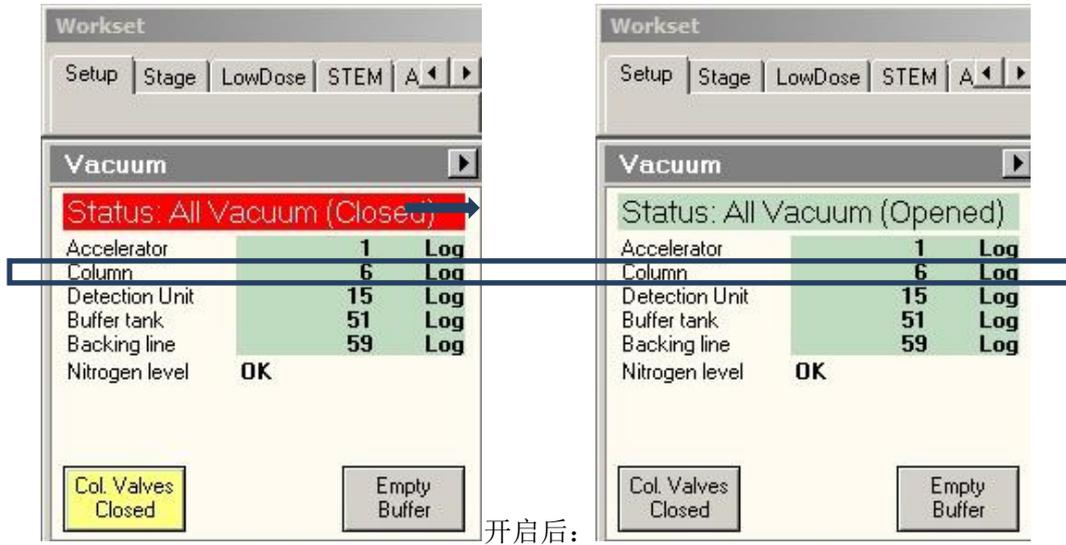


Talos 电镜低温样品检查基本操作流程 (SerialEM 版)

一、预检

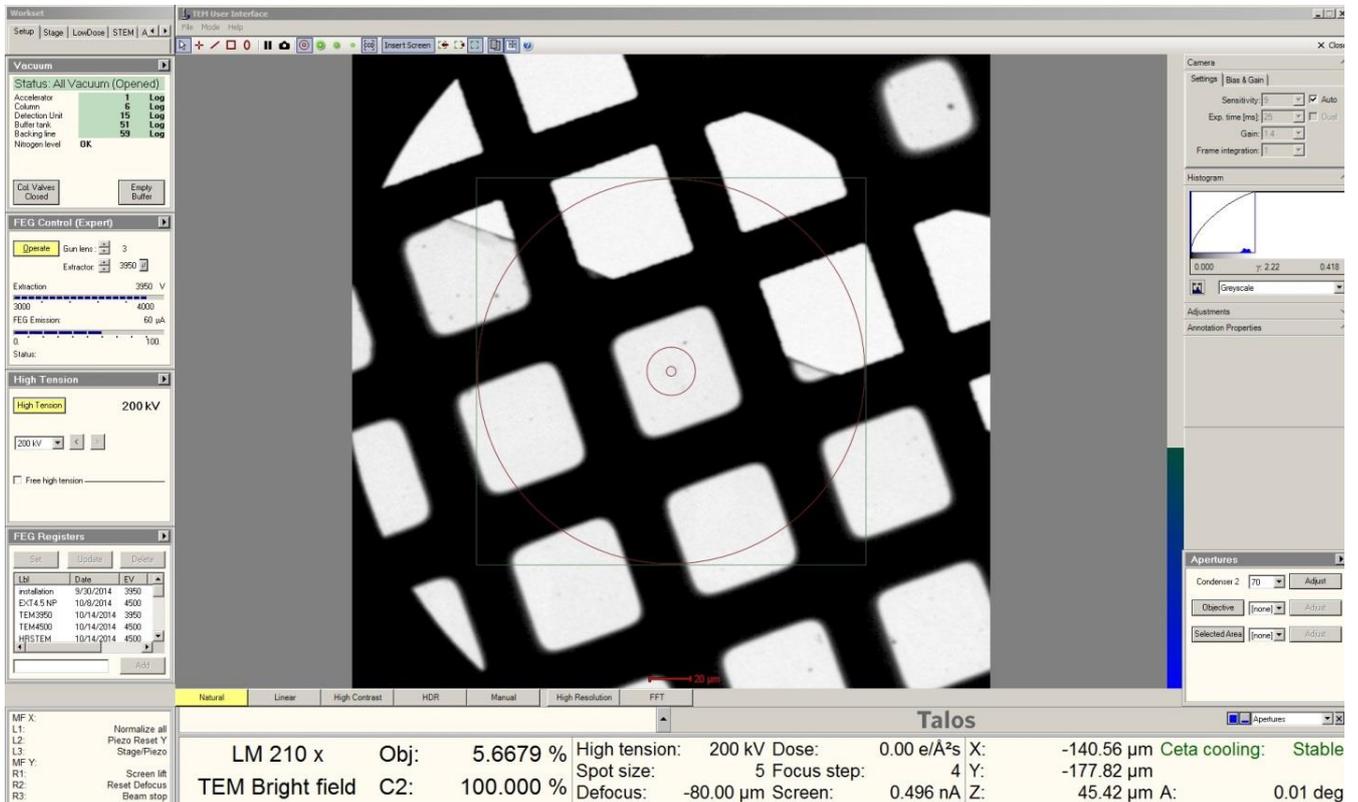
1. 开启 Col. Valves

上样完成后, 待电镜 Column 值低于 20 Log 后打开低温样品杆 shutter, 待 Column 值低于 10 Log 后开启 Col. Valves。



