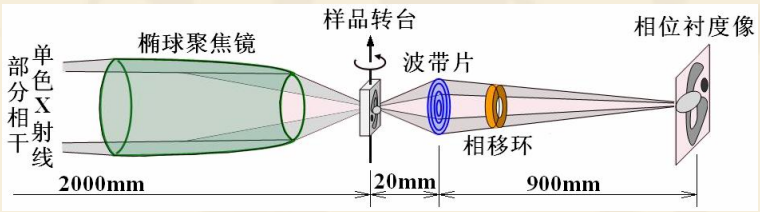
纳米成像样品制备、数据采集及处理

黄万霞

2013.11.21

同步辐射纳米分辨CT系统



常用能量8keV

大视场模式：视场60um×60um，分辨率100nm

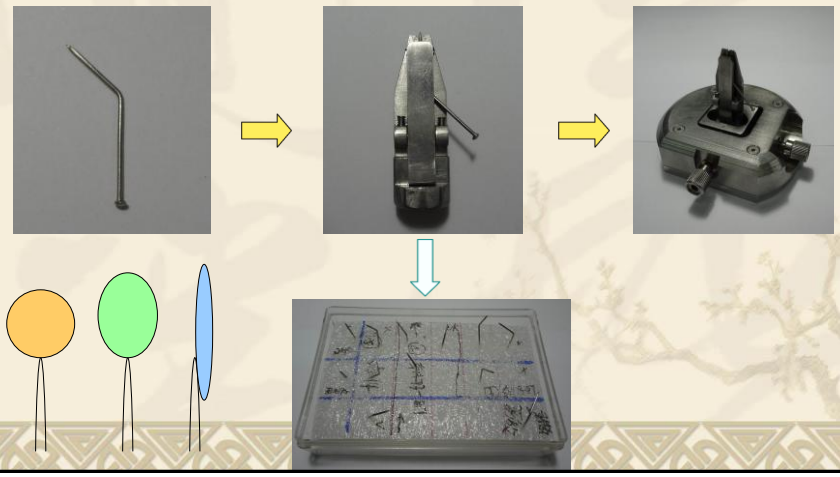
高分辨模式：视场15um ×15um，分辨率50nm

样品尺寸60um以内，样品处理非常重要！！

样品处理

样品制备之一：粘在针尖上

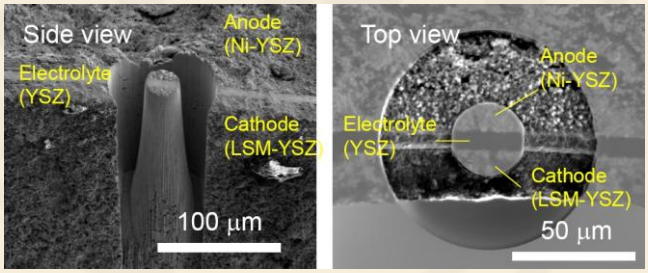
- 大视场成像
- 样品：尺寸20~60um，颗粒状（球状或条状）
- 工具：大头针、环氧树脂AB胶、显微镜

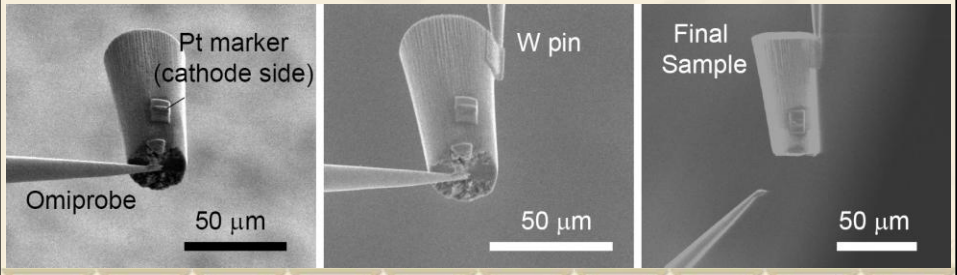


FIB 聚焦离子束刻蚀处理样品

1. FIB milling

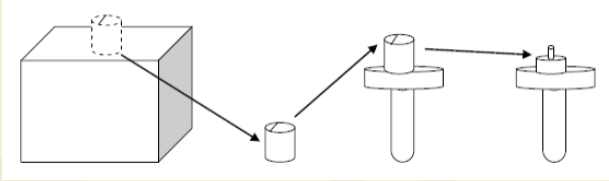
2. Lift-out

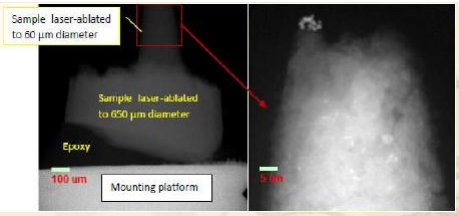




激光切割处理样品

- Stage1: 从大样品中切割出约600um圆柱，需20min；
- Stage2: 激光切割，需20min，加工完的样品直径60~100um。





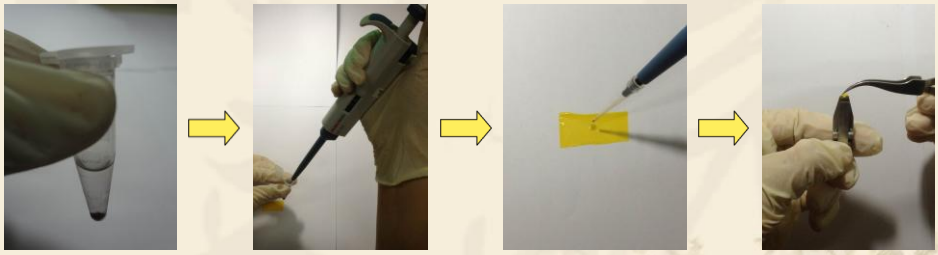
Oxford Laser Micro-Machining Systems

Double Workstation Sample Preparation System

Model A-532DW

样品制备之二：吸附在膜上

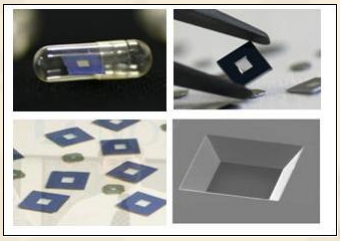
- 高分辨成像
- 样品：尺寸5~15um，颗粒状、粉末状、细胞
- 工具：聚酰亚胺薄膜（25um，50um）、移液器（0.5-10ul） 及枪头、超声波清洗机



