

单颗粒数据收集（使用 EPU）

作者：曾俨¹、李中文¹、韩名铭¹、赵超²、黄小俊¹

单位：¹中国科学院生物物理研究所；²中国科学院大学

电镜配置：CFEG, Selectris X + Falcon 4/i；软件配置：EPU

1. 前序步骤

1.1 Inventory 样品

在 TEM（左屏）找到 Autoloader，点击标题栏小箭头打开侧框。点击侧框中的 Inventory 键，若此处存在样品，则检索结果为蓝色，若不存在样品，则检索结果为灰色。

当检索到最后一个存在样品的位置时，可以再次点击 Inventory 键，停止检索。如图 1a。可 load 一个有较完整碳支持膜的载网，用于前序步骤的调整。

1.2 flash 电子枪

在 TEM（左屏）最左侧上方找到 Setup，找到其下的 E-CFEG Control。若 Operate 如图 1b 所示为黄色，点击 Flash，待 Beam current 显示数值后进行下一步操作；若 Operate 为灰色，则点击 Operate，显示数值后再进行下一步操作。

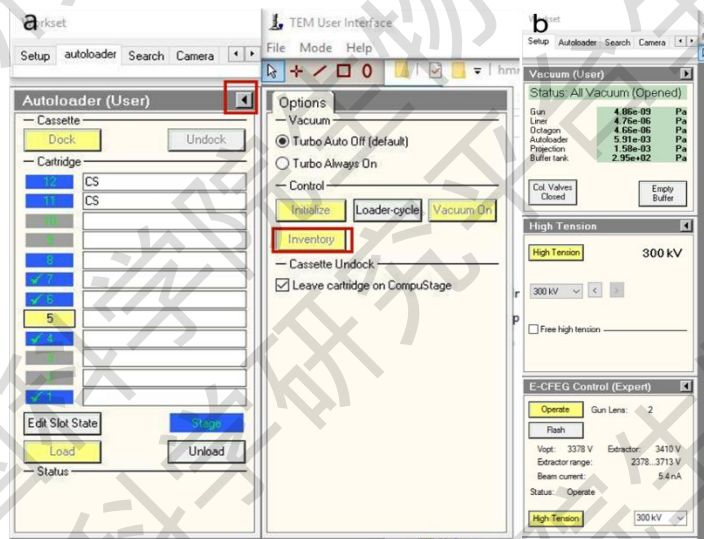


图 1 a: Inventory 样品; b: flash 电子枪

1.3 调 setting

打开 EPU，在左上角找到 Import。在存储路径中调出已存的对应拍摄倍数的文件，打开（图 2）。在 Preparation 模块的 Presets 中选择 Data Acquisition 倍数，点击 Set，将改变的倍数载入电镜。如未有已存储的 setting 文件，可直接设定每个 Presets。

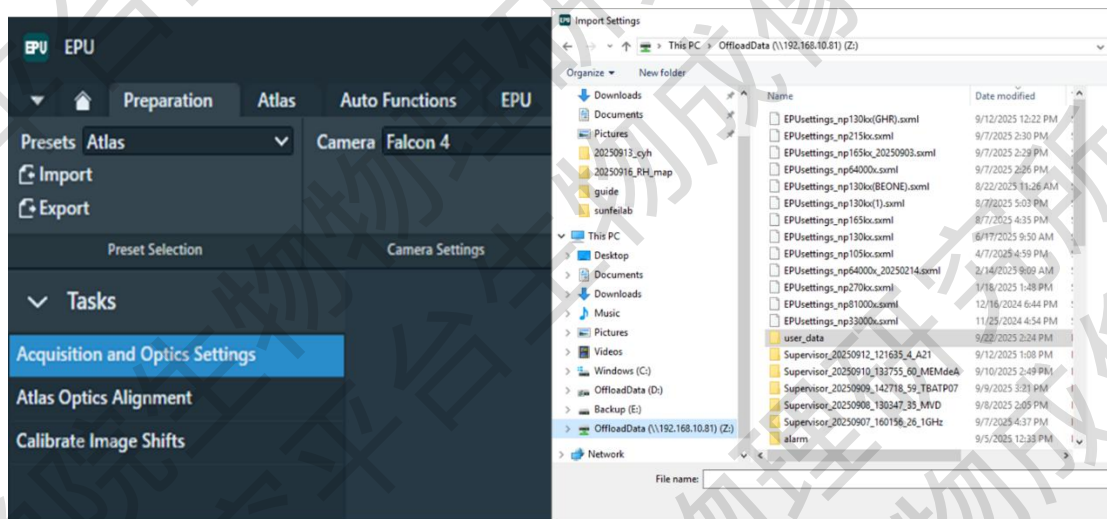


图 2：调节 setting

1.4 调光

1. 在 Preparation 模块的 Presets 中选择 Data Acquisition 倍数，点击 Set，将改变的倍数载入电镜。点击右侧操作面板的 Eucentric focus 按键。
2. 在 TEM 中找到右下角选择框，选择其中的 Direct Alignments（图 3）。
3. 按操作板 R1 键放下荧光屏，点击 np Beam tilt pp X，旋转操作面板 Multifunction X 旋钮，直到两个光斑重合。
4. 点击 np Beam tilt pp Y，同样旋转 Multifunction X 旋钮，直到两个光斑重合。
5. 点击 Beam shift，旋转 Multifunction X 与 Multifunction Y 旋钮，使光斑与相机中心（绿色圈）同心。
6. 如果光斑比绿色提示圈小、或大小差不多，旋转操作板上的 Intensity 旋钮以调整光斑大小，使其略大于荧光屏上显示的相机范围（绿色圈），再进行一次 Beam shift 对中。
7. 点击 Done，同时在 EPU Preparation 模块的 Data Acquisition 倍数中点击 Get，将电镜中的改变载入到 EPU。



