

# Krios EPU-K3 单颗粒数据收集操作手册



- 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
- 请勿自行删除数据，平台数据留存时间一周，请及时拷走

新手可按此手册流程使用 EPU 软件和 Gatan K3 相机收集单颗粒数据。资深用户可按情况灵活调整。但所有用户均需重视注意事项。

**使用过程中有任何疑问，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 load 进电镜，底下图片上是上样时所需的耗材及工具等。

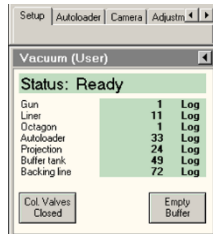


注：用户需在 9 点前抵达上样间，组装好 loading station，并使用**过滤后的液氮**冷却 loading station 和 Nanocab。

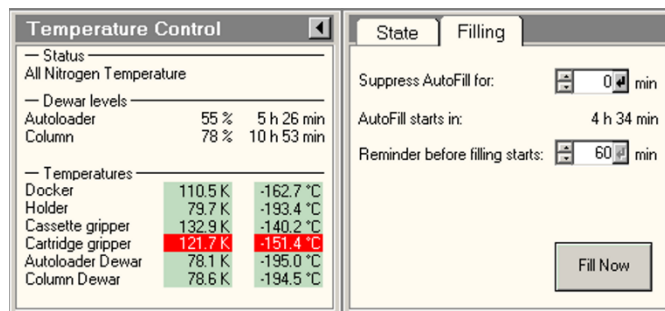
注：不要全上金网金膜载网，很难校正像散和 coma。

## 2. 检查电镜的状态、启动软件

- 1) 检查电镜真空是否有异常。所有的真空数值都应该是绿色状态。如有问题，不要打开 COLUMN VALVES。



- 2) 检查 HT, FEG 是否都处于运行状态。
- 3) 检查电镜各部分温度是否正常。在 Temperature control 中，所有部位温度都应该为绿色，且温度低于 100K。上样后，温度有所升高，请耐心等待 dock 温度低于 100K 后进行下一步操作使用。



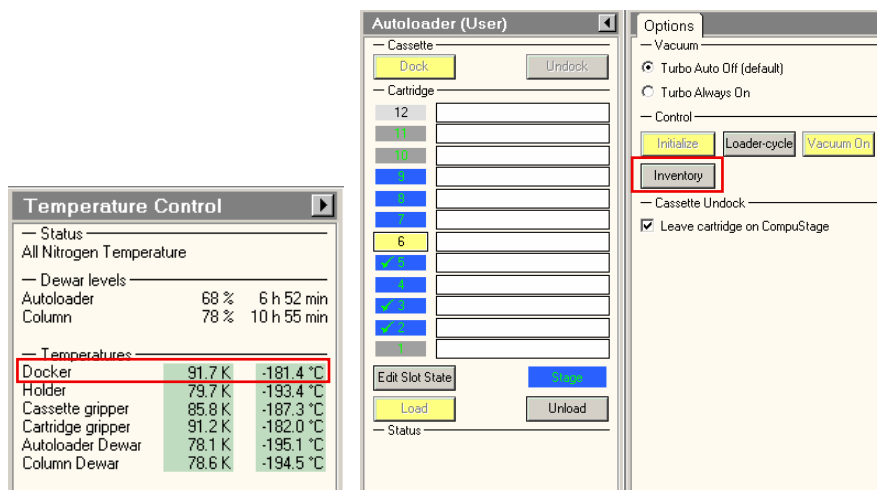
- 4) 检查 UI 里面当天是否有报错信息。
- 5) 检查 EPU 和 DM 里目前是否有报错信息。

