

岡山大学クライオ電子顕微鏡マニュアル

Titan Krios G4 and Falcon 4i

ユーザー編

謝辞

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

を参考に作成し、公開しました。

KEK テキスト作成者のみなさまに心より感謝申し上げます。

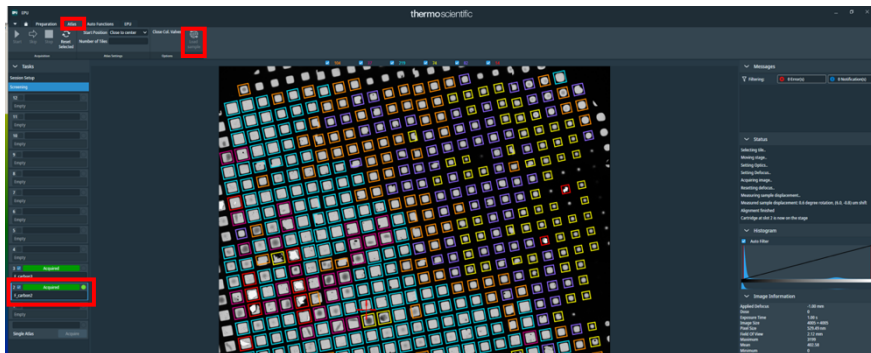
岡山大学異分野基礎科学研究所国際構造生物学研究センター

沼本修孝

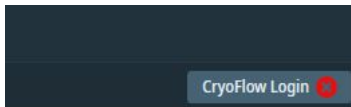
データ測定

1. グリッドのスクリーニング

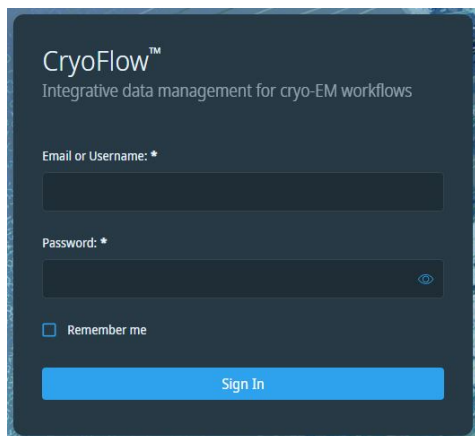
EPU > Atlas tab で目的のグリッドを選択し、**Load Sample**



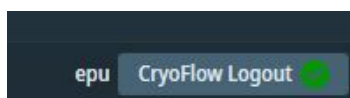
EPU 画面の右下 -> **CryoFlow Login** をクリック



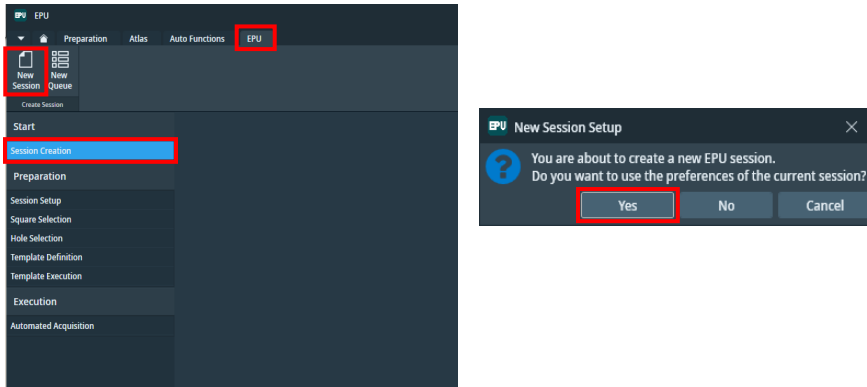
User ID (epu)、パスワードを入力して **Sign In**



CryoFlow にログインできたら、EPU 画面右下の表示が変わる



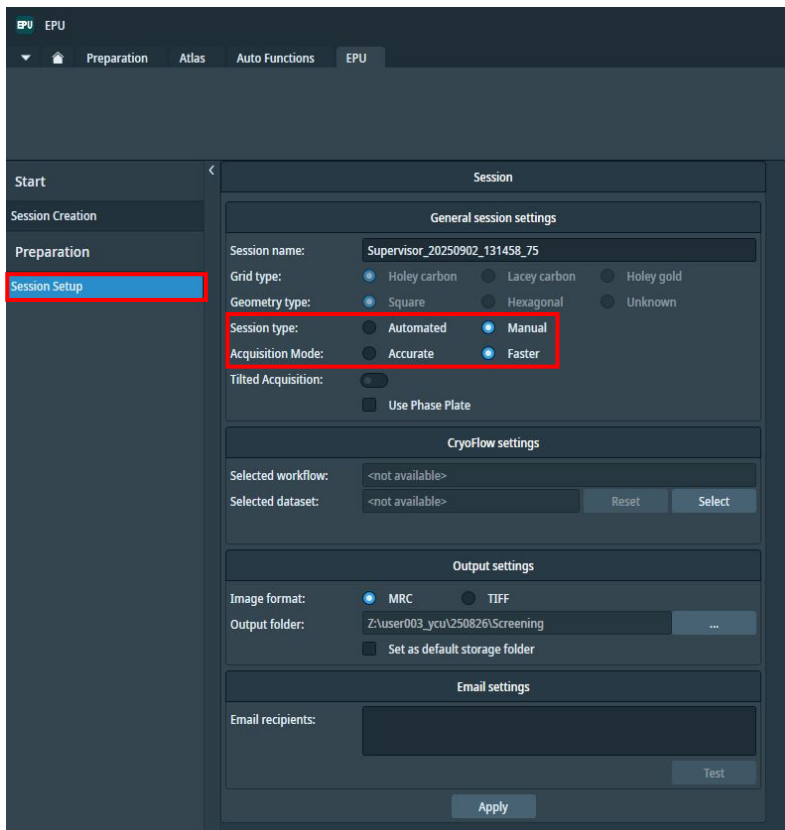
EPU > EPU tab から、**Session Creation -> New Session -> Yes**



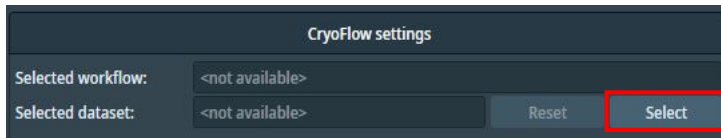
Session Setup を押す

Session name: **変更しない**

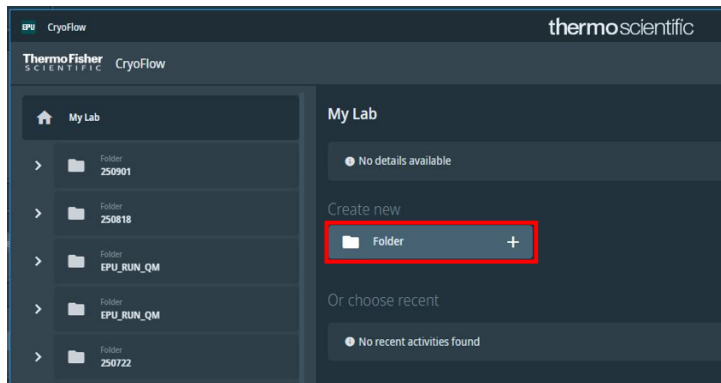
Session type: **Manual**, Acquisition mode: **Faster** を選択



