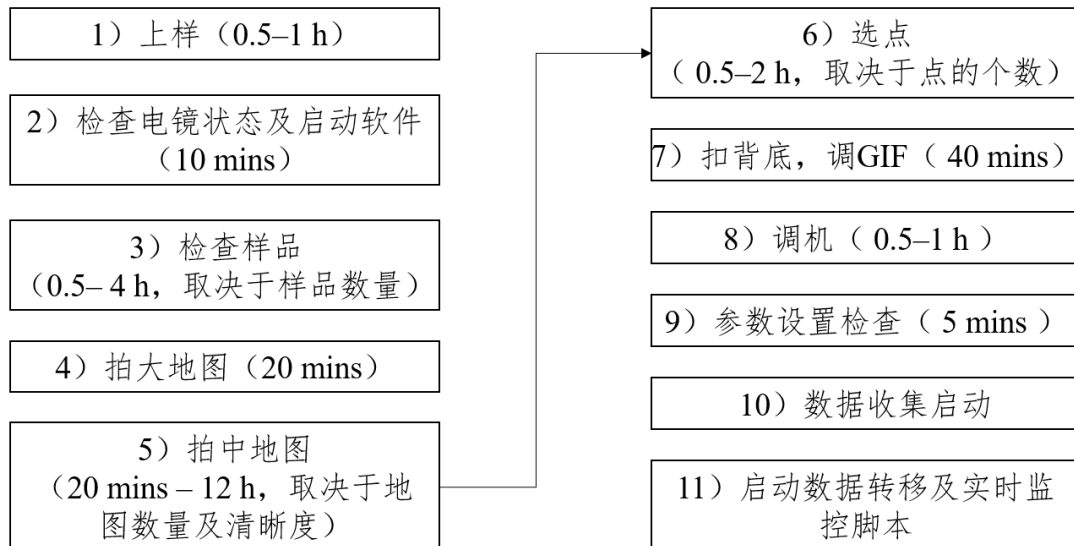


## Krios 3- SerialEM 单颗粒数据收集流程指南



- 请勿更改 FEG 参数
- 请勿进行任何 gun 相关的合轴
- 请勿更改任何 column 合轴
- 请勿安装任何软件
- 不允许进行 condenser aperture 对中

## 一、 上样

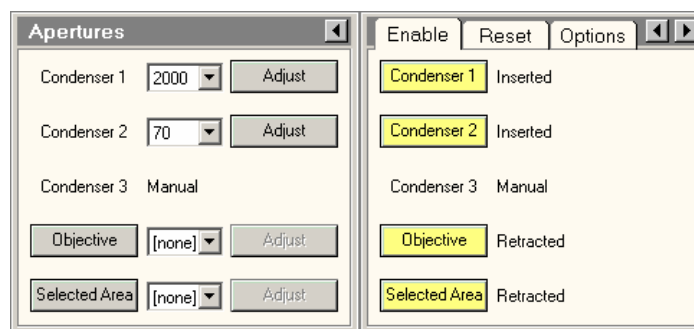
由管理员进行样品卡环和上样。

## 二、 检查电镜状态及启动软件

- 启动软件（由管理员进行）。UI > FluCam > DM > TIA > SerialEM（勾选 SerialEM 里的 Low Dose Mode，打开一个近期 setting）
- 检查真空状态。检查数值是否与下图相符。注意 Gun 和 Octagon 的数值必须是 1，若不是，请立即联系管理员。

