

20241209 (ver. 1.4)

岡山大学クライオ電子顕微鏡マニュアル

Titan Krios G4 and Falcon 4i

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)

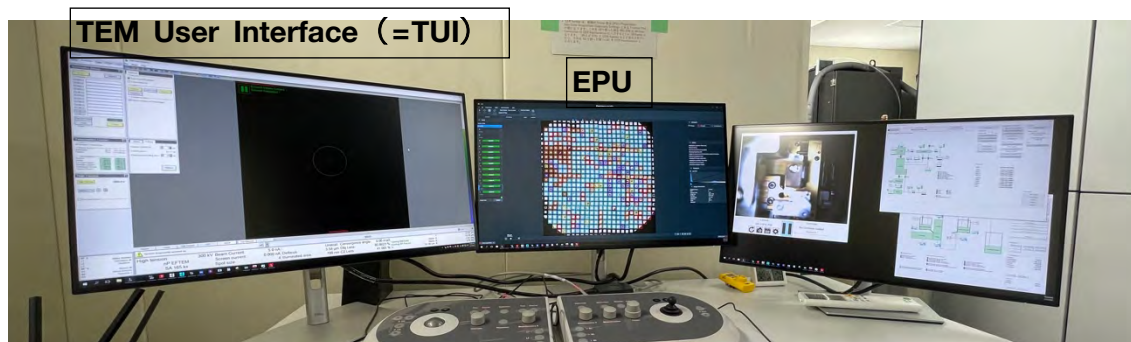
https://www2.kek.jp/imss/sbrc/230203_KEKTitan_TrainingText_v3.pdf

をもとに、毎日の調整と routine のデータ測定に関する箇所のみ抜粋したうえで、画面のキャプチャを追加し、内容にも若干の改変を加え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. 試料交換から Atlas 取得まで

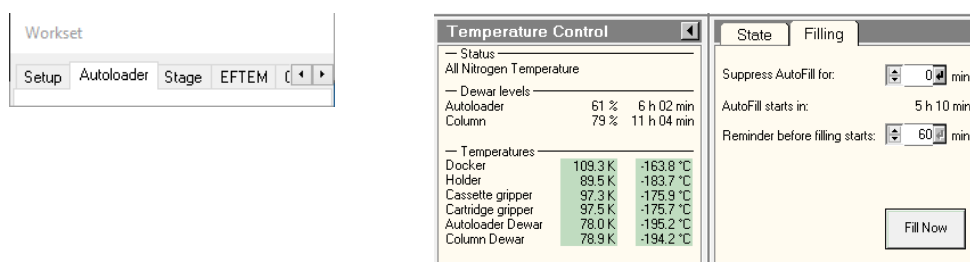
*TEM User Interface は version 3.16.1、EPU は version 3.4.0.5704REL



1. Inventory

TEM User Interface (=TUI) を使います

- TUI > Autoloader tab > Temperature Control



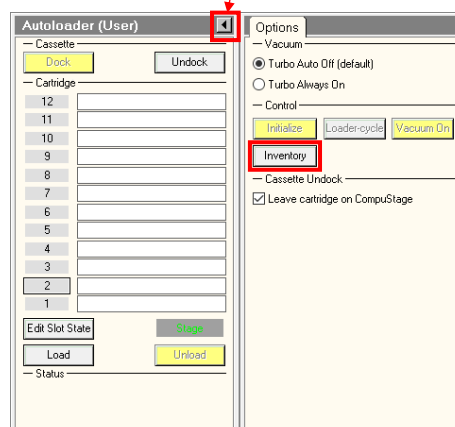
- NanoCab の Dock が終了したら (NanoCab の取り出しを忘れずに!), 温度表示が全て緑になるまで待ち、さらに、全てが-160°C以下になるまで待つ (数分)

Optionウィンドウが開いていない場合はここをクリック

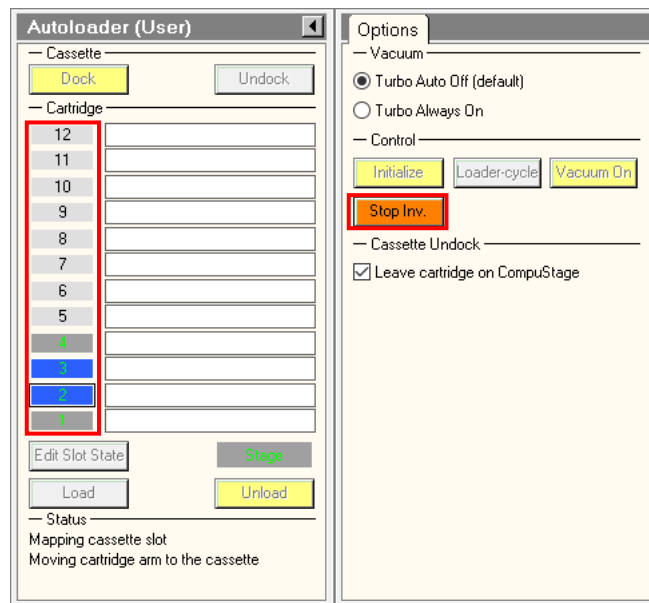
- TUI > Autoloader tab > Autoloader > Option



- **Inventory** ボタンを押す
(Dock 後、active になるまでしばらくかかる)



- 入れたグリッドが全て正しく認識されたら OK



濃いグレー：グリッドがないと判定
 青：グリッドありと判定
 薄いグレー：まだ認識作業がなされていない

(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?)

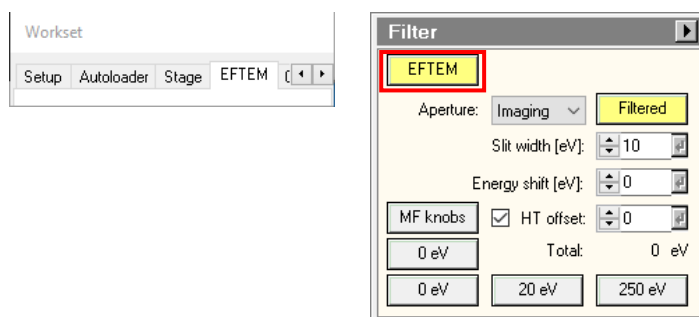
- EPU 再起動

(右上の×を押して落とす。30 秒くらい待つ。ピン留めアイコンから起動)



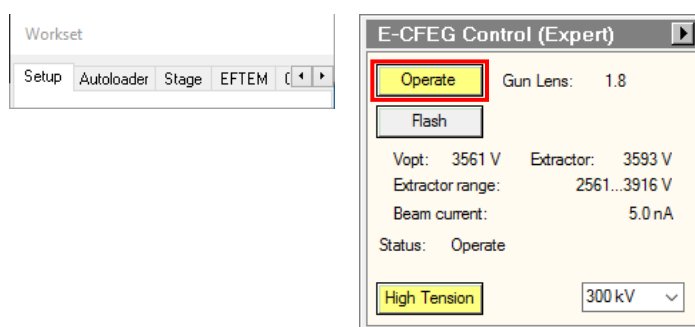
- TUI > EFTEM tab > Filter を見る

- **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)

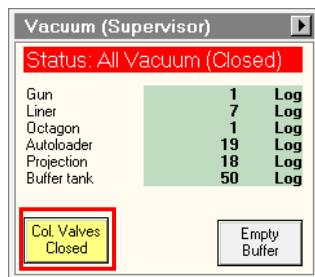


- TUI > Setup > E-CFEG

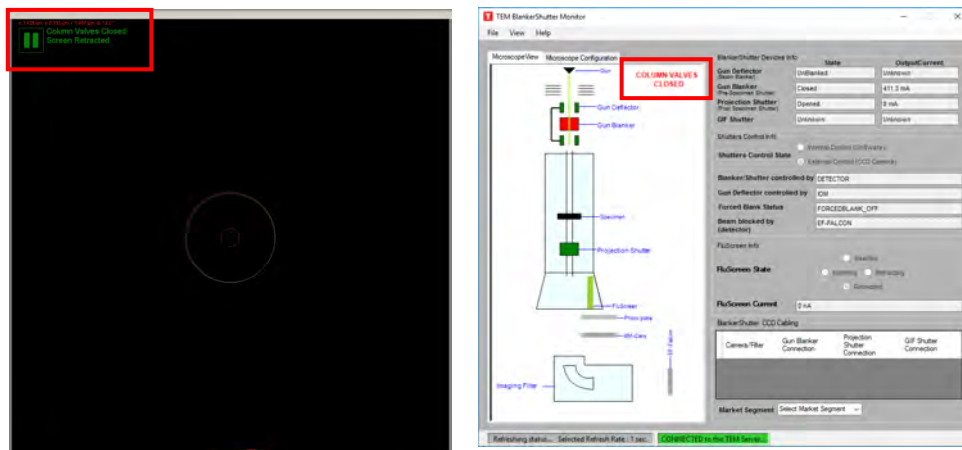
- **Operate** ボタンが黄色くなっていることを確認
(黄色くなっていなかったら **Operate** ボタンを押して黄色にする)



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



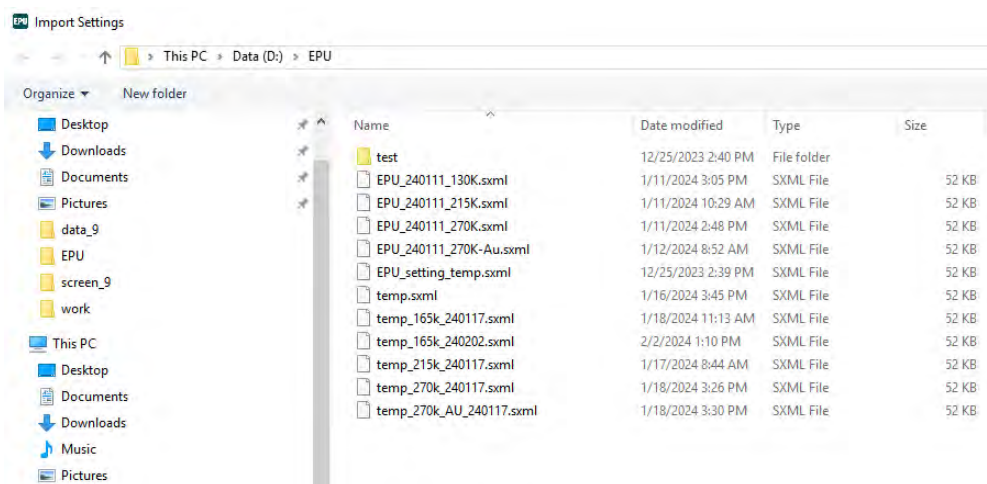
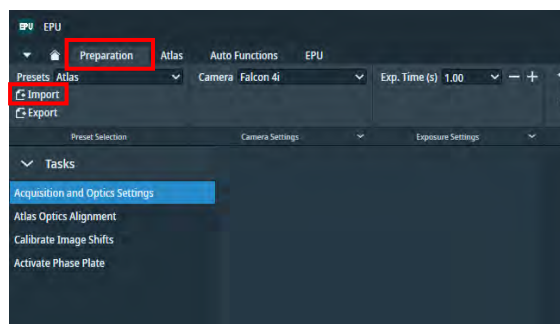
Column valve の開/閉の状態は、TUI の画面上や、右側モニターの「TEM BlankerShutter Monitor」で確認出来る



- EPU > Preparation tab の **Import** を押して、以下の.sxml file を open

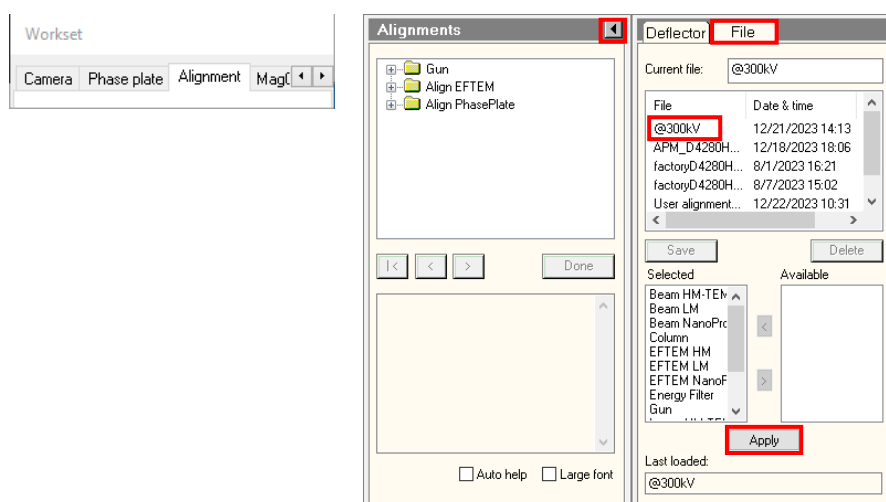
D:/EPU/temp_xxxk_YYMMDD.sxml

(xxx=倍率。自分の使用したい倍率で日付の最新のものを選択)



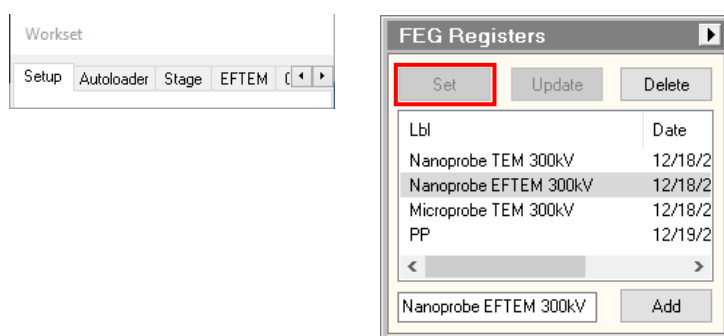
- TUI > Alignment tab > Alignments > Option > File tab から 300kV (11/27/2024 に作成された最新のもの) を選び、

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



- TUI > Setup tab > FEG registers から Nanoprobe EFTEM 300kV (11/29/2024 に更新された最新のもの) を選び Set

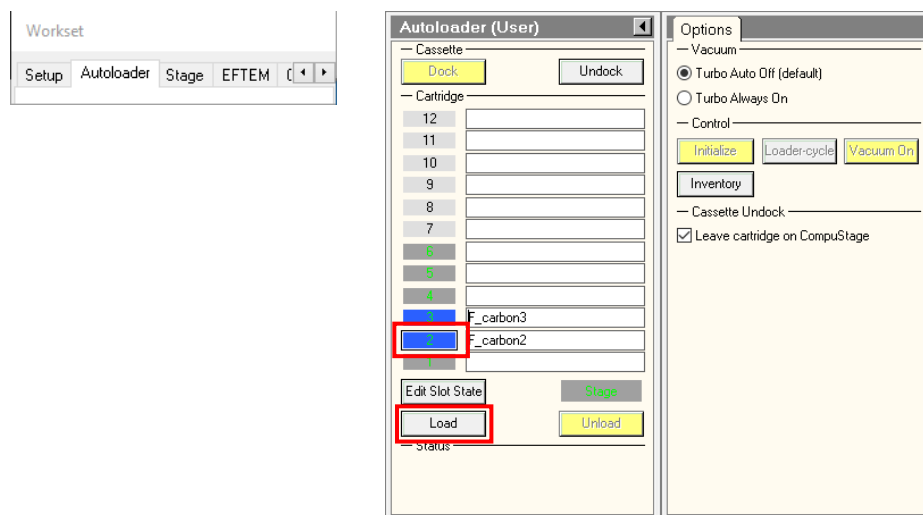
(ビームロストの時も有効。ただしこれを行ったら、調整をいちからやり直し)



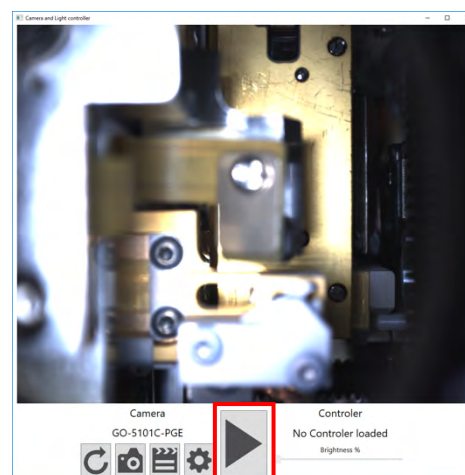
3. グリッドの load と preview、Atlas 取得

- TUI > Autoloader tab > Autoloader

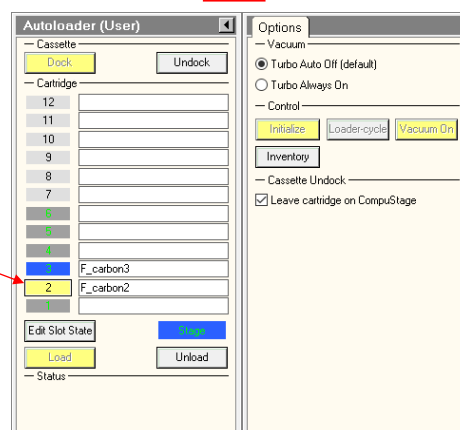
- 見たいグリッドの数字をクリック（黒い線でハイライトされる）して
Load ボタンを押す



右側モニターの「Camera and Light controller」の再生ボタンを押すと Autoloader のライブビューが見れる。この画面は15分で自動停止する。再度見たいときは再生ボタンを押す。



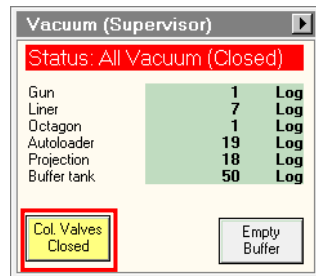
正しく loadされたグリッドは黄色の表示に変わる



<このページは丸ごと省略可>

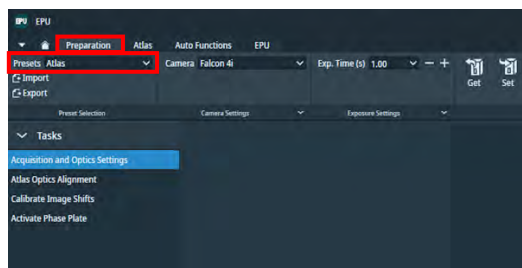
- TUI > Setup tab > Vacuum

- ☐ Col. Valves Closed ボタンを押して Column valve を開ける



- EPU > Preparation tab

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



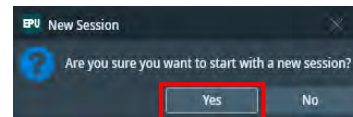
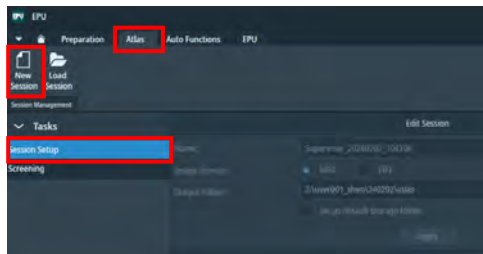
- ☐ EPU > Preparation tab で上部右端の  を押して Preview 撮影

*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。

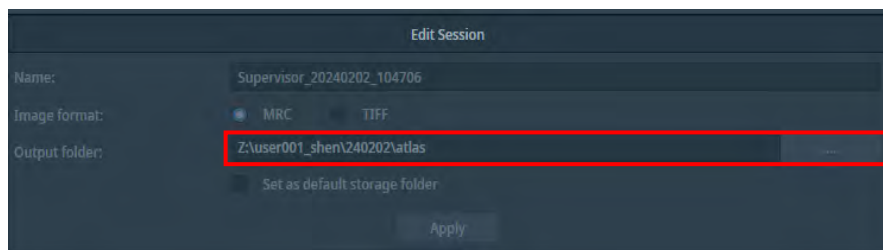
*氷が厚すぎる場合はほぼ真っ暗ですが、うっすら Grid square が見えるはず

