

利用 SerialEM 进行单颗粒数据收集的流程

1 设置 SerialEM 各模式的放大倍数和 dose rate

关闭 FEI 界面中的 low dose。在数据收集放大倍数下，按电镜面板中的 Eucentric focus 键，将物镜电流归中(obj len: Titan 为 79.6164%， Talos 为 85.6750%)。完成电镜合轴(rotation center 和 coma-free)、消像散后，如果是 Titan Krios，需先选择并插入 Falcon2 相机后，再启动 SerialEM。勾选 SerialEM 的 Low Dose Control 中的 Low Dose Mode 选项 (1)。

放下电镜荧光屏，依次选择图中 Area to show when screen down (2) 中的 Vie., Foc., Tri., Rec., 查看放大倍数，dose rate 是否符合要求。其中，Low Dose Mode 下的文本显示当前成像模式下的实际状态参数 (3)。

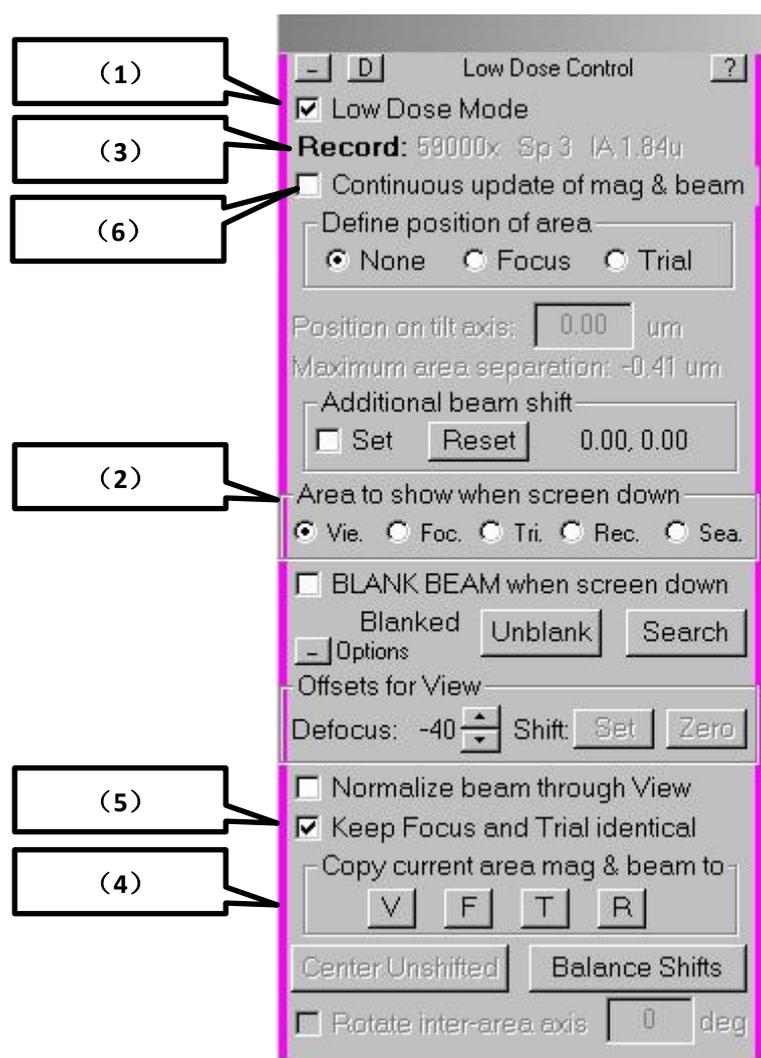
View 模式为低倍 (2000-4000 倍即可)，低剂量 ($<0.1e/\text{\AA}^2/\text{sec}$)，用于搜索拍照位点。

Record 模式是真正的数据收集模式，按照所需的 pixel size 选取适当的放大倍数，在根据具体的剂量要求通过电镜面板上的 intensity 旋钮，调整到合适的 dose rate。

focus 模式是 SerialEM 的聚焦模式，通常设置和 Record 模式倍数相同 (4)，光斑大小可以在充分覆盖相机的前提下适当缩小。

Trial 模式是光斑自动居中模式，设置与 focus 模式一致即可。也可通过勾选 Keep Focus and Trial identical 选项 (5) 自动将 Trial 模式和 focus 模式设置成一致。

当修改了放大倍数或者 intensity 时，需要勾选 continuous update mag & beam (6)，来更新状态，然后再取消勾选 continuous update mag & beam 来保护当前状态不被修改。

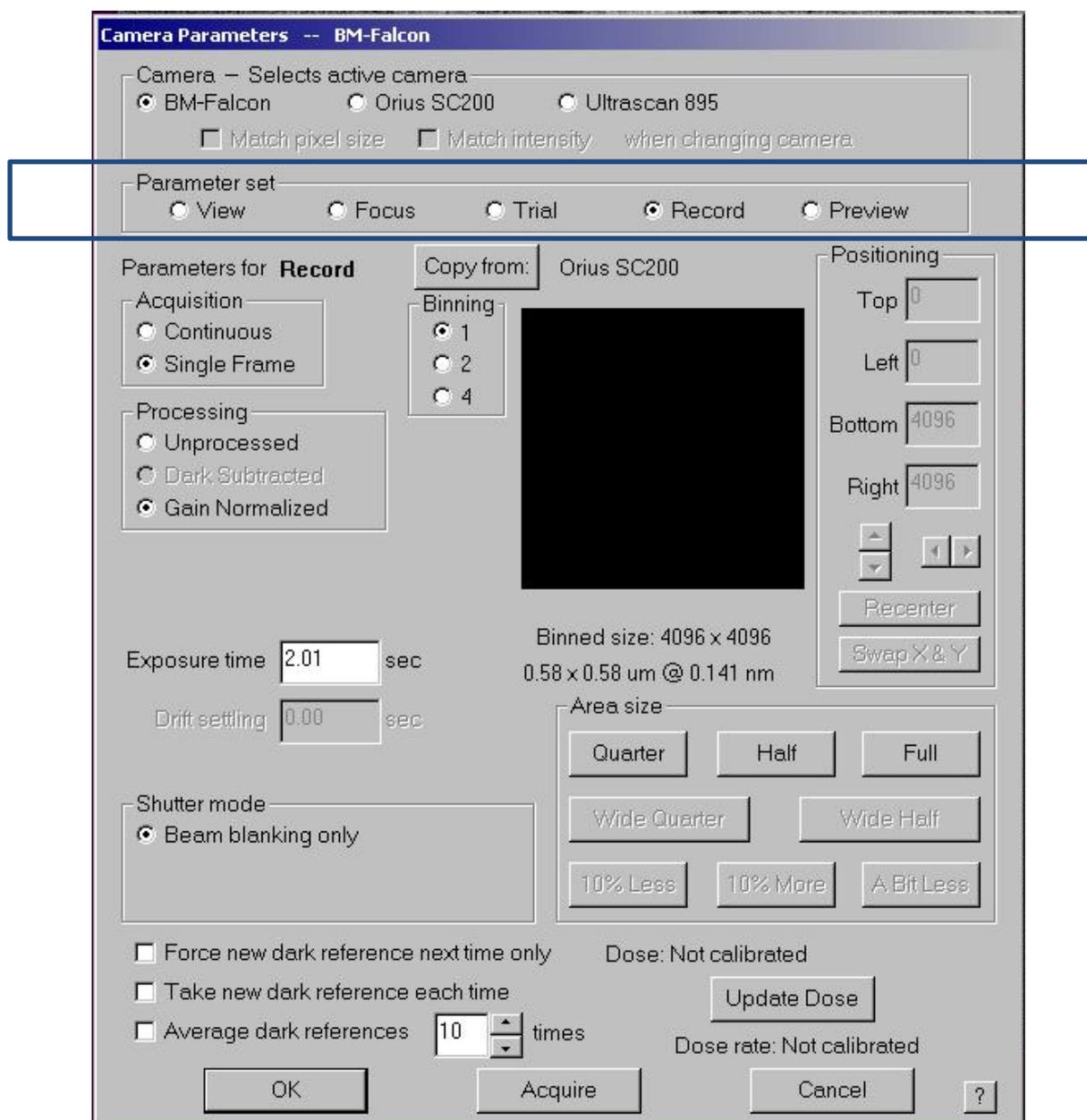


2 设置 SerialEM 各模式的相机参数及曝光时间

点击 Camera & Macro Controls 中的 Setup 按钮。

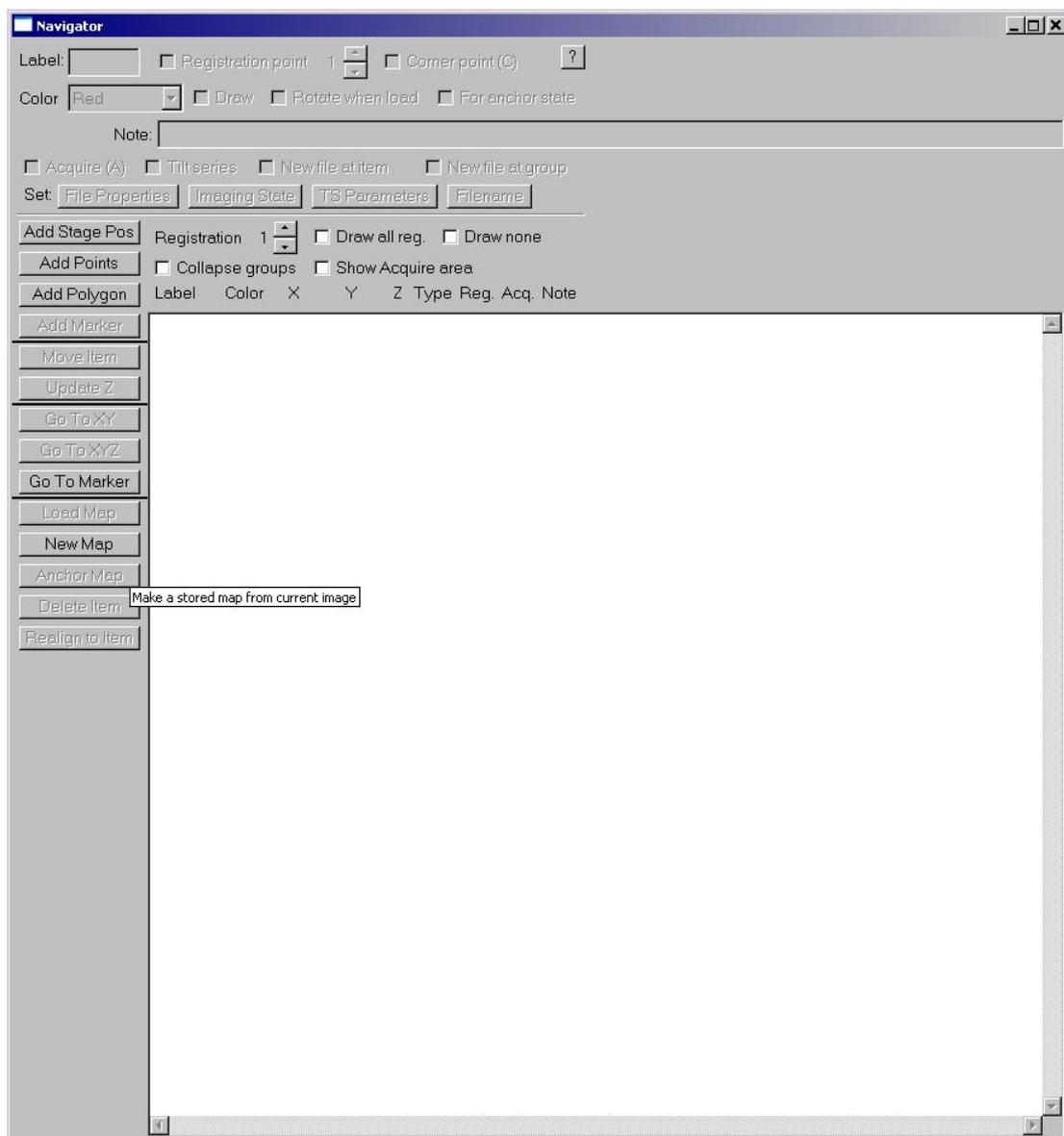
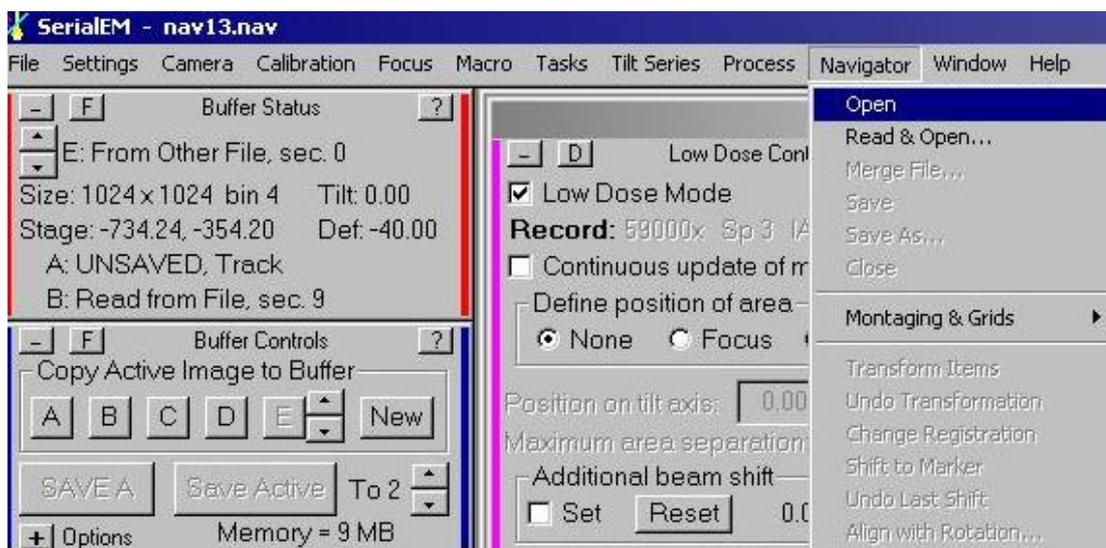


