

Titan Krios #2 操作流程

目录

◆ 上样.....	2
◆ 切换样品的操作.....	2
◆ 设置 View 模式下 Defocus -50.....	3
◆ 拍地图.....	4
◆ 离线选点.....	7
◆ 数据收集前的准备.....	9
◆ 数据开始收集.....	12

Titan Krios #2 操作流程

◆ 上样

将样品在上样专用操作台中转移至 Titan 的 cassette 中，确保打开 Turbo Always On、关闭 Column 阀，将放有 cassette 的杯子(检查销杆拔起)放到电镜 autoloader 的指定位置处（杯子圆口朝里，方口朝外推进放置，待检测到杯子后，Dock/Undock 按钮指示灯亮起，点击 Dock/Undock 按钮将 cassette 转入或者卸下，在这个过程中 Autoloader 的 status 会显示整个动作过程，完成后指示灯灭，将杯子取下放到安全位置；

The screenshot displays the software interface for the Titan Krios autoloader. It is divided into several panels:

- Temperature Control:** Shows status for All Nitrogen Temperature, Dewar levels (Autoloader at 72% and 7h 18min, Column at 86% and 12h 16min), and various temperatures (Docker, Holder, Cassette gripper, Cartridge gripper, Autoloader Dewar, Column Dewar).
- State / Filling:** Includes controls for Suppress AutoFill (0 min), AutoFill start time (6h 26min), and Reminder before filling (60 min), with a 'Fill Now' button.
- Autoloader (User):** Features 'Dock' and 'Undock' buttons, 'Initialize', 'Loader-cycle', and 'Vacuum On' buttons, and an 'Inventory' button. It also has 'Edit Slot State', 'Load', and 'Unload' buttons.
- Options:** Includes 'Vacuum', 'Turbo Auto Off (default)', and 'Turbo Always On' (checked) options.
- Slot characteristics / Explanation:** A legend defining slot colors and symbols:

Slot characteristics	Explanation
Light gray color	Slot content is unknown
Blue color	Slot is occupied
Dark grey color	Slot is empty
Black slot number	No inventory of slot has been done by the AutoLoader hardware
Green slot number	An inventory of this slot has been performed by the AutoLoader hardware
Yellow slot color	Cartridge from this slot is either in the progress of being loaded / unloaded or is loaded on the CompuStage
Red cross	Slot blocked for further use
Green checkmark	Manual and AutoLoader inventory are consistent
- Stage:** A legend defining stage colors:

Stage	Explanation
Light gray	The stage content is unknown; no stage map has been performed
Dark gray	The stage contains no cartridge
Blue	The stage contains a cartridge

上样及样品切换图

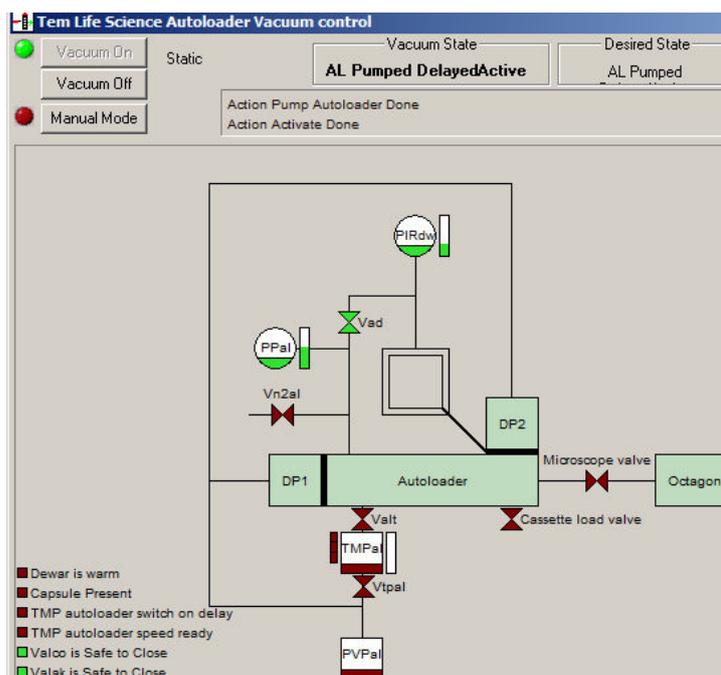
- ✓ 一般会把 1 号位空出来，如果镜筒里面有一个样品没有 unload 的话点击 inventory 则镜筒中留的样品直接放到 1 号位。

上样完成后要等 Autoloader 降温，Autoloader 温度显示全部变为绿色以后可以开始将样品 load 到镜筒中（在上下样过程中 Docker 和 Cartridge gripper 的温度会变化比较大，最好等这两项的温度降到 100K 以下再 load 样品到镜筒中比较安全，防止因温度不够冷样品有回温现象）；在 Dock/Undock 的过程中不要开关 SerialEM。

标记可用样品位置：在样品 load 进镜筒之前先点击 Edit Slot State 按钮，选 Cartridge 对应的含有样品的数字，选过之后有样品的数字编号变为蓝色，选完后点击 Edit Slot State 按钮，样品位置标记完毕（只有 Edit 过的样品才能被 load 到镜筒中）。也可以点 inventory 让 autoloader 自己检查哪个位置有样品。

◆ 切换样品的操作

关闭镜筒阀，打开 turbo(选择 Turbo Always on)，打开 TMP 的状态显示图，等待 TMPa1 泵变为绿色；TMPa1 泵变为绿色以后，点击 Unload 按钮可以将上一个样品换下来（刚点击时按钮为橙色，且 status 对话框底端会有文字显示切换工作状态，结束后文字消失，按钮变为黄色，代表下样完成）；



Autoloader 真空示意图

选中想要观看的样品的序列号，选中数字出现方框，点击 load 按钮（同理，由橙变黄代表上样完成）；上样完成后，可关闭 turbo 开始检查样品（选择 Turbo Auto off-default）；