2. 低倍检查样品

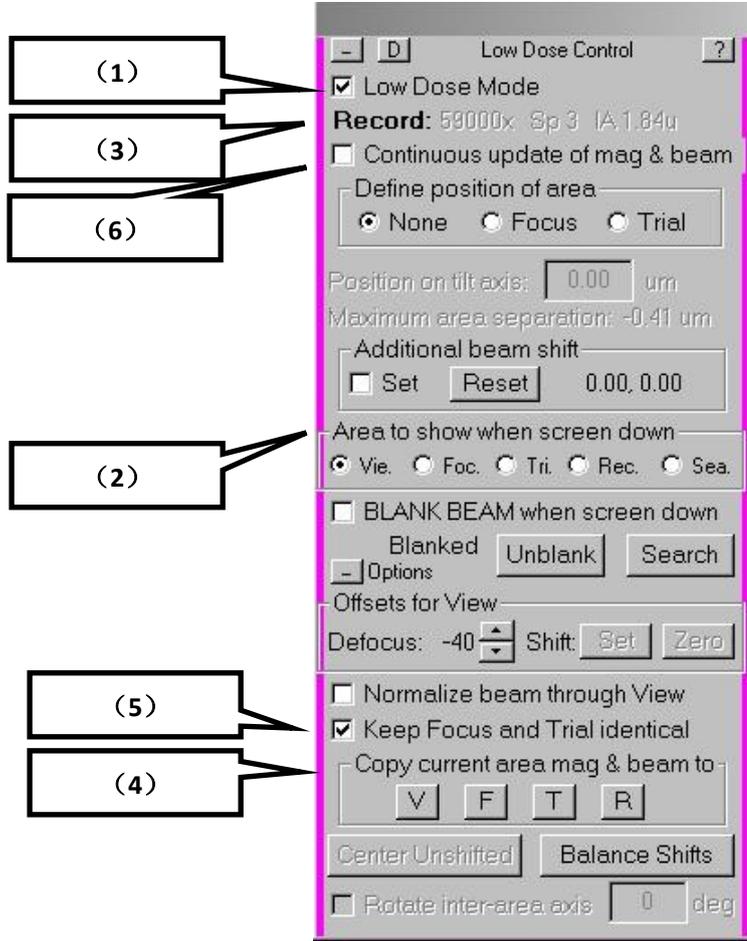
放下荧光屏, 把放大倍数调至 100 X 左右, 低倍下检查载网支持膜的完整度、冰层厚度、是否有严重污染等情况, 将合适的网孔移动到荧光屏上小圈位置, 并在 Stages 界面选择并记录下适宜进行数据收集的网孔位置。



3.自动聚焦与成像

使用 FEI Low dose 或者 Serial EM Low dose mode （注：两者只能选其一，不可同时开启）进行聚焦与高倍成像，具体步骤如下（此处主要介绍 Serial EM Low dose mode）：

选择目标网孔，并将 Stage 移动到该位置，开启 Serial EM（确认 TIA 已经处于开启状态），勾选 Low dose mode（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 是否符合实际要求。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（确定数据收集放大倍数后，按下控制面板中 Eucentric Focus 使 Obj lens 值到 85.6750%（Talos）或者 79.6164%（Titan）），然后再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（如剂量调整范围不能满足要求，可以结合调整 Spot size 实现）。

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。

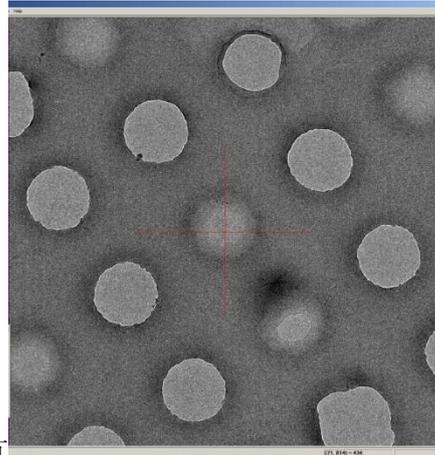
Trial 模式是光斑自动居中模式，设置与 focus 模式一致即可。也可通过勾选 Keep Focus and Trial identical 选项（5）自动将 Trial 模式和 focus 模式设置成一致。

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

以上设置完成后，在 Serial EM 中 Camera & Macro Controls 面板中点击 View，获得一张 View 模式下的图片。



获得低倍图片



右键拖拽该图片，使目标区域位于红十字叉中心，即可定位到该区域（为了便于聚焦，该步骤最好定位在碳膜上）。

定位完成后，点击 **View** 刷新当前界面，确认目标区域定位正确（位于红十字叉中心），然后点击 **Z_focus** 运行自动聚焦 **Macro**，完成后，样品成像区域将位于**正焦点**，之后可通过调整 **Z** 轴高度使之达到目标欠焦值（最好不要使用“defocus”钮，这可能会造成后期数据收集不在 **Eucentric Focus** 上进行）。



欠焦值设定完成后，点击 **view** 回到低倍模式，右键拖拽到成像区域，点击 **Camera & Macro Controls** 面板中 **Record** 成像即可。

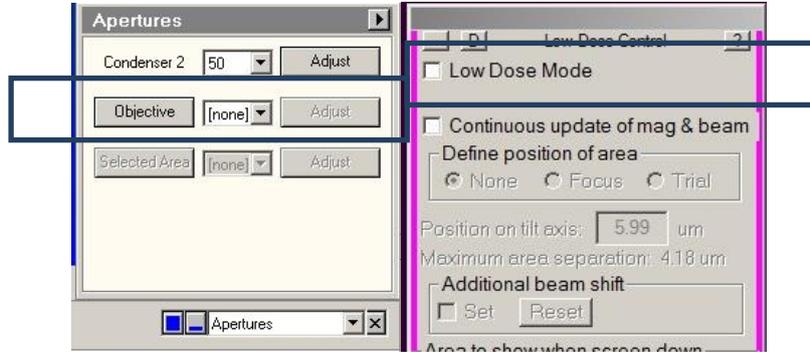
4. 自动数据收集

如要进行自动数据收集，详情参见《利用 SerialEM 进行单颗粒数据收集的流程》

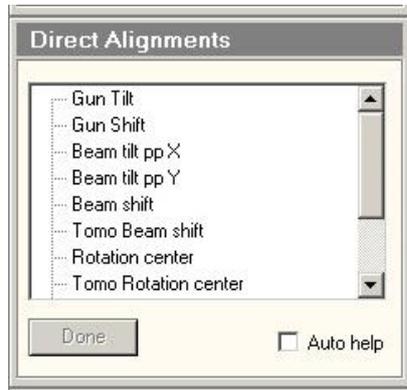
二、合轴（本步骤不建议普通用户自行操作，如需请联系电镜管理员）

（进行此步骤操作前，请确保已经点击控制面板中 Eucentric Focus 使 Obj lens 值到 85.6750%（Talos），并使用 SerialEM 的 Z_focus 自动聚焦至正焦）

