

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、蔡弼丞、飯尾友愛

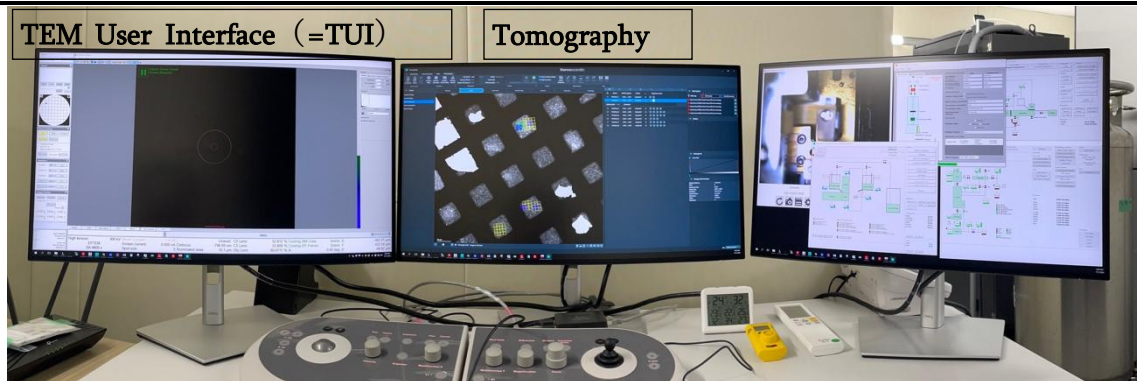
20260825 (ver. 2.2)
20241204 (ver. 1.1)



岡山大学
OKAYAMA UNIVERSITY

I. 試料交換から **Atlas** 取得まで

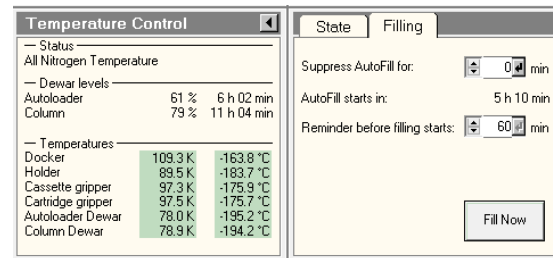
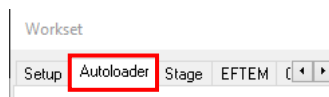
*TEM User Interface は version 3.22.1、Tomography は version 5.24.0.5704REL



1. Inventory

TEM User Interface (=TUI) を使います

- TUI > Autoloader tab > Temperature Control

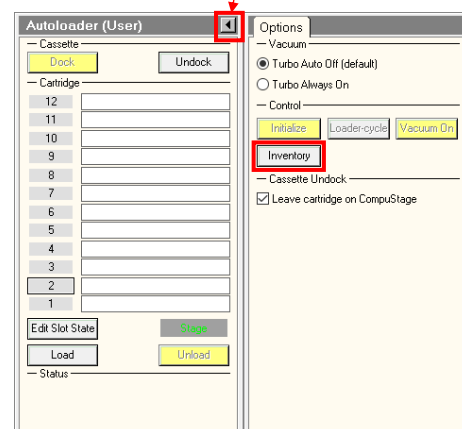


- NanoCab の Dock が終了したら（NanoCab の取り出しを忘れずに！）、温度表示が全て緑になるまで待ち、さらに、全てが-160°C以下になるまで待つ（数分）

- TUI > Autoloader tab > Autoloader > Option



Optionウィンドウが開いていない場合はここをクリック



- **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

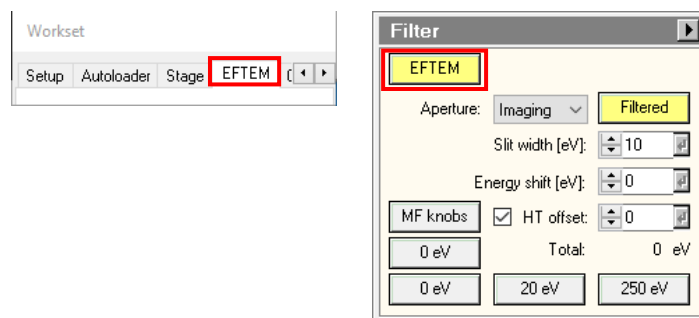
*この名前が結果のフォルダ名等に反映されることはない。メモを残しておく。

2. およそのアライメント（毎日でなくてもよい？）

- 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

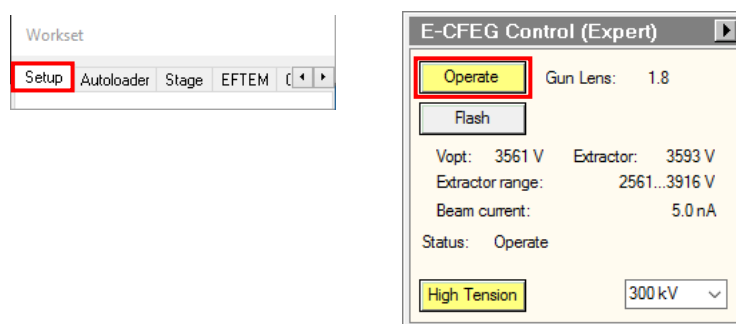
（黄色くなっていなかったら **EFTEM** ボタンを押して黄色にする）



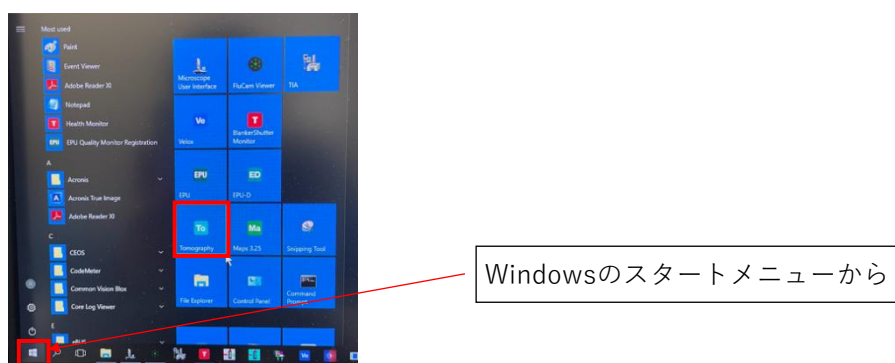
- TUI > Setup > E-CFEG

- **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）



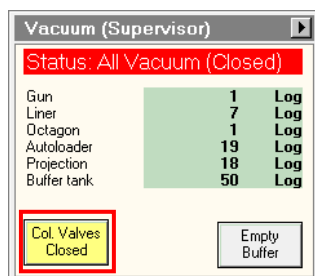
- Tomography（以下 Tomo）の起動



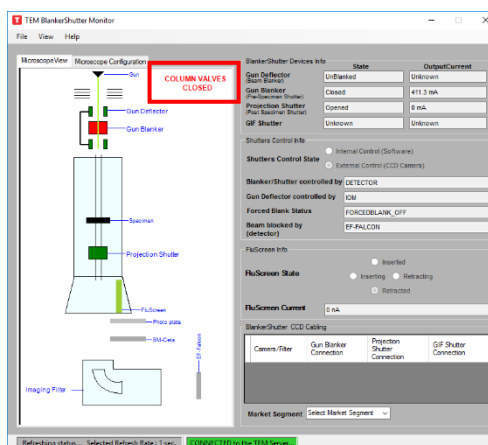
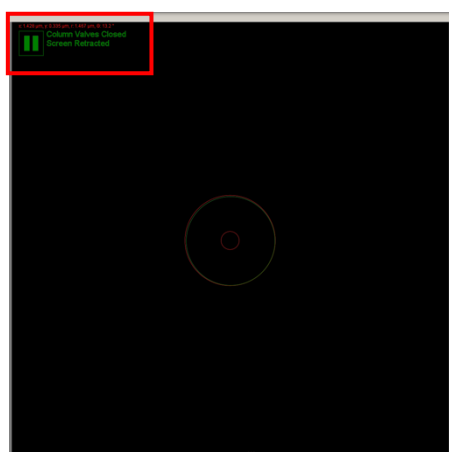
もしエラーメッセージが出たら、Reset してください。

< 確認事項 >

- 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



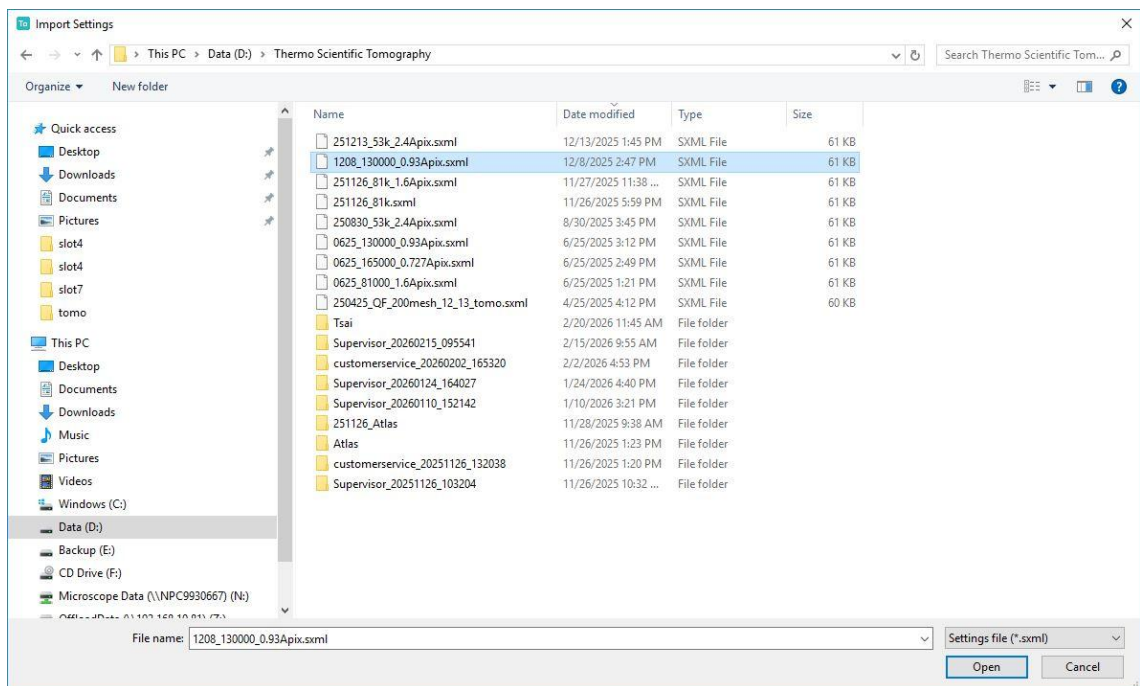
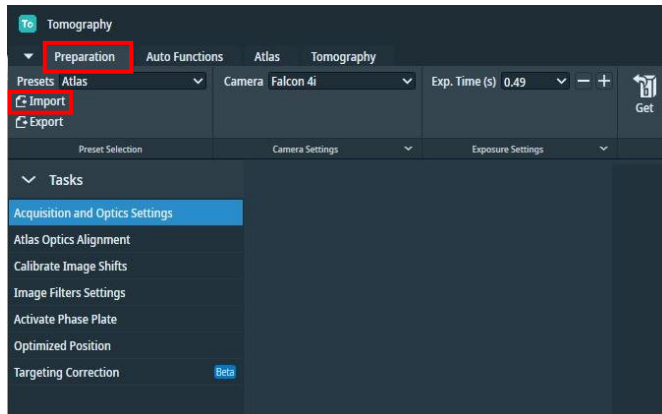
- Tomo> Preparation tab の **Import** を押して、以下の.xml file を open

D:/Thermo Scientific Tomography/YMMDD_*.xml**

*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）。

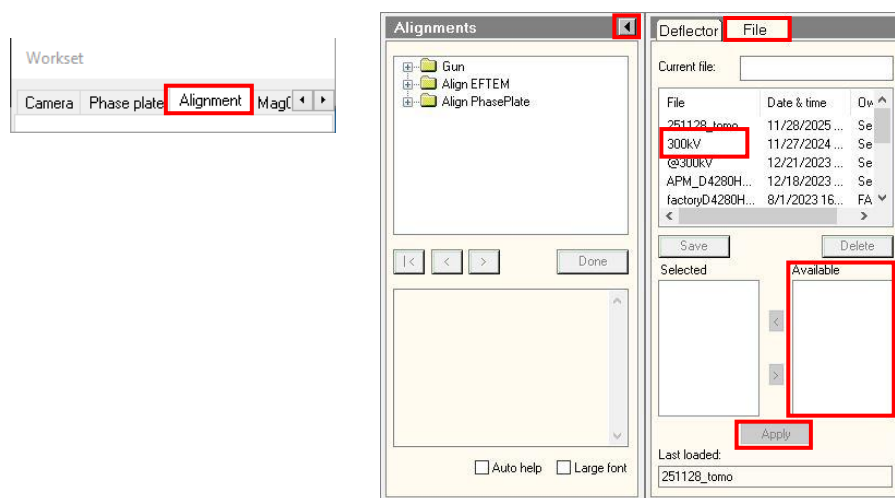
自分の使用するグリッドのもので日付の最新のものを選択する。

*なければ、別途作成する。



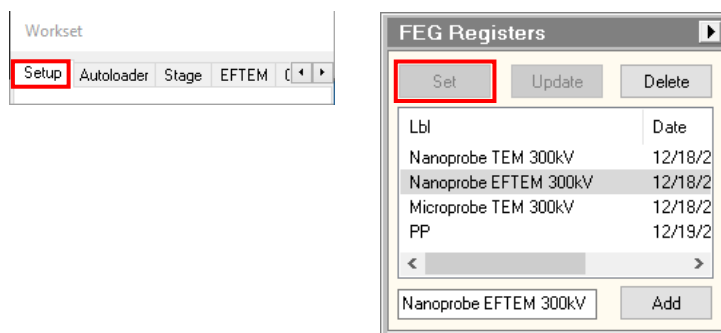
<コンディショニング、再起動時>

- TUI > Alignment tab > Alignments > Option > File tab から 251128_tomo を選び、
Available にあるものを Selected に移動して、Apply を押す



- TUI > Setup tab > FEG registers から Nanoprobe EFTEM 300kV(11/29/2024)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)