- 操作简单
- 缺点：不能-90~90º采集，稳定性较差。

使用氮化硅薄膜窗

- 框架5mm×5mm，窗口2mm×2mm，膜厚200nm
  框架7.5mm×7.5mm，窗口2.5mm×2.5mm，膜厚200nm



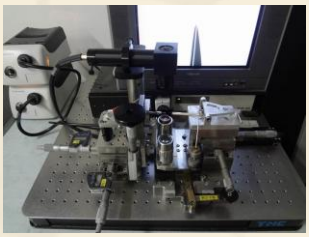
- 优点：比聚酰亚胺薄膜稳定性好
- 缺点：粘金颗粒时可能捅破SiN窗

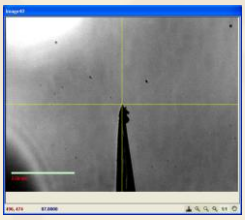
样品制备之三：细胞制备

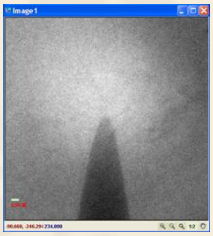
- 将聚酰亚胺薄膜浸泡于纯水中，超声清洗10min,再用纯水洗涤两次；
- 放于培养台晾干，照射紫外线1h消毒；
- 细胞接种和培养；
- 药物处理后，用常温的PBS(磷酸缓冲液)洗涤细胞2-3次(注意：固定前观察细胞，贴壁密度控制在30%以下，细胞之间不要紧挨着)；
- 70%冰冷乙醇固定细胞30min；
- 重金属染色10-15min(0.1%-0.5%醋酸铀染色，或0.2%-1%的磷钨酸盐：盐的浓度根据细胞来调节)，用PBS洗涤1-2次；
- 50%，70%，80%，90%，100%，100%浓度酒精分别脱水，每次脱水10min；
- 空气中干燥。