**注意：K3 相机一般每两/三天升温一次，持续时间约 3 小时。用户可选择使用 falcon 相机进行查样。请联系管理员进行相机切换。**

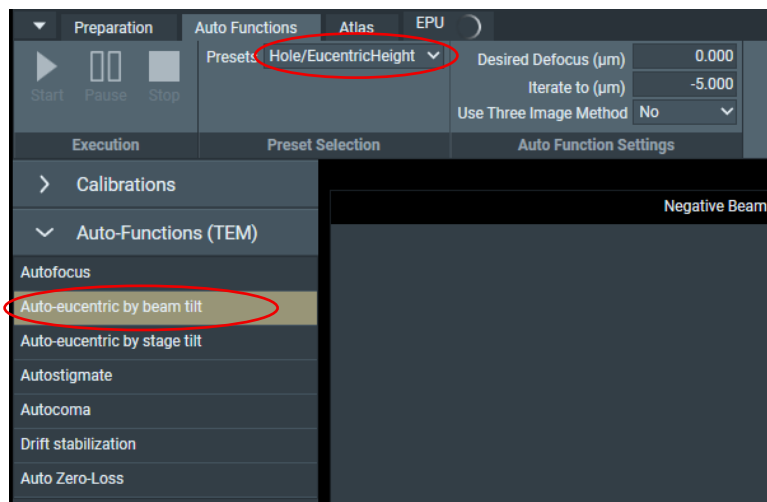
**注意：如有报错信息，请联系管理员解决。**

### 3. 筛选样品

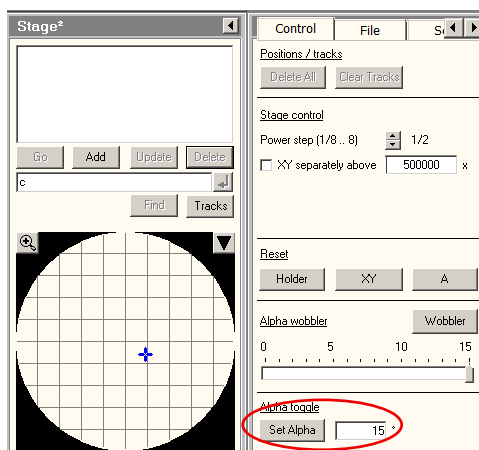
- 1) 当 Dock 温度下降至 100k 后，在 autoloader 右边的选项里点 Inventory. 此操作会依次检查样品槽位置后将其中是否有样品的状态显示在 autoloader 中，有样品的 slot 显示为蓝色。**检查其显示的样品位置是否和预想的一致。**



- 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），请先 'Unload'，此样品会被放在第一个空的样品槽中。当样品已经 Load 完毕时，'Cartridge successfully loaded' 的信息会显示在 UI 底部的 log 中（Load 样品通常需要 2-3 分钟），然后样品槽的编号会变成黄色。
- 3) 在 EPU 中选择 Preparation > Acquisition and Optics Settings, Preset Selection > Atlas, 点击 set。
- 4) 放下荧光屏（右手控制面板 R1 键或 UI 中的 Insert Screen 按钮），打开 Column Valve，通过移动样品台操纵杆，选择一个合适的区域，使其位于屏幕中心。
- 5) 抬起荧光屏，在 EPU 中选择 Preparation > Acquisition and Optics Settings, Preset Selection 中选择 "Atlas"，点击菜单栏最右侧 Preview 按钮，获得一张低倍（Atlas 倍率）照片。
- 6) 鼠标右键选择 Move Stage Here，将鼠标移动至 square 中心。选择 Preset Selection > Gridsquare，点击 Preview，获得一张低倍（Gridsquare 倍率）照片。
- 7) 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。结束后右侧状态栏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（下方步骤 8）。



- 8) 通过倾转样品台手动调节 eucentric height (可选步骤)。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  $15^\circ$ ，通过调节 Z axis 按钮将特征点移回中心。然后 set Alpha 为  $0^\circ$ ，观察特征点是否还在中心，若不是则重复以上步骤。



- 9) 返回 Preset Selection > Hole/EucentricHeight，将鼠标移动至合适冰层厚度的孔，点击右键选择 Move Stage Here，然后选择 Preset Selection > Data Acquisition，点击右侧的 Preview，获得一张数据收集倍率的图片。用户可使用截图工具或者右键弹出选项 export image 保存图片。
- 10) 如果要观察下一个样品，首先关掉 column valves，点击 'Unload'，待样品卸下后，再点击所需上样的样品槽位置，点击 'Load'。重复以上操作直到你筛查完所有样品。

#### 4. 数据采集 presets 参数设置

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。若要打开已保存的 presets，请点击

EPU 软件中 preparation > Presets > import.

