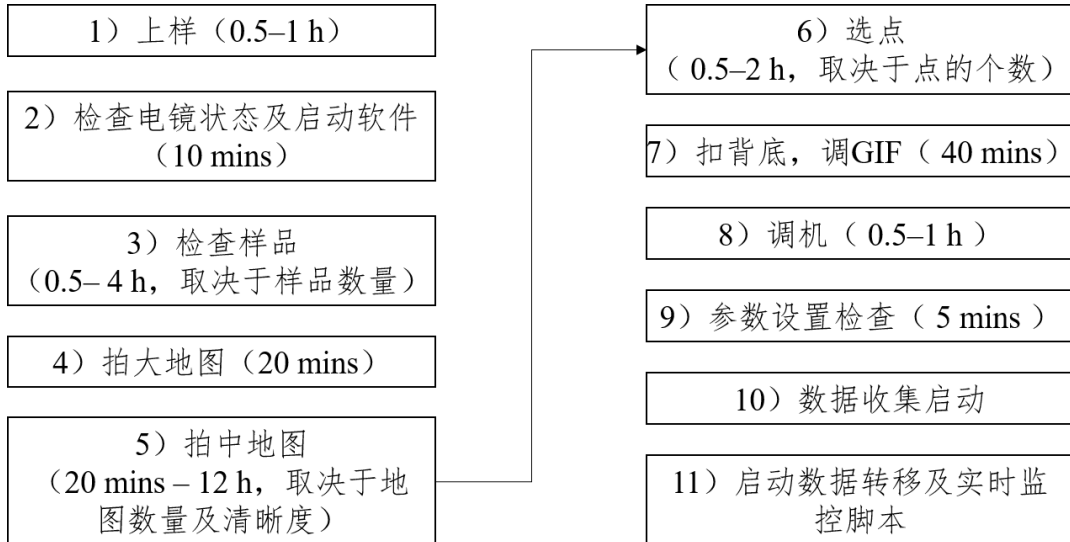


## SerialEM 单颗粒数据收集流程指南



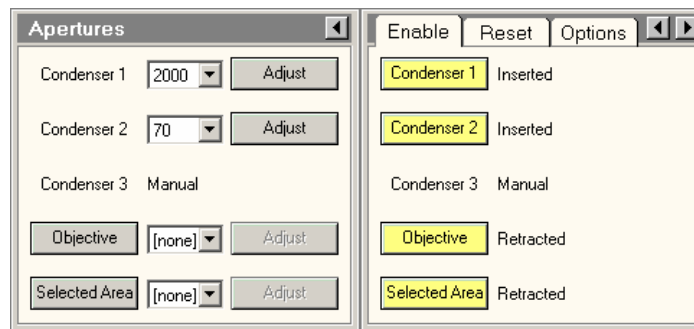
- 请勿更改 FEG 参数
- 请勿进行任何 gun 相关的合轴
- 请勿更改任何 column 合轴
- 请勿安装任何软件

## 一、上样

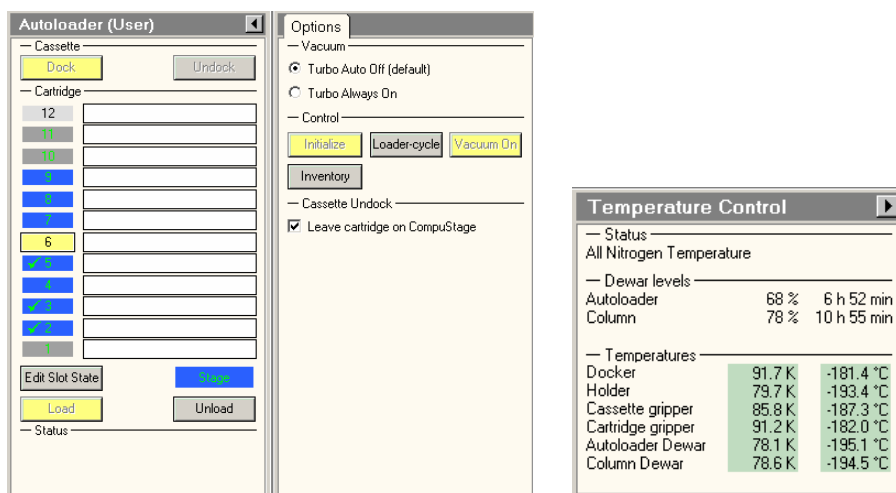
由管理员进行样品卡环和上样。

## 二、检查电镜状态及启动软件

- a) 按顺序检查软件是否都开启。UI > FluCam > GMS > TIA > FEI-SEMserver > SerialEM (勾选 SerialEM 里的 **Low Dose Mode**, 打开一个近期 setting 或用户自己曾用的setting)。
- b) 检查真空状态。所有的真空数值都应该是绿色状态。**注意 Gun 和 Octagon 的数值必须是 1**, 若不是, 请立即联系管理员, 不要打开 COLUMN VALVES。
  - i. UI 里的 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 SerialEM 里的设置相互干扰。
  - ii. 检查电镜是否为 EFTEM 模式, K2/K3 相机是否正常插入。
  - iii. **Condenser 1、Condenser 2 和 Condenser 3 光阑处于插入状态** (如下图)。其中 C1 光阑应为 2000  $\mu\text{m}$ , C2 光阑可选 50 / 70 / 100 / 150  $\mu\text{m}$  (不同电镜光阑选项会不一样), C3 为 manual 不可调节。



- iv. FEG control 应处于 **gun lens = 3或4, HT = 300 kV** 的状态。若不是, 请立即联系管理员。
- v. 在 Autoloader > Options, 确认 **Turbo Auto Off** 处于选中状态, Status 为 **All Nitrogen Temperature**, 各温度显示为绿色。

