

KEK クライオ電子顕微鏡 (Talos Arctica, Falcon 3EC)

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]

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

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 (Linear mode x 3 通り)	p.09
3. トラブルシューティング	p.13

<u>III. 後片付け</u>	p.16
------------------------	------

IV. 自動測定をする前に必要な準備

1. Autoloader の Conditioning (週 1 回)	p.17
2. およそのアラインメント (毎日)	p.17
3. C2 絞りの中心合わせ (毎日)	p.18
4. ピボットポイントの調整 (毎日)	p.19
5. Rotation Center (毎日)	p.19
6. 位相板への焦点合わせ (毎日)	p.20
7. 対物絞りの中心合わせ (毎日)	p.21
8. AutoCTF (毎日)	p.22
9. EPU における dose, fraction の設定 (毎日)	p.23
10. Gain reference (毎日)	p.24
11. EPU の倍率間の中心合わせ (毎日)	p.24
12. EPU のリスタート (必要に応じて)	p.24
13. EPU の Preparation の設定 (必要に応じて)	p.25
14. グリッドのアセトン処理 (必要に応じて)	p.27
15. グリッド作製用の液体窒素の補充 (必要に応じて)	p.27
16. 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
17. Counting mode での撮影 (高分解能解析用の画像を撮る場合: Counting mode x 2 通り)	p.28
18. Image shift を用いた 3x3 hole の撮影方法	p.38
19. 長期休暇時の対応	p.39
20. 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.41
21. Talos Arctica のレンズ/絞りの構成	p.45

V. 補遺

1. EPU-D で microED 測定を行う際の手順	p.46
------------------------------	------

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	フレイ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を 5 通りに場合分け
日本語第 19 版	18.10.15.	安達 成彦	AutoCTF ヒ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 の条件を設定を変更。microED の項目を改訂。他、様々な項目を改訂

英語第 1 版 20.##.##.##.##

日本語第 ## 版を英語に翻訳

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 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 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℃以下が望ましいと言われているので、固化するぎりぎりを使うのが良いそうです。一度固化させてからピンセットのお尻を入れて溶かす方法もあるそうです。

- ☐ 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 ビーカーで液体窒素の注ぎ口にフタをする)



- ☐ AutoGrid alignment 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
- ガラスプレパレートの上に、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=10 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 3 μ L 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て、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下さい！**



- ☐ 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 の先端を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ので注意！）

II. 自動データ測定

*IV に示した事前準備が一通り終わっているならば、以下を行えば OK です。

*TEM User Interface は version 1.15.1、EPU は version 2.5.0.4799REL となっています。

1. Inventory

(*左側の画面の TEM User Interface を使います)

・ Autoloader>Temperature Control

- ☐ NanoCab の Dock が終了したら、
温度表示が全て緑になって、全てが-160℃以下になるまで待つ

・ Autoloader>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 のボタンを押して停止

2. EPU による自動測定 (*右側の画面の EPU を使います)**・ Autoloader>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 (*数分かかります)

・ Setup>Vacuum

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

・ Preparation タブ

- ☐ 左上の Presets のプルダウンメニューから Atlas を選ぶ

- ☐ 上部右端のカメラマークを押して Preview 撮影

(この段階でグリッドが見えなければ、カラムバルブが閉じているので開けましょう。

氷が厚すぎる場合も何も見えませんが、うっすら Grid square が見えるはずです。

どうしてもダメな場合は KEK スタッフか FEI に電話してください。)

・ Atlas タブ

- ☐ **左側の画面の Search>Stage の option で z=180um に。**

- ☐ Session Setup : New Session _____ (番号を記録しておく)

- ☐ Atlas Acquisition : Start (*6x6 で全体像を撮影するのでしばらく待つ)

***KEK では、EPU による自動測定について、サンプルやグリッドの状態に応じて、以下の 5 通りの条件を用意しています。#1 は cryo sample screening、#2,3 は Liner mode での連続測定、#4,5 (p.36-37 に記載) は Counting mode での連続測定に使います。**

条件	位相板	モード	倍率	露光時間	Fraction	目的
#1	あり	Linear	92k	~1.7 秒*	12 枚	粒子状態/分布や氷の厚さを確認
#2	なし	Linear	92k	~1.7 秒*	33 枚	Over night で測定して解析
#3	なし	Linear	120k	~1.7 秒*	33 枚	Over night で測定して解析
#4	なし	Counting	92k	~75 秒*	50 枚	3 日連続測定して本解析
#5	なし	Counting	120k	~65 秒*	50 枚	3 日連続測定して本解析

測定条件#1：位相板あり・Linear・92k・～1.7 秒・12 枚

・ EPU タブ

☐ Session Setup : New session _____ (番号を記録しておく)

(*位相板を使う場合は、Use Phase Plate にチェックを入れること！)

(*保存先は Atlas と同じ folder を選ぶ。Quantifoil は R1.2/1.3 を選択)

☐ Square Selection : Unselect All, 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 Add
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 : ひとまず Acquire で撮影。良い Square か確認。良ければ以下へ。

画面中央で氷が厚くて Hole が見えない時は Move stage here で移動
Auto Functions タブの Auto Eucentric by beam tilt を選ぶ
Presets から Hole/Eucentric を選び、Obj=none で Start
EPU タブに戻り Acquire(Square 中央でなければ中央に戻り 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 : Acquire, **C2=50, Obj=PhP4 に変更**, Find and Center Hole

add Acquisition Area: Defocus = **-1um**

(点線枠の下の方 2 点が、黄色い円と接するように配置)

add Autofocus Area: after distance = **10um**

add Drift Measurement Area: **once/grid**, 0.20nm/s

☐ Automated Acquisition: **Set up>Aperture, Option** で位相板の **Next** を押し, Start Run

(*位相板の影が出るので PhP4 の position 21-31, 39-51, 58-71 を使うのが良い)

☐ **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**

(*撮影時の Skip 率が高い時は、Hole size, 高さ, アラインメントを再確認しましょう)

測定条件#2 : 位相板なし・Linear・92k・~1.7 秒・33 枚

・ EPU タブ

☐ Session Setup : New session _____ (番号を記録しておく)

(*保存先は Atlas と同じ folder を選ぶ。Quantifoil は R1.2/1.3 を選択)

☐ Square Selection : Unselect All, ホイールで拡大, Add, Move stage to grid square

☐ Hole selection : ひとまず Acquire で撮影。良い Square か確認。良ければ以下へ。

**画面中央で氷が厚くて Hole が見えない時は Move stage here で移動
Auto Functions タブの Auto Eucentric by beam tilt を選ぶ
Presets から Hole/Eucentric を選び、Obj=none で Start
EPU タブに戻り Acquire(Square 中央でなければ中央に戻り Acquire)**

measure Hole size, Find Hole, Quality Bar & Brush tool

(複数の Square を選ぶなら、Square selection に戻る)

