
SerialEM Tomography 数据收集流程操作指南

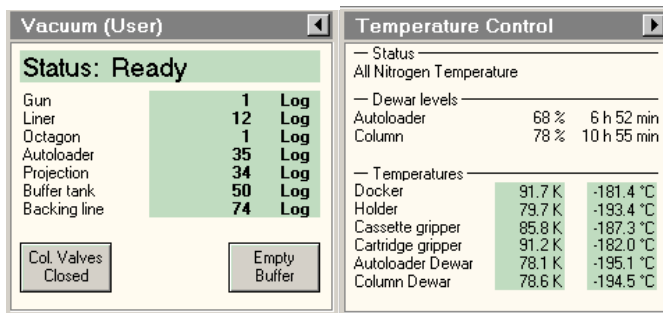
- 请勿更改 FEG 参数
- 请勿进行任何 gun 相关的合轴
- 请勿更改 direct alignment 以外的合轴
- 请勿安装任何软件

一、 上样

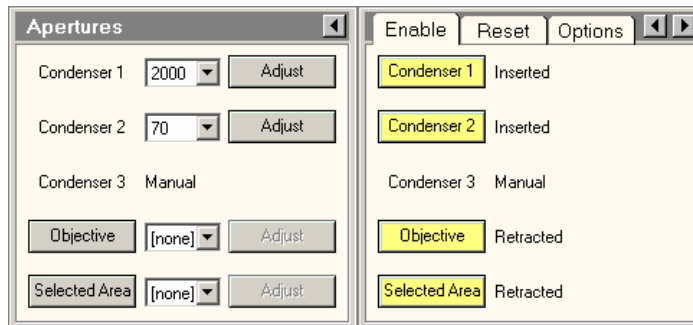
由管理员进行样品卡环和上样。

二、 检查电镜状态及启动软件

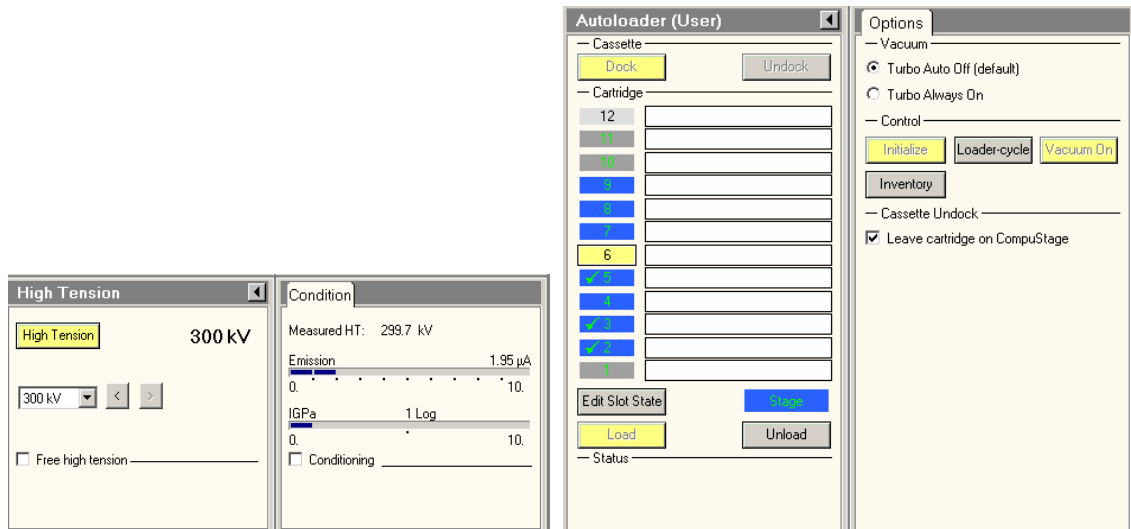
- 启动软件（由管理员进行）。UI > FluCam > DM > TIA > SerialEM（勾选 SerialEM 里的 **Low Dose Mode**，打开一个近期带有 tomo 标识的 settings 文件）
- 打开电镜 UI 界面 setup 页面检查真空状态和温度状态是否均为绿色。**注意 Vacuum 页面的 Gun 和 Octagon 的数值必须是 1**，其余数值允许小范围的变动，若数值异常，请立即联系管理员。注意 temperature control 页面的所有温度均为绿色，温度均为 -150 以下可正常操作。若数值异常，请立即联系管理员。



