

冷冻双束扫描电镜 Aquilos 2

—Liftout 操作流程



北京大学冷冻电镜平台

管理老师：秦昌东

办公室电话：62750127

办公地址：B127

目录

使用设备须知	1
Liftout 操作流程	3
一、设备样品台倾转角度关系说明.....	3
二、操作流程.....	3
1. 上样品.....	3
2. 找样品.....	4
3. 镀 Pt 保护层和 Sputtering 导电层	4
4. 切取切块样品.....	4
5. 移至提出位置、底部和侧面切断.....	5
6. 插入 EasyLift, 针和切块反沉积焊接.....	6
7. 切段切块一侧连接点.....	6
8. 找到梳齿焊接位置, 对中后插入带样品的针.....	7
9. 到剪薄位置并进行切块剪薄.....	7

使用设备须知

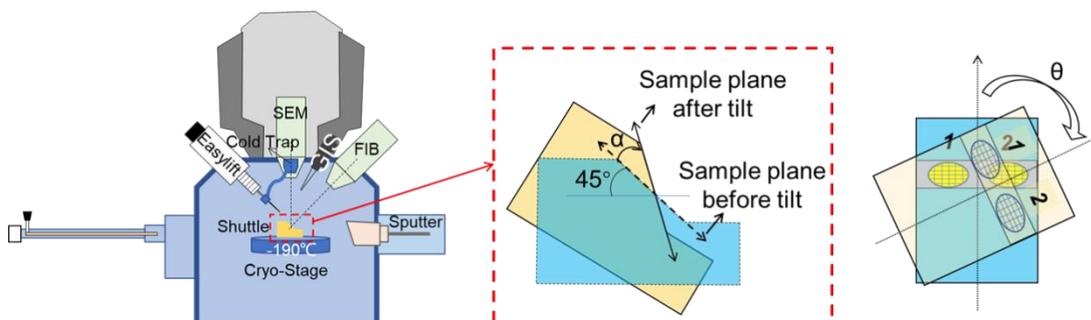
冷冻双束扫描电镜 Aquilos 2 使用频繁,为提高其使用效率,方便用户使用,请用户认真阅读以下须知:

1. 新用户/课题组使用本设备前,需向平台管理老师(高宁老师、郭振玺老师)提交设备使用的申请;
2. 双束机时预约以课题组为单位预约,每个课题组指定一名预约管理员,在每周一上午 9:00 平台管理员在预约群内说开始预约时起课题组预约管理员将本周机时安排发至群内,平台管理员按照预约信息的先后顺序进行机时安排,最终机时安排会第一时间发至预约群内。课题组管理员预约信息应具体到每个机时的具有操作权限的具体用户。
3. 周一预约机时开始前一天,平台管理人员会把本周可预约时间发至预约群内,各个课题组按照可预约时间进行安排。
4. 机时预约时间段为: 8:30-16:00 (A 时段)、16:00-22:30 (B 时段)。可以单独预约 A 时段、B 时段,也可以预约全天机时。具体使用时间可依据样品和仪器状态进行动态调整。
5. 预约格式: 周一: xxx-A 时段 (普通/荧光/liftout)。
6. 预约 A 时段的用户需在早上 8:30 到达电镜室,使用结束及时补充液氮。
7. 预约 B 时段的用户使用结束同样也需要将液氮罐加满。
8. 需要荧光及 lift out 样品制备,建议按全天进行预约,课题组预约管理员在群内的预约信息需要注明。
9. 对于可以使用 Cryo-Auto TEM 软件减薄的细胞来说,用户可以实现 7-7.5h 完成减薄两个 grids (5-6 lamellae/grid)。
10. 如遇特殊情况需取消机时,应提前 24h 告知电镜平台管理员。
11. 如因其他情况需进行机时互换,应在确定时间后及时告知电镜平台管理员。
12. 为节约机时及离子源使用寿命,用户在预约时间段内使用仪器,如操作不当,造成仪器长时间空缺的,将会停止该用户预约权限。

13. 用户应及时关注液氮和氮气的使用情况，若发现不充足时应及时联系平台管理人员进行更换，保证下一用户顺利实验。
14. 用户使用设备后应严格登记信息，登记本手动登记和 Excel 电子登记，设备有任何报错或故障需第一时间联系平台管理员。
15. 禁止未经培训的用户私自预约和上机使用，如需使用请找平台管理员培训后，并全流程观摩实验累计 14 天后方可独立操作。未经培训使用仪器发生重大损失的由课题组自行承担。
16. 使用平台任何设备发表论文专利或其他形式的成果，需要请致谢平台。
17. 如有其他问题，请与平台管理员联系。

