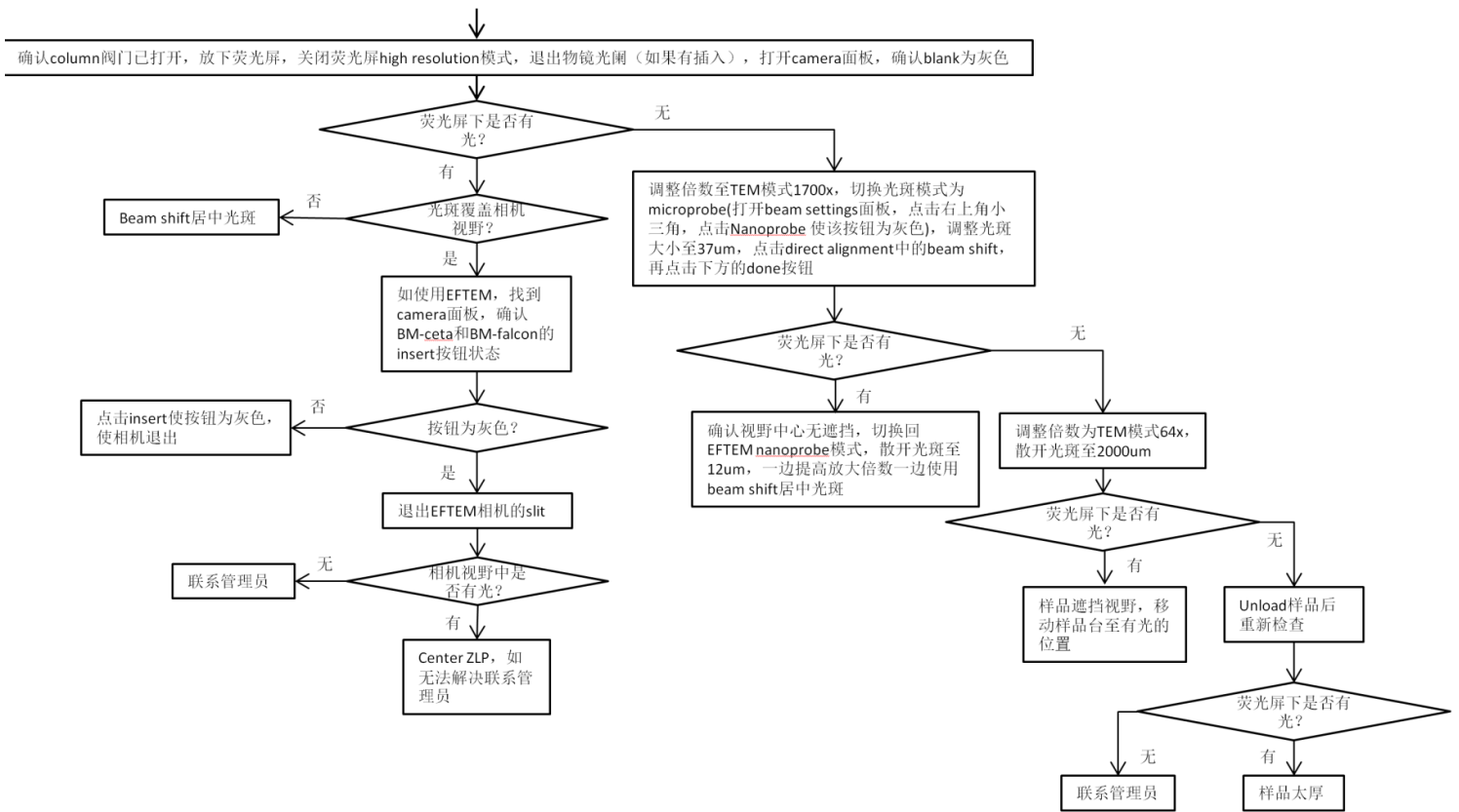


Krios 常见问题 Q&A

目录

| | |
|---|---|
| Q1: 为什么相机拍出的照片是黑的? | 2 |
| Q2: 为什么居中光斑还是会偏? | 2 |
| Q3: 为什么照片看起来很模糊? | 3 |
| Q4: 为什么照片里什么都看不到? | 3 |
| Q5: 为什么找不到 movie 文件? | 4 |
| Q6: 为什么照片上有黑边? | 4 |
| Q7: 为什么照片的 CTF 看起来很差/怪/不正常? | 4 |
| Q8: 为什么 EPU 选不了孔/square? | 4 |
| Q9: 为什么 slit 偏移很频繁? | 5 |
| Q10: 为什么照片中间有一道横线/竖线背底? (K2/K3) | 5 |
| Q11: 为什么收集的照片 defocus 差异很大? | 5 |
| Q12: Flucam 报错 screen position unknown..... | 5 |
| Q13: 为什么 record 区域不在选择的位置/总是偏? | 6 |
| Q14: 为什么 EPU 在数据收集时跳过了很多孔? | 6 |
| Q15: EPU 数据收集中断, DM 软件出现如下报错弹窗: | 6 |
| Q16: 打开 SerialEM 后报错: | 6 |
| Q17: K2 相机无法正常进出怎么办? | 6 |
| Q18: 收集 tomo 数据时 record 不在同一位置? 高角度偏/正负角度不一致? | 7 |
| Q19: Serial-EM 软件 Zby-V 操作后无法得到准确 Z 高度怎么办? | 7 |
| Q20: 为什么使用 sherpa 调整像散/coma 会失败? | 8 |
| Q21: 为什么 EPU 点 start 无法正常启动数据收集..... | 8 |
| Q22: 为什么 EPU 收集数据时卡住不动? | 8 |
| Q23: EPU 显示 calgetter.exe 相关报错..... | 8 |
| Q: 其他问题补充..... | 9 |

Q1: 为什么相机拍出的照片是黑的?



Q2: 为什么居中了光斑还是会偏?

- 使用 beam shift 居中光斑而不是轨迹球
- 如果 Record/Data acquisition 已居中, 切换 View/Eucentric height 模式不居中, 可能存在 spot size 和光阑偏移
