20241204 (ver. 1.1)

岡山大学クライオ電子顕微鏡マニュアル

Titan Krios G4 and Falcon 4i

For tomography

このマニュアルは、KEK クライオ電子顕微鏡・外部ユーザー向け初期トレー ニングテキスト (ver.3) https://www2.kek.jp/imss/sbrc/230203_KEKTitan_TrainingText_v3.pdf をもとに、毎日の調整と routine のデータ測定に関する箇所を、トモグラフィ ーの操作に対応するよう改変して作成したものです。

> 岡山大学異分野基礎科学研究所国際構造生物学研究センター 沼本修孝

I. <u>試料交換から Atlas</u> 取得まで

*TEM User Interface は version 3.16.1、Tomography は version 5.14.0.5704REL



1. Inventory

TEM User Interface (=TUI) を使います

TUI > Autoloader tab > Temperature Control

Workset	Temperature Control	•	State Filling
Setup Autoloader Stage EFTEM (• •	- Status All Nitrogen Temperature - Dewar levels Column 79 % - Temperatures Docker 109.3 K Holder 8835 K Cassette gripper 97.3 K Castridge gripper 97.5 K Catridge gripper 97.8 K Column Dewar 78.0 K	6 h 02 min 11 h 04 min -163.8 °C -183.7 °C -175.9 °C -175.7 °C -195.2 °C -194.2 °C	Suppress AutoFill for: AutoFill starts in: 5 h 10 min Reminder before filling starts: Fill Now

□ NanoCab の Dock が終了したら (NanoCab の取り出しを忘れずに!)、温度表示が 全て緑になるまで待ち、さらに、全てが-160°C以下になるまで待つ (数分)

TUI >	Autoloader tab > Autoloader > Option	Autoloader (User)	Options
	Workset	Cartridge	O Turbo Always On
	Setup Autoloader Stage EFTEM (+ +	11 10 9 8 7	Initialize Loader-cycle Vacuum Dn Initialize Loader-cycle Vacuum Dn Inventoy — Cassete Undock — V Leave catridge on CompuStage
	nventory ボタンを押す	5 4 3 2	
(Dock 後、active になるまでしばらくかかる)	1 Shage Load Unload	

Optionウインドウが開いていない 場合はここをクリック □ 入れたグリッドが全て正しく認識されたら OK

Autoloader (User) Cassette Dock Undock - Cartridge 12 11 10 9 8 7 6 5 4 5 4 10 11 10 9 8 7 6 5 4 1 Edit Slot State Stage Load Unload - Status Mapping cassette slot Moving catridge arm to the cassette	Options - Vacuum Turbo Auto Off (default) Control Initialize Loader-cycle Vacuum On Stop Inv. - Cassette Undock - Cassette Undock Leave cartridge on CompuStage
濃いグレー:グリッドがないと 青:グリッドありと判定 薄いグレー:まだ認識作業がな	≤判定 なされていない

(正しく認識されなければ、もう一度 Inventory それでも齟齬があれば一度 Cassette を取り出して確認する。グリッドが落ちていないか? それでもおかしければ FEI に問い合わせ)

- 入れたグリッドの数 +2 までチェックが終わったら Stop Inventory ボタン を押して停止
- グリッドの名前は、Inventory が終わって(もしステージにグリッドが残っていたら Unload して)から入力する

*空の slot に名前があるとよくない *この名前が結果のフォルダ名等に反映されることはない。メモを残しておく。

- 2. およそのアライメント(毎日でなくてもよい?)
 - □ Tomography (以下 Tomo)の起動



- I TUI > EFTEM tab > Filter を見る
- EFTEM ボタンが黄色くなっていることを確認 (黄色くなっていなかったら EFTEM ボタンを押して黄色にする)

Workset	Filter D
Setup Autoloader Stage EFTEM (• •	EFTEM Aperture: Imaging Filtered Slit width [eV]: ↓ 10 ₽ Energy shift [eV]: ↓ 0 ₽ MF knobs ✓ HT offset: ↓ 0 ₽ 0 eV Total: 0 eV 0 eV 0 eV 20 eV 250 eV

- \Box TUI > Setup > E-CFEG
- Operate ボタンが黄色くなっていることを確認
 (黄色くなっていなかったら Operate ボタンを押して黄色にする)



- \Box TUI > Setup tab > Vacuum
- Col. Valves Closed ボタンを押して Column valve を開ける

Vacuum (Sup	ervisor) 🗾
Status: All Va	acuum (Closed)
Gun	1 Log
Liner	7 Log
Octagon	1 Log
Autoloader	19 Log
Projection	18 Log
Buffer tank	50 Log
Col. Valves	Empty
Closed	Buffer

Column valve の開/閉の状態は、TUI の画面上や、右側モニターの「TEM BlankerShutter Monitor」で確認出来る



□ Tomo> Preparation tab の Import を押して、以下の.sxml file を open

D:/Thermo Scientific Tomography/YYMMDD_****.sxml

*Hole や mesh のサイズごとにファイルが作成してある(倍率の設定などが異なる)。 自分の使用するグリッドのもので日付の最新のものを選択する。 *なければ、別途作成する。

