

KEK クライオ電子顕微鏡 (Talos Arctica, Falcon 4)

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]、

*I-III 章は外部ユーザー向けの内容、IV-V 章は KEK スタッフ向けの内容、VI 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 (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 (毎日)	p.18
2. C2 絞りの中心合わせ (毎日)	p.19
3. ピボットポイントの調整 (毎日)	p.20
4. Rotation Center (毎日)	p.20
5. 位相板への焦点合わせ (毎日)	p.21
6. 対物絞りの中心合わせ (毎日)	p.22
7. AutoCTF (毎日)	p.23
8. EPU における dose, fraction の設定 (毎日)	p.24
9. Gain reference (毎日)	p.25
10. EPU の倍率間の中心合わせ (毎日)	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 (週 1 回)	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.36

VI. 補遺

1. EPU-D で microED 測定を行う際の手順	p.37
------------------------------	------

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 による自動測定の条件を 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 などに伴い改訂
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
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 の新棟への移設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に追記。Titan の text に合わせて様々な項目を改訂。

英語第 1 版 22.##.##.## ## 日本語第##版を英語に翻訳 (予定)

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℃以下に急速凍結してガラス状に凍結する必要があるため、固化するぎりぎりを使うのが良いです。冷やしすぎて固化したらピンセットのお尻で溶かします。

- CryoGrid Box (水色) を入れて、完全に冷えるまで数分待つ

・ Loading station の組み立てと冷却

- 組み立てる (500mL 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
- ガラスプレパラートの上に、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 3uL スポット (*泡を作らない。少しチップに溶液が残ってもあきらめる)
- Footpedal を踏むと、グリッドが Blotting されて液体エタンにじゃぼんと浸かる
- ピンセットと発泡スチロール容器が下がってくる
- 霧が晴れるまで 20 秒くらい待つ (待っている間に液体窒素を注ぎ足す)
- 親指の腹で押すような感じでピンセットを外し、発泡スチロール容器ごと手元に移動
- グリッドはエタンの中に浸したまま、
ピンセットの黒い留め具の下を持ち、黒い留め具を少しずつ上にずらす
- グリッドをエタンから液体窒素へ移動
- グリッドを CryoGrid Box (水)に収納 (どの番号に何を入れたか記録しておく)
- 発泡スチロール容器に十分量の液体窒素を注ぐ
(#以降の操作を、サンプル数だけ繰り返します)

3. オートグリッドの作製

- Loading station に、再度、十分量の液体窒素を注ぐ
- CryoGrid Box (水色)のフタをシャーペン型治具にはめて、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ください！



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



- 先細ピンセットを 30 秒くらい冷やす
- C-clip ring を AutoGrid alignment tool (鉄)の中央に置く
- グリッドを C-clip ring にはまるように置く
- C-clip をはめた C-clip insertion tool 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。もしそうなると、Autoloader 内で落ちた場合は修理に数日、鏡筒内で落ちた場合は修理に 1-2 週間かかるので、共同利用の運営に大きな支障が出ます。オートグリッドがきちんとできていることを、必ず確認して下さい！！必要に応じて拡大鏡を使うと良いです。

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

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

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



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



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

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

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

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

II. 自動データ測定

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

*TEM User Interface は version 2.9.1、EPU は version 2.12.1.2782REL 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るまで待ち、さらに、全てが -160°C 以下になるまで待つ (数分)

• 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

***1. KEK では Falcon4 で測定したデータを EER format で出力しています。RELION で解析するためには Gain reference の file が必要になるので、測定を開始したら、**

/OffloadData/ImagesForProcessing/BM-Falcon/200kV/

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

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

Preparation>Data Acquisition>Exposure Settings にある Frames (Nr) に 7 をかけた値になります。これを 50 で割った値を RELION の Motion Correction の EER fractionation に入力すると $1\text{ e}^-/\text{\AA}^2$ frame になります。(例えば EPU で 172 frames と表示されていたら実際は 1204 frames 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 : 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 (*2-3 分かかります)