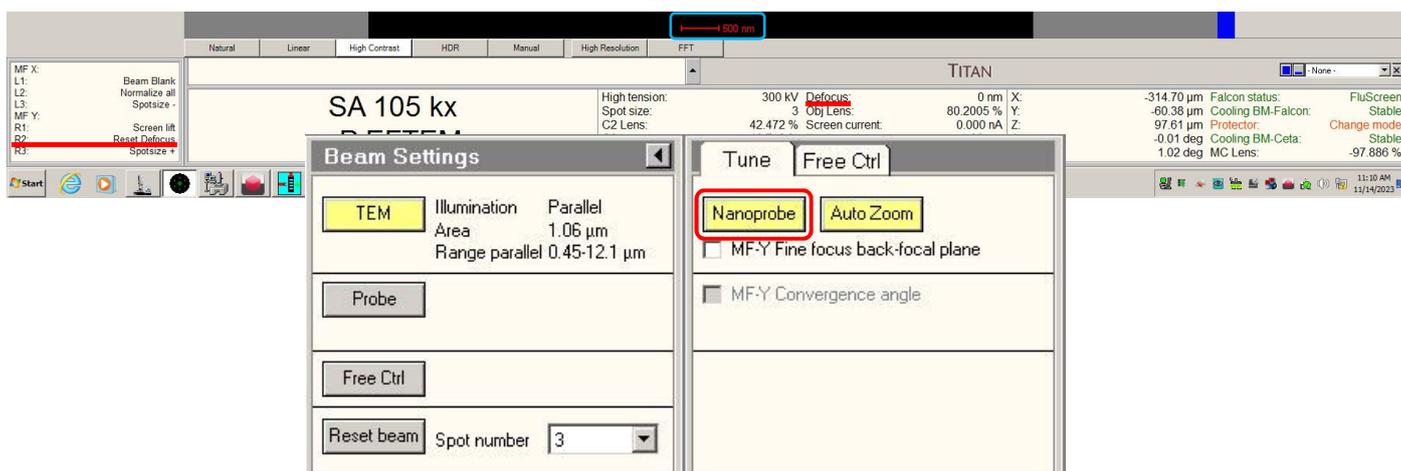
✓ 注意在上下样的过程中不要开关 SerialEM，软件 bug。

◆ 设置 View 模式下 Defocus -50

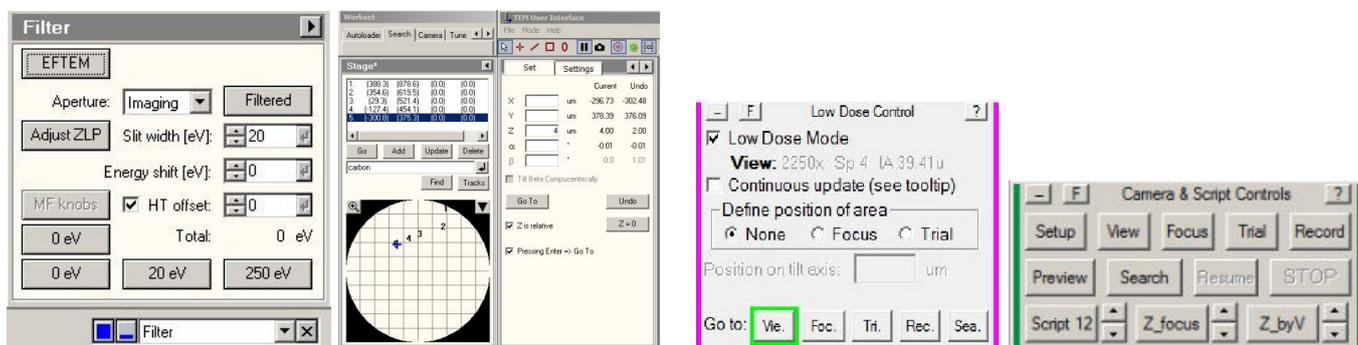
注意拍地图前，一定要检查 View 模式下 Defocus 是-50。如果不是，按以下步骤设置。

1. 打开 column 阀，Go to record，放屏，点按操作面板上的 Eucentric focus，等待光斑出现在荧光屏上（或荧光屏底部的标尺出现），检查 Defocus 应已归零。若已归零进入步骤 2；若未归零，检查 UI 软件上 R2 功能是否为 Reset Defocus，点按操作面板上 Reset Defocus 相应的功能键（一般为 R2），等待光斑出现在荧光屏上。
2. 单击 Nanoprobe，黄色消失，等待光斑出现在荧光屏上（或荧光屏底部的标尺出现），点按操作面板上的 Eucentric focus，等待光斑出现在荧光屏上，检查 Defocus 应已归零。若已归零进入步骤 3；若未归零，点按操作面板上 Reset Defocus 相应的功能键（一般为 R2，按键与步骤 1 相同），等待光斑出现在荧光屏上。
3. 单击 Nanoprobe 点亮黄色，等待光斑出现在荧光屏上。
4. Go to view，等待光斑出现在荧光屏上，检查 Defocus 应为-50。

✓ 重启 Serial EM，并重新导入 setting 时，需重新检查 View 模式下 Defocus 是-50。



选择感兴趣的点：Insert Screen，打开 column 阀，在 UI 里点击 EFTEM 使其变为灰色退出 EFTEM 模式；在 Serial EM 里勾选 Low Dose Mode；点击 Go to Sea (Search 模式一般在 LM100-200 倍，方便看整个 Grid 的状态)，移动样品寻找感兴趣的位置，并在 UI 软件的 Stage 中 Add 标记点的位置，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）；



检查样品图

感兴趣点的状态检测：抬起荧光屏，点击 Serial EM 软件中的 Go to view，移动样品中心至 carbon 上点击 Z-byV 调节 Z-high 进行聚焦，Z-by V 结束以后点击 Z-focus 再次精调 focus，结束后点击 view 拍一张照片，然后用鼠标右键拖拽要拍照的位置到中心，移动完成后再点击 view 拍照确认中心位置，确认后点击 Record 即可获得一张高倍照片（可打开 Process 下的 FFT 选项确认 defocus 值，若 defocus 比较大可以使用操作面板 Z 按钮在 UI 界面给它一个合适的 Z 值然后在 Record 模式下拍照）。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；

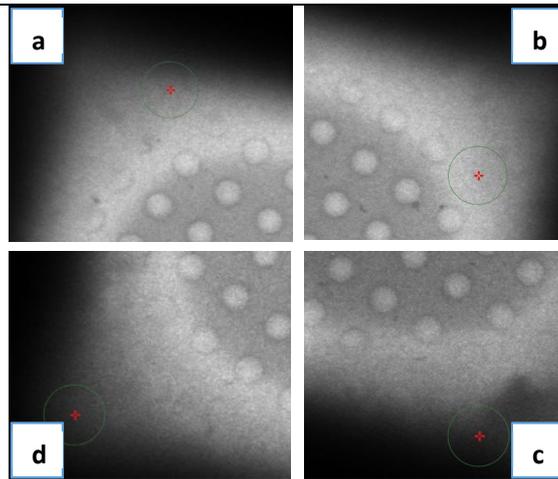
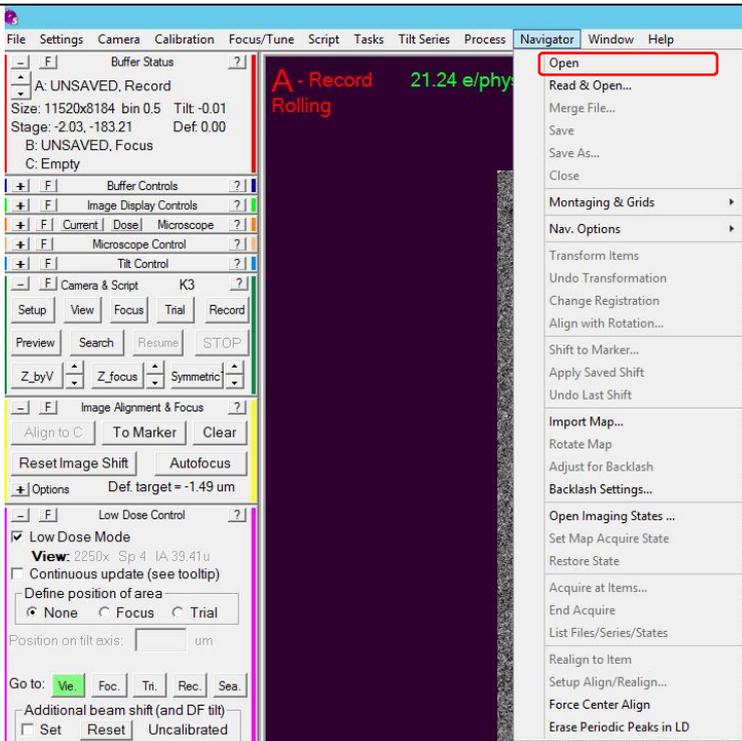
手动拍照注意事项：

