

Krios#3 使用说明书-EPU

1	上下样及切换样品	2
1.1	上样	
1.2	切换样品	
2	EPU 页面介绍及样品快速检查	3
2.1	EPU 界面	
2.2	检查样品	
3	Acquisition and Optics 参数设置	5
4	拍 Atlas 地图	7
5	收数据前的其他准备工作	8
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)	13
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	18

孙倩倩 2022 年 1 月

郑森 2024 年 1 月 更新

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

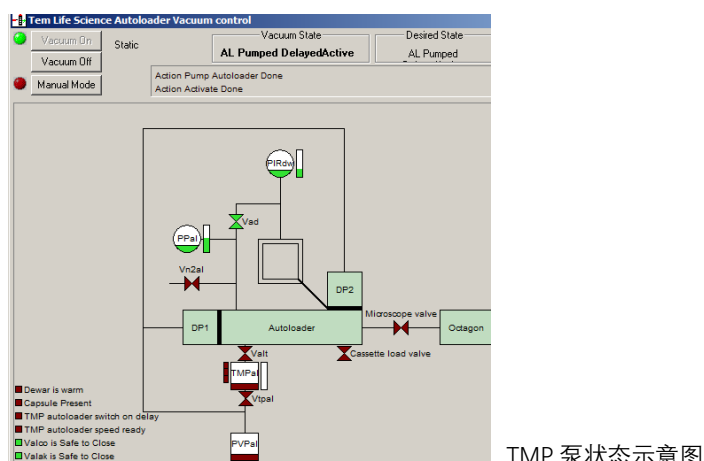
1.1 上样

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 (Unknown)	The stage content is unknown; no stage map has been performed
Stage (Green)	The stage contains no cartridge
Stage (Blue)	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

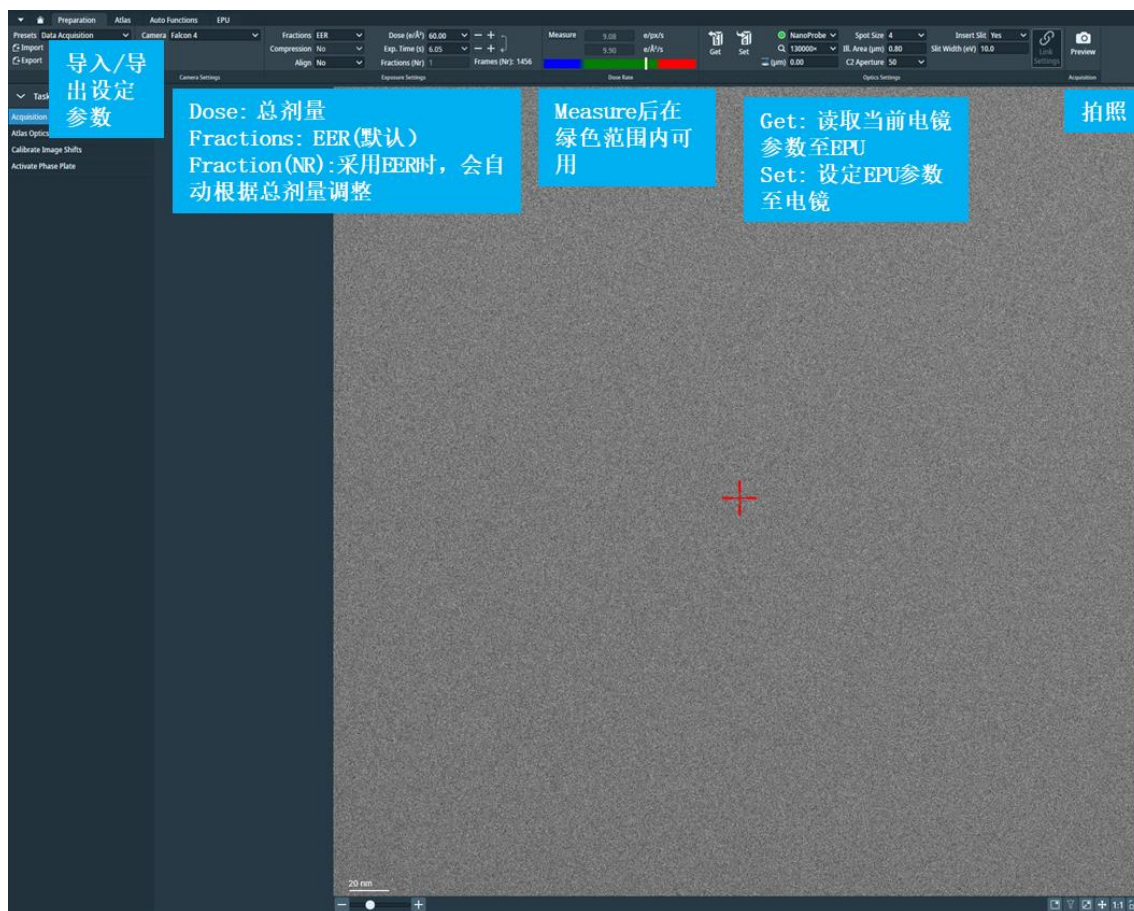
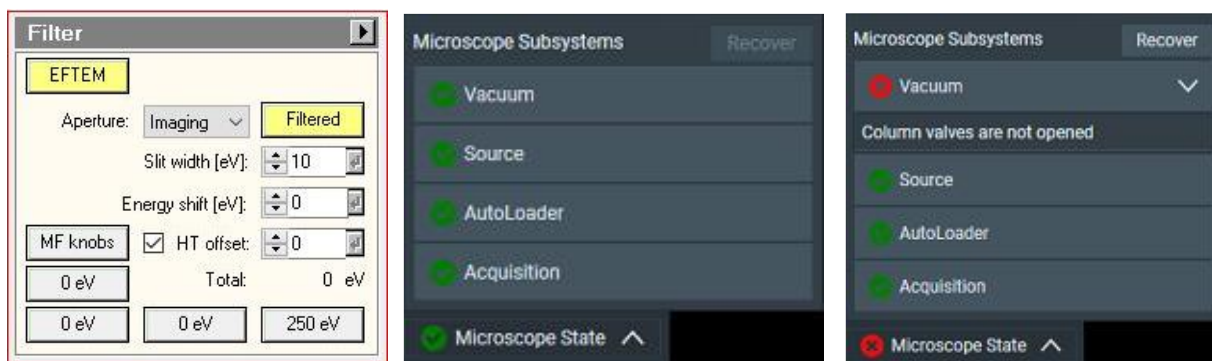
上一个样品 unload 结束以后可以选择想要观看的样品的序列号, 选中数字出现方框, 点击 load 按钮 (同理, 由橙变黄代表上样完成); 上样完成后, 可关闭 turbo 开始检查样品 (选择 Turbo Auto off-default);