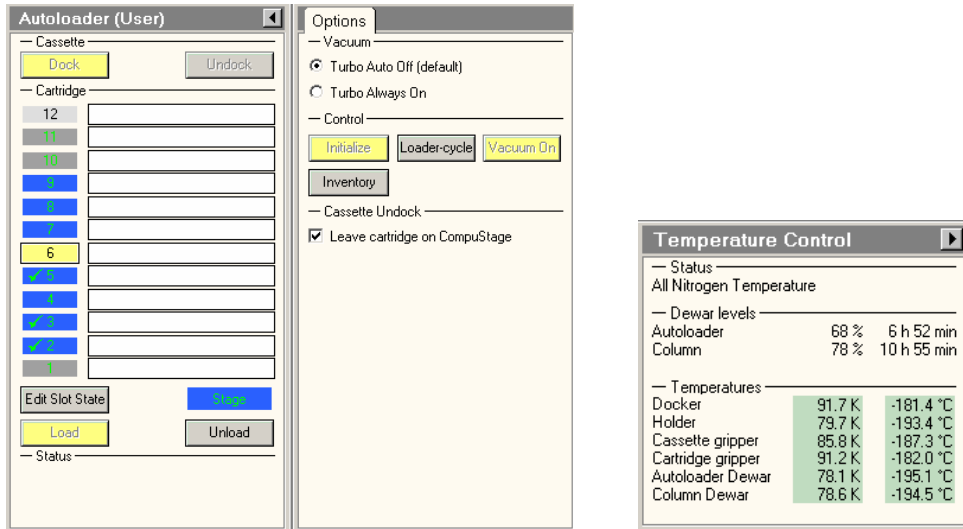
Vacuum area	Log
Gun	1
Liner	9
Octagon	1
Autoloader	39
Projection	25
Buffer tank	51
Backing line	78

- 检查下述事项：
  - 若不使用 UI 里的 Low Dose 模式检查样品，请使其处于关闭状态。
  - Condenser 1、Condenser 2 和 Condenser 3 光阑处于插入状态**（如下图）。其中 C 1 光阑应为 2000  $\mu\text{m}$ ，C 2 光阑应为 50 / 70 / 100  $\mu\text{m}$ 。在收集数据时，可选择插入 70 / 100  $\mu\text{m}$  物镜光阑。建议在现阶段使其处于 retract 状态。



- FEG control 应处于 **gun lens = 4, extraction V = 3800, HT = 300 kV** 的状态。若不是，请立即联系管理员。

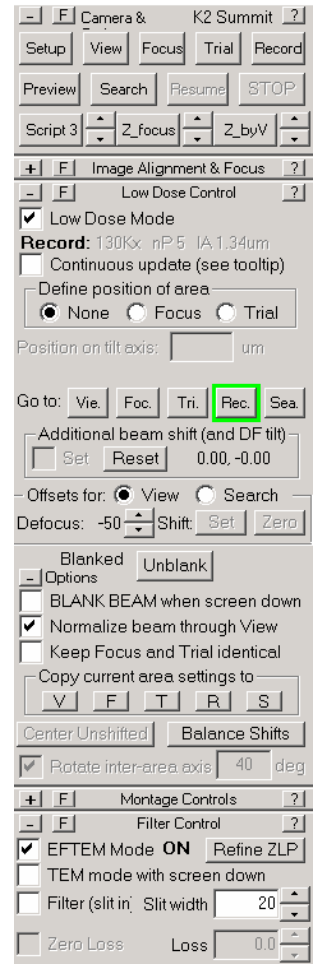
- iv. 在 Autoloader > options, 确认 Turbo Auto Off 处于选中状态, 各温度显示为绿色 (如下图)。



- v. 检查 UI 状态栏是否有报错, 若有, 请联系管理员。

- vi. 放下电镜荧光屏, 依次选择 SerialEM 中的“Go to:”检查 **View, Foc., Tri., Rec., Sea.**, 查看放大倍数、dose rate 是否符合要求, defocus 是否正确 (除 View 状态下 defocus 为 -50  $\mu\text{m}$  外, 其它状态应为 0  $\mu\text{m}$ )。其中, Low Dose Mode 下的文本显示当前成像模式下的实际状态参数。

