

KEK クライオ電子顕微鏡 (Titan Krios G4, Falcon 4i)

外部向け初期トレーニング・テキスト

本テキストは、以下の先生方のご協力のもと作成いたしました。心より感謝申し上げます。(*敬称略)

Talos: 青山一弘 [FEI/阪大]、八木橋陽 [FEI]、Robert Stickler [FEI]、千田俊哉 [KEK]、川崎政人 [KEK]、湯本史明 [KEK]、Christoph Gerle [阪大]、岩崎憲治 [筑波大]、杉田征彦 [阪大]、横山武司 [理研]、内窪友美 [理研]、Arjen J. Jakobi [TU Delft]、Radostin Danev [東大]、包明久 [東大]、滝沢由政 [東大]、重松秀樹 [理研]、広瀬恵子 [産総研]、守屋俊夫 [KEK]、小祝孝太郎 [KEK]、吉川雅英 [東大]、柳澤春明 [東大]、西澤知宏 [東大]、荒牧慎二 [TVIPS]、真柳浩太 [九大]、村田和義 [生理研]、宮崎直幸 [筑波大]、久保田孝幸 [KEK]、山田悠介 [KEK]、山下恵太郎 [東大]、中根崇智 [阪大]、池田聡人 [KEK]、稲葉理美 [KEK]

Titan: 青山一弘 [FEI/阪大]、Robert Stickler [FEI]、川崎政人 [KEK]、久保田孝幸 [KEK]、稲葉理美 [KEK]、池田聡人 [KEK]、関口雄介 [シオノギ]、田辺幹雄 [KEK]、藤田 雅也 [KEK]、Radostin Danev [東大]

*I-III 章は外部ユーザー向けの内容、IV-V 章は KEK スタッフ向けの内容となっています。

目次

I. オートグリッドの作製と電顕への導入

- | | |
|--|------|
| 1. 器具の冷却など | p.03 |
| 2. クライオグリッドの作製 | p.05 |
| 3. オートグリッドの作製 | p.06 |
| 4. オートグリッドを Cassette・NanoCab 経由で電顕へ入れる | p.07 |

II. 自動データ測定

- | | |
|---------------------------------------|------|
| 1. Inventory | p.08 |
| 2. EPU による自動測定 (EC mode x 3 通り) | p.09 |
| 3. トラブルシューティング | p.13 |

III. 後片付け

p.14

IV. 自動測定をする前に必要な準備

1. およそのアラインメント (毎日)	p.15
2. C2 絞りの中心合わせ (毎日)	p.16
3. ピボットポイントの調整 (毎日)	p.17
4. Rotation Center (毎日)	p.17
5. 位相板への焦点合わせ (毎日)	p.18
6. 対物絞りの中心合わせ (毎日)	p.19
7. Energy Filter 関連 (毎日)	p.20
8. AutoCTF (毎日)	p.21
9. EPU における dose, fraction の設定 (毎日)	p.22
10. Gain reference (必要に応じて)	p.23
11. EPU の倍率間の中心合わせ (毎日)	p.24

V. その他

1. EPU の Preparation の設定	p.25
2. グリッドのアセトン処理 (必要に応じて)	p.27
3. グリッド作製の液体窒素の補充 (必要に応じて)	p.27
4. 電顕用の 250L 液体窒素タンクの交換 (2 週間に 1 回くらい)	p.27
5. Autoloader の Conditioning (2 週間に 1 回くらい)	p.27
6. 長期休暇時の対応	p.28
7. 電顕のシャットダウンと立ち上げ (計画停電の前や故障時)	p.30
8. Titan Krios のレンズ/絞りの構成	p.34

変更履歴

日本語第 01 版	22.12.25. 安達 成彦	初版
日本語第 02 版	23.02.01. 安達 成彦	英語版の作成に合わせて様々な箇所を改訂。
日本語第 03 版	23.02.03. 安達 成彦	タイプなどの修正。

I. オートグリッドの作製と電顕への導入

グリッド作製における全般的な注意点

*Grid に触れる全てのものが、すでに冷えた状態であるように気をつける。器具から出る泡が激しく沸騰した状態から小さい泡が出る状態になるまで待ってから使う。

*一度液体窒素で冷やしたものを外に出すと霜がつくが、それを再度液体窒素に入れると、霜がグリッドに付いて良くない。なので、液体窒素の外に出さないか、新しいものを使うこと

1. 器具の冷却など

1L ポット x 4 に液体窒素を注ぐ。注ぎ口をアルミ箔でフタをする。

・ Vitrobot の立ち上げ

Humidifier をはめる (**正しくはめないとステージとぶつかって故障します**)

下からシリンジで MQ 50mL を入れる (最後に少し引く)

Vitrobot の電源を入れる (スイッチは装置の背面の右手下)

タッチパネルで 18℃ (or 希望の温度), 100%, humidifier ON に設定

Use Footpedal, Humidifier off, Skip grid transfer にチェックを入れる

2 回くらい踏んで、白いフタを閉じる

ろ紙を 1 枚ずつ、左右にセット (手袋着用。切り口の曲がり方が外側を向くように)

(ろ紙を入れて 1 時間たったら新しいものに取り替える)

・ Vitrobot 用の発泡スチロール容器の組み立てと冷却

組み立てて、500mL プラスチックビーカーでフタをする

周辺の堀とエタンカップ (金色) に液体窒素を注ぐ (2-3 回繰り返す、10 分以上待つ)

気体エタンを液体エタンにする。できるだけ、カップのフチぎりぎりまで作る。

注意：液体エタンは大変危険です。必ず防護メガネ・手袋を着用すること。もし目に入ると失明します。また、直接容器を持つと危ないのでフタに乗せて運びましょう。

スパイダーを外す (そのままにすると、凍ってスパイダーが取れなくなります)

エタンカップの内壁が白くなるくらいまで待つ

注意：液体エタンの温度は-89℃から-183℃まで幅があります。よいグリッドを作るには-160℃以下に急速凍結してガラス状に凍結する必要があるため、固化するぎりぎりを使うのが良いです。冷やしすぎて固化したらピンセットのお尻で溶かします。

CryoGrid Box (水色) を入れて、完全に冷えるまで数分待つ

・ Loading station の組み立てと冷却

- 組み立てる (500mL プラスチックビーカーで液体窒素の注ぎ口にフタをする)



- AutoGrid clipping tool (鉄)と AutoGrid container (白)を入れる



- 注ぎ口から液体窒素を注ぐ (霜の混入を防ぐため、注ぎ口にキムワイプを詰めておく)
- これを 2-3 回繰り返す
- 液体窒素が減らなくなってから、さらに 10 分以上待つ

(*この容器は液体窒素の減りが早いので、以降、こまめに液体窒素を継ぎ足しましょう)

・ NanoCab の冷却

- NanoCab に液体窒素を注ぐ



- 少し待つと半分くらいに減るので、再び液体窒素を入れる
- これを何回か繰り返す
- 液体窒素が減らなくなってから、さらに 10 分以上待つ

・ PIB-10 の空運転

- 朝一番で、PIB-10 を一度、空運転しておく

2. クライオグリッドの作製

- グリッドはあらかじめアセトンに一晩浸けた後、風乾させておく
- アセトン処理済みのグリッドを必要枚数だけ、先細ピンセットで取り出す
- スライドガラスの上に、グリッドの裏面(ピカピカしたほう)を上にして並べる
- PIB-10 で親水化 (Hard, 1.5min → Start ボタンを押す)
- PIB-10 から取り出して、グリッドをひっくり返して、再度親水化 (Hard, 1.5min)
- Vitrobot の設定 (Blotting time を 15-20 秒に。もしくは 5 秒で blot force=15 など)

