

# KEKクライオ電子顕微鏡 (Talos Arctica, Falcon4)

## 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)

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]、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-VI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.17

**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.18
2. C2絞りの中心合わせ (週 1 回) .....	p.19
3. ピボットポイントの調整 (週 1 回) .....	p.20
4. Rotation Center (週 1 回) .....	p.20
5. 位相板への焦点合わせ (週 1 回) .....	p.21
6. 対物絞りの中心合わせ (週 1 回) .....	p.22
7. AutoCTF (週 1 回) .....	p.23
8. EPUにおけるdose, fractionの設定 (測定前) .....	p.24
9. Gain reference (週 1 回) .....	p.25
10. EPUの倍率間の中心合わせ (週 1 回) .....	p.26

**V. その他**

1. EPUのPreparationの設定 .....	p.27
2. グリッドのアセトン処理 (必要に応じて) .....	p.29
3. グリッド作製の液体窒素の補充 (必要に応じて) .....	p.29
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.29
5. AutoloaderのConditioning (月1回程度) .....	p.29
6. 長期休暇時の対応 .....	p.30
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.32
8. Talos Arcticaのレンズ/絞りの構成 .....	p.38

**VI. 補遺**

1. EPU-DでmicroED測定を行う際の手順 .....	p.39
---------------------------------	------

**変更履歴**

日本語第 01 版	18.05.11.	安達 成彦	初版
日本語第 02 版	18.05.13.	安達 成彦	軽微な変更
日本語第 03 版	18.05.13.	安達 成彦	FEIのカタログより写真を追加
日本語第 04 版	18.05.22.	安達 成彦	Section IVに追記
日本語第 05 版	18.05.22.	安達 成彦	軽微な変更
日本語第 06 版	18.06.11.	安達 成彦	重要事項を赤字に変更。位相板なし・Counting modeの測定条件を追加
日本語第 07 版	18.06.12.	安達 成彦	軽微な変更
日本語第 08 版	18.06.13.	安達 成彦	トラブルシューティングを追加
日本語第 09 版	18.06.14.	安達 成彦	軽微な変更
日本語第 10 版	18.06.15.	安達 成彦	Preparationの表の内容を変更
日本語第 11 版	18.06.16.	安達 成彦	軽微な変更
日本語第 12 版	18.06.25.	安達 成彦	変更履歴を追加
日本語第 13 版	18.07.09.	安達 成彦	プレーカーが落ちた時の対応を追記。その他、各種変更
日本語第 14 版	18.07.18.	安達 成彦	作成協力の項目を追記
日本語第 15 版	18.07.26.	安達 成彦	軽微な変更
日本語第 16 版	18.08.07.	安達 成彦	電源のシャットダウンと立ち上げを追記
日本語第 17 版	18.08.23.	安達 成彦	Talos Arcticaのレンズ構成などを追記
日本語第 18 版	18.10.11.	安達 成彦	EPUによる自動測定の場合5通りに場合分け
日本語第 19 版	18.10.15.	安達 成彦	AutoCTF, ピボットポイントの項目を変更。
日本語第 20 版	18.11.06.	安達 成彦	AutoCTFの順序を変更。トラブルシューティングを追加
日本語第 21 版	19.03.26.	安達 成彦	EPU, TEM User Interfaceのversion upに伴い改訂
日本語第 22 版	19.03.28.	安達 成彦	Auto Eucentricの手順を改訂
日本語第 23 版	19.04.02.	安達 成彦	AutoCTFの手順を改訂
日本語第 24 版	19.04.11.	安達 成彦	アラインメントの手順について、部分的に変更
日本語第 25 版	19.07.02.	安達 成彦	LMでのEucentric focusを追加。Image shiftを用いた撮影を追加。
日本語第 26 版	19.12.19.	安達 成彦	EPU, TEM User Interfaceのversion upなどに伴い改訂
日本語第 27 版	20.02.27.	安達 成彦	長期休暇時の対応などを追記。Section V. 補遺 (microED, Relion) を追記
日本語第 28 版	20.06.01.	安達 成彦	microEDの項目などを改訂
日本語第 29 版	21.05.28.	安達 成彦	EPU-Dの導入に合わせてmicroEDの項目を改訂。他、様々な項目を改訂
日本語第 30 版	21.08.24.	安達 成彦	Linearの条件設定を変更。microEDの項目を改訂。他、様々な項目を改訂
日本語第 31 版	21.10.26.	安達 成彦	Falcon4の導入に合わせて様々な項目を改訂
日本語第 32 版	22.07.14.	安達 成彦	Talosの新機への移転に合わせて様々な項目を改訂。microEDの項目を改訂
日本語第 33 版	22.12.25.	安達 成彦	トラブルシューティングを追記。Titanのtextに合わせて様々な項目を改訂
日本語第 34 版	26.04.13.	安達 成彦	EPU及び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
  - 液体窒素のバ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で親水化処理を行う (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ずらす
  - 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 (スタップ対応) 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 2.24.1、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、スタップに連絡する)

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  ボタンを押す (\*2-3分かかります)

### ・左側の画面：TUI>Setupタブ>Vacuum

- 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  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=180umと入力して、 ボタンを押す

### ・右側の画面：EPU>Atlasタブ

- , , ,  (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)
- (\*5x5で全体像を撮影するのでしばらく待つ)

\*KEK-Talos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	120k (1.08Å)	~4 秒	No	スクリーニング
#2	なし	Counted	92k, 120k, 150k (1.08, 0.84, 0.66Å)	~7,4,4 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	92k, 120k, 150k (1.08, 0.84, 0.66Å)	~7,4,4 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・x120k・~4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, #3では必要に応じ使用), 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=PhP4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, 120s
- TUI>Autoloaderタブ>Aperture>Option>PhasePlateを見て、位相板のNextを押す  
(\*位相板の影が出るのでPhP4のposition1-12, 20-32, 39-52, 58-71を使うのが良い)
- 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・x92k/120k/150k・~7,4,4秒・AFIS無し**

- ・ **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Acquire**  
Square中央にいなければ、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を選び終わったらカーボンの破れた所に移動。Preparation>GridSquareで**Preview**(破れ場所確認)
- EPU>Preparationタブで、Data acquisitionにして**Set**。**C2=50, Obj=100**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
- Dose Rateの**measure**を押し、緑の範囲にいるか確認。
- Fractions(Nr)に、50と入力して、Enterを押す(自動で計算される) (スクショ: dose) **Get**
- **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=100**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, 120s (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・x92k/120k/150k・~7,4,4秒・AFIS有り**