- View 模式为低倍 (2000~4000 倍即可), 低剂量 (<0.1e/Å<sup>2</sup>/sec), 用于拍中地图。
- Record 模式是真正的数据收集模式, 按照所需的 pixel size 选取适当的放大倍数, 在根据具体的剂量要求通过电镜面板上的 intensity 旋钮, 调整到合适的 dose rate。
- Focus 模式是 SerialEM 的聚焦模式, 通常设置和 Record 模式倍数相同, 光斑大小可以在充分覆盖相机的前提下适当缩小。
- Trial 模式是光斑自动居中模式, 设置与 Focus 模式一致即可。也可通过勾选 Keep Focus and Trial identical 选项自动将 Trial 模式和 Focus 模式设置成一致。
- Search 模式为很低倍 (100 ~ 300 倍即可), 用于检查样品 square 冰层厚度和拍大地图。
- Krios 1 各状态常用设置如下:



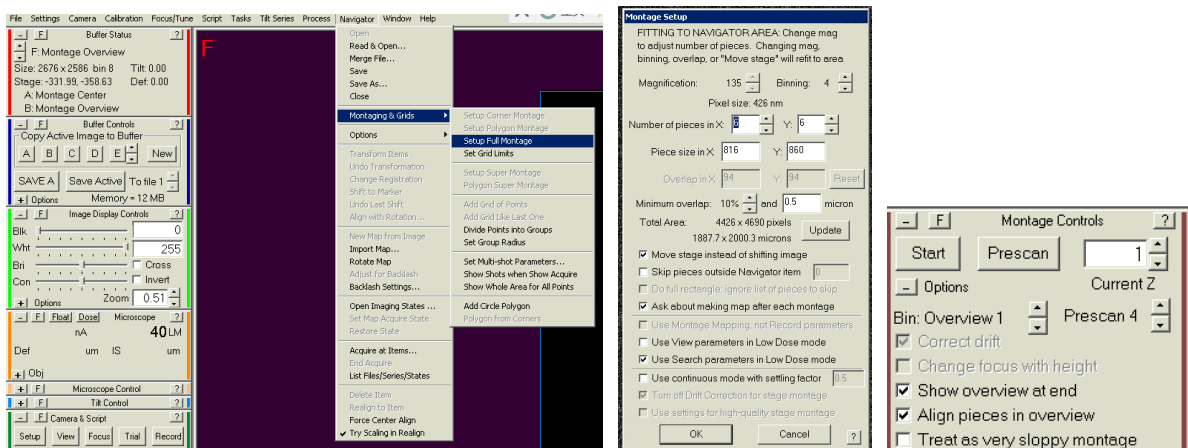
<b>Preset</b>	Search	View	Focus	Trid	105 k-Record (1.41 Å/pix)	130 k-Record (1.11 Å/pix)	165 k-Record (0.86 Å/pix)
<b>Mag</b>	175 x	3600 x	As Record	As Record	105 kx	130 kx	165 kx
<b>Bin</b>	4	4	1	1	0.5	0.5	0.5
<b>Readout</b>	Full	Full	Full	Full	Full	Full	Full
<b>Exp. time</b>	1 s	1 s	1 s	1 s	10 s	6.08 s	4.64 s
<b>NP / MP</b>	MP	MP	NP	NP	NP	NP	NP
<b>Mode</b>	Linear	Linear	Counting	Counting	Super-Resolution	Super-Resolution	Super-Resolution
<b>Defocus</b>	0	-50 µm					
<b>Spot Size</b>	7	7	As Record	As Record			
<b>Ill. area</b>	1 mm	60 µm	As Record	As Record			

