



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112129795 B

(45) 授权公告日 2024.11.12

(21) 申请号 202010578893.3

(22) 申请日 2020.06.23

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112129795 A

(43) 申请公布日 2020.12.25

(30) 优先权数据
16/450321 2019.06.24 US

(73) 专利权人 FEI 公司
地址 美国俄勒冈州

(72) 发明人 B.比伊泽 A.科特查

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
专利代理师 张凌苗 申屠伟进

(51) Int. Cl.
G01N 23/2055 (2018.01)
G01N 23/04 (2018.01)
G01N 23/2251 (2018.01)

(56) 对比文件
SVEN HOVMOLLER et al..Crystal

Structure Determination from EM Images and Electron Diffraction Patterns.《ADVANCES IN IMAGING AND ELECTRON PHYSICS》.2000,第123卷第257-289页.

SVEN HOVMOLLER et al..Crystal Structure Determination from EM Images and Electron Diffraction Patterns.《ADVANCES IN IMAGING AND ELECTRON PHYSICS》.2000,第123卷第257-289页.

Giulia Zanetti et al..Contrast transfer function correction applied to cryo-electron tomography and sub-tomogram averaging.《Journal of Structural Biology》.2009,(第168期),第305-312页.

Glaeser,R.M.et al..High resolution electron crystallography of protein molecules.《Ultramicroscopy》.1993,第52卷第478-486页.

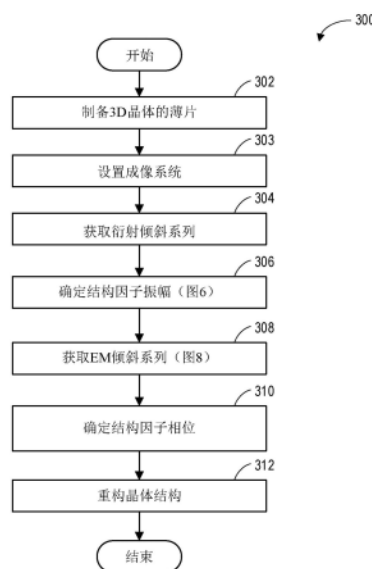
审查员 李佩

权利要求书2页 说明书11页 附图10页

(54) 发明名称
用于确定分子结构的方法和系统

(57) 摘要

用于确定分子结构的方法和系统。可以基于从样品的衍射图和电子显微镜图像中求解的结构因子来确定分子结构。具体地,所述结构因子的振幅可以基于多个衍射图中的各衍射峰的强度来确定。所述结构因子的相位可以基于电子显微镜图像和所述各衍射峰的所述强度来确定。



1. 一种用于确定样品的分子结构的方法,其包括:
在相对于入射束倾斜所述样品的同时获取所述样品的多个衍射图;
基于所述多个衍射图中的衍射峰的强度来确定结构因子的振幅;
获取所述样品的第一电子显微镜 (EM) 图像;
在获取所述第一EM图像之后,以比用于获取所述第一EM图像的电流密度更高的电流密度获取所述样品的第二EM图像;
基于所述第一EM图像、所述第二EM图像和所述多个衍射图中的所述衍射峰的所述强度来确定所述结构因子的相位;以及
基于所述结构因子的所述振幅和所述结构因子的所述相位来确定所述样品的所述分子结构。
2. 根据权利要求1所述的方法,其进一步包括基于所述第二EM图像确定对比度传递函数 (CTF), 并且基于所述第二EM图像确定所述结构因子的所述相位包含基于所述CTF确定所述结构因子的所述相位。
3. 根据权利要求1到2中任一项所述的方法,其中获取所述第一EM图像包含以一定倾斜角获取所述第一EM图像,并且基于所述第一EM图像、所述第二EM图像和所述多个衍射图中的所述衍射峰的所述强度来确定所述结构因子的所述相位包含基于所述第一EM图像和所述衍射峰在所述倾斜角下的强度来确定所述结构因子在所述倾斜角下的所述相位。
4. 根据权利要求3所述的方法,其中所述结构因子在所述倾斜角下的所述相位基于所述衍射峰的弗里德尔配对 (Friedel mate) 的强度来进一步确定。
5. 根据权利要求4所述的方法,其中所述衍射峰的所述强度与所述衍射峰的所述弗里德尔配对的所述强度是不同的。
6. 根据权利要求1到2中任一项所述的方法,其中基于所述衍射峰的强度确定所述结构因子的所述振幅包含通过取所述衍射峰在所述倾斜角下的强度的平方根来计算所述结构因子在特定倾斜角下的所述振幅。
7. 根据权利要求1到2中任一项所述的方法,其中基于所述衍射峰的强度确定所述结构因子的所述振幅包含:使所述衍射峰的所述强度与曲线拟合,以及通过取所述曲线在所述倾斜角下的强度的平方根来计算所述结构因子在特定倾斜角下的所述振幅。
8. 根据权利要求1到2中任一项所述的方法,其进一步包含通过对所述多个衍射图进行阈值化来标识所述衍射峰。
9. 根据权利要求1到2中任一项所述的方法,其中所述多个衍射图中的所述衍射峰的强度非零。
10. 一种用于确定样品的分子结构的系统,其包括:
电子源,所述电子源用于生成电子束;
样品固持器,所述样品固持器用于使所述样品相对于所述电子束倾斜;
第一检测器,所述第一检测器用于获取所述样品的衍射图;
第二检测器,所述第二检测器用于获取所述样品的电子显微镜 (EM) 图像;
控制器,所述控制器具有存储在非暂时性介质中的计算机可读指令,所述控制器被配置成:在所述样品通过所述样品固持器相对于所述电子束倾斜时,将所述电子束朝着所述样品的第一位置引导,并且通过所述第一检测器获取所述样品的多个电子衍射图;

基于所述多个衍射图中的衍射峰的强度来确定结构因子的振幅；

将所述电子束引导到所述样品的第二位置,并且通过所述第二检测器获取所述样品的低剂量EM图像；

基于所述低剂量EM图像和所述衍射峰的所述强度来确定所述结构因子的相位;并且

基于所述结构因子的所述振幅和所述结构因子的所述相位来确定所述样品的所述分子结构。

11. 根据权利要求10所述的系统,其中所述控制器被进一步配置成:

在将所述电子束引导到所述样品的所述第二位置并获取所述低剂量EM图像之前,以第一倾斜角定位所述样品;

在获取所述低剂量EM图像之后,在所述样品的所述第二位置处获取高剂量EM图像;并且

其中基于所述低剂量EM图像和所述衍射峰的所述强度来确定所述结构因子的所述相位包含基于所述低剂量EM图像、所述衍射峰的所述强度和所述高剂量EM图像来确定所述结构因子在所述第一倾斜角下的所述相位。

12. 根据权利要求10到11中任一项所述的系统,其中所述控制器被进一步配置成沿着两个正交轴倾斜所述样品,并且获取所述多个衍射图包含:在沿着所述两个正交轴中的一个正交轴倾斜所述样品的同时获取第一组衍射图,以及在沿着所述两个正交轴中的另一个正交轴倾斜所述样品的同时获取第二组衍射图。

13. 根据权利要求11所述的系统,其中所述控制器被进一步配置成:

在获取所述高剂量EM图像之后,以第二倾斜角定位所述样品;

将所述电子束引导到以所述第二倾斜角定位的所述样品的第三位置,并且顺序地获取所述样品的第二低剂量EM图像和第二高剂量EM图像;

基于所述第二低剂量EM图像、所述第二高剂量EM图像和所述衍射峰的所述强度来确定所述结构因子在所述第二倾斜角下的所述相位;并且

其中基于所述结构因子的所述振幅和所述结构因子的所述相位确定所述分子结构包含基于所述结构因子的所述振幅、所述结构因子在所述第一倾斜角下的所述相位和所述结构因子在所述第二倾斜角下的所述相位来确定所述分子结构。

14. 根据权利要求10到11和13中任一项所述的系统,其中所述控制器被配置成在通过所述样品固持器持续地倾斜所述样品的同时获取所述多个衍射图。

用于确定分子结构的方法和系统

[0001] 本说明书总体上涉及用于确定分子结构的方法和系统,并且更具体地涉及基于衍射图和电子显微镜图像确定分子结构。

背景技术

[0002] 可以通过其对应的结构因子来确定有机分子的分子结构。结构因子描述了晶体的晶格如何散射入射辐射。形成晶体的分子的3D分子结构可以通过确定晶体的结构因子来解析。来自晶体的散射波相互干扰,并且可以形成二维衍射图。当散射角满足布拉格条件(Bragg condition)时,衍射图中的高强度建设性地形成。结构因子包含振幅和相位。尽管可以从衍射图中获得结构因子的振幅,但是相位信息丢失。为了解决分子结构,可以从晶体的电子显微镜图像中提取相位信息。具体地,可以从电子显微镜图像的傅立叶变换(Fourier transform)中读出相位信息。

发明内容

[0003] 在一个实施例中,一种用于确定分子结构的方法,其包括:在倾斜角范围内使样品倾斜的同时获取所述样品的多个衍射图,基于所述多个衍射图中的衍射峰的强度来确定结构因子的振幅;获取所述样品的电子显微镜(EM)图像;基于所述EM图像和所述多个衍射图中的所述衍射峰的所述强度来确定所述结构因子的相位;并且基于所述结构因子的所述振幅和所述结构因子的所述相位来确定所述样品的所述分子结构。以此方式,所述分子结构可以从所述样品的所述衍射图和所述EM图像中求解。所述样品可以通过铣削巨观晶体(macro-crystal)制备的薄片。

[0004] 应当理解,提供以上概述以便以简化的形式引入在详细描述中进一步描述的一系列概念。其并不意味着标识所要求保护的的主题的关键或必要特征,其范围由详细描述之后的权利要求进行唯一地限定。此外,所要求保护的的主题并不限于解决上文或本公开的任何部分中指出的任何缺点的实施方式。

附图说明

[0005] 图1展示了根据示例性实施例的用于确定分子结构的系统。

[0006] 图2A展示了三维晶体和埃瓦尔德球(Ewald sphere)在倒易空间中的反射的示例位置。

[0007] 图2B示出了在图2A的条件下所获取的衍射图。

[0008] 图3是示出了用于基于衍射图和电子显微镜图像来确定分子结构的示例方法的高级流程图。

[0009] 图4展示了用于获取衍射图和电子显微镜图像的薄片的示例位置。

[0010] 图5展示了处于不同倾斜角下的薄片。

[0011] 图6是用于获取衍射倾斜系列的示例子例程。

[0012] 图7A展示了在多个衍射图中所采样的衍射峰。

- [0013] 图7B示出了针对图7A的衍射峰所生成的摇摆曲线。
- [0014] 图8示出了用于获取电子显微镜倾斜系列的示例子例程。
- [0015] 图9示出了用于确定结构因子的相位的示例子例程。
- [0016] 图10A示出了示例衍射图。
- [0017] 图10B示出了以与图10A相同的倾斜角获取的低剂量电子显微镜图像的傅立叶变换。
- [0018] 贯穿附图的若干视图,相似的附图标记指代对应的部分。