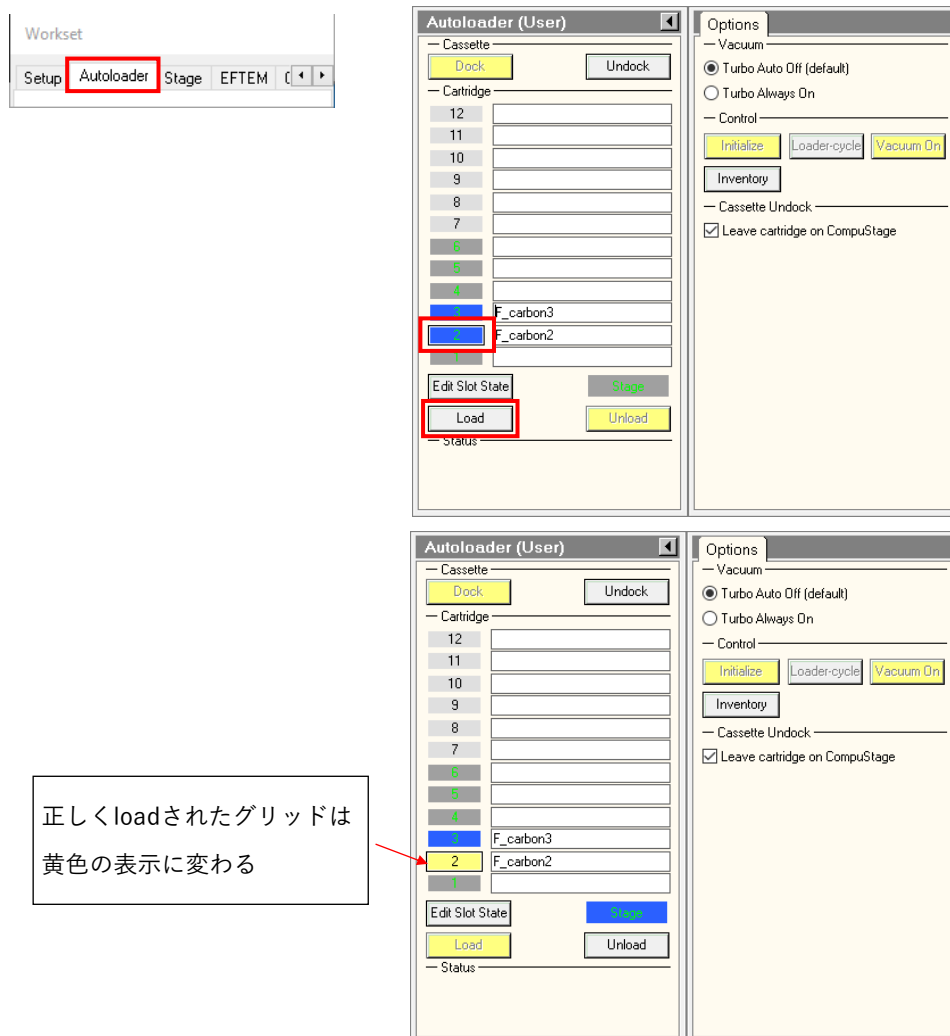


3. グリッドの **load** と **preview**、Atlas 取得

- TUI > Autoloader tab > Autoloader

- ビーム調整用の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

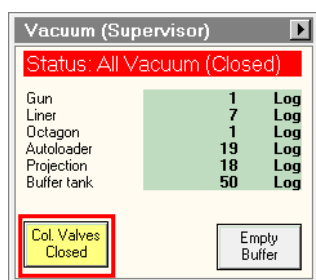
Load ボタンを押す



<このページは丸ごと省略可>

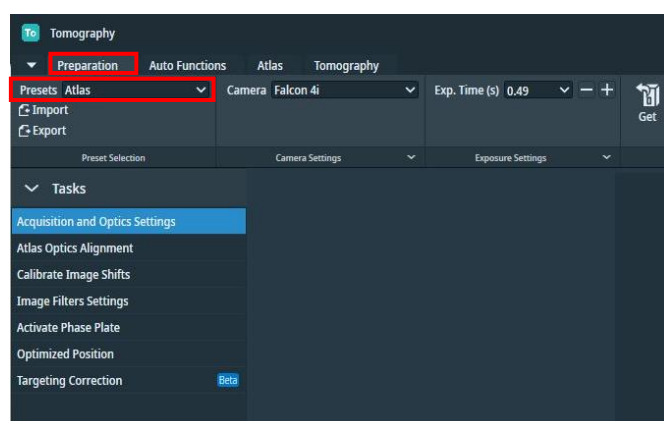
- TUI > Setup tab > Vacuum

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



- Tomo > Preparation tab

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



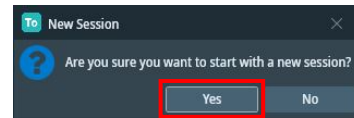
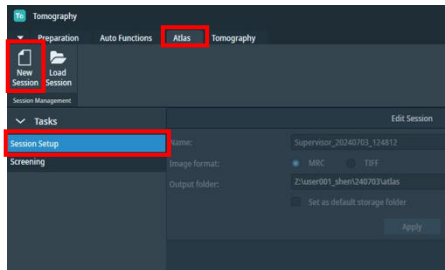
- ☐ 上部右端の  を押して Preview 撮影

*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。

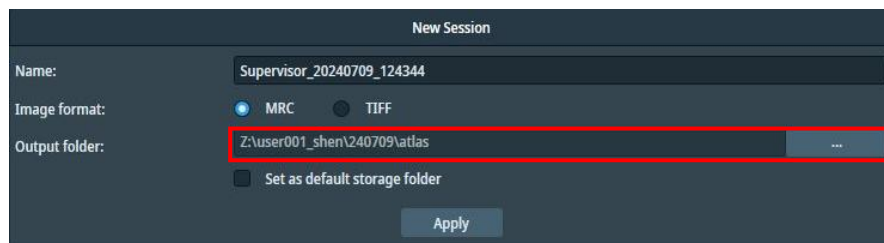
*氷が厚すぎる場合はほぼ真っ暗ですが、うっすら Grid square が見えるはず(トモグラフィのグリッドなら、うっすらありません)

- Tomo > Atlas tab

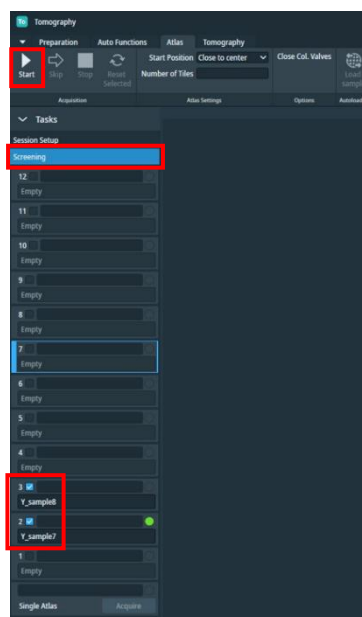
- Session Setup New Session Yes



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



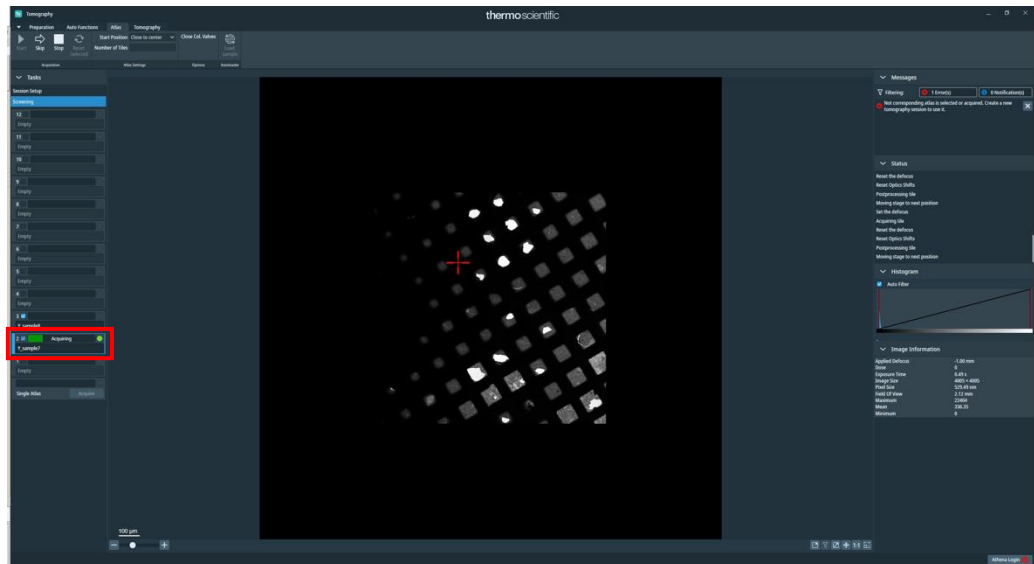
- Screening を押して、撮りたい Grid の番号にチェックを入れて、
Start ボタンを押すと Atlas 撮影開始
調整用グリッドを 2 に入れておき、以降の調整に使用するとよい



- **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?)

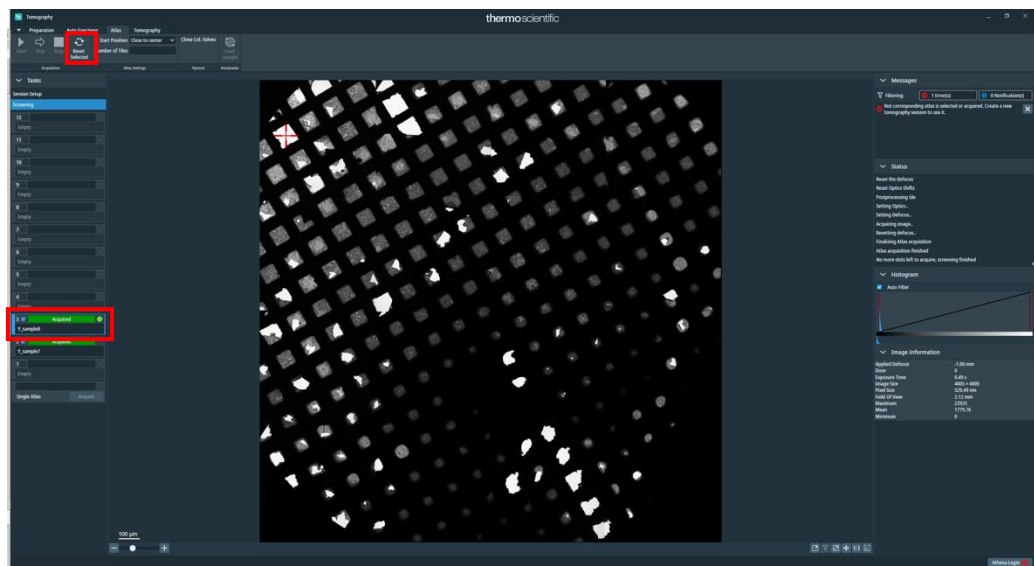
ビーム調整だけの場合は全部取らなく、カーボン膜と破れているところがあれば、stopする



*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

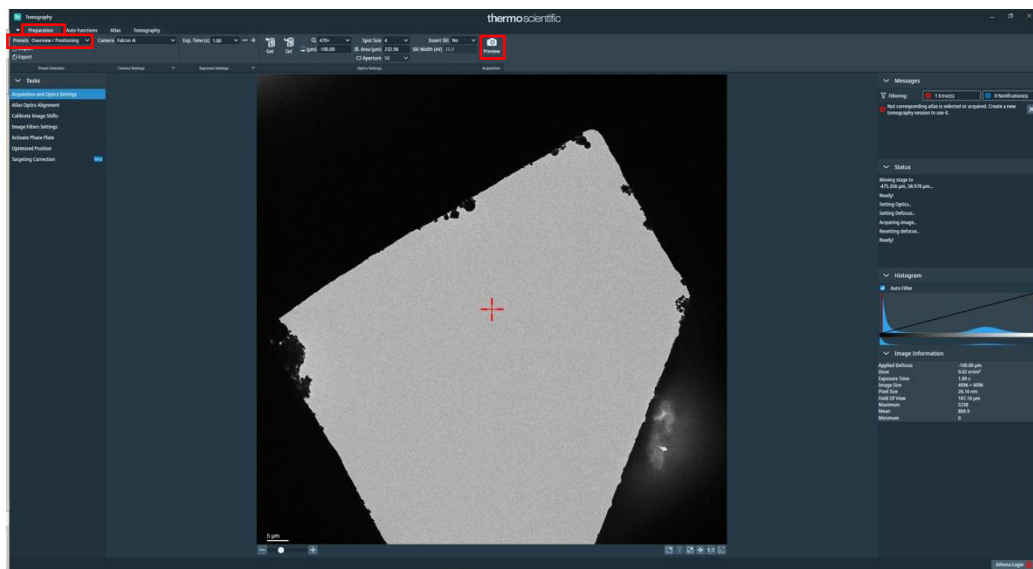
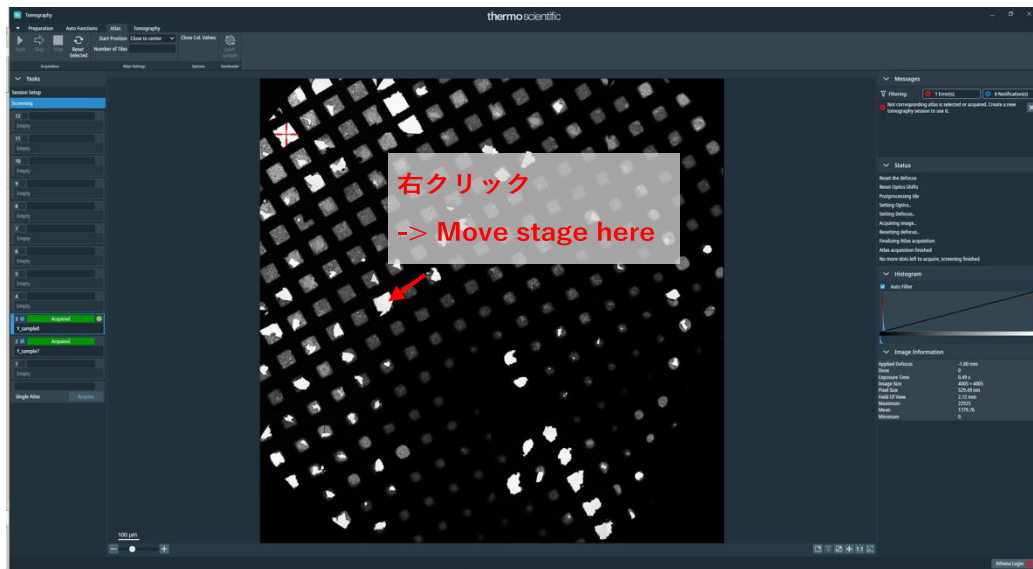
データが消えるので、そのグリッドにチェックを入れて **Start**



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 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

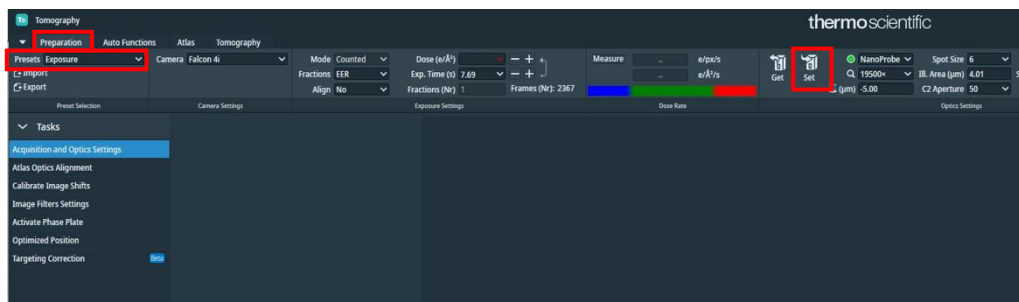


- Flucam Viewer が **EF** (=EF mode の中心を緑の円で表示)、
Natural **High Resolution** となっていることを確認

