20241204（ver. 1.1）

岡山大学クライオ電子顕微鏡マニュアル

Titan Krios G4 and Falcon 4i

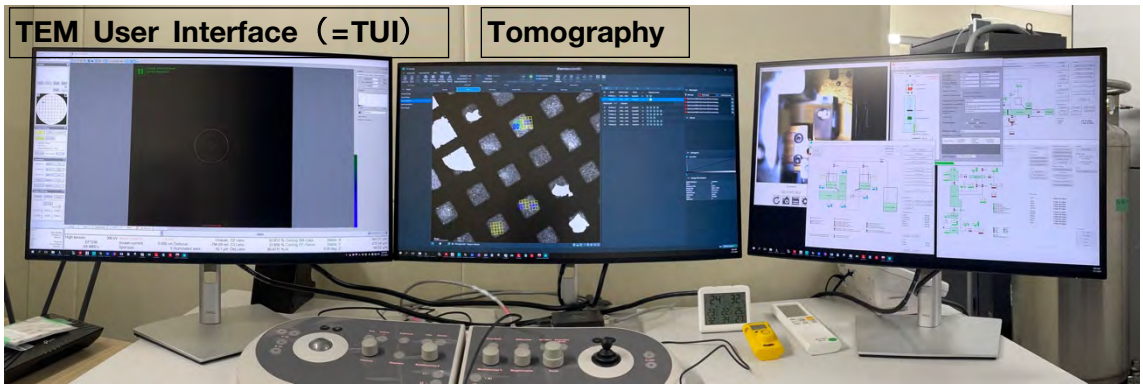
For tomography

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

岡山大学異分野基礎科学研究所国際構造生物学研究センター
沼本修孝

I. 試料交換から Atlas 取得まで

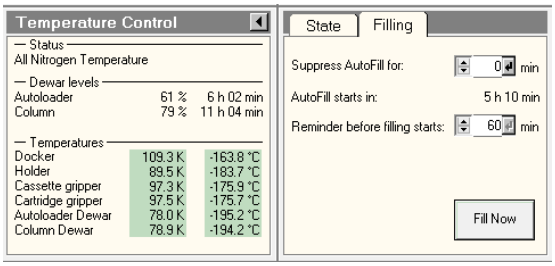
*TEM User Interface は version 3.16.1、Tomography は version 5.14.0.5704REL



1. Inventory

TEM User Interface（=TUI）を使います

・ TUI > Autoloader tab > Temperature Control



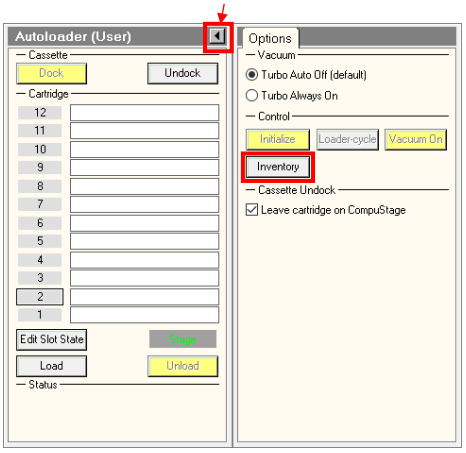
□ NanoCab の Dock が終了したら（NanoCab の取り出しを忘れずに！）、温度表示が全て緑になるまで待ち、さらに、全てが-160°C以下になるまで待つ（数分）

・ TUI > Autoloader tab > Autoloader > Option

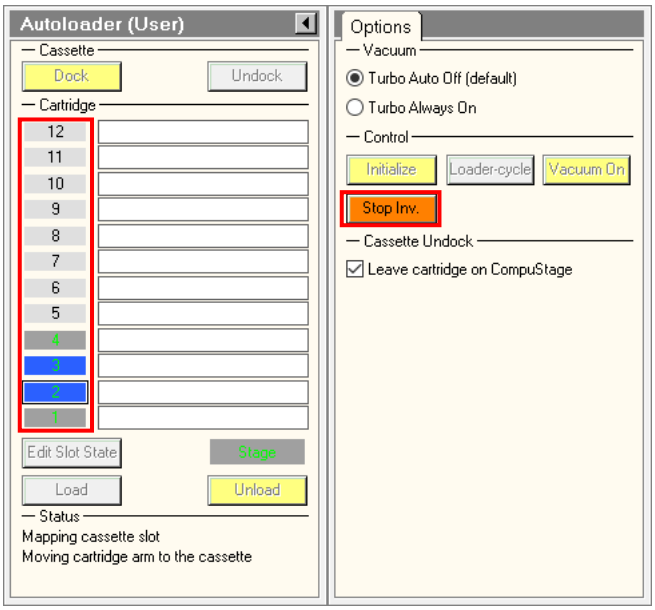
□ Inventory ボタンを押す

（Dock 後、active になるまでしばらくかかる）

Optionウインドウが開いていない場合はここをクリック



□　入れたグリッドが全て正しく認識されたら OK



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）

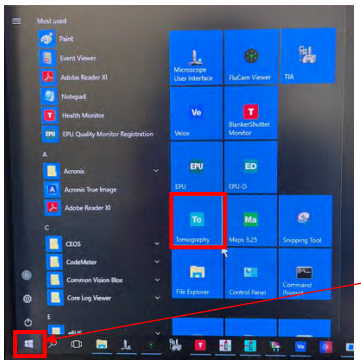
□　入れたグリッドの数 +2 までチェックが終わったら Stop Inventory ボタンを押して停止

□　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。

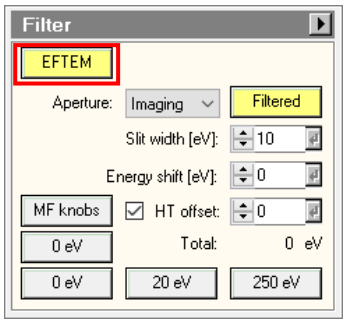
2. およそのアライメント（毎日でなくてもよい？）

□ Tomography（以下 Tomo）の起動



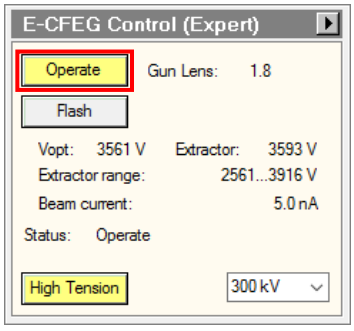
□ TUI > EFTEM tab > Filter を見る

□ 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）



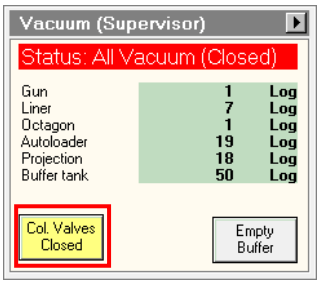
□ TUI > Setup > E-CFEG

□ 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）

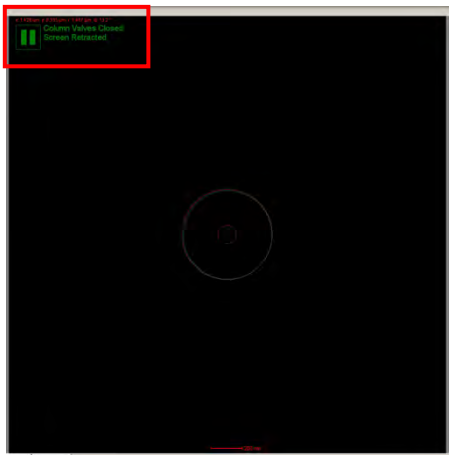


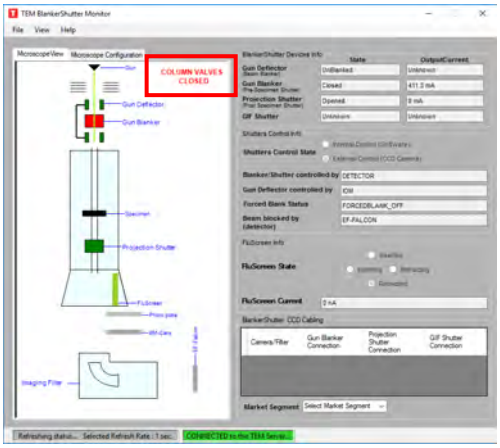
□ TUI > Setup tab > Vacuum

□ 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

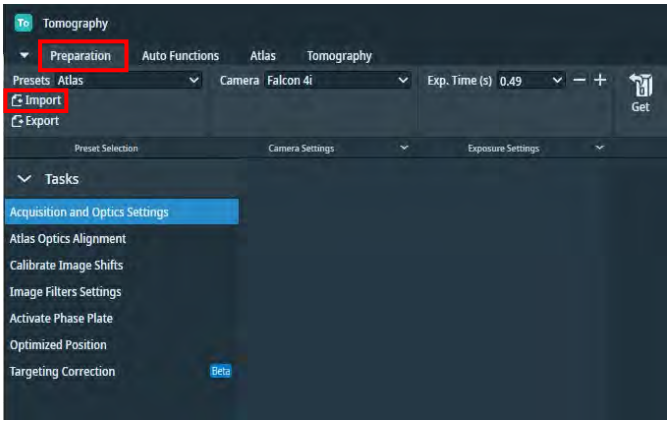


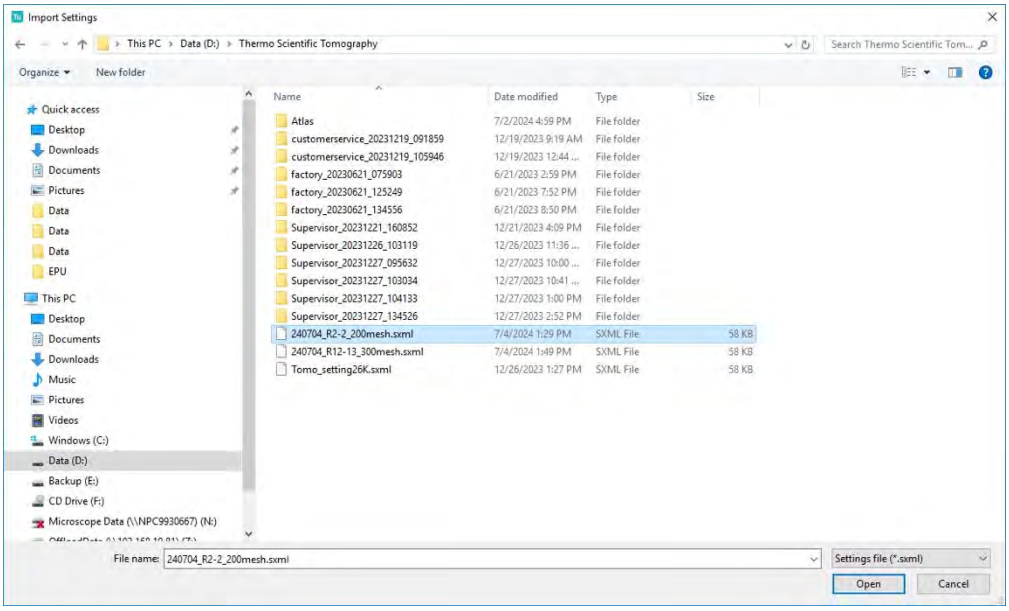


□ Tomo> Preparation tab の Import を押して、以下の.sxml file を open

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

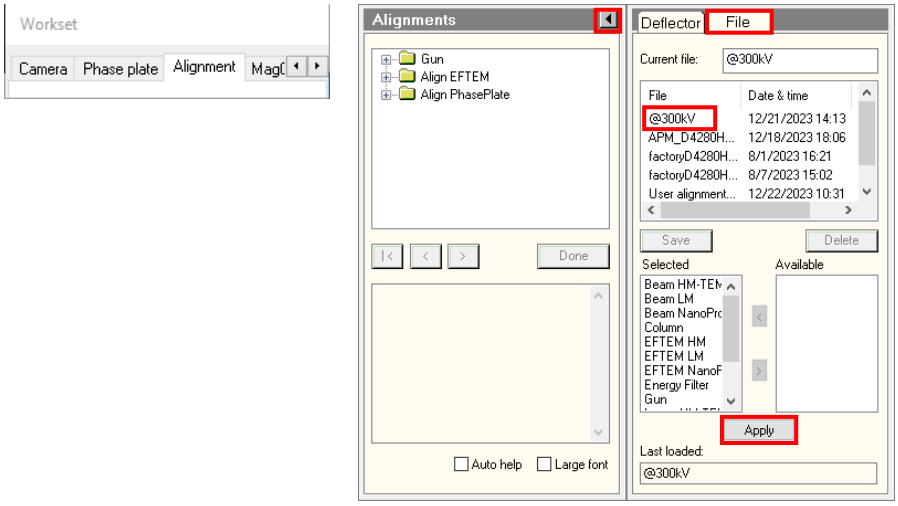
*Hole や mesh のサイズごとにファイルが作成してある（倍率の設定などが異なる）。
自分の使用するグリッドのもので日付の最新のものを選択する。
*なければ、別途作成する。





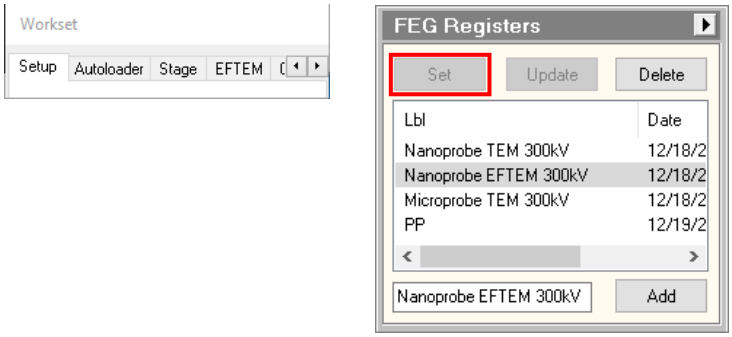
□ TUI > Alignment tab > Alignments > Option > File tab から 300kV（11/27/2024 に作成された最新のもの）を選び、