**注：用户一般无需更改 atlas, gridsquare, hole/eucentric 等 presets 的设置，按数据收集需要更改 data acquisition 模式的 mag, 曝光时间, 曝光区域即可，并在确定后将 autofocus 等 preset 的光路参数设置与 data acquisition 保持一致。**

以下表格为 Krios #2 EPU 在 Gatan K3 相机下的 beam presets 的推荐值。

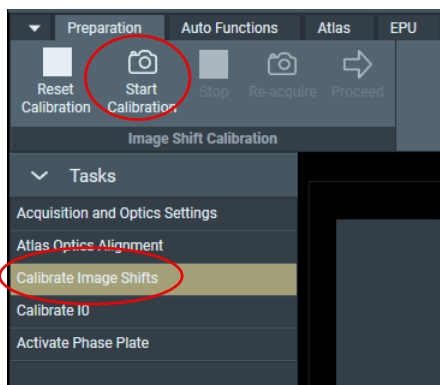
Preset	Camera/mod e	Readout	Exposure time, s	NP/MP	Magnificatio n	Defocus, $\mu$ m	Spot	Illumination area, $\mu$ m	C2 aperature
Atlas	Counted	Full	1	MP	82x	0	8	1050	70
Grid square	Counted	Full	1	MP	740x	-50 0	8	150	70
Hole/eucentric	Counted	Full	1	NP	8700x	-50	8	10	70
Autofocus	Counted	Full	0.5	NP	As data acq	N/A	As data acq. linear	As data acq. linear	70
Drift measurement	Counted	Full	0.5	NP	As data acq	N/A	As data acq.	As data acq.	70
105000x-Data acquisition	Counted super resolution	Full	用户 待定	NP	用户 待定	-2	4-5	1.0 左 右	70

## 5. 图像偏移校准 Image shift calibration

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。

**注：通常不需要做。如果筛样时发现图像中心在切换不同 preset 时有较大偏移，则需要重做。如已经拍了大地图，请重拍。**

- 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，并将特征点居中。
- 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，拍摄预览图片并调整位置。
- 4) 在 EPU 软件中，点击 preparation > calibrate image shifts > start calibration 开始校准的步骤。



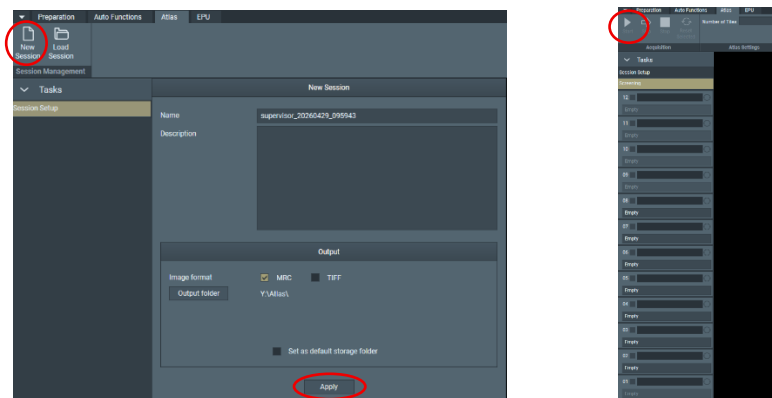
- 5) 软件会自动在 data acquisition 的放大倍数下拍摄一张图片，中间会有一个标记的 marker。如果中间的 marker 是一个可以辨认的特征点，点击 proceed。如果你需要移动位置，双击图片上的位置，点击 re-acquire，重复此操作直到找到合适的特征点，然后点击 proceed。
- 6) 此时电镜会降到下一个 beam presets 的放大倍数然后拍一张图片。在这张图片中，双击刚刚的特征点，然后点击 'proceed'。重复这些步骤直到其显示 'image shift calibration finished successfully'。

**注：hole/eucentric height 和 gridsquare 模式之间，照片有一个 180 度旋转。**

## 6. 拍大地图 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 square。

- 1) 在 Atlas 选项卡内，Session setup -> New Session，新建一个 session。保持默认设置即可，注意存储路径 (Y:\Atlas\)，点击 Apply。