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);

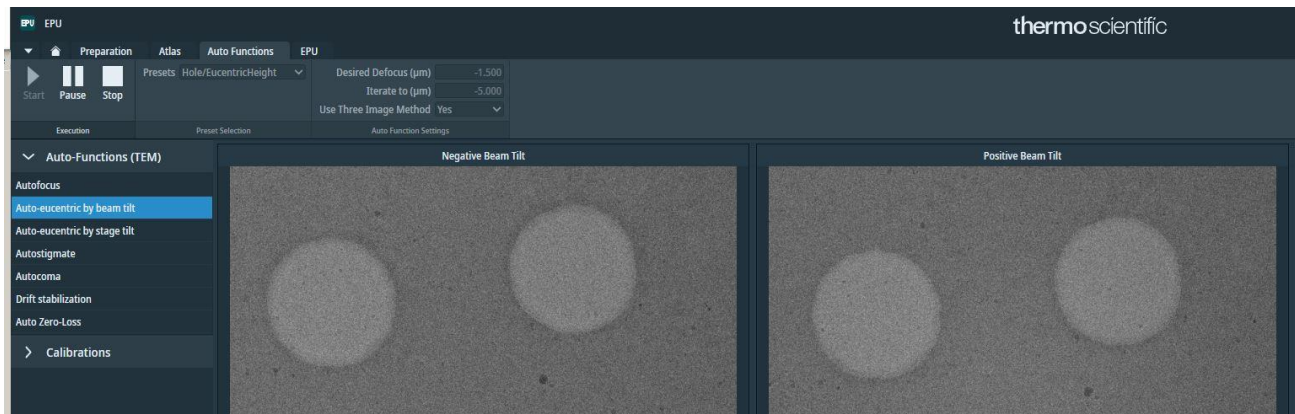
检查 EPU 里面 Microscope State 是不是绿色的, 若不是绿色, 点开看下具体的提醒, 部分提醒可以直接点击 recover;



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): 分别做一次 **Auto-eucentric by beam tilt** (Hole Eucentric Presets) 和 **Autofocus** (autofocus Presets, 膜上做), Desired Defocus 可以输入收数据常用的值即可;



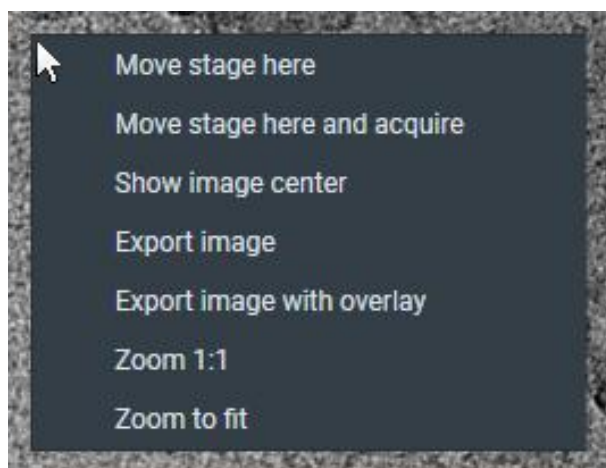
b) 拍摄图像:

Preparation>Acquisition and Optics settings>**hole eucentric**>preview, 右击选择一个要拍照的孔, 点击 move stage here and acquire, Acquisition and Optics settings >**Data Acquisiton**>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;

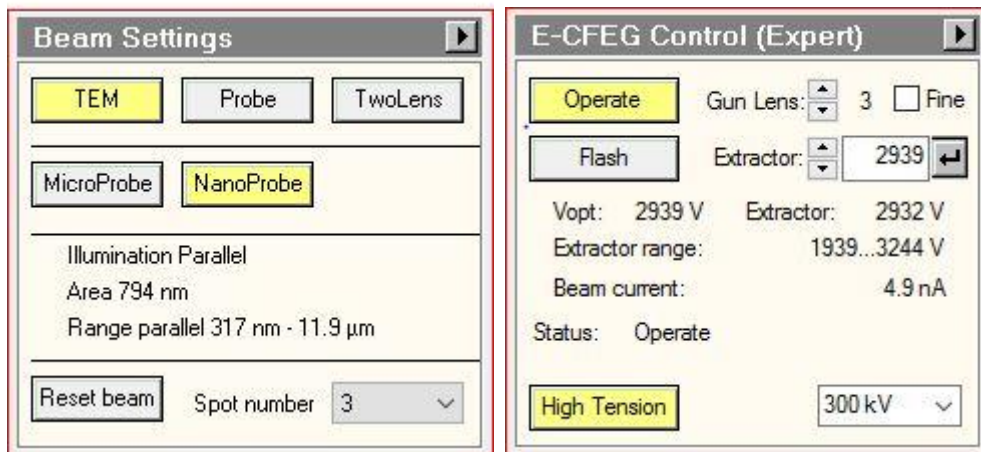
EPU>Preparation > Acquisition and Optics settings 参数设置：

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>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> <p>Link settings: 点选后, 自动将Autofocus至Zero Loss条件对其至Data Acquisition</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 Autocoma 和 Autostigmatte 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-CEFG 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, 可关闭镜筒愕然然后点击Flash, 待Beam current值重新检测到后继续使用;

