

# 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]、徐希帆 [KEK]、藤井裕己 [KEK]、李慶武 [KEK]、坪松卓耶 [KEK]

\*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 (週 1 回) .....	p.15
2. C2絞りの中心合わせ (週 1 回) .....	p.16
3. ピボットポイントの調整 (週 1 回) .....	p.17
4. Rotation Center (週 1 回) .....	p.17
5. 位相板への焦点合わせ (週 1 回) .....	p.18
6. 対物絞りの中心合わせ (週 1 回) .....	p.19
7. Energy Filter 関連 (測定前) .....	p.20
8. AutoCTF (週 1 回) .....	p.21
9. EPUにおけるdose, fractionの設定 (測定前) .....	p.22
10. Gain reference (週 1 回) .....	p.23
11. EPUの倍率間の中心合わせ (週 1 回) .....	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 (月1回程度) .....	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.37

**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	タイポなどの修正
日本語第 04 版	26.04.13.		EPU, TEM User Interfaceのversion upなどに伴い改訂

## 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つから使う。
- \*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 3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**)
- Humidifierの下部に電源ケーブルを接続
- 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 During Process**, **Skip grid transfer** にチェックを入れる
- 白いフタが閉じているか確認し、閉じてない場合は、Footpedalを踏んで閉じる
- ろ紙を1枚ずつ、左右にセット (手袋着用。切り口の曲がり外側を向くように)
  - ・ 濾紙をセットしてから1時間もしくは16回使用したら、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

- Vitrobot用の発泡スチロール容器を組み立てて、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回繰り返し、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**

- 白く凍り始めたら、スパイダーを外す
- 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

- Loading stationを組み立てる（霜の混入を防ぐため、注ぎ口にキムワイブを詰めておく）
- 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ぎ、Loading stationを冷やす（最初はほとんど蒸発する）
  - さらにCassette handleの先端部分の高さまで、数回繰り返し注ぐ
  - 液体窒素のパブリングがある程度取まったら、さらに 10分以上待つ
- (\*Loading station中で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すこと)**

### ・ 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 → Start)
- Vitrobotのパラメータを設定する (デフォルトは Blot time=5 sec、Blot force=15)

- 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)

↓ 留め具はここまで(これ以下では濾紙にあたる)



- カーボン面 (表) が利き手側を向くように、ピンセットをピンセットホルダーに固定する
- Footpedalを2回踏んで、ピンセットをチャンバー内に移動させる
- 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に移動させる
- Footpedalを1回踏んで、ピンセットを下げる
- サンプル3  $\mu$ Lをグリッド表面に載せる (泡を作らない。少しチップに溶液が残っても諦める)
- Footpedalを踏むと、グリッドが濾紙でBlotされ、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秒程度待つ (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にピンセットを外す
- グリッドをエタンの中に浸したまま、ピンセットと発泡スチロール容器を手元に移動
- 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ならず
- グリッドをエタンから液体窒素へと素早く移動させる
- グリッドをCryoGrid Box (水色) に収納する (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す)
- 繰り返しグリッドを作製する場合は、ピンセットに付いた霜をキムワイプでよく拭いてから使う

### 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(水色)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



- 先細ピンセットを液体窒素に入れ、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用ピンセットを冷やして、オートグリッドのC-clipが右を向くように、グリッドボックス(白)に収納する (どこに何を入れたか、番号と試料名を記録する)

#### 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に移動して、NanoCabに液体窒素を入れる
- NanoCabをLoading stationにセット
- 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30秒以上、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が右(=AutoGrid container(白)と同じ方向)になるように入れる）
- AutoGrid tweezersで軽く押し、**  
**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！）
- NanoCab を試料準備室の元の位置に戻す

## II. 自動データ測定

\*IV章に示した事前準備 (スタッフ対応) 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 3.24.1、EPUはversion 3.14.0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タブ>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℃以下**になるまで待つ (数分)

#### ・ TUI>Autoloaderタブ>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、スタッフに連絡する)

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. EPU3.6.0以降になってからgainファイルが自動的にコピーされるようになりました  
また、データをLZW圧縮TIFF形式でも保存できるようになりました**

**\*2. TIFF formatで保存した場合、**

**EPU>Preparationタブ>Data Acquisition>Exposure SettingsにあるFractions (Nr)に、50と入力して、Enterを押すと自動で計算してくれる**

**(例えば、EPUでDose RateのMeasureにより、Frames(Nr):が146と表示されていたら、Fractions(Nr)が49になります。これにより、3 frame/1 fractionで構成された動画が49 fraction生成されるようになり、最後のfractionだけ、2 frame/1 fractionの動画になります)**