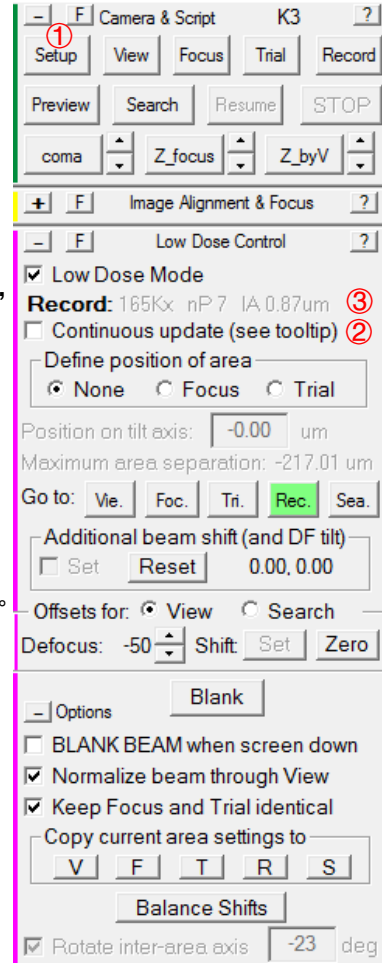


- vi. 检查UI状态栏是否有报错信息, 若有, 请联系管理员。

### 三、倍率和拍照条件预设

1. 调用 setting 后需检查当前 setting 的倍率和光照条件是否符合自己的使用要求。

- a) 放下电镜荧光屏 (screen)，依次选择 SerialEM 中的 “Go to:” 检查 **View**，**Foc.**，**Tri.**，**Rec.**，**Sea.**，查看放大倍数和 **dose rate** 是否符合要求，**defocus** 是否正确（除 View 状态下 defocus 为 -50 μm 外，其它状态应为 0 μm）。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 ①。
  - **View**: 中低倍 (2k ~ 4k 倍), 低剂量 (< 0.1e<sup>-7</sup>Å<sup>2</sup>/sec), 用于查看 Square 内孔的情况和拍中地图。
  - **Record**: 高倍, 数据收集模式, 按照所需的 pixel size 选取适当的放大倍数, 再根据具体的剂量要求选择适当的 spot size, 并通过 intensity 旋钮调整合适大小的光斑, 直到 dose rate 符合需求。
  - **Focus**: 高倍, 自动调焦模式, 通常与 Record 倍数相同, 光斑大小可在充分覆盖相机的前提下适当缩小。
  - **Trial**: 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**: 低倍 (100 ~ 300 倍), 用于检查整个样品 Square 冰层厚度和拍大地图。
- b) 每修改一个模式的倍率或光照条件时, 需要先勾选 continuous update ② 更新状态, 然后取消勾选来保护当前状态不被修改。



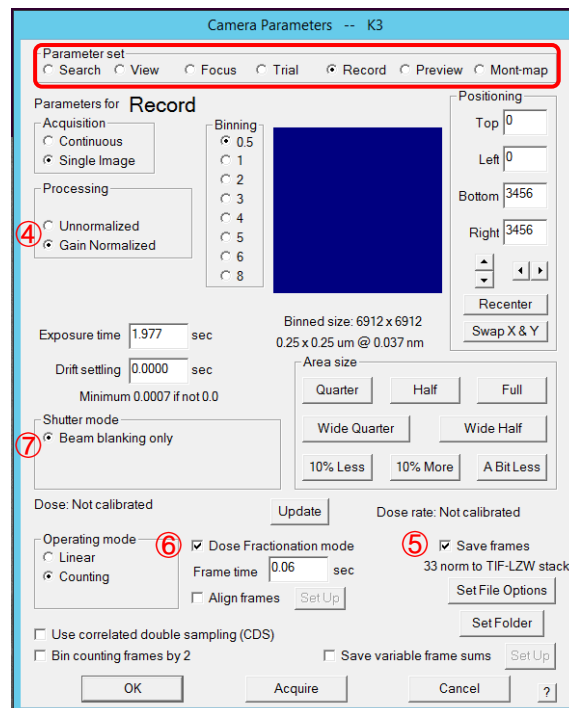
c) 点击 setup ③ 设置各模式的相机参数及曝光时间。弹出以下界面。

- 通过选择 Parameter set 中的 Search, View, Focus, Trial, Record, 来分别设置这几个状态的 Exposure time 和 Binning 值。
- 通常 Search, View, Focus, Trial 选用 Binning 2 或 4, Exposure time < 1 sec (视图像反差而定, 若图像发白, 减少曝光时间; 图像过暗, 则增加)。
- Record 通常选择 Binning 0.5 (即 super-resolution 模式) Exposure time 根据所需 total dose 计算:

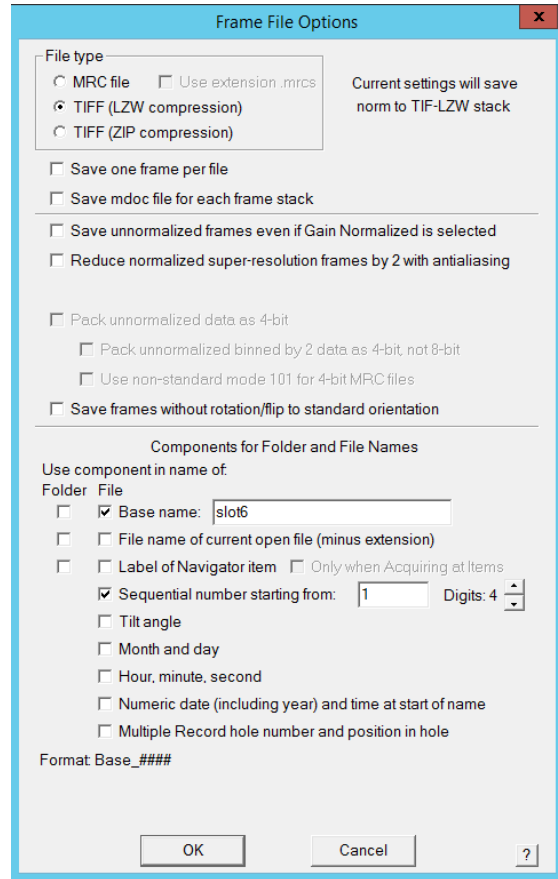
$$Exp\ time\ (s) = \frac{total\ dose * pixel\ size^2}{dose\ rate}$$

total dose: e<sup>-7</sup> Å<sup>2</sup>

dose rate: e<sup>-7</sup>/pix-s      pixel: Å



- Record 模式需勾选上 Counting ④, Dose Fraction mode ⑤ 和 save frames ⑥, Frame time 根据 Exposure time 和所需的图像帧数计算, 如 33 帧, Frame time 为  $1.97 / 33 = 0.06$  s.
  - 一般数据收集默认选择 Gain Normalized ⑦ 即保存已校正相机背底噪音的图片, 若需保存相机纯原始信号的图片, 则勾选 Unprocessed.
  - 点击 Set Folder 设置图片保存路径, 选择 X 盘.
  - 点击 Set File Options 设置自动保存的图片文件名, Base name 和 Sequential number 必选, 其他选择性勾选.
  - 其他设置默认不改, 若有改动请咨询管理员.
- d) 修改后及时保存成自己的 setting.



