

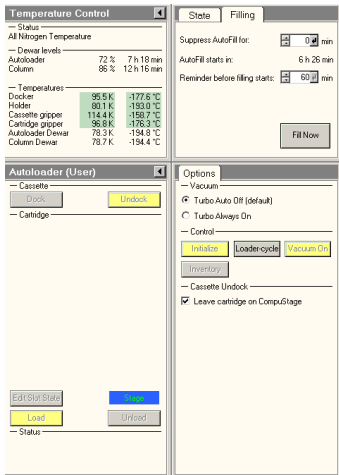
Krios#3 使用说明书-EPU

- 1 上下样及切换样品
 - 1.1 上样
 - 1.2 切换样品
- 2 EPU 页面介绍及样品快速检查
 - 2.1 EPU 界面
 - 2.2 检查样品
- 3 Acquisition and Optics 参数设置
- 4 拍 Atlas 地图
- 5 收数据前的其他准备工作
 - 5.1 光路的调试
 - 5.2 Image shift 的校准
 - 5.3 检查背底/扣背底
 - 5.4 能量过滤器的调节
- 6 自动数据收集设置 (EPU)
 - 6.1 Session Creation
 - 6.2 Session Setup
 - 6.3 The Square Selection
 - 6.4 Hole Selection
 - 6.5 Template Definition
 - 6.6 Template Execution
 - 6.7 Automated Acquisition
- 7 Multigrid Option

孙倩倩 2022 年 1 月
欢迎大家多多提意见，我们及时改进/修正

1 上下样及切换样品

1.1 上样

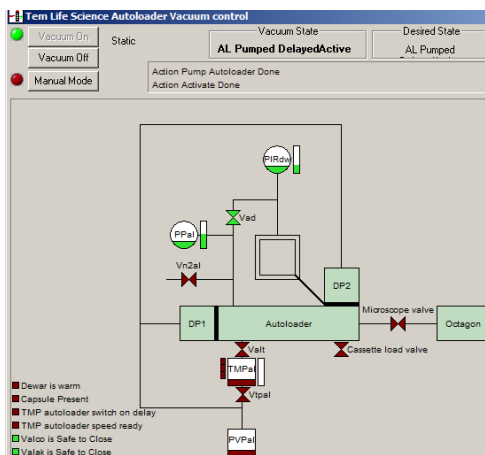


Slot characteristics	Explanation
12 Light gray color	Slot content is unknown
11 Blue color	Slot is occupied
10 Dark grey color	Slot is empty
9 Black slot number	No inventory of slot has been done by the AutoLoader hardware
8 Green slot number	An inventory of this slot has been performed by the AutoLoader 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	The stage content is unknown; no stage map has been performed
Green Stage	The stage contains no cartridge
Blue Stage	The stage contains a cartridge

上样 (Dock) 完成后要等 Autoloader 降温, Autoloader 温度显示全部变为绿色 (最好在 Docker 温度降到-170 以下), 再点击 inventory 按钮, autoloader 会先自检 cassette 上每个位置的样品情况。

1.2 切换样品

关闭镜筒阀, 打开 autoloader 中选择 Turbo Always on, 打开 TMP 的状态显示图 (Tem Life Science Autoloader Vacuum control), 等待 TMPal 泵变为绿色; TMPal 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);



TMP 泵状态示意图

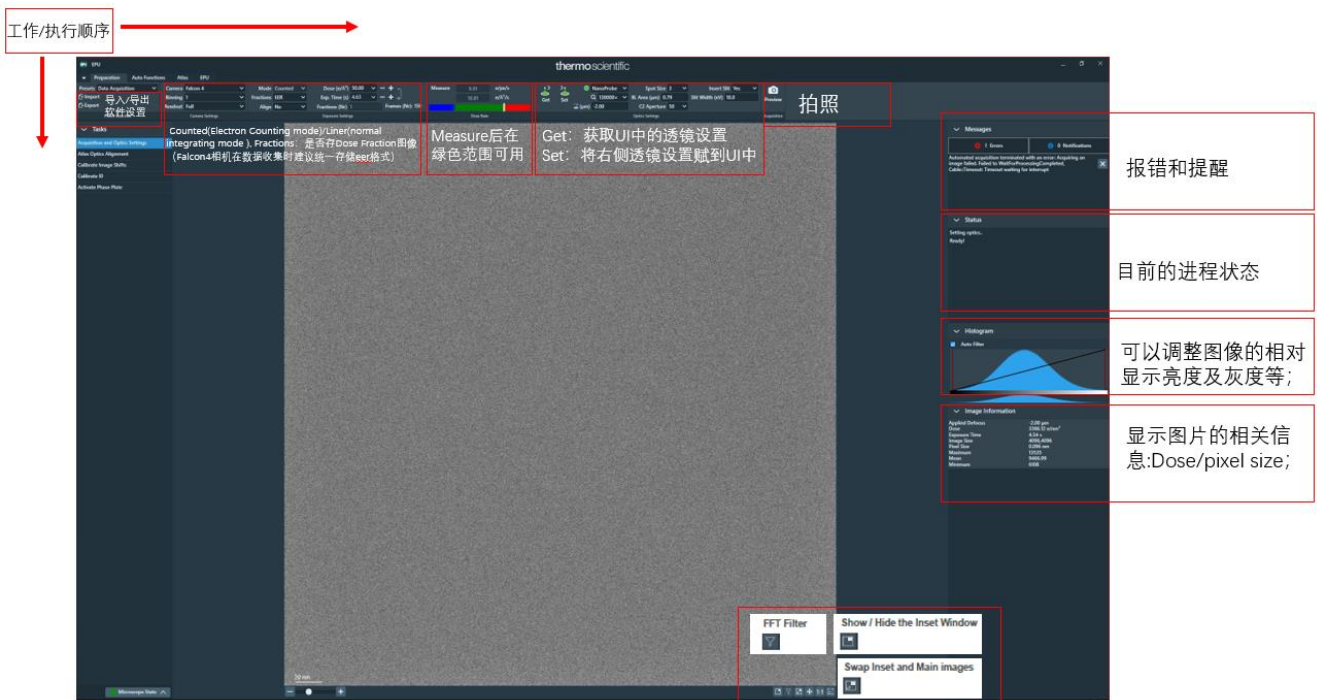
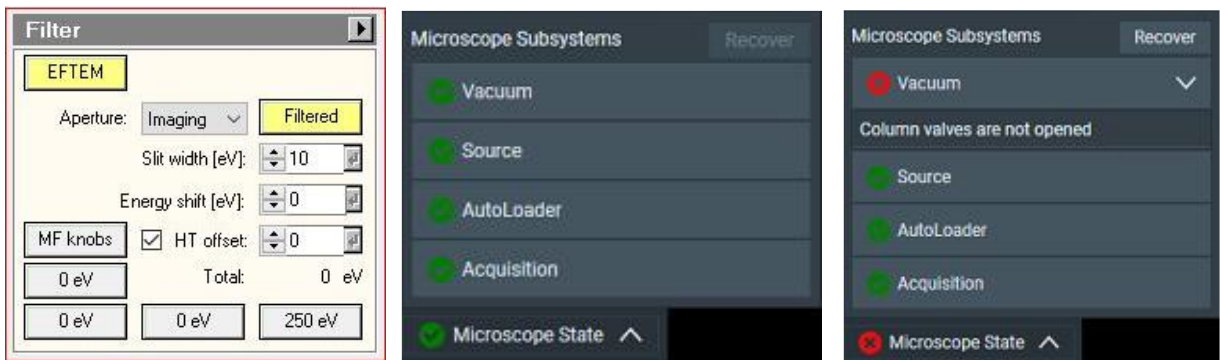
上一个样品 unload 结束以后可以选择想要观看的样品的序列号, 选中数字出现方框, 点击 load 按钮 (同理, 由橙变黄代表上样完成); 上样完成后, 可关闭 turbo 开始检查样品 (选择 Turbo Auto off-default);

