

# Glacios 操作手册

中国科学技术大学  
冷冻电镜中心

高永翔

2022 年 3 月

## 1. 上样 【此工作通常由管理员进行，用户可忽略】

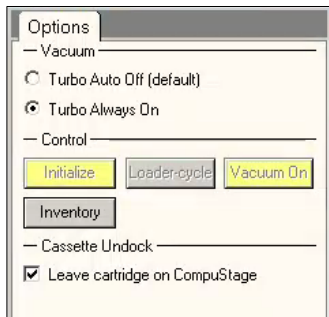
【注意杯子编号，卸样用(3#)杯，上样用(4#)杯】

### 1.1 预冷 Capsule 杯 【充分预冷：液氮不沸腾后等待 5 分钟】

1.2 结束之前的拍摄进程：点 EPU 中的 EPU-Stop。关闭 EPU

### 1.3 Unload 样品

在 TUI 中打开 Autoloader 菜单的小三角剪头，点击 Turbo Always On，等 Vacuum On 的颜色由橙色变成黄色后，点击 Unload，机械手从镜筒中抓回样品放置在原位置。Unload 过程中 autoloader 界面状态栏会不断更新状态，unload 动作完成后，状态栏无任何提示。Unload 完成，stage 按钮变黄，表示 column 内无样品。



### 1.4 卸载 cassette

开氮气阀，将 Capsule 杯圆口朝向机器推入 Autoloader，点屏幕上的 Undock，等待机器将 cassette 放入杯中。完成后杯子下降，取出。

### 1.5 装载 cassette

等 Docker 温度低于 100K 后，在氮气阀开着的情况下，推入杯子，点屏幕上的 Dock 按钮，等待机器装载 cassette。注意，如果 10 秒左右听不到泵工作的声音，可能是氮气阀忘了开。

## 2. 检查样品

### 2.1 标记 cassette 中样品的位置

Cassette 放入 autoloader 后，autoloader 的分子泵（TMPa1）会重新加速启动，恢复 autoloader 腔室内的真空度。真空恢复后，Autoloader 界面会弹出如图 2.1 左图所示窗口，点击 autoloader 界面右上角小三角图标，在图 2.1 右图所示的 Options 窗口点击“Inventory”，机器将自动检测 slot 中是否有 grid。蓝色表示该 slot 中有 grid，灰色表示该 slot 中无 grid。

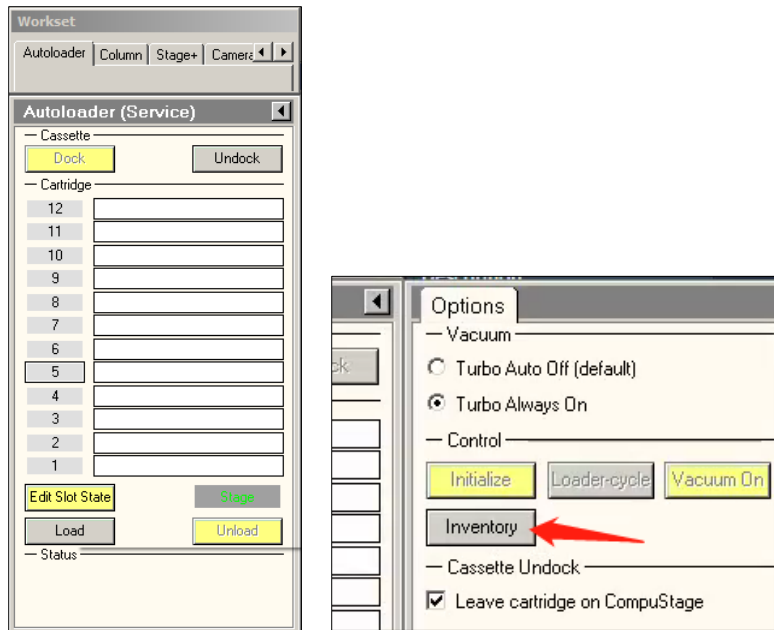
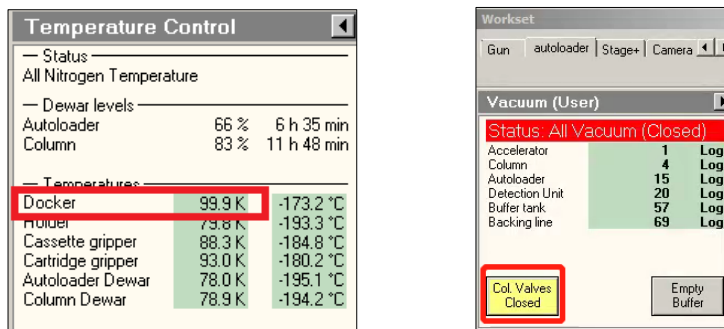