(必要なら、氷の厚さが異なるいくつかの hole, square を撮影)

☐ Hole を選び終わったら、カーボンの破れた所に移動

☐ Preparation タブで Data acquisition で set。C2=50, Obj=100 にする。

☐ Linear, Manual, No, Dose: ~50, fraction: 33, 倍率: 92k にする。

☐ Dose Rate の measure を押し Get-get-get(e/A^2 を枚数で割り $e/A^2/\text{fraction}$ を計算)

☐ Template definition : Acquire, **C2=50, Obj=100 に変更**, Find and Center Hole

add Acquisition Area: Defocus = -0.5 - -1.5 or -1.5 - -3 um

(測定条件#1 で確認した画像を踏まえて適切な位置に置く)

add Autofocus Area: after distance = Always

add Drift Measurement Area: Always, 0.20nm/s

☐ Template Execution : Preview

☐ Automated Acquisition : Start Run

測定条件#3 : 位相板なし・Linear・120k・~1.7 秒・33 枚

・ EPU タブ

☐ Session Setup : New session _____ (番号を記録しておく)

(*保存先は Atlas と同じ folder を選ぶ。Quantifoil は R1.2/1.3 を選択)

☐ Square Selection : Unselect All, ホイールで拡大, Add, Move stage to grid square

☐ Hole selection : ひとまず Acquire で撮影。良い Square か確認。良ければ以下へ。

**画面中央で氷が厚くて Hole が見えない時は Move stage here で移動
Auto Functions タブの Auto Eucentric by beam tilt を選ぶ
Presets から Hole/Eucentric を選び、Obj=none で Start
EPU タブに戻り Acquire(Square 中央でなければ中央に戻り Acquire)**

measure Hole size, Find Hole, Quality Bar & Brush tool

(複数の Square を選ぶなら、Square selection に戻る)

(必要なら、氷の厚さが異なるいくつかの hole, square を撮影)

☐ Hole を選び終わったら、カーボンの破れた所に移動

☐ Preparation タブで Data acquisition で set。C2=50, Obj=100 にする。

☐ Linear, Manual, No, Dose: ~50, fraction: 33, 倍率: 120k にする。

☐ Dose Rate の measure を押し Get-get-get(e/A^2 を枚数で割り $e/A^2/\text{fraction}$ を計算)

☐ Template definition : Acquire, **C2=50, Obj=100 に変更**, Find and Center Hole

add Acquisition Area: Defocus = -0.5 - -1.5 or -1.5 - -3 um

(測定条件#1 で確認した画像を踏まえて適切な位置に置く)

add Autofocus Area: after distance = Always

add Drift Measurement Area: Always, 0.20nm/s

☐ Template Execution : Preview

☐ Automated Acquisition : Start Run

3. トラブルシューティング

・ 8500x 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 Function 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、750x の画像と 8500x 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 の隣に氷の張っていない 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

→ 原因はよくわかりませんが、こうなったら基本的に、KEK スタッフか FEI 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。

- ☐ 操作室の外に出て、電顕のブレーカーが落ちていることを確認
- ☐ 電顕室に戻り、電顕の操作 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 click してから、IGPa, IGPco を click
 - それぞれが緑になったら、もう一度 Manual Mode を click
 - 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。だめなら 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 で 22,000x, -10um など AutoFocus の Calibration をした後、EPU で 92,000x で自動測定しようとする、倍率が違いすぎるのでエラーが出ます。この場合、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 tag で Data Acquisition にして set
- ☐Data Acquisition にして Auto Eucentric by stage tilt
- ☐AutoFunction tag 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

・8500x で Auto Eucentric や測定した後に 700x 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、700x 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 をしないとイケない場合

→ 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 ダイアルで 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 ダイアルで光を一番小さくして中央に移動して、Next

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 の冷却

- ☐ 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 **4 点** について確認して下さい。

- ・ 電顕の **Column Valve** 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)
- ・ 電顕を使ってない時は **カメラ** をはずす (何かの弾みでカメラが壊れるのを防げます)
- ・ **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. Autoloader の Conditioning (週 1 回 : 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)

2. およそのアラインメント (毎日)

- ☐ 蛍光板を上げた状態で Column Valves を開く
- ☐ 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
- ☐ EPU の 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)

- ☐ EPU の Preparation タブの Import で 001,002,003_.sxml file のいずれかを読み込む
 - *E:/Preparation/001_PhP_Linear_92k_210706.sxml を選択 (1.13Å/pix)
 - *E:/Preparation/002_Linear_92k_210706.sxml (1.13Å/pix)
 - *E:/Preparation/003_Linear_120k_210706.sxml (0.88Å/pix)
- ☐ 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。

3. C2 絞りの中心合わせ (毎日)

- ☐ 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。
- ☐ EPU の 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=6.0349)**
- ☐ EPU の Preparation タブで、Data Acquisition にして set
- ☐ **操作パネルの Eucentric focus ボタンを押す (*92k で Obj lens=86.5350)**
- ☐ C2=50, Obj=none になっていることを確認。倍率を 17500 倍に。

1 回目

- ☐ Intensity ダイアルを左に回してビームを絞る
- ☐ Direct Alignment から Beam shift を選び、Multi function ダイア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、Multi function ダイアルで、
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

2 回目

- ☐ もう一度ビームを絞って、Multi function ダイア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、Multi function ダイアルで、
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 Alignment の Beam shift を Done 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)

4. ピボットポイントの調整（毎日：ビームティルトの設定）

- ☐場所は C2 絞りの中心合わせのときのまま、蛍光板も下ろしたままで OK
- ☐EPU の Preparation タブで、Data Acquisition にして Set
- ☐C2=50, Obj=none になっていることを確認。
- ☐倍率を 28000 倍にして、Intensity を左に回して光を絞る
- ☐Direct Alignment から、nP Beamtilt pp X を選ぶ
- ☐Multi Function ダイアル 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 Alignment から、nP Beamtilt pp Y を選んで同様に合わせる
- ☐Done を押す

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

- ☐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
 - ☐EPU の 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
 - ☐EPU の 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
 - ☐EPU の Preparation タブで Hole/Eucentric の Preview をとる
 - ☐Move stage here で、目立つゴミのある近くへ移動
 - ☐EPU の Auto Functions タブで、Hole/Eucentric にして Auto Eucentric by stage tilt
-
- ☐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 8500 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 Alignment から、Rotation Center を選ぶ。
Multi Function ダイアルで、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、ある程度あっていれば良いそうです)
 - ☐Done を押す