2 EPU 页面介绍及样品快速检查

2.1 EPU 界面

打开 EPU 软件 (打开 EPU 软件前确保 UI 中的 low dose 是灰色关闭状态, 如果用过滤器后面的 Falcon4 成像, 则注意 UI 中的 EFTEM 为打开的黄色状态);

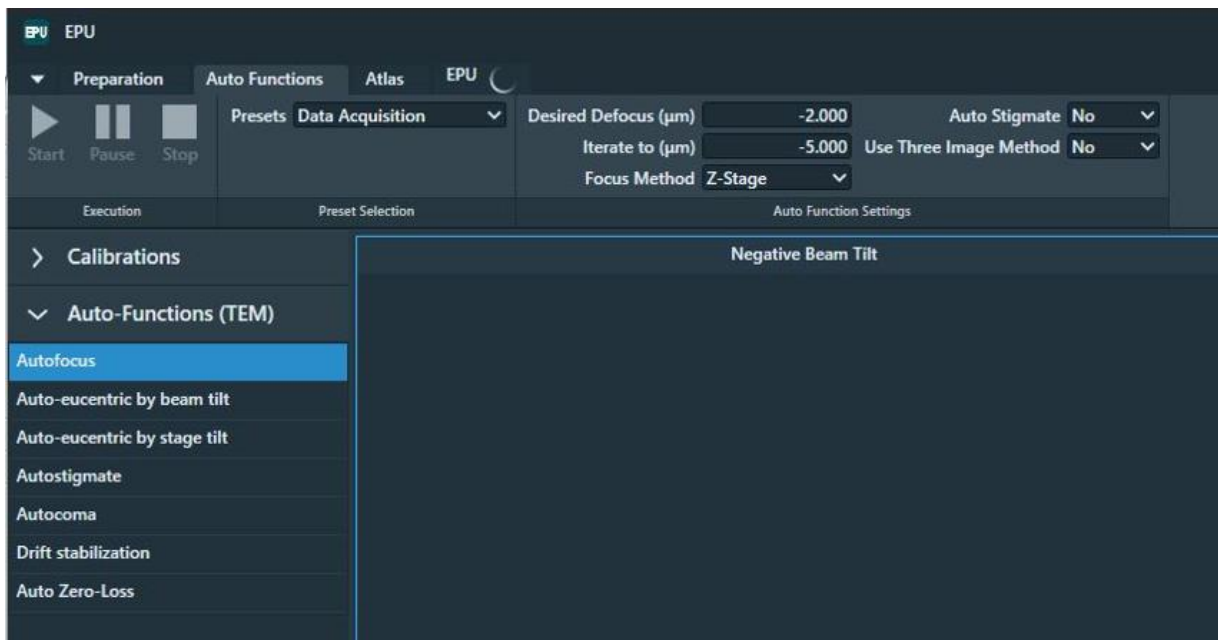
检查 EPU 里面 Microscope State 是不是绿色的, 若不是绿色, 点开看下具体的提醒, 部分提醒可以直接点击 recover;



2.2 快速检查样品情况

a) 调节 eucentric height:

将 stage 移动到感兴趣的 square, The Auto Functions Tab> Auto Functions > Auto Functions (TEM): 分别做 Auto-eucentric by beam tilt (Hole Eucentric 倍数) 和 Autofocus (autofocus 倍数, 膜上做), Desired Defocus 可以输入收数据常用的值即可;



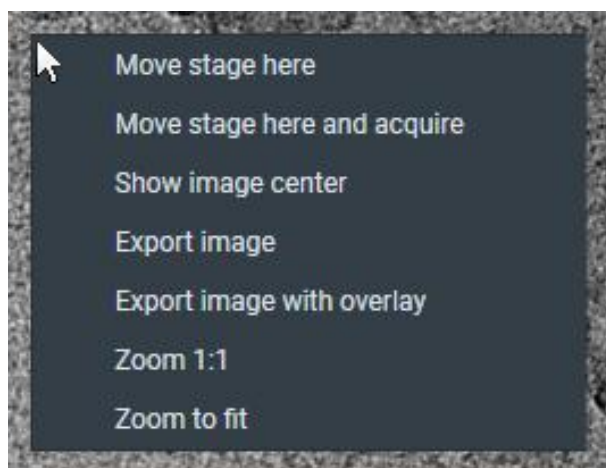
b) 拍摄图像:

Preparation>Acquisition and Optics>hole eucentric>preview, 右击选择一个要拍照的孔, 点击 move stage here and acquire, Acquisition and Optics>Data Acquisition>preview, 查看该位置图片质量;

c) 数据保存, 右击图像即可选择 Export。

Export image 保存图像的原始分辨率;

Export image with overlay 可保存带有标尺或者标志的信息, 只能保持展示的分辨率, 会比原始图片的信息要少。



3 Acquisition and Optics 参数

主要包含 3 个信息：Camera Settings、Optics Settings.、Advanced camera and/or exposure settings;