- ✓ 手动拍照光容易偏掉，注意对中；
- ✓ 低倍 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，然后再切换到高倍下 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，高倍下光偏掉只调节高倍下的 Direct Alignment 用 Beam Shift 将光斑调至居中即可。

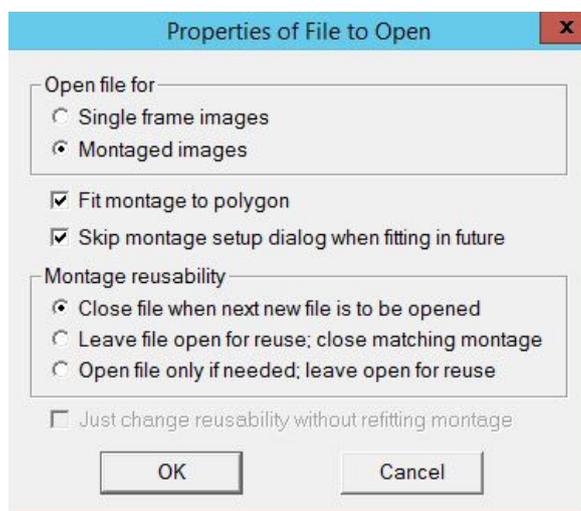
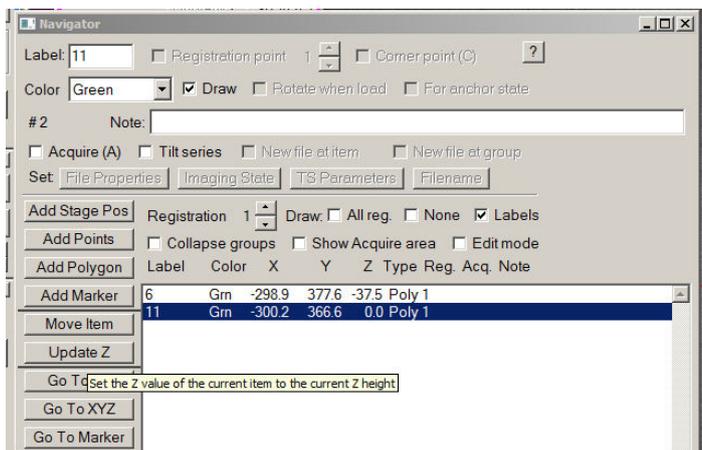
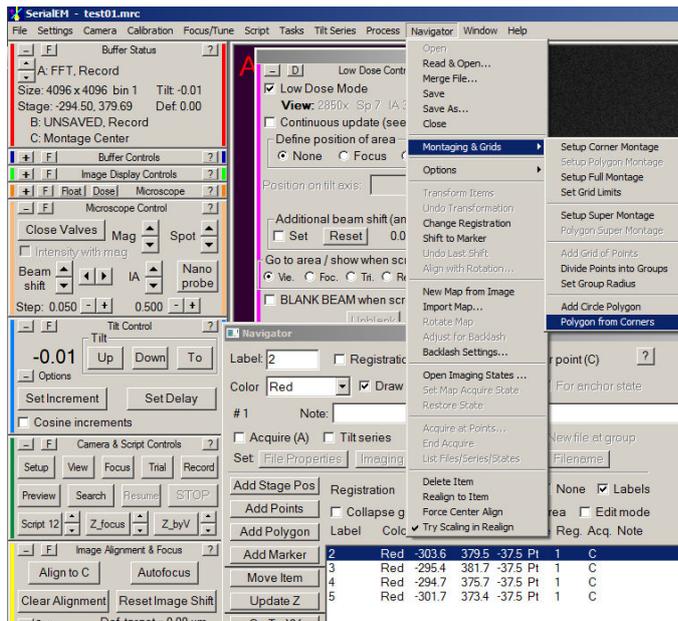
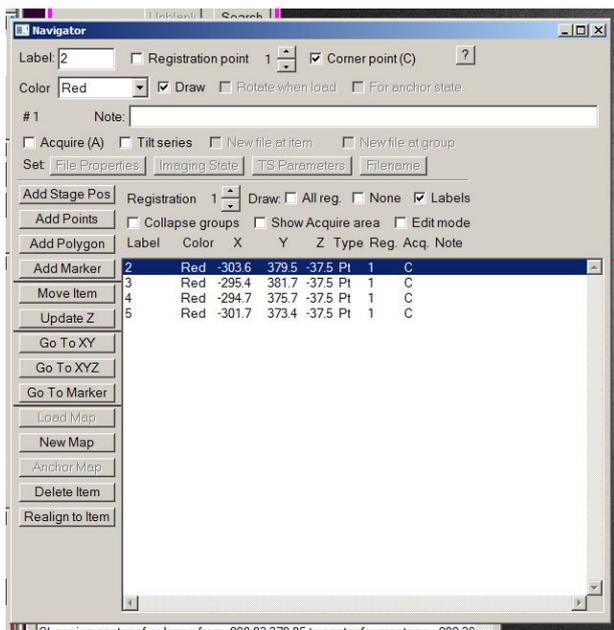
拍地图