Tomography							
 Preparation 	Auto Function	s Atlas	Tomograph	y			
Presets Atlas	~	Camera Falco	n 4i	~	Exp. Time (s) 0.49	× - +	'n
Export							Get
Preset Selecti	bn	Carner	a Settings		Exposure Settings		
✓ Tasks							
Acquisition and Optics	Settings						
Atlas Optics Alignment							
Calibrate Image Shifts							
Image Filters Settings							
Activate Phase Plate							
Optimized Position							
Targeting Correction		Beta					

Y 📩 > This PC > Data (D:)	> Thermo Scientific Tomography				~ 0	Search Thermo Scientific To	m ,
Organize 👻 New folder						855 * 0	
rganze v rew rolder Cuick access Cuick access Desktop Downloads Pictures Data Data Data Data Data Data Data Da	Name Adas customerservice_20231219_091859 customerservice_20231219_05966 factory_2020821(7)05908 factory_2020821(7)05908 factory_2020821(7)05908 Supervisor_20231225_108319 Supervisor_20231225_108319 Supervisor_20231225_108324 Supervisor_20231225_108344 Supervisor_20231225_108344 Supervisor_20231225_108344 Supervisor_20231225_108344 Supervisor_20231225_108344 Supervisor_20231225_108344 Supervisor_20231225_108344 Supervisor_20231225_108344 Supervisor_20231225_108344 Supervisor_20231225_108344 Supervisor_20231225_108344 Supervisor_20231225_108344 Supervisor_20231225_108344 Supervisor_20231225_108344 Supervisor_20231225_108344 Supervisor_20231226_108344 Supervisor_20231225_108344 Supervisor_20231225_108344 Supervisor_20231226_108444 Supervisor_20231226_108444 Supervisor_20231226_1084444 Supervisor_20231226_1084444 Supervisor_20231226_1084444 Supervisor_20231226_108444444444444444444444444444444444444	Date modified 7/2/2024-4/59 PM 12/19/2023-6/19 AM 12/19/2023-6/19 AM 12/19/2023-7/52 PM 6/21/2023-7/52 PM 6/21/2023-7/52 PM 6/21/2023-7/52 PM 12/21/2023-7/52 PM 12/21/2023-1041	Type File folder File folder SXML File SXML File	Size 58 K8 58 K8 58 K8		(c2 ♥ L	
File name: 240704_R2-2	✓ 200mesh.sxml				Ý	Settings file (*.sxml)	

□ TUI > Alignment tab > Alignments > Option > File tab bb 300kV (11/27/2024

Available にあるもの全てを Selected に移動して、Apply を押す

Workset	Alignments Deflector File
Camera Phase plate Alignment Mag(• •	Gun Current file: @300kV Align EFTEM File Date & time @ @Align PhasePlate File Date & time @ @300kV 12/21/2023 18:06 factory04280H 12/18/2023 18:06 factory04280H 8/1/2023 16:02 factory04280H 8/7/2023 16:02
	User slignment 12/22/2023 10.31 × Save Delete Selected Available Beam HM-TEtr A Beam MM-TEtr A Beam ManoPro
	Courting Courting HM EFTEM EFTEM HM EFT

□ TUI > Setup tab > FEG registers $b\dot{b}$ Nanoprobe EFTEM 300kV (11/29/2024 c

更新された最新のもの)を選び Set

に作成された最新のもの)を選び、

(ビームロストの時も有効。ただしこれを行ったら、調整をいちからやり直し)

Workset			FEG Regi	sters	Þ			
Setup Autoloader	Stage EFTEM	(• •	Set Update Delete					
			LЫ		Date			
			Nanoprobe 1	FEM 300kV	12/18/2			
			Nanoprobe B	EFTEM 300kV	12/18/2			
			Microprobe 1	FEM 300kV	12/18/2			
			PP		12/19/2			
			<		>			
			Nanoprobe E	FTEM 300kV	Add			

3. <u>グリッドの load と preview、Atlas 取得</u>

- TUI > Autoloader tab > Autoloader
 - 見たいグリッドの数字をクリック(黒い線でハイライトされる)して
 Load ボタンを押す

Workset	Autoloader (User)	•	Options		
Setup Autoloader Stage EFTEM (• •	Dock	Undock	 Vacuum Turbo Auto Off (defa 	ult)	
	— Cartridge —		O Turbo Always On		
	11		Initialize Loader-	cycle Vacuum On	
	9		Inventory		
	8		- Cassette Undock -		
	6		Leave cartridge on U	CompuStage	
	4				
	F_carbon3				
	Edit Slot State	Stage			
	Load	Unload			
		Camera and Light controller			- D X
		1	AN DECK		
石側モニターの「Camera	and Light			0	
controller」の再生ボタン	'を押すと			a state	
Autoloader のライブビュー	が見れる。		and the second second		
この画面は15分で自動停止	する。再度		and the second s		
見たいとさは再生ホッノを	/ Т 9 о				E.
		2.1			2
			e 3		
				0	
			Camera GO-5101C-PGE	Controler No Controler load	ed
		C		Brightness %	
		Autoloader	(liser)	Ontions	
		- Cassette		- Vacuum	
		- Cartridge		O Turbo Always On	an j
		11			ycle Vacuum On
		9		Inventory	
		7		Leave cartridge on Ci	ompuStage
正しくloadされた	:グリッドは				
黄色の表示に変わ	る		arbon3 arbon2		
		Edit Slot State	Unioad		
		- Status			

