

Aquilos 细胞样品自动减薄 (AutoTEM) 操作指南

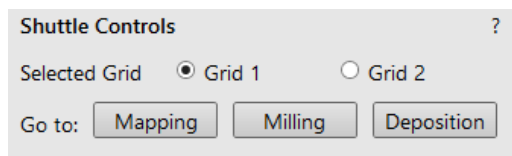
一、AutoTEM 工作流程

1.1 样品组装

载网样品正常卡环，卡环时载网样品面朝下，卡环之前标记卡环方向，卡环完成后，将组装好的 autogrid 放置到 shuttle 中 1 号位置（左边）和 2 号位置（右边）。

1.2 Sample checking

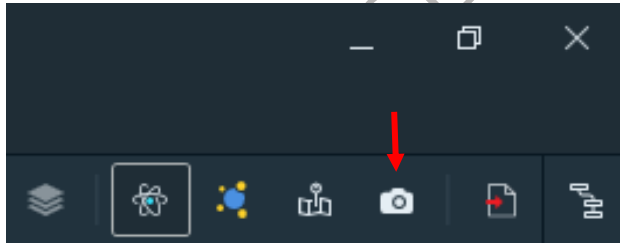
将 shuttle load 进电镜中，通过 CryoTab 工具栏  移动样品台至 Grid1/2 Mapping position，通过 Ebeam 在高倍及低倍下检查样品，确认样品后 Go to mapping Position 后倍数降低至可以看到整个载网。



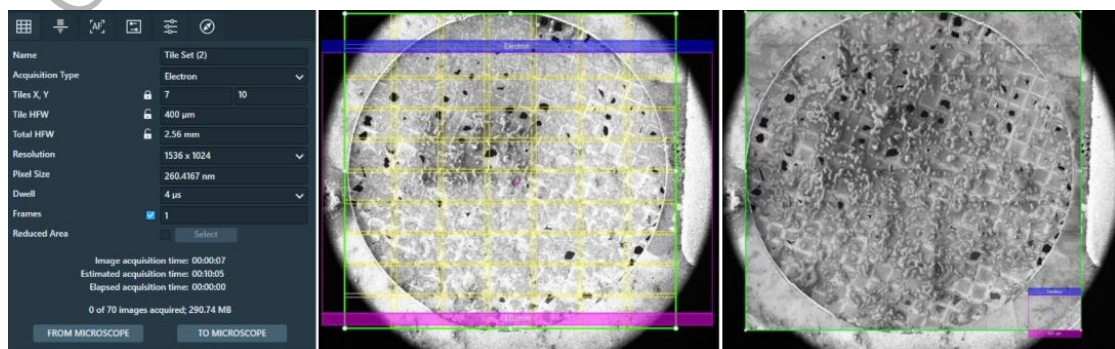
1.3 Maps 软件设置

1.3.1 打开 Maps，新建一个 project，存储 D: 课题组文件夹内。

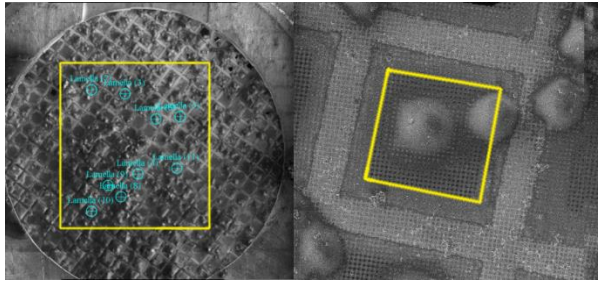
1.3.2 点击 take a snapshot 拍一张整个载网的缩略图。



1.3.3 选择模板 GridMapping，点击添加 tileset，调整 tileset 的位置和数量及拍照参数后，点击开始进行拍高倍地图。



1.3.4 选 ROI: 可以滚轮放大缩小图片，选取感兴趣的位置，右键后点击 Add Lamella Site Here,尽量在黄色区域内选位置，尽量选在 Square 中间区域。

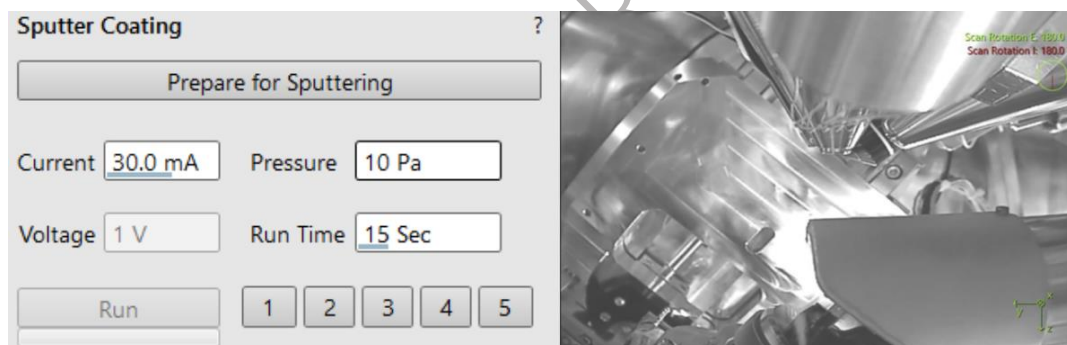


1.3.5 Grid2 (如有) 上重复 3.2-3.4 步骤，添加完所有的 ROIs。

1.4 Coating the grids (三明治结构)

1.4.1 Sputter coating: 在 UI 界面，通过 CryoTab 工具栏  点击 *Prepare for Sputtering*，样品台移动到 sputter 位置后，真空达到指定值（一般为 10Pa，真空图 chamber 变成蓝色），设好参数后点击 Run，样品台会上移且会变亮，变亮说明正常 Coating 了，两个载网都会被 coating。结束后点击 *Recover from Sputtering*