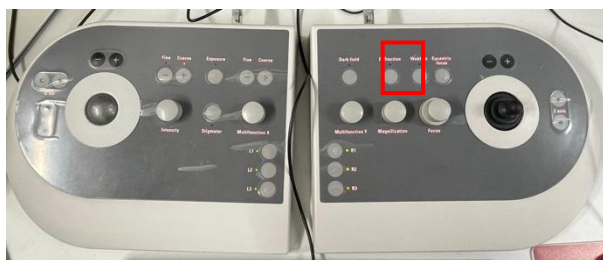


2. ピポットポイントの調整

- ☐ 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 Overview / Positioning を選んで **Set**

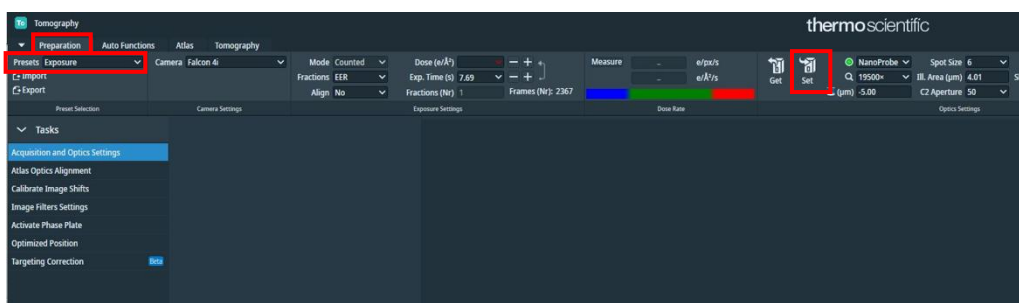


- ☐ 操作板の **Eucentric Focus** を押す
TUI の下の方 ×740 で、Obj lens=7%前後であることを確認
Defocus が 0 でなければ操作板 R2 (Reset Defocus) で 0 にする



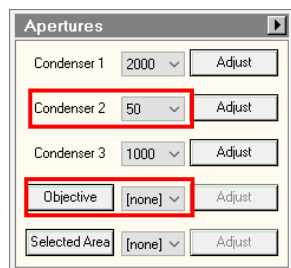
- ☐ Tomo > Preparation tab > Presets から Exposure を選んで **Set**

*Exposure = EPU での Data Acquisition に相当

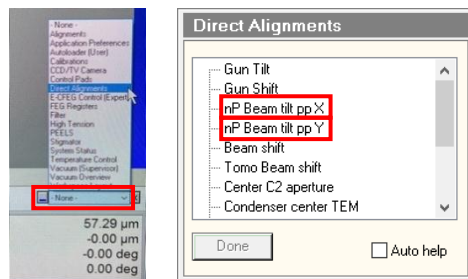


- ☐ 操作板の **Eucentric Focus** を押す
TUI の下の方 設定した倍率で、Obj lens=80%前後であることを確認
Defocus が 0 でなければ操作板 R2 (Reset Defocus) で 0 にする

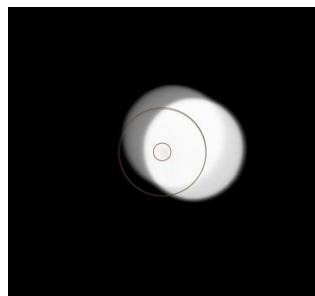
- TUI > Stage tab > Apertures を見て **C2=50, Obj=none** であることを確認
(*C1=2000, C3=1000 は今後一切触らなくて OK)



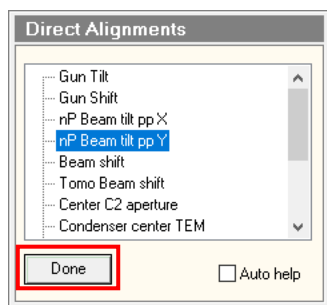
- TUI 右下 > **Direct Alignment** から **nP Beamtilt pp X** を選ぶ



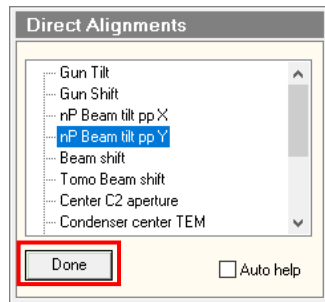
- 操作板の **Multifunction-X** のみで、点滅する 2 つの光が重なるように調整する



- **Done** を押す

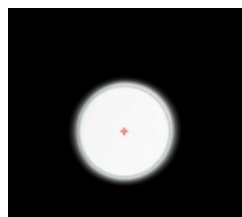


- TUI 右下 > **Direct Alignment** から **nP Beamtilt pp Y** を選ぶ
- 操作板の **Multifunction-X** のみで、点滅する 2 つの光が重なるように調整する
- **Done** を押す

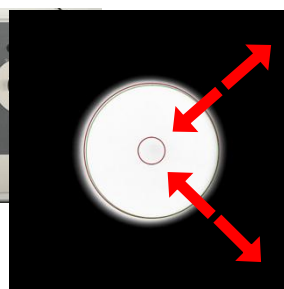
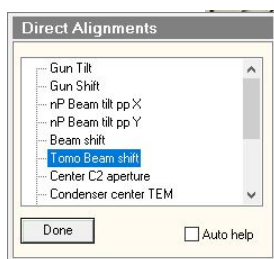
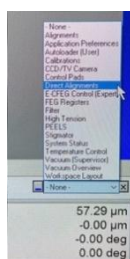


3. C2 絞りの中心合わせ

- ☐ グリッドの穴にいて、蛍光板が下りていることを確認
- ☐ Intensity ダイアルを左に回して光を絞って、Flucam Viewer の内側の緑の円くらいの大きさにする



- ☐ TUI 右下 > **Direct Alignment** から **Tomo Beam shift** を選ぶ
- ☐ **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、光が外側の赤い円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、光の円が赤い円に接するように絞りを移動する



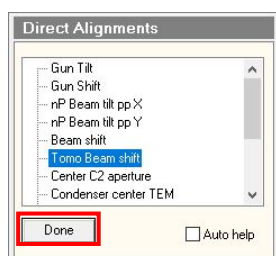
- C2 の右横の **Adjust** をもう一度押す

2 回目

- 再度光を緑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、光が外側の赤い円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、光の円が赤い円に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
- 再度光を緑の円くらいに絞る。この際光の輪がほぼ同心円状に広がれば OK

それまでの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



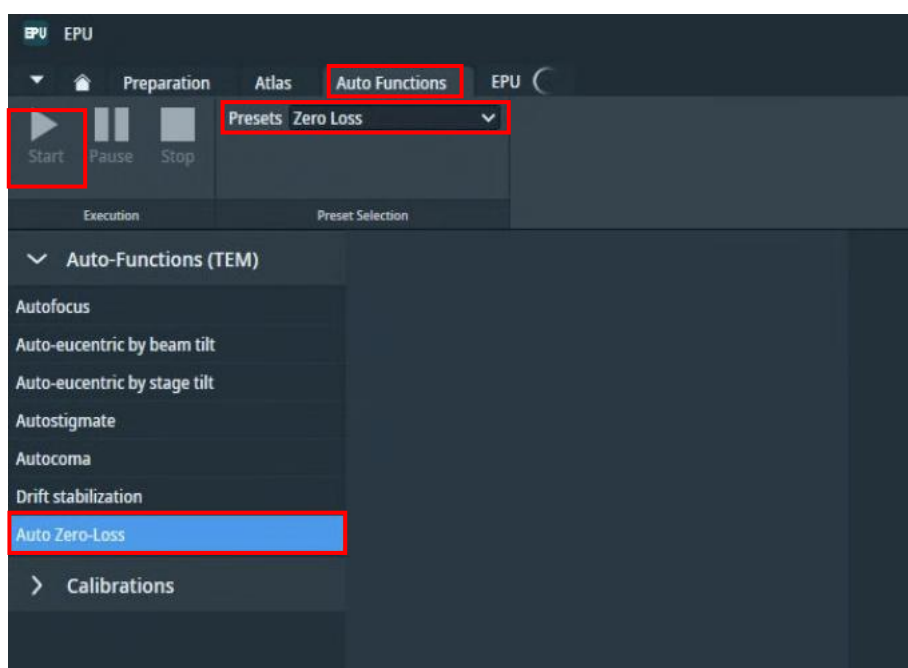
- ビームのサイズを変更した場合は Exposure を選んで **Set**

4. Center Zero-loss Peak (Auto Zero-Loss)

(Conditioning の後は、energy filter の調整を行う)

Tomo > Auto Functions tab > Center Zero-Loss Peak

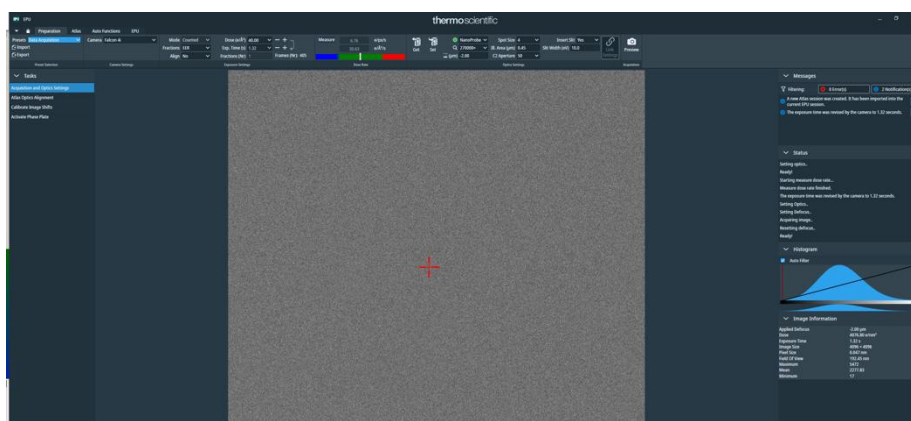
Presets が Zero Loss であることを確認して **Start**



*Energy filter の芯出しを行っている

Tomo > Preparation tab > Presets から Exposure を選んで **Preview**

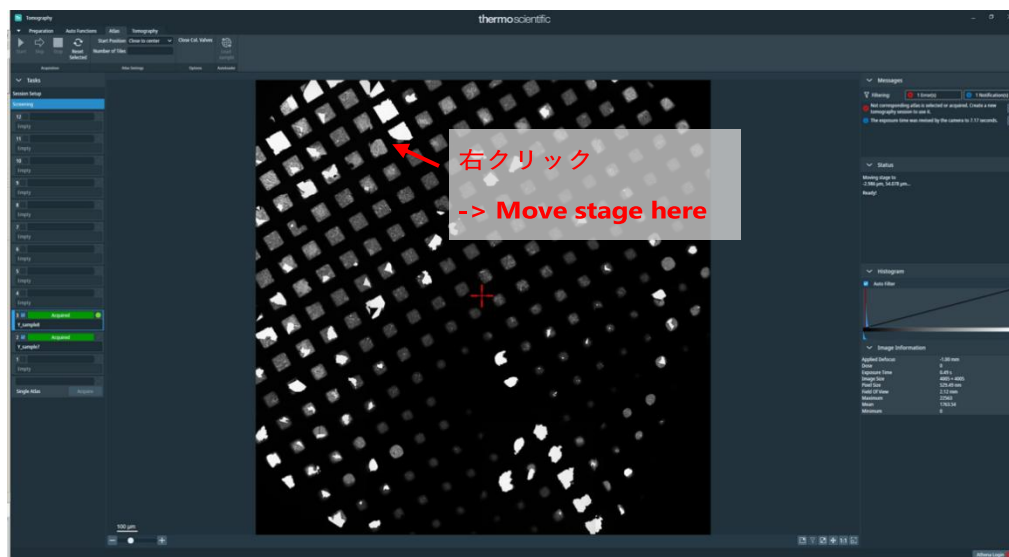
画像が flat であることを確認



*もし flat でなかったら、このページ冒頭からやり直し

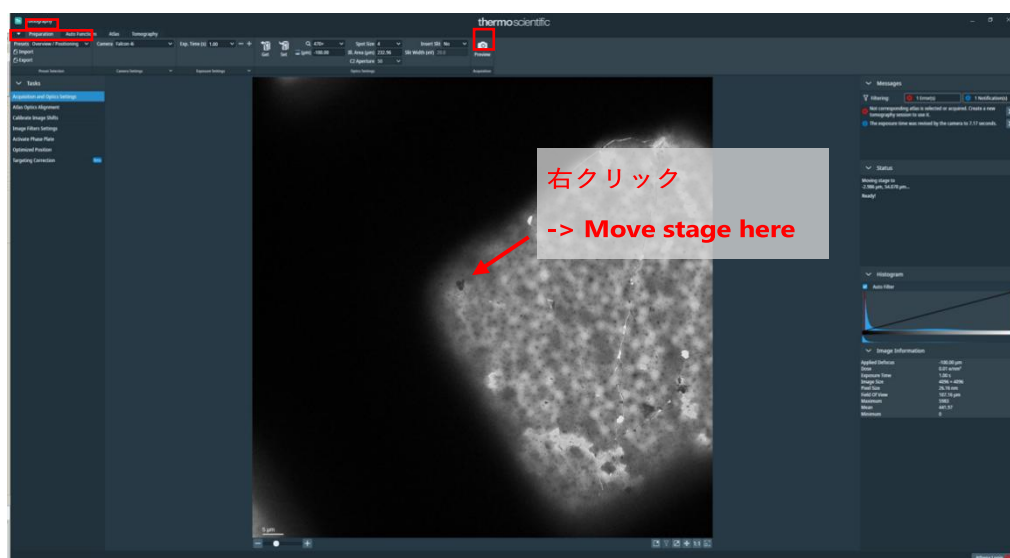
5. 倍率間の中心合わせ (Image Shift のキャリブレーション)

- Tomo > Atlas tab を見て目立つゴミのあるところに **Move stage here**

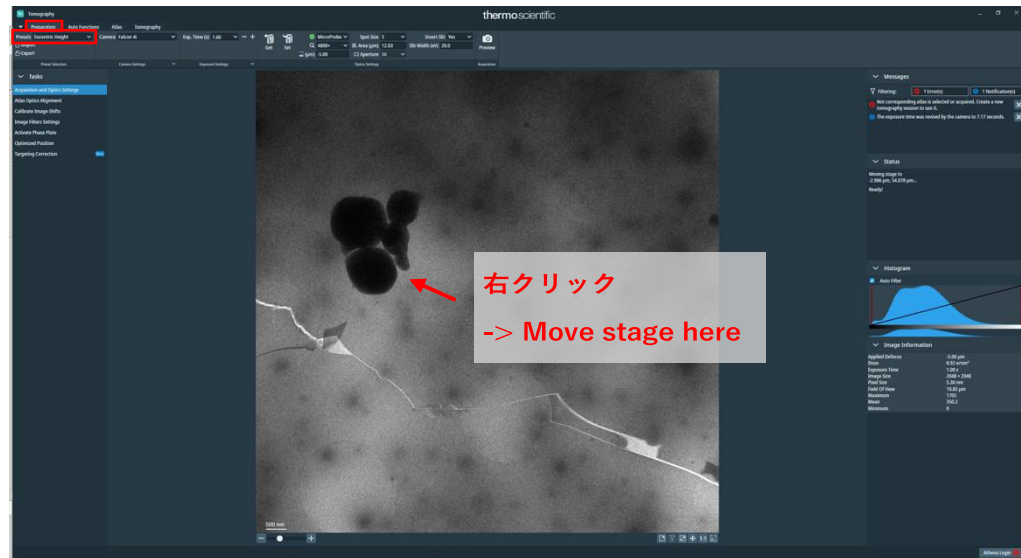


*あまり大きすぎないゴミを選ぶ。マウスのホイールで画像の zoom in/out を操作可
比較的きれいなスクエアのほうが以下の調整をやりやすい
ゴミと hole の境界上に中心をもってくるとよい