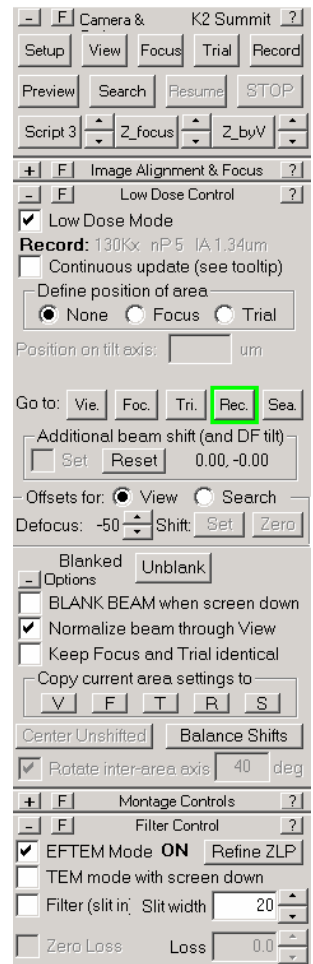
- 检查下述事项：
 - 不使用 UI 里的 Low Dose 模式检查样品，请使其处于关闭状态。
 - Condenser 1、Condenser 2 和 Condenser 3 光阑处于插入状态**（如下图）。其中 C 1 光阑应为 2000 μm ，C 2 光阑应为 50 / 70 / 100 μm 。在收集数据时，可选择插入 70 / 100 μm 物镜光阑。



- FEG control 处有正常的 extraction 电压（约 3800V，不同机器稍有差别）和 emission（约 200-450uA，不同机器有差别）读数且读数稳定。High Tension 处 High Tension 按钮为黄色，面板显示 300kV 且数值稳定。
- 在 Autoloader > options，确认 **Turbo Auto Off** 处于选中状态。



- v. **检查 UI 状态栏是否有报错，若有，请联系管理员。**
- vi. 打开 serialEM, 加载管理员推荐的默认设置文件, 勾选 Low Dose Control 面板中的 low dose mode。使用 Energy filter 的相机需要在 filter control 面板确认勾选 EFTEM mode, 并取消勾选 TEM mode with screen down。放下电镜荧光屏, 依次选择 SerialEM 中的“Go to:”**检查 Vie., 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 一般为 -50 μm 外, 其它状态应为正焦附近)。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 SA 模式 (一般 2250 ~ 8700X), 光斑一般使用 Micro probe 模式, 保证能满足寻找样品的需要下使用尽量低的剂量 (一般 $< 0.1e/\text{\AA}^2$), 用于拍摄 Anchor map。
 - Record 模式是数据收集模式, 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 模式用于倾转角度后的位置校正, 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 模式为低倍 LM 模式 (一般为 82~175X), 用于检查样品 square 冰层厚度和拍摄载网大地图。
 - 各状态常用设置如下:



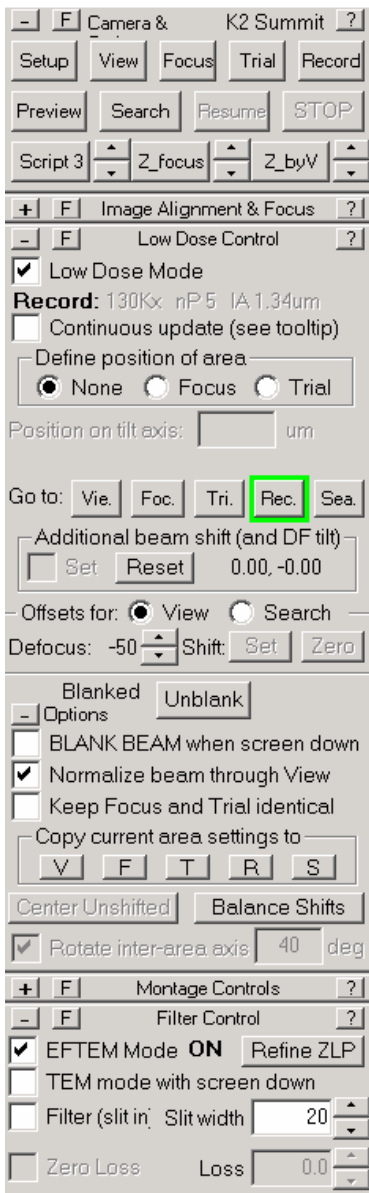
Preset	Search (LM)	View	Focus	Tril	Record	Preview
Mag	135 x	2250 x	As Record	As Record	105 kx	As Record
Bin	4	2	2	2	0.5	2
Readout	Full	Full	Full	Full	Full	Full
Exp. time	1 s	1 s	1 s	1 s		0.1
NP / MP	MP	MP	NP	NP	NP	As Record
Mode	Linear	Linear	Counting	Counting	Super-Resoluti on	As Record
Defocus	0	-50 μ m				
Spot Size	7	7	As Record	As Record		As Record
Ill. area	1 mm	50 μ m	As Record	As Record		As Record