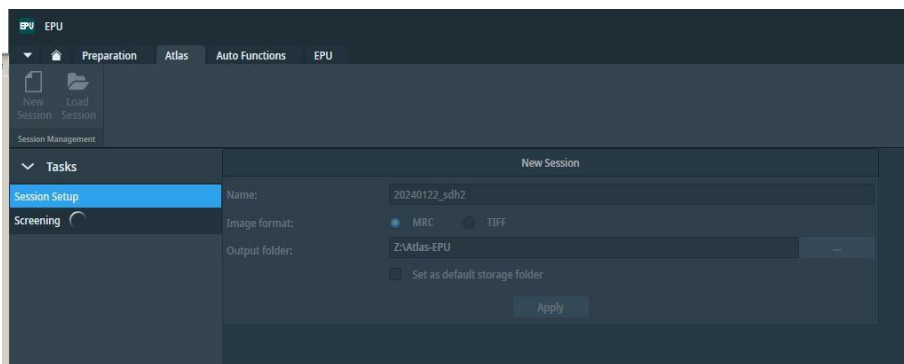


4 拍 Atlas 低倍下的地图 The Atlas Tab

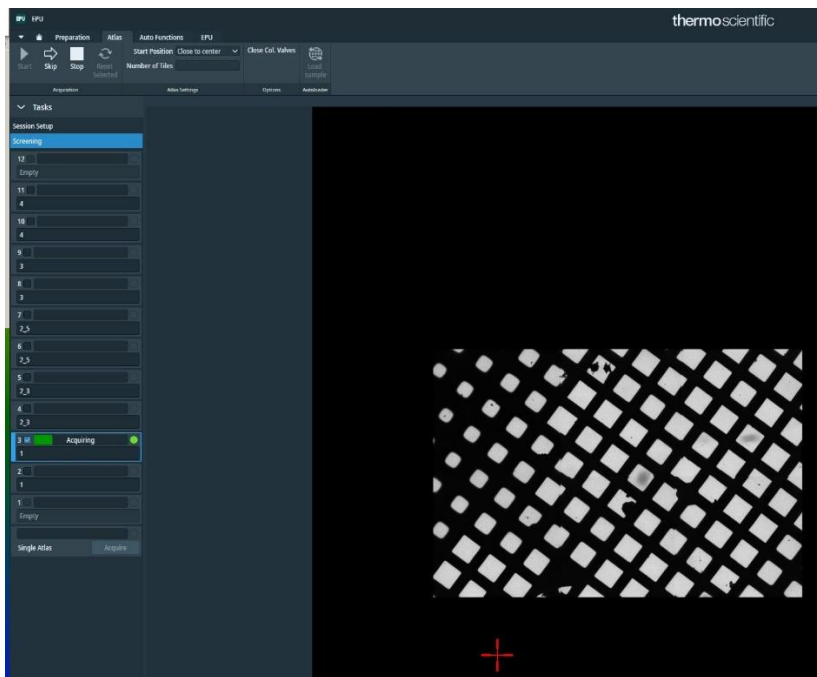
拍之前先找到 Preparation > The Acquisition and Optics Settings task > Atlas > preview, 拍一张图片确认照片四个角没有被遮挡;

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

图片格式默认 mrc, 位置默认选择 Z 盘的 Atla-EPU 文件夹下;



拍摄 Atlases: Atlas > Screening > 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;



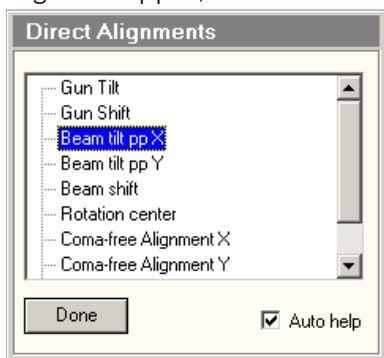
Close to center从样品的中心位置开始拍； Close to current从stage所在的位置开始拍；

Number of tiles可自定义拍摄小地图的方格，如设9（3x3）块方格；若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;



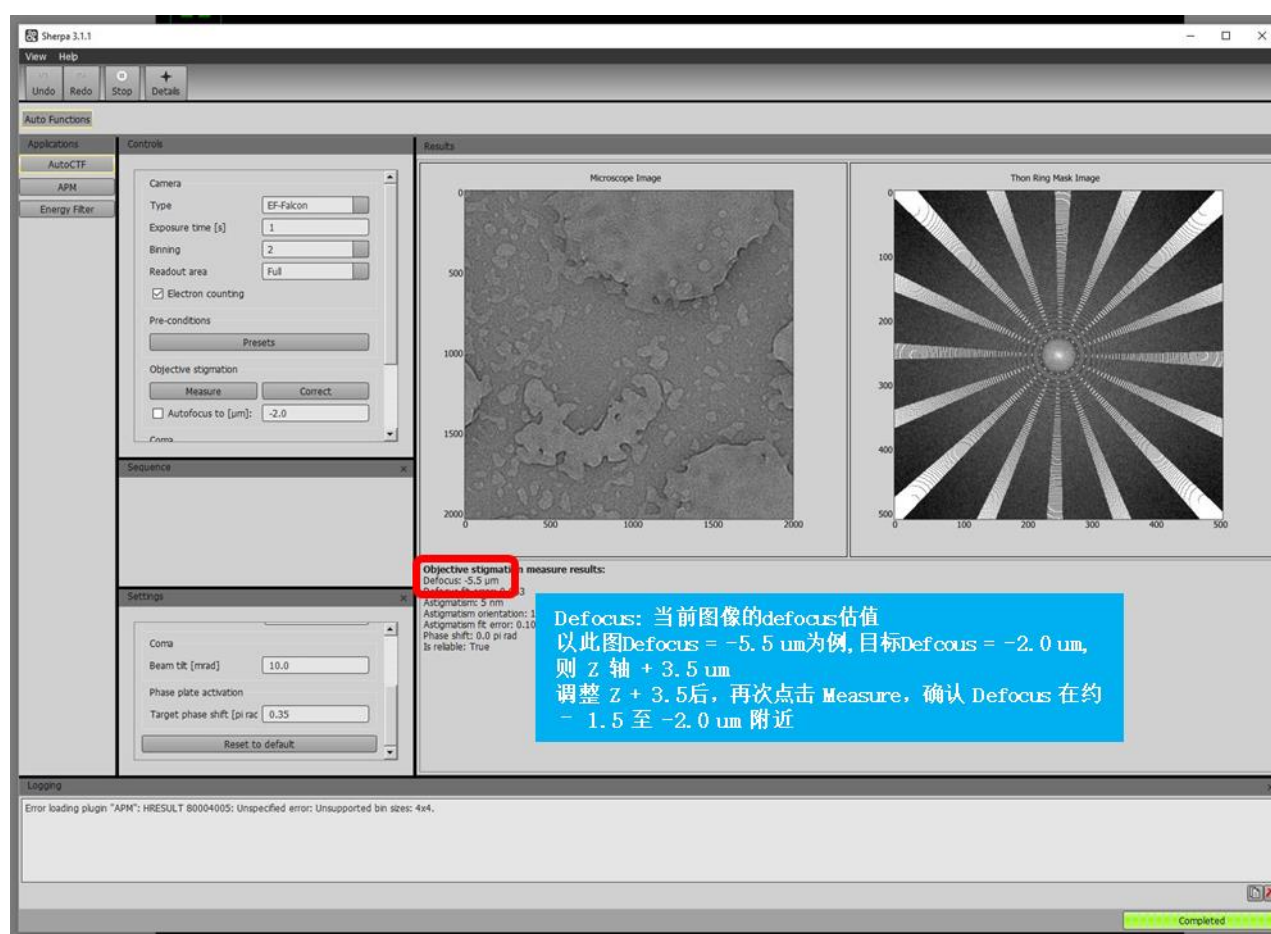
c) 抬起荧光屏，在sherpa软件找到AutoCTF准备调节stigmator和coma;

通过底部任务栏，或C:\Thermo_Scientific\Python\envs\AutoStar3104_6\Scripts\sherpa.exe，Run as Administer，打开Shpera，

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；可参考下图示例

若能正确识别且测出来的defocus在想要的defocus附近(一般是-1.5~-2.0 um)，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；