选择 Area to show when screen down 中的 Rec.（数据收集模式），放下荧光屏（照明区域最好为碳膜上），调出 Apertures 取消物镜光阑（Objective: [none]），退出 Serial EM 中的 Low dose mode:

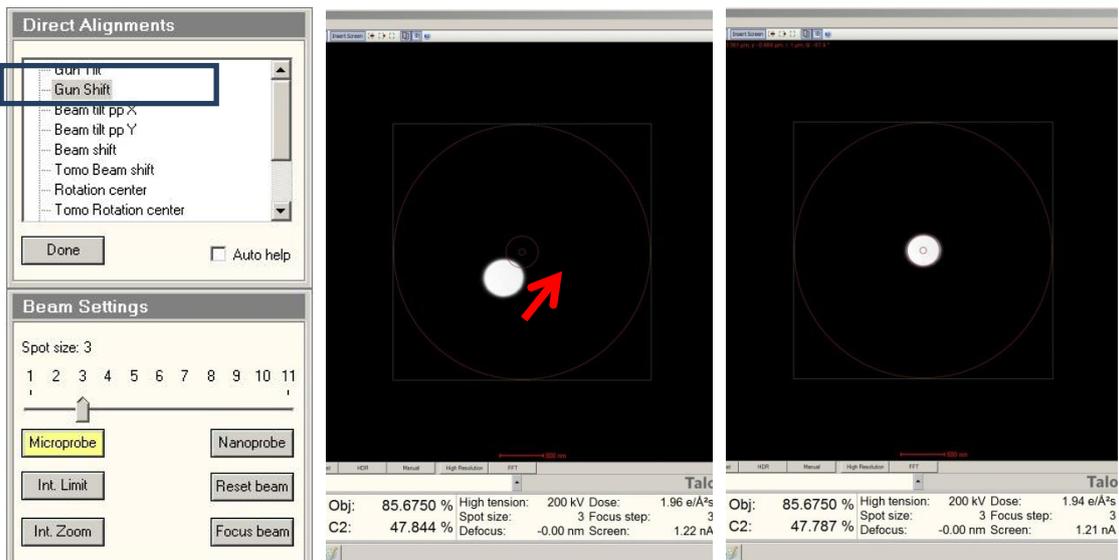


调出 Direct Alignments，开始电镜合轴相关操作：

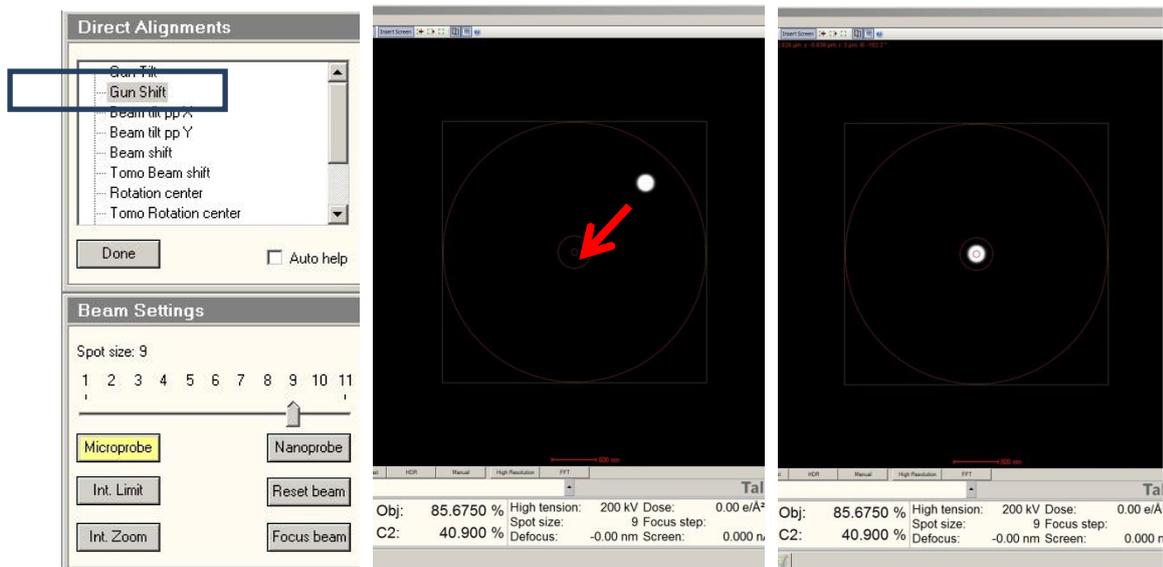


1. Gun Shift: 39 合轴

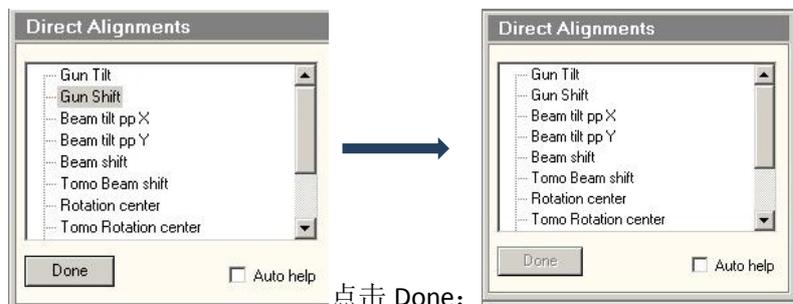
点中 Direct Alignments 下 Gun Shift，将 spot size 选定在 3，缩小光斑到最小，使用控制面板上多功能按钮 XY 将光斑居中（如下图所示）：