图 2.1 Cassette 中样品位置

### 2.2 load 与 unload 样品

在 Temperature Control 菜单中观察，当 Docker 的温度降至 100k 以下时，可以开始 load 样品。

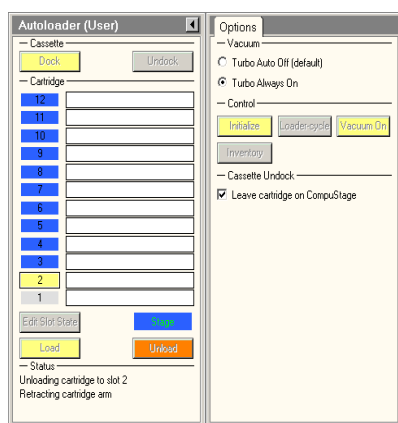


向镜筒内 Load 或 unload 样品前要先关闭 Column Valve（此按钮黄色为关闭状态）并启动分子泵（点击 autoloader 界面右上角小三角图标，在弹出的界面中选中“Turbo Always On”，分子泵即启动），目的是尽量保持 autoloader 腔室内的真空度与镜筒内相同。等 Vacuum On 的颜色由橙色变成黄色后，可 load 样品。点击希望 load 样品的 cartridge 编号（对应数字上会出

现方框)，再点 Load 键，autoloader 机械手会自动将该样品放入镜筒中。样品放入过程中，autoloader 界面状态栏会不断更新状态。样品 load 完成后，autoloader 状态栏无内容，cartridge 对应样品编号图标变为黄色。Load 完成后，为减小震动，可点击“Turbo Auto Off (default)”关闭分子泵，准备观察样品。

**【在筛选样品阶段建议始终选择 Turbo Always On，这样可以节省切换样品的时间。】**

unload 样品前也要先打开分子泵，等 Vacuum On 的颜色由橙色变成黄色后，点击 Unload，机械手会从镜筒中抓回样品放置在原位置。unload 过程中 autoloader 界面状态栏会不断更新状态，unload 动作完成后，状态栏无任何提示，该位置变成蓝色。



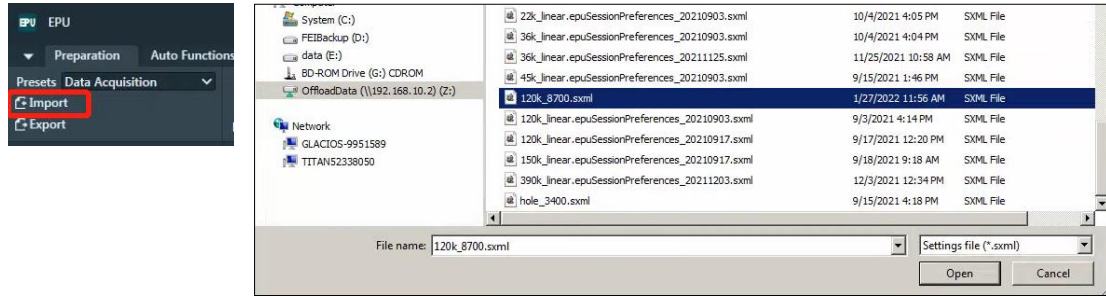
### 2.3 如果之前有一个样品留在镜筒中

如果之前有一个样品留在镜筒里未卸载，则等 Docker 的温度降至 100k 以下时，点击 Inventory，结束后**确认 1#位没有样品**，选择 1#空位，点击 Unload，将镜筒中的样品回收到 1#位。

## 2.4 利用 EPU 检查样品

**【注意：EPU 中各放大倍数参数已设置好，可直接调用，不得自行更改，如特殊情况需更改参数请联系管理员。】**

\* 目前常用的 Data Acquisition 放大倍数为 120K，如需其他倍数可在 Preparation-Import 中调用：在 Z 盘找到对应放大倍数的 xml 文件。