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

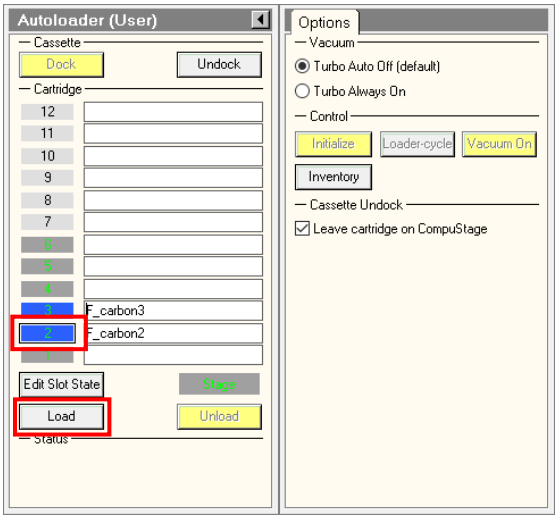
（ビームロストの時も有効。ただしこれを行ったら、調整をいちからやり直し）



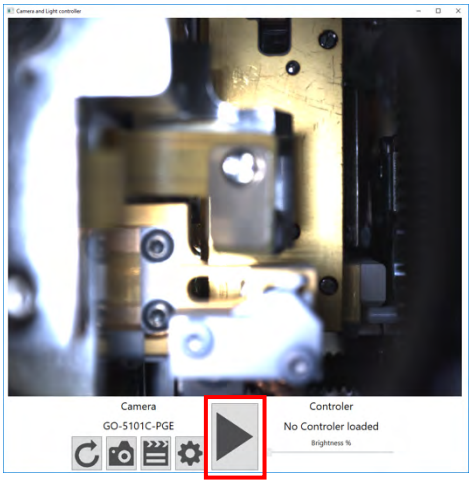
3. グリッドの load と preview、Atlas 取得

・ TUI > Autoloader tab > Autoloader

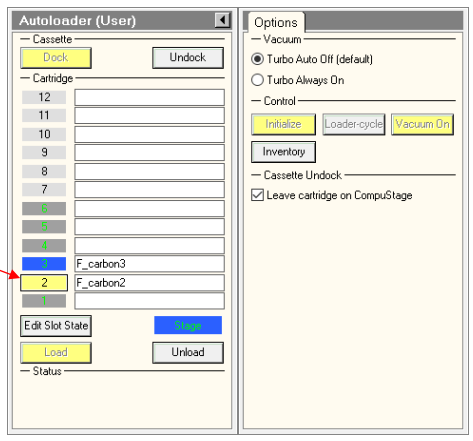
□ 見たいグリッドの数字をクリック（黒い線でハイライトされる）して Load ボタンを押す



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。



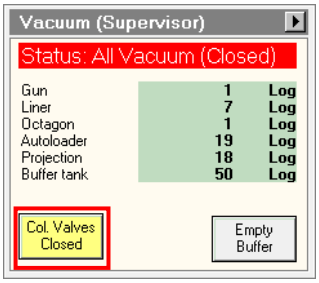
正しくloadされたグリッドは黄色の表示に変わる



＜このページは丸ごと省略可＞

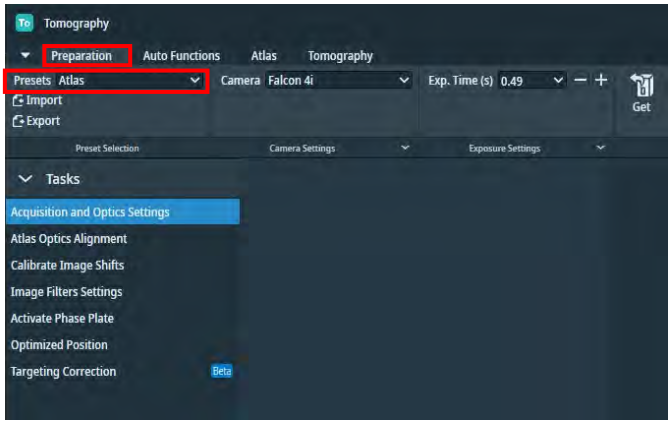
- TUI > Setup tab > Vacuum

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



- 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

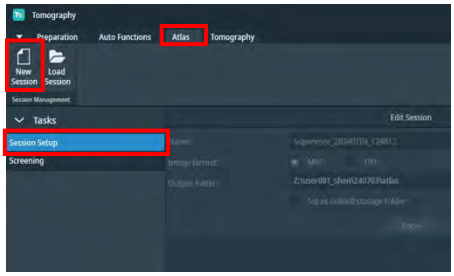
  *この段階で完全に真っ暗な場合は、カラムバルブが開いていること、E-CFEG が Operate になっていることをもう一度確認。

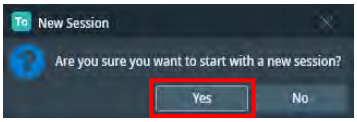
  *氷が厚すぎる場合はほぼ真っ暗ですが、うっすら Grid square が見えるはず

・ Tomo > Atlas tab

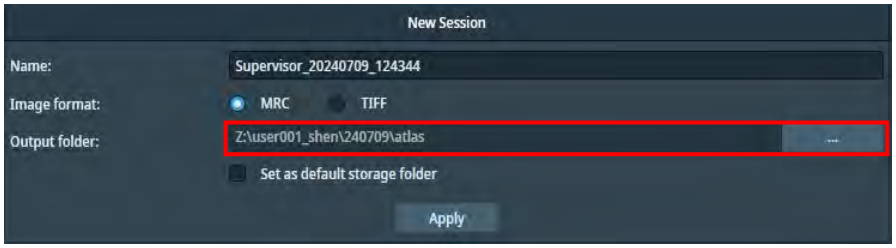
□ Session Setup　New Session　Yes

□

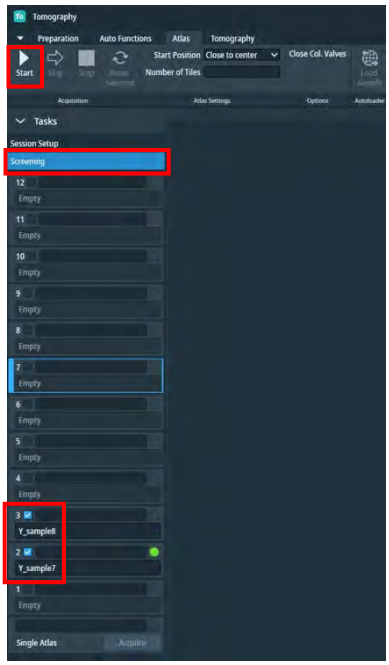




□ Output folder を指定（保存先：Z:/userxxx/yymmdd/atlas/）して Apply

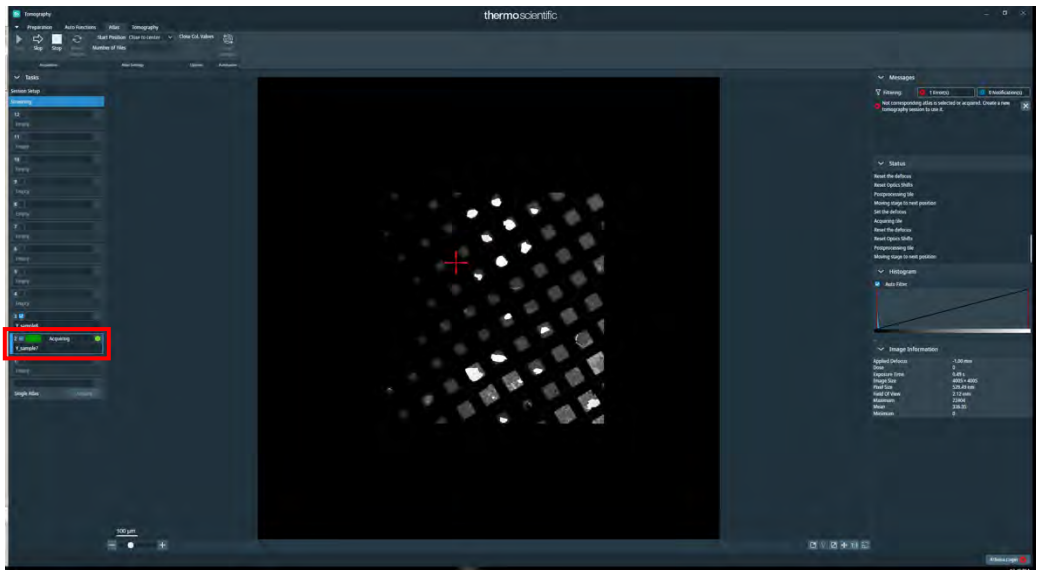


□ Screening を押して、撮りたい Grid の番号にチェックを入れて、Start ボタンを押すと Atlas 撮影開始



□ Acquiring をクリックすると画像が表示される

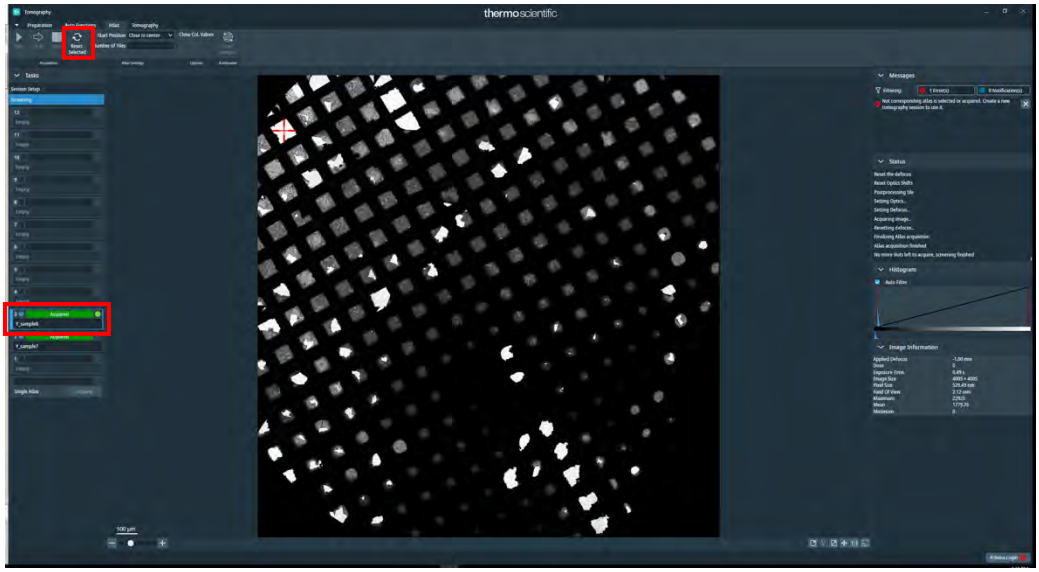
（* 4 x 4 で全体像を撮影するのでしばらく待つ。グリッドの入れ替えの時間も含めて、1 枚あたり、10 分弱？）



*何らかの理由で、特定のグリッドだけ Atlas を撮り直したいとき

Atlas tab でそのグリッドを選択して、左上 Reset Selected のボタンを押す

データが消えるので、そのグリッドにチェックを入れて Start

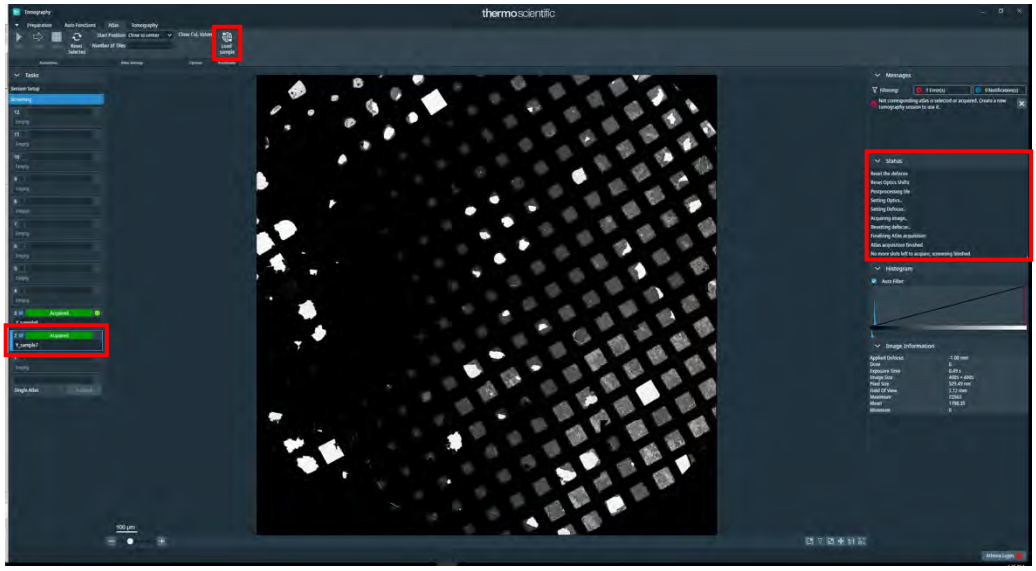


II. ビームの調整（毎日）

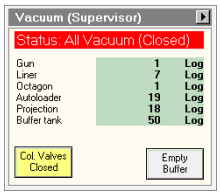
1. グリッドの穴の空いたところに移動

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

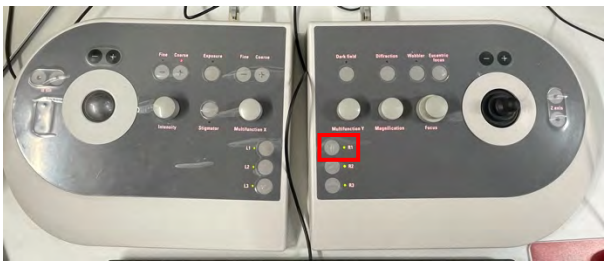
Tomo > Status で「Cartridge at slot x is now on the stage」と表示されたことを確認する