6. 位相板への焦点合わせ (毎日)

(*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)

☐ 蛍光板を上げる

☐ EPU の EPU タブの Square selection など、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、Data Acquisition で Set

☐ 倍率を 13500/17500 倍に下げて 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 21-31, 39-51, 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 focus を合わせる

(*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 で後焦点面に焦点を合わせる

(*それなりにコツがいるが、シマシマを伸ばす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 ダイアルを止めて (=Just focus)

None を押す (***これ以降、Intensity ダイアルは触らないこと**)

☐ 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 92000 倍、C2 絞りを 50、Obj 絞りを PhP4 or 100 にする

☐ EPU の Preparation タブで、

Data Acquisition にして Get

Autofocus にして Get

Drift Measurement にして Get

*参考：平行照射になる C2 Lens の目安の値 (%) Spot 11: 36.3%, 9: 36.94%,

Spot 8: 37.8%, 7: 38.5%, 6: 39.55%, 5: 40.7%, 4: 42.0%, **1: 46.22%**

7. 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)
- ☐ 蛍光板を上げて、ゴミのあるところへ移動 (C2: 50, Obj: none)
- ☐ EPU の Auto Functions タブで、Hole/Eucentric にして Auto Eucentric by stage tilt

- ☐ EPU の Preparation タブで Hole/Eucentric にして撮影。ゴミのないカーボン面へ移動
- ☐ EPU の Preparation タブで、Data Acquisition にして set
- ☐ C2=50, Obj=none
- ☐ **必ず蛍光板を下ろす**
 - (*蛍光板を下ろさずに Diffraction ボタンを押すとカメラが壊れることがあります)**
- ☐ Diffraction のボタンを押す (EPU でエラーが出るが、無視して次に進む)
- ☐ D=530mm くらいになっていることを確認
- ☐ Obj=100
- ☐ TUI は HDR モードにする
 - *ほぼ合っているはずなので、一応確認はするが、以下 3 点はやらないほうが無難
- (☐ Objective の横の Adjust を押す)
- (☐ Multi Function 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終了 (EPU のエラーに対しては Yes を押す)

8. AutoCTF (毎日：非点収差・コマ収差の補正)

- ☐ゴミのあまりないカーボン膜上に移動 (C2: 50, Obj: none)
- ☐Hole/Eucentric の倍率で高さ合わせ (*対物絞りの中心合わせでやってあれば不要)
- ☐Defocus が 0um であることを確認

- ☐EPU の Preparation タブで、Data Acquisition で Set (**C2: 50, Obj: none**)
- ☐Direct Alignments, Beam shift を押す
- ☐倍率 57000 倍にして、Intensity ダイアルを左に回して光を絞る
- ☐光がずれていたら、MultiFunction ダイアルで画面中央に移動
- ☐もう一度、Data Acquisition で Set して、倍率 57000 倍にする
- ☐蛍光板を上げる
- ☐カメラを Falcon にする (Autoloader>CCD/TV Camera で BM-Falcon にして Insert)
- ☐Microscope Software Launcher の Tools から Sherpa を立ち上げる (少し時間かかる)
(*Auto Functions タブ経由でも可能ですが、失敗してもエラーが出ない点がイマイチ)

- ☐**Linear mode なので Electron counting のボックスのチェックは外す**
(Exp.: 4, Binning: 2, 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 Passed と出たら、Coma の Correct を押す (コマ収差をとってくれる)

- ☐右下に Passed と出たら、**C2: 50, Obj: 100** にして、
もう一度、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。アラインメントを最初からやり直しましょう。)

9. EPU における dose, fraction の設定 (毎日)

- ☐ Grid なしの状態、もしくは Atlas など Grid に穴のあいたところに右クリックで移動
- ☐ EPU の 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)
- ☐ EPU の Preparation タブの Presets を Data Acquisition にして Set
- ☐ C2: 50, Obj: 100
- ☐ Exposure Settings を Linear, Manual, No, Dose= ~ 50 ,
Fractions=12 or 秒数の 20 倍にする
- ☐ Dose Rate のところの Measure ボタンを押す
- ☐ Exp. time= ~ 1.7 になったことを確認 ($\sim 30 \text{ e}/\text{\AA}^2/\text{s}$ くらいになるはず)
- ☐ EPU の Preparation タブで、
 - Data Acquisition にして Get
 - Autofocus にして Get
 - Drift Measurement にして Get

10. Gain reference (毎日 : カメラのゼロ点合わせ)

- ☐ Grid なしの状態、もしくは Atlas など Grid に穴のあいたところに右クリックで移動
- ☐ EPU の 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)
- ☐ EPU の Preparation タブで、Data Acquisition にして Set
- ☐ 倍率: 45000, C2: 150, Obj: 100。光が画面全体に当たっていることを確認
- ☐ CCD/TV camera のオプションから Bias Gain を選ぶ
- ☐ Reference Image Manager を押す
- ☐ Linear mode なので、normal@日付のファイルを選ぶ
- ☐ 蛍光板を上げて、measure dose を押す
- ☐ バーが緑の範囲に入っていなければ、Intensity, Spot size, Mag で調節
- ☐ 蛍光板を上げて、measure dose を押す (30-50%の間くらいになるはず)
- ☐ 以上の手続きを繰り返して、バーを緑の中に入れる
(*値が小さすぎる場合は、Beam Blank や Camera Insert がおかしくないか確認。
なお、平行照射にしたいので **Spot size: 1 なら C2 Lens 46.247%** くらいのはず)
- ☐ バーが緑の範囲に来たら Exp:10, #Image to Average: 4 として
Acquired Selected Gain Reference を押す
- ☐ 日付が update されたことを確認
- ☐ EPU の Preparation タブの Data Acq, Preview で、像が flat なことを確認して完了

11. EPU の倍率間の中心合わせ (毎日)

- ☐ Atlas で、低倍率から高倍率まで見えそうな、目立つゴミを探す
- ☐ Preparation タブに戻って、Calibrate Image Shifts、Start Calibration
- ☐ 92000x で見る。よければ Proceed
- ☐ 8500x で見る。92000x と対応する場所をダブルクリックして Proceed
- ☐ 700x で見る。8500x と対応する場所をダブルクリックして Proceed
- ☐ 115x で見る。700x と対応する場所をダブルクリックして Proceed
- ☐ finish successfully と出たら終わり

12. EPU のリスタート (必要に応じて)

- ☐ EPU の window が開いてたら閉じて、Windows の Start から EPU を立ち上げれば OK。

13. EPU の Preparation の設定 (必要に応じて)

以下に、EPU の Preparation の設定例を、参考として示す。

測定条件#1 : Linear mode_92k (*E:/Preparation/001_PhP_Linear_92k_210706.sxml)