2. 各模式常用设置如下: (需根据不同电镜进行调整)

Preset	Mag	Readout	NP/MP	Binning	Mode	Spot	Illumination area, $\mu\text{m}$	Defocus, $\mu\text{m}$
Search	135 x	Full	MP	4	Linear	8	1000	0
View	2250 x	Full	MP	4	Linear	8	40	-50
Focus	As Record	Full	NP	1	Counting	As Record	As Record	-
Trial	As Record	Full	NP	1	Counting	As Record	As Record	-
105 k-Record	105 kx	Full	NP	0.5	Counting	5/6	1.1	-
130 k-Record	130 kx	Full	NP	0.5	Counting	5/6	1.1	-
165 k-Record	165 kx	Full	NP	0.5	Counting	6/7	1.1	-

## 四、检查样品

- a) 当样品放入 autoloader 后，待所有的温度低于 $-175^{\circ}\text{C}$ ，显示全部为绿色后，点击“inventory”依次检查每个 slot 样品槽的状态。下图为 slot 状态说明。**不要编辑样品槽状态!**

	Slot characteristics	Explanation
12	Light gray color	Slot content is unknown
11	Blue color	Slot is occupied
10	Dark grey color	Slot is empty
9	Black slot number	No inventory of slot has been done by the AutoLoader hardware
8	Green slot number	An inventory of this slot has been performed by the AutoLoader hardware
7	Yellow slot color	Cartridge from this slot is either in the progress of being loaded / unloaded or is loaded on the CompuStage
6	Yellow slot color	Cartridge from this slot is either in the progress of being loaded / unloaded or is loaded on the CompuStage
5	Yellow slot color	Cartridge from this slot is either in the progress of being loaded / unloaded or is loaded on the CompuStage
4	Red cross	Slot blocked for further use
3	Red cross	Slot blocked for further use
2	Red cross	Slot blocked for further use
1	Green checkmark	Manual and AutoLoader inventory are consistent

Stage	The stage content is unknown; no stage map has been performed
Stage	The stage contains no cartridge
Stage	The stage contains a cartridge

- b) 选中其中一个样品槽位置点击“load”，该样品会被机械手夹取放入镜筒 stage，status 对话框底端会有文字显示目前切换的工作状态。当样品 load 完毕时，文字消失，slot 底框颜色变为黄色，stage 显示蓝色底框绿色字。
- c) 打开 column 阀开始观察样品。点击 serialEM 软件中的 Go to sea.，按 R1 插入荧光屏 screen，使用 control panel 上的操纵杆进行前后左右的移动，在低倍下通过荧光屏检查样品整体冰层厚度。使用荧光屏时推荐选择“natural”或“high contrast”的模式进行观察。寻找到合适冰层厚度的 square，可在 UI 软件的 Stage 中 Add 位置，同时可以打开 Tracks 标记样品杆移动的位置痕迹（避免反复寻找）。点击“Search”荧光屏会自动抬起，可在当前倍率通过相机预览样品情况。
- d) 选择要观察的 square 区域，用鼠标右键拖拽至视野中心，切换至“View”，可在该倍率下观察 Square 内的冰层情况。点击“Z\_byV”，软件会自动调节高度至 eucentric height 附近。随后移动样品中心至碳膜上，先点击 Define position of area 中的 Focus 确认聚焦点在视野十字中心，然后再点击“Z\_focus”进一步精确校正 Z 高度。点击“View”预览图片，用鼠标右键拖拽要拍照的孔位置到视野中心，点击“Record”在高倍拍照，可检查孔内样品情况。依次检查感兴趣的点，检查不同冰层厚度的 square 中样品状态，最终确认用于收集数据的冰层厚度。
- e) 如果要观察下一个样品，首先关掉 column valves，点击“Unload”，结束后选择新的 slot 后再点击“Load”。重复以上操作直到找到收集数据所需的样品。

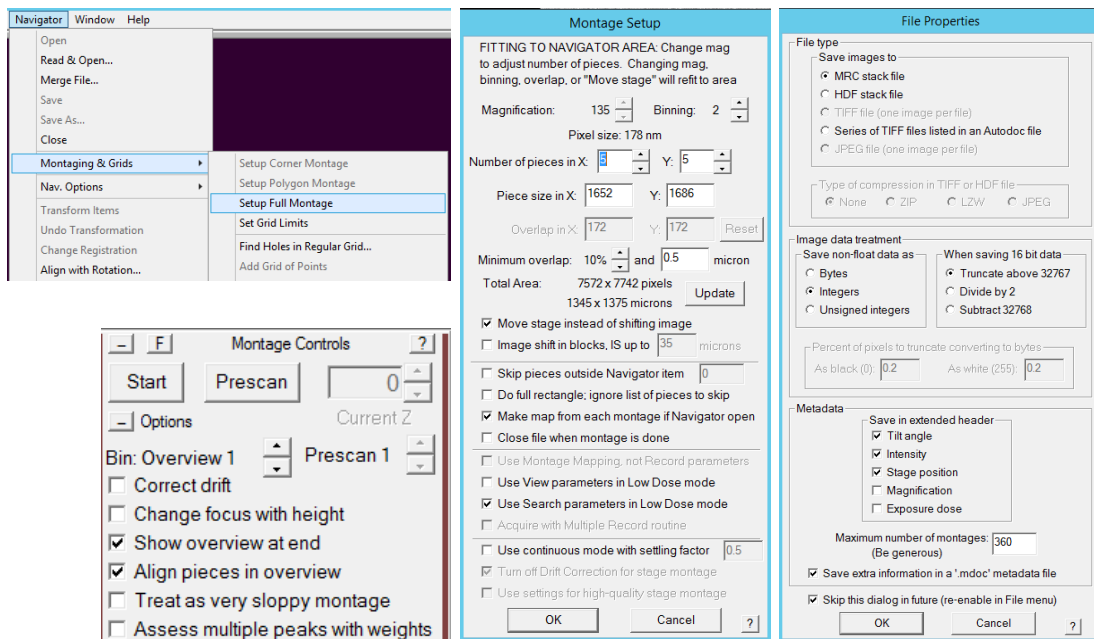
### 查样和手动拍照注意事项：

- View 时拖动鼠标位置有可能不够准确，需要再点一次 view 确认一下，然后再切换到高倍 Record 进行拍照。
- 低倍下不要移动光斑，低倍下移动光斑后切换到高倍光容易偏，高倍下光偏只调节高倍下的 Direct Alignment，用 Beam Shift 将光斑调至居中即可。