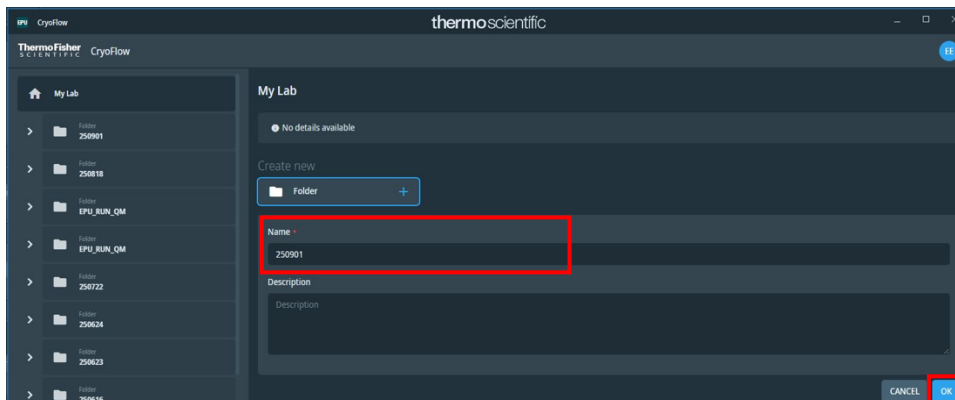
CryoFlow settings -> **Select**



Create new -> **Folder**



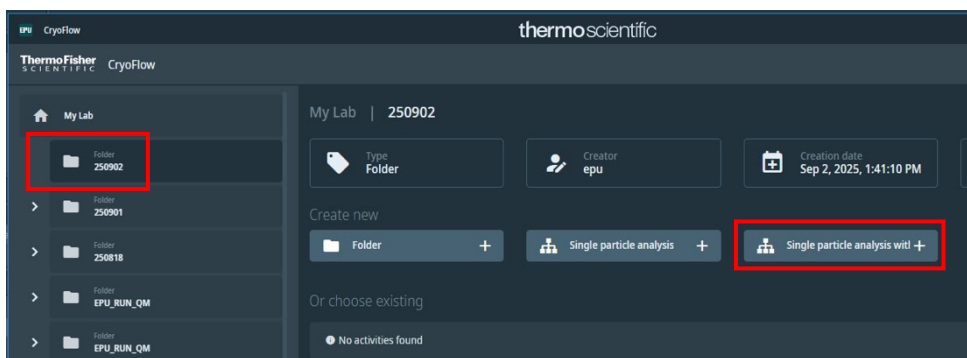
Name に当日の日付をつける (yymmdd) -> **OK**



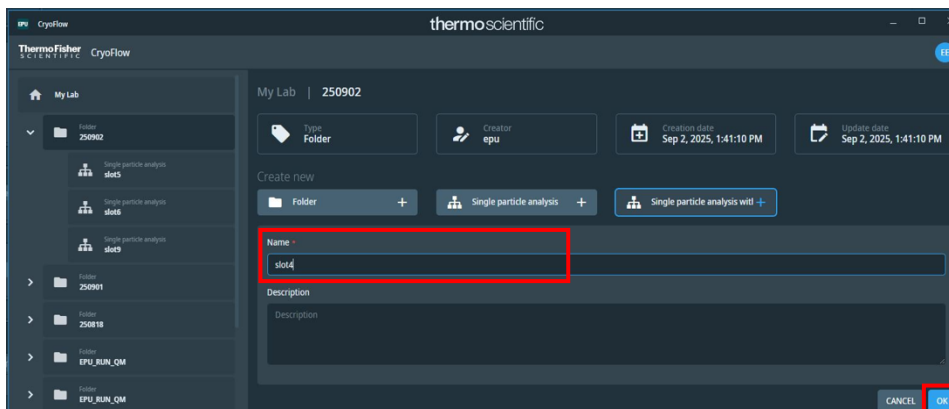
新しいフォルダができたことを確認

*以降、グリッドを変えて新しい Session を作るときは、このフォルダを選ぶ

Create new -> **Single particle analysis with...**

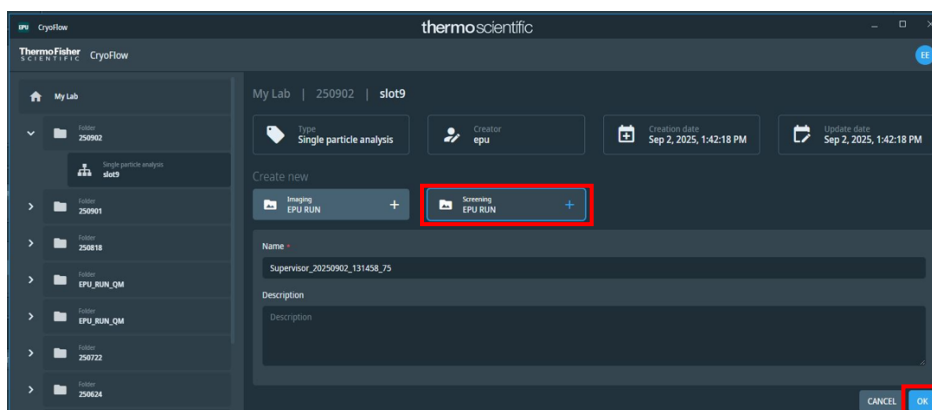


Name にグリッドの名前等を入力 (slot_x etc.) -> OK



Create new -> **Screening**

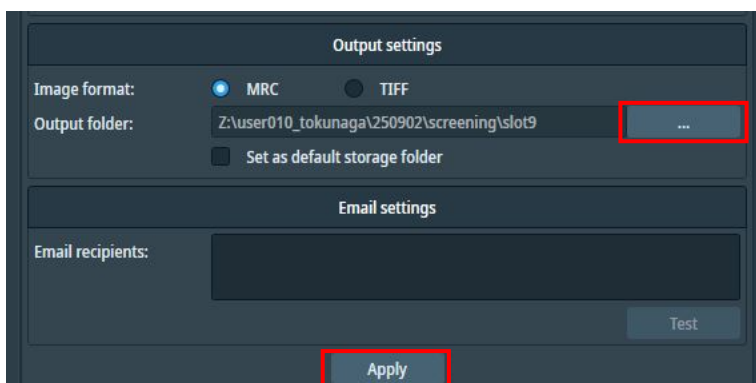
Name はそのまま -> OK



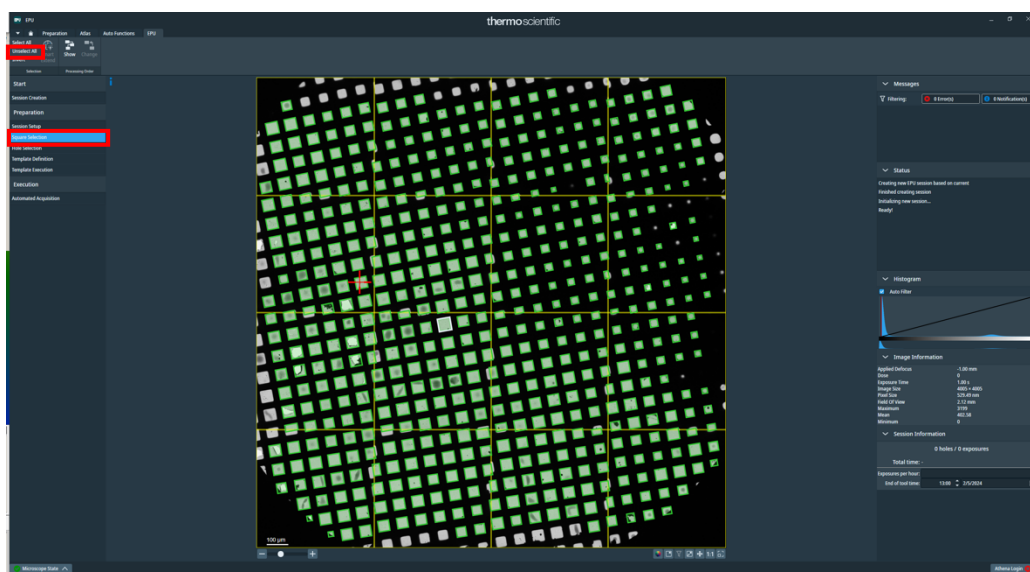
Output settings -> ... をクリックして、保存先を選択

保存先の例 : Z:/userxxx/yymmdd/screen/slotxx

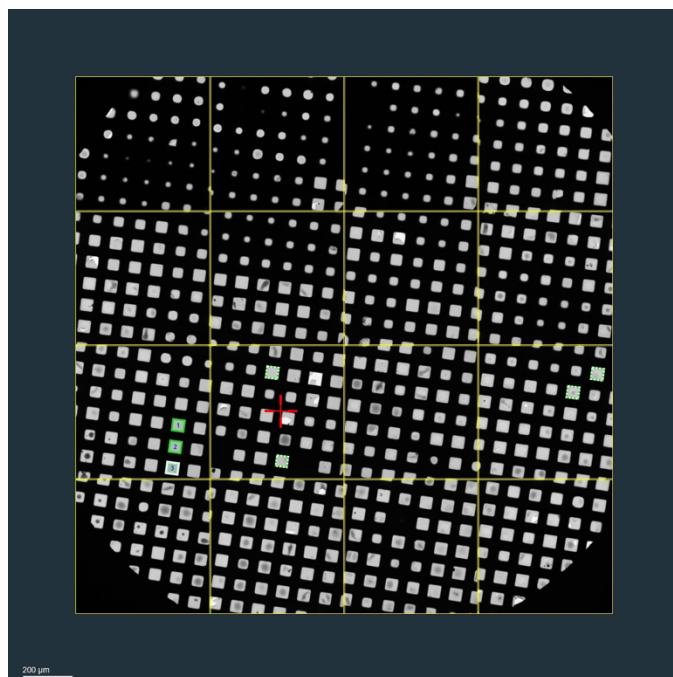
Apply を押す



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する (Ctl + 左クリック)



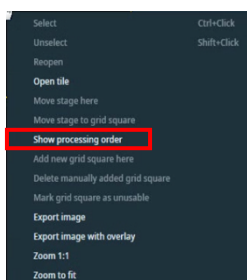
*氷の薄そうなの、少し厚い、厚い、などバラつかせるとよい

*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

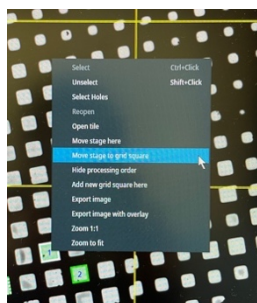
*スクリーンショットを撮っておく 右クリック -> Export image with overlay

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。

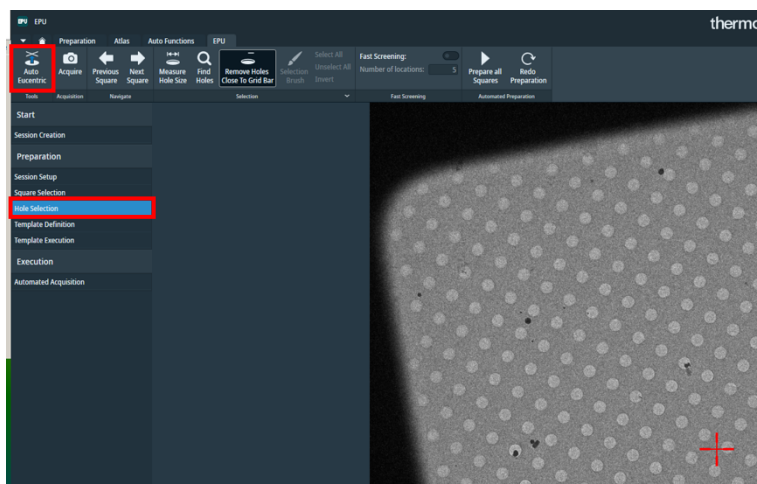
画面右クリック -> Show processing order



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



Hole selection > **Auto Eucentric** を押す

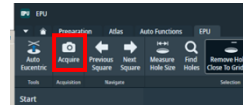


Eucentric height を自動で探索するのでしばらく待つ

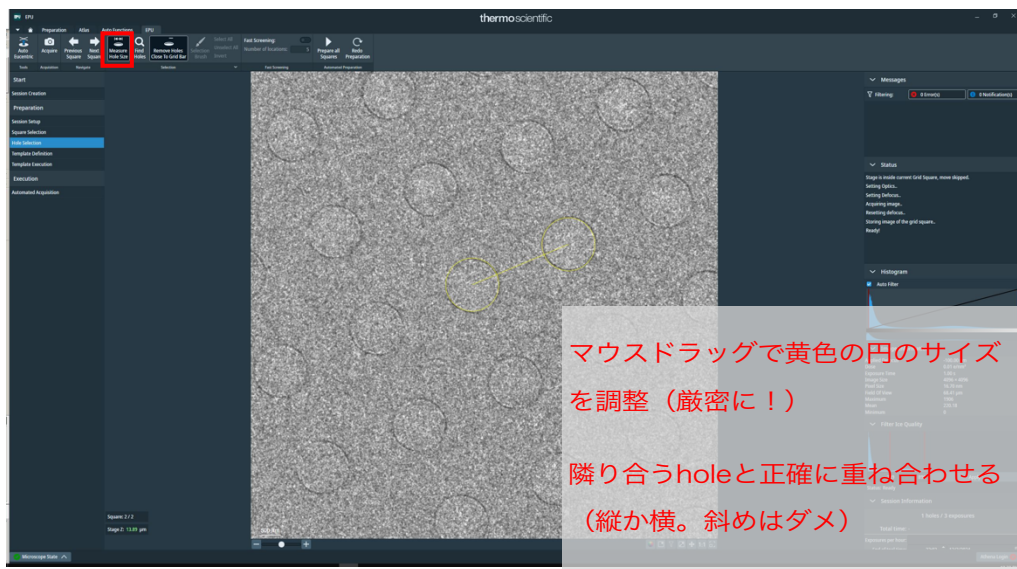
*Auto Eucentric が失敗した場合、Auto Functions tab から
Auto-eucentric by beam tilt になっていることを確認して **Start**