使用时根据需要将 record 模式设置到合适的 pixelsize 和 dose rate。常用倍数一般约为 33000~130k。注意不同机器的显示放大倍数和 pixelsize 的对应关系并不一致，请视具体机器的放大倍数校准表而定。

三、 检查样品

- 当样品放入 autoloader 后，待所有的温度低于-170°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 上的摇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 encentric 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、 设置调整和参数设定



a) 在镜筒中没有样品的情况下，切换 serialEM 至 record 模式。放下荧光屏，调整放大倍数至所需的大小，确定要使用的 C2 光阑并切换（一般为 50 或 70）。调整 spot size 为 4-7，调整光斑至比相机视野稍大。

b) 抬起荧光屏，在 SerialEM 中的 low dose control 面板勾选 unblank，根据使用的相机使用 DM 软件或 falcon reference manager 测试光强，并调整至合适范围后，勾选 low dose control 面板中的 Continuous update，并在 3 秒之后取消勾选，使 record 模式更新为所需设置。注意调整 Spot size 和光阑需要放下荧光屏，禁止在使用相机测光强时直接操作（若有疑问或不熟悉操作，请联系管理员）。

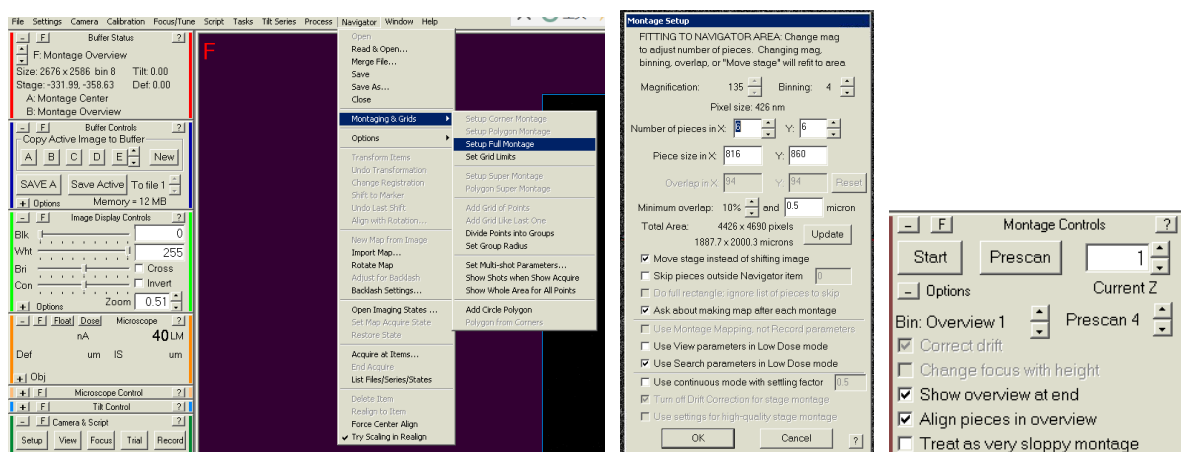
c) 打开 camera & script 面板中的 setup，找到 record 页面，根据光强和 pixel size 计算曝光时间和帧数，设置文件名，文件格式和保存路径等。同时修改 preview 曝光时间，一般低于 $1e^{-}/A^2$ 。

d) 关闭 column valve。加载样品。加载完成后打开 column valve，找到载网上的显著标记物，切换 serialEM 至 view 模式，将标记物挪至相机中心，切换至 record 模式，放下荧光屏，适当散开光斑，找到标记物并用摇杆挪至相机中心。点击 image alignment & focus 面板中的 set threshold shift 按钮，设置范围为 0.5 和 5um。抬起荧光屏，在 view 模式下拍照并找到标记物，使用右键拖动标记物至十字中心处，点击 low dose control 面板中的 offset for: view，点击下方的 shift: Set 按钮。

e) 在 view 模式下寻找另一个标记物并移动至十字中心，再次拍照确认标记物确实到达中心后，点击 camera & script 面板中的 preview，确认 view 和拍照倍数已严格对中。

