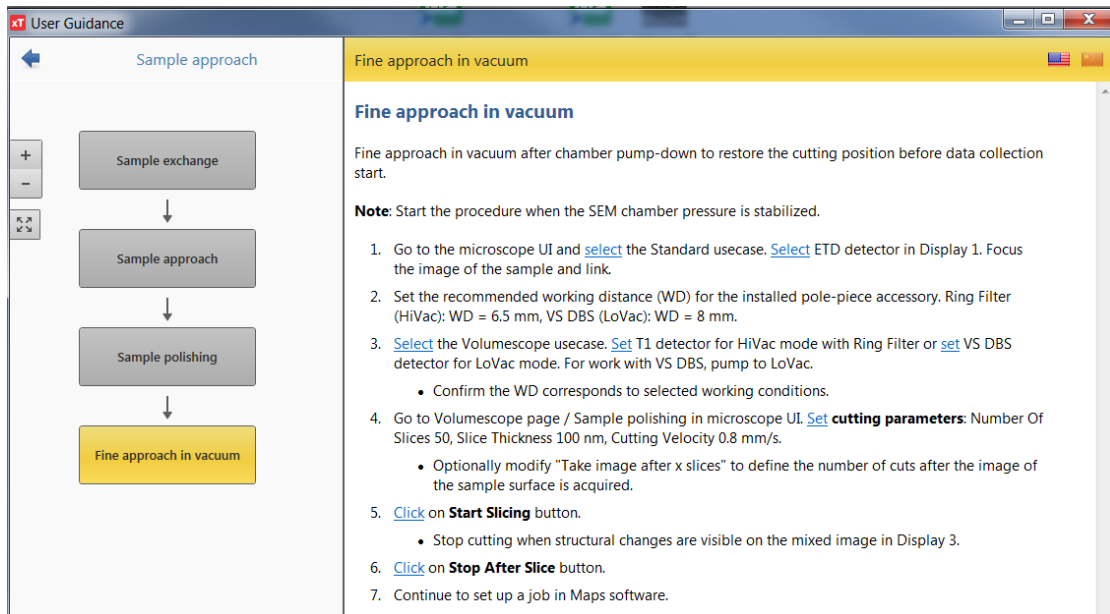


VS DBS

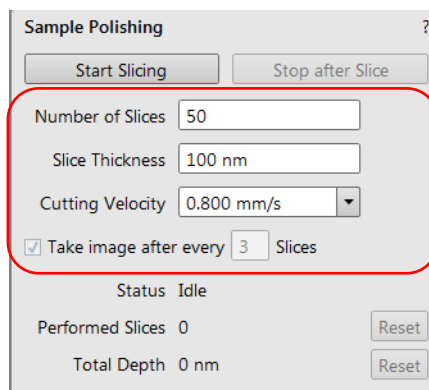


10. 点击 **Move** 样品台至工作位置;
11. 关上样品仓门, Pump 抽上真空, 选择对应的配件 (Ring Filter 或 VS DBS)。
 - 可提前一天下午装样装刀, 真空抽一晚上 (抽 8h 以上, 最少也需 2-3h 使室压稳定);
 - 抽完真空样品和刀之间的距离会变大, 是正常的;

六、在真空下精修对刀 Fine Approach in Vacuum



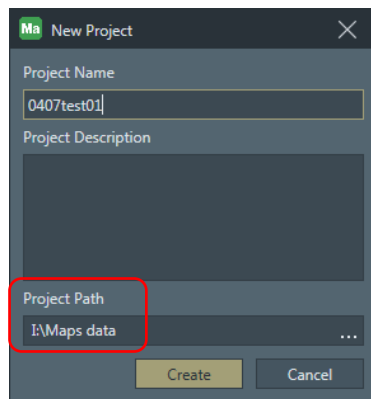
- 电子束 beam on, display 窗口1设置为 ETD 探测器，设置光束条件，找到样品精确调焦，link Z to WD，调好电镜相关参数（Lens，stigmator 等）；
- 根据模式设置 WD，**Ring Filter (HiVac) 6.5mm, VS DBS (LoVac) 8mm**；
- HiVac** 设置 **T1**探测器，**LoVac** 设置 **VS DBS** 探测器，
- 在UI界面 sample polishing 窗口设置切割参数：
Number of Slices = 50, Slice Thickness = 100nm, Cutting Velocity = 0.8 mm/s.
为了评估切片过程中图像之间的结构变化，可以通过勾选 “Take image after every nth Slices”选项来定义切割的次数。