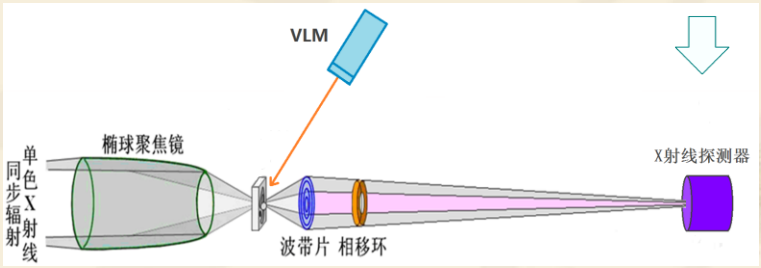
数据采集

实验调节过程

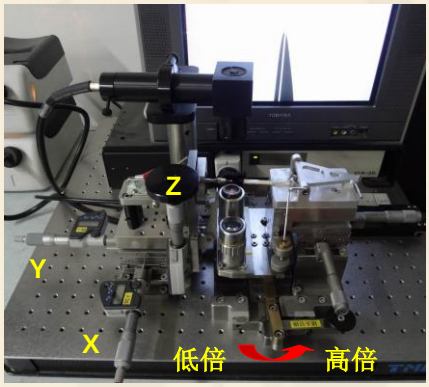


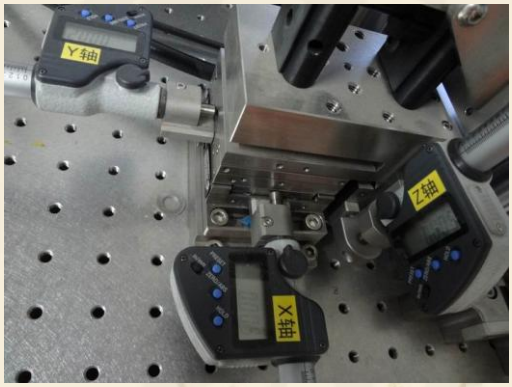






Step1 在预准直系统中找到并挑选样品





低倍镜头(10X)下调节样品XYZ

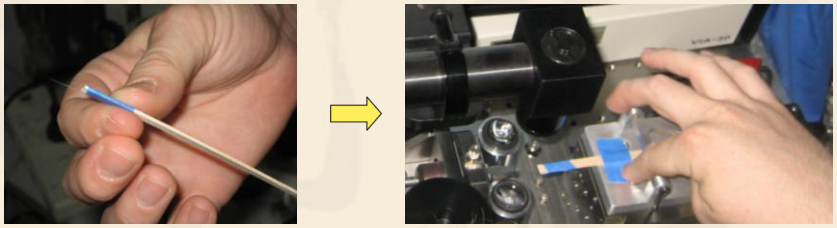
切换到高倍镜头(50X)下调节

使样品位于屏幕中心

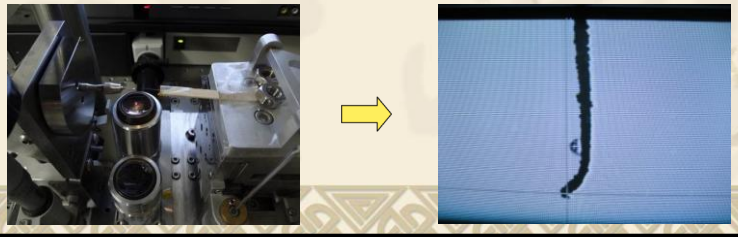
记下预准直系统样品的坐标值

Step2 在样品上粘标记物（金颗粒）

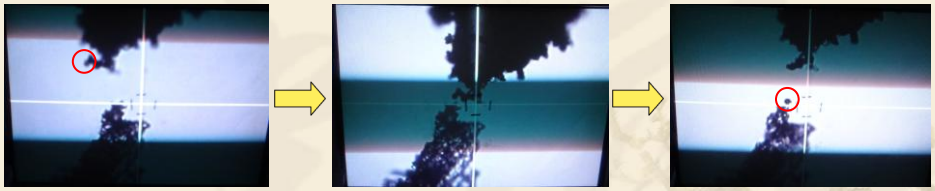
- 准备一根纤维将其固定在一根细长木片的末端，在纤维上粘上金颗粒（~3um），固定在预准直显微镜的操作平台上。



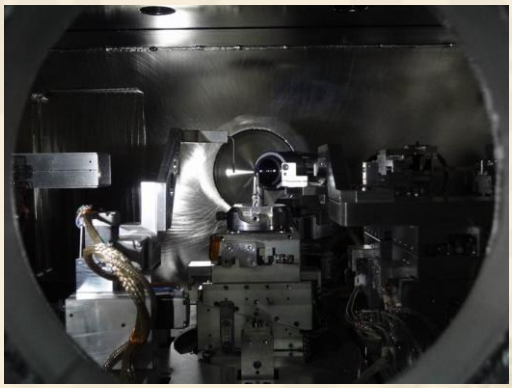
- 移动操作平台的XYZ轴将纤维调节到显微镜视场中



- 小心地慢慢地移动纤维去碰触样品，将金颗粒粘在样品上。



Step3 将样品放入纳米分辨成像设备中，样品坐标设成和预准直系统一致，样品转角θ转到-60度。



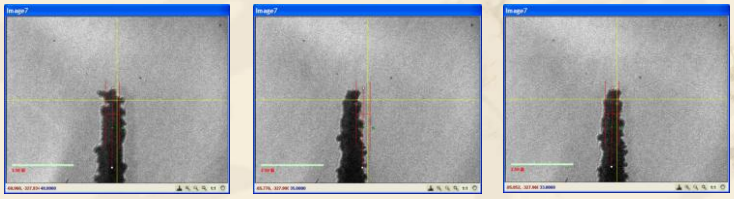
Step4 利用可见光显微镜VLM观察样品并将样品粗调至转轴上。

- 切换到VLM（Secondary Camera）观察样品；
- 点击连续采集；
- 显示黄色十字中心线；
- 调节样品X轴和Y轴至视场中心；

调节样品转轴

- 旋转样品到30°和-150°（样品零点在-60°），用红色线分别标出样品位置，求出两根红线的中间位置；

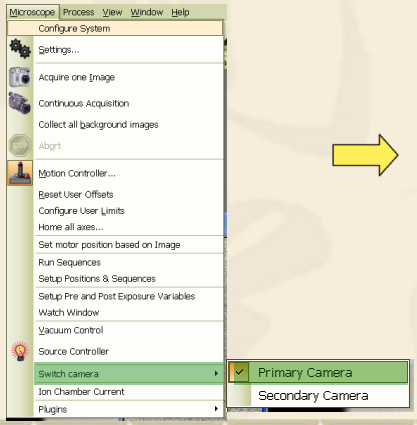
- 移动样品Z轴位置，使得样品位于“中间位置”；
- 旋转样品到-60°，移动样品X轴，使得针尖到达红色“中间位置”

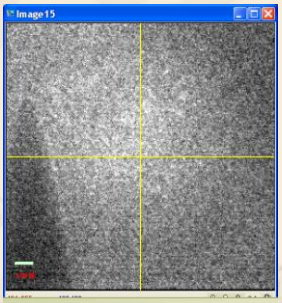


移动Z轴后　　旋转样品到-60°　　移动样品X轴后

Step5 切换到X射线下找到样品

- 先停止采集，切换到X射线CCD（Primary Camera），20倍镜头，点击连续采集。
- 移动样品X轴使样品靠近视场中央，移动Y轴找到想观察的样品部位。