*それでも失敗したら、**Auto-eucentric by stage tilt** で **Start**
どちらかで上手くいけばよい

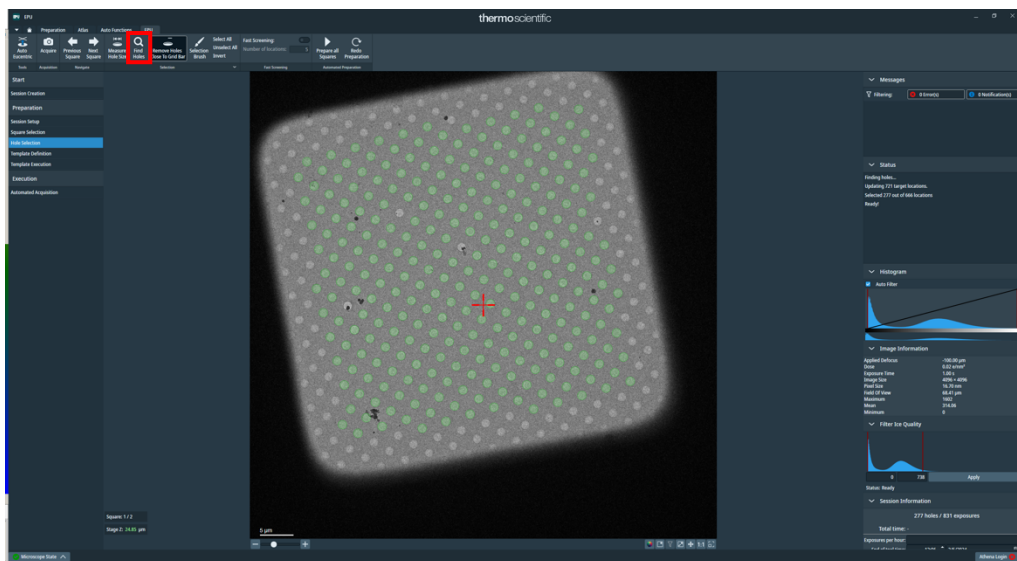
*Eucentric height が決まったら、**Hole selection** に戻って **Acquire**
(これをしないと、eucentric height が反映されない)



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

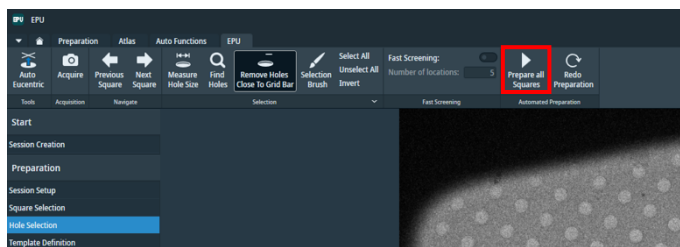


うまく hole が拾えたら **Unselect All** して、代表的な数 hole を選択 (Ctl + 左クリック)

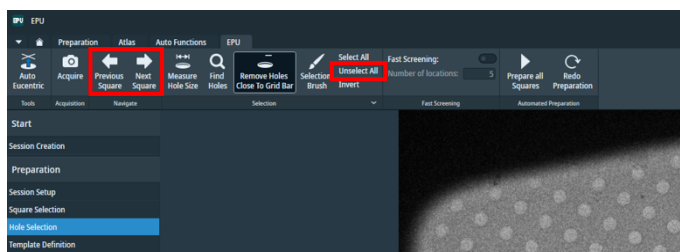


*スクエアの中心や周縁部など、見た目の氷の厚さも考慮して選ぶとよい

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

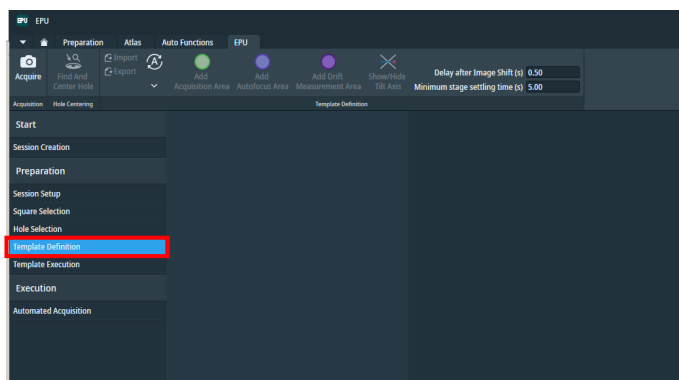


Next Square/Previous Square でスクエアを移動して hole の認識を確認
各スクエアで認識された hole を **Unselect All** して、代表的な数 hole を選択