- ・ **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Acquire**  
Square中央にいなければ、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を選び終わったらカーボンの破れた所に移動。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
- Dose Rateの**measure** を押し、緑の範囲にいるか確認。
- Fractions(Nr)に、50と入力して、Enterを押す(自動で計算される) (スクショ: dose) **Get**
- **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, 120s (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

#### ・x8500の画像がおかしい(画像が変に拡大されてしまう)

→ 高さの設定がずれて、おそらく $z=0\mu\text{m}$ になっています。Hole selectionの際に高さ設定ができていないので、Skip Grid Squareをしてから、同じSquareをReopenした後にHole selectionのところまで戻り、Auto EucentricかAuto Functions経由で高さ合わせをするか、EPUのsessionを新しく作りなおして下さい。

#### ・自動測定中、x750の画像とx8500の画像で、選んでいるHoleが異なる

→ 倍率間の中心合わせがずれているなら再設定します。EPUがバグっている場合は、一度測定をstopして、EPUを落とし、再度EPUを立ち上げると改善することが多いです。ただし、狙ったholeの隣に氷の張ってないholeがあるとそちらを選んでしまう傾向もあります。

#### ・EPUの測定がいきなり停止するなどして、TEM User Interfaceの中央下のProt.の表示が、普段の%ではなく、「?」や「Do calibration」となる。(=こうなるとカメラが温まり、Cooling(F)が赤/橙色になります)

→ 何らかの理由で操作PCからFalconカメラへの通信が行きっぱなしになった場合にこうなるそうです。この場合、一度Falconカメラをリセットする必要があります。以下にいくつかの対策を示します。

対策1：操作PCをlog off/log inするか、再起動する。(これで治ればラッキー)

対策2：service用のMicroscope Software LauncherのToolsから、Camera and detectorのFalcon Service Toolを選ぶ。現れたWindowのCSUタブを選び、右下の Reboot CSUボタンをクリックする。Basic OperationsタブのSensor temperatureが下がり始めればOK。-25℃まで下がってCooling(F)がStable(緑色)になるまで待つ。その後、SetupのFEG controlのGuns lensの値を、4.2から4.1にして、4.2に戻すと、Do calibrationが解除されるはずです。

対策3：操作PCをshut downした状態で、Falconカメラコントローラーの電源ケーブルを一度抜いて刺し、PCを起動する。

### ・画像に水滴のようなものが見える

→ 位相板がチャージアップしすぎか、位相板にゴミがついています。Nextボタンで場所を変えるか、PhP2, 3, 4, 5, 6などを使いましょう。

### ・いきなりブレーカーが落ちた

→ 原因はどうあれ、こうなったら基本的に、KEKスタッフかThermo Fisher社に電話してください。念のため、復旧方法を以下に示します。

- サーバー室に行って、電頭のブレーカーが落ちていることを確認
- 電頭室に戻り、電頭の操作PCの少し上にある、メインスイッチをOFFにする
- ブレーカーをONにしてから、メインスイッチをON
- 操作PCの起動後、User用LauncherでTUIを起動（Hang upしたら操作PCをrestart）
- User用LauncherをExitして、Service用Launcherを立ち上げる
- Toolsから、Vacuum testを選んで、
  - Manual Modeをクリックしてから、IGPa, IGPcoをクリック
  - それぞれが緑になったら、もう一度Manual Modeをクリック
  - Evacuate Allを押す
- Toolsから、Autoloader Vacuumを選んで、Pumpを押す
- ApertureのOptionのEnableタブで、C2, Obj, SAを黄色にする
- FEG controlのOptionを見て、Powerが押せるようになったら押す
- Auto LoaderのOptionを見て、Initialize
- SetupのHigh tensionが押せるようになるまで待つ。
- 電源が落ちてから（or 落としてから）すぐ復帰するときは Warm start
- High tensionのOptionを見ながら、電圧を80kVから200kVに上げていく
- CetaとFalconを認識しない場合、TUIを再起動か、電源ボードのケーブルを抜き差し
- Toolsから、Camera and detectorのFalcon service toolを選ぶ
- CSUのタブを選んで待つ。ダメならRebootする。（温度が-18℃/-25℃になるはず）
- Align>AlignmentsのOptionを押して、Fileから200を選び、
  - Availableにあるものを全てSelectedに移動して、Applyを押す。
- Align>FEG registerのfileから、200kV TEMを選んでSetを押す。
- Auto Loader>Temp ControlのStatusを見て、
  - Errorが出たらOption>StateのRecoverを押す

### **・自動測定中、Autofocus did not convergeのエラーが出た**

→ Tomography TEMなどでx22,000, -10umなどでAutoFocusのCalibrationをした後、EPUでx92,000で自動測定しようとする、倍率が変わりすぎているのでエラーが出ます。この場合はKEKスタッフを呼んでください。以下の通りに対応いたします。（\*この操作は勝手に行わないでください！）

- 一通りのアラインメントを行う（\*特にpivot pointと高さがあってないとダメ）
- Preparation tagでHole/Eucentricにしてset
- カーボン膜上に移動
- Hole/EucentricにしてAuto Eucentric by stage tilt
- Preparation tabでData Acquisitionにしてset
- Data AcquisitionにしてAuto Eucentric by stage tilt
- AutoFunction tabで、Data Acquisitionを選ぶ
- CalibrationのAutoFocusを選んでスタート
- あとは指示にしたがって進む

### **・x8500でAuto Eucentricや測定した後にx700で測定すると、輪っかが見える**

→ 見えている輪っかは、カーボン膜にたまったChargeの影響です。通常は見えないものなのですが、x700のdefocusがきつすぎると見えます。TEM User Interfaceでは、SAとLMでdefocus値をそれぞれ記憶していますが、LMのdefocusが変な値を覚えている可能性があります。アラインメントの最初に、EPUのPreparationタブのPresetsからGrid squareを選んで、Eucentric focusボタンを押すよう手順を変更したので、そのようにしてください。

### **・Do calibrationが出て、本当にCalibrationをしないといけない場合**

→ Align>AlignmentsのOptionで一連のFileを右から左に移してApplyし、Align>FEG registerでfileを選んでSet。Falcon Camera>Falcon Protector Calibrationから、プルダウンメニューの下3つ（Calibrate Microprobe, Nanoprobe, LM）を以下の順で実行。