将 spot size 选定在 9，使用控制面板上样品台滚轮将光斑居中（如下图所示）：

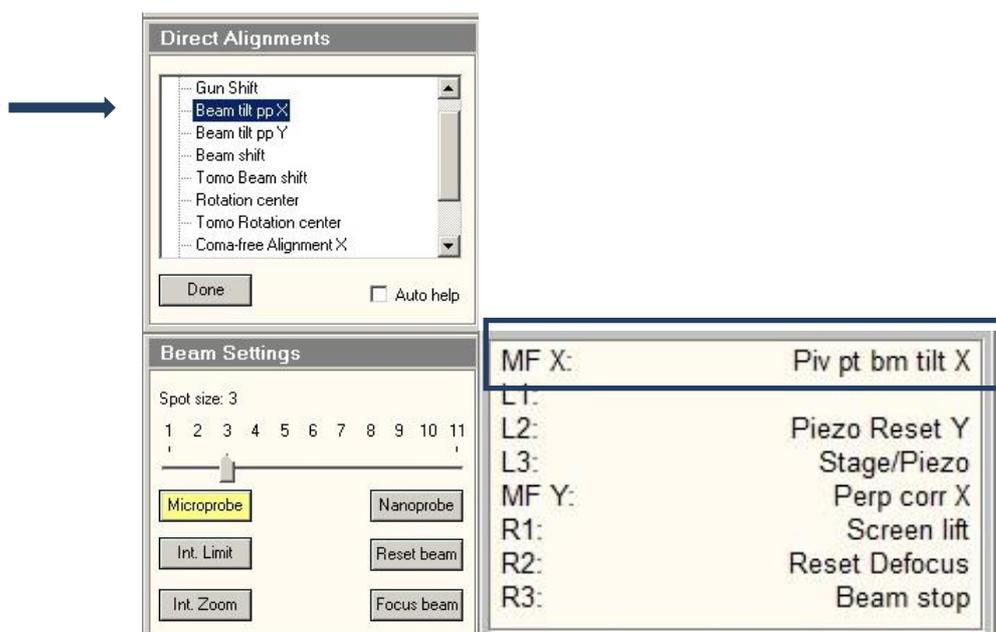


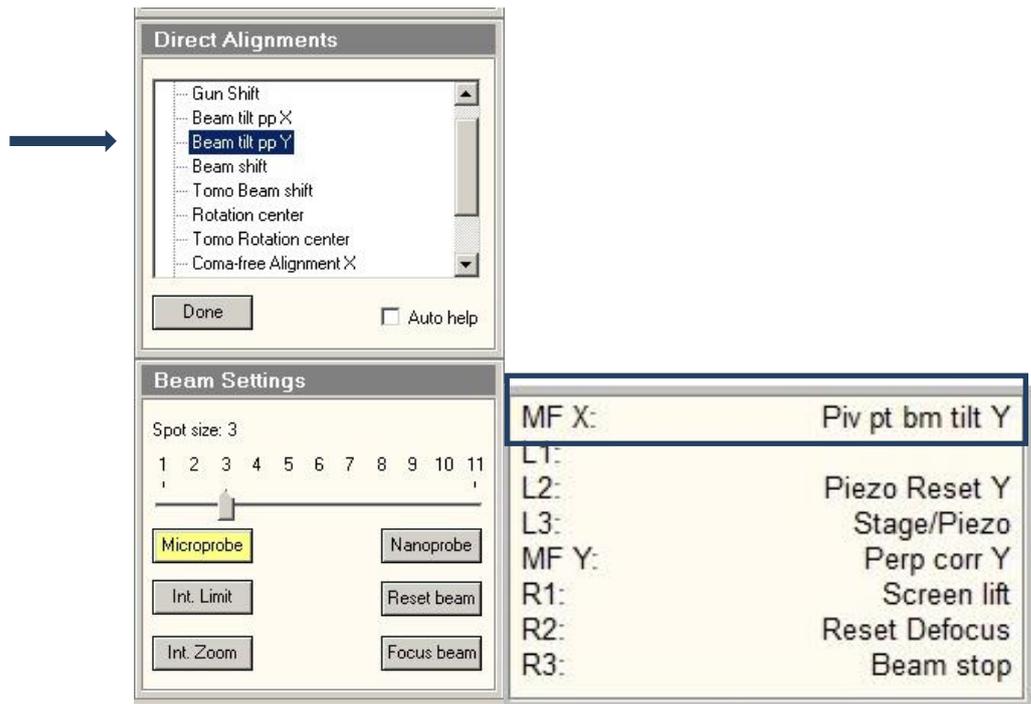
如此反复调整，直至 Spot size 在 3、9 之间转换时，光斑始终在屏幕最中央即可。调整完成后，点击 Done，完成 Gun Shift 操作。