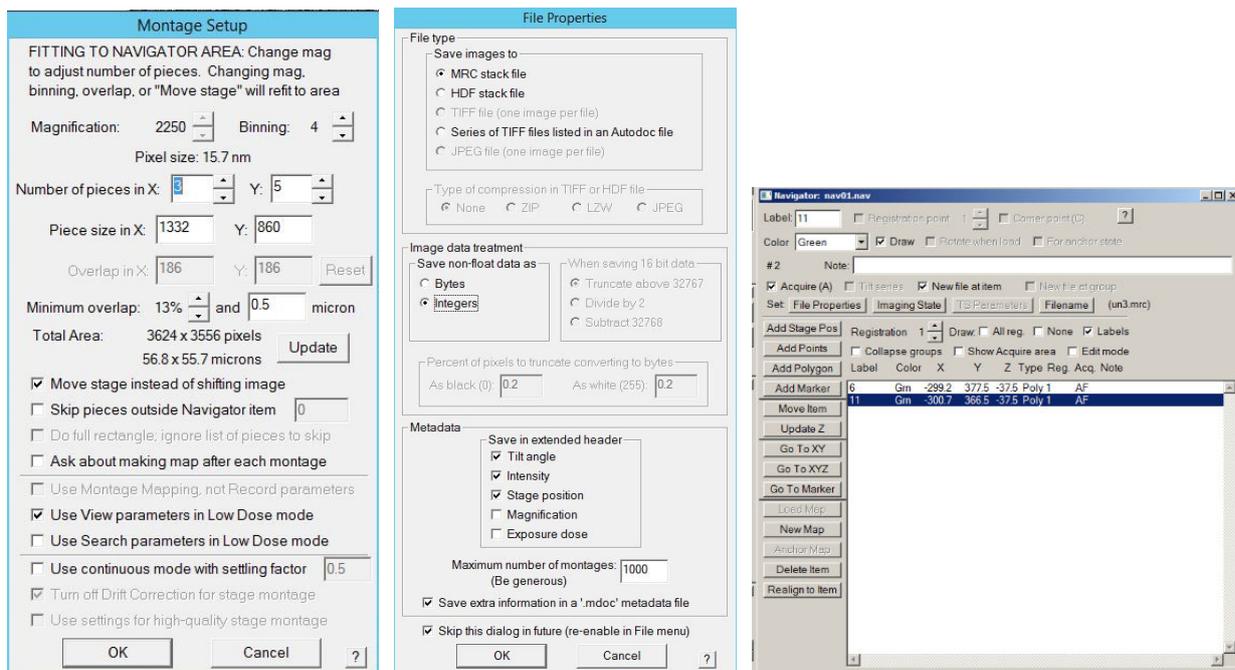
View 模式下将样品移动到要收数据的 square 位置，点击 Z-byV 调节 Z-high 进行聚焦（第一个 square 做 z by V，其余不做）。在 Serial EM 软件中打开 Navigator 下拉菜单中的 Open 选项，打开 Navigator 界面，放下荧光屏移动样品到 square 的边角处，点击 Add Stage Pos 按钮添加位置信息，至少选 4 个点的信息（具体位置参见下图），一定要按顺时针或者逆时针顺序依次添加，添加完之后抬屏（防止光束一直照射样品），添加完一个 square 的全部边角位置信息后点击 Corner point (C)，将每一个边角位置信息后面都有 C 的标记，然后选择 Navigator 里的 Montaging& Grids_Polygon from Corners，将几个点围成一个多边形，此步完成后可看到几个边角点的信息合并成一个多边形的信息。点击 Navigator 里的 Save as 为 nav01。依次标记目标 square 的信息，直至全部完成，点击 Save 再次保存 nav01。

依次在每个 square 的多边形信息 上选择 Acquire (或按动键盘按键 A)，全部 square 信息后面都有 A 的标记后勾选 New file at item，然后勾选 Montaged images、Fit montage to polygon 和 Skip montage setup dialog when fitting in future，点击 OK，注意查看使用的放大倍数。依次确认并保存至 nav01 所在文件夹下面，按照从上往下的顺序依次命名(第一张存为 map01 后，后面的不用输入会依次进行保存)，存过以后在 Acq. 信息处会显示 AF。再次点击 Save 保存一下。



a: 左上角，最左上的孔再往左往上各一行
 b: 右上角，最右上孔再往上一行
 c: 右下角，最右下孔再往下两行
 d: 左下角，最左下孔再往左往下各两行
 2#300kV 电镜拍地图较快, Add Stage Pos 位置可适度洗大点。



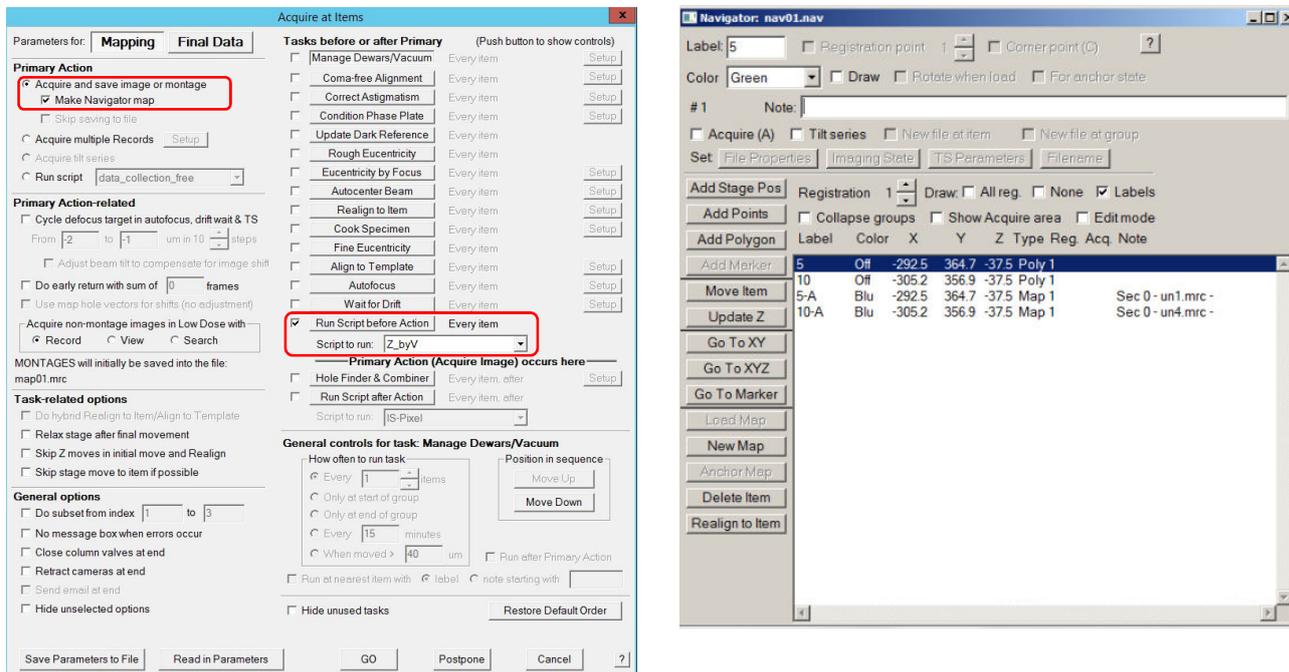


SerialEM 设置拍地图

选择 Navigator 下拉菜单中的 Acquire at points, 在 acquire at items 对话框下 Primary Action 中选中 Acquire and save image or montage, 勾选 Make Navigator map; 勾选 RunScript before Action 选择 Z_byV (若前面选地图时候手动给每一张地图调节过 Z-high, 可以不勾选 Run script Z by V)。点击 Go 按钮, 在 Choice 对话框选择 Go on, 开始拍摄地图。

注意事项:

- ✓ LM 模式与 SA 模式之间位置容易对不准, 在 LM 模式下进入高倍模式时拍照位置有偏差, 软件有时候也会报错, 拍地图一定要在 SA 模式下做。
- ✓ 拍地图时在 Serial EM 软件中不要出现任何下拉菜单, 否则软件就会出现 bug, 自动停止地图的拍摄。
- ✓ 拍地图时在第一张拍完以后就检查一下地图对齐情况, 如果曝光时间太短或者光斑扩的太大那么光束亮度太暗拍出来的图像 feature 不够明显, 就有可能对的不够齐, 如果是这种情况可以尝试在平行光的范围内将光斑缩拢或者增大曝光时间。另外如果 grid 有弯折, Z 值高度偏差比较大的情况下地图也有可能对不准。