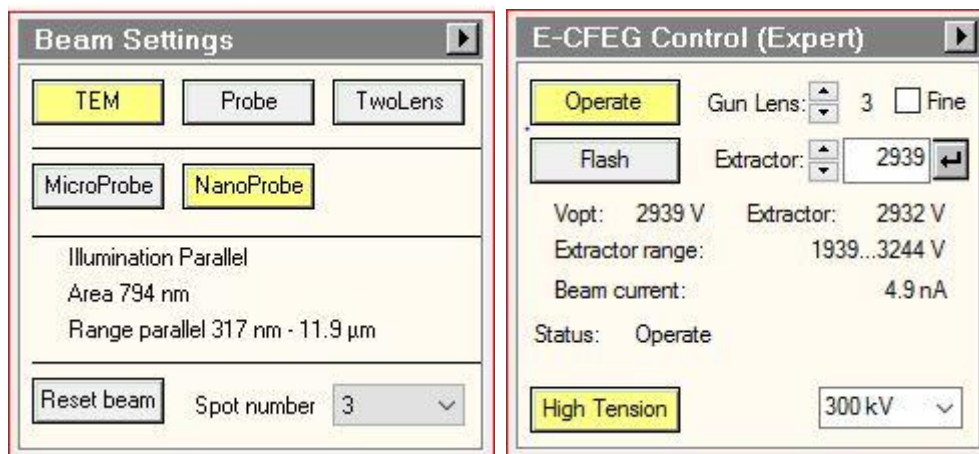
EPU>Preparation > Acquisition and Optics 参数设置：

Presets	功能及设置要求	建议设置
Atlas	低倍下拍地图拼图用，拍出来的图片要能看出来冰层厚度，尽量选 LM 的较低倍数（图像的四周不能被阻挡）；	Microprobe low LM(LM155X-LM200X) Illuminated Area: $\pm 800 \mu\text{m}$ (Parallel beam) Binning: 1 Readout: Full Linear mode C2: $150 \mu\text{m}$ Defocus= $-500\mu\text{m} \sim -1000\mu\text{m}$
GridSquare	拍单个的 square，该设置下应该看到一个清晰且完整的 square；	Microprobe Binning: 1 Readout: Full Linear mode C2 尽量与 data acquisition 一致 Defocus= $-50\mu\text{m} \sim -500\mu\text{m}$
Hole/EucentricHeight	在自动收集过程中用来做 Auto-eucentric Height，以及获得低剂量的图像定位等功能。对于 Quantifoil 的样品的话需要至少看到包含一个完整的孔，且该视野需要包含碳膜可以用来做 Auto-eucentric，衬度要能够清晰分辨孔的边缘，	Nanoprobe low SA mag Defocus: $-10 \sim -50\mu\text{m}$. 剂量在 $0.1 [e^- / \text{\AA}^2\text{sec}]$ 以下 Binning: 1 Readout: Full C2 光阑保持与 data acquisition 一致
Data Acquisition	数据收集	Nanoprobe Parallel beam

		<p>Magnification 根据需要的 pixel size 设置</p> <p>Illuminated Area 尽量小但要保证能覆盖相机成像面积且四周没有条纹</p> <p>Spot Size 匹配成像面积达到合适的剂量,</p> <p>Defocus: -2um (只是前期在这个设置进行 preview 有效, 真正收数据的 defocus 在 EPU 的收集里面设置)</p> <p>Binning: 1</p> <p>Readout: Full</p> <p>C2 光阑尽量选比较小的尺寸(有条件的话 50um/70um);</p> <p>Measure dose要在绿色范围 (Falcon4相机为4-10e/px/s), measure后可以直接点/选需要的Dose(e/A²)</p>
Autofocus	自动收集过程中 autofocus 功能的实现;	<p>透镜的设置与 Data Acquisition 保持一致;</p> <p>Binning: 2</p> <p>Readout: Half</p>
Drift Measurement	自动收集过程中执行 drift 参数测量;	<p>透镜的设置与 Data Acquisition 保持一致;</p> <p>Binning: 1</p> <p>Readout: Half</p>
Thon Ring	该参数用来单独执行 Autocomo 和 Autostigmatate 功能, 参数设置要使得图像的 FFT 清晰可见; 自动收集过程中用不到相关参数;	<p>透镜的设置与 Data Acquisition 保持一致;</p> <p>Defocus: -1 mm and -3 mm</p> <p>Binning: 2</p> <p>Readout: Full</p>
Zero Loss (only for EFTEM mode)	电镜在 EFTEM 模式下运行时自动找零峰;	保持与 Data Acquisition 保持一致;

注意要点:

- 除 Atlas 以外, 其他几个预设的参数设置请保持用与 Data Acquisition 一样的 spot size 和 C2 aperture;
- 所有的预设参数保持在平行光范围(Illuminated Area), 可在UI下的Beam settings下查看是否为平行光;
- 设置Data Acquisition参数的时候注意measure时查看UI中 E-CFEG Control的Beam current值, 尽量在5.0nA左右(该冷场的电子枪的电流值是一个范围, 尽量在范围的中段做完dose measurement), 在合适的剂量测完剂量后即可设置Data Acquisition所需要的Dose(e/A²); Measure的时候要在空的地方才准确;
- 可以通过调节不同的Spot size、C2 Aperature等结合以找到合适的光照面积及所需剂量, 先确认Data Acquisition所需的Spot size, 然后再去调节其他几组倍数的透镜参数;
- E-CFEG在自动数据收集过程 (EPU、Tomography) 中~4hr自动做一次Flash, 如果在前面的检查/准备过程发现Status显示Flash is advised, 可关闭镜筒阀然后点击Flash, 待Beam current值重新检测到后继续使用;