X射线CCD上样品成像

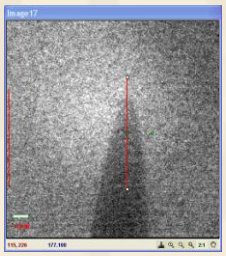
bin4或bin8，曝光时间2~5s

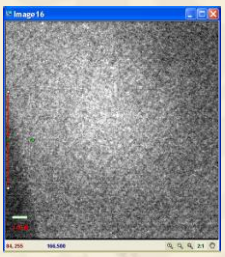
Step6 开启真空

点击Enable开启真空，当真空~1Torr，点击Disable关闭真空；

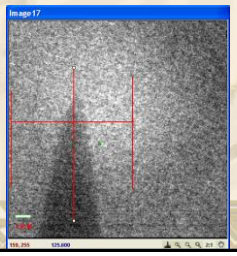
Step7 在X射线下精确调节样品转轴

- 旋转样品到-90º和90º，用红色线分别标出样品位置，求出两根红线的中间位置；

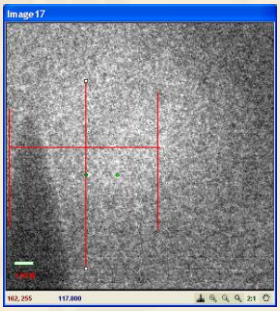




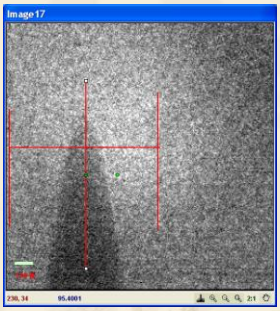
- 移动样品Z轴到两根红线中间位置；



- 旋转样品到0°，移动样品X轴到两根红线中间位置；
- 这样，样品就调到了转轴的中心；样品的X，Y，Z坐标确定。



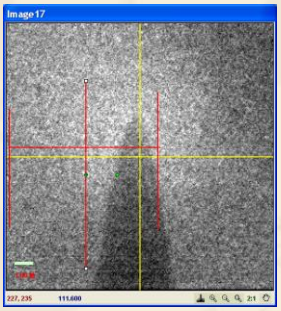
旋转样品到0°



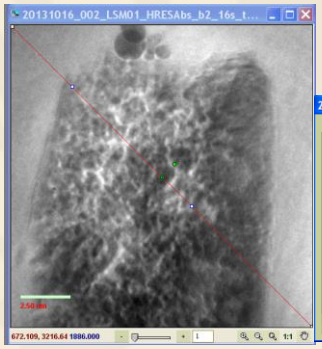
移动X轴到中间位置

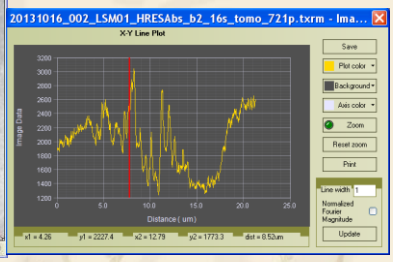
Step8 调节样品转轴至视场中央

- 微调波带片 X轴，使样品位于十字叉丝中心。



Step9 采集单张图像，确定成像参数

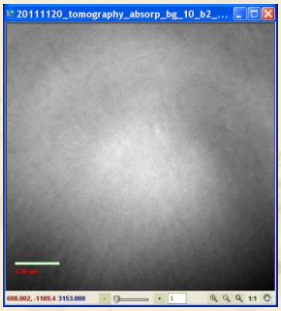




计数2000左右即可

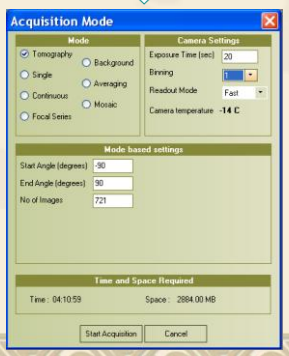
Step10 采集背景

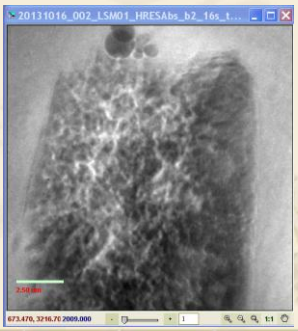
- 将样品旋转至-90°，Z轴+1000；
- 按照已确定的成像参数，采集10张背景；



Step11 采集CT数据

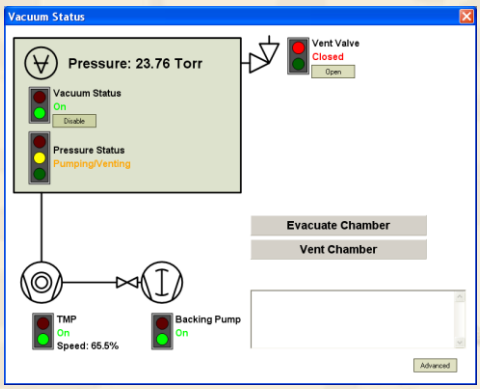
- 样品Z轴-1000，移回；
- 采集CT数据，参数：-90°~90°,361p或721p





Step12 取出样品

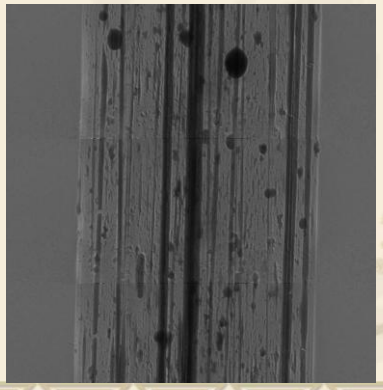
- 采集完成后，先检查数据，确认无误；
- 真空放气，点 Open；
- 真空腔内恢复常压后，取出样品。