五、拍大地图

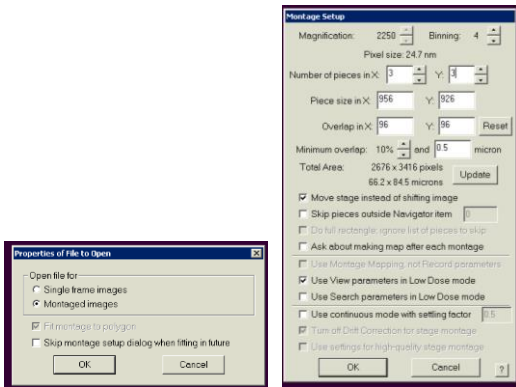
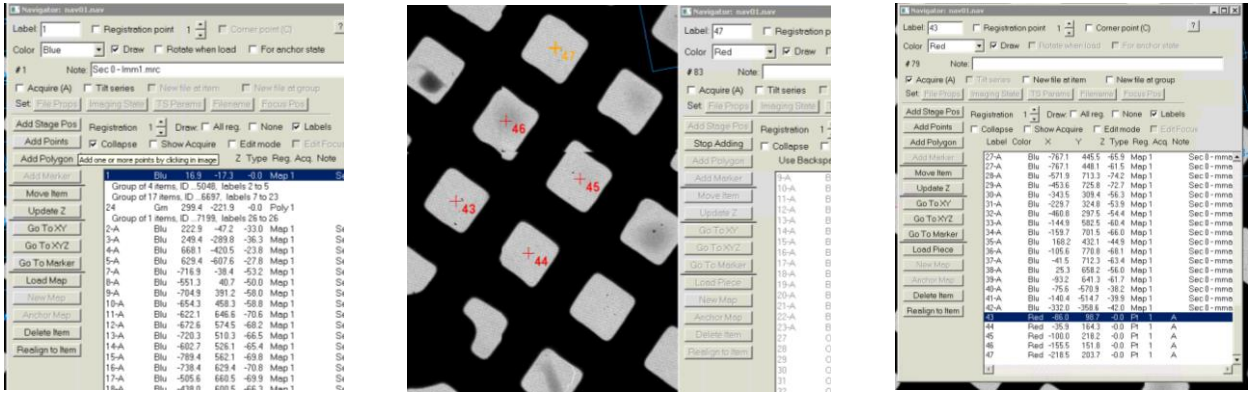
- 在 X 盘 (K2/K3) 或 Z 盘 (falcon3/4) 新建一个文件夹 (如 20200308)。
- 在 SerialEM 中, Navigator > open, 打开一个新的 navigator 界面。
- Navigator > Montaging & Grids > Setup Full Montage, 选择 use search parameters, 确认使用的倍数和 binning 正确, 选择“ok”, 为大地图起一个名字 (如 Imm.mrc) 保存在 a) 中所建文件夹内。待 Montage Controls 的“Start”可用后点击开始拍地图。