弹出以下界面。通过选择 Parameter set 中的 View, Focus, Trial, Record, 来分别设置这四个状态的 Exposure time 和 Binning 值。通常 View, Focus, Trial 模式选用 Binning 4, Exposure time < 1 sec (视图像反差而定, 若图像发白, 则减少曝光时间)。而 Record 模式通常选择 Binning 1, Exposure time 在 Talos 时按需要填写; 在 Titan 上若是用 capture 进行数据收集, 则 Exposure time > 1 sec (可选 Binning 4 以提高收集速度), 若不用 capture, 则 Binning 1, Exposure time 按需要填写。

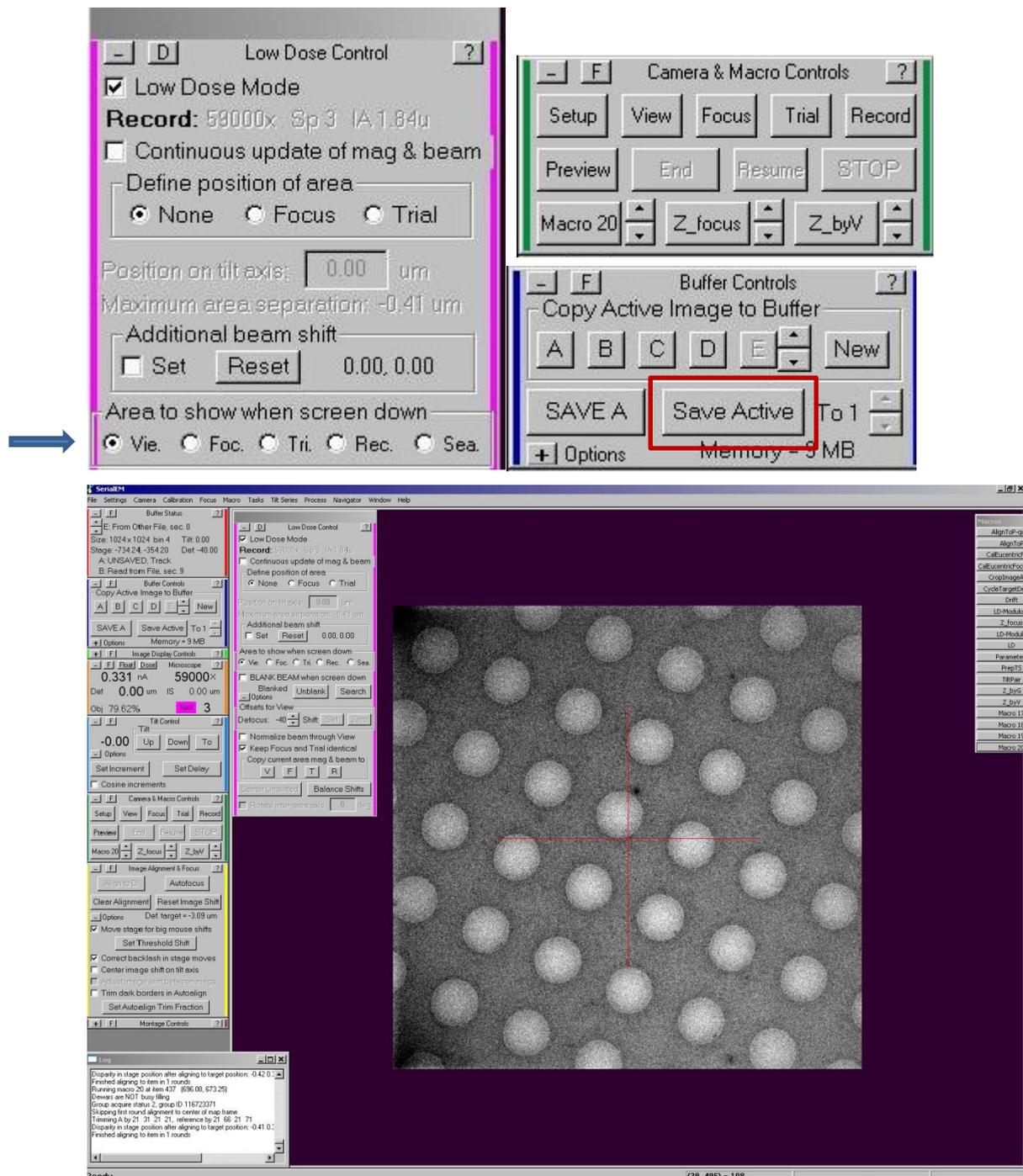


3 设置自动拍地图

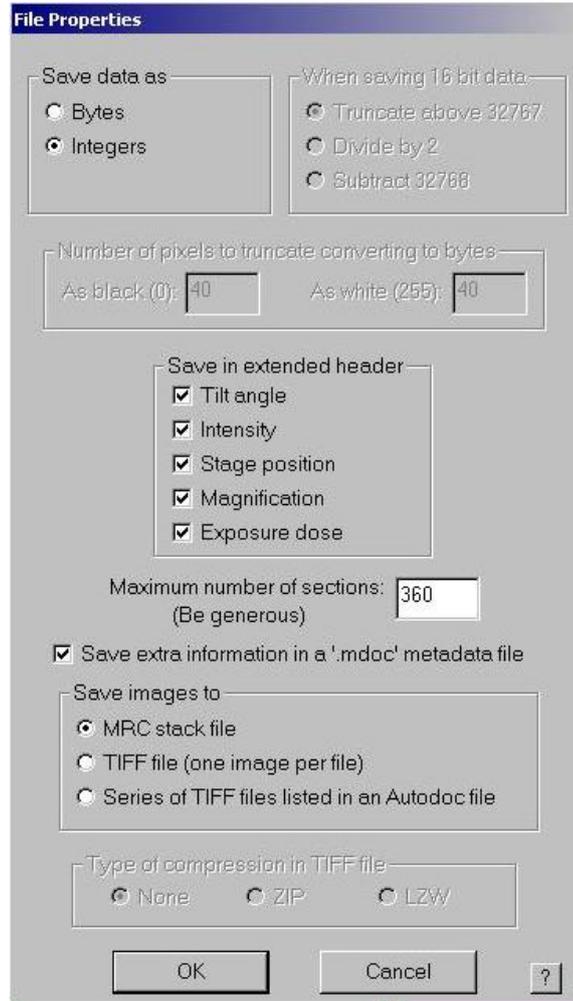
a) 在 SerialEM 菜单栏 navigator-> open 打开 navigator



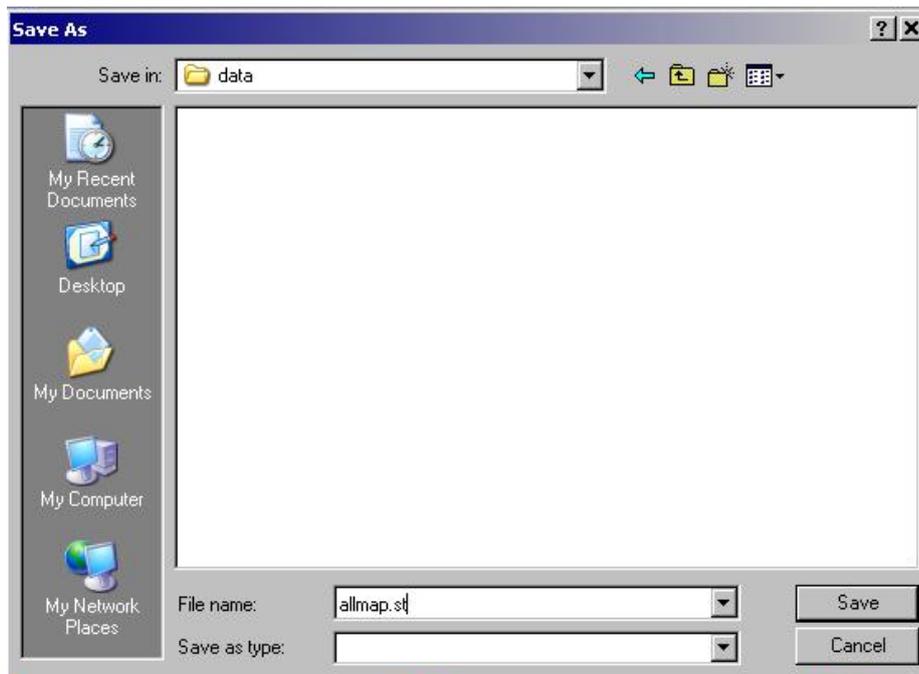
- b) 在 Low Dose Control 界面 -> Area to show when screen down -> 选择 Vie.
 放下电镜荧光屏，等待 20 sec 将自动进入 View 模式。
 在这个模式下，移动样品到载网的网格的中心（即 square 的中心）。
 点击 Camera & Macro Controls 界面中的 View 按钮，拍一张低倍照片。
 点击 Buffer Controls 界面中的 Save Active 按钮，保存该张低倍照片。



如果此前没有打开的 mrcs 或 st 文件供存储该尺寸的小地图，则会跳出保存信息界面要求指定存储信息及存储位点。如果此前已有打开的 mrcs 或 st 文件则设定保存信息和位点的步骤将不会出现。这张低倍照片仅做为下一步大地图拍摄的定位使用。



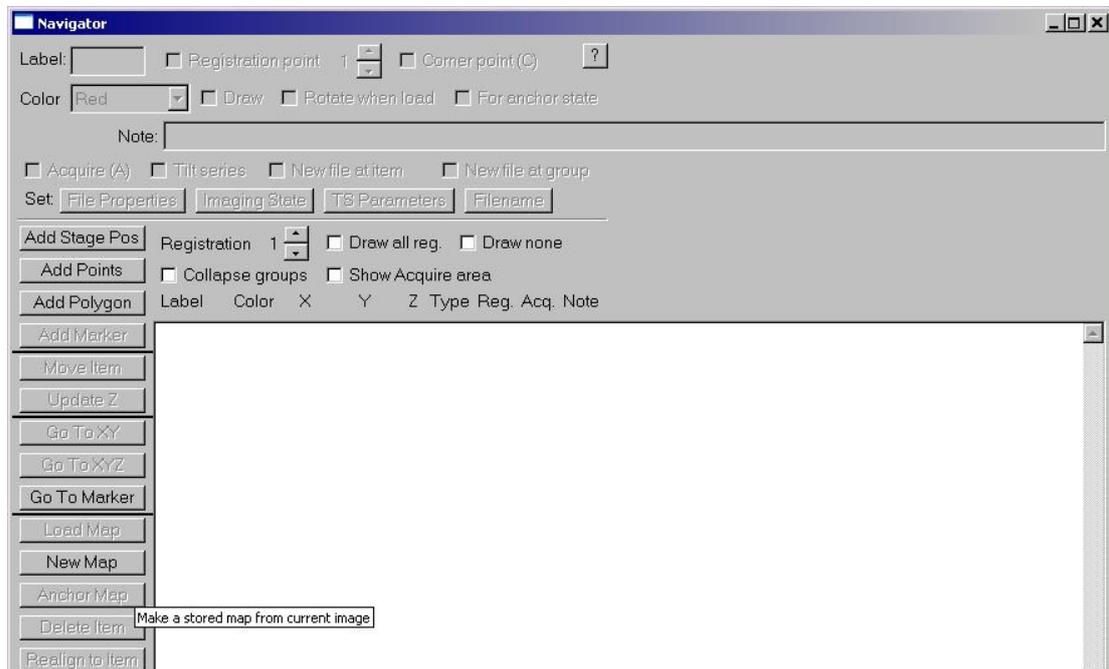
指定存储信息，按照图所示选择即可。



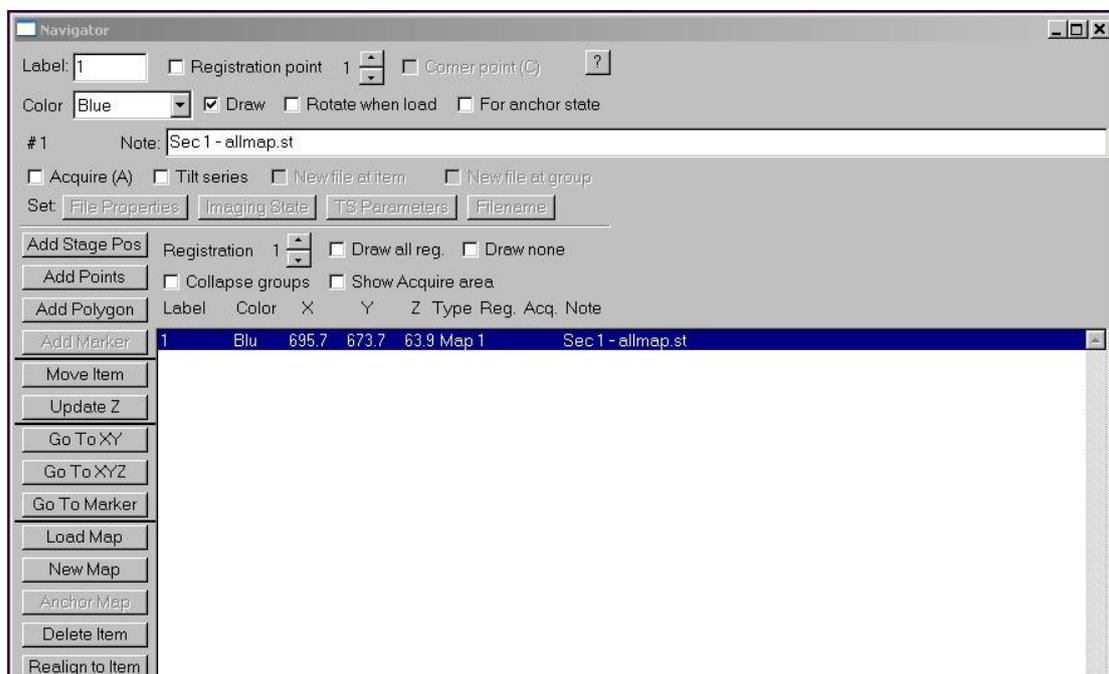
指定存储位置及文件名。如图起一个 st 为扩展名的文件名在电镜可存储临时文件的位