□Footpedal を何回か踏んで、ピンセットホルダーを下げる

- Vitrobot 用ピンセットでグリッドをつまんで黒い留め具で固定(振って落ちないか確認)



- ピンセットを Vitrobot にセット (*カーボン面(表面)が利き手側を向くように)
- Footpedal を 3 回踏んで、ピンセットを上を移動させる

- 発泡スチロール容器に十分量の液体窒素を注ぎ、Vitrobot のステージに置く
- Footpedal を 1 回踏んで、発泡スチロール容器を上を移動させる
- Footpedal を 1 回踏んで、ピンセットを下げる
- サンプルを 3uL スポット (*泡を作らない。少しチップに溶液が残ってもあきらめる)
- Footpedal を踏むと、グリッドが Blotting されて液体エタンにじゃぼんと浸かる
- ピンセットと発泡スチロール容器が下がってくる
- 霧が晴れるまで 20 秒くらい待つ (待っている間に液体窒素を注ぎ足す)
- 親指の腹で押すような感じでピンセットを外し、発泡スチロール容器ごと手元に移動
- グリッドはエタンの中に浸したまま、
ピンセットの黒い留め具の下を持ち、黒い留め具を少しずつ上にずらす
- グリッドをエタンから液体窒素へ移動
- グリッドを CryoGrid Box (水)に収納 (どの番号に何を入れたか記録しておく)
- 発泡スチロール容器に十分量の液体窒素を注ぐ
(#以降の操作を、サンプル数だけ繰り返します)

3. オートグリッドの作製

- Loading station に、再度、十分量の液体窒素を注ぐ
- CryoGrid Box (水色)のフタをシャーペン型治具にはめる
- 液体窒素にフタを入れて冷やし、激しい沸騰が終わるまで待つ
- CryoGrid Box (水色)にフタをして、Loading station に移す

注意：**フタを扱う操作は静電気に注意。操作前にサンダルを脱いでアースする。**

- CryoGrid Box (水)のフタを外す

- C-clip insertion tool (白いシャーペンのような治具) に C-clip をはめる

注意：ゆがんだ C-clip を使うと電顕内で外れるので、**ゆがんだものは捨ててください！**



- C-clip ring を Loading station に入れて冷やす



- 先細ピンセットを 30 秒くらい冷やす
- C-clip ring を AutoGrid alignment tool (鉄)の中央に置く
- グリッドを C-clip ring にはまるように置く
- C-clip をはめた C-clip insertion tool を液体窒素に入れ、激しい沸騰が終わるまで待つ
- C-clip をカチャンとはめる (この状態がオートグリッド)
- **AutoGrid alignment tool の土手から落とすなどして、正しくはまったことを確認**

注意：オートグリッドがきちんと組み立てられていないと、電顕内部でロボットアームがグリッドを掴み損ねて落ちたり、破片が落ちたりします。もしそうになると、Autoloader 内で落ちた場合は修理に数日、鏡筒内で落ちた場合は修理に 1-2 週間かかるので、共同利用の運営に大きな支障が出ます。オートグリッドがきちんとできていることを、必ず確認して下さい!!! 必要に応じて拡大鏡を使うと良いです。

- AutoGrid container (白)に収納 (どの番号に何を入れたか記録しておく)

4. オートグリッドを Cassette・NanoCab 経由で電顕へ入れる

- NanoCab に液体窒素を注ぎ足す
- 電顕の前に行って NanoCab をセットし、タッチパネルの **Undock** ボタンを押す
- Loading station に NanoCab をセット
- Cassette を NanoCab から Loading station に移動（把手の横のボタンを押すと掴む）



- AutoGrid tweezers（先が十字型のピンセット）を 1 分以上、冷やす



- AutoGrid tweezers で、オートグリッドを Cassette に移す（番号を記録しておく）
（*この時、C-clip ring が下(=普通に操作すると手前)になるように入れる）
- AutoGrid tweezers を縦にして軽く押し、
全てのグリッドがきちんとはまっていることを必ず確認する**

- Cassette を NanoCab に戻す（把手の横のボタンを押すと掴む）

注意：Cassette がコテから外れにくいのですが、NanoCab に入れたらボタンを離して、下側に押し当てるように、手首を返すようにコテを動かすと、Cassette が NanoCab に残ります。ここで、**あまり無理にガチャガチャやると、オートグリッドがばらけてしまうので注意が必要**です。

- NanoCab を Loading station から外す
- NanoCab に液体窒素を注ぎ足す
- NanoCab のピンが上がっていることを確認（上がってなければ指でつまみあげる）
- 電顕の前に行って NanoCab をセットし、タッチパネルの Dock ボタンを押す
（NanoCab がうまく認識されない場合、ピンを少し回すと認識されることがありますが、回しすぎるとピンが外れることがあるので注意！）

II. 自動データ測定

*IV 章に示した事前準備が一通り終わっているならば、II 章の操作を行えば OK です。

*TEM User Interface は version 3.13.1、EPU は version 3.1.0.4506REL となっています。

1. Inventory

(*中央の画面の TEM User Interface (=TUI) を使います)

・ TUI>Autoloader tab>Temperature Control

NanoCab の Dock が終了したら、

温度表示が全て緑になるまで待ち、さらに、全てが -160°C 以下になるまで待つ (数分)

・ TUI>Autoloader tab >Autoloader>Option

Inventory ボタンを押す

入れたグリッドが全て正しく認識されたら OK

(正しく認識されなければ、もう一度 Inventory。それでダメなら FEI に電話します)

入れた Grid+2 までチェックが終わったら Stop Inventory ボタンを押して停止

***1. KEK では Falcon4i で測定したデータを EER format で出力しています。RELION で解析するためには Gain reference の file が必要になるので、測定を開始したら、**

/OffloadData/ImagesForProcessing/EF-Falcon/300kV/

の中にある「日付_時間_EER_GainReference.gain」の中で一番新しい file を、OffloadData にある自分の測定データの Directory に忘れずにコピーして下さい。

***2. EER format で保存した場合、動画の frame 数は**

EPU>Preparation tab>Data Acquisition>Exposure Settings にある Frames (Nr) の値になります。これを 50 で割った値を RELION の Motion Correction の EER fractionation に入力すると $1 \text{ e}^{-}/\text{\AA}^2 \text{ frame}$ になります。(例えば EPU で 1220 frames などと表示されていたら、それを 50 で割った値 (=24) を EER fractionation に入力します)

2. EPU による自動測定

・中央の画面：TUI>Autoloader tab>Autoloader

見たいグリッドの数字をクリックして ボタンを押す (*2-3 分かかります)

・中央の画面：TUI>Setup tab>Vacuum

というボタンを押して、Column Valve を開ける

・右側の画面：EPU>Preparation tab

左上の Presets のプルダウンメニューから Atlas を選ぶ

C2=50, Obj=none であることを確認

上部右端の を押して Preview 撮影

(この段階で完全に真っ暗な場合は、カラムバルブが閉じているので開けましょう。

氷が厚すぎる場合は、ほぼ真っ暗ですが、うっすら Grid square が見えるはず)

・中央の画面：TUI>Search tab

Stage>option>Set tab で z に 120um と入力して ボタンを押す。

・右側の画面：EPU>Atlas tab

, , , (file 名を記録しておく)

を押して、今入ってる Grid (緑点灯) の番号にチェックを入れて、

ボタンを押すと Atlas 撮影開始 (* をクリックすると画像が表示される)