Liftout 操作流程

一、 设备样品台倾转角度关系说明



设备各个部件位置及样品台倾转角度关系示意图，因为 Lift-out 实验过程中涉及很多次倾转和旋转，所以该图为方便后续步骤用户对设备和角度关系的理解。虚线和实线分别代表 Tilt 之前和之后的样品台平面位置。

二、 操作流程

1. 上样品

将载有生物样品的载网放到 N1 位置，压环后的梳齿放到 N2 位置。

梳齿安装注意要点：

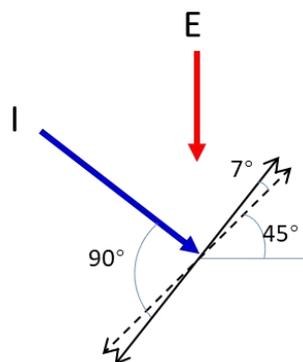
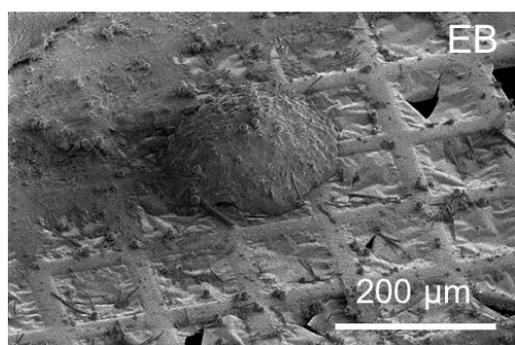
- (1) 梳齿正反面判别：有台阶面是正面，和反面比该面无光泽（肉眼看）。
- (2) 安装梳齿时保证正面向上，即正面朝向自己，圆孔在左下方。
- (3) 梳齿放置于底端，手指指向上方（如图所示）



2. 找样品

将样品台 Rotation 至 110° ，找到某一个特征明显位置移至视野中心，电子束聚焦并 Link，然后 Tilt 至 7° ，调节 z 使特征位置回到视野中心，并确认 z 数值在 7 mm 附近，完成对中。此时离子束束流方向和样品平面垂直（如图）。找到要提取的样品移至视野中心，并保存位置。

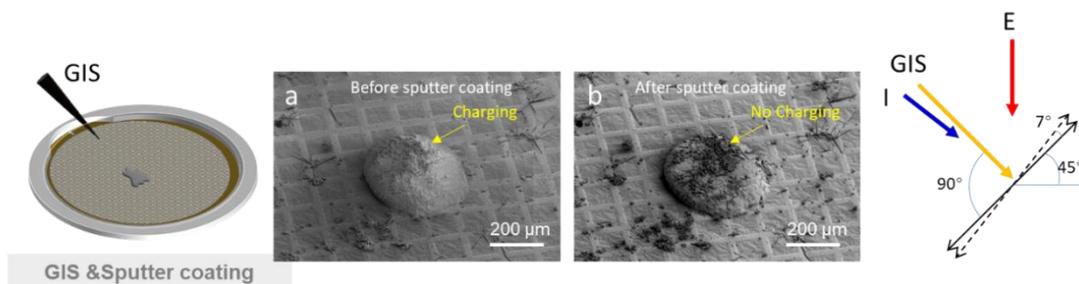
注意：选取样品的位置要离载网条几个微米。



3. 镀 Pt 保护层和 Sputtering 导电层

保持 Rotation 110° 不变，将样品台 Tilt 至 0° 。找到载网中心，并 link 高度 Z 至 7 mm。插入 GIS 针并使用 Purge 功能沉积 7 秒后收回 GIS 针。Purge 时 GIS 针和样品平面垂直，沉积均匀且效率高（如图）。

