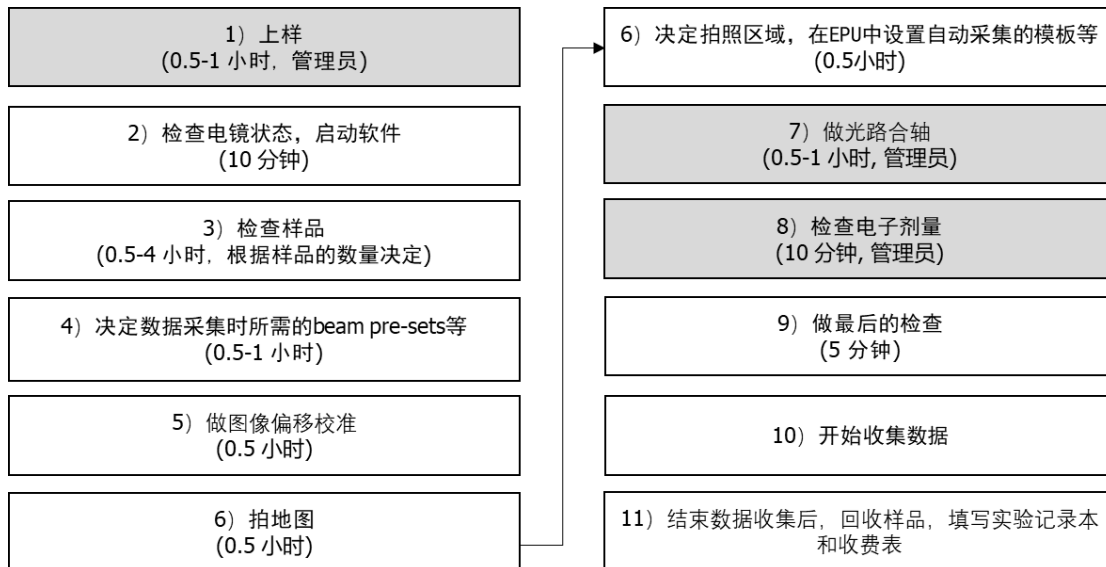


## Krios 5 EPU/Falcon 3 单颗粒数据采集操作指导



此操作手册用于指导使用 Krios 5 号机的 EPU 软件和 Falcon 3 相机收集单颗粒重构的数据。用户可根据上图中的流程图查询正文中相对应的部分。虽然收集数据的过程中可以根据需要对操作步骤进行顺序上的调整，但是建议初学者按照指导操作尽量避免错误发生。

**请注意，冷冻电镜的软件不是玩具，任何不当的操作可能会导致非常严重的损害，因此有任何不确定的请咨询管理员。有以下需求也请寻求管理员帮助。**

- 改变 FEG 的参数设置
- 做任何的光路合轴操作，包括电子枪合轴、镜筒合轴等
- Falcon 相机的保护校准（一般当电子枪合轴有问题时会需要重新做这个）。
- 请在取出或插入样品时确保 phase plate 是取出状态。

**有任何不懂的问题请咨询管理员！**

## 1. 上样

管理员会帮助用户对样品进行卡环并送进电镜，底下图片上是上样时所需的耗材及工具等。



## 2. 检查电镜的状态、启动软件

- 1) UI 界面一般是已经启动的状态，若是没有，则按顺序打开以下软件 UI > FluCam > Tia > EPU.
- 2) 检查真空状态。所有的真空数值都应该是绿色状态。Gun 和 octagon 应该是 1 log。若有问题，立即联系管理员，不要打开 COLUMN VALVES.
- 3) 检查以下事项：
  - a. 检查是否在 TEM 模式 (Setup > beam settings > TEM mode 应该为黄色)
  - b. Low Dose 模式应该为关闭状态，除非用户特意使用此模式，这是为了防止此模式和 EPU 中 beam shift 设置互相干扰.
  - c. 在 Apertures 的选项下，Condenser1, Condenser2 and Condenser3 光阑是在插入的状态，C1 光阑的大小是 2000  $\mu\text{m}$ , C2 的大小是 70 或 100  $\mu\text{m}$ , C3 为 manual 不可调节。通常在采集数据时可以选择 100 或 70  $\mu\text{m}$  的物镜光阑，或者选择取出不用。
  - d. 在 FEG control 里，**gun lens 应该为 4，HT 为 300 kV，extraction 为 4050。若不是，请联系管理员。**
  - e. 在 Autoloader > options 选项里，检查 **Turbo Auto Off 为选中的状态。检查 autoloader 里所有温度显示为绿色。**
  - f. **检查 UI 里面是否有错误信息**，若不确定，请联系管理员。