具体实施方式

[0019] 以下描述涉及用于基于样品的衍射图和电子显微镜 (EM) 图像来确定分子结构的系统和方法。在一个实例中,衍射图和EM图像可以从如图1的电子显微镜系统等电子显微镜成像系统中获取。

[0020] 分子结构可以基于其在倒易空间中的结构因子来求解,所述倒易空间是实空间的傅立叶变换。结构因子包含振幅和相位。结构因子的振幅和结构因子的相位两者是在倒易空间中所限定的三维 (3D) 数据集。来自实空间中的晶格的平面的散射波在倒易空间中形成反射。每次反射具有相对于倒易空间的原点中心对称定位的弗里德尔配对 (Friedel mate)。反射和其弗里德尔配对形成弗里德尔对。反射可以通过2D衍射图来捕获或采样。如图2A中所示,衍射图中的衍射峰可以仅当其对应反射与倒易空间中的弯曲的埃瓦尔德球重叠 (或在距所述弯曲的埃瓦耳德球的阈值距离内) 时才会出现。对于弱相位物体,衍射图中的反射的弗里德尔对的振幅可以具有相同强度。然而,由于埃瓦尔德球的曲率,单个衍射图可能无法捕获反射的弗里德尔对的振幅。换句话说,如图2B的衍射图中所示,衍射图中的衍射峰可能不是中心对称的。衍射图中的衍射峰的弗里德尔对可以具有不同强度。因此,结构因子的弗里德尔对的强度可能是不同的。进一步地,当基于EM图像确定结构因子的相位时,需要考虑由衍射峰的弗里德尔对的不相等强度所引起的另外的相移。

[0021] 图3示出了用于基于样品的衍射倾斜系列和EM倾斜系列来确定3D晶体的分子结构的示例方法。衍射倾斜系列包含以多个倾斜角获取的衍射图,并且EM倾斜系列包含以多个倾斜角获取的EM图像。所述样品可以呈薄片的形式。结构因子的振幅可以基于衍射倾斜系列中的衍射峰的强度来确定。结构因子的相位可以基于样品的EM图像和来自衍射倾斜系列的衍射峰的强度来求解。图4展示了用于获取衍射图和EM图像的薄片上的示例位置。图5展示了处于不同倾斜角下的薄片。图6示出了用于确定结构因子的振幅的子例程。图7A和7B展示了用于生成衍射峰的摇摆曲线的过程。图8示出了用于获取EM倾斜系列的子例程。图9示出了用于确定结构因子的相位的子例程。图10A和10B分别示出了以相同倾斜角获取的低剂量EM图像的衍射图和傅立叶变换。

[0022] 转到图1,示出了根据本公开的实施例的透射电子显微镜 (TEM) 系统100。TEM系统100包含沿着发射轴110 (如电子束11) 朝着柱12发射带电粒子的电子源10。电子源10可以生成高能电子,即,具有介于约10 keV与1,000 keV之间的典型能量的电子。在一些实施例中,柱12可以包含如聚光器透镜120和121等一个或多个聚光器透镜,以及如孔径122等一个或多个孔径。柱12使从电子源10生成的电子准直,并且将电子束引导到样品14上。样品14可以由样品固持器13固持。样品固持器13可以通过倾斜和/或平移样品来调整样品位置。聚光器

孔径15可以任选地插入到束路径中,以允许电子束仅照射样品的选定区域。

[0023] TEM系统100可以用于获取样品的衍射图和EM图像两者。在衍射成像模式中,散射电子可以透射通过样品14,并且在顺序地行进通过物镜123、中间透镜126和投影仪透镜127之后由检测器25收集,如用实线所示。未散射束可能被束霖止器17阻挡。所收集的散射电子用于形成电子衍射图,如选定区域电子衍射(SAED)图。在EM成像模式中,从束路径中移除束霖止器17。从样品14中所透射的电子顺序地行进通过物镜123、中间透镜126和投影仪透镜127,并且在检测器25上形成样品的TEM图像,如用虚线所示。

[0024] 检测器25可以检测接收到的电子并且将信号发送到图像处理器24以形成图像。检测器25可以包含用于在将信号发送到图像处理器24之前放大信号的放大器。在一个实例中,检测器25可以是CCD摄像机或CMOS摄像机。在一些实施例中,不同的检测器可以用于衍射图获取和EM图像获取。

[0025] 控制器30可以响应于操作员指令手动地或根据存储在非暂时性存储器(或计算机可读介质)32中的计算机可读指令自动地控制TEM系统100的操作。控制器30可以包含处理器,并且被配置成执行计算机可读指令并控制TEM系统100的各种组件,以便实施本文所描述的任何方法。例如,控制器可以通过调整选定区域孔径15和物镜光阑124的位置来调整成像模式以获取SAED图或EM图像。控制器30可以通过调整电流密度来调整朝着样品照射的电子束的剂量。例如,电流密度可以通过调整聚光器光学器件(如聚光器透镜120和121)来调整。控制器30可以通过调整在柱12中的一个或多个孔径和/或透镜来调整入射束的轮廓。控制器30可以通过调整样品固持器13来调整样品相对于入射束的位置和/或朝向。控制器30可以进一步耦接到显示器31以显示样品的通知和/或图像。控制器30可以从用户输入装置33接收用户输入。用户输入装置33可以包含键盘、鼠标或触摸屏。

[0026] 尽管通过举例描述了TEM系统,但是应当理解的是,可以通过其它显微镜系统来获取衍射图和EM图像。在一个实施例中,衍射图和EM图像可以通过不同的显微镜系统来获取。作为一个实例,衍射图可以从X射线衍射系统获取的X射线衍射图。作为另一个实例,EM图像可以从扫描透射电子显微镜(STEM)系统来获取。TEM系统的本讨论仅被提供作为一种合适的成像模态的实例。

[0027] 图2A示出了3D晶体和埃瓦尔德球在倒易晶格中的例反射的位置。图2B示出了在图2A的条件下所获取的对应衍射图。在图2A中,在倒易空间中的 k_x - k_z 平面中示出了反射的位置。倒易空间由轴 k_x 、 k_y 和 k_z 限定。在方向212处,用带电粒子束照射3D晶体。反射(201、202、203、204和205)表示3D晶体在倒易空间中的反射的子集。在本文中,反射(201-205)沿着 k_x - k_z 平面中的虚线210对准。弓形211是埃瓦尔德球的一部分。尽管反射的弗里德尔对可能具有相同的振幅,但是由于埃瓦尔德球的曲率,衍射峰的弗里德尔对可能具有不同的强度。接近(即,在小的距离内)埃瓦尔德球的反射表现为衍射图中的高强度衍射峰。在此实例中,与轴 k_z 左侧上的反射(即, $k_x < 0$)相比,轴 k_z 右侧上的反射(即, $k_x > 0$)更接近埃瓦尔德球。在对应的衍射图图2B中,衍射峰(223、224、225和226)沿着倒易空间的 k_x - k_y 平面中的线222对准。大多数衍射峰出现在图像的右侧,在位于衍射图原点(即,倒易空间的原点)处的束霖止器221的右侧。衍射峰223和224是弗里德尔对。衍射峰225和226的弗里德尔配对没有在衍射图中被捕获。换句话说,衍射峰225和226的弗里德尔配对的强度分别与衍射峰225和226的强度相比更低。

[0028] 图3示出了用于确定分子的分子结构的示例方法300。分子可以呈2D晶体或3D晶体的形式。分子结构可以通过求解其结构因子的振幅和相位来确定。结构因子的振幅可以基于衍射倾斜系列来确定。结构因子的相位可以基于衍射倾斜系列和EM倾斜系列来确定。

[0029] 在302处,制备晶体样品。所述样品可以呈薄片的形式。可以从宏观晶体铣削薄片。例如,可以通过使用带电粒子束(如聚焦离子束)铣削宏观晶体而从宏观晶体形成薄片。可以通过如坐滴或悬滴汽相扩散或分批结晶等的标准蛋白质结晶方法来制备宏观晶体。薄片的厚度可以基于被研究的分子的类型来确定。例如,薄片厚度可以大于晶体的晶胞(unit cell)的尺寸,以确保分子结构是完整的。薄片厚度可以处于300 nm以下。较薄的薄片可以减少动态散射对确定结构因子的振幅的影响。在一些实施例中,样品可以包含多个薄片。

[0030] 图4示出了通过用聚焦离子束铣削宏观晶体制备的示例薄片401。对于每个薄片,可以对多个位置进行成像以获取衍射图和EM图像。例如,在图4中,薄片上的实心方形指示用于EM图像获取的位置,并且薄片上的虚线方形指示用于衍射图获取的位置。用于衍射图和EM图像的成像区域可以是相同的。图像的像素分辨率可以基于分子结构的期望分辨率来确定。例如,分子结构中5埃的期望分辨率可能需要EM图像中2.5埃的像素分辨率以满足奈奎斯特条件(Nyquist condition)。成像区域可以由晶体的辐射硬度确定。在一个实例中,在成像区域中可以是 $0.01-1 \text{ } \mu\text{m}^2$ 。

[0031] 在303处,设置如图1的成像系统等成像系统,以便获取图像。设置成像系统可以包含将薄片加载到系统中。设置成像系统可以包含在对样品进行成像之前执行无慧差对准(coma-free alignment)。

[0032] 在304处,获取样品的衍射倾斜系列。衍射倾斜系列是包含多个2D衍射图的3D数据集。这些衍射图可以是用低于 $0.1 \text{ e1}/\text{\AA}^2$ 的电流密度所获取的电子衍射图。例如,电流密度为 $0.01 \text{ e1}/\text{\AA}^2$ 。