- Calibrateを押しC2のCenteringして（=Beam Shift で光を中央に移動）、Next
- IntensityダイヤルでC2 Lensの値を100%にして（=光を最大に広げて）、Next
- Focus Beamと出るのでIntensityダイヤルで光を一番小さくして中央に移動して、Next

**・ Boards degradedのエラーが出てProt: ?となっている。**

→ 以下の通りに対応。

- Service用Microscope Software Launcher>Tools>Opticsを選ぶ
- Optics Boards Diagnostics and Controlを選ぶ
- 開いたWindowのどこかにDegradedと表示されているはず
- 左下のRecoverを押す (表示がAll Greenになる)
- Prot: ?のままであったり、TEM UIでFalconが見つからない場合は、制御PCを再起動したり、Falcon4の電源コードを抜き差しする

**・ Search>SettingsでStageを動かさない。AutoLoaderのLoadが押せない。**

→ 以下の通りに対応。

- Service用Microscope Software Launcher>ToolsからTadUIを選ぶ。
- 開いたWindowから、Compustage>Monitorをクリック
- Control MkIをダブルクリック
- Option>Encoder Power supplyをOFF-ONしてClose
- TadUIをCloseするとSearch>Settings>Enableが白くなる
- Enableを押すと黄色くなる (こうなったらStage, AutoLoaderを利用可能)

**・ Cetaの温度が上がっている**

→ 以下の通りに対応。

- LauncherのToolsから、Camera and detector, Ceta Service Toolを選ぶ
- Basic Operations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)
- CSU タブのShow detailsボタンを押す
- Clear historyボタンを押して履歴をクリア

### 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、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  を押して、 を押してEPUを落とす (落ちるまで30秒くらい待つ)
- EPUを起動 (起動したらWindowを右側の画面に移動)
- TUI>Setupタブ>Vacuumを見て、 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「180μm」入力 → go to

Atlasタブ → screening → グリッドにチェックを入れてSTART

- 蛍光板が上がった状態(=Screen Retracted)でなければ、操作板の  を押して、Retractにする
- EPU>AtlasタブでGridに穴のあいたところに右クリック  で移動
- EPU>Preparationタブで、 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、
- きちんと穴のあいたところにいることを確認する
- を押して蛍光板を下ろす

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

**D:/Preparation/EC\_120k\_240131.xml (0.84Å/pix)**

- TUI>Alignタブ>Alignments>Option>Fileタブから、**200**を選び、 があるものを全て  に移動して、 を押す
- TUI>Alignタブ>FEG registersから、**200**を選び、 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 (\*x510でObj lens=6.0087%)
- 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 (\*x120kでObj lens=86.5350%)
- TUI>Autoloaderタブ>Aperturesを見て、**C2=50, Obj=none**であることを確認
- Magnificationで倍率を17500倍に

### 1回目

- Intensityダイヤルを左に回してビームを絞る  
(光を絞った時、光がうまく絞られない場合は、Naturalになっているか確認し、変更する)
- TUI右下>>を選び、Multifunctionダイヤルで光を中央に移動
- Intensityダイヤルを右に回して、光を画面いっぱいを広げる
- C2の右横のを押して、Multifunctionダイヤルで、  
光の円が画面の四辺に接するように移動する
- C2の横のをもう一度押す

### 2回目

- もう一度ビームを絞って、Multifunctionダイヤルで光を中央に移動
- Intensity右に回して光を画面いっぱいを広げる
- C2の右横のを押して、Multifunctionダイヤルで、  
光の円が画面の四辺に接するように移動する
- 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)
  
- C2=150については確認のみでOK (Beam shiftで光を動かさない)

### 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)

- 光の位置は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
- Magnificationで倍率を28,000倍にして、Intensityを左に回して光を絞った後、右に回して光を広げて、1.8 $\mu$ mの枠に光の大きさを合わせる
- 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
- 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=180 $\mu$ m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/EucentricHeight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)
- Magnificationで倍率を6,700倍から57,000倍にする
- TUI>Autoloaderタブ>Aperturesを見て、**C2=150 (視野を広げる), Obj=None**とする
- このままだと暗くて何も見えないのでIntensityを左に回して光を絞る
- 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)

(\*透過波だけの位相を変えたいが、位相板のところでビームが点になっていないと、散乱波も位相がずれてしまうので、位相板のある後焦点面に焦点を合わせる。)

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

R1を押して蛍光板を下げる

EPU>Preparationタブ>PresetsからGrid Squareを選び、set (穴にいるのを確認)

EPU>Preparationタブ>PresetsからData Acquisitionを選んで、Set → Ready

Magnificationで倍率を**13,500倍**に下げて、**C2=150 (視野を広げる)**, **Obj=PhP4**とする

(\*位相板の影が出るのでPhP4のposition1-12, 20-32, 39-52, 58-71を使うのが良い)

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

Intensityを**Fine(2回押す)**にして、左右に回してfocusを合わせる (C2:40.843%付近)

(\*Intensity 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、左右に行ったり来たりして、シマシマの向きが90°変わるところを探す)

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

(\*それなりにコツがいるが、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)

終わったら、像が消えるところでIntensityダイヤルを止めて (=Just focus)

Noneを押す (\*これ以降、Intensityダイヤルは触らないこと)

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**x120k**, **C2=50**, **Obj=100**にする

EPU>Preparationタブ>Presetsで、Data Acquisitionで、Get

\*参考：平行照射になるC2 Lensの目安の値 (%) Spot 11: 36.4%, 9: 36.94%, 8: 37.8%,  
Spot 7: 38.5%, 6: 39.55%, 5: 40.7%, 4: 42.0%, **3: 42.2%**, 1: 46.22%

## 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)
- C2=50, Obj=none**にする
- 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=530mmくらいに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**  
(蛍光板の画像の左上に一時停止マークが出ていたら、下の**Natural**ボタンを押す)

## 7. AutoCTF (週1回:非点収差・コマ収差の補正)

- R1を押して蛍光板を上げる (Retracted状態)
- C2=50, Obj=none**にする
- 高さ合わせを、6.対物絞りの中心合わせでしていれば、以下の四角内は不要

