

Krios 5 号机 STEM Tomography 操作指南

这是使用 Krios 5 号机的 STEM Tomography 电子断层扫描软件收集系列倾转数据的操作指导。接下来的步骤是在检查完电镜状态和筛查样品后进行。

1. STEM 简介

STEM 是和 TEM 完全不同的模式，电子束被聚焦成一个点打在样品上，然后通过逐点扫描，逐线扫描的方式对样品进行扫描。被散射的电子通过电子探测器（HAADF 高角环形暗场探头）进行收集，然后形成像素化的图像。

2. 准备工作

1) 不同模式设置

STEM tomography > Preparation > Mode dependent settings 里面有三种模式：nanoprobe (用于拍摄高倍图像), microprobe (用于中等倍数, 在这个电镜上不推荐使用), LM (低倍, 用于拍摄 Atlas 地图)。这些模式之间相对独立, 并保存了 spot size, contrast, brightness, camera length, direct alignments, focus, stigmators 等值。理论上每次你切换模式时, 会回到上次你调节的最佳状态, 但是实际上还是会有微小偏差, 特别是聚焦和像散还需要重新调节。**推荐在收集数据时只采用一种模式, 比如 nanoprobe 模式, 后面会给出具体做法。**

- a. 设定正确的 Eucentric height, 然后聚焦图像。(详见后面 Auto Functions)
- b. 对比度和亮度 (Contrast and Brightness) 非常重要, 需要对每个样品进行相应的调节。切换到 Atlas 放大倍数 (详见下节), 点击 UI > STEM imaging > Search, TIA 软件中会有实时图像。点击 UI > STEM Detector > Auto C/B, 检查样品的亮度对比度是否符合你的要求。如果是的, 切换到 TEM tomography > Preparation > Mode dependent setting > presets, 选择 LM 模式, 然后点击 Get 保存亮度对比度设置。
- c. 在 nanoprobe 模式下用 Exposure 放大倍数做相同的设置。
- d. 下表中仅列出推荐值。

Presets	Detector	Contrast,%	Brightness,%	Spot size	Camera length	Screen current
LM	HAADF	25	44	3	7.9 m	0.8 nA
NanoProbe	HAADF	48	44	8	275 mm	0.015 nA

2) 确定不同 beam presets (Acquisition and Optics setting)

设置完不同的模式之后，切换到 Preparation > Acquisition and Optics Settings, 根据你的喜好设置不同的 beam presets。在 STEM tomography 中, field of view (FOV) 通常被用来替代放大倍数, dwell time 是指电子束在样品上每个像素点的停留时间。像素尺寸 pixel size 可以通过 FOV 除以 resolution (比如 2048) 进行计算。

如果你不确定如何设置参数，可以参考下面的表格然后根据自己的情况进行调整。你可以选择将这些设置保存下来，点击 export，保存到 E:\TEMtomoPresets 文件夹，以后可以点击 import 读取这些设置。

确保在收取数据之前计算 exposure 状态下的电子剂量。

$$Dose (e/\text{\AA}^2) = \frac{\text{Screen current (nA)} \times 10^{-9} \times \text{Dwell time } (\mu\text{s}) \times 10^{-6} \times 6.2 \times 10^{18} (e/C)}{\text{Pixel area } (\text{\AA}^2)}$$

Summary of values for Krios 5 Tomography beam presets for HAADF detector with camera length of 275 mm and C2 aperture of 70 μm .