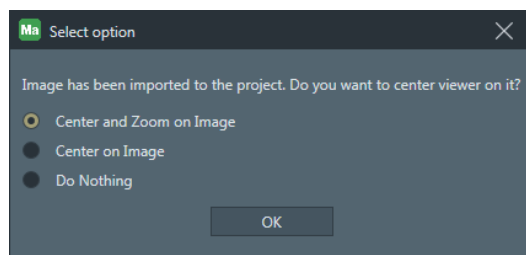
- Start Slicing**，每切三刀拍一次图片，分别显示在 Display1 和 Display2，两张照片的叠加显示在 Display3；
- 当 Display1 和 Display2 出现结构不一致，Display3 图像明显模糊，说明已经切到样品，可以点击 **Stop after Slice**；
- 打开 **Maps** 软件进行数据采集设置。

七、数据收集

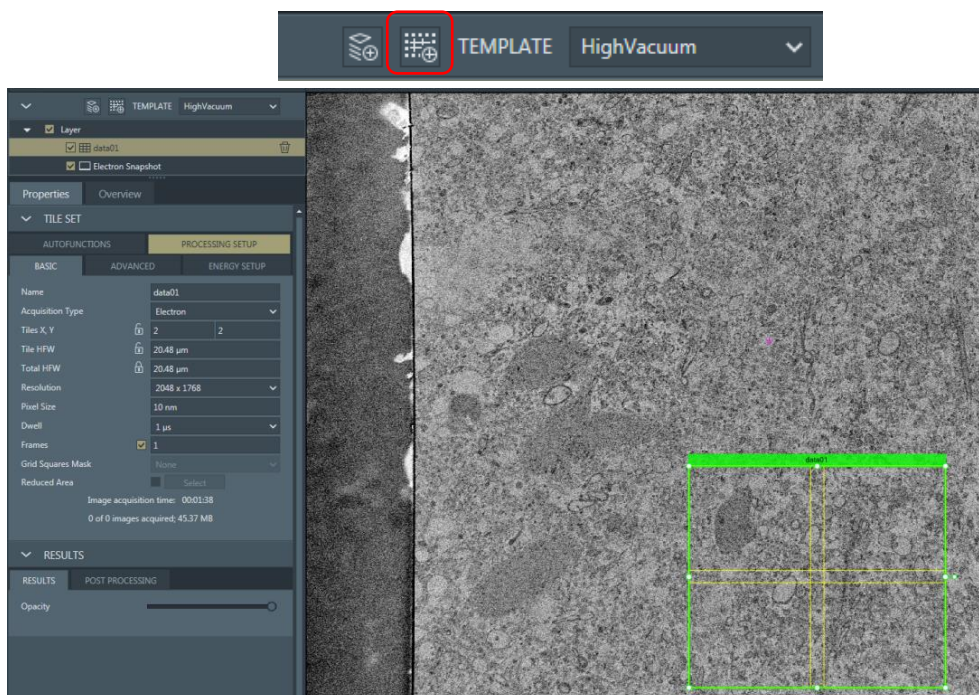
1. 打开 Maps 软件，创建一个新的 Maps 项目（路径设置 I 盘）；



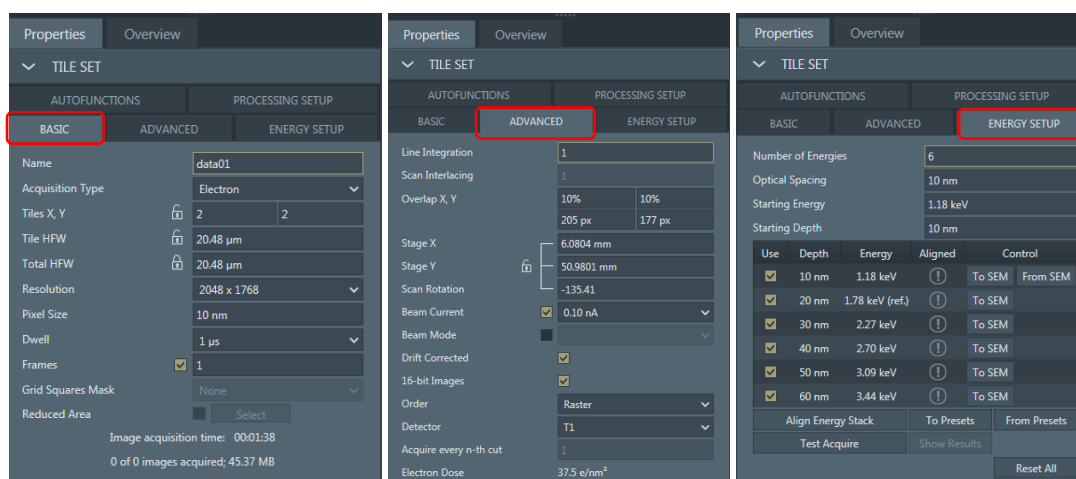
2. 在 UI 中 display 窗口 1 调到合适的低倍找到感兴趣的样品区，用 **6k x 4k, 3μs** 拍一张清晰的大地图，然后在 Maps 软件中 Microscope > Get Image from XTUI，导入刚拍的大地图，选择 Center and Zoom on Image；