(*4x4 で全体像を撮影するのでしばらく待つ)

***KEK-Titan では EPU による自動測定について、以下 3 通りの条件を用意しています。**

条件	位相板	モード	倍率	露光時間	AFIS	目的
#1	あり	Counted	x130k (0.96Å)	~3.1 秒	No	スクリーニング
#2	なし	Counted	x165k, 215k, 270k (0.75, 0.58, 0.46Å)	~3.1 秒	No	本測定 (初回測定または Hole 内における粒子分布に偏りがある場合)
#3	なし	Counted	x165k, 215k, 270k (0.75, 0.58, 0.46Å)	~3.1 秒	Yes	本測定 (Hole 内における粒子分布が一様な場合)

測定条件#1 : 位相板あり・Counting・x130k・~3.1 秒**・EPU>EPU tab**

- Session Creation を押して、New Session を押して、Yes を押す
- Session Setup を押す : _____ (Session name を記録しておく)
 - (*1. Session type: Manual, Acquisition mode: Accurate を選択)
 - (*2. 測定条件#1 では位相板を使うので、Use Phase Plate にチェックを入れる)
 - (*3. 保存先は Atlas と同じ folder を選ぶ) → Apply を押す

- Square Selection を押す : Unselect All, マウスのホイールで拡大,
 氷の厚さが #1 薄い・#2 中間・#3 厚い Square を右クリックで Select
 まず #1 を右クリックして、Move stage to grid square で #1 に移動
 (スクショ 000)
- Hole selection を押す : Acquire で撮影して、良い Square が確認。良ければ以下へ。
Square 中央にいないければ、右クリックで Square 中央に移動
(Hole が見えない時は Move stage here で Hole が見える位置に移動)
Auto Functions tab の Auto-eucentric by beam tilt を選ぶ
Presets から Hole/Eucentric を選び、C2=50, Obj=None で Start
EPU tab に戻り Acquire (Square 中央にいないければ中央に戻り Acquire)
 Measure Hole size, Find Hole, Unselect All
 右 click, Add で画面中央から外に向けて Hole を 3 コ選択 (スクショ 001)
- Square Selection に戻り、#2, #3 も同様に Hole を 3 コずつ選択
 (*Square や Hole を選択した後、どこを選んだか記録が残るよう、Screen shot で保存)

- Template definition を押す : Acquire, **C2=50, Obj=PhP1**, Find and Center Hole
 add Acquisition Area: Defocus = -1um
 (緑四角の下の角 2 点が、黄色い円と接するように配置)
 add Autofocus Area: After distance, 10um, Objective lens
 add Drift Measurement Area: once/gridsquare, 0.20nm/s
- TUI>Autoloader tab>Aperture>Option>PhasePlate を見て、位相板の Next を押す
- Automated Acquisition を押す : Start Run を押す
- 測定条件#1 では、hole の明るさ (氷の厚み) と粒子の有無などの相関を確認します**
 (*撮影時の Skip 率が高い時は、Hole size, 高さ, アライメントを再確認しましょう)

測定条件#2 : 位相板なし・Counting・x165k/215k/270k・~3.1秒・AFISなし

- ・ **EPU>EPU tab** **Session Creation** を押して、**New Session** を押して、**Yes** を押す
- Session Setup** を押す : _____ (Session name を記録しておく)
- (*1. Session type: Manual, Acquisition mode: Accurate を選択)**
- (*3. 保存先は Atlas と同じ folder を選ぶ) → **Apply** を押す (スクショ epu)
- Square Selection** を押す : **Unselect All**, マウスのホイールで拡大,
スクリーニング測定を参考に良さそうな見た目の Square を右クリックで **Select**
最初の Square を右クリックして **Move stage to grid square** で移動
- Hole selection** を押す : **Acquire** で撮影して、良い Square が確認。良ければ以下へ。
Square 中央にいないければ、右クリックで Square 中央に移動
(Hole が見えない時は Move stage here で Hole が見える位置に移動)
Auto Functions tab の Auto-eucentric by beam tilt を選ぶ
Presets から Hole/Eucentric を選び、C2=50, Obj=none で Start
EPU tab に戻り Acquire (Square 中央にいないければ中央に戻り Acquire)
Measure Hole size, Find Hole, 必要なら Quality Bar の値を調整
(複数の Square を選ぶ場合は **Prepare all Squares** を押す)
(必要に応じて、氷の厚みが異なる hole や square を選択)
Selection Brush を使って Grid Bar の近くやゴミ周辺を消す
- Hole を選び終わったらカーボンの破れた所に移動 (Preparation>GridSquare で確認)
- EPU>Preparation tab で Data acquisition で **Set**。 **C2=50, Obj=none** にする。
- EER, No, No, Dose: ~50, fraction: --, 倍率: x165k/215k/270k のいずれかを選択。
- Dose Rate の **measure** を押し **Get x4 (スクショ dose)**
- 操作板の **R1** を押して蛍光板を下ろし、光の中心が緑の円の中心と一致しているか確認
- EPU>Auto Functions tab>Auto Zero-loss で Presets を Zero loss に変更して **Start**
- Square Selection** を押す : 最初の Square を右クリックして **Move stage to grid square**
- Hole Selection** を押す : Template def の場所を右クリックして **Move stage to grid square**
- Template definition** を押す : **Acquire, C2=50, Obj=none を確認, Find and Center Hole**
add Acquisition Area: Defocus = -0.8 - -2.0 or -1.0 - -2.5 um
(測定条件#1 を踏まえて適切な位置に置く) **(スクショ defocus)**
add Autofocus Area: **Always**, Objective lens
add Drift Measurement Area: **Always**, 0.20nm/s
- Template Execution** を押す : **Preview** (*設定した撮影手順が順調に動くかを確認する操作)
- Automated Acquisition** を押す : Auto Zero loss=Yes/20hrs, **Start Run** を押す

測定条件#3 : 位相板なし・Counting・x165k/215k/270k・~3.1秒・AFISあり

- ・ **EPU>EPU tab** **Session Creation** を押して、**New Session** を押して、**Yes** を押す
- Session Setup** を押す : _____ (Session name を記録しておく)
- (*1. Session type: Manual, Acquisition mode: Faster を選択)**
- (*3. 保存先は Atlas と同じ folder を選ぶ) → **Apply** を押す (スクショ epu)
- Square Selection** を押す : **Unselect All**, マウスのホイールで拡大,
スクリーニング測定を参考に良さそうな見た目の Square を右クリックで **Select**
最初の Square を右クリックして **Move stage to grid square** で移動
- Hole selection** を押す : **Acquire** で撮影して、良い Square が確認。良ければ以下へ。
Square 中央にいないければ、右クリックで Square 中央に移動
(Hole が見えない時は Move stage here で Hole が見える位置に移動)
Auto Functions tab の Auto-eucentric by beam tilt を選ぶ
Presets から Hole/Eucentric を選び、C2=50, Obj=none で Start
EPU tab に戻り Acquire (Square 中央にいないければ中央に戻り Acquire)
Measure Hole size, Find Hole, 必要なら Quality Bar の値を調整
(複数の Square を選ぶ場合は **Prepare all Squares** を押す)
(必要に応じて、氷の厚みが異なる hole や square を選択)
Selection Brush を使って Grid Bar の近くやゴミ周辺を消す
- Hole を選び終わったらカーボンの破れた所に移動 (Preparation>GridSquare で確認)
- EPU>Preparation tab で Data acquisition で **Set**。 **C2=50, Obj=none** にする。
- EER, No, No, Dose: ~50, fraction: --, 倍率: x165k/215k/270k のいずれかを選択。
- Dose Rate の **measure** を押し **Get x4 (スクショ dose)**
- 操作板の **R1** を押して蛍光板を下ろし、光の中心が緑の円の中心と一致しているか確認
- EPU>Auto Functions tab>Auto Zero-loss で Presets を Zero loss に変更して **Start**
- Square Selection** を押す : 最初の Square を右クリックして **Move stage to grid square**
- Hole Selection** を押す : Template def の場所を右クリックして **Move stage to grid square**
- Template definition** を押す : **Acquire, C2=50, Obj=none を確認, Find and Center Hole**
add Acquisition Area: Defocus = -0.8 - -2.0 or -1.0 - -2.5 um
(測定条件#1 を踏まえて適切な位置に置く) **(スクショ defocus)**
add Autofocus Area: **After Centering**, Objective lens
add Drift Measurement Area: **Always**, 0.20nm/s
- Template Execution** を押す : **Preview** (*設定した撮影手順が順調に動くかを確認する操作)
- Automated Acquisition** を押す : Auto Zero loss=Yes/20hrs, **Start Run** を押す