	Camera	Binning	Readout	Exp. time, etc.	Probe	Mag	Defocus	Spotsize	Int.
Atlas	Falcon	2	Full	0.50	Micro	115x	-1000	8	1.103
Grid Sq	Falcon	2	Full	2.99	Micro	700x	-200	8	0.685 C2: 60%
Hole/ Eucentric	Falcon	2	Full	Linear,No 1.00	Nano	8500x	-50	8	0.548
Data Acq	Falcon	1	Full	Linear,Man,No ~50e/Å ² ~1.7 s, 12 fr	Nano	92000x	-2	1	0.446
Autofocus	Falcon	2	Full	Linear,No 0.50	Nano	92000x	なし	1	0.446
Drift mes	Falcon	2	Full	Linear,No 1.00	Nano	92000x	-5	1	0.446

*~4.2 e/Å²/fraction

測定条件#2 : Linear mode_92k (*E:/Preparation/002_Linear_92k_210706.sxml)

	Camera	Binning	Readout	Exp. time, etc.	Probe	Mag	Defocus	Spotsize	Int.
Data Acq	Falcon	1	Full	Linear,Man,No ~50e/Å ² , ~1.7 s, ~33 fr	Nano	92000x	-2	1	0.446
Autofocus	Falcon	2	Full	Linear,No 0.50	Nano	92000x	なし	1	0.446
Drift mes	Falcon	2	Full	Linear,No 1.00	Nano	92000x	-5	1	0.446

*~1.5 e/Å²/fraction

測定条件#3 : Linear mode_120k (*E:/Preparation/003_Linear_120k_210706.sxml)

	Camera	Binning	Readout	Exp. time, etc.	Probe	Mag	Defocus	Spotsize	Int.
Data Acq	Falcon	1	Full	Linear,Man,No ~50e/Å ² , ~1.7 s, ~33 fr	Nano	120000x	-2	1	0.446
Autofocus	Falcon	2	Full	Linear,No 0.50	Nano	120000x	なし	1	0.446
Drift mes	Falcon	2	Full	Linear,No 1.00	Nano	120000x	-5	1	0.446

*~1.5 e/Å²/fraction

測定条件#4 : Counting mode_92k (*E:/Preparation/004_Counting_92k_191120.sxml)

参考例	Camera	Binning	Readout	Exp. time, etc.	Probe	Mag	Defocus	Spotsize	Int.
Data Acq	Falcon	1	Full	Counted,Man,No ~50e/Å ² , ~75 s, 50 fr	Nano	92000x	-2	8	0.394
Autofocus	Falcon	2	Full	Linear,No 0.50	Nano	92000x	なし	8	0.394
Drift mes	Falcon	2	Full	Linear,No 1.00	Nano	92000x	-5	8	0.394

*~1.0 e/Å²/fraction**測定条件#5 : Counting mode_120k (*E:/Preparation/005_Counting_120k_191120.sxml)**

参考例	Camera	Binning	Readout	Exp. time, etc.	Probe	Mag	Defocus	Spotsize	Int.
Data Acq	Falcon	1	Full	Counted,Man,No ~50e/Å ² , ~65 s, 50 fr	Nano	120000x	-2	8	0.394
Autofocus	Falcon	2	Full	Linear,No 0.50	Nano	120000x	なし	8	0.394
Drift mes	Falcon	2	Full	Linear,No 1.00	Nano	120000x	-5	8	0.394

*~1.0 e/Å²/fraction

* EC mode, 150k で測定する際は Autofocus の露光時間を 1.00sec にした方が良いです。

14. グリッドのアセトン処理（必要に応じて）

- ☐作業はステンレス机の上で行う
 - （*普通の机だと、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る）
- ☐ガラスシャーレにろ紙を敷く
- ☐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）
 - （*カーボングリッド作成時に残ったプラスチックが溶けるので、親水性が上がる）
- ☐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）

15. 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

16. 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

17. Counting mode での撮影（高分解能解析用の画像を撮る場合）

・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
- ☐ Grid なしの状態、もしくは Atlas など Grid に穴のあいたところに右クリックで移動
- ☐ EPU の 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)

- ☐ EPU の Preparation タブの Import で、004_.xml または 005_.xml file を読み込む
 - *E:/Preparation/004_Counting_92k_191120.xml (1.13Å/pix)
 - *E:/Preparation/005_Counting_120k_191120.xml (0.88Å/pix)
- ☐ 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。

・ C2 絞りの中心合わせ

- ☐ 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。
- ☐ EPU の 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=6.0349)**
- ☐ EPU の Preparation タブで、Data Acquisition にして set。
- ☐ **操作パネルの Eucentric focus ボタンを押す (*92k で Obj lens=86.5350)**
- ☐ C2=50, Obj=none になっていることを確認。倍率を 17500 倍に。

1 回目

- ☐ Intensity ダイアルを左に回してビームを絞る
- ☐ Direct Alignment から Beam shift を選び、Multi function ダイア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 の横の Adjust を押して、Multi function ダイアルで、
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

2 回目

- ☐ もう一度ビームを絞って、Multi function ダイア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 の横の Adjust を押して、Multi function ダイアルで、
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 Alignment の Beam shift を Done 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)

・ ピボットポイントの調整

- ☐ 場所は C2 絞りの中心合わせのときそのまま、蛍光板も下ろしたままで OK
- ☐ EPU の Preparation タブで、Data Acquisition にして Set
- ☐ C2=50, Obj=none になっていることを確認。
- ☐ 倍率を 28000 倍にして、Intensity を左に回して光を絞る
- ☐ Direct Alignment から、nP Beamtilt pp X を選ぶ
- ☐ Multi Function ダイアル 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 Alignment から、nP Beamtilt 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
 - ☐ EPU の 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
 - ☐ EPU の 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
 - ☐ EPU の Preparation タブで Hole/Eucentric の Preview をとる
 - ☐ Move stage here で、目立つゴミのある近くへ移動
 - ☐ EPU の Auto Functions タブで、Hole/Eucentric にして Auto Eucentric by stage tilt
-
- ☐ 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 8500 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 Alignment から、Rotation Center を選ぶ。
 - Multi Function ダイアルで、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、ある程度あっていれば良いそうです)
 - ☐ Done を押す

・位相板への焦点合わせ

(*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)

☐ 蛍光板を上げる

☐ EPU の EPU タブの Square selection など、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、Data Acquisition で Set

☐ 倍率を 13500 倍に下げて、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 21-31, 39-51, 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 focus を合わせる

(*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 で後焦点面に焦点を合わせる

(*それなりにコツがいるが、シマシマを伸ばす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 ダイアルを止めて (=Just focus)