3. 在大地图选择要收数据的区域，双击移动 stage，去 UI 中确认去到的位置是否与大地图对应；
4. **Add tile set**，设置数据采集区域 properties 参数：



■ Properties 参数



4.1 Basic

- Name 可修改 tile set 名称；
- Tile X Y, 在 X 和 Y 方向上数据收集的图片数，拖动大地图上的绿框可以变成拼图，即数字大于 1（建议在满足分辨率的情况下能不使用拼图时就不拼图）；
- Resolution 与 Pixel size 决定图片分辨率好坏（不要采集正方形图片，用长方形）；
- Dwell 与 Frames 决定图像信噪比，荷电严重时可用短的 Dwell 时间叠加多张 Frames；
- Reduced Area 仅在不拼图时能勾选使用，即选择绿框内更小感兴趣区域采集数据；

4.2 Advanced

- Line Integration 默认 1；
- Overlap X Y, 每片拼图的重叠区域（不拼图用不上）；
- Order 拍图顺序；
- Acquire every n-th cut 单电压下可改数值，实现每 n 刀拍一次图片，多电压下不可改，1 即每切一刀就拍图片；

4.3 Energy Setup

- Number of Energies 使用的电压数，单电压为 1，多电压建议用 4；
注：由于 z 方向分辨力不够（50 nm），可以采取多电压扫图的方式提高 z 方向的精度。即每个电压下扫一张图，通过反卷积后得到对应的不同的 z 深度，以此提高 z 分辨率。由于多电压方式对样品的稳定性、导电性要求高，因此一般情况都建议用单电压模式；
- Optical Spacing 对应反卷积后的 z 精度；
- 若使用多电压模式，需做 Align Energy Stack，点击后会自动开始；