<このページは丸ごと省略可>

- TUI > Setup tab > Vacuum
 - □ Col. Valves Closed ボタンを押して Column valve を開ける

Vacuum (Sup Status: All Va	ervisor) 🔹 🕨
Gun	1 Log
Liner	7 Log
Octagon	1 Log
Autoloader	19 Log
Projection	18 Log
Buffer tank	50 Log
Col. Valves	Empty
Closed	Buffer

- Tomo > Preparation tab
 - □ 左上の Presets のプルダウンメニューから Atlas を選ぶ

🔞 Tomography					
Preparation Auto Function	ns Atlas Tomograph	/			
Presets Atlas	Camera Falcon 4i	~	Exp. Time (s) 0.49	× - +	Get
Preset Selection	Camera Settings		Exposure Settings		
✓ Tasks					
Acquisition and Optics Settings					
Atlas Optics Alignment					
Calibrate Image Shifts					
Image Filters Settings					
Activate Phase Plate					
Optimized Position					
Targeting Correction	Beta				

□ 上部右端の

0

Previe

を押して Preview 撮影

*この段階で完全に真っ暗な場合は、カラムバルブが開いていること、E-CFEGがOperate になっていることをもう一度確認。

*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

• Tomo > Atlas tab

Session Setup	New Session	n Yes
tenography former land tenography tenography	Konography Edit Session Nagarence (2004/1764, 1981)2 March 1764 Session Call Status Session Call Status Session Call Status Konoge (2004/1764, 1981)2	Image: New Session Are you sure you want to start with a new session? Yes No
Output folder を排	旨定(保存先:Ζ:/ι	userxxx/yymmdd/atlas/) して Apply
	New S	Session
Name:	Supervisor_20240709_124344	
Image format:	MRC TIFF	
Output folder:	Z:\user001_shen\240709\atlas	
	Set as default storage folder	
	Ар	фріу

Screening を押して、撮りたい Grid 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

Preparation Auto Function	ns Atlas	Tomography		
Start	Start Position C Number of Tiles	lose to center 🛛 🛩	Close Col. Valves	
Acquisition	Atlas	Settings	Options	Autoloade
✓ Tasks				
ession Setup				
Screening				
12 Empty				
11 Empty				
10 Empty				
9 Empty				
7 Empty				
6 Empty				
5 Empty				
4				
3 Z				
2 Z Y_sample7	•			
1 Empty				
Contra Marcine				

□ |Acquiring | をクリックすると画像が表示される

(* 4 x 4 で全体像を撮影するのでしばらく待つ。グリッドの入れ替えの時間も含めて、 1 枚あたり、10 分弱?)



*何らかの理由で、特定のグリッドだけ Atlas を撮り直したいとき Atlas tab でそのグリッドを選択して、左上 Reset Selected のボタンを押す データが消えるので、そのグリッドにチェックを入れて Start



Ⅱ. ビームの調整(毎日)

1. グリッドの穴の空いたところに移動

□ Tomo > Atlas tab で目的のグリッドを選択し、 Load Sample

Tomo > Status で「Cartridge at slot x is now on the stage」と表示されたことを確認する



Column valve が閉じていたら
 Col. Valves Closed
 ボタンを押して Column valve を開ける

Vacuum (Supervisor) Status: All Vacuum (Closed)				
Gun Liner Octagon Autoloader Projection Buffer tank	1: 1: 5:	1 Log 7 Log 1 Log 9 Log 8 Log 0 Log		
Col. Valves Closed		Empty Buffer		

 ・ 蛍光板が上がった状態(=Screen Retracted)でなければ操作板の R1 を押して
 Retract





- Image: Section of the section of th
- □ Tomo > Atlas tab で Grid に穴のあいたところで右クリック Move stage here

□ Tomo > Preparation tab > Presets から Overview / Positioning を選んで Preview



□ きちんと穴のあいたところにいることを確認する

*位置がずれていたら Overview の画像でもう一度右クリック Move stage here *Overview / Positioning = EPU での Grid Square に相当 □ R1 を押して蛍光板を下ろす

Natural



□ Flucam Viewer が EF (=EF mode の中心を緑の円で表示)、

High Resolution となっていることを確認

2. <u>ピボットポイントの調整</u>

- □ グリッドの穴にいて、蛍光板が下りていることを確認
- □ Tomo > Preparation tab > Presets から Exposure を選んで Set



*Exposure = EPU での Data Acquisition に相当

□ 操作板の Eucentric Focus を押す



□ TUI > Stage tab > Apertures を見て C2=50, Obj=none であることを確認

(*C1=2000, C3=1000 は今後一切触らなくて OK)

Apertures	F
Condenser 1 2000 🗸	Adjust
Condenser 2 50 🗸	Adjust
Condenser 3 1000 🗸	Adjust
Objective [none] ~	Adjust
Selected Area [none] ~	Adjust