None を押す (***これ以降、Intensity ダイアルは触らないこと**)

☐ 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 92000 倍 or 120000 倍、C2 絞りを 50、Obj 絞りを 100 にする

☐ EPU の Preparation タブで、

Data Acquisition にして Get

Autofocus にして Get

Drift Measurement にして Get

*参考：平行照射になる C2 Lens の目安の値 (%) Spot 11: 36.3%, 9: 36.94%,

Spot 8: 37.8%, 7: 38.5%, 6: 39.55%, 5: 40.7%, 4: 42.0%, 1: 46.22%

・対物絞りの中心合わせ

- ☐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）
- ☐蛍光板を上げて、ゴミのあるところへ移動（C2: 50, Obj: none）
- ☐EPU の Auto Functions タブで、Hole/Eucentric にして Auto Eucentric by stage tilt

- ☐EPU の Preparation タブで Hole/Eucentric にして撮影。ゴミのないカーボン面へ移動
- ☐EPU の Preparation タブで、Data Acquisition にして set
- ☐C2=50, Obj=none
- ☐必ず蛍光板を下ろす
 - （*蛍光板を下ろさずに Diffraction ボタンを押すとカメラが壊れることがあります）
- ☐Diffraction のボタンを押す（EPU でエラーが出るが、無視して次に進む）
- ☐D=530mm くらいになっていることを確認
- ☐Obj=100
- ☐TUI は HDR モードにする
 - *ほぼ合っているはずなので、一応確認はするが、以下 3 点はやらないほうが無難
- （☐Objective の横の Adjust を押す）
- （☐Multi Function ダイアルで、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終了（EPU のエラーに対しては Yes を押す）

・ AutoCTF

- ☐ゴミのあまりないカーボン膜上に移動 (C2: 50, Obj: none)
 - ☐Hole/Eucentric の倍率で高さ合わせ (*対物絞りの中心合わせでやってあれば不要)
 - ☐Defocus が 0um であることを確認

 - ☐EPU の Preparation タブで、Data Acquisition で Set (**C2: 50, Obj: none**)
 - ☐Direct Alignments, Beam shift を押す
 - ☐倍率 92000 倍 or 120000 倍のまま、Intensity ダイアルを左に回して光を絞る
 - ☐光がずれていたら、MultiFunction ダイアルで画面中央に移動
 - ☐もう一度、Data Acquisition で Set して、倍率 92000 倍 or 120000 倍のまま
 - ☐蛍光板を上げる
 - ☐カメラを Falcon にする (Autoloader>CCD/TV Camera で BM-Falcon にして Insert)
 - ☐Microscope Software Launcher の Tools から Sherpa を立ち上げる (少し時間かかる)
(*Auto Functions タブ経由でも可能ですが、失敗してもエラーが出ない点がイマイチ)

 - ☐**EC mode なので Electron counting のボックスにチェックを入れる**
(**Exp.: 8**, Binning: 2, 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 Passed と出たら、Coma の Correct を押す (コマ収差をとってくれる)
- *Linear mode で AutoCTF をした後に、EC mode で AutoCTF をすると、Spot size が 4 から 8 になっているため、成功しても Thon ring の見た目がイマイチな場合があります。その時は、Objective Stigmation-Coma をもう一度やるのが良いでしょう
- ☐右下に Passed と出たら、**C2: 50, Obj: 100** にして、
もう一度、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)

・ EPU における dose, fraction の設定

- ☐ Grid なしの状態、もしくは Atlas など Grid に穴のあいたところに右クリックで移動
- ☐ EPU の 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)
- ☐ EPU の Preparation タブの Presets を Data Acquisition にして Set
- ☐ C2: 50, Obj: 100
- ☐ Exposure Settings を、Counted, Manual, No, Dose= ~ 50 , Fractions= 50 に
- ☐ Dose Rate のところの Measure ボタンを押す
- ☐ 92000 倍なら Exp. time= ~ 75 になったことを確認 ($0.83 \text{ e}/\text{\AA}^2/\text{s}$ くらい)
120000 倍なら Exp. time= ~ 65 になったことを確認 ($0.98 \text{ e}/\text{\AA}^2/\text{s}$ くらい)
- ☐ EPU の Preparation タブで、
Data Acquisition にして Get
Autofocus にして Get
Drift Measurement にして Get

*参考：東大の Talos Arctica での設定 (位相板なし・Counting mode)

Mag. 190Kx, Spot 7
 C2 38.455 % for acquisition (parallel illumination)
 C2 33.500 % for focusing
 Pixel size (uncalibrated) $0.76 \text{ \AA}/\text{pix}$
 Exposure rate (no sample): $0.78 \text{ e}/\text{pix}/\text{s}$
 Total dose $50 \text{ e}/\text{\AA}^2$
 48 fractions (movie frames)
 Exposure time 37.70 s, Align "Yes" (←KEK だと No にしたほうが良いかも,,,))

・ **Counting mode 用の Gain Reference をとる (*90 分以上かかります)**

☐ Grid なしの状態、もしくは Atlas など Grid に穴のあいたところに右クリックで移動

☐ EPU の 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)

☐ EPU の Preparation タブで、Data Acquisition にして Set

☐ 倍率: 120K、C2: 50、Obj: 100、Spot size: 8。

光が画面全体に当たっていることを確認。

☐ CCD/TV camera のオプションから Bias Gain を選ぶ

☐ Reference Image Manager を押す

☐ Counting mode なので、pre_ec@日付のファイルを選ぶ

☐ 蛍光板を上げて、measure dose を押す

☐ バーは緑の範囲に入っているはず (もしも入ってなければ何かおかしい)

(*Falcon 3EC は 0.7 el/pix 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。

なお、平行照射にしたいので **Spot size: 8 なら C2 Lens 37.8%**くらいにする)

☐ バーが緑の範囲に来たら、Acquired Selected Gain Reference を押す (45 分かかる)

☐ 日付が update されたことを確認

☐ post_ec@日付についても同様にやる (45 分かかる)

☐ EPU の Preparation タブの Data Acq, Preview で、像が flat なことを確認して完了

測定条件#4 : 位相板なし・Counting・92k・~75 秒・50 枚

・ EPU タブ

☐ Session Setup : New session _____ (番号を記録しておく)

(*保存先は Atlas と同じ folder を選ぶ。Quantifoil は R1.2/1.3 を選択)

☐ Square Selection : Unselect All, ホイールで拡大, Add, Move stage to grid square

☐ Hole selection : ひとまず Acquire で撮影。良い Square か確認。良ければ以下へ。

画面中央で氷が厚くて Hole が見えない時は Move stage here で移動

Auto Functions タブの Auto Eucentric by beam tilt を選ぶ

Presets から Hole/Eucentric を選び、Obj=none で Start

EPU タブに戻り Acquire(Square 中央でなければ中央に戻り Acquire)

measure Hole size, Find Hole, Quality Bar & Brush tool

(複数の Square を選ぶなら、Square selection に戻る)