3. トラブルシューティング

III. 後片付け

・ Vitrobot の終了

- 扉を閉めて、タッチパネルの **Exit** を押す (Yes/No をきいてくるので **Yes**)
- しばらく経つと画面が暗くなるのでスイッチを切る
- Humidifier を外して、中の水を捨てる (よく振って捨てる)
- ろ紙を外して捨てる
- 扉は開けて中を乾燥させておく

・ Vitrobot 用の発泡スチロール容器

- 全てのパーツをばらして、キムタオルの上に並べる
 - そのまま置いて乾燥させる
- (*すぐに次の実験をしたい場合は、金属パーツはドライヤーで乾かし、
発泡スチロール部分はキムワイプなどで完全に水気をとる)

・ Loading station

- 全てのパーツをばらして、キムタオルの上に並べる
 - そのまま置いて乾燥させる
- (*すぐに次の実験をしたい場合は、他のよく乾いた Loading station を使う)

・ NanoCab

- 液体窒素を入れたまま、蓋もしたまま、翌日まで静置する
- (*すぐに次の実験をしたい場合は、他のよく乾いた NanoCab を使う)

注意：帰る前に必ず、以下の **3点** について確認して下さい。

- ・電頭の **Column Valves** を閉じる (EPU で測定中なら測定後に閉じるボタンを押す)
- ・電頭を使ってない時は **位相板** を抜く (入れたまま真空が飛ぶと位相板が破れます)
- ・**エタンガスボンベ** の Valve を閉じる

IV. 自動測定をする前に必要な準備

1. およそのアラインメント (毎日)

- EPU の右上の×を押して **Yes** を押して EPU を落とす (落ちるまで 30 秒くらい待つ)
- TUI>Setup tab>Filter を見る
- EFTEM** ボタンが黄色くなっていることを確認
(黄色くなっていなかったら **EFTEM** ボタンを押して黄色にする)
- TUI>Setup tab>Vacuum を見て **Col. Valves Closed** を押し Column Valves を開く
- EPU を起動 (起動したら Window を右側の画面に移動)
- 蛍光板が上がった状態(=Screen Retracted)でなければ操作板の **R1** を押して Retract
- EPU>Atlas tab で Grid に穴のあいたところに右クリック **Move stage here** で移動
- EPU>Preparation tab で **Acquisition and Optics Settings** が選ばれていることを確認
- EPU>Preparation tab>Presets から Grid Square を選んで **Preview**
- きちんと穴のあいたところにいることを確認する
- R1** を押して蛍光板を下ろす
- Flucam Viewer が **EF** (=EF mode の中心を緑の円で表示), **Natural**, **High Resolution** となっていることを確認
- EPU>Preparation tab の **Import** を押して、以下の.sxml file を open
D:/Preparation/EC_215k_230117.sxml (=0.58Å/pix)
- TUI>Align tab>Alignments>Option>File tab から **300** を選び、
Available にあるものを全て **Selected** に移動して、**Apply** を押す。
- TUI>Align tab>FEG registers から **300kV-nP_EFTEM_kek** を選び **Set** を押す

2. C2 絞りの中心合わせ (毎日)

- 前頁の続きなので Grid に穴のあいたところにおいて、蛍光板は下りているはず。
- EPU>Preparation tab>Presets から Grid Square を選んで
- 操作パネルの ボタンを押す (*x580 で Obj lens=6.9276%)
- EPU>Preparation tab>Presets から Data Acquisition を選んで
- 操作パネルの ボタンを押す (*x215k で Obj lens=80.6499%)
- TUI>Autoloader tab>Apertures を見て **C2=50, Obj=none** であることを確認。
(*C1=2000, C3=1000 は今後一切触らなくて OK。倍率は x215k で OK。)

(Flucam Viewer の画面に赤い四角が大小 2 つ描いてあるなら、枠内の操作は不要)

- Flucam Viewer に 0.4 x 0.4um の赤い四角を描く
- 赤い四角を矢印キーで移動させて緑の円 (=EFTEM モードの中心) に外接させる
- 右側の Annotation Properties を使って赤い四角を 0.8 x 0.8um に変更
- Flucam Viewer に 0.4 x 0.4um の赤い四角を描く
- 赤い四角を矢印キーで移動させて緑の円 (=EFTEM モードの中心) に外接させる
- 右側の Annotation Properties を使って赤い四角を 2.2 x 2.2um に変更

1 回目

- Intensity ダイアルを左に回して光を絞って 0.8um の赤い四角くらいの大きさにする
- TUI 右下>> を選び Multifunction ダイアルで光を中央へ
- Intensity ダイアルを右に回して、光が 2.2um の赤い四角の大きさになるまで広げる
- C2 の右横の を押して、Multifunction ダイアルで、
光の円が 2.2um の赤い四角に外接するように絞りを移動する
- C2 の横の をもう一度押す

2 回目

- 再度光を 0.8um の赤い四角くらいに絞って、Multifunction ダイアルで光を中央に移動
- Intensity ダイアルを右に回して、光が 2.2um の赤い四角の大きさになるまで広げる
- C2 の右横の を押して、Multifunction ダイアルで、
光の円が 2.2um の赤い四角に外接するように絞りを移動する
- C2 の横の をもう一度押す
(*ビームを絞った時も広げた時も中央にくるよう、以上を何回か繰り返す)
- Direct Alignment の Beam shift を する (*光の輪がほぼ同心円状に広がれば OK)

3. ピボットポイントの調整 (毎日: ビームテイルトの設定)

- ビームの位置は C2 絞りの中心合わせのときのままで OK。蛍光板も下ろしたままで OK
- EPU>Preparation tab>Presets から Data Acquisition を選んで
- TUI>Autoloader tab>Apertures を見て **C2=50, Obj=None** であることを確認。
- TUI 右下> から を選ぶ
- Multifunction-Xのみ** で、点滅する 2 つの光が重なるように微調整する
- TUI 右下> から を選ぶ
- Multifunction-Xのみ** で、点滅する 2 つの光が重なるように微調整する
- を押す

4. Rotation Center (毎日: 電流軸を対物レンズの中心に通す)

- を押して蛍光板を上げる
- EPU>Atlas tab を見て目立つゴミのあるところに右クリック で移動
- TUI>Search tab>Stage>Option>Set tab で z=120um に合わせる
- EPU>Preparation tab>Presets から Grid Square を選び
- 目立つゴミのあるところに右クリック で移動
- EPU>Preparation tab>Presets から Hole/Eucentric を選び
- 目立つゴミのあるところに右クリック で移動
- EPU>Auto Functions tab で になっていることを確認
- Presets を Hole/Eucentric にして (*傾斜軸は画面に対して横向きに走っている)