- 如果 Record/Data acquisition 已居中, 切换 View/Eucentric height 同样居中而 GridSquare、Search/Altas 倍数下不居中, 尝试在这些倍数下 beam shift. **不要在 Atlas 模式中使用与拍照倍数不同的 C2 光阑**
- 如果 Record/Data acquisition 已居中, 但 Focus 时光斑偏移, 可能 beam tilt pivot point 存在较大偏差

| 光斑偏移情况 | 调整办法 |
|--------------------------|--|
| 不同 spot size 切换时光斑中心偏差很大 | 切换 spot size 至 9, 光斑汇聚最小, 使用 beam shift 居中光斑; 切换 spot size 至 3, 使用 gun shift 居中光斑。重复 2-3 遍直至不同 spot size 切换时光斑中心基本不偏 |

| | |
|--|--|
| <p>调整 intensity 时光斑不是同心圆缩放，存在光阑偏移，需要调整 C2 光阑和 condenser center</p> | <p>切换至 Record, R1 放下荧光屏，先点击操作面板 Eucentric focus C2 光阑居中：光斑汇聚最小，记下 C3 lens 电流值，使用 beam shift 居中光斑。稍微散开光斑至 C3 lens 电流值发生改变前，在 aperture 面板中点击 C2 光阑的 adjust 按钮，使用操作面板 multifunction X/Y 居中光斑。重复 2-3 次； Condenser center 调整：居中 C2 光阑后，点击 Direct alignment 中的 condenser center TEM，确认 C3 lens 电流值发生变化的情况下，使用操作面板 multifunction X/Y 使光斑同心放大缩小</p> |
| <p>在做 Focus 时光斑偏移，需调整 Beam tilt pivot point</p> | <p>光斑汇聚最小，先点击操作面板 Eucentric focus 点击 Direct alignment 中的 beam tilt pp x，使用操作面板 multifunction X 调整至光斑闪动幅度最小。点击 direct alignment 中的 beam tilt pp y，同样用 multifunction X 调整至光斑闪动幅度最小</p> |