### 三、 检查样品

- 当样品放入 autoloader 后，待所有的温度低于 $-175^{\circ}\text{C}$ ，点击“inventory”，检查每个 slot 的状态。
- 选择一个 slot 数字，点击“Load”，结束后打开 column，可使用电镜荧光屏和 SerialEM 检查该样品。
- 在 SerialEM 设置的“search”倍数下，使用 control panel 上的遥杆进行前后左右的移动，通过电镜荧光屏检查样品冰的厚度。选择合适冰层厚度的 square，切换至“View”倍数下，使用“Z\_byV”脚本矫正至 enccentric height 附近。再选择碳膜位置，使用“Z\_focus”脚本更为精细的矫正 z 高度。选择其附近需要拍照的位置，点击“Record”检查样品。
- 若要检查下一个样品，先将 column 关闭，点击“Unload”，结束后选择新 slot 后再点击“Load”。

### 四、 拍大地图

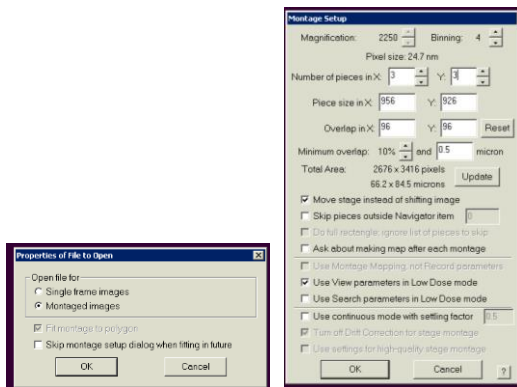
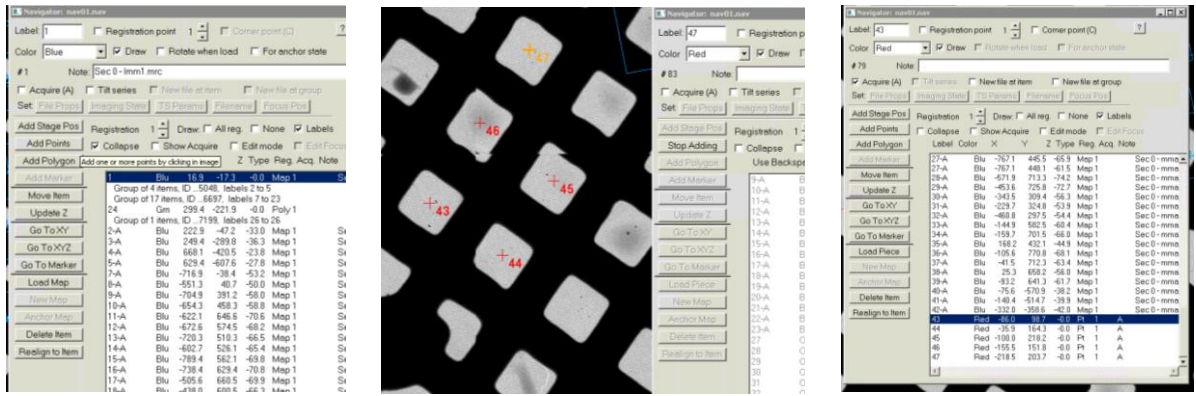
- 在 X 盘新建一个八位数字日期的文件夹（如 20200308）。
- 在 SerialEM 中，Navigator > open，打开一个新的 navigator 界面。
- Navigator > Montaging & Grids > Setup Full Montage，选择“ok”，为大地图起一个名字（如 lmm.mrc）保存在 a) 中所建文件夹内。点击 Montage Controls 的“Start”。



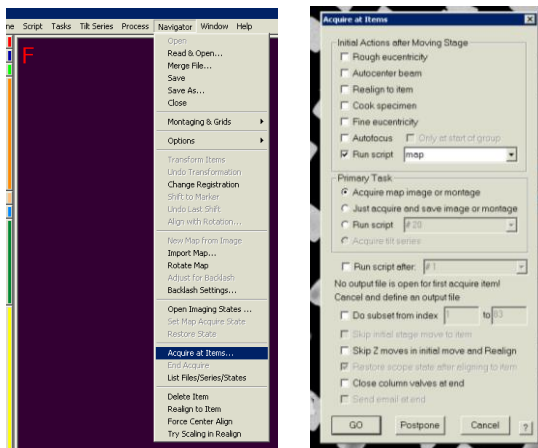
- 地图拍完后，选择“Yes”，将 navigator 文件命名（如 nav01.nav）保存在 a) 中所建文件夹内。
- 由管理员进行 Search 模式和 View 模式的对中。