- 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を確認し、TUIを**Natural**モードにする
- 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
- Direct Alignments>Beam Shiftを押す
- R1を押して蛍光板を下げる
- 倍率×120K倍のまま、Intensityダイヤルを左に回して光を絞る  
(Fine→Coarseに変えると光の絞るスピードが上がる)
- ビームがずれていたら、MultiFunctionダイヤルで光を中央に移動して、Done
- もう一度、Data Acquisitionで、Setして、倍率120k倍のまま
- 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  
(なければ、Microscope Software LauncherのToolsから、Sherpaを立ち上げる)  
(\*Auto FunctionsタブでもAutoCTFは可能だが、失敗してもエラーが出ない)
- Sherpa Windowの左側にあるAutoCTFボタンを押し、Camera>TypeをBM-Falconに変更
- EC modeなので、Electron countingのボックスにチェックを入れる**  
(Exp. Time=4, Binning=2, Readout=Full, Autofocus to=チェックして、-2.0を確認)
- 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、**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、**C2=50, Obj=100**にして  
再度、**Objective StigmationのCorrect**を押す  
(\*1次の収差がfocus、2次の収差が非点収差、3次の収差がコマ収差)  
(\*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

## 8. 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、Set → Ready
- R1を押して蛍光板を下げる
- きちんと穴のあいたところにいることを確認
  
- 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=100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、x92k, x120k, x150kのいずれかに変更
  
- Manual, On, Off, Dose=~50, Fractions=(1)と設定する
  
- Dose RateのところのMeasureボタンを押す
  - x92kなら、Exp. time=~7 secになったことを確認 (8.8 e/Å<sup>2</sup>/s くらい)
  - x120kなら、Exp. time=~4 secになったことを確認 (9.0 e/Å<sup>2</sup>/s くらい)
  - x150kなら、Exp. time=~4 secになったことを確認 (5.7 e/Å<sup>2</sup>/s くらい)
  
- Fractionsのところに、50と入力して、enterを押す
  
- EPU>Preparationタブ>PresetsをData Acquisitionにして、Get

## 9. Gain reference (週1回: カメラのゼロ点合わせ)

- EPUの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  
(すでにGrid穴のところにいるはず)
- EPUのPreparationタブで、Grid Squareにして、**set** → Ready
- R1**を押して、蛍光板を下ろす  
(きちんと穴のあいたところにいることを目視で確認)
- EPU>Preparationタブ>PresetsからData Acquisitionを選んで、**Set** → Ready
- 倍率を**x120Kのまま**
- TUI>Autoloaderタブ>Aperturesを見て、**C2=50, Obj=100**であることを確認
- Spot size: **4**で、もう一度、**Set**
- 光が画面全体に当たっていることを確認
  
- Software launcher>Tools>Camera and detectorから  
**Falcon4 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x120Kにしてあれば、バーは緑の範囲に入るはず (9.3 e/px/sくらいになるはず)  
(\*Falcon4は4-10 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のfileはEPUで測定を開始すると、  
OffloadData/ImagesForProcessing/BM-Falcon/200kV/の中にコピーされる)
  
- Gain referenceが終わったら、Falcon4 Reference Image Managerは閉じる

## 10. 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
  
- TUI>Autoloaderタブ>Aperturesを見て、**C2=50, Obj=None**とする
- 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で画面の中心に移動
- C2=50, Obj=None を確認
  
- EPU>PreparationタブからCalibrate Image Shiftsを選んで、Acquire、Resumeと表示、再び押す
  
- x120k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）
- x6700の画像を見る。x120kの中心と対応する場所をダブルクリック
- x510の画像を見る。x6700の中心と対応する場所をダブルクリック
- x84の画像を見る。x510の中心と対応する場所をダブルクリック
- Store Calibrationを押す
  
- この後にスクリーニングを行う時も、倍率はx120kのままにする
- EPU>Preparationタブ>PresetsからAcquisition and Optics Settingsを選ぶ
- Data Acquisitionにして倍率x120k確認
- 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にして、Get
  
- 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\_120k with phase plate

	Camera	Binning	Exp. time, etc.	Probe	Mag	Defocus	Spotsize	Int.	Link
Atlas	Falcon4	-	0.50s	-	X84	-1000	8	1.103 C2:150	-
Grid Sq	Falcon4	-	3.00s	-	x510	-200	6	0.880 C2:50	-
Hole/ Eucentric	Falcon4	-	1.00s	Micro	x6700	-50	5	0.624 C2:50	-
Data Acq	Falcon4	-	Manual,On,Off, ~50 e <sup>-</sup> /Å <sup>2</sup> ~4s, (1 fr)	Nano	X120k (0.84Å)	-1	4	0.443 C2:50	-
Autofocus	Falcon4	2	Counted, 1.00s,Off	-	-	-	-	-	Link
Drift Mes	Falcon4	2	Counted, 1.00s,Off	-	-	-3	-	-	Link
Thon ring	Falcon4	2	Counted, 1.00s,Off	-	-	-2	-	-	Link

**測定条件#2,3-92k : Counting mode\_92k (\*x120kから倍率を変更して使用)**

	Camera	Binning	Exp. time, etc.	Probe	Mag	Defocus	Spotsize	Int.	Link
Data Acq	Falcon4	-	Manual,On,Off, ~50 e <sup>-</sup> /Å <sup>2</sup> ~7s, (1 fr)	Nano	X92k (1.08Å)	-1	5	0.443 C2:50	-
Autofocus	Falcon4	2	Counted, 1.00s,Off	-	-	-	-	-	Link
Drift Mes	Falcon4	2	Counted, 1.00s,Off	-	-	-3	-	-	Link
Thon ring	Falcon4	2	Counted, 1.00s,Off	-	-	-2	-	-	Link

**測定条件#2,3-120k : Counting mode\_120k (\*D:/Preparation/EC\_120k\_211019.xml)**

	Camera	Binning	Exp. time, etc.	Probe	Mag	Defocus	Spotsize	Int.	Link
Atlas	Falcon4	-	0.50s	-	X84	-1000	8	1.103 C2:150	-
Grid Sq	Falcon4	-	3.00s	-	x510	-200	6	0.880 C2:50	-
Hole/ Eucentric	Falcon4	-	1.00s	Micro	x6700	-50	5	0.624 C2:50	-
Data Acq	Falcon4	-	Manual,On,Off, ~50 e <sup>-</sup> /Å <sup>2</sup> ~4s, (1 fr)	Nano	X120k (0.84Å)	-1	4	0.443 C2:50	-
Autofocus	Falcon4	2	Counted, 1.00s,Off	-	-	-	-	-	Link
Drift Mes	Falcon4	2	Counted, 1.00s,Off	-	-	-3	-	-	Link
Thon ring	Falcon4	2	Counted, 1.00s,Off	-	-	-2	-	-	Link