- (1) 在 EPU 中选择 Preparation > Acquisition and Optics Settings , Preset Selection > Atlas;
- (2) 点“Set”按钮【注意！不要点 Get】，这时电镜放大倍数为 135 倍；
- (3) 插入荧光屏（右手控制面板 R1 键，或 TUI 中的 Insert Screen 按钮），打开镜筒阀，观察 Grid 整体的冰层厚度如何（如某些 square 看上去透光，但是不停闪烁，说明这些 square 冰层很厚，实际上基本不透光）。
- (4) 选择一个透光的 square，移动样品台操纵杆使其位于屏幕中心；
- (5) 撤出荧光屏，在 EPU 中选择 Preparation > Acquisition and Optics Settings , Preset Selection 中选择“Atlas”，点击菜单栏最右侧“Preview”按钮，获得一张低倍照片。
- (6) 鼠标放在一个 square 的中心，点击右键，选择“Move Stage Here”，在 Auto Functions 菜单中选择 “Auto-eucentric by beam tilt” 任务。在 Preset Selection 中选择 “Hole/EucentricHeight”，在 Execution 点击“Start”（右侧状态栏会显示当前任务运行情况）。
- (7) 等待 Auto-eucentric by beam tilt 运行结束，点击 Preparation > Acquisition and Optics Settings , Preset Selection 中选择“Hole/EucentricHeight”，鼠标放在四个孔之间的碳膜位置，点击右键，选择“Move stage here”。然后在 Auto Functions 菜单中选择 Preset Selection > Autofocus，在 Auto Function 中选择“Autofocus”任务，在 Execution 点击 “Start”。
- (8) 选择 Preparation > Acquisition and Optics Settings , Preset Selection > Hole/EucentricHeight，鼠标放在希望拍照的位置（孔中心），点击右键，选择“Move stage here”。然后 Preparation > Acquisition and Optics Settings , Preset Selection > Data Acquisition，点击右侧的“Preview”，获得一张照片。

在不同冰层厚度的 Square 中重复（4）-（8）步骤进行样品的筛查，当确定该样品适合收数据时可进行下一章节【3. 拍摄 Atlas 地图】并随后进入收集

数据的流程。

也可在确定 grid 有较多 square 透光的情况下，如下章节所示，先拍摄 Atlas 地图，然后筛查样品。这样筛查效率较高，该 Atlas 地图也可用于后续的数据收集。

## 3. 拍摄 Atlas 地图

Atlas 是对整个 Grid 或部分区域拍摄地图。收数据前必须先获得该 grid 的 Atlas。

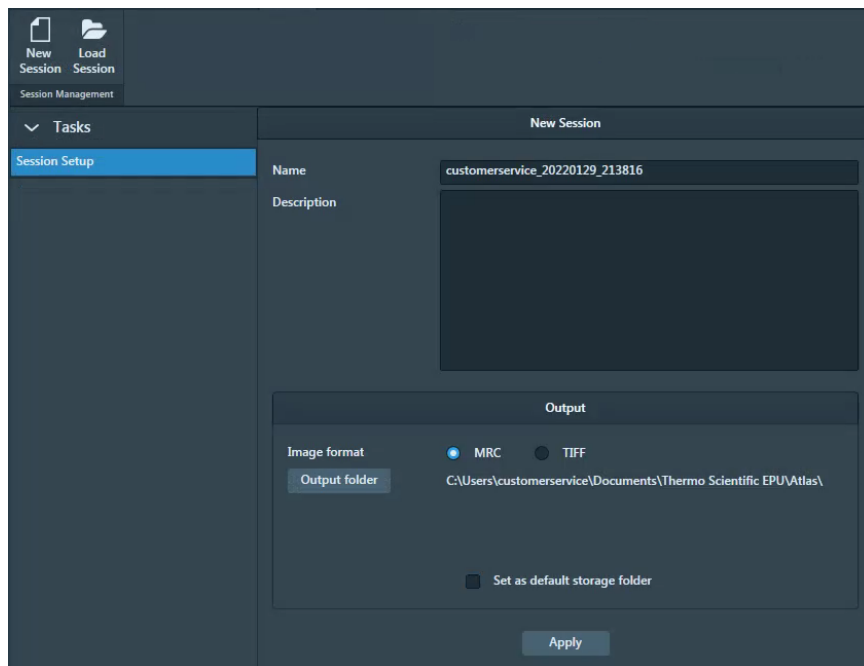
### 3.0 拍 Atlas 前的准备：调 Eucentric Height

【如前面已 check 过样品，则样品基本已处于 Eucentric Height，可忽略此步骤。】

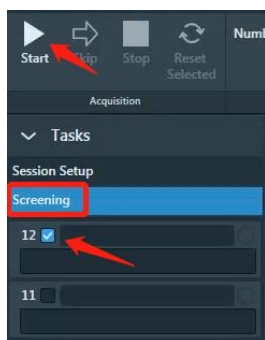
找一个透光较好的 square，调好 Eucentric height（见 2.3 步骤（6））