□ Intensity ダイヤルを回して、Flucam Viewer の画面中心の大きい方の円くらい の大きさにする





TUI 右下 >	Direct Alignment	から	nP E	Beamtilt pp	o X	を選ぶ
None Adjourners Adjourn	The set of	IS TEM	* •			

□ 操作板の Multifunction-Xのみで、点滅する2つの光が重なるように調整する



- □ TUI 右下 > Direct Alignment から nP Beamtilt pp Y を選ぶ
- □ 操作板の Multifunction-Xのみで、点滅する2つの光が重なるように調整する
- Done を押す



3. C2 絞りの中心合わせ

- □ <u>グリッドの穴にいて、蛍光板が下りていることを確認</u>
- □ TUI 右下 > Direct Alignment から Tomo Beam shift を選ぶ
- Multifunction ダイヤルで光を中央へ合わす



 Intensity ダイヤルを右に回して、光を広げる。このとき、同心円状にひろがる かを確認。



だいたい同心円状に広がれば問題無いので、Direct Alignment の Tomo Beam shift を Done する Direct Alignments



そうでなければ、以下の調整を行う。

□ C2 の右横の Adjust を押して、Multifunction ダイヤルで、光の円が中心になるように絞りを移動する

Apertures), a		
Condenser 2 50 Condenser 2 50 Condenser 2			
Condenser 3 1000 V Adjust	annel Anter St	\bigcap	
Objective [none] V Adjust	 	(\circ)	
Selected Area [none] V Adjust	1		

- □ C2の右横の Adjust をもう一度押す
- 再度光を中心の大きい方の円くらいに絞って、Multifunction ダイヤルで光を中
 央に移動



- □ Intensity ダイヤルを右に回して、同心円状にひろがるかを確認。
- □ 光の輪がほぼ同心円状に広がれば OK。 それまで以上の操作を繰り返す
- □ 問題無ければ、Direct Alignment の Tomo Beam shift を Done する



4. Energy filter の調整

- □ R1 を押して蛍光板を上げる
- TUI > Autoloader tab > Apertures を見て C2=50, Obj=none にする

Workset	Apertures D
Setup Autoloader Stage EFTEM (• •	Condenser 1 2000 ~ Adjust
	Condenser 2 50 🗸 Adjust
	Condenser 3 1000 V Adjust
	Objective [none] ~ Adjust
	Selected Area [none] ~ Adjust

□ Tomo > Atlas tab で Grid に穴のあいたところに右クリック Move stage here



Tomo > Preparation tab > Presets から Overview / Positioning を選んで Preview



- Commo > Preparation tab > Presets から Exposure を選んで Set

 ・ Tomo > Preparation tab > Presets から Exposure を選んで

 ・ Tomo > Preparation tab > Presets から Exposure を選んで

 ・ Tomo > preparation tab > Presets から Exposure を選んで
- □ R1 を押して蛍光板を下げる
- ビームが中央になければ Direct Alignment > Tomo Beam Shift で



- □ ビームが緑の円の全体に当たっていることを確認
- □ R1 を押して蛍光板を上げる



□ 通常、既に Sherpa が立上がっているはずなので、window を表に出す



(立上がってない場合は Microscope Software Launcher の Tools から Sherpa を起動)

- □ Sherpa Window の左側にある Energy Filter のボタンを押す
- □ Sherpa Window の左下にある Settings の四角を見る
- □ EF-Falcon, Bin=1, Exp time=0.5sec, Electron counting にチェックを入れる
- □ Sherpa Window の左上にある Controls の四角を見る
- □ Zero loss: スリットの中央にビームを通すため Center ボタンを押す
- □ 画面右下で completed と表示されるのを確認(以下同じ)



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

No. Ann. Son Senai Res Juccon No. No. 7 Jun 2000		
Burrendeny Burrendeny Dermany of Charles Heaver Particular Starture Heaver Particular Starture Heaver Particular Starture	4,4,47 4,15,7 4,15,7 1-4 4,16,7 1-4 4,16,7 1-4 4,16,7 1-4 4,16,7 1-4 4,17,7 1-4 <td< td=""><td></td></td<>	
Accessor scores. Oranis Information Accessor to 10 13 Accessor to 10 13	minimum end () () () The set of section of the set of	
Technical General Services Decision of the memory protons (1.58-45, 3.252-45) was stated into The	Bit for all and a second secon	

Geometric and Chromatic Distortions: Tune Magnification のボタンを押す

Windowski Windowski	Steps 3.0.1		- D X
	Vew kep		
<pre>keesest</pre>	tunto Reso Stor Details		
	Auto Renctions		
<form></form>	Applications Comman	C Manti and	
	And a constrained of the second of the	More and the second sec	
6			KC
			Completed

Geometric and Chromatic Distortions: Tune Distortions のボタンを押す

Steps 3A.1	х <u>р</u> –
Vow Heb	
Auto Functions	
Rostations Comma	head?
Comp Term	manufactors of the second seco
	101