置 (Talos 为 supportPC 的网盘 data\, Titan 为 E:\SerialEM_Titan\))。

c) 在 navigator 窗口中点击 New map 按钮, 上一步中拍摄的低倍照片将做为一个小地图, 做为下一步大地图拍摄的定位使用

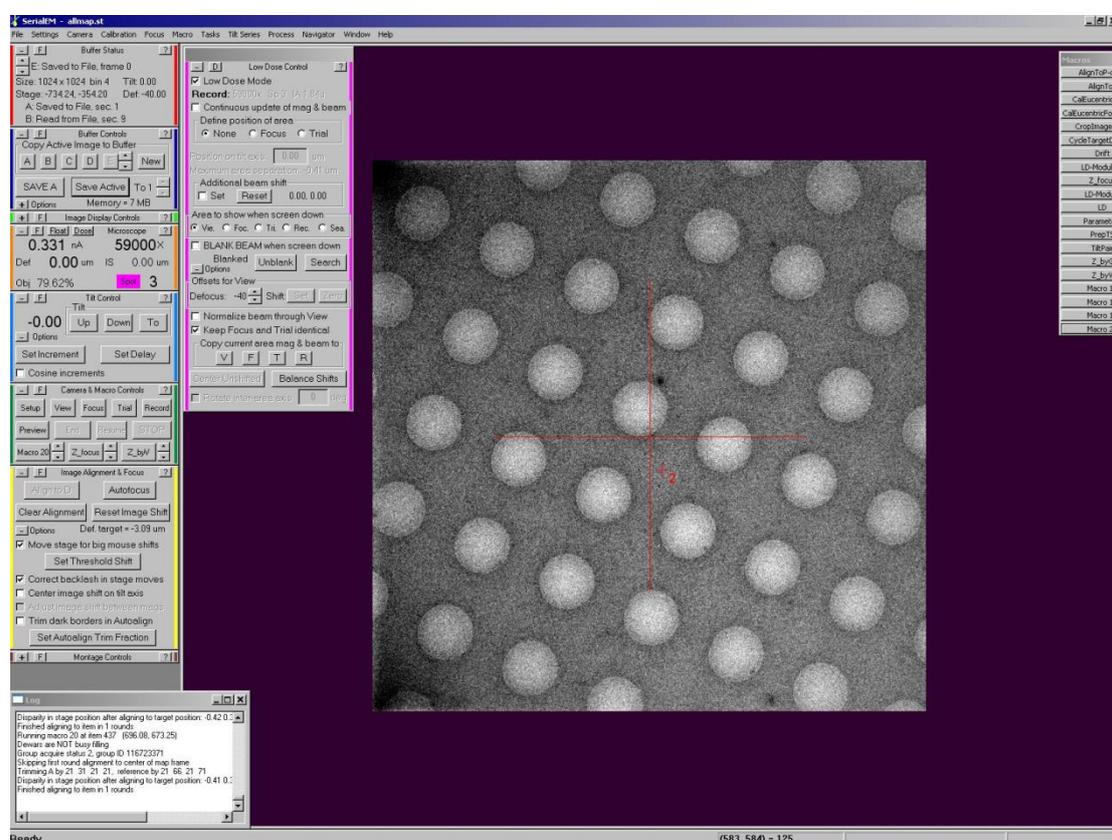
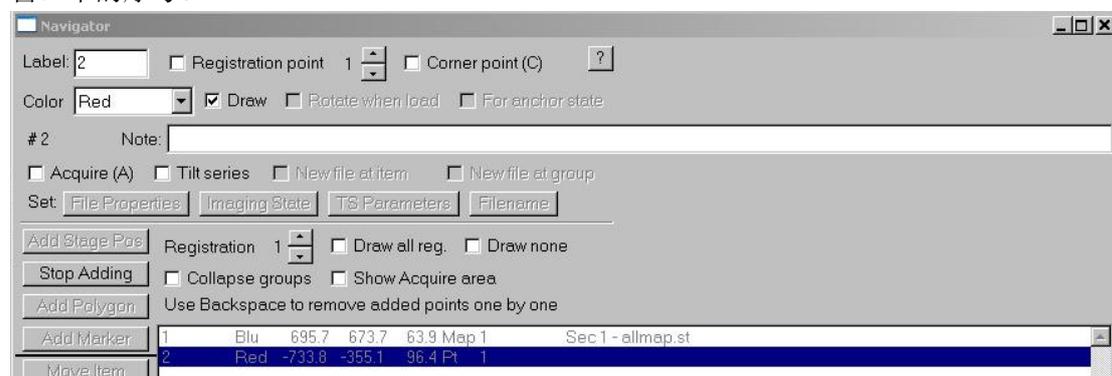


在 navigator 窗口将出现一个条目, 代表上一步中保存的低倍照片 (小地图)

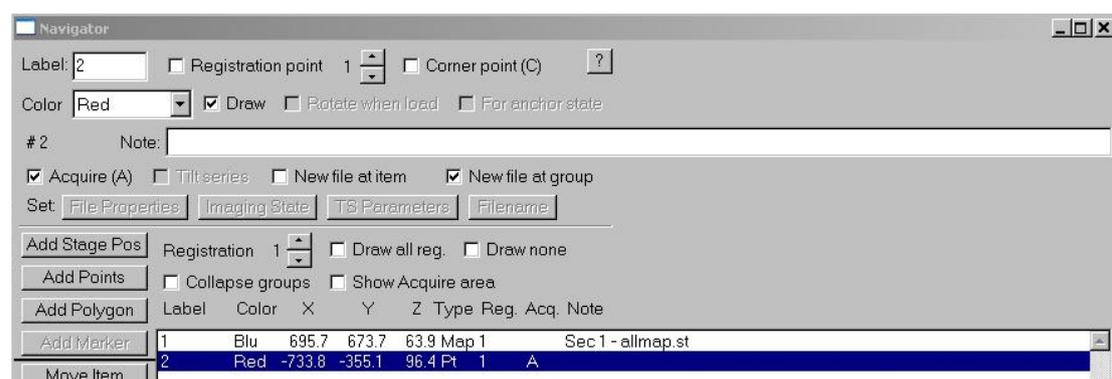


d) 在 navigator 窗口中点击 Add Points 按钮（随即该按钮变为 Stop Adding）。

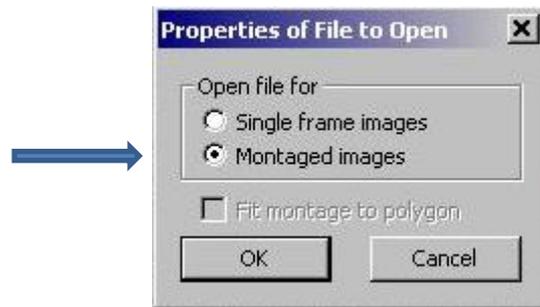
然后在已保存的低倍照片（小地图）上点击左键，设置拍大地图前的聚焦位点（通常在碳膜上）。选定的点会自动在 navigator 窗口添加一个条目，并在照片上出现该点在 navigator 窗口中的序号。



在 navigator 窗口中点击 Stop Adding 按钮，并勾选 Acquire 和 New file at group



如果此前没有设定大地图的拍摄参数及存储位点，则在勾选了 **New file at group** 后弹出以下窗口。在此窗口中选择 **Montaged images** -> **OK**。如此前已设定大地图的拍摄参数及存储位点，以下步骤将不会出现。

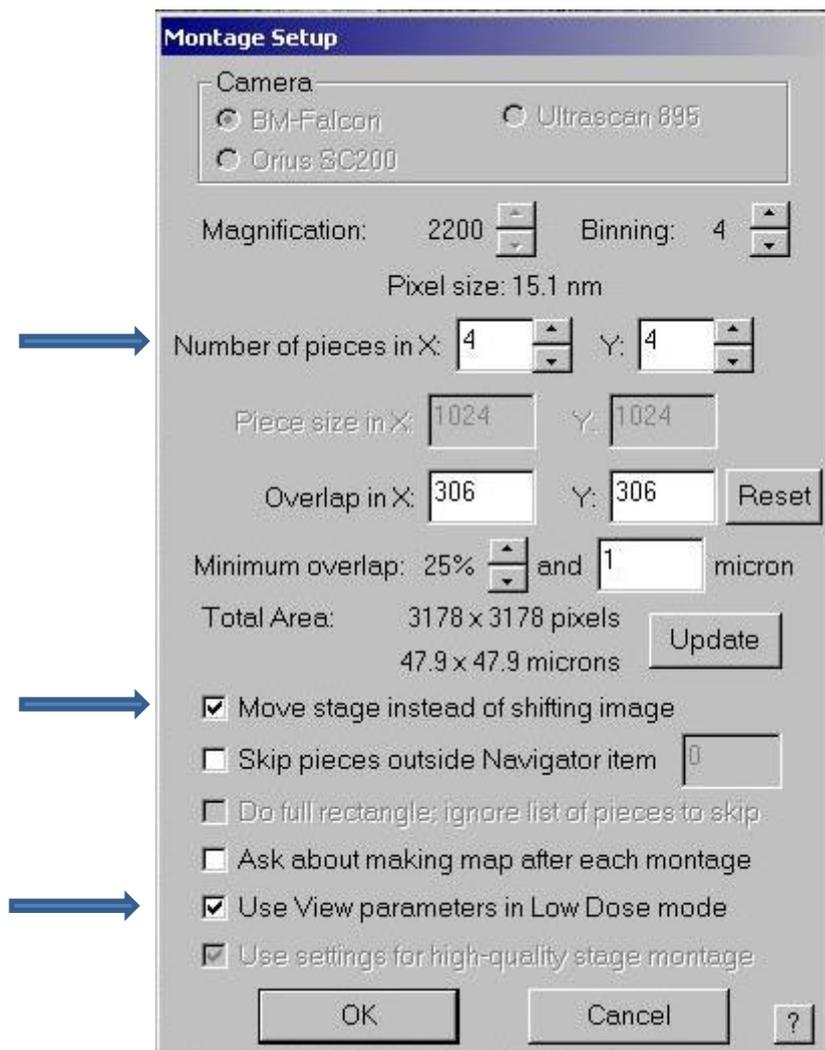


设置大地图拍摄参数：

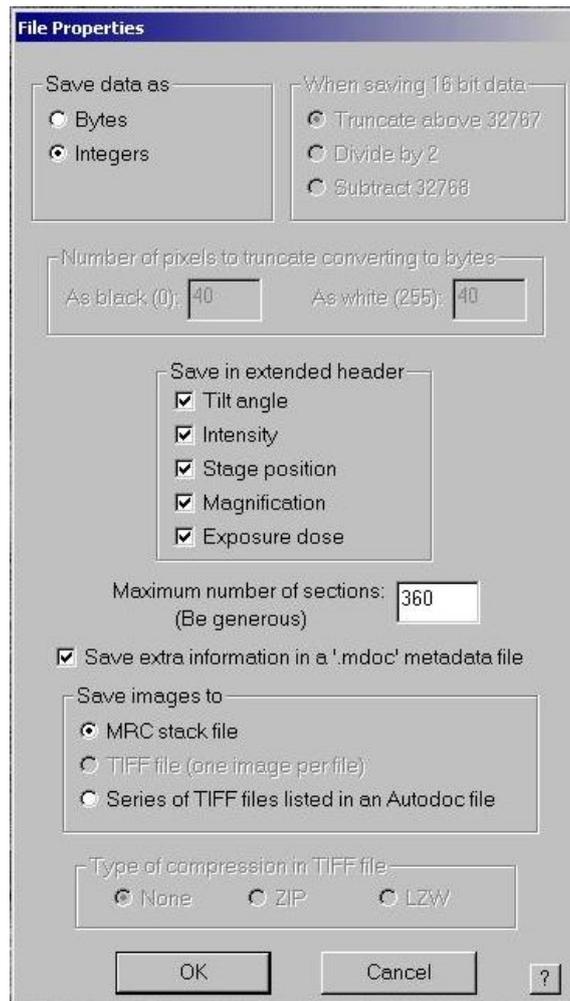
如下图显示 X 方向拍摄 4 张，Y 方向拍摄 4 张（可根据样品的实际载网的网格大小来设置）。

勾选 **Move stage instead of shifting image**，则程序在拍大地图时使用 **stage** 移动方式而非 **image shift**。