- EPU > Atlas tab

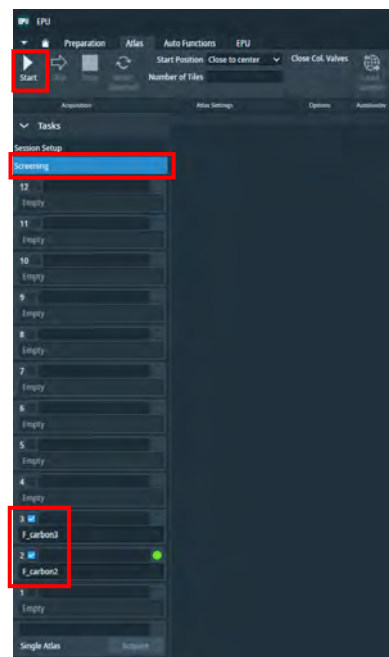
☐ Session Setup New Session Yes



☐ Output folder を指定（保存先：Z:/userxxx/yymmdd/atlas/）して

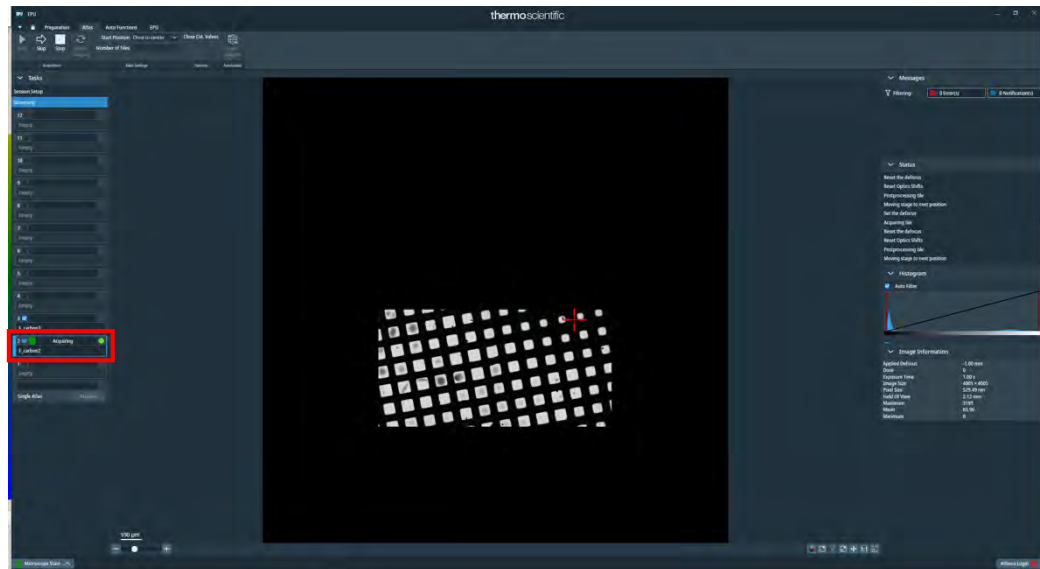


☐ Screening を押して、撮りたい Grid（緑点灯）の番号にチェックを入れて、
 ボタンを押すと Atlas 撮影開始



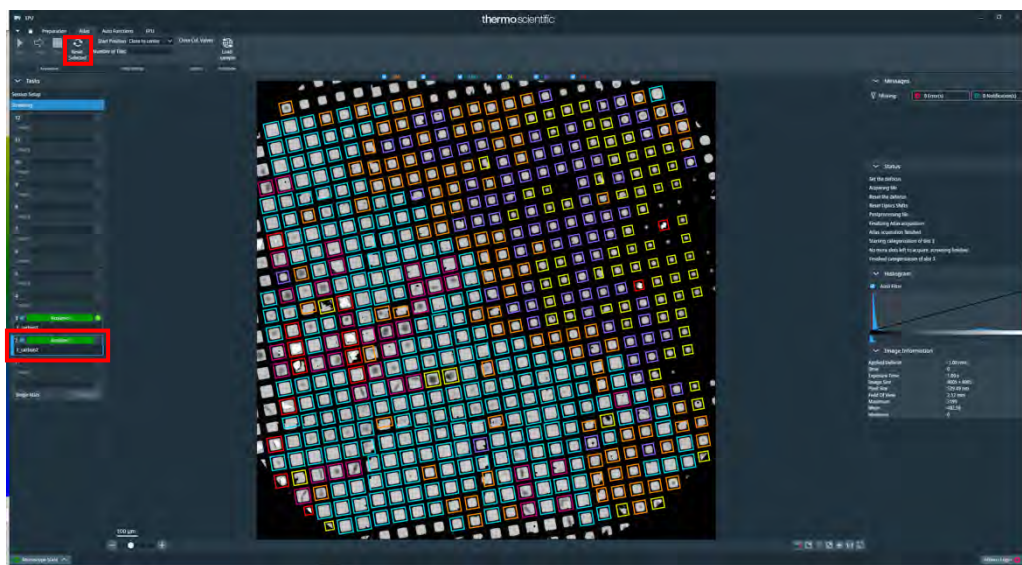
- **Acquiring** をクリックすると画像が表示される

(* 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? 2024/11/29 より、Atlas の倍率は 155x を推奨)



*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**



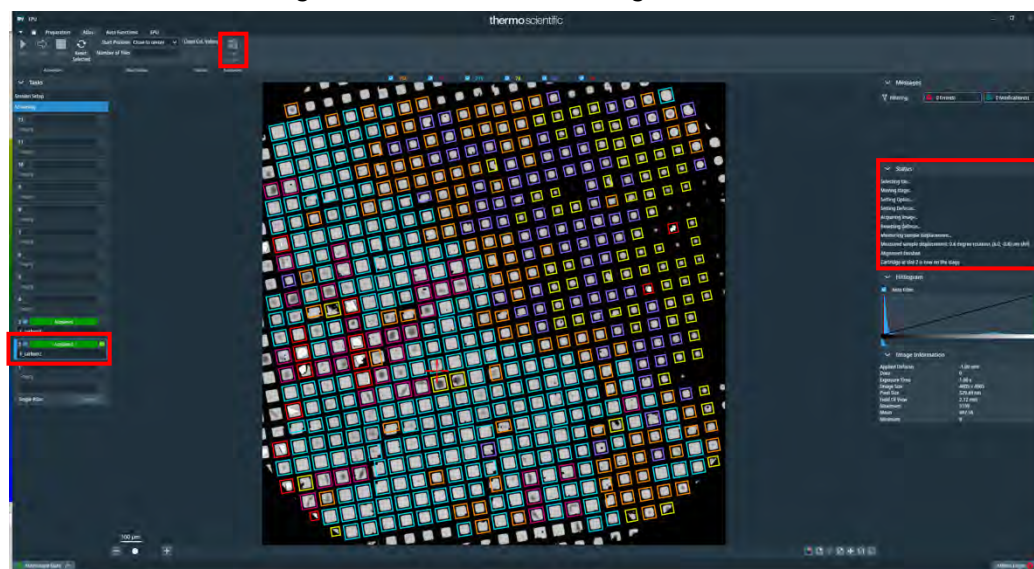
II. ビームの調整（毎日）

（UltrAufoil を使うときでも、6. は carbon film のグリッドでないとできない）

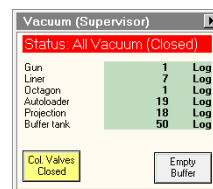
1. グリッドの穴の空いたところへ移動

- EPU > Atlas tab で目的のグリッドを選択し、**Load Sample**

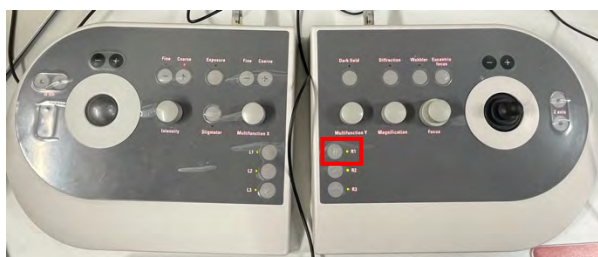
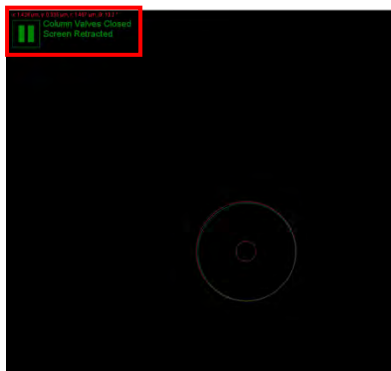
EPU > Status で「Cartridge at slot x is now on the stage」と表示されたことを確認する



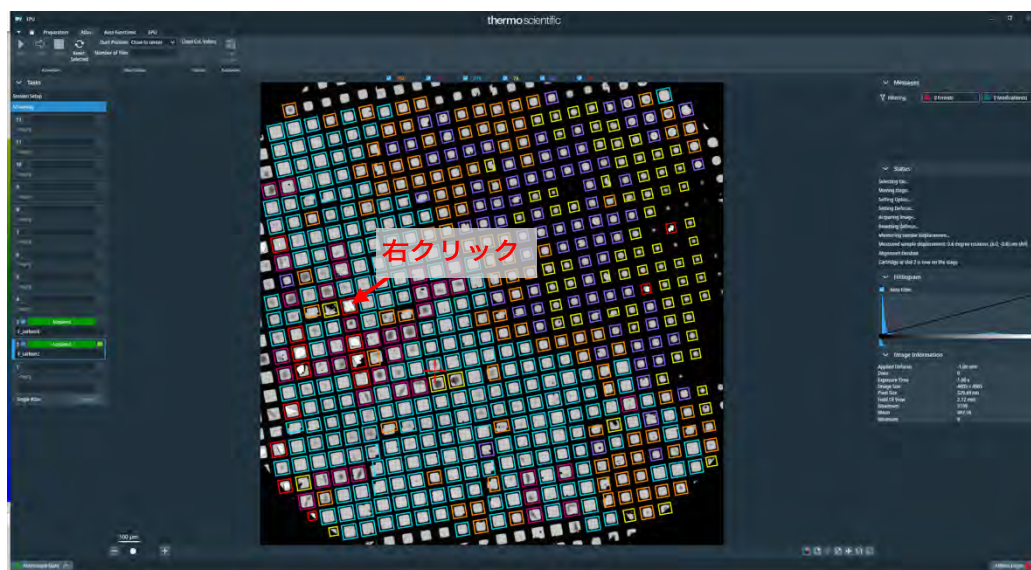
- Column valve が閉じていたら **Col. Valves Closed**
ボタンを押して Column valve を開ける



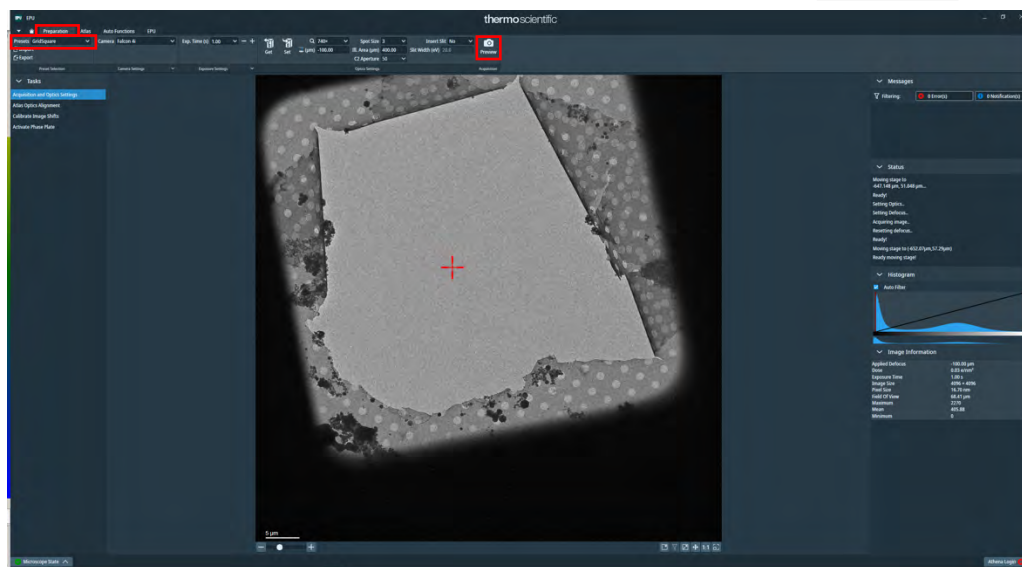
- 蛍光板が上がった状態（=Screen Retracted）でなければ操作板の **R1** を押して Retract



- EPU > Atlas tab で Grid に穴のあいたところで右クリック Move stage here



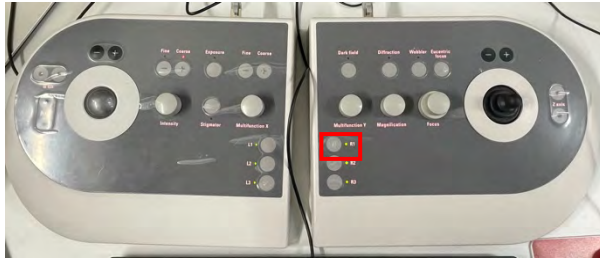
- EPU > Preparation tab > Presets から Grid Square を選んで Preview



- きちんと穴のあいたところにいることを確認する

*位置がずれていたらスクエアの画像でもう一度右クリック Move stage here

- ☐ **R1** を押して蛍光板を下ろす

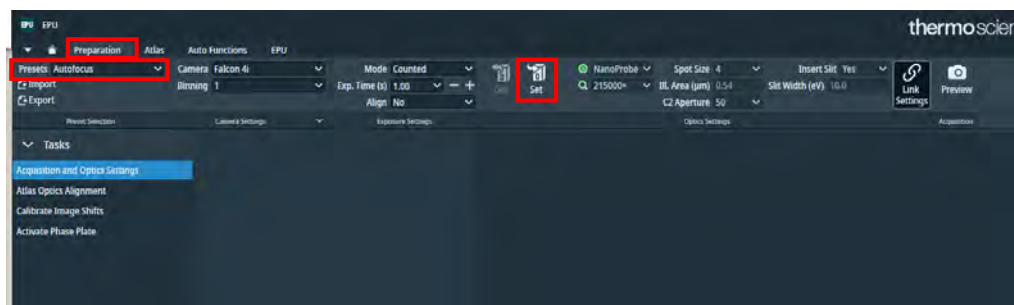


- ☐ Flucam Viewer が **EF** (=EF mode の中心を緑の円で表示)、
Natural **High Resolution** となっていることを確認

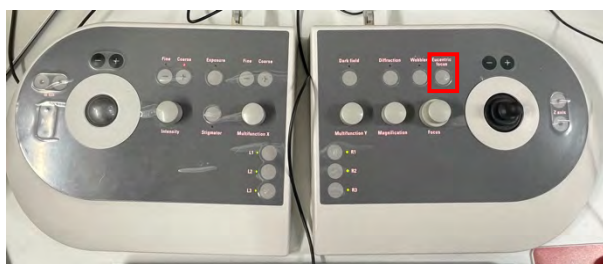


2. ピボットポイントの調整 (KEK マニュアル 3.)

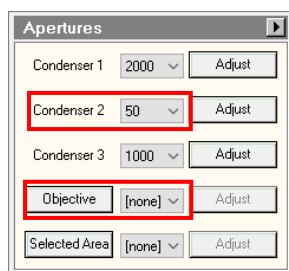
- グリッドの穴にいて、蛍光板が下りていることを確認
- EPU > Preparation tab > Presets から Autofocus (Data Acquisition) を選んで Set



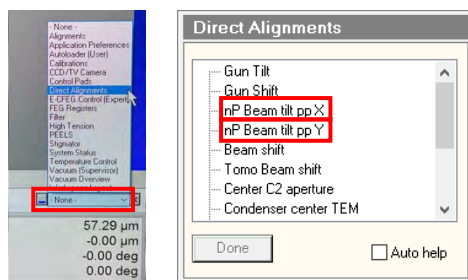
- 操作板の **Eucentric Focus** を押す



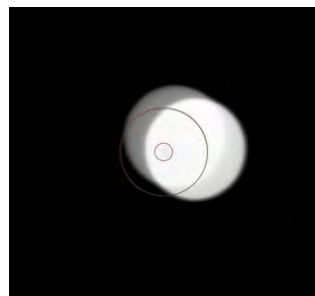
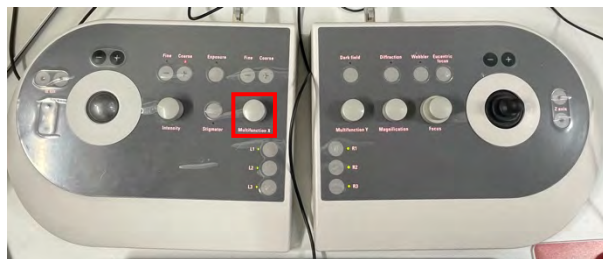
- TUI > Stage tab > Apertures を見て **C2=50, Obj=none** であることを確認
(*C1=2000, C3=1000 は今後一切触らなくて OK)



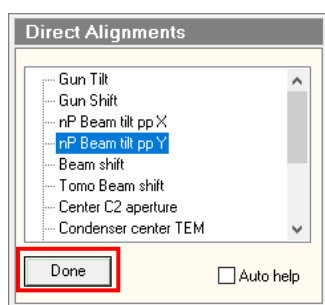
- TUI 右下 > **Direct Alignment** から **nP Beamtilt pp X** を選ぶ



- 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

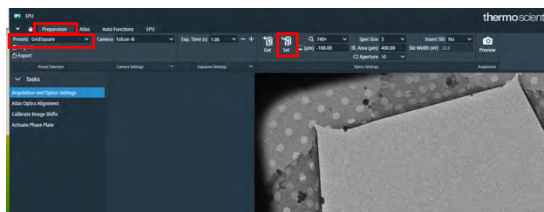


- TUI 右下 > **Direct Alignment** から **nP Beamtilt pp Y** を選ぶ
- 操作板の **Multifunction-X** のみで、点滅する2つの光が重なるように調整する
- **Done** を押す

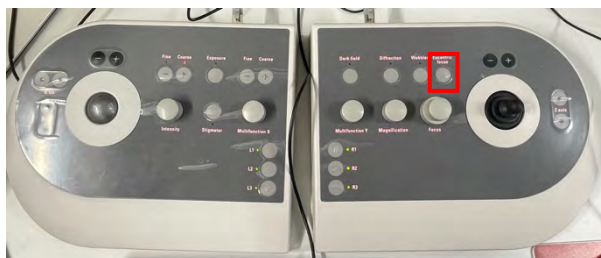


3. C2 絞りの中心合わせ (KEK マニュアル 2.)

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



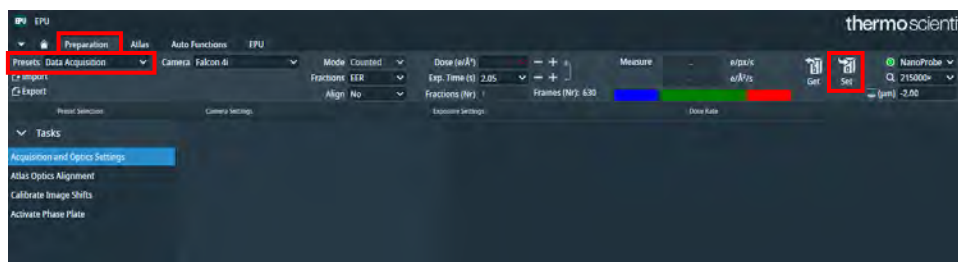
- 操作板の **Eucentric Focus** ボタンを押す (*x740 で Obj lens=7%前後)