・左側の画面 : Setup>Vacuum

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

・右側の画面 : 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

上部右端のカメラマークを押して Preview 撮影

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

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

・左側の画面 : Search タブ

Stage>option で z に 180um と入力して Go To ボタンを押す。

・右側の画面 : Atlas タブ

Session set up, New Session, Yes, Apply (file 名を記録しておく)

Screening に移動して、今入ってる Grid (緑点灯) の番号にチェックを入れて、

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

(*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、以下の 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	92k (1.08Å)	~6 秒	No	スクリーニング
#2	なし	Counted	92k, 120k, 150k (1.08, 0.84, 0.66Å)	~6,5,4 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)	~6,5,4 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・92k・~6 秒**・EPU タブ**

Session creation : New session, Yes

Session Setup : _____ (番号を記録しておく)

(*1. Acquisition mode: Accurate hole centering を選択)

(*2. 測定条件#1 では位相板を使うので、Use Phase Plate にチェックを入れる)

(*3. 保存先は Atlas と同じ folder を選ぶ) (*4. Quantifoil は R1.2/1.3 を選択), Apply

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 Select

まず#1 を右クリックして、Move stage to grid square で#1 に移動

(スクショ 000)

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

Square 中央にいないければ、右クリックで Square 中央に移動

(Hole が見えない時は Move stage here で Hole が見える位置に移動)

Auto Functions 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

(点線枠の下の角 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/gridsquare, 0.20nm/s

Automated Acquisition : **Autoloader>Aperture,Option** で位相板の **Next**。Start Run

(*位相板の影が出るので PhP4 の position 39-47, 58-67 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します

(*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・Counting・92k,120k,150k・~6,5,4 秒・AFIS なし

・ **EPU タブ** Session creation : New session, Yes

Session Setup : _____ (番号を記録しておく)

(*1. Acquisition mode: Accurate hole centering を選択)

(*3. 保存先は Atlas と同じ folder を選ぶ) (*4. Quantifoil は R1.2/1.3 を選択)

(*5 スクシヨ epu) , Apply

Square Selection : Unselect All, 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 Select

(必要に応じて、氷の厚みが異なる square や hole を選択)

最初の Square を右クリックして Move stage to grid square で移動

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

Square 中央にいないければ、右クリックで Square 中央に移動

(Hole が見えない時は Move stage here で Hole が見える位置に移動)

Auto Functions 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中央に戻り Acquire)

Measure Hole size, Find Hole, 必要なら Quality Bar の値を調整

Brush tool で Grid Bar の近くやゴミ周辺を消す

(複数の Square を選ぶ場合は次の Square に移動して Hole Selection)

(必要に応じて、氷の厚みが異なる hole や square を選択)

Hole を選び終わったらカーボンの破れた所に移動 (Preparation>GridSquare で確認)

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

Counted, EER, No, Dose: ~50, fraction: --, 倍率: 92k/120k/150k にする。

Dose Rate の measure を押し Get-get-get (**スクシヨ dose**)

Template definition : Acquire, **C2=50, Obj=100 を確認**, Find and Center Hole

add Acquisition Area: Defocus = **-0.8 - -2.0 or -1.0 - -2.5 um**

(測定条件#1 を踏まえて適切な位置に置く) (**スクシヨ defocus**)

add Autofocus Area: **Always**

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

Template Execution : 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 : Start Run

測定条件#3 : 位相板なし・Counting・92k,120k,150k・~6,5,4 秒・AFIS あり

・ **EPU タブ** Session creation : New session, Yes

Session Setup : _____ (番号を記録しておく)

(*1. Acquisition mode: Faster acquisition を選択)

(*3. 保存先は Atlas と同じ folder を選ぶ) (*4. Quantifoil は R1.2/1.3 を選択)