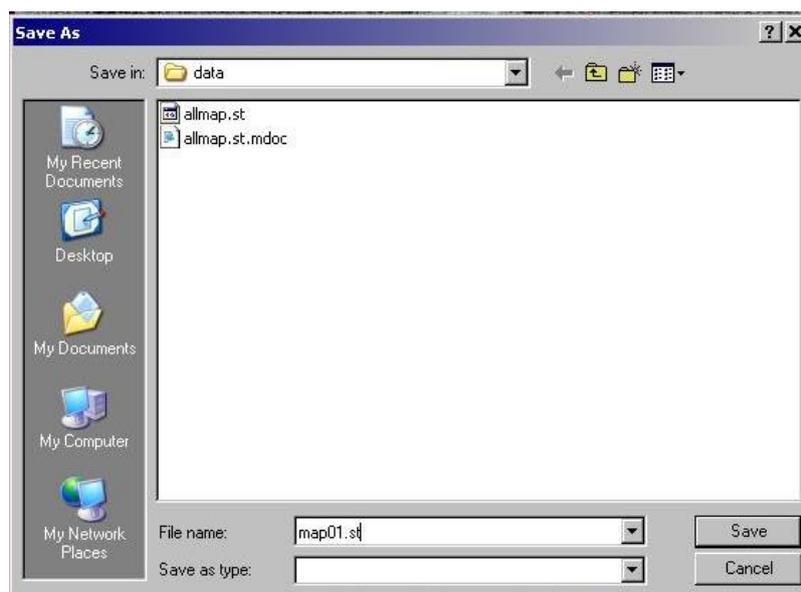
勾选 **Use View parameters in Low Dose mode**，则程序在拍大地图时使用 **View** 模式，而非 **Record** 模式。



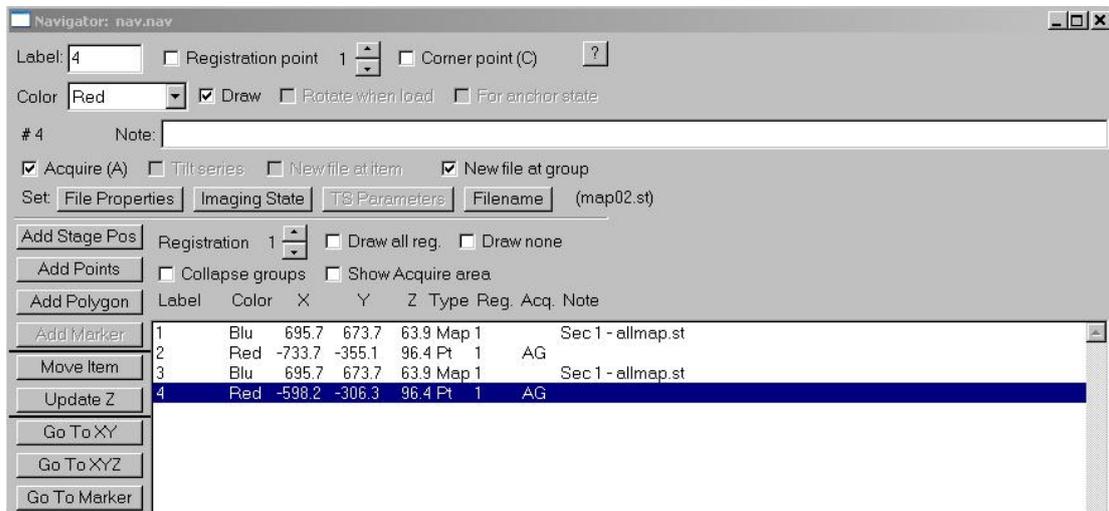
设置大地图存储位点



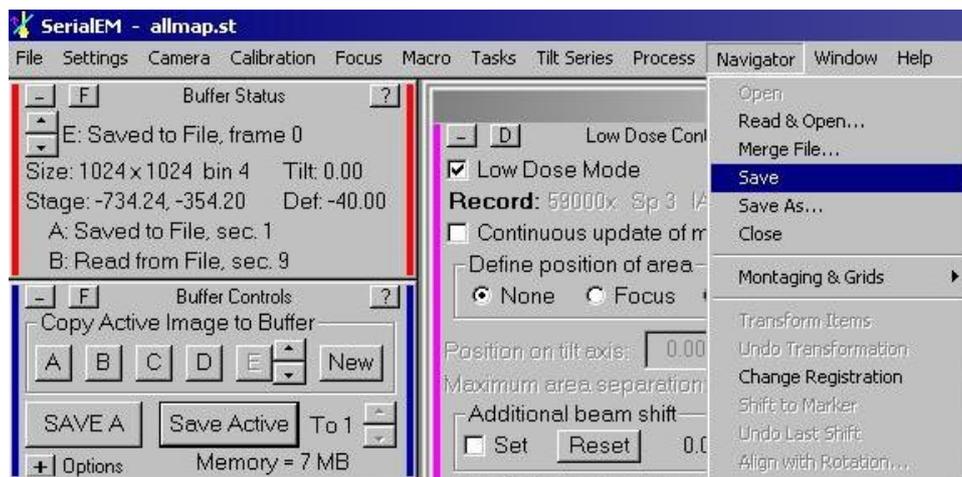
命名大地图，建议使用字母+数字.st（例：map01.st）的模式命名，此后的大地图将由程序自动根据这种模式命名。



e) 移动到下一个 square, 按照步骤 b, c 和 d 进行设置, 直至所有需要进行数据收集的 square 都已完成标定。每个完成标定的 square 将有两个条目, 一个是小地图 (没有 AG 标记), 一个是拍大地图前的聚焦点 (有 AG 标记)。



保存 navigator, SerialEM 菜单 navigator -> save



f) 按照设定自动拍摄大地图。

按 Ctrl 键 + 鼠标左键点击 macro 17，查看 macro17 的内容。适用于自动大地图拍摄的 macro17 应为：

```
RealignToNavItem 1          # 移动样品台至所选的点
call Z_focus                # 通过改变 z 轴高度进行自动聚焦至正焦
MoveStage 0 0 -4.5         # 自动欠焦-4.5um
updateitemZ                 # 更新当前点的 z 值
```

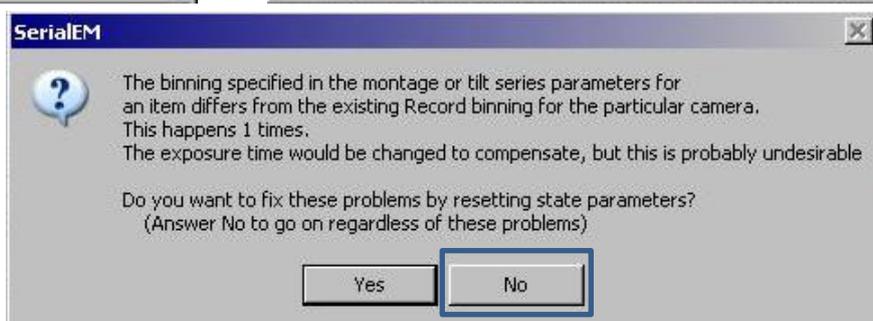
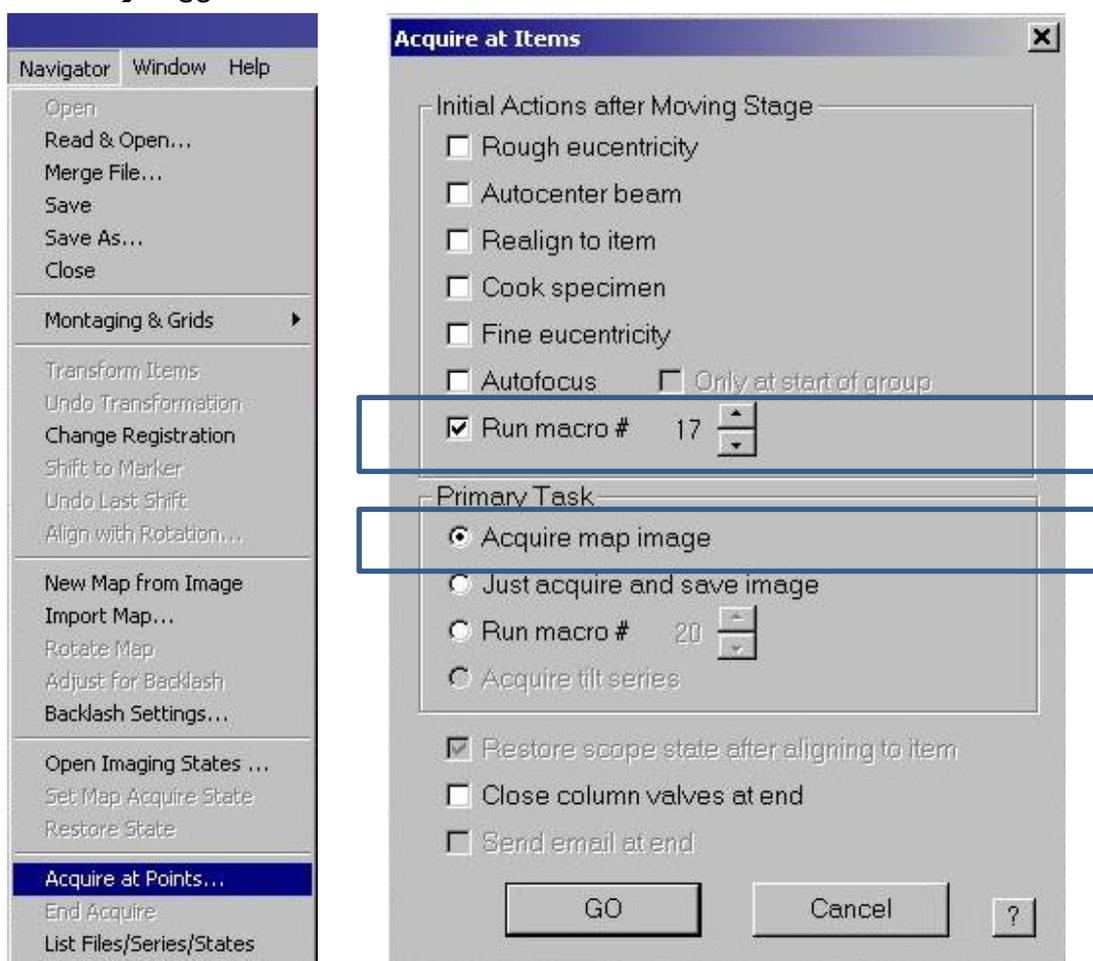
当 macro17 检查无误后，可用以下步骤开启自动地图拍摄。

SerialEM 菜单 -> Navigator -> Acquire at Points ->

在 Initial Actions after Moving Stage 栏中，选择 Run Macro #17

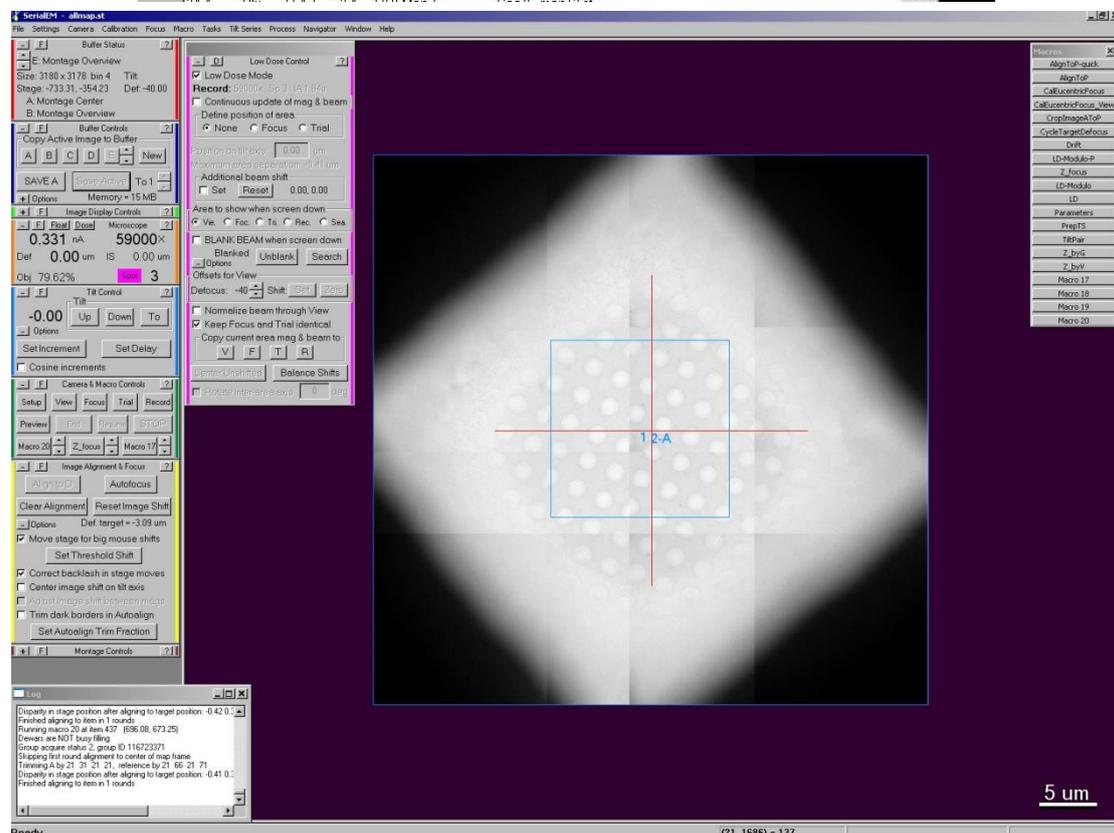
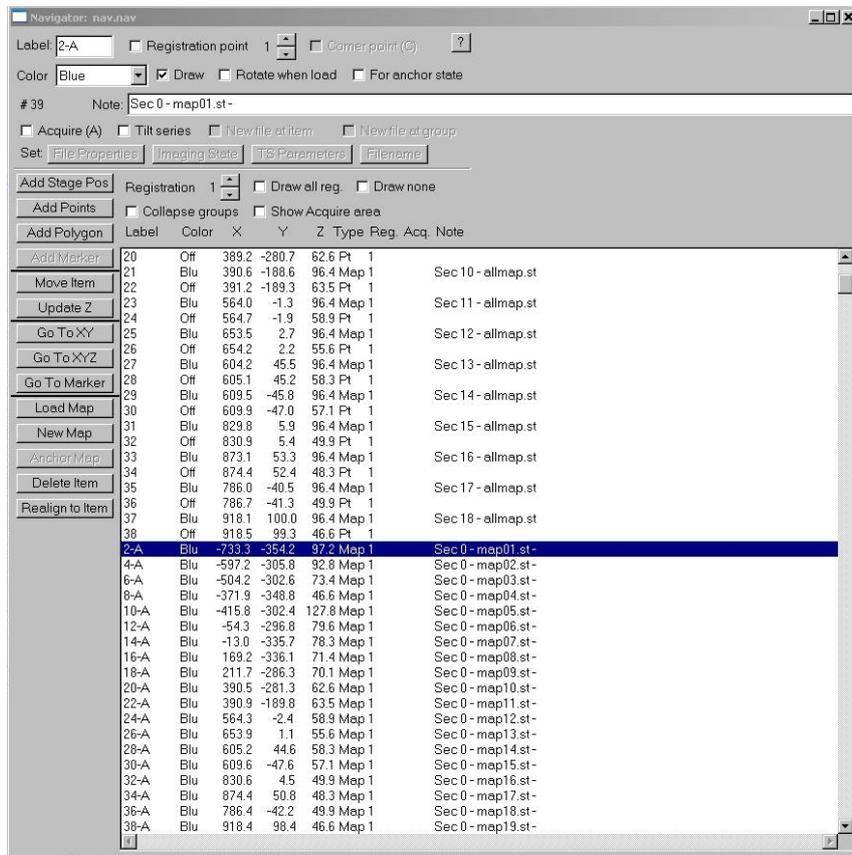
在 Primary Task 栏中，选择 Acquire map image