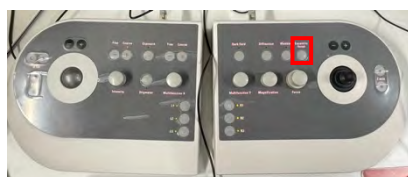
High tension:	300 kV	Beam Current:	5.8 nA	Dose rate:	0.00 e/Å²s	C2 Lens:	52.478 %	Cooling BM-Ceta:	Stable X:	-108.57 μm
EFTEM		Screen current:	0.144 nA	Defocus:	0 nm	C3 Lens:	43.385 %	Cooling EF-Falcon:	Stable Y:	-127.39 μm
LM 740 x		Spot size:	3	Illuminated area:	400 μm	Obj Lens:	7.0473 %	A:	-0.01 deg Z:	-10.22 μm

TUIの下の方 x740で、Obj lens=7%前後であることを確認。
Defocusが0でなければ操作板R2 (Reset Defocus) で0にする。

- EPU > Preparation tab > Presets から Data Acquisition を選んで Set



- 操作板の **Eucentric Focus** ボタンを押す (*設定した倍率で Obj lens=80%前後)
(*Defocus が 0 でなければ操作板 R2 で 0 にする。)

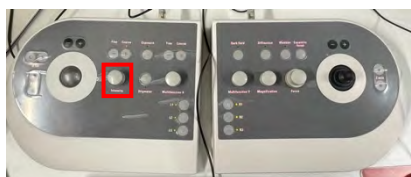


High tension:	300 kV	Beam Current:	5.0 nA	Dose rate:	15.8 e/Å²s	C2 Lens:	41.005 %	Cooling BM-Ceta:	Stable X:	-520.90 μm
np EFTEM		Screen current:	0.066 nA	Defocus:	0 nm	C3 Lens:	49.561 %	Cooling EF-Falcon:	Stable Y:	-623.28 μm
SA 165 kx		Spot size:	4	Illuminated area:	700 nm	Obj Lens:	80.7993 %	A:	-0.01 deg Z:	-0.01 μm

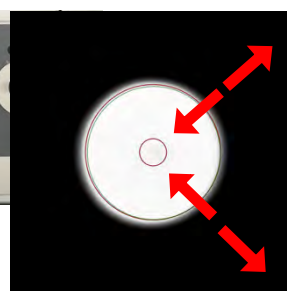
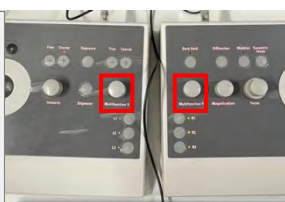
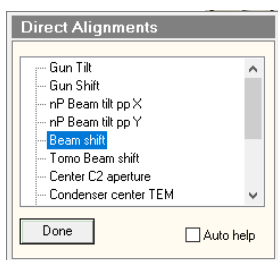
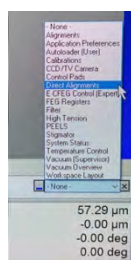
- TUI > Stage tab > Apertures を見て **C2=50, Obj=none** であることを確認 (p. 9)

1 回目

- Intensity ダイアルを左に回して光を絞って、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** > **Beam shift** を選び **Multifunction** ダイアルで光を中央へ合わす

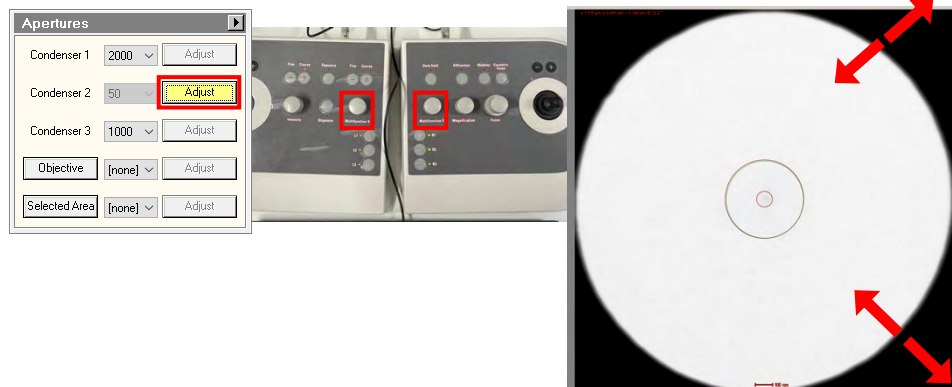


- **Intensity** ダイアルを右に回して、光が黒い背景の大きさになるまで広げる



光のコントラストは、マウスのホイールで調整できる

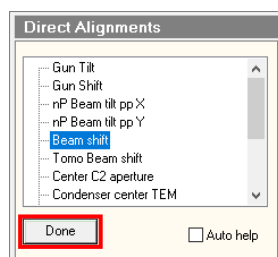
- C2 の右横の **Adjust** を押して、**Multifunction** ダイアルで、光の円が黒い背景に外接するように絞りを移動する



- C2 の右横の **Adjust** をもう一度押す

2 回目

- 再度光を中心の大きい方の円くらいに絞って、**Multifunction** ダイアルで光を中央に移動
- **Intensity** ダイアルを右に回して、光が黒い背景の大きさになるまで広げる
- C2 の右横の **Adjust** を押して、**Multifunction** ダイアルで、光の円が黒い背景に外接するように絞りを移動する
- C2 の右横の **Adjust** をもう一度押す
- 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 Beam shift を **Done** する

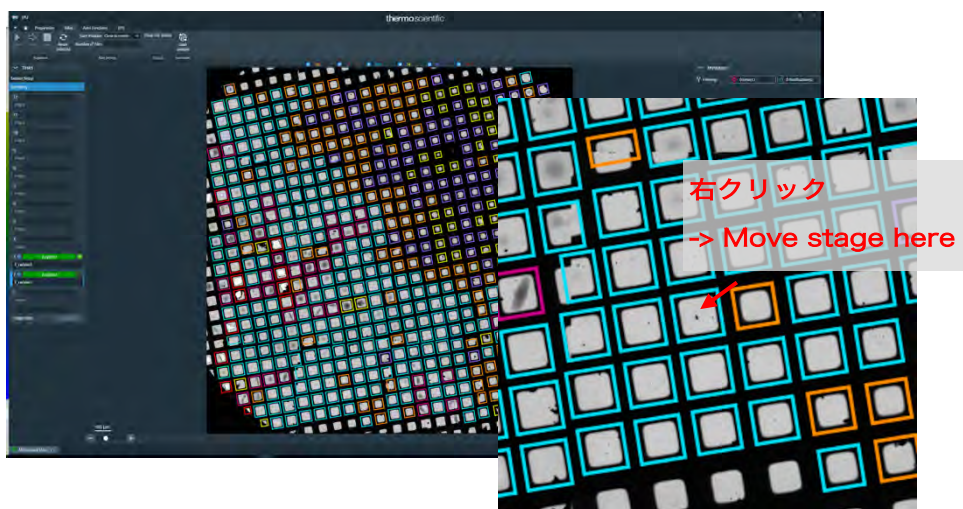


*Atlas のときは C2=150 を使うので、atlas で不具合を感じたときなどは C2=150 でも同様の調整を行うとよいかも。

4. Rotation Center（電流軸を対物レンズの中心に通す）（KEK マニュアル 4.）

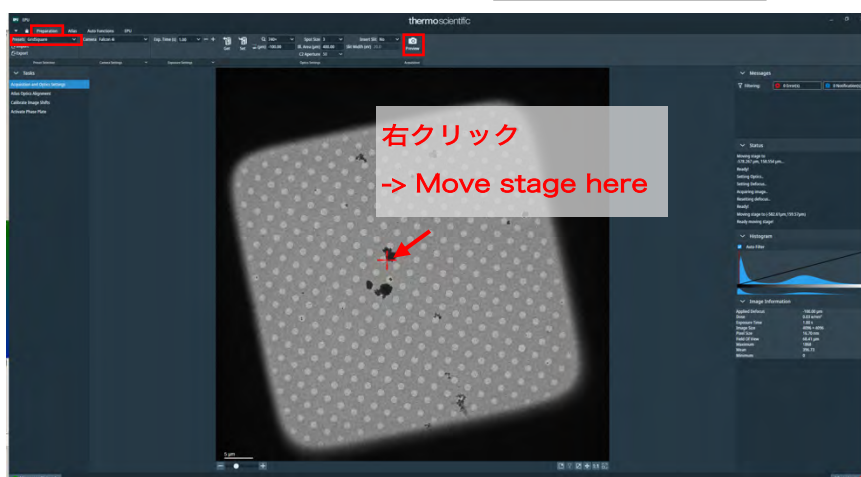
*この項目は、後で Sherpa を使った AutoCTF で coma 補正を行う場合は省略可

- ☐ （*前項の続きなら、グリッドの穴の空いたところにいて、蛍光板は下りている）
- ☐ 蛍光板を上げる（操作板 **R1** ）
- ☐ EPU > 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

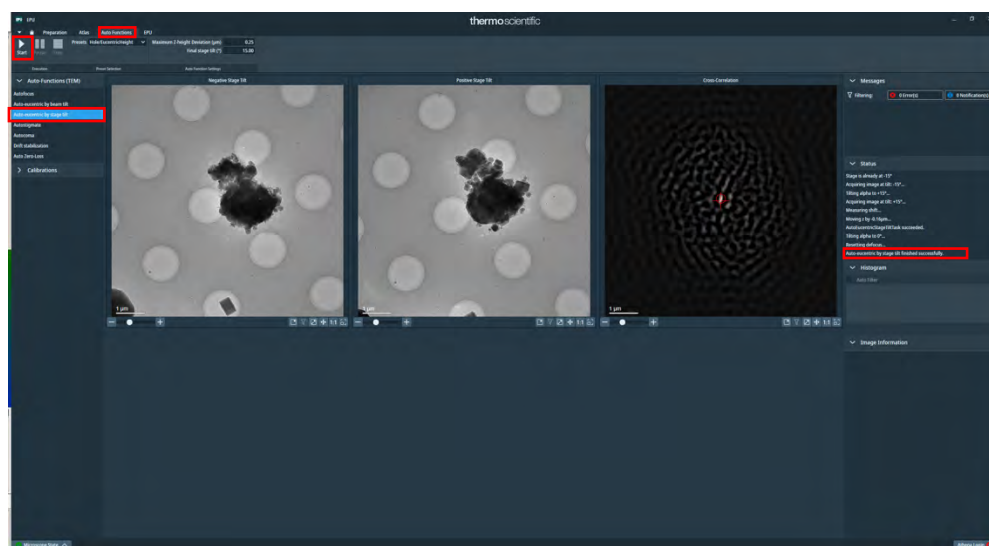
- ☐ EPU > Preparation tab > Presets から Grid Square を選び **Preview**
- ☐ 目立つゴミのあるところに右クリック **Move stage here** で移動



- EPU > Preparation tab > Presets から Hole/Eucentric を選び Preview
- 目立つゴミのあるところに右クリック Move stage here で移動



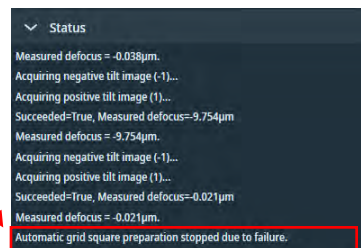
- EPU > Auto Functions tab で Auto-eucentric by stage tilt を確認
- Presets を Hole/Eucentric にして Start
- Status で「Auto-eucentric by stage tilt finished successfully」の表示を確認



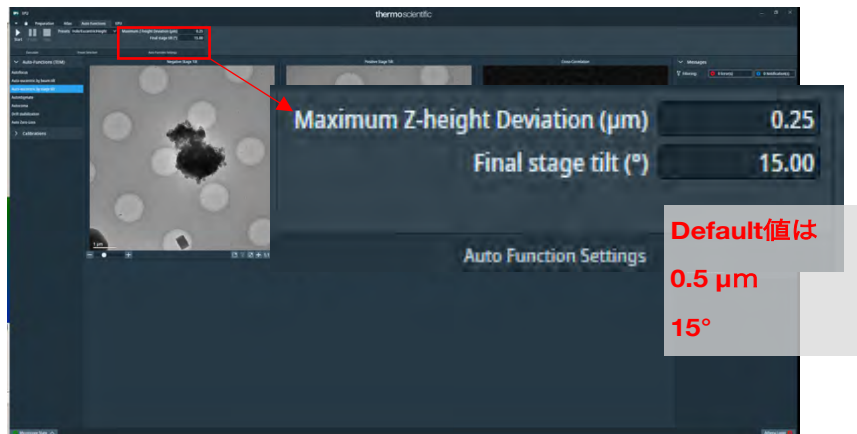
*傾斜軸は画面に対して横向きに走っている

うまく eucentric height が決まったら、p. 23 へ

*Auto-eucentric が失敗したら



EPU > Auto Functions tab > Auto Function Settings の値を確認

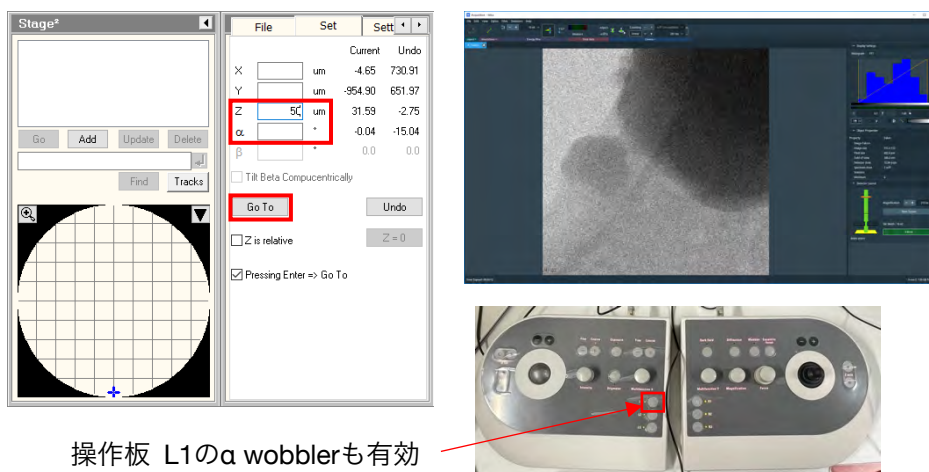


*Final stage tilt を 30°とかにしてみるのもよいかも。

*それでもダメなら **Auto-eucentric by beam tilt** でやってみる
 (どちらかで成功すれば OK)。

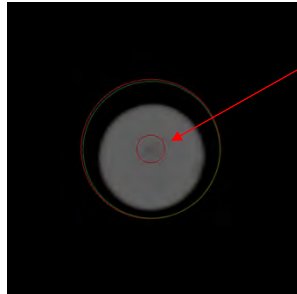
*それでもダメなら、場所を変える。

*どうしてもその場所で eucentric height を決めたいときは、Velox (p. 35) で確認しながら、Stage² で手動で tilt 角 (α) と Z 軸を動かして決める、という手もある。



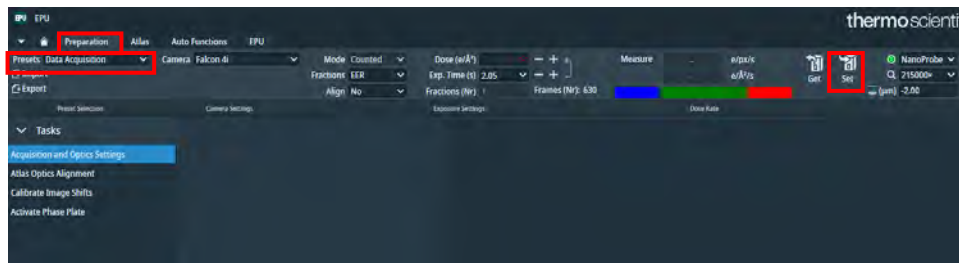
操作板 L1のα wobblerも有効

- **R1** を押して蛍光板を下ろす（ゴミが緑の円の中心になかったら joystick で中心に移動）



この倍率では蛍光板ではわかりづらいですが、マウスのホイールでコントラストを調整して、うっすら黒い影が見えればよい

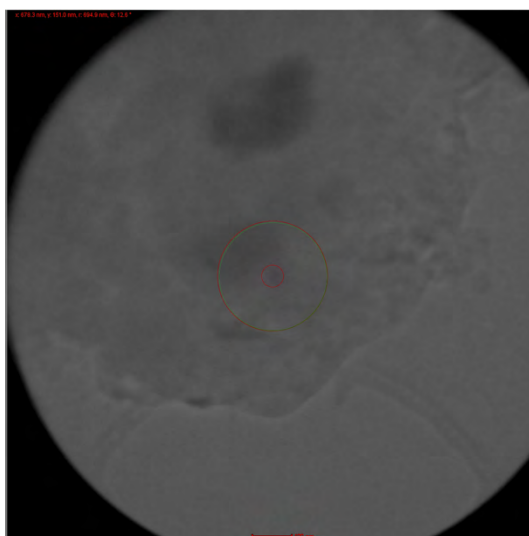
- EPU > Preparation tab > Presets から Data Acquisition を選んで **Set**



- TUI > Stage tab > Apertures で **C2=150（視野を広げる）** , **Obj=none** に
*EPU と蛍光板で画像の向きが違うので、そのつもりで見ること（90°回転している？）
- **Magnification** ダイアルを右に数クリック回して倍率を x350k まで上げる

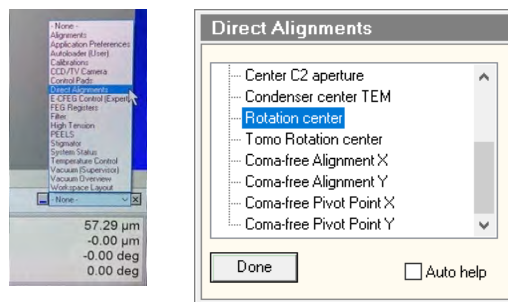
High tension: 300 kV	Beam Current: 5.0 nA	Unavail. Convergence angle: 0.00 nrad	Cooling BM-Ceta: 80.8623 %	Stable Z: 23.85 µm
Screen current: 0.000 nA	Defocus: 4.000 µm	Obj Lens: 3.58 µm	Cooling EF-Falcon: 41.005 %	Stable A: 132.95 µm
Spot size: 4.000 µm	Illuminated area: 700 nm	C2 Lens: 41.005 %		Stable B: 261.93 µm

350 kxになって
いることを確認



*ゴミが見にくかったら、
「Natural」を押す

- TUI 右下> **Direct Alignment** > **Rotation Center** を選ぶ。

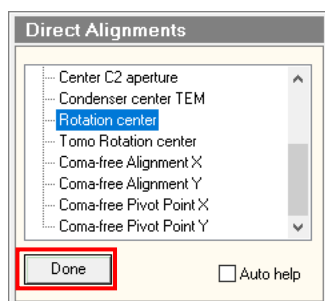


- **Multifunction** ダイヤルで、ゴミが上下左右に動かなくなるように微調整する



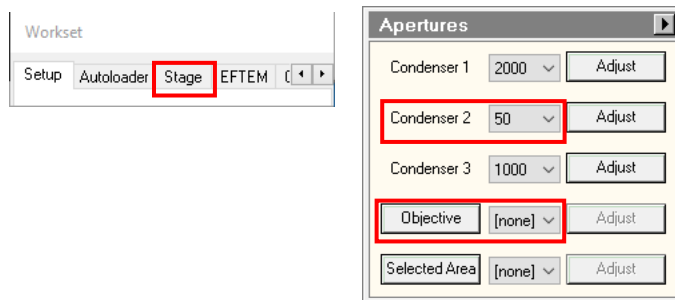
*この後、AutoCTF でコマ収差を除くので、ある程度あっていれば良いそうです