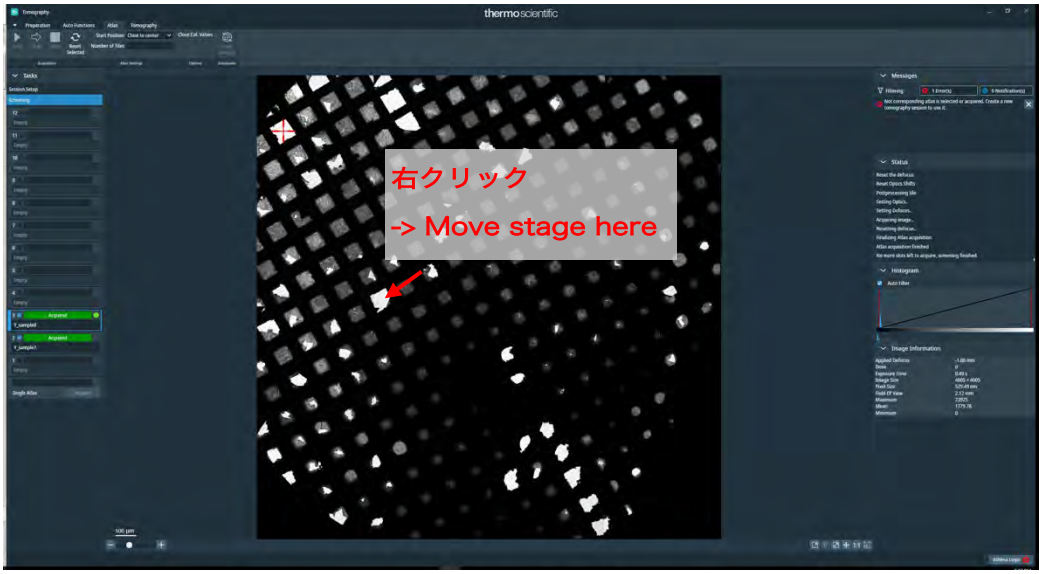
□ Column valve が閉じていたら Col. Valves Closed ボタンを押して Column valve を開ける



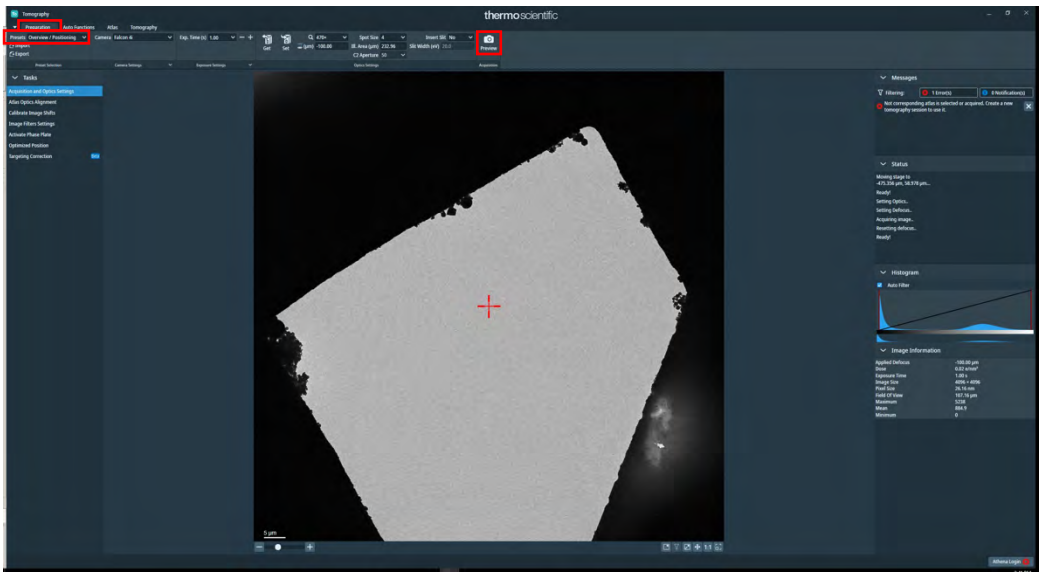
□ 蛍光板が上がった状態（=Screen Retracted）でなければ操作板の R1 を押して Retract



□ 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

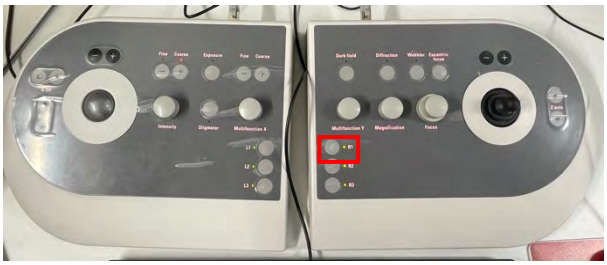


□ きちんと穴のあいたところにいることを確認する

*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



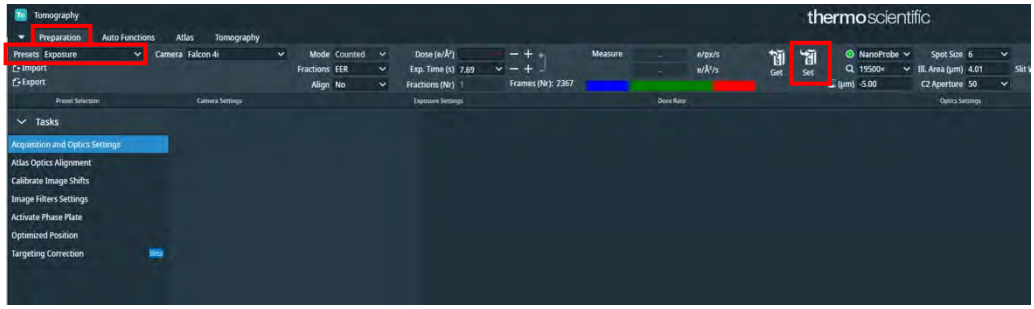
□ Flucam Viewer が EF (=EF mode の中心を緑の円で表示)、

Natural High Resolution となっていることを確認

2. ピボットポイントの調整

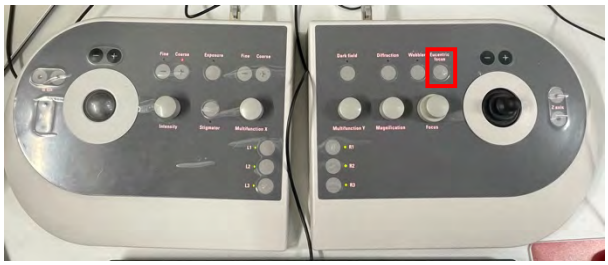
□ グリッドの穴にいて、蛍光板が下りていることを確認

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



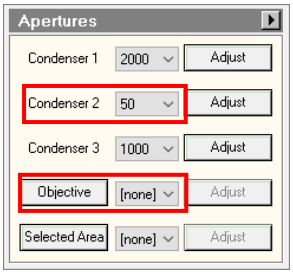
*Exposure = EPU での Data Acquisition に相当

□ 操作板の **Eucentric Focus** を押す

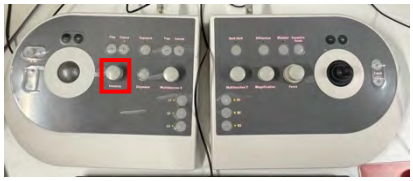
□ 

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

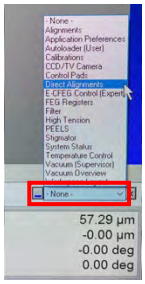
（*C1=2000, C3=1000 は今後一切触らなくて OK）

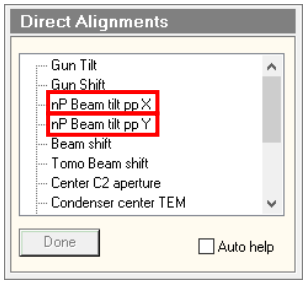


□ Intensity ダイヤルを回して、Flucam Viewer の画面中心の大きい方の円くらいの大きさにする

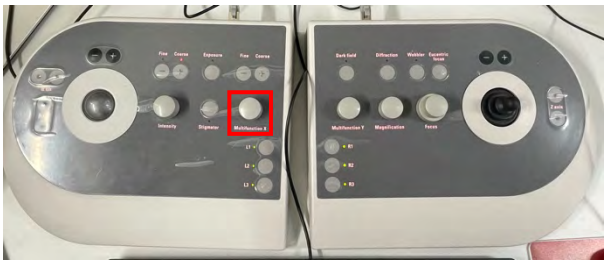


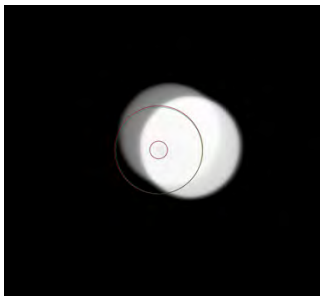
□ TUI 右下 > Direct Alignment から nP Beamtilt pp X を選ぶ





□ 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

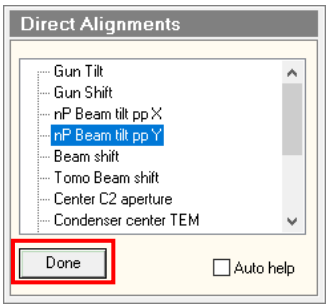




□ TUI 右下 > Direct Alignment から nP Beamtilt pp Y を選ぶ

□ 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

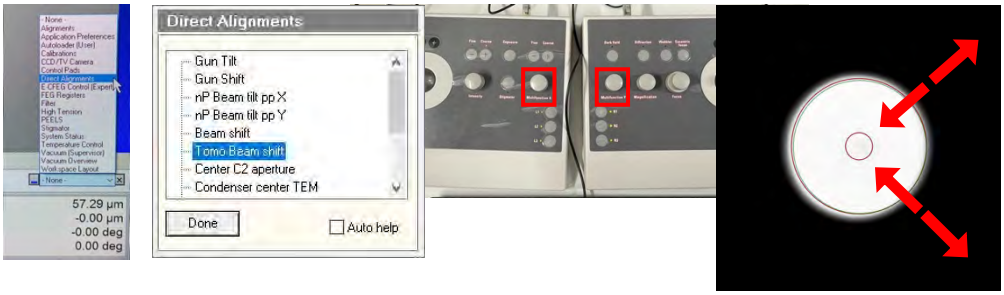


3. C2 絞りの中心合わせ

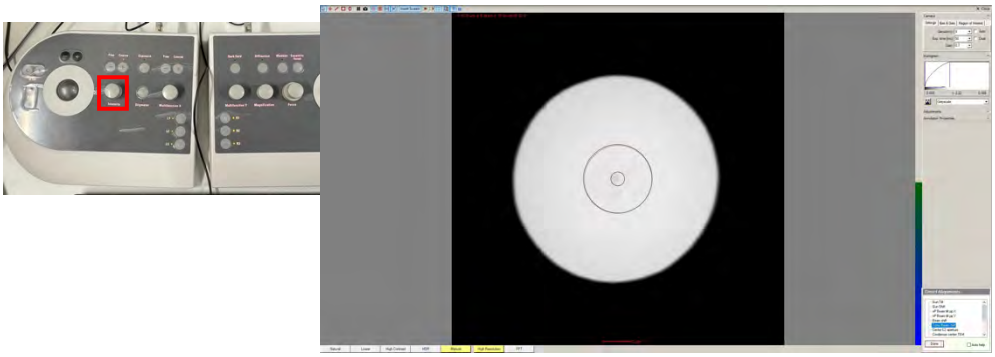
□ グリッドの穴にいて、蛍光板が下りていることを確認

□ TUI 右下 ＞ Direct Alignment から Tomo Beam shift を選ぶ

□ **Multifunction** ダイヤルで光を中央へ合わす

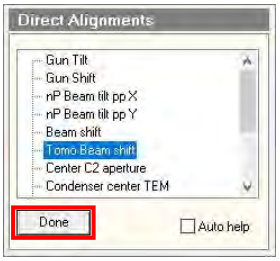


□ **Intensity** ダイヤルを右に回して、光を広げる。このとき、同心円状にひろがるかを確認。



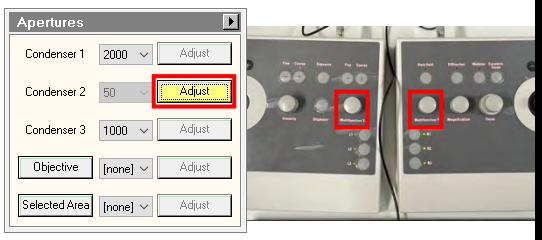
光のコントラストは、マウスのホイールで調整できる
倍率の問題で黒い画面に接するほど大きくはできない

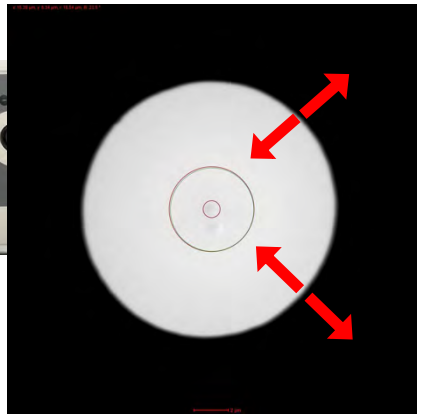
だいたい同心円状に広がれば問題無いので、Direct Alignment の Tomo Beam shift を Done する



そうでなければ、以下の調整を行う。

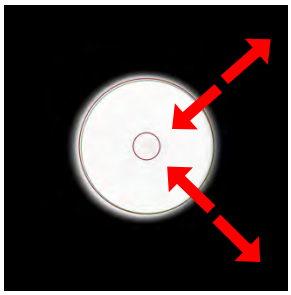
□ C2 の右横の Adjust を押して、**Multifunction** ダイヤルで、光の円が中心になるように絞りを移動する





□ C2 の右横の Adjust をもう一度押す

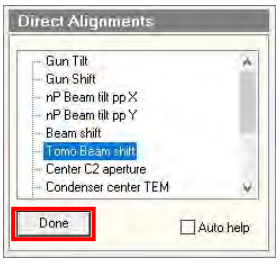
□ 再度光を中心の大きい方の円くらいに絞って、**Multifunction** ダイヤルで光を中央に移動