- iii. 观察 Z\_byV 和 Z\_focus 两次调整高度后 Z 值相差是否过大，若相差 3  $\mu\text{m}$  以上请联系管理员，否则易影响后续选点收数据时拍照位置的准确度。

## 五、拍大地图

- 在 X 盘新建一个收数据的文件夹。
- 在 SerialEM 中，Navigator > open，打开一个新的 navigator 界面。
- Navigator > Montaging & Grids > Setup Full Montage，Number of pieces in X/Y 通常 4-6 范围（根据不同电镜配置的相机大小和倍率选择），确认勾选 Use Search parameters in Low Dose mode（即使用 Search 模式拍大地图）点击“OK”，下一个弹框 File Properties 全都默认，点击“OK”，命名保存在 a) 中所建文件夹内。点击 Montage Controls 的“Start”，开始自动拍大地图。



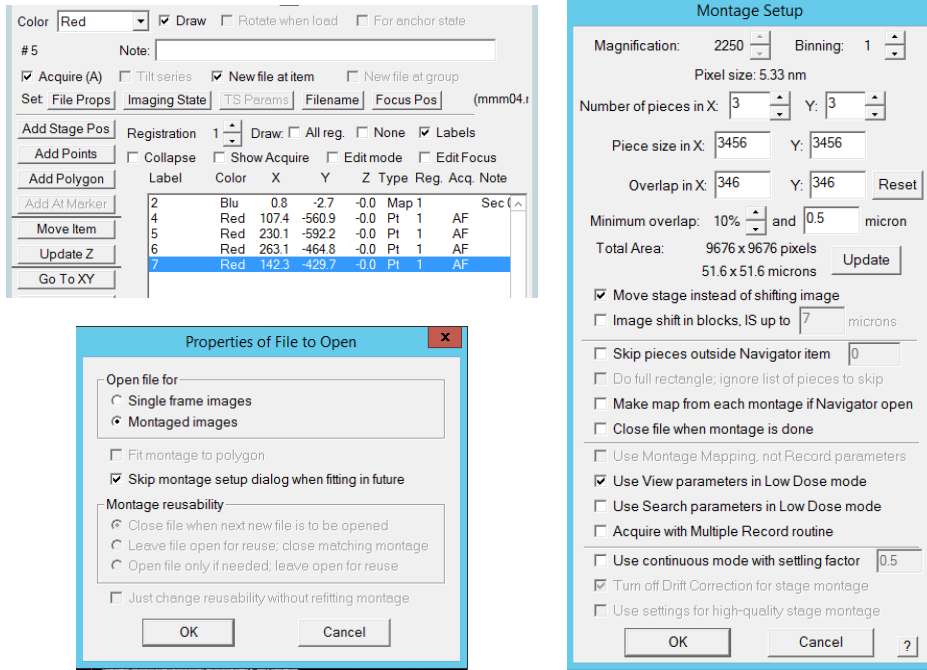
- 将 navigator 命名 (如 nav01.nav) 保存在 a) 中所建文件夹内。
- 由管理员进行 Search 模式和 View 模式的对中。

## 六、拍中地图

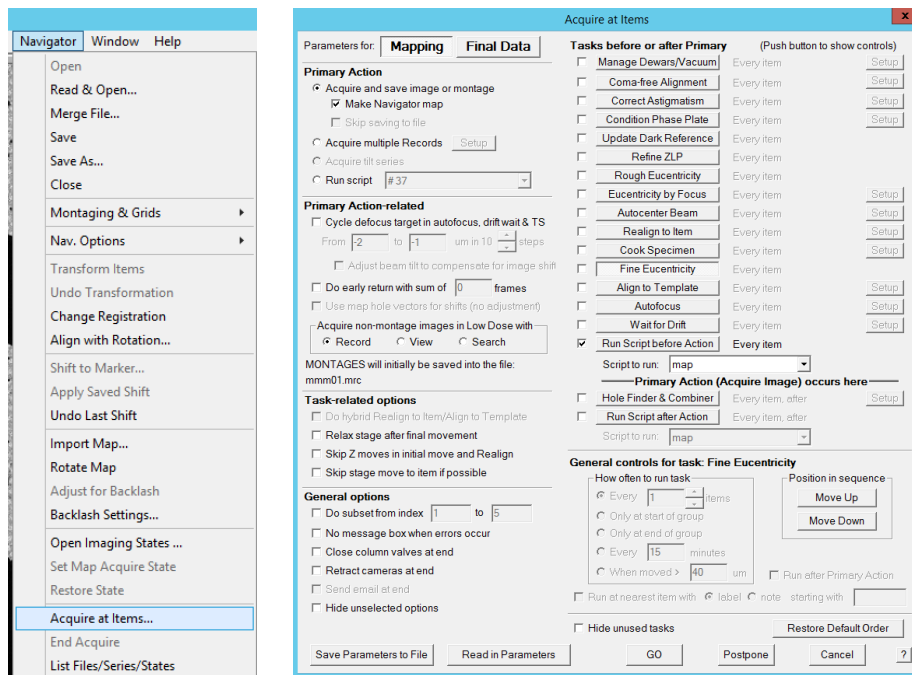
- 在 navigator 列表双击打开已拍好的大地图 Map1，点击 Add Points，使用鼠标左键点击大地图中想要收数据的 square 的中心，添加完毕后点击 Stop Adding。



- b) 依次将添加的点勾选上“Acquire”（可通过键盘 A 快捷按键，或勾选 collapse 折叠后将所有点统一勾选“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 > OK，在 Montaged Setup 里根据 square 大小的设置 Number of pieces，通常设置 3-4（与载网目数有关）。确认勾选 Use View parameters in Low Dose mode（即使用 View 模式拍中地图）。点击“OK”，弹出提示框对第一个拍摄的中地图进行命名（如 mmm001.mrc，后续地图会自动按序列往后命名 002, 003...）。



- c) 工具栏 Navigator > Acquire at Items > Mapping, Primary Action > Acquire and save image or montage，勾选 Make Navigator map。Tasks before or after Primary 勾选 Run Script before Action，Script to run 选择 map，点击“Go”开始拍中地图。