- を押して蛍光板を下ろす(ゴミが緑の円の中心になかったら joystick で中心に移動)
- EPU>Preparation tab>Presets から Data Acquisition を選んで
- TUI>Autoloader tab>Apertures を見て **C2=150 (視野を広げる) , Obj=None** に。
(*EPU と蛍光板で画像の向きが違うので、そのつもりで見ること)
- Magnification ダイヤルを右に 2 click して倍率を x350k まで上げる
- TUI 右下> から を選ぶ。
- Multifunction ダイヤルで、ゴミが上下左右に動かなくなるように微調整する
(*この後、AutoCTF でコマ収差を除くので、ある程度あっていけば良いそうです)
- を押す

5. 位相板への焦点合わせ (毎日 or 必要に応じて)

- 位相板ヒーターの電源が入っていることを確認 (*電源 ON にした後は2時間程待つ)
- R1** を押して蛍光板を上げる
- EPU>Atlas tab で Grid に穴のあいたところに右クリック **Move stage here** で移動
- EPU>Preparation tab>Presets から Grid Square を選び **Preview** (穴にいるのを確認)
- EPU>Preparation tab>Presets から Data Acquisition を選んで **Set**
- R1** を押して蛍光板を下げる
- 倍率は x215k のまま、**C2=150 (視野を広げる) , Obj=PhP1** とする
- TUI の表示モードを Linear にする (そのほうが見やすい)
- ヒストグラムのところではピークのみを選んで、もやもやが見えるようにする

- TUI>Search tab>Beam Settings>Option>TEM tab
- MF-Y Fine focus back-focal plane** にチェックを入れる
(*Titan だと Intensity を回しても平行照射が維持され焦点位置が変わらないため)
- Multifunction-Y を左右に回してシマシマを出す
(* Multifunction-Y を回すと、**もやもや→縦シマ→白→横シマ→もやもや**、
などと変わるので、左右に行き来して、シマシマが見えるところを探す)
- TUI 右下>**Stigmator** を選んで **Condenser** を押す
- Multifunction-X,Y で縞々の間隔を広げて網目模様にする
(*それなりにコツがあるが、シマシマの間隔を広げる感じでやると上手くいく。
シマシマが見えるのは、ビームが楕円になっているということ)

という、上の枠内の操作を繰り返して、**もやもや→白→もやもや**、となるようにする。

- 終わったら、像が消えるところで Multifunction-Y ダイアルを止めて (=Just focus)
 - MF-Y Fine focus back-focal plane** のチェックを外し、
 - Condenser** の下の **None** を押す
- TUI>Autoloader tab>Apertures>Option>PhasePlate を選び **Next** を押す
- TUI の表示モードを Natural に戻す
- 倍率を x215k, C2=50, Obj=none** にする
- EPU>Preparation tab>Presets で Data Acquisition から Zero loss まで **Get** x4
- Presets を Data Acquisition に戻す

6. 対物絞りの中心合わせ (毎日)

- 位相板への焦点合わせの後に行う (=平行照射の状態で行う。Ill. area=800nm なら OK)
- R1 を押して蛍光板を上げる

- EPU>Preparation tab>Presets の Hole/Eucentric にゴミ画像が残っているはずなので
右クリック Move stage here でその付近に移動

- EPU>Auto Functions tab で Auto-eucentric by stage tilt が選ばれていることを確認

- Presets を Hole/Eucentric にして Start

- EPU の Preparation tab で Hole/Eucentric にして Preview

- ゴミのないカーボン面を右クリックして Move stage here

- EPU>Preparation tab>Presets を Data Acquisition にして Set

- TUI>Autoloader tab>Apertures を見て **C2=50, Obj=none** であることを確認。

- ここで必ず R1 を押して蛍光板を下ろす！**

(*蛍光板を下ろさずに Diffraction ボタンを押すとカメラが壊れる可能性があります)

- 操作板の Diffraction のボタンを押す

- TUI の下を見て D=6.4m などとなっていることを確認

- TUI>Autoloader tab>Apertures を見て **Obj=100** に変更

- TUI は HDR モードにする (*対物絞りの影が見づらい時はマウスのホイールを回す)

*ほぼ合っているはずなので、一応確認はするが、

以下、枠内の 3 点は、よほどズレていなければやらないほうが無難

- Objective の横の Adjust を押す
- Multifunction ダイヤルで、明るい光の中心とぼやとした光の中心が合うようにする
- Objective の横の Adjust をもう一度押す

- Diffraction ボタンをもう一度押して diffraction mode を終了**

(*FluCam Viewer の表示は自動で Natural に戻るはず)

7. Energy filter 関連 (毎日)

- R1 を押して蛍光板を上げる
- TUI>Autoloader tab>Apertures を見て **C2=50, Obj=none** にする
- EPU>Atlas tab で Grid に穴のあいたところに右クリック **Move stage here** で移動
- EPU>Preparation tab>Presets から Grid Square を選び **Preview** (穴にいるのを確認)
- EPU>Preparation tab>Presets から Data Acquisition を選んで **Set**

- R1 を押して蛍光板を下げる
- ビームが中央になれば **Direct Alignments**>**Beam Shift** で光を中央に移動して **Done**
- ビームが緑の円の全体に当たっていることを確認
- R1 を押して蛍光板を上げる

- 通常、既に Sherpa が立ち上がっているはずなので、
画面下の歯車マークを押して Sherpa の Window を表に出す
(立ち上がってない場合は Microscope Software Launcher の Tools から Sherpa を起動)
- Sherpa Window の左側にある **Energy Filter** のボタンを押す

- Sherpa Window の左下にある Settings の四角を見る
- EF-Falcon, Bin=1, Exp time=0.5sec, Electron counting** にチェックを入れる

- Sherpa Window の左上にある Controls の四角を見る
- Zero loss : スリットの中央にビームを通すため **Center** ボタンを押す (1-2 分待つ)

- Isochromaticity : カメラにあたるエネルギーを均一にするため、**Tune** ボタンを押す
- しばらくすると赤緑青の画像が出てくる。この画面の色が一様に緑になるまで数分待つ

- Geometric and Chromatic Distortions : **Tune Magnification** のボタンを押す
- Geometric and Chromatic Distortions : **Tune Distortions** のボタンを押す
- Zero loss : 曲がり角の調整をするため、再度 **Center** ボタンを押す

8. AutoCTF (毎日：非点収差・コマ収差の補正)

- EPU>Preparation tab>Presets の Hole/Eucentric にゴミ画像が残っているはずなので
右クリック **Move stage here** でその付近に移動
- EPU>Auto Functions tab で **Auto-eucentric by stage tilt** が選ばれていることを確認
- Presets を Hole/Eucentric にして **Start**
- Defocus が 0um であることを確認
- EPU>Preparation tab>Presets から Hole/Eucentric を選び **Preview**
- ゴミのないカーボン面を右クリックして **Move stage here**

- EPU>Preparation tab>Presets から Data Acquisition を選んで **Set**
- TUI>Autoloader tab>Apertures を見て **C2=50, Obj=None** であることを確認。
- R1** を押して蛍光板を下げる
- ビームが中央になれば **Direct Alignments**>**Beam Shift** で光を中央に移動して **Done**
- もう一度、Data Acquisition で **Set** して、**R1** を押して蛍光板を上げる