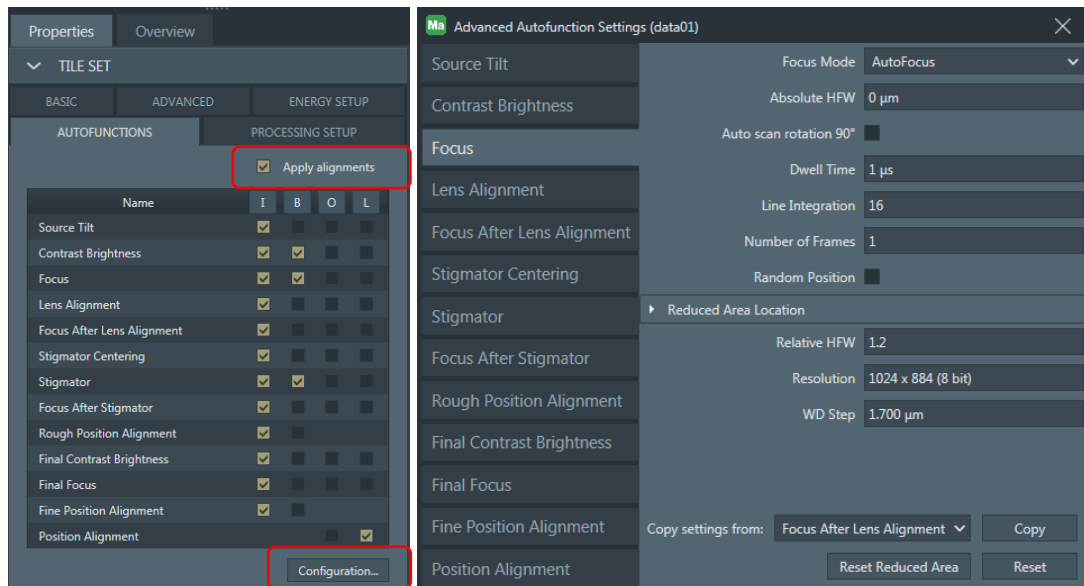
4.4 Processing Setup

- 预处理数据，参数都默认即可；

4.5 Auto Functions

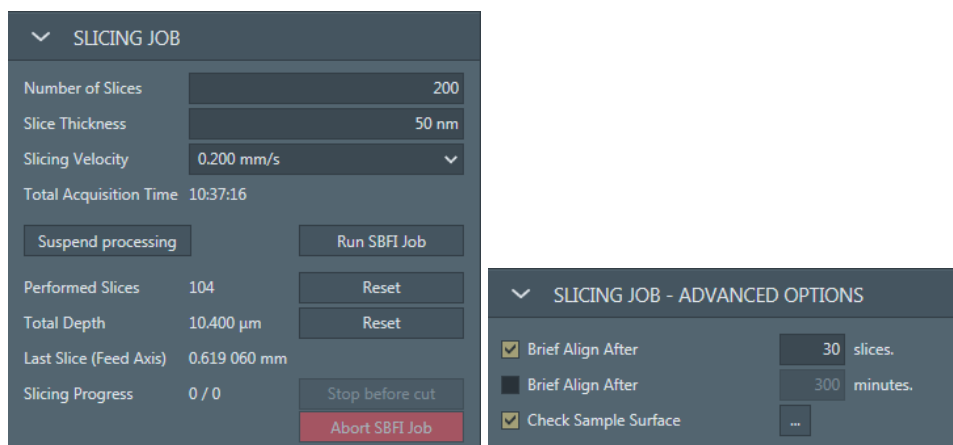
- Apply alignments 若使用多电压模式，此选项必勾选；单电压模式可不勾选（即手动做更好）；

- I (Initial) : 在创建的项目开始执行前做最初选的 alignment;
- B (Brief) : 在一定数量的切片完成或指定时间后执行简要的选定的 alignment;
- O (One time) : 只在第一个 tilt 中执行一次选定的 alignment;
- L (Local) : 在每个 tile 拍照之前执行局部的选定的 alignment;
- 在右下角 Configuration 中可设置每一项 alignment 的具体参数;



注：若用同一个参数的 tile set，可直接右键 copy grid，拍摄不同区域，也可单独修改 pixel size 等参数；alignment 区域也可单独用一个 tile set，放置在拍照区域旁边。

5. Slicing Job 切片设置

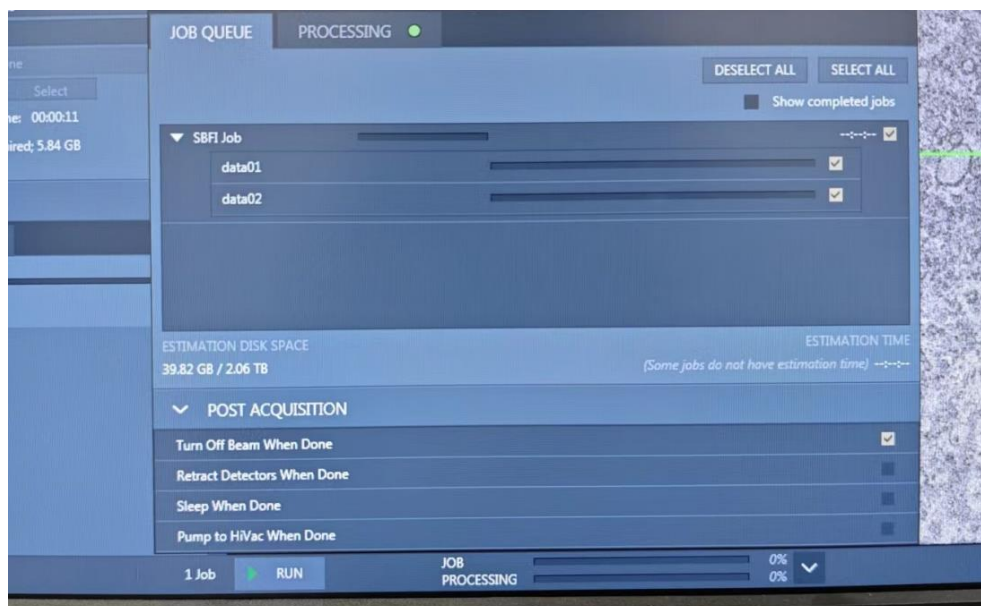


- Slice thickness **不能超过 100 nm**;
- Performed Slices 当前已经切了多少片，在新项目开始前可 Reset 归零;
- Total Depth 当前已经切了多少深度，在新项目开始前可 Reset 归零;
- Brief Align After ___ slices : Autofunctions 里 B 选项下的 alignment 项目在切多少片之后做;
- Brief Align After ___ minutes : Autofunctions 里 B 选项下的 alignment 项目在隔多少时间之后做;
- Check Sample Surface **建议勾选**，点开...后 Create New Area for Analysis，设置