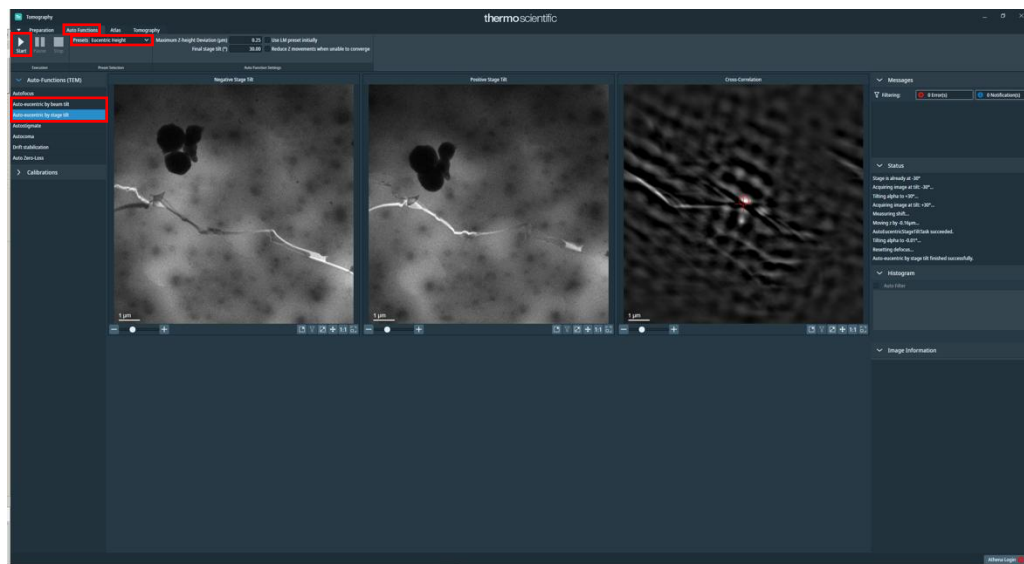
- Tomo > Preparation tab > Presets から Overview / Positioning を選んで **Preview**
- 目立つゴミのあるところに右クリック **Move stage here** で移動



- 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



- Tomo > Auto Functions tab で **Auto-eucentric by stage tilt** または **Auto-eucentric by beam tilt** を選ぶ
- Presets を Eucentric Height にして **Start**

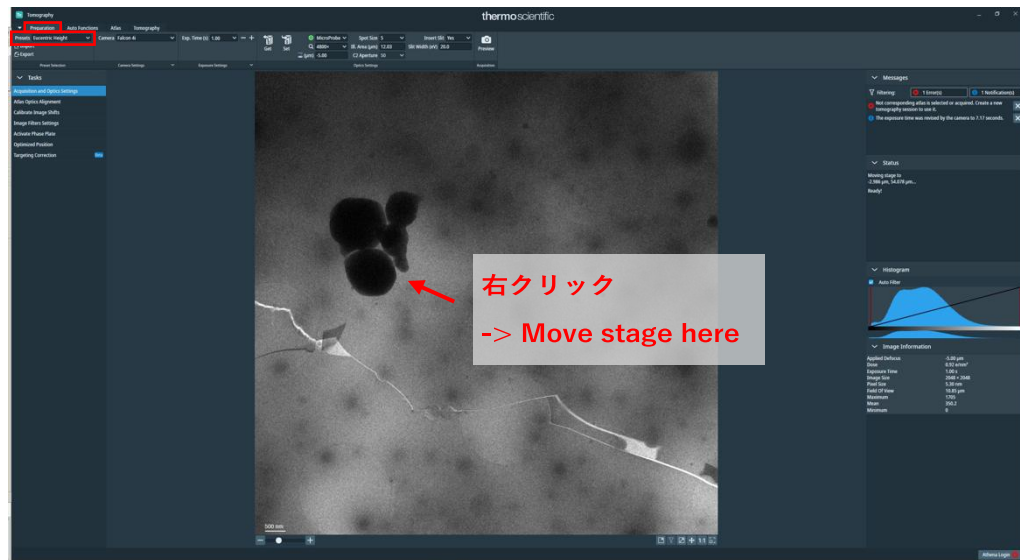


*Beam tilt か stage tilt のどちらかで成功すればよい。

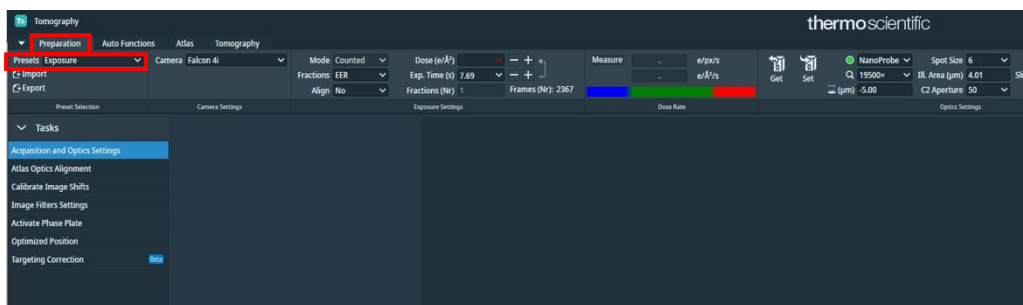
□ Tomo > Preparation tab > Presets から Eucentric Height を選び Preview

□ ゴミの角もしくはゴミと Hole の交点などに Move stage here

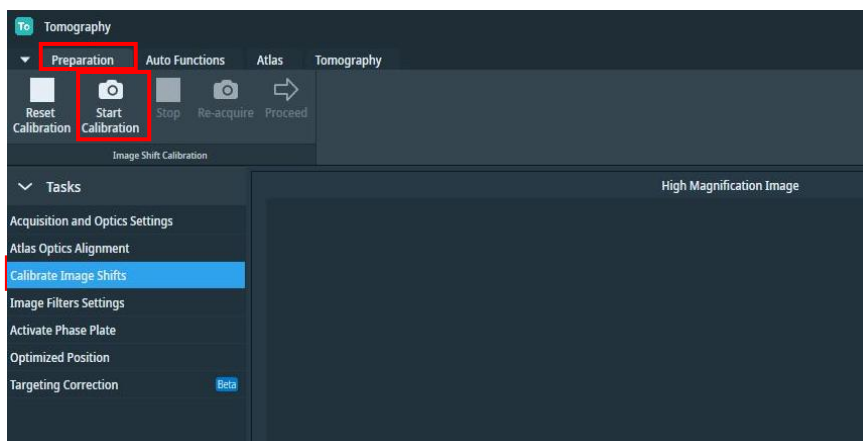
* Eucentric Height があった状態でもう一度中心を合わせる



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



□ Tomo > Preparation tab から Calibrate Image Shift を選んで Start Calibration



- Exposure での倍率（図は x19.5k）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-acquire**
よほどズレている場合以外はやらないほうがよい？

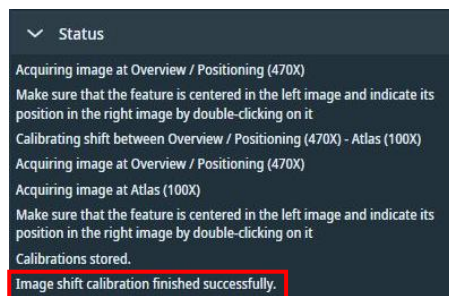
- **Proceed**

- 右側に一段階低倍率（Search = Eucentric）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

6. AutoCTF (非点収差・コマ収差の補正)

*この補正は carbon film のグリッドでないとできない

*Sherpa を使用した調整法は、単粒子用マニュアルを参照

Tomo > Preparation tab > Presets の Eucentric Height にゴミ画像が残っているはず。
付近のなるべくきれいなカーボン面を右クリックして **Move stage here**



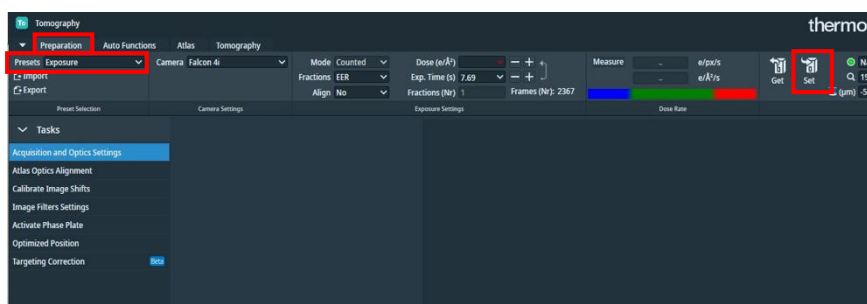
観察試料が繊維状のポリマーなどの場合は要注意！

カーボン面にもびっしり試料が乗っている場合が多く、試料由来の規則性により **Thon ring** が著しく歪められる恐れがある

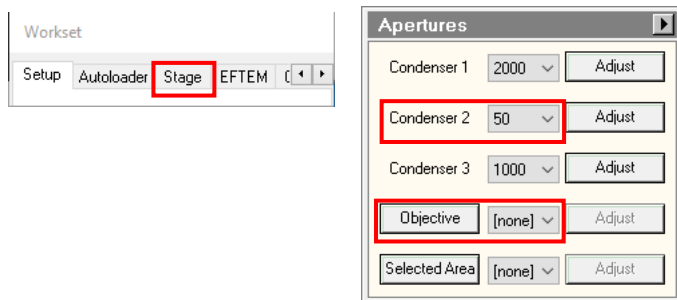
そのまま調整を進めてしまうと、大変おかしなことになる

Sherpa を使った調整では、最初に **Snap** を撮るのでやや安全

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

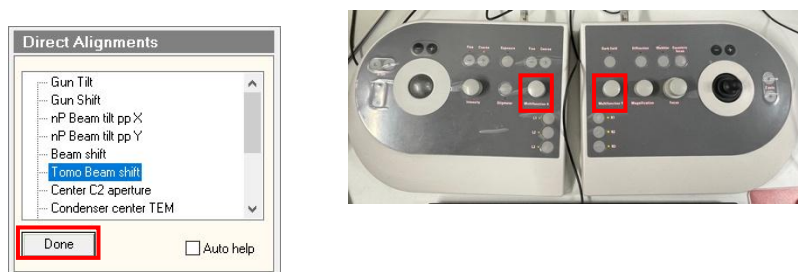


TUI > Autoloader tab > Apertures を見て **C2=50, Obj=none** であることを確認

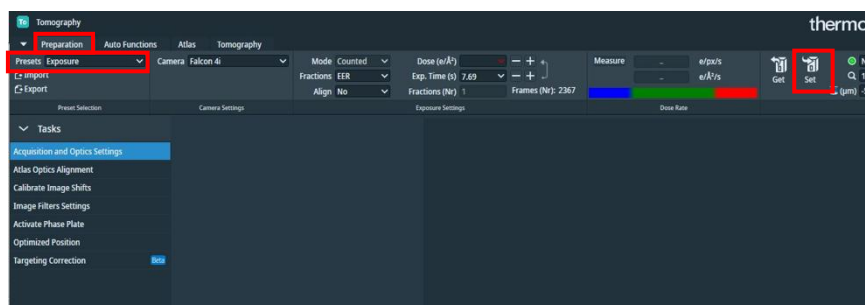


R1 を押して蛍光板を下げる

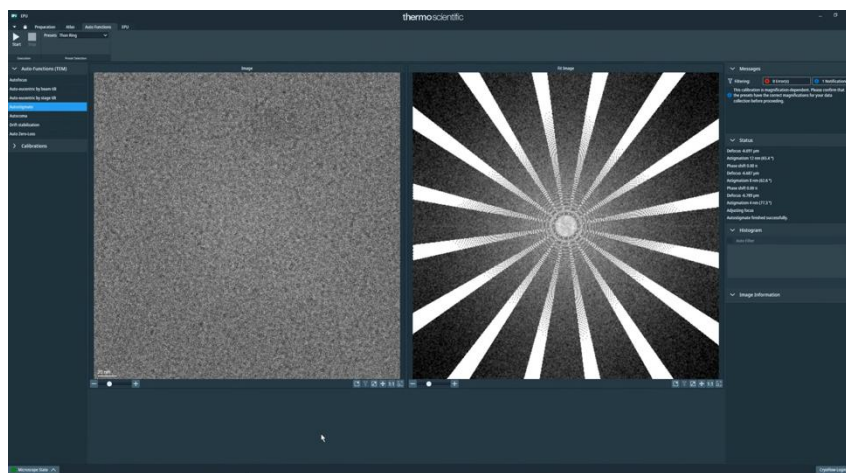
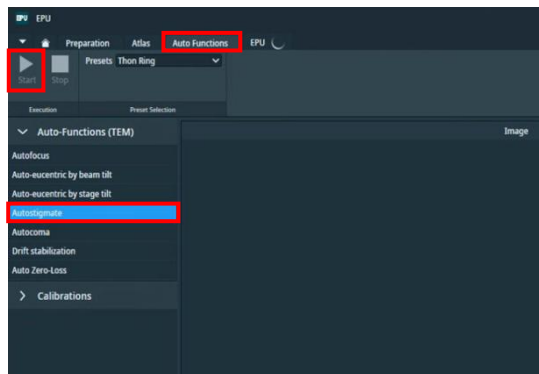
ビームが中央になれば **Direct Alignment** から **Tomo Beam shift** で中央にして **Done**



もう一度 Exposure を選んで **Set** して、**R1** を押して蛍光板を上げる



Tomo > Auto Functions tab で Autostigmatate を選択して Start

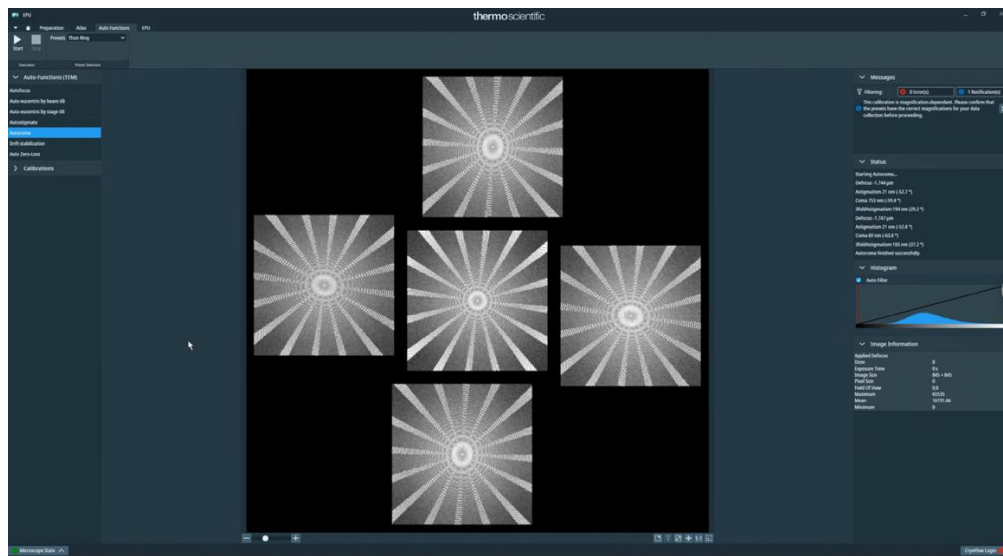
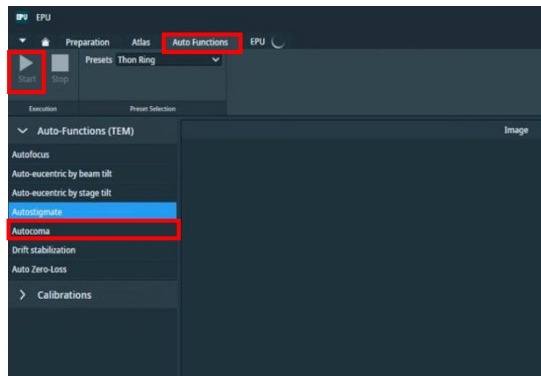