[0033] 在一个实施例中,薄片可以绕倾斜轴以倾斜速度持续地倾斜。倾斜轴可以与入射束正交。倾斜速度可以基于衍射图的期望采样分辨率和获取速度来确定。当每个倾斜角差 $\Delta\theta$ 使薄片倾斜时,可以形成衍射图。换句话说,每个衍射图跨越倾斜角差 $\Delta\theta$ 。连续获取的衍射图之间的倾斜角差 $\Delta\theta$ 可以基于期望采样分辨率来确定。例如,倾斜角差 $\Delta\theta$ 可以随着期望采样分辨率的增加而减小。进一步地,可以基于过采样率来调整倾斜角差 $\Delta\theta$,以获得更精细的切片。倾斜角差 $\Delta\theta$ 可以与过采样率成反比。在一个实例中,倾斜角差 $\Delta\theta$ 可以是3度。即,在每3度角倾斜期间获取一个衍射图。在另一个实施例中,薄片可以离散地倾斜。例如,可以首先使薄片倾斜倾斜角差 $\Delta\theta$ 。然后,当样品相对于束静止时,朝着样品照射所述带电粒子束以获取衍射图。

[0034] 图5展示了薄片在由轴x、y和z限定的实空间中的处于不同倾斜角下的位置。可以用由箭头501指示的带电粒子束沿着z轴照射薄片。薄片可以围绕与入射束正交的轴倾斜。例如,薄片可以绕y轴倾斜或旋转,如箭头510所指示的。Y轴可以与样品固持器的旋转轴相对应。倾斜角可以由薄片与x轴之间的角限定。例如,在位置502处,薄片的倾斜角为零。在位置504处,薄片的正倾斜角为505。在位置503处,薄板的负倾斜角为506。

[0035] 在一些实施例中,倾斜角的范围可以由样品固持器的最大旋转范围来限制。倾斜角范围可以与样品固持器的最大旋转范围相同。例如,可以在将薄片从-70度倾斜到+70度的同时获取衍射倾斜系列。在一个实施例中,可以在样品的相同位置处获取整个衍射倾斜

系列。在另一个实施例中,可以从样品的多个位置中获取衍射倾斜系列。例如,可以在样品的第一位置处获取具有范围为-70度到0度的倾斜角的衍射图,可以在样品的第二位置处获取具有范围为0度到70度的倾斜角的衍射图。为了避免破坏分子结构,在每个位置处获取的衍射图的数量可能受到电子束剂量的限制。在一些实施例中,衍射倾斜系列可以从在302处制备的多个薄片获取。

[0036] 在一些实施例中,衍射倾斜系列可以包含通过沿着两个正交轴倾斜所获取的衍射图。例如,如图5中所示,第一组衍射图可以通过沿着y轴使样品倾斜来获取,并且第二组衍射图可以通过沿着x轴使样品倾斜来获取。通过包含在沿着两个正交轴倾斜的同时获取的衍射图,可以获得衍射峰在3D倒易空间中的更精确的轮廓。进一步地,可以减少动态散射对确定结构因子的振幅的影响。

[0037] 在306处,结构因子的振幅可以基于衍射倾斜系列来计算。结构因子的振幅可以基于衍射倾斜系列中的衍射峰的强度来确定。每个衍射峰与倒易空间中的反射相对应。由于晶体的有限尺寸和/或束发散,衍射峰可能不是德尔塔函数(delta function),而是占据倒易空间中的体积。换句话说,衍射峰的强度在倒易空间中的体积内扩展(即,具有非零强度)。因此,单个衍射图无法捕获衍射峰的全角斑点轮廓,并且多个倾斜角中的衍射峰的强度用于求解结构因子振幅。

[0038] 图6和图7A-7B详细示出了结构因子振幅计算。结构因子的振幅可以基于衍射峰的强度非零的倾斜角的子集上的每个衍射峰的角度斑点轮廓(或摇摆曲线)来确定。每条摇摆曲线通过在多个倾斜角上拟合衍射峰的强度来生成。

[0039] 在601处,确定衍射倾斜系列中的每个衍射峰的强度。确定衍射峰的强度可以包含通过对属于特定衍射峰的高强度斑点进行分组来标识每个衍射峰,并且基于衍射图中的衍射峰的高强度斑点的总强度来计算衍射图(或在倾斜角下)中的衍射峰的强度。

[0040] 在602处,可以对衍射倾斜系列进行阈值化。例如,在移除背景之后,衍射倾斜系列中的低强度数据点(或像素)通过阈值化被滤除。背景可能是由非弹性散射电子、从试样支撑膜散射的电子或试样的非晶部分引起的。在一个实例中,可以通过低通滤波移除背景。在移除低强度数据点之后,仅保留具有高于阈值水平的强度的数据点。在一个实施例中,阈值水平可以是预定的。在另一个实施例中,阈值水平可以基于衍射倾斜系列中的最大强度来确定。例如,阈值水平可以是最大强度的10%。在又一个实施例中,阈值水平可以由成像系统的灵敏度来确定。例如,阈值水平可以是衍射倾斜系列的噪声水平。

[0041] 在604处,标识衍射倾斜系列中的衍射峰。例如,标识衍射峰可以包含标识每个衍射图中的高强度斑点,并且标识属于衍射峰的高强度斑点。高强度斑点是在衍射图中包含一组高强度数据点(或像素)的区域。标识高强度斑点可以包含确定高强度斑点的位置和总强度。高强度斑点可能不彼此重叠。在一个实施例中,标识高强度斑点可以包含标识每个高强度斑点的边界。每个高强度斑点的总强度可以通过对高强度斑点的边界内的所有数据点(或像素)的强度进行求平均或求和来计算。高强度斑点的位置可以是倒易空间中的高强度斑点边界的几何中心。

[0042] 标识属于每个衍射峰的高强度斑点可以包含基于高强度斑点的强度和位置对其进行分组。可以在多个衍射图中捕获衍射峰。在一个实施例中,属于衍射峰的高强度斑点可以基于高强度斑点在倒易空间中的距离来标识。例如,在倒易空间中彼此相距阈值距离内

的高强度斑点被确定为属于一个衍射峰。高强度斑点之间的距离可以基于高强度斑点衍射图中的位置和衍射图的倾斜角来确定。每个衍射峰的高强度斑点可以进一步基于高强度斑点的总强度来标识。例如,总强度首先增加,然后随着倾斜角的增加而减小。

[0043] 在606处,计算每个衍射图中的衍射峰的强度。例如,衍射图(或在倾斜角下)中的衍射峰的强度是衍射图内的衍射峰的高强度斑点的总强度。

[0044] 图7A展示了衍射倾斜系列中的示例衍射峰的强度。在图7A中,衍射倾斜系列701包含以多个倾斜角 θ 获取的多个衍射图。在每个衍射图711、712、713和714上示出一个示例高强度斑点。衍射图711-714中的高强度斑点被确定为属于相同的衍射峰,因为其在倒易空间中彼此靠近定位。高强度斑点的灰度水平指示高强度斑点的总强度,或衍射图中的衍射峰的强度。高强度斑点越暗,总强度越高。总强度首先增加,然后随着倾斜角的增加而减小。

[0045] 在608处,可以基于多个衍射图中的衍射峰的强度来生成每个衍射峰的摇摆曲线(或角斑点轮廓)。例如,可以通过使衍射峰的强度与如高斯曲线(Gaussian curve)等曲线拟合来生成摇摆曲线。

[0046] 图7B示出了基于从图7A的倾斜角 θ_1 到 θ_2 的衍射峰的强度所生成的示例摇摆曲线725。在图7B中,x轴是倾斜角。y轴是衍射峰的强度,并且强度如由箭头所示增加。在此实例中,因为在持续地旋转薄片的同时获取衍射图,所以每个高强度斑点的总强度呈具有倾斜角差 $\Delta\theta$ 的宽度的条的形式。条721、722、723和724的高度分别与衍射图711、712、713和714中的高强度斑点的总强度相对应。衍射峰的强度从倾斜角 θ_1 到 θ_2 均高于零,并且在其它地方为零。摇摆曲线可以通过使衍射峰的强度与曲线拟合来生成。例如,高强度斑点的总强度可以与高斯曲线拟合 $I(\theta) = I^{Max} e^{-0.5(\frac{\theta-\theta_0}{\sigma})^2}$,其中 I^{Max} 是衍射峰的最大强度, θ_0 是具有 I^{Max} 的最大强度的倾斜角,并且 σ 是高斯曲线的标准偏差。标准偏差 σ 可以通过使衍射峰的强度与高斯曲线拟合来获得。衍射峰在倒易空间中的位置可以基于摇摆曲线来确定。例如,衍射峰在倒易空间中的位置可以基于衍射图中具有最大强度的倾斜角(如图7B中的 θ_0)和具有最大强度的高强度斑点的位置(如图7A的衍射图713中衍射峰的位置)来确定。

[0047] 在610处,结构因子的振幅可以基于摇摆曲线来确定。空间频率 k 下的结构因子的振幅可以通过取对应倾斜角 θ' 下的摇摆曲线的平方根来计算。即, $F(k) = \sqrt{I(\theta')}$,其中 $F(k)$ 是结构因子在倒易空间中的空间频率 k (即,衍射峰的位置)下的振幅,并且 $I(\theta')$ 是摇摆曲线在倾斜角 θ' 下的强度。倾斜角 θ' 可以基于空间频率 k 来计算。注意,对于绝对结构因子确定,需要对摇摆曲线进行适当的积分并且缩放。对于本发明,仅关注与弗里德尔配对相对应的结构因子的相对强度,因此不需要积分和缩放。

[0048] 以此方式,结构因子的振幅可以基于衍射峰的摇摆曲线来确定。摇摆曲线通过拟合衍射倾斜系列中的衍射峰的强度来生成。衍射峰在倒易空间中的位置可以基于衍射图中其对应高强度斑点的位置来确定。衍射峰在特定倾斜角下的强度可以是高强度斑点在倾斜角下的总强度。

[0049] 返回到图3,在308处,获取EM倾斜系列。EM倾斜系列可以包含样品在多个倾斜角下的低剂量和高剂量EM图像两者。例如,在每个倾斜角下,在样品的相同位置处获取低剂量和高剂量EM图像。图8示出了用于获取多个EM图像的示例子例程800。

[0050] 在802处,确定多个EM图像的倾斜角。EM倾斜系列的倾斜角的范围可以与图3的304

处的衍射倾斜系列的倾斜角的范围相同。EM倾斜系列之间的间距,即连续的EM图像之间的倾斜角差,可以不同于衍射倾斜系列。在一个实施例中,用于EM成像的倾斜角的间距可以基于衍射倾斜系列的倾斜角差 $\Delta\theta$ 来确定。倾斜角的间距可以进一步取决于可用成像区域。

[0051] 在804处,可以使薄片样品偏移到新位置并倾斜到在802处确定的倾斜角之一。可以通过操作样品固持器使薄片偏移和倾斜。在一些实施例中,新位置可以是不同薄片上的位置。在一个实施例中,薄片可以围绕与衍射倾斜系列相同的倾斜轴倾斜。在另一个实施例中,薄片可以围绕与衍射倾斜系列不同的倾斜轴倾斜。倾斜轴可以与入射束轴正交。