## 3. 筛选样品

- 1) Cassette 装在电镜上之后，等到 autoloader 选项里所有温度的数值都低于  $-160^{\circ}\text{C}$  后，在 autoloader 右边的选项里点 Inventory. 此操作会依次检查样品槽位置后将其中是否有样品的状态显示在 autoloader 中。检查其显示的样品位置是否和预想的一致。**不要编辑样品槽状态!**
- 2) 点击选中其中一个样品槽位置后点击 'load'。如果此时镜筒中已存在一个样品（前一个

cassette 中留下来的样品），此样品会被放在第一个空的样品槽中。当样品已经加载完毕时，‘Cartridge successfully loaded’ 的信息会显示在 UI 底部的 log 中（加载样品通常需要 2-3 分钟），然后样品槽的编号会变成黄色。

- 3) 此时可以开始观察样品。在 EPU 中点击 ‘set’ 将放大倍数调整到 grid square 的倍数，首先将 column valve 打开，按 R1 将荧光屏放下，若需 unblank beam 到 Camera > Falcon > Blank (blanked 时是黄色的)。用户可以选择使用荧光屏或者 TIA 进行实时观测。
- 4) 使用操纵杆移动样品，在低倍下观察样品冰的厚度，使用荧光屏时推荐选择 ‘natural’ 或 ‘high contrast’ 的模式进行观察。
- 5) 选择了要观察的区域时，可以在 EPU 中通过拍摄不同放大倍数的图像进行观察。在 preparation 选项卡中选择想要使用的 presets，点击 ‘preview’ 进行预览。拍照之前首先要确保在不同的 square 都要在正确的 eucentric height 下。
- 6) **使用 EPU 设置 eucentric height**，选择 EPU > Auto function > Auto-Functions(TEM) > Auto-eucentric by beam tilt/ stage tilt（不要和软件上面的 calibration 弄混），选择 Hole/eucentric 的 preset 后点击 Start 开始。观察此时图像是否正常，结束后会显示此操作是否成功，若失败可能是由于样品离 eucentric height 离的太远，可能需要进行手动调节。
- 7) **通过倾转样品台手动调节 eucentric height**。将放大倍数设定为 hole/eucentric preset 的倍数，按 R1 将荧光屏放下。使用操纵杆将一个特征点移到屏幕的中心，然后在 Stage 里面将 Alpha tilt 设置到 15°，通过调节 Z axis 按钮将特征点移回中心。然后 set Alpha 为 0°，观察特征点是否还在中心，若不是则重复以上步骤。
- 8) 如果要观察下一个样品，首先关掉 column valves，点击所需上样的样品槽位置后点击 ‘load’。重复以上操作直到你找到所需的样品。

## 4. 光照条件预设值 pre-sets

在 EPU 中，光照条件的 presets 根据不同的使用场景定义了不同的放大倍数、曝光时间等，比如 Atlas 用于拍低倍的地图。

用户可以将自己设定的 presets 保存下来，在 preparation > Presets > export 中导出这些设置，保存路径为 E:/BeamSettingPresets。推荐将每次实验的 presets 都保存下来供将来作为参考。若要打开已保存的 presets，请点击 EPU 软件中 preparation > Presets > import。

底下的表格给出部分较好的 presets 参数作为参考。

- 1) 加载新的 presets 之后，最好先检查一下这些 presets 是否正常工作，比如光斑是否居中，是否为平行光，是否为合适的放大倍数和电子剂量。
  - a. 按 R1 按钮将荧光屏放下，点击 set 将所选的 preset 设置为当前光照状态，检查光照区域，光斑是否为平行光（Beam settings > illumination），以及电子剂量等。如果 beam shift 偏的很远，则需要重新进行合轴 direct alignment，完成之后重新检查一遍，在 EPU 中拍一张预览图。
  - b. 如果有需要的话，调整 presets 的放大倍数至最优状态。比如在 grid square 的模式下，可以调整放大倍数使整个 grid square 都能被观测到。在 Hole/eucentric 的模式下，如果使用 quantifoil 的支撑膜，可以使观测区域内只包含一个圆孔，但是不建议太大的放大

倍数，这样在找孔的时候会出现问题。

- 2) 如果收集的数据需要包含 fractions，则需要在 presets > data acquisition > Fractions 中选择 'Yes'，在 Align 选项选中 'No' (如果选择了 align，则会失去原始数据，最终得到一张图片)。在 EPU > data acquisition preset 中确保设置正确的 exposure time，选择合适的 number of fractions。推荐每张 fraction 中的电子剂量大于 1 electron/pixel/second，否则在做 motioncorr 的时候很难得到好的结果，同时 Fraction 的数目需要能被 frames 整除。
- 3) Falcon 3 有两种模式：Linear 和 counting。确定你所需要的模式，然后改变相应的 presets，确保测量的电子剂量在绿色 bar 的范围之内。