图 3 TEM Direct Alignments 和操作面板

1.5 Auto functions

1. 通过切换 Preparations Presets 中的 Grid Square, Hole Eucentric Height、Data Acquisition 倍数（图 4）将视野由大到小进行拍摄，和使用右键 move stage here 调整位置，以确定视野落在非孔的碳膜上。

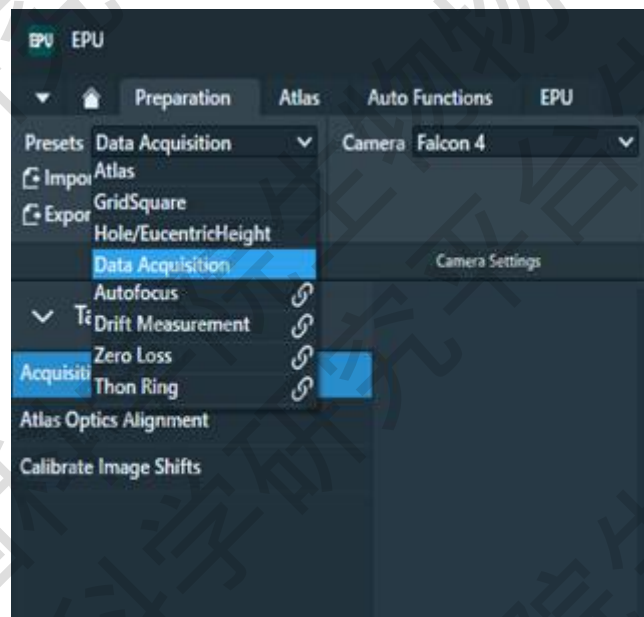


图 4 改变放大倍数

2. 进入 Auto Functions 模块（图 5），按 Auto-eucentric by beamtilt→ Autofocus→ Autostigmator→ Autocomp→ Autostigmator 的顺序进行操作。

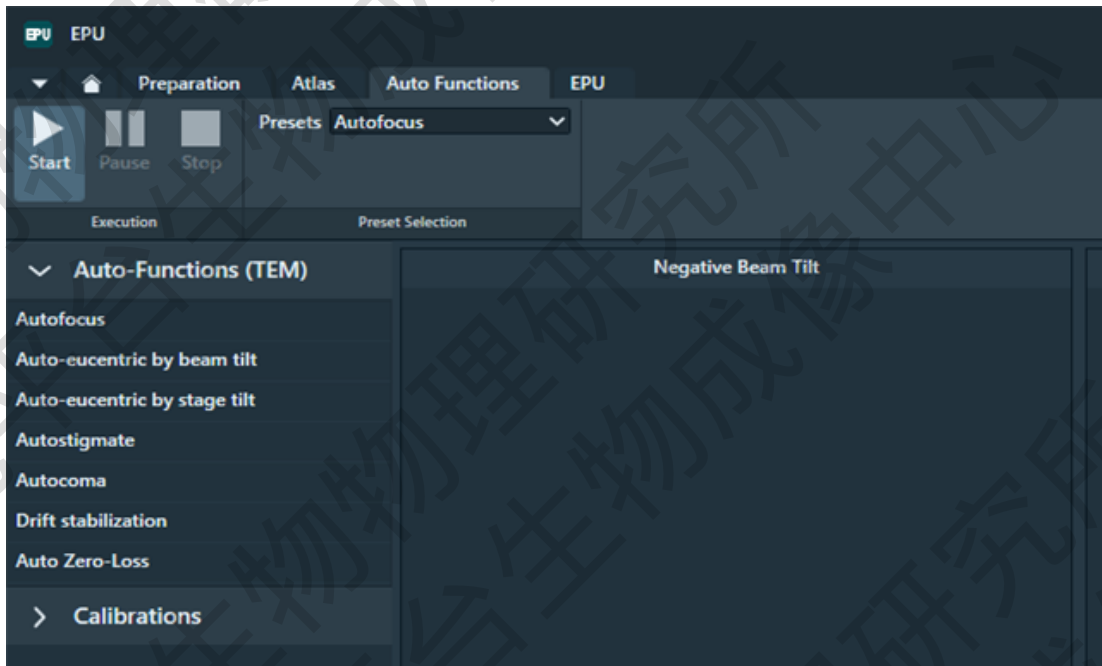


图 5 Auto Functions 模块

3. 观察 EPU 右侧状态栏，如果其中任何一项显示了非成功之外的提示，则重新做一次，若重新做仍不成功，需换至另一 square 的平坦碳膜区域，重新按 2 顺序做一次操作。