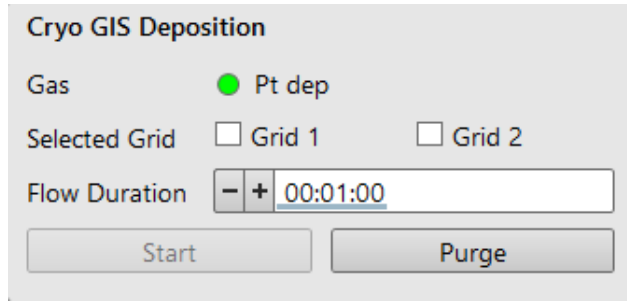
- Current: 30 mA
- Pressure: 10 Pa
- Run Time: 15 s



注意:

Sputter coating 过程中会引起样品台少许升温，应尽量避免长时间处于此状态，另在 sputter coating 之前可以稍微加大气流量补偿升温效应

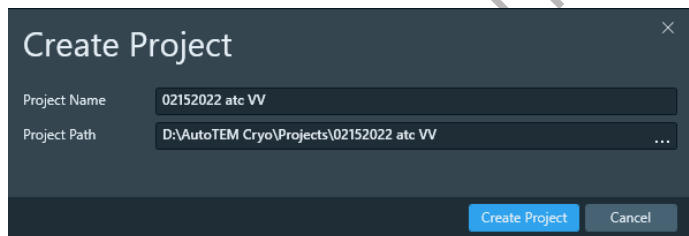
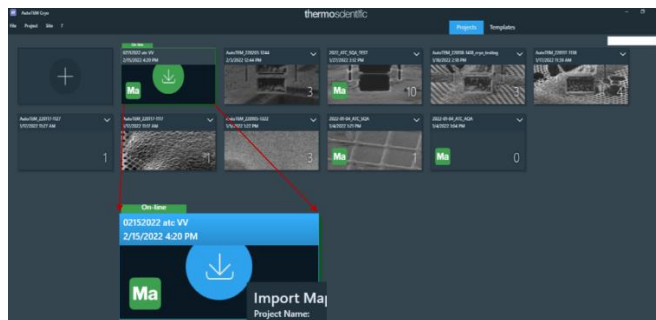
1.4.2 GIS coating: Go to Mapping position，放大并聚焦样品，点击 link Z to FWD  后变成 ，在 Cryo GIS Deposition 版块勾选 Grid1/2,并选择喷镀时间（一般 15-30s，视情况而定）点击 start 后，样品台自动移动到 Deposition position 后，自动 insert 后自动开启 flow 设定时间后自动退针并回到 last position。



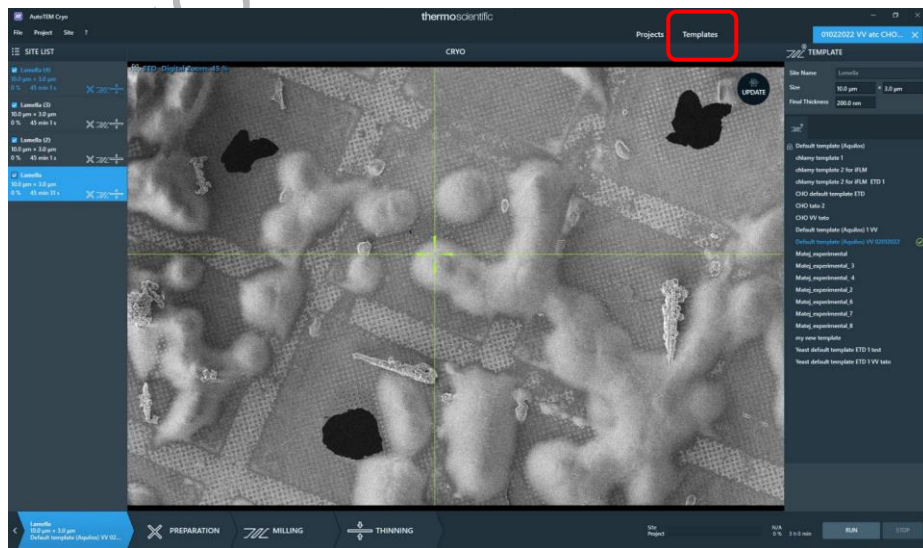
1.4.3 Second Sputter Coating after GIS (optional)具体步骤与第一次相同，见上文。