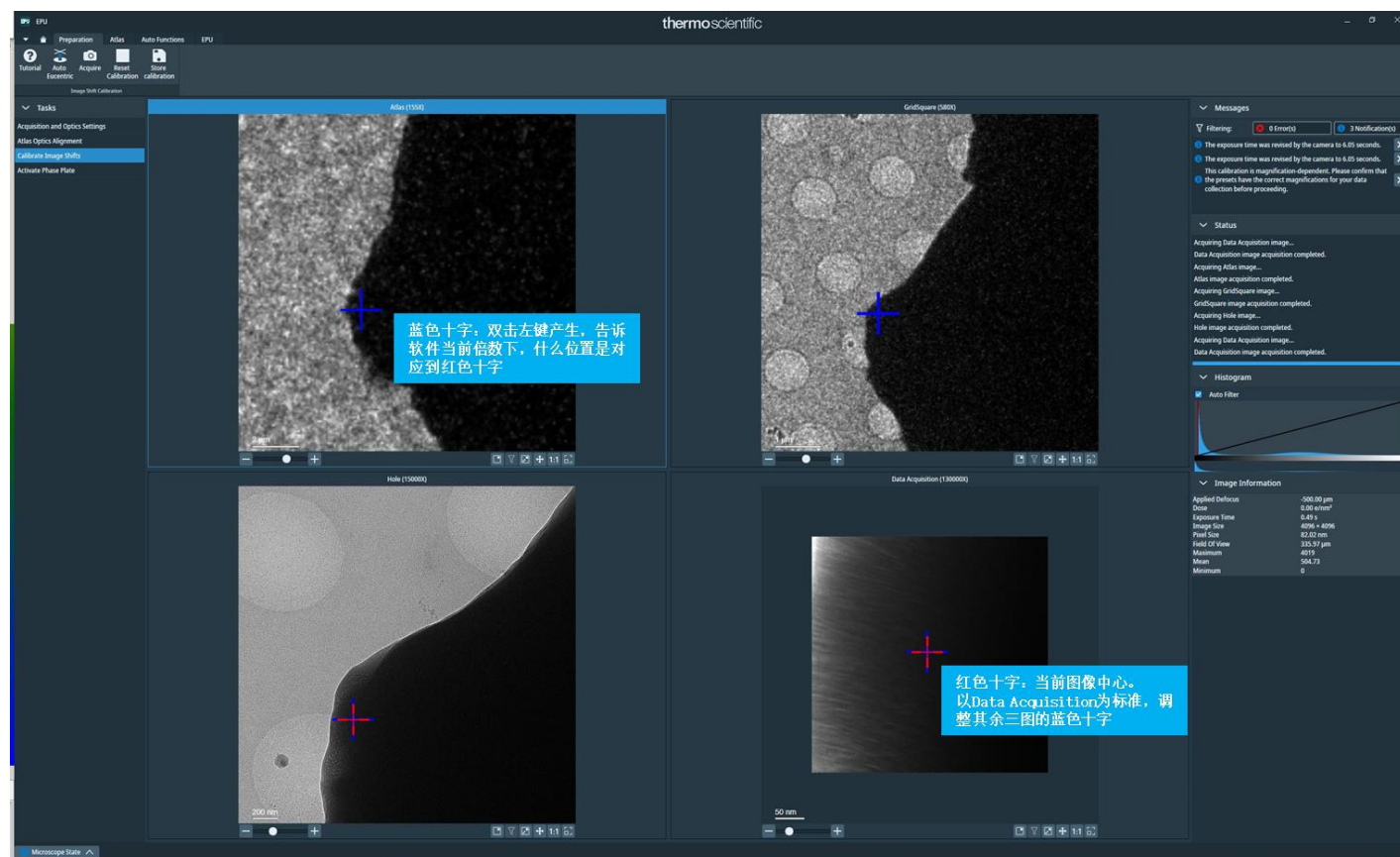
Stigmation校准完成后做Coma的Correct (<160nm)，Coma校准结束后返回再Measure下 Stigmation (<5nm)；



5.2 Calibrate Image shift的校准（可选）

准备工作：首先在正确的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；Data Acquisition下 Preview 一次，确认标志物在相机图像中心。

点击 EPU> Preparation > Calibrate Image Shifts > Acquire > (提醒弹窗) Resume

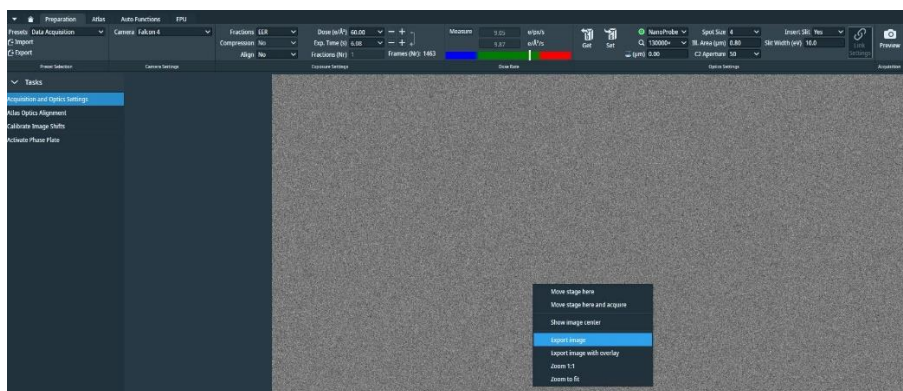


自动拍摄四组图，以右下图（Data acquisition倍数）下的红十字为标准，在其余三组图上双击对应的位置产生蓝色十字，既将Atlas-GridSquare-Hole倍数中心对齐至Data Acquisition中心。Store Calibration。

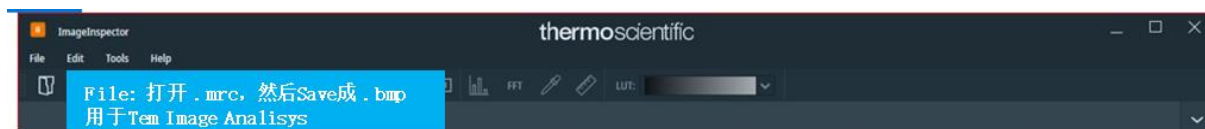
5.3 检查背底/扣背底(空的位置)