**\*3. EER format で保存した場合、**

**EPU>Preparationタブ>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 e-/Å<sup>2</sup> frame になります。(例えばEPUで172framesと表示されていたら実際は1204framesで、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

### ・左側の画面：TUI>Autoloaderタブ>Autoloader

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

### ・左側の画面：TUI>Setupタブ>Vacuum

- Col. Valves Closed というボタンを押して、Column Valveを開ける

### ・右側の画面：EPU>Preparationタブ

- 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 **Preview** を押して撮影
- 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

### ・左側の画面：TUI>Searchタブ

- Stage>option>Setタブで、z=120umと入力して、**Go To** ボタンを押す

### ・右側の画面：EPU>Atlasタブ

- Session Setup, New Session, Yes, Apply (file名を記録しておく)
- Screening 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、**Start** ボタンを押すとAtlas撮影開始 (\*Acquiring 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	x165k (0.75 Å)	~3秒	No	スクリーニング
#2	なし	Counted	x130k, 165k, 215k, 270k (0.96, 0.75, 0.58, 0.46Å)	~6,3,3,3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	x130k, 165k, 215k, 270k (0.96, 0.75, 0.58, 0.46Å)	~6,3,3,3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・x165k・~3秒****・EPU>EPUタブ**

- 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を選び、Set as default storage folder**() **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の中心に移動  
(スクショ: 000) 24%
- Hole selectionを押す：Acquireで撮影して、良いSquareか確認。良ければ以下へ  
Square中央にいないければ、右クリックMove stage here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
- 高さ合わせ：Auto FunctionsタブのAuto-eucentric by beam tilt**を選ぶ  
Presetsから**Hole/Eucentric**を選び、**C2=50, Obj=None**で**Start**  
**EPUタブに戻り、squareの中心で右クリックして、Move stage here and acquire**  
Square中央にいないければ、squareの中央でMove stage here and acquire
- Hole選択：Measure Hole size (#2からは必要に応じ使用), 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) 48%
- 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、スクショで記録を残す) (スクショ: 002, 003) 48%
  
- Template definitionを押す：Acquire, C2=50, **Obj=PhP1に変更**, Find and Center Hole  
add Acquisition Area: Defocus = **-1um**  
(緑四角(撮影場所)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 per gridsquare**, 0.20nm/s, 180s
- TUI>Autoloaderタブ>Aperture>Option>PhasePlateを見て、位相板のNextを押す  
(\*PhP1のposition8, 26, 27, 28, 45, 46は使用不可)
- 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する**  
(\*撮影時のSkip率が高い時は、Measure Hole size, 高さ合わせ, アラインメントを再確認)

**測定条件#2：位相板なし・Counting・x130k/165k/215k/270k・~6,3,3,3秒・AFIS無**

- **EPU>EPUタブ** □ 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か確認。良ければ以下へ。  
Square中央にいなければ、右クリックMove stage here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
- **高さ合わせ：Auto FunctionsタブのAuto-eucentric by beam tiltを選ぶ**  
PresetsからHole/Eucentricを選び、**C2=50, Obj=None**でStart  
**EPUタブに戻り、squareの中央でMove stage here and acquire**
- Hole選択：Measure Hole size, Find Hole, 必要ならFilter Ice 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、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を選び終えたらカーボンの破れた所移动到。Preparation>GridSquareでPreview(破れ場所確認)
- EPU>Preparationタブで、Data acquisitionにしてSet。C2=50, Obj=Noneにする
- TIFFの設定：**Manual, On, Off, Dose:~50, fraction: --, 倍率: x92k/120k/150kのいずれかを選択**  
EERの場合：EER, Dose: ~50, fraction: --, 倍率: x92k/120k/150kのいずれかを選択
- Exposure SettingsにあるFractions(Nr)に、50と入力して、Enterを押す(自動で計算される)
- Dose Rateのmeasureを押し、緑の範囲にいるか確認。(スクショ: dose) Get
- 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タブ>Center Zero-loss peak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 definitionの場所を右クリックしてMove stage here
- Template definitionを押す：Acquire, **C2=50, Obj=Noneを確認**、Find and Center Hole  
add Acquisition Area: Defocus = **-0.8, -1.2, -1.6, -2.0** or **-1.0, -1.5, -2.0, -2.5um** 等  
(測定条件#1を踏まえて適切な位置に置く)  
add Autofocus Area: **Always**, 10um, Objective lens  
add Drift Measurement Area: **Always**, 0.20nm/s, 180s (スクショ: defocus)
- 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：Start Runを押す