- **Done** を押す

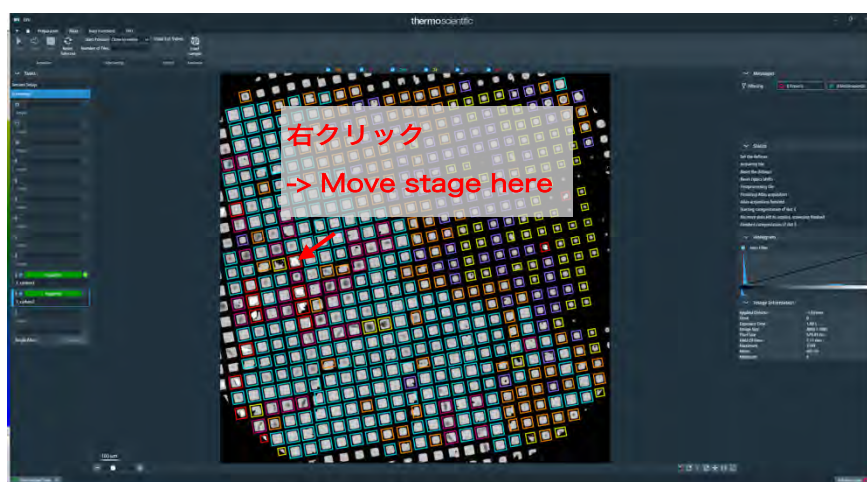


5. Energy filter 関連 (KEK マニュアル 7.)

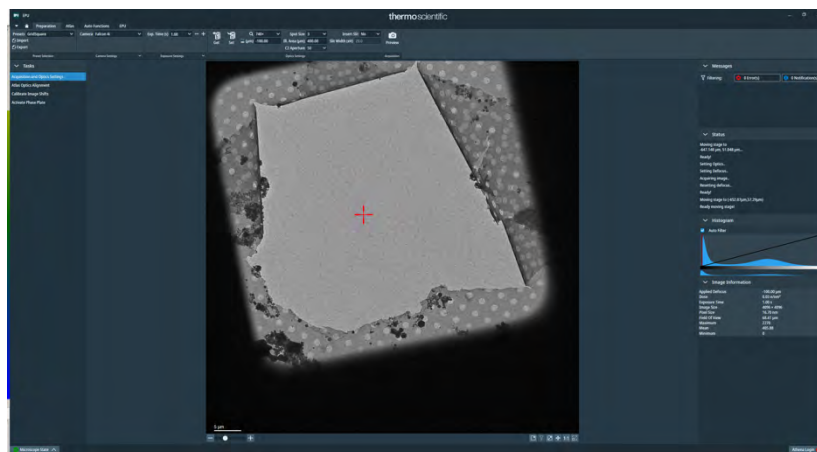
- **R1** を押して蛍光板を上げる
- TUI > Autoloader tab > Apertures を見て **C2=50, Obj=none** にする



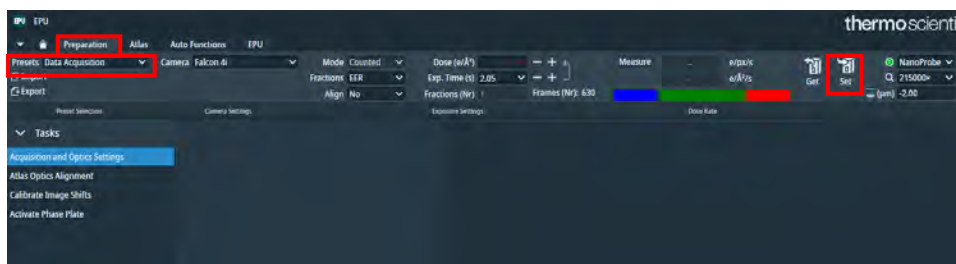
- EPU > Atlas tab で Grid に穴のあいたところに右クリック **Move stage here**



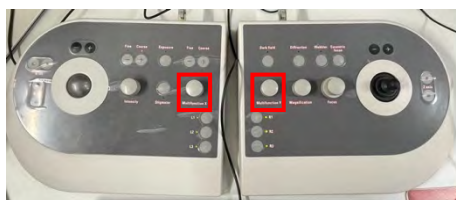
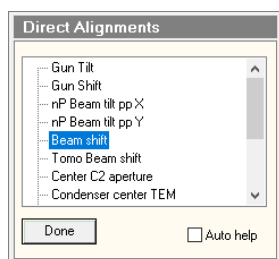
- EPU > Preparation tab > Presets か Grid Square を選び **Preview**
(穴にいるのを確認)



- EPU > Preparation tab > Presets から Data Acquisition を選んで Set



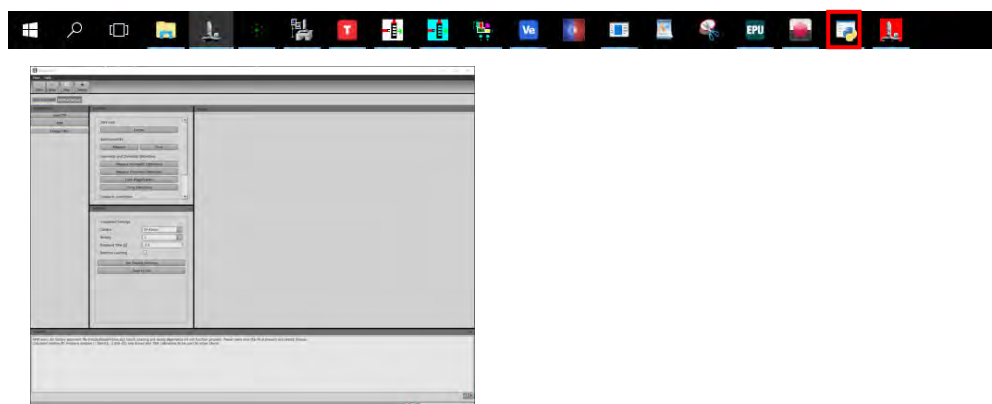
- R1 を押して蛍光板を下げる
- ビームが中央になれば Direct Alignment > Beam Shift で中央にして Done



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

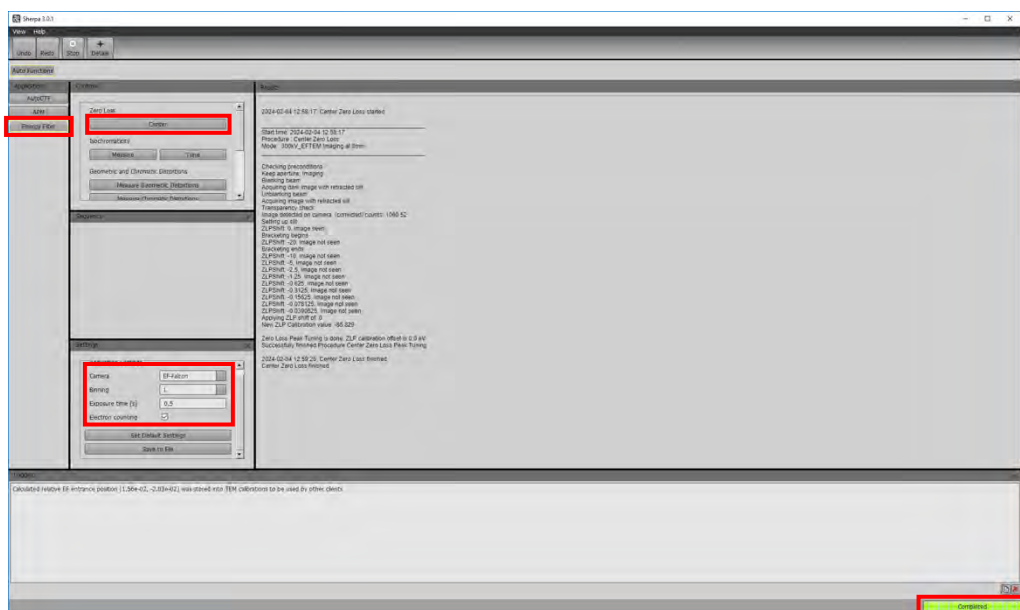


- 通常、既に Sherpa が立上がっているはずなので、window を表に出す

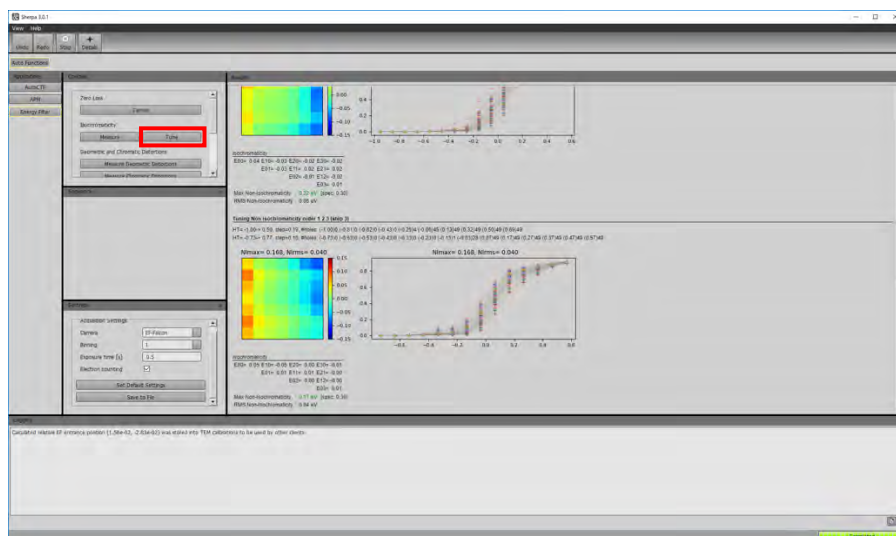


(立上がってない場合は Microscope Software Launcher の Tools から Sherpa を起動)

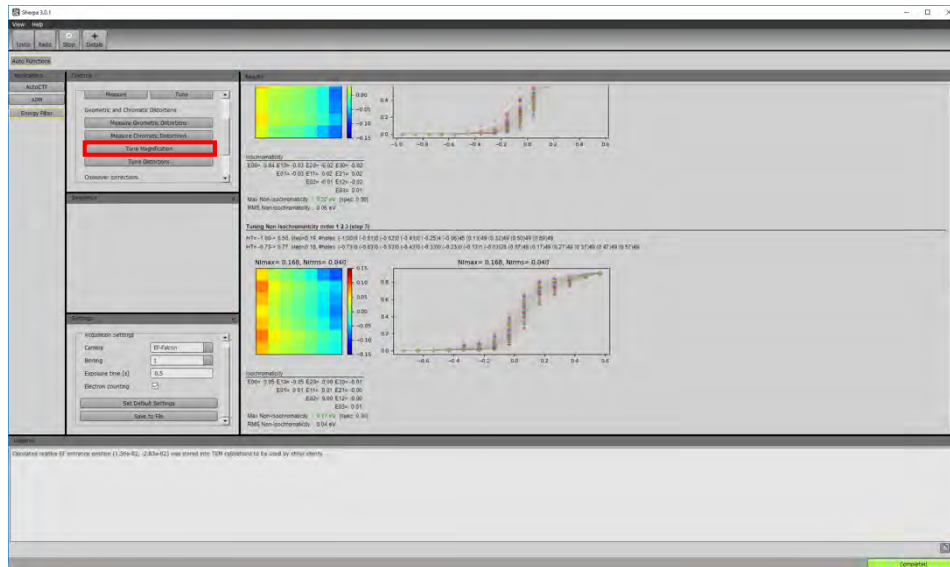
- Sherpa Window の左側にある **Energy Filter** のボタンを押す
- Sherpa Window の左下にある **Settings** の四角を見る
- **EF-Falcon, Bin=1, Exp time=0.5sec, Electron counting** にチェックを入れる
- Sherpa Window の左上にある **Controls** の四角を見る
- Zero loss: スリットの中央にビームを通すため **Center** ボタンを押す
- 画面右下で **completed** と表示されるのを確認（以下同じ）



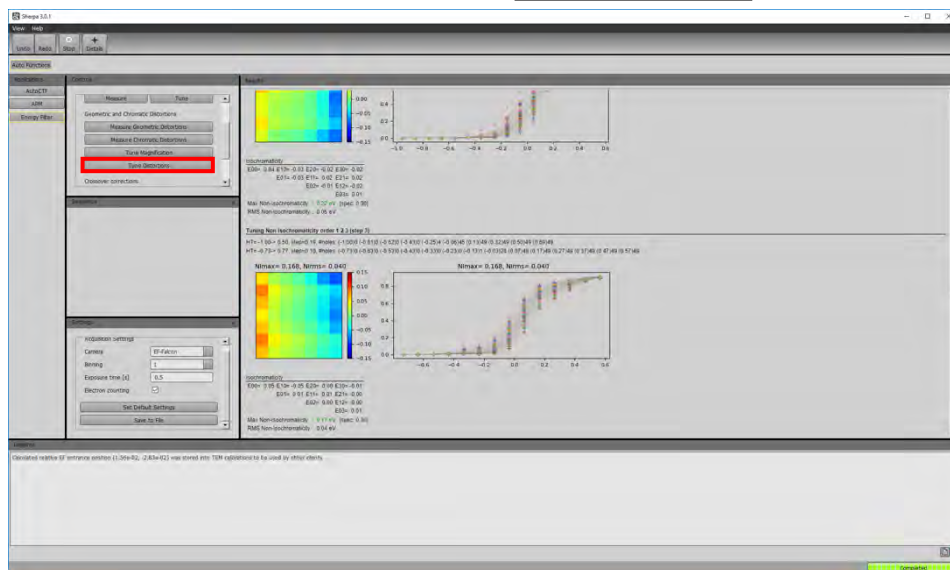
- Isochromaticity: カメラにあたるエネルギーを均一にするため、**Tune** を押ししばらくすると赤緑青の画像が出てくる。この画面の色が一様に緑になるまで数分待つ



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



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



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

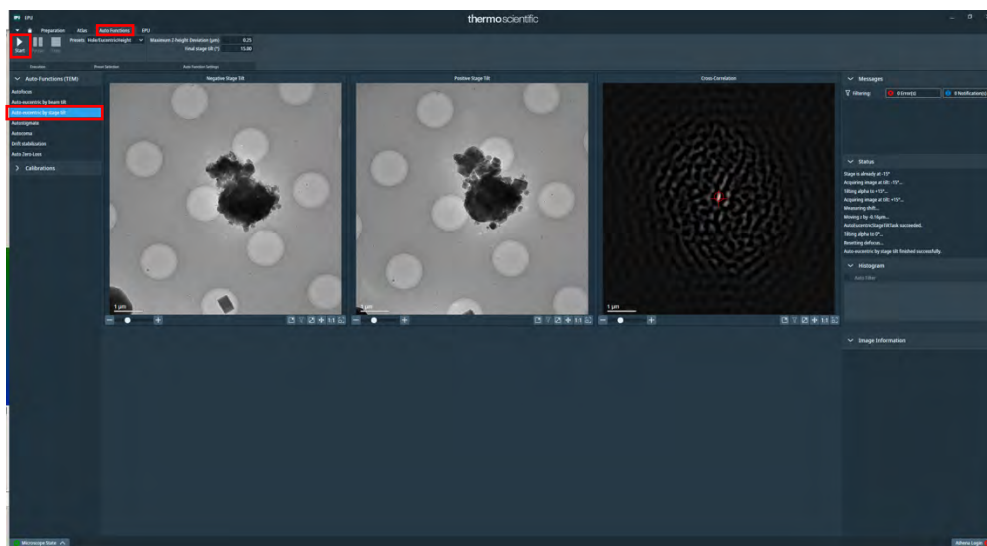
6. AutoCTF (非点収差・コマ収差の補正) (KEK マニュアル 8.)

*この補正は carbon film のグリッドでないとできない

- EPU > Preparation tab > Presets の Hole/Eucentric にゴミ画像が残っているはずなので右クリック **Move stage here** でその付近に移動



- EPU > Auto Functions tab で **Auto-eucentric by stage tilt** を確認
- Presets を Hole/Eucentric にして **Start**



*失敗したら、**Auto-eucentric by beam tilt** でもう一度 (p. 22 も参照)。

- Defocus が 0 μm であることを確認

High tension:	300 kV	Beam Current:	5.0 nA	Unavail. Convergence angle:	0.00 nrad	Y:	23.85 μm
nP EFTEM		Screen current:	0.000 nA	Defocus:	3.58 μm	Obj Lens:	80.8623 %
SA 165 kx		Spot size:	4	Illuminated area:	700 nm	C2 Lens:	41.005 %
						Cooling BM-Catal:	Stable Z
						Cooling EF-Falcon:	Stable A
							261.93 μm B
							0.00 deg

*0 であってもいいみたい

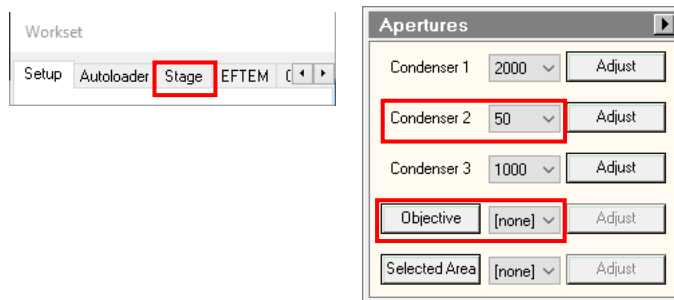
- EPU > Preparation tab > Presets から Hole/Eucentric を選び Preview
- ゴミのないカーボン面を右クリックして Move stage here



- EPU > Preparation tab > Presets から Data Acquisition を選んで Set

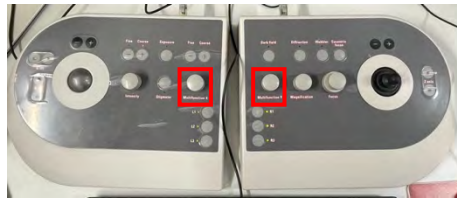
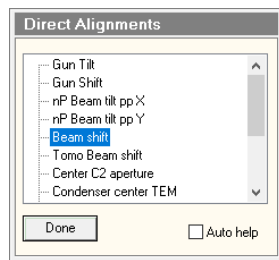