首先检查背底是否可用：

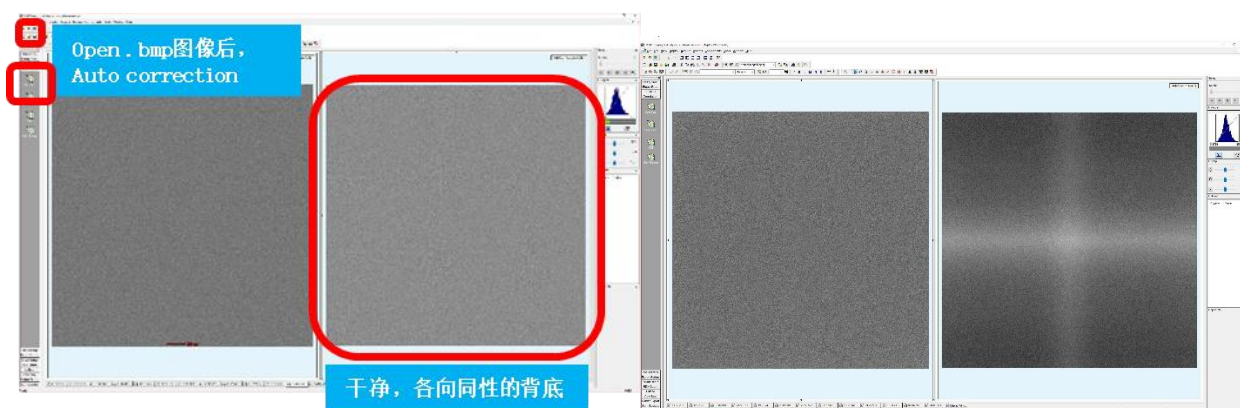
移动到空的位置，EPU> Preparation > The Acquisition and Optics Settings task> Data acquisition, 收数据的倍数下，用 Data acquisition 参数 Preview 拍一张照片，检查这张图片的FFT是否有杂信号；



然后将这张图片右击选择export Image另存为mrc文件，在电脑任务栏找到ThermoScientific ImageInspector软件，打开刚刚存好的.mrc图片，再将.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；

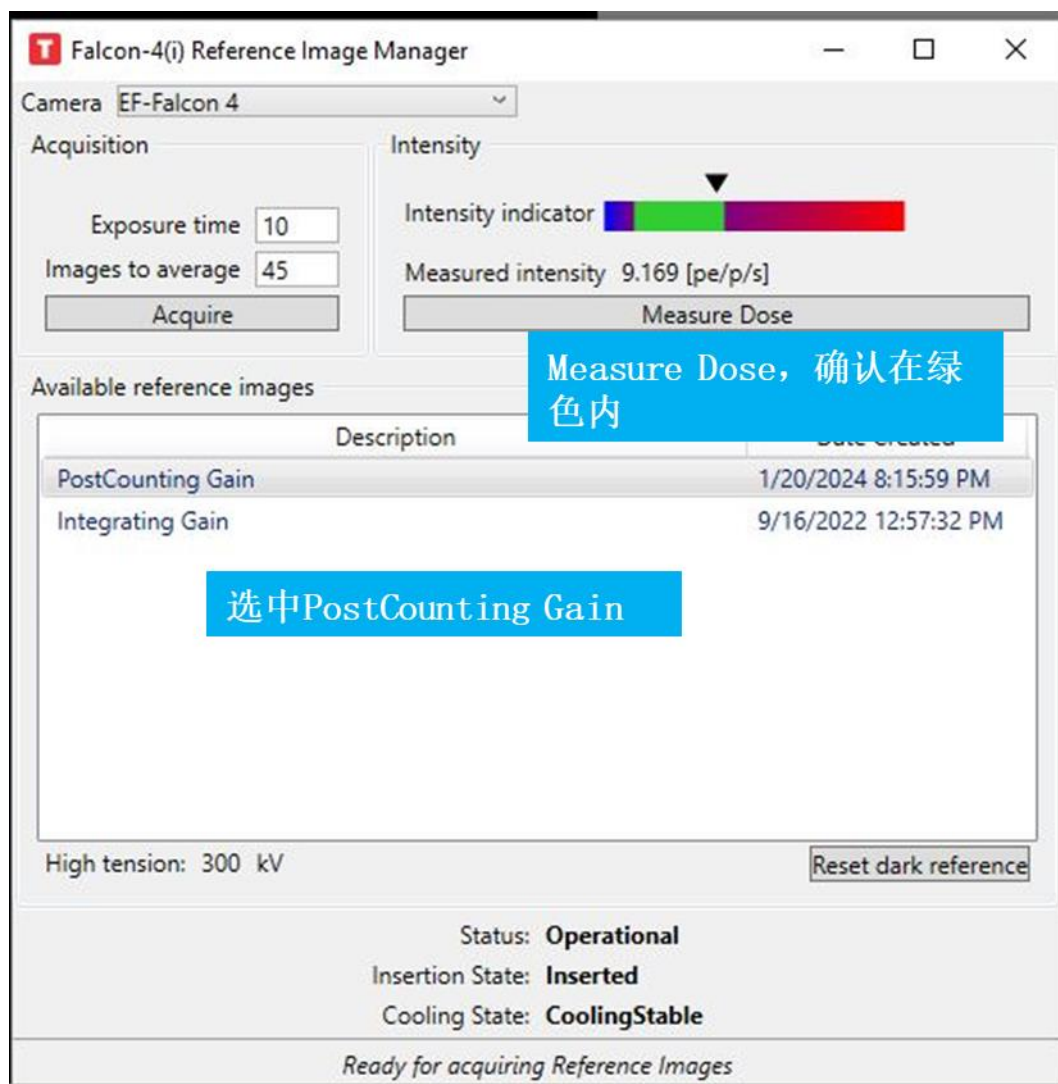


左图为正常的背底，右图情况需要重新做一次背底；

去背底：

桌面任务栏 > Falcon 4 (i) Reference Image Manager> PostCounting Gain>Acquire;

在Reference Image Manager点Measure dose，确认剂量4-10e/px/s 绿色内，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

