

# 300 kV Titan Krios G2 Cryo-EM

## —EPU 数据收集流程



北京大学冷冻电镜平台

管理老师：秦昌东

办公室电话：62750127

办公地址：B127

# 目录

使用设备须知 .....	2
<b>300kV Titan Krios G3 冷冻电镜单颗粒操作流程 .....</b>	<b>4</b>
一、 上样品.....	4
二、 筛样流程.....	4
三、 EPU 拍地图 (Atlas) .....	6
四、 EPU 数据收集.....	7
<b>GisSPA Cryo-FIB 切片样品单颗粒数据收集操作流程.....</b>	<b>13</b>
一、 方法简介: .....	13
二、 数据收集前的准备工作及注意事项: .....	13
三、 数据收集流程.....	13
1. Load Lamella 样品 .....	13
2. 拍低倍 Atlas .....	14
3. 设置 EPU 项目参数 .....	15
4. 开始自动化数据收集.....	16
<b>EMshark-数据实时处理软件操作流程.....</b>	<b>18</b>
一、 系统登录.....	18
二、 新建项目.....	18
三、 数据传输.....	19
四、 项目总览及参数设置.....	19
五、 查看数据质量.....	21
<b>数据备份和拷贝 .....</b>	<b>22</b>
一、 数据备份.....	22
二、 数据拷贝.....	22

## 使用设备须知

为了合理的使用平台设备，为实验室提供更优质的服务，经平台例会讨论，对 300 kV Titan Krios 电镜预约规则进行了补充修订，自 2023 年 12 月 27 日开始实行，内容如下：

1. 新用户/课题组使用本设备前，需向平台管理老师（高宁老师、郭振玺老师）提交设备使用的申请。
2. 300 kV Titan Krios G3 电镜用于收集单颗粒数据、Cryo-ET 数据，不得用于样品筛选。
3. 机时预约以课题组为单位进行，每个课题组指定一名电镜预约管理员，以天为单位在找郭振玺老师预约排队，预约结果会及时发布在 300 kV 电镜机时通知群。
4. 机时预约优先校内用户，其次校外用户。每个课题组尽量在满足需求的情况下，**节约机时**。平台会尽一切努力保证每个预约用户有机时用于数据收集。如课题组有国家重大需求或临时紧急实验，可直接与平台联系。
5. 若用户使用人预约机时不相符时或其他变化，须由本课题组电镜预约管理员**至少提前 48 h** 告知平台电镜管理员，否则以预约机时为准。
6. 用户如需取消机时，须由课题组电镜预约管理员在所预约时间段**前 48 h** 告知平台电镜管理员，否则课题组须承担所预约时间一半机时费，并由管理员安排其它用户使用。
7. **平台按照用户预约时间收费**，在仪器正常运行下，若课题组未按照正常预约时间使用电镜如发生迟到、早退等情况造成的机时空闲，空闲机时按正常收费。因平台电镜管理员原因或其他不可抗力造成用户机时浪费的，平台不收取任何费用。
8. 如遇**电镜故障或其它不可抗力造成**的电镜无法正常工作，耽误实验室数据收集，根据耽误时长，处理方法如下：（1）无法正常工作 0~6h 时，登记机时减少实际耽误的时间，该机时不顺延不收费；（2）无法正常工作 6~12

h 时,与 实验室协商是否需要把机时延长一天。如需要已预约机时自动顺延一天,如不需要则按原预约计划继续执行。以实际使用机时登记,耽误机时不收费;(3)无法正常工作 12 h 以上时机时自动顺延一天。以实际使用机时登记,耽误机时不收费。

9. 数据收集完成后,管理员需将 EPU 数据收集参数界面、数据照片、EM\_Flow 截图、Thon 截图等发到平台工作群。
10. 校外用户在无工作人员在场的情况下,不准自己调电镜;校内用户,未经过平台考核的用户,不准自己调电镜。
11. 使用平台任何设备发表论文专利或其他形式的成果,需要请致谢平台。
12. 如遇其他特殊问题,请联系平台管理员。

## 300kV Titan Krios G2 冷冻电镜单颗粒操作流程

300 kV 场发射 Titan Krios G2 数据收集操作流程包括：上样品、检查电镜状态、EPU 参数设定、样品筛选、拍地图等，具体步骤如下：

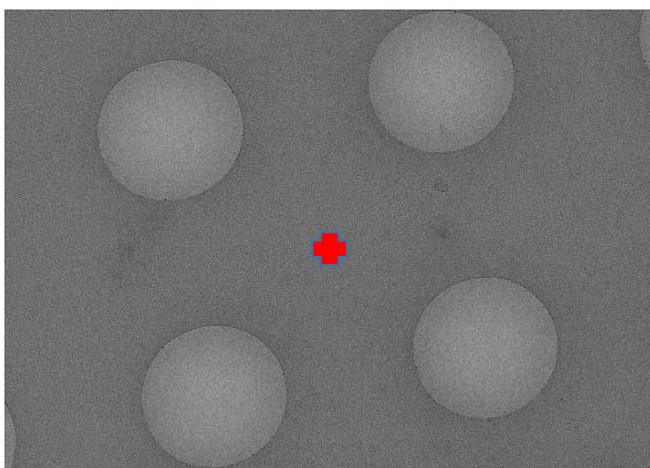
### 一、 上样品

1. 上样前状态检查：检查镜筒阀门是否关闭、真空值是否达到要求、所有样品是否均为 unload 状态、是否温度均在 $-170^{\circ}\text{C}$ 以下、Turbo 是否为 Turbo always on 状态。
2. 上完样，等温度、真空值达到标准，则点击 Inventory，检查样品槽（Blue 为有样品，gray 为无样品），注意点 Load 之前镜筒阀门保持 off（黄色）。
3. Inventory 结束后，鼠标左键点击选择需要 load 的样品，然后左键点击 load，完成后选择 Turbo always off。