Preset	Mode	Resolution	Dwell time, μs	Field of View, μm	Spot size	Pixel size, nm
Atlas	LM	2K*2K	0.5	300	3	146
Overview/ Positioning	LM	2K*2K	0.5	60	3	29.2
Search/ Template	NP	2K*2K	1	20	8	9.7
Eucentric Height	NP	1K*1K	1	10	8	9.76
Tracking	NP	1K*1K	1	2	8	1.95
Focus	NP	1K*1K	1	2	8	1.95
Drift	NP	1K*1K	1	2	8	1.95
Exposure	NP	2K*2K	2	2	8	0.97

3) 图像偏移校准

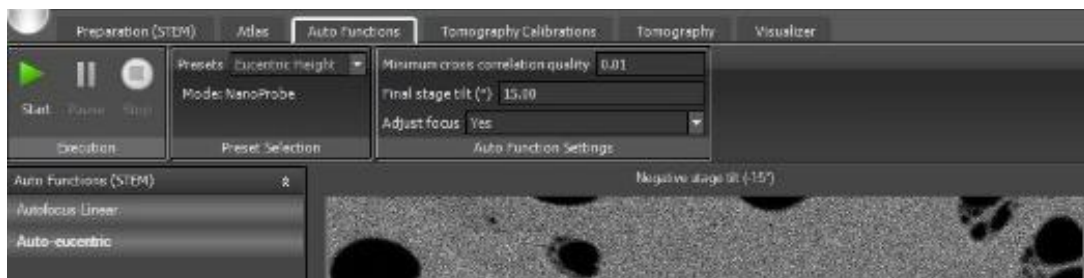
在每次使用 STEM tomography 软件及光路合轴之后都需要进行图像漂移校准。

- a. 在低倍下找到一个微米级的参照物：比如冰晶或者其他污染物等。
- b. 确定 eucentric height 后点击 eucentric focus，重新将参照物居中。
- c. 切换到 exposure 的放大倍数后，确保此参照物还能居中。通常你可以从低倍到高倍依次拍预览图，然后将参照物移到中间。
- d. 在 preparation 选项中点击 calibrate image shifts，然后点击 start calibration 开始校正。
- e. 首先软件会在 exposure 倍数下拍摄一张图，中心会有一个十字标记。如果此标记在你的参照物上，点击 proceed。如果你想移动位置，双击图片中的位置，然后点击 re-acquire，重复此操作直到你找到想要的位置，然后点击 proceed。
- f. 此时软件会自动将放大倍数减小为 beam preset 中下一个最高倍数，然后拍摄一张图片。在第二张图片中，双击参照物后点击‘proceed’。重复此操作直到软件显示 ‘image shift calibration finished successfully’。

3. 自动功能 Auto Functions

在设置各种参数之前首先要确定样品的 eucentric height。在加载完样品之后，建议在 TEM 模式下先调节到 eucentric height，然后切换到 STEM mode，聚焦样品之后在 STEM tomography 软件里进行 Auto-eucentric 和 Auto-focus。

- 1) Auto-eucentric: 选择 eucentric height 的 presets, **Adjust focus 选项选择 Yes**，点击 Start。以下几点需要注意：确保开始之前图像是在聚焦的状态，否则 Auto-eucentric 很可能会失败；如果 eucentric height 偏离较远 (比如超过 15 μm 偏差)，这个过程也可能失败。你需要手动调节 eucentric height。做完 Auto-eucentric 后，focus 可能会有偏差，做下一步。



- 2) Autofocus Linear: 选择 Focus 作为 beam preset 后点击 start。结束后软件会显示 finished successfully。有需要的话可以调节 condenser stigmator。