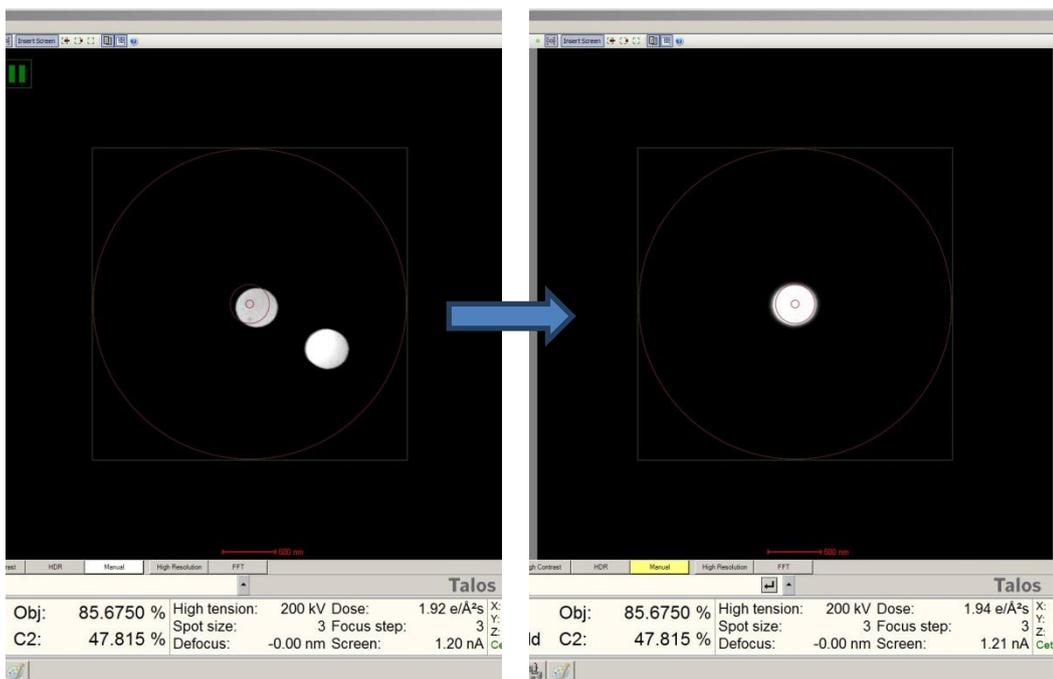
2. Beam tilt pp X & Beam tilt pp Y

点击 Beam tilt pp X (Y)，将光斑缩小到合适大小，MF X 将变为 Piv pt bm tilt X (Y)：



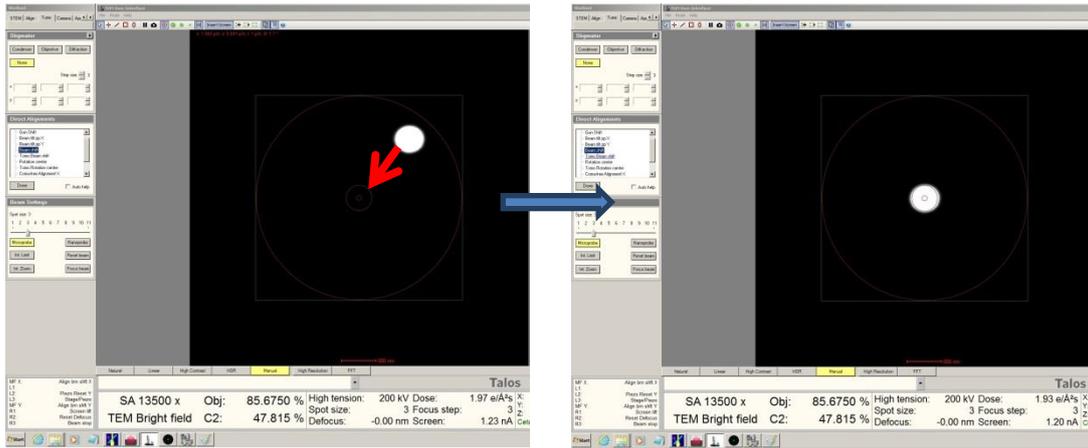


查看 Beam tilt 过程中光斑是否存在偏移量，若有（如下左图），则通过调整 MF X 和 MF Y 消除该偏移量（如下右图所示）。调整完成后，点击 Direct Alignments 下方 Done。



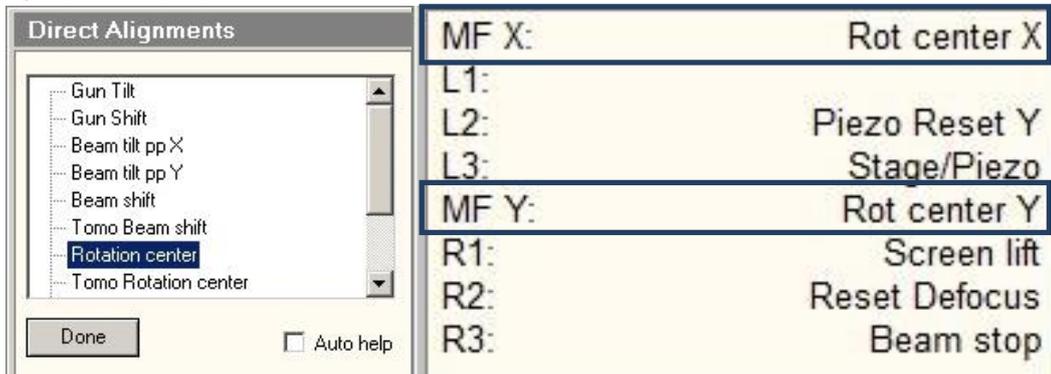
3. Beam shift (Tomo beam shift)

点击 Beam shift（若进行 Tomo 数据收集，则此处选择 Tomo beam shift），将光斑缩小至最小，观察光斑是否居中，若否（如下图左），则通过调整 MF X 和 MF Y 将光斑居中。调整完成后，点击 Direct Alignments 下方 Done。



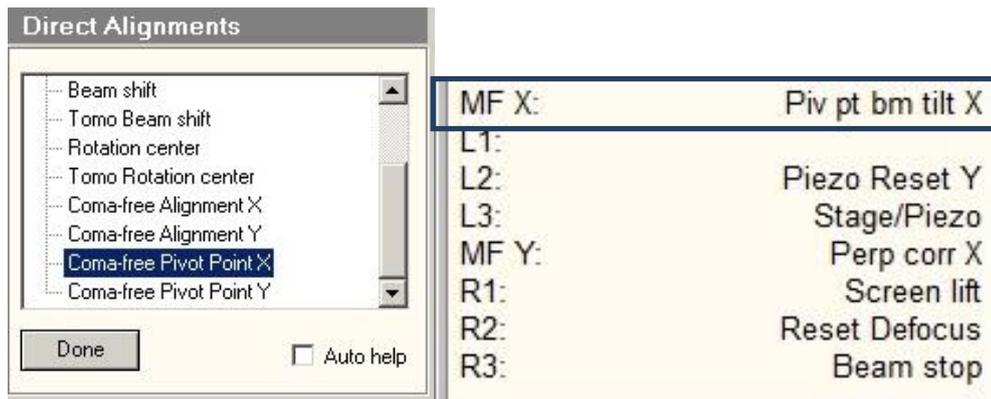
4. Rotation center (Tomo Rotation center)

点击 Rotation center (若进行 Tomo 数据收集, 则此处选择 Tomo Rotation center), 将光斑调整到合适大小, 移动 Stage, 使得视野正中央有明显目标物, 观察光斑转动过程中, 目标物图像是否只存在大小缩放, 没有位置平移, 若否, 则通过调整 MF X 进行调节, 直至目标物图像只在原位大小缩放为止。调整完成后, 点击 Direct Alignments 下方 Done。