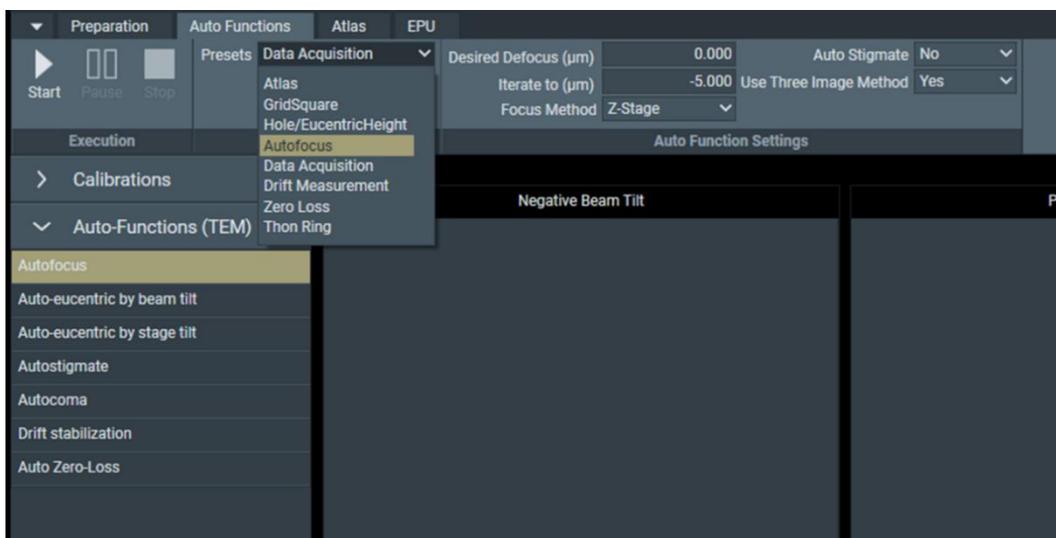
注：上样品期间若发现任何异常请及时联系管理员。

### 二、 筛样流程

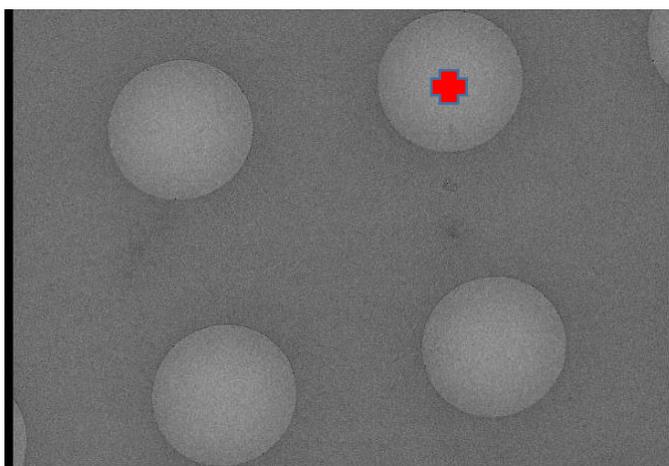
1. 粗调 Eucentric: 将 Preparation 中的 Grid Square 成像参数 Set 给电镜，点击 R1 放下荧光屏，使用操纵杆将想要查看的 square 移动至相机中心（绿色圆圈），依次选择 Stage2 > Control > Set Alpha ( $15^{\circ}$ )，若视野发生偏移，则通过调节控制面板上的 Z 按钮来调节高度，使视野回到相机中心。再依次选择 Stage2 > Control > Set Alpha 使 Alpha 归零。
2. 在 Preparation 中选择 Hole/Eucentric，再点击 Preview，通过鼠标右键点击并选择 Move stage here and acquire 使视野移动至四个孔之间的碳膜位置上。



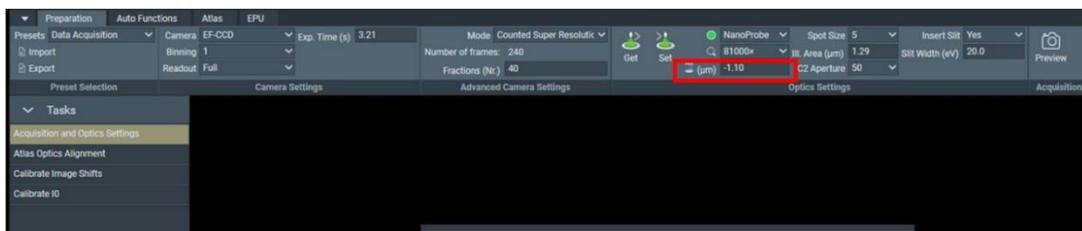
- 依次选择 Auto Functions > Autofocus, Presets 中选择 Autofocus 作为聚焦参数。点击 Start 开始聚焦。



- 聚焦结束并成功后,反复通过鼠标右键点击并选择 Move stage here and acquire 使视野移动至聚焦区域临近的某个孔中间位置上。



- 选择 Preparation, Presets 中选择 Data Acquisition, 点击 Preview 进行拍照, 并查看数据样品质量。其中 defocus 数值用户可以进行自定义设置(红色框)。

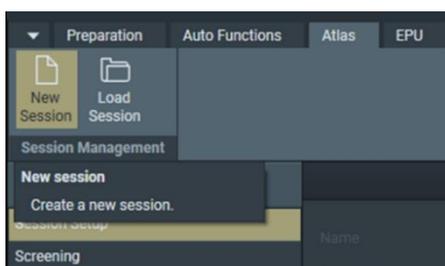


**注: Data Acquisition 参数中的 defocus 数值仅用于该参数 Preview 使用, 不会影响最终 EPU 数据收集的 defocus。**

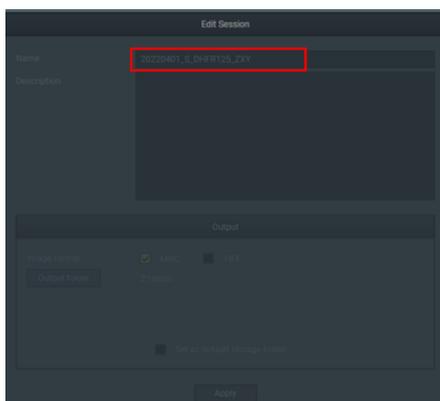
### 三、 EPU 拍地图 (Atlas)

(用户在进行拍地图前需确保管理员调好光路以及数据收集参数,做完 Full Tune 和 Gain Reference)

1. 点击最左侧电脑的开始菜单栏, 打开 EPU 软件。打开镜筒阀门。
2. 选择 Atlas, 然后点击 Session Setup 任务。选择 New Session 功能。



3. 为该 Session 设置一个名字, 程序运行时会在 /X300/DosFractions/atlas 目录下产生以该名字命名的地图文件, 文件名由用户自定义, 注意尽量不使用“-”等特殊字符。点击 Apply 生成一个新的 Atlas Session。



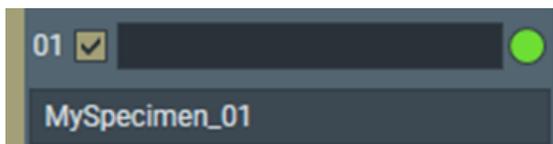
4. 调整样品到 eucentric height:
 

方法一: 将 Preparation 中的 Grid Square 成像参数 Set 给电镜, 点击 R1 放下荧光屏, 使用操纵杆将某一最近的 square 移动至相机中心 (绿色圆圈), 依次选择 Stage2 > Control > Set Alpha, 若视野发生偏移, 则通过调节控制面板上的 Z 按钮来调节高度, 使视野回到相机中心。再依次选择 Stage2 > Control > Set Alpha 使 Alpha 归零。