1.6 能量过滤器与剂量调节

1.6.1 能量过滤器

1. 在 Atlas 中或放屏找到没有膜和载网的空白处，前往。
2. 打开能量过滤器操作界面（图 6）。
3. 按图 6 顺序进行操作，请确定每次报出的结果为绿色，若为红色，则跳回第 2 步重新进行，直到变绿。

4. 若进行第 2 步中的 Center 步骤时、没有显示如下图中的 counts 数值，说明相机权限位于 EPU 中，回到 EPU，在 Data Acquisition 倍数上做 Measure，再回能量过滤器重做 Center 及后续步骤。

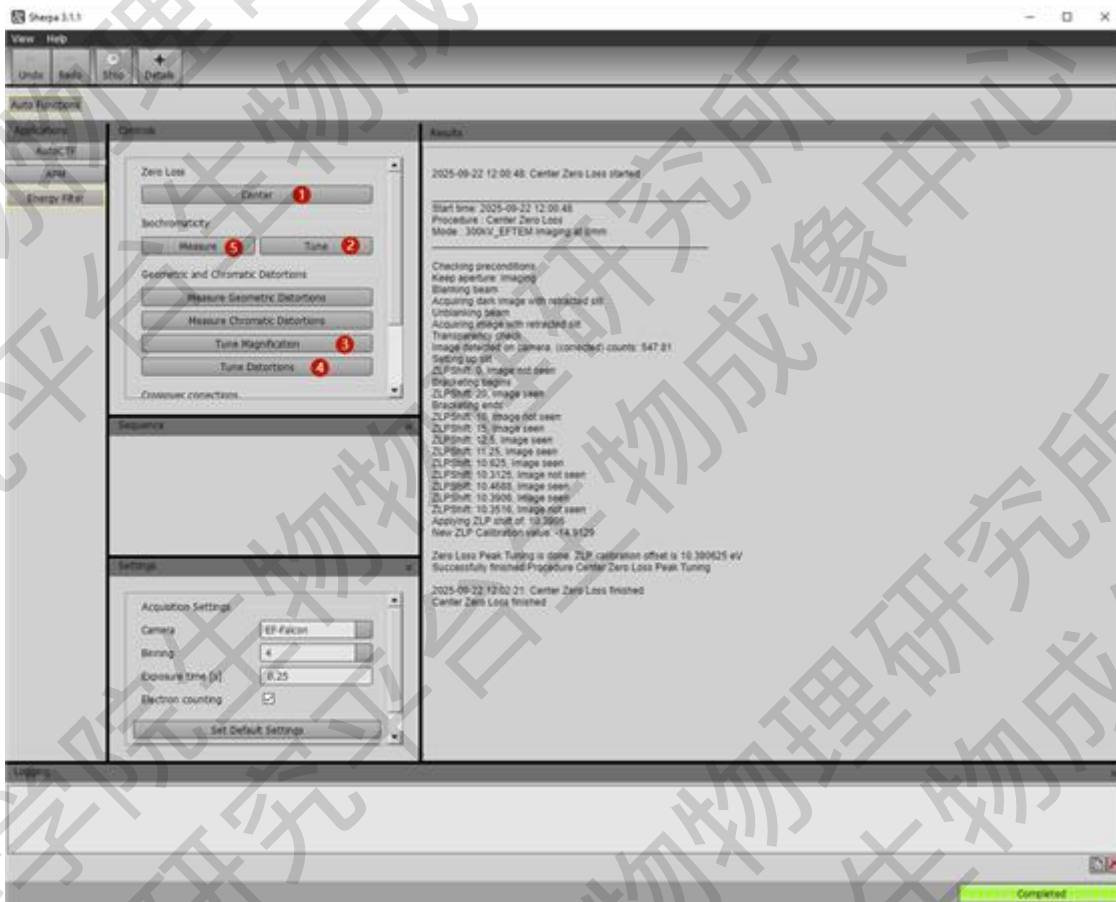


图 6 能量过滤器调试

1.6.2 拍摄条件设置

1. 剂量测定。回到 EPU，确认 Preparation 模块处于 Data Acquisition 倍数，做 measure，观察得到的数值是否处于绿色区间（图 7）。

注意：剂量率测定需要在无样品处测定，以确定曝光时长。剂量率需比相机的最佳收集剂量率范围略高，以便使通过了样品后的剂量率落在相机的最佳收集剂量率范围内。Falcon4i 最佳收集剂量率在 6-8e/px/s，Falcon4 则在 4-6e/px/s。



图 7 剂量测定

2. 拍摄文件选择

若拍摄 Tiff 文件，Fractions 选 Manual，Compression 选 Yes，Align 选 No。

若拍摄 EER 文件，Fractions 选 EER，其余选 No。

若拍摄 Mrc 文件，Fractions 选 Manual，Compression 选 No，Align 选 No。

3. 在 Dose 中输入需要的总剂量，回车，软件自动计算出相应的曝光时间与帧数。

1.7 高低倍对中

1. 通过 Preparation 中的 Presets 的低倍数 (Atlas 或 Grid Square) 找到合适的标记点，在 Hole Eucentric 与 Data Acquisition 倍数下拍摄。最终确认 Data Acquisition 落在标志物上。

2. 在 Preparation 模块左侧列中找到 Calibrate Image Shifts，打开页面，点击左上角的 Start (若显示出 Resume，则继续点击 Resume)，见图 8。