以下表格为 Krios 5 的 EPU 中 Falcon 3 的 beam presets 的推荐数值，测量时使用了 70  $\mu\text{m}$  C2 aperture。

Preset	Camera/mode	Readout	Exposure time	NP/MP	Magnification	Defocus	Spot	Illumination area	Pixel size
Atlas	Falcon/linear	Full	1	MP	81x	0	8	2000	
Grid square	Falcon/linear	Full	1	MP	520x	-150	5	200	
Hole/eucentric	Falcon/linear	Full	1	MP	6500x	-50	8	20	
Autofocus	Falcon/linear	Full	0.5	NP		N/A	As data acq. linear	As data acq. linear	
Drift measurement	Falcon/linear	Full	0.5	NP			As data acq.	As data acq.	
59000x-Data acquisition	Falcon/linear	Full	1-2	NP		-2 range	4/5	1.1	1.11
59000x-Data acquisition	Falcon/Counting	Full	60-90	NP		-2 range	10/11	1.1	1.11
75000x-Data acquisition	Falcon/linear	Full	1-2	NP		-2 range	4/5	1.1	0.089
75000x-Data acquisition	Falcon/Counting	Full	50-80	NP		-2 range	10	1.1	0.089
96000x-Data acquisition	Falcon/linear	Full	1-2	NP		-2 range	4/5	1.1	0.069
96000x-Data acquisition	Falcon/Counting	Full	30-60	NP		-2 range	9/10	1.1	0.069

## 5. 图像偏移 Image shift 校准

不同的 beam presets 在切换时会存在一定的图像偏移，因此需要进行图像偏移校准。图像偏移校准时需要根据 presets 中不同的放大倍数，因此通常在已经确定 presets 后进行，而且每次实验时特别是改变 presets 的放大倍数后需重新进行校准。

- 1) 在低倍时(grid square 的倍数下)，将样品挪动到一个有微米级特征点的区域，如冰晶和其他的污染物等。
- 2) 将样品调节到 eucentric height (同时按下 eucentric focus)下将特征点居中。
- 3) 切换到 data acquisition 的放大倍数下，保证特征点仍然居中。一般可以在 EPU 中从低倍到高倍逐级切换，拍摄预览图片调整位置。
- 4) 在 EPU 软件中，点击 preparation > calibrate image shifts > start calibration 开始校准的步骤。
- 5) 软件会自动在 data acquisition 的放大倍数下拍摄一张图片，中间会有一个标记的 marker。如果中间的 marker 是一个可以辨认的特征点，点击 proceed。如果你需要移动位置，双击图片上的位置，点击 re-acquire，重复此操作直到找到合适的特征点，然后点击 proceed。
- 6) 此时电镜会降到下一个 beam presets 的放大倍数然后拍一张图片。在这张图片中，双击刚刚的特征点，然后点击 'proceed'。重复这些步骤直到其显示 'image shift calibration finished successfully'。

## 6. 拍低倍地图 (atlas)

Atlas 是整个样品的低倍地图，用于收集数据时选择你所需的方形区域 square。

- 1) 确保物镜光阑已取出。
- 2) 在 Atlas 选项卡内，新建一个文件 (或载入一个以前的 Atlas)。将图片存为 MRC 格式，并选择存储路径 (Z:\Atlas)。
- 3) 在 Atlas Acquisition 里选择是从中心还是从当前区域开始拍摄图片。点击 'acquire' 后将会开始拍摄地图，注意观察拍摄的图片是否正常 (主要是看光照是否正常，拼图是否正常工作)。如果已经有足够多的 square，可以随时停止地图拍摄。当放大倍数为 81x 时，地图是 4x4 的拼图。

## 7. 开始一个新的 EPU session, 然后选择区域

- 1) 在 EPU 里, 选择 EPU tab > session set up > new session.
- 2) 填完所需的信息，选择 'manual selection', 保存 MRC 格式的文件到 Z, 然后点击 'apply'.
- 3) 转到 square selection 选项 > 如果所有的方块都为绿色，点击 'unselect all'。一个方形区域 (右击 > add > move stage to grid square)。