(*5 スクシヨ epu) , Apply

Square Selection : Unselect All, 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 Select

(必要に応じて、氷の厚みが異なる square や hole を選択)

最初の Square を右クリックして Move stage to grid square で移動

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

Square 中央にいないければ、右クリックで Square 中央に移動

(Hole が見えない時は Move stage here で Hole が見える位置に移動)

Auto Functions 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中央に戻り Acquire)

Measure Hole size, Find Hole, 必要なら Quality Bar の値を調整

Brush tool で Grid Bar の近くやゴミ周辺を消す

(複数の Square を選ぶ場合は次の Square に移動して Hole Selection)

(必要に応じて、氷の厚みが異なる hole や square を選択)

Hole を選び終わったらカーボンの破れた所に移動 (Preparation>GridSquare で確認)

Preparation タブで Data acquisition で set。 **C2=50, Obj=none** にする。

Counted, EER, No, Dose: ~50, fraction: --, 倍率: 92k/120k/150k にする。

Dose Rate の measure を押し Get-get-get (**スクシヨ dose**)

Template definition : Acquire, **C2=50, Obj=none を確認**, Find and Center Hole

add Acquisition Area: Defocus = -0.8 - -2.0 or -1.0 - -2.5 um

(測定条件#1 を踏まえて適切な位置に置く) (**スクシヨ defocus**)

add Autofocus Area: **After Centering**

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

Template Execution : 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 : 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

→ 原因はどうあれ、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。

- サーバー室に行って、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などで22,000x, -10umなどで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 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 を動かせない。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 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)
- 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)
- 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. およそのアラインメント (毎日)

- EPU の右上の×を押して Yes を押して EPU を落とす (落ちるまで 30 秒くらい待つ)
- EPU を起動 (起動したら Window を右側の画面に移動)

- Column Valves を開く
- 蛍光板が上がった状態であることを確認
- 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
- 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/Preparation タブ/Import を押して、以下の.sxml file を読み込む
 - * **D:/Preparation/EC_120k_220117.sxml (0.84Å/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、200 を選んで Set を押す。

2. C2 絞りの中心合わせ (毎日)

- 前頁の続きなので Grid に穴のあいたところにおいて、蛍光板は下ろしてあるはず。
- 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 (*510x で Obj lens=6.0087)**
- 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 (*120k で Obj lens=86.5350)**
- AutoLoader タブで 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)

3. ピボットポイントの調整 (毎日 : ビームティルトの設定)

- 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 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 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 Alignment から、nP Beamtilt pp X を選ぶ
- Multi Function ダイアル X 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 を選び Multi Function ダイアル X で合わせる
- Done を押す

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

- 蛍光板を上げる
- EPU の Atlas タブで目立つゴミのあるところに右クリック Move stage here で移動
- Search>Stage の option で z=180um に合わせる
- EPU の Preparation タブで Grid Square の Preview をとる
- 目立つゴミのあるところに右クリック Move stage here で移動
- EPU の Preparation タブで Hole/Eucentric の Preview をとる
- 目立つゴミのあるところに右クリック Move stage here で移動
- EPU の Auto Functions タブで Auto Eucentric by stage tilt になっていることを確認
- Presets を Hole/Eucentric にして Start(*傾斜軸は画面に対して縦向きに走っている)

- 蛍光板を下ろして、ジョイスティックで目立つゴミを画面の中心に持ってくる
- 倍率を 6,700 倍から倍率 57,000 倍にする。
- AutoLoader タブ>Apertures を見て、C2=150, 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
- 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

5. 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 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

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 13,500 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 39-47, 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 度変わる場所を探す)

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、AutoLoader>Apertures>Option>PhasePlate を選び Next を押す

TUI の表示モードを Natural に戻す

倍率 120,000 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: 36.4%, 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 (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、ゴミのあるところに移動 (C2: 50, Obj: none)
- EPU の Auto Functions タブで Auto Eucentric by stage tilt になっていることを確認
- Presets を Hole/Eucentric にして Start