Mosic 成像

导电纤维材料

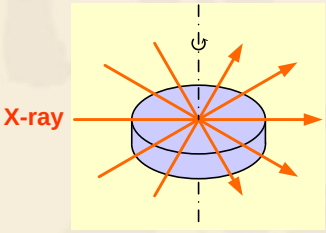
3×11 Mosic拼图，成像区域180um ×660um

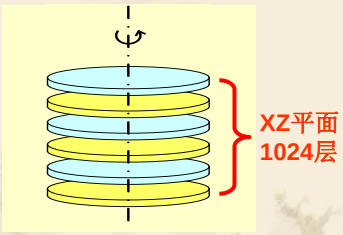


数据处理

CT数据处理

已获取的CT数据 → TXMReconstructor → 样品的断层图





- 样品不同角度的投影图；
- 纳米分辨CT数据： -90º~90º，每隔0.5º拍摄一张图像，共361张投影图；

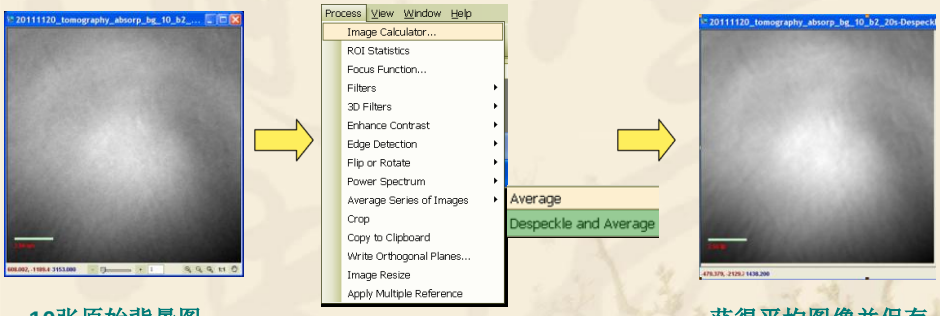
- 重建结果：1024张断层图（Bin1）

数据处理的过程要用到三个程序

- TXMcontroller → 扣除背景；图像几何校正
- TXMReconstructor → 转轴校正；重建断层图像
- TXM3DViewer → 显示重建结果