*非点収差の調整が行われる

*Thon ring が真円であるべきなので、そうなるよう調整されるはず

*「Autostigmatate finished successfully」の表示を確認

Tomo > Auto Functions tab で **Autocoma** を選択して **Start**

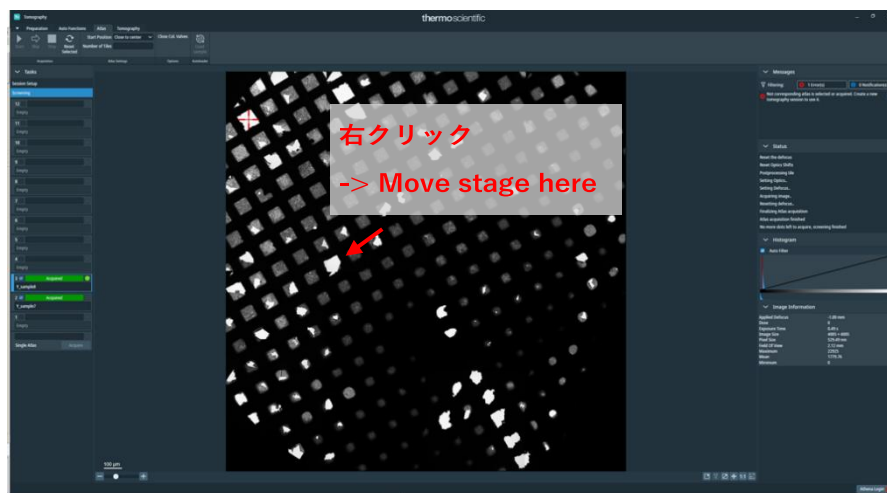


- *コマ収差の調整が行われる
- *上下（左右）の Thon ring の楕円が同様であるべきなので、そうなるよう調整されるはず
- *「Autocoma finished successfully」の表示を確認

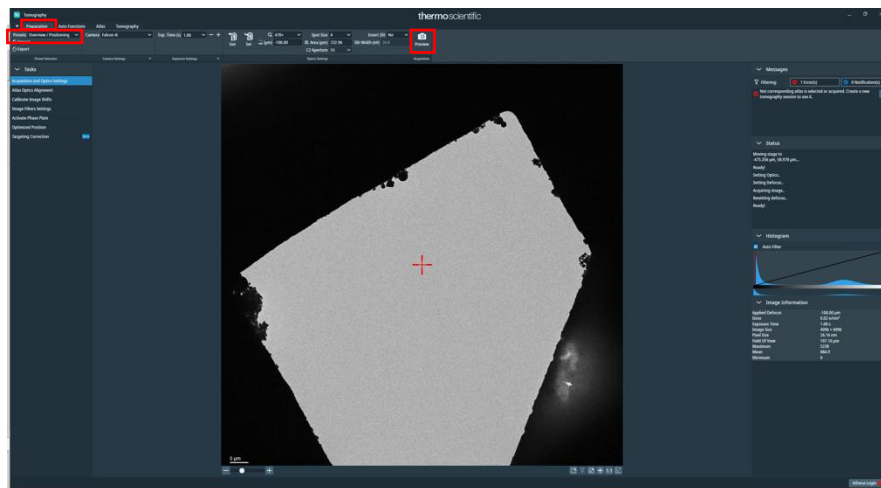
もう一度 **Autostigmat** を選択して **Start**

7. Dose の見積もり

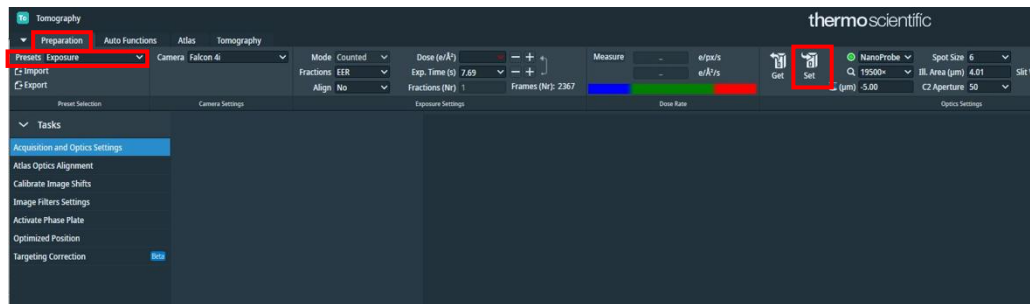
- ☐ (穴のあいたスクエアにいることを確認)
- ☐ Tomo > Atlas tab で Grid に穴のあいたところに右クリック Move stage here



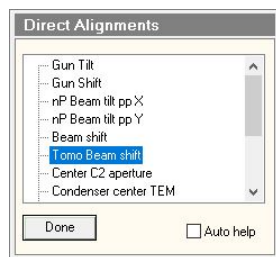
- ☐ Tomo > Preparation tab > Presets から Overview / Positioning を選んで Preview
(穴にいるのを確認)



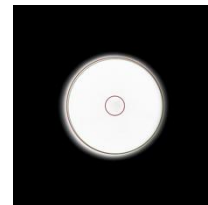
- Tomo > Preparation tab > Presets から Exposure を選んで **Set**



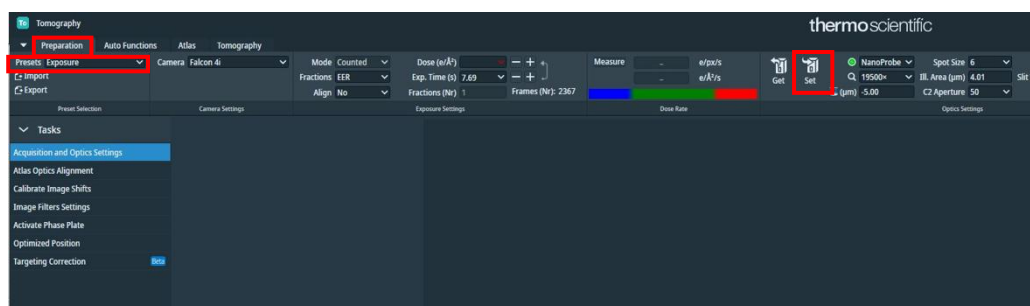
- **R1** を押して蛍光板を下げる
- ビームが中央になれば **Direct Alignment** > **Tomo Beam Shift** で中央にして **Done**



- 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



- Tomo > Preparation tab > Presets から Exposure を選んで **set**



- Dose ($\text{e}/\text{\AA}^2$) の値を入力して **Measure**

*トモグラフィーでは、total で $120 \text{ e}/\text{\AA}^2$ くらいが目安。

$\pm 60^\circ$ で 3° 刻みだとすると、41 枚。

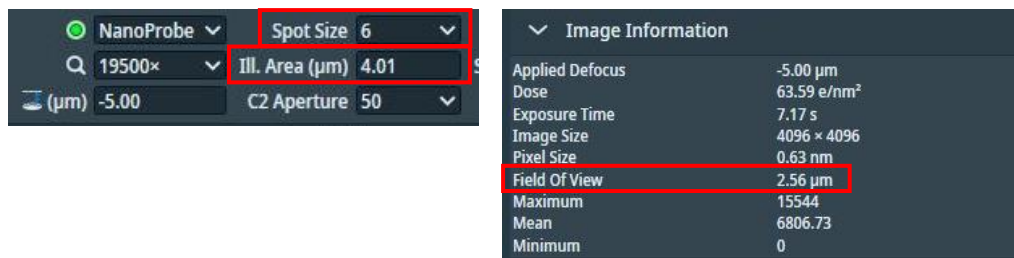
従って、1 枚あたり $3 \text{ e}/\text{\AA}^2$ 程度。



*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, Ill.Area で調整。

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



- 最後に **Preview** してからスクリーンショットを取得



画面全体をスクショアプリでとる

Gain file もコピーしてディレクトリに保存しておく

Z:/ImagesForProcessing/EF-Falcon/300kV?

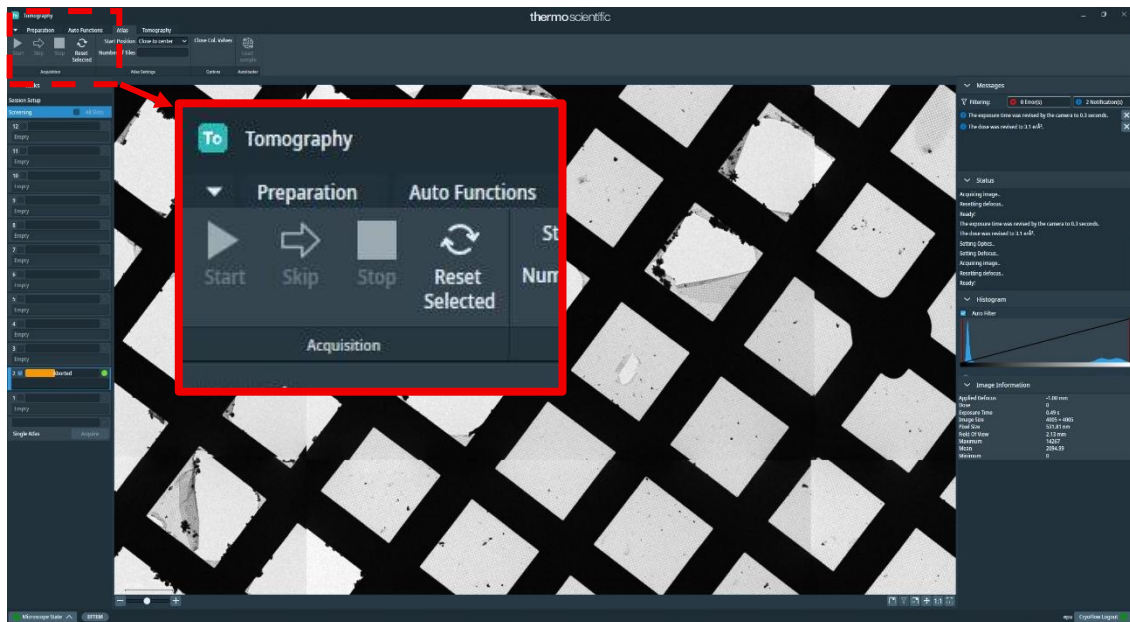
*当日のユーザーのディレクトリに保存しておく

Z:/userxxx/yymmdd

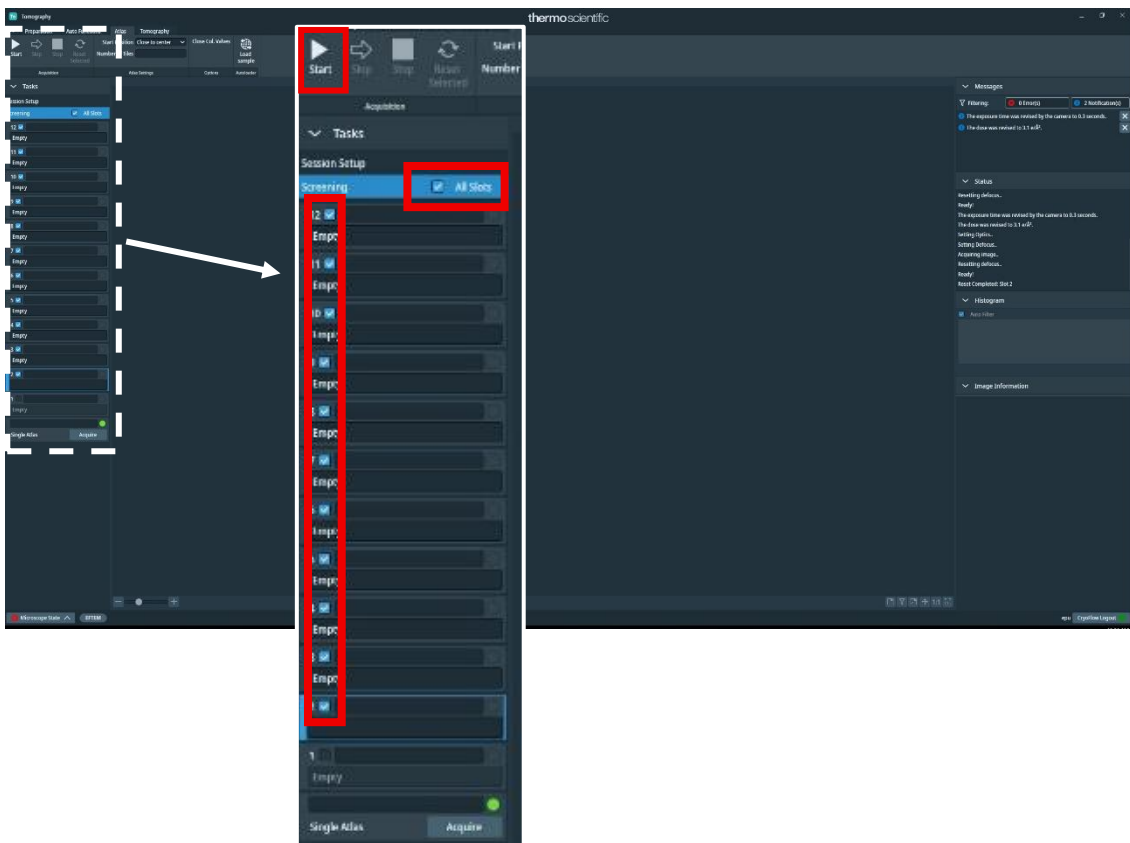
調整は以上で完了

III. Atlas の取得

- Tomo > Atlas tab で調整用に取得した atlas を選択し、Reset Selected



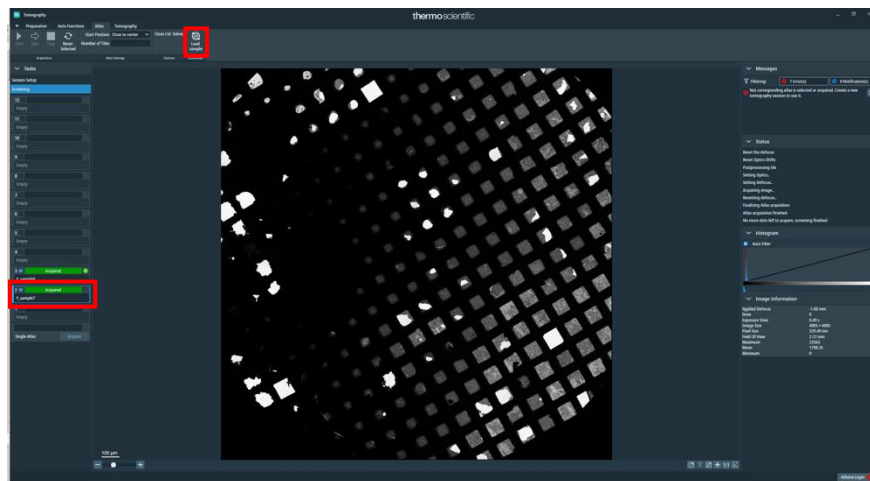
- 改めて全てのグリッドにチェックを入れ(一つずつあるいは All Slots)で Start