Zero loss: 曲がり角の調整をするため、再度 Center ボタンを押す

5. <u>Dose の見積もり</u>

- □ (穴のあいたスクエアにいることを確認)
- I Tomo > Preparation tab > Presets から Exposure を選んで

Set



Dose (e/Å²) の値を入力して Measure

*トモグラフィーでは、toral で 100 e/Å² くらいが目安。±60°で 3°刻みだとすると、41 枚。 従って、1 枚あたり 2 e/Å² 程度。

Dose (e/Ų)	2.00 ~	-+-	Measure	10.92	e/px/s
Exp. Time (s)	7.17 ~	-++		0.28	e/Ų/s
Fractions (Nr)		Frames (Nr): 2205			

*バーの赤いところに行かない程度に、なるべく短い照射時間になるよう

Spot Size, III.Area で調整。

ただし、III. Area は視野(Field of View, FOV)に対して十分にひろくとるべき。

NanoProbe	✓ Spot Size	6	V Image Informa	ation
Q 19500×	🗸 Ill. Area (μm)	4.01	Applied Defocus	-5.00 µm
🥃 (μm) -5.00	C2 Aperture	50	Dose Exposure Time Image Size Pixel Size	63.59 e/nm² 7.17 s 4096 × 4096 0.63 nm
			Field Of View	2.56 µm
			Maximum	15544
			Mean	6806.73

- 6. <u>倍率間の中心合わせ(Image Shift のキャリブレーション)</u>
 - <complex-block>
 - □ Tomo > Atlas tab を見て目立つゴミのあるところに Move stage here

*あまり大きすぎないゴミを選ぶ。マウスのホイールで画像の zoom in/out を操作可 比較的きれいなスクエアのほうが以下の調整をやりやすい ゴミと hole の境界上に中心をもってくるとよい

Tomo > Preparation tab > Presets から Overview / Positioning を選んで Preview



□ 目立つゴミのあるところに右クリック Move stage here で移動

- □ Tomo > Preparation tab > Presets の Eucentric Height を選んで Preview
- □ Move stage here でゴミの角もしくはゴミと Hole の交点に移動



I Tomo > Auto Functions tab で Auto-eucentric by stage tilt または

Auto-eucentric by beam tilt を選ぶ

ロ Presets を Eucentric Height にして Start



*Beam tilt か stage tilt のどちらかで成功すればよい。

- □ Tomo > Preparation tab > Presets から Eucentric Height を選び Preview
- ゴミの角もしくはゴミと Hole の交点などに Move stage here

* Eucentric Height があった状態でもう一度中心を合わせる

□ Tomo > Preparation tab > Presets から Exposure を選んで Set





- □ Velox を立ち上げる(ふたつ window があるが、Acquisition のみ使用する)
 - *中心を表すcross hair 画面右クリックから出せる

1.

- □ → アイコンをクリック。ビーム照射が始まり、画像が写る。 *手動で stop するまで照射しっぱなし
- □ 画像の行きたいところをダブルクリックで移動
- □ ゴミの角もしくはゴミと Hole の交点などを中心にもってくる *何度かダブルクリックを繰り返さないと思った中心に行かない?

Acquisition - Velox	- 🗆 x
in Mo Yeen Spins Here Denomin Hele 2	
Aprend X	A Disalar Sement
	Hatatan ET
ダブルクリックで そこに移動	
	 Object Properties
	Trugenty rabout terrings rabout terrings ratio terrings ratio radia trivine Solid ratio Solid ratio So
	A betech kyol Magadcason 💌 🐮 1900 x V Kasi Saran
	Stratch 201 Fear aint

- □ もう一度 → アイコンをクリックしてビーム照射終了
- Tomo > Preparation tab から Calibrate Image Shift を選んで Start Calibration



- x19.5k(Exposure での倍率)の画像(画面左側)を見る。
 *中心がズレていたらダブルクリックであわせてから Re-aquire よほどズレている場合以外はやらないほうがよい?
- □ Proceed
- □ 右側に一段階低倍率(Search = Eucentic)の画像が取得される。

双方の対応すべき場所をダブルクリックして指定し Proceed



- □ 右側の画像が左側に変わり、より一段階低倍率(Overview)の画像があらたに 右側に取得される。以下同様に、
- □ 双方の対応すべき場所をダブルクリックして指定して Proceed
- □ Status に finished successfully と出たら終了



*倍率を変更した場合はもう一度やり直す

毎日のビーム調整は以上

*Rotation center は、SPA のときもほとんど安定している。必要に応じて調整する? *Auto CTF は、トモグラフィーの Exposure の倍率(x20k 前後)では Thon リングが出 ないので、調整したいときはより高倍率で行う?