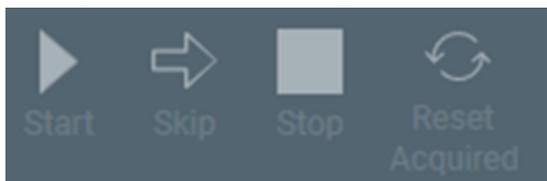
方法二: 将 Preparation 中的 Grid Square 成像参数 Set 给电镜, 点击 R1 放下荧光屏, 使用操纵杆将某一最近的 square 移动至相机中心 (绿色圆圈)。在 EPU 软件中:

  - a. 依次选择 Auto Functions > Auto-eucentric height by beam tilt 任务。
  - b. 依次选择 Preset Selection > Presets: Hole/EucentricHeight
  - c. 选择 Execution > Start
  - d. 等待 Auto-eucentric height by beam tilt 任务运行结束并成功收敛。

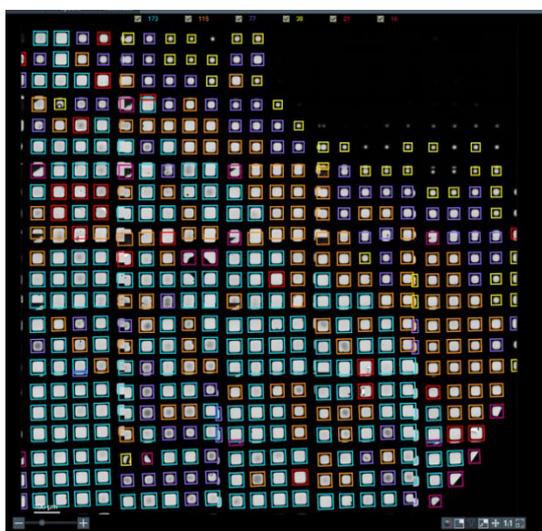
- 依次选择 Atlas > Screening，显示出所有 AutoLoader 上的所有 Slot Positions。勾选已经 Load 的 Slot Position（LED 等为绿色）。



- 点击 Start 开始拍摄 Atlas。

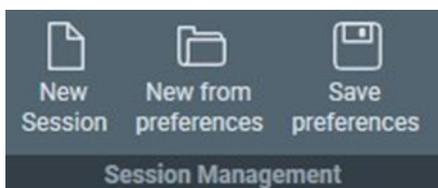


- Atlas 拍摄结束后软件会根据厚度对 Square 进行分类，不同厚度用不同颜色表示。

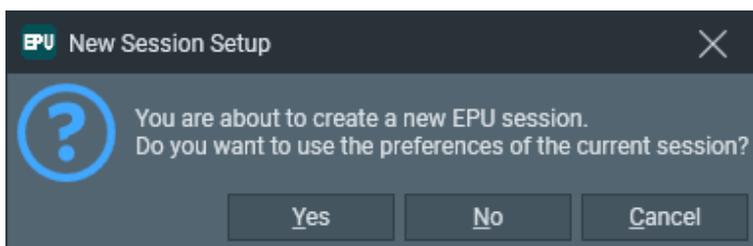


#### 四、 EPU 数据收集

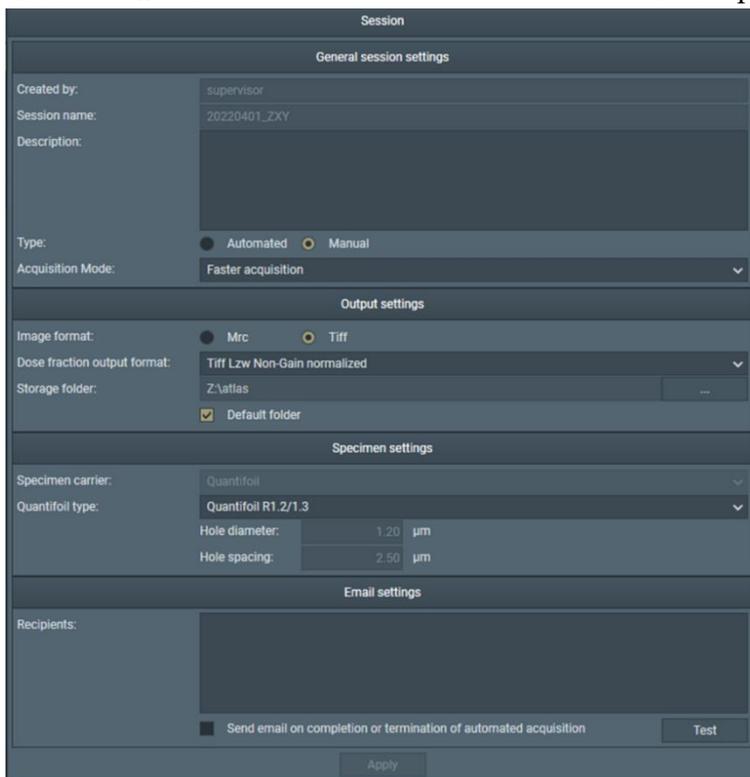
- 依次选择 EPU Tab > Session Setup 任务。
- 选择 New Session。



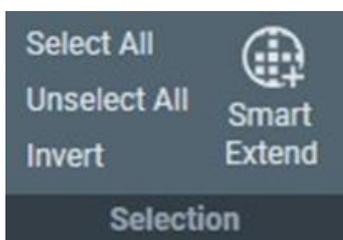
- 点击 Yes 来产生一个与当前设置一致的 EPU Session。



4. 给 EPU Session 设置一个名字，程序运行时会在 /X300/DosFractions 目录下产生以该名字命名的数据文件，命名间隔尽量用下划线。选择 Faster acquisition, 选择 Tiff 格式和 Tiff Lzw Non-Gainnormalized 点击 Apply 生成 Session。



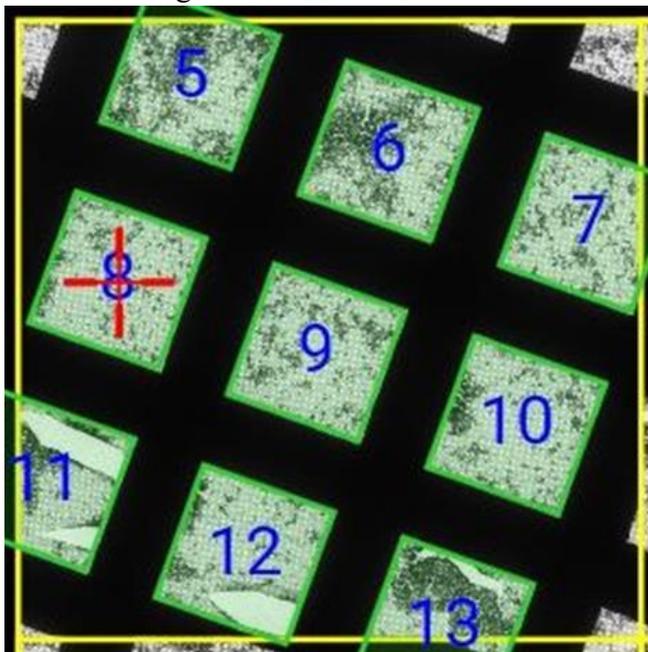
5. 进行 Square 挑选：依次选择 EPU tab > Square Selection 任务。
6. 选择 Unselect All 显示删除默认全选。