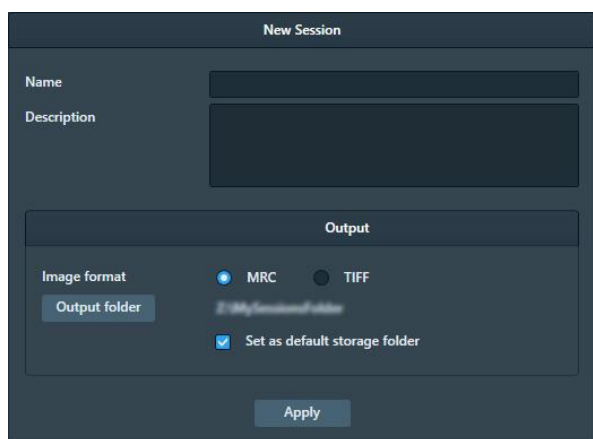


4 拍 Atlas 低倍下的地图 The Atlas Tab

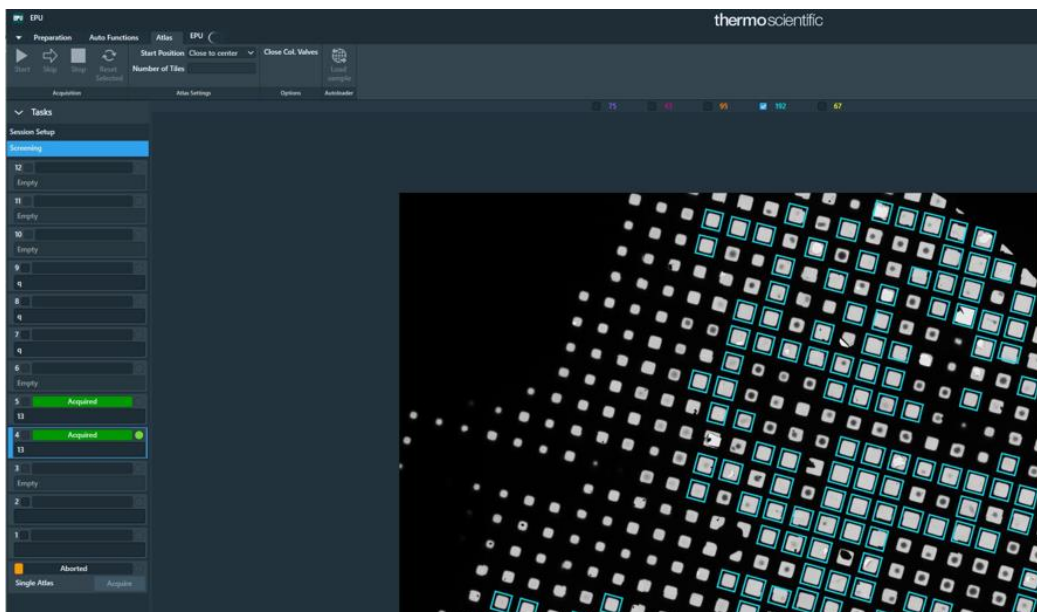
拍之前先找到 The Preparation Tab >The Acquisition and Optics Settings task >Atlas >preview, 拍一张图片确认照片四个角没有被遮挡;

新建 Atlas 地图任务:The Atlas tab > Session Setup task>New Session>输入 Name>Apply;

图片格式默认 mrc, 位置默认选择 Z 盘的 Atlas 文件夹下;



拍摄Atlases: Atlas > Screening task>勾选一个或多个要拍的slot位置>start; 拍摄过程中可双击看已拍摄的位置地图情况;



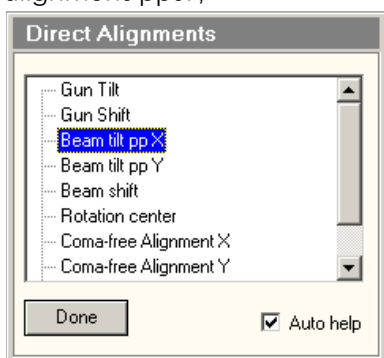
Close to center从样品的中心位置开始拍； Close to current从stage所在的位置开始拍；

Number of tiles可自定义拍摄小地图的数量； 若以上参数不定义默认拍整个网子；

5 收数据前的其他准备工作

5.1 光路的调试

- 移动到碳膜位置，找到EPU的The Auto Functions Tab Auto Functions > Auto Functions (TEM): 分别做Auto-eucentric by beam tilt (Hole eucentric倍数) 和Autofocus (autofocus倍数), Desired Defocus输入收数据常用的值即可； 保证该位置在正确的Eucentric height
- 结束后把光路切换到Data acquisition的倍数，放下荧光屏，摁控制面板上的eucentric focus按钮，在荧光屏依次调节： beam tilt ppX, beam tilt ppY, beam shift, coma-alignment pptX, coma-alignment pptY;

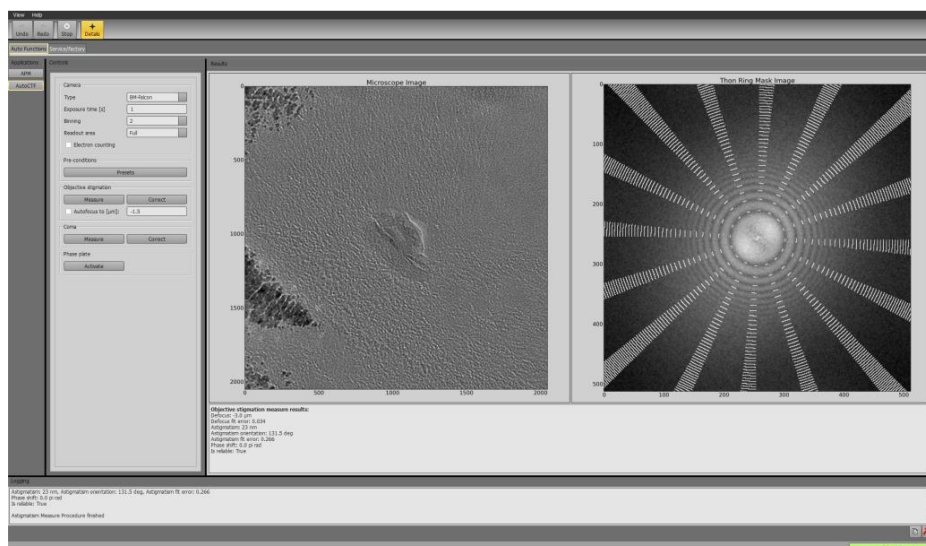


- 抬起荧光屏，在sherpa软件找到AutoCTF准备调节stigmator和coma;

Objective stigmation下点击measure按钮，观察白色虚线是否能正确识别FFT环，若不能需要检查下该位置是否已在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；

若能正确识别且测出来的defocus在想要的defocus附近则可以进行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的校准（<160nm），coma校准结束后返回再检查下Stigmation(<5nm)；



5.2 Image shift的校准

EPU>The Preparation Tab>Calibrate Image Shifts

准备工作：在正确的Eucentric高度上做，先在较低的倍数下(grid square或者hole eucentric)找到一个标志点，然后切换到Data acquisition倍数下，在荧光屏上将标志点放到中心位置；

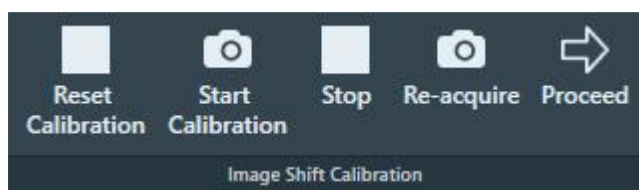


Image Shift Calibration > Start Calibration，第一张左图为Data acquisition倍数下的照片，可以双击易识别标志位置，点击Re-acquire，点击Proceed依次取得每个倍数的图像，若标志位置不在十字位置则点击Re-acquire，若在则点击Proceed依次完成各倍数之间的校准；