**測定条件#3：位相板なし・Counting・x130k/165k/215k/270k・~6,3,3,3秒・AFIS有**

- **EPU>EPUタブ** □ 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: **Fast**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か確認。良ければ以下へ。  
Square中央にいなければ、右クリックMove stage here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
- **高さ合わせ：Auto FunctionsタブのAuto-eucentric by beam tiltを選ぶ**  
PresetsからHole/Eucentricを選び、**C2=50, Obj=None**でStart  
**EPUタブに戻り、squareの中央でMove stage here and Acquire**
- Hole選択：Measure Hole size, Find Hole, 必要ならFilter Ice 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を選び終えたらカーボンの破れた所へ移動。Preparation>GridSquareでPreview(破れ場所確認)
- EPU>Preparationタブで、Data acquisitionにしてSet。C2=50, Obj=Noneにする
- TIFFの設定：**Manual, On, Off, Dose:~50, fraction: --, 倍率: x92k/120k/150kのいずれかを選択**  
EERの場合：EER, Dose: ~50, fraction: --, 倍率: x92k/120k/150kのいずれかを選択
- Exposure SettingsにあるFractions(Nr)に、50と入力して、Enterを押す(自動で計算される)
- Dose Rateのmeasureを押し、緑の範囲にいるか確認。(スクショ: dose) Get
- 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タブ>Center Zero-loss peak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 definitionの場所を右クリックしてMove stage here
- Template definitionを押す：Acquire, **C2=50, Obj=Noneを確認**、Find and Center Hole  
add Acquisition Area: Defocus = **-0.8, -1.2, -1.6, -2.0** or **-1.0, -1.5, -2.0, -2.5um** 等  
(測定条件#1を踏まえて適切な位置に置く)
- add Autofocus Area: **After Centering**, Objective lens
- add Drift Measurement Area: **Always**, 0.20nm/s, 180s (スクショ: defocus)
- 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：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)
- シリンジで中の水も吸い出して捨てる
- ろ紙は外して、固定用のプラスチックと分離して、捨てる
- 固定用プラスチックは元の位置に戻す
- 扉は開けておき、内部を乾燥させる

#### ・ 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ブ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、蓋もしたままで、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。

- ・ 電顕の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)
- ・ 電顕を使ってい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)
- ・ エタンガスポンベの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 (週1回)

EPUの右上の **X** 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タブ>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)

EPUを立ち上げる

TUI>Setupタブ>Vacuumを見て、**Col. Valves Closed** を押し、Column Valvesを開く

\*Gridを変えて、Atlasを撮り直す場合は、枠内の作業が必要

\*Gridを変えて、Atlasを撮り直す場合

Atlasタブ → Session setup → New session

アンダーバー(\_)をファイル名前の前につけて、作成

Searchタブ → SETタブ → Z軸に「120 $\mu$ m」入力 → go to

Atlasタブ → screening → グリッドにチェックを入れてSTART (アトラス撮影5分ほど)

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タブで、**Acquisition and Optics Settings** が選ばれていることを確認

EPU>Preparationタブ>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タブの **Import** を押して、以下の.xmlファイルを開く

**D:/Preparation/ EC\_215k\_240119.xml (=0.58Å/pix)**

TUI>Alignタブ>Alignments>Option>Fileタブから、**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タブ>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 (週1回)

- 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タブ>PresetsからGrid Squareを選んで、 → Ready
- 操作パネルのEucentric focusボタンを押す (\*x580でObj lens=6.9276%)**
- EPU>Preparationタブ>PresetsからData Acquisitionを選んで、 → Ready
- 操作パネルのEucentric focusボタンを押す (\*x215kでObj lens=80.6146%)**
- TUI>Autoloaderタブ>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。)

以下の四角の中は、操作PCをOFF/ONした場合に行う

(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0.4x0.4um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0.8x0.8umに変更
- Flucam Viewerに0.4x0.4um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2.2x2.2umに変更

### 1回目

- Intensityダイヤ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ダイヤルで光を中央へ
- Intensityダイヤルを右に回して、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ダイヤルで、  
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ダイヤルで光を中央に移動
- Intensityダイヤルを右に回して、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ダイヤルで、  
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 Alignments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 (週1回: 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そのままOK。蛍光板も下ろしたままでOK
- EPU>Preparationタブ>PresetsからData Acquisitionを選んで、 → ready
- TUI>Autoloaderタブ>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 (週1回: 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タブを見て、目立つゴミのあるところに右クリックで移動
- TUI>Searchタブ>Stage>Option>Setタブで、z=120umを入力し、を押す
- EPU>Preparationタブ>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タブ>PresetsからHole/EucentricHeight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タブで、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タブ>PresetsからData Acquisitionを選んで、 → ready
- TUI>Autoloaderタブ>Aperturesを見て、**C2=150 (視野を広げる)**, **Obj=none**とする  
(\*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2click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 (週1回)**