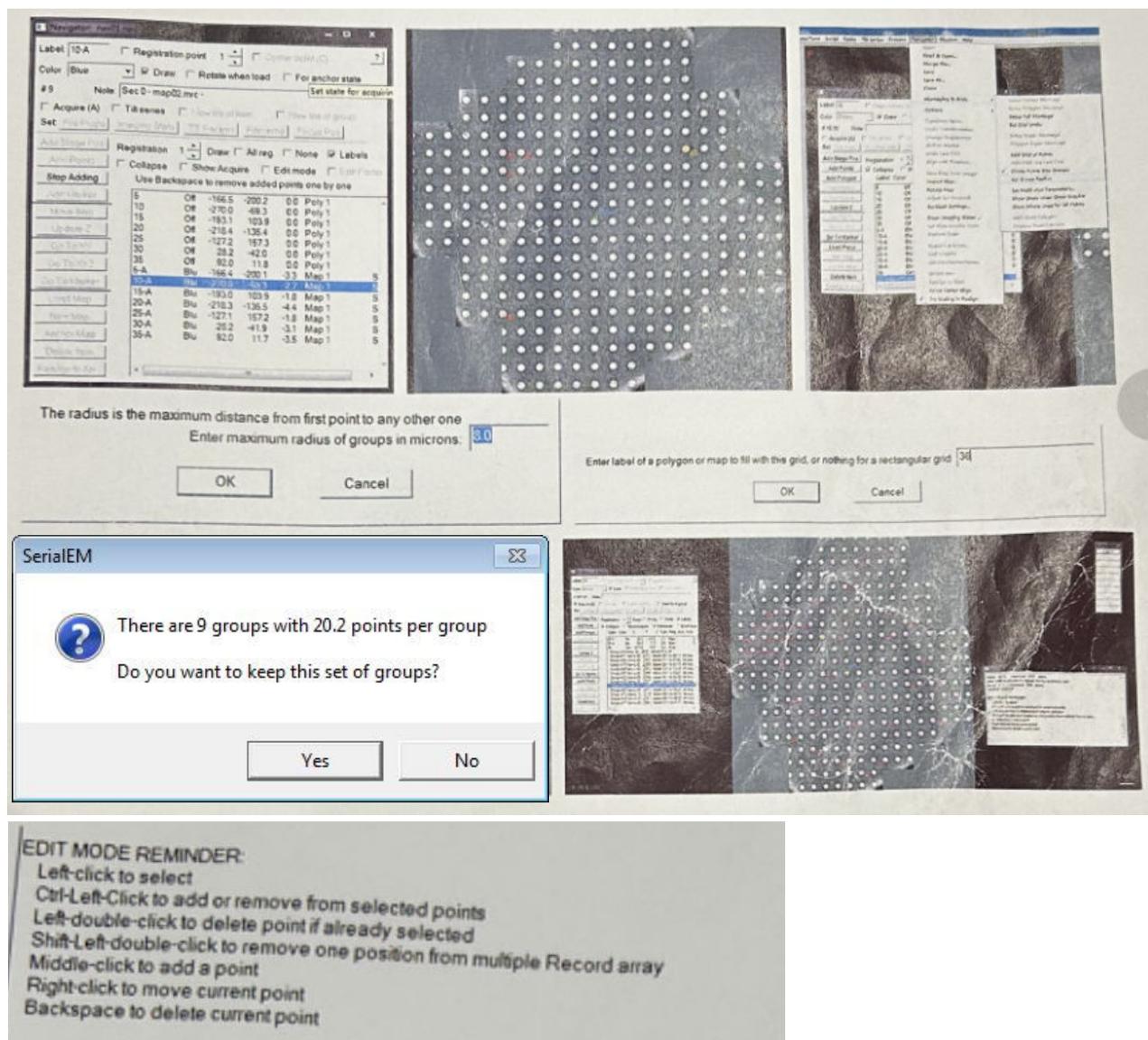


◆ 离线选点

在部分地图出来后即可开始选点,点击 Navigator 下拉菜单中的 End Acquire ,停止后选择 Save, 再次保存 nav01 文件。转移已拍摄的地图文件 map 和 nav01 至 Support PC 上,在 Serial EM 上再次开始拍摄地图,每次暂停以及最后完成都重新 Save 一下,保存最新的 nav01 文件。在 Support PC 打开离线版 Serial EM,选择 Navigator 下拉菜单中的 Read&Open,读取 nav01,双击已拍摄的地图照片 (map.mrc)。

自动选点:

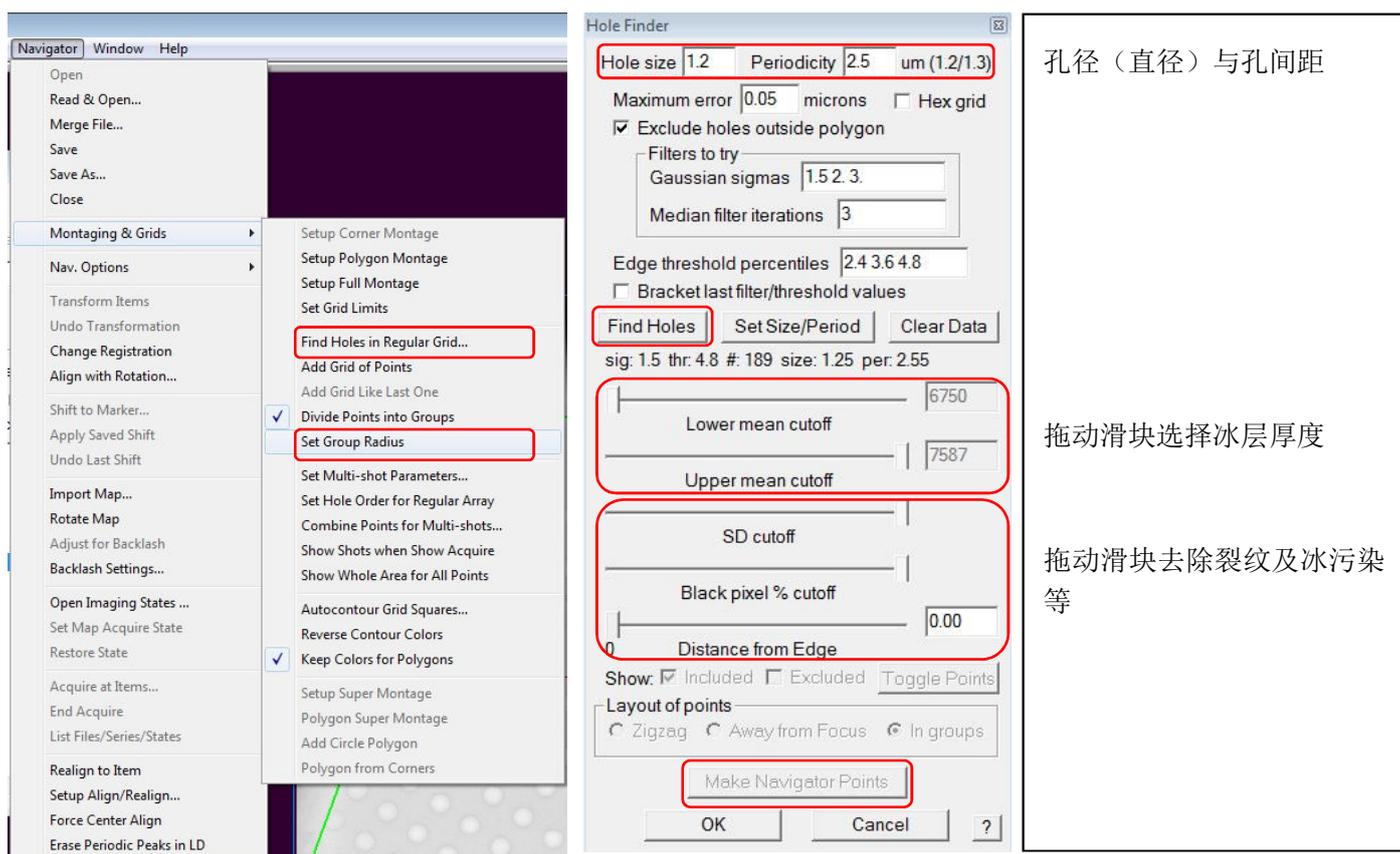
1. 点击 Add polygon, 然后在地图上点击要选的区域,将要选的区域框在多边形里面,多边形画好以后,点击 Stop Adding;
2. 选模板,一般选 5 个点,这 5 个点的分布是一个 90 度的直角,要选择孔与孔之间距离最近的那条线上的直角。
3. 在 Navigator 下面找 Montage & Grids, 将 Divide points into group 勾选上,打开 Set group radius, 设上合适的数值用来分组,打开 Add grid of points 输入刚刚画的 polygon 的编号开始进行自动选点,分组合适后点“是”,如果不合适重新设置 Set group radius 数值后自动加点即可。
4. 剔除不要的点,勾选上 Edit mode, 即可用快捷键进行相应的操作。