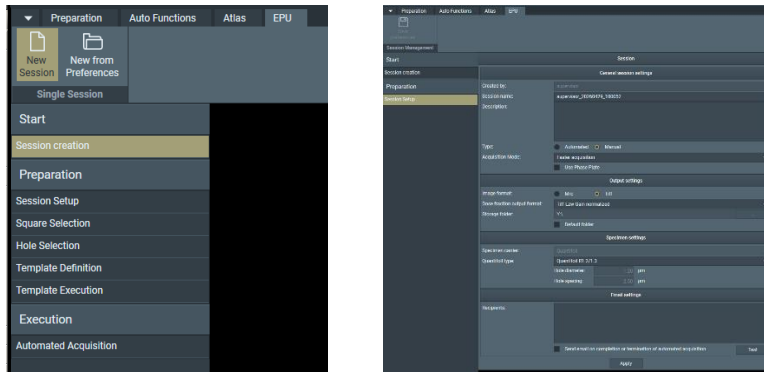


- 2) 在 Screening 里勾选 load 进电镜的载网，点击 'Start' 后将会开始拍摄地图，注意观察拍摄的图片是否正常（主要是看光照是否正常，拼图是否正常工作）。如果已经有足够多的 square，可以随时点击 stop 停止地图拍摄。

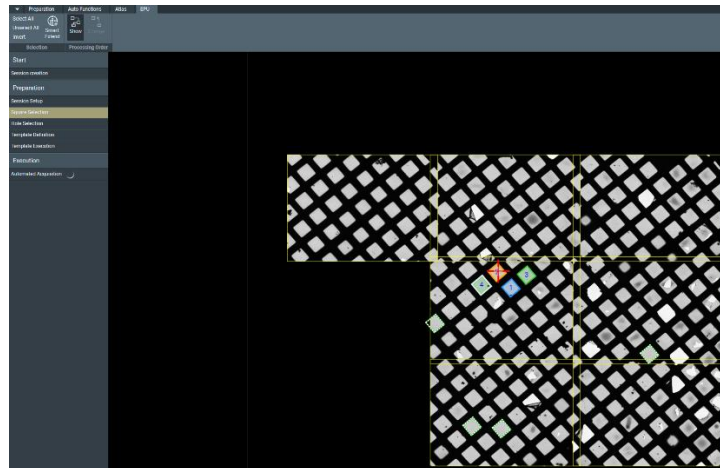
## 7. 选孔、定义模板和数据自动收集

- 1) Session Setup

- a) 在 EPU 菜单中 Start 栏下点击 Session Creation>New Session，在弹出对话框中选择 Yes/No。Yes 继承上一个用户的设置，No 需要重新设置。选择后进入 Session Setup 界面。

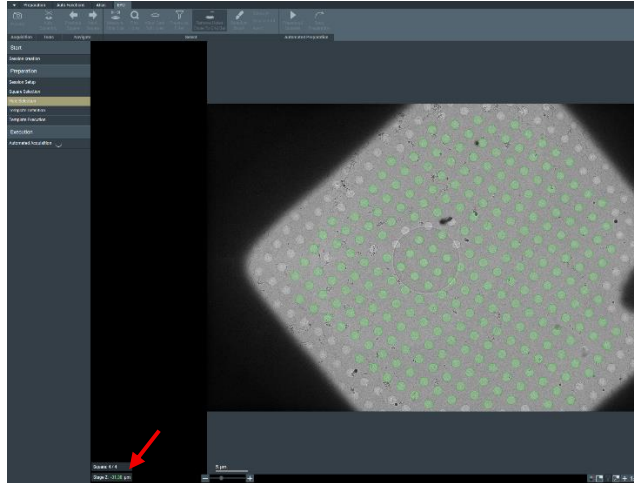


- b) Session name 保持默认格式即可  
 c) Session type (Manual)  
 d) Acquisition Mode (Faster)  
 e) 数据格式选择 TIFF LZW Gain normalized 或者 TIFF LZW Gain unnormalized 均可  
 f) Grid type: 根据载网实际情况选择  
 g) 点击 Apply
- 3) Square Selection
- a) 在 Preparation 栏下点击 Square Selection 后，系统会自动选上所有的 square，点击左上角的 Unselect All，去除已选的所有 square。  
 b) 根据筛样结果，鼠标右键 add 选择合适的 squares  
 c) 点 show 可以显示选中 square 的顺序编号。点击 change，鼠标左键对可以对选中的 square 重新排列。