3. 四个倍数拍摄结束后，以 Data Acquisition 倍数为准 (不要在这个倍数下调整)，找到其余三个倍数的该标志物对应的位置，双击左键，使蓝标落在正确的位置上，点击上栏 Store Calibration。

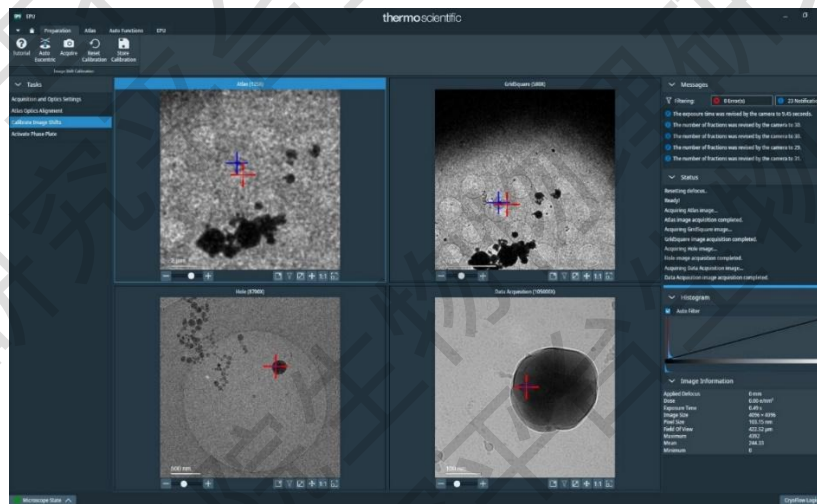


图 8: 高低倍对中

2 筛样流程

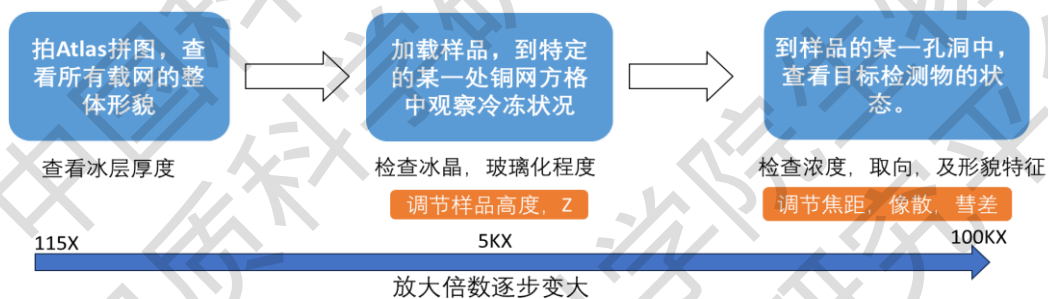


图 9 EPU 筛样流程导图

2.1 Atlas 拼图拍摄 (整体预览)

Atlas 拼图拍摄获取所有载网的低倍全景图，评估冰层均匀性与样品分布。具体操作方式如图 10。

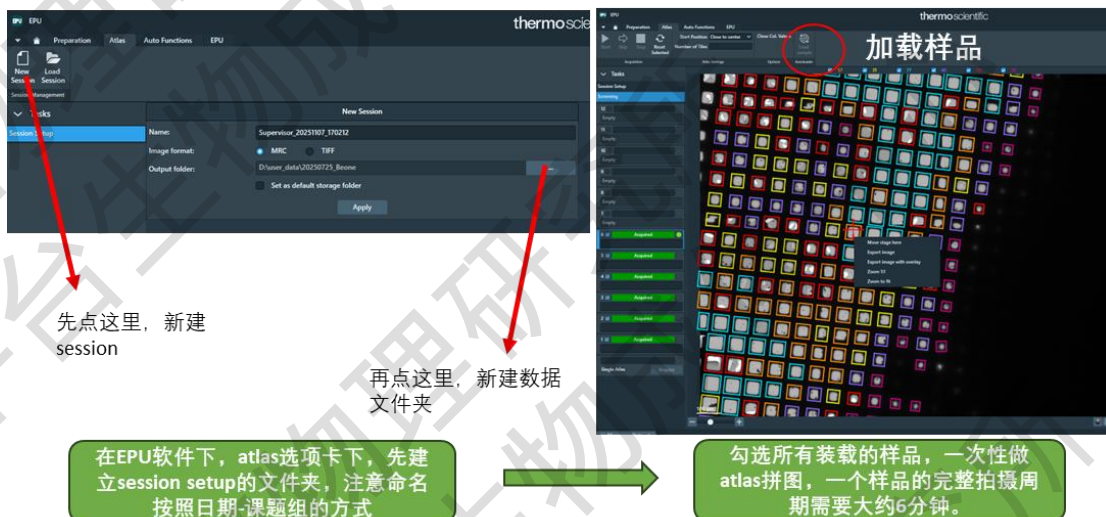


图 10 拼图拍摄

注意: 软件会自动对拍摄到样品拼图的碳膜状况做分类, 用不同的颜色标注, 用户可进行初步判断和统计。在所有样品拍摄过 Atlas 拼图后, 样品台装载的是编号最靠后的样品, 可使用 EPU 界面的 load sample 切换到感兴趣的样品。