*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

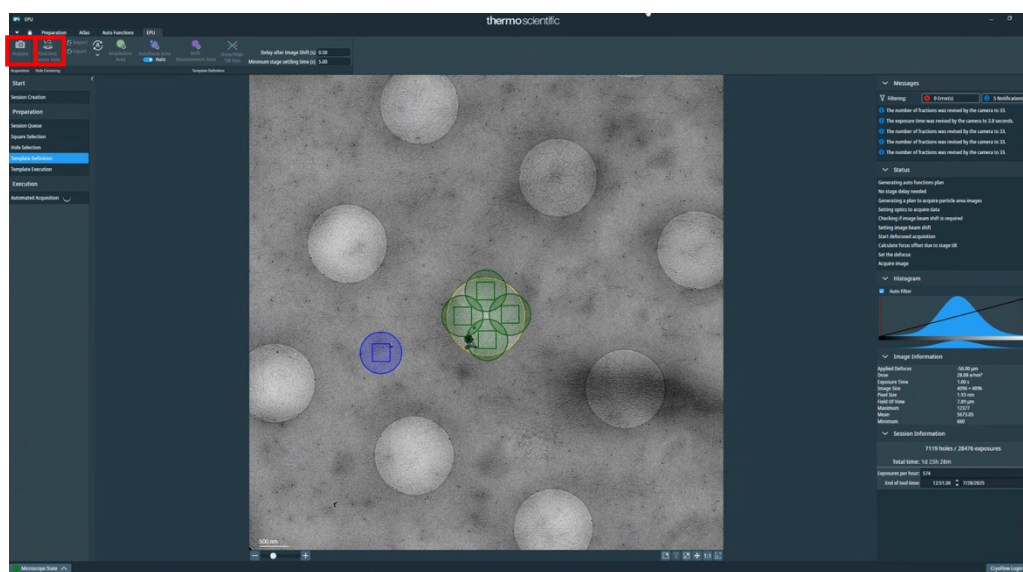
Template Definition を押す



Acquire -> **Find and Center Hole**

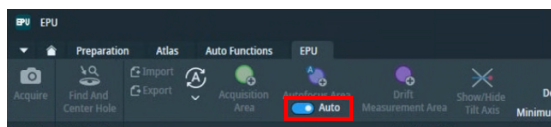
Hole が正しく認識され、画面のほぼ中央にあることを確認

*これが上手くいっていないと、以後の測定が全て失敗します

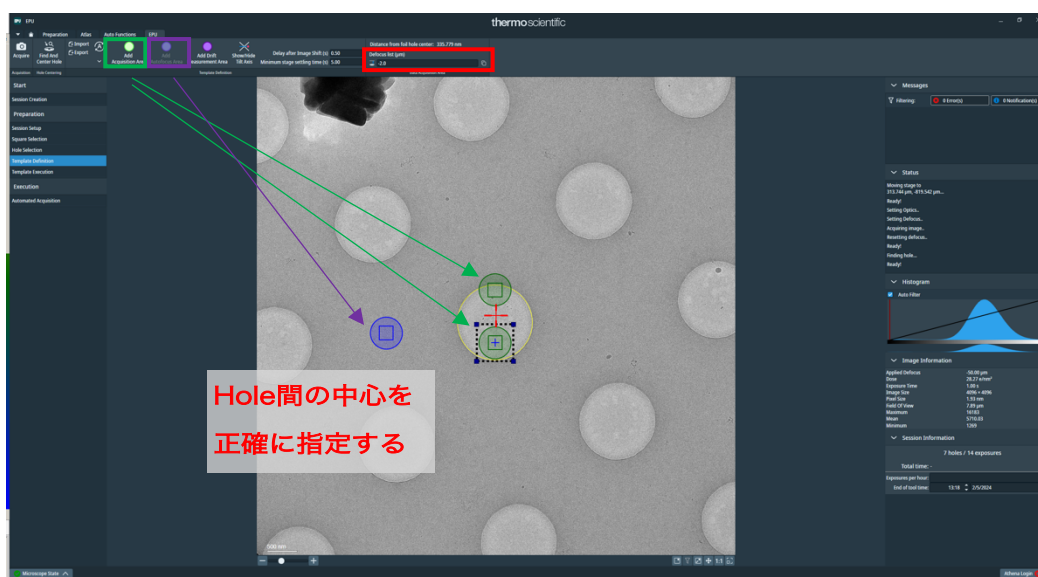


Add Acquisition Area で hole のどこを撮るのかを指定
複数箇所可（中心と端など条件を変えるとよい）

Add Autofocus Area の下、**Auto** を ON にする



または、Auto を OFF にして、focus 合わせの照射位置を自分で指定する。

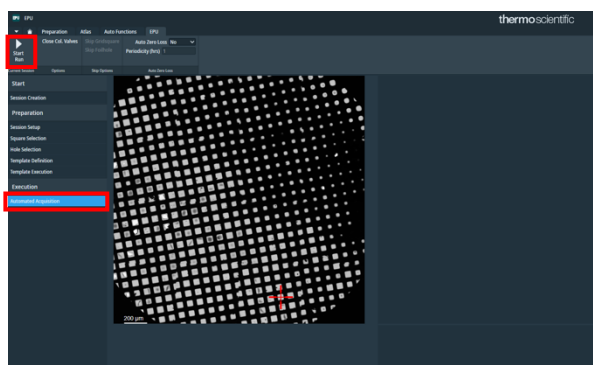


Defocus 値を指定。スクリーニングのときは少し大きめに、- 2.0 um 等でよい。
撮影場所を複数箇所指定した場合、個別に設定できる。

*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）

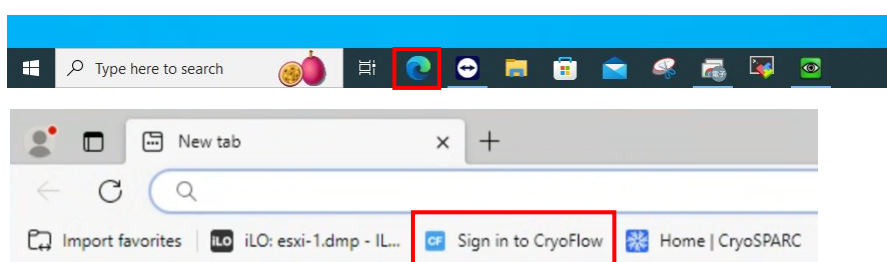


Automated Acquisition -> Start

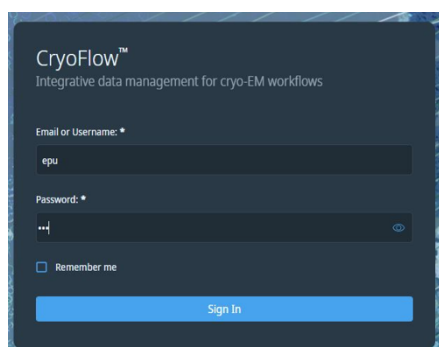


2. CryoFlow での確認

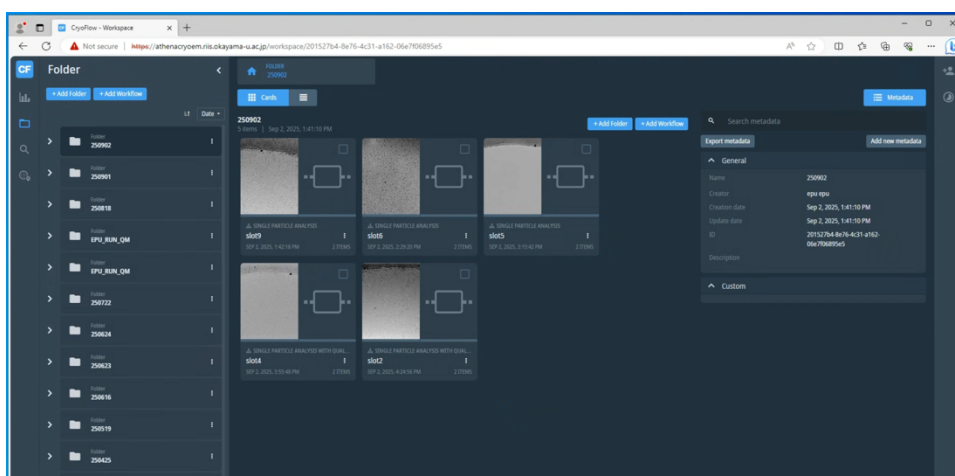
CryoFlow のモニター用 PC にて、Edge > Bookmark > Sign in to CryoFlow