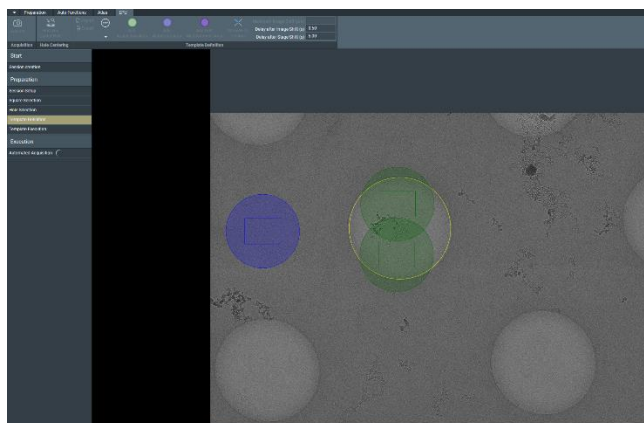
- 4) Hole Selection
- a) 在 Preparation 栏下点击 Hole Selection，点击 AutoEucentric，等待完成后，会返回当前 square 的照片，点击 Measure Hole Size，将两个黄圈放在相邻的两个 hole 上，调整黄圈大小使其匹配当前 hole 孔径大小。点击 Find Holes，软件会自动识别并选中当前 square 中的 hole。

- b) 点击 Remove Holes Close To Grid Bar 来去除 grid bar 上的 hole。
- c) 使用 Selection Brush 去除或添加 hole。单击或长按鼠标左键，可以擦除选中的 hole，按 ctrl 单击并长按鼠标左键，可以添加 hole，按 shift 并滚动鼠标滚轮可以改变刷子大小。满意后，点击取消 Selection Brush。
- d) 点击 Prepare all Squares，软件会自动对其他选择的 square 进行 Eucentric Height 及 Hole selection 操作，结束后重复步骤 (c) 进行手动擦除或添加 hole。另外，**需确保每个 square 高度已经调节（如调节，左下高度显示为绿色）。**



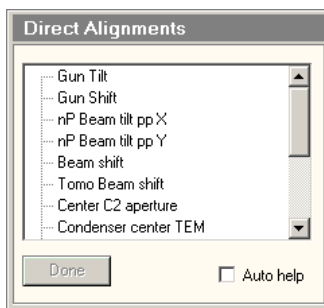
#### 5) Template Definition

- a) 在 Preparation 栏下点击 Template Definition，点击 Acquire，检查黄色圆圈是否与孔径大小匹配。
- b) 设定 Acquisition、Focus 以及 Drift Measurement 的位置及参数。选择 Add Acquisition Area，在孔内点击添加一个位置进行数据收集，绿色圆圈代表光斑照射区域，内部矩形代表相机记录区域。拍照区域可使用右键进行移动。
- c) 点击绿色圆圈，在上方的 defocus list 输入 defocus 梯度（用逗号隔开，输入完成后，点击右侧复制按钮可以将 defocus 梯度复制给其他拍照区域）。
- d) 点击 Add Autofocus Area，在孔临近的碳膜上添加 focus 区域。在上方的 Auto focus Area > Recurrence 中选择 After centering。碳膜不平 defocus 波动范围大的情况下，可选择 After Distance，在 Distance (um) 栏输入 Autofocus 的范围，一般输入 8-15。
- e) 点击 Add Drift Measurement Area。将其放置与 Autofocus 重叠，Recurrence 设为 Once Per GridSquare。