**測定条件#2,3-150k : Counting mode\_150k (\*x120k から倍率を変更して使用)**

	Camera	Binning	Exp. time, etc.	Probe	Mag	Defocus	Spotsize	Int.	Link
Data Acq	Falcon4	-	Manual,On,Off, ~50 e <sup>-</sup> /Å <sup>2</sup> ~4s, (1 fr)	Nano	X150k (0.66Å)	-1	4	0.443 C2:50	-
Autofocus	Falcon4	2	Counted, 1.00s,Off	-	-	-	-	-	Link
Drift Mes	Falcon4	2	Counted, 1.00s,Off	-	-	-3	-	-	Link
Thon ring	Falcon4	2	Counted, 1.00s,Off	-	-	-2	-	-	Link

\* Exposure rateについて、total exposureが50e<sup>-</sup>/Å<sup>2</sup>なので、Relionでtotal frame数を50で割った値を入力すれば 1.00e<sup>-</sup>/Å<sup>2</sup> frameとなります。

## 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ろ紙を敷く
- もろ紙の上に、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もろ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、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をにして、を押す
- After Conditioningのところは、  
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

#### 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!**）

#### Falcon4, 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時間後になる  
（このまま12時間以上待つ）

### Falcon4, Cetaの冷却をON

- Launcher>Tools>Camera and detectorから、Falcon 4 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、200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、200を選び、Setを押す

\*この後はIV章（p.18-26）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

##### 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 4 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 4 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！

##### 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

## ◎シャットダウン当日

### Transferの立ち下げ

- 立ち下げ順は、Talos Transfer → Falcon4 → 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
- 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

### 温度が5-10℃を越えたら

- サーバールーム1に入って、Falcon4サーバーの電源マークを押してshut down (操作不要)
- 2024年1月の保守作業でFalcon4サーバーの構成が変わったので、  
Falcon4サーバー本体の電源ボタンを1回短く押すだけでシャットダウンできる
- 5-10分ほどかかるので、待つ
- offload data の接続が切れる
  
- Software Launcher で電顕マーク右の□を右クリックして、Stop all を選ぶ  
(エラーメッセージが出た場合は、もう一度 Stop all を選ぶ)  
(もし PC の時間を直す場合は、全てが止まってから、ここで行う)
  
- 全てが止まったら、操作 PC の電源を落とす  
→Training data の接続が切れる
  
- Support PC も電源を落とす  
→閲覧用の HDD の点灯も消える。
  
- 電顕本体のメイン電源を落とす (左に回して、OFF にする)
  
- チラーをとめる (OFF ボタンを押す)  
**注意!** 停電などで、**真冬**にチラーを止める場合は、室外機が外部にあるので、  
熱交換器の配管などが**凍結**して破裂する可能性があるため、  
停電などが終了したら、できるだけ早く電源を入れて冷却水を循環させておくのが良い
  
- サーバールーム 1 の UPS の電源を OFF (Hub, FSSW, Transfer の電源が落ちる)

◆電顕の立ち上げ

## ◎1日目の作業：電源関連

- サーバー室1にあるUPSの電源を入れる。(Hub, FSSW, Transferの電源がON)
- チラー、電顕本体の電源をON (5分くらい待つ)  
(シャットダウン時、ブレーカーは落とさないで、ONになっているはず)
- 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)  
(蓋を開けたままにする：OFFの印)
- 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  
Microsoft Software Launcherから、▷ボタンを押して、TEM User Interfaceを立ち上げる  
途中で止まって何も進まない場合は、Messageを確認  
stop applications → start server and applications → stop all  
もう一度、▷ボタンでstart  
Hang upしたら操作PCをrestart
  
- 立ち上がったらservice用に切り替え  
(Software Launcherを閉じて、service用のMicrosoft Software Launcherを立ち上げ)  
(service用のMicrosoft Software Launcherは、windowsのマークを押すとある)
- Setup>VacuumのOptionのControlからTo All Vacuumを押す
- \*Tools>Vacuum Testか、TUI右下>Vacuum Testを開き、残り時間を確認  
TMP status infoのSpeedが100%まで上がるのを見守る)  
Talos vacuum overviewにてVacuum StateがAll Vacuum(Closed)になれば大体OK  
しばらくかかる
  
- 注1**：再立ち上げ時、To All Vacuumを押してもガ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
  
- Autoloader>AutoloaderのOptionのVacuum ONが押せるようになったら押す  
(Setup>Vacuum, Columnが自動的に37logになる。1.5hrほど待ちになる)
- 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100minくらいかかる)  
→Extraction: 4300V、FEG Emission: 245uAになる
  
- 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: All Nitrogen Tempを選び、12時間後の日時を入力して  をクリック  
(まだ真空引きが足りないので、真空引きを十分してから冷やすため、12時間後にする)
  
- Apertures>Option>EnableでCondensor2, Objective, Selected Areaをクリックし、黄色にする
  
- サーバーの立ち上げ順は、Falcon4 → Lustre1 → Talos Transferである  
Falcon4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、  
Talos Transferも立ち上げてOK

## ◎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にチェックを入れて、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)
  
- 2026年1月の保守点検作業後、Thermo Fisherから、  
電顕本体の再起動時には以下の作業が必要とのこと (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

## 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  
natural, 倍率は低いLMで見えるはず
  
- Align>AlignmentsのOptionを押して、Fileから200を選んで、  
Availableにあるものを全てSelectedに移動して、Applyを押す
- Align>FEG Registerのfileから、200を選んでSetを押す
  
- 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
  
- アラインメントを行う

### 注意点

- ・ 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 4 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を進める
- ・ 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

### アラインメント時の注意点

- ・ アラインメント2番目の「C2絞りの中心合わせ」時、  
Intensityの調整時、coarseが点いてない状態なので、coarseを押して、調整する必要がある
- ・ アラインメント3番目の「ピボットポイントの調整」時、赤い枠が見えてないはず。  
倍率をSA28000倍にして、画面上部の赤い□を選択し、画面に適当に□を書いた後、  
画面右側のannotation Propertiesで、WとHに1.8umを入力して、赤い先を引く