Q3: 为什么照片看起来很模糊？

- 确保照片有适宜的欠焦量（通常为-1 至-3um）。在拍照前要确认做好 Eucentric height 和 Autofocus
- 确保照片有足够强的电子剂量。通常在高倍下能看清楚样品颗粒至少需要 $20e^-/A^2$ 的剂量
- 确保样品厚度适宜，溶剂中没有大量的去垢剂、其他有机物等
- 确保该模式下拍照使用的光强满足相机所需的强度范围。（ $k2 < 20e^-/px$, $k3 < 80e^-/px$, falcon4/4i $< 12e^-/px$ ）
- 如果有 Energy filter，请插入 slit 使用
- 确保 Autoloader 的 Turbo pump 拍照时处于 off 状态
- 确保成像时没有大的像散（astigmatism）和慧差（coma）。可以使用 EPU/serialEM 内置程序进行校正或使用 sherpa 软件调整

Q4: 为什么照片里什么都看不到？

- 参考 3。如果确认条件正常，可能拍照区域冰层过薄，拍照过程中快速融化导致无法成像；或品太稀不进孔

Q5: 为什么找不到 movie 文件?

- 无论设置何路径名字, EPU 的 movie 文件一定会保存在 `Dosefractions\{session name}` 文件夹下。为了使文件都存放在一起, 保存路径一定选择盘名为 Dosefractions 的盘符根目录下
- `SerialEM+falcon4` 的 movie 文件一定会保存在 `Offloaddata\TemScripting\{serial em 文件夹设置目录}`

Q6: 为什么照片上有黑边?

- 光斑偏离相机视野中心
 - beam shift 居中光斑
- 光斑过小
 - intensity 增大光斑面积
- slit 位置偏移
 - 重做 center ZLP

Q7: 为什么照片的 CTF 看起来很差/怪/不正常?

- 在 Super resolution 模式下原始照片的 pixel size 为物理像素尺寸的一半。当在 motioncor 中使用 `ftbin 2` 参数时, 原始照片的 pixel size 会被乘以 2, 得到原始照片 2 倍 pixel size 的 mrc 文件 (即回到物理像素尺寸大小)。CTF 校正过程使用的是 motioncor 输出文件 mrc 的 pixel size
 - 检查 EPU 中 Record 参数是否为 Super resolution 模式的 bin1 (Serial EM 在 Super resolution 模式 bin 0.5)
 - 检查 CTF 的 pixel size 输入是否正确
 - 调整 CTF 中 defocus 上下限值以确保计算结果准确
- Tomography 的照片由于存在倾转和剂量较低, 无法准确获得像散值, 测出的像散值偏大是正常的

Q8: 为什么 EPU 选不了孔/square?

- 剂量不合适 (过强或过弱都有可能), 图像衬度不够
 - 先确保 Square 模式下拍到的图片 hole 边缘清晰: 剂量足够、光强适宜
- Square 太靠近边缘
 - 可适当增加欠焦量、插入 slit 等方式增强反差
- 倾角过大, 不适合用 EPU 收数据
 - 确保模板正确设置, filter 参数正确, 如果孔厚度过大, 可以尝试使用 allow dark hole
 - 进行样品台倾转时, 确保角度小于 30 度。如果需要大于 30 度的倾转, 请使用 SerialEM 进行数据收集

Q9: 为什么 slit 偏移很频繁?