### 3.1 建立 Atlas 任务

所有 12 个样品的 atlas 属于同一个任务，不需要对每一个 grid 单独建 session 在 Atlas 标签中，选“New session”，在 Session Setup 界面中输入任务名称、选择图片格式（MRC 或 TIFF 均可）、存放的目录（这些选项均可使用默认值），点击“Apply”完成任务设定。



### 3.2 拍摄 Atlas



点击 Session Setup 下方的 Screening，在 Screening 标签中，勾选当前 grid 对应编号，点击 Start 开始拍摄 Atlas 地图。拍摄过程中点击进度条可看到 Atlas 拍摄的进程（如已拍摄的区域满足收数据需求，可点击 Stop 停止拍摄，不必等待整个 grid 拍完）

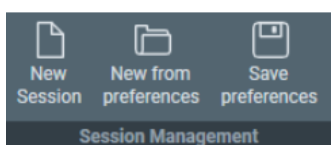
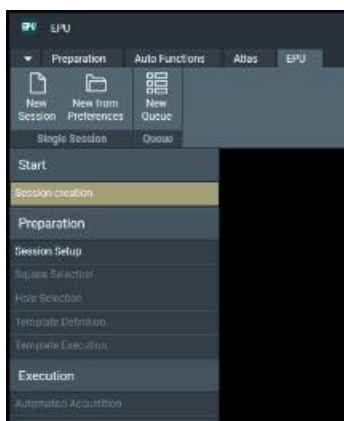
如需重新拍摄，可点击 reset 后重新开始拍摄。