## **8. Talos Arctica のレンズ/絞りの構成**

Talos Arctica 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)

C2 Lens (\*intensity)

C2 Aperture

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

## **VI. 補遺**

### **1. EPU-DでmicroEDの測定を行う際の手順**

・ Gridは穴あきGrid (Quantifoil, Cu300, R1.2/1.3など) を使うこと。そのほうが、結晶がない場所でも高さ合わせをできるので、結晶へのダメージを軽減できる

・ GridをCassetteに入れる際、常温グリッドの場合は上から順に（#12から順に）、

#12 Evap. Aluminium Film (S108, 3.05mm)

#11 サンプル 1

#10 サンプル 2

#09 サンプル 3

などとする。 常温保存Gridは、液体窒素の泡がGridに直撃してカーボン膜が破れないよう、Cassetteの#12から順に入れる

NanoCabの液体窒素量も少なめにする

手順としては、一度、NanoCabに液体窒素を満タンで入れて、揮発するのを待つ  
そこそこ揮発したら、NanoCab内部のピンが浸るくらいまで液体窒素を追加する  
そうしたら NanoCab にカセットを入れて、すみやかに電顕に入れる

**・ microED用のAlignment (\*Gun lens=8, Extractor=4200の設定)**

まずはEPUを切って、EPU-Dを立ち上げた状態で以下を行う。(エラーが出たら Reset)

**およそのアラインメント**

- 蛍光板を上げた状態でColumn Valvesを開く
- アラインメント用のGridでAtlasを撮影し、EPU-DでSession Setup & New session
- Gridなしの状態、もしくはAtlasなどで、Gridに穴のあいたところに右クリックで移動
- Preparationタブで、Grid Squareにしてsetして、蛍光板を下ろす  
(きちんと穴のあいたところにいることを確認)
- Preparation>Importで、**D:/Preparation/microED\_EPUD\_220117.xml**を選択
- Image Acquisitionの設定をSpot size=11から9に変更 (\*11 だと暗すぎるので)**
- Align>AlignmentのOptionを押して、Fileから**200\_GL8**を選び、  
Availableにあるものを全てSelectedに移動して、Applyを押す
- Align>FEG registerのfileから、**200kV\_GL8\_Ex4300**を選んで、Setを押す  
(\*Do calibrationが出た場合は、p.15を参考にCalibrationを行い、200kV\_GL8\_Ex4300を上書き)

**測定条件 : microED (\*D:/Preparation/microED\_EPUD.xml)**

	Camera	Binning	Readout	Exp. time, etc.	Probe	Mag	Defocus	Spotsize	Int.
Atlas	Ceta	2	Full	0.50	Micro	X115	-1000	8	1.103 C2:150
Grid Sq	Ceta	2	Full	3.00	Micro	X700	-200	8	0.685 C2:150 C2:60%
Search/Auto Eucentric	Ceta	2	Full	2.00	Nano	X4300	-10	8	0.992 C2:150 C2:95%
Imaging Acq	Ceta	2	Full	1.00	Nano	X13500	-5	11	0.464 C2:50
<b>Diffraction Acq</b>	<b>Ceta</b>	<b>2</b>	<b>Full</b>	<b>0.50</b>	<b>Nano</b>	<b>0.53m</b>	<b>0</b>	<b>11</b>	<b>0.467</b> <b>C2:50</b>

\*~0.07 e/Å<sup>2</sup>/s

### C2絞りの中心合わせ (C2=50)

- 前頁の続きで、Gridに穴のあいたところにいるはず。蛍光板も下ろしたままでOK
- Preparationタブで、Grid Squareにして、set
- 操作パネルのEucentric focusボタンを押す (\*700xで、Obj lens=6.0087)
- Preparationタブで、Image Acquisitionにして、set
- 操作パネルのEucentric focusボタンを押す (\*13500xで、Obj lens=86.5350)
- C2=50, Obj=noneにして、蛍光板を下ろし、倍率を17500倍に

### 1回目

- Intensityダイヤルを左に回してビームを絞る
- Direct AlignmentsからBeam shiftを選び、Multifunctionダイヤルで光を中央に移動
- Intensity右に回して光を画面いっぱい広げる
- C2の横のAdjustを押して、Multifunctionダイヤルで、光の円が画面の四辺に接するように移動する
- C2の横のAdjust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Doneする (\*光の輪がほぼ同心円状に広がればOK)

### C2絞りの中心合わせ (C2=20) (\*C2=20を使わないのであれば、ここは不要)

- TUIの四角を描く機能で、0.72x0.72umの正方形を描く
  - 座標をX=0, Y=0として、Enter
  - TUIで、C2=20に変えて、Intensityダイヤルを左に回してビームを絞る
  - Direct Alignmentsから、Beam shiftを選び、Multifunctionダイヤルで光を中央に移動
  - Intensity右に回して光を0.72umくらいに広げる
  - C2の横のAdjustを押して、Multifunctionで光が0.72umの枠に接するように移動
  - C2の横のAdjustをもう一度押す
- 以上を何回か繰り返す

### ピボットポイントの調整

- 光の位置は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-DのPreparationタブで、Image Acquisitionにして、Set
- C2=50, Obj=noneにして、蛍光板を下ろす
- 倍率を28,000倍にして、Intensityを左に回して光を絞った後、  
右に回して光を広げて、1.8umの枠に光の大きさを合わせる
- Direct Alignmentsから、nP Beamtillt pp Xを選ぶ
- MultiFunctionダイヤルX (とY)で、点滅する2つの光が重なるように微調整する
- Direct Alignmentsから、nP Beamtillt pp Yを選んで同様に合わせる
- Doneを押す

### Rotation Center

- 蛍光板を上げて、AtlasなどでGridに目立つゴミのあるところに右クリックで移動
- Preparationタブで、AtlasのPreviewをとる
- Move stage hereで、目立つゴミのあるところへ移動
- Preparationタブで、Grid SquareのPreviewをとる
- Move stage hereで、目立つゴミのあるところへ移動
- Search>Stageのoptionで、z=180umに合わせる
- Preparationタブで、Search/Auto EucentricのPreviewをとる
- Move stage hereで、目立つゴミのある近くへ移動
- EPU-DタブのAutomated Acquisitionで、Auto Eucentricを押して高さ合わせ  
(\*なかなか合わないようなら、Search/Auto Eucentricの露光時間を2-3secにする)
  