注意：插入 GIS 一定确认已经完成 link 至 7mm 操作。

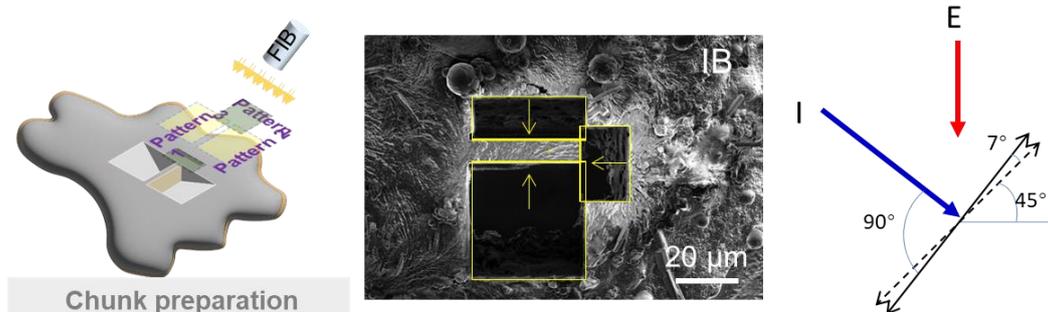


4. 切取切块样品

回到步骤 2 中保存的感兴趣样品位置（此时 Rotation 110° 不变，Tilt 转至

7°，如图所示)。将 Patterns 放置在格子上，适当调整图案大小。电压为 30 kV，电流为 1 nA。

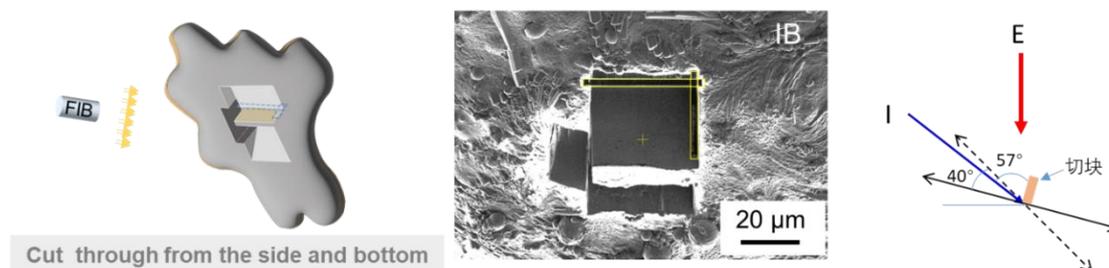
注意：Patterns 的 y 值要大，易于后期底部切断。



5. 移至提出位置、底部和侧面切断

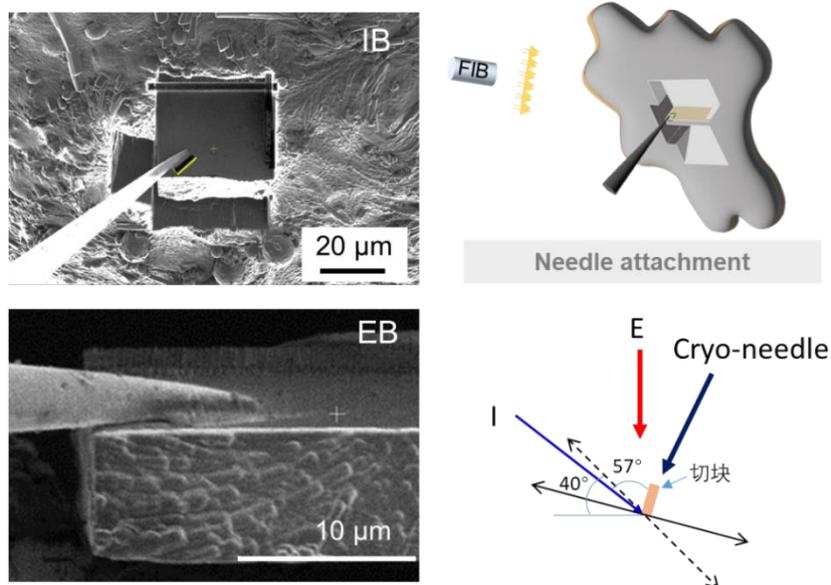
将样品台 Tilt 至 40°，Rotation 至 -70°。调整 Patterns 的位置和尺寸，对底部和侧面位置进行修剪，电压 30 kV，电流 0.5 nA。因为此时离子束与物块平面角度较大，如图所示。

注意：该步骤一定要做 link 对中，为下一步入 Easylift 针做准备。修剪 Pattern 的大小视样品大小而定，此步骤目的是易于后期提出。在提出位置，很难确认切块底部和侧面是否被切透，这对 Lift-out 成功率至关重要。保存当前位置并旋转回 110°。需要尝试不同的倾斜角度来观察是否切透。重复上面的步骤，确保底部和侧面被完全切开。