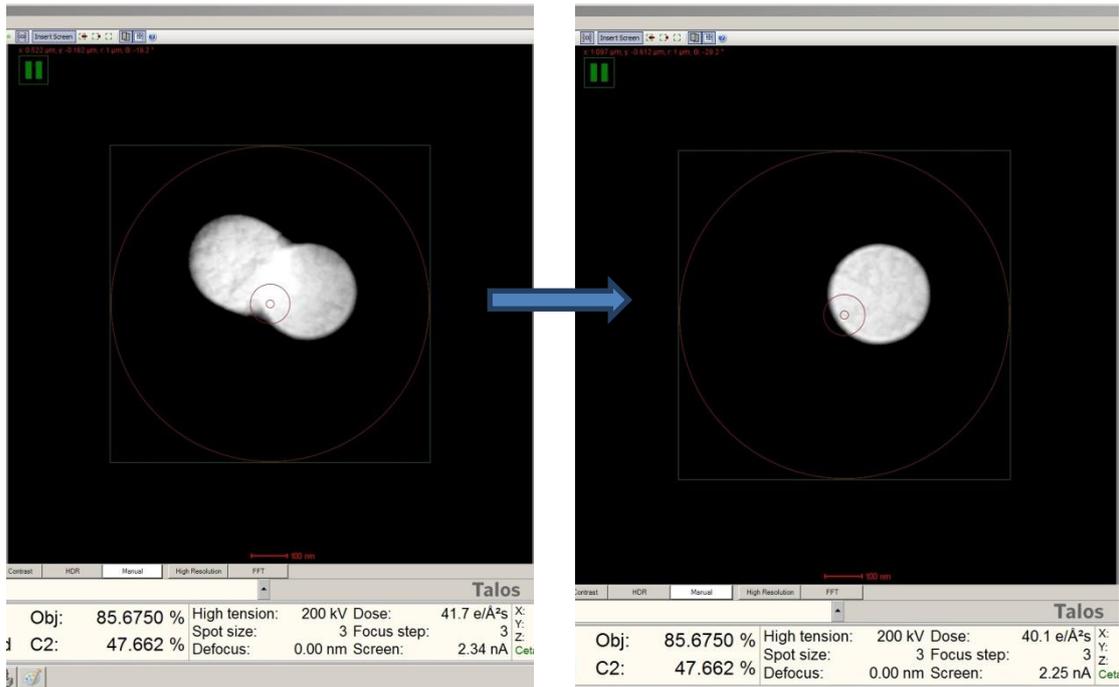


5. Coma-free Pivot Point X (Y)

点击 Coma-free Pivot Point X (Y):

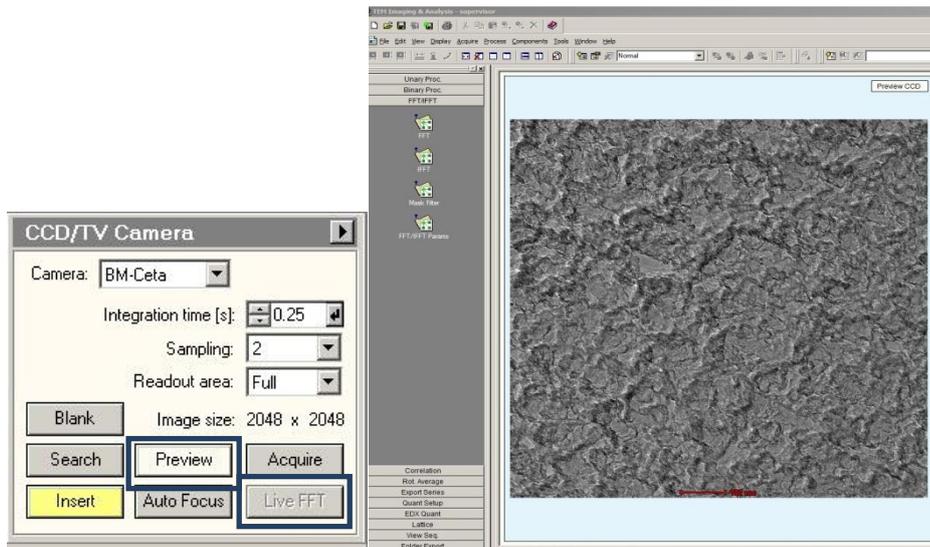


缩小光斑到合适大小, 观察光斑是否存在偏移量, 若有 (如下左图), 则通过调整 MF X 和 MF Y 消除该偏移量 (如下右图所示)。调整完成后, 点击 Direct Alignments 下方 Done。

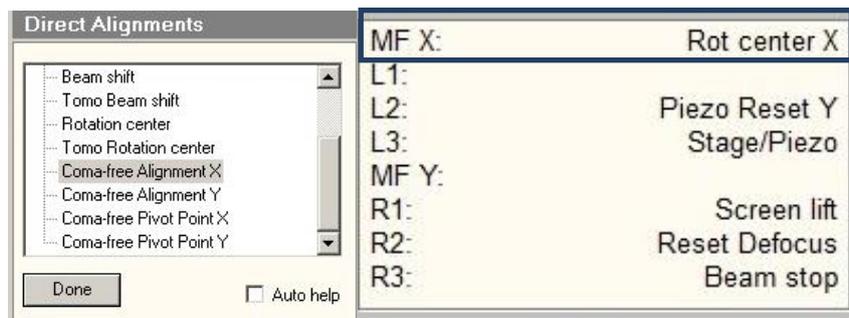


6. Coma-free Alignment X (Y)

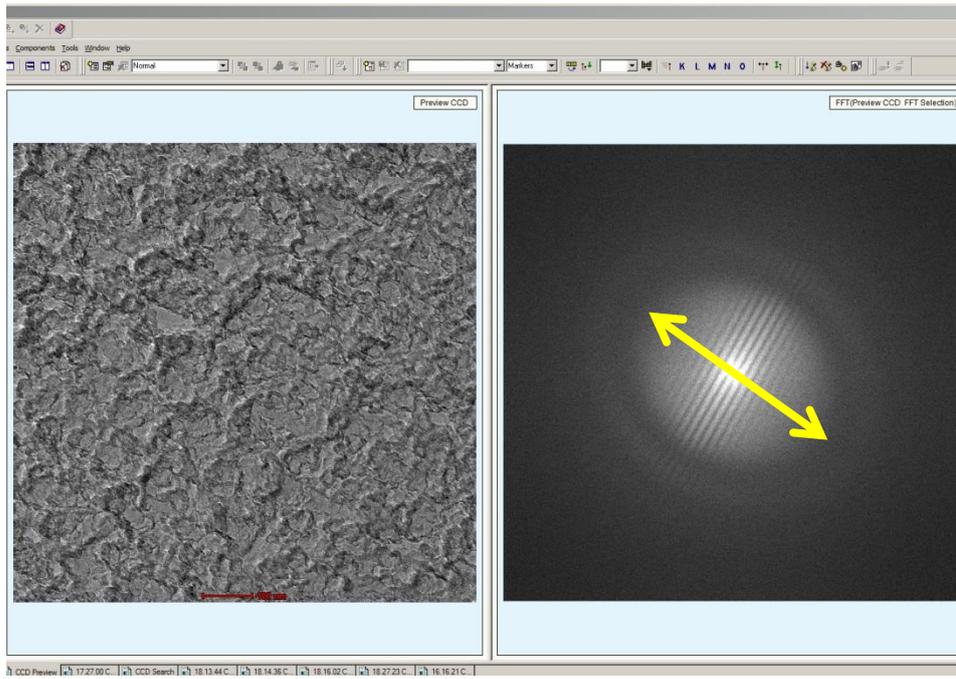
将光斑扩大到覆盖整个相机成像区域，抬起荧光屏，调出 CCD/TV Camera 面板，设定 Integration time 到 0.25s, Sampling: 2, 点击 Preview 以及 Live FFT, 调出 TIA 界面:



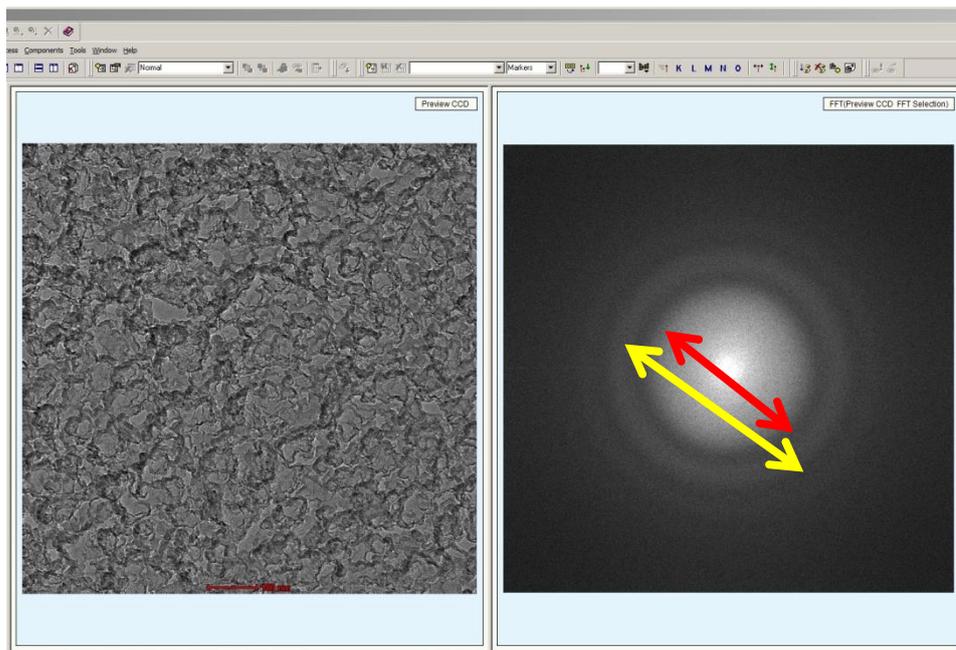
点击 Coma-free Alignment X (Y):



观察两个交替变化的成像状态下椭球形傅里叶环的长轴是否有变化，若有（如下图组所示）:



(状态一)

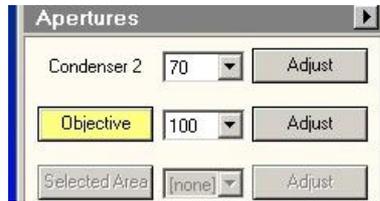


(状态二)

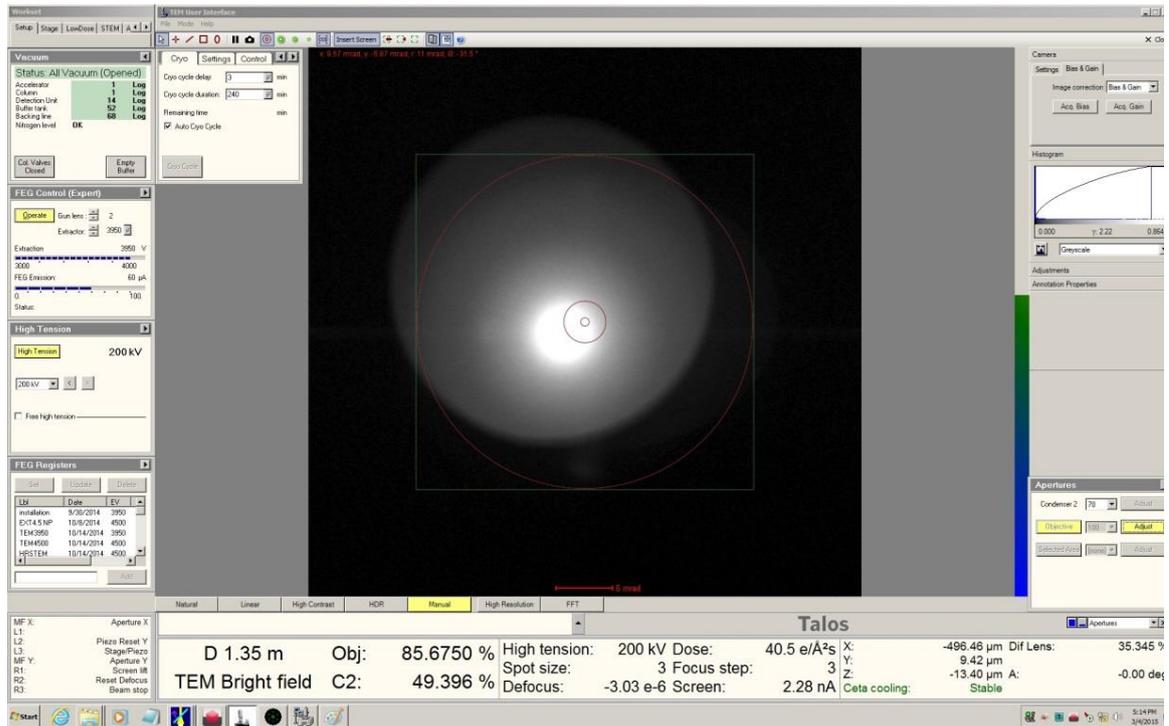
则需通过调节 MF X 使得两个交替变化的成像状态下椭圆形傅里叶环的长轴基本相同。调整完成后，点击 Direct Alignments 下方 Done。