- 蛍光板を下ろして、目立つゴミを探して画面の中心に持ってくる
- 倍率を4300倍から、倍率57000倍にする。C2=150, Obj=none
- このままだと暗くて何も見えないので、Intensityを左に回して光を絞る
- Direct Alignmentsから、Rotation Center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でコマ収差をとらないので、それなりにきちんと合わせる)
- Doneを押す

**位相板への焦点合わせ (Spot size=9)**

- 蛍光板を上げる
  - Atlasで、やぶけて穴が空いているところに移動
  - 蛍光板を下げて、Preparationタブで、GridSquareで、Setして目視で確認
  - Preparationタブで、Image Acquisitionで、Set
  - 倍率を13500倍のままで、C2: 150 (視野を広げる)、**位相板 (PhP4) を入れる**  
(\*位相板の影が出るのでPhP4のposition39-47, 58-67を使うのが良い)
  
  - 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ピークのみを選んで、もやもやが見えるようにする
  - IntensityをFineにして、左右に回して、**ひとまずC2を36.9%に合わせる**  
(\*Intensity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、左右に行ったり来たりして、シマシマの向きが90度変わるところを探す)
  - StigmatorをCondensorにして、Multifunction X,Yで縞々の間隔を広げて網目模様へ  
(\*それなりにコツがいるが、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)  
終わったら、像が消えるところで、Intensityダイヤルを止めて (=Just focus)  
Noneを押す **(\*これ以降、Intensityダイヤルは触らないこと)**
  - Phase plateは、Setup>AperturesのOption>Phase Plateを選んで、Nextを押す
  - TUIの表示モードをNaturalに戻す
  - 倍率13500倍、C2絞りを50、Obj絞りをnoneにする**
  - Preparationタブで、**Image Acquisitionにして、Get**
- \*参考：平行照射になるC2 Lensの目安の値 (%) Spot 11: 36.4%, **9: 36.94%**, 8: 37.8%,  
Spot 7: 38.5%, 6: 39.55%, 5: 40.7%, 4: 42.0%, 3: 42.2%, 1: 46.22%

### 対物絞りの中心合わせ

- microEDでは対物絞りを使わないので必要なし

### AutoCTF

- Atlasでゴミのいるカーボン膜上に移動
- GridSquareとSearch/Auto EucentricでPreviewしつつ、ゴミを画面の中心に移動
- EPU-DタブのAutomated Acquisitionで、Auto Eucentricを押して高さ合わせ
- Defocusが0umであることを確認
- ゴミのあまりないカーボン膜上に移動
  
- 蛍光板を下ろす
- Preparationタブで、Image Acquisitionで、Set
- C2: 50, Obj: noneとして、倍率45000倍にする
- 光がずれていたら、Beam Shiftで中央に (\*CCD の緑枠全体に光が当たるようにする)
- もう一度、Image Acquisitionで、Set
- C2: 50, Obj: noneとして、倍率45000倍にする
- 蛍光板を上げる
  
- Microscope Software LauncherのToolsからSherpaを立ち上げる (少し時間かかる)
- AutoCTFボタンを押して、カメラタイプをBM-Falconにする
- Electron countingのボックスにチェックを入れる**  
(**Focusダイヤルを回してDefocusを-2.5umくらいかける**)  
(**Exp.: 8, Binning: 1, Readout: Full, Auto-focus-to: チェックして-2.0**)
- 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)  
(うまくいかない場合は、Defocusを深くするか、Exposure timeを伸ばす)  
(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と出たら終了。Comaは不要

**位相板への焦点合わせ (Spot size=11)****□ PreparationタブのImage Acquisitionの設定をSpot size=11に戻す**

- 蛍光板を上げる
- Atlasで、やぶけて穴が空いているところに移動
- 蛍光板を下げる (\*Preparation タブで、GridSquareでSetして目視で確認)
- Preparationタブで、Image Acquisitionで、Set
- 倍率を13500倍のままで、C2: 150 (視野を広げる)、**位相板 (PhP4) を入れる**  
(\*位相板の影が出るので、PhP4のposition 39-47, 58-67を使うのが良い)

- TUIの表示モードをLinearに

(**TUI左上のCamera>Settings. Autoのチェックを外して、Exp.time=200に**)

- 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
- IntensityをFineにして、左右に回して、**ひとまずC2を36.4%に合わせる**  
(\*Intensity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、左右に行ったり来たりして、シマシマの向きが90度変わるところを探す)
- StigmatorをCondensorにして、Multifunction X,Yで縞々の間隔を広げて網目模様へ  
(\*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)  
終わったら、像が消えるところでIntensityダイヤルを止めて (=Just focus)  
Noneを押す (**\*これ以降、Intensityダイヤルは触らないこと**)
- Phase plateは、Setup>AperturesのOption>Phase Plateを選んで、Nextを押す
- TUIの表示モードをNaturalに戻す
- **倍率13500倍、C2絞りを50、Obj絞りをnoneにする**
- Preparationタブで、Image Acquisitionにして、Get  
**\*TUI左上のCamera>Settings>Exp.timeは自動で100に戻る**

\*参考 : 平行照射になるC2 Lensの目安の値 (%) **Spot 11: 36.4%**, 9: 36.94%, 8: 37.8%,  
Spot 7: 38.5%, 6: 39.55%, 5: 40.7%, 4: 42.0%, 3: 42.2%, 1: 46.22%

**・測定前の準備****□蛍光板を下ろす**

- Image Acquisitionを選び、13500x, C2=50のまま、Set
- 蛍光板を下ろしたままDiffractionボタンを押して、Magダイヤルで、D=530mmにする
- Focusノブを左右に回して光を一番小さくなる位置を探した後（36.6%くらい）、  
Direct Alignments > Diffraction alignmentで光を画面中央に移動
- ビームストップを出して光が消えることを確認
- Diffraction Acquisitionにして、Get

**・EPU-Dにおける倍率間の中心合わせ**

- Diffraction modeを解除。ビームストップを引っ込める
- Atlas, Grid square, Hole/EucentricHeightで目立つゴミを画面中央に持ってくる
- EPU-DタブのAutomated Acquisitionで、Auto Eucentricを押して高さ合わせ
- Imaging Acquisitionで、Set
- 視野が狭いので、C2 = 150にしてゴミを画面中央に寄せる
- 蛍光板を上げる
- Preparationタグ, Calibrate Image Shifts。Start Calibration を押して開始