离线选点

自动选点（升级版）：

1. 选择 Navigator 下拉菜单中的 Montaging & Grids - Find Holes in Regular Grid..., 在 Hole Finder 对话框下输入孔径与孔间距, 点击 Find Holes, 开始自动选点。红色十字为已选点, 蓝色十字为弃选点。(Find Holes 前也可以先 Add polygon。)
2. 拖动滑块选择冰层厚度, 去除裂纹及冰污染等。
3. 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。
4. 剔除不要的点, 勾选上 Edit mode, 即可用快捷键进行相应的操作。



自动选点

手动选点：

点击 Add points 开始选点, 通常以 9 个孔为一组, 先选最中间的点, 然后顺序选择边上的点, 以用最小的移动时间为准, 选好一组后点击 Stop adding 结束。再点击 Add points 开始选下一组, 一张地图选完后 Save as 为 nav02, 及时保存, 以软件出现 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)

离线选的点与地图的拼合: 在离线 Serial EM 中选择 Navigator 下拉菜单中的 Merge File, 点击 nav01, 即将 nav01 的地图文件与带有选点的 nav02 文件拼合, 后续用 nav02 文件进行数据收集。

◆ 数据收集前的准备

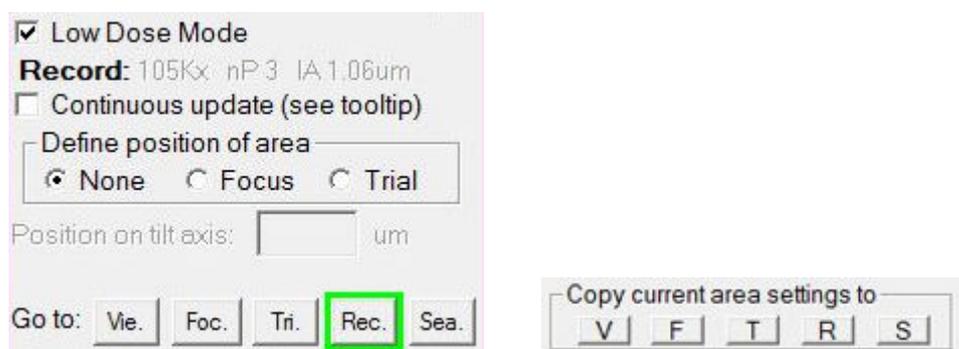
可以将设置好的参数存成一个 **setting** 文件保存，以防中间出现 **bug** 需要关闭 SerialEM 时候再重新调用。

在调机之前先找到 square 破的位置 hole (测剂量、扣背底、调能量过滤器用) 和冰较薄的 carbon (调像散以及 Coma、设置 Focus 位点用) 两个点的位置并记录下来。

设置 SerialEM 中 Focus 的位置偏移量选定位置和角度都设为 0，**检查 Record 和 Focus 模式下的 defocus 是不是 0，如果不是 0 摁下 Eucentric focus，如果依然不是 0 则摁下 Reset defocus 设为 0。**

测电子剂量 (在 hole 位置):

在 hole 的位置测电子剂量, 根据具体需求设置一下 Record 模式的放大倍数以及光斑大小等条件, 选择不同的 Spot size 配比不同 Condenser 来达到所需的 Dose rate, 设置好后 update 一下并将这个设置赋给 Focus 或者 Trial 模式。(一般 K3 相机 Record 使用 20e/pixel/s)