- 4) 将选择的方块调整到 eucentric height, 可以通过观察荧光屏或者实时图像, 或者通过 Auto eucentric height 的功能。点击 eucentric focus。根据需要插入物镜光阑。
- 5) 对于 quantifoil 来说:
  - a. 转到 hole selection > 点击 acquire。第一次做此操作是, 点击测量孔的大小 (hole size)。移动调整黄色的圆圈使其覆盖 quantifoil 的孔>点击 find holes。重复此步骤直到软件找到的孔和观察到的孔一致, 使用放大的功能可以更加准确的进行观察。
  - b. 使用 'filter ice quality' 直方图可以调整孔的选择, 使用 'remove holes close to grid bar' 和 'hole selector' 工具可以去掉不想要的孔。选择 'hole selector' 时可以手动加上 (control + left click) 或者去掉 (shift + left click) 选择的孔。
  - c. 下一步选择 template definition > acquire > find and centre holes (如果软件找不到孔, 则检查物镜光阑是否在插入状态。如果物镜光阑已插入, 可以增加 hole/eucentric height preset 的曝光时间, 或者增加欠焦值 (defocus) )。
  - d. 改变 'Delay after Stage Shift' 和 'Delay after Image Shift' 的时间到 4s 以上。
  - e. 点击添加拍照区域 'Add acquisition area', 然后点击图中的任何一点, 移动拍照区域到所需的位置。在右上角, 添加此拍照区域的欠焦范围 (例如 -1.5 to -3.5  $\mu\text{m}$ , 增幅为 0.25  $\mu\text{m}$ , 中间用逗号隔开)。然后依次添加其他的拍照区域, 双击查看欠焦范围是否符合要求。图中显示的拍照区域中绿色圆形中间的方形代表探测器能探测的范围, 圆圈代表光斑大小。当选择一孔拍多张时, 记住光斑的直径会有 +/- 10 % 的误差, 所以拍照区域之间最好留有最后的间隙。
  - f. 点击添加自动聚焦区域 'add autofocus area', 同样单击图中的任意一个位置, 移动自动聚焦区域到孔附近的碳膜上, 调整 autofocus 菜单里面的数值。推荐的做法为每隔 5-15  $\mu\text{m}$  自动聚焦一次, 取决于你支撑膜的 square 是否平整, 不平整的样品需要更经常聚焦。
  - g. 点击添加漂移测量区域 'add drift measurement area'。在一个 grid square 只需进行一次漂移测量, 设定阈值为 0.05 nm/s。漂移测量区域可以和自动聚焦区域重合, 但是需要保证漂移测量区域和自动聚焦区域不能和拍照区域重合。
  - h. 可选步骤: 你可使用模板执行工具 (template execution function) 检查你的模板 template。这可以给你的拍照区域提供一个参考, 比如照片中是否有太多或太少的碳膜。
- 6) 对于 lacey carbon 来说:
  - a. 在区域的选择上, 需要改变以下内容:
    - i. 数据采集过程中, 经过一定的距离后需要自动聚焦。根据样品的高度区别, 此距离推荐值为 8-15  $\mu\text{m}$ 。聚焦使用物镜 (objective lens), autostigmatte 选择 'no'。
    - ii. 改变 stage shift delay 为 10 s。
    - iii. 选择拍照区域之间的间隔。推荐此间隔在你光照面积的基础上加上 ~ 300-400 nm (e.g. 光照面积为 0.9  $\mu\text{m}$ , 选择间隔为 1.3  $\mu\text{m}$ ), 这样拍照区域就不会有重合。点击显示图形。



- iv. 使用右边的柱状图选择你的拍照区域，也可以手动添加（control + left click）或删除（shift + left click）不想要的区域。
  - b. 在拍照区域设置里 'Data acquisition area settings'，添加欠焦值范围（一般需要为负值）
- 7) 选择自动采集 automated acquisition > 点击 run。确认 'close col. valves' 是被选中的，这样当 EPU 突然中断或者结束采集时，column valves 将会关闭从而保护电镜状态。

建议用户先选择一个方形区域后完成剩下的步骤，不要一次性选择太多的区域，否则有可能在遇到问题后需要重新选择。如果确认了一切正常，此时可以回到 'square selection' 和 'hole selection' 添加更多的数据采集区域。

## 8. 做光路合轴 (管理员)

## 9. 检查电子剂量 (管理员)

使用 EPU 确认电子剂量，找到一个真空区域，使用 data acquisition 的 preset 拍摄一张预览图片，在右边的信息栏里能显示电子剂量。检查这是否是你所需的剂量，若不是，需要对光进行调节。

## 10. Final checks

- 1) 检查 turbo pump 是不是 'auto off' (autoloader 菜单栏里)。
- 2) 检查 data acquisition 模式下光是不是在中心。
- 3) 如果需要的话，确保最后的图片包含 fractions。
- 4) 确保 Close Col. Valves 选项是选中的。