1.5 AutoTEM 软件设置

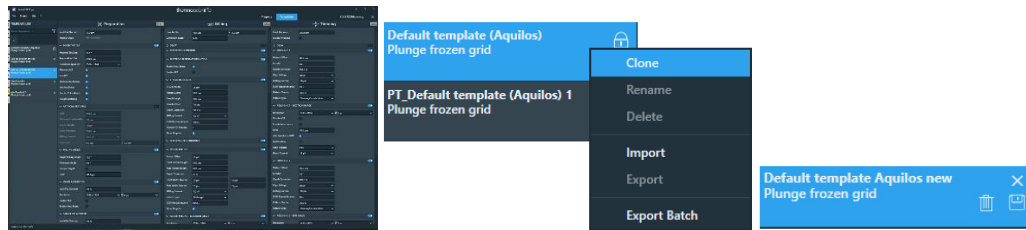
1.5.1 打开 AutoTEM，会显示绿色 Maps Online 图标，可以直接将 Maps 数据导入 AutoTEM，新建一个 project 名字，存储 D:\课题组文件夹内，AutoTEM 文件夹内容较大，预计需 20G 空间。



导入 Maps 文件后，Maps 里选的 Lamella 位置会出现在 Site list 面板处，如图示。



1.5.2 模板设置，点击 Templates 界面，选择并更改模板。尽量不改动别人的模板，可以右键 clone 后，复制成自己的再进行改动，改动后点击保存，设置方法可参考第二/四部分。

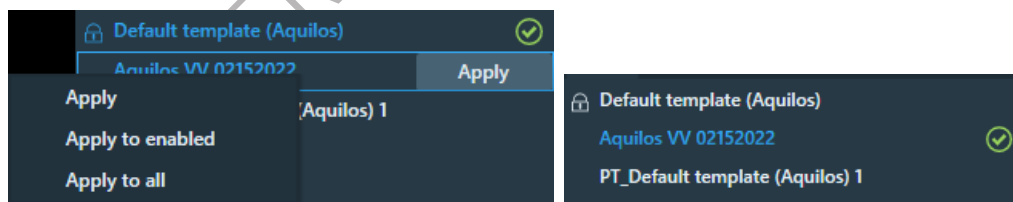


1.5.3 模板调整结束后点击界面右上角 Projects 选项卡进入当前项目。

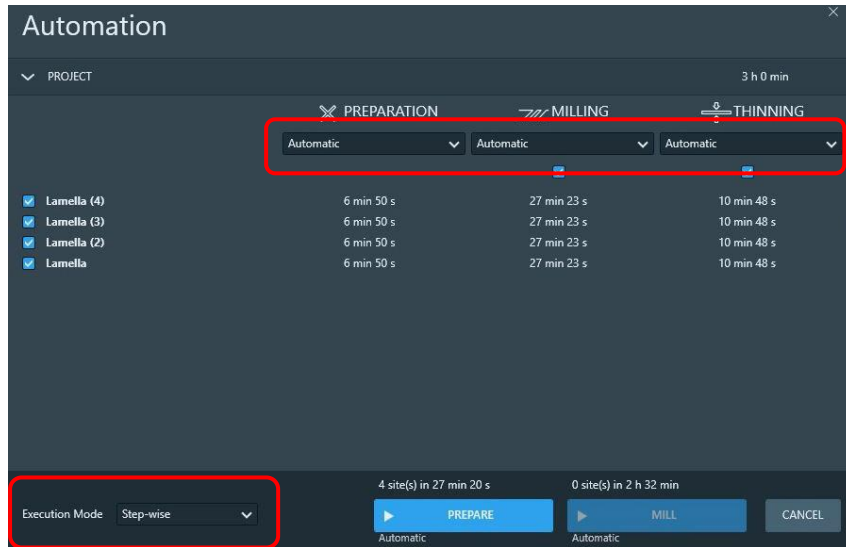
界面下方从左至右分 4 个模块，分别为 Site information, preparation, milling 和 thinning, 界面右边是所有可用的 templates 列表



1.5.4 模板应用，选择修改后的模板右键出现 3 个选项：apply:仅应用到当前 lamella; apply to enabled: 应用至所有勾选中的 lamella; apply to all:应用至项目内所有的 lamella。模板应用后该模板会有绿色标志。