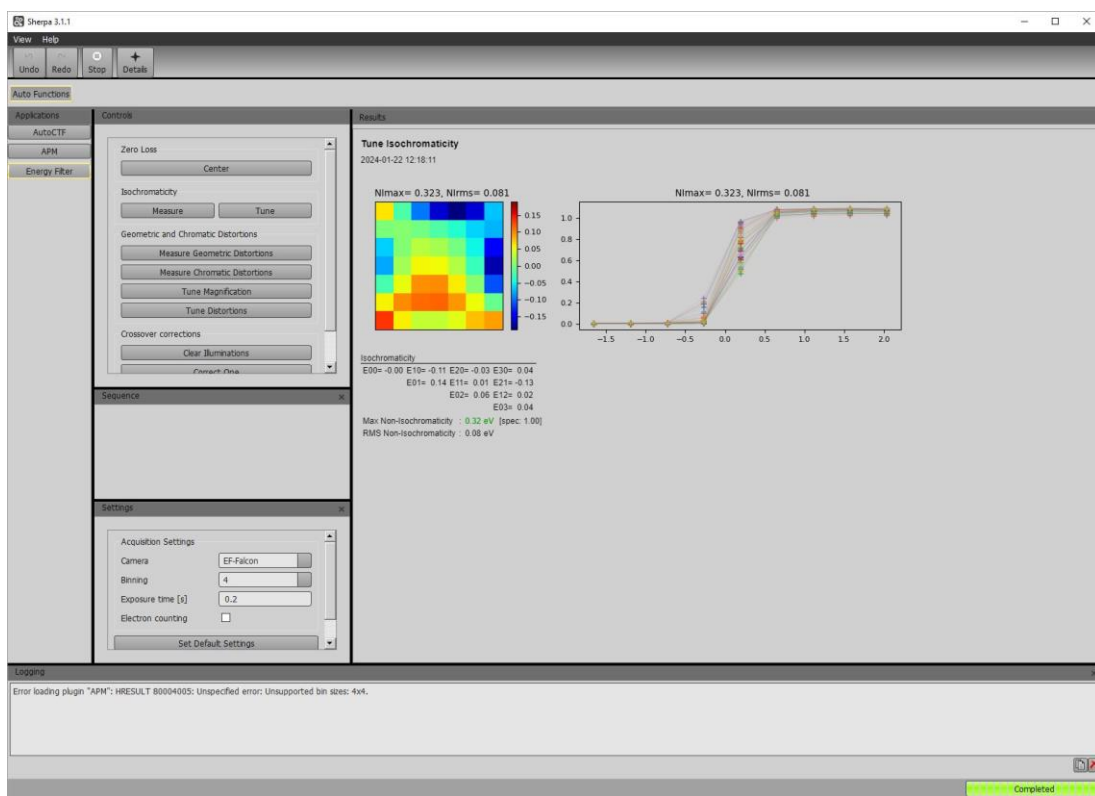
Name	Date modified	Date	Type	Size	Ta
20220110_043451_EER_GainReference.gain	1/10/2022 4:34 AM	1/10/2022 4:34 AM	GAIN File	33,560 KB	
20220110_043451_EER_GainReference.gain.bt	1/10/2022 4:34 AM	1/10/2022 4:34 AM	Text Document	1 KB	
gain_post_ec.raw	1/10/2022 4:34 AM	7/1/2021 11:13 AM	EM Image	65,537 KB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

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，找空的地方；

a) 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；

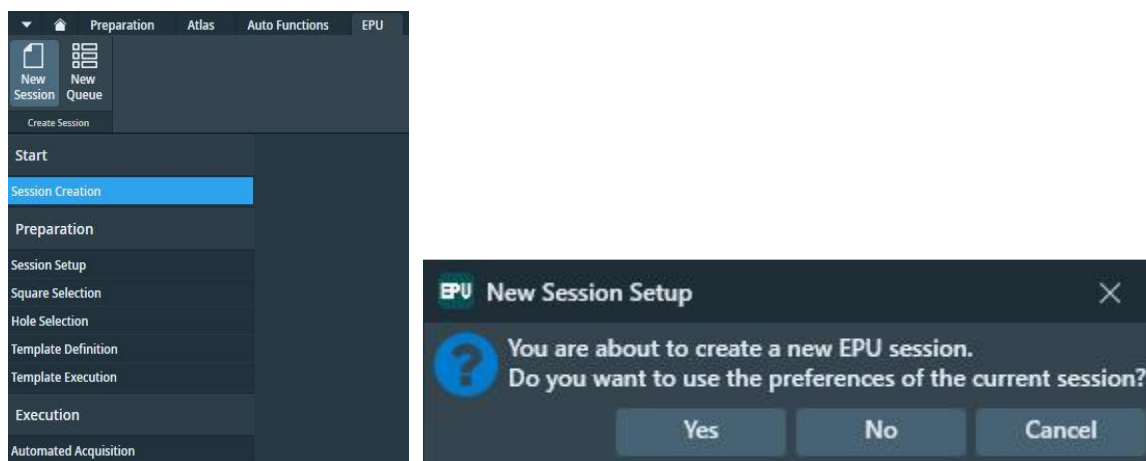
- b) 依次点击Isochromaticity的measure和Measure Chromatic Distortions，若测出来的结果为红色(大于spec数值)，则需要点对应的Tune按钮，若测出来的结果为绿色（小于spec数值）则为通过；