- 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タブで、Gridに穴のあいたところに右クリック**Move stage here**で移動
- EPU>Preparationタブ>PresetsからGrid Squareを選び、**Preview** (穴にいるのを確認)
- EPU>Preparationタブ>PresetsからData Acquisitionを選んで、**Set** → ready
- 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タブ>Beam Settings>Option>TEMタブ
- 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 (spot:5, C2:40.849%付近)  
(\* Multifunction-Yを回すと、**もやもや→縦シマ→白→横シマ→もやもや**、  
などが変わるので、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

(III. area=800nmがずれてしまうので、Multifunctionの操作時、Intensityは触らないこと)

- 終わったら、像が消えるところで、Multifunction-Yダイヤルを止めて (=Just focus)
  - MF-Y Fine focus back-focal plane**のチェックは、勝手に外れているはず
  - Condenser**の下の**None**を押す
- TUI>Autoloaderタブ>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タブ>Presetsで、Data Acquisitionで、**Get**

## 6. 対物絞りの中心合わせ (週1回)

- 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タブ>PresetsのHole/EucentricHeight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、ゴミの付近に移動
  - EPU>Auto Functionsタブで、Auto-eucentric by stage tiltが選ばれていることを確認
  - PresetsをHole/EucentricHeightにして Start
  
  - EPUのPreparationタブで、Hole/EucentricHeight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タブ>PresetsをData Acquisitionにして Set → ready
  - TUI>Autoloaderタブ>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タブ>Aperturesを見て、**Obj=100**に変更
  - TUIはHDRモードになるはず。 (\*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、よほどズれ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 (測定前)

- R1を押して蛍光板を上げる
- TUI>Autoloaderタブ>Aperturesを見て、**C2=50, Obj=none**にする
- EPU>Atlasタブで、Gridに穴のあいたところに右クリックMove stage hereで移動
- EPU>Preparationタブ>PresetsからGrid Squareを選び、Preview (穴にいるのを確認)
- EPU>Preparationタブ>PresetsからData Acquisitionを選んで、Set → ready
  
- 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ウィンドウの左側にあるEnergy Filterのボタンを押す
  
- Sherpaウィンドウの左下にあるcontrolsの四角を見る
- EF-Falcon, Exposure=0.5sec, Binning=1, Counting**にチェックを入れる
  
- Sherpaウィンドウの左上にある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
  
- Distortions : Tune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
  
- Sherpaのウィンドウは最小化しておく

## 8. AutoCTF (週1回：非点収差・コマ収差の補正)

- EPU>Preparationタブ>PresetsのHole/EucentricHeight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タブで、Auto-eucentric by stage tiltが選ばれていることを確認
- PresetsをHole/EucentricHeightにして、Start
- Defocusが0umであることを確認
- EPU>Preparationタブ>PresetsからHole/EucentricHeight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タブ>PresetsからData Acquisitionを選んで、Set → ready
- TUI>Autoloaderタブ>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ウィンドウの左側にある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ダイヤルを回して、Defocusを-800nmほどかける)
- トーンリングが拾えたら、Objective Stigmationの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です。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 (測定前)

- EPU>Atlasタブで、Gridに穴のあいたところに右クリックMove stage hereで移動
- EPU>Preparationタブ>PresetsからGrid Squareを選び、Preview (穴にいるのを確認)
  
- EPU>Preparationタブ>PresetsからData Acquisitionを選んで、Set → ready
- TUI>Autoloaderタブ>Aperturesを見て、C2=50, Obj=noneであることを確認
  
- EPU>Preparationタブ>Exposure Settingsを見る
- 必要に応じて倍率をx130k, x165k, **x215k**, x270kのいずれかに変更
  
- Manual, On, Off, Dose=~50と設定
  
- Dose RateのところのMeasureボタンを押す
  - x130kなら、Exp. time=~6 secになったことを確認 (Spot size: 6, 8.80 e/px/sくらい)
  - x165kなら、Exp. time=~3 secになったことを確認 (Spot size: 5, 10.75 e/px/sくらい)
  - x215kなら、Exp. time=~3 secになったことを確認 (Spot size: 5, 6.63 e/px/sくらい)
  - x270kなら、Exp. time=~3 secになったことを確認 (Spot size: 5, 4.21 e/px/sくらい)
  
- Fractionsのところ、50と入力して、enterを押す
  
- EPU>Preparationタブ>PresetsをData Acquisitionにして、Get

**10. Gain reference (週1回: 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タブ>PresetsからGrid Squareを選び、Preview (穴にいるのを確認)
- EPU>Preparationタブ>Presets からData Acquisitionを選んで、Set → ready
- TUI>Autoloaderタブ>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 (6.6 e/px/sくらいになるはず)  
(\*Falcon4i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 reference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 (週 1 回)