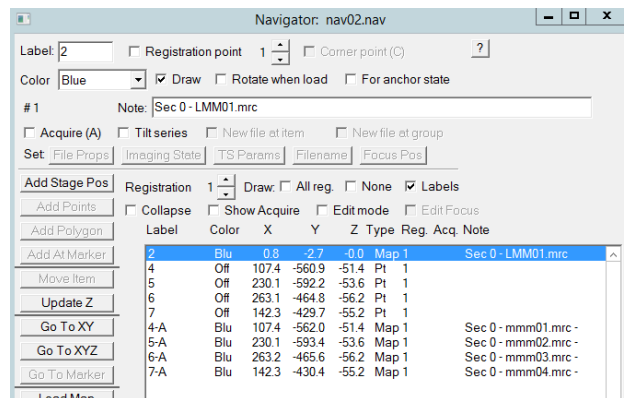


**拍地图时注意事项：**

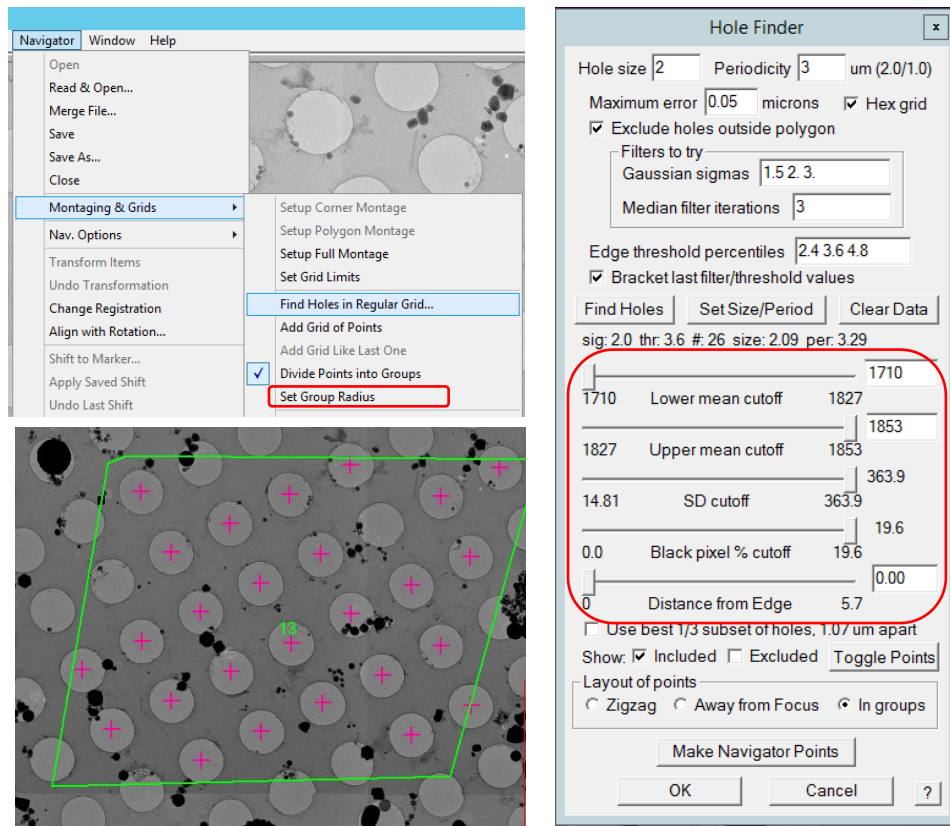
- i. 拍地图时在 SerialEM 软件中不要出现任何下拉菜单，否则软件可能会出现 bug，自动停止地图的拍摄。
- ii. 在第一张地图拍完以后检查一下地图拼接情况，是否对齐，如果有较明显的拼接不齐，请联系管理员。

**七、选点**

- a) 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。在 nav02.nav 上完成离线选点，nav01.nav 可继续拍中地图。拍完的地图会在 navigator 列表显示 map 和对应的序列命名。



- b) 手动选点：在列表中双击拍摄完成的中地图 map，点击 Add Points 开始加点，选在每个孔的中心。建议每组所有的点要围绕在第一个点的周围，4 x 4 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。Group 是指从点击 Add Points 开始到点击 Stop Adding 结束的整个期间里，所选定的所有点。group 选择完成后，勾选 Collapse groups 选项时，可将同一个 group 中的所有点归至一个条目内。逐个选定每个 group，勾选 Acquire 选项，让 group 内的每个点都带上标记 A，在 Collapse groups 状态中，每个 group 带上 All Acq 标记。
- c) 自动选点：
  1. 在列表中双击拍摄完成的中地图 map，点击 Add polygon，然后在地图上依次点击区域绘制绿色多边形，将要收集数据的区域框在多边形里面，多边形框选完毕后点击 Stop Adding。当 square 完整时，可将一整个 square 作为一个区域框选；当 square 支撑膜出现裂缝时，应避免裂缝，分成多个区域框选，即绘制多个 polygon，画好以后，点击 Stop Adding。
  2. Navigator > Montaging & Grids > Find Holes in Regular Grid，在 Hole Finder 对话框下输入 Hole size 孔径与孔间距，点击 Find Holes，开始自动在 polygon 框选区域内选点。红色十字为已选点，蓝色十字为弃选点。
  3. 可通过拖动滑块选择冰层厚度，去除裂纹及冰污染等。
  4. 点击 Make Navigator Points，弹出分组信息。若接受，点 Yes；若不接受，点 No，并通过 Set Group Radius，重新分组。分组完成后，点 OK。所有选好的点会自动带上“A”。



- d) 想要剔除选错或不要的点，需勾选上 Edit mode，即可用鼠标左键双击两下对改点进行删除操作；或直接在列表选中该点，点击 Delete item。用鼠标右键单击一下可修改选点的位置。
- e) 离线版 DUMMY SerialEM 点击 Navigator > Merge File，选择 nav01.nav 可将 nav01.nav 中新拍的中地图添加进 nav02.nav 中，继续在新 map 中选点。
- f) 选点完毕后，回到在线版 SerialEM 使用 nav02.nav 进行数据收集。

#### 选点时注意事项：

- 每张地图选完后点击 Save 及时保存，以防软件出现 BUG 时丢失已选数据。（不要选碳膜裂的位置，不要选靠近边缘的区域，不要把点选在地图拼接处）
- 若想等待所有中地图拍完再统一选点，可直接用在线版 SerialEM 进行，无需更改 nav 文件。