ログイン画面で ID (epu) とパスワードを入力して **Sign In**



CryoFlow の Workspace が表示される

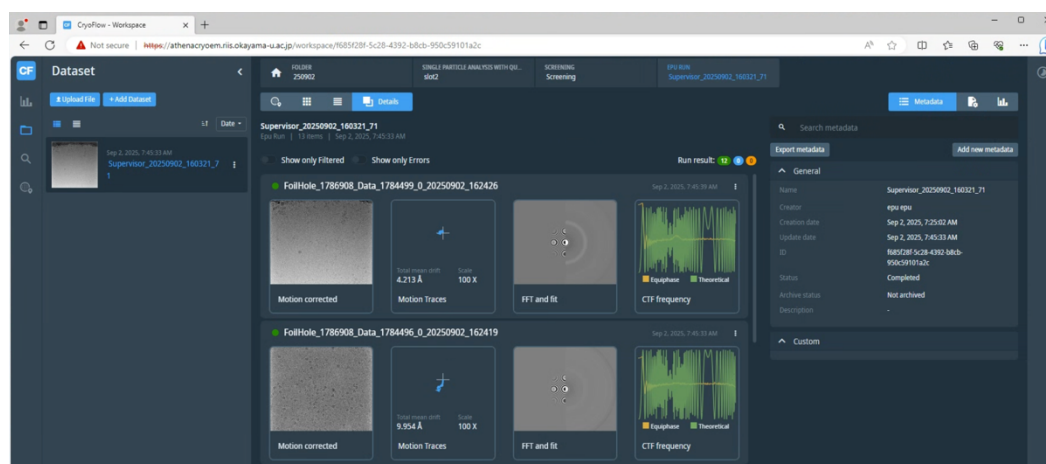


Folder (日付) -> slot_x -> Screening -> Supervisor_xxx

の順にクリックしていく



Motion correction や CTF estimation の結果が表示される

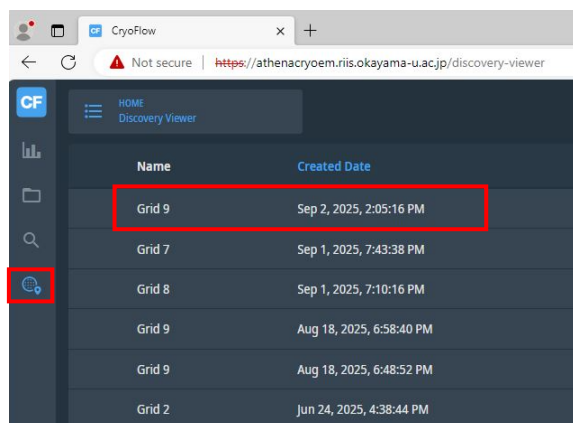


*CTF からは、分解能の評価ができる？

画面左上の Discovery viewer アイコンをクリック

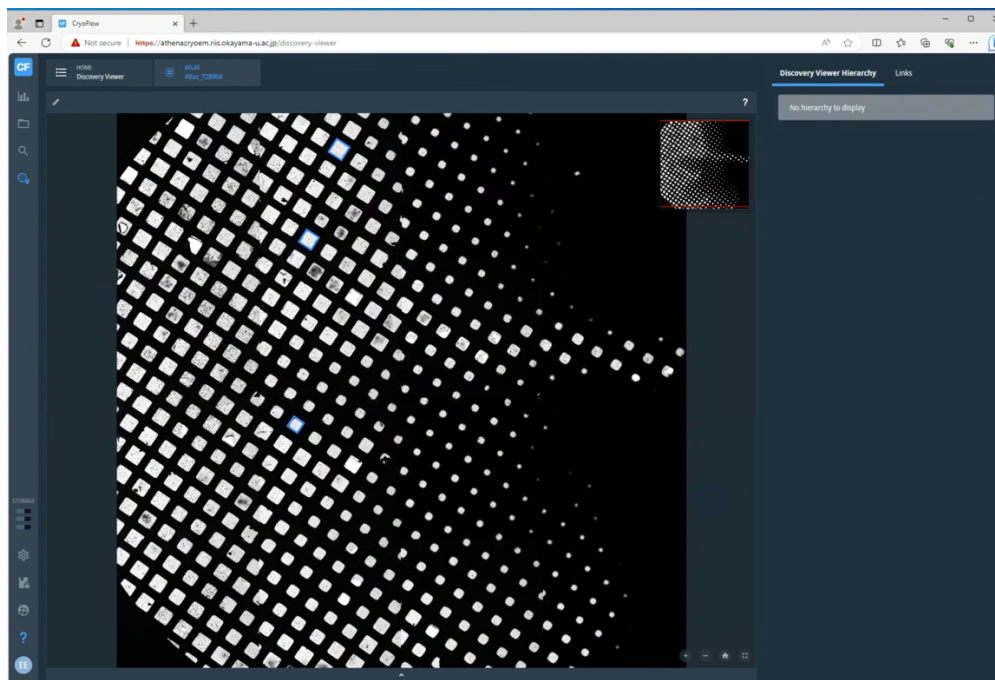


みたいグリッドを選択



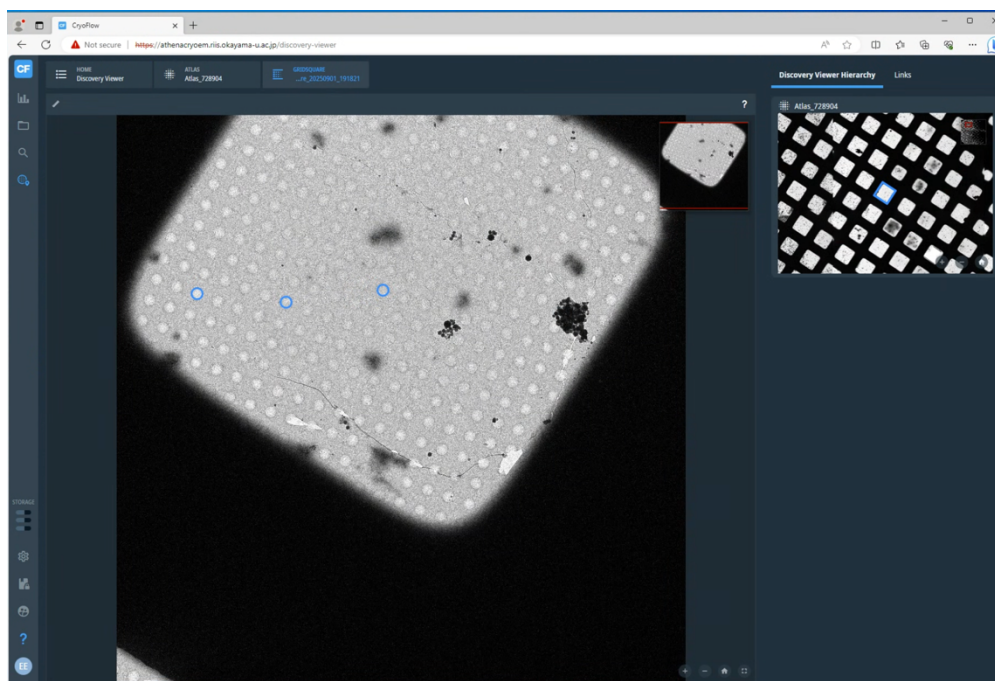
アトラスが表示され、データを撮ったスクエアがハイライトされている

確認したいスクエアをクリック

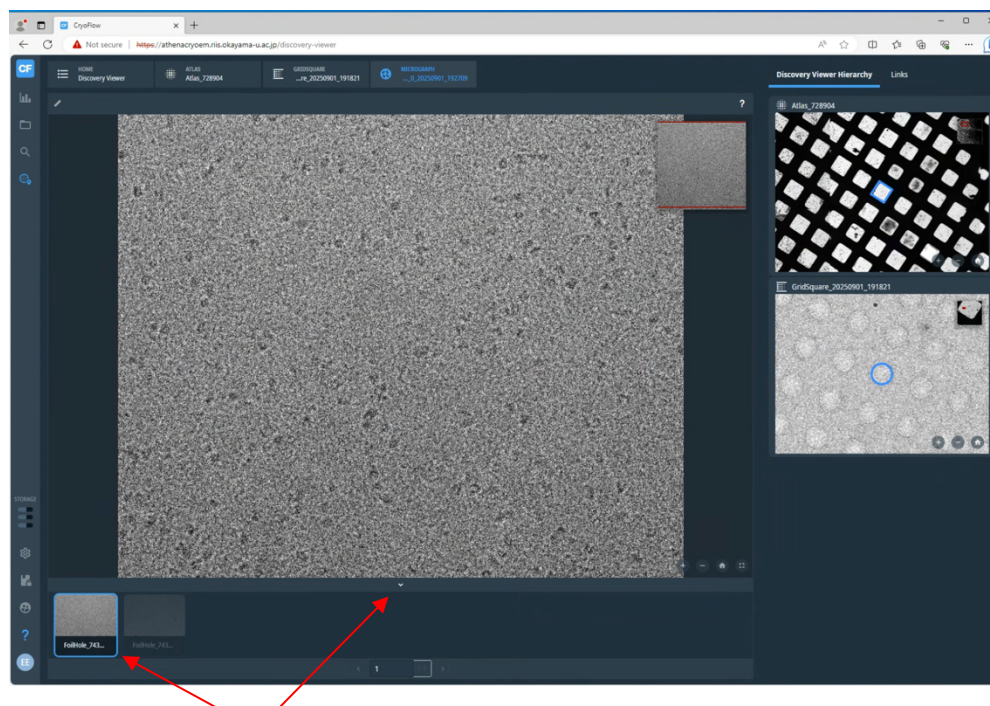


スクエアが表示され、データを撮った hole がハイライトされている

確認したい hole をクリック



その hole から撮った画像が表示される



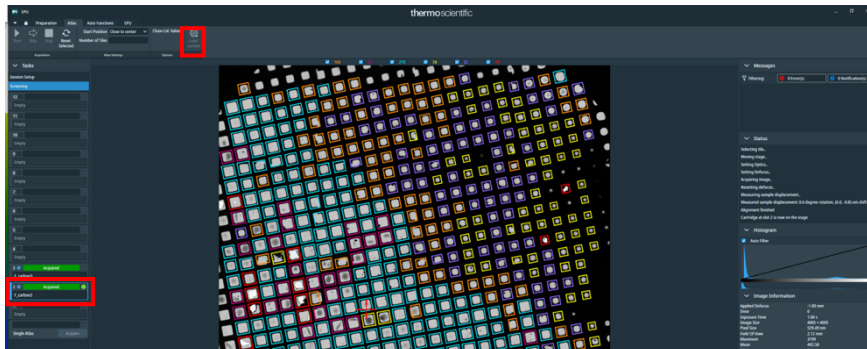
*バーをクリックすると、その hole で撮った画像のサムネイルが表示される

グリッドの各所での取得画像を比較し、よいスクエア、よい hole の特徴をつかむ

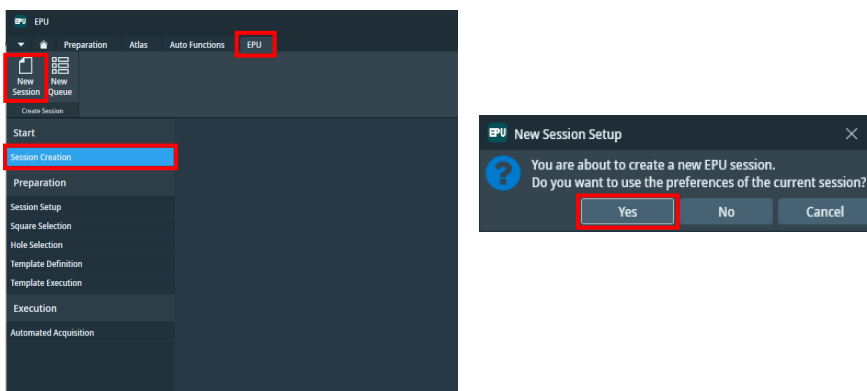
ひとつのグリッドのスクリーニングが終わったら、グリッドを入れ替えて同じ事を繰り返す

3. データの連続測定

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



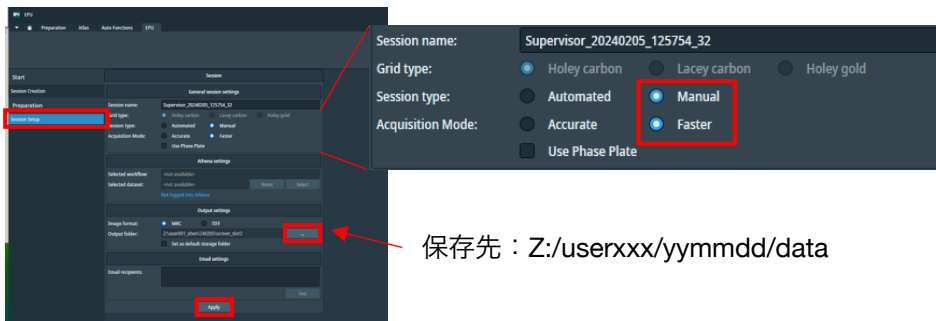
EPU > EPU tab から、**Session Creation -> New Session -> Yes**



Session Setup を押す

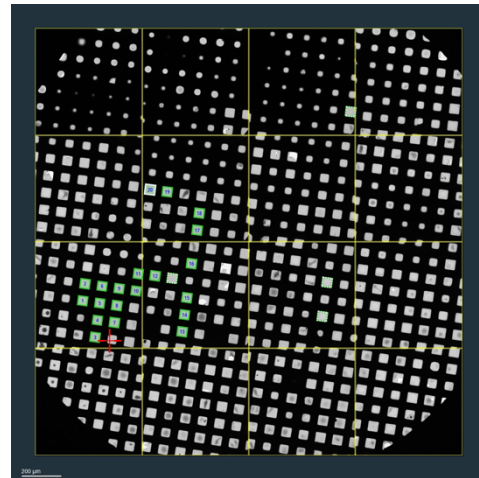
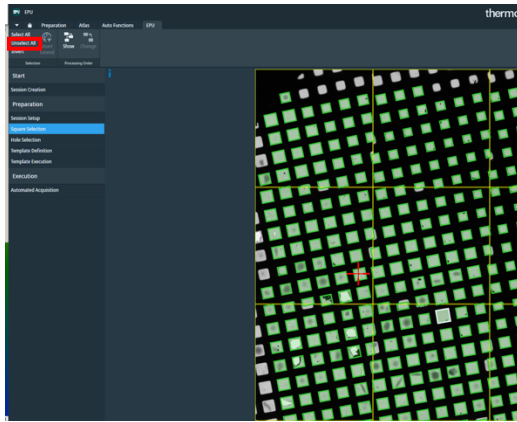
Session type: **Manual**, Acquisition mode: **Faster** を選択

*CryoFlow は使わない



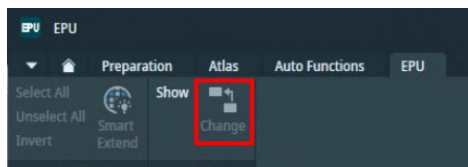
Apply を押す

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

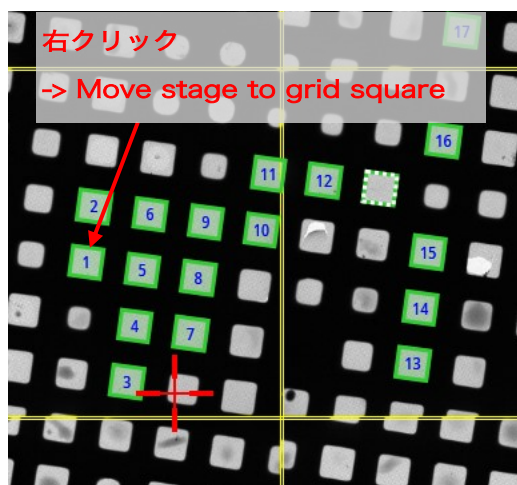


- *スクエア間の移動距離が大きすぎるとそれだけ測定時間をロスする。
- *なるべく近隣のスクエアを順次たどりながら測定するように選択するとよい

Change ボタンをクリックしてからスクエアを順にクリックしていくと、その順番に振り直される



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



Move stage here:

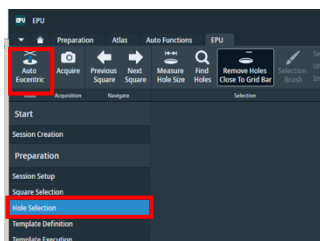
クリックした場所に移動

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

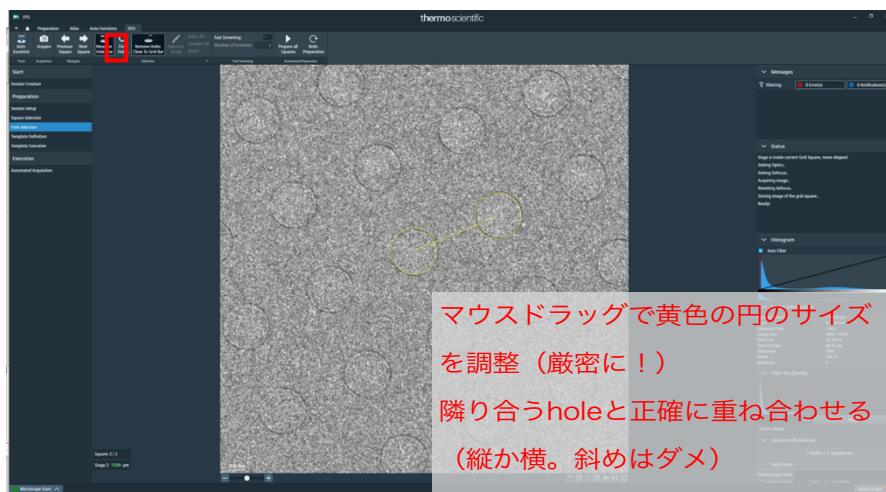
左上の **Auto Eucentric** ボタンを押す



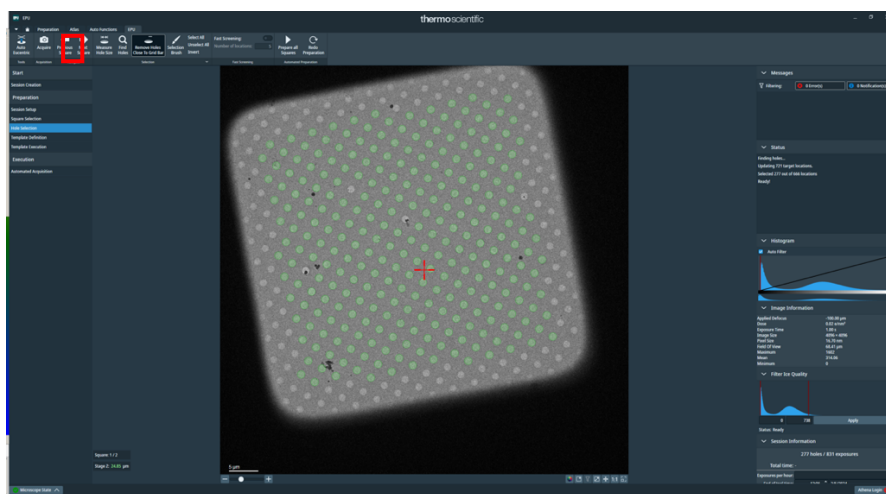
*Auto Eucentric が失敗したら、Auto Functions tab から **Auto-eucentric by beam tilt** または **Auto-eucentric by stage tilt** で **Start**

*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

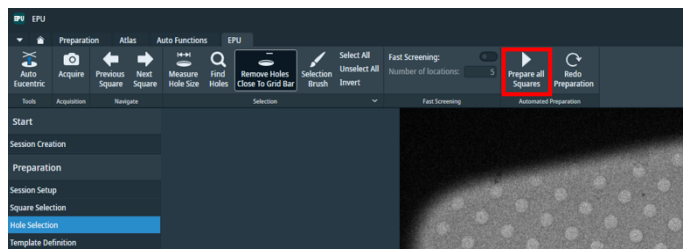


Find Holes で hole を自動認識させる



うまく hole が拾えたら **Prepare all Squares** を押す

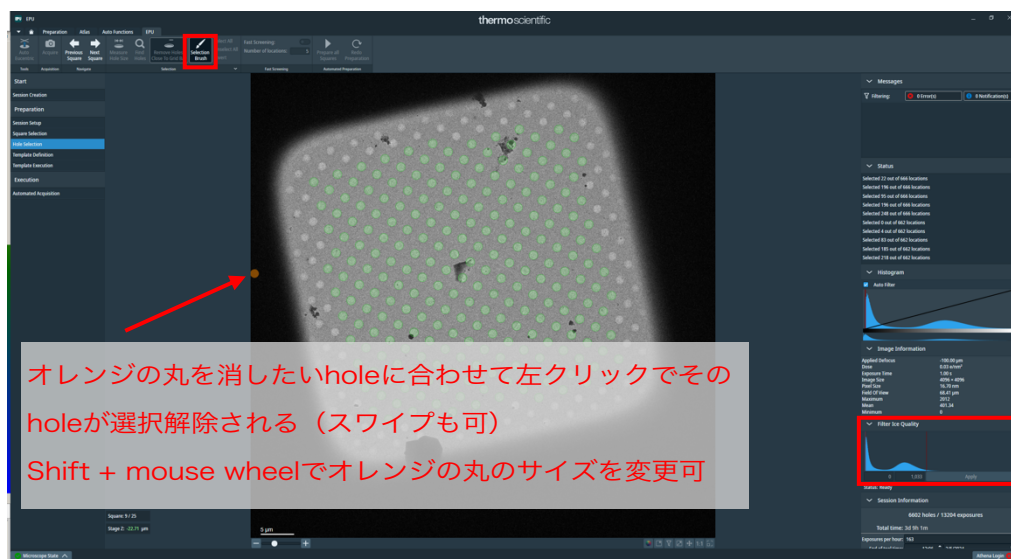
*選択したすべてのスクエアで同じ事をしてくれる



*スクエアひとつあたり 1 分程度かかる

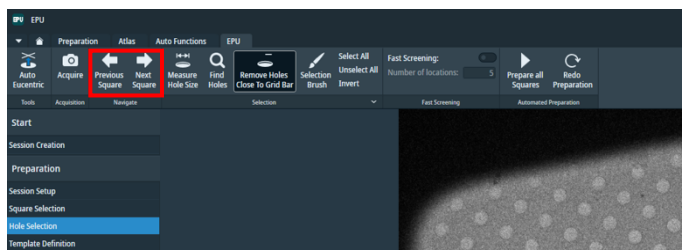
*Eucentric が失敗したら、そのスクエアは skip される。あまりに skip が多い場合、Hole/Eucentric の設定を調整する

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

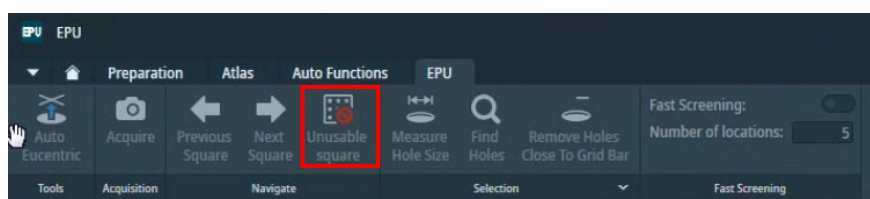


*亀裂の入っているスクエアは選択しない方が無難 (電子が当たった際に揺れやすい)

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、そのスクエアを表示させて **Unusable square**

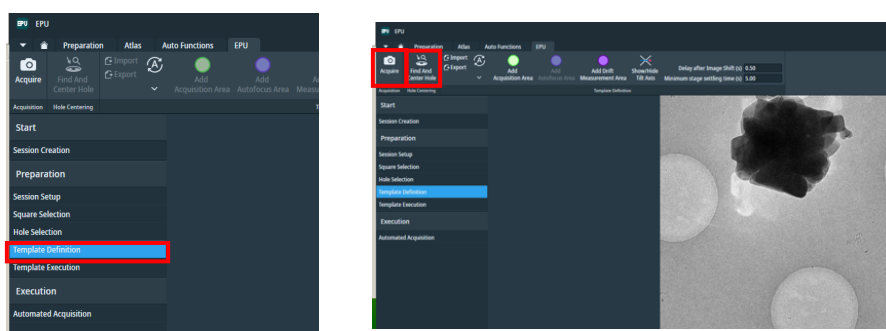


*Square selection のところで、赤で表示される

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



Hole が正しく認識され、画面のほぼ中央にあることを確認

*これが上手くいっていないと、以後の測定が全て失敗します

*上手くいかないときは、Hole Selection の **Measure Hole Size** をやり直す

Add Acquisition Area で hole のどこを撮るのかを指定 (緑)

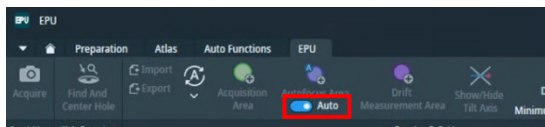
*複数箇所可 (中心と端など)

Defocus 値を指定

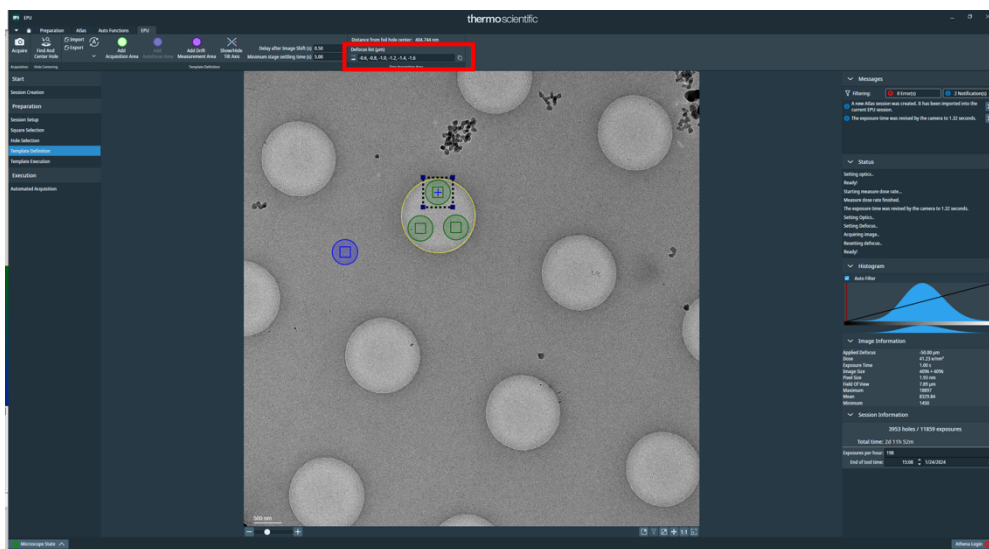
-0.6, -0.8, -1.0, -1.2, -1.4, -1.6, -1.8 um など