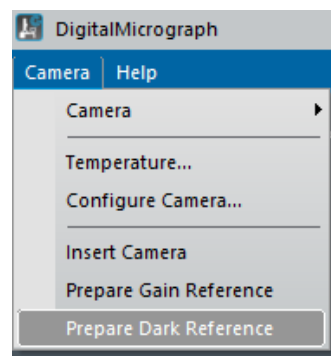
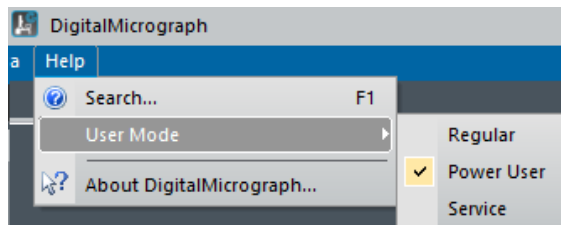
- 在开始数据收集时没调好, slit 本身已偏移至边缘
- 相机 slit 电压不稳定

- 数据收集前确认 slit 已居中
- 在 EPU 中检查 Auto zero loss 设置, 打开该功能可每隔一段时间自动调节 slit 位置, 调不准时需手动至 DM 软件中点击 center ZLP

Q10: 为什么照片中间有一道横线/竖线背底? (K2/K3)

- 使用了 **Non-normalized** 的数据格式, 但未添加背底
- 若是 **Gain-normalized** 数据, 可能 dark reference 不好
- 收数据时使用的 Dose rate 与生成 gain reference 时使用的 Dose rate 差距过大导致背底不均匀

- 在进行 Motioncor 时需要添加 gain reference 文件
- 重新获取 dark reference: DM 软件—工具栏 help—user mode—power user—工具栏 camera—Prepare Dark reference
- 调整 Dose rate 或联系管理员确认背底



Q11: 为什么收集的照片 defocus 差异很大?

- 载网不平整
- EPU 中 Autofocus 距离设置的较大

- 换样或换区域
- 将 Autofocus 的距离间距改小

Q12: Flucam 报错 screen position unknown

- 按 R1 时, screen 不能正常抬起或放下, flucam 左上方显示 screen position unknown, EPU 拍照也受影响卡住

- 点击 flucam 上方菜单栏的 insert screen, 过一会就会显示 screen 状态是 inserted 还是 retracted, 即可恢复正常使用

Q13: 为什么 record 区域不在选择的位置/总是偏?

- 检查切换不同倍率时是否始终保持在同一个位置中心，若存在位置偏移，说明高低倍对中没做好，需进行偏移校准
- EPU 重新进行 calibrate image shifts
- SerialEM 重新做 search, view 和 record 的对中
- 若偏移总往一个固定方向，可往相反方向增加一定偏移量

Q14: 为什么 EPU 在数据收集时跳过了很多孔?

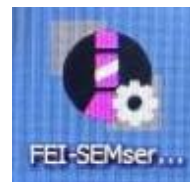
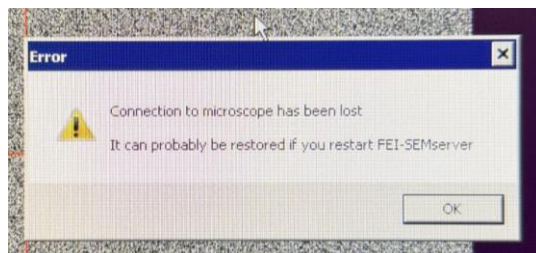
- 样品太厚导致衬度差
- Hole/Eccentric height 参数设置有问题
- 高低倍对中 calibrate image shifts 没做好
- 选择厚薄合适、非边缘、非破损区域的 square 和 hole
- 修改 Hole/Eccentric height 参数
- 重新进行 calibrate image shifts

Q15: EPU 数据收集中断，DM 软件出现如下报错弹窗:



- 点击 Retry 一般可恢复正常

Q16: 打开 SerialEM 后报错:



- 先关闭 Serial EM 软件，在电镜电脑屏幕打开 sever 后，再重新打开软件

Q17: K2 相机无法正常进出怎么办?