□ **Intensity** ダイヤルを右に回して、同心円状にひろがるかを確認。

□ 光の輪がほぼ同心円状に広がれば OK。　それまで以上の操作を繰り返す

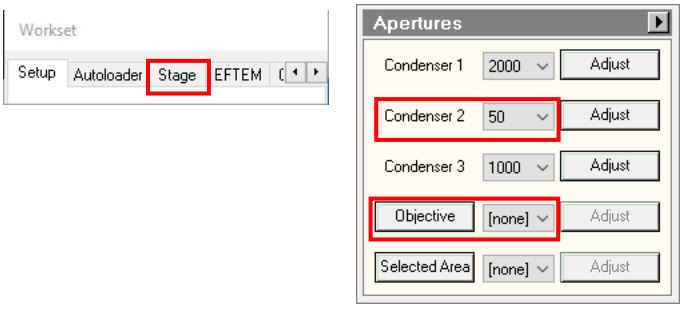
□ 問題無ければ、Direct Alignment の Tomo Beam shift を Done する



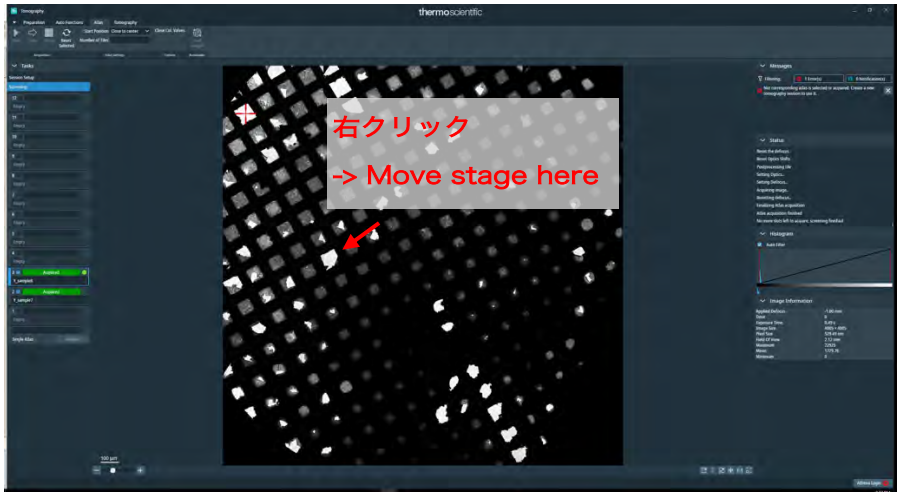
4. Energy filter の調整

□ R1 を押して蛍光板を上げる

□ TUI > Autoloader tab > Apertures を見て **C2=50, Obj=none** にする

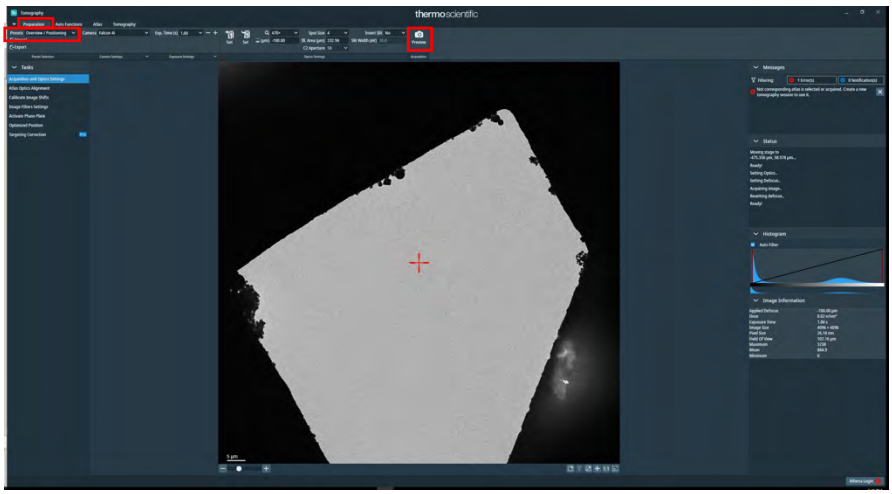


□ Tomo > Atlas tab で Grid に穴のあいたところに右クリック Move stage here

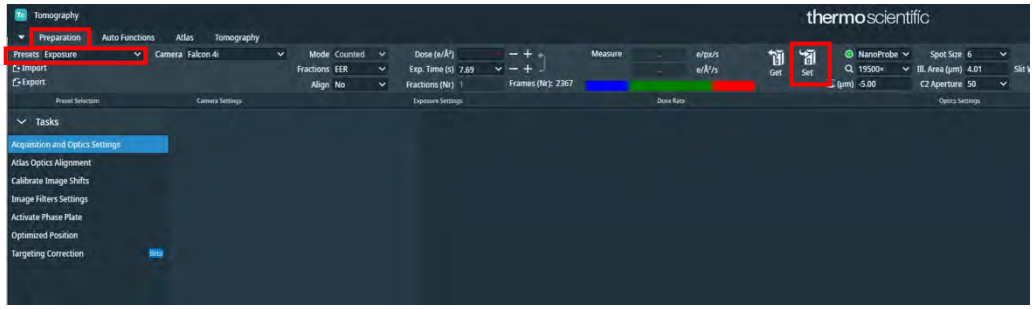


□ Tomo > Preparation tab > Presets から Overview / Positioning を選んで Preview

（穴にいるのを確認）

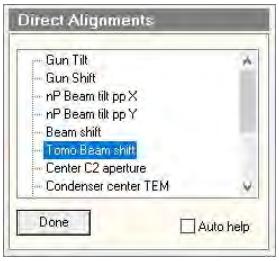


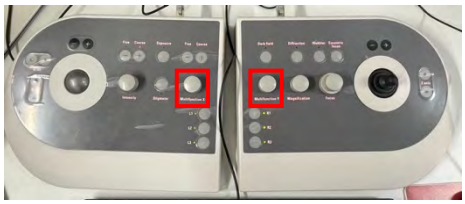
□ Tomo > Preparation tab > Presets から Exposure を選んで Set



□ R1 を押して蛍光板を下げる

□ ビームが中央になければ Direct Alignment > Tomo Beam Shift で中央にして Done

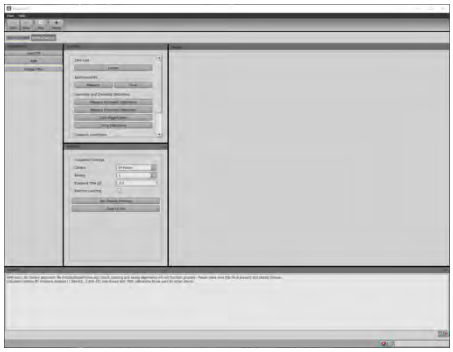




□ ビームが緑の円の全体に当たっていることを確認

□ R1 を押して蛍光板を上げる

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



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

□ Sherpa Window の左側にある Energy Filter のボタンを押す

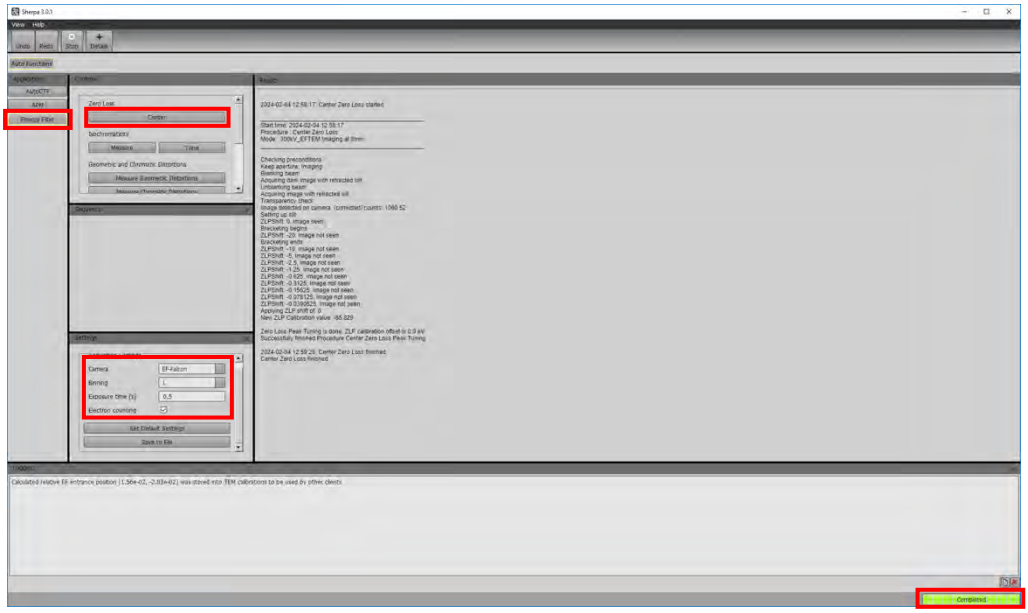
□ Sherpa Window の左下にある Settings の四角を見る

□ EF-Falcon, Bin=1, Exp time=0.5sec, Electron counting にチェックを入れる

□ Sherpa Window の左上にある Controls の四角を見る

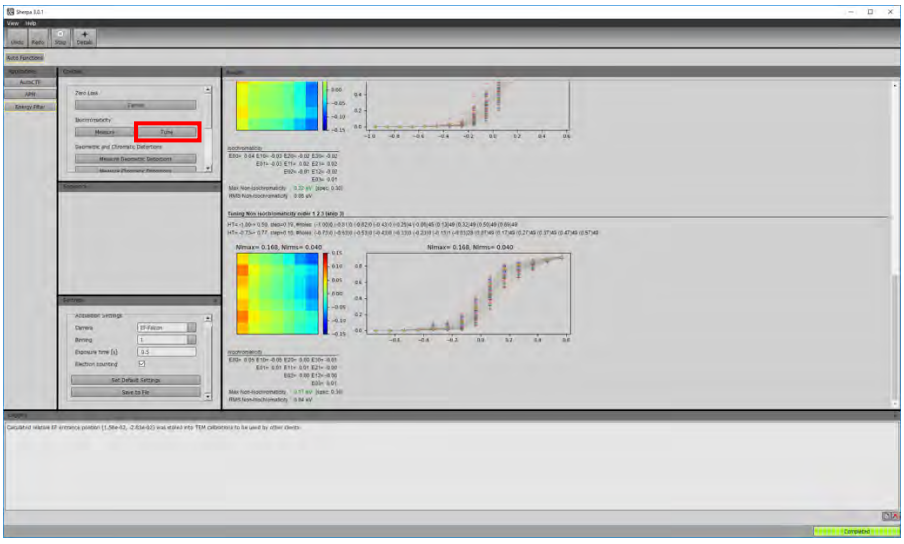
□ Zero loss: スリットの中央にビームを通すため Center ボタンを押す