- EPU>Preparationタブ>PresetsのHole/EucentricHeightにゴミ画像が残っているはずなので  
右クリックMove stage hereでゴミの付近に移動
- EPU>Auto Functionsタブで、Auto-eucentric by stage tiltが選ばれていることを確認
- PresetsをHole/EucentricHeightにして、Start
- EPU>Preparationタブ>PresetsからHole/EucentricHeight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タブ>PresetsからData Acquisitionを選んで、Set → Ready
- 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タブからCalibrate Image Shiftsを選んで、Acquire (Resumeと表示、再び押す)
  
- x215k の画像を見る。 (\*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
- 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
- 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
- Store Calibrationを押す。
  
- EPU>PreparationタブのAcquisition and Optics Settingsを選ぶ
- EPU>Preparationタブ>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x165kにする
- EPU>Preparationタブ>PresetsからData Acquisitionを選ぶ
- 右側のプルダウンにて倍率をx165kに変更してSet
- TUI>Autoloaderタブ>Aperturesを見て、C2=50, Obj=noneであることを確認
- EPU>Preparationタブ>Presetsで、Data AcquisitionでGet
- PresetsをAtlasにしてSet
  
- Auto FunctionsタブのAuto-eucentric by stage tilt → Auto-eucentric by beam tiltに変更しておく
- TUI右下の、Direct alinementsなどを選ぶドロップダウンをXを押して、閉じておく
- TUI>Setup>Vacuum>Col. Valves Openedを押して、Column ValvesをClosedにしておく

## 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\_165k with phase plate (\*x215k から倍率を変更して使用)

	Camera	Binning	Exp. time, etc.	Probe	Mag	Defocus	Spotsize	Ill. area	Link
Atlas	Falcon4i	-	1.00s	-	x100	-1000	5	1413.21um C2:50 Slit:60eV	-
Grid Sq	Falcon4i	-	1.00s	-	x580	-200	5	272.55um Slit:60eV	-
Hole/ Eucentric	Falcon4i	-	1.00s	Micro	x6500	-50	5	25.00um Slit:60eV	-
Data Acq	Falcon4i	-	Manual,On,Off, ~50 e <sup>-</sup> /Å <sup>2</sup> ~3s, (1 fr)	Nano	x165k (0.75Å)	-1	5	0.8um C2:50 Slit:10eV	-
Autofocus	Falcon4i	2	Counted, 0.50s,Off	-	-	-	-	-	Link
Drift Mes	Falcon4i	2	Counted, 0.50s,Off	-	-	-2	-	-	Link
Zero-loss	Falcon4i	4	Counted, 0.10s,Off	Nano	x165k	-	5	0.8um Slit:10eV	-
Thon ring	Falcon4i	4	Counted, 0.50s,Off	-	-	-2	-	-	Link

#### 測定条件#2,3-130k : Counting mode\_130k (\*x215k から倍率を変更して使用)

	Camera	Binning	Exp. time, etc.	Probe	Mag	Defocus	Spotsize	Ill. area	Link
Data Acq	Falcon4i	-	Manual,On,Off, ~50 e <sup>-</sup> /Å <sup>2</sup> ~6s, (1 fr)	Nano	x130k (0.96Å)	-1	6	0.8um C2:50 Slit:10eV	-
Autofocus	Falcon4i	2	Counted, 0.50s,Off	-	-	-	-	-	Link
Drift Mes	Falcon4i	2	Counted, 0.50s,Off	-	-	-2	-	-	Link
Zero-loss	Falcon4i	4	Counted, 0.10s,Off	Nano	x165k	-	5	0.8um Slit:10eV	-
Thon ring	Falcon4i	4	Counted, 0.50s,Off	-	-	-2	-	-	Link

**測定条件#2,3-165k : Counting mode\_165k (\*x215k から倍率を変更して使用)**

	Camera	Binning	Exp. time, etc.	Probe	Mag	Defocus	Spotsize	Ill. area	Link
Data Acq	Falcon4i	-	Manual,On,Off, ~50 e <sup>-</sup> /Å <sup>2</sup> ~3s, (1 fr)	Nano	x165k (0.75Å)	-1	5	0.8um C2:50 Slit:10eV	-
Autofocus	Falcon4i	2	Counted, 0.50s,Off	-	-	-	-	-	Link
Drift Mes	Falcon4i	2	Counted, 0.50s,Off	-	-	-2	-	-	Link
Zero-loss	Falcon4i	4	Counted, 0.10s,Off	Nano	x165k	-	5	0.8um Slit:10eV	-
Thon ring	Falcon4i	4	Counted, 0.50s,Off	-	-	-2	-	-	Link