5.3 检查背底/扣背底(空的位置)

检查背底是否可用：

移动到空的位置，EPU>The Preparation Tab>The Acquisition and Optics Settings task>Data

acquisition,收数据的倍数下, 用Data acquisition参数preview拍一张照片, 检查这张图片的FFT是否有杂信号;

然后将这张图片右击选择export Image另存为mrc文件, 在电脑上找到thermoscientific ImageInspector软件, 将mrc图片另存为bmp文件;

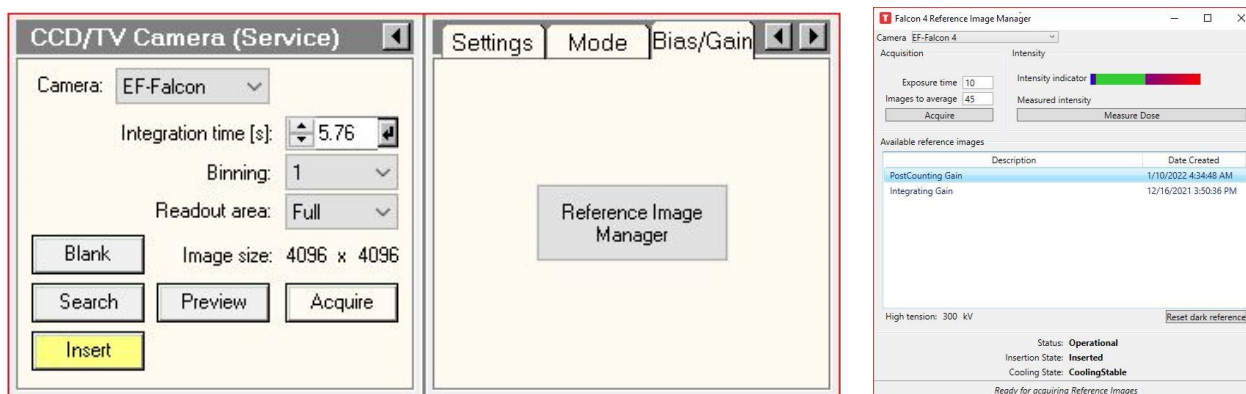
在TEM Image Analysis软件中打开bmp图片, 选择correction-Auto correction, 看图片是否均匀, 若有杂条纹则需要重新区背底;



去背底:

UI>Camera>Bias/Gain>Reference Image Manager> PostCounting Gain>Acquire;

若使用4-6e/px/s, 可以在Reference Image Manager点measure dose后去背底, 如果剂量6-10e/px/s, 则直接在EPU/或者Tomography软件中点击measure dose即可, 超过6在Reference Image Manager会显示dose too high! Exposure time可以选择收数据的曝光时间或者默认的10都可以;

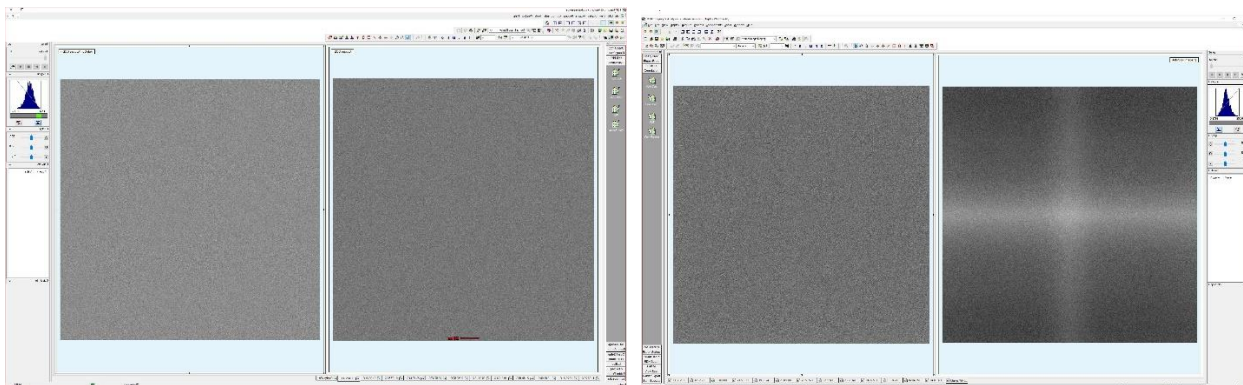


去背底结束后再次检查背底是否良好, 如果良好则可将背底拷贝到offload文件夹中当日日期下, 数据开始收集以后也拷贝一份到自己收数据的文件夹;

Windows(C:)>Titan>Data>EF-Falcon4>Reference Images>300kv

This PC > Windows (C:) > Titan > Data > EF-Falcon4 > Reference Images > 300 kv

Name	Date modified	Date	Type	Size	Ta
20220110_043451_EER_GainReference.gain	1/10/2022 4:34 AM	1/10/2022 4:34 AM	GAIN File	33,560 KB	
20220110_043451_EER_GainReference.gain.bt	1/10/2022 4:34 AM	1/10/2022 4:34 AM	Text Document	1 KB	
gain_post_ec.raw	1/10/2022 4:34 AM	7/1/2021 11:13 AM	EM Image	65,537 KB	
gain_post_ec.raw.bt	1/10/2022 4:34 AM	1/10/2022 4:34 AM	Text Document	1 KB	
gain_normal.raw	12/16/2021 3:50 PM	6/23/2021 11:41 AM	EM Image	65,537 KB	
gain_normal.raw.bt	12/16/2021 3:50 PM	12/16/2021 3:50 PM	Text Document	1 KB	