□ 画面右下で completed と表示されるのを確認（以下同じ）

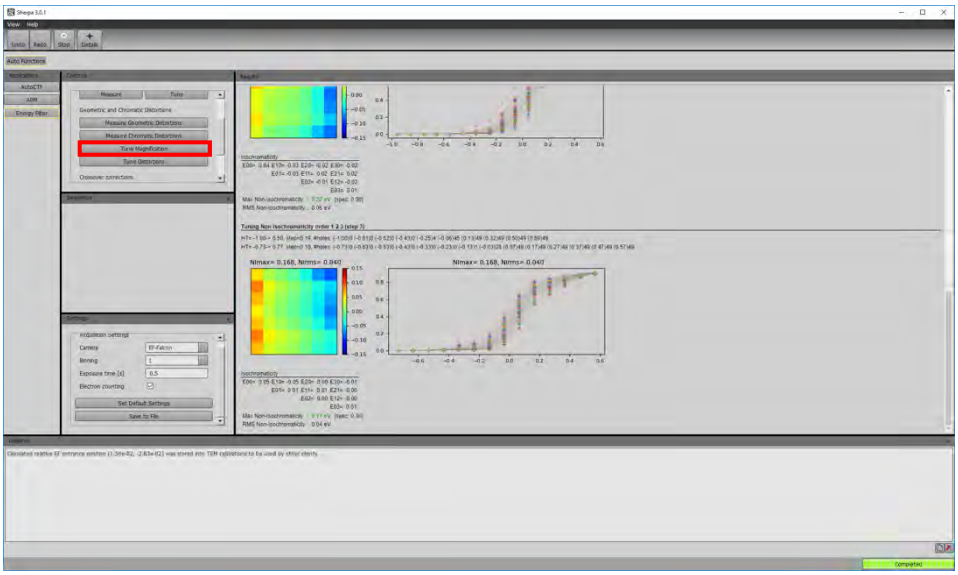


□ Isochromaticity: カメラにあたるエネルギーを均一にするため、Tune を押す

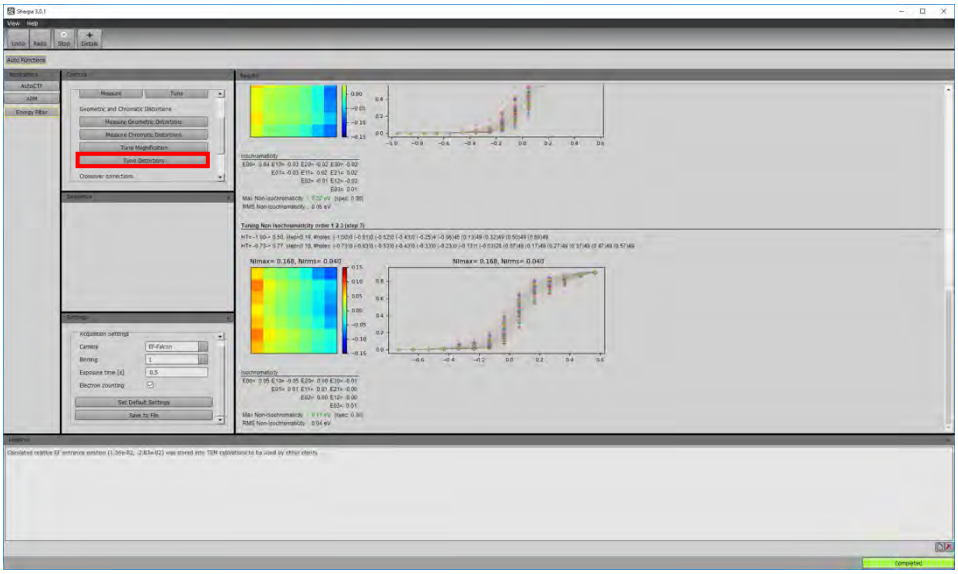
しばらくすると赤緑青の画像が出てくる。この画面の色が一様に緑になるまで数分待つ



□ 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

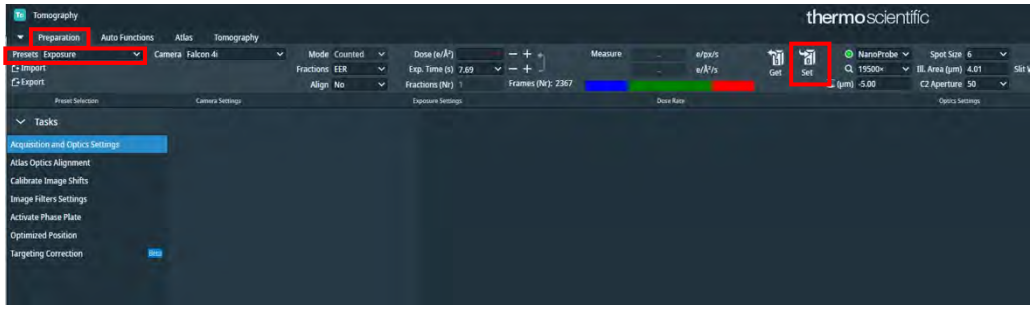


□ Zero loss: 曲がり角の調整をするため、再度 Center ボタンを押す

5. Dose の見積もり

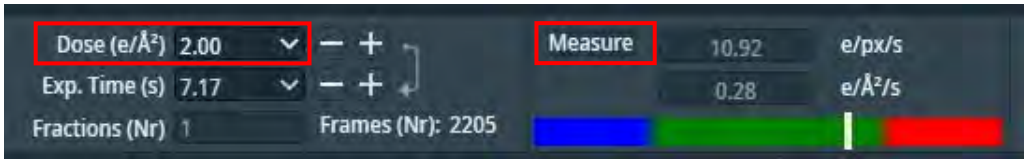
□ （穴のあいたスクエアにいることを確認）

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



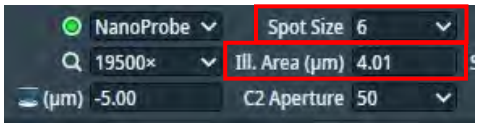
□ Dose (e/Å^2) の値を入力して Measure

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



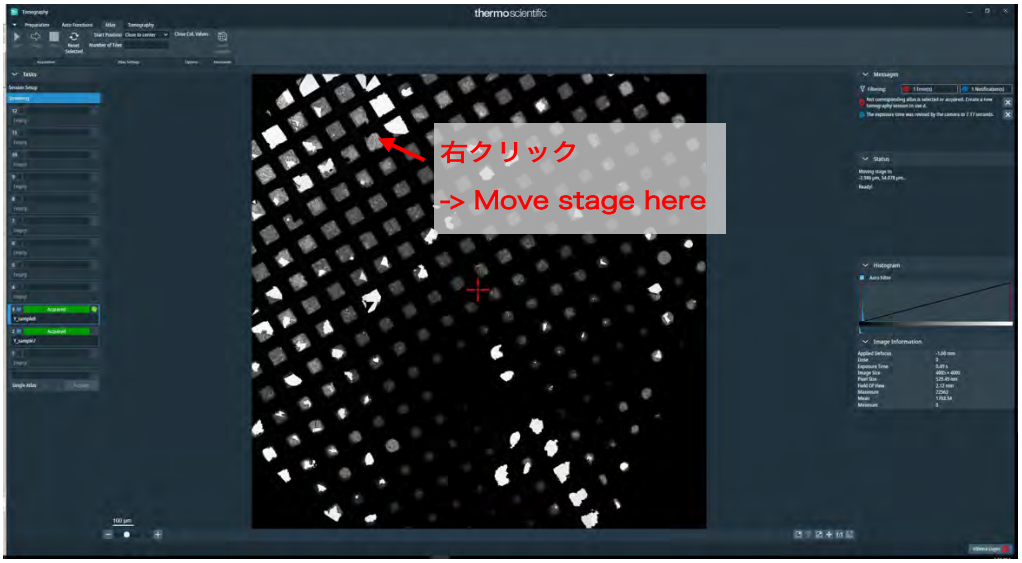
*バーの赤いところに行かない程度に、なるべく短い照射時間になるよう Spot Size, Ill.Area で調整。

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。



6. 倍率間の中心合わせ（Image Shift のキャリブレーション）

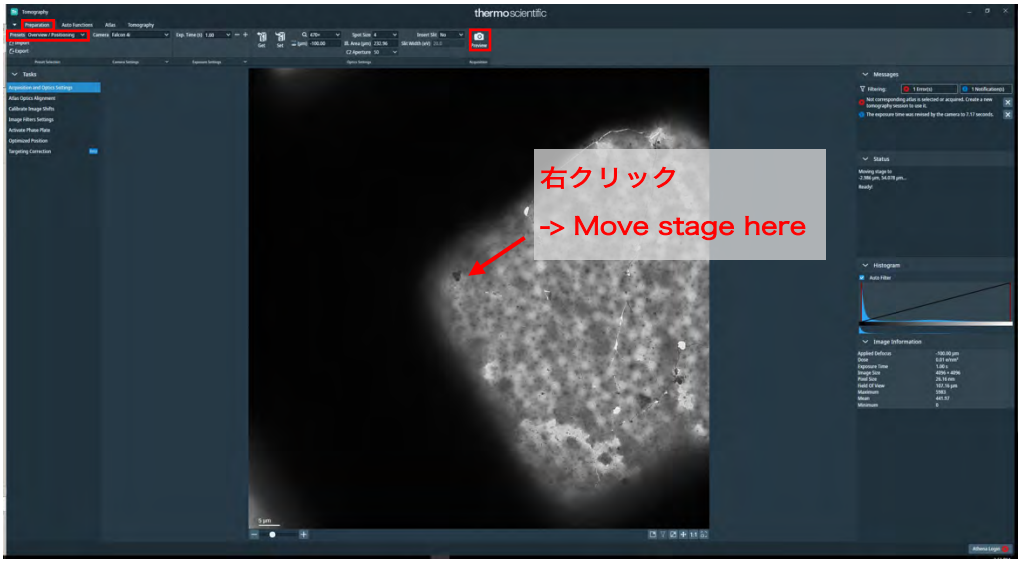
□ Tomo > Atlas tab を見て目立つゴミのあるところに Move stage here



*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

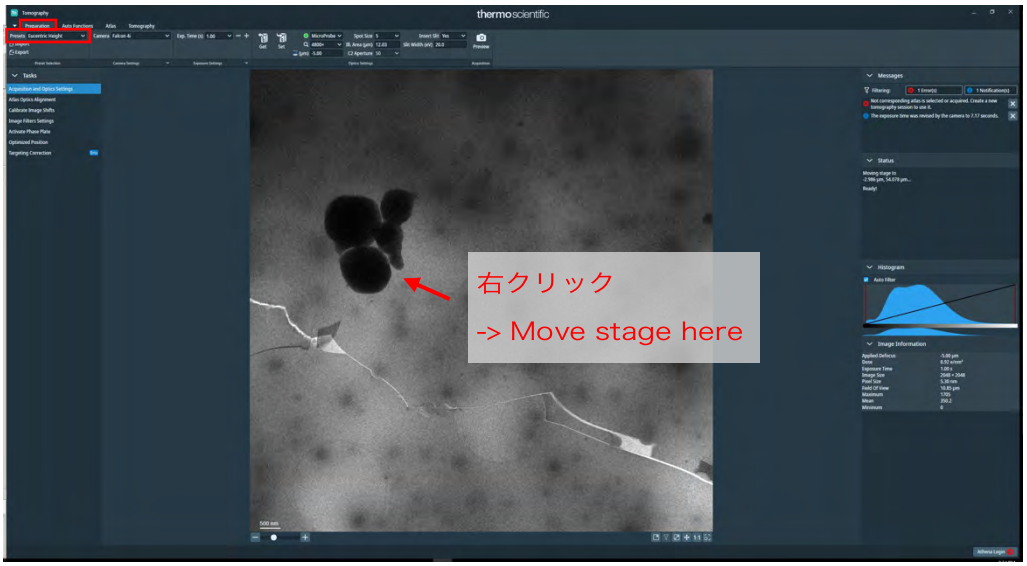
□ Tomo > Preparation tab > Presets から Overview / Positioning を選んで Preview

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



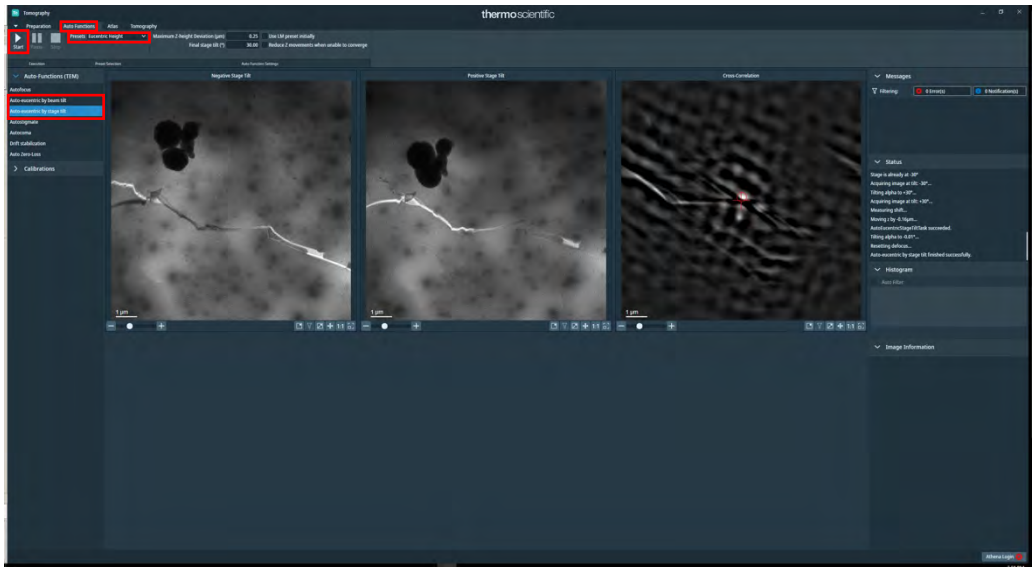
□ Tomo > Preparation tab > Presets の Eucentric Height を選んで Preview

□ 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

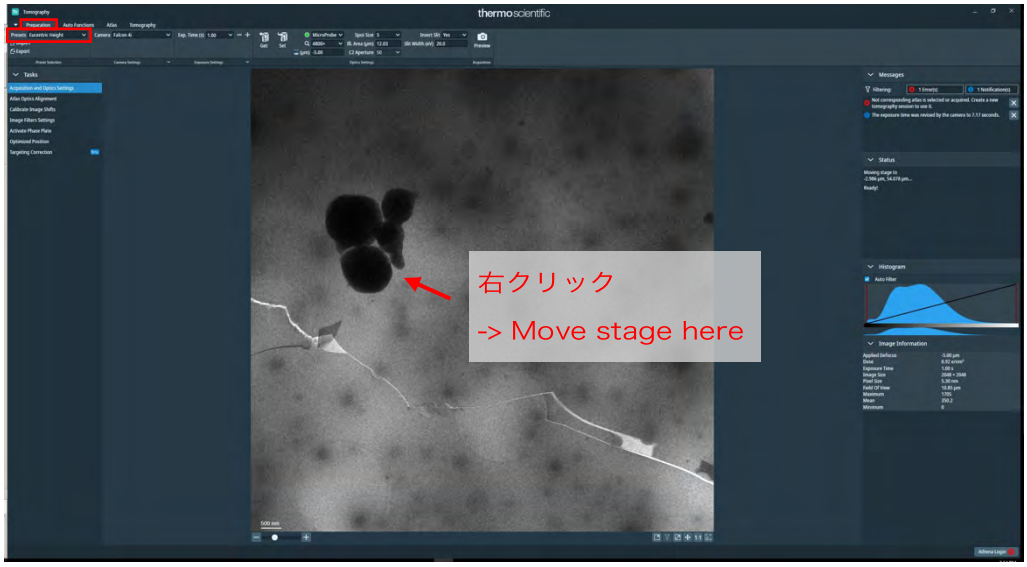


*Beam tilt か stage tilt のどちらかで成功すればよい。

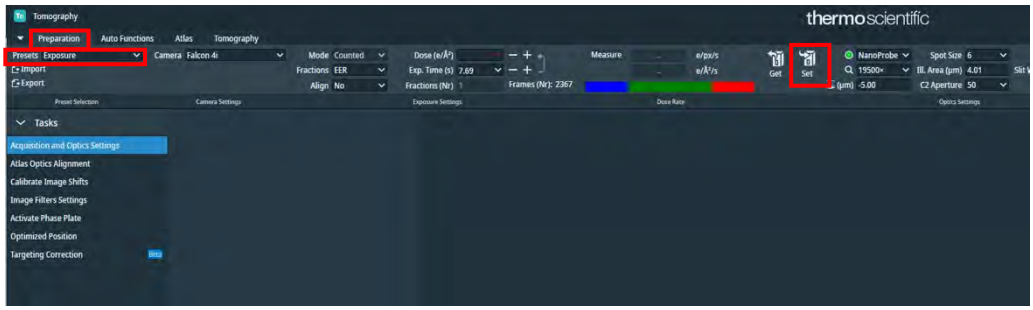
□ Tomo > Preparation tab > Presets から Eucentric Height を選び Preview