三、消象散

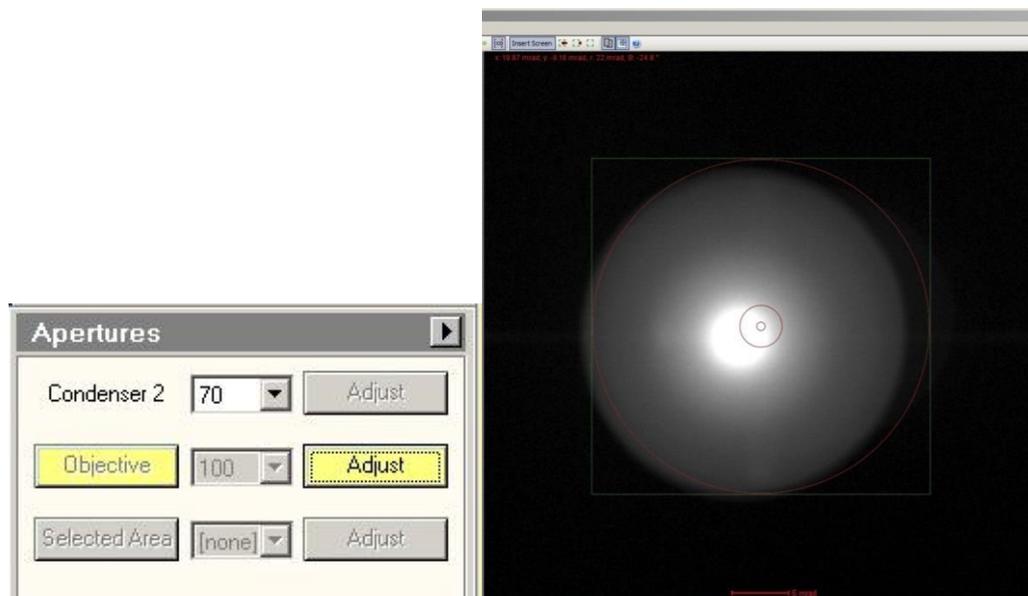
放下荧光屏，将光斑扩大到覆盖整个荧光屏，调出 Apertures，根据实际需要插入物镜光阑：



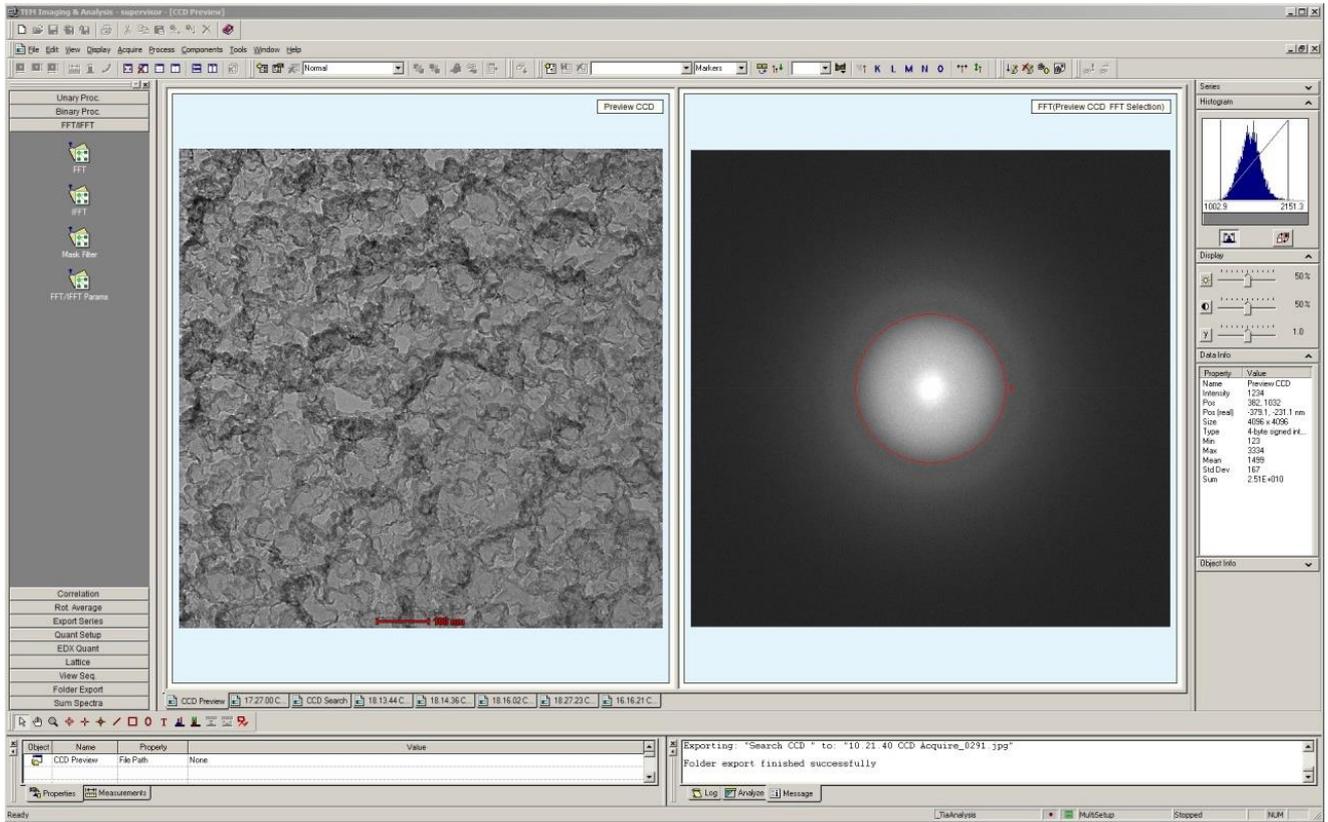
点击控制面板上 Diffraction 进入衍射模式，如下图所示：



观察光阑与光斑是否同心，若否（见上图），点击物镜光阑右侧 Adjust，通过 MF X 和 MF Y 将光阑与光斑调整到同心（见下图）。调整完成后，再次点击 Adjust 结束本次调整。



以上步骤调整完成后，再次点击控制面板上 Diffraction 退出衍射模式，将光斑扩大到覆盖整个相机成像区域，抬起荧光屏，调出 CCD/TV Camera 面板，设定 Integration time 到 2s，Sampling: 1，点击 Preview 以及 Live FFT，调出 TIA 界面，观察 FFT 环是否有为正圆形：



若否，调出 Stigmator，点击 Condenser（或者 Objective），使用 MF X 和 MF Y 调整到 FFT 环呈现正圆形（如上图所示）。调整完成后点击 None，结束本次调整。