- EPU の Preparation タブで Hole/Eucentric にして Preview
- ゴミのないカーボン面を右クリックして Move stage here
- EPU の Preparation タブで、Data Acquisition にして set
- C2=50, Obj=none であることを確認

ここで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可能性があります)

- 操作板の 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 に変える
- 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、枠内の3点は、よほどズレていなければやらないほうが無難

- Objective の横の Adjust を押す
- 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)
(蛍光板の画像の左上に一時停止マークが出てたら、下の Natural ボタンを押す)

7. 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 120,000 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 120,000 倍のまま
- 蛍光板を上げる
- Microscope Software Launcher の Tools などから 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)

- AutoCTF ボタンを押して、カメラタイプを BM-Falcon にする
- EC mode なので Electron counting のボックスにチェックを入れる**
(**Exp.: 4**, Binning: 2, Readout: Full, Auto-focus-to: チェックして-2.0)
- Objective Stigmatism の Measure** を押す(*グリッドに跡がついていたら少し移動)
(トーンリングが拾えなければ Focus ダイアルを回して Defocus を-800nm かける)
- トーンリングが拾えたら、**Correct** を押す
(対物レンズの非点収差をとってくれる。光があまり暗いと拾ってくれない)
(途中で Stop しないこと。Stop すると途中の変な状態で止まってしまう)

- 右下に Completed と出たら、**Coma の Correct** を押す (コマ収差をとってくれる)

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

8. EPU における dose, fraction の設定 (毎日)

- 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
- 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, EER, No, Dose= ~ 50 , Fractions= (1)に
- 必要に応じて倍率を 92k, 120k, 150k のいずれかに変更
- Dose Rate のところの Measure ボタンを押す
(92,000 倍なら Exp. time= ~ 6 sec になったことを確認 (8.2 e/Å²/s くらい)
120,000 倍なら Exp. time= ~ 5 sec になったことを確認 (10.1 e/Å²/s くらい)
150,000 倍なら Exp. time= ~ 4 sec になったことを確認 (11.6 e/Å²/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
- EPU の Preparation タブの Presets を Data Acquisition に戻す

9. Gain reference (週に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
- 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目視で確認)
- EPU の Preparation タブで、Data Acquisition にして Set
- 倍率: **150K に変更**、C2: 50、Obj: 100、Spot size: 3 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
- 蛍光板を上げてから**、Measure Dose ボタンを押す
- 倍率を 150K にしてあれば、バーは緑の範囲に入るはず (~5.1 e/px/s になるはず)
(*Falcon 4 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)

- Falcon4 Reference Image Manager を再起動して、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
(.gain の file は OffloadData/ImagesForProcessing/BM-Falcon/200kV/の中にできる)

- Gain ref 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 (毎日)

- EPU の Preparation タブの Presets を Data Acquisition にして **倍率を 120k に戻す**

- Atlas で低倍率から高倍率まで見えそうなゴミを探し、右クリックして Move stage here
- EPU の Preparation タブで Hole/Eucentric にして 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 の Auto Functions タブで Auto Eucentric by stage tilt になっていることを確認
- Presets を Hole/Eucentric にして Start
- EPU の Preparation タブで Hole/Eucentric にして 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 の Preparation タブで Data Acquisition にして Set
- 蛍光板を下ろす
- ゴミの角もしくはゴミと Hole の交点などをジョイスティックで画面中央に移動

- Preparation タブから **Calibrate Image Shifts** を選んで Start Calibration
- 120,000x で見る。よければ Proceed (C2: 50, Obj: none に変更)
- 6,700x で見る。120,000x と対応する場所をダブルクリックして Proceed
- 510x で見る。6,700x と対応する場所をダブルクリックして Proceed
- 84x で見る。510x 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