(必要なら、氷の厚さが異なるいくつかの hole, square を撮影)

☐ Hole を選び終わったら、カーボンの破れた所に移動

☐ Preparation タブで Data acquisition で set。C2=50, Obj=100 にする。

☐ Counted, Manual, No, Dose: ~50, fractions: 50, 倍率: 92k にする。

☐ Dose Rate の measure を押し Get-get-get(e/A^2 を枚数で割り $e/A^2/\text{fraction}$ を計算)

☐ Template definition : Acquire, **C2=50, Obj=100 に変更**, Find and Center Hole

add Acquisition Area: Defocus = **-0.5 - -1.5 or -1.5 - -3 um**

(測定条件#1 で確認した画像を踏まえて適切な位置に置く)

add Autofocus Area: after distance = **Always**

add Drift Measurement Area: **Always**, 0.20nm/s

☐ Template Execution : Preview

☐ Automated Acquisition : Start Run

測定条件# 5 : 位相板なし・Counting・120k・~65 秒・50 枚

・ EPU タブ

☐ Session Setup : New session _____ (番号を記録しておく)

(*保存先は Atlas と同じ folder を選ぶ。Quantifoil は R1.2/1.3 を選択)

☐ Square Selection : Unselect All, ホイールで拡大, Add, Move stage to grid square

☐ Hole selection : ひとまず Acquire で撮影。良い Square か確認。良ければ以下へ。

**画面中央で氷が厚くて Hole が見えない時は Move stage here で移動
Auto Functions タブの Auto Eucentric by beam tilt を選ぶ
Presets から Hole/Eucentric を選び、Obj=none で Start
EPU タブに戻り Acquire(Square 中央でなければ中央に戻り Acquire)**

measure Hole size, Find Hole, Quality Bar & Brush tool

(複数の Square を選ぶなら、Square selection に戻る)

(必要なら、氷の厚さが異なるいくつかの hole, square を撮影)

☐ Hole を選び終わったら、カーボンの破れた所に移動

☐ Preparation タブで Data acquisition で set。C2=50, Obj=100 にする。

☐ Counted, Manual, No, Dose: ~50, fractions: 50, 倍率: 120k にする。

☐ Dose Rate の measure を押し Get-get-get(e/A^2 を枚数で割り $e/A^2/\text{fraction}$ を計算)

☐ Template definition : Acquire, **C2=50, Obj=100 に変更**, Find and Center Hole

add Acquisition Area: Defocus = **-0.5 - -1.5 or -1.5 - -3 um**

(測定条件#1 で確認した画像を踏まえて適切な位置に置く)

add Autofocus Area: after distance = **Always**

add Drift Measurement Area: **Always**, 0.20nm/s

☐ Template Execution : Preview

☐ Automated Acquisition : Start Run

18. Image shift を用いた 3x3 hole の撮影方法

□Hole を選ぶ際、3x3 の撮影に合わせて、2 コ飛ばしで Hole を選ぶ

(*Square の端の Hole を選ばないように気をつける)

□EPU の Preparation にて、Presets を Hole/Eucentric にして set

- ・倍率を 8500x から 4300x に変更 (*KEK だとこの倍率で 3x3 が 1 画面に入る)
- ・NanoProbe から MicroProbe に変更 (*Dose protection かかるなら Intensity 弱める)
- ・Spot Size=4、Exp. Time=2sec に変更
- ・いったん set を押して、操作パネルの Intensity ダイアルを使って C2 Lens = 80%
- ・Hole/Eucentric のまま Get

***3x3 で測定する場合、以下の赤字部分を変更することになります**

	Camera	Binning	Readout	Exp. time, etc.	Probe	Mag	Defocus	Spotsize	Int.
Hole/ Eucentric	Falcon	2	Full	Linear, No 2.00	Micro	4300x	-50	4	0.848 C2: 80%

□Obj=none にする

□Template definition で、Acquisition Area を置く際、

- ・Max Image Shift=10 に変更 (値が小さいと Image shift を許容できずエラーが出る)
- ・Defocus について、-1 ~ -2.5um に設定する場合、
1 枚ずつ撮影するとき、もし-1um, -1.5um, -2um, -2.5um としているなら、
最初の 9 つを-1um、次の 9 つを-1.3um、次の 9 つを-1.6um、、、など、
少し細かめに設定 (*Skip 時に特定の defocus がごっそり抜けるのを避けるため)
(*9 つの hole について、右上を-1, 右中を-1.5, 右下を-2, などとするのは、
特定の defocus が特定の tilt angle になるのでイマイチかも)

□Hole/Eucentric の倍率を変えているので、

Image Shift Calibration を合わせなおす (これをやらないと Skip が連発します)

□他の事項については、通常と同様に撮影を行う。

19. 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

- 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！**）

Falcon3, Ceta の冷却を OFF（*3-4 ヶ月に 1 回）

- Launcher の Tools から、Camera and detector の Falcon-3 service tool を選ぶ
- Basic Operation のタブの、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）
- Launcher の Tools から、Camera and detector, Ceta 16M Service Tool を選ぶ
- Basic Operation のタブの、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）

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、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 時間後になる。
（このまま 12 時間以上待つ）

Falcon3, Ceta の冷却を ON

- Launcher の Tools から、Camera and detector の Falcon service tool を選ぶ
- Tools から、Camera and detector, Falcon-3 Service Tool を選ぶ
- Basic Operation のタブの 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 の Tools から、Camera and detector, Ceta 16M Service Tool を選ぶ
- Basic Operation のタブの 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 34 log 以下になるのを待つ。理想的には 1 log）
- Setup>Apertures の Option の Enable で Obj, SA が黄色になっていることを確認
- 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 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、200kV TEM を選んで Set を押す。

20. 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℃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

- ブレーカー, チラー, 電顕本体, 位相板ヒーターの電源を 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

- 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 時間後になる。
(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)

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)
- Setup>Apertures の Option の Enable で、Obj, SA を押して黄色にする。
- 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 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、200kV TEM 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
- IGP_a 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 IGP_{co} 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 などで↵。
 - 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

21. 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

C2 Lens

C2 Aperture

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

Obj Lens (*stage)

Obj Aperture (*Back Focal Plane)

SA Aperture

Int. Lens

Pro. Lens

V. 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、結晶に近いけれど結晶がない場所で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 Casette 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 Cross grating grid (2160, 1/mm, 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、Casette の#12 から順に入れる。NanoCab の液体窒素量も少なめにする。