atlas 拍摄结束后稍等一会儿，软件会对各 square 冰的厚薄进行判断，并用不同颜色进行标记，可供参考（不完全准确，仅供参考）

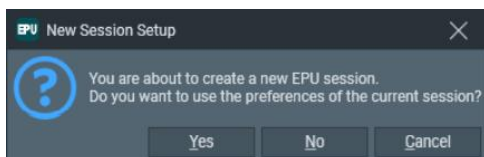
## 4. 收数据

### 4.1 建立 EPU 任务

(1) 在 EPU 菜单，选择 session creation - New Session



这时会跳出提示窗口：

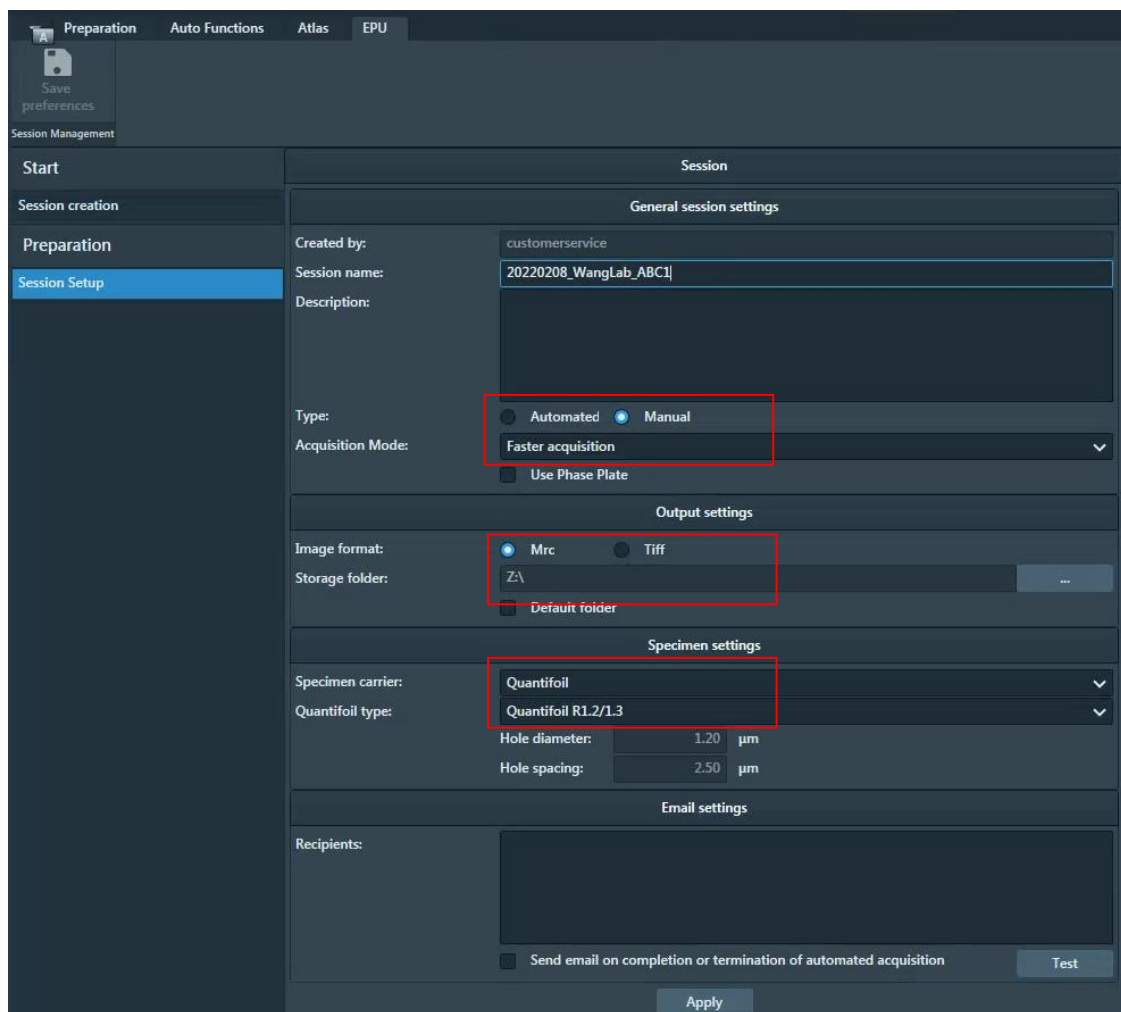


选择 Yes

(如数据收集放大倍数不同，可选择 Session creation- New from preferences，选择一个其它的 preference)

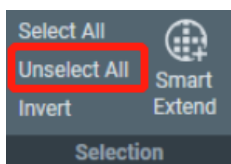
(2) 在 Session Setup 窗口按下图进行设置：修改 Session name(为方便数据管理，请按照“日期\_课题组\_蛋白名称”格式进行命名，如 20220208\_WangLab\_ABC1)【注意红色框出的选项】





## 4.2 Square Selection

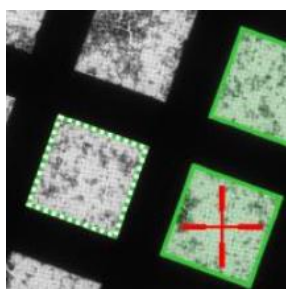
(1) 选择 Square Selection 后，会自动跳出 Atlas 图像，系统已默认将所有的 square 选中，点击左上角“Unselect all”，去除已选的所有 square，开始手动选择要收数据的 square。



(2) 点“Show”可显示选中的 square 编号

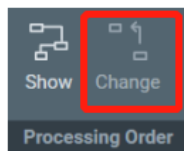
(3) 左键点击一个 square，右键选择“select”可选择 a square（快捷键：Ctrl+鼠标左键）。“remove”可将选择去除（快捷键：Shift+鼠标左键）

(4) 如果 Grid Square Suggestion 功能处于激活状态，当选择一个 square 后，软件会基于机器学习算法，给出建议选择的 square，用绿色虚线提示；



(5) 如 square 看不清可双击 square 打开大图，看得更清楚些（右键选择 close tile 可关闭大图）。如仍不确定该 square 是否合适，可右键选择“Move stage here”，然后拍摄 GridSquare 倍数或 Hole/EucentricHeight 倍数照片看一下，也可进一步做 Eucentric Height、Autofocus、Data Acquisition 看一下颗粒的情况

(6) 调整 square 的顺序（将最好的 square 放在前面，同时考虑 square 间移动的距离较小）：选择 Processing Order > Change，点击计划拍摄的第一个 square，该 square 的序号会标为“1”，随后点击计划中的第二个 square，依次类推【注意：最后一个 square 不要点，否则最后一个会变成第一个！如点了最后一个，则可以将最后一个 remove，然后再重新加上】完成调整后点击 change 结束调整（也可连续点击某个 square，可使其序号后移）。

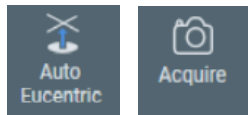


(7) 选择好 square 后，进入下一步“Hole Selection”（可以先选择一部分 square 拍摄，后续可以随时中断拍摄，继续选择 square）