- Sherpa は立ち上がっているはずなので、Sherpa の画面を見る
- Sherpa Window の左側にある **AutoCTF** ボタンを押し Camera>Type を EF-Falcon に
- EC mode なので Electron counting のボックスにチェックを入れる**
(**Exp. Time=2, Binning=2, Readout=Full, Auto-focus-to=チェックして-1.0**)
- Objective Stigmation の Measure** を押す(*グリッドに跡がついていたら少し移動)
(トーンリングが拾えなければ Focus ダイアルを回して Defocus を-800nm かける)
- トーンリングが拾えたら、**Correct** を押す
(対物レンズの非点収差をとってくれる。光があまり暗いと拾ってくれない)
(途中で Stop しないこと。Stop すると途中の変な状態で止まってしまう)

- 右下に Completed と出たら、**Coma の Correct** を押す (コマ収差をとってくれる)
- 右下に Completed と出たら、再度、**Objective Stigmation の Correct** を押す
(*AutoCTF が全くうまくいかない場合は何かが変わる。最初からやり直しましょう)

- 終わったら Sherpa の Window は最小化しておく

9. EPUにおける dose, fraction の設定 (毎日)

- EPU>Atlas tab で Grid に穴のあいたところに右クリック **Move stage here** で移動
- EPU>Preparation tab>Presets から Grid Square を選び **Preview** (穴にいるのを確認)

- EPU>Preparation tab>Presets から Data Acquisition を選んで **Set**
- TUI>Autoloader tab>Apertures を見て **C2=50, Obj=none** であることを確認

- EPU>Preparation tab>Exposure Settings を見る
- EER, No, No, Dose=**~50**, Fractions= (1) と設定する
- 必要に応じて倍率を x165k, x215k, x270k のいずれかに変更
- Dose Rate のところの **Measure** ボタンを押す
 - (x165k なら Exp. time=**~3.1 sec** になったことを確認 (8.28 e/px/s くらい))
 - x215k なら Exp. time=**~3.1 sec** になったことを確認 (5.10 e/px/s くらい)
 - x270k なら Exp. time=**~3.1 sec** になったことを確認 (3.24 e/px/s くらい))
- EPU>Preparation tab>Presets を
 - Data Acquisition にして **Get**
 - Autofocus にして **Get**
 - Drift Measurement にして **Get**
 - Zero loss にして **Get**
- EPU>Preparation tab>Presets を Data Acquisition に戻す

10. Gain reference (必要に応じて：カメラのゼロ点合わせ。倍率を変えたらとる)

*本テキストの設定では倍率を変えた時にビーム径が変わらないようにしてあるため、倍率を変えると明るさが変わります。そうすると、CMOS は linearity が悪いいため gain も変わってしまうため、倍率を変えて撮影するときは gain を取り直したほうが無難です。

- EPU>Preparation tab>Presets から Grid Square を選び Preview (穴にいるのを確認)
- EPU>Preparation tab>Presets から Data Acquisition を選んで Set
- TUI>Autoloader tab>Apertures を見て **C2=50, Obj=none** であることを確認
- R1 を押して蛍光板を下ろし、光が緑の円全体に当たっていることを確認。

- Software launcher>Tools>Camera and detector から **Falcon4i Reference Image Manager** を選ぶ

- Counting mode なので、PostCounting Gain のファイルを選ぶ
- R1 を押して蛍光板を上げてから、Measure Dose ボタンを押す
- 倍率を x215K にしてあれば、バーは緑の範囲に入るはず (~5.1 e/px/s になるはず)
 - (*Falcon 4i は 1-12.5 e/px/s が適切とのこと)
 - (*値が小さすぎる場合は、蛍光板, Beam Blank, Camera Insert が正しいかを確認)
- バーが緑の範囲に来たら、Acquire を押す (20 分ほどかかる)

- PostCounting Gain の日付が update されたことを確認
- EPU>Preparation>Presets で Data Acquisition にして Preview
- 得られた像が flat なことを確認して完了
 - (.gain は EPU で測定を開始すると、OffloadData/ImagesForProcessing/EF-Falcon/300kV/の中にコピーされる)

- Gain ref が終わったら Falcon4i Reference Image Manager は閉じる

11. EPU の倍率間の中心合わせ (毎日)

- EPU>Preparation tab>Presets の Hole/Eucentric にゴミ画像が残っているはずなので
右クリック **Move stage here** でゴミの角もしくはゴミと Hole の交点に移動
- EPU>Auto Functions tab で **Auto-eucentric by stage tilt** が選ばれていることを確認
- Presets を Hole/Eucentric にして **Start**
- EPU>Preparation tab>Presets から Hole/Eucentric を選び **Preview**
- ゴミの角もしくはゴミと Hole の交点などを右クリックして **Move stage here**

- EPU>Preparation tab>Presets から Data Acquisition を選んで **Set**
- R1** を押して蛍光板を下ろす (視野が狭くてゴミが見えにくければ C2=150 にする)
- ゴミの角もしくはゴミと Hole の交点などを、joystick で緑の円の中心に移動

- EPU>Preparation tab から **Calibrate Image Shifts** を選んで **Start Calibration**
- x215k の画像を見る。 **Proceed** (*ここでダブルクリックで移動させるとズレます)
- x6500 の画像を見る。x215k の中心と対応する場所をダブルクリックして **Proceed**
- x580 の画像を見る。x6500 の中心と対応する場所をダブルクリックして **Proceed**
- x100 の画像を見る。x580 の中心と対応する場所をダブルクリックして **Proceed**
- finished successfully と出たら終了

- EPU>Preparation tab の **Acquisition and Optics Settings** を選ぶ
- EPU>Preparation tab>Presets から Data Acquisition を選んで **Set**
(*装置管理者用メモ : FEG registers, Preparation file を保存する場合はここで保存)

- この後にスクリーニングを行うなら以下の操作を行って倍率を x130k にする。
- EPU>Preparation tab>Presets から Data Acquisition を選ぶ
- 右側のプルダウンにて倍率を x130k に変更して **Set**
- TUI>Autoloader tab>Apertures を見て **C2=50, Obj=none** であることを確認
- EPU>Preparation tab>Presets で Data Acquisition から Zero loss まで **Get** x4**
- Presets を Data Acquisition に戻す
- 最後、Presets を Atlas にして **Set**

V. その他

1. EPU の Preparation の設定

以下に、EPU の Preparation の設定例を、参考として示す。

測定条件#1 : Counting mode_130k with phase plate (*x215k から倍率を変更して使用)

	Camera	Binning	Readout	Exp. time, etc.	Probe	Mag	Defocus	Spotsize	Ill. area
Atlas	Falcon4i	2	Full	Linear,No,No 1s	Micro	x100	-1000	5	1413um C2:50
Grid Sq	Falcon4i	2	Full	Linear,No,No 1s	Micro	x580	-200	5	272.55um C2:50
Hole/ Eucentric	Falcon4i	2	Full	Linear,No,No 1.00s	Micro	x6500	-50	5	25.00um C2:50
Data Acq	Falcon4i	1	Full	EER,No,No ~50 e⁻/Å² ~3.1s, (1 fr)	Nano	x130k (0.96Å)	-1	5	0.8um C2:50 Slit:10eV
Autofocus	Falcon4i	2	Full	Linear,No,No 0.50s	Nano	x130k	--	5	0.8um C2:50
Drift Mes	Falcon4i	2	Full	Linear,No,No 1.00s	Nano	x130k	-2	5	0.8um C2:50