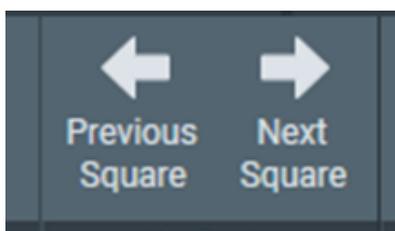
7. 用户根据自己的判断来选择合适的 Square，可在目标 Square 上右键点击并选择 Add 或者 Remove 来实现 Square 的添加和删除。用户需要根据数据收集的时间来估算需要添加的 Square 数量。



8. 在 Processing Order 选项中选择 Show 来显示选择的 Square 顺序。



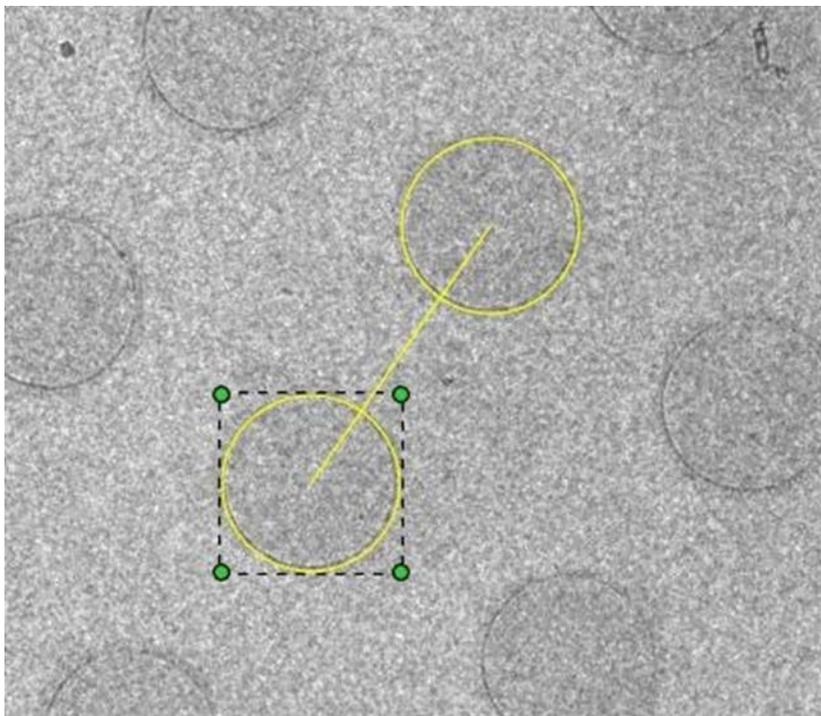
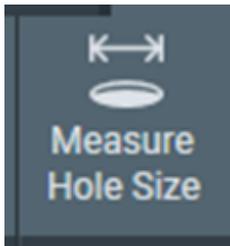
9. Square 选完后进行 Holes 的选择: 首先通过点击左右箭头调整到第一个 Square 上 (左下角显示所选的 Square 编号)。



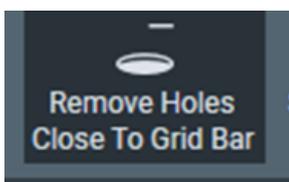
10. 点击 Auto Eucentric。结束后会自动收集一张照片。



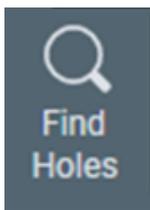
11. 点击 Measure Hole Size，调节圆圈的大小和位置，使其两圆圈分别与相邻的两个孔（非对角线或间隔）完全吻合。



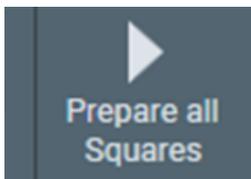
12. 勾选上 Remove Holes Close To Grid Bar 功能键，使靠近 Square 边缘和之外的孔排除在外。



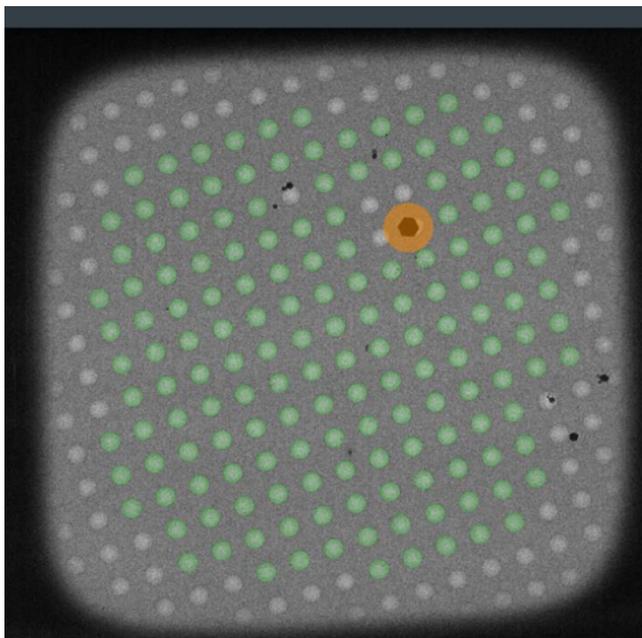
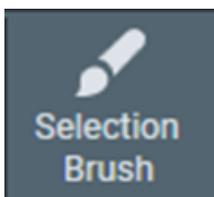
13. 点击 Find holes 对当前 Square 自动选孔。



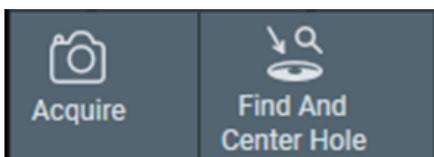
14. 点击 Prepare all Squares 来对选择的所有 Square 进行自动选孔。



15. 等 Prepare all Squares 功能成功结束后，点击 Selection Brush 功能键对每一个 Square 的孔进行筛选。鼠标左键点击孔或按住左键拖动会删除孔，右键 add 可以添加孔，Brush 区域的大小可以通过同时按住键盘的 Ctrl 和 Shift 并转动鼠标滚轴来调节。