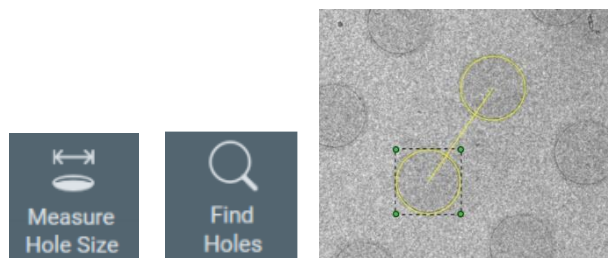
### 4.3 Hole Selection

(1) 选择 Hole Selection

(2) 点击“Auto Eucentric”，等待软件自己进行 Eucentric Height 的调整，结束后会出现当前 square 的照片；如当前 square 已经处于 Eucentric height，可直接点击“Acquire”，获得当前 square 的照片

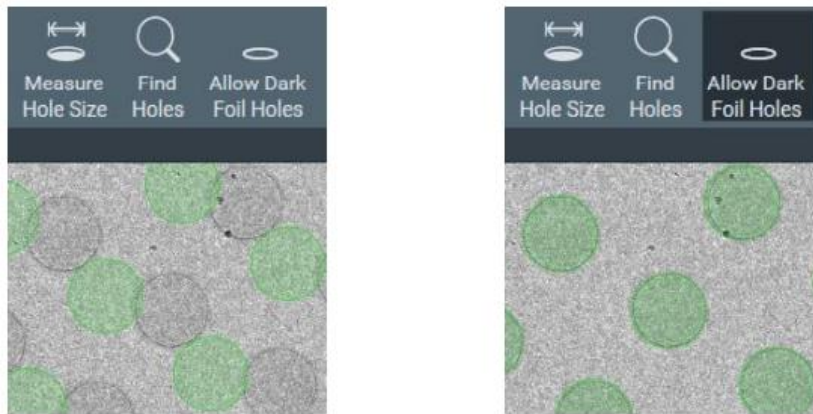


(3) 点击“Measure Hole Size”，将两个黄圈调整大小（拖动黄圈角上的绿点可改变黄圈大小），分别恰好套上两个孔（黄圈应与孔的大小尽量完全一致）。两个黄圈应位于四个孔构成的正方形的边，而不是对角线；滑动鼠标滚轮可放大图片）；



(4) 点击“Find Holes”，软件会自动将孔的位置用绿色圆套住，表示这些孔是需要进行数据收集的位置。如绿圆与孔的位置发生偏差，可能是因为冰太厚，孔的位置不易识别，或是上一部黄圈的大小与孔不一致。（拖动其中一个黄圈，可改变两个圈之间距离；拖动其中一个绿色点可改变黄圈的尺寸）

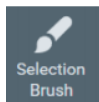
如果孔内的冰比碳膜颜色深，则激活“Allow Dark Foil Holes”选项后再点击“Find Holes”



(5) 通过滑动 Ice Filter（红线），可自动对孔进行筛选（滑动左边红线可去除太黑的孔，滑动右边红线可去除太亮的孔）。

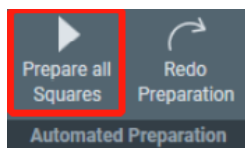


(6) 选择 Selection Brush 工具可进一步精细选择需要拍摄的孔，用法：鼠标左键点击或拖动，可消除；按着 shift 滑动鼠标滚轮，可改变刷子大小；按着 Ctrl 点击鼠标左键或拖动，可添加该孔



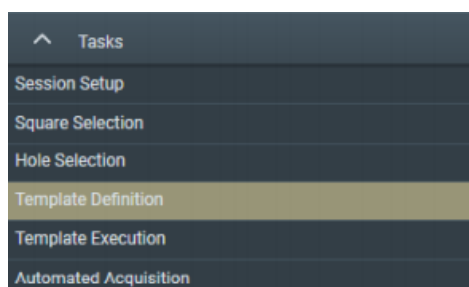
(7) 选好孔后，点击 Selection Brush，结束对当前 square 的操作。【建议在该步骤后进行 4.4 Template Definition 的操作，操作中可观察到 Measure Hole Size 时给的 hole size 是否准确，如有偏差则回到“Measure Hole Size”步骤进行调整，重复（3）-（7）步骤后再进行（8）】

(8) 点击“Prepare all Squares”，自动进行后续 square 的 eucentric height 调整、找孔。结束后用 Selection Brush 将不要的孔去除（通常 square 边缘的两圈孔冰不好，不要选）