2.2 冰层与玻璃态检查

- 1 在 Atlas 的拼图中, 选择定位到目标载网的某个方孔 (Hole), 单击鼠标右键, 选择 move stage here.
- 2 在 preparation 选项卡下, 点击 preset, 选择 Hole/Eucentric Height, 用 Preview 功能拍摄图像, 以确定位置适合进行下一步操作。
- 3 在 Auto function 选项卡下, 调节 Z 高度至转轴中心平面。
- 4 可使用 Beam Tilt (快速) 或 Stage Tilt (高精度) 模式, 执行其中之一就可。Beam tilt 的方式有可能出现操作程序失败的情况, 这种情况出现后执行 stage tilt, stage tilt 调节高度成功率很高。如再失败, 联系管理员。

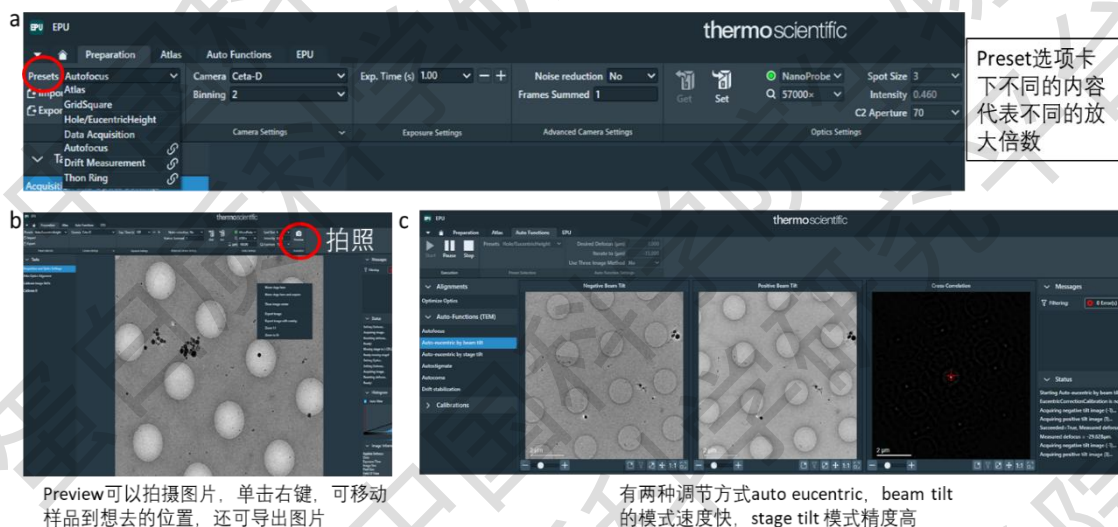


图 11 Hole/EucentricHeight 下样品检查及高度调节

- 5 在 preparation 选项卡下，点击 preset，选择 Hole/Eucentric Height, 移动到碳膜上。
- 6 Auto function 选项卡下执行 Auto Focus, 进行自动对焦。
- 7 在 preparation 选项卡下，点击 preset，选择 Hole/Eucentric Height, 移动到孔内
- 8 在 preparation 选项卡下，点击 Data Acquisition, 设定合适的离焦量-2 到 -3um, 进行拍摄。
- 9 需要保存筛查图片时，可右击鼠标选择 export image。

3 单载网数据收集

- 3.1 打开 EPU 模块，在 Session Creation 中点击 New Session。

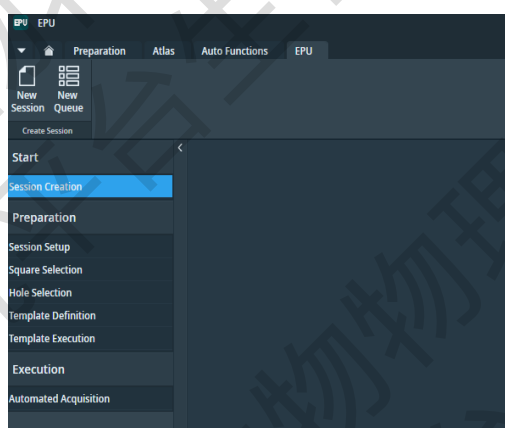


图 12: 新建 New Session

- 3.2 在 Session Setup 中输入命名（保留 Supervisor_日期，在其后添加后缀），选择对应的载网，默认的 Session type 为 Manual, Acquisition Mod 为 Faster, 其余部分无需改动。

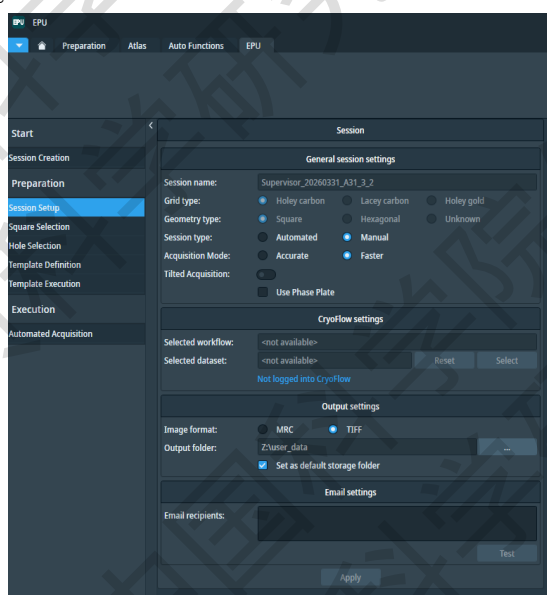


图 13: 设置拍摄 Session

3.3 进入 Square Selection, 右键需要的 Square, 在列表中点击 Select, 即为选中此 Square 进行后续拍摄。(建议不要选载网边缘的 Square。)