4. 拍摄低倍地图

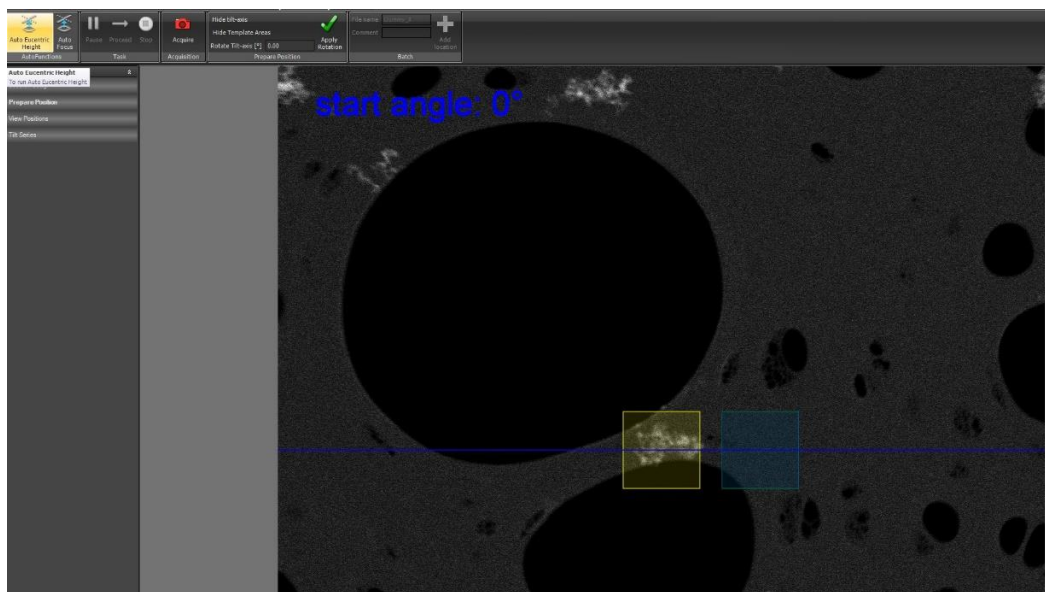
- 1) 到 Atlas 选项卡里选择 Session Setup，新建一个 New Session，另存为 MRC 格式后存到指定文件夹 Z:\sTEMtomoAtlas 中。
- 2) 切换到 Atlas Acquisition 中，选择地图开始的位置 (Start Stg. Pos.) 为靠近中心 (Close to center) 或者靠近当前位置 (Close to current)。你可以选择拍摄地图的大

小 (number of tiles), 比如你可以输入 2, 软件会拍摄一个 2*2 的地图。如果不填的话, 软件会自动拍摄一个全地图, 比如在 FOV 为 300 μm 下会拍摄 6*6 的地图。