III. <u>データ測定</u>

- 1. <u>セッションのセッティング(Tomo Live 使用)</u>
 - □ Tomo > Atlas tab で目的のグリッドを選択し、 Load Sample



□ Tomo > 右下より Athena に Login する





ログイン画面が表示されるので、ID: epu, Password: epu

□ ログインできたら、右下の表示が変わる





□ Tomo Live のモニター用 PC にて、Edge > Bookmark > Sign in to athena

ログイン画面が表示されるので、ID: epu, Password: epu



ログイン後、Athena > +Add Project

2		Athena - Workspace	× +									- ¤ ×
+	C	A Not secure Hitter	/athenacrycem.nis.okay	ema-ulacjp/workspuce/406b	6485-0174-Jic2e-track-4216	46699659			1. 1	0	6 6	s - b
At	Pro	oject										
		Marine .		II 9 M								
				240703test			+id(turned)	Metadata				
				▲ 240703	ul 4, 2024, 11:51:46 AM ep	o, jebn -				240733test		
								1 000 B 00000		epul lepul (w) 3, 2024, 5	11:07 AM	
		tomo live test										
		HPU_SAT						8 w		43(644)54	174-462e-bach-4	
۲												

Project 名を入力して Create Project

*サンプル名ごとに作成するなどでよい

2° 🗖 🗖 Athena	Workspace × +					- 0 X
	t secure https://athenacrycem.nis.ok	ayama-s.ac.jp/workspace/40	5b4485-0174-4b2e-bacb-421546699659			 M & D & G @ @ 🜔
Al Project						Ø
a Photos						E least
C -					+ lot beciment)	
R 10						
14 D 187			pira, 202a, 115338 AM - 1997 1998			
ET Ionol						
- Bus						
			New Project			
				Cancel Cossile Patrierz		
-						
						T 1
0						2
2						

□ Athena > +Add Experiment > Experiment 名(日付など)を入力

Visibility は Private でよい > Create Experiment

-	🗖 🔲 Athena - Workspace	× +				- 0 3
+	C A Not secure https	//athenacryoem.nis.oka	yama-u.acjp/ecikspace/7c2f6ba	6-5ae9-4257-bibbe-4a09730263bf	A	0 0 0 0 0 0
At						
105						(= 1000 ()
			20240709		Metadata 9	
à.						
				New Experiment		
				Name*		
				Tr.		
				Visibility		
				Choose experiment visibility, it can be private or public		
=						

 \Box Athena > +Add Workflow > Cryo-electron tomography with Tomo Live \overline{E}

Athens - Workspace x +			- 0
C A Not secure Hitps://athenacryoem.nis.okayam	a-u.ac.jp/workspace/14def58f-37c0-4eaa-8b7e-6beee496ae3a		○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○
Experiment <			
(CAUSeparated)			(E) 10000
	0240709	Metada	ta a
		s Inc	
	New Workflow		
	Time	time t	
	174		
	Free Free		
	🚠 Cryo-electron tomography with Tomo Live	Workflow	
	Single particle analysis with quality monitor	Cryo-electron tomography with Tomo Live	
	${f A}$ single particle analysis	The workflow includes all stops and off for cyp-decisit homography workflow its constant for early: Wirdscales, Milling, Imaging and Processing. The Transport stops a declarated in the International And Transmission and the Andrews and Andrews in help judging the sample quality. Tags:	
		Careet Could Workline	

選択して Workflow 名(日付など)を入力 > Create Workflow



- Experiment Settings

 Name
 Supervisor_20240709_201655

 Description
 Sample Type

 Sample Type
 Slab-like

 Options
 Batch
- □ Experiment settings のところで、Slab-like, Batch, Low Dose にチェック

□ Athena settings のところで Select

	Athena settings	
Selected workflow:	<not available=""></not>	
Selected dataset:	<not available=""></not>	Select

先ほど Athena で作成した Project、Experiment, Workflow を順に選択し、

Step に「cryotomo.tqm.imaging」を選択して Add dataset



□ Dataset 名を入力して OK



□ Dataset が入ったことを確認する

🔟 Select Dataset	
Projects	PROJECT EXPERIMENT WORKFLOW STEP
2024-07-09 20:21	20240709 20240709 20240709 cryotomo.tqm.imaging
20240709	
024-07-03 14:11	
40703test	
023-12-20 15:59	
PUSAT	
24-01-10 15:55	
ST	DATASET Not started
23-12-21 10:27	slot7
omo live test	2024-07-09 20:33

□ Output settings のところで、保存先ディレクトリを選択

Tomography			
 Preparation Auto Function 	ns Atlas Tomography		
1			
New			
Section			
✓ Tasks		Experiment Settings	
Session Setup	Name	Supervisor_20240709_201655	
Search Maps	Description		
Batch Positions			
Data Acquisition			
Movie Player			
	Sample Type	Slab-like Rod-like	
	Options	🐱 Batch 🛛 🔽 Low Dose	
		Athena settings	
	Selected workflow:	20240709, 20240709, 20240709.	
	Selected dataset:	cryotomo.tqm.imaging, slot7.	Reset Select
		Output Settings	
		output settings	
	Storage Folder	2:\user001 shen\240709\tama	Open Folder
			Z:/userxxx/yymmdd/tomo
		Email Settings	4. 1.8
	Recipients		なと
		Send email after data acquisition is finished.	Test
			Apply

□ Apply を押す

2. <u>サーチマップの取得</u>

□ Tomo > Tomography tab > Search Maps > Sample で目的のアトラスがハイラ

ancent Ale Strappely The Society 42 State Countries Agent Agent Agent Description - Optimist *観察したいグリッドが load してなければ、Atlas tab より Load Sample

イトされていることを確認

*Tomo > Auto Function tab で、適当なところで eucentric height をとっておく?