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

まずは EPU を立ち上げた状態で以下を行う。

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
- ☐ 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
- ☐ EPU の 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 **E:/Preparation/200117_microED_EPU.xml** を選択

☐ **Data 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_Ex4200** 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_Ex4200 を上書きする)

測定条件#1 : Linear mode_92k (*E:/Preparation/200117_microED_EPU.xml)

	Camera	Binning	Readout	Exp. time, etc.	Probe	Mag	Defocus	Spotsize	Int.
Atlas	Falcon	2	Full	0.50	Micro	115x	-1000	8	1.103
Grid Sq	Falcon	2	Full	2.99	Micro	700x	-200	8	0.685 C2: 60%
Hole/ Eucentric	Falcon	2	Full	Linear,No 1.00	Nano	4300x	-50	8	0.992 C2: 95%
Data Acq	Falcon	1	Full	Linear,Man,No ~3.5e/Å ² ~5.0 s, 12 fr	Nano	13500x	-2	11	0.466
Autofocus	Falcon	2	Full	Linear,No 0.50	Nano	13500x	なし	11	0.466
Drift mes	Falcon	2	Full	Linear,No 1.00	Nano	13500x	-5	11	0.466

*~0.3 e/Å²/fraction

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。
- ☐ EPU の 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=6.0349)**
- ☐ EPU の Preparation タブで、Data Acquisition にして set
- ☐ **操作パネルの Eucentric focus ボタンを押す (*92k で Obj lens=86.5350)**
- ☐ C2=50, Obj=none になっていることを確認。蛍光板を下ろし、倍率を 17500 倍に。

1 回目

- ☐ Intensity ダイアルを左に回してビームを絞る
- ☐ Direct Alignment から Beam shift を選び、Multi function ダイア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、Multi function ダイアルで、
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 Alignment 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)

- ☐ 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 ダイアルを左に回してビームを絞る
- ☐ Direct Alignment から Beam shift を選び、Multi function ダイア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、Multi function 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

- ☐場所は C2 絞りの中心合わせのときそのまま、蛍光板も下ろしたままで OK
- ☐EPU の Preparation タブで、Data Acquisition にして Set
- ☐C2=50, Obj=none になっていることを確認。蛍光板を下ろす。
- ☐倍率を 28000 倍にして、Intensity を左に回して光を絞る
- ☐Direct Alignment から、nP Beamtilt pp X を選ぶ
- ☐Multi Function ダイアル 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 Alignment から、nP Beamtilt 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
- ☐EPU の 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
- ☐EPU の 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
- ☐EPU の Preparation タブで Hole/Eucentric の Preview をとる
- ☐Move stage here で、目立つゴミのある近くへ移動
- ☐EPU の Auto Functions タブで、Hole/Eucentric にして Auto Eucentric by stage tilt
(*なかなか合わないようなら、Hole/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 Alignment から、Rotation Center を選ぶ。

Multi Function ダイアルで、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
 - ☐ EPU の EPU タブの Square selection など、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、Data 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 21-31, 39-51, 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 で後焦点面に焦点を合わせる
(*それなりにコツがいるが、シマシマを伸ばす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 ダイアルを止めて (=Just focus)
None を押す (***これ以降、Intensity ダイアルは触らないこと**)
 - ☐ 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**
 - ☐ EPU の Preparation タブで、
 - Data Acquisition にして Get
 - Autofocus にして Get
 - Drift Measurement にして Get
- *参考：平行照射になる C2 Lens の目安の値 (%) Spot 11: 36.3%, **9: 36.94%**,
Spot 8: 37.8%, 7: 38.5%, 6: 39.55%, 5: 40.7%, 4: 42.0%

対物絞りの中心合わせ

- ☐ microED では対物絞りを使わないのでやる必要なし

AutoCTF

- ☐ ゴミのいるカーボン膜上に移動 (C2: 50, Obj: none)
- ☐ Hole/Eucentric の倍率で Auto-eucentric by stage tilt で高さ合わせ
- ☐ 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 (C2: 50, Obj: none)

- ☐ EPU の Preparation タブで、Data Acquisition で Set (**C2: 50, Obj: none**)
- ☐ 倍率 45000 倍にする
- ☐ 光がずれていたら、Beam Shift で中央に
- ☐ もう一度、Data Acquisition で Set して、倍率 45000 倍にする
- ☐ 蛍光板を上げる
- ☐ カメラを Falcon にする (Autoloader>CCD/TV Camera で BM-Falcon にして Insert)
- ☐ Microscope Software Launcher の Tools から Sherpa を立ち上げる (少し時間かかる)
(*Auto Functions タブ経由でも可能ですが、失敗してもエラーが出ない点がイマイチ)

- ☐ **Electron counting のボックスにチェックを入れる**
(Exp.: **12**, Binning: **1**, Readout: Full, Auto-focus-to: チェックして-2.0)
(**Focus ダイアルを回して Defocus を-3um くらいかける**)
- ☐ 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)
(うまくいかないなら、Defocus を深くするか、Exposure time を 18 などとする)
(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 Passed 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 Data Acquisition の設定を Spot size=11 に戻す

- 蛍光板を上げる
- EPU の EPU タブの Square selection など、やぶけて穴が空いているところへ移動
- 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、Data 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 21-31, 39-51, 58-71 を使うのが良い)

□TUI の表示モードを Linear に(TUI 左上の Camera>Settings>Exp.time=200 に)

- ヒストグラムのところ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 36.3%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 で後焦点面に焦点を合わせる
(*それなりにコツがいるが、シマシマを伸ばす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 ダイアルを止めて (=Just focus)
None を押す (***これ以降、Intensity ダイアルは触らないこと**)

□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

- EPU の Preparation タブで、
 - Data Acquisition にして Get
 - Autofocus にして Get
 - Drift Measurement 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: 36.3%**, 9: 36.94%,
Spot 8: 37.8%, 7: 38.5%, 6: 39.55%, 5: 40.7%, 4: 42.0%, 1: 46.247%

EPU における dose, fraction の設定

- ☐ Grid なしの状態、もしくは Atlas など Grid に穴のあいたところに右クリックで移動
- ☐ EPU の 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)
- ☐ EPU の Preparation タブの Presets を Data Acquisition にして Set
- ☐ Exposure Settings を、Linear, Manual, No, Dose=~50, Fractions=12 などとする
- ☐ TUI で倍率を 22,000x、C2: 150, Obj: none にする
- ☐ 光が蛍光板全体に当たっていることを確認
- ☐ EPU の Preparation タブの Data Acquisition のほうも倍率 22,000x、C2=150 にする
- ☐ Dose Rate のところの Measure ボタンを押す
- ☐ **Dose rate が $0.04 \text{ e}/\text{\AA}^2/\text{s}$ くらいになるはず**
- ☐ EPU の Preparation タブで、
 - Data Acquisition にして Get
 - Autofocus にして Get
 - Drift Measurement にして Get