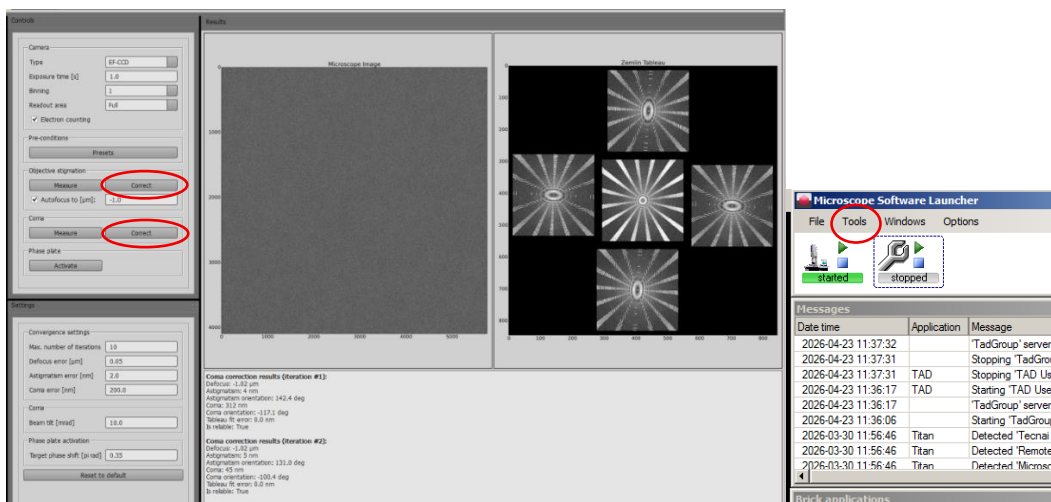


## 8. 光路合轴及消除像散和 coma

- 移动到一片完整平坦的碳膜位置，做 Auto-eucentric by beam tilt，确保该位置在正确的 Eucentric height。
- 结束后把光路切换到 Data acquisition 模式，放下荧光屏，点击控制面板上的 eucentric focus 按钮。在荧光屏依次调节：beam tilt ppx, beam tilt ppy, beam shift, rotation center。调节结束后点击 Done 保存退出。

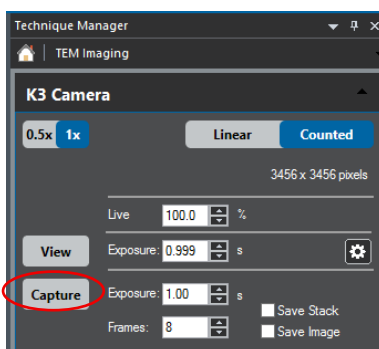


- 抬起荧光屏，在 Sherpa 软件选择 AutoCTF，准备矫正 stigmator 和 coma。在 Objective stigmation 下点击 Measure 按钮，观察白色虚线是否能正确识别 FFT 环，若不能，需要检查该位置是否已在 eucentric 的高度，剂量是否足够（若剂量原因可调节该选项下的曝光时间）等；可以利用面板上的 Z 高度调节 defocus 至 -1~2um。
- 若能正确识别且测出来的 defocus 在想要的 defocus 附近(一般是 -1.5~-2.0um)，则可以点击 Objective stigmation > Correct，若不在则可以手动点击控制面板上的 Z 高度调节到目标的 defocus 附近。
- Stigmation 校准完成后做 Coma 的 Correct (<160nm)，Coma 校准结束后返回再 Measure 下 Stigmation (<5nm)。



## 9. 计算曝光时间

移动 stage 至无样品和碳膜的破损区域，将 Data Acquisition 设置 set 给电镜，在 DM 里 capture 一张照片。在照片下方读取当前光路设置的 dose rate。



计算曝光时间。根据设置的放大倍数查表可得 pixel size，照片 total dose 由用户自己决定。曝光时间 = total dose \* pixel size \* pixel size / dose rate  
将计算所得曝光时间填入到 Data Acquisition > exposure 中。

## 10. 最终检查

检查 turbo pump 是不是 'auto off' (autoloader 菜单栏里)。

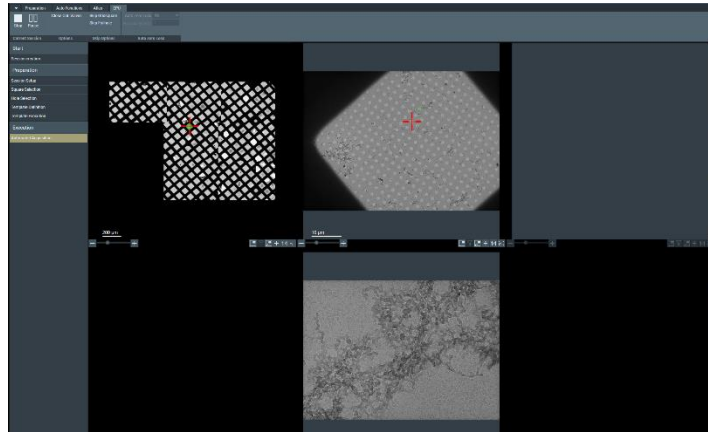
核对 Data Acquisition 中的 mag，曝光时间，frame 数等是否与实验设计一致。