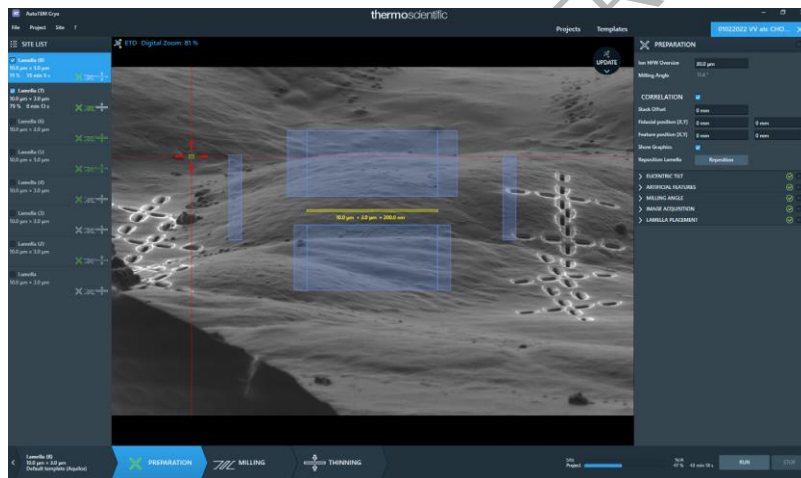


1.5.5 程序运行:模板确认无误后，点击界面右下角 Run 按键，自动弹出界面如下：



左侧部分可以通过复选框任意选择要进行 autoTEM 的 lamella 位置，整个 autoTEM 的流程主要分为 3 部分，分别为 Preparation, Milling 及 Thinning, 建议三部分都选成 Automatic 的模式，且 Execution Mode 选择 Step-wise,

1.5.6 点击 PREPARATION, 开始进行样品准备，包含 euthectic height 调整，milling angle 设置，切片窗口放置等步骤，程序会把勾选的所有 Lamella 全部准备好以后，只需要用户统一放置切片区域即可，可以通过 Continue 按钮切换到下一个 Lamella 位置，直到所有的位置摆放结束，屏幕会弹出 preparation finished 界面。

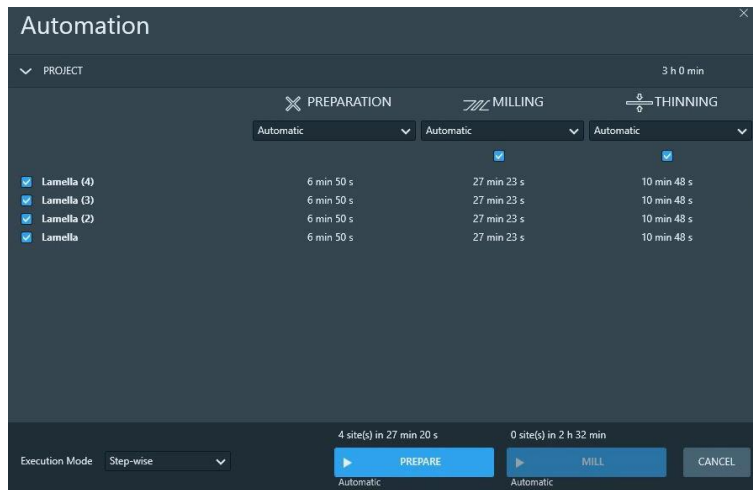


1.5.7 Milling & thinning

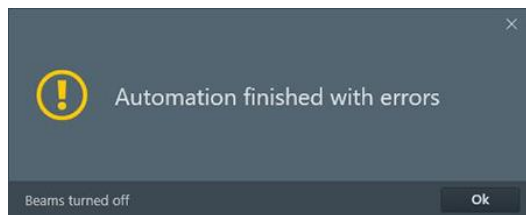
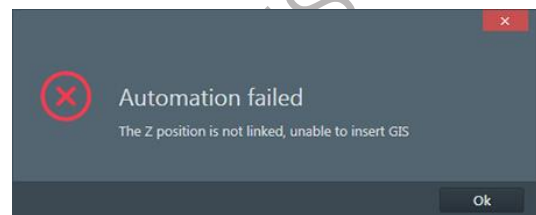
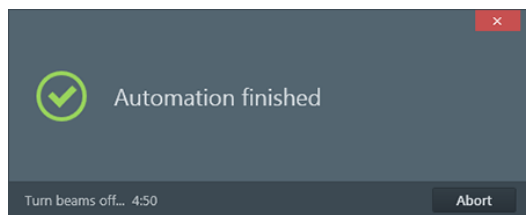
待 preparation 结束后，点击界面右下角 Run 按键，自动弹出界面如下：

左侧勾选想要减薄的 lamella，可单独选择仅 milling，或与 thinning 一起勾选，则程序会在所有 lamella milling 结束后自动进入 Thinning 阶段。

点击 mill，程序进入自动切片阶段。



1.5.8 程序结束后，会自动跳出一个提示框，正常结束，失败，或者报错，共 3 种提示。



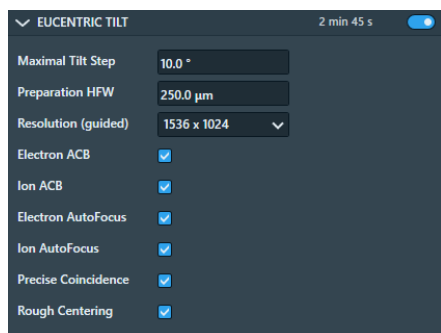
二、模板设置

在正式自动切片之前，建议至少在一个 Lamella 位置进行模板参数测试，并根据实际情况及时调整模板参数，待模板没问题，再保存并应用至其他 Lamella 位置。