I Tomo > Tomography tab > Search Maps > Atlas で、search map を描きたいス Add new Search Map here



キューに入る。気になるスクエアにどんどん置いていく。 *Grid Width, Height で Search Map のタイル数を指定可能

□ Start Queue

Eucentric を取って map を取得していく (eucentric が失敗したらスキップされる)



*黄色が取得できた map (Acquired)。 *オレンジは取得できなかった(eucentric が取れなかった)map(Queued のまま)。 *緑は今選択している map

□ Eucentric が取れなかったところ、queue を消して Move stage here

Auto Functions でマニュアルで eucentric をとったら、

Tomo > Tomography tab > Search Maps > Atlas で右クリック

Move stage here and Acquire Search Map

Search map が取得され、Acquired として加わる

□ Tomo > Tomography tab > Search Maps > Search map で確認

*画面下、Stage Z の値、eucentric が自動で決まったやつは緑、その他は白

3. <u>データの取得</u>

I Tomo > Tomography tab > Batch Positions > Atlas で、マップをひとつ選択



□ Tomo > Tomography tab > Batch Positions > Search Map でデータ収集したい



□ データ収集用の照射位置(緑)と focus 位置(黄)が出てくるので調整する



青線はステージtiltの中心軸



*照射位置(緑)は、holeが中心に収まる ようにし、周辺部(位置決め用の金コロ イド)もしっかりと視野に収まるように する *Focus位置(黄)は、tilt軸上にしか配置 できない



*ひとつの search map につき、照射位置は最大 5 箇所



*追加の照射位置については、AFIS でデータ収集が行われる *最初の照射位置(緑 = tilt 軸上)からあまり離れた位置を選ばない方が無難 20 μm 程度なら問題無くデータ収集できた

 照射位置、focus 位置の配置ができたら
 Add Position

で queue にはいる





*照射位置の順序が表示され、queue に反映される

□ サーチマップの取得、照射位置の決定と queue への追加を繰り返し、撮影した

い箇所を網羅する

*ひとつの search map で最大の5箇所とした場合、その5箇所を撮るのに約1時間を要する

^{*}Queue を削除したいときは、選択してゴミ箱アイコン

□ Tomo > Tomography tab > Data Acquisition でデータ収集パラメータの設定





- ・Tilt step (°): 何度おきに撮影するか
- ・Tilt Span (°): ±何度までのデータを撮影するか
- ・Dose Symmetric Scheme: チェックを入れる
- ・Track Before Acquisition:チェックを入れる
- ・Focus Before Acquisition: チェックを入れる
- ・Use Predictions : 今の撮影条件で Holder Calibration がされていればチェック を入れる
- □ Start Batch でデータ収集開始



*両方ともチェックを入れておく



□ データ収集進行中、各 Exposure Area は画面左下の番号で切り替えて確認可

□ Athena の Tomo Live で on the fly 処理の結果を確認出来る



*Tilt series のデータ取得完了から 10-20 分後には三次元再構成が出来ている

IV. <u>データ解析(Inspect 3D)</u>

1. 画像の相関による三次元再構成

□ Inspect 3D がインストールされた PC にログイン



*本体は、タワー型のデスクトップ

□ データ処理用フォルダを E:ドライブに作り、.mrc ファイルをコピーする

E:/YYMMDD/Position_X_Y など

*.mrc ファイルのあるフォルダがデータ処理のフォルダとなる

137

Inspect 3D のアイコン

をダブルクリックして起動

Inspect 3D > File Preparation tab > Load で.mrc ファイルを選択して Open



正しく読み込まれたら、ヘッダー情報などが表示される



Inspect 3D > Pre-processing Data tab > Load でもう一度同じ.mrc を開く



スライドバーを上下に動かし、各フレームを確認する

□ 状態のよくないフレームは、右ダブルクリック > Delete Image で解析から外す





*一度外したフレームを戻すには、右ダブルクリック -> Accept Image

* をクリックして、画像上でマウスを左クリックで上下左右にドラッグすると(または、画像上で右クリックでドラッグ)画像の明るさ、コントラストの調整ができる (以下の各タブでも同様) □ Inspect 3D > Pre-processing Data tab > Reduce window \circ Rebin factor ϵ_2

(4K -> 2K)にして	Generate
Inspect3D 4.5.2	
File Preparation Pre-processing Data St	ack Alignment Feature Tr
File information	
Input file	
E:\240709\Position_3_3\Position_3_3.mrc	Load
Additional files to reduce	
	Load
Output file	
Cutent Frankright Fran	
Output directory for additional files	
Generate	Cancel
Reduce	
Rebin factor	2
Skin images	Nono w
	None
ROI	
	4096
Top1 Bo	ttom4096
Move tilt axis to center of ROI	
Pre-rotate ROI with tilt axis angle	
Image manipulation	
MotionCorrection	

Inspect 3D > Stack Alignment tab で直前の操作の output ファイル(***red0.mrc)



 \Box Setup filter window $\overline{\circ}$

*Image edge > Hanning window にチェック *Noise suppression > Non linear filtering で Median を選択

ttinas Load, Save Band pass 0 igh pass igh p 0 0 Low pass 0 6.5 Geometry stretching Use stretching before correlation Image edge -🔽 Hanning window Tapering Feature enhancement Morphological operation None 👻 Window None 👻 Sobel n linear filtering ➡ Window 3x3 Median