### 五、 拍中地图

- 打开大地图，点击 Add Points，使用鼠标左键点击 square 的中心，添加完毕后点击 Stop Adding。
- 依次将添加的点勾选上“Acquire”，再依次勾选上 New file at item。第一次选中 new file at item 时会弹出一个新的窗口，选择 Montaged image，在 Montaged Setup 里根据 square 大小的设置 Number of pieces，点击“ok”对中地图进行命名（如 mmm001.mrc）。

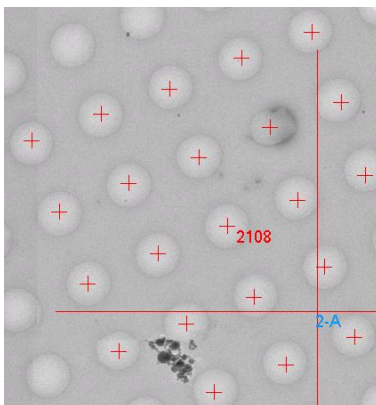


- c) Navigator > Acquire at Items, Initial Actions after Moving Stage 选择 Run script“map”, Primary Task 选择 “Acquire map image or montage”, 点击“Go”开始拍中地图。



## 六、 选点

- 当拍完部分中地图后,打开离线版 SerialEM(DUMMY SerialEM),打开 nav01.nav 文件,另存为 nav02.nav。
- 双击拍摄完成的中地图,点击 navigator 窗口的 Add Points 开始加点。建议每组所有的点要围绕在第一个点的周围, 5 x 5 为一组。一组点添加完毕后,点击 Stop Adding。再次点击 Add Points 开始添加下一组点。



c) Navigator > Merge File, 选择 nav01.nav 可将 nav01.nav 中新拍的中地图添加进 nav02.nav 中。

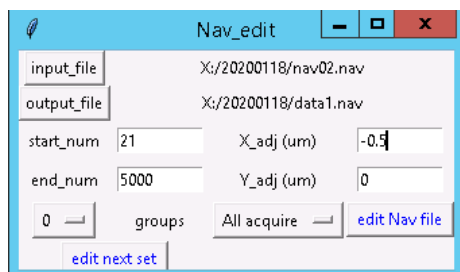
## 七、 扣背底, 调 GIF

由管理员完成, 一般在每次相机升温结束后进行。

## 八、 调机

由管理员完成:

- i. direct alignment
- ii. 坐标位置调整 (调整坐标的脚本为位于桌面上的 nav\_edit.py 或 nav\_edit\_copy.py)



## 九、 参数设置检查

- Navigator > Acquire at Items, Primary Task 选择“Run script V”, 点击“Go”检查坐标调整的是否合适
- 检查 View、Focus、Record 的参数设置
- 检查 Record 状态下的 dose rate
- 检查 Focus 和 Record 的相对位置
- 检查 defocus 范围
- 再次检查 Turbo 处于关闭状态
- 检查光在中心

## 十、 数据收集启动

Navigator > Acquire at Items, Primary Task 选择“Run script #20”, 点击“Go”。

## 十一、 启动数据转移和实时监控脚本

a) 打开 Gatan PC 桌面上的 MobaXterm, 连接 172.31.113.2

b) 运行命令 (以文件夹 20200308 为例):

```
cd /home/user/Desktop/3X/20200308
```

```
cp ../script/*.py .
```

```
./mv.py (#注意修改该文件内的文件名和路径)
```

```
./report.py (#注意修改该文件内的文件名和路径及 pix, e/frame 等参数)
```