- 3) 拍摄地图后, 你可以在图片上通过鼠标右击 move stage here 移动到感兴趣的区域。

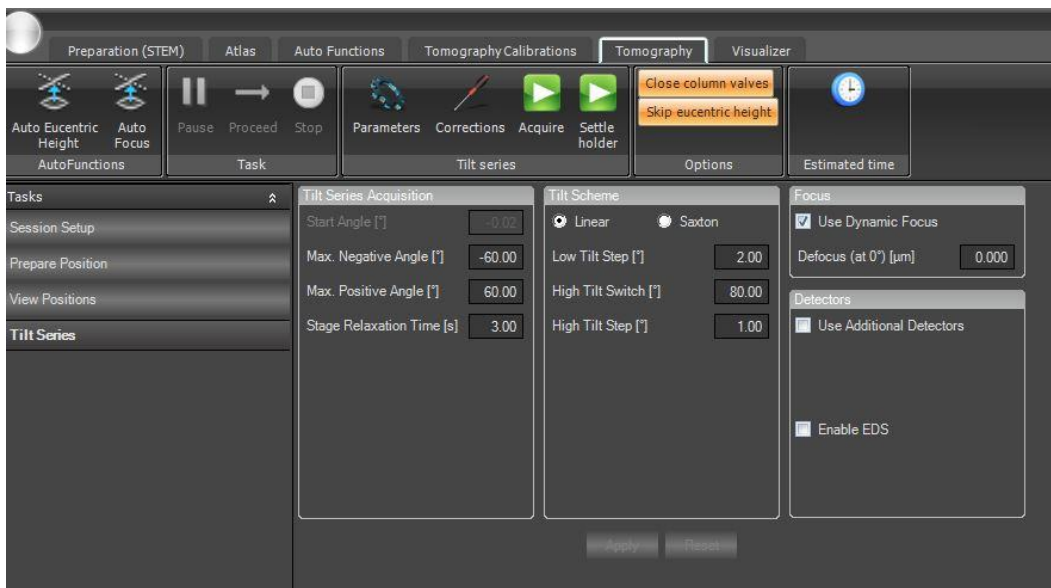
5. 数据采集

- 1) 切换到 Tomography 选项, 点击新建样品 New specimen, 输入名称 Name 后选择样品类型: Slab-like 是薄片样品, rod-like 是针状样品且针状样品的轴平行于 Alpha 旋转轴。
- 2) **Low dose 低剂量模式:** 如果你的样品对电子束敏感, 选择 low dose 模式, 应用此设定之后, 左边的任务栏中会出现 Prepare Position 选项卡, 用于确定 track position 和 autofocus position。如果不选择 low dose 模式的话 track position 和 autofocus position 和 exposure position 位置一致。
- 3) **Batch:** 如果只有一个倾转系列 tilt series, 不要选择 Batch。如果有很多倾转系列, 选择 Batch。
- 4) 对于低剂量模式和单个倾转系列:
 - a. 在应用了此模式之后, 左边的任务栏会有三个任务: Session setup, Prepare Position and Tilt series。
 - b. 选择 Prepare Position, 点击 Auto Eucentric Height, 然后点击 acquire 拍摄一张图片, 此时会出现三个不同颜色的方形区域。黄色代表 exposure area。绿色代表 tracking area, 蓝色代表 Autofocus area。可以通过鼠标拖拽这些方形沿着倾转轴 (蓝色线) 调整位置。建议 tracking、focus 和 exposure 的参数设置为一样, 且 tracking 位置可以和 focus 的位置一致。确保这些位置不会在高倾转角时被其他东西遮挡。调整完位置之后, 可以点击 Autofocus 进行聚焦。



- c. 在 Tilt Series 任务下, 选择 Parameters, 设定相应的参数 (如下图所示)

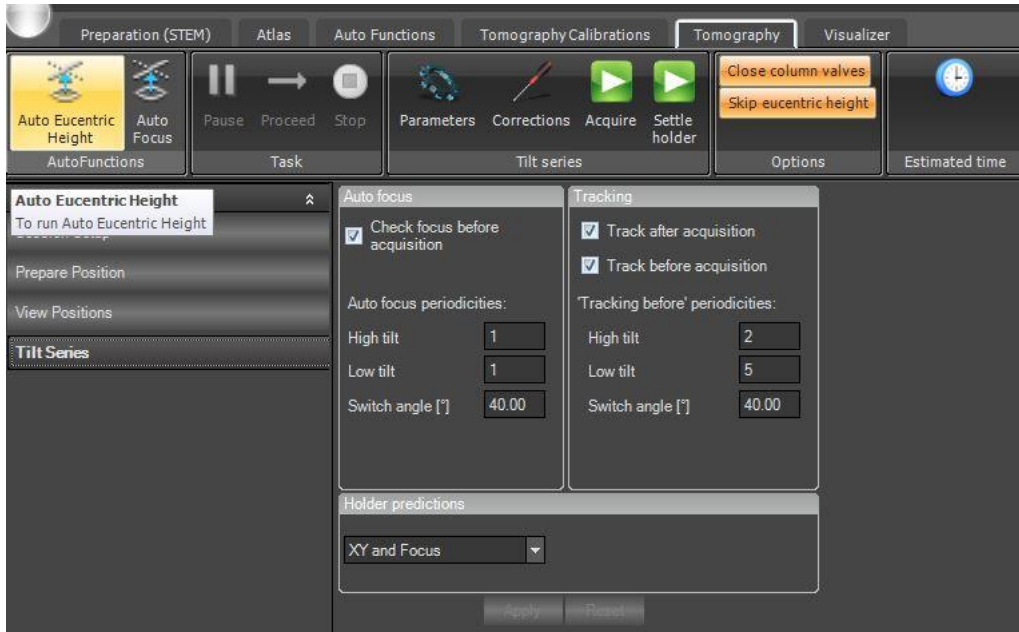
- i. Tilt Series Acquisition: 设定开始的角度 start angle (通常为 0°), 最大的正负倾转角度 maximum negative and positive tilt angle (小于等于 70°), 样品台倾转后等待时间 stage relaxation time (至少 3s).
- ii. Tilt Scheme 倾转方式: linear 线性是最常用的模式, 你可以设定均一的倾转步长或者在不同的角度下设定两种不同大小的倾转步长。例如在低角度使用大的倾转步长 (比如每 2° 照一张图片), 在高角度使用小的倾转步长 (比如每 1° 照一张图片)。High tilt switch 指的是高低倾转角的转变点 (例如 40°)。
- iii. Dynamic focus 动态聚焦: 当你使用薄片状样品时, 倾转时由于高度变化, 不同部位的聚焦高度将会发生变化。在 STEM 模式下, 你可以通过动态聚焦克服这个问题。点击 Use Dynamic Focus 后软件会根据倾转角调整不同地方的聚焦高度。【如果你想检查动态聚焦的效果, 去到 Calibration 选项卡中选中 dynamic focus, 将样品倾转到一个角度, 比如 60° , 拍摄一张没有动态聚焦的图片, 确保图片的中心为聚焦状态。然后拍摄一张动态聚焦的图片, 观察是否各部分均在聚焦状态。可以通过调节系数调整动态聚焦的效果, 主要用于样品本身不平或者在 0° 时不水平。数据采集之后记得切换回 1。】