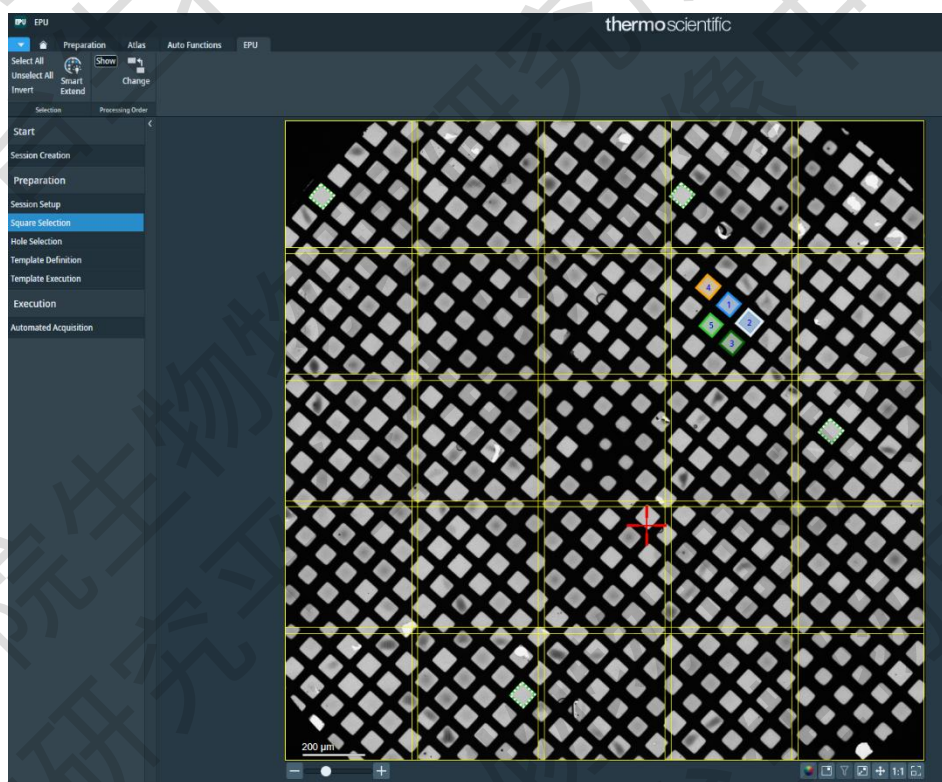


图 14: 选择要拍摄的 Square

3.4 选好 Square 后, 进入 Hole Selection, 需对每个 Square 做 Auto Eucentric, 若有多个 Square 则可点击上栏的 Prepare All。做好后, 在选孔前, 需做 Measure Hole Size, 点击选中, 将弹出的黄色圆圈对齐所拍孔大小, 将两个黄圈分别置于相邻的 Hole 之上。取消选中 Measure Hole, 点击 Find Holes, 如需去掉靠近 Square 边缘的孔则点击 Remove Holes Close To Grid Bar; 如不需要此 Square 了则点击 Unusable square 取消。

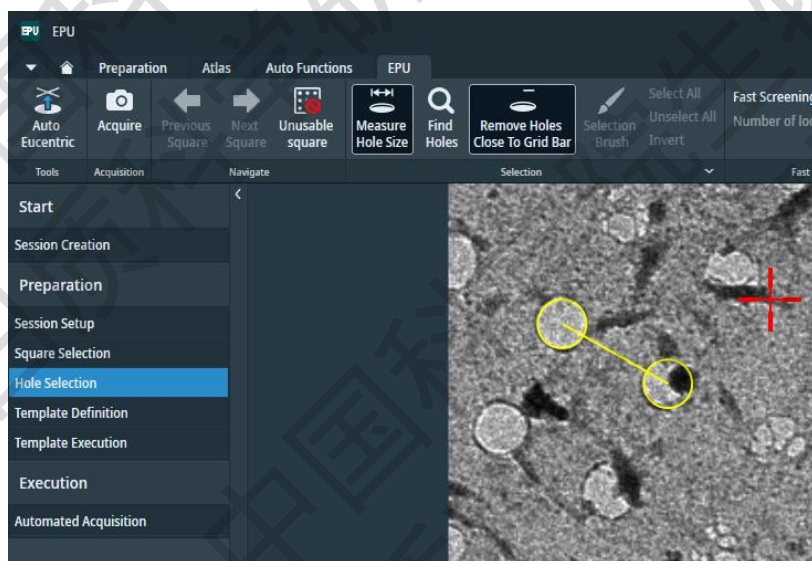


图 15: 对 Square 拍摄进行选择

3.5 选好孔后，进入 Template Definition，点击 Acquire，将代表 Acquisition Area 的绿圈置于孔中，每一个绿圈代表一张拍摄的图，圆圈代表光斑大小，方块代表所拍摄的图片，圆圈不可与方块范围叠加，此时可以在上栏填写所需的 Defocus 范围，点击右侧的粘贴标将其赋予给所有拍摄范围。在非孔且位于四孔中间位置的地方放置代表 AutoFocus Area 的蓝圈，并在上栏选择 Autofocus 的模式。