**測定条件#2,3-215k : Counting mode\_215k (\*D:/Preparation/EC\_215k\_230117.xml)**

	Camera	Binning	Exp. time, etc.	Probe	Mag	Defocus	Spotsize	Ill. area	Link
Data Acq	Falcon4i	-	Manual,On,Off, ~50 e <sup>-</sup> /Å <sup>2</sup> ~3s, (1 fr)	Nano	X215k (0.58Å)	-1	5	0.8um C2:50 Slit:10eV	-
Autofocus	Falcon4i	2	Counted, 0.50s,Off	-	-	-	-	-	Link
Drift Mes	Falcon4i	2	Counted, 0.50s,Off	-	-	-2	-	-	Link
Zero-loss	Falcon4i	4	Counted, 0.10s,Off	Nano	x165k	-	5	0.8um Slit:10eV	-
Thon ring	Falcon4i	4	Counted, 0.50s,Off	-	-	-2	-	-	Link

**測定条件#2,3-270k : Counting mode\_270k (\*x215k から倍率を変更して使用)**

	Camera	Binning	Exp. time, etc.	Probe	Mag	Defocus	Spotsize	Ill. area	Link
Data Acq	Falcon4i	-	Manual,On,Off, ~50 e <sup>-</sup> /Å <sup>2</sup> ~3s, (1 fr)	Nano	X270k (0.46Å)	-1	5	0.8um C2:50 Slit:10eV	-
Autofocus	Falcon4i	2	Counted, 0.50s,Off	-	-	-	-	-	Link
Drift Mes	Falcon4i	2	Counted, 0.50s,Off	-	-	-2	-	-	Link
Zero-loss	Falcon4i	4	Counted, 0.10s,Off	Nano	x165k	-	5	0.8um Slit:10eV	-
Thon ring	Falcon4i	4	Counted, 0.50s,Off	-	-	-2	-	-	Link

## 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機の上で行いましょう。普通の機の上で行うと、アセトンで機の表面が溶けて、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も紙を敷く
- 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
- 交換した空タンクは、黒バルブを少し開けて、内部の圧を下げておく

## 5. AutoloaderのConditioning (月1回程度 : 電顕内部のゴミ飛ばし)

- Autoloader>Temperature Controlのオプションから、Stateタブを選ぶ
- 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、必要に応じて、電顕の未使用時に行う)

## 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タブ>Filterのを押して黄色から灰色にする

#### Conditioning

- TUI>Autoloaderタブ>Temp Control>Option>Stateタブで、  
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タブの、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タブの、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タブ>Autoloader>OptionのInitializeを押す
- TUI>Autoloaderタブ>Temp Control>Option>Stateタブから、  
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時間後が変わる  
（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タブの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タブの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34log以下になるのを待つ。理想的には1log）

- Autoloader>Apertures>OptionのEnableで、Obj, SAが黄色であることを確認
- TUI>Setupタブ>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タブ>Alignments>Option>Fileタブから、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タブ>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

#### ◎シャットダウン前日

##### グリッドやカセットの取り出し

- unload（ステージに乗っているサンプルの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
- EPU を落とす
- TUI>Setup tab>FilterのEFTEMを押して黄色から灰色にする

##### Conditioning

- Autoloader>Temp ControlのOption>Stateタブで、  
Temp State Go to: Conditioning bothを選んで  
時間を現在の時刻から1分後にして、マークをクリック
- After conditioning はgo to All Room Temp delayedを選んで、  
時間を12時間後（PM⇔AM変更）に設定し、マークをクリック
- 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！**）

##### カメラの冷却をOFF(Conditioning開始後ですぐに行ってOK！)

- Launcher>Tools>Camera and detectorからFalcon 4i Service Toolを選ぶ  
Basic Operationsタブの、Cooling controlled by TEM serverのチェックを外す  
Cooling OnからOffに変更
  - Launcher>Tools>Camera and detectorからCeta Service Toolを選ぶ  
Basic Operationsタブの、Cooling controlled by TEM serverのチェックを外す  
Cooling OnからOffに変更（\*自動でOffになります）
- 注意！** Falcon 4i Service ToolとCeta Service Toolのwindowを閉じると、  
Detector（カメラ）が再びActiveになるので、閉じないこと！