- TUI > Autoloader tab > Apertures を見て C2=50, Obj=none であることを確認

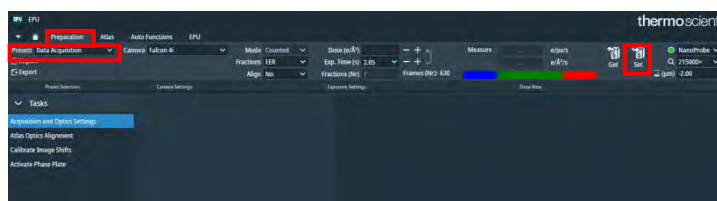


- R1 を押して蛍光板を下げる

- ビームが中央になれば **Direct Alignment** > **Beam Shift** で中央にして **Done**



- もう一度、Data Acquisition で **Set** して、**R1** を押して蛍光板を上げる



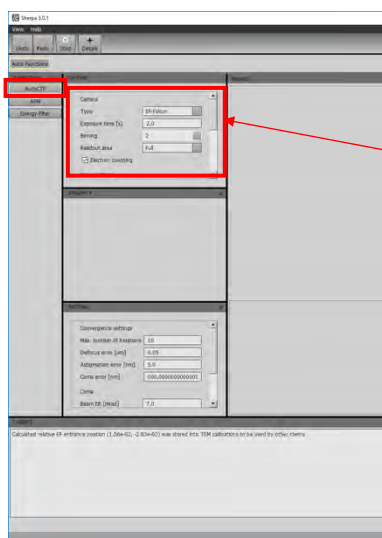
- Sherpa は立ち上がっているはずなので、Sherpa の画面を見る

- Sherpa Window の左側にある **AutoCTF** のボタンを押し

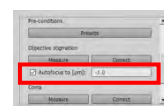
Camera > Type を EF-Falcon に

- EC mode なので **Electron counting** のボックスにチェックを入れる

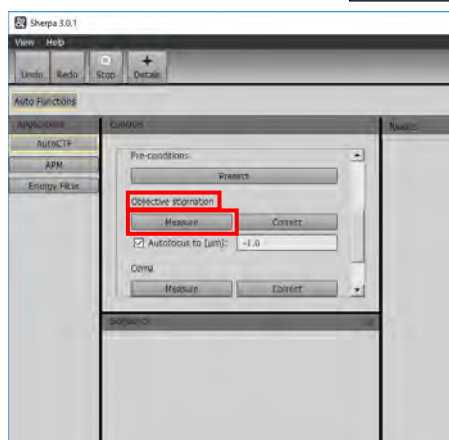
- Exp. Time=2, Binning=2, Readout=Full, Auto-focus-to=チェックして-1.0



スクロールして下へ



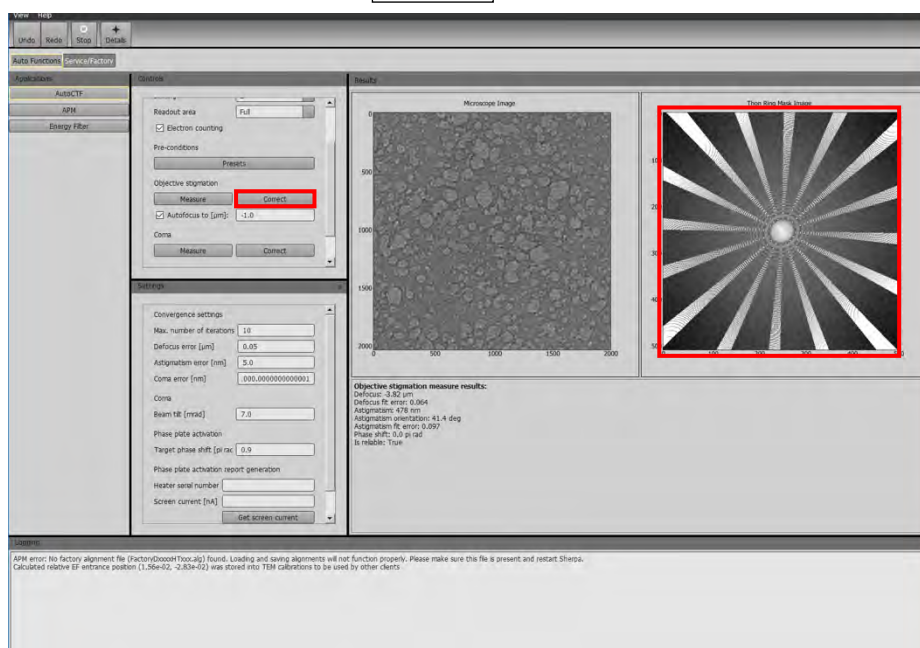
- Objective Stigmation の Measure を押す



*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 -800 nm かける

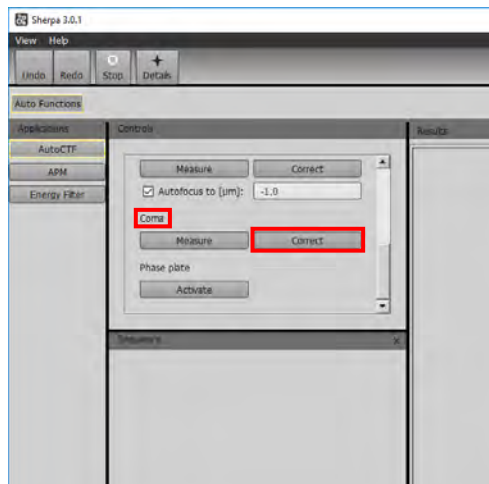
- トーンリングが拾えたら、Correct を押す



(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（コマ収差をとる）



- 右下に Completed と出たら、再度 **Objective Stigmatism** の **Correct** を押す

*AutoCTF が全くうまくいかない場合は何かが変。最初からやり直しましょう

- 終わったら Sherpa の window は最小化しておく

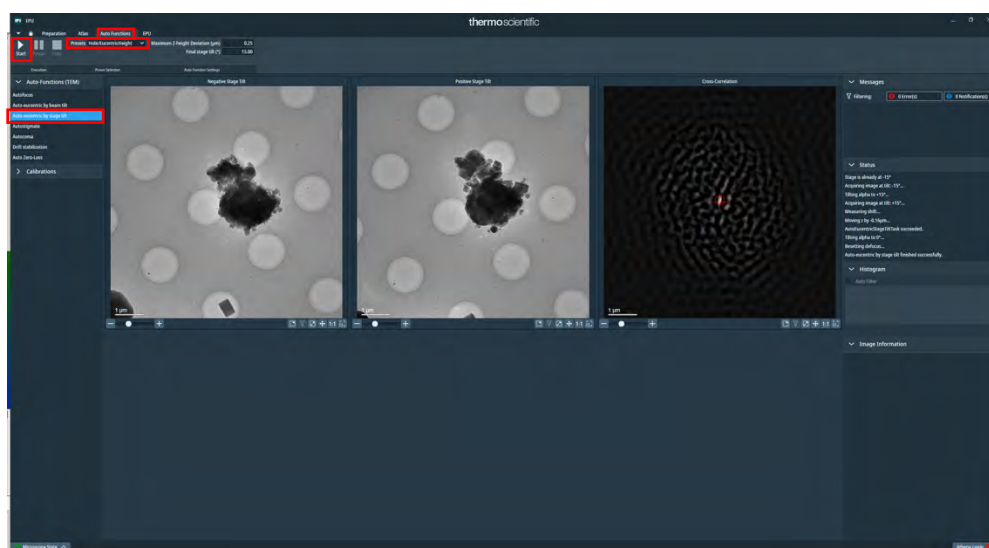
7. EPU の倍率間の中心合わせ (KEK マニュアル 11.)

(*UltrAufoil を使うときは、この調整は UltrAufoil で行うほうがよい)

- EPU > Preparation tab > Presets の Hole/Eucentric にゴミ画像が残っているはずなので **Move stage here** でゴミの角もしくはゴミと Hole の交点に移動



- EPU > Auto Functions tab で **Auto-eucentric by stage tilt** を確認
- Presets を Hole/Eucentric にして **Start**

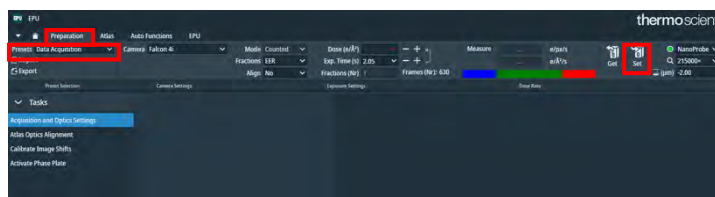


*失敗したら、**Auto-eucentric by beam tilt** でもう一度 (p. 22 も参照)。

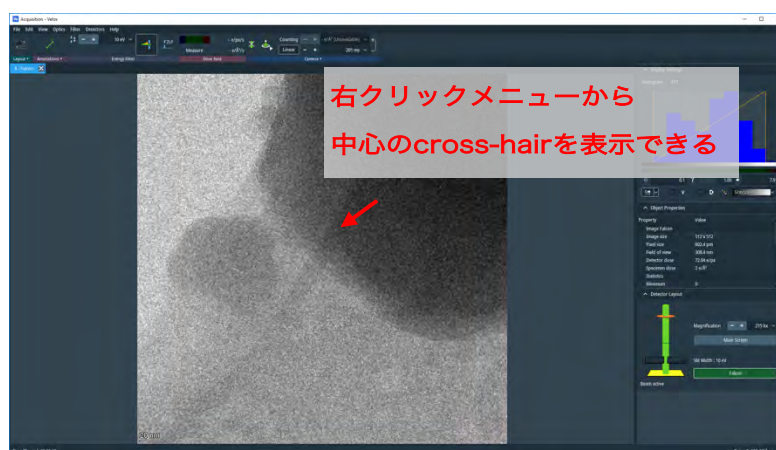
- EPU > Preparation tab > Presets から Hole/Eucentric を選び Preview
- ゴミの角もしくはゴミと Hole の交点などに Move stage here



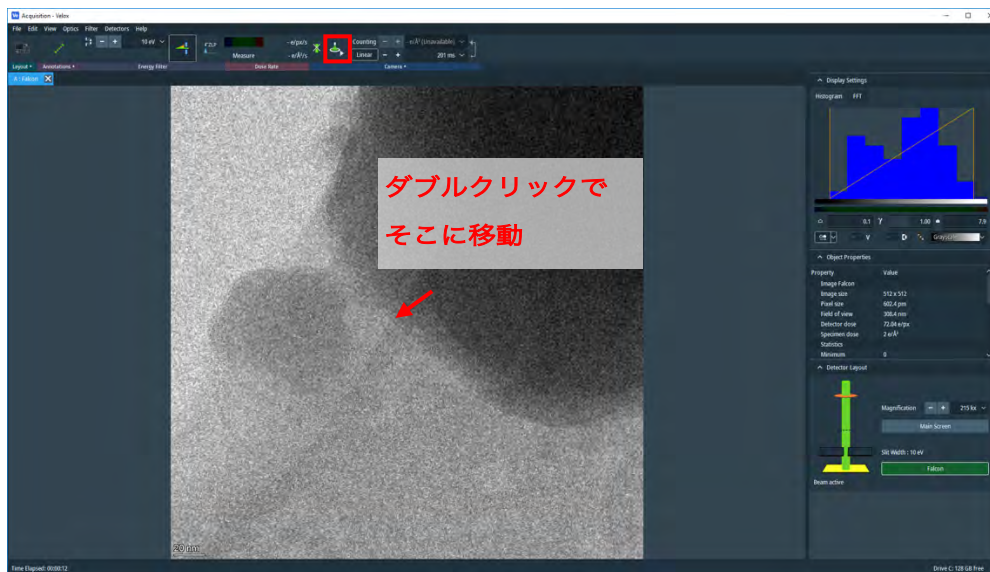
- EPU > Preparation tab > Presets から Data Acquisition を選んで Set



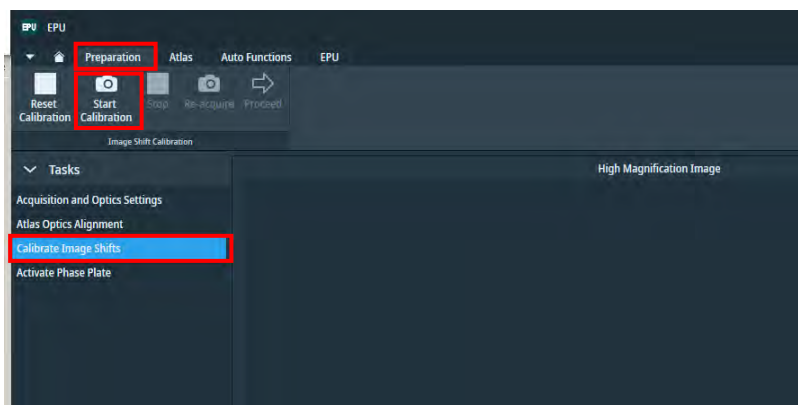
- Velox を立ち上げる（ふたつ window があるが、Acquisition のみ使用する）



-  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？



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

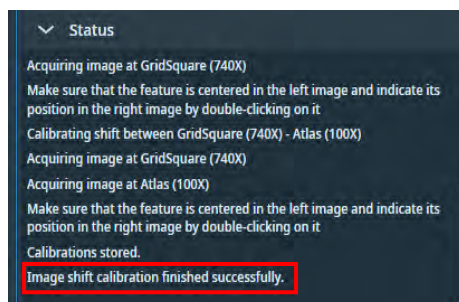


- x215k（または撮りたい倍率）の画像（画面左側）を見る。 Proceed

*中心がズれていたらダブルクリックであわせてから Re-aquire
よほどズれている場合以外はやらないほうがよい？



- x6500 の画像、x215k の中心と対応する場所をダブルクリックして Proceed
- x6500 の画像が左側になる
- 以下同様に、
- x740 の画像、X6500 の中心と対応する場所をダブルクリックして Proceed
- x155 の画像、X740 の中心と対応する場所をダブルクリックして 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

（carbon film のグリッドの場合）毎日のビーム調整は以上

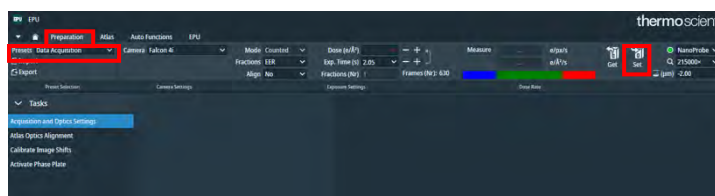
8. 対物絞りの中心合わせ (KEK マニュアル 6.)

(*UltrAufoil を使うときは、この調整を UltrAufoil で行う)

- ☐ 蛍光板を確認。入っていたら **R1** を押して蛍光板を上げる。
- ☐ EPU > Preparation tab > Presets の Hole/Eucentric にゴミ画像が残っているはずなので **Move stage here** でその付近に移動
- ☐ EPU > Auto Functions tab で **Auto-eucentric by stage tilt** を確認
- ☐ Presets を Hole/Eucentric にして **Start**
- ☐ EPU > Preparation tab > Presets から Hole/Eucentric を選び **Preview**
- ☐ Hole と hole の間で、ゴミのないところを右クリックして **Move stage here**

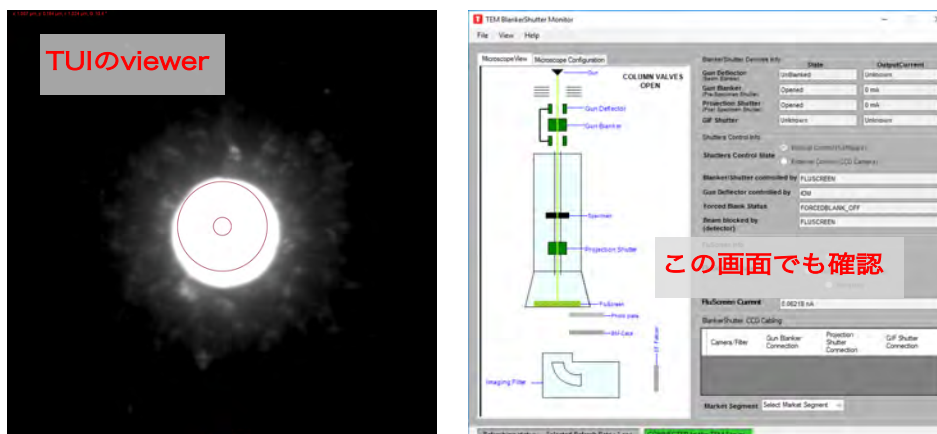


- ☐ EPU > Preparation tab > Presets から Data Acquisition を選んで **Set**

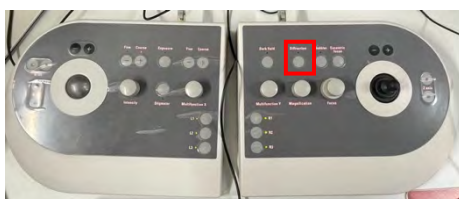


- TUI > Autoloader tab > Apertures を見て **C2=50, Obj=none** であることを確認
- ここで必ず **R1** を押して蛍光板を下ろす！

*蛍光板を下ろさずに **Diffraction** ボタンを押すとカメラが壊れる可能性あり



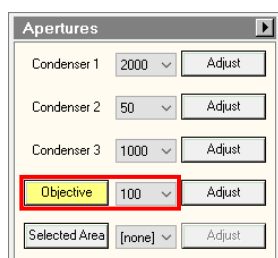
- 操作板の **Diffraction** ボタンを押す



- TUI の下を見て、D = xx m などとなっていることを確認

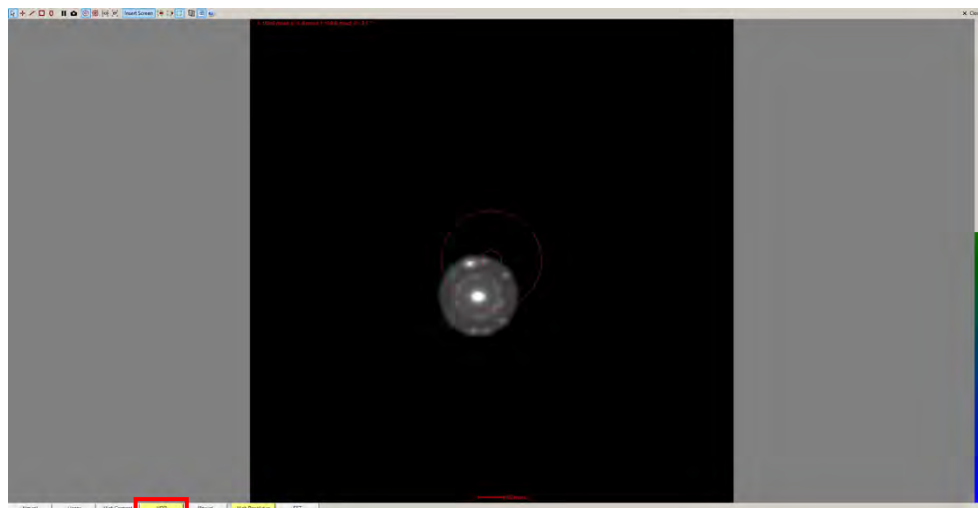
High tension:	300 kV	Beam Current:	5.3 nA
nP EFTEM		Screen current:	0.065 nA
D 2.5 m		Spot size:	4

- TUI > Autoloader tab > Apertures を見て **Obj = 100** に変更

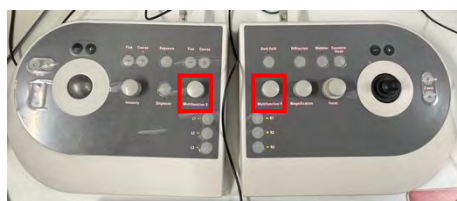
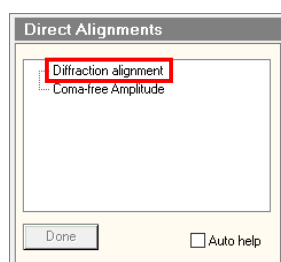


- TUI は HDR モードにする

(*対物絞りの影が見つらい場合はマウスホイールで調整)

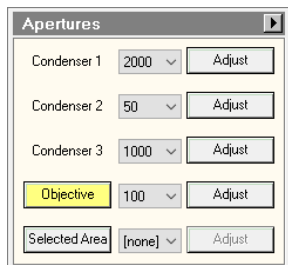


- ビームが中央になれば Direct Alignment > Diffraction Alignment で、**Multifunction** ダイアルで中央にもってくる



- (以下の枠内の 3 点は、よほどズれていない限りやらないほうが無難?)