## 4.4 Template Definition

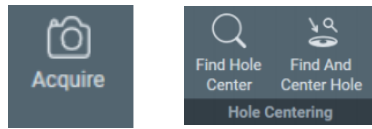
(1) 在 Hole Selection 任务完成后，选择 Template Definition 任务




(2) 点击 Acquire, 获得一张 Hole/EucentricHeight 倍数的照片

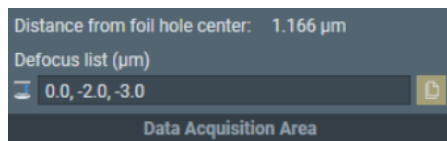
(3) 选择 Find And Center Hole

(4) 定义收数据区域: 点击 Add Acquisition Area, 出现一个绿色圆圈, 中间一个方框。绿色圆圈表示光斑大小, 方框表示相机的成像范围。黄色圆圈是软件自动识别的孔。拖

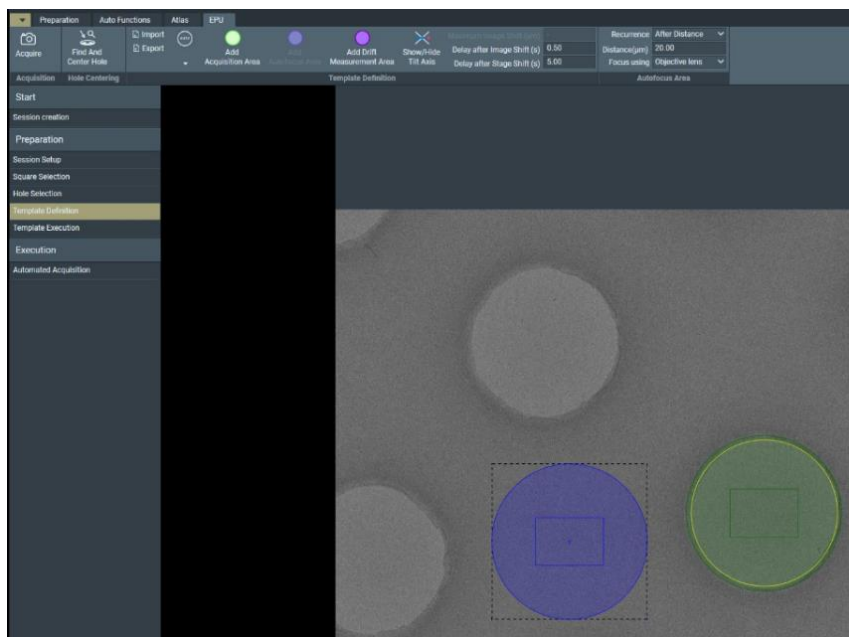


动绿色圆圈可定义拍照位置, 如需一孔多收, 可再次点击 Add Acquisition Area, 出现第二个绿色圆圈。(两个圆圈中间的方框不可重叠, 尽量拉大距离)

(6) 定义 defocus 范围: 点击绿色圆圈, 在右上角的 defocus 栏输入所需的 defocus 值。注意: 必须将所需的值输入, 而不是范围, 用逗号分割, 例如“-1.5,-1.7,-1.9,-2.1,-2.3,-2.2,-2.0,-1.8,-1.6”, 输入后点击右侧的复制按钮将这些 defocus 数列定义给每个拍摄位置。



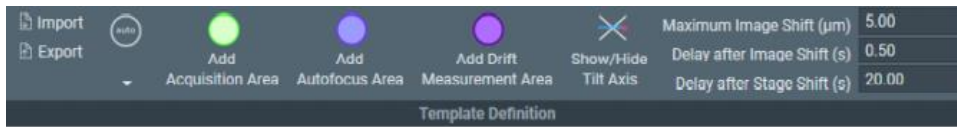
(7) 定义 Autofocus 区域: 点击 Add Autofocus Area, 出现一个蓝色圆圈, 将该圆圈拖到孔之间的碳膜上。在右上角的 Autofocus Area 菜单中的 Recurrence 中选择“After Distance”, 然后在 Distance (um) 栏输入做 Autofocus 的范围, 如载网较平整, 可输入 20, 如载网不平整或希望 defocus 更精准, 可输入较小值, 如 11。(值越小, Autofocus 越频繁, 数据收集速度相应较慢些)。Focus using 选择“Objective lens”



(8) 定义 Drift Measurement 区域 (该操作会在数据收集过程中检测样品漂移的情况, 漂移距离低于阈值后开始数据收集 (阈值通常设为 0.2nm/s)): 点击 Add Drift Measurement Area, 出现一个紫色圆圈, 通常将该圆圈拖到和蓝色圆圈重合的位置, 然