→ GO



若跳出此窗口，则选 No。

随后, 所选定的所有点都将进行自动大地图拍摄。拍摄好的大地图条目的序号将带一个 A, 如 2-A, 4-A, 6-A 等。双击该条目可将拍好的大地图调出到 buffer E 中, 显示到主界面上。
 注意保存 navigator。SerialEM 菜单 navigator -> save



4 选择数据收集位点

在 navigator 窗口中点击 Add Points 按钮（随即该按钮变为 Stop Adding）。

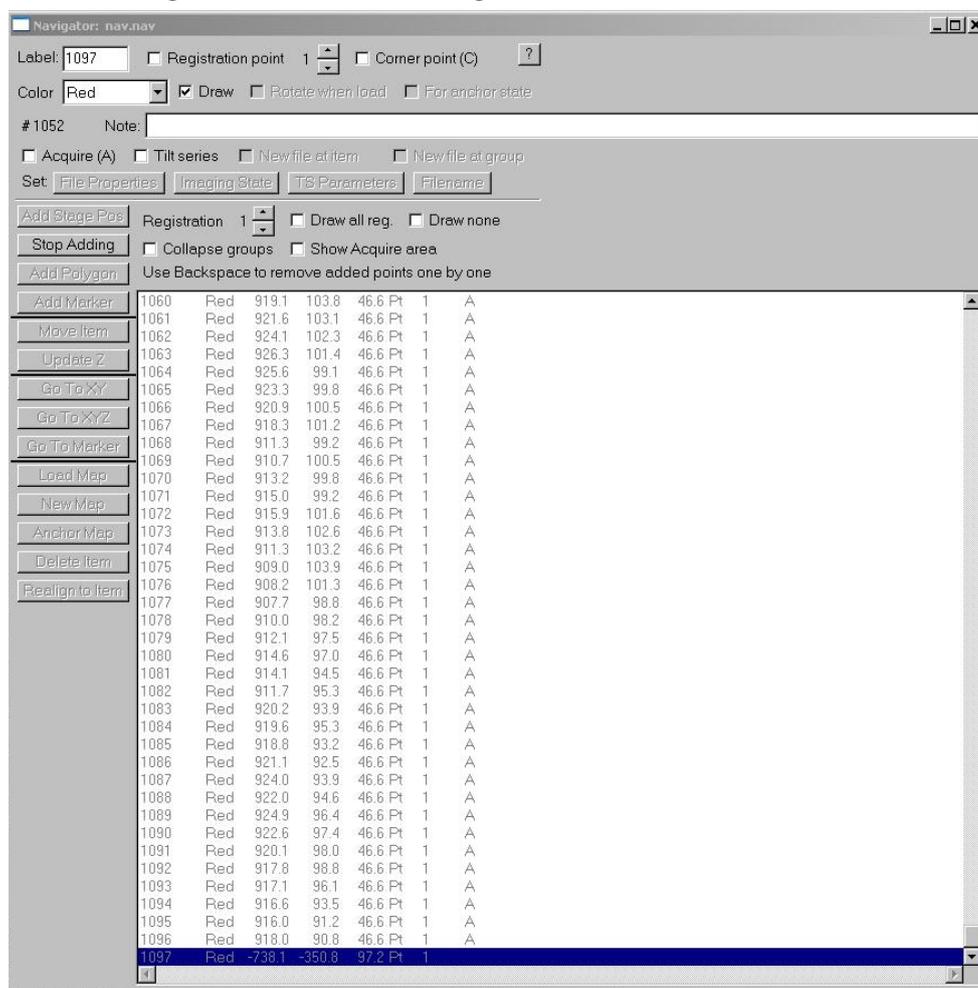
然后在地图上点击左键，设置数据收集的位点。点击选定的点会自动在 navigator 窗口添加一个条目，并在照片上出现该点在 navigator 窗口中的序号。选择完成后，点击 Stop Adding 退出选择位点的状态。

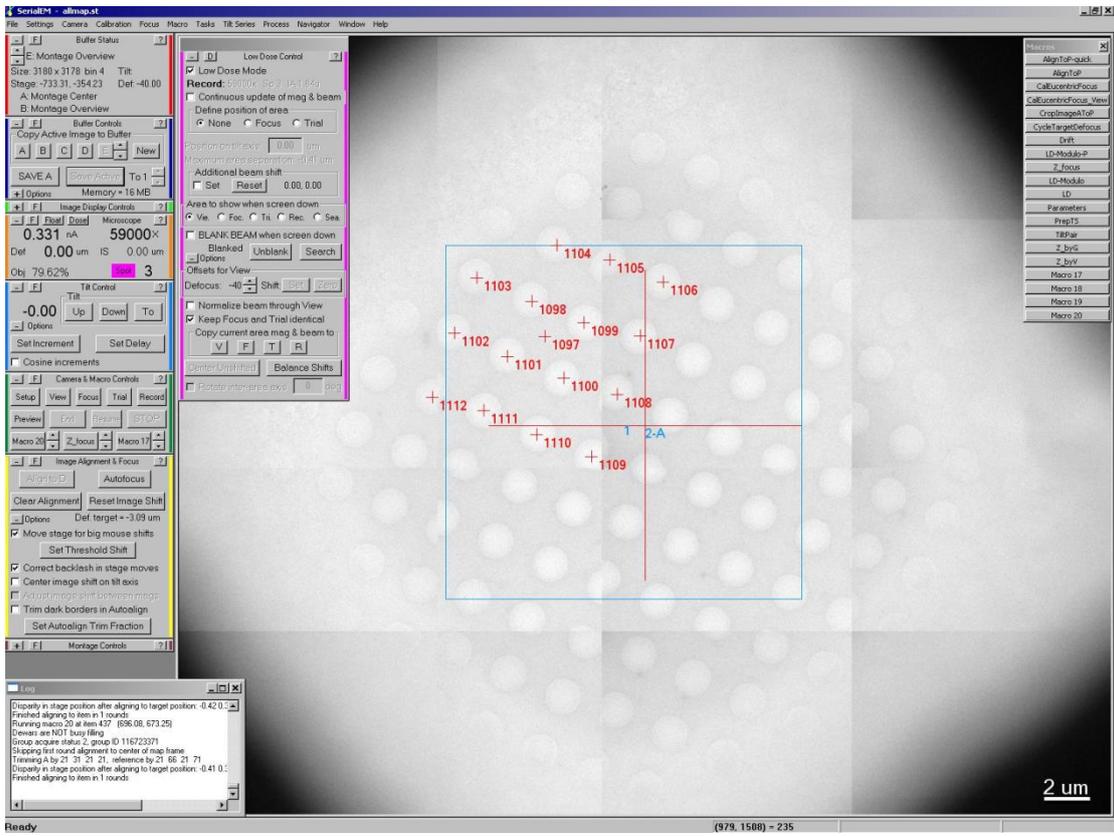
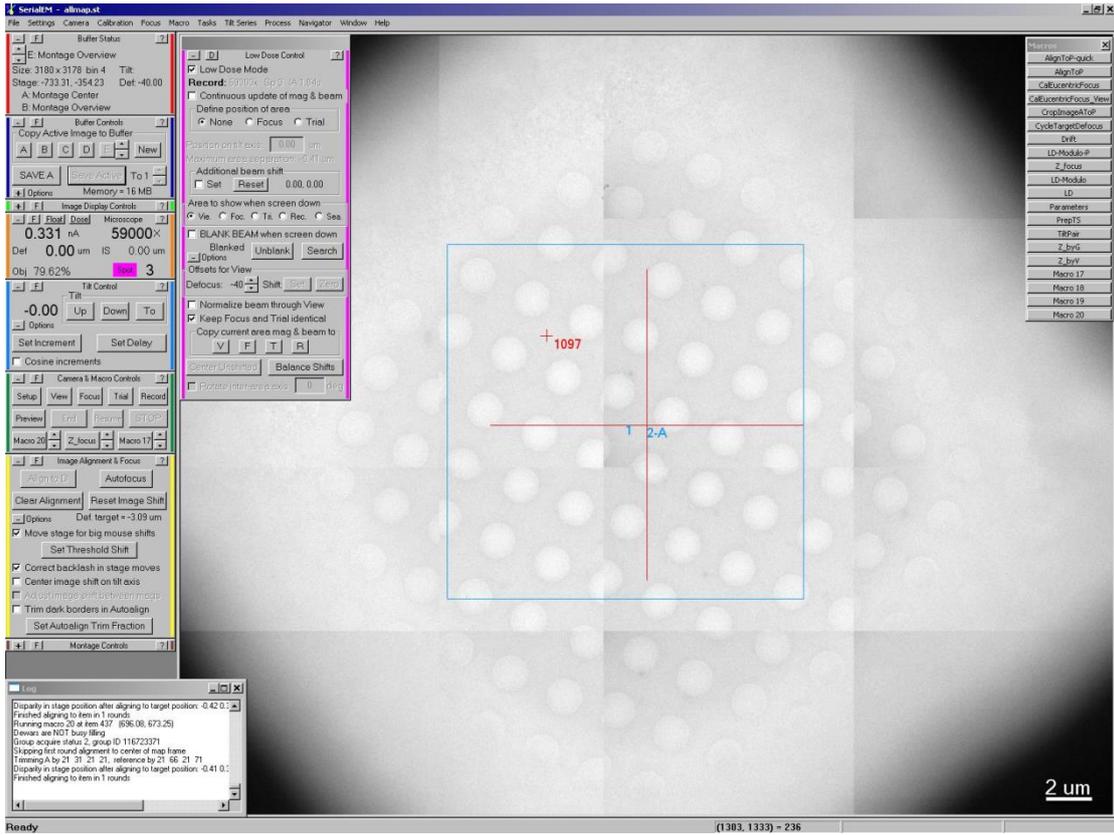
Group 是指从点击 Add Points 开始到点击 Stop Adding 结束的整个期间里，所选定的所有点。