- 收数据过程中加液氮，电镜加完液氮后，K2 相机无法正常插入，导致 DM 软件卡死，SerialEM 卡死
- 相机本身出现 bug
- 重启 DM 和 SerialEM 软件
- 重启 K2 相机（联系管理员或学生助管进行操作）

Q18: 收集 tomo 数据时 record 不在同一位置? 高角度偏/正负角度不一致?

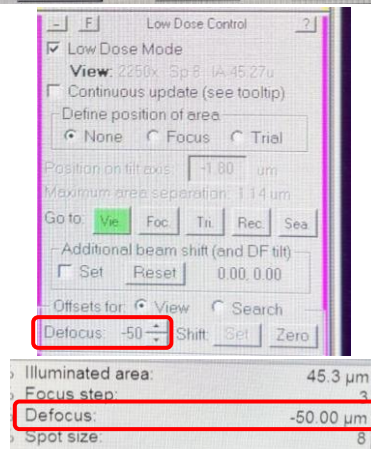
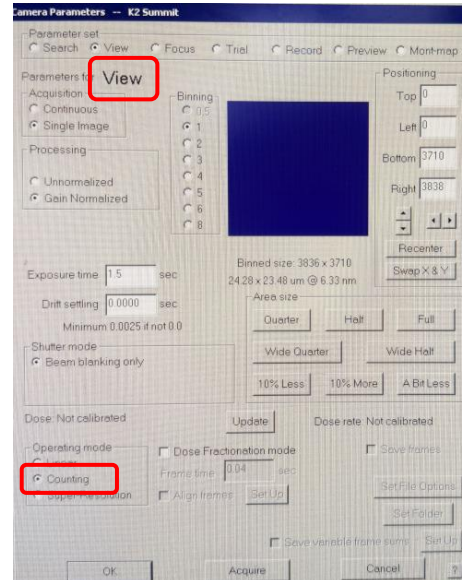
- tracking 失败: tracking 设置剂量过低, tracking 倍数过高, tracking 位置不在轴上等...
- 样品太厚高角度衬度差, 或高角度被挡, 样品太厚跟碳膜高度不一致, 错误 focus 导致图像异常等...
- SerialEM 校准问题

- 可能性很多, 建议直接联系工程师

Q19: Serial-EM 软件 Zby-V 操作后无法得到准确 Z 高度怎么办?

- Z 高度相差太大; 样品不平整
- 电子剂量过低图像反差不足或 view 模式下未选择 counting
- view 模式设置的 defocus 与电镜 UI 界面显示的 defocus 不同

- 手动调整 Z 高度
- 增加光强、曝光时间、defocus; setup 中 view 模式选择 counting
- 将 view 模式的 defocus 与电镜的 defocus 调至相同



Q20: 为什么使用 sherpa 调整像散/coma 会失败?

- 在 Data acquisition 确认中心在碳膜区域，确认 Dose rate 足够，Image shift 为 0，Eucentric height 已调整，成像为欠焦状态
- 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
- 如果倍数较低时，应当适当增大软件允许的 error 值，避免 error 值过于苛刻导致校正失败

Q21: 为什么 EPU 点 start 无法正常启动数据收集

- 检查是否正在充装液氮
- 打开 DM 软件，确保 view 是关闭状态

Q22: 为什么 EPU 收集数据时卡住不动?

- 检查电镜是否正在充装液氮，充液氮时软件会暂停操作
- 检查 DM 软件是否有报错，电镜 UI 上的读数是否正常（检查真空值，autoloader 和 column 的温度值正常）。
- 如果机器异常，尝试联系管理员，请关闭 column 阀门

Q23: EPU 显示 calgetter.exe 相关报错

- 打开任务管理器，打开 process 页面，找到 calgetter.exe，右键 open file location，结束 calgetter.exe 进程，然后双击 calgetter.exe 重新启动

Q: 其他问题补充