检查光路是否正常。

检查 slit 是否对中。

## 11. 启动数据收集

在 Automated Acquisition 点击 Start Run 启动数据收集。选中 Close Col.Valves，数据收集结束会自动关闭镜筒阀)。

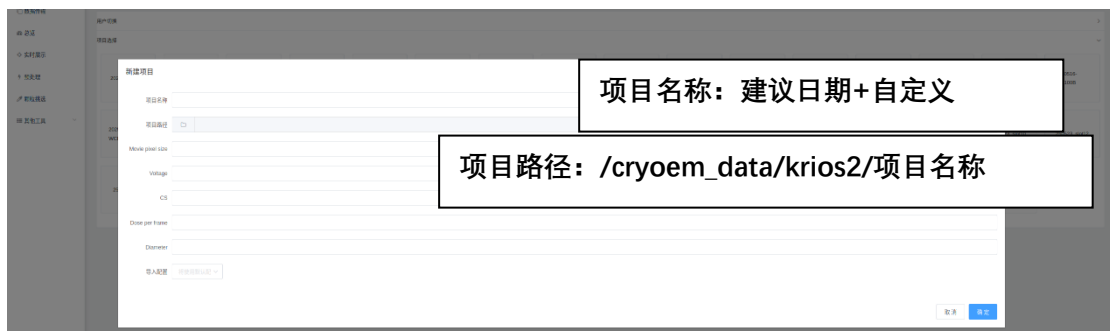


## 12. EmsHark 设置和数据转移

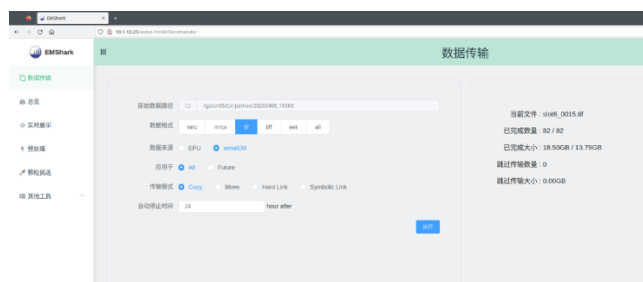
左上方屏幕为预处理服务器的显示器, 我们利用 emshark 进行数据转移和初步的 motion correction、CTF estimation, 以实时监督数据质量。

**注: 新建项目时需要确认之前需要先将之前项目停止, 否则无法新建项目。**

1. 打开火狐浏览器, 会自动打开 emshark 的网页界面 (如#2 光明预处理地址: 10.1.10.22)。在其右上方点击 user 处, 选择切换界面。
2. 在空白项目点击, 设置项目名称、存储路径和参数。确定。



3. 选择数据传输。原始数据路径为/gatan02/DoesFractions/[你在 EPU Session Setup 里设置的文件夹名]。数据格式为 tiff, 数据来源选择 EPU, 如果连续收集超过 24 小时, 需增加自动停止时间。点击开始。



4. 选择总览。依次点击 Motion-Corr 和 CTF, 设置相应参数。取消 pick(点击 CTF 旁边的勾号), 点击 run p1。

EPU 数据收集模式设置需与 EMSHARK 保持一致：

EPU	EMSHARK	
	Motion correction	CTF estimation
Super resolution bin1	FtBin 2, Physical pixel size/2	Physical pixel size
Super resolution bin2	FtBin 1, Physical pixel size	Physical pixel size

注意：如果 EMSHARK 参数设置错误，可在总览里点击 clear 清除已处理的所有中间数据，正确设置参数后重新运行。

5. 在实时展示中选择 auto，观察照片、thon ring 和 ctf 参数评价数据质量。

### 13. 数据转移和备份

将硬盘插到预处理工作站上，在家目录下找到 cp\_1.py 和 cp\_motion.py，修改 path 和 storage 路径为自己的原始数据和硬盘路径。

运行 python cp\_1.py/cp\_motion.py

稍等，可见数据的传输正常运行。

```
#!/usr/bin/env python
import os,time,shutil,subprocess

path = '/cryoem_data/krios2/20260423csl/Movies'
storage = '/home/user/csl/20260423csl/Movies:'
type = '.tiff'

while True:
    storage_mountpoint_check = subprocess.check_output(['df', '-h', storage], universal_newlines = True)
    mountpoint = storage_mountpoint_check.split()[-1]
    if mountpoint == '/':
        print("Error: Please use 'df -h' to check the mountpoint first if you are using sshfs to transfer files to cluster!")
        break
```