□ 引き続き Setup filter window で Band pass > High pass, Low pass を少しずつ

ettings -Load. Save Band pass High pass 😑 📮 0 スライドバーで画像切り替え High pass 0 なるべく真ん中の(tilt角の浅い) 0 画像を使う . Originalの画像2 Originalの画像のcorrelation Originalの画像1 (画像1とtilt角が1 step異なる) + Filter適用後の画像2 Filter適用後の画像1 Filter適用後の画像のcorrelation

動かして、correlation のピークがわかりやすいように調整する

ボヤッとした中にピークが確認 できる程度がよいみたい □ Stack alignment window の設定

*Maximum number of iteration -> 2-4 回 *Update tilt axis orientation period -> 2-4 回 (どちらもとりあえず 4 回くらいがよい?) *Live view にチェック *Fast alignment shift calculation のチェック は外す



□ File information window で「Apply Alignment to a difference file」のチェックを

外して Generate

画像の correlation による位置合わせが行われる



*画面右上の shift 量が、iteration が進むにつれ下がる(ほぼ 0 になる)事を確認



*下がらない場合は、Setup filter window の値を調整してやり直し

Iteration 数を増やすのもよいかも

□ Inspect 3D > Reconstruct volume tab > Load で.ali ファイルを開く



Reconstruction techniques window で「SIRT」を選択、Iteration を 20 にする



□ 右の画面で再構成に使う範囲を指定する

Live view にチェックを入れて Generate

<complex-block>

- <complex-block>
- □ Inspect 3D > Inspect stack tab > Load で.rec ファイルを開く

- □ 画面右下をダブルクリックして画像を入れ替える
- □ サイドバーを動かして、三次元再構成を確認する



2. 三次元再構成の傾き補正

*以下、前項の続きであることが前提

□ Inspect 3D > Reconstruct volume tab > Tomogram positioning window

必要に応じて Step size を調整して、Y-tilt の矢印ボタンをクリック



*a, b, c の画面を見て、水平になるようにする

Live view にチェックを入れて Generate

File information	
Input file	· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·
E:\240709\Position_3_3\Position_3_3_2.ali	🚹 Load
Additional files to reconstruct	-
	📕 Load
Output file	-
E:\240709\Position_3_3\Position_3_3_2_SIR	
Output directory for additional files	-
Generate Z Live view	Cancel

□ Inspect 3D > Manipulate volume tab で.rec ファイルを開く



Manipulate volume window で Load を押す



右側の画面を見て、X-axis の Thickness, Z-height, Angle を調整する



3. <u>金コロイドなどのマーカーを使った tracking</u>

*以下、p. 48 まで行ってあることが前提

□ Inspect 3D > Feature Tracking tab > Load で.ali ファイルを開く



 \Box Inspect 3D > Feature Tracking tab > Tracking window \tilde{C}





おかしなところを拾っていたら、左ダブルクリックで緑色の状態にし、次に望ましいところを左シングルクリックでサークルを移動



□ Tracking window で Bead

*拾った金コロイドの平均画像が生成され、教師データとなる *楕円状などの場合、きちんと中心に拾えていないので戻って修正

Tracking	
O Gold beads	General features Patches
📃 Use filter	
Find beads — Number of featu	res for bead image:
9-9	
Find	
Bead	Bead image:
Beads to track -	J
97	
	Select
Track beads —	
	Track

□ Tracking window > Beads to track に適当な値(何個くらい拾えそうか)を入れ



*ヘンなところを拾っていたら、前ページのやり方で修正



*左下のログを確認。0.1%以下(2K なら 2 pixel)に落ち着いているのが理想 *この段階ではそんなに低い値にはならないので、以下で refine する □ Post-tracking analysis window > Bead Error tab



Post-tracking analysis window > Image Error tab
 *同様にバーを真ん中にもってきて、Auto-refine にチェックを入れ Correct

*画像の window で右ダブルクリック > Display > Toggle Bead Number Display でビーズの番号を表示できる



tilt角によってtrackできていない ものがないかなど確認 □ Post-tracking analysis window > Total Error tab

*Remove beads with error でスライドバーを大きく右にして値を大きくとって(error の 大きいものだけを選ぶということ) Select

*Auto-refine にチェックを入れ Correct



*削除された bead は赤く表示される



*Remove beads with error の数を少しずつ調整して Correct へンなものだけ削除されるように

 \Box Solving window > Solve > Solve

Solving	_	
- Solve		
Minimum chain length		5
Maximum iterations		5
Initial angle		0.00
	Solve	

*この段階で、Total Error で削除した bead が復活できなくなるので注意 *Solve してしまってから復活はできないので、.ali ファイルを開くところからやり直し *左下のログを確認。0.1%以下(2K なら 2 pixel)に落ち着いているのが理想 \Box Solving window > Results



□ File information window > Generate



 新しくできた.ali ファイルで再度 Inspect 3D > Reconstruct volume tab で再構 成と結果の確認(p. 49 から p. 52)

以上