測定条件#2,3-165k : Counting mode_165k (*x215k から倍率を変更して使用)

	Camera	Binning	Readout	Exp. time, etc.	Probe	Mag	Defocus	Spotsize	Ill. area
Data Acq	Falcon4i	1	Full	EER,No,No ~50 e ⁻ /Å ² ~3.1s, (1 fr)	Nano	x165k (0.75Å)	-1	5	0.8um C2:50 Slit:10eV
Autofocus	Falcon4i	2	Full	Linear,No,No 0.50s	Nano	x165k	--	5	0.8um C2:50
Drift Mes	Falcon4i	2	Full	Linear,No,No 1.00s	Nano	x165k	-2	5	0.8um C2:50
Zero Loss	Falcon4i	4	Full	Linear,No,No 0.1s	Nano	x165k	--	5	0.8um C2:50 Slit:10eV

測定条件#2,3-215k : Counting mode_215k (*D:/Preparation/EC_215k_230117.xml)

	Camera	Binning	Readout	Exp. time, etc.	Probe	Mag	Defocus	Spotsize	Ill. area
Data Acq	Falcon4i	1	Full	EER,No,No ~50 e ⁻ /Å ² ~3.1s, (1 fr)	Nano	x215k (0.58Å)	-1	5	0.8um C2:50 Slit:10eV
Autofocus	Falcon4i	2	Full	Linear,No,No 0.50s	Nano	x215k	--	5	0.8um C2:50
Drift Mes	Falcon4i	2	Full	Linear,No,No 1.00s	Nano	x215k	-2	5	0.8um C2:50
Zero Loss	Falcon4i	4	Full	Linear,No,No 0.1s	Nano	x215k	--	5	0.8um C2:50 Slit:10eV

測定条件#2,3-270k : Counting mode_270k (*x215k から倍率を変更して使用)

	Camera	Binning	Readout	Exp. time, etc.	Probe	Mag	Defocus	Spotsize	Ill. area
Data Acq	Falcon4i	1	Full	EER,No,No ~50 e ⁻ /Å ² ~3.1s, (1 fr)	Nano	x270k (0.46Å)	-1	5	0.8um C2:50 Slit:10eV
Autofocus	Falcon4i	2	Full	Linear,No,No 0.50s	Nano	x270k	--	5	0.8um C2:50
Drift Mes	Falcon4i	2	Full	Linear,No,No 1.00s	Nano	x270k	-2	5	0.8um C2:50
Zero Loss	Falcon4i	4	Full	Linear,No,No 0.1s	Nano	x270k	--	5	0.8um C2:50 Slit:10eV

2. グリッドのアセトン処理 (必要に応じて)

*この作業はステンレス机の上で行いましょう。普通の机の上で行うと、アセトンで机の表面が溶けて、シャーレが机にくっつくことがあります。

- ガラスシャーレの中にくる紙を敷く
- くる紙の上に、丁寧にグリッドを 25 枚くらい並べる (静電気に注意)
- グリッドが浸るように、ゆっくりアセトンを注ぐ
- 室温で静置 (over night)
- キムワイブなどでアセトンをできるだけ吸い取る
- ピンセットで新しい紙の上にグリッドを移動させる
- ガラスシャーレでフタをして、1 時間は置いて乾燥させる
- グリッドを白い長方形のグリッドボックスに収納
(*静電気に注意。グリッドボックスのフタでグリッドを曲げぬよう注意)

3. グリッド作製の液体窒素の補充 (必要に応じて)

- 朝、5L シーベル x2 本に、120L 液体窒素タンクから汲み出す

4. 電顕用の 250L 液体窒素タンクの交換 (2 週間に 1 回くらい)

- Autoloader の Option から、**Fill Now** を選んでしばらく待つ
- バルブを全て閉じる (取り出し口の緑と、黒)
- 電顕とつながっている黒いホースとプラスチックチューブを外す
- 250L 液体窒素タンクを入れ替え
- 電顕とつながっている黒いホースとプラスチックチューブをつなげる
- 取り出し口の緑と黒を全開

5. Autoloader の Conditioning (2 週間に 1 回くらい : 電顕内部のゴミ飛ばし)

- Autoloader > Temperature Control のオプションから State を選ぶ
- Temperature State の Go to を **Conditioning Autoloader** にして **↔** を押す
- After Conditioning のところは、
Go to All Nitrogen temperature を選んで、
At を復帰させたい日時 (*default では 12 時間後) にして **↔** を押す
(*Conditioning both については、計画停電や長期休暇のシャットダウンで行う)

6. 長期休暇時の対応

・電顕内部の温度を室温にする（真空は引いたまま）

グリッドやカセットの取り出し

- , (*Nanocab に液体窒素を入れる必要はない)
- 温度表示が緑に戻るまで待つ
- EPU を落とす
- TUI>Setup tab>Filter の を押して黄色から灰色にする

Conditioning

- TUI>Autoloader tab>Temp Control>Option>State tab で、
Temp State Go to: を選んで
- After conditioning は を選んで
- Dewar が 0%になるまで待つ
- 温度が室温になるまで待つ（**8-10 時間くらいかかります！**）

Falcon4i, Ceta の冷却を OFF（*3-4 ヶ月に 1 回）

- Launcher>Tools>Camera and detector から を選ぶ
- Basic Operations tab の、 のチェックを外す
- Cooling から に変更
- Launcher>Tools>Camera and detector から を選ぶ
- Basic Operations tab の、 のチェックを外す
- Cooling から に変更（*自動で Off になります）

その他

- 電子銃および HT は ON のままにする
- 真空も引きっぱなしにする

・再立ち上げ時：電顕内部の温度を液体窒素温度にする

- 必要なら、TUI>Autoloader tab>Autoloader>Option の **Initialize** を押す
- TUI>Autoloader tab>Temp Control>Option>State tab から、
まず Temp State Go to: **Conditioning both** を選んで **↔** を押す。
再度 Temp State Go to: **All Nitrogen Temp** を選び 12 時間後を入力して **↔**
すると、After Conditioning の表示が (日付と時刻) が 12 時間後になる。
(このまま 12 時間以上待つ)

Falcon4i, Ceta の冷却を ON

- Launcher>Tools>Camera and detector から **Falcon 4i Service Tool** を選ぶ
- Basic Operation tab の **Cooling controlled by TEM server** のチェックを入れる
- Cooling **Off** から **On** に自動で変更される (-25℃になるまで 10-20 分かかる)
- Launcher>Tools>Camera and detector から **Ceta Service Tool** を選ぶ
- Basic Operation tab の **Cooling controlled by TEM server** のチェックを入れる
- Cooling **Off** から **On** に自動で変更される (-18℃になるまで 10-20 分かかる)

およそのアラインメント

(*Column の Vacuum が 34 log 以下になるのを待つ。理想的には 1 log)

- Autoloader>Apertures>Option の Enable で **Obj**, **SA** が黄色であることを確認
- TUI>Setup tab>Vacuum の **Col. Valves Closed** を押す
- **R1** を押して蛍光板を下ろし、ビームが見えることを確認
- TUI>Align tab>Alignments>Option>File tab から **300** を選び、
Available にあるものを全て **Selected** に移動して、**Apply** を押す。
- TUI>Align tab>FEG registers から **300kV-nP_EFTEM_kek** を選び **Set** を押す