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

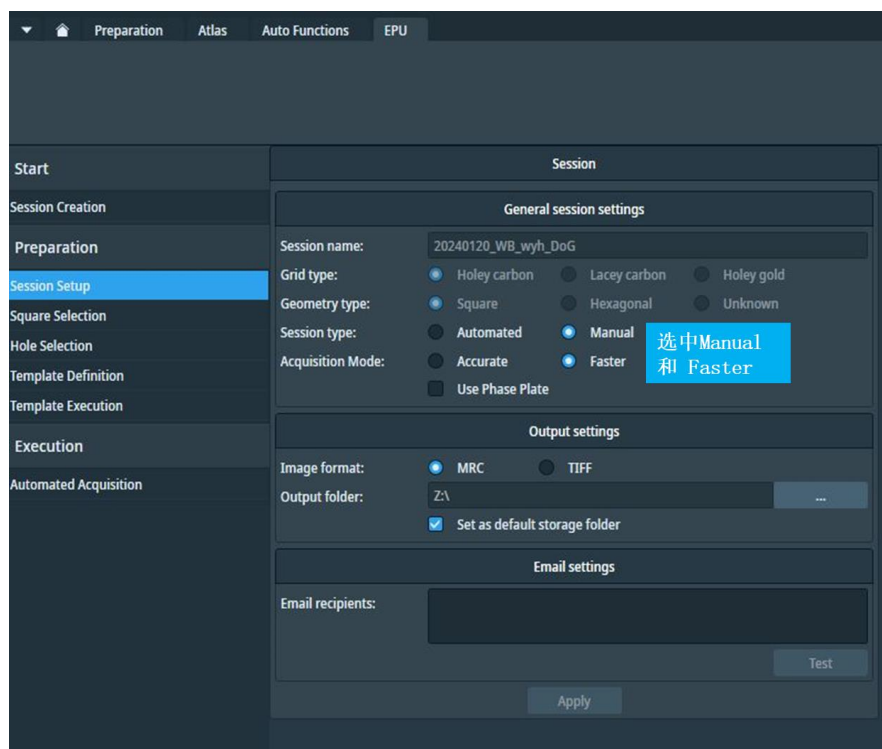


Yes: 新建一个EPU任务，后续设置与上一个EPU收集任务相同；

No: 完全新建一个EPU任务，后续设置重新设定；

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；

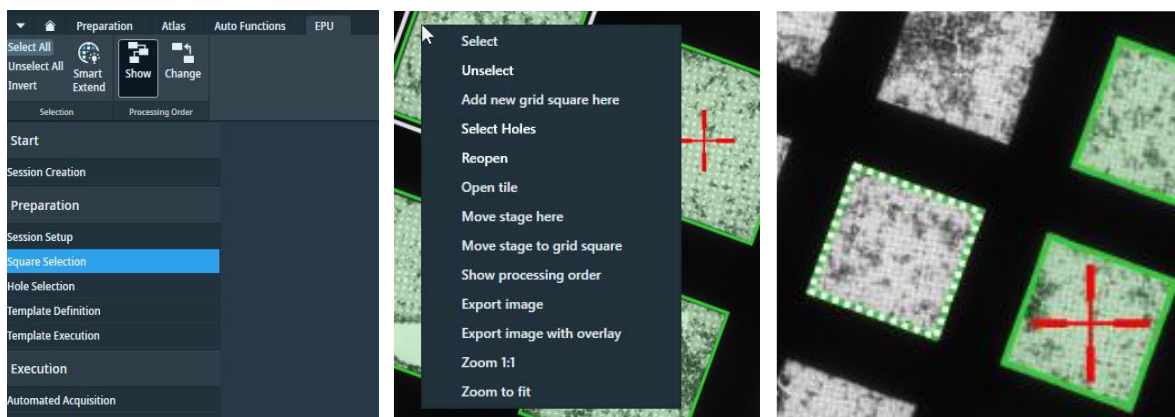
Type: Automated 通过过滤器和算法自动检测、评估和选择合适的区域； **Manual**: 必须手工挑选合适的区域；

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

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

6.3 The Square Selection

EPU > Square Selection



Show显示数据收集的先后顺序; Change开启可以手动点击区域, 先点的先收, 改变收集顺序;

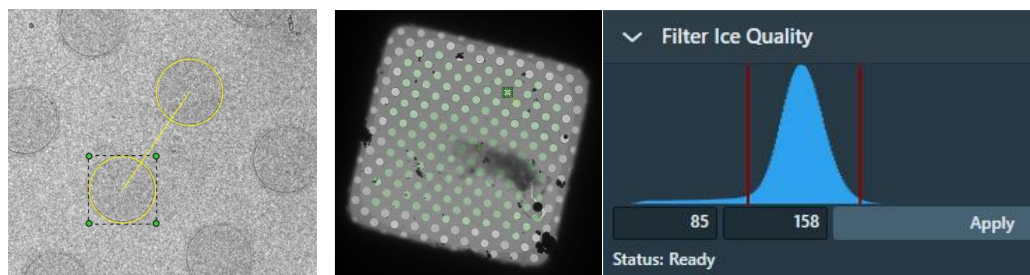
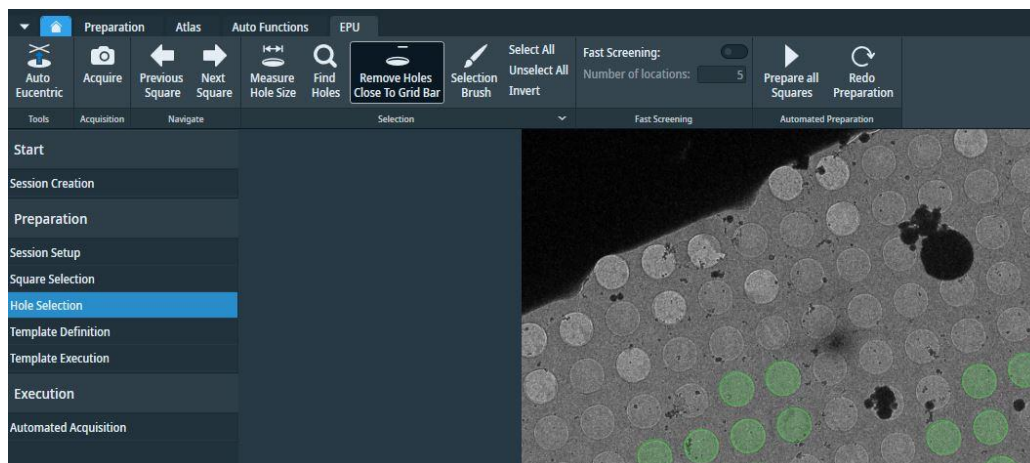
选择合适的square, 右击select/unselect, 或者Ctrl + 左键添加;

绿色虚线的为根据已选的正方形进行推荐, 点击Smart Extend会将虚线加入收集区域。

选择合适的square, 右键选择Select Holes, 进入选孔Hole Selection步骤。

6.4 Hole Selection

对于第一个Square, 首先Auto Eucentric => Measure Hole Size => Find Holes => Brush。完成第一个Square后, Prepare all Squares自动做完所有。完成后手动确认, Brush调整。



可以通过调节Preset Ice Filter选择不同厚度的冰层；

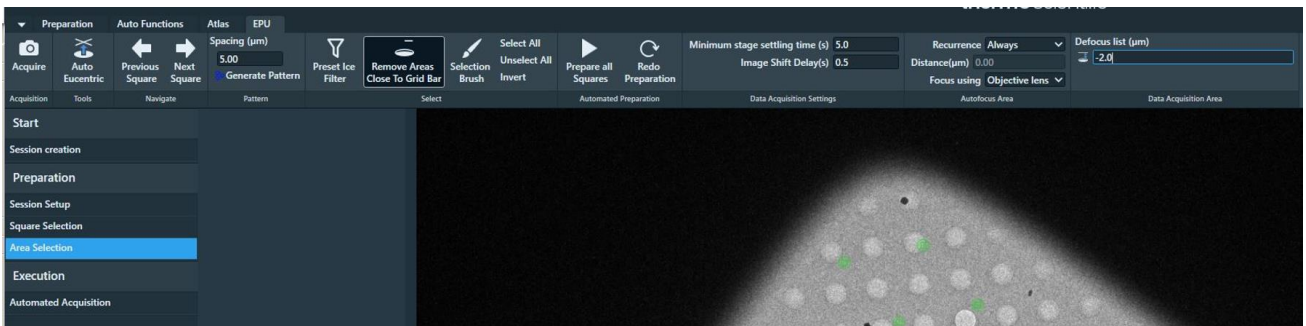
Remove Holes Close To Grid Bar 去掉靠近网格的孔；