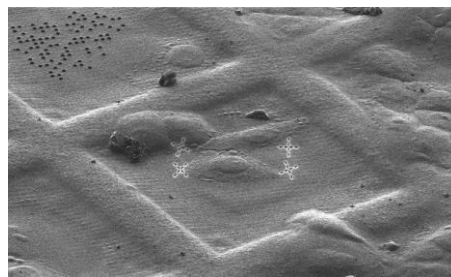
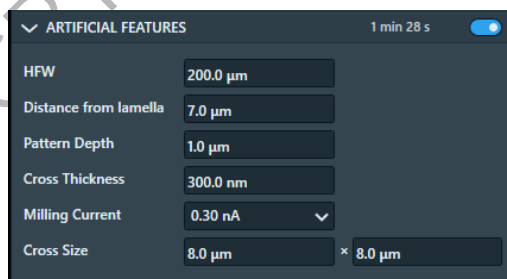
2.1 Preparation



- **Correlation:** 与荧光数据(iFLM)关联时需开启，此台设备无 iFLM，故无需勾选；
- **Eucentric Tilt:** 从 Mapping 位置 (Tilt45°) 通过 tilt 角度改变将 Lamella 高度调至共心高度 (EbeamWD6.7mm, IbeamWD19mm 附近)，保证 E-Beam 可以观察到同一区域，Maps 导入的位置需要重新做 Eucentric Tilt，可按照默认参数；



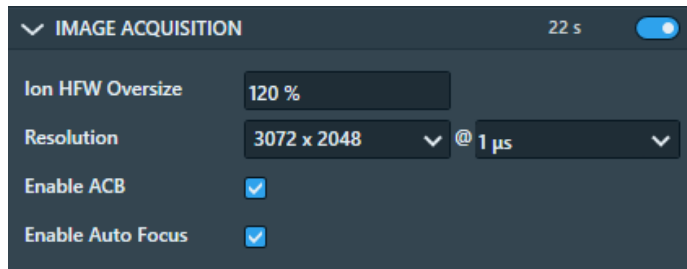
- **Artificial Features:** 如果样品很厚，且没有很多特征供软件进行图像识别来较准位置，建议激活此项目，此步骤是在选定位置手动打标记，如下图所示，基本原则是主要依据细胞位置，不要距离太近，但是也不可距离太远，偏出图像视野范围。此步骤仅是方便后续图像识别，若样品本身可识别标记较多，可关闭此步骤。



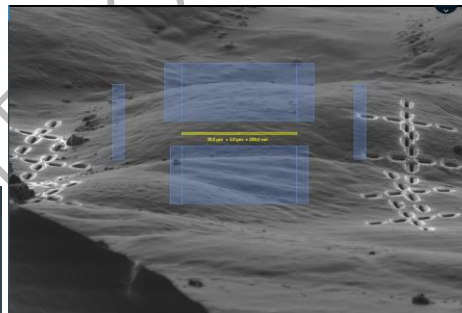
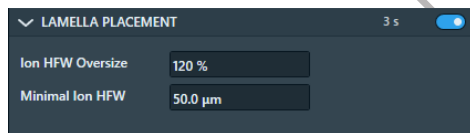
- **Milling angle:** 可设置 Target milling angle,除非使用高角度 (如>15°), 勾选 Enforce Target,否则低角度时不建议勾选该项目，低角度 ROI 容易被遮挡，从而导致 Lamella 位置报错，无法进行后续切割；



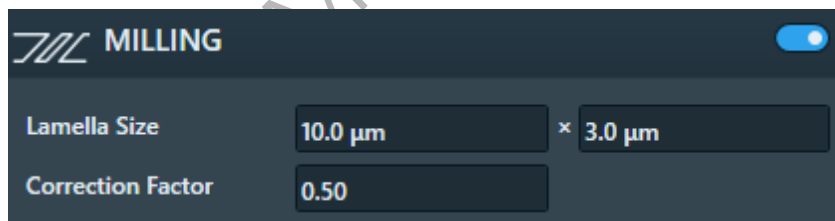
- **Image Acquisition:** 此步骤是为了拍一张较为清晰的 Ibeam 图片，有助于后续放置切片位置，建议 resolution: 1534×1024 , Dwell time 可根据实际情况更改，0.5/1/2us 都可。



- **Lamella Placement:** 如果需要更大的视野来放置 Lamella 位置，可以增大 Ion HFW Oversize value，在视野中放置切片位置即可。黄色区域为最终保留的 Lamella 位置。

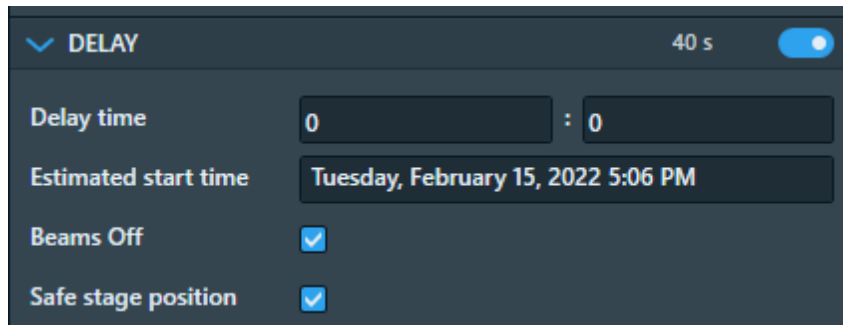


2.2 Milling



首先设置 Lamella Size 宽度 x 长度，这是最终成片的尺寸，后续过程不可改动；Correction Factor 是指材料的硬度指数（与硅相比），生物材料比硅更软，此数值<1, 数值越大需要切割时间越久才可以达到设置的深度。