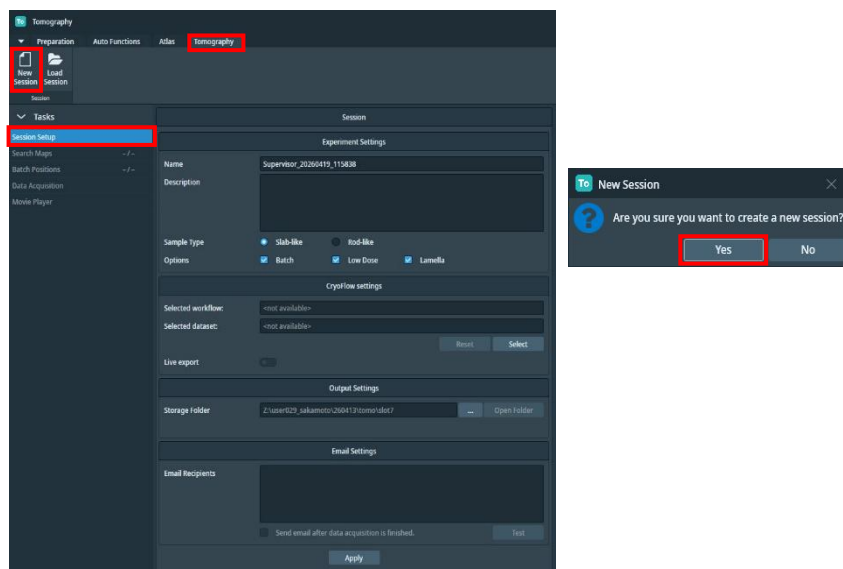
IV. データ測定

1. セッションのセッティング（Cryoflow 使用で Lamella のデータ収集）

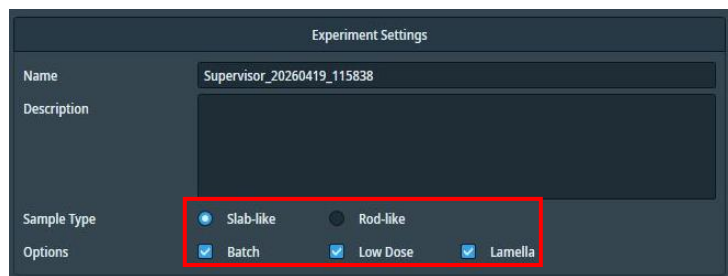
- Tomo > Atlas tab で目的のグリッドを選択し、Load sample



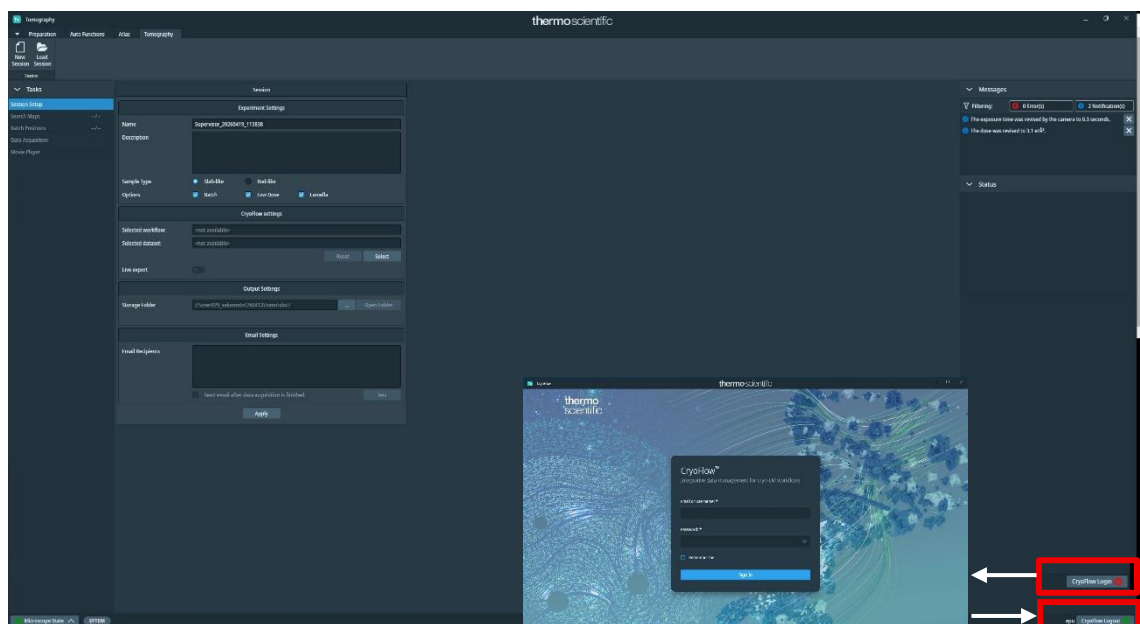
- Tomography tab > Session setup > New Session
> Yes



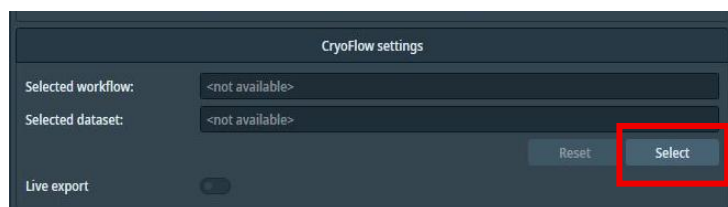
- Experiment settings のところで、Slab-like, Batch, Low Dose, Lamella にチェック

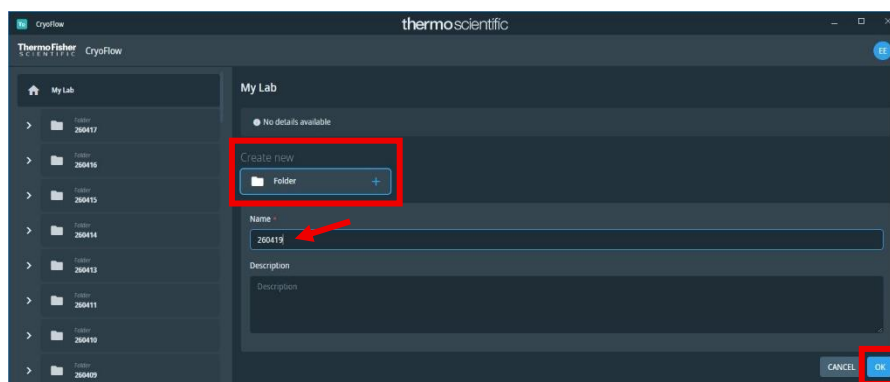


- 右下に CryoFlow の状態を確認できる。赤の場合は、CryoFlow Login をクリックして、ログインする。(username password: epu)

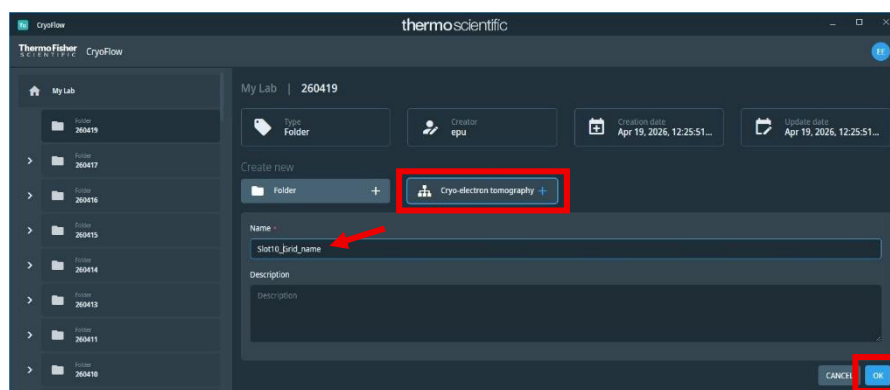


- CryoFlow settings のところで、Select をクリック、新しいフォルダーを名前を日付をつけて作成する。

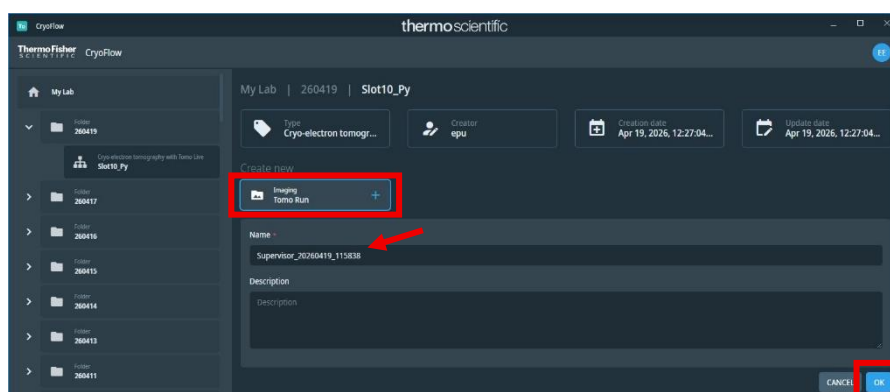




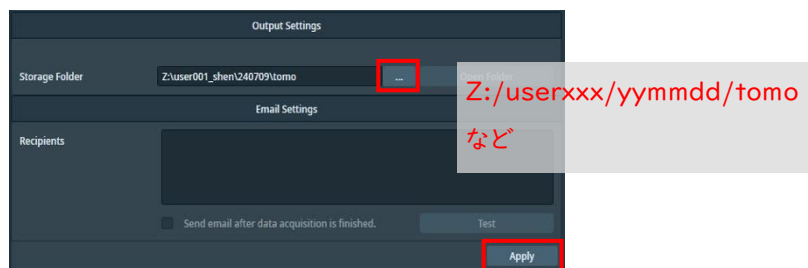
- 新しい Cryo-electron tomography で名前をグリッドのスロットをつけて、OK をクリック、作成する。



- 新しい Imaging- Tomo Run を作成する(名前はそのまま)。



- Output settings のところで、保存先ディレクトリを選択

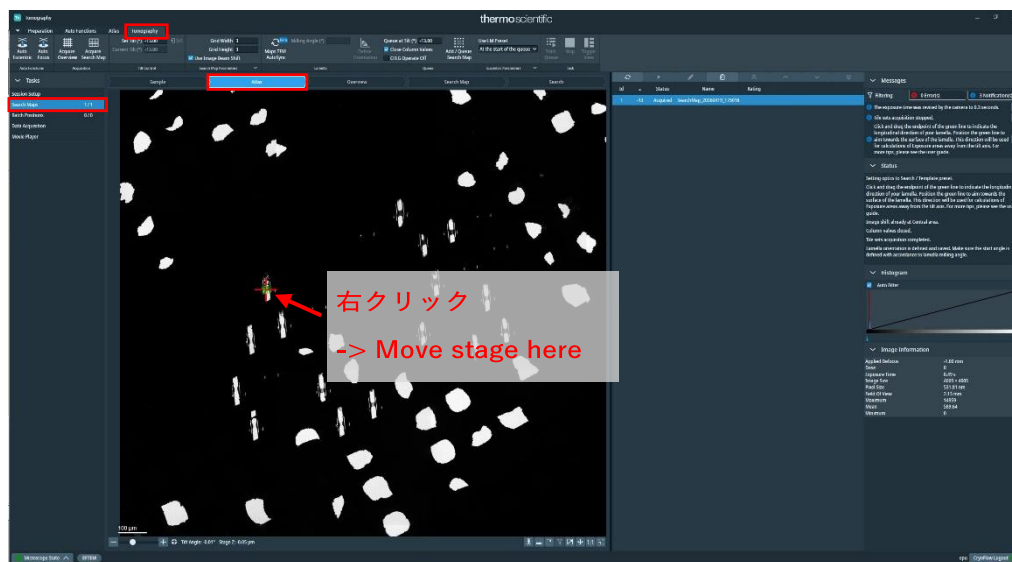


- **Apply**を押す

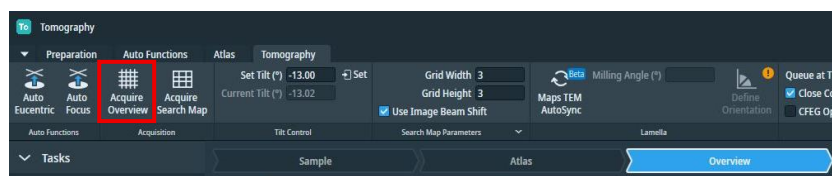
2. サーチマップの取得

*観察したいグリッドが load してなければ、Atlas tab より **Load Sample**

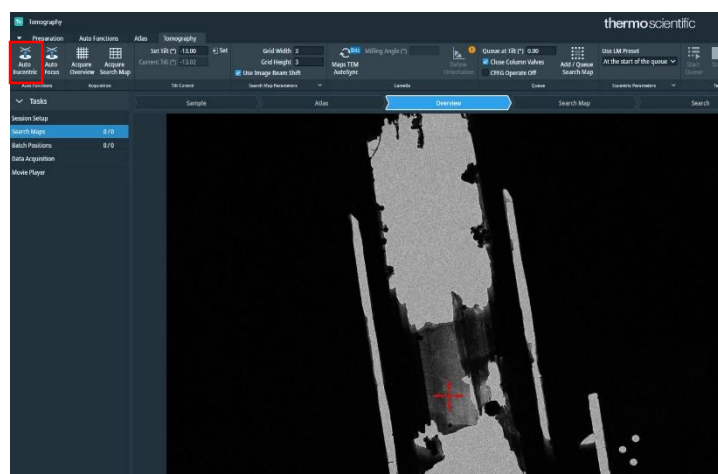
- Tomo > Tomography tab > Search Maps > Atlas で観察したいスクエアを右クリック **Move stage here**



- Tomo > Tomography tab で **Acquire Overview**



- Stage は Lamella にあることを確認して(赤いクロス的位置)、Tomo > Tomography tab で **Auto Eucentric**

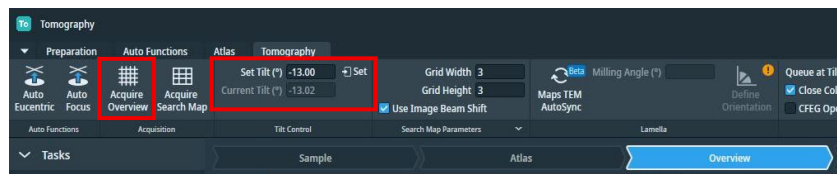


*Auto Eucentric がコケた場合、Auto Functions tab から **Auto-Eucentric by stage tilt** または **Auto-Eucentric by beam tilt** を選んで **Start** どちらかで上手くいけばよい。