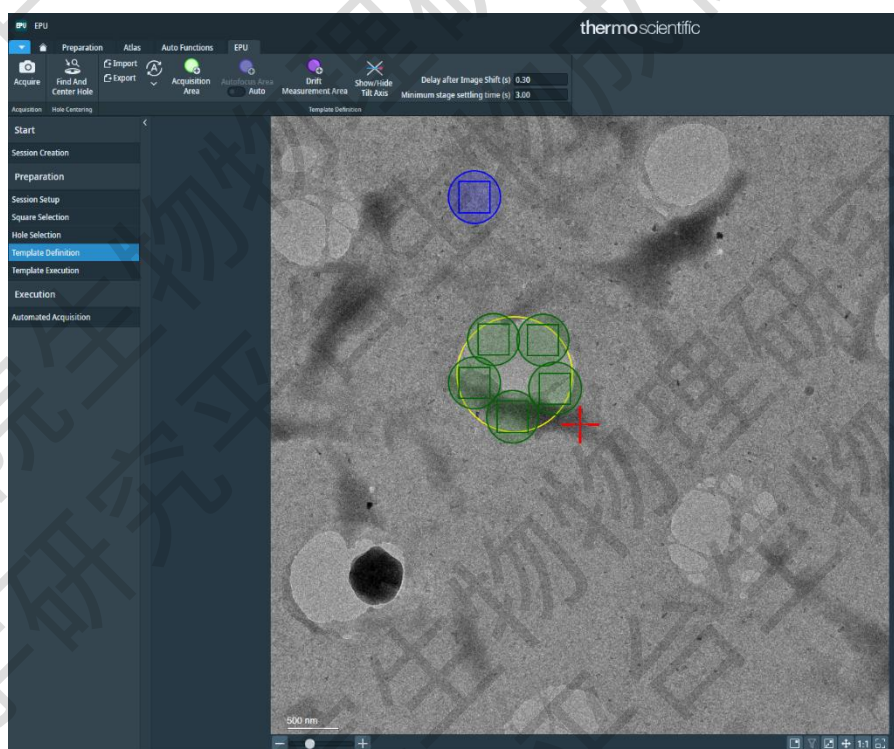


图 16: 拍摄参数设置

3.6 前序步骤均设置好后，进入 Automated Acquisition，点击左上角 Start Run 开始拍摄。

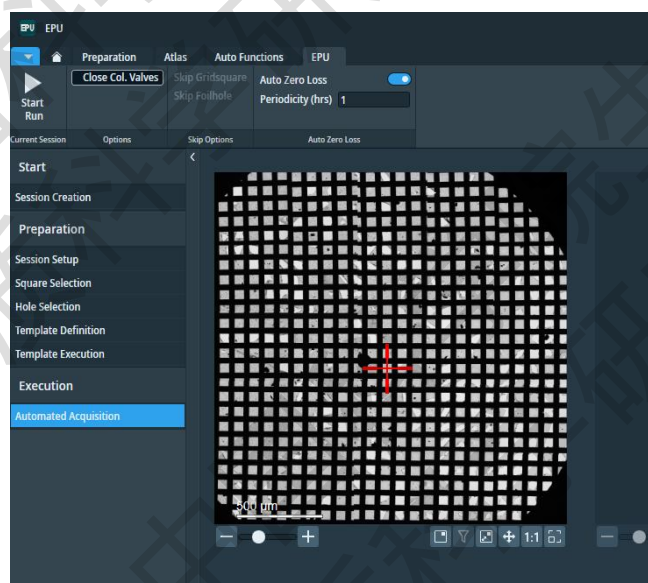


图 17: 正式开始拍摄

4 多载网数据收集 (queue 模式)

基本流程与单载网一致, 除了以下内容。

所有要进行筛查或者数据收集的载网都在 Atlas 界面都选自动拍摄全载网地图。特别注意:

- 先在 UI 界面做 inventory, 然后在 Atlas 界面 new session, 可以直接读取 UI 界面的各载网信息。

- 必须让全载网地图都拍摄完全, 不要提前终止 (因为 reload 载网时, 需要利用全载网地图的信息, 进行载网位置的重新匹配)。

- 当拍摄了载网全局地图后, reload 载网并设置数据收集时, 请务必使用 EPU Atlas 界面的 load sample 功能, 不要使用 UI 界面的 load (只有当使用 EPU Atlas 的 loadsample 功能, 才能在 reload 载网时, 利用全载网地图的信息, 对载网位置重新匹配)。