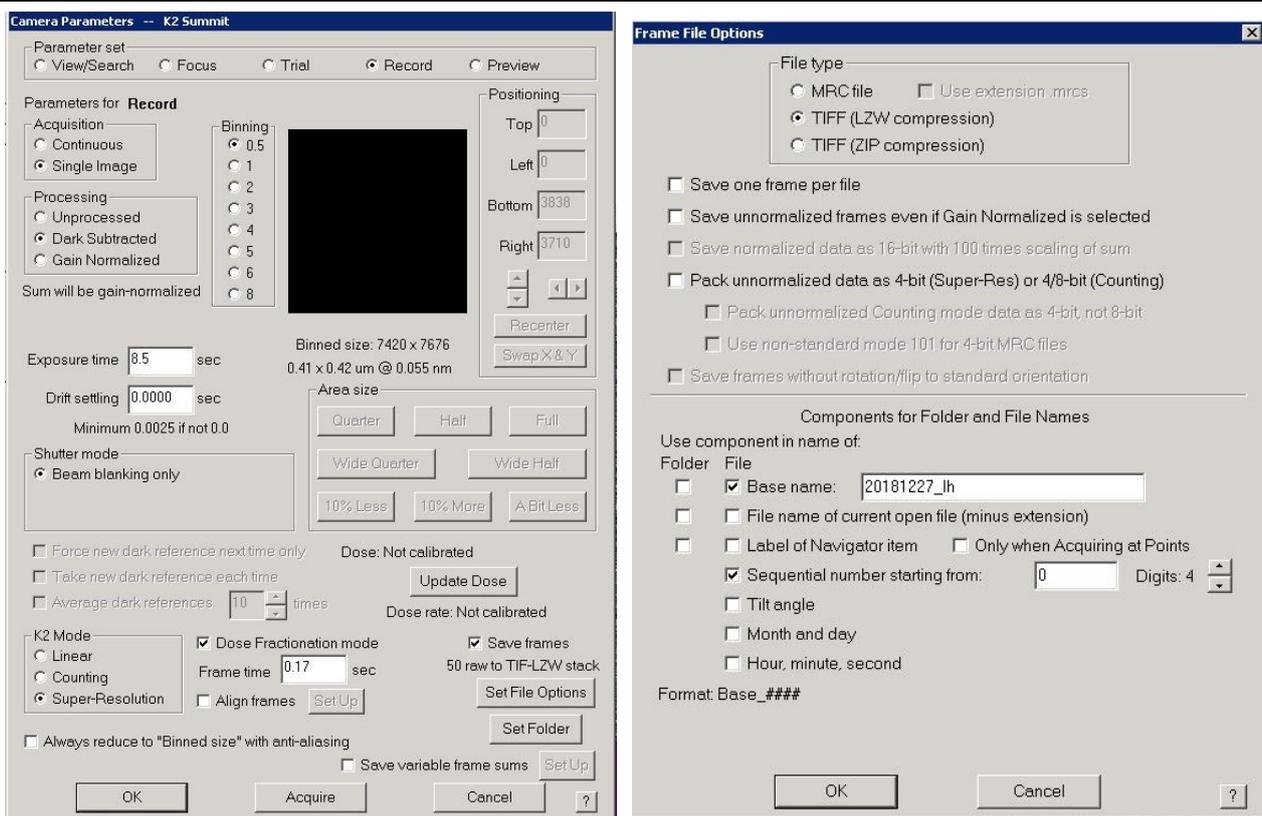


根据用户要求的 total dose、dose rate, 来确定总的曝光时间以及每一帧的曝光时间。K3 相机 dose rate 一般使用 10-20e/pixel/s (counting 模式), Falcon 相机一般使用 50-55e/pixel/s。根据以下公式计算曝光时间

$$\text{Exposure time} = \frac{\text{total dose } e/\text{\AA}^2}{\frac{\text{dose rate } \frac{e}{\text{pixel}}/s}{(\text{pixel size})\text{\AA}^2}}$$

- ✓ 可将在 SerialEM 中设置好的各项参数 setting 文件保存下来，在下次数据收集的时候可以在 SerialEM 中打开上次用的 setting 文件，调节需要更改的参数后即可使用。
- ✓ 在每次改变 SerialEM 中 Low dose Control 中不同模式的设置后，一定要点 Continuous update 按钮，保证更改后的参数能够被保存进去。更新保存完后再将 Continuous update 勾掉，否则在任何一种模式下动一下它都会被记录并且进行自动更改。

在 Serial EM 软件中的 Camera-Set up-Record 选项中设置总的曝光时间以及 stack 中每张照片的曝光时间，设置照片的存储名称及存储文件夹等。

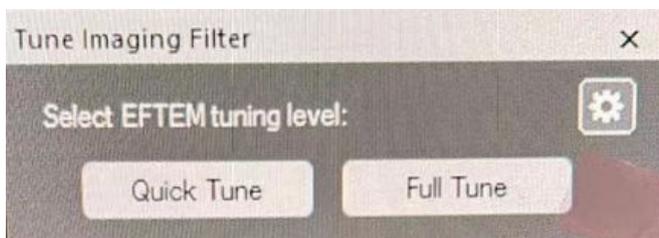


设置收集参数及文件名称

能量过滤器对中 (在 hole 位置):

放屏，将 SerialEM 里的 Low Dose Mode 去掉勾，先把 Condenser 2 放到 150，Spot size 放到 1，Linear 1×模式，检查光是否在中心位置，调节控制面板上的 intensity 旋钮，至 Illuminate area 1.56um 左右（放大倍数 105K 时），抬屏-放屏，二次检查调节光到中心位置后抬屏。在 K3 DM 里 View，检查 Slit in 去掉勾时，dose rate 约为 180e/px/s。Center ZLP，直到 ZLP Offset 绝对值两次 ≤ 0.5 。（详细步骤见附页）

Tune GIF 光异常时不要做。重启 K3 硬件，或者重启 GIF，或者收数据过程中发生 Slit 偏移需要 Center ZLP 两次以上，这三种情况需要做 Tune GIF。在完成 Center ZLP 后，做 Full Tune（耗时约 15 分钟）。做完再做 1 至 2 次 Center ZLP。



✓ EFTEM 对中的时候一定要选择 Linear 模式，测剂量使用 counted 模式。

扣背底 (在 hole 位置):

需要在数据收集的倍数下做 (Record 模式)，设置与能量过滤器对中相同 (Low Dose Mode 去掉勾，Condenser 2 放到 150，Spot size 放到 1，Linear 1×模式，Illuminate area 1.56um 左右) 光斑调到中心位置，点击 K3 DM 中的 Camera 选择 prepare Gain reference，调节 intensity 大小至它指示的 1280 的量，然后将屏放下，确定光斑处在中心位置，抬屏至指示的 Avg count 数值有显示之后点击 Done 开始扣背底。

第一步扣背底完成后, 放屏, 调整到数据收集时要使用的 condenser 2 以及 spot size 下 (一般 Condenser 2 为 70, spot size 为 3), 确定光斑在中心位置后, 调节 intensity 大小至收数据的剂量 (一般为 20), 然后将屏放下, 确定光斑处在中心位置后点击 Done 开始第二步扣背底。(详细步骤见附页)

- ✓ 扣完背底之后选择 Counted 1×模式, Capture 一张检查一下扣背底效果, 确定无误后进行下一步。
- ✓ 一般来说相机升温降温一个循环后做一次即可。
- ✓ 在对中能量过滤器以及扣背底的时候只有去掉 SerialEM 中的 Low dose 选项后可以反复的抬屏降屏, 否则在中间过程抬屏放屏会自动切换回 low dose 中设置的模式。

调机 (在碳膜位置):

在收数据的放大倍数下调机 (Record 模式)。比较稳定的情况下只需要调节 Coma free Alignment X 和 Y 以及物镜像散两项。

常规合轴:

Beam shift/Beam tilt ppX-ppY

Rotation Center/Coma free ppX-ppY

Coma free Alignment X-Y

Stigmator-Condenser/Objective

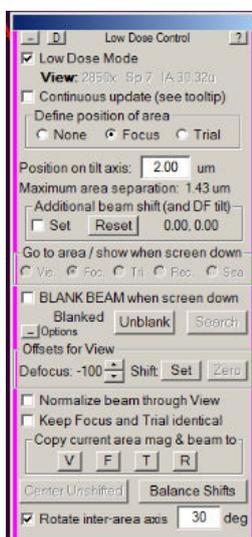
调机前摁下 Zucentric focus, 使所以 Lens 能够归一化。一般来说先在非数据收集区域的 carbon 上用 Z by V (如果已经有 Z 值可以省略这一步) 和 Z_focus 调节一下 focus, 用 FFT 环来辅助调节物镜像散, 像散调节完成后调节 Coma free Alignment X-Y, 最后返回确认物镜像散。

调节 Coma 时环突然变得很少的原因: 1-中间位置的 motion 比较大, 可以移到比较靠边的位置, 说明 carbon 的导电性比较差, 2-冰层太厚, 3-Turbo 突然开始工作, 4-碳膜有破裂;