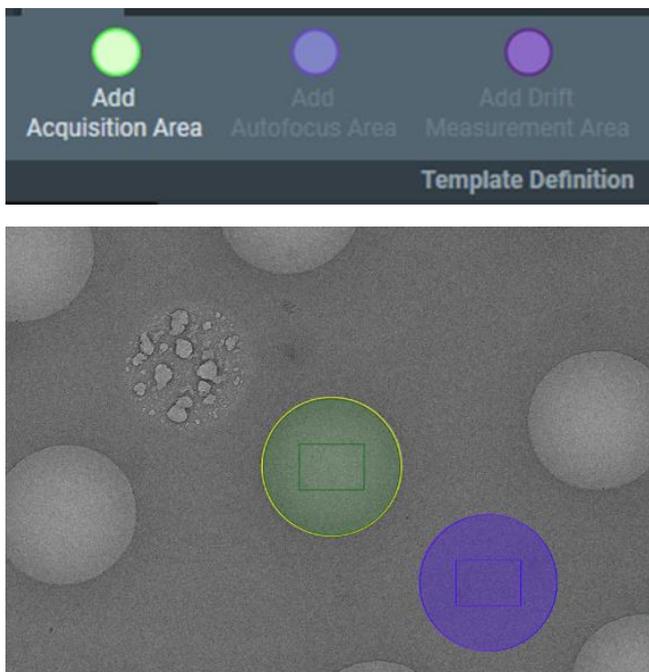


16. 所有的 Square 筛选结束后进行 Template Definition。在有样品的区域依次点击 Acquire > Find And Center Hole。

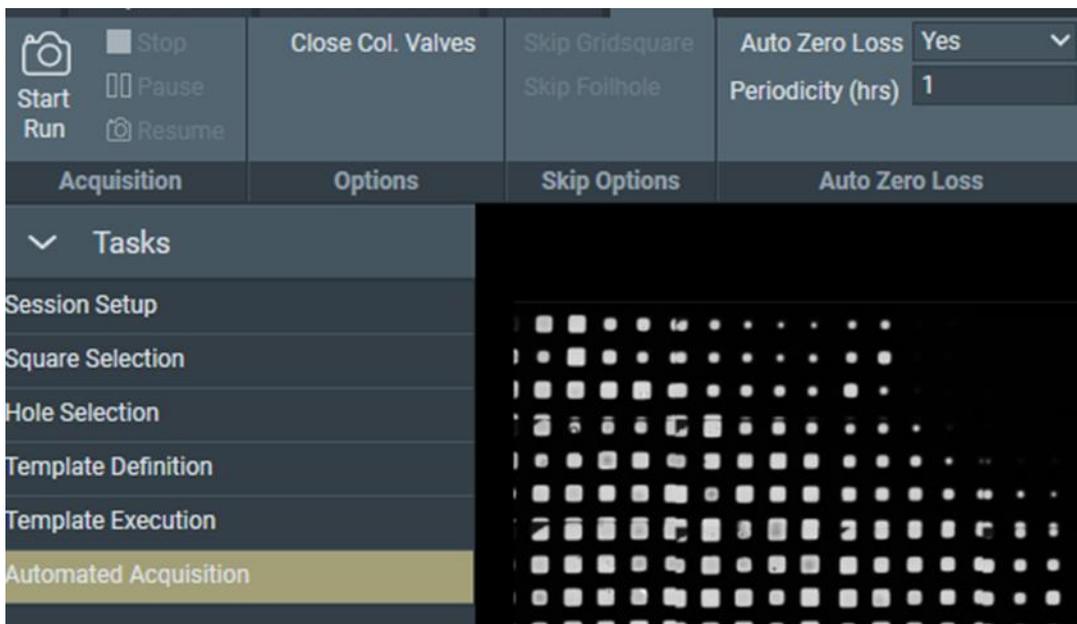


17. 分别设定 Acquisition、Focus 以及 Measurement 的位置及参数。点击 Acquisition

Area 圆圈，并将其移动至孔中间，并设置收数据的 defocus 区间。其他两个圆圈均移动至孔中间的碳膜位置上（一般设置 Focus 和 Measurement 位置重合）。



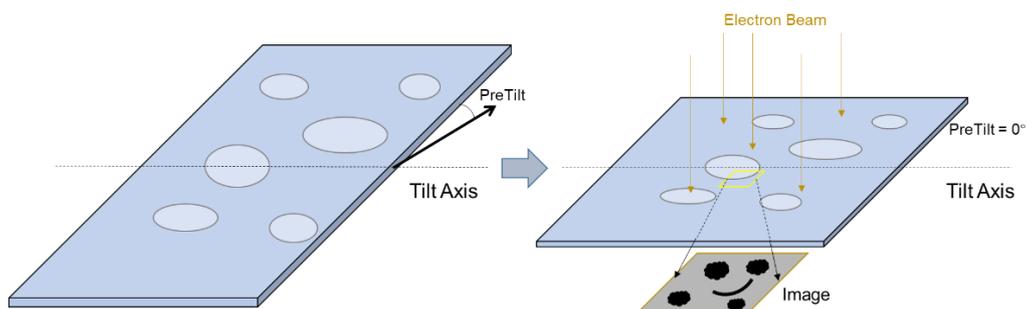
18. 选择 Automated Acquisition 并点击 Start Run 开始数据收集。



## GisSPA Cryo-FIB 切片样品单颗粒数据收集操作流程

### 一、方法简介：

利用原位的 FIB 冷冻切片，非 Tilt 角度情况下使用单颗粒相同的方法进行数据收集，为复杂结构解析提供原位数据。鉴于 EPU AFIS 优化较好，所以建议使用 EPU 进行数据收集。