Step1 扣除背景

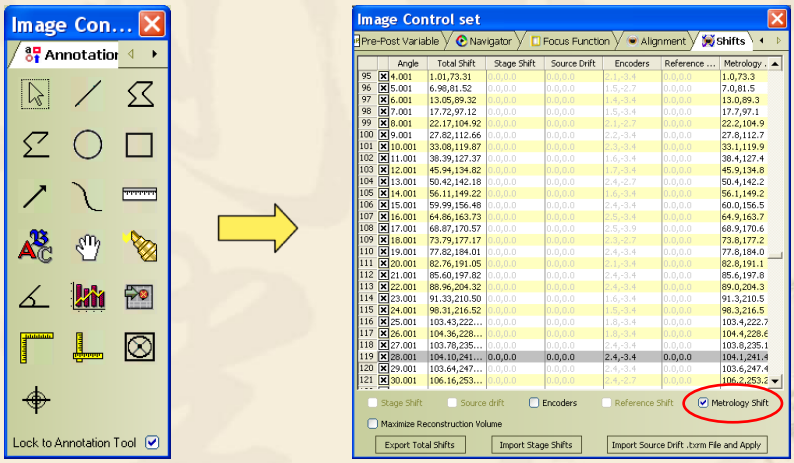
- 在XMcontroller程序中完成

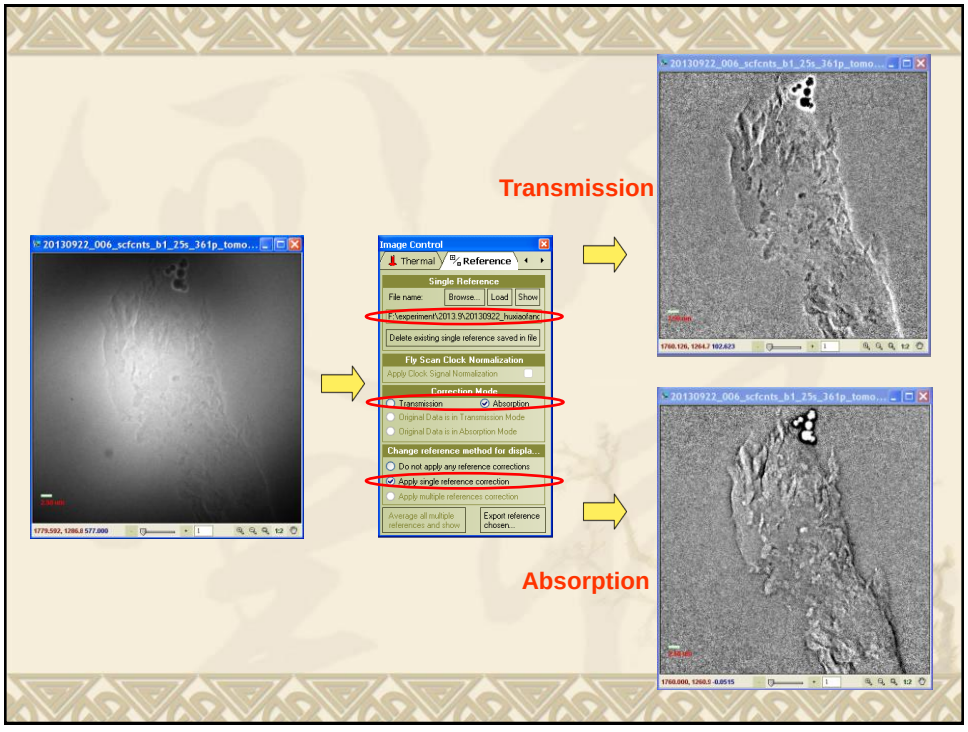


10张原始背景图

获得平均图像并保存

- **Shifts窗口中Metrology shift 前面的勾去掉，然后点Save。**





Step2 图像几何校正

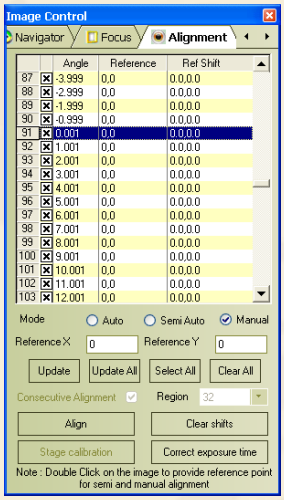
目的：

- 消除样品转动过程中上下左右振动和热膨胀的影响
- 计算样品转轴偏离图像中心的偏移量的基础

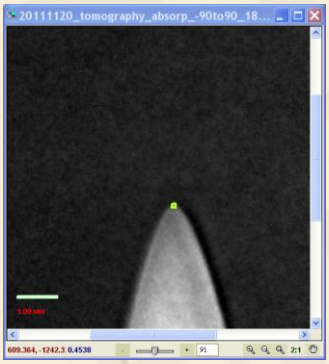
具体方法：

- 对每一张图像上的标记物（金颗粒）的位置进行标记

打开Alignment，选择角度为0°的图像

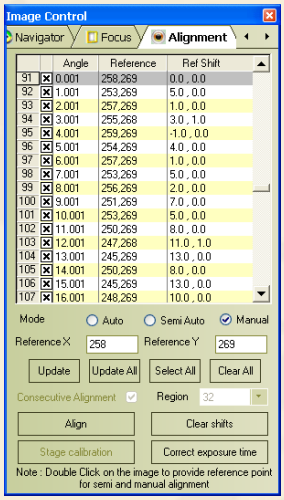


选取图像上的特征点，双击图像



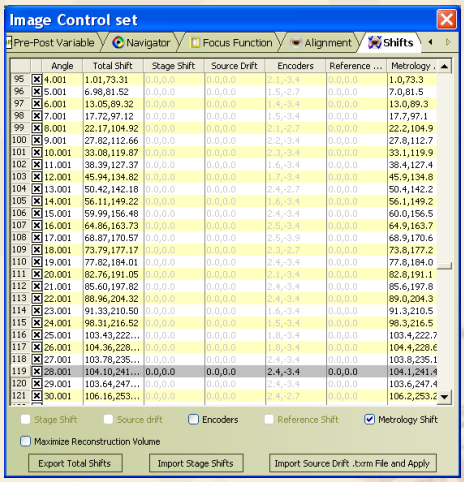
- 每双击一次，图像会自动先向负角度方向向下一个角度移动；
- 在每一张图像上重复点击同一特征点，直到负角度方向的图像校正完；
- 程序会自动跳回到0度；
- 此时选择正方向第一张图像，双击特征点，图像开始向正方向角度移动，直到完成所有图像。

点击Align，再点击Save



切换到Shift窗口，

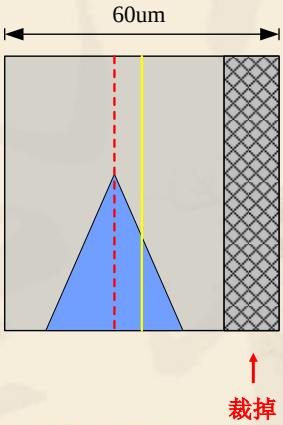
Maximize Reconstruction Volume前打勾



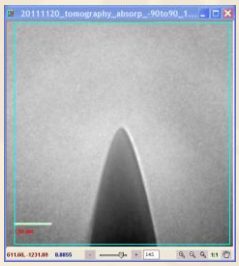
上述转轴校正过程可重复多次，效果更好

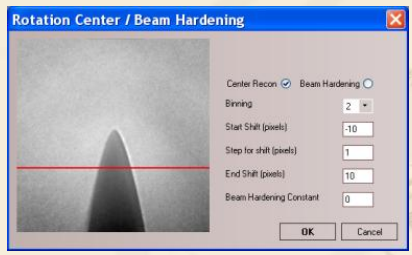
Step3 转轴校正（计算Center Shift值）

- 目的：计算样品转轴偏离视场中心的偏移量
- 最后重建的图像以样品转轴为图像中心，对称裁剪

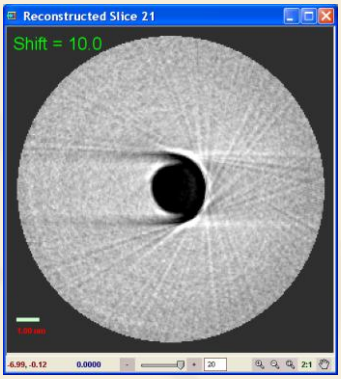


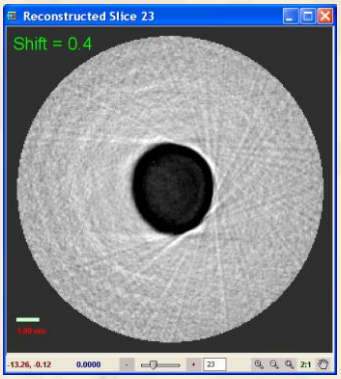
- 打开TXMReconstructor程序；
- 打开前面已做完转轴校正的CT数据；





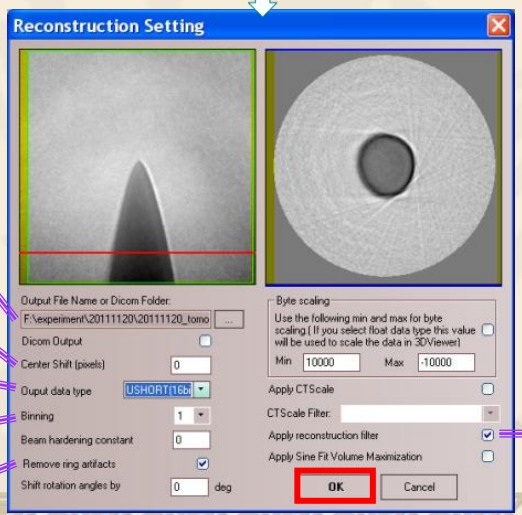
- 将红线移到标记物上；
- 依次输入参数，点击OK；





- 得到Shift分别为-10,-9,-8…0…,8,9,10时，红线那一层的断层图；
- 当重建断层界面为封闭图像（如封闭的圆环），就是合适的shift的值。
- 如果都没有找到合适的Shift值，再更改Shift ：-40~-10或者10~40，找到合适的Shift值。