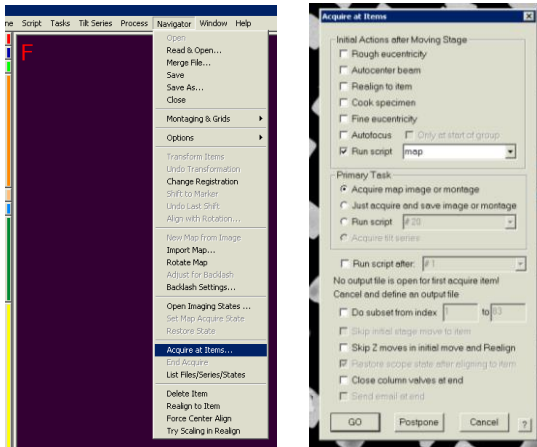
- 将 navigator 文件命名 (如 nav01.nav) 保存在 a) 中所建文件夹内。
- 在地图中找到明显的标记物, 在标记物处点击左键, 点击 navigator 窗口中的 add marker, 此时在标记物处增加一个 point, 再点击 go to XYZ 后, 在 search 模式下, 放下荧光屏, 找到标记物的实际位置, 使用 control panel 的摇杆将其挪至荧光屏中心 (红圈为 TEM 模式中心, 绿圈为 EFTEM 模式中心), 使用 magnification 旋钮逐步放大至 view 模式的倍数, 放大同时移动摇杆确保标记物仍然在相机视野内, 抬起荧光屏, 点击 SerialEM 中的 camera 面板的 view 拍照, 在所得照片上点击标记物位置, 此时标记物上有一个绿色十字, 在 navigator 窗口中选中之前添加的 point, 打开 Navigator 菜单, 选择 shift to marker, 点击 yes。(若有疑惑建议由管理员完成)。

六、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, 确认勾选 use search mode 选项而不是 use view mode 选项, 确认倍数和 binning 合适, 点击“ok”对中地图进行命名 (如 mmm001.mrc)。点击 navigator 菜单, 点击 save 保存 nav 文件。

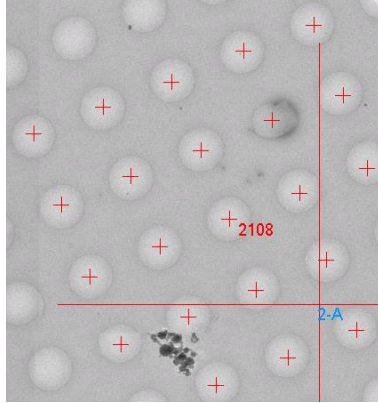


c) Navigator > Acquire at Items, Initial Actions after Moving Stage 选择 Run script“map”, Primary Task 选择 “Acquire map image or montage”, 点击“Go”开始拍中地图。



七、 添加拍照位置

a) 拍照完成后, 双击一个中地图, 点击 navigator 窗口的 Add Points 开始加点。添加完毕后, 点击 Stop Adding。打开下一个中地图, 再次点击 Add Points 开始添加下一组点。添加位置时需要注意是高角度下位置是否会被 grid bar 遮挡。可以在荧光屏下观察, 使用 control panel 调整角度。



八、 拍摄高倍地图（非必须项，只有对位置准确性要求很高的情况下需要）

- 打开 File 菜单，open new，OK，保存为 anchormap.mrc。
- 选择一个拍照点，点击 go to XYZ，点击 view 拍照，鼠标右键将目标拖至十字中心，点击 preview，鼠标右键将目标样品拖至十字中心，点击 navigator 窗口中的 new map。点击 view 拍照，再次点击 new map。勾选 navigator 窗口中的 for anchor state。
- 选择下一个拍照点，点击 go to XYZ，点击 view 拍照，鼠标右键将目标拖至十字中心，点击 preview，鼠标右键将目标样品拖至十字中心，点击 navigator 窗口中的 new map。点击 anchor map。对每一个点重复该步骤。

九、 Tomography 参数设置

- 一般情况使用 SerialEM 自带的 tilt series 功能收集数据。若有特殊需求需要使用特定脚本进行数据收集，请联系管理员咨询对应脚本的使用方法和设置方法。
- 在 navigator 窗口选中需要进行数据收集的 point（如已拍摄高倍地图，则选中高倍地图），勾选 navigator 窗口上的 Tilt series，此时会弹开 tilt series 设置界面(如下图)。用户可参照该图参数填写，并修改 tilt 角度范围，tilt 步长和 defocus target 为自己所需的参数。

Tilt Series Setup X

Tilt Angle Specifications

Tilt to End at Base increment

Increment proportional to cosine of angle Total # of tilts: 35

Run series in two directions from Return with Walk Up

Magnification for anchor: um Use View for anchor

Use dose-symmetric scheme

Delay time after tilting by basic increment: seconds

Change some settings as a function of angle

Size, Image Shift, and Recentering Specifications

Magnification: Binning: Pixel size: 0.207 nm

At start and when needed, track at magnification:

Limit image shift to um at start

Recenter beam from Low Dose tracking images

Auto-center beam every minutes

Auto-center beam in second half of series at degrees

Refine the zero-loss peak every minutes

Beam Intensity or Exposure Control

Change Record exposure time instead of beam intensity

Keep exposure time constant

Vary exposure to be 2 x higher at 60 deg (1/cos to 1/1 power)

Set exposure to keep mean counts of Record images at

The image in buffer A implies a Record zero-tilt mean of 1518

Taper counts down to above +/- degrees

Keep exposure below current value (use if exposure already set up)

Do not increase exposure above value for first saved image

Use current exposure at zero tilt (increase to start series)

Total dose: 35.0 x dose at 0 deg; 35.0 x dose at -51 deg

Change other exposures proportional to Record change

Change drift settling proportional to exposure change

Camera and Acquisition Parameters

Ceta Falcon 4EC-EF

Average Record dark references

If taking frames, get initial partial sum of frames

Autofocus Control

Defocus target: um Beam tilt: milliradians

Autofocus offset: um Iteration threshold: um

Do autofocus at least every degrees Skip Autofocusing

Focus every time above degrees

Repeat autofocus if focus differs from prediction by > um

Do autofocus when error in focus prediction exceeds um

Check autofocus, stop if measured < X actual defocus

Stop if autofocus exceeds absolute focus limits

Stop if autofocus change exceeds um

Initial and Final Actions

Align to image now in Buffer A

Refine eucentricity

Leave mid-tilt anchor near plus or minus degrees

Use mid-tilt anchor that you have left in buffer T

Close column valves at end of series

Tracking Control Parameters

Wait for drift to settle

Repeat Record if percentage of field lost is more than

Stop and ask before repeating Record in Low Dose mode

Stop if Autoalign shifts more than % of image size

Get tracking image when error in X/Y prediction is > % of field

Track: Before After Before & after Autofocusing

Stop after aligning tracking image to allow manual adjustment

Align only with tracking images, not Record images

Align with Preview before getting new track reference

Get new track reference if Record alignment differs by > %

十、调机

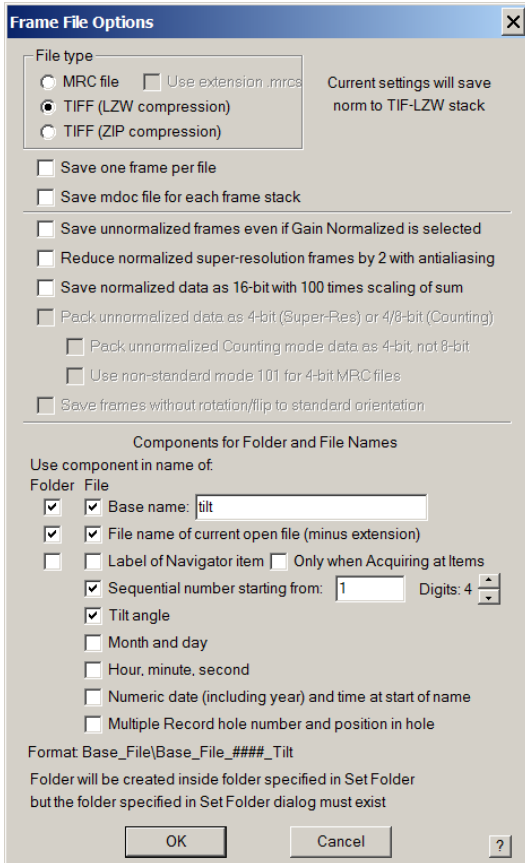
可由管理员完成。

十一、设置检查

- 检查各模式的光斑位置是否居中
- 再次检查 Turbo 处于关闭状态
- 检查物镜光阑是否居中
- 检查 slit 是否居中

十二、 数据收集启动

Navigator > Acquire at Items, Primary Task 选择“Acquire tilt series”, 点击“Go”。若使用脚本, 则 Navigator > Acquire at Items, Primary Task 选择“Run script”, 选择所需使用的脚本, 点击“Go”。



十三、 启动 emshark

- a) 打开预处理工作站的网页浏览器, 此时主页为 10.1.10.2x (如使用 4 号机, 地址为 10.1.10.24)。
- b) 具体使用方法请咨询管理员。