*この後は IV 章 (p.15-24) の手順でアラインメント操作を行えば利用可能です。

7. 電顕のシャットダウンと立ち上げ (計画停電の前や故障時)→ 電顕のシャットダウン—— グリッドやカセットの取り出し

- unload, undock (*Nanocab に液体窒素を入れる必要はない)
- 温度表示が緑に戻るまで待つ

—— Conditioning

- Autoloader>Temp Control の Option>State で、
- Temp State Go to: Conditioning both を選んで⇒
- After conditioning は go to All Room Temp にする
- Dewer が 0%になるまで待つ
- 温度が室温になるまで待つ (**8-10 時間くらいかかります!**)

—— Gun の OFF

- EPU を落とす
- Setup>FEG Control の Option の power をクリックして、✓をクリック

—— 温度が 5-10°C を越えたら、、、

- 操作 PC の Desktop にある Remote desktop を立ち上げ
 - Falcon server に入って、電源マークをクリックして shut down
 - Software Launcher で電顕マーク右の□を右クリックして
 - Stop all を選び全てが止まってから、PC を落とす (操作 PC、Support PC 共に)
 - 電顕本体のメイン電源を落とす
 - チラーをとめる (OFF ボタンを押す)
 - Talos Arctica のブレーカーを落とす
-

電顕の立ち上げ

1日目の作業：電源関連

- ブレーカ, チラ, 電顕本体, 位相板ヒータの電源を ON (5分くらい待つ)
- ガンの Back up 電源をしばらく OFF (真空が良すぎるとガンを Start できないので)
- Falcon server, 操作 PC, サポート PC を ON (5分くらい待つ)

TEM User Interface 関連

- 操作 PC に Log In (*ユーザ名とパスワードは施設の人に)
- Software Launcher から、▶ ボタンで TEM User Interface を立ち上げる。
- (Hang up したら操作 PC を restart. 立ち上がったら service 用に切り替え)
- Setup>Vacuum の Option の Control から To "All Vacuum" を押す *次ページに注あり
- (*Tools>Vacuum Test か、TUI 右下>Vacuum Overview で残り時間がわかる。
- TMP status info の Speed が 100% まで上がるのを見守る)
- Autoloader>Autoloader の Option の Vacuum ON が押せるようになったら押す。
- (ここで 1.5hr ほど待ち時間。Setup>Vacuum, Column が 37log になるまで待つ)
- Setup>FEG Control の Option の Power が押せるようになったら押す。
- 2-3分待つと Cold Start か Warm Start が押せるようになるのでいずれかを押す。
- (Shutdown して、1-2 時間以内なら Warm start、それ以上なら Cold start)
- そうすると、Setup>FEG Control の Extraction の値が徐々に上がっていく。
- (Warm start は 25min くらいかかり、Cold start は 90min くらいかかる)
- ここで、ガンの Back up 電源を ON に戻す。
- Autoloader>Autoloader の Option の Initialize を押す。
- Autoloader>Temp Control の Option の State から、
- まず Temp State Go to: Conditioning both を選んで ⇨ を押す。
- 再度 Temp State Go to: All Nitrogen Temp を選び 12 時間後の日時を入力して ⇨
- すると、After Conditioning の表示が (日付、時刻) が 12 時間後に変わる。
- (このまま 12 時間以上待つ)

2日目の作業

- ~~Setup>High Tension~~ のボタンを、押せるようになったら押す。
- ~~まずは 80kV まで上げてから、段階的に 120, 160kV に上げる。~~
- ~~(Option の Emission がすぐ下がらないなど変なら、少し電圧を下げて待つ)~~
- ~~その後 Free high tension にチエッタを入れて、10000V (=10kV) ずつ上げて、~~
- ~~190kV まで持っていく。さらにその後、1000V (=1kV) ずつ 200kV まで上げる。~~
- ~~(*実測値 (Measured HT) は指定した値より 1-2kV、小さくなるようです)~~

およそのアラインメント

- ~~(*Column の Vacuum が 34 log 以下になるのを待つ。理想的には 1 log)~~
- ~~Autoloader>Apertures>Option の Enable で Obj, SA が黄色であることを確認~~
- ~~Column Valves を開いて、光があることを確認~~
- ~~Align>Alignments の Option を押して、File から 300 を選び、~~
- ~~Available にあるものを全て Selected に移動して、Apply を押す。~~
- ~~Align>FEG registers の file から、**300kV-nP_EFTEM_kek** を選んで Set を押す。~~

注 1: 再立ち上げ時、To “All Vacuum” を押してもカラムの真空が良くならない場合

- ~~おそらく、IGPco が動いてないので、~~
- ~~Tools>Vacuum Test を開いて、Manual Mode を ON~~
- ~~Vmco: open~~
- ~~TMP: ON~~
- ~~PVP: ON~~
- ~~Vbfpv: open~~
- ~~と設定する~~
- ~~TMP が 100% になったら、Buffer cycle を押して、Manual Mode を OFF~~
- ~~この状態で翌日まで放置 (ガンの Backup 電源を OFF にしていたら ON に戻す)~~
- ~~翌日、ガンの Backup 電源を OFF して、To “All Vacuum” から再開~~

- ~~注2: 再立ち上げ時、TMP in error が出た (Vacuum Test で TMP が赤いはず)~~
- ~~TEM User Interface を再起動~~
- ~~Launcher から、Tools>Vacuum Test を開く (TMP が緑か小豆色になってるはず)~~
- ~~Manual Mode を ON にして、~~
- ~~PVP ON~~
- ~~Vbfpv Open~~
- ~~Vmco Open~~
- ~~TMP ON~~
- ~~と設定する~~
- ~~- TMP が 100% になったら、Manual Mode を OFF~~
- ~~そうすると、自動的に Vacuum State の表示が Cond. column になるはず。~~
- ~~この段階でカラムの真空を十分に引きたいので、2-3 時間放置。~~

- ~~- 待つ間に、Setup>FEG Control の Option で Power が押せるはずなので押す~~
- ~~Output が 3300V くらいになるはず (この段階だと、Current は 0.001uA)~~
- ~~電子銃の Back up 電源を落としてあれば、Current が徐々に上がるはず~~
- ~~IGPa が動き始めたら Cold Start を押す (90 分待ち)~~
- ~~待っている間に、ガンの Back up 電源を ON に戻す~~

- ~~カラムの真空が十分に下がったら、Vacuum Test の Evacuate all を押す~~
- ~~自動的に IGPCo が ON になり、数分後に Vacuum State が All vacuum になるはず~~

- ~~Autoloader>Autoloader の Option の Vacuum ON を押す~~
- ~~Autoloader>Autoloader の Option の Initialize を押す~~

- ~~Autoloader>Temp Control の Option の State から、~~
- ~~Temp State Go to: Conditioning both を選んで⇒を押す。~~
- ~~Temp State Go to: All Nitrogen Temp & 8/7/2018, 7:00AM など⇒。~~
- ~~すると、After Conditioning の表示が (日付、時刻) が変わる (over night)~~

- ~~Setup>High Tension のボタンを押し、以降、p.40 の下から 5 行目の手順に戻る~~

8. Titan Krios G4 のレンズ/絞りの構成

Titan Krios では、Lens, Apertures が、上から順に、以下のように配置されています。

Gun (+Gun lens)

C1 Lens (*Spot size)
C1 Aperture (*2000 で固定)

C2 Lens (*Spot size & intensity)
C2 Aperture (*50 or 150)

C3 Lens (*intensity)
C3 Aperture (*1000 で固定)

Mini-condenser Lens (*nano probe/micro probe の切り換え)

Obj Lens (*stage)
Obj Aperture (*Back Focal Plane)

SA Aperture (*KEK ではほぼ使わない)
Int. Lens
Pro. Lens