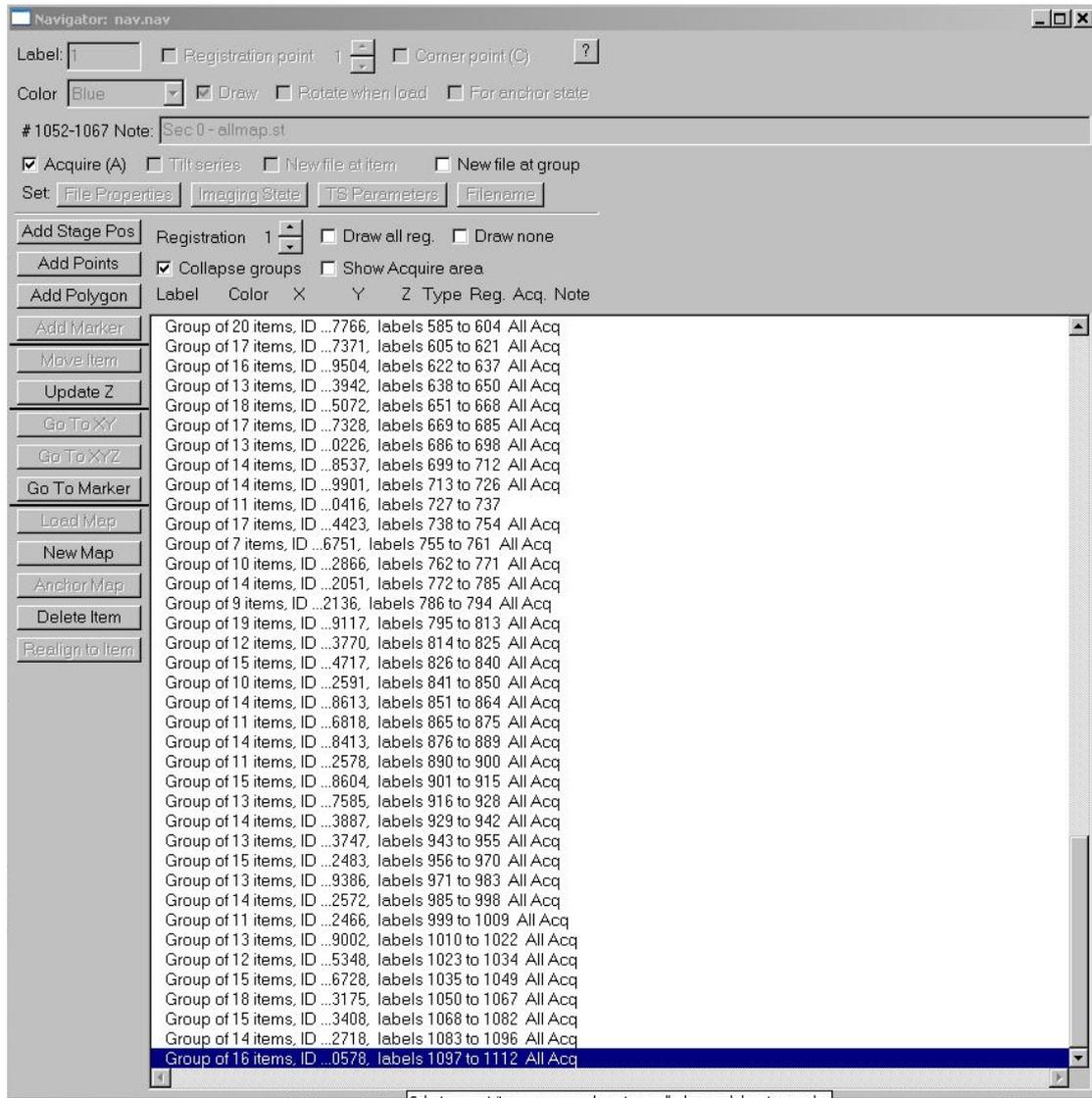
请注意每个 group 的第一个位点为 Focus 位点（通常选择在碳膜上）。随后的其它位点为需要进行数据收集的位点。请注意每个 group 只在第一个 Focus 位点进行自动聚焦（只改变 Z 值，不改变 obj lens），随后的其它点采用与 Focus 位点相同的 Z 值进行数据收集，不再聚焦。因此，每个 group 的点分布的范围不宜过大，通常 1/1 的支持膜内，4 * 4 个孔的范围可作为一个 group。

group 选择完成后，勾选 Collapse groups 选项时，可将同一个 group 中的所有点归至一个条目内。逐个选定每个 group，勾选 Acquire 选项，让 group 内的每个点都带上标记 A，在 Collapse groups 状态中，每个 group 带上 All Acq 标记。在 Talos 或者在 Titan 但不用 capture 进行数据收集时，还需勾选 New file at group，以设定数据收集的存储位点，使每个数据收集位点条目带上 AG 标记。在 Titan 用 capture 进行数据收集时，不需要选择勾选 New file at group，使每个数据收集位点条目只带 A 标记，因为 capture 会自动获取 exposure time 超过一秒的照片进行输出。

注意保存 navigator。SerialEM 菜单 navigator -> save



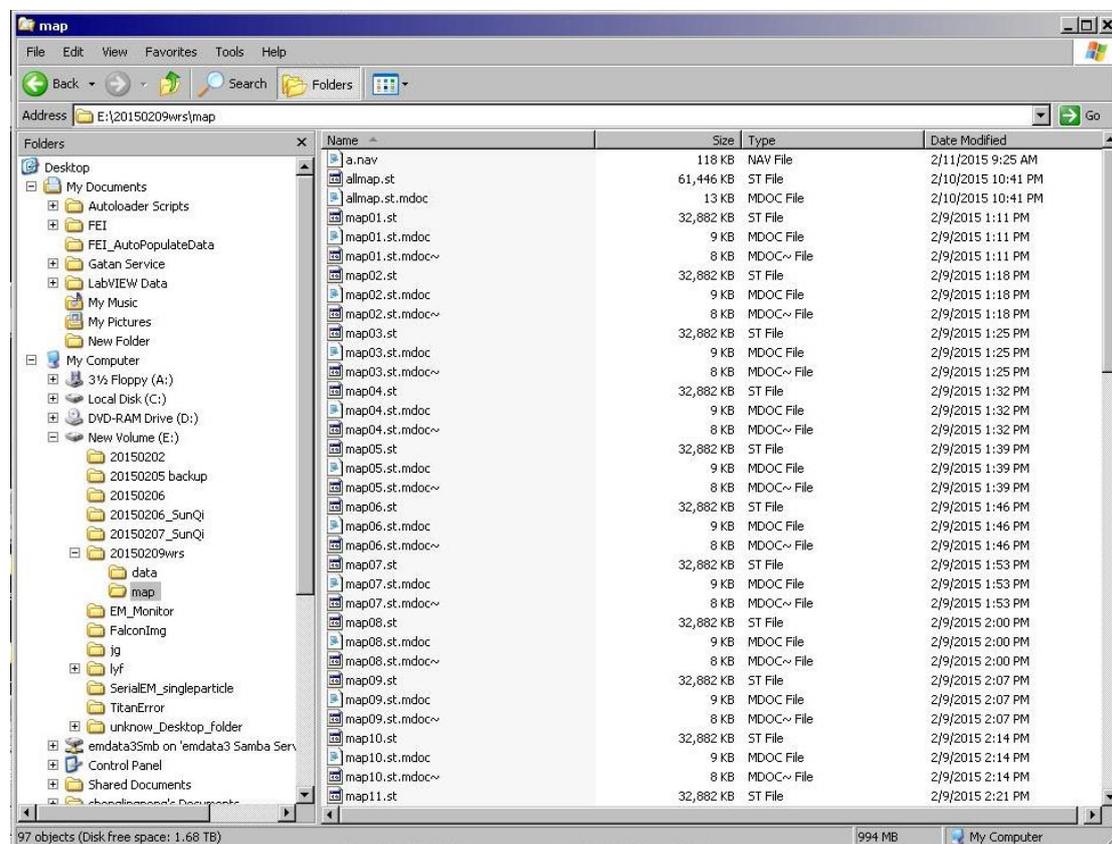




5 离线选择数据收集位点

为了缩短自动数据收集的设置时间，可在选择了少量点运行数据收集的同时，进行离线的选择数据收集位点。具体步骤如下：

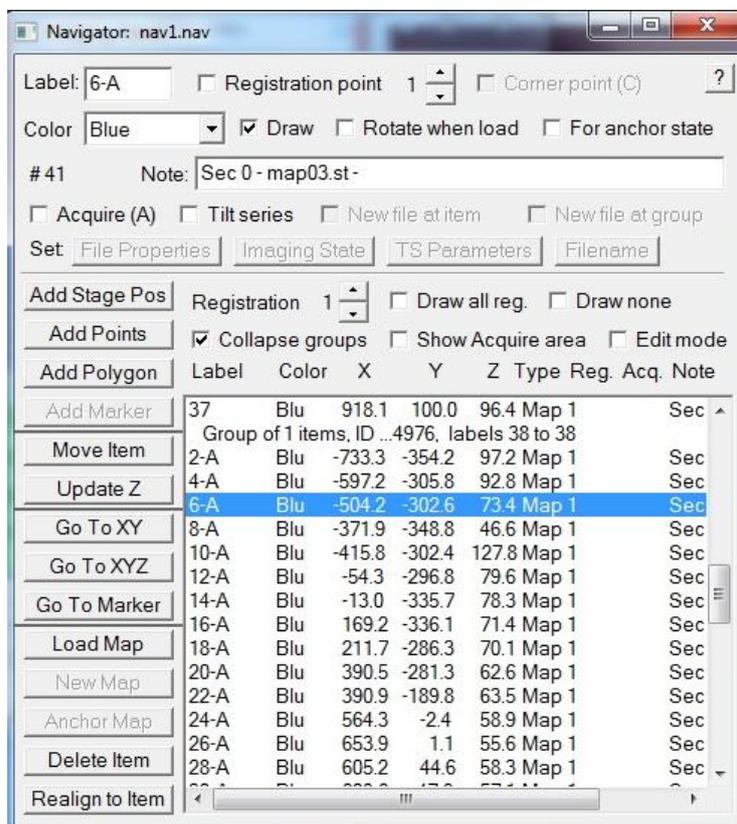
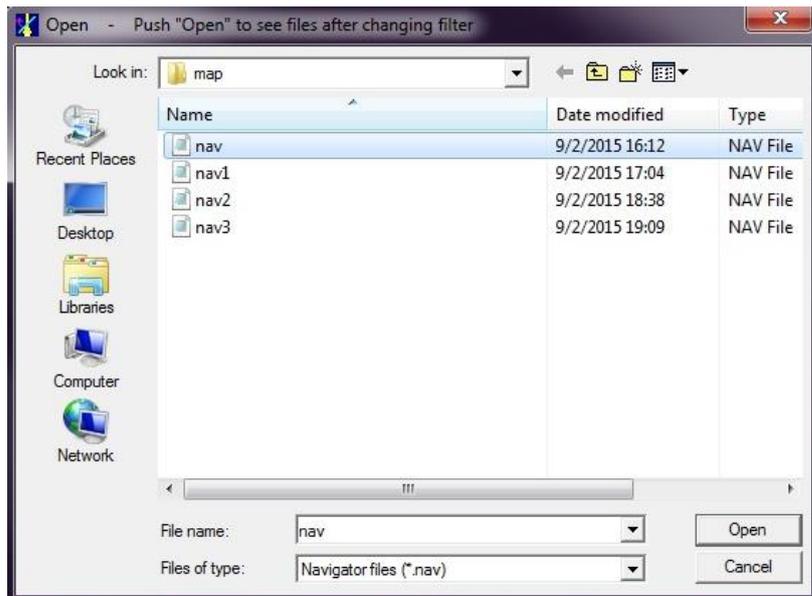
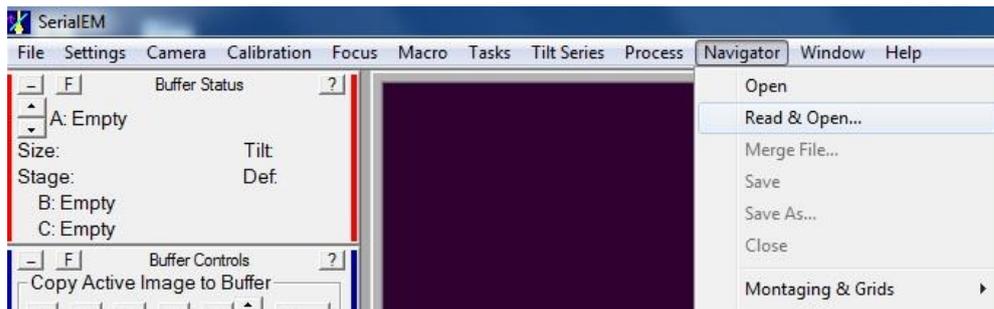
- a) 将自动拍摄好的所有大地图文件（map*.st）和自动拍摄完大地图后保存的 nav 文件（nav.nav），拷贝到 supportPC 上。



- b) 启动 supportPC 上的 SerialEM-offline。



c) 在离线版的 SerialEM 中打开拷贝过来的 nav 文件（nav.nav）。



d) 在 navigator 窗口中点击 Add Points 按钮（随即该按钮变为 Stop Adding）。

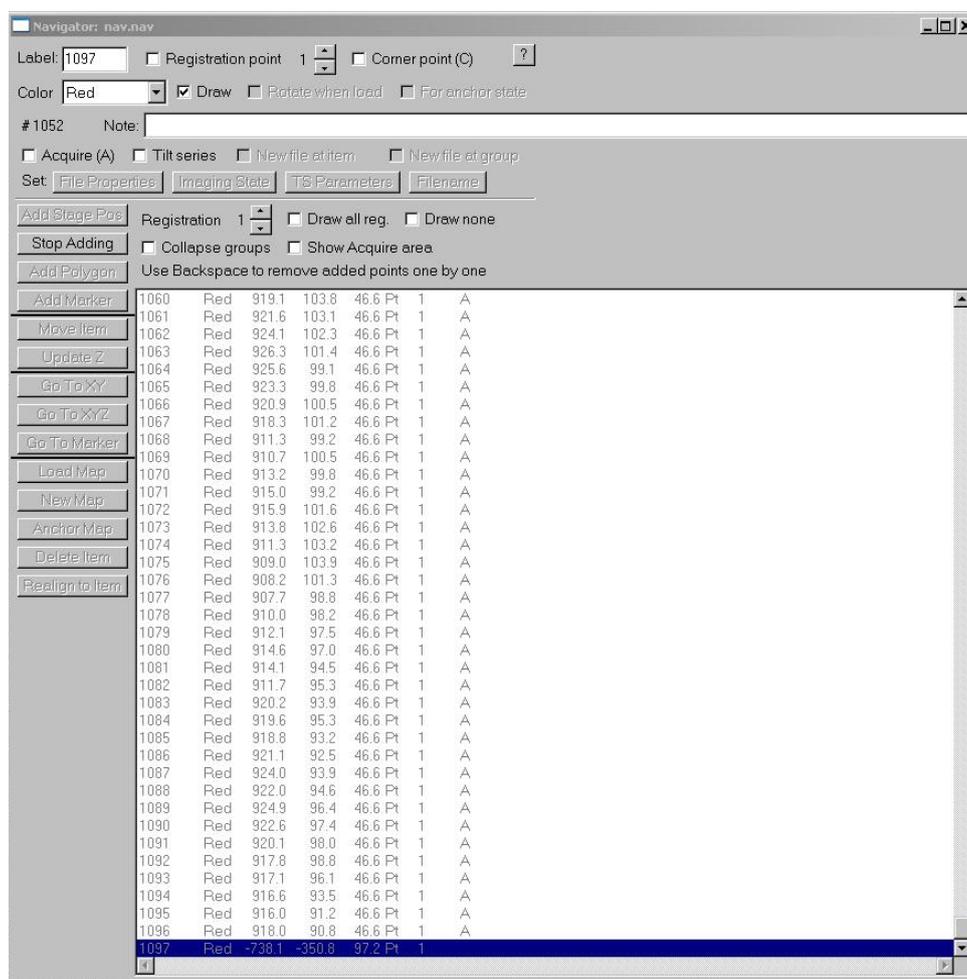
然后在大地图上点击左键，设置数据收集的位点。点击选定的点会自动在 navigator 窗口添加一个条目，并在照片上出现该点在 navigator 窗口中的序号。选择完成后，点击 Stop Adding 退出选择位点的状态。