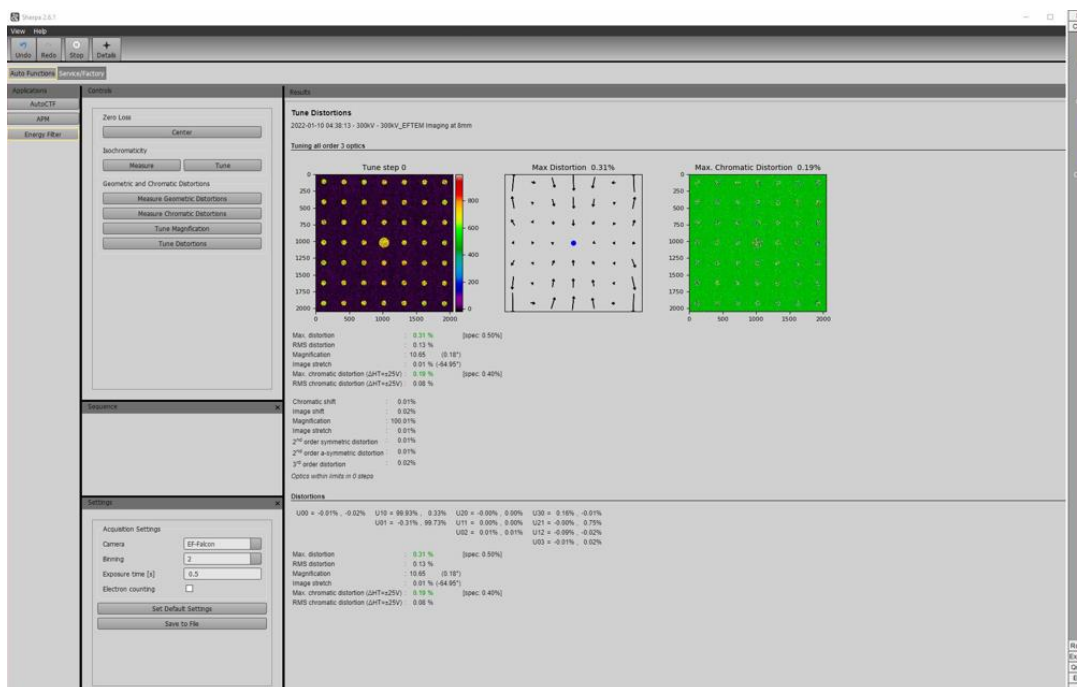


左图为正常的背底，右图情况需要重新做一次背底；

5.4 能量过滤器的调节

能量过滤器的调节在Data Acquisition的设置下，空的地方；

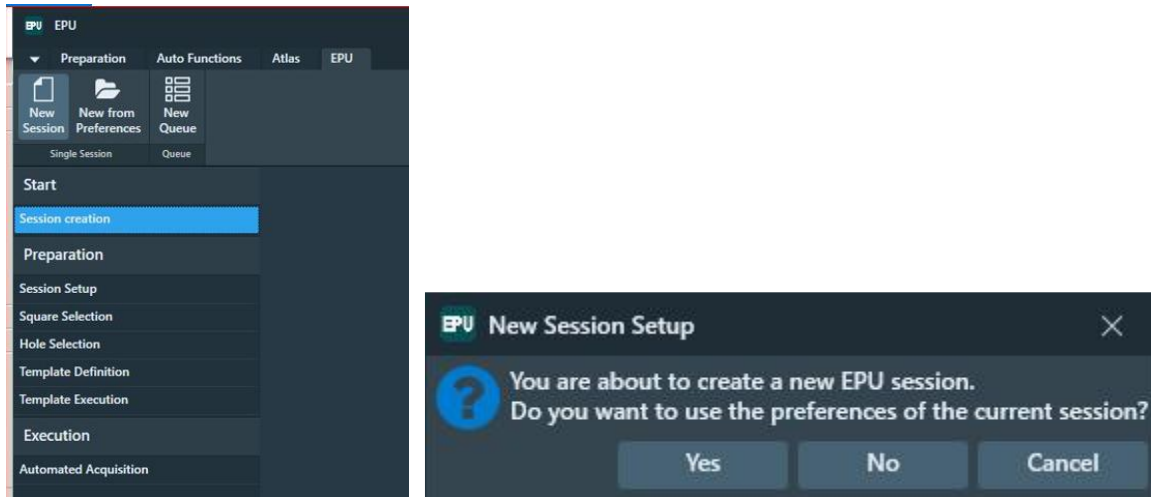
- 在sherpa软件找到Energy Fiter， 点击Center找到零峰， 若最后的数值不在0左右则再次点击；
- 依次点击Isochromaticity的measure和Measure Chromatic Distortions， 若测出来的结果为红色(大于spec数值)， 则需要点对应的Tune按钮， 若测出来的结果为绿色 (小于spec数值) 则为通过；



6 自动数据收集设置 (EPU) The EPU Tab

6.1 Session Creation

EPU > Session Creation > New Session/New from preferences



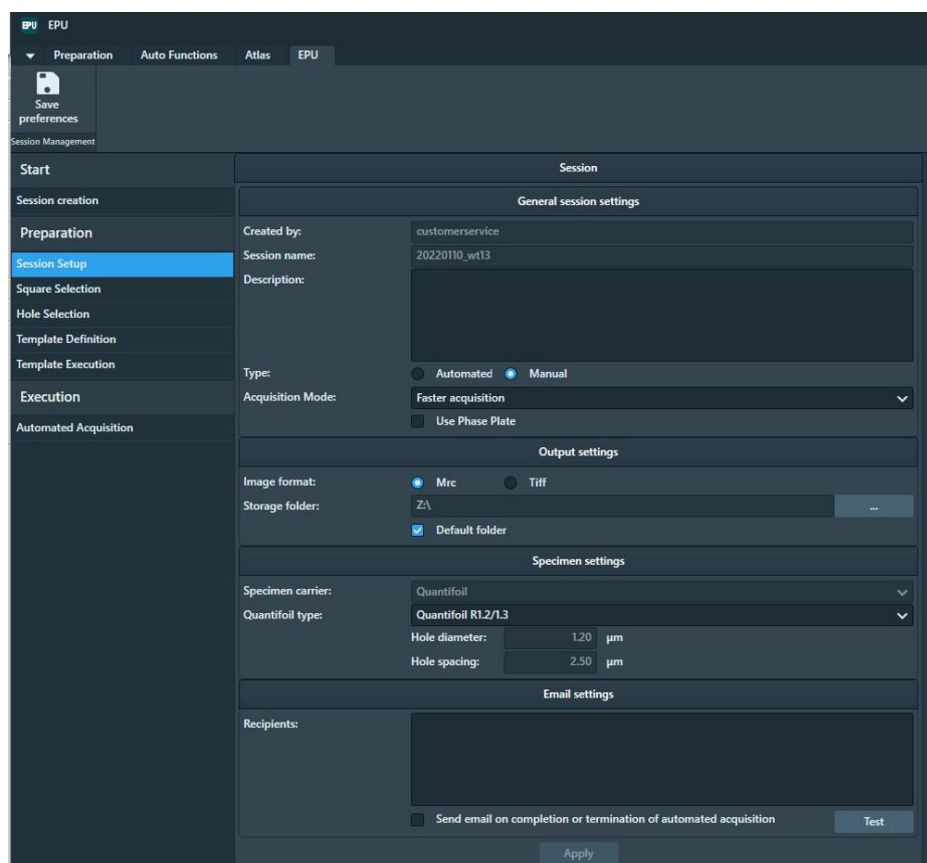
Yes: 新建一个EPU任务，大多数设置与上一个EPU任务相同的设置；

No: 完全新建一个EPU任务

Cancel: 取消新建

6.2 Session Setup

EPU > Session Setup >Apply



Session name: 存储数据的文件夹名字，建议日期_姓名_其它；

Type: Automated 通过过滤器和算法自动检测、评估和选择合适的区域； Manual: 必须手工挑选合适的区域；

Acquisition Mode: Accurate Hole Centering 每一个孔都通过移动stage精确寻找； Faster Acquisition 为在同一个组内的孔通过image/beam偏移寻找；