[0052] 在806处,可以获取样品的低剂量率EM图像。可以使用减小的电流密度来获取低剂量EM图像。例如,低剂量EM图像可以用低于 $0.1 \text{ e}1/\text{埃}^2$ 的电流密度来获取。低剂量EM图像可以用 $0.01 \text{ e}1/\text{埃}^2$ 电流密度来获取。低剂量EM图像包含来自晶格的布拉格反射。

[0053] 在808处,紧接着在获取低剂量EM图像之后,可以在不调整样品位置的情况下获取样品的高剂量EM图像。高剂量EM图像可以使用低剂量EM图像获取的电流密度来获取。例如,用于高剂量EM成像的电流密度可以是 $10\text{-}100 \text{ e}1/\text{埃}^2$ 。通过用高能电子照射薄片样品的区域,成像区域内的分子结构可能被损坏。如此,高剂量EM图像不包含来自晶格的布拉格反射。从高剂量EM图像,可以导出反映成像系统的像差的对比度传递函数(CTF)。图10B示出了低剂量EM图像的傅立叶变换。围绕图10B的中心的索恩环(Thon rings)可能是由如成像系统的散焦、球面像差和像散的像差引起的。由于低剂量,与图10A的衍射图相比,索恩环在EM图像中仅可见性差,其是以与低剂量EM图像相同的倾斜角获取的。因此,计算CTF需要高剂量EM图像。图10A的区域1001中的衍射峰与图10B的区域1002中的高强度信号相对应。

[0054] 在810处,子例程800确定是否获取了在802处确定的所有倾斜角下的EM图像。如果已经对所有倾斜角进行成像,则子例程800结束。否则,获取在另一个位置和倾斜角下的EM图像。

[0055] 在一个实施例中,在相对于入射束持续地倾斜样品的同时获取衍射倾斜系列,并且在样品相对于入射束静止的同时获取多个EM图像中的每个EM图像。如此,每个衍射图与倾斜角的范围相对应,而每个EM图像与离散倾斜角相对应。样品在EM获取期间保持静止,因为在EM获取期间使样品倾斜可能抹掉这些EM图像中的高分辨率信息,并降低经过傅立叶变换的EM图像中的分辨率。

[0056] 返回到图3,在310处,结构因子的相位可以基于在308处获取的EM倾斜系列和衍射图中的衍射峰的强度来确定。图9示出了用于确定结构因子相位的示例子例程900。具体地,倾斜角下的2D结构因子相位可以基于低剂量EM图像的傅里叶变换、从以倾斜角释放的高剂量EM图像导出的CTF以及在倾斜角下的衍射峰的弗里德尔对的强度来求解。然后将多个倾斜角下的2D结构因子相位重构成结构因子相位的3D数据集。

[0057] 在902处,可以将步骤308的以选定倾斜角获取的高剂量和低剂量EM图像加载到存储器中。选定角可以是在图8的802处确定的倾斜角之一。

[0058] 在904处,CTF可以从高剂量EM图像导出。在一个实施例中,可以基于高剂量EM图像的傅立叶变换来导出CTF。可以进一步基于倾斜角调整CTF,以解决跨倾斜样品(如薄片)中的成像区域的非均匀焦点。

[0059] 在906处,可以基于低剂量EM图像的傅立叶变换、在904处导出的CTF以及选定倾斜角下的衍射峰的弗里德尔对的强度来计算选定倾斜角下的结构因子相位(即,2D结构相

位)。

[0060] 例如,低剂量EM图像的单个傅立叶分量可以表示为:

$$I_{\theta}(x) =$$

[0061] $(-F(k) + F(-k)) \cos \gamma(k) \sin(kx + \alpha_k) -$, 等式1

$$(F(k) + F(-k)) \sin \gamma(k) \cos(kx + \alpha_k)$$

[0062] 其中 $I_{\theta}(x)$ 是以倾斜角 θ 获取的, x 是在实空间中的位置、 k 是在倒易空间中的空间频率, $F(k)$ 和 $F(-k)$ 是结构因子的弗里德尔对的振幅, $\gamma(k)$ 是在90°处导出的CTF,并且 α_k 是空间频率 k 下的结构因子的相位。 $F(k)$ 和 $F(-k)$ 与衍射图中的衍射峰的弗里德尔对的强度的平方根成比例。如图2B中所示,衍射图中的衍射峰的弗里德尔对的强度可能是不同的,因为反射与埃瓦尔德球之间的距离相对于原点不是中心对称的。因此,结构因子、 $F(k)$ 和 $F(-k)$ 的弗里德尔对的振幅可能是不同的。在一个实施例中,在任何给定空间频率下的结构因子的振幅可以基于衍射峰的摇摆曲线来获得。例如,如图7B中所示,结构因子 $F(k')$ 的振幅可以是摇摆曲线 $I(\theta')$ 的平方根。在另一个实施例中,在不生成摇摆曲线的情况下, $F(k')$ 可以从衍射图中的衍射峰的强度中直接获得。例如,在图7B中,可以将 $F(k')$ 设定为强度731的平方根。在另一个实例中,如果衍射图和EM图像是以相同的离散角 θ' 拍摄的,则可以将结构因子的振幅设定为衍射图中的衍射峰强度的平方根。

[0063] 等式1可以被进一步简化:

$$I_{\theta}(x) = a(k) \sin(Kx + \alpha_k) + b(k) \cos(Kx + \alpha_k) = R(k) \sin(Kx + \alpha_k +$$

[0064]

$$\beta(k) = R(k) \cos(Kx + \alpha_k + \beta(k) + \pi/2)$$

[0065] 等式2

[0066] 其中 $a(k) = (-F(k) + F(-k)) \cos \gamma(k)$, $b(k) = -(F(k) + F(-k)) \sin \gamma(k)$,

[0067] $\beta(k) = \frac{b(k)}{a(k)} = \arctan \left[\frac{-F(k) + F(-k)}{-F(k) + F(-k)} \cdot \frac{\sin \gamma(k)}{\cos \gamma(k)} \right]$, 和 $R = \sqrt{a(k)^2 + b(k)^2}$ 。如此,结构因子在倾斜角 α_k

θ 下的相位可以基于低剂量EM图像 $I_{\theta}(x)$ 的傅立叶变换、结构因子的弗里德尔对的强度和CTF来求解。结构因子的弗里德尔对(或衍射峰的弗里德尔对)的强度差异引起 $\beta(k) + \pi/2$ 额外相移。当弗里德尔对的强度相等时,即 $F(k') = F(-k')$, $\beta(k') = -\pi/2$,不存在额外相移。

[0068] 在908处,在2D结构因子相位中确定相位原点。具体地,将2D结构因子相位调整到坐标系在实空间中的公共原点,使得可以合并具有不同倾斜角的2D结构因子相位,以获得结构因子的3D相位。在一个实施例中,相位原点可以通过要求倾斜轴上的2D结构因子相位具有相同相位来确定。例如,如果通过绕实空间中的 y 轴使样品倾斜来获取EM图像,则可以调整2D结构因子相位,使得沿着倒易空间的 k_y 轴的反射的相位是相同的。

[0069] 在910处,子例程900检查是否处理了所有EM图像。换句话说,子例程900检查是否处理了用于EM成像的所有倾斜角。如果答案为否,则在912处选择另一个倾斜角,并且计算结构因子在选定倾斜角下的相位。否则,如果处理了所有EM图像,则可以在914处基于不同角度下的2D结构因子来构建结构因子的3D相位。构建结构因子相位可以包含基于相对于晶体

轴的倾斜角合并2D结构因子相位。

[0070] 返回到图3,在312处,可以基于在306处确定的结构因子的振幅和在310处确定的结构因子的相位来重构分子结构。分子结构可以包含晶体在实空间中的原子坐标。在一个实例中,分子结构可以基于3D结构因子振幅和3D结构因子相位的傅立叶逆变换来确定。在一些实施例中,分子结构可以基于所获取的衍射倾斜系列进一步精细化。例如,分子结构中的原子位置可以被微调以最小化经过计算的衍射图与所观察到的衍射图之间的差异。经过计算的衍射可以通过傅里叶变换求解的分子结构以及来自衍射倾斜系列的所观察到的衍射图来确定。

[0071] 在一些实施例中,EM倾斜系列可以在获取衍射倾斜系列之前获取。在一些实施例中,衍射倾斜系列或EM倾斜系列中的倾斜角范围可以基于晶体的已知对称性而减小。例如,可以获取覆盖第一倾斜角范围的第一衍射倾斜系列。可以基于第一衍射倾斜系列和晶体的已知对称性来构建覆盖大于第一倾斜角范围的第二倾斜角范围的第二衍射倾斜系列。

[0072] 以此方式,3D晶体的分子结构可以基于衍射倾斜系列和EM倾斜系列来求解。衍射倾斜系列可以包含以第一倾斜角范围获取的衍射图,并且EM倾斜系列可以包含以第二倾斜角范围获取的低剂量和高剂量EM图像。3D结构因子振幅可以基于摇摆曲线在倾斜角之上的积分来确定。3D结构因子相位可以基于EM倾斜系列和3D结构因子振幅来求解。分子结构可以基于结构因子的振幅和相位来获得。

[0073] 获取衍射图的技术效果是获得结构因子的振幅。基于多个衍射图中的衍射峰的强度来确定结构因子的振幅的技术效果是捕获衍射峰的总强度。基于衍射图中的衍射峰的弗里德尔对的强度来确定2D结构因子的相位的技术效果是,可以考虑由于弗里德尔对的强度不相等引起的额外相移。以每个倾斜角获取高剂量EM图像和低剂量EM图像的技术效果是,可以基于高剂量EM图像来确定与低剂量EM图像相对应的CTF。