- Objective の横の **Adjust** ボタンを押す



- **Multifunction** ダイアルで、明るい光の中心と、周囲のぼやっとした光の中心が合うようにする



- Objective の横の **Adjust** ボタンを再度押す

- 操作板の **Diffraction** ボタンを再度押して **diffraction mode** を終了

*FluCam Viewer の表示は自動で Natural に戻るはず

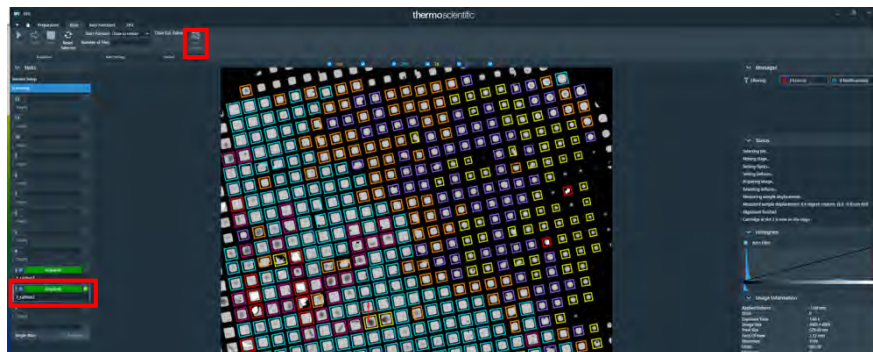
ビーム調整は以上

UltrAufoil での観察は、**Obj = 100** としたまま行えばよい

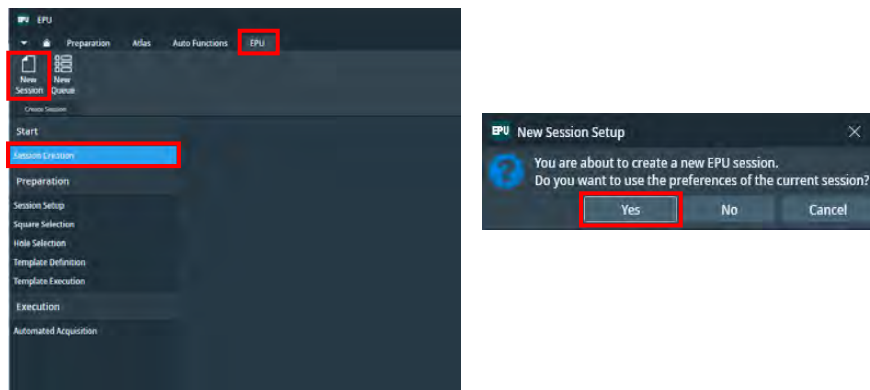
III. データ測定

1. グリッドのスクリーニング

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

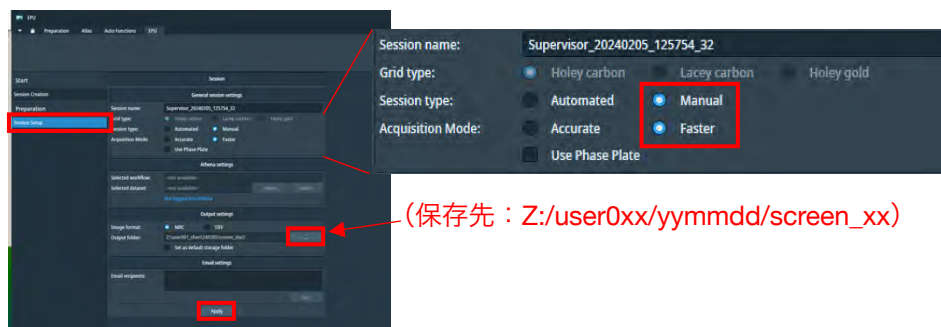


- EPU > EPU tab から、Session Creation -> New Session -> Yes



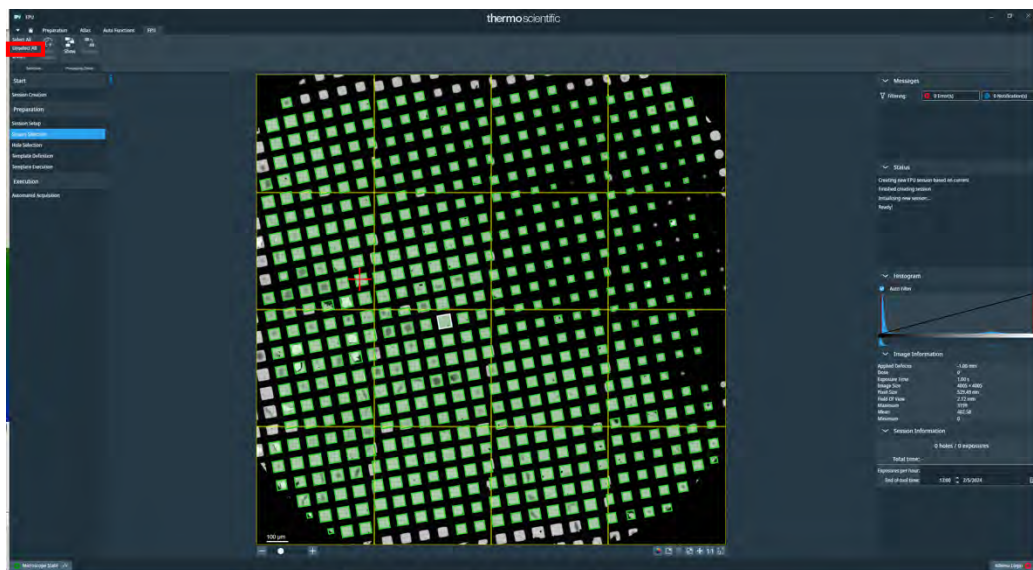
- Session Setup を押す

(Session type: Manual, Acquisition mode: Faster を選択)

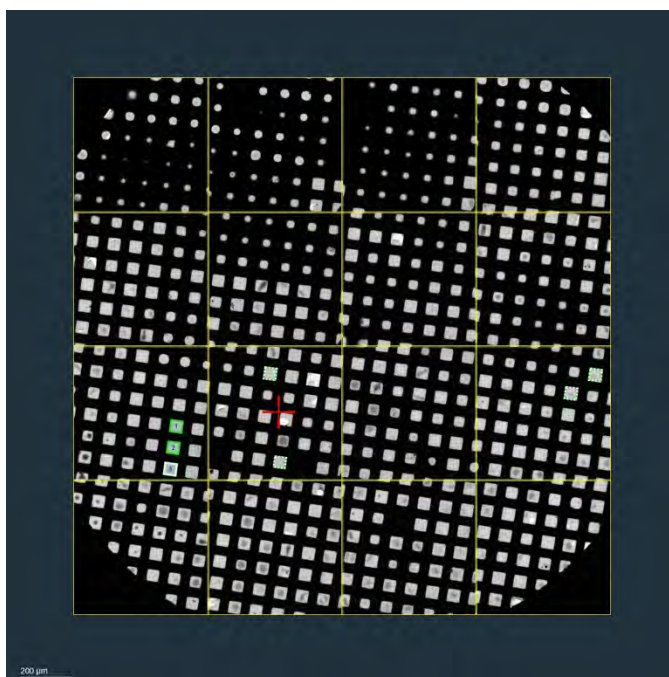


- Apply を押す

- **Square Selection** を押す -> スクエアが自動選択されているが **Unselect All**

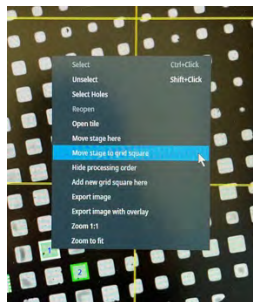


- 2-3 の代表的なスクエアを選択 (Ctl + 左クリック) する

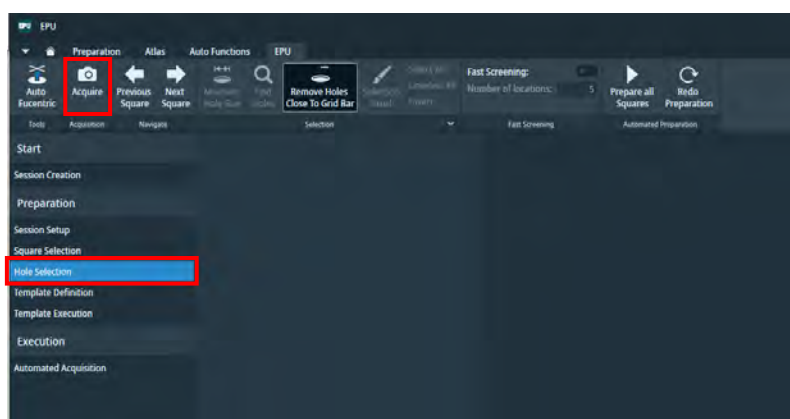


- *氷の薄そうなの、少し厚い、厚い、などバラつかせるとよい
- *選択したスクエアの番号を出す場合は、右クリックして Show processing order
- *スクショを撮っておく 右クリック -> Export image with overlay
- ズームしたまま上記を行うと、ズーム画像が保存されてしまうので注意。

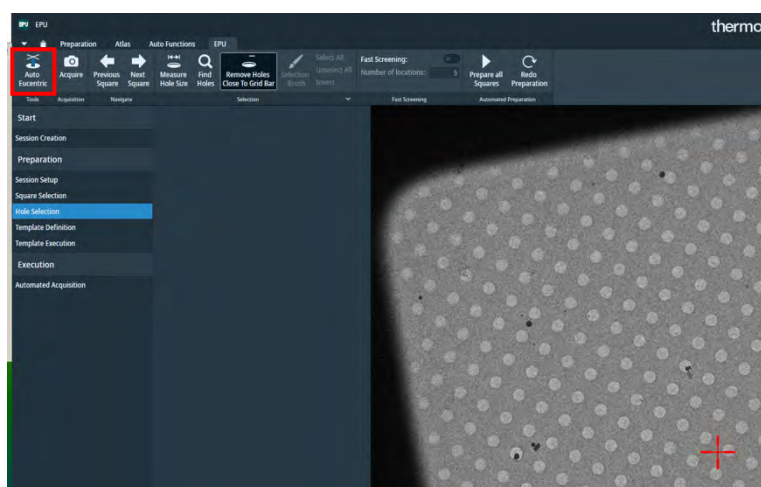
- 最初のスクエアを右クリック -> Move stage to grid square



- Hole selection を押す
- Acquire で撮影して、良いスクエアか確認。良ければ以下へ



- 左上の Auto Eucentric ボタンを押す

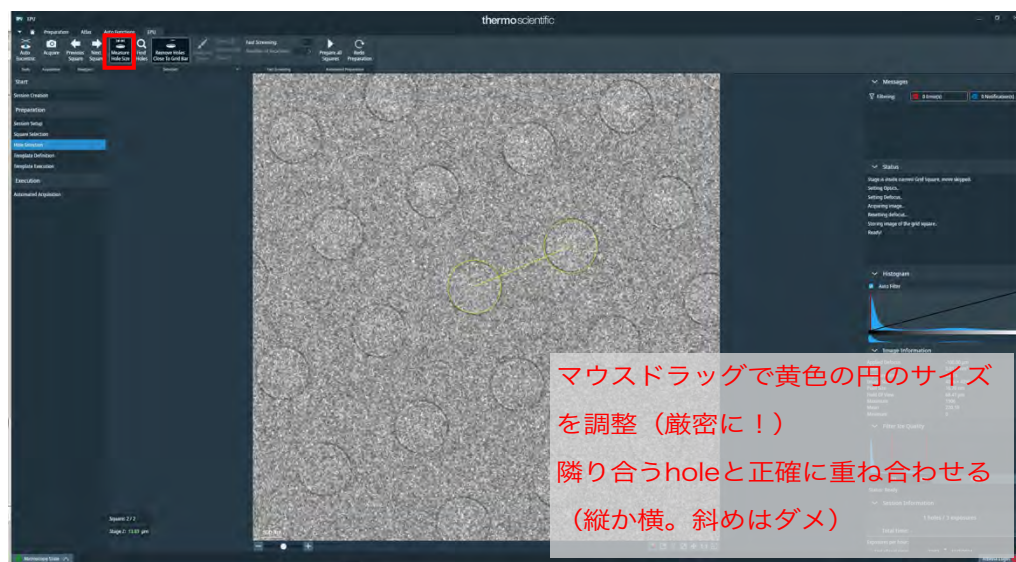


*Auto Eucentric がコケた場合、Auto Functions tab から **Auto-eucentric by stage tilt** になっていることを確認して **Start** でうまくいくこともある

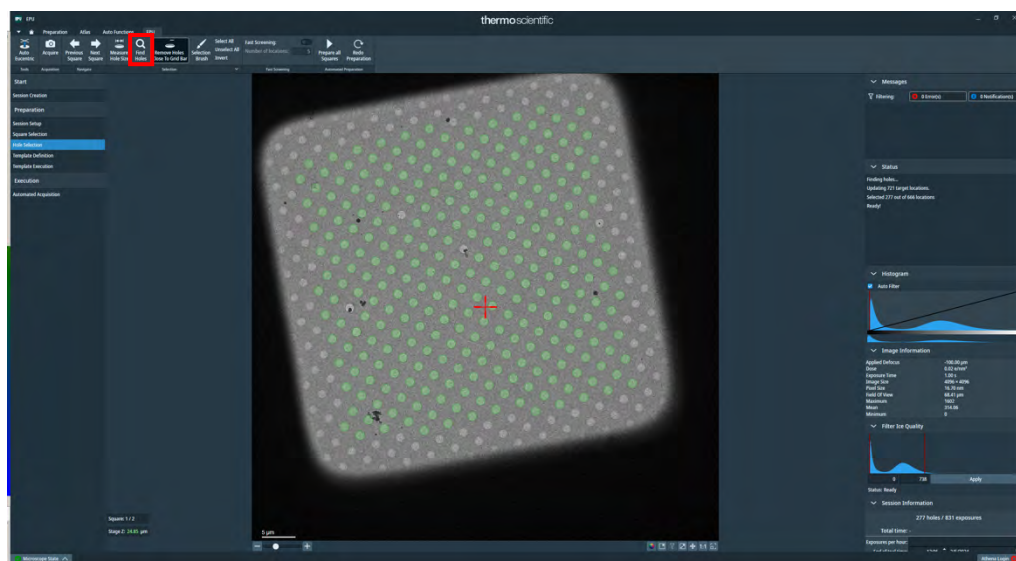
*それでも失敗したら、**Auto-eucentric by beam tilt** で **Start** どちらかで上手くいけばよい (p. 22 も参照)

*Eucentric height が決まったら、**Hole selection** に戻って **Acquire** (新しい eucentric height が反映される)

- うまく決まったら **Measure Hole Size** を押して、hole の大きさと隣接する hole との間隔を定義する



- **Find Holes** で hole を自動認識させる

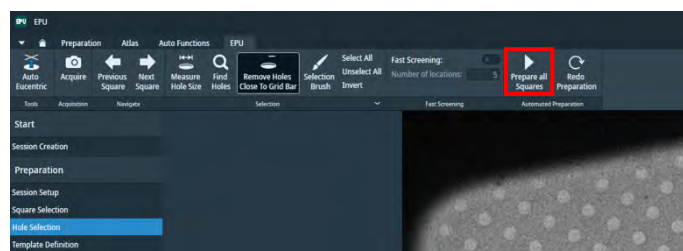


- うまく hole が拾えたら **Unselect All** して、代表的な数 hole を選択 (Ctl + 左クリック)



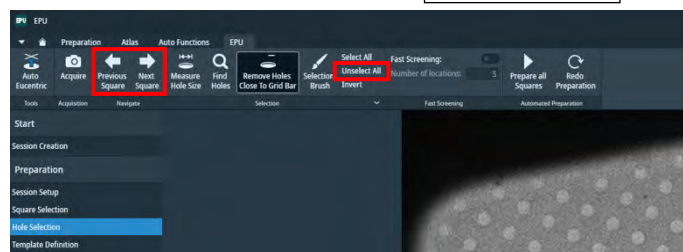
*スクエアの中心や周縁部など、見た目の氷の厚さも考慮して選ぶとよい

- **Prepare all Squares** を押して、選択した全てのスクエアで同じ事をさせる



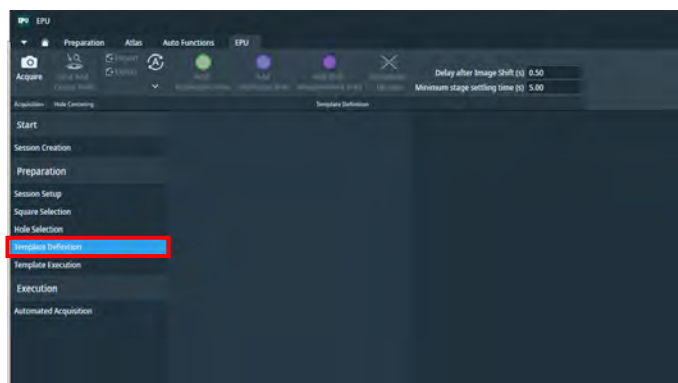
*途中でfailした場合はスクエアを選び直すか p. 52を参照

- **Next Square/Previous Square** でスクエアを移動して hole の認識を確認
各スクエアで認識された hole を **Unselect All** して、代表的な数 hole を選択



*各スクエアについて、選択した hole のスクショを撮っておく
右クリック -> Export image with overlay

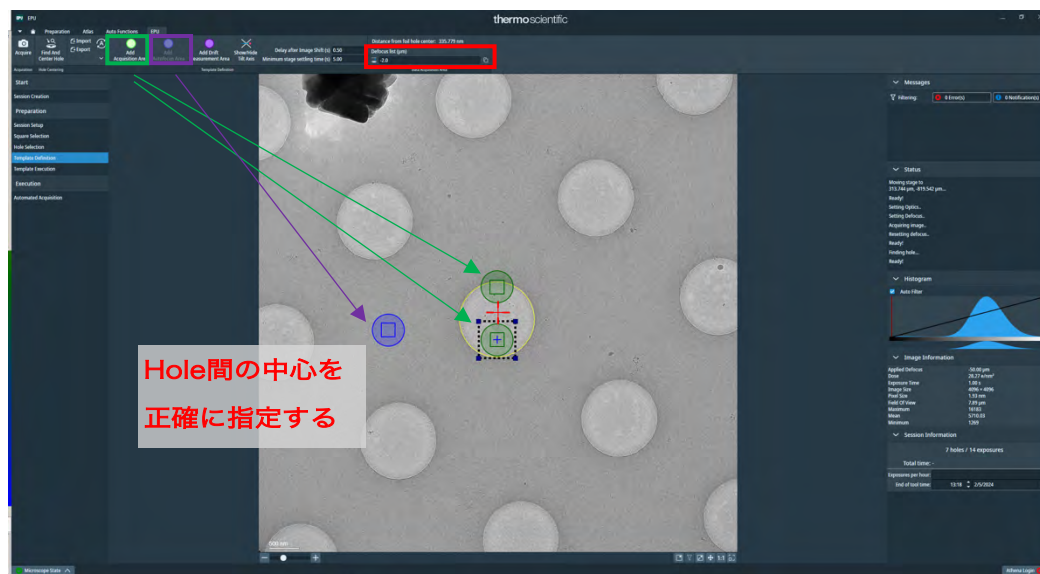
- Template Definition を押す



- Acquire -> Find and Center Hole



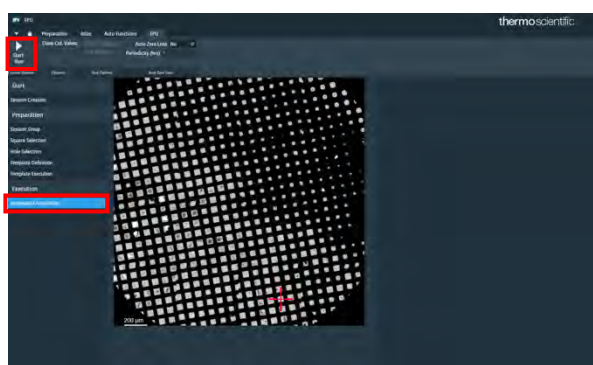
- **Add Acquisition Area** で hole のどこを撮るのかを指定。
複数箇所可（中心と端など条件を変えるとよい）。
- Defocus 値を指定。スクリーニングのときは少し大きめに、-2.0 μm 等でよい。
撮影場所を複数箇所指定した場合、個別に設定できる。
- **Add Autofocus Area** で focus 合わせの照射位置を指定する。