## 八、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。

## 九、调机

视野中心选择碳膜位置，在 Record 倍率下进行 direct alignment 光路合轴：

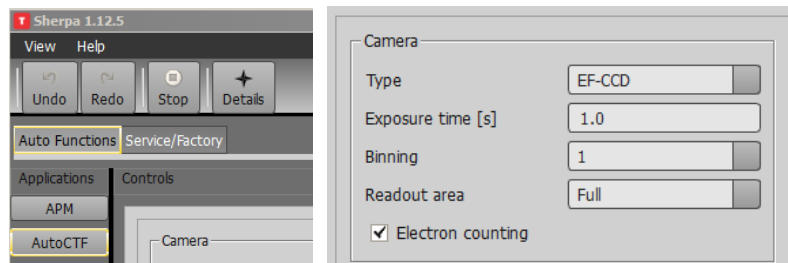
1. Beam shift（调光斑居中）
2. nP Beam tilt ppX – ppY（调两个晃动光斑完全重合，抖动最小）
3. Rotation Center（找标记物调至原地像心脏搏动，无上下左右抖动）
4. Stigmator – Objective（调FFT环正圆，消除物镜像散 objective astigmatism）

5. Coma free Alignment X – Y （调两个方向摆动的光斑大小完全一致，消除物镜彗差 coma）
6. Coma free ppX – ppY （调两个方向摆动的光斑完全重合，消除投影镜慧差 coma）
7. 再次 Stigmator – Objective

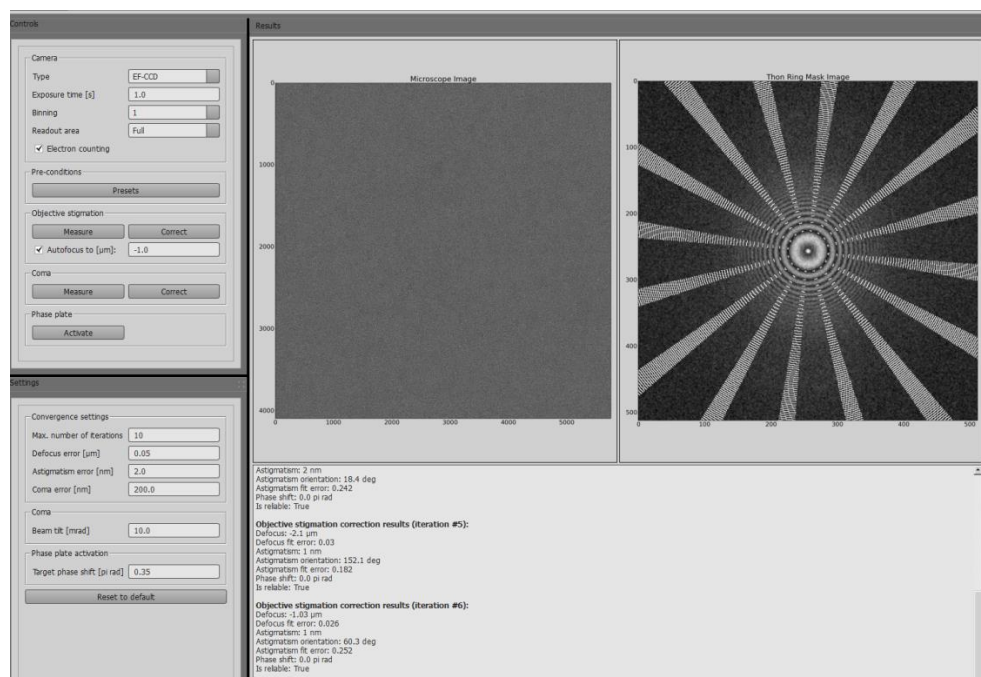
**注意：**

- i. 调机操作前务必先按一次 **Eucentric focus**，确认 Focus 值归0。
- ii. 除5号福田外，其他电镜均可通过 Sherpa 软件自动校正 **objective astigmatism** 和 **coma**（即通过 sherpa 完成步骤4-7）。
- iii. 5号福田只需要进行一次步骤4 Stigmator – Objective 即可，无需调节 coma。
- iv. Sherpa 软件使用如下：

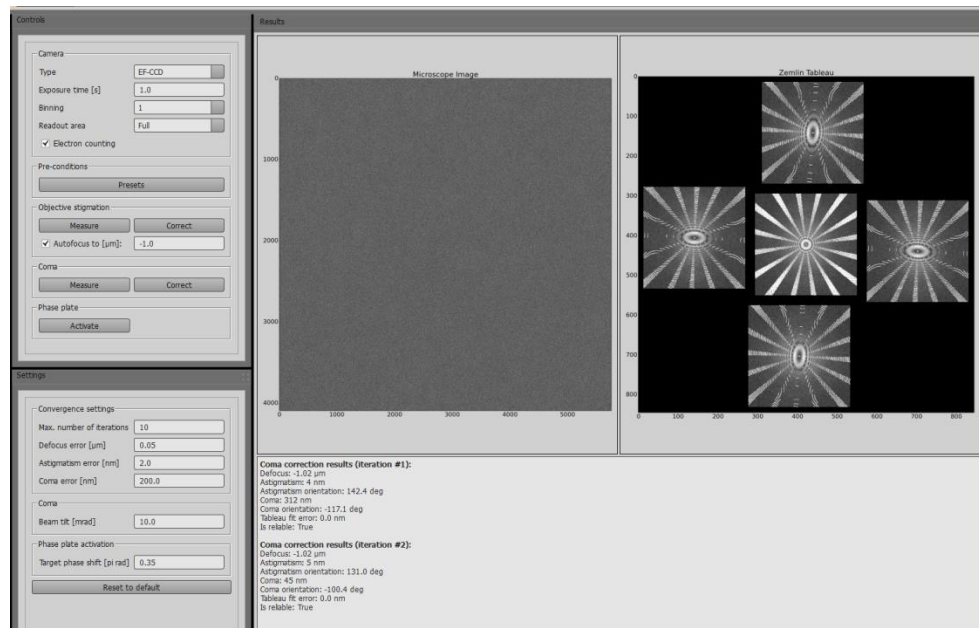
- 保持 Record 倍率视野中心在碳膜区域，抬起荧光屏，在 Sherpa 软件选择 AutoCTF。Camera 选择 EF-CCD，Exposure time (s) 设置1，Binning 选择1，Readout area 选择Full，勾选 Electron counting。