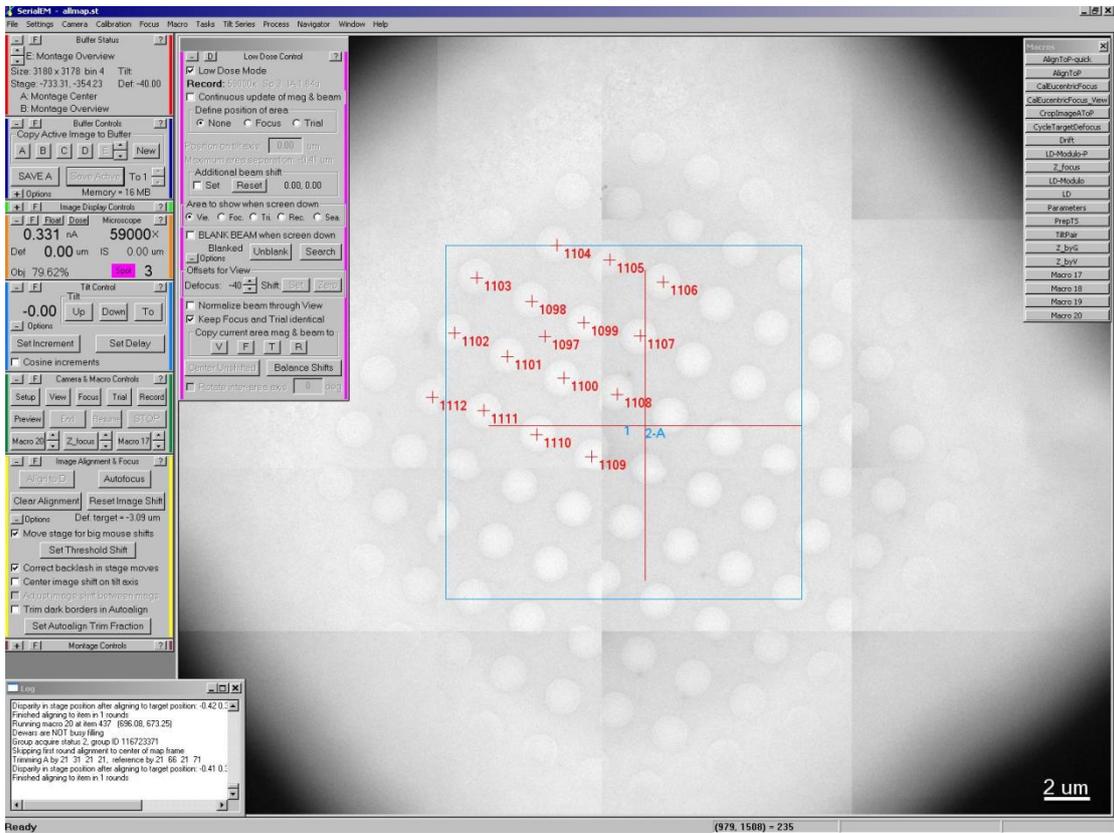
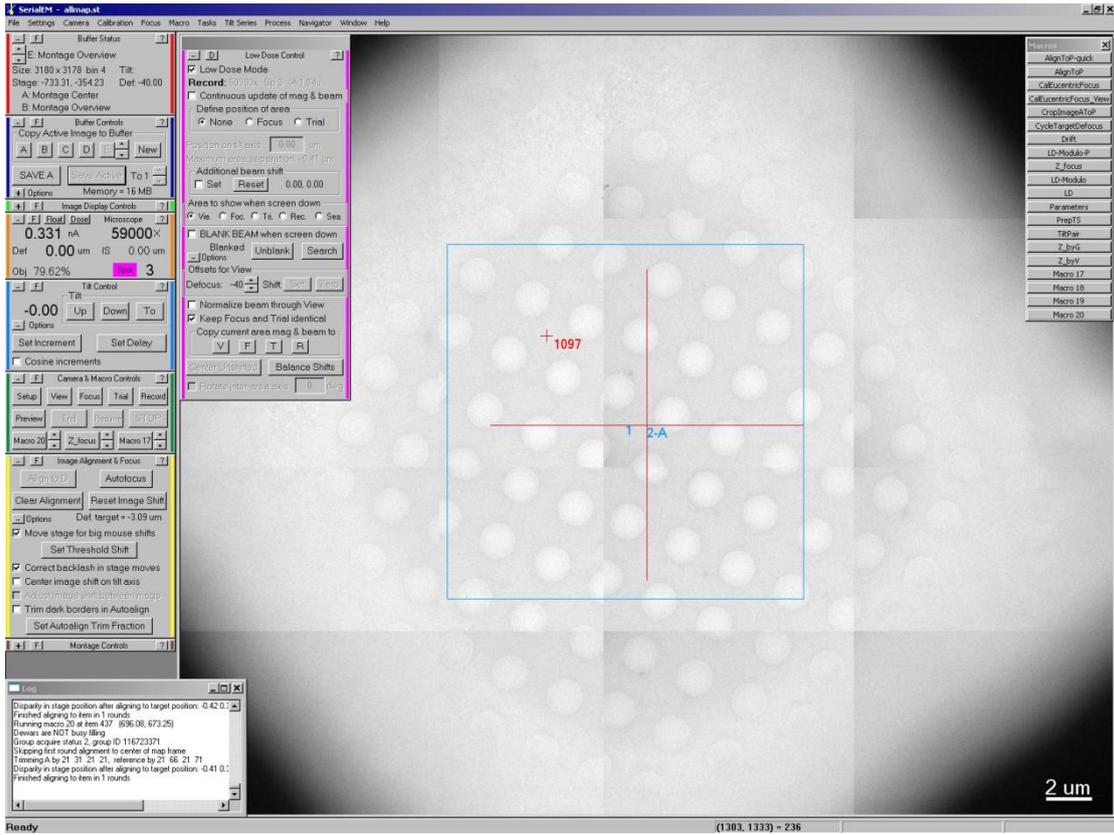
Group 是指从点击 Add Points 开始到点击 Stop Adding 结束的整个期间里，所选定的所有点。

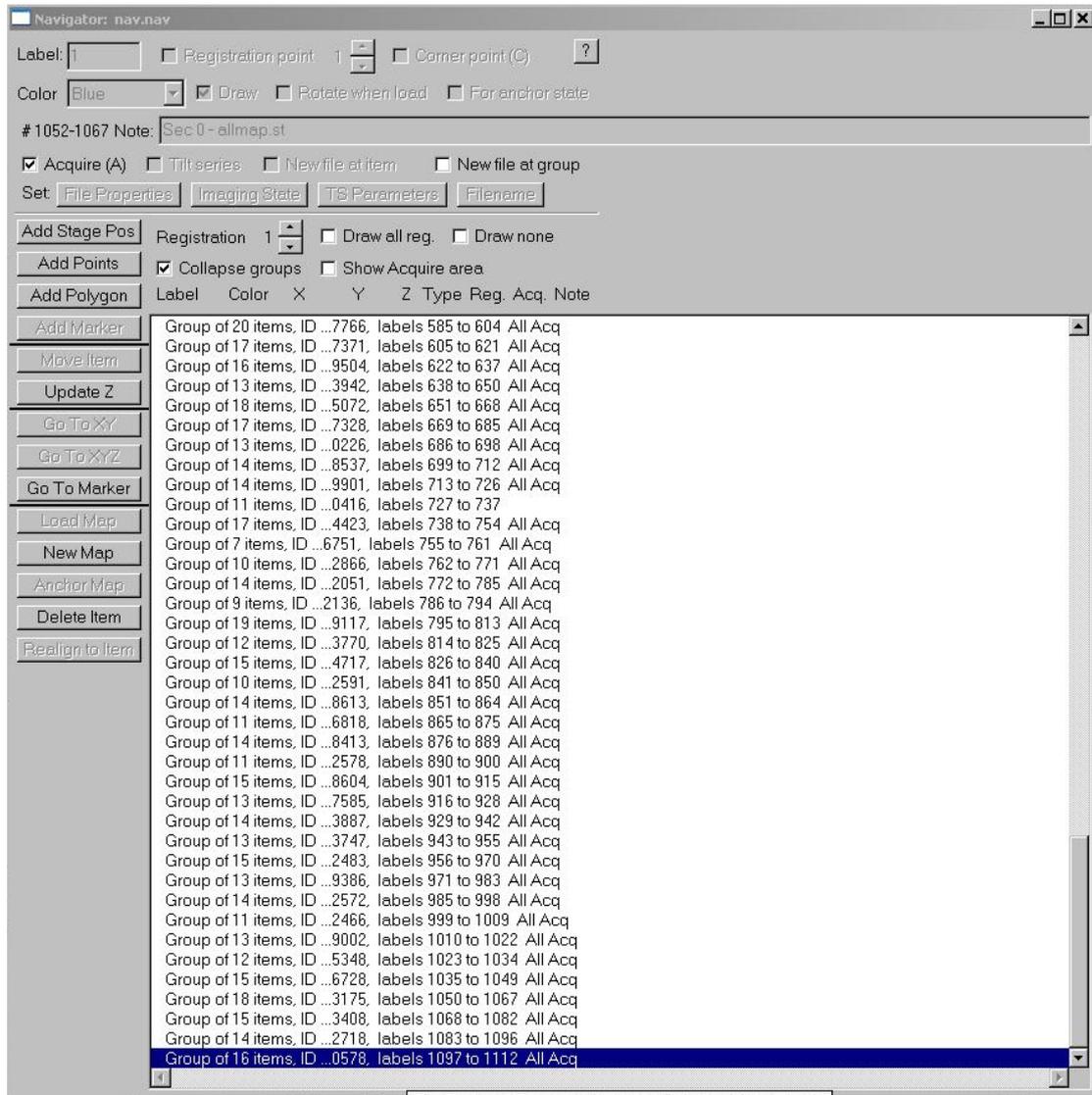
请注意每个 group 的第一个位点为 Focus 位点（通常选择在碳膜上）。随后的其它位点为需要进行数据收集的位点。请注意每个 group 只在第一个 Focus 位点进行自动聚焦（只改变 Z 值，不改变 obj lens），随后的其它点采用与 Focus 位点相同的 Z 值进行数据收集，不再聚焦。因此，每个 group 的点分布的范围不宜过大，通常 1/1 的支持膜内，4 * 4 个孔的范围可为一个 group。

group 选择完成后，勾选 Collapse groups 选项时，可将同一个 group 中的所有点归至一个条目内。逐个选定每个 group，勾选 Acquire 选项，让 group 内的每个点都带上标记 A，在 Collapse groups 状态中，每个 group 带上 All Acq 标记。在 Talos 或者在 Titan 但不用 capture 进行数据收集时，还需勾选 New file at group，以设定数据收集的存储位点，使每个数据收集位点条目带上 AG 标记。在 Titan 用 capture 进行数据收集时，不需要选择勾选 New file at group，使每个数据收集位点条目只带 A 标记，因为 capture 会自动获取 exposure time 超过一秒的照片进行输出。

注意保存 navigator。SerialEM 菜单 navigator -> save as -> nav01.nav （与第一个 nav 文件不一样的名字）。

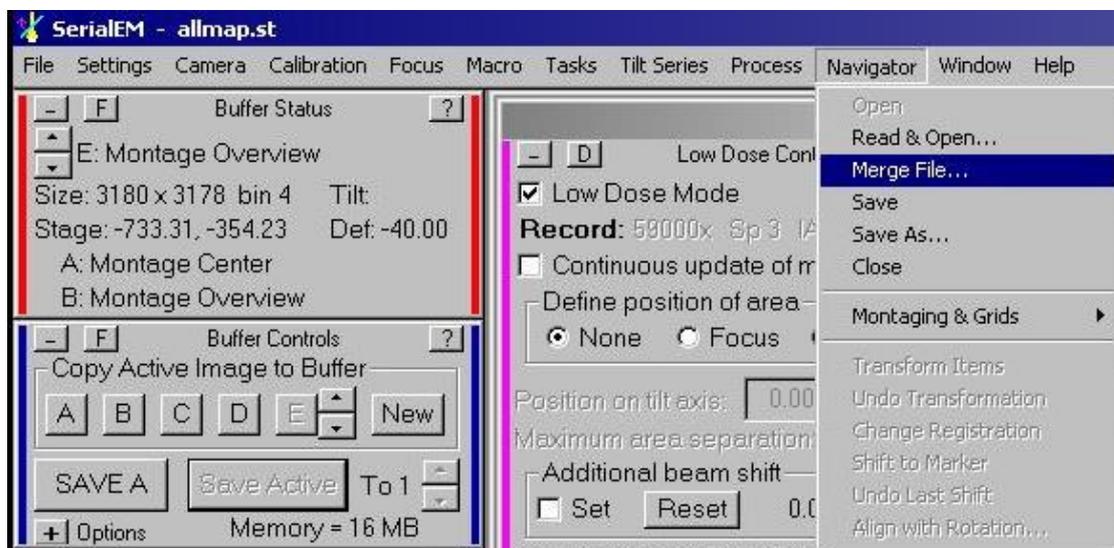






e) 当所有大地图都已经选点结束，可在 SerialEM 的在线运行版本上停止正在进行的数据收集，将离线版选择的点 merge 到在线版的 navigator 中。具体步骤如下：