[0074] 在一个实施例中,一种用于确定样品的分子结构的方法,其包含:在倾斜角范围内使所述样品倾斜的同时获取所述样品的多个衍射图;基于所述多个衍射图中的衍射峰的强度来确定结构因子的振幅;获取所述样品的电子显微镜(EM)图像;基于所述EM图像和所述多个衍射图中的所述衍射峰的所述强度来确定所述结构因子的相位;并且基于所述结构因子的所述振幅和所述结构因子的所述相位来确定所述样品的所述分子结构。在所述方法的第一实例中,在获取所述EM图像之后,以比用于获取所述EM图像的电密度更高的电密度来获取所述样品的第二EM图像,并且进一步基于所述第二EM图像来确定所述结构因子的所述相位。所述方法的第二实例任选地包含所述第一实例,并且进一步包含基于所述第二EM图像确定对比度传递函数(CTF),并且基于所述第二EM图像确定所述结构因子的所述相位包含基于所述CTF确定所述结构因子的所述相位。所述方法的第三实例任选地包含所述第一实例和所述第二实例中的一个或多个,并且进一步包含:其中获取所述EM图像包含在倾斜角范围内以一定倾斜角获取所述EM图像,并且基于所述EM图像和所述多个衍射图中的所述衍射峰的所述强度来确定所述结构因子的所述相位包含基于所述EM图像和所述衍射峰在所述倾斜角下的强度来确定所述结构因子在所述倾斜角下的所述相位。所述方法的第四实例任选地包含所述第一实例到所述第三实例中的一个或多个,并且进一步包含其中所述结构因子在所述倾斜角下的所述相位基于所述衍射峰的弗里德尔配对的强度进一步确定。所述方法的第五实例任选地包含所述第一实例到所述第四实例中的一个或多个,并且

进一步包含其中所述衍射峰的所述强度和所述衍射峰的所述弗里德尔配对的所述强度是不同的。所述方法的第六实例任选地包含所述第一实例到所述第五实例中的一个或多个,并且进一步包含:其中基于所述衍射峰的强度来确定所述结构因子的所述振幅包含通过取所述衍射峰在所述倾斜角下的强度的平方根来计算所述结构因子在特定倾斜角下的所述振幅。所述方法的第七实例任选地包含所述第一实例到所述第六实例中的一个或多个,并且进一步包含:其中基于所述衍射峰的强度来确定所述结构因子的所述振幅包含使所述衍射峰的所述强度与曲线拟合,以及通过取所述曲线在所述倾斜角下的强度的平方根来计算所述结构因子在特定倾斜角下的所述振幅。所述方法的第八实例任选地包含所述第一实例到所述第七实例中的一个或多个,并且进一步包含通过对所述多个衍射图进行阈值化来标识所述衍射峰。所述方法的第九实例任选地包含所述第一实例到所述第八实例中的一个或多个,并且进一步包含其中所述多个衍射图中的所述衍射峰的强度非零。所述方法的第十实例任选地包含所述第一实例到所述第九实例中的一个或多个,并且进一步包含其中所述样品是薄片。

[0075] 在另一个实施例中,一种非暂时性计算机可读介质,其包括指令,所述指令当执行时使处理器执行以下:在倾斜角范围内使样品倾斜的同时获取所述样品的多个衍射图;基于所述多个衍射图中的每个衍射峰的强度来确定结构因子的振幅;以多个倾斜角获取所述样品的多个电子显微镜(EM)图像;基于所述多个EM图像和衍射峰的所述强度来确定所述结构因子的相位;并且基于所述结构因子的所述振幅和所述结构因子的所述相位来确定所述样品的分子结构。在第一实例中,其中基于所述多个EM图像和所述衍射峰的所述强度来确定所述结构因子的相位包含基于所述多个EM图像和所述衍射峰的弗里德尔对的所述强度来确定所述结构因子的相位。所述非暂时性计算机可读介质的第二实例任选地包含所述第一实例,并且进一步包含其中基于所述多个EM图像和所述衍射峰的所述强度确定所述结构因子的相位包含:基于所述衍射峰的所述强度确定所述结构因子的弗里德尔对的强度,并且基于所述多个EM图像和所述结构因子的弗里德尔对的所述强度来确定所述结构因子的相位。所述非暂时性计算机可读介质的第三实例任选地包含所述第一实例和所述第二实例中的一个或多个,并且进一步包含:指令,所述指令当执行时使所述处理器在所述样品的第一位置处获取多个衍射图,并且在所述样品的第二位置处获取多个EM图像。

[0076] 在又一个实施例中,一种用于确定样品的分子结构的系统,其包含:电子源,所述电子源用于生成电子束;样品固持器,所述样品固持器用于使所述样品相对于所述电子束倾斜;第一检测器,所述第一检测器用于获取所述样品的衍射图;第二检测器,所述第二检测器用于获取所述样品的电子显微镜(EM)图像;控制器,所述控制器具有存储在非暂时性介质中的计算机可读指令,所述控制器被配置成:通过所述样品固持器在倾斜角范围内倾斜所述样品;在所述样品倾斜时,将所述电子束朝着所述样品的第一位置引导,并且通过所述第一检测器获取所述样品的多个电子衍射图;基于所述多个衍射图中的衍射峰的强度来确定结构因子的振幅;将所述电子束引导到所述样品的第二位置,并且通过所述第二检测器获取所述样品的低剂量EM图像;基于所述低剂量EM图像和所述衍射峰的所述强度来确定所述结构因子的相位;并且基于所述结构因子的所述振幅和所述结构因子的所述相位来确定所述样品的所述分子结构。在所述系统的第一实例中,所述控制器被进一步配置成:在将所述电子束引导到所述样品的所述第二位置并获取所述低剂量EM图像之前,以第一倾斜

角定位所述样品;在获取所述低剂量EM图像之后,在所述样品的所述第二位置处获取高剂量EM图像;并且其中基于所述低剂量EM图像和所述衍射峰的所述强度来确定所述结构因子的所述相位包含:基于所述低剂量EM图像、所述衍射峰的所述强度和所述高剂量EM图像来确定所述结构因子在所述第一倾斜角下的所述相位。所述系统的第二实例任选地包含所述第一实例,并且进一步包含其中所述控制器被进一步配置成沿着两个正交轴倾斜所述样品,并且获取所述多个衍射图包含:在沿着所述两个正交轴中的一个正交轴倾斜所述样品的同时获取第一组衍射图,以及在沿着所述两个正交轴中的另一个正交轴倾斜所述样品的同时获取第二组衍射图。所述系统的第三实例任选地包含所述第一实例和所述第二实例中的一个或多个,并且进一步包含其中所述控制器被进一步配置成:在获取所述高剂量EM图像之后,以第二倾斜角定位所述样品;将所述电子束引导到以所述第二倾斜角定位的所述样品的第三位置,并且顺序地获取所述样品的第二低剂量EM图像和第二高剂量EM图像;基于所述第二低剂量EM图像、所述第二高剂量EM图像和所述衍射峰的所述强度来确定所述结构因子在所述第二倾斜角下的所述相位;并且其中基于所述结构因子的所述振幅和所述结构因子的所述相位确定所述分子结构包含:基于所述结构因子的所述振幅、所述结构因子在所述第一倾斜角下的所述相位和所述结构因子在所述第二倾斜角下的所述相位来确定所述分子结构。所述系统的第四实例任选地包含所述第一实例和所述第三实例中的一个或多个,并且进一步包含其中所述控制器被配置成在通过所述样品固持器持续地倾斜所述样品的同时获取所述多个衍射图。