Step4 重建参数设置



输入文件名
-recon

输入Shift值

输出数据类型

Binning=1

RingRemoved
选Low contrast

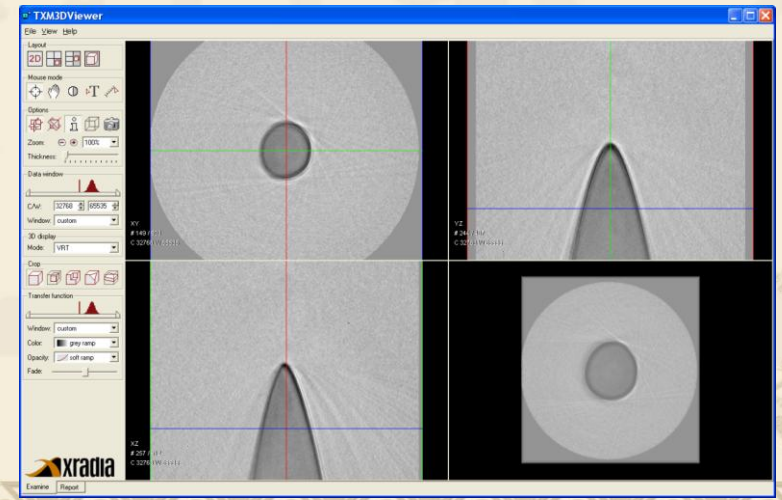
Recon Filters
选Smooth1.2

Step5 重建断层数据

重建断层数据

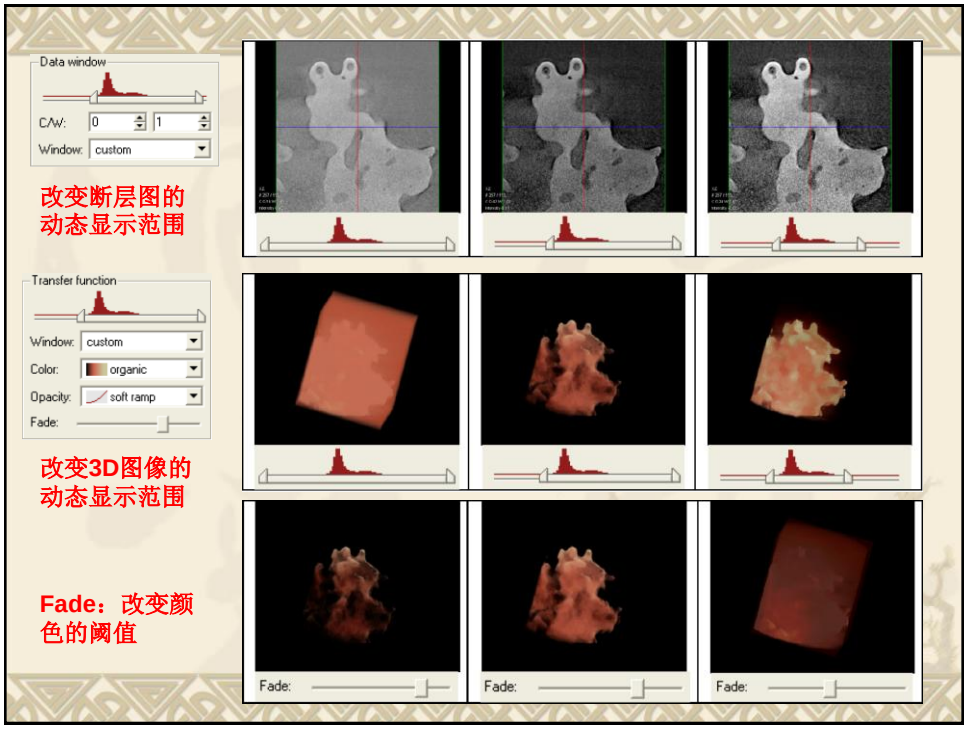
Step6 显示重建结果

- 打开TXM3DViewer程序

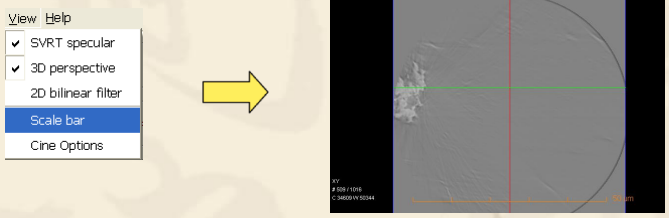



Layout
2D
Mouse mode
Options
Zoom:
100%
Thickness:
Data window
C/W:
32768
65535
Window:
custom
3D display
Mode:
VRT
Crop
Transfer function
Window:
custom
Color:
grey ramp
Opacity:
soft ramp
Fade:


Layout
2D
Mouse mode
Options
Zoom:
100%
Thickness:
Data window
C/W:
32768
65535
Window:
custom
3D display
Mode:
VRT
Crop
Transfer function
Window:
custom
Color:
grey ramp
Opacity:
soft ramp
Fade:
标线
图像移动
调节亮度
添加注释
两点间的距离或标尺
显示图像上的说明文字
拍照


Data window
C/W:
0
1
Window:
custom
改变断层图的
动态显示范围
Transfer function
Window:
custom
Color:
organic
Opacity:
soft ramp
Fade:
改变3D图像的
动态显示范围
Fade：改变颜
色的阈值
Fade:
Fade:
Fade:

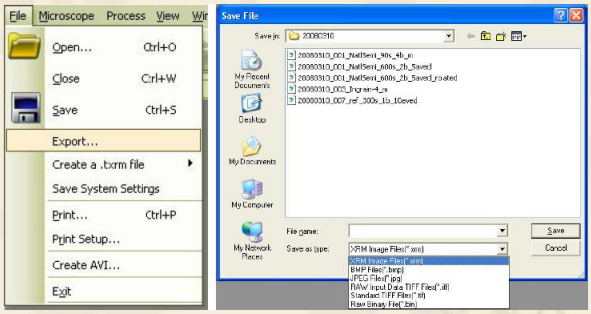
在断层图上显示标尺


View Help
SVRT specular
3D perspective
2D bilinear filter
Scale bar
Cine Options

Step7 数据和实验结果导出

- 使用TXMcontroller导出数据

1. 导出单图片文件（*.xrm)



可导出数据类型：BMP、JPEG、RAW TIFF、TIFF、BIN

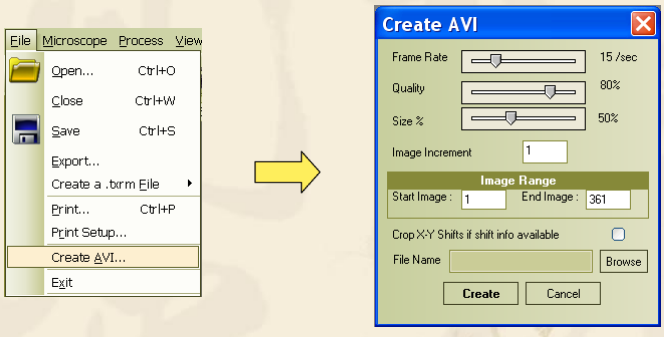
2. 导出多图片文件（*.txrm)

导出XY断层图

可导出数据类型：BMP、JPEG、RAW TIFF、TIFF、BIN

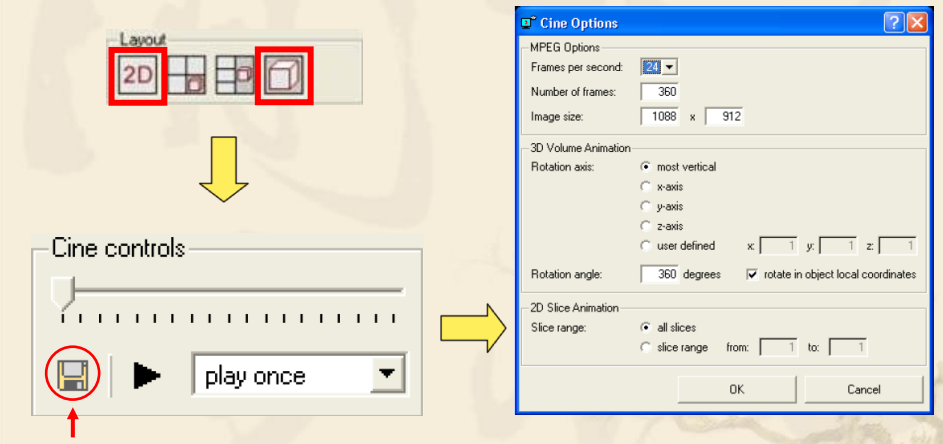
3. 导出XY和YZ平面数据

4. 将多图片文件（*.txrm)制作成AVI文件



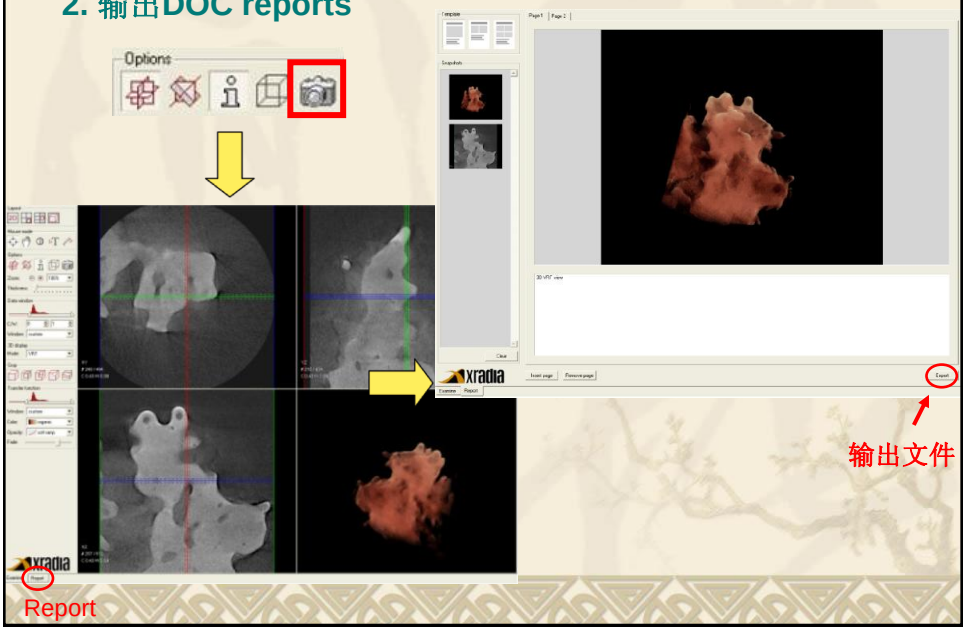
❖ 使用TXM3DViewer输出结果

1. 制作MPEG（*.mpg）动画



点击即开始输出动画

2. 输出DOC reports



Thanks !