- 保证当前碳膜位置在 Eucentric height 欠焦状态，在 Objective stigmatism 下点击 Measure 按钮，观察右图是否能识别到 Thon Ring，若能正确识别且测出来的 Defocus 在  $-3.0 \mu\text{m}$  以下，则可以点击 Objective stigmatism > Correct 进行校正。若数值测不到，说明可能偏离 Eucentric height 很远，可手动点击控制面板上的Z高度微调，再进行校正。Autofocus 默认勾选，设置  $-1.0 \mu\text{m}$ 。



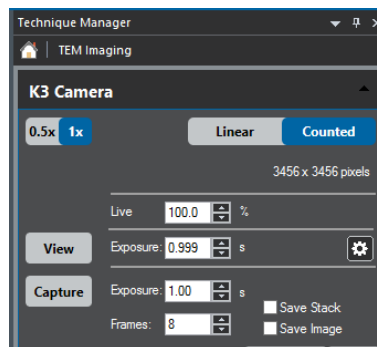
- 点击Coma 的 Measure，软件自动检测 coma值，然后点 Correct 可自动校正。



- 总共需进行三次校正：① Objective stigmatism 的 Measure 和 Correct；② Coma 的 Measure 和 Correct (< 200 nm)，③ Objective stigmatism 的 Measure 和 Correct (< 5 nm)。
- 确保校正像散或 coma 时的所有 FFT 图像上的 thon ring 为椭圆形，如果是双曲线，需要增大欠焦量或减小 beam tilt 幅度使 thon ring 先为椭圆型后再开始校正。
- Settings 内的数值请勿随意更改！

## 十、参数设置检查

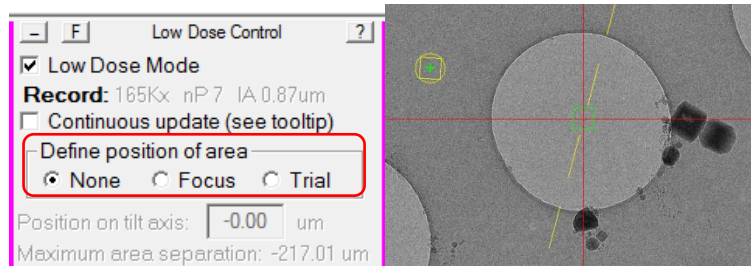
- 使用 GMS 软件确认电子剂量。找到一个真空区域，使用 Record 模式，在 GMS 软件中选择 Counted 1x，Capture 图片看右下信息栏显示的电子剂量。检查这是否为所需剂量，若不是，需要对光进行调节(不要使用 View 查看电子剂量，相机易报错)。



- 检查 Slit 位置是否居中。点击 GMS 软件中的 Center ZLP，slit 自动校正居中。



- c) 检查 Focus 和 Record 的相对位置。在 View 模式下，将红色十字视野中心移动至一个孔的中心，点击 Low dose mode control > Define position of area 的 focus，出现黄色圆圈，点击碳膜上的任意位置可改变黄色圆圈的位置，即软件进行自动 focus 时选择在该位置。确定好位置后选回 none。



- d) 检查运行脚本的参数设置。注释部份可修改，其余参数请勿随意修改！如需修改请联系管理员。修改后“save”。**注意：**Script 语句中 = 与数值之间要留有空格。

```

Script 20
<- Editor -> Up Script Down
Indent Fix Increase Reduce
Tab or ` to complete command
# find GroupStatus for current item. It is 1 for first
# acquire item in the group.
# It is recommended to have the first item in the group to be the focus position.

CloseLogOpenNew 1
resetclock

GroupSize = 20          #可根据实际每个 group 中的点的大致个数进行修改
MinDefocus = -1.5      #欠焦最小值（单位 μm）
MaxDefocus = -2.0      #欠焦最大值（单位 μm）
Step = 5

IS_distance = 0
IS_angle = 0
IS_step = 1            #默认每孔收 1 张图片，如需更改每孔多张，请联系管理员

stage_ring_offset = 1
adj_X = -0.3
adj_Y = -0.3

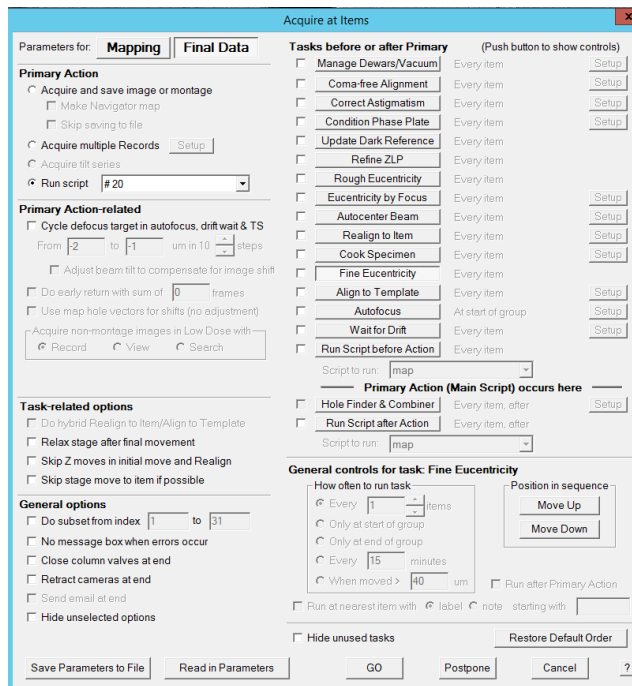
DarkUpdated = 1
Loop 10
  AreDewarsFilling
  Filling = $reportedValue1
  if $Filling == 0
    Break
  Endif