Dwell 图像采集时间和 Frames 图片张数。该功能是通过拍两张 Image 观察比对是否有表面切片残留，若有，则在高度不改变的情况下表面再切一刀，直到表面干净为止。

6. Job queue 底部工具栏箭头点开

- SBFI Job 可上下拖动调整不同 tile set 的拍照顺序，也可随时去掉勾选，取消该区域（无需 stop job）；
- 当样品荷电严重，采取短 Dwell 和 Frames 叠加的方法时，可通过 copy grid 在拍照区域基础上设置一个更大区域，用大 pixel size、小束流多扫几次去荷电，在 job 队列中放在最前；
- Post acquisition 任务完成后对电镜进行的操作，可自行选择。**Beam off 必选。**



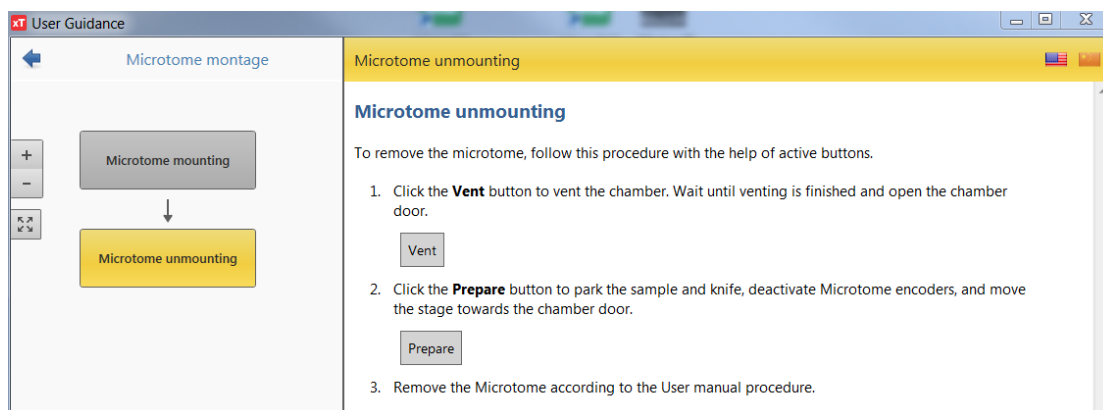
➤ 数据文件

Layers_Data: 包含所有原始图片，未拼，未处理，每个子文件夹对应不同 tile set；

Plugin_Data: 包含处理后的图片，拼好的图在 processed 中；

文件名带 s 表示对应的切片，文件名带 e 表示多电压模式下的电压。

八、结束实验 Microtome unmounting



1. 点击 **Vent** 样品仓放气，刀台会自动降低高度；
2. 点击 **Prepare**，钻石刀和样品自动回到 Park 位置；
3. 卸样品和刀台
 - 3.1 先松 Z-fixing（拧 2 圈即可），固定钉子的夹子会松开，取下样品；
 - 3.2 卸下 debris trap（轻捏往上翘后提起）反向扣在固定器上（往前送再向后拉卡好）；
 - 3.3 卸下钻石刀放置刀架上（轻拿轻放）；
 - 3.4 拆 Ring Filter，先拔圆环再拔线（**四指握住，大拇指轻拨下环，勿碰极靴！！**）；
 - 3.5 卸刀台。先取下金属板，按照 X5 到 X1 的顺序拔下线缆，拧松固定螺丝，拿下刀台，放置桌面上，旋好固定器，清洁一下刀台放回盒中收好；
 - 3.6 用吸尘器清洁极靴，按住小孔再放松，多次重复；
 - 3.7 用吸尘器清洁样品台和 debris trap；
 - 3.8 清洗钻石刀，酒精沾湿泡沫棒尖端，垂直刀刃擦拭（若非常脏可用洗洁精浸泡清洗）。