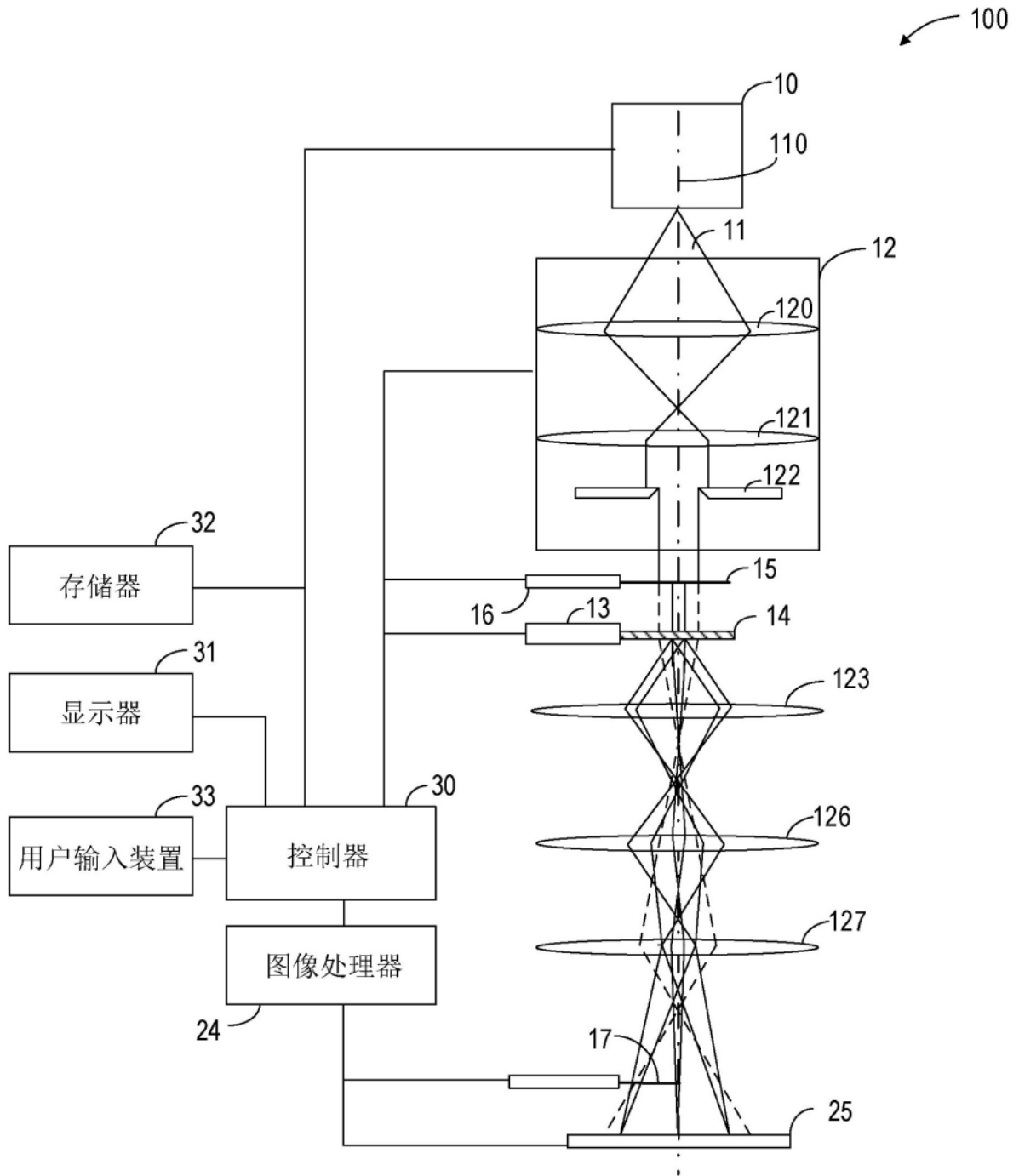


图 1

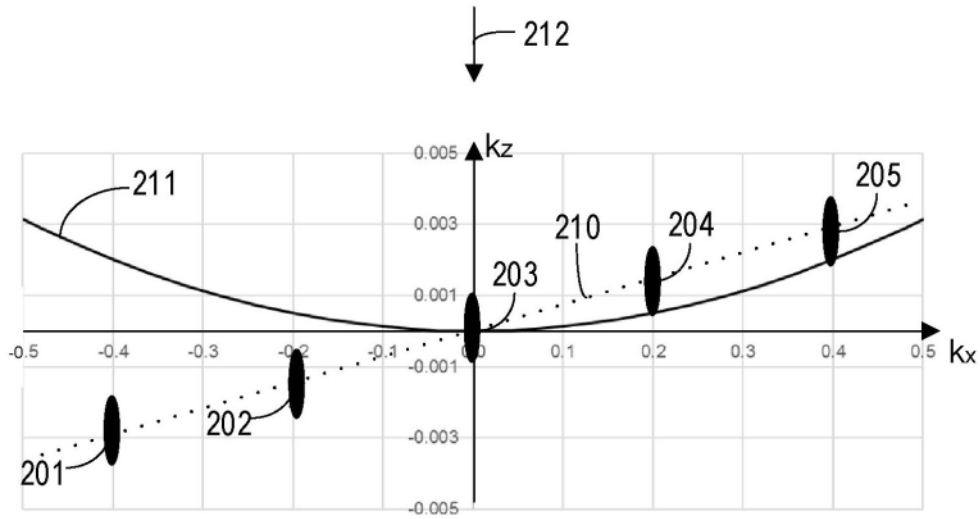


图 2A

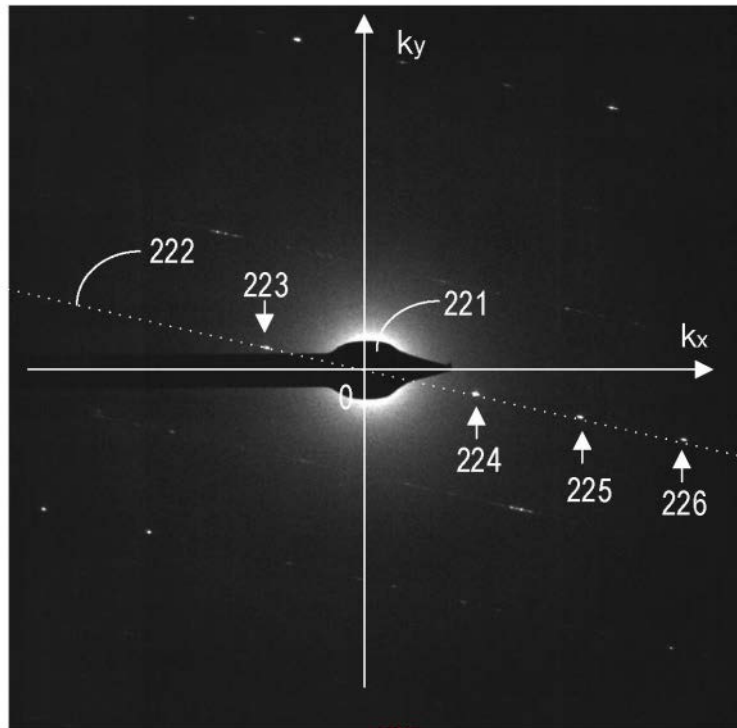


图 2B

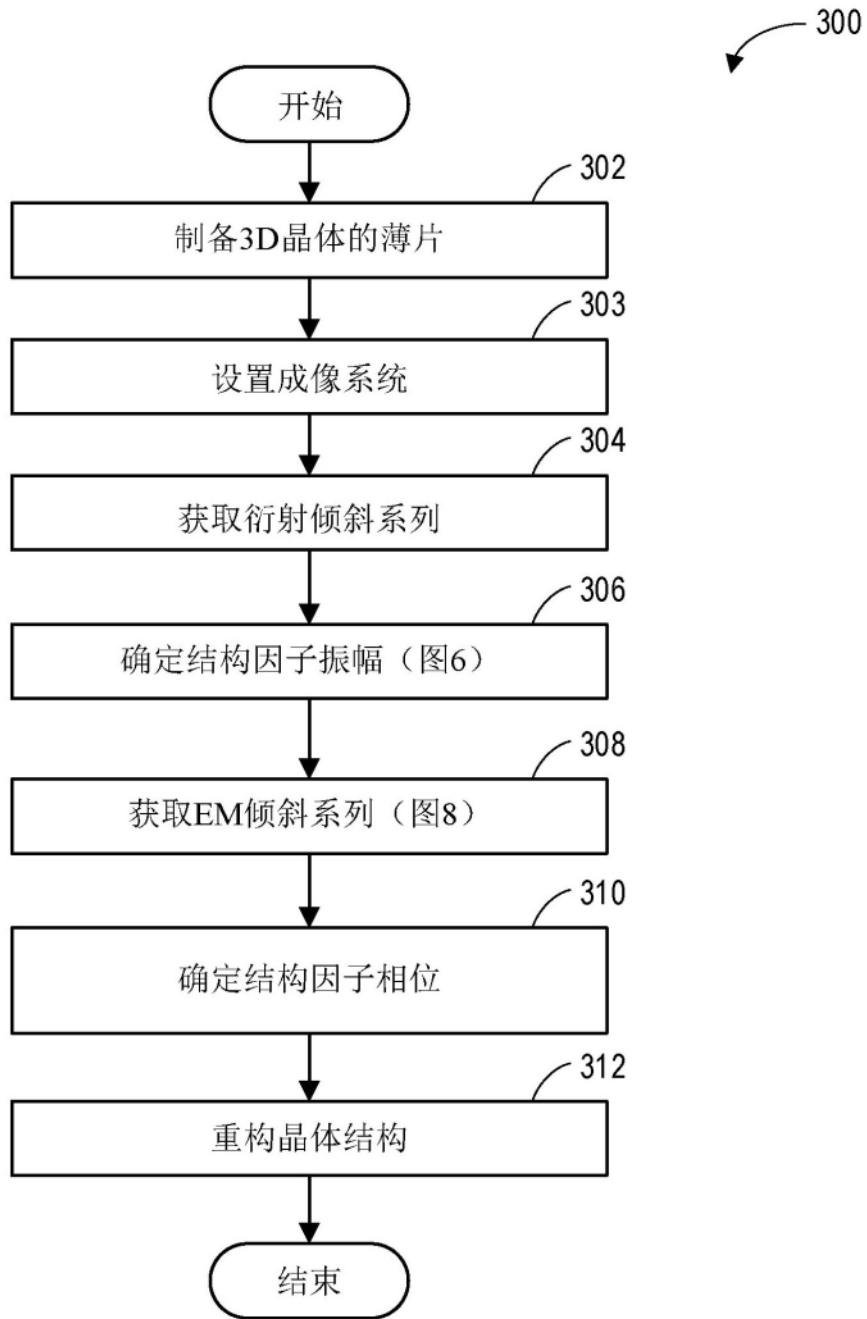


图 3