SerialEM 在线版菜单 -> Navigator -> Merge File -> 选择离线版最后保存的 nav 文件（文件名与在线版当前文件名不同）



6 启动自动数据收集

按 Ctrl 键 + 鼠标左键点击 macro 20, 查看 macro20 的内容。适用于自动数据收集的 macro20 应为:

#For Titan Krios with capture

GroupSize = 50 # 根据实际每个 group 中的点的大致个数进行修改

MinDefocus = -2.5 # 欠焦最小值 (-2 适用于最小欠焦为-1um)

MaxDefocus = -3.5 # 欠焦最大值 (-3.5 适用于最大欠焦为-5um)

Step = 10

Loop 10

AreDewarsFilling

Filling = \$reportedValue1

If \$Filling == 0

Break

Endif

Delay 5 min

EndLoop

ReportGroupStatus

GS = \$reportedValue1

RealignToNavItem 1

If \$GS == 1

ReportNavItem

TargetIndex = \$reportedValue1

GroupIndex = \$TargetIndex / \$GroupSize

TargetStep = \$GroupIndex

Loop 10000

If \$TargetStep < \$Step

Break

Endif

TargetStep = \$TargetStep - \$Step

EndLoop

FocusRange = \$MaxDefocus - \$MinDefocus

TargetDefocus = \$MinDefocus + \$FocusRange / \$Step * \$TargetStep

GoToLowDoseArea F

ScreenDown

Delay 20

ScreenUp

Call Z_focus

MoveStage 0 0 \$TargetDefocus

UpdateGroupZ

Else

ResetImageShift

Delay 15

R

Endif

```

#For Talos and Titan without capture
GroupSize = 50          # 根据实际每个 group 中的点的大致个数进行修改
MinDefocus = -2.5      # 欠焦最小值 (-2 适用于最小欠焦为-1um)
MaxDefocus = -3.5      # 欠焦最大值 (-3.5 适用于最大欠焦为-5um)
Step = 10

Loop 10                # Talos 可不要
  AreDewarsFilling     # Talos 可不要
  Filling = $reportedValue1 # Talos 可不要
  If $Filling == 0     # Talos 可不要
    Break              # Talos 可不要
  Endif                # Talos 可不要
  Delay 5 min          # Talos 可不要
EndLoop                # Talos 可不要

ReportGroupStatus
GS = $reportedValue1
RealignToNavItem 1
If $GS == 1
  ReportNavItem
  TargetIndex = $reportedValue1
  GroupIndex = $TargetIndex / $GroupSize
  TargetStep = $GroupIndex
  Loop 10000
    If $TargetStep < $Step
      Break
    Endif
    TargetStep = $TargetStep - $Step
  EndLoop
  FocusRange = $MaxDefocus - $MinDefocus
  TargetDefocus = $MinDefocus + $FocusRange / $Step * $TargetStep
  GoToLowDoseArea F
  ScreenDown
  Delay 20
  ScreenUp
  Call Z_focus
  MoveStage 0 0 $TargetDefocus
  UpdateGroupZ
Else
  ResetImageShift
  Delay 15 #指样品台移动到拍照位点后停滞时间 15 秒，该数值可依据实际情况修改
  R
  S
Endif

```

此外, 这两个 macro 以及之前的自动大地图拍摄都引用一个叫 Z_focus 的 macro, 按 Ctrl 键 + 鼠标左键点击 Z_focus, 查看 Z_focus 的内容如下:

```
MacroName Z_focus
Loop 2
Autofocus -1
ReportAutofocus
t = -1 * $reportedValue1
MoveStage 0 0 $t
echo --> Z moved $reportedValue1 micron
EndLoop
```

当检查以上 macro 都无误后, 在 Titan Krios 用 capture 收集的, 按 capture 的步骤进行扣相机背底和启动 capture 的操作。

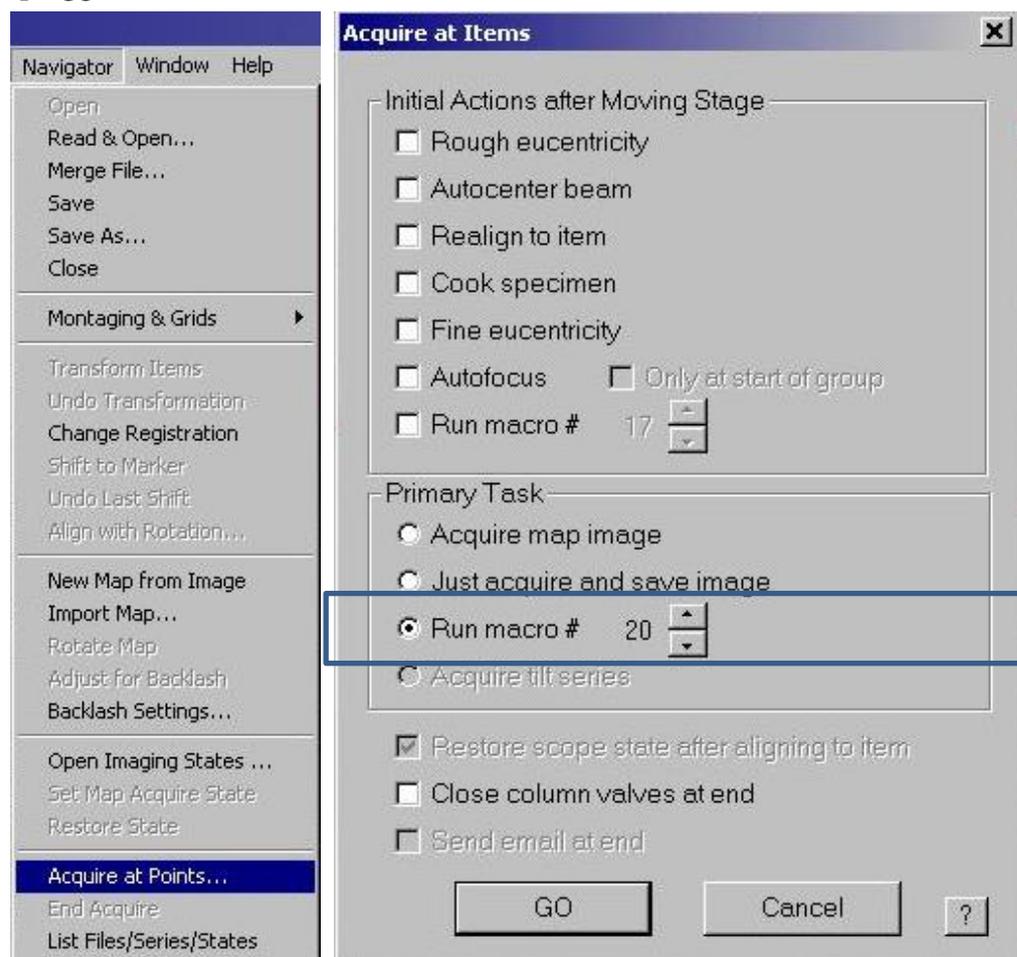
确认相机设置无误(参照步骤 2)后, 确认“Low dose control”界面 Area to show when screen down 选择 Rec. 或者 Foc.模式, 以上设置无误后, 启动自动数据收集。

SerialEM 菜单 -> Acquire at Points ->

在 Initial Actions after Moving Stage 栏中, 不选择任何选项

在 Primary Task 栏中, 选择 Run Macro # 20

→ GO



7 停止自动数据收集

实验结束或是需要为低温杆加注液氮时，需要停止数据收集。当看到 SerialEM 主界面右下角状态显示的最后两项均无操作（显示内容为空白），即可进行自动数据收集停止的操作。



1. 点击 Camera & Macro Controls 中的 Stop 按钮。



2. 紧接着，点击 End Mac 按钮



3. 紧接着，再点击 Stop 按钮



4. 当三个按钮均为灰色不可点状态，则自动数据收集完全停止



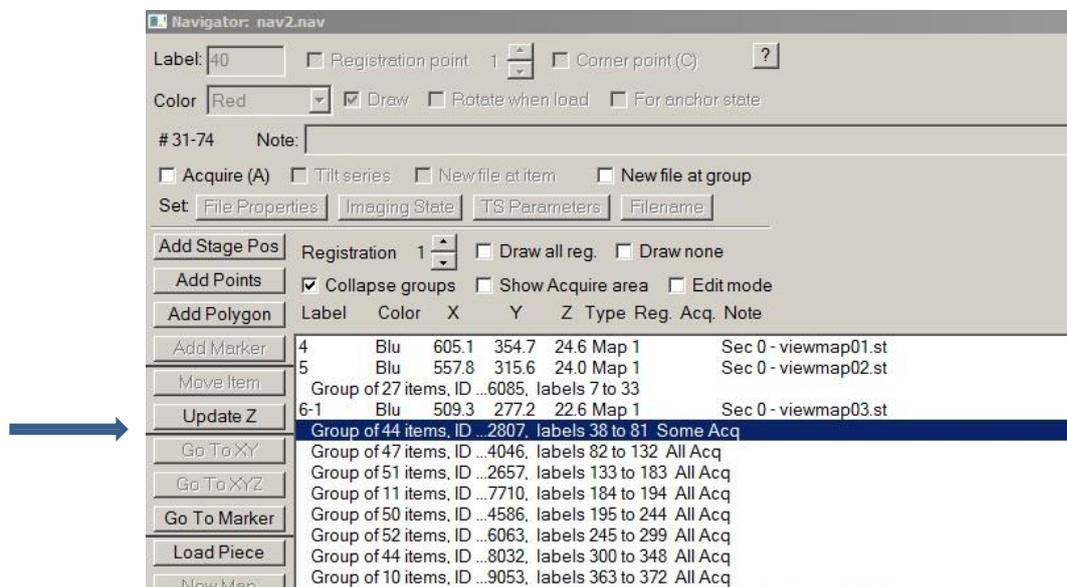
此时 SerialEM 主界面右下角状态显示栏内容均为空，如下图所示：



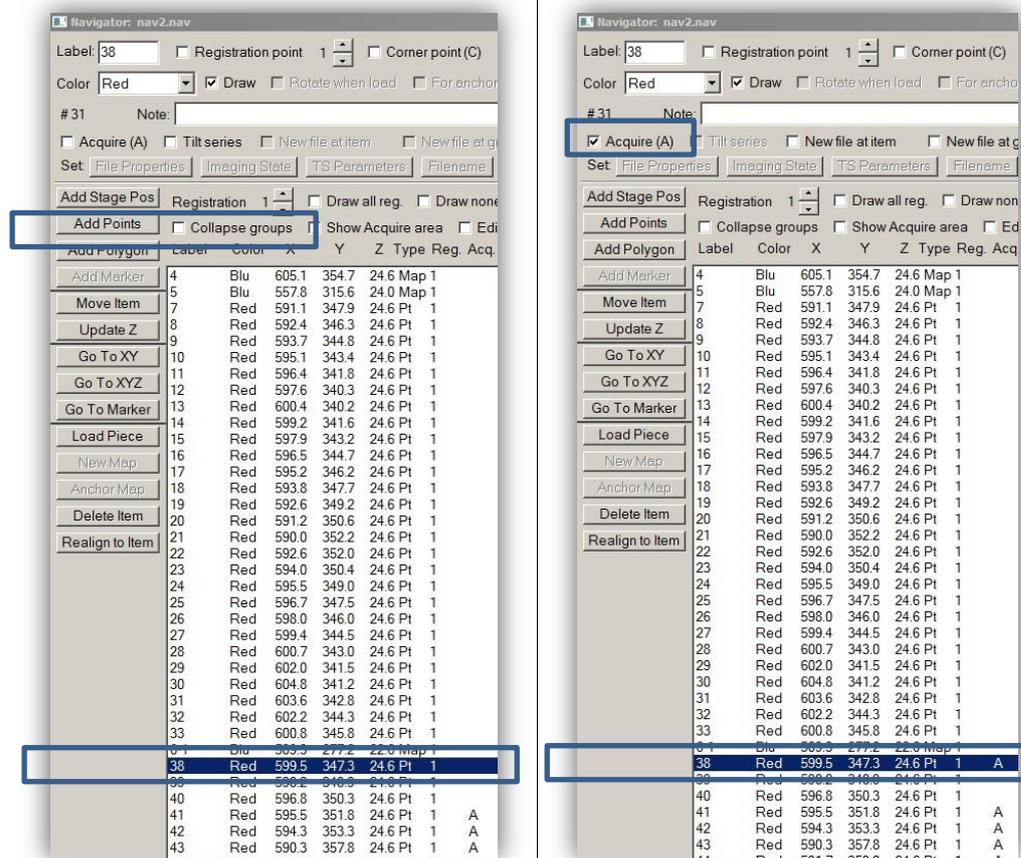
8 暂停后重启自动数据收集

如若是实验中因故暂停了数据收集（如，为液氮罐加注液氮等），之后需要继续收集数据，则需要重启自动收集程序，步骤如下：

1. 在 Navigator 中找到并选中自动数据收集暂停点 Group，该条目后显示为 Some Acq



2. 取消勾选 Navigator 中 Collapse groups，展开当前 Group，默认自动选中该 Group 内第一个点（每个 group 的第一个位点为 Focus 位点），若该点条目后面没有 A，则需要勾选 Navigator 中的 Acquire 使条目后出现 A 字样，如下图所示：



3. 设置完成后，保存 Navigator，点击 Acquire at points 重新启动自动数据收集。