- d. 在 Tilt Series 任务中, 选择 Corrections, 设定相应参数 (如下图所示)。
 - i. Autofocus 选项卡中: 如果想在采集数据时进行自动调焦, 则选择 Check focus before acquisition。if you want to do auto focus during tilt series. Periodicities 表示 autofocus 的频率, 比如如果在 low tilt step 输入 5 is chosen, 则在 5 次曝光之后进行一次 autofocus。
 - ii. Tracking 追踪功能: Track after acquisition 意味着在拍摄一张图片之后, 软件会对比此图片和前一张图片, 然后确定偏移量。选中此选项之后每照一张图片都会对比。Track before acquisition 意味着在倾转到下

一个角度之后，样品台会移动到 tracking position，拍摄一张照片和前一张进行对比确定偏移量，这个需要额外的时间，推荐在高角度时可以进行更频繁的进行校准。

- iii. Holder predictions 样品: 样品杆倾转时 XY 方向的偏移以及 focus 的变化已经通过工程师进行校准，若是要使用此结果对你的样品在倾转过程中进行预测，则选中 XY，focus 或同时选中两者。



- e. Settle holder: 选择这个样品杆会空转进行测试，可以在第一次倾转样品之前进行测试。
- f. 点击 **Close column valves**, 软件会在结束之后关闭阀门。
- g. 开始之前调整 condenser stigmator, 如果此状态不好会影响到图片的质量，特别是未聚焦的地方图像会变形。
- h. 在确定所有的参数之后，点击 **Acquire** 进行数据采集。开始之后软件可能会要求人工干预，根据右侧 Status 窗口显示的信息进行操作。

5) 对于低剂量和批量系列倾转:

- a. 在应用此设定之后，左边的任务栏会有四个任务出现：Session setup, Prepare Position, View Positions 和 Tilt series.
- b. 选择 Prepare Position, 使用 Atlas 地图移动到第一个位置，进行 Auto Eucentric Height 后 acquire 拍摄一张图片。调整 exposure area, tracking area 和 Autofocus area 等各个区域的位置后点击 Add Location, 这样第一个位置就被记录在软件中，重复此步骤直到所有的区域都被添加。
- c. 进入 View Positions 中然后检查所有的区域 (选做)
- d. 进入 Tilt Series, 设置所有的参数，此操作和单个倾转系列类似。如果你已经对所有添加的位置做了 auto eucentric height, 在这里可以点击 Skip Eucentric Height.
- e. 检查 condenser stigmator, 点击 **Close column valves**, 然后点击 Acquire, 软件

会自动进入数据采集。