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；

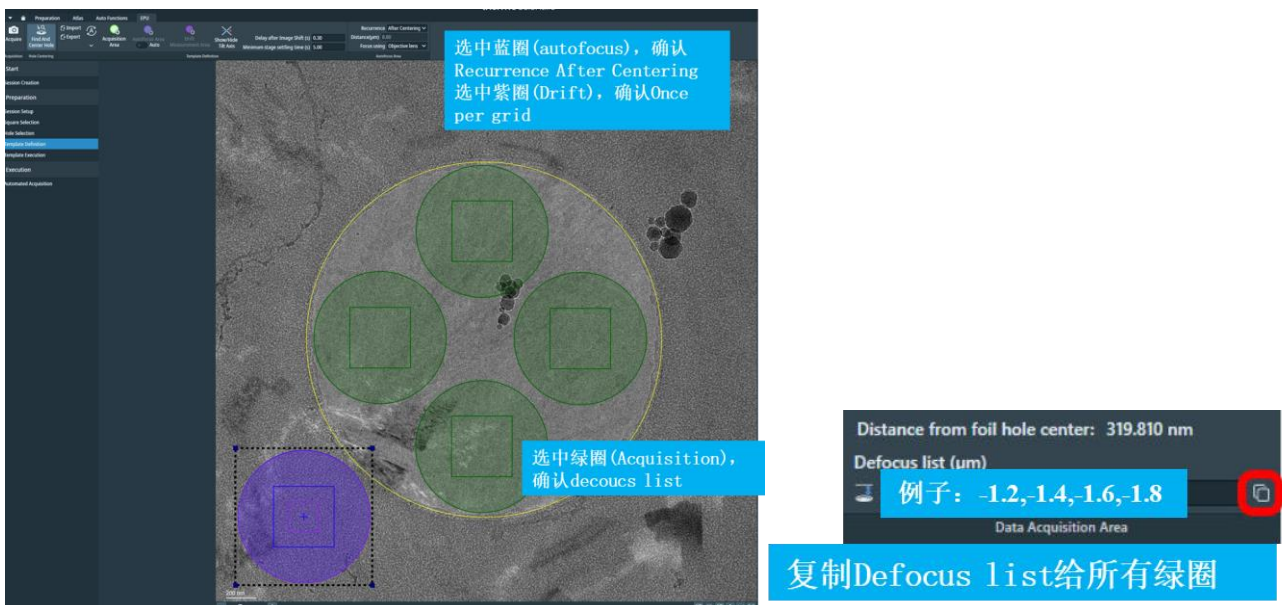
Area Selection task for Lacey Carbon specimens:

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

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



右键 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，如“-1.2,-1.4,-1.6,-1.8,-2.0”，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；

右键 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，默认选这个）

Focus using:

Objective Lens 改变Z高度对应的焦平面（默认）；

Stage Z axis改变Z高度；

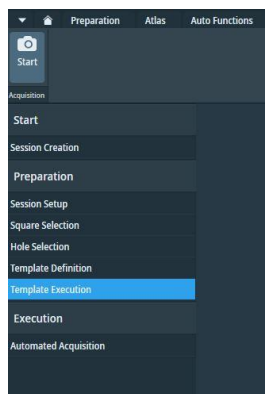
Add Drift Measurement Area，在图片上点击做drift测量的位置，一般选在非数据收集区域，可与autofocus位置重合；

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 > Template Execution > Start, 每个样品最好执行一次, 选孔后执行。



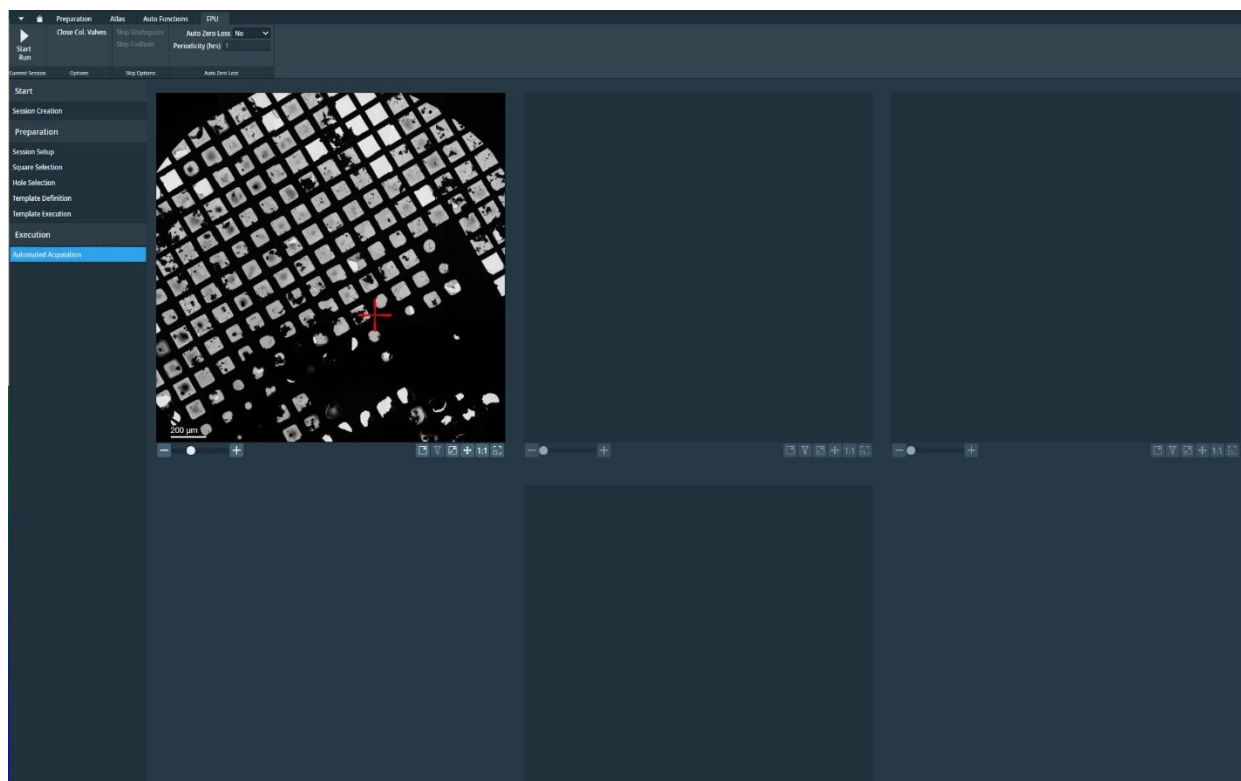
6.7 Automated Acquisition

所有holes都确认过后，开始Start Run收集

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(一般不需要，No)； 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	
2	MultiGrid02	Planned	0/45	0	

附页

一般流程:

1. Preparation中导入一个Setting, 先拍Atlas (页7), 约15min。
2. (可选, 每天或每个样品一次) 找一个地图上看的清的标志物, 做一次Calibrate Image Shift (页10)
3. 找一个不会收数据, 有碳膜, 冰足够薄的GridSquare, 做光路调节 (页8), 约10min。
4. 找一个空的GridSquare, 没有碳膜, 做背底和能量过滤器 (页10-12), 此时确认Measure Dose 在 4-10 e/pix/s, E-CFEG的Beam Current在5.0nA附近。如果Beam Current过高或过低, 可能影响数据收集时总Dose的差异。做完后在Prepartion - Data Acquisition 再次 Measure, 此时选择总Dose对于最后收集到的数据比较接近。约30min。
5. 开始选孔, (页13-18), 正式开始收集。