★TMPがerrorになった場合は、recoverを押して、回復を試みる

1回押してもダメなら、2回押すと、直る可能性あり

TMPがうまく動き出したら、もう一度、コンディショニング(Conditioning both)を行う

## ◎シャットダウン当日

### Transferの立ち下げ

- 立ち下げ順は、Titan Transfer → Falcon4i → Lustre1である
- Transferの立ち下げはスタッフにお願い

### GunのOFF

- EPUを落とす（すでに落としているはず）
- Setup>High TensionのHigh TensionをOFF
- FEG Controlのoption → FEGを押す → ✓をクリック（少し待つ）
- FEG ControlのPowerを押す → ✓をクリック
  
- 操作PCの画面左下Windowsスタートメニューから  
Remote Desktop Connectionを立ち上げ192.168.10.2にConnect  
ログイン
  
- remoteで見れたPCの画面の左下にあるWindowsスタートメニューから  
shut down（理由を聞かれるが、なんでも良いので、shutdownする）

### サーバーのOFF

- サーバー室2のFalconサーバーの電源ボタンを一回短く押す  
5-10分ほどかかる  
offload dataの接続が切れる

### TUIのOFF

- 操作PCのSoftware Launcherで、□を右クリックでstop all（Talosと同じ）  
もしhangupになったら、もう一度stop all  
もし、Microsoft.Net Framework →Quit
  
- ※時刻がズレていたらこのタイミングで、操作PC上で修正する
  
- 操作PC、サポートPC、TG用のPCを全て落とす  
（もし、カメラの温度が常温になっていない場合は、20分待つ）

## 電顕のOFF

- 電顕室2奥のラックに行く
- PRA6000-60のPOWERを90度左に回してOFF（レンズに供給している60V）
- その上のパネル左側にあるSWITCHであるOPTICS PSU 60Vを落とす
- 続いてその右に並んでいるCIRCUIT BREAKERSを左から順に落とす
- その上のMAIN CIRCUIT BREAKERを落とす。
  
- 電源ラックの反対側の壁にある  
THREE PHASE EMO BOXのMAIN SYSTEM DISCONNECTつまみを左に回してOFF  
(復電後にこれをONに回して起動しようとするときEMO ACTIVATEDの赤ランプがつくので  
POWER ONを押したりする手順が必要になるらしい。)
  
- サーバー室2に移動し、奥にあるSFC ENERGYのON/OFF SWITCHを左に回してOFF  
(これもONにしようとするとき赤ランプがつくので  
その上の縦線ボタンを押したりする手順があるらしい。)
- サーバー室2のチャラーの電源ボタンをOFF、扇風機もOFF
- サーバー室2のUPSの電源をOFF。(Hub, FSSW, Transferの電源が落ちる)  
○と書いてあるのは、OFFのボタンである。

## ◆電顕の立ち上げ

### ◎1日目の作業：電源関連

- サーバールーム2にあるUPSの電源を入れる。(Hub, FSSW, Transferの電源がON)  
Testと書いてあるのが、ONのボタンである
- サーバールーム2のチャラーの電源ボタンをON

#### **注意 1** ポンプが作動しない時

Haskrisの正面のスイッチを一旦OFFにし、天板の固定ネジを2か所外して開けると奥側にブレーカー(写真右側の白い本体に灰色のスイッチ)があるので、トリップしていればONにする。一度手前側に降ろしてから上げる

- サーバールーム2奥にあるSFC ENERGYのON/OFF SWITCHを右に回してONにすると赤ランプが点灯するので、上の縦線①ボタンを押し、SWITCHを左に一旦回し右へ再度回す
- 電源ラックの反対側の壁にあるTHREE PHASE EMO BOXのMAIN SYSTEM DISCONNECTのつまみを右に回して、ONに回して起動しようとする、EMO ACTIVATEDの赤ランプがつくので、POWER ONを押す。
- 最上段パネルのMAIN CIRCUIT BREAKERを投入する。
- その下のパネル右側に並んでいるCIRCUIT BREAKERSの左から3つ目だけを上げて、数分待ってから(操作PC本体の下にあるイーサネットスイッチが点滅始めてから)、残りを上げる  
続いてその左OPTICS PSU 60V SWITCHを投入する
- PRA6000-60のPOWERを90度右に回してON (レンズに供給している60V)

### サーバーとPCのON


- サーバールーム2のFalcon4iサーバーの電源ボタンを押してON
- 操作PC、サポート、トモグラフィ用PCをONにする。(5分くらい待つ)
- 操作PCログイン  
(サブモニターが点灯しない場合、モニター電源入り切り)

## TUIの立ち上げ

- Microsoft Software Launcherの▶ボタンを押す  
startedになったら、次へ
  
- TEM User Interfaceが立ち上がったら service用に切り替え  
Software Launcherを✕、画面右下をExitした後、service用のSoftware Launcherを立ち上げ
  