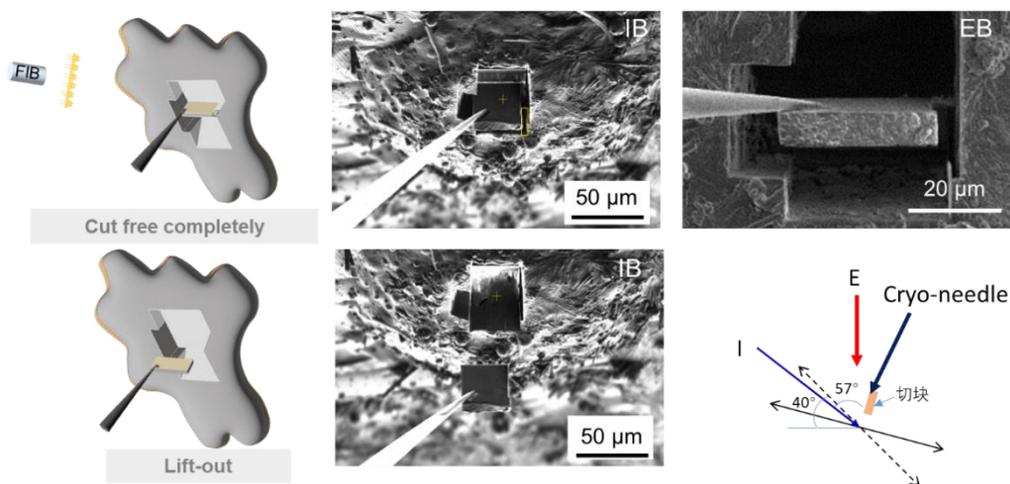
6. 插入 EasyLift, 针和切块反沉积焊接

将 EasyLift 针插入到 park position, 并慢慢接近块的顶部。在针附近放置一个规则的 cross-section pattern, 用 0.1 nA 的电流进行反沉积。将块体抬升约 20 μm , 然后将针移至 park position 位置并缩回。



7. 切段切块一侧连接点

将块体焊接在针上后, 用 0.5 nA 电流的矩形图案将块体侧面仅有的连接点彻底切断。将切块拉出约 20 μm , 然后收回 cryo-needle。

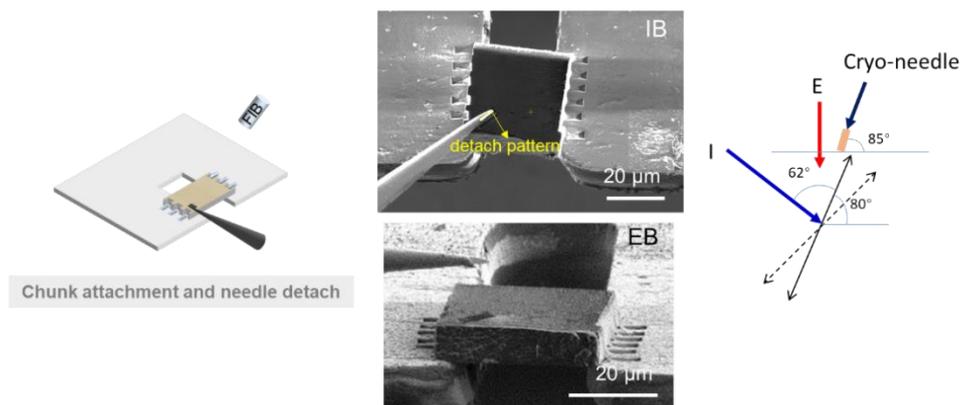


8. 找到梳齿焊接位置，对中后插入带样品的针

将样品台 Tilt 至 0° ，再将样品台 rotate 至 110° ，找到梳齿焊接位置，并 link 对中，确保 7 mm 安全距离。为了避免 EasyLift 针与 Autogrid 环的碰撞，只能使用位于右侧的两个缝隙（如图所示）。

将样品台 Tilt 至 35° ，将带有样品的 Easylift 针插入到 park position，并在电子束和离子束成像来回切换，仔细观察并移动样品至缝隙上。

靠近切块的位置创建多个个拉长的 cross section patterns，调整扫描方向是从切块到手指。使用 Si-multipass 应用程序文件。在 Properties of patterns 中将 multi-passes 属性改为 1，将 patterns 的 z-size 改为 $4\ \mu\text{m}$ ，并选择削剪电流为 500 pA。最后使用 rectangle pattern，0.1 nA 将针与切块分离，将针缓慢抬起并收回，此过程中应减少离子束对切块的辐照。



9. 到剪薄位置并进行切块剪薄

将样品台 Tilt 回 0° ，rotation 至 -70° ，并对切块进行 Link 对中，然后 Tilt 至 13° 进行剪薄。剪薄 pattern 深度 z 的设定视样品而定。

注意：剪薄时有 Pt 保护层的面正对离子束。