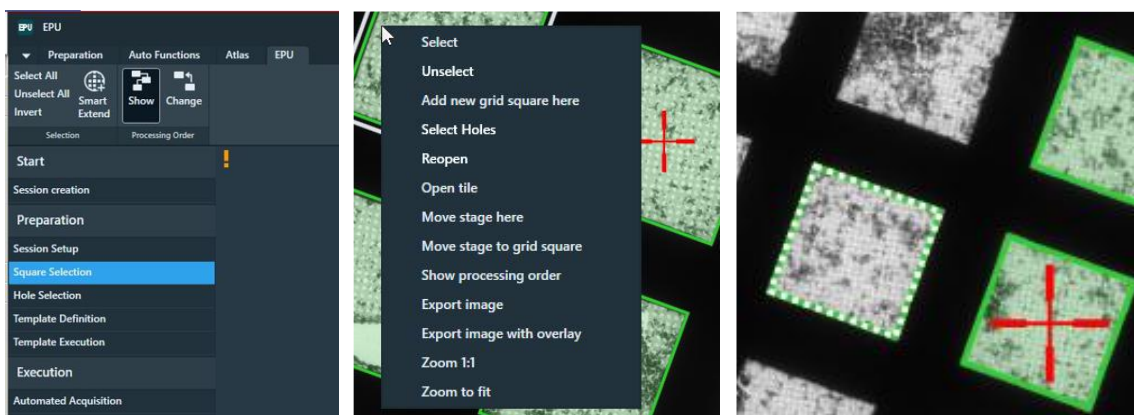
Image Format/Storage folder 默认设置mrc和Z盘（Falcon4的服务器）；

Specimen carrier: Lacey Carbon or Quantifoil

Quantifoil type: 选择存在的规格，若选项没有则选择Custom然后手动输入hole diameter and spacing 即可；

6.3 The Square Selection

EPU > Square Selection



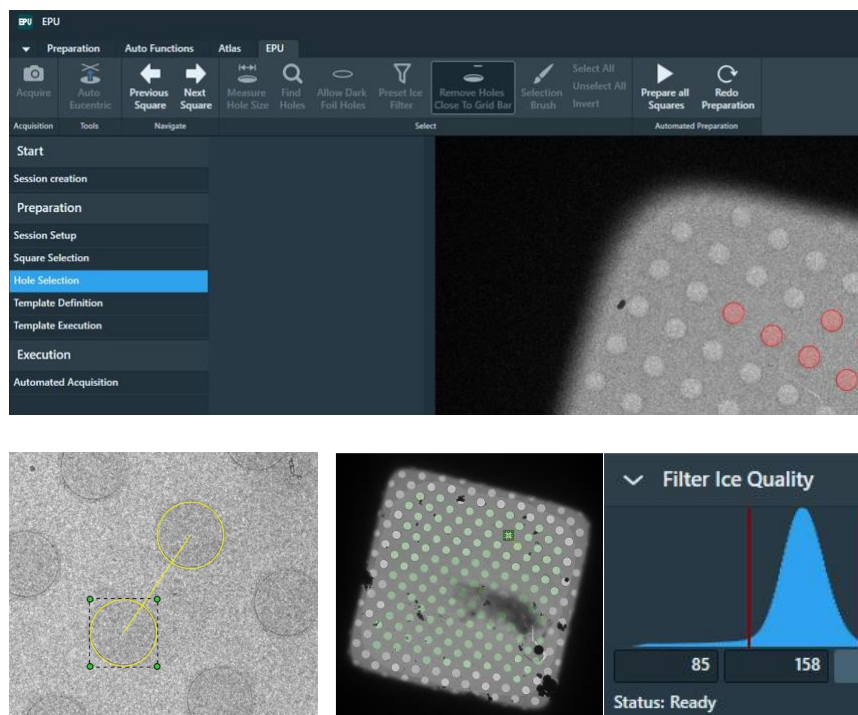
show显示选择的先后顺序，change可以改变顺序；

选择合适的square，右击select/unselect；

绿色虚线的为根据已选的square进行推荐；

6.4 Hole Selection

The Hole Selection task for Quantifoil specimens



选择合适的square，右键选择Select Holes，Auto Eucentric，Measure Hole Size，Find Holes。

可以通过调节Preset Ice Filter选择不同厚度的冰层；

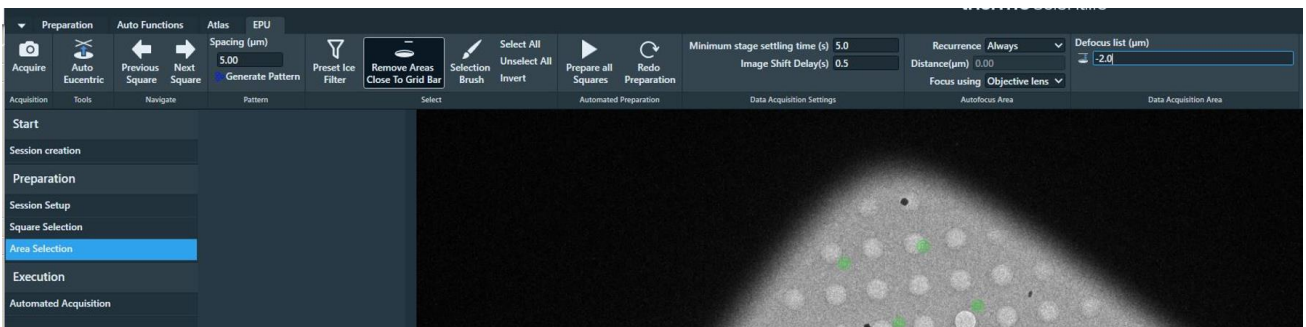
Remove Holes Close To Grid Bar 去掉靠近网格的孔；

Selection Brush 用来擦除已选定区域的橡皮擦，按shift+滚轮可调节橡皮擦的大小；

Prepare all Squares 可将所有已选的square自动做Eucentric高度的调节并获得square的照片，然后手动点Previous/Next Square即可对每一个Square进行孔的挑选/确认；