右横のボタンを押すと、すべての area に反映

Add Autofocus Area の下、**Auto** を ON にする



または、Auto を OFF にして、focus 合わせの照射位置を自分で指定する。

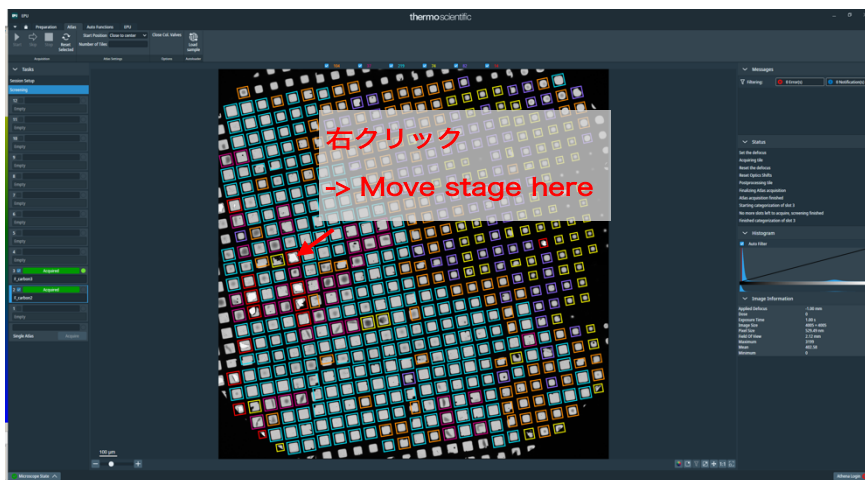


スクショを撮っておく (defocus 値を含めた画面全体をとるため、アプリでとる)



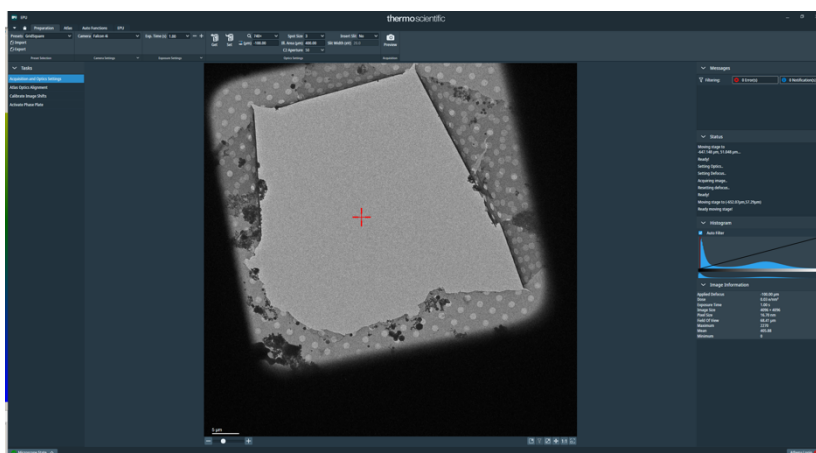
Dose の見積もりを行うため、グリッドの穴のあいたところに移動

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**

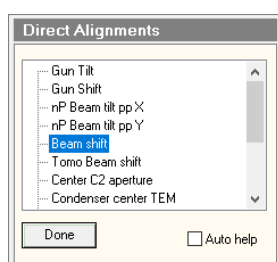
*穴にいるのを確認



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**



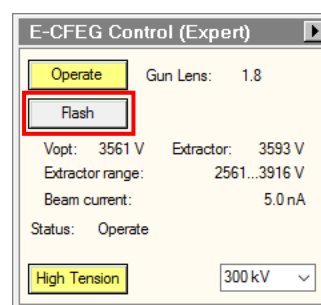
TUI で Beam Current を確認。

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

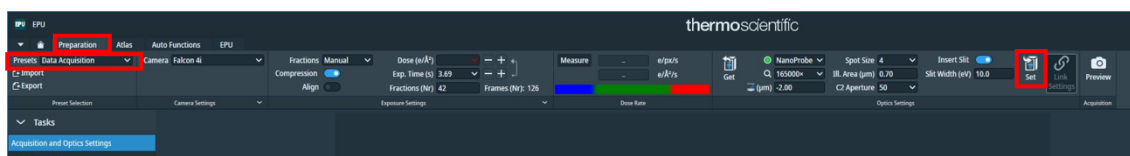
5 を下回っているようなら Flash する

*TUI -> Set up tab -> E-CFEG Control

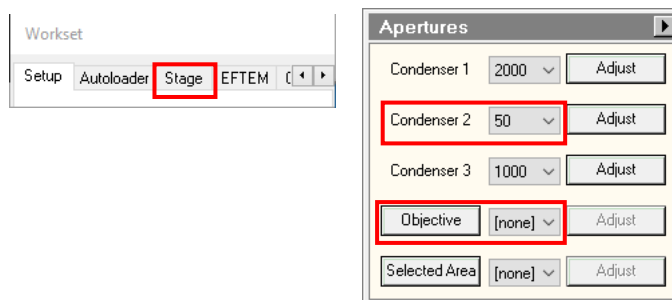
*Flash するときにはカラムバルブを閉じる



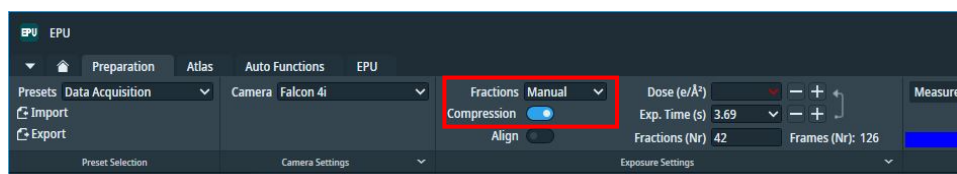
EPU > Preparation tab > Presets から Data Acquisition を選んで Set



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



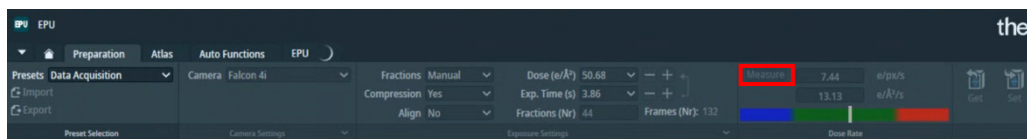
Fractions = **Manual**, Compression = **Yes** となっていることを確認



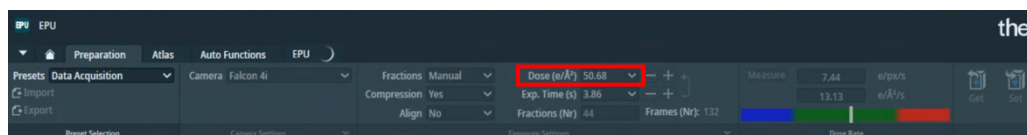
*TIFF 形式での設定

*EER 形式で撮影したい場合は別途記述

Measure を押す



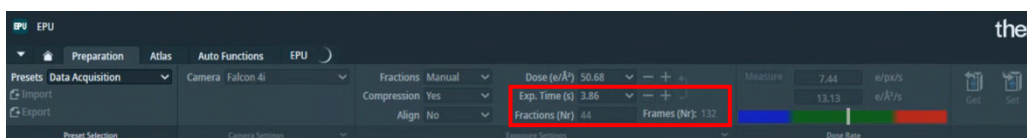
Dose のプルダウンから 50 (多くの場合この値がよい) を選ぶ



Fractions の値 (40-50 が望ましい) × (整数) = Frames の値

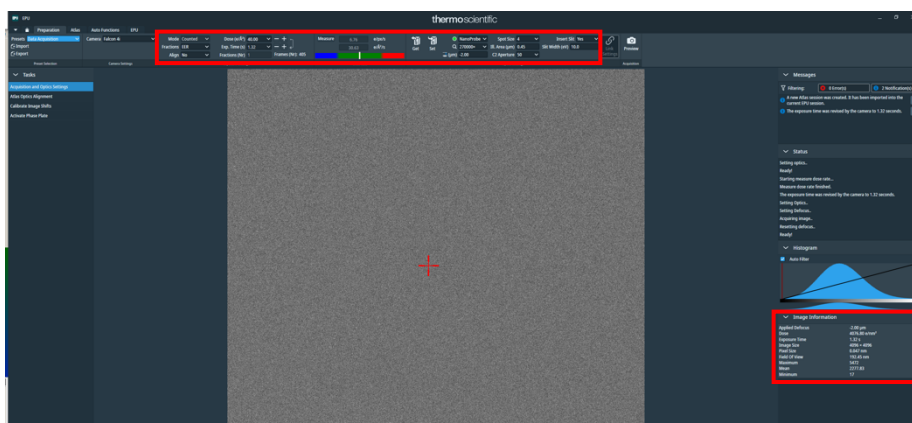
となるよう、Exp. Time と Fractions の値を微調整する

*Dose の値は Exp. Time と連動する



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

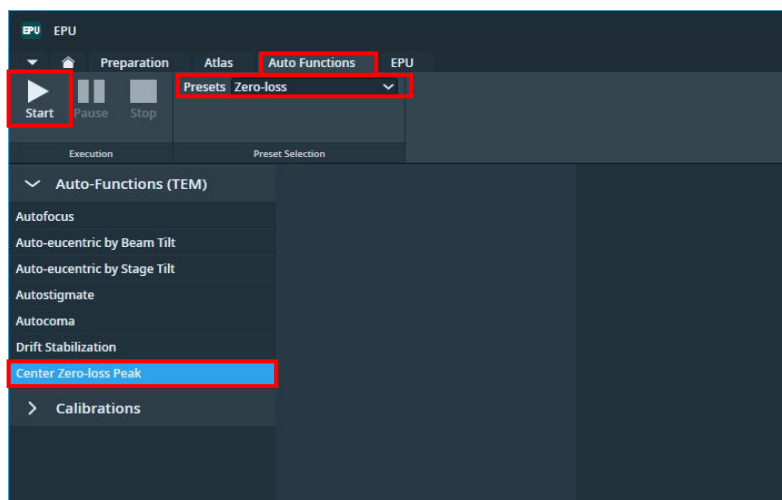


(画面全体をアプリでとる)