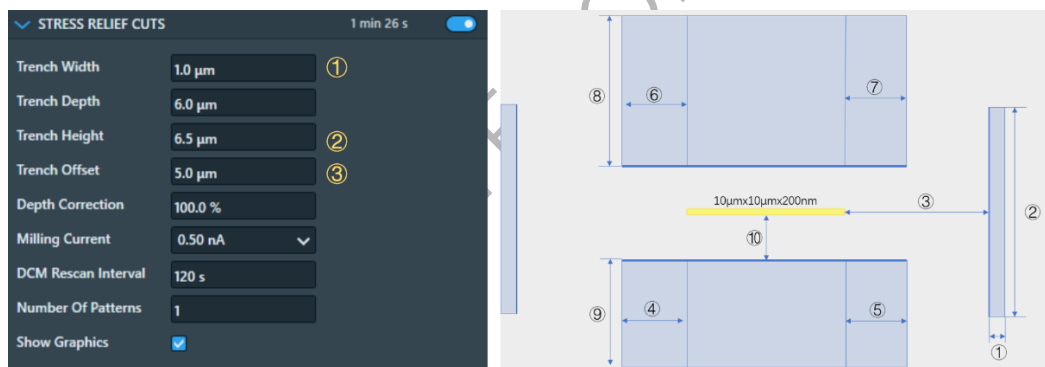
- **Delay:** 可以设置延迟开始时间?h:?min，避免切片减薄后长时间处 chamber 导致冰晶污染, 只需设置第一个 lamella 位置 delay 即可。如若启用此功能超过 10min，建议勾选 beam off 和 safe stage position。



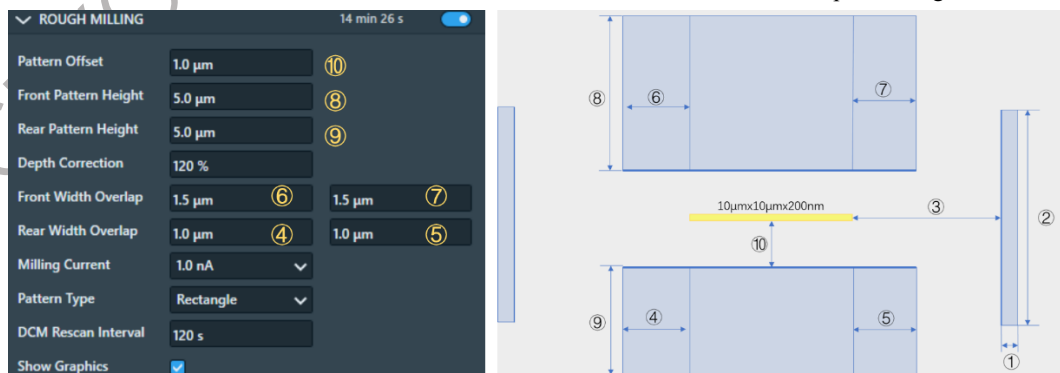
- **Reference Definition:** I-beam 下寻找并定义参考物，这对后续切片位置较准极为重要，建议激活此功能。



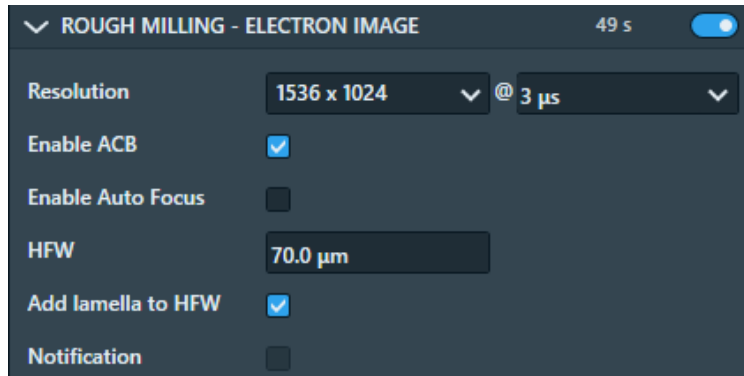
- **Electron Reference Definition:** E-beam 下寻找并定义参考物，这仅对后续切片电子束成像做位置较准，对切片本身没有影响，若不需要电子束成像，可不启用此功能。
- **Stress Relief Cuts:** 在 Lamella 左右两侧各切一个切口释放环境张力，避免张力传递至 Lamella 导致 Lamella 损坏，根据样品厚度调整参数，目的是为了把两侧碳膜切透，表中各参数分别对应图中尺寸，Trench Depth 是该处的深度，对应 Z，Depth Correction 是深度校正系数，数字越大，对应 Z 越大，选择响应束流即可。DCM Rescan Interval 是指自动漂移较准的时间间隔，时间越长，较准的间隔越长