**・カメラ長の確認**

- GridをEvap. Aluminium Film (S108, 3.05mm)に取り替える
- Filmの張っている領域に移動
- Z:/にSupervisor\_日付\_時間のDirectoryを作り、その下にNew sessionを作る
- EPU-D>EPU-Dタブ>Automated acquisitionのAuto Eucentricで高さ合わせ
- EPU-DのImage Acquisitionでset。蛍光板を下ろす (C2: 50, Obj: No)
- カメラがBM-Cetaであることを確認。Beam stopを入れて、Diffraction modeにする
- Autoloader>CCD/TV Camera>integration time = 20sec, 1, Full
- 蛍光板を上げる
- D=330mmから1500mmまでの画像を、CCD/TV CameraのAcquireを押し、  
右クリック>Export data>PC TIFF(16Bits)w/scale maker(full res)で  
Z:/Supervisor\_日付\_時間の下に保存
- カメラ長を計算 (\*例えば D=530mmだとKEKのTalos Arcticaでは761mmに相当)

### ・ EPUにおけるdose, fractionの設定

- ここでいったんGridをUnload
- EPU-DのPreparationタブのPresetsをImage Acquisitionにして、Set
- EPU-Dをいったん閉じる
- Column ValvesをOpen
- EPUを立ち上げる
- EPUのPreparationタブのPresetsをData Acquisitionにして、Get
- EPUのPreparationタブのData AcquisitionのC2=150に変更 (Obj=none)
- 光が撮影範囲全体に当たっていることを確認
- EPUのPreparationタブのMeasureを押す (**0.07 e/Å<sup>2</sup>/sくらいになるはず**)
- EPUのPreparationタブのData Acquisitionにて、Exp. Time=1.0secで、Preview
- 画像を右クリック、Export image
- dose.mrcという名前をつけて前頁で作った Z:/Supervisor\_日付\_時間の下に保存

以上でmicroED用のアラインメントは終了

サンプルのGridをステージにLoadする

### ・ EPU-DのAtlasタブ (\*新しいGridを撮影するたびに行う)

- Session set up, New Session, Yes, Apply (\*z: ドライブに保存)
- Searchタブで、180umに設定
- Screeningで、Gridが入っているposition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)  
(\*6x6で全体像を撮影するのでしばらく待つ)

### ・ EPU-DのEPU-Dタブ

- New Session, Yes,
- Batchにチェック、file形式はMrc, Separate files**
- 保存先はz:/のAtlas folderの下にする
- Applyを押す

**・ EPU-DのAtlasタブ\*\***

- 右クリック、Move stage hereで適切なSquareに移動
- 右クリック、Export image with overlayで.jpg画像を保存 (例えばatlas\_s001.jpg)

**・ EPU-DのPreparationタブ**

- GridSquareでPreview撮影
- Squareの中央か高さ合わせをしやすいようなゴミのあるところに移動

**・ EPU-DのEPU-Dタブ**

- Automated AcquisitionのAuto-eucentricを押して高さ合わせ (or EPUで高さ合わせ)

**・ EPU-DのPreparationタブ**

- 正しい高さにおいて、GridSquareで再度Preview撮影
- 右クリック、Export imageで.mrcで保存 (例えばs001.mrc)

**・ EPU-DのPreparationタブ**

- GridSquareの画像で結晶の位置を右クリックして、Move stage here

**・ EPU-DのEPU-Dタブ**

- Batch PositionsのAddをクリックして結晶の位置を登録

**(GridSquare内の結晶について、上の枠内の2つの手順を繰り返す**

**GridSquare内の結晶について選択し終わったら、**

**このページの最初の\*\*に戻り、次のSquareでも同じことを繰り返す)**

**・ EPU-DのEPU-Dタブ**

- Automated Acquisition
- 例えば、Start -50°, End 50°, Increment 1°, Tilt Speed 1°/secに設定
- Start

(\*Diffraction Centerについて、1つ目の結晶の測定でズれていても、なぜか2つ目からは元に戻るのもそのまま放置すればOK)

**(\*連続測定後、Diffraction modeを解除したほうがEPU-Dが落ちにくいかも)**

### **\*測定時のコツ**

- ・測定する結晶について、最初の3つくらいに対しては、以下のチェックを行う
  - Batch positions>Diffraction Screening>Startを押して回折点ができるか確認
  - 同じ結晶をVeloxで200秒くらい撮影してみて、反射数の減少からダメージの程度を調べる  
それによって、露光時間や何度から何度まで撮影するかを考える  
なお、Veloxの使い方は以下の通り
  - Veloxを起動
  - Acquisition windowのsettingを以下のように変更  
Detector: Ceta, Camera: show on Toolbarにチェック  
Mode: Series, Read area and size: 2048x2048, Exposure time: 1s  
Frame combining: 1 frame, series mode: Auto Stop,  
Series size: 200 frames, Shutter: Pre-specimen,  
Disable shutter during imageにチェック, Image correction: Dark and Gain
  - Edit>Preference>Folder>Auto save folderで、保存先をEPU-Dの下に変更
  - Movieの撮影マークを押して撮影開始
  
- ・ひとまず何か1つ測定して、Snap shotとデータ測定時のDiffraction centerがずれていないか確認。  
おそらく、Snap shotでは合っているが、データ測定時はずれているので、以下の手順でデータ測定時のDiffraction centerを合わせる。（そうすると、Snap shot のDiffraction centerはズレることになりませんが）
  - PreparationタブのImaging Acquisitionを選んで、Set
  - Diffractionボタンを押す
  - Direct Alignments > Diffraction alignmentで光を画面中央に移動
  - ビームストップを出して光が消えることを確認
  
- ・見た目の異なる結晶をいくつか撮影して、どういう見た目のものであればディフラクションが出るのかを調べる。同じ見た目の結晶ばかりを撮影すると、completenessが上がりにくくなるかもしれない。  
見た目の異なる結晶を交えて選んで撮影したほうが、completenessが上がるかもしれない。
- ・ **microED測定が終わった際には、電顕内部を綺麗にするためにovernightで、Conditioning bothをすると良いかもしれない。**