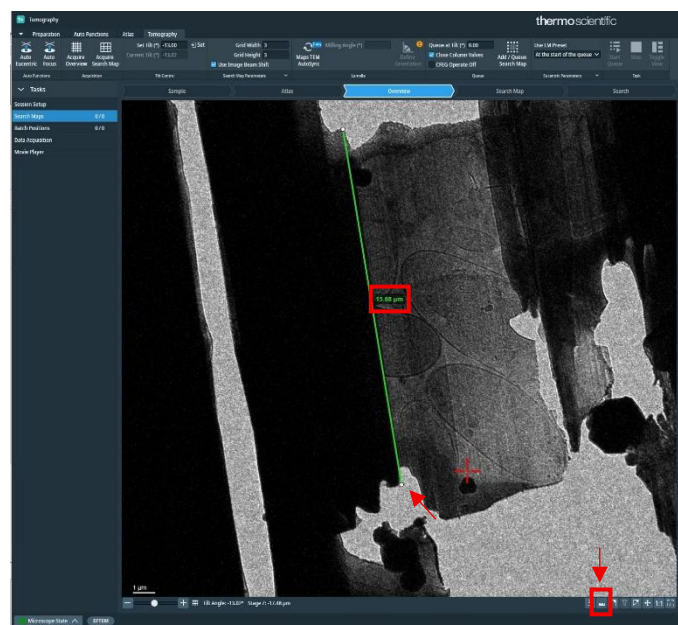
- 再び Tomo > Tomography tab で **Acquire Overview**

傾斜角度の確認 (プラスかマイナスにして、**Lamella** の角度は水平になる)

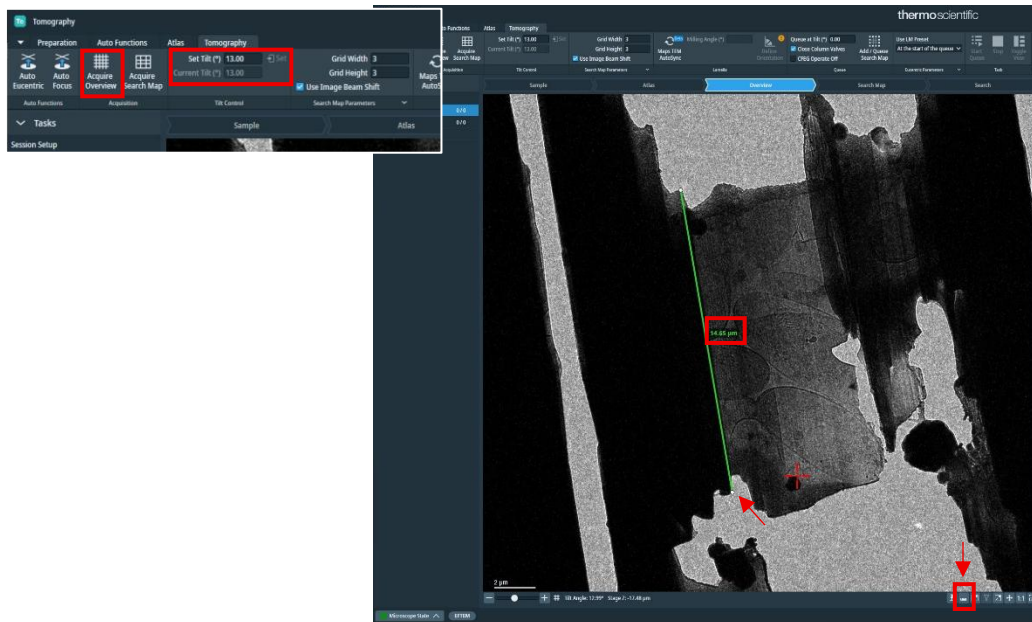
- Tomo > Tomography tab で set tilt にまずマイナスの角度を入れて、Set する (角度は Arctis を用い milling の角度、WebUI で確認できる)
- Tomo > Tomography tab で **Acquire Overview**



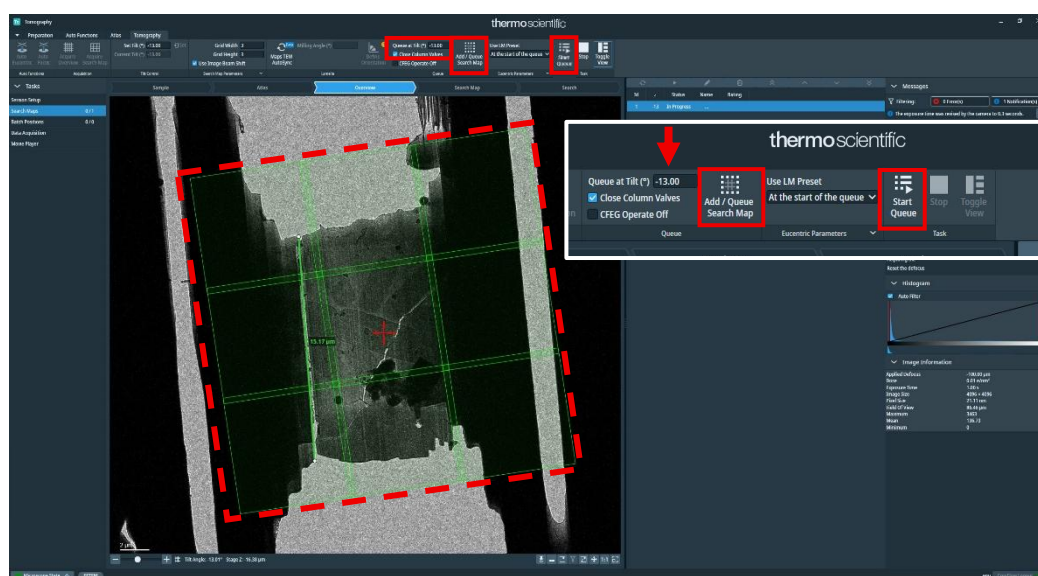
- 右下に定規をクリックして、Lamella の長さを測り、記録する(分かりやすい目立つところを使うと長いところが推奨)。



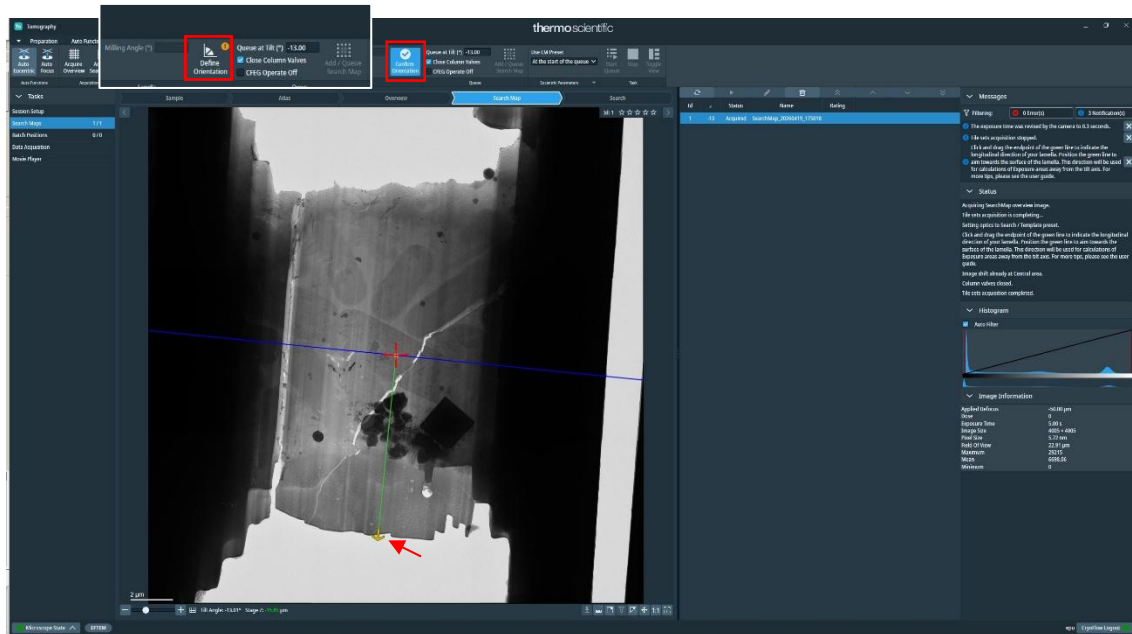
- Tomo > Tomography tab で set tilt にまずプラスの角度を入れて、Set する
- Tomo > Tomography tab で **Acquire Overview**



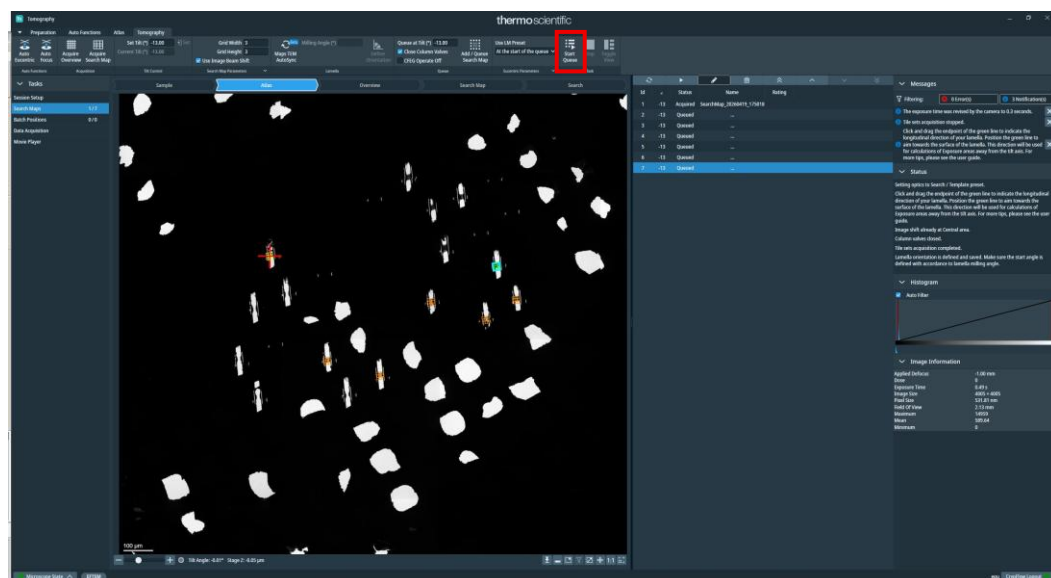
- 右下に定規をクリックして、Lamella の長さを測り、マイナスの長さと比較する。長い方が Lamella の角度が水平に近い。
- Tomo > Tomography tab で Queue at Tilt のところに角度を入れる(プラスかマイナスを入れる)
- Tomo > Tomography tab で **Add/ Queue Search Map** 撮る範囲は Lamella より大きく設定する。Start Queue をクリックする。



- Tomo > Tomography tab > Search Map で **Define Orientation** をクリックして、黄色矢印を FIB 線が発射先に示す(GIS のところ)、緑色の線は FIB 線の経路に平行する。
- 終わったら、**Confirm Orientation** をクリックする。



- Tomo > Tomography tab > Atlas で **Add/ Queue Search Map**、取得したい Lamella を指定して、Start Queue をクリックする。

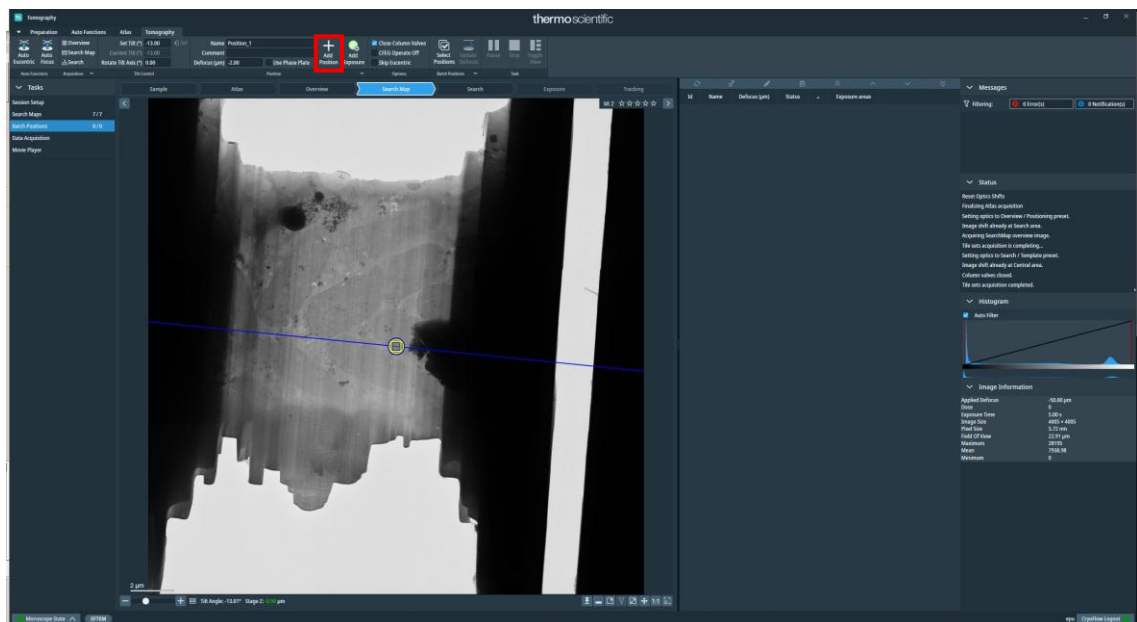


3. データの取得

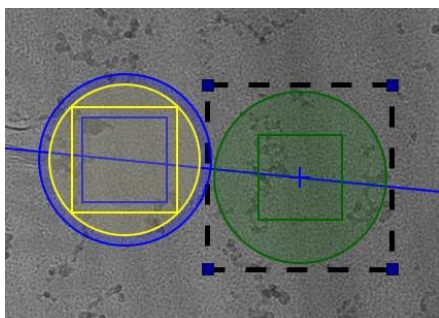
- Tomo > Tomography tab > Search Maps > Search Map でデータ収集したい Search Map を選ぶ



- Tomo > Tomography tab > Batch Positions > Search Map で **Add Position** あるいは右クリックして **Add Position**