### 二、数据收集前的准备工作及注意事项：

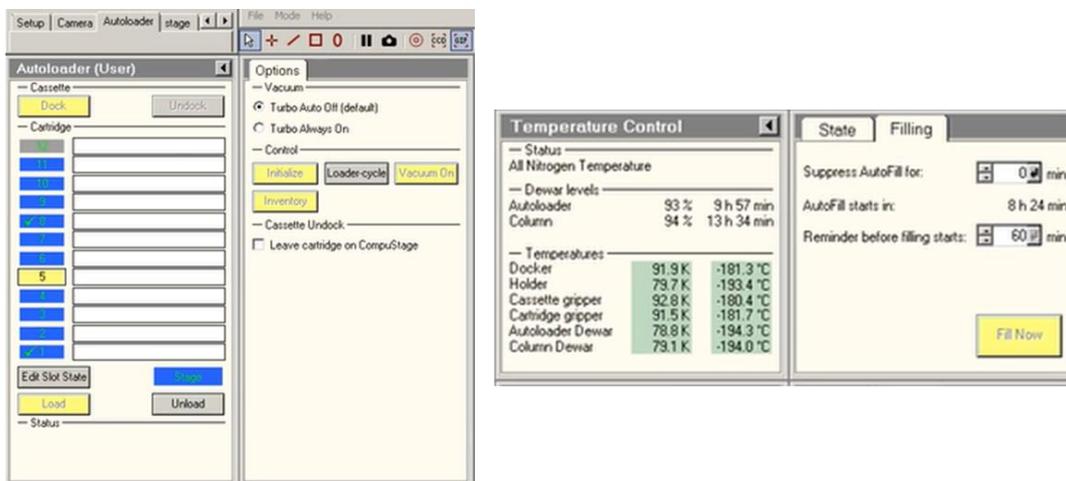
1. 制备 Cryo-FIB 样品前样品 **Clip/Sample/Ring** 要压牢固，防止脱落。
2. 制备 Cryo-FIB 切片样品时应尽量**避开载网边缘区域**，优先减薄中间区域。
3. 制备 Cryo-FIB 切片样品时样品应**尽可能薄**，为减小 motion 和提升分辨率。
4. 制备 Cryo-FIB 切片样品时最后要留**一定厚度的 Pt 保护层**，一个是保护样品，另外一个是为样品提供支撑，再一个是减少 Curtain 效应的产生。
5. 同批次的样品需要使用 200 kV 电镜筛查至少一个样品，筛查时要进行 FFT 分析，**确保样品 Vitrification 正常**，没有明显冰的衍射。
6. 制备 Cryo-FIB 切片样品时**减薄方向的标记要明显**，保证上样时样品与倾转轴更接近垂直。
7. 上样过程中要告知平台管理员**准确切割方向的标记点位置**，保证样品上正。
8. 上样时告知管理员上一个**连续碳膜样品**，为电镜状态调整时使用。

### 三、数据收集流程

#### 1. Load Lamella 样品

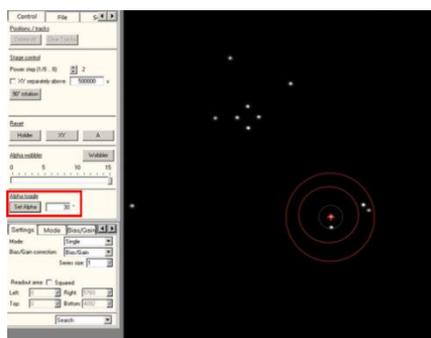
检查是否镜筒阀门关闭、是否真空值达到要求、是否所有样品均 unload、是

否温度均在 165°C 以下（特别是 Docker 和 Cartridge gripper）、是否 Turbo 为 Turbo always on。上完样，等温度达到标准，点击 Inventory，检查样品槽（Blue 为有样品，gray 为无样品），注意点 Load 之前镜筒阀门 off（黄色），点击 Load。

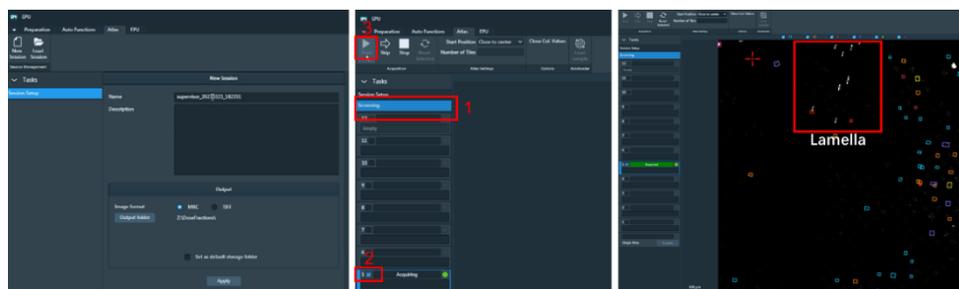


## 2. 拍低倍 Atlas

- (1) 使用 GridSquare 参数找到 Grid 中心或 Lamella 特征位置，Set Alpha，调整 z 高度让特征点回到中心位置。

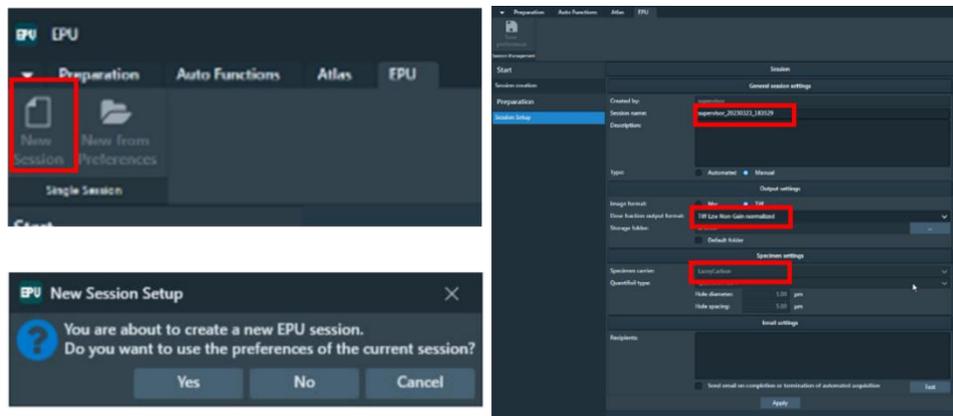


- (2) 在 EPU 软件里面，点击 Atlas 选项，点击 New Session，在 Session Setup 里面设置所拍 Atlas 的名字，该名字也是所有 Map 图所在文件夹的名字，其保存位置为 /X300/atlas/。最后依次点击 Apply-Screening-勾选对应 grid-Start，开始低倍 Atlas Mpa 的收集。结束后可观察到 Lamella 的位置。



### 3. 设置 EPU 项目参数

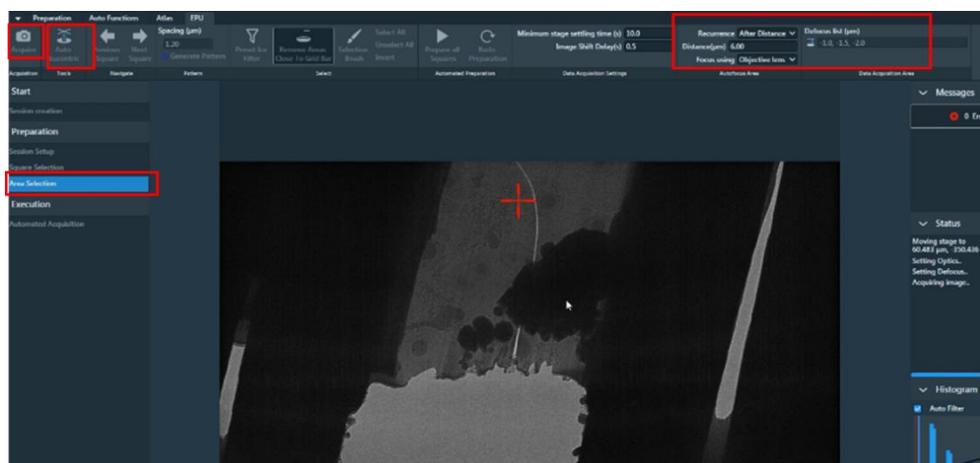
- (1) 在 EPU 选项内点击 New Session，点击 No，然后在 Session Setup 里面设置 Session Name（此 Name 为最终数据保存文件夹的名字，路径为/X300/Dosefractions/）、Type 为 Manual、DataFormat 为 TiffLzwNon-Gainnormalized、Specimen carrier 设置为 LaceyCarbon，点击 Apply。