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

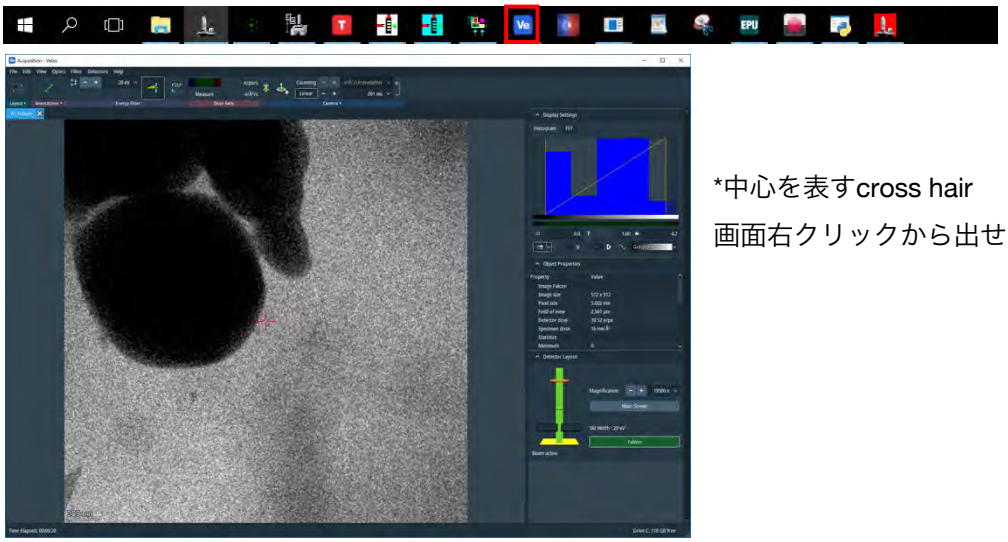
* Eucentric Height があった状態でもう一度中心を合わせる



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



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



*中心を表すcross hair
画面右クリックから出せる

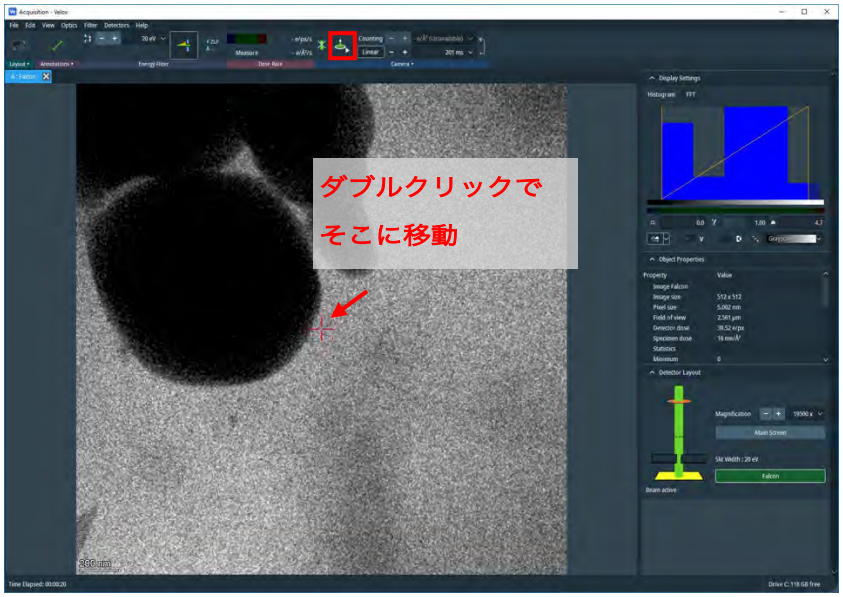
□ アイコンをクリック。ビーム照射が始まり、画像が写る。

*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

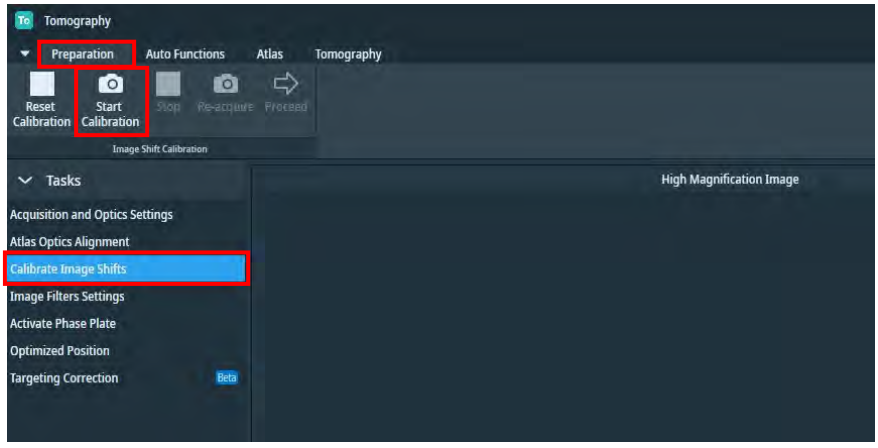
□ ゴミの角もしくはゴミと Hole の交点などを中心にもってくる

*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

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



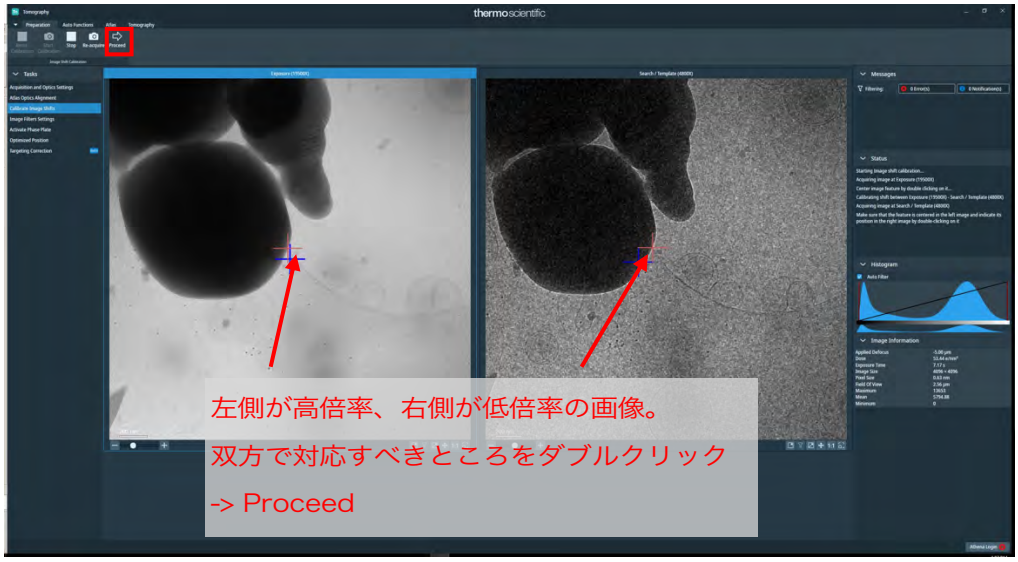
□ x19.5k（Exposure での倍率）の画像（画面左側）を見る。

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

□ Proceed

□ 右側に一段階低倍率（Search = Eucentic）の画像が取得される。

双方の対応すべき場所をダブルクリックして指定し Proceed

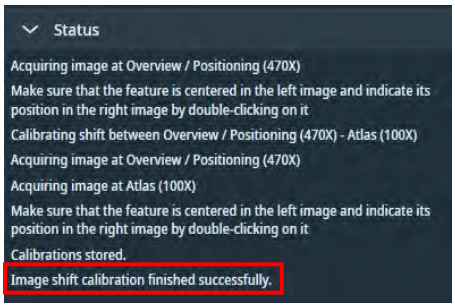


□ 右側の画像が左側に変わり、より一段階低倍率（Overview）の画像があらたに

右側に取得される。以下同様に、

□ 双方の対応すべき場所をダブルクリックして指定して Proceed

□ Status に finished successfully と出たら終了



*倍率を変更した場合はもう一度やり直す

毎日のビーム調整は以上

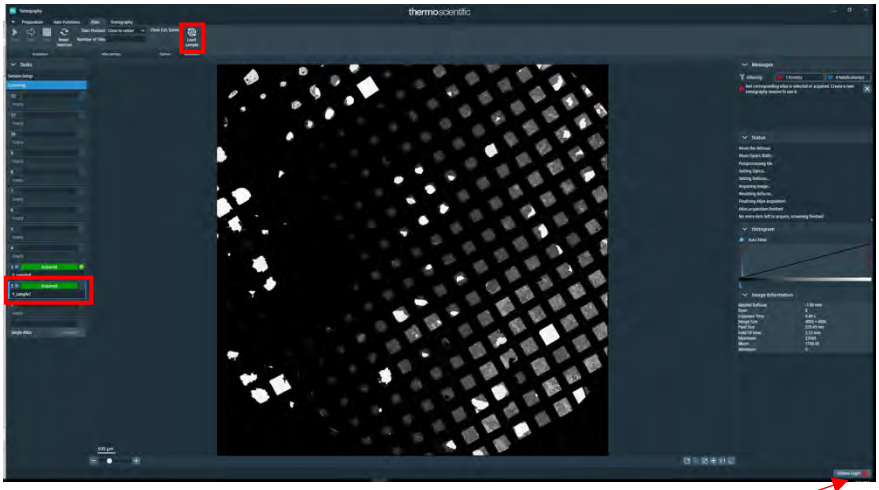
*Rotation center は、SPA のときもほとんど安定している。必要に応じて調整する？

*Auto CTF は、トモグラフィーの Exposure の倍率（x20k 前後）では Thon リングが出ないので、調整したいときはより高倍率で行う？

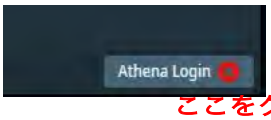
III. データ測定

1. セッションのセッティング（Tomo Live 使用）

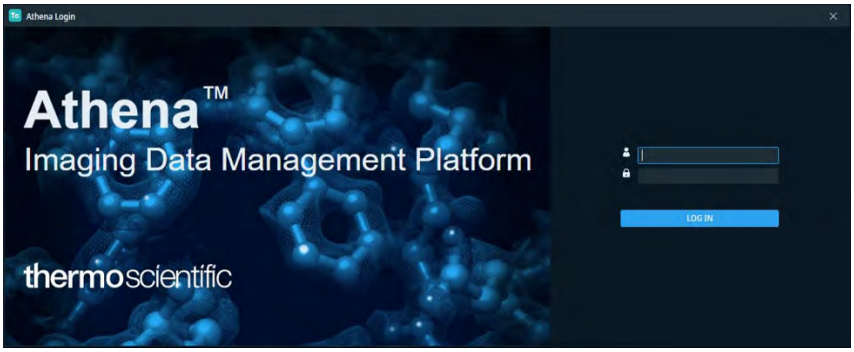
□ Tomo > Atlas tab で目的のグリッドを選択し、Load Sample