スクショを撮っておく（defocus 値を含めた画面全体をとるため、アプリでとる）



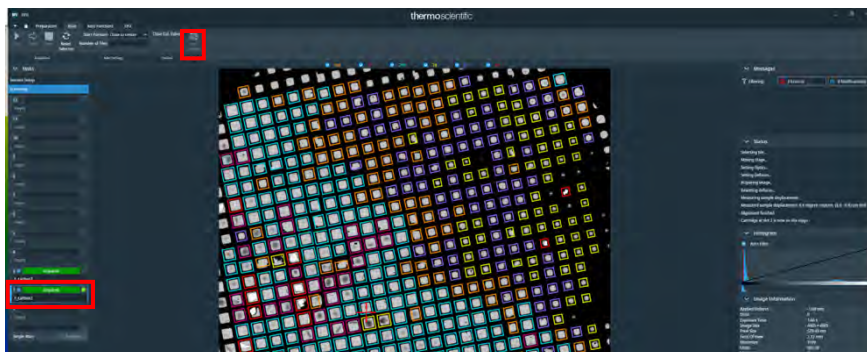
- **Automated Acquisition** から **Start**



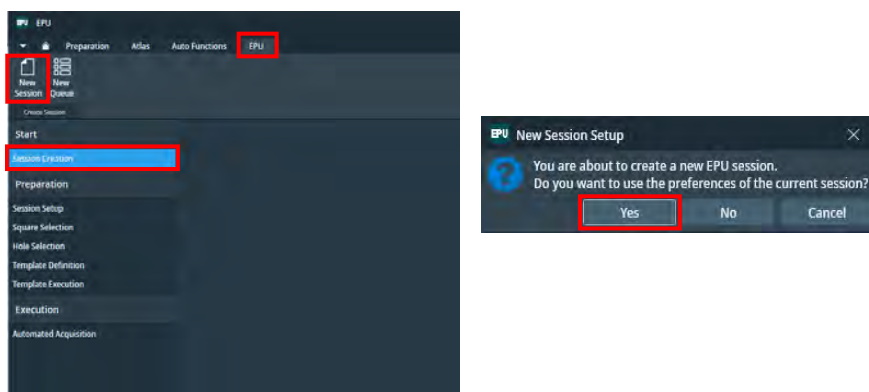
- ひとつのグリッドのスクリーニングが終わったら、グリッドを入れ替えて同じ事を繰り返す

2. データの自動測定

- EPU > Atlas tab でデータ測定を行うグリッドを選択し、Load Sample

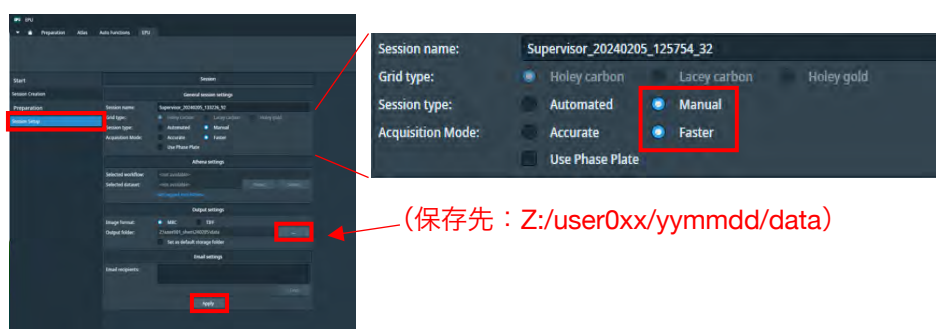


- EPU > EPU tab から、Session Creation -> New Session -> Yes



- Session Setup を押す

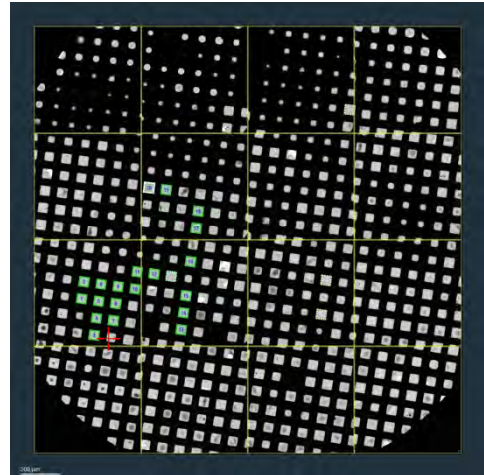
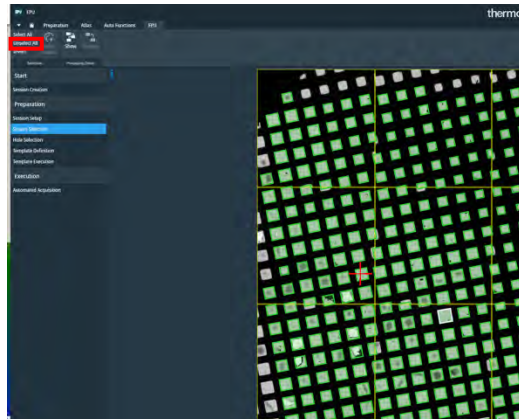
(Session type: Manual, Acquisition mode: **Faster** を選択)



- Apply を押す

- **Square Selection** を押す -> スクエアが自動で選択されているが **Unselect All**

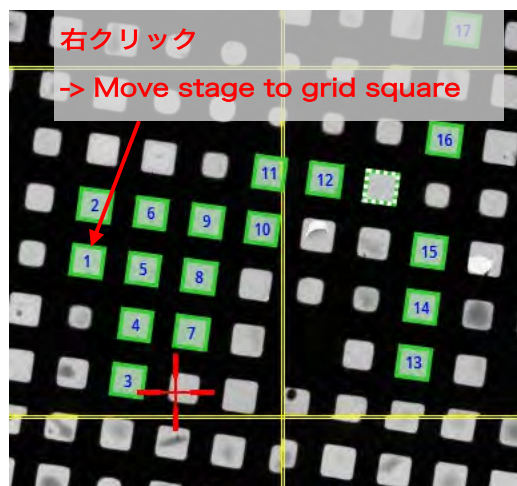
して 20-30 のスクエアを選択する



*スクエア間の移動距離が大きすぎるとそれだけ測定時間をロスする。

*なるべく近隣のスクエアを順次たどりながら測定するように選択する

- 最初のスクエア（番号 1）を右クリック -> **Move stage to grid square**



Move stage here:

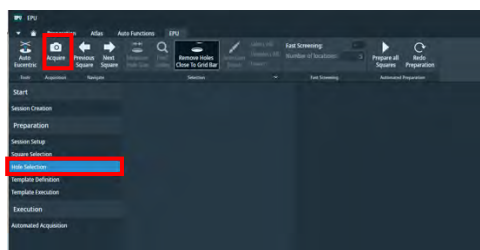
クリックした場所に移動

Move stage to grid square:

クリックしたスクエアの中心に移動

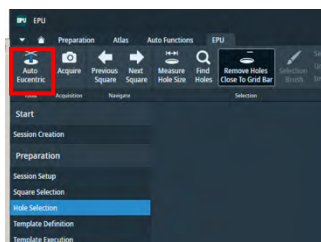
- **Hole selection** を押す

- **Acquire** で撮影して、良いスクエアか確認。良ければ以下へ



*いきなりAuto Eucentricでもよい

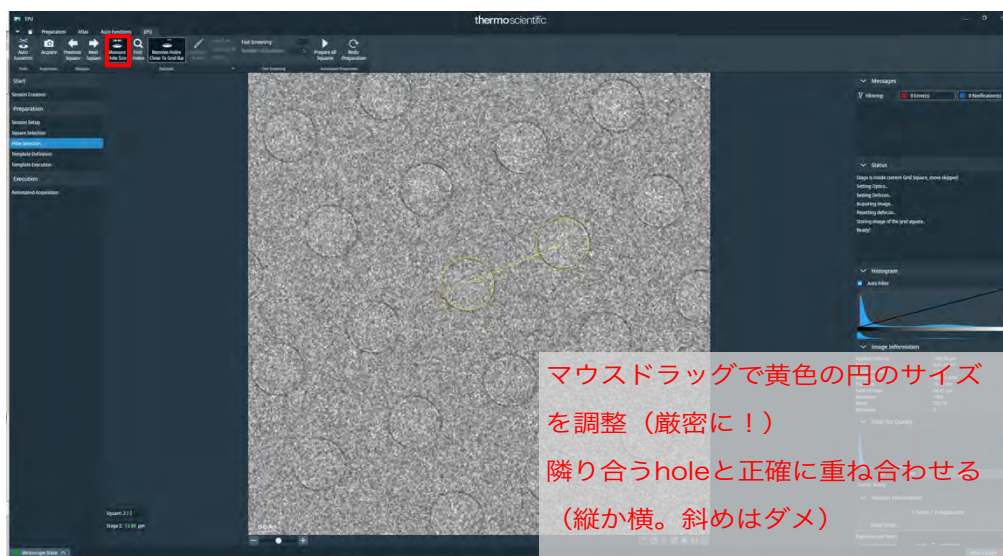
- 左上の **Auto Eucentric** ボタンを押す



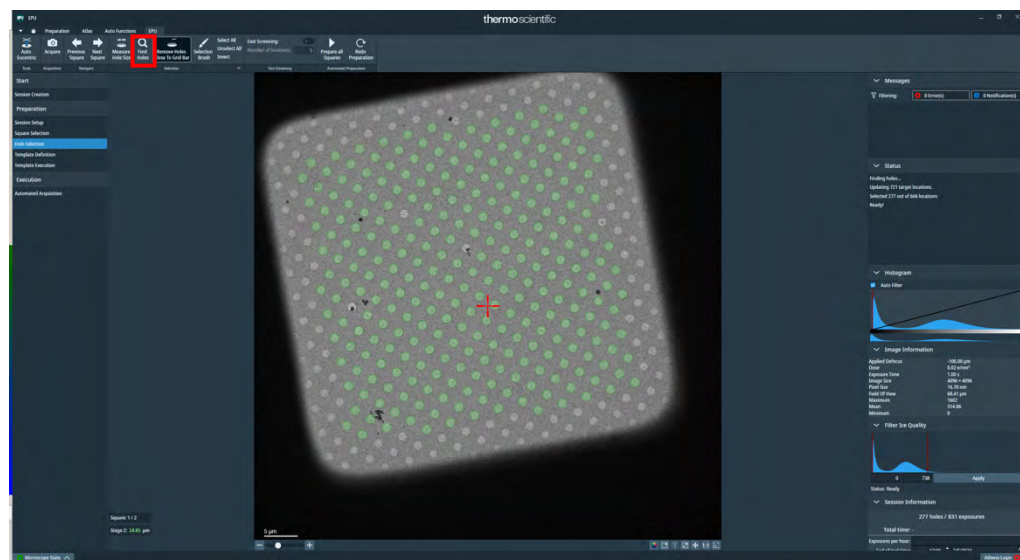
*Auto Eucentric がコケた場合、Auto Functions tab から
Auto-eucentric by stage tilt または
Auto-eucentric by beam tilt で **Start** でうまくいくこともある (p. 22 も参照)

*Eucentric height が決まったら、**Hole selection** に戻って **Acquire**

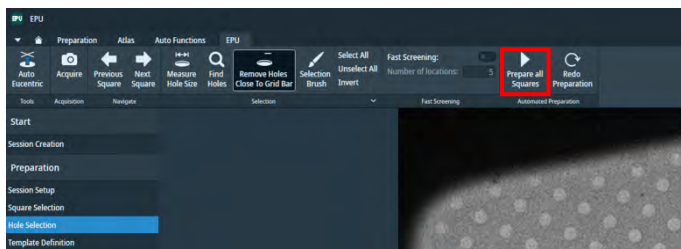
- うまく決まったら **Measure Hole Size** で hole の定義



- **Find Holes** で hole を自動認識させる



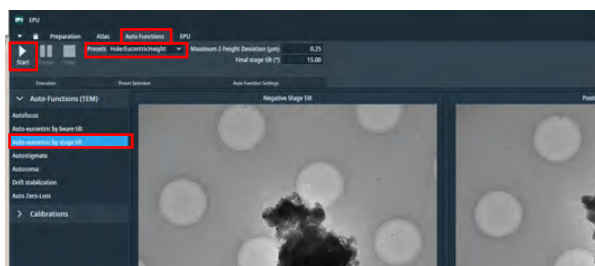
- うまく hole が拾えたら **Prepare all Squares** を押す（選択したすべてのスクエアで同じ事をしてくれる）



*すべてのスクエアが終わるまで、20-30 分程度（スクエアひとつあたり 1 分程度？）

*途中で eucentric がコケて stop した場合、Auto Functions tab で

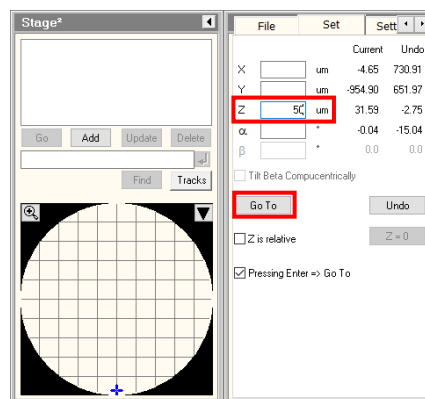
Auto-eucentric by stage tilt、preset を Hole/Eucentric にして **Start**



または **Auto-eucentric by beam tilt** で **Start**

それでもうまく行かなければ、TUI -> Stage tab
-> Stage² -> option から、Z=50um（eucentric
height に近いだろう値）など入力して

Go To



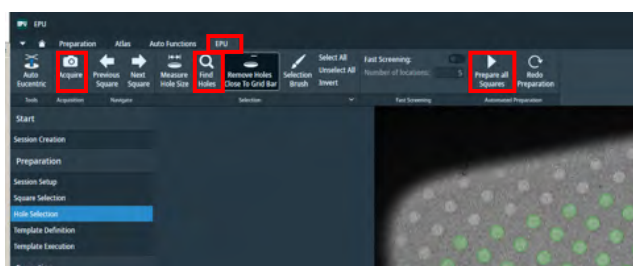
その後 Auto Functions tab で

Auto-eucentric by stage tilt -> **Start**

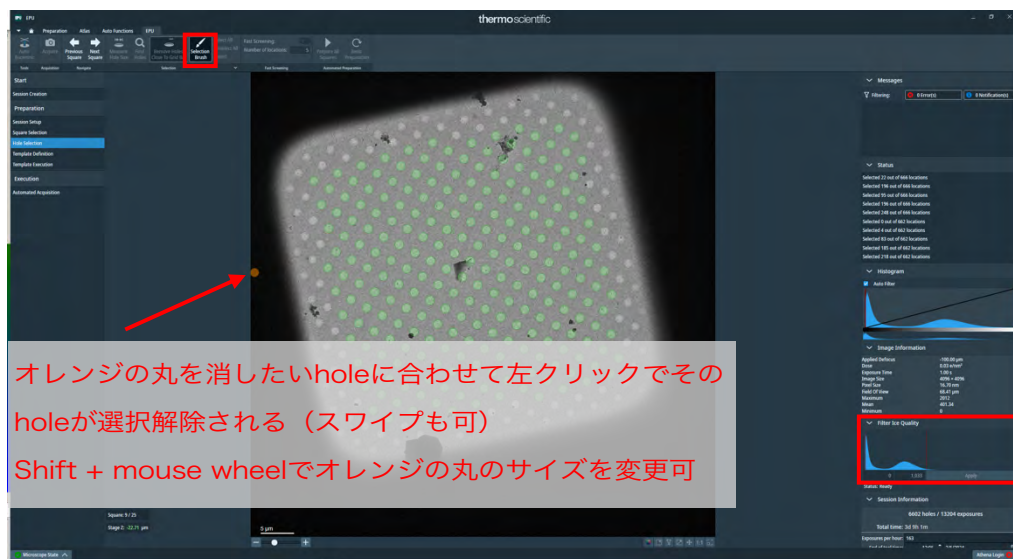
を試みる（p. 22 も参照）

いずれかでうまく決まれば EPU タブに戻って **Acquire** -> **Find Holes**

Hole が認識されていれば **Prepare all Squares**

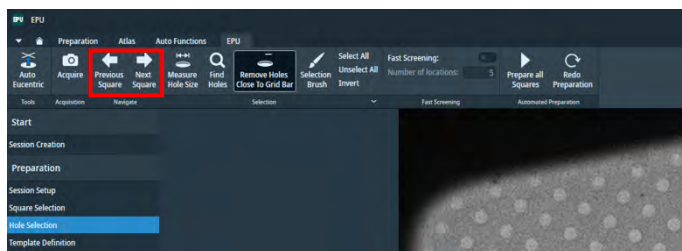


- 自動認識された hole を確認する。ゴミがあるもの、亀裂が入っている箇所などは、selection brush で手動で削除する。右下の「Filter Ice Quality」の 2 本のバーを調節してもよい



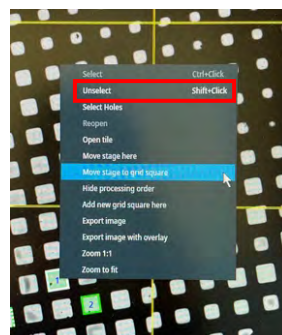
*亀裂の入っているスクエアは選択しない方が無難（電子が当たった際に揺れやすい）

- **Next Square/Previous Square** でスクエアを移動して、上記の hole 選択の確認と修正を行う。

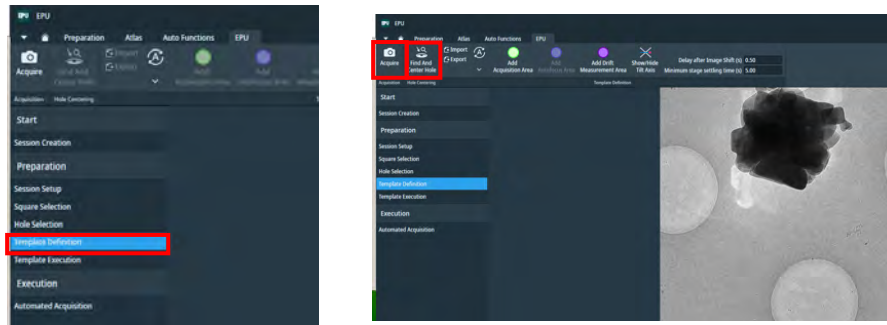


- スクエアまるごと削除したい場合、**Square Selection** に戻って消したいスクエアを右クリック -> **Unselect**

大きな番号から消さないと、番号が合わなくなる！



- 最初のスクエアに移動 (Square Selection -> Move stage to grid square)
- Template Definition を押す
- Acquire -> Find and Center Hole