- (2) 点击 Square Selection，再点击 Unselect All 删除自动选取的非感兴趣区域，在 Lamella 中心位置对 Lamella 逐个进行右键 Add new grid square here，对所有的 Lamella 依次进行添加，直至添加结束为止。

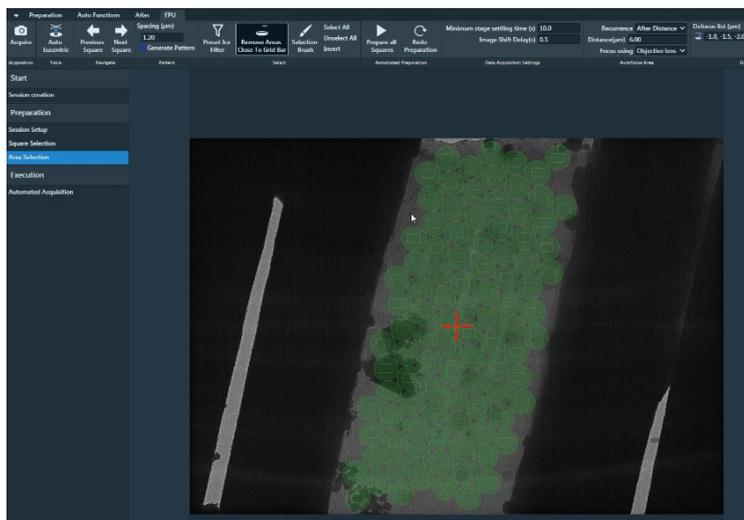


- (3) 点击 EPU 内的 Area Selection，点击 Acquire 获得一张照片，然后右键 Move Stage Here and Acquire 将 Lamella 移动到视野中央，然后点击 Auto Eucentric。



- (4) AutoEucentric 结束后软件会自动收一张低倍图，在 Spacing 中设置

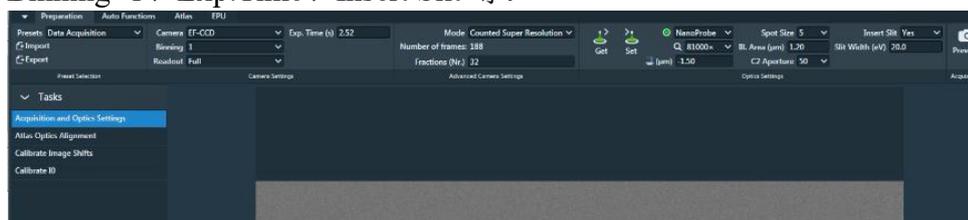
Pattern 间距，建议设置和照明面积一致，然后点击 Generate Pattern，利用 Selection Brush 擦除掉不感兴趣的位置，或者 Ctrl+左键添加感兴趣的位置。



- (5) 点击 Next Square 重复 (3) - (5) 直至所有的 Lamella 都选好感兴趣的 Area。
- (6) 设置自动化收集的参数，包括 stage settling time、Image Shift Delay、Recurrence 选择 After Distance ( $6 \mu\text{m}$ )、Focus using 为 Objective lens、Defocus List。

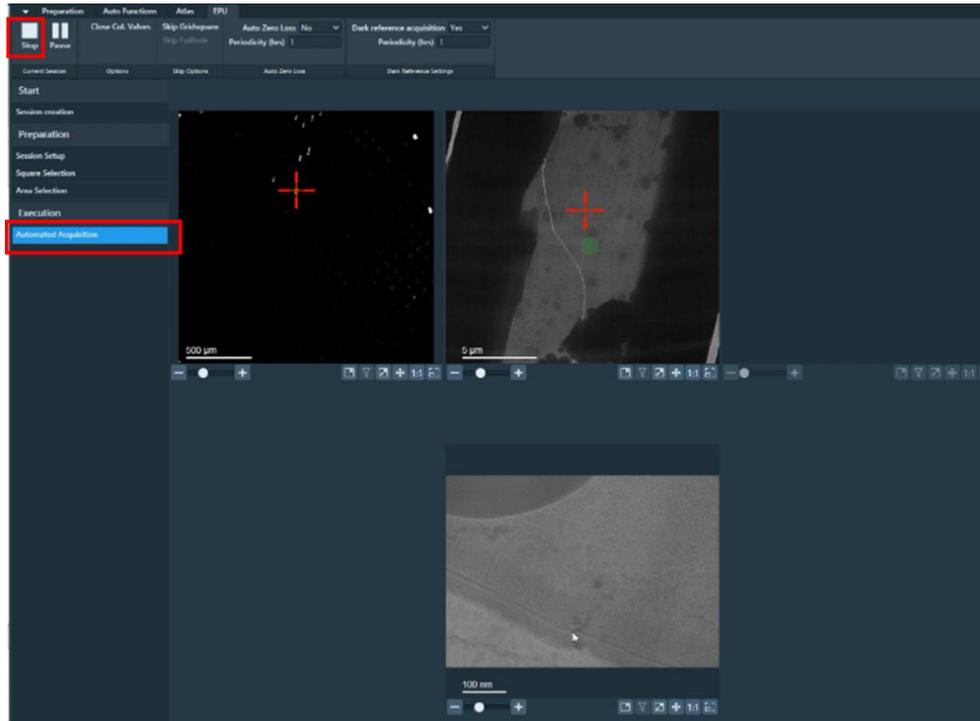


- (7) 检查数据收集参数。着重检查 Data Acquisition 的参数设置。包括 Binning=1、Exp.Time、Insert Slit 等。



#### 4. 开始自动化数据收集

点击 EPU 设置中 Automated Acquisition，然后点击 Start 即可开始数据收集。



## EMshark-数据实时处理软件操作流程

### 一、系统登录

通过浏览器进入登录页面，打开谷歌或火狐浏览器，选择一个节点输入其 IP: 10.60.0.40，输入账号和密码，账号：root，密码：62750127。



### 二、新建项目

在第一次进入系统时，此时需点击+号新建项目，或者直接点击 enter 进入已有的项目。

**注意：新建项目时需要确认之前需要将之前项目停止，否则无法新建项目。**



在弹出界面中输入项目配置参数，**选择项目文件夹地址/archive/groupname/**，项目文件夹路径不能与已经存在项目的路径重复，也不能在已经存在项目路径的子目录内。另外，可以将做过的项目中其他的配置信息导入新的项目中。