□ Tomo > 右下より Athena に Login する

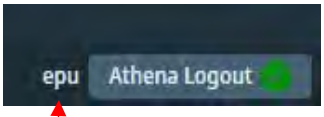


ここをクリック



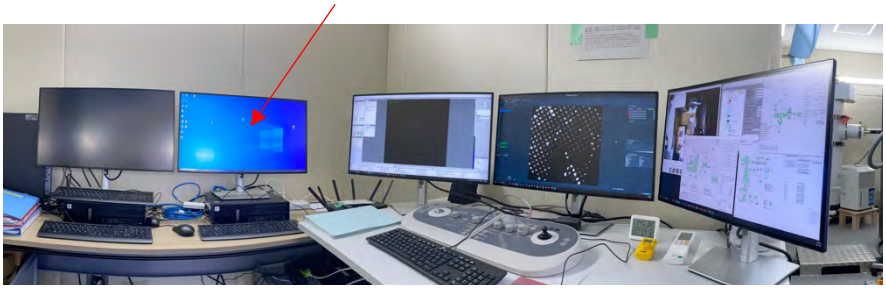
ログイン画面が表示されるので、ID: epu, Password: epu

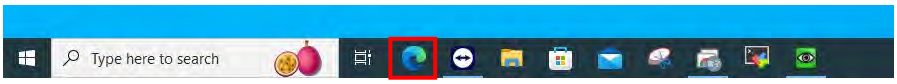
□ ログインできたら、右下の表示が変わる

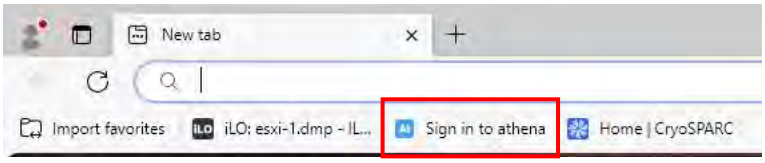


ログイン中のID

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

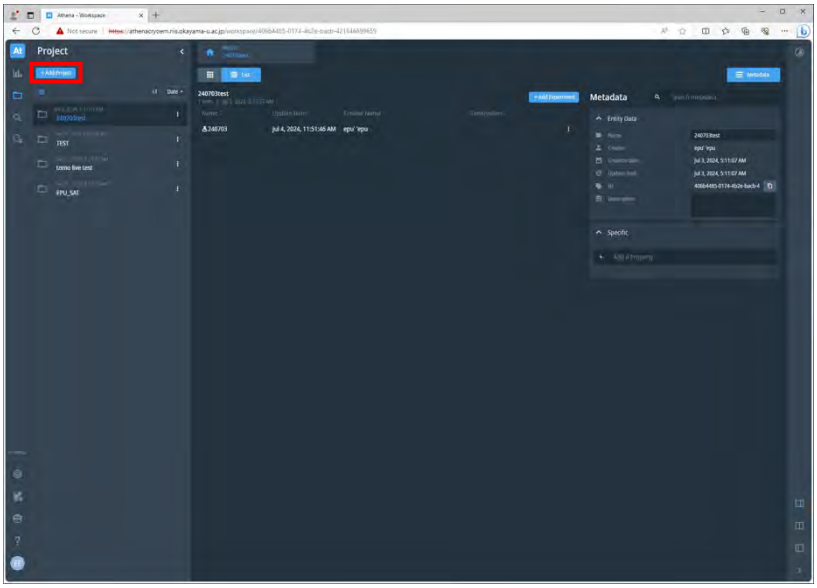






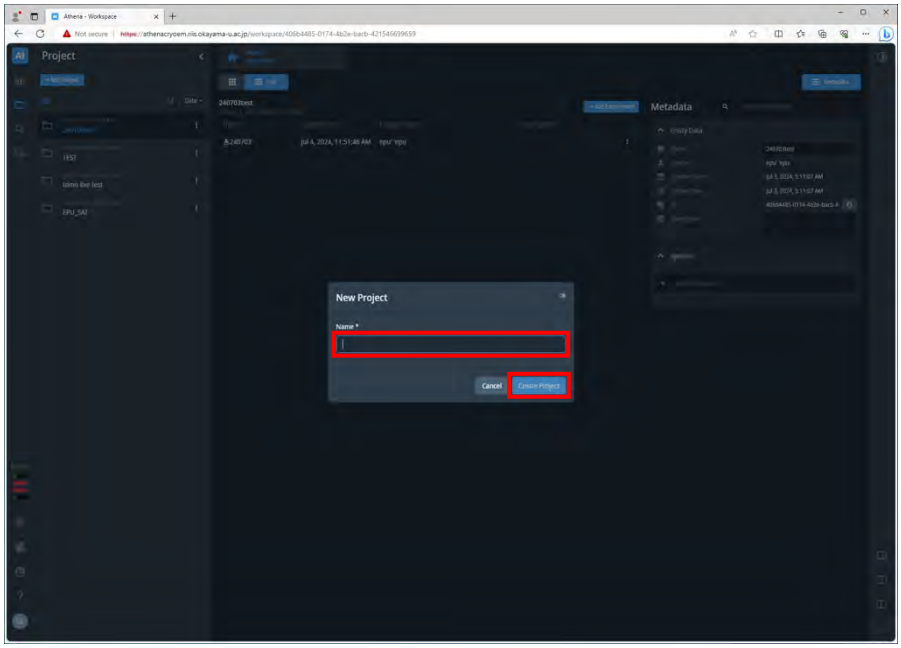
□ ログイン画面が表示されるので、ID: epu, Password: epu

□ ログイン後、Athena > +Add Project



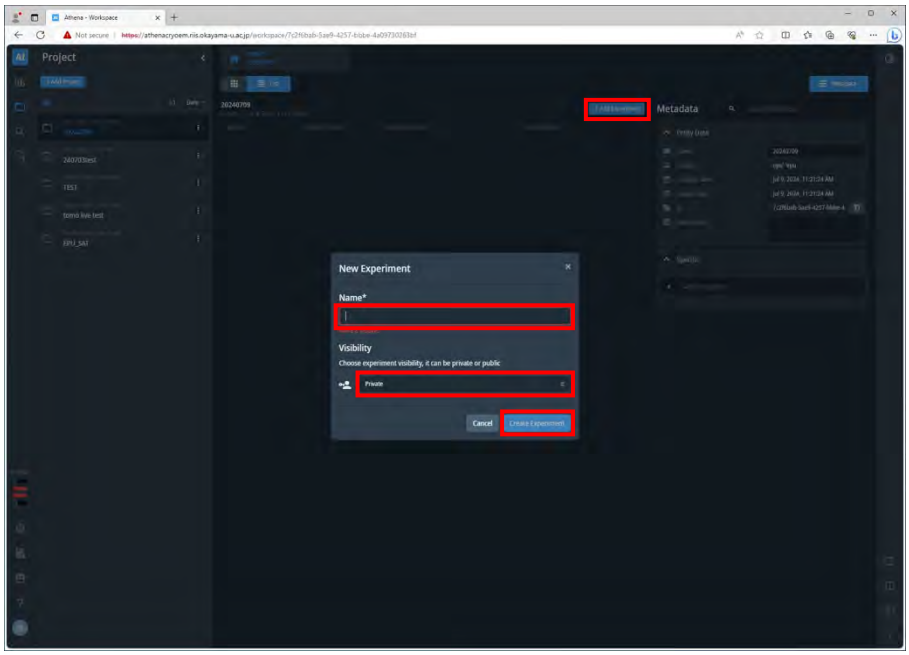
□ Project 名を入力して Create Project

*サンプル名ごとに作成するなどでよい

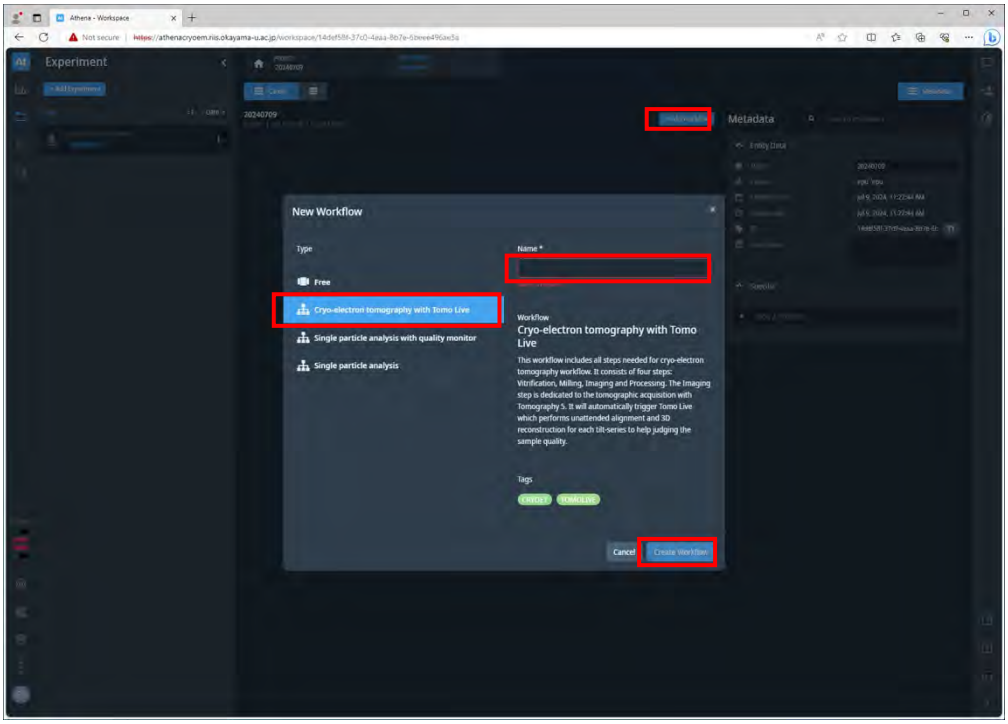


□ Athena > +Add Experiment > Experiment 名（日付など）を入力

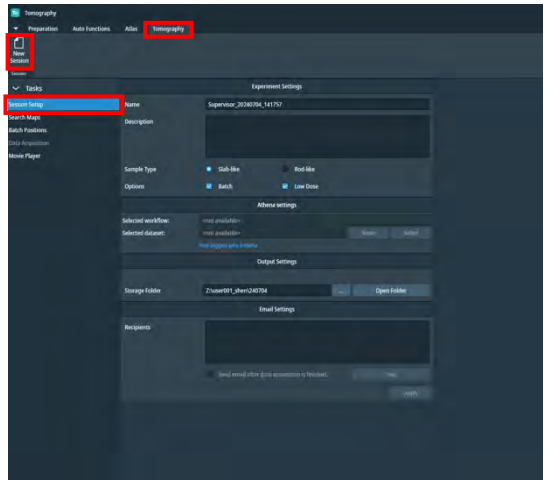
Visibility は Private でよい > Create Experiment

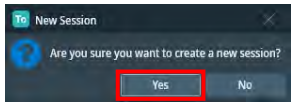


□ Athena > +Add Workflow > Cryo-electron tomography with Tomo Live を選択して Workflow 名（日付など）を入力 > Create Workflow

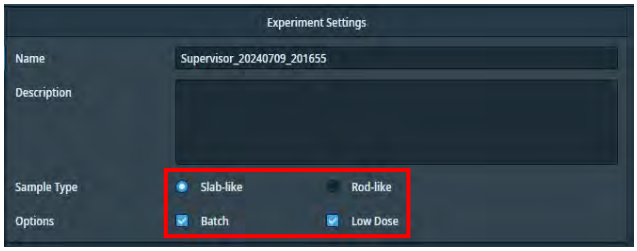


□ Tomo の画面に戻り、Tomography tab > Session Setup > New Session > Yes

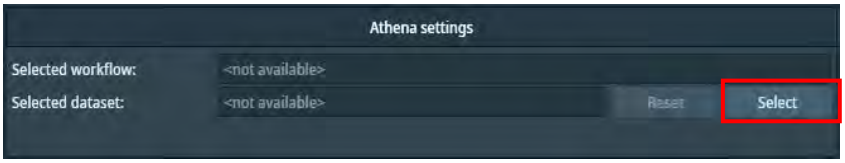




□ Experiment settings のところで、Slab-like, Batch, Low Dose にチェック

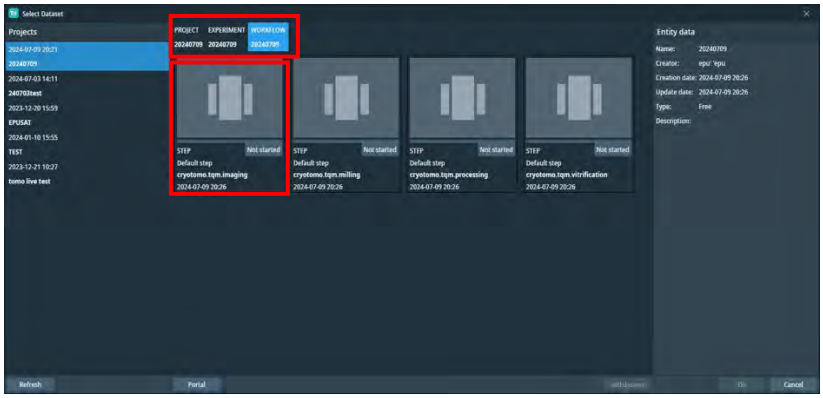


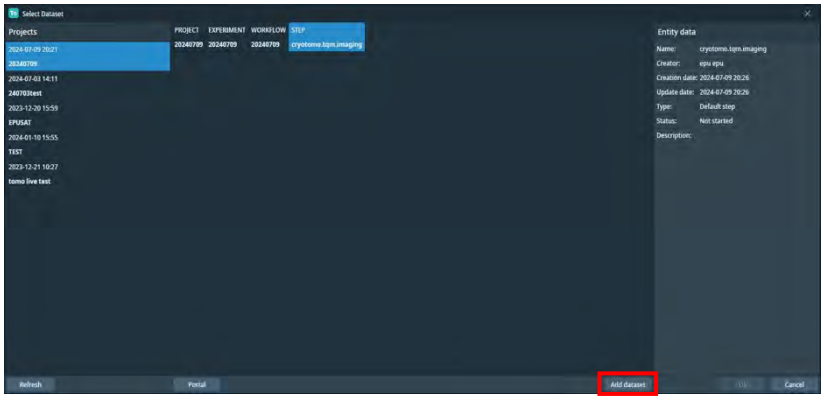
□ Athena settings のところで Select



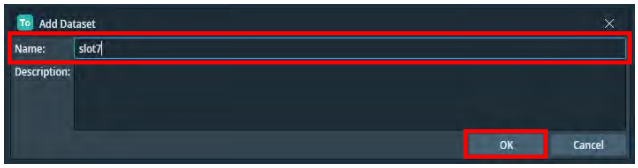
先ほど Athena で作成した Project、Experiment, Workflow を順に選択し、