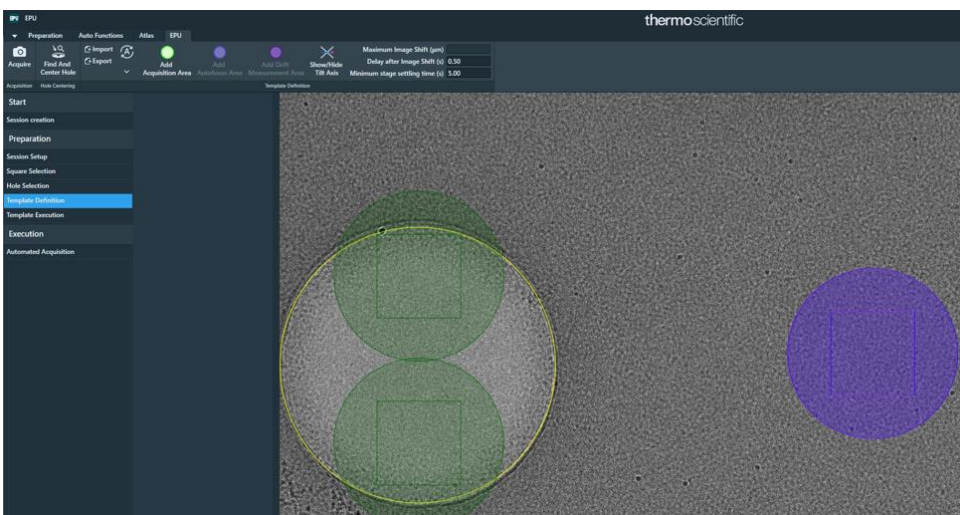
Area Selection task for Lacey Carbon specimens:

右键选择合适的square，然后点击select Areas；做Auto Eucentric，输入需要设置的间隔距离，选择Generate Pattern进行即可自动选点；其他选项的使用说明参考quantifoil样品的设置；

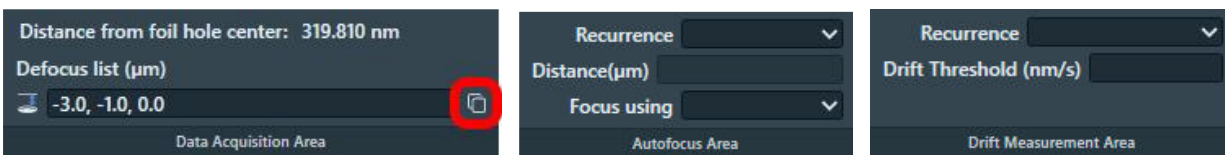


6.5 Template Definition

The Template Definition task for Quantifoil specimens



Acquire拍一张照片，Find And Center Hole找到孔的中心位置并居中；



Add Acquisition Areas 在图片上点击拍摄的位置，根据实际情况一个孔可拍一张或多张，Defocus List 数值需要以,隔开，一个位置若有多张Acquisition则点击Copy defocus list to all areas将目标的defocus值赋给所有区域；

Add Autofocus Area，在图片上点击需要做autofocus的位置，一般选在膜上，

Recurrence:

Never: 从来不做Autofocus

Always: 每个位置都做；

After Distance: 超过设定的距离以上做；

After Centering: 孔的位置居中一次为一组，一组做一次；（若选faster模式，直接选这个）

Focus using:

Objective Lens 改变Z高度对应的焦平面；

Stage Z axis改变Z高度；

Add Drift Measurement Area，在图片上点击做drift测量的位置，一般选在非数据收集区域，可与autofocus位置重合；

Always为每次stage移动后都做，Once per GridSquare:一般情况下一个square做一次即可；

Drift Threshold默认的0.2或者0.3即可；

6.6 Template Execution 在定义的位置试拍

EPU tab > Template Execution> Preview

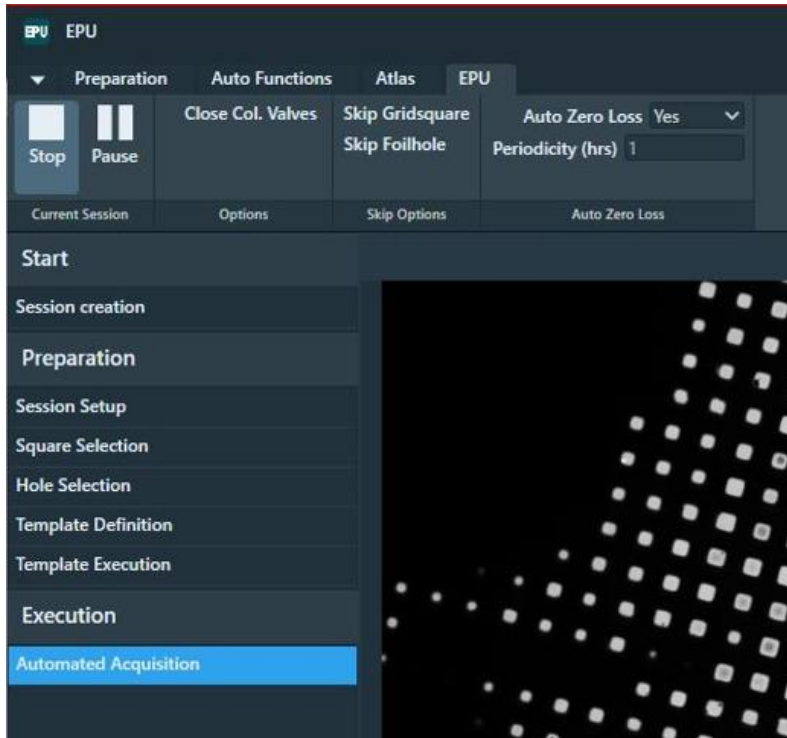
6.7 Automated Acquisition

EPU tab > The Automated Acquisition task

Close Col.Valves结束后自动关闭镜筒阀门；

Skip Gridsquare 跳过正在拍摄的square； Skip Foilhole 跳过正在拍摄的孔；

Auto Zero Loss 是否自动找零峰； Periodicity(hrs) 如果自动找零峰则设置频率；



7 The EPU Multigrid Option

Preparation > Calibrate I0 > Remove I0 Measurements

Atlas > Screening, 每一个要用的样品都需要拍atlas, New Queue;

Queue > Max Exposures

Queue					
Slot	Session Name	Status	Gridsquare Progress	Completed Exposures	Max Exposures
1	MultiGrid01	Planned	0/30	0	<input type="text"/>
2	MultiGrid02	Planned	0/45	0	<input type="text"/>