**注意：** Pixel Size 是原始数据的值，super resolution 为 Pixel Size 的一般

### 三、 数据传输

原始数据路径：**要传输的数据目录地址，数据传输会将该目录下及其子目录下的所有冷冻电镜数据传入项目中，一般在/X300/DoseFractions/中。**

数据格式：要传输的数据类型，EPU: tiff, SerialEM: tif。

数据来源：不同软件来源的数据

K2 相机数据：不勾选

应用于：all 全部数据。

传输模式：copy 是复制。

自动停止时间：根据需求设置。

点击执行运行程序。

### 四、 项目总览及参数设置

依次点下图击红线所示任务，对 Motion-corr、CTF、Pick 任务进行参数配置，如果已经从其他项目中导入配置信息，则请检查相关任务参数。点击蓝色框中的“√”可勾选所需执行的任务

总览					
Movie	<input checked="" type="checkbox"/> Motion-corr R	<input checked="" type="checkbox"/> CTF R	Mark	<input checked="" type="checkbox"/> Pick	Particles
May08_03.05.02.bin	SUCCESS	SUCCESS	good	156	SUCCESS
May08_03.13.02.bin	SUCCESS	SUCCESS	good	148	SUCCESS
May08_03.15.02.bin	SUCCESS	SUCCESS	good	182	SUCCESS
May08_03.43.44.bin	SUCCESS	SUCCESS	good	148	SUCCESS
May08_04.32.27.bin	SUCCESS	SUCCESS	good	163	SUCCESS
May08_04.33.57.bin	SUCCESS	SUCCESS	good	180	SUCCESS
May08_04.36.57.bin	SUCCESS	SUCCESS	good	154	SUCCESS
May08_05.24.39.bin	SUCCESS	SUCCESS	good	177	SUCCESS
May08_05.31.00.bin	SUCCESS	SUCCESS	good	185	SUCCESS
May08_05.35.20.bin	SUCCESS	SUCCESS	good	166	SUCCESS

Total 20 | 10/page | 1 2 | Go to 1 | TEST | RUN P1 | CLEAR

按照下图设置 MotionCor 的参数：

参数设置

MotionCor2

Bit

Group

Patch

FIBin  Bin 的设置为 2

Gain  此路径为 Gain 的存储路径：

RotGain  Rotation Gain

FlipGain  Flip Gain

Iter

Gpu  要是用的 GPU 编号

Tol

按照下图设置 Gctf 的参数：

参数设置

Gctf

**Pixel Size 设置为新建项目时 pixel size 的 2 倍。**

apix

kV

Cs

ac

Min def

Max def

Def step

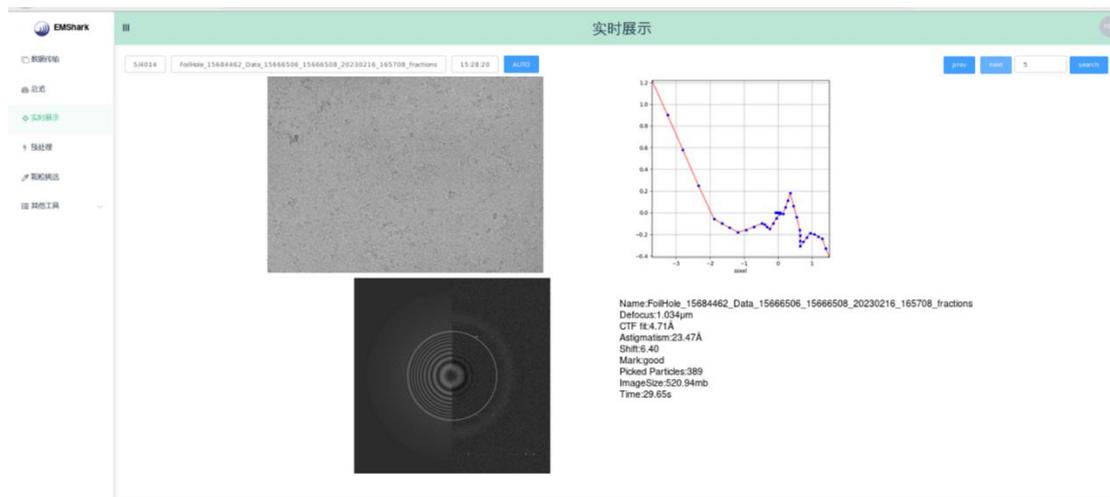
Astm

Min res

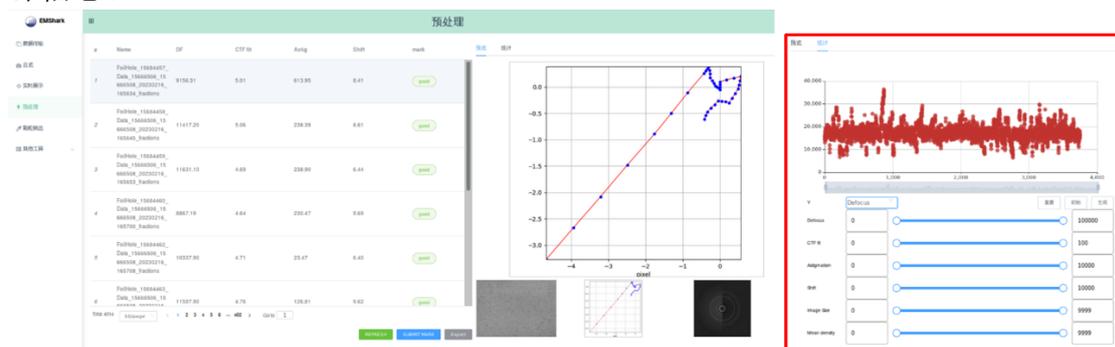
查看对应预处理结果确定执行任务参数正确，然后点击 run all，正式执行预处理任务。

## 五、查看数据质量

任务执行后，可以在实时展示界面，查看实时处理的数据结果。



在预处理界面中，可以看到电镜数据进行处理后的列表信息，预览图，和统计信息。



## 数据备份和拷贝

### 一、 数据备份

为保证 X300 中留有足够的空间给用户进行数据收集，单次收集完数据后要先将 X300/DoseFractions 中的数据备份至 smb 中，备份的路径：  
/smb/X300/data/groupname。

首先打开 terminal，输入 smb 回车登录进去 smb 服务器，然后用如下命令备份：  
rsync -avP /X300/DoseFractions/... /smb/X300/data/groupname/...

最后用户从 smb 中再传输到课题组自己相应的存储中。

注意：用户确认数据备份完成后需要将/X300 中对应的数据删除！

### 二、 数据拷贝

由于较多用户需要将数据拷贝到移动硬盘中，拷贝之前先按上述照数据备份将原始数据备份至 smb 中，然后用如下命令进行数据拷贝：

```
rsync -avP smb@192.168.12.10: /smb/X300/data/groupname/... /run/media/...
```