- Add Acquisition Area で hole のどこを撮るのかを指定 (緑)。
複数箇所可 (中心と端など)。
- Defocus 値を指定。
-0.6, -0.8, -1.0, -1.2, -1.4, -1.6, -1.8 um などが標準?
右横のボタンを押すと、すべての area に反映
- Add Autofocus Area で focus 合わせの照射位置を指定 (紫) する。

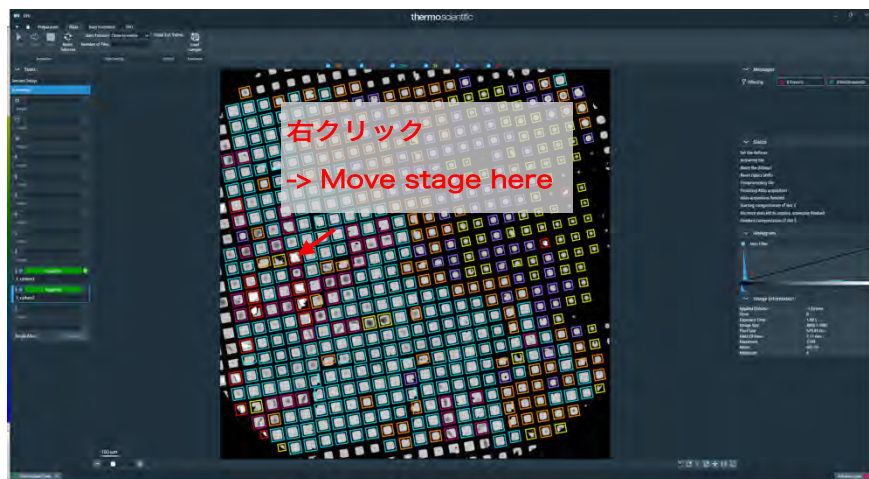


スクショを撮っておく (defocus 値を含めた画面全体をとるため、アプリでとる)

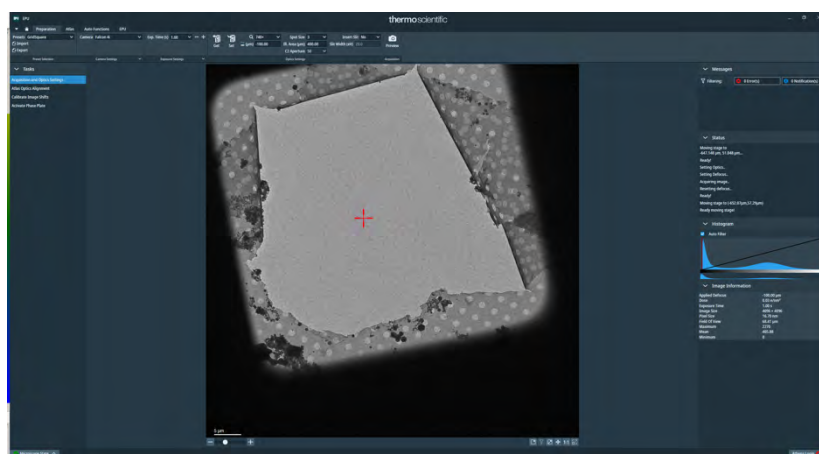


- Dose の見積もりを行うため、グリッドに穴のあいたところへ移動

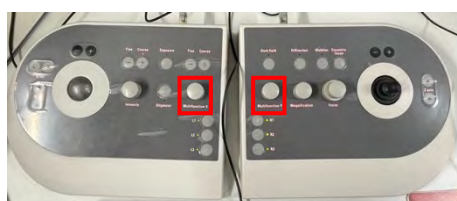
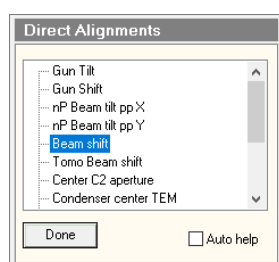
EPU > Atlas tab で Grid に穴のあいたところへ右クリック Move stage here



- EPU > Preparation tab > Presets から Grid Square を選び Preview
(穴にいるのを確認)



- EPU > Preparation tab > Presets から Data Acquisition を選んで Set
- R1 を押して蛍光板を下げる
- ビームが中央になれば Direct Alignment > Beam Shift で中央にして Done



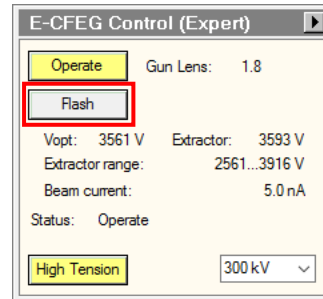
- TUI で Beam Current を確認。

High tension:	300 kV	Beam Current:	3.7 nA
nP EFTEM		Screen current:	0.000 nA
SA 6500 x		Spot size:	4

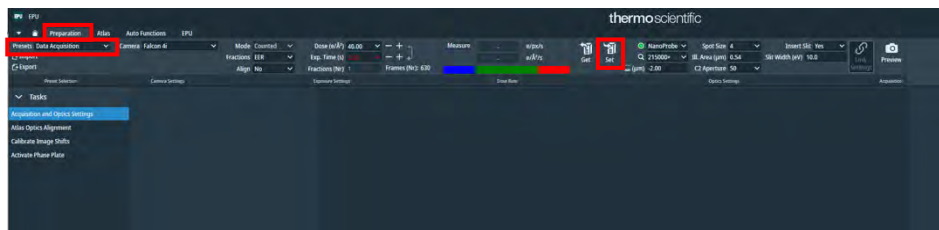
- 5 を下回っているようなら Flash する

(TUI -> Set up tab -> E-CFEG Control)

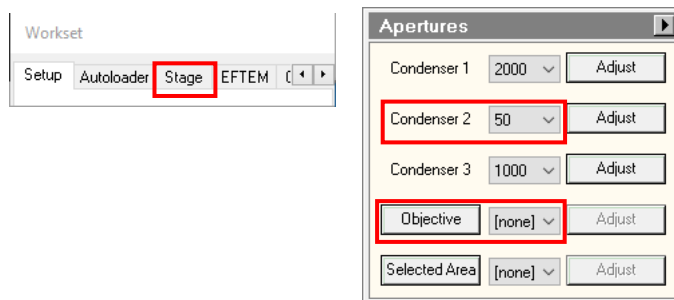
*Flash するときにはカラムバルブを閉じる



- EPU > Preparation tab > Presets から Data Acquisition を選んで Set



- TUI > Autoloader tab > Apertures を見て **C2=50, Obj=none** であることを確認



- EER, No, Dose: ~50, 好みの倍率を選択 (x165k/215k/270k あたりが一般的?)



- Measure を押す



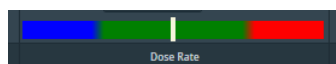
測定結果をもとに指定の dose となる照射時間が算出される

*照射時間は、spot size, illuminated area と相関する。

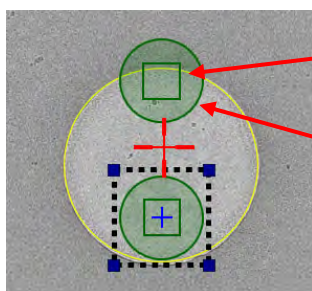


*Spot size, illuminated area を狭くすれば照射時間は短くなる (=撮影枚数が増える) が、電子を狭い領域に集中させるため dose rate が高くなる。

*あまり高い dose rate は低 DQE、試料へのダメージ等弊害が多くなるので、バーの赤にいかないように設定する。



Template Definition のところで検出器サイズと比べながら適切な値に調整する



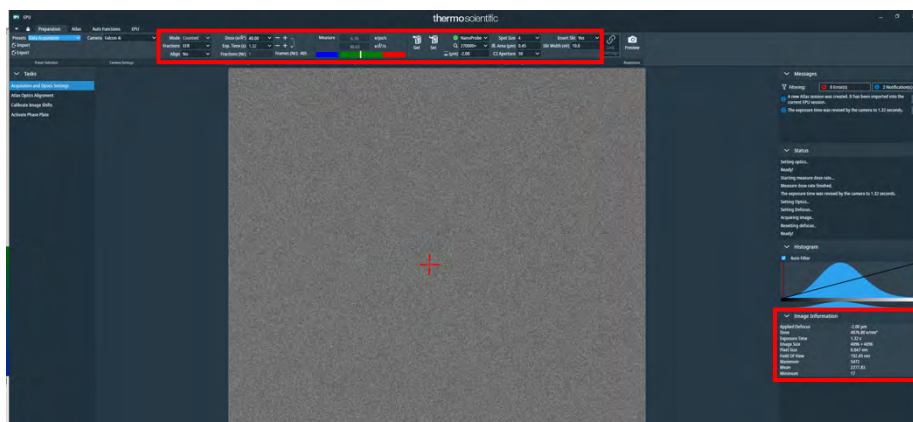
四角が検出器の視野 (Field of View, FOV)

丸がilluminated area

視野に対して十分にひろくとるべき。

- 最後に Preview してからスクショ取得

*Preview すると、画面右下に pixel size 等の情報が出てくる

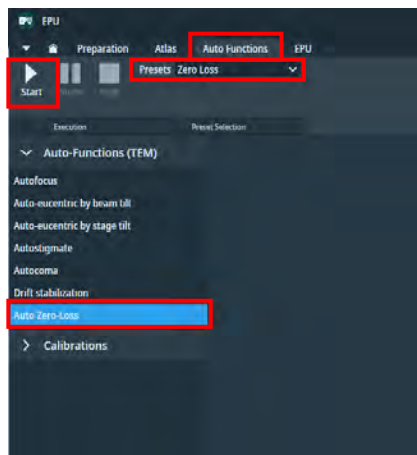


(画面全体をアプリでとる)



- EPU > Auto Functions tab > Auto Zero-loss

Presets を Zero loss に変更して **Start**

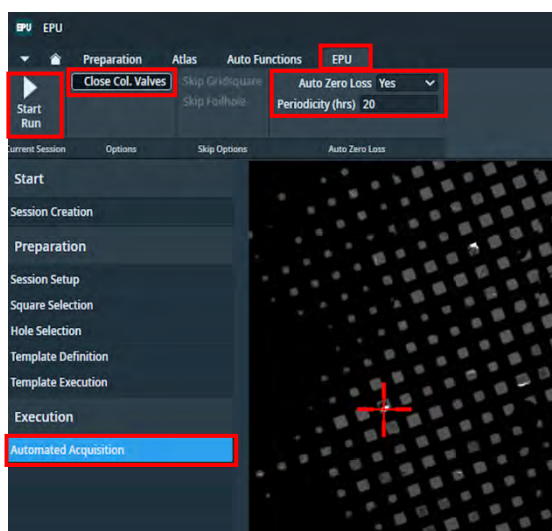


- EPU > EPU tab > **Automated Acquisition**

Auto Zero loss = Yes、Periodicity (hrs) = 20 hrs （測定が 20 h 以下ならいない？）

測定後カラムバルブを閉じるように、**Close Col.Valves** を有効にする

Start で測定開始



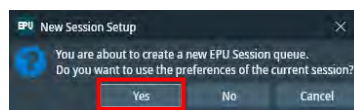
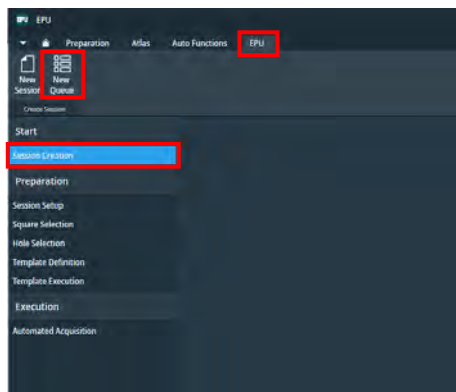
以上

3. Multi Grid Session によるデータ測定

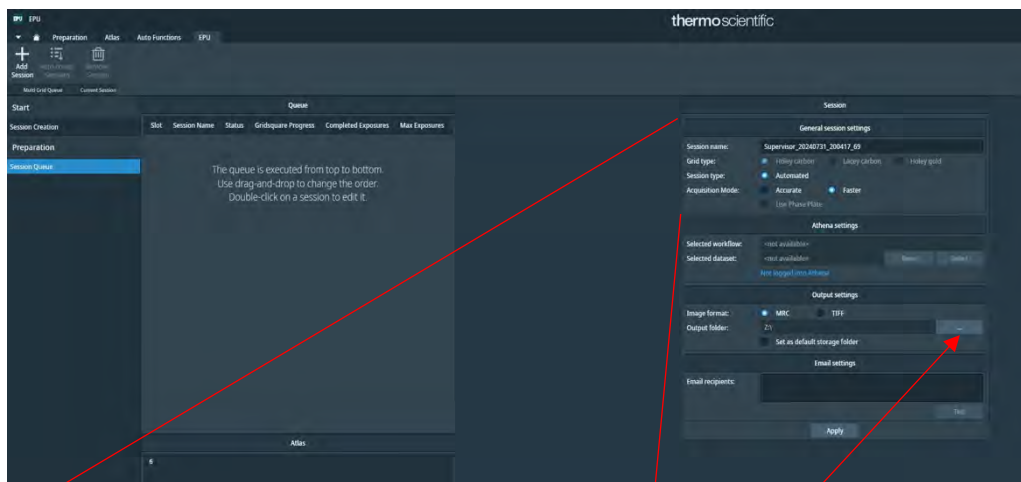
□ EPU > Atlas tab で一つ目のグリッドを選択し、Load Sample

□ p. 55-57 に従い、dose の見積もりを行う

□ EPU > EPU tab から、Session Creation -> New Queue -> Yes



□ Session Queue 右側の window に入力



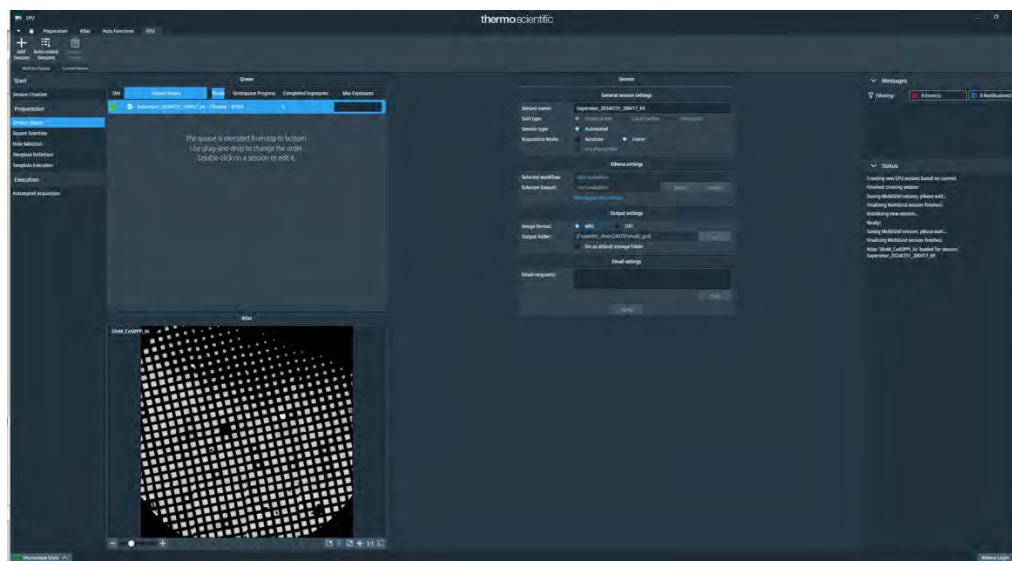
(保存先: Z:/user0xx/yymmdd/multi)

Session type: Automated (しか選べない)

Acquisition mode: Faster を選択

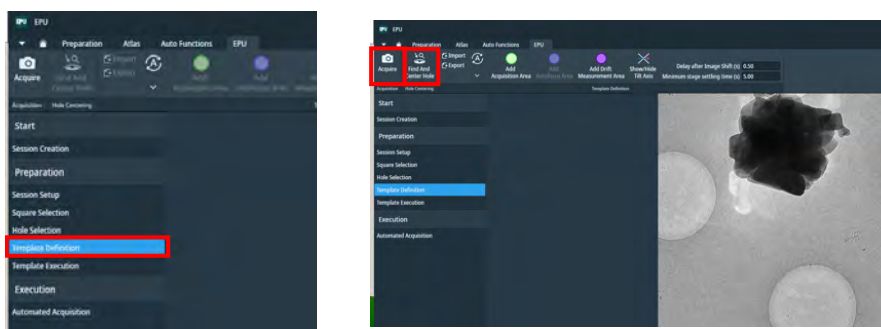
□ Apply を押す

- 一つ目のグリッドが Queue に入り、Atlas が表示される



- p. 50-51 に従い、スクエアの選択と hole の選択を行う。
 *Automated なので、hole の選択操作は最初のスクエアだけ。
 *Hole の取捨選択もできない (Ice filter の設定による選別はできる)。

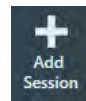
- **Template Definition** を押す
- **Acquire** -> **Find and Center Hole**



- p. 54 に従い、autofocus 位置、照射位置、defocus 値などを設定する。

□ グリッドを交換 (Atlas tab で Load Sample)

□ EPU tab > Session Queue で Add Session



-> Yes

□ 新しい Session ウィンドウに保存先を入力して Apply

□ 現在のグリッドが queue に追加される。最初のグリッド同様にスクエアの選択、hole の選択、Template Definition を行う。

□ 目的のグリッド全てについて繰り返す。

□ 必要に応じて、Max Exposures を設定

Queue					
Slot	Session Name	Status	Gridsquare Progress	Completed Exposures	Max Exposures
10	Supervisor_20240731_200417_69	Planned	0/508	0	

ここで設定した枚数に達したら次のグリッドに進む

□ p. 58 に従い、Auto Zero-loss の設定を行う

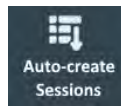
□ Automated Acquisition から Start Queue



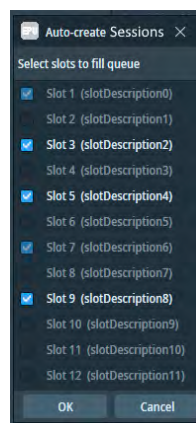
*Auto-create Sessions による一括設定

- **Dose の見積もり (p. 55-57) を済ませておく。**
- 一つ目のグリッドの設定終了後、**Session Queue** でその queue を選択して

Auto-create Sessions



- どのグリッドを queue に入れるかを選ぶ。



- **OK** で選択したグリッドが Queue に入る。
- 新しくできた queue は保存先が Z ドライブ直下になっているので、右側の Session ウィンドウに保存先を入力して **Apply**
- **Square Selection** から、スクエアの選択を行う。

*グリッドがステージにないので、hole の設定、Template Definition はできない（最初のグリッドと同じ設定となる？）

- 必要に応じて、Max Exposures を設定

Queue					
Slot	Session Name	Status	Gridsquare Progress	Completed Exposures	Max Exposures
10	Supervisor_20240731_200417_69	Planned	0/508	0	

ここで設定した枚数に達したら次のグリッドに進む

- p. 58 に従い、Auto Zero-loss の設定を行う

- **Automated Acquisition** から **Start Queue**



以上