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

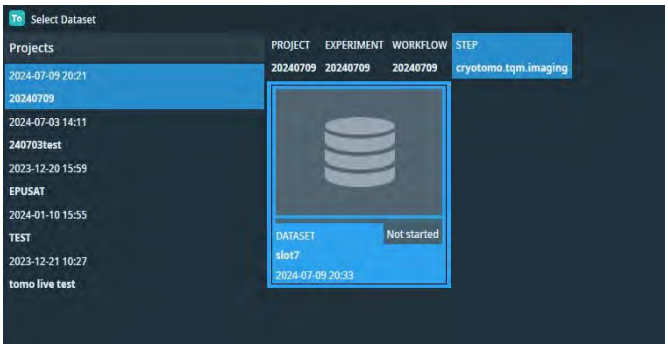




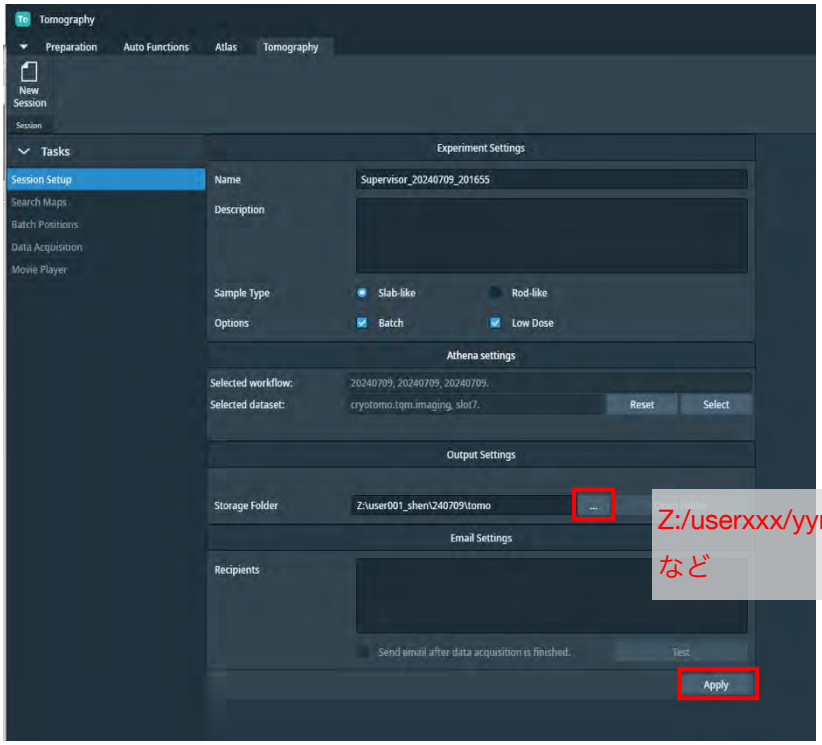
□ Dataset 名を入力して OK



□ Dataset が入ったことを確認する



□ Output settings のところで、保存先ディレクトリを選択

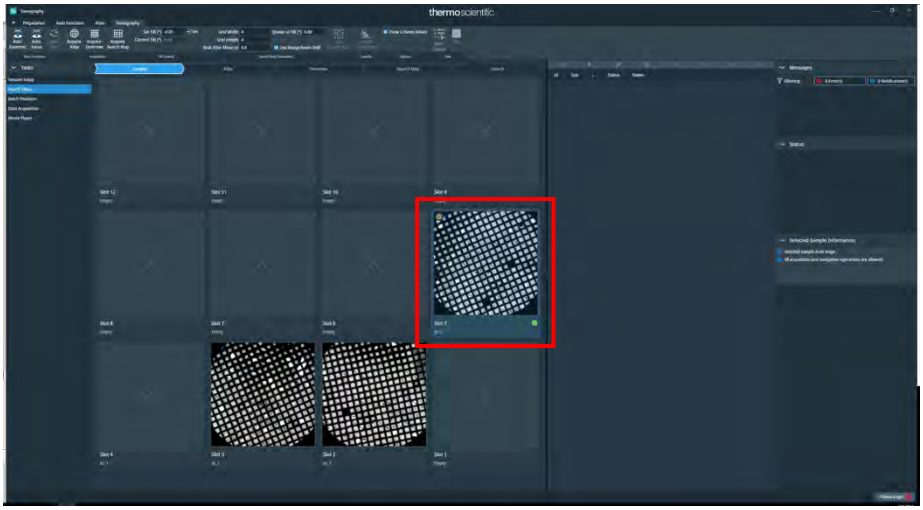


Z:/userxxx/yymmdd/tomo など

□ Apply を押す

2. サーチマップの取得

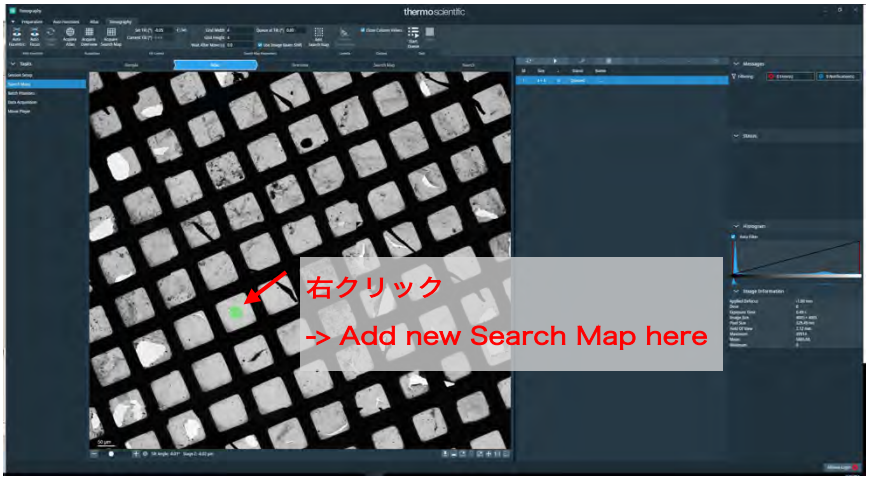
□ Tomo > Tomography tab > Search Maps > Sample で目的のアトラスがハイライトされていることを確認



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

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

□ Tomo > Tomography tab > Search Maps > Atlas で、search map を描きたいスクエアを右クリック Add new Search Map here

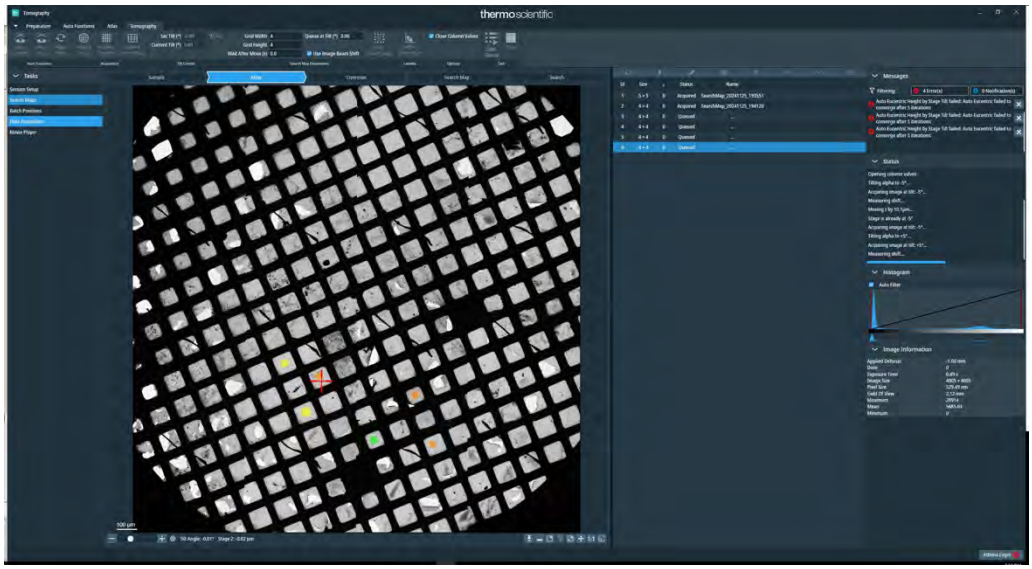


キューに入る。気になるスクエアにどんどん置いていく。

*Grid Width, Height で Search Map のタイル数を指定可能

□ Start Queue

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



*黄色が取得できた map (Acquired)。

*オレンジは取得できなかった（eucentric が取れなかった）map（Queued のまま）。

*緑は今選択している map

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

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

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

Move stage here and Acquire Search Map

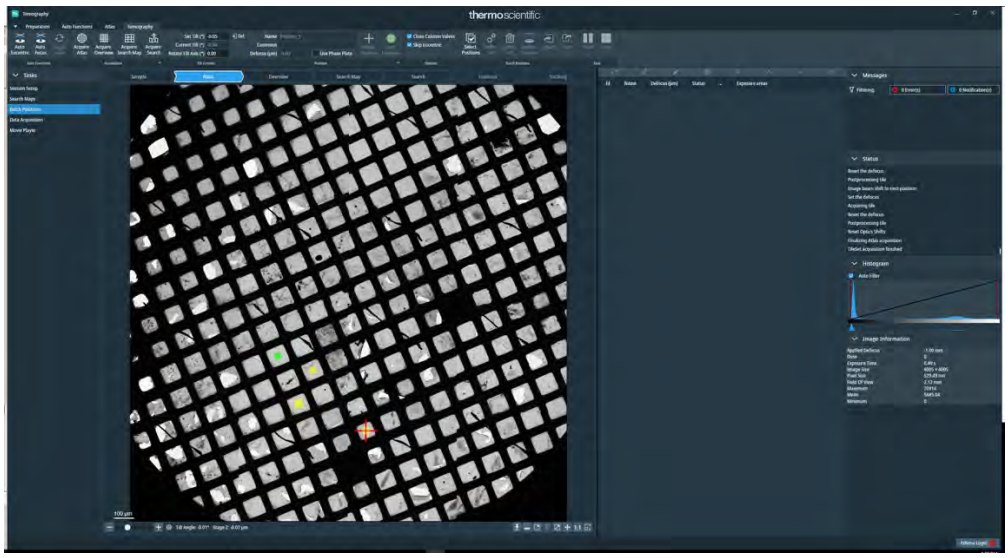
Search map が取得され、Acquired として加わる

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

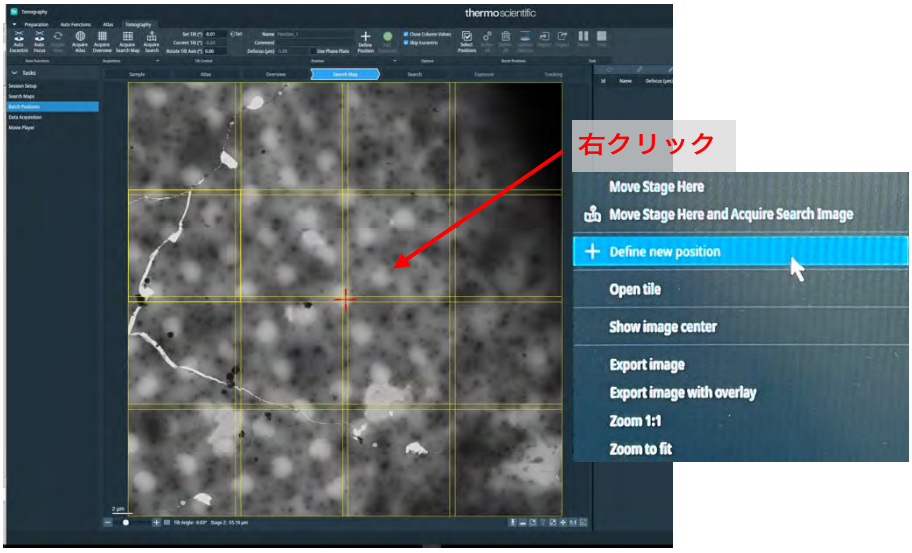
*画面下、Stage Z の値、eucentric が自動で決まったやつは緑、その他は白

3. データの取得

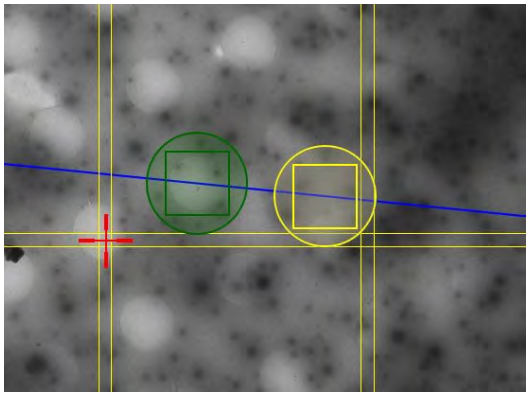
□ Tomo > Tomography tab > Batch Positions > Atlas で、マップをひとつ選択



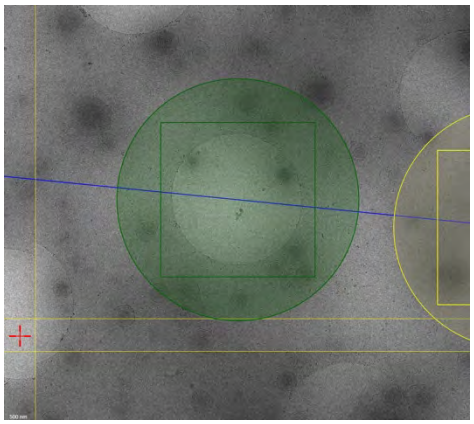
□ Tomo > Tomography tab > Batch Positions > Search Map でデータ収集したいところを右クリック + Define new position



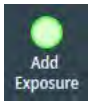
□　データ収集用の照射位置（緑）と focus 位置（黄）が出てくるので調整する



青線はステージtiltの中心軸

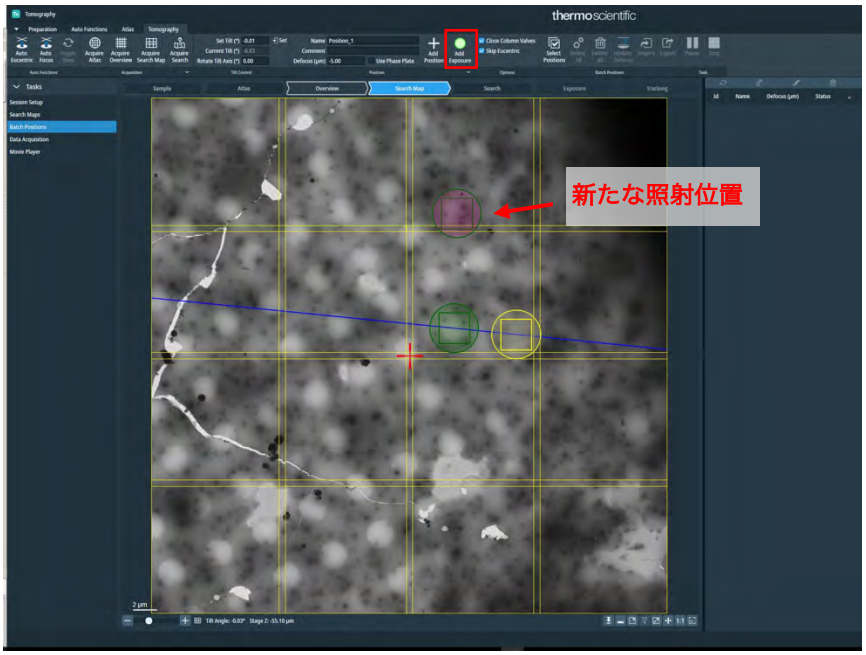


*照射位置（緑）は、holeが中心に収まるようにし、周辺部（位置決め用の金コロイド）もしっかりと視野に収まるようにする
*Focus位置（黄）は、tilt軸上にしか配置できない

□ Add Exposure 

で照射位置を増やせる（magenta）

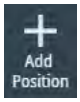
*ひとつの search map につき、照射位置は最大 5 箇所