- Setup>VacuumのOptionのControlからTo “All Vacuum”を押す  
Tools → Vacuum overviewで確認  
※ここでVacuum StateがUnknown or Errorの場合、どこかが転けているので、  
まずは、Recoverを押す  
それではダメな場合は、最初からやり直し。(ブレーカー、Falconサーバーを再起動する)
  
- Autoloader>AutoloaderのOptionのVacuum ONが押せるようになったら押す  
(すでに黄色になっている場合は、次へ)

## GunのON

- ガンのバックアップ電源をOFF
- Setup>FEG ControlのOptionのPowerが押せるようになったら押す
- Cold Start or Warm startが押せるようになったら押す  
※基本的にはCold start (90 min)  
もしShutdownして、1-2時間以内なら、Warm start (30 min)
- ガンのバックアップ電源をONに戻す
  
- 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, 150kVに上げる  
(OptionのEmissionがすぐ下がることを確認しながら)  
その後、Free high tensionにチェックを入れて、>のマークで上げて行く  
10000V (=10kV) ずつ上げて200kVまで持って行く  
3000V (=3kV) ずつ上げて270kV付近まで持って行く  
さらにその後、1000V (=1kV) ずつ、300kVまで上げる
  
- Autoloader>ApertureをEnableにする。(全て黄色にする)
  
- AutoloaderをInitialize  
TUI>Autoloaderタブ>Autoloader>Option のInitializeを押す

- TUI>Autoloaderタブ>Temp Control>Option>Stateタブから、Temp State Go to: All Nitrogen Tempを選び、12時間後の時刻を入力して、をクリックすると、After Conditioning が開始する。（このまま12時間以上待つ）
- サーバーの立ち上げ順は、Falcon4i → Lustre1 → Titan Transferである  
Falcon4iは、上記で立ち上げているので、Lustre1が立ち上がったという連絡がきたら、Titan Transferも立ち上げてOK
- ★2026年1月の保守点検作業後、電顕本体の再起動時には以下の操作が必要となる  
（操作PCの再起動のみの場合は必要ない。）
- Microscope Software LauncherからTools → TEM HALを選択  
Loadを押す。しばらく待つとTstHalNGのウィンドウが立ち上がる
- 左のメニューの上から2行目のHalAutoloaderを選択し、
- 右側のリストの中からPowerSupplyNotOkTimeoutを0から700に変更し
- Saveボタン（フロッピーディスクのアイコン）を押して終了

## ◎2日目の作業

- Falcon4iとCetaは自動で冷却されてるはず
- cassetelにgridを1つ入れて、Nanocabに入れて、液体窒素で冷やす  
電顕に入れて、-160℃になったら、inventory / inventory stop  
gridをLoadする
- TUI → Setup → Filterで、EFTEMを黄色にする
- EPUを立ち上げて、アラインメントの準備を行う  
まず、Atlasを撮ってみる。もし以下のエラーが出たら、対応する

### 注意点1

EPU起動時、以下のメッセージが出た場合は、

One or more Root Storage Paths are not available, contact Service.

Root Storage Path 192.168.10.2 OffloadData is not available.

Press Ignore to start EPU with Athena. Press Retry to check again.

Ignoreを押して、EPUを立ち上げて、Atlasを撮ると、以下のメッセージが出るので、

Atlas acquisition failed: Failed executing AcquireTile activity:

Falcon 4i is not operation: The storage server is not connected to the microscope PC

- 上記の場合は、以下の対応が必要となる  
Falcon4サーバーの再起動（サーバーのOff/OnのみでOK）が必要  
Offloadが見えるようになったら、EPUを閉じて、再度立ち上げて見る  
OffloadData is not available文句がなくなるので、Ignoreで進める
- Reset Selectedを押して、もう一度atlasを撮り直す  
atlas撮影が開始できたら、アラインメント作業に進める

## 注意点2

- atlas撮影時、縦に黒い影が縞になる現象が起きると、energy filterが写っている可能性がある  
Microscope Software LauncherのToolsで、  
EnergyFilterMonitorでSlitをInsert/Retractして、Insert状態としてから、  
アラインメントを継続する

もし、アラインメント（7番目のEnergy Filter関連）時、  
SherpaのEnergy FilterのZero loss 「Center」で、  
Acquiring dark image with retracted slitの状態ですり（Running中）し、  
終了できない状態になった場合は、  
Windows Task ManagerでPythonをEnd taskして、強制終了させてSherpa再起動後  
EnergyFilterMonitorでSlitをInsert/Retractして、Insert状態としてから、  
（EnergyFilterMonitorは開いたまま行う。）  
SherpaのEnergy FilterのZero loss 「Center」することで、解決できることがある

## **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