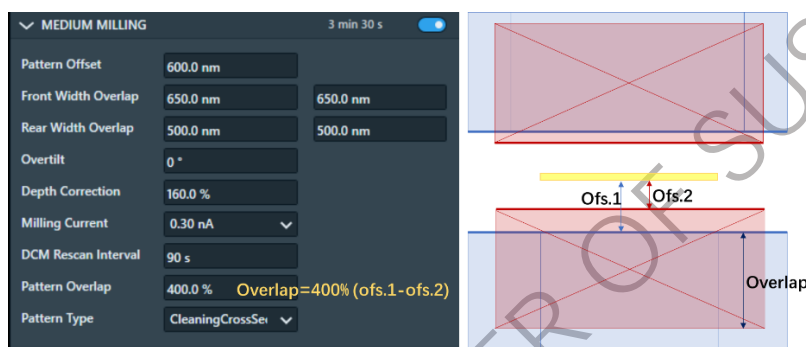
- **Reference redefinition 1:** 如果 stress relief cuts 被激活，该功能一定被激活，否则不激活。
- **Rough Milling:** 第一步将 Lamella 上下全部挖空，各参数对应右图中的尺寸，注意，该图形会在 Lamella Placement 中出现，见上图，上下边框的高度可随意拖动改变 Front/Rear pattern Height 的大小。



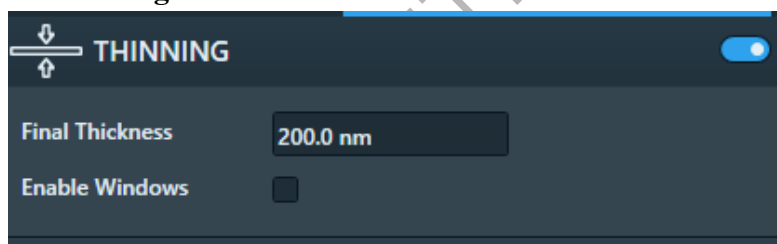
- **Rough/Medium/Fine/Finer Milling – Electron Image:** 用于每一步 mill 后的 Ebeam 成像，成像参数可自设定，推荐使用如图示参数，如需要此功能，需将前面 Electron Reference Definition 激活。



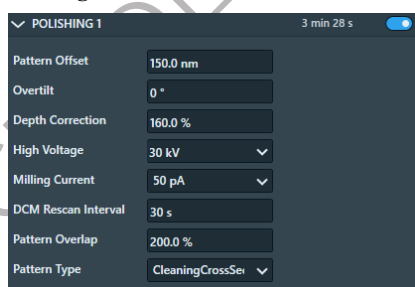
- **Reference redefinition 2:** 建议激活此功能，增加切片位置准确性
- **Medium/Fine/Finer Milling:** 后续减薄流程慢慢减小 offset, offset 越小使用的束流应越小，在后续减薄过程中建议通过 overtilt 的方式，Pattern type 可选择 CCS。



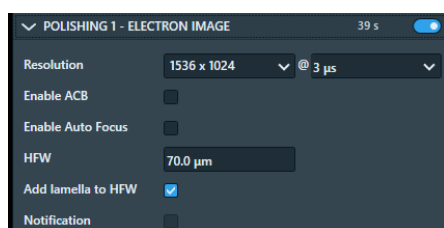
➤ 2.3 Thinning



➤ Polishing 1/2

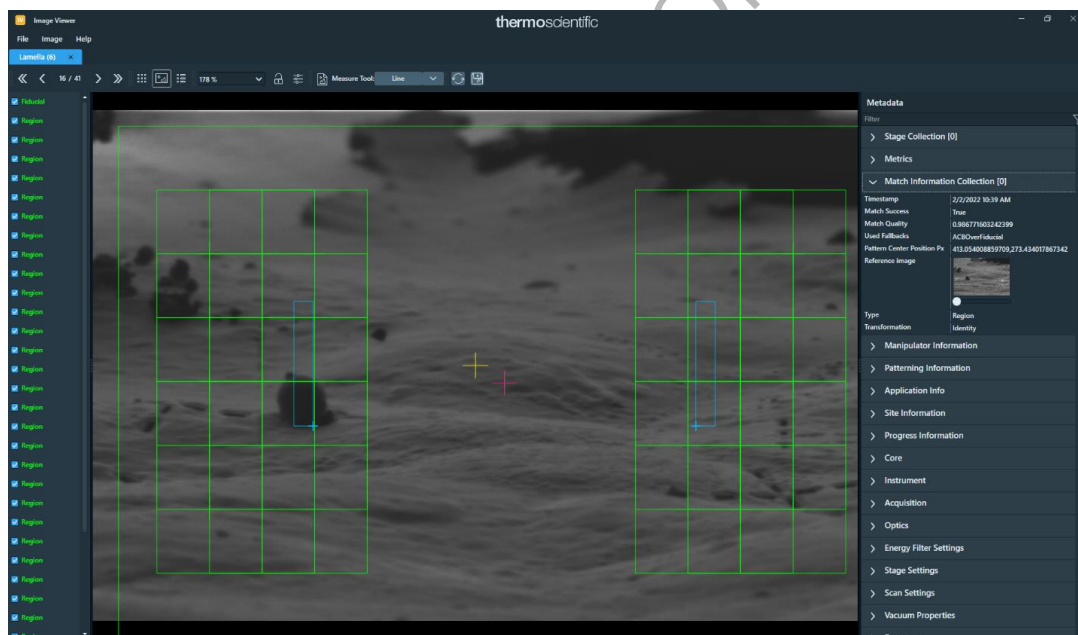
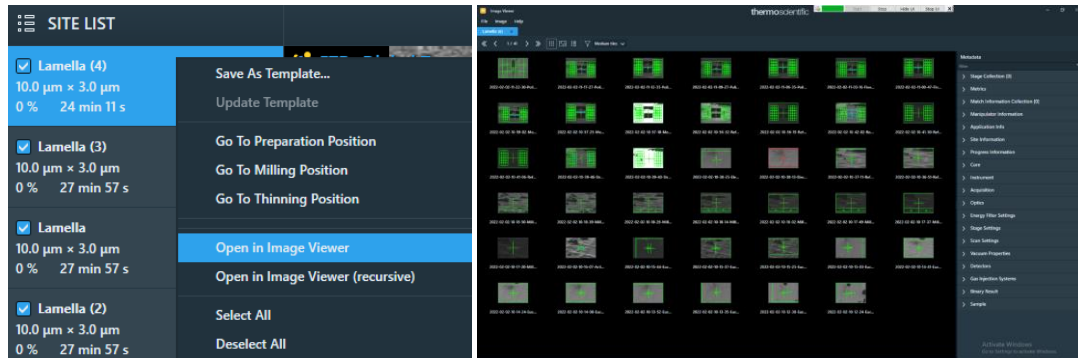