- データ収集用の照射位置（緑）と focus 位置（黄）とトラッキング位置（青）が出てくるので調整する



青線はステージ tilt の中心軸

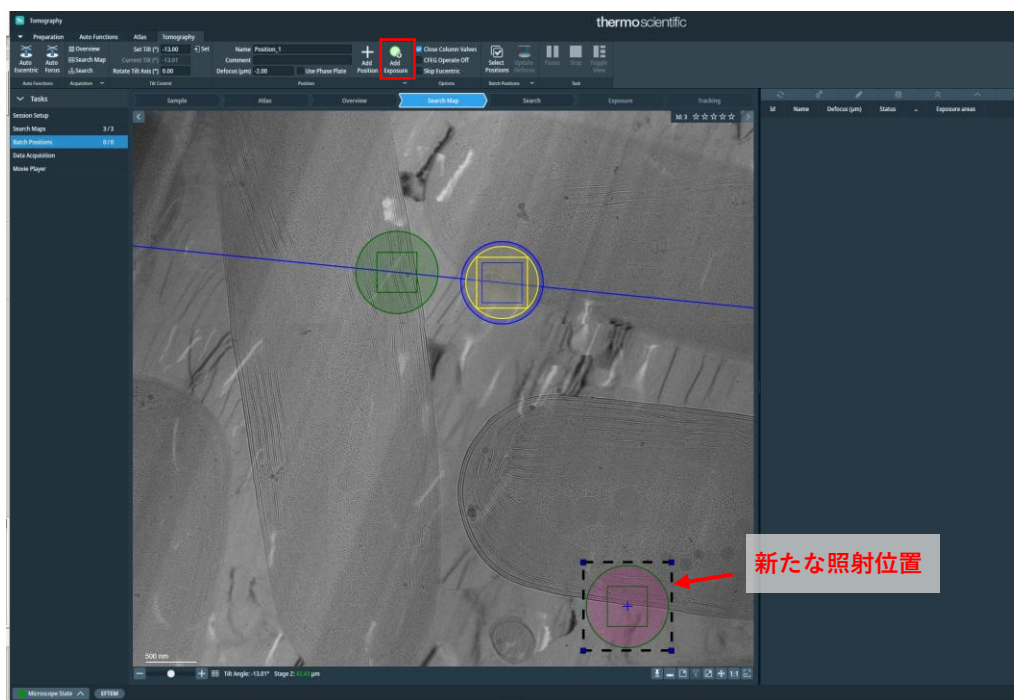
*照射位置（緑）は、もししっかりと視野に収まるようにする

*Focus 位置（黄）tracking 位置（青）は、tilt 軸上にしか配置できない

- **Add Exposure**



で照射位置を増やせる

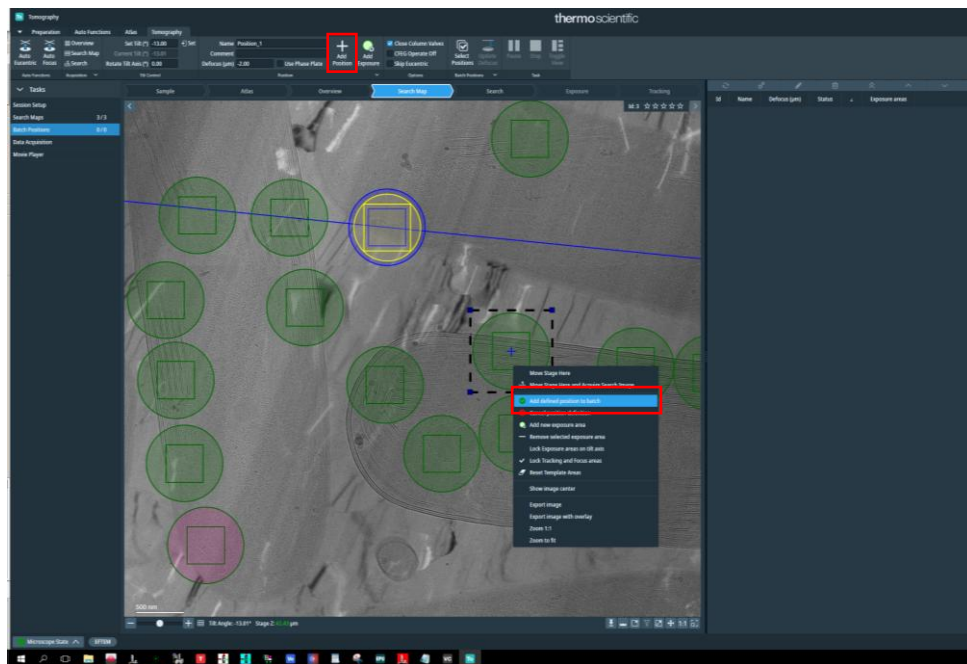


*追加の照射位置については、AFIS でデータ収集が行われる

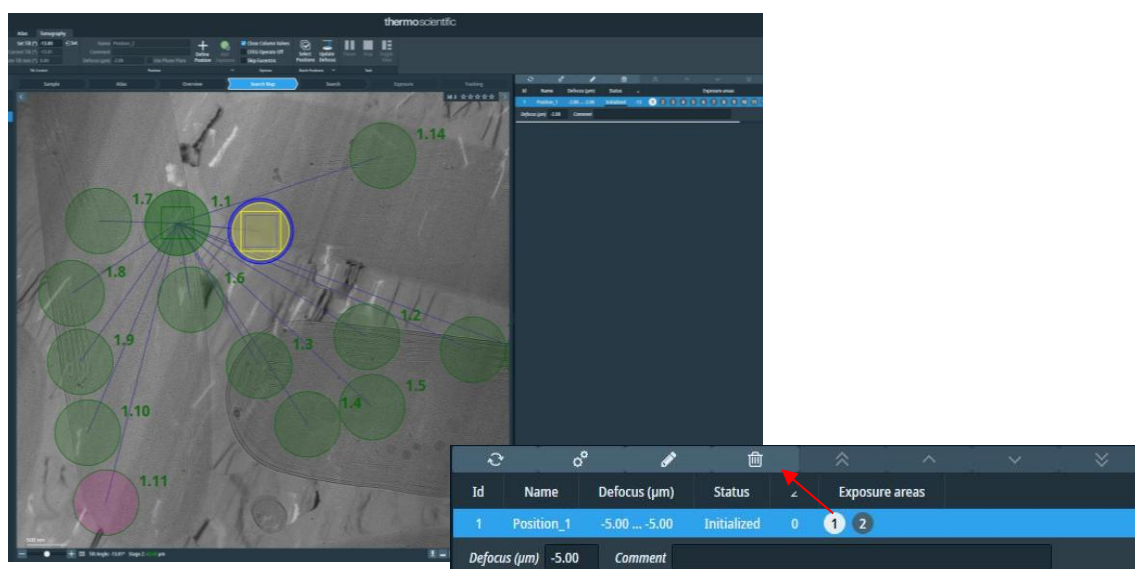
*最初の照射位置（緑 = tilt 軸上）からあまり離れた位置を選ばない方が無難
離れすぎると（magenta）になる

*最初の照射位置から直線で $25\mu\text{m}$ 以上離れた位置に追加の照射位置を置くと、データ収集時にエラーとなって止まる

- 照射位置、focus 位置の配置ができたら **Add Position** か右クリックで **Add defined position to batch** で queue にはいる

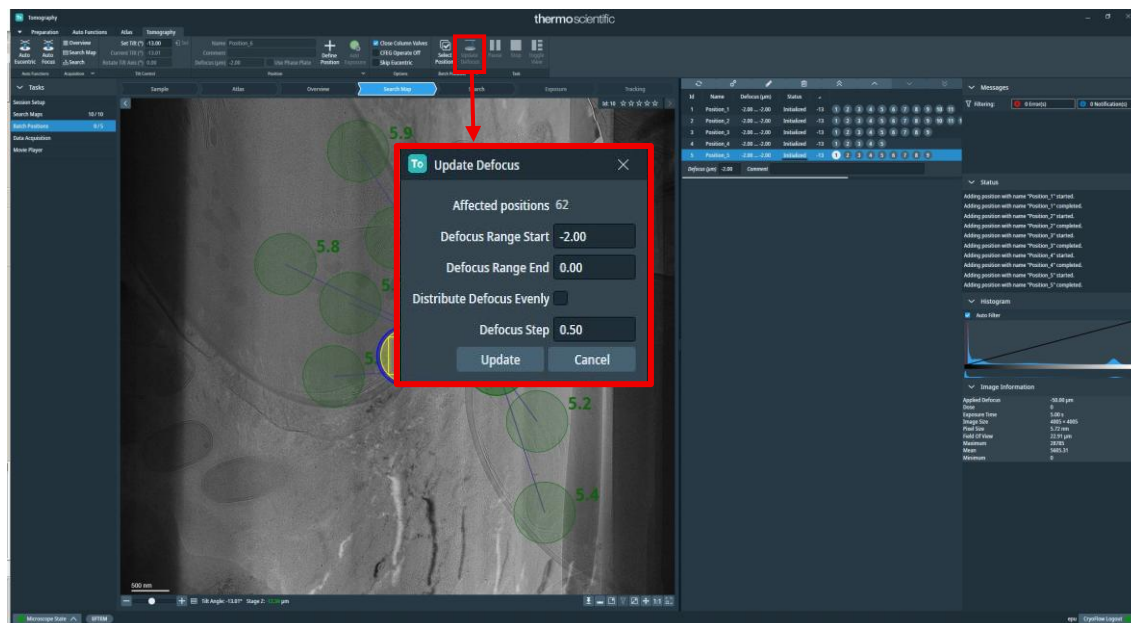


*照射位置の順序が表示され、queue に反映される



*Queue を削除したいときは、選択してゴミ箱アイコン

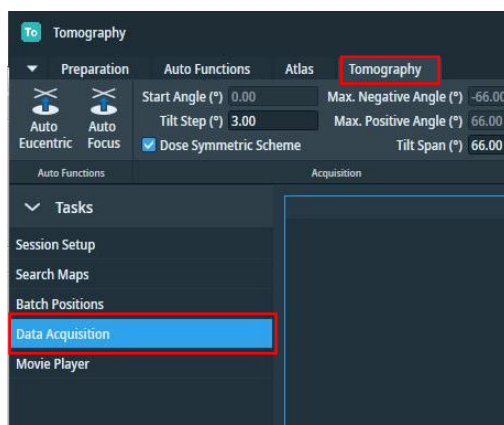
- **Update Defocus** で Defocus 値を一気に設定できる。(例: Start: -2, End: -4, Step: 0.5→-2.0, -2.5, -3.0, -3.5, -4.0 を繰り返す)

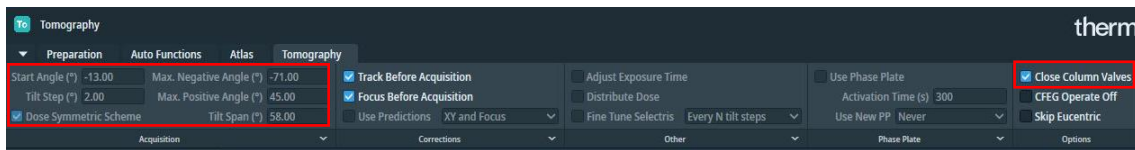


- サーチマップの取得、照射位置の決定と queue への追加を繰り返し、撮影したい箇所を網羅する

*ひとつのトラッキング位置を撮るのは約 30 分を要する

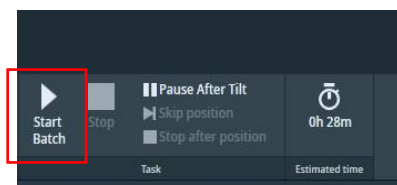
- Tomo > Tomography tab > Data Acquisition でデータ収集パラメータの設定



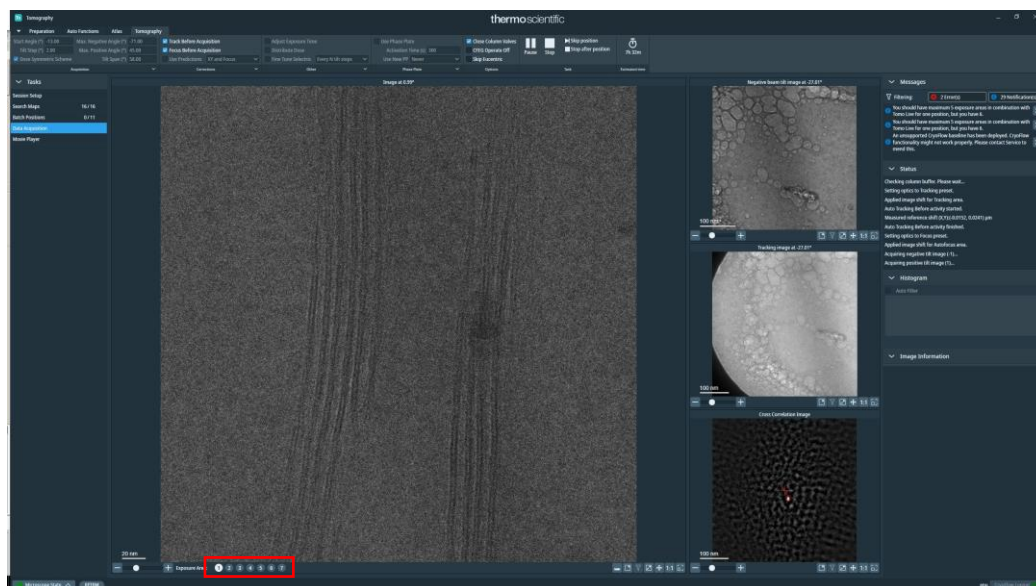


- Tilt step (°) : 何度おきに撮影するか
- Tilt Span (°) : ±何度までのデータを撮影するか
- Dose Symmetric Scheme : チェックを入れる
- Track Before Acquisition : チェックを入れる
- Focus Before Acquisition : チェックを入れる
- Use Predictions : チェックを**外す**
- Close Column Valves : チェックを入れる
- CFEG Operate Off : チェックを**外す**

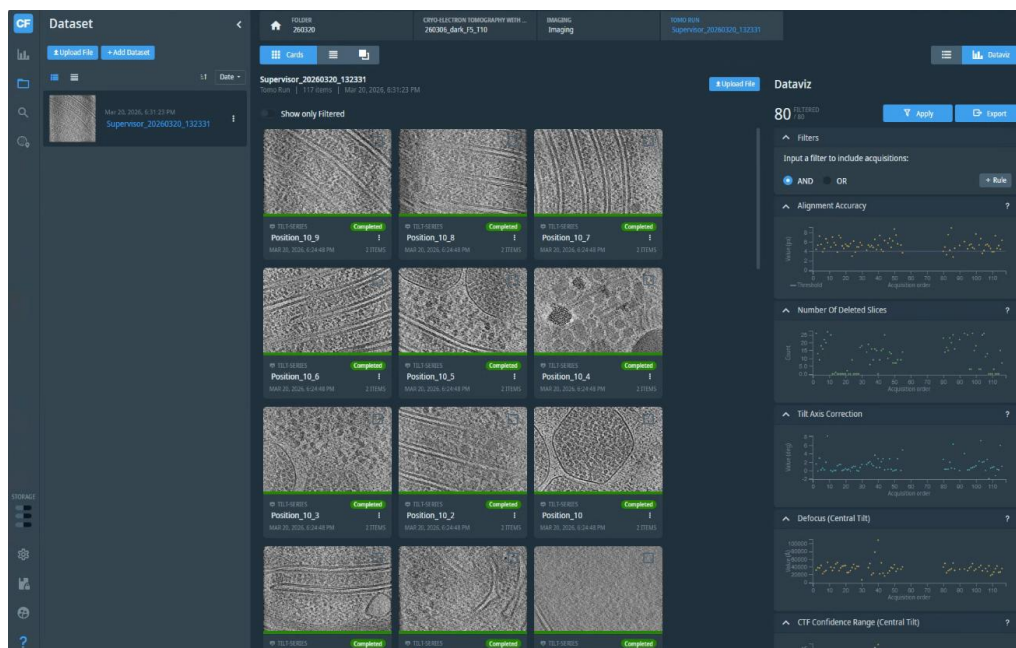
□ **Start Batch** でデータ収集開始



- 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



- CryoFlow 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