・測定前の準備 (*必要に応じて、Preparation file の設定)**□蛍光板を下ろす**

- EPU をシャットダウンし、Diffraction mode にして EPU-D を立ち上げる
- Diffraction mode を解除して、EPU を立ち上げる
- EPU: Atlas で Set した後、EPU-D: Atlas にして Get (*同じ設定を移行)
- EPU: GridSquare で Set した後、EPU-D: GridSquare にして Get (*同じ設定を移行)
- EPU: Hole/EucentricHeight で Set した後、

EPU-D: Search/Auto Eucentric にして Get (*同じ設定を移行。**EPU は 8500x に変更**)

- EPU: Data Acquisition を選び、13500x, C2=20 に変更して Set した後、
EPU-D: Diffraction Acquisition にて C2=20 に変更して、
EPU-D: Imaging Acquisition にして Get (*一部変更することになります)
- 蛍光板を下ろしたまま Diffraction ボタンを押して Mag で D=750mm にする。
Focus ノブを左右に回して光が一番小さくなる位置を探した後 (36.5%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。

EPU-D: Diffraction Acquisition にして Get

- EPU-D の Atlas, GridSquare, Search/Auto Eucentric, Imaging Acquisition,
Diffraction Acquisition などのカメラが全て Ceta になっていることを確認
(*210308_microED_EPUD.xml におよその設定が保存してある。上書きは不要)

測定条件 : microED (*E:/Preparation/210308_microED_EPUD.xml)

	Camera	Binning	Readout	Exp.time,etc.	Probe	Mag	Defocus	Spotsize	Int.
Atlas	Ceta	2	Full	0.50	Micro	115x	-1000	8	1.103 C2=150
Grid Sq	Ceta	2	Full	2.99	Micro	700x	-200	8	0.685 C2=50 C2: 60%
Search/Auto Eucentric	Ceta	2	Full	1.00	Nano	4300x	-10	8	0.992 C2=50 C2: 95%
Imaging Acq	Ceta	2	Full	1.00	Nano	13500x	-5	11	0.466 C2=20
Diffraction Acq	Ceta	2	Full	1.00	Nano	0.75m	0	11	0.466 C2=20

*~0.03 e/Å²/s

・ EPU-D における倍率間の中心合わせ

- ☐ EPU-D の Imaging Acquisition は絞り 20 で視野が狭いので、まずは EPU を使う。
- ☐ Diffraction mode を解除して Yes。ビームストップを引っ込める。
EPU で Preparation の Data Acquisition の C2 絞りを 50 に戻す。
Atlas, Grid square, Hole/EucentricHeight で目立つゴミを探して、
Hole/EucentricHeight で Auto-eucentric by beam tilt か stage tilt で高さ合わせ
EPU-D の Imaging Acquisition などゴミを画面中央に寄せたら、蛍光板を上げる。
EPU-D の Preparation タブ, Calibrate Image Shifts.Start Calibration を押して開始。

・ カメラ長の確認

- ☐ Grid を Cross grating grid (2160, 1/mm, 3.05mm) に取り替える
- ☐ 金のある領域に移動 (*視野内にちょっとしたゴミがあるところが better)
- ☐ EPU の Hole/Eucentric の倍率で set して Auto Eucentric by beam tilt で高さ合わせ
- ☐ EPU の Data Acquisition で set。蛍光板を下ろす。(C2: 50, Obj: No)
- ☐ カメラを Ceta にして、Beam stop を入れて、Diffraction mode にする
- ☐ Autoloader>CCD/TV Camera>integration time = 4 sec
- ☐ 例えば D=330mm から 1500mm までの画像を、TIA でひと通り Acquire
右クリック>Export data>PC TIFF(16Bits)w/scale maker(full res)で保存 (e:/)
- ☐ カメラ長を計算(*例えば D=530mm だと KEK の Talos Arctica では 761mm に相当)

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 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 を撮影してくれる。

・ EPU-D の EPU-D タブ

- ☐ New Session, Yes,
- ☐ Batch にチェック, file 形式は Smv, 保存先は z:/の Atlas folder の下にする。

以下、主に EPU-D を使うが、Auto-eucentric だけ EPU を使って実験を進める。

・ EPU-D の Atlas タブ

- ☐ 右クリックで適切な Square に移動してスクショ（例えば s001）

・ EPU-D の Preparation タブ

- ☐ GridSquare でひとまず Preview 撮影

・ EPU の Auto Function タブ

- ☐ Square の中央で Hole/Eucentric の倍率で Auto-eucentric by beam tilt で高さ合わせ

・ EPU-D の Prepation タブ

- ☐ GridSquare で正しい高さで再度 Preview 撮影
- ☐ GridSquare の画像で結晶の位置に右クリックで移動してスクショ（例えば s001-c001）
- ☐ Search/Auto Eucentric で Preview 撮影
- ☐ 結晶の位置に右クリックで移動してスクショ（例えば s001-c001-p001）

・ EPU-D の EPU-D タブ

- ☐ Batch Positions, Add, Id#をクリックして位置を登録

- ☐ GridSquare 内の結晶について、以上を繰り返したら Start（回折点が出るはず）

(* GridSquare の倍率の視野範囲内であれば、高さ合わせは 1 回で良い。

あまり頻繁に高さ合わせをすると、むしろそのダメージのほうが気になる)

(*時間節約を考えるならば、ここの Snapshot 撮影は飛ばして OK)

・ EPU-D の EPU-D タブ

- ☐ Automated Acquisition
- ☐ 例えば、Start -30°, End 30°, Increment 1°, Tilt Speed 1°/sec に設定
- ☐ Start

(*Diffraction Center がずれていたら、1 セット終わったところで Stop して中心合わせ)

*測定時のコツ

・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す。。)

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。

・高さ合わせは、結晶に近いけれど、結晶が視野に入っていない場所でやると、結晶へのダメージを軽減できる

・照射範囲 (0.7um) より十分に大きい結晶であれば、結晶のフチを移動するなどして、複数箇所を測定すると効率が良い

・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 が上がりにくい。見た目の異なる結晶をいくつか選んで撮影したほうが、completeness が上がるかもしれない。

・同じ箇所を 5-10 回くらい撮影してみて、反射数の減少からダメージの有無を調べる。もしダメージに強いようだったら、C2=50 で測定するのも良いかもしれない。どうしても結晶が重なってしまうようなら、C2=20 で撮影したら良いかもしれない。