➤ Polishing 1/2 Electron Image

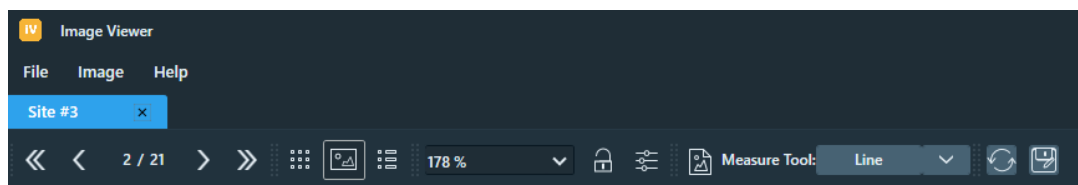


三、图片查看工具

Image viewer:在整个切片过程中拍下的所有 I/Ebeam 照片都会被保存下来，并可以用 Image viewer 打开查看，用于整个切片流程的记录与复盘。可以通过 AutoTEM 软件打开，具体的方式如图示选中想要查看的 Lamella，右键 open in image view,即可弹出该 Lamella 在减薄过程中所拍摄的所有图片，单击任意一张图片可放大查看，右侧是该图片的具体信息，可根据需要查看。



界面上方有工具栏可对图片进行处理，如测量等，图中 x 可以关闭查看图片。



四、Milling 过程中一些通用的参数

更好的理解这些参数的含义方便后续根据样品情况调整参数的值，从而创建更合适的模板。

- **Depth Correction:** 深度校正参数，在 milling, thinning 和 polishing 中会用到，主要与切割时间相关，数字越大，切割时间越长，一般 rough milling 步骤中根据样品厚度设 15%-20% 之间，后续 milling 部分可设为 100%。

Depth Correction 160.0 %

- **Pattern Offset:** 减薄的终止线距离最终切片在 Y 方向的距离，随着 milling 步骤的增加，该值逐渐减小，注意当前切片厚度应该等于两侧 offset 值*2+lamella thickness（忽略离子束束斑影响）。

Pattern Offset 600.0 nm

- **Overtilt:** 在 Rough milling 以后的减薄过程中可设置一个小角度如 0.3° ，在后续减薄过程中，Stage 会在 milling angle 的基础上 $\pm 0.3^\circ$ 再进行减薄，目的是为了把切片后端减薄。

Overtilt 0°

- **Milling Current:** 切割束流，越靠近样品束流应该越小，避免大束流灼伤样品。

Milling Current 0.23 nA

- **DCM Rescan interval:** 漂移校正时间间隔，数值越小，校正越频繁，但不建议小于 10s，medium milling 以后可以适当减小该数值，尤其 polishing 步骤，选择一个合适的校正时间可以更精准的减薄切片。

DCM Rescan Interval 90 s

- **Pattern overlap:** 在 Rough milling 以后的步骤都需要设置此参数，offset 值定义切割终止线，该值定义切割起始线，具体的计算如前图所示 $\text{Overlap} = 400\% (\text{ofs.1} - \text{ofs.2})$

Pattern Overlap 200.0 %

- **Pattern Type:** 图形类型，主要有 Rectangle, Regular Cross Section, Cleaning Cross Section 三种类型，一般 Stress relief cuts 和 Rough milling 采用 Rectangle, milling 和 thinning 都采用 Cleaning Cross Section。

Pattern Type CleaningCrossSe