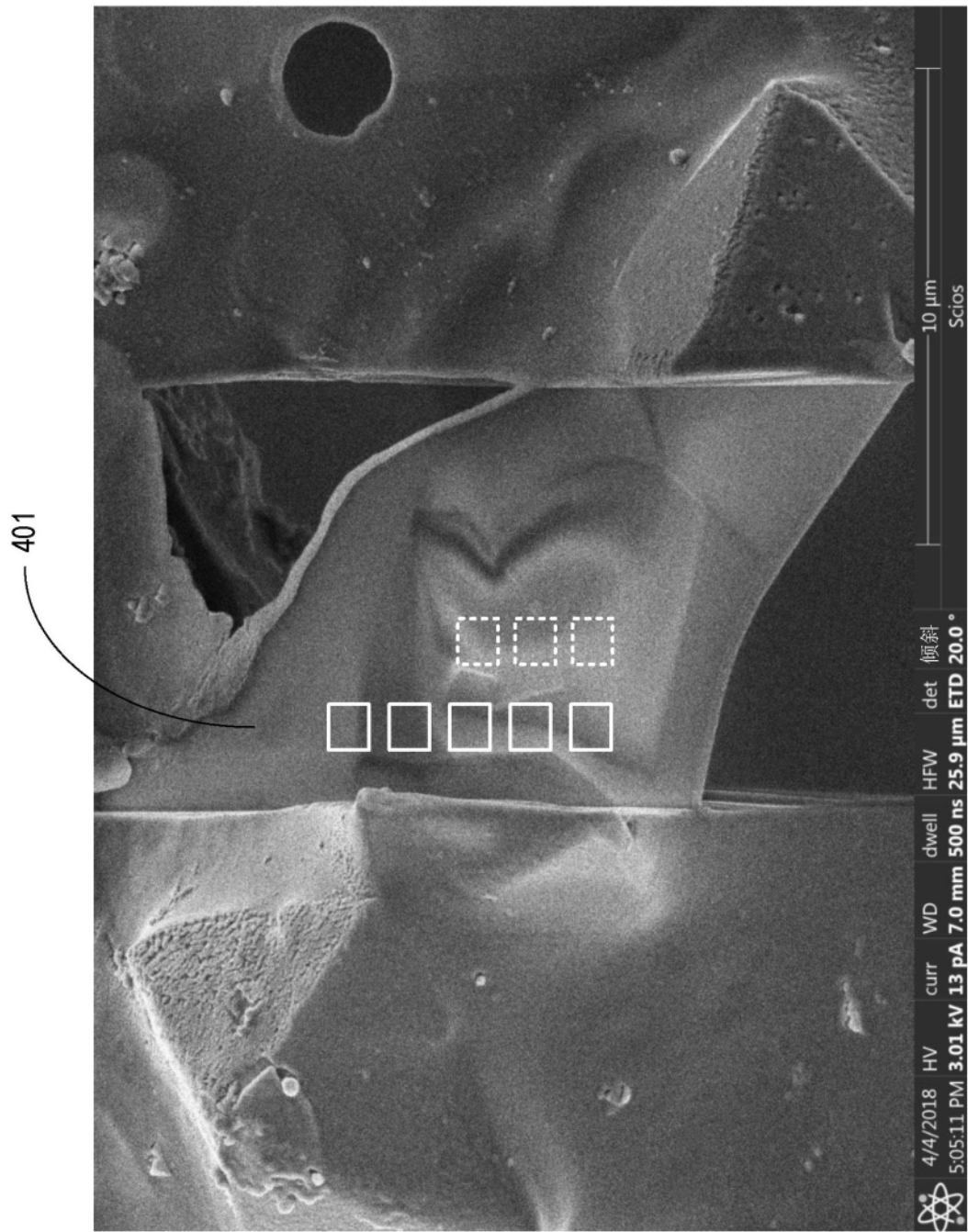


图 4

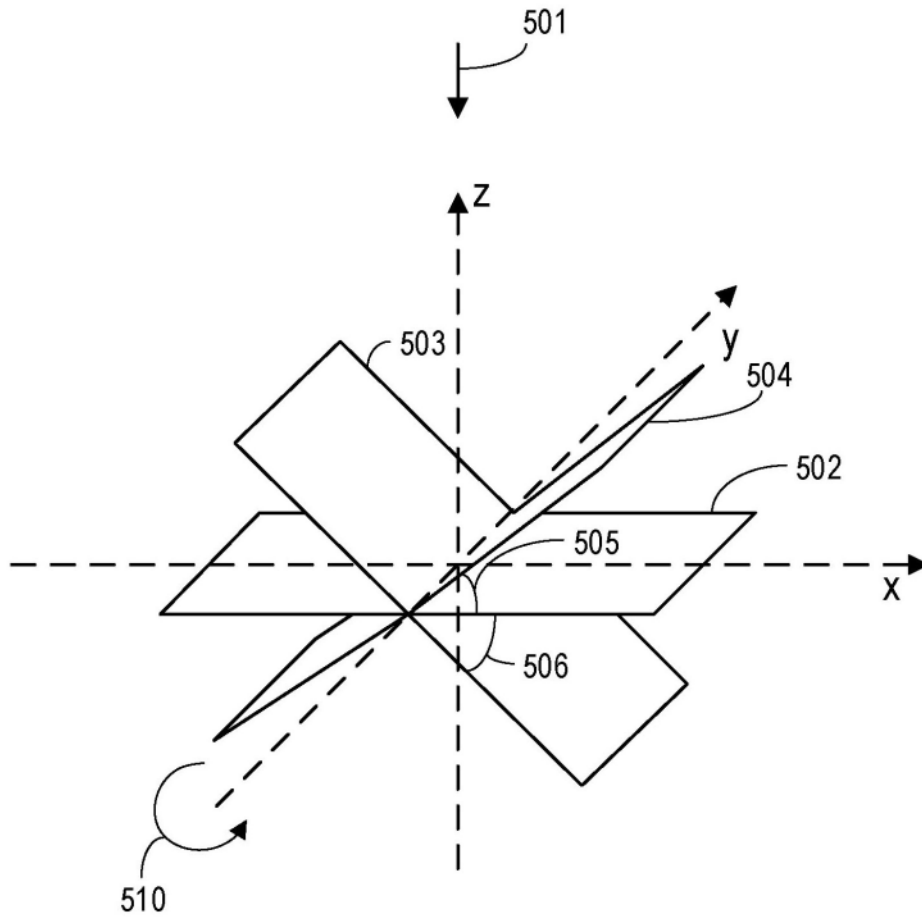


图 5

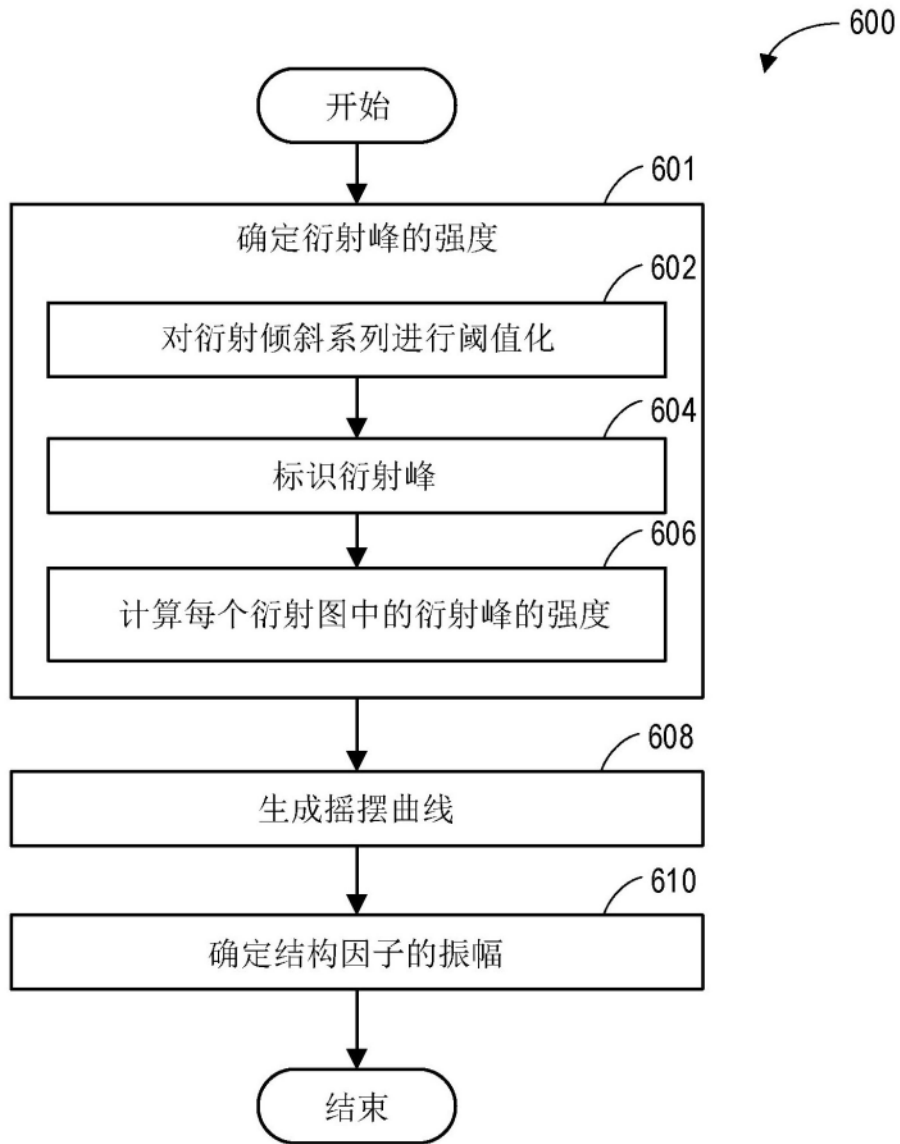


图 6

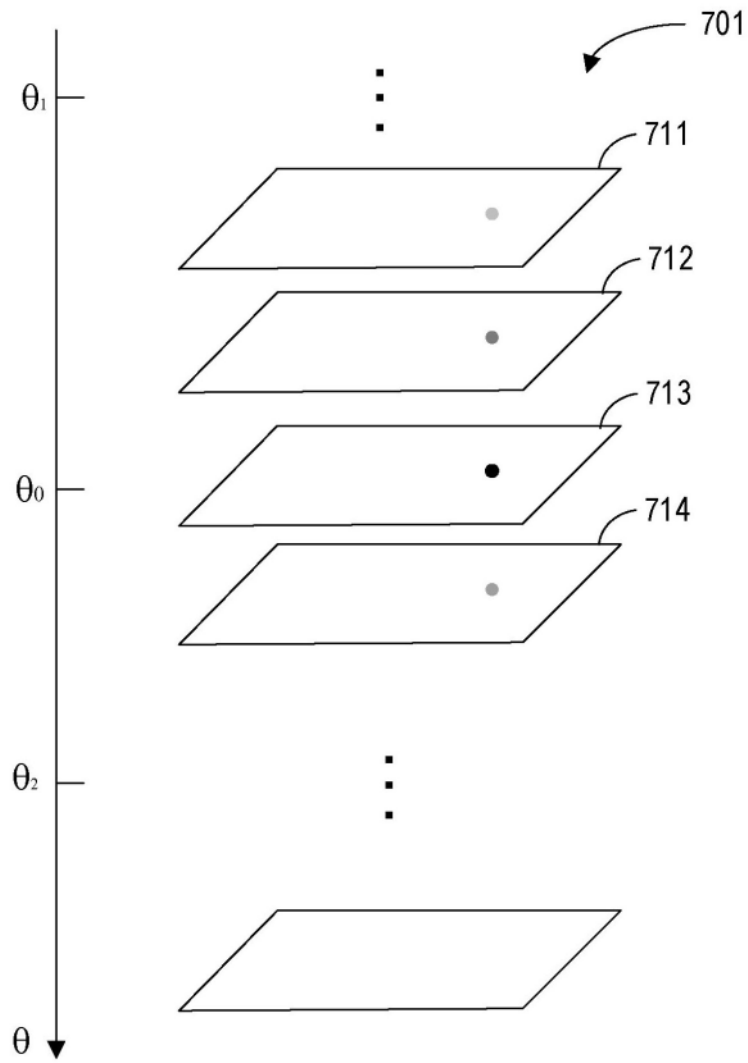


图 7A

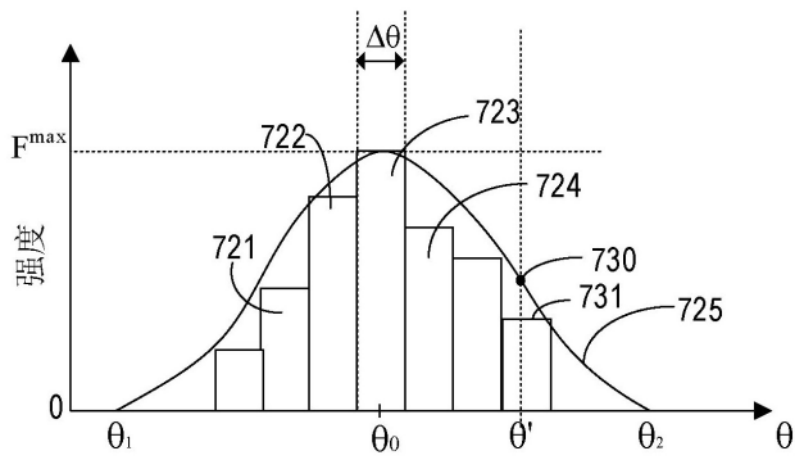