- この後にスクリーニングを行うなら以下の操作を行って倍率を 92kx にする。
- EPU の Preparation タブの Acquisition and Optics Settings を選ぶ
- Data Acquisition にして倍率 92kx で Set する。
- Autoloader タブで C2 絞りを 50、Obj 絞りを none であることを確認。
- EPU の Preparation タブで、Data Acquisition から Drift Mesurement まで Get x3
- Presets を Data Acquisition に戻す

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_92k with phase plate (*120k から倍率を変更して使用)

	Camera	Binning	Readout	Exp. time, etc.	Probe	Mag	Defocus	Spotsize	Int.
Atlas	Falcon4	2	Full	Linear,No,No 0.50s	(Micro)	84x	-1000	8	1.103 C2:150
Grid Sq	Falcon4	2	Full	Linear,No,No 3.00s	(Micro)	510x	-200	6	0.880 C2:50
Hole/ Eucentric	Falcon4	1	Full	Linear,No,No 1.00s	Nano	6,700x	-50	5	0.940 C2:50
Data Acq	Falcon4	1	Full	Counted,EER,No ~50 e⁻/Å² ~ 6s, (1 fr)	Nano	92,000x (1.08Å)	-1	3	0.441 C2:50
Autofocus	Falcon4	2	Full	Counted,No,No 1.00s	Nano	92,000x	--	3	0.441 C2:50
Drift mes	Falcon4	2	Full	Counted,No,No 1.00s	Nano	92,000x	-3	3	0.441 C2:50

測定条件#2,3-92k : Counting mode_92k (*120k から倍率を変更して使用)

	Camera	Binning	Readout	Exp. time, etc.	Probe	Mag	Defocus	Spotsize	Int.
Data Acq	Falcon4	1	Full	Counted,EER,No ~50 e ⁻ /Å ² ~ 6s, (1 fr)	Nano	92,000x (1.08Å)	-1	3	0.441 C2:50
Autofocus	Falcon4	2	Full	Counted,No,No 1.00s	Nano	92,000x	--	3	0.441 C2:50
Drift mes	Falcon4	2	Full	Counted,No,No 1.00s	Nano	92,000x	-3	3	0.441 C2:50

測定条件#2,3-120k : Counting mode_120k (*D:/Preparation/EC_120k_211019.xml)

参考例	Camera	Binning	Readout	Exp. time, etc.	Probe	Mag	Defocus	Spotsize	Int.
Atlas	Falcon4	2	Full	Linear,No,No 0.50s	(Micro)	84x	-1000	8	1.103 C2:150
Grid Sq	Falcon4	2	Full	Linear,No,No 3.00s	(Micro)	510x	-200	6	0.880 C2:50
Hole/ Eucentric	Falcon4	1	Full	Linear,No,No 1.00s	Nano	6,700x	-50	5	0.940 C2:50
Data Acq	Falcon4	1	Full	Counted,EER,No ~50 e ⁻ /Å ² ~ 5s, (1 fr)	Nano	120,000x (0.84Å)	-1	3	0.441 C2:50
Autofocus	Falcon4	2	Full	Counted,No,No 1.00s	Nano	120,000x	--	3	0.441 C2:50
Drift mes	Falcon4	2	Full	Counted,No,No 1.00s	Nano	120,000x	-3	3	0.441 C2:50

測定条件#2,3-150k : Counting mode_150k (*120k から倍率を変更して使用)

参考例	Camera	Binning	Readout	Exp. time, etc.	Probe	Mag	Defocus	Spotsize	Int.
Data Acq	Falcon4	1	Full	Counted,EER,No ~50 e ⁻ /Å ² ~ 4s, (1 fr)	Nano	150,000x (0.66Å)	-1	3	0.441 C2:50
Autofocus	Falcon4	2	Full	Counted,No,No 1.00s	Nano	150,000x	--	3	0.441 C2:50
Drift mes	Falcon4	2	Full	Counted,No,No 1.00s	Nano	150,000x	-3	3	0.441 C2:50