```

- e) 检查 Turbo 处于 off 状态。  
f) 检查 Record 倍率光斑居中。

## 十一、 数据收集启动

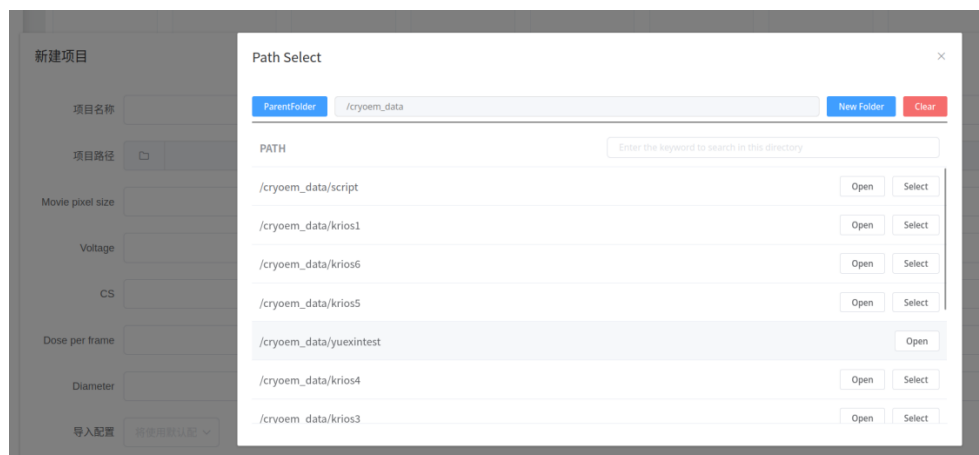
- a) Navigator > Acquire at Items > Final Data, Primary Action > Run script 选择#20, 其余选项都不勾选, 点击 “Go” 。



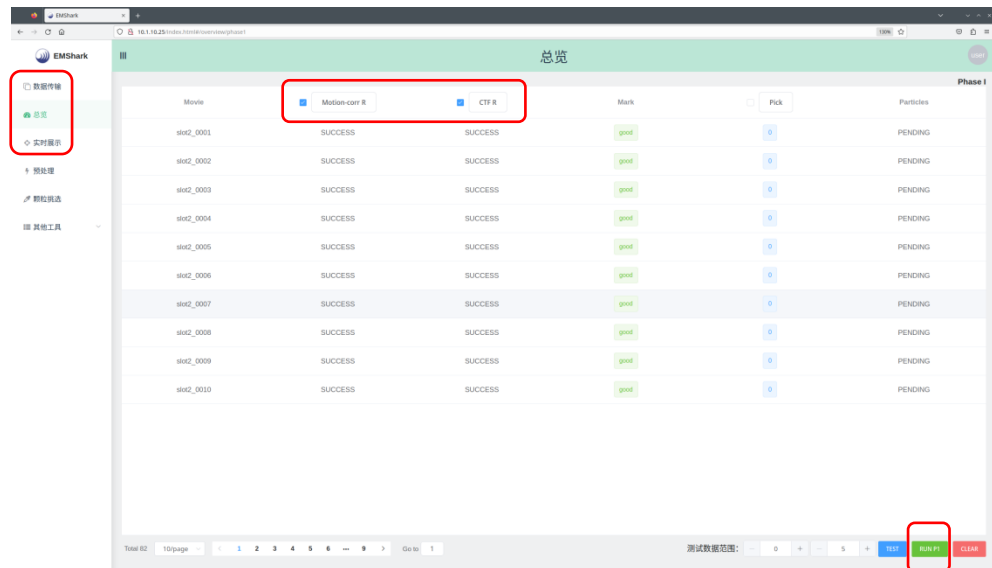
- b) 若需停止数据收集, Navigator > End Acquire, 会在收集完当前 Group 后停下。弹出 Script run to completion at XX areas 对话框时, 即表示系统已停止自动数据收集。

## 十二、 启动 EMShark 数据转移和实时观察

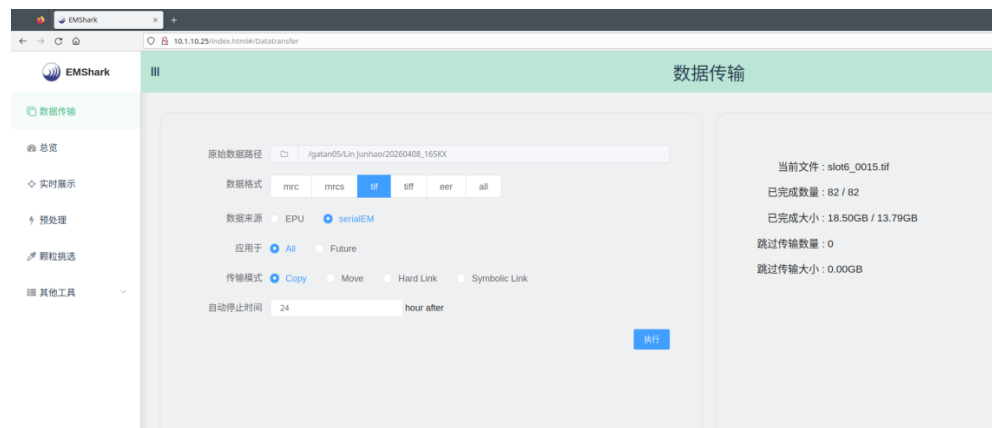
- a) 在预处理服务器电脑打开火狐浏览器, 会自动打开 EMshark 的网页界面 (地址: 10.1.10.2x, x 对应每台机的编号, 1-6)。点击右上角 “user”, 切换项目。确认是否有未停止的项目 (带蓝色边框), 若有, enter 进入仍在运行的项目, 在总览中点击 “PAUSE RUN”, 数据传输中点击 “结束”。再点击 “user”, 切换项目, 新建项目。
- b) 新建项目时项目路径选择对应的机台路径下 (cryoem\_data/krios x, x 对应每台机的编号, 1-6), 先 open 再 New Folder, 创建自己的文件夹名称。再填入其它参数。



- c) 进入总览界面，点击“Motion-corr R”和“CTF R”进入修改参数，当用 super-resolution 的 bin0.5 收集数据时，Motion-corr R 中的 ftbin 改为 2，CTF R 中的 apix 改为对应 bin1 的 pixel size。设置好后点击“Run P1”。



- d) 进入数据传输界面，原始数据路径 > Parent folder 选择创建 Navigator 时保存在 X 盘（对应 gatan0x, x 对应每台机的编号, 1-6）下的文件夹，SerialEM 收集的数据格式选择 tif，传输模式 copy，自动停止时间可根据机时调整，点击“执行”，右侧即可看到已经拍好的图片在进行传输。若未看到文件传输，请联系管理员。



- e) 进入实时展示界面，点击“Auto”，即可实时观察拍到的图片情况，以及相关 motion 后的结果，若数据明显异常，请进行相应调整，或联系管理员。
- f) 数据上传集群请参考集群用户手册。