后在 Drift Measurement Area 菜单中进行设定：Recurrence 通常设为 “Once per GridSquare”；Drift Threshold 通常设为 0.2 (nm/s)

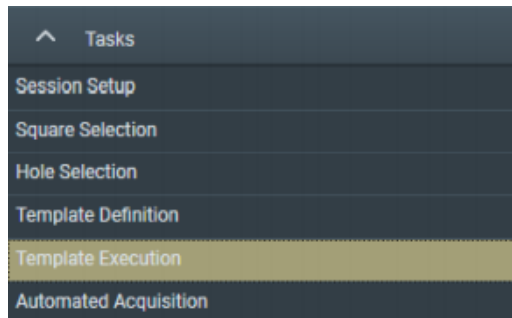
(9) 也可不设置 Drift Measurement Area，而仅设置 Delay after Stage Shift



## 4.5 Template 执行

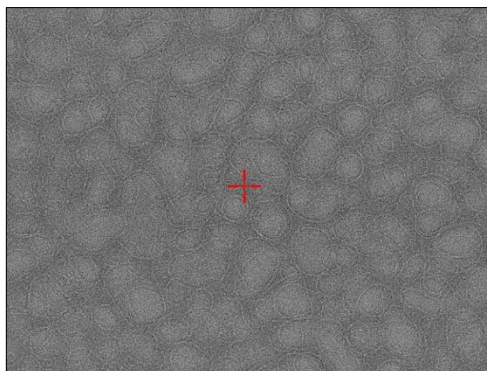
此步骤是测试自动收数据模板是否能正常运行。如确定没问题，可忽略该步骤。

方法：选择 Template Execution，点击 Preview

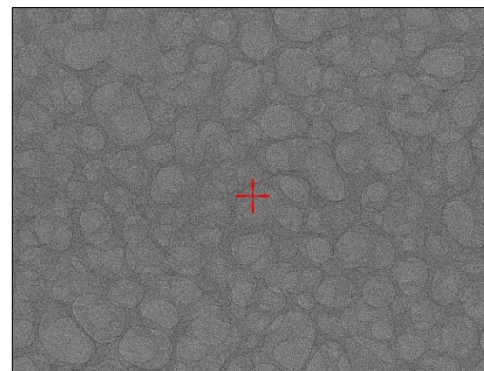


## 4.6 收数据前调光

- (1) 移动到一个冰很薄甚至孔内没有冰的 Square 【注意检查 Autoloader 的泵是否已关上；
- (2) 调整到 **Eucentric height** 高度，移动 stage 到孔之间的碳膜上；
- (3) 选择 Preparation > Acquisition and Optics Settings，Preset Selection > Thon ring 倍数，点 Set；
- (4) 按左控制面板 L2 (Normalize All Lens)，再按一下右控制面板 Eucentric Focus；
- (5) 选择 Preparation > Acquisition and Optics Settings，Preset Selection > Thon ring 倍数，Acquire 一张照片，观察照片是否处于欠焦状态【如过焦，则图片中气泡边缘有黑边，这时按右控制面板 Z 右侧的“-”按钮，使 Z 值减小 1-2um】



过焦



欠焦

- (6) insert 屏幕，逆时针旋转 Intensity 旋钮缩小光斑为一个点。【如发现光斑非常不圆，

需要调节聚光镜像散】

- (7) 在右下角找到 Direct Alignments 菜单，选择 “nP Beam tilt pp X”，调节 Multifunction X 使两个光斑尽量重合；再选择 “nP Beam tilt pp Y”，调节 Multifunction X 使两个光斑尽量重合；然后选择 “Beam Shift”，调节 Multifunction X/Y 使光斑位于屏幕中心。
- (8) Extract 屏幕
- (9) EPU 中 Autofunction 中模式选择 Thon ring，功能选择 Auto Stigmater，点 Start，等待右侧窗口中提示成功。
- (10) EPU 中 Autofunction 中模式选择 Thon ring，功能选择 Auto Coma，点 Start，等待右侧窗口中提示成功。
- (11) 重复第（7）步，如 “nP Beam tilt pp X/Y” 时光斑抖动明显，则调整后再次运行（8）-（10）步，否则可直接进入 “4.7 收数据任务”

## 4.7 运行收数据任务

选择 Automated Acquisition，按下 “Close Col. Valves”（这样数据收集结束会自动关闭镜筒阀），然后点击 “Start Run” 开始运行收数据任务。