* Exposure rate について、total exposure が 50 e⁻/Å² なので、Relion で total frame 数 (EPU で表示される frame 数 x 7) を 50 で割った値を入力すれば 1.00e⁻/Å² frame となります。

2. 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)
- 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)

3. グリッド作製の液体窒素の補充 (必要に応じて)

- 朝、5L シーベル x2 本に、120L 液体窒素タンクから汲み出す

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

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

5. Autoloader の Conditioning (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)

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

- 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 を選んで↔
- 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！**)

Falcon4, Ceta の冷却を OFF (*3-4 ヶ月に 1 回)

- Launcher の Tools から、Camera and detector の Falcon 4 service tool を選ぶ
- Basic Operations 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
- Launcher の Tools から、Camera and detector, Ceta Service Tool を選ぶ
- Basic Operations 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 時間後に変わる。
（このまま 12 時間以上待つ）

Falcon4, Ceta の冷却を ON

- Launcher の Tools から、Camera and detector の Falcon 4 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 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）
- Autoloader>Apertures>Option の Enable で Obj, SA が黄色であることを確認
- Column Valves を開いて、光があることを確認

- Align>Alignments の Option を押して、File から 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。

7. 電顕のシャットダウンと立ち上げ（計画停電の前や故障時）

・電顕のシャットダウン

グリッドやカセットの取り出し

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

Conditioning

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

Gun の OFF

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

温度が 5-10℃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

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

2日目の作業

- Setup>High Tension のボタンを、押せるようになったら押す。
まずは 80kV まで上げてから、段階的に 120, 160kV に上げる。
(Option の Emission がすぐ下がらないなど変なら、少し電圧を下げて待つ)
その後 Free high tension にチェックを入れて、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)
- Autoloader>Apertures>Option の Enable で Obj, SA が黄色であることを確認
- Column Valves を開いて、光があることを確認

- Align>Alignments の Option を押して、File から 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
- IGPa が動き始めたら Cold Start を押す (90 分待ち)
- 待っている間に、ガンの Back up 電源を ON に戻す
- カラムの真空が十分に下がったら、Vacuum Test の Evacuate all を押す
 - 自動的に IGPco が ON になり、数分後に Vacuum State が All vacuum になるはず
- Autoloader>Autoloader の Option の Vacuum ON を押す
- Autoloader>Autoloader の Option の Initialize を押す
- Autoloader>Temp Control の Option の State から、
 - Temp State Go to: Conditioning both を選んで↵を押す。
 - Temp State Go to: All Nitrogen Temp & 8/7/2018, 7:00AM など↵。
 - すると、After Conditioning の表示が (日付、時刻) が変わる (over night)
- Setup>High Tension のボタンを押し、以降、p.40 の下から 5 行目の手順に戻る

8. 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 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 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、Casette 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に入れて、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 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 を上書きする)

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	115x	-1000	8	1.103 C2=150
Grid Sq	Ceta	2	Full	3.00	Micro	700x	-200	8	0.685 C2=150 C2: 60%
Search/Auto Eucentric	Ceta	2	Full	2.00	Nano	4300x	-10	8	0.992 C2=150 C2: 95%
Imaging Acq	Ceta	2	Full	1.00	Nano	13500x	-5	11	0.464 C2=50
Diffraction Acq	Ceta	2	Full	0.50	Nano	0.53m	0	11	0.467 C2=50

*~0.07 e/Å²/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) (*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

- 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 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
- 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 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 でコマ取差をとらないので、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へ移動
- 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 position 39-47, 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**
- 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やる必要なし

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**
- 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 のままで Set
- 蛍光板を下ろしたまま Diffraction ボタンを押して Mag ダイアルで 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 = 20 sec, 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/Å²/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そうなゴミのあるところへ移動

・ 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 Prepatation 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 Prepatation 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 $1^\circ/\text{sec}$ 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なので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。

・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。**