EPU > Auto Functions tab > Center Zero-loss Peak

Presets を Zero-loss に変更して **Start**

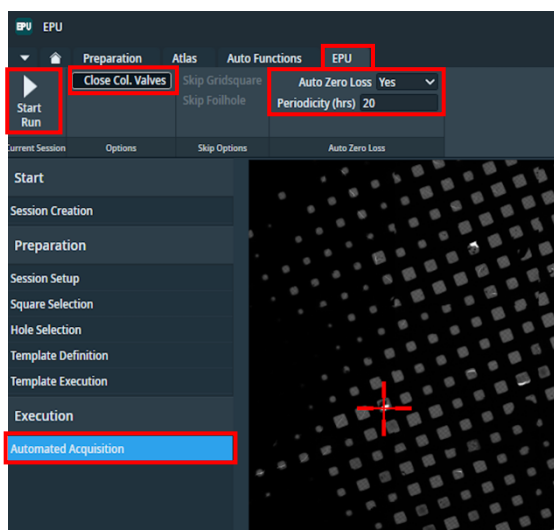


EPU > EPU tab > **Automated Acquisition**

Auto Zero loss = Yes、Periodicity (hrs) = 12 hrs

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



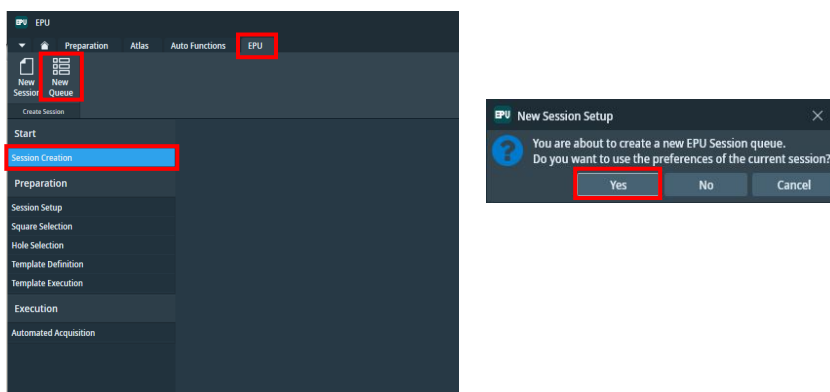
以上

4. Multi Grid Session によるデータ測定

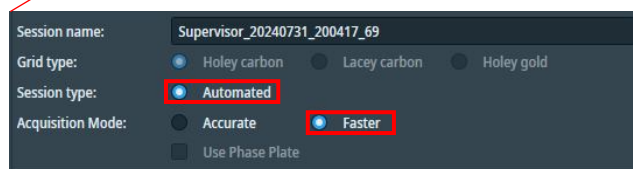
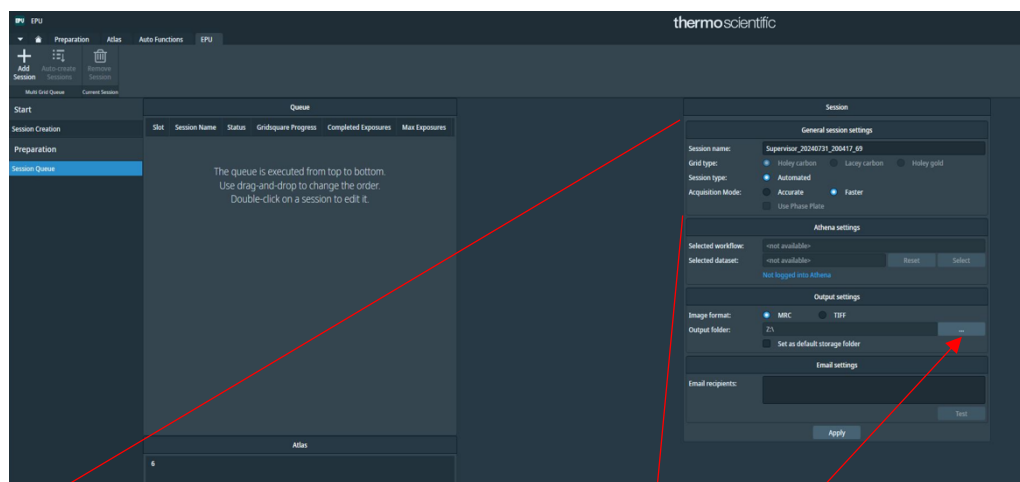
EPU > Atlas tab で一つ目のグリッドを選択し、Load Sample

p. 22-24 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



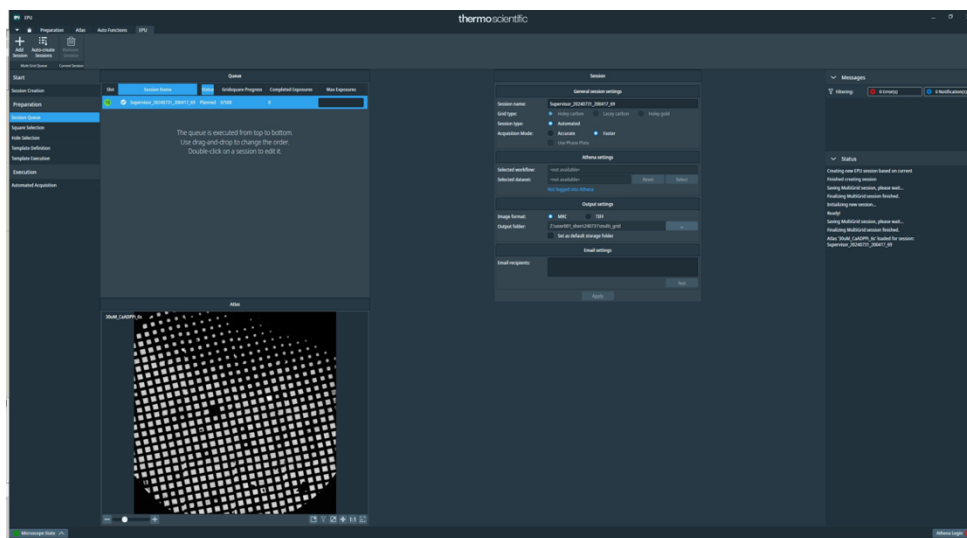
(保存先: Z:/userxxx/yyyydd/multi)

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



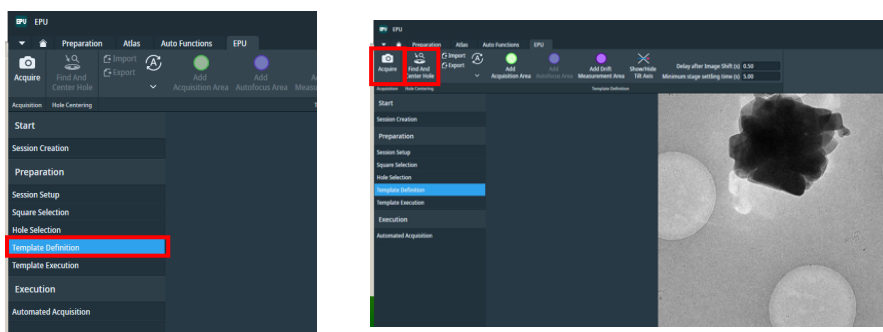
p. 17-18 に従い、スクエアの選択と hole の選択を行う。

*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



Hole が正しく認識され、画面のほぼ中央にあることを確認

*これが上手くいっていないと、以後の測定が全て失敗します

*上手くいかないときは、Hole Selection の **Measure Hole Size** をやり直す

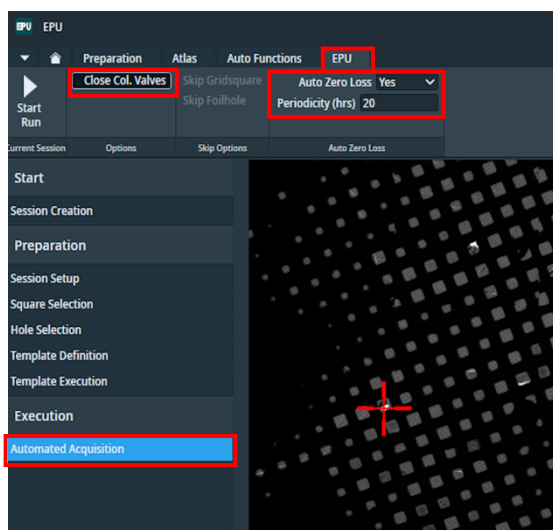
p. 21 に従い、autofocus 位置、照射位置、defocus 値などを設定する。

EPU > EPU tab > **Automated Acquisition**

Auto Zero loss = Yes、Periodicity (hrs) = 12 hrs

(ひとつのグリッドに対し、一度は実行されるよう時間を調整する)

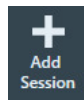
測定後カラムバルブを閉じるように、Close Col. Valves を有効にする



(これで1枚目の設定が完了)

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**

The screenshot shows the 'Session' configuration window with the following sections:

- General session settings:** Session name: Supervisor_20240731_200417_69; Grid type: Holey carbon (selected), Lacey carbon, Holey gold; Session type: Automated (selected), Accurated; Acquisition Mode: Accurate, Faster (selected), Use Phase Plate (checkbox).
- Athena settings:** Selected workflow: <not available>; Selected dataset: <not available>; Not logged into Athena.
- Output settings:** Image format: MRC (selected), TIFF; Output folder: Z:\user001_shen\240731\multi_grid; Set as default storage folder (checkbox).
- Email settings:** Email recipients: (empty field); Test button.

The 'Apply' button at the bottom center is highlighted with a red box.

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、Automated Acquisition の設定を行う

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

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

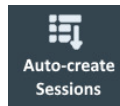
Automated Acquisition -> Start Queue



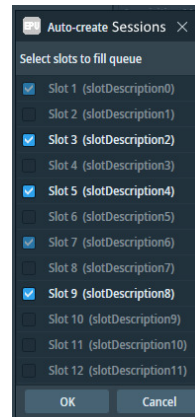
*Auto-create Sessions による一括設定

Dose の見積もり (p. 22-24) 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



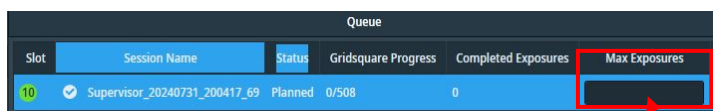
OK で選択したグリッドが Queue に入る

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



ここで設定した枚数に達したら次のグリッドに進む

p. 25 に従い、Auto Zero-loss の設定を行う

Automated Acquisition -> Start Queue



以上