图 7B

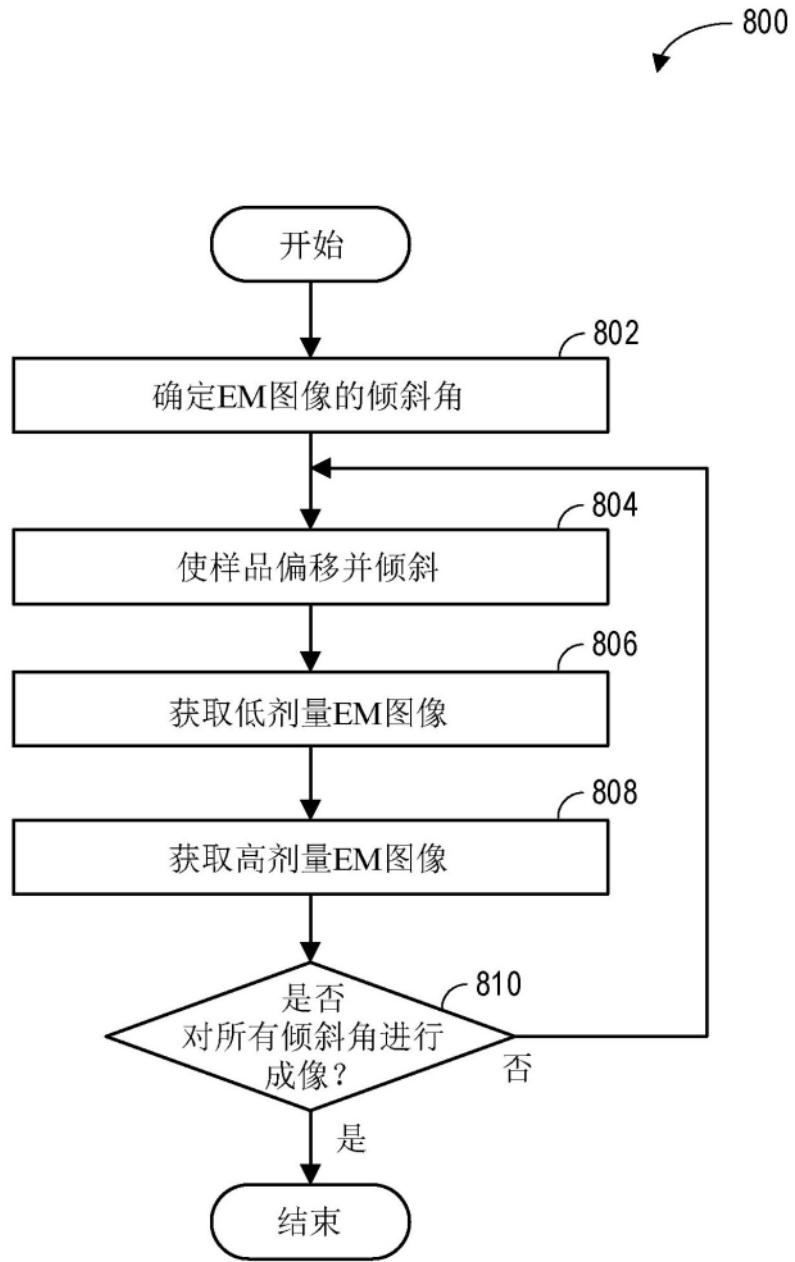


图 8

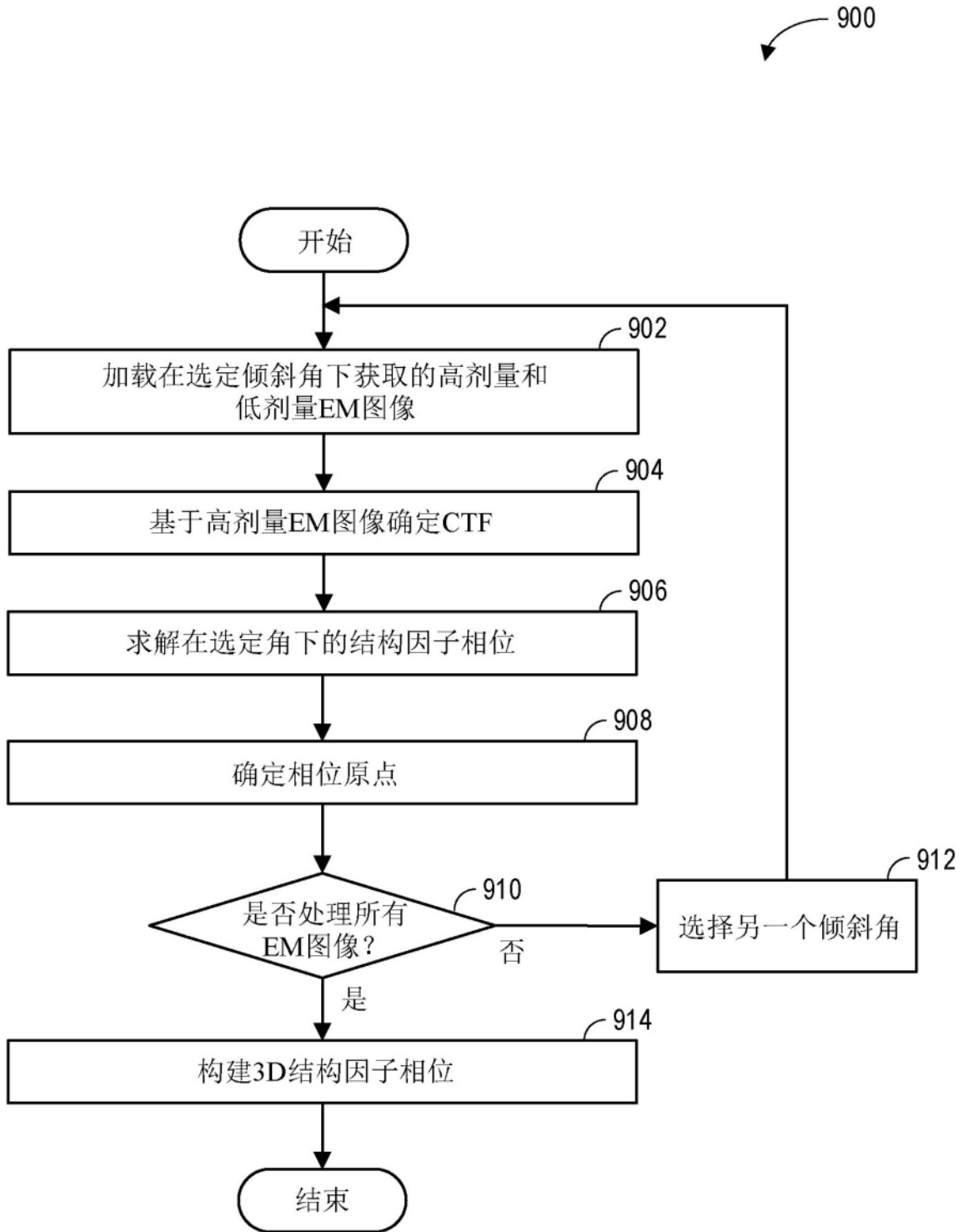


图 9

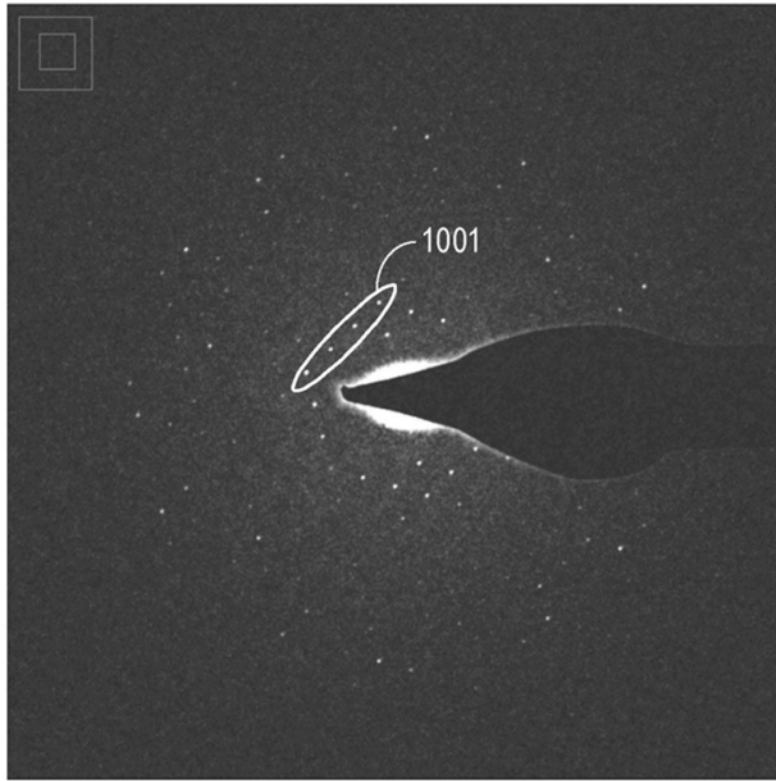


图 10A

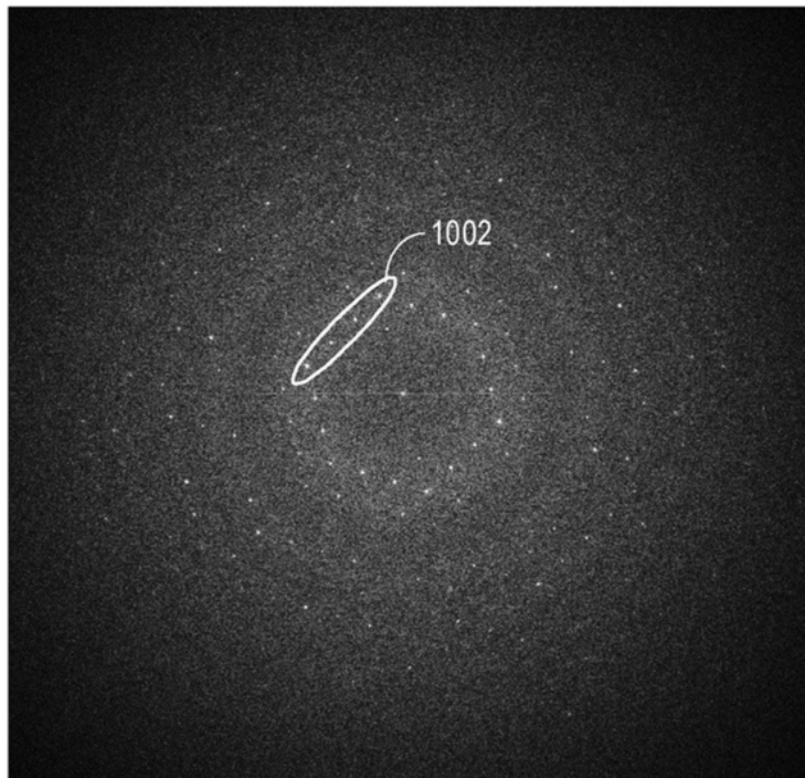


图 10B