如果样品的每一个孔都比较珍贵, 也可以选择和数据收集前试拍, 根据试拍的图像信息细致调节像散信息。

高低倍对中: 低倍下找到一个标志点, 在荧光屏上在高倍下移动 stage 将其移到中心位置, 点击 serialEM 中的 view 拍摄一张照片, 此点再次回到低倍确认标志点位置即为中心位置。(如需拍照辅助, 尽量选择 Focus 拍照, 后台无输出)

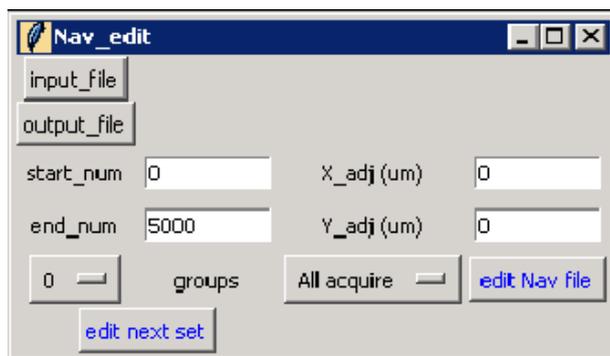
数据收集时 focus 位点设置: 将孔中心放到十字中心, 点击 Low Dose Mode 中的 Define position of area—Focus, 根据样品 hole 的大小以及 hole 之间的距离设置 focus, 调节 distance 以及角度确保 focus 位置在 carbon 上且最好在四个孔的中心位置, 防止照射到其他要拍的区域。设置完成点 None.



位置矫正:

手动选择的点与软件识别的点之间可能会有一些位置差异，需要测试偏移量，在 Serial EM 中打开选完点的 nav02 文件(已复制到本地 DoseFractions 文件夹下的对应位置)，选择 Navigator 下拉菜单中的 Acquire at points，选择 Run Script V，观察所选的点是不是在想要收集的中心位置，如果不在中心位置则需要用桌面上的 Nav_edit 小程序修改。

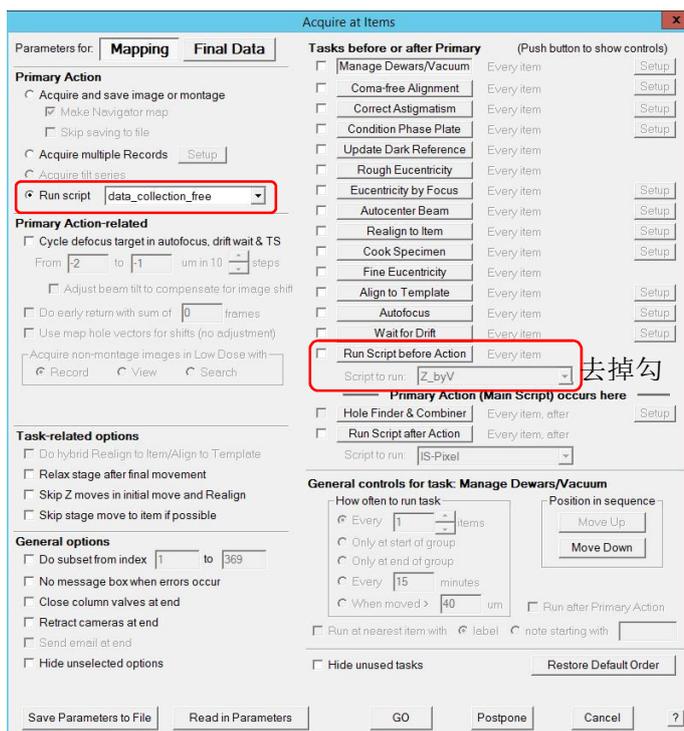
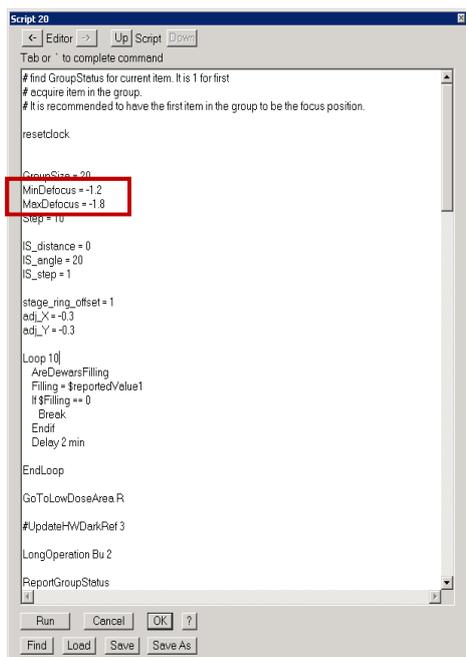
输入修改后的 X/Y 坐标值，input_file 选择 nav_02（选过点保存的那个文件），output_file 设为 nav02_1.nav（存成新的文件名，注意加上后缀），start_num 为点的起始编号，end_num 如果不超过 5000 则可以不输入，点击一下 edit Nav file。重新用 Navigator 打开修改后的 nav02_1.nav，选择 Navigator 下拉菜单中的 Acquire at points，运行 Script#V，查看修改效果，如果依然不准确则可继续修改 Nav_edit (X_adj ,Y_adj)，点击 edit Nav file 后重新打开修改后的开始检测位置信息，如果位置位置正常后可开始数据收集。



◆ 数据开始收集

勾选上 Slit in, DM 模式设为 counted, 修改 Serial EM 中的脚本 data_collection_free, 修改 Mindefocus= 和 Maxdefocus= , 输入想要收集的 defocus 范围, 设置是否下低倍, 点击 OK, 选择 Navigator 下拉菜单中的 Acquire at points, 运行 data_collection_free 即可。

✓ 注意 Script 语句中=与数值之间要有空格。



开始数据收集

```
LongOperation Bu 2  
Realign ToNavItem 0  
V  
Copy A P  
ResetImageShift  
V  
AlignTo P  
ResetImageShift  
NormalizeAllLenses  
Delay 3
```

框内语句不加#为下低倍
框内语句加#为不下低倍

选择 Navigator 下拉菜单中的 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。若要继续收集则可选择 Navigator 下拉菜单中的 Acquire at points, 运行 data_collection_free 便可。

数据收集流程:

1. 检查样品
2. 切换至 K3 相机, load setting, 确认收集倍数
3. 拍地图
4. 标记调机用 hole 和 carbon 位置, 在 carbon 上调节光路
5. 到 hole 位置测电子剂量, 设置收集参数等
6. 能量过滤器对中 (Titan#1 无此步骤)
7. K3 扣背底
8. 高低倍对中
9. Focus 位点的设置
10. 位置矫正
11. 开始数据收集 (检查一下 beam 在中心, 勾上 silt)

- SerialEM Setting 保存位置:

K3 电脑 D 盘 SerialEM-setting 文件夹

- Maps 存储位置:

K3 电脑 DoseFractions(Q:)-map-新建一个当天日期的文件夹

- 收集数据的存储位置:

K3 电脑 DoseFractions(Q:)-新建一个当天日期的文件夹