- 不按照上述两个必须做时, 连续数据收集会在切换样品时频繁报错, 导致 queue 数据收集流程无法进行, 甚至 EPU 卡死。

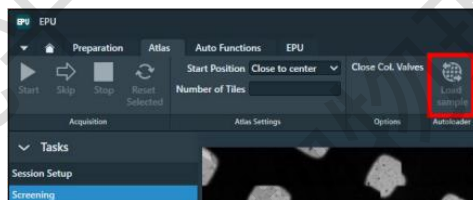


图 18: load sample

对特定载网设置收集任务时

1. 先新建的收集任务。
2. 对不在 stage 的载网进行设置时, 必须使用 Atlas 中的 load sample 功能进行载网切换 (切换后不需要重新拍摄载网全地图) 重新 load 的载网, 必须移动样品台到一个非常有特征的 square, 并拍摄 square 全貌, 验证重新 load 的位置信息匹配是准确的。如果位置匹配不准确, 则放弃设置该载网的收集任务 (否则在自动数据收集过程中, 容易报错, 导致 queue 数据收集流程无法进行对特定载网设置收集任务时)。

3. 选择需要进行数据收集的 square

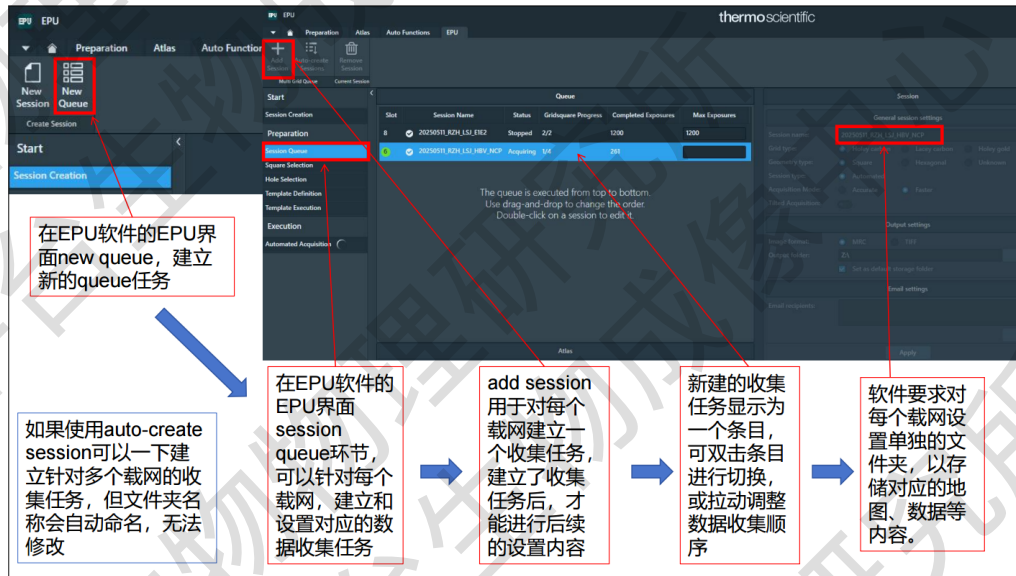


图 19: 新建 queue

4. 通过冰层厚度, 选择需要进行数据收集的 hole。注意: Queue 模式无法使用画笔工具选择 hole。

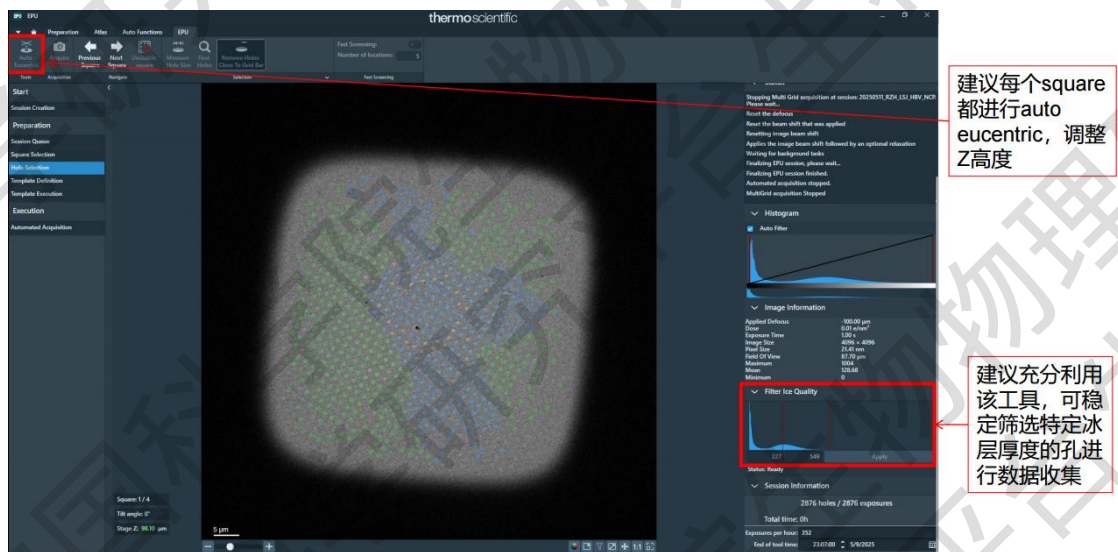


图 20: 利用冰层厚度选择 hole

5. 设置 focus、drift、record 的位置和欠焦范围, 即设置 template (数据收集方式)。每个载网数据收集方式可以设置不一样, 孔径和孔间距也可以不同。

6. 当所有载网的收集任务都设置完成后, 回到 session queue 环节, 做数据收集的各载网收集顺序、收集最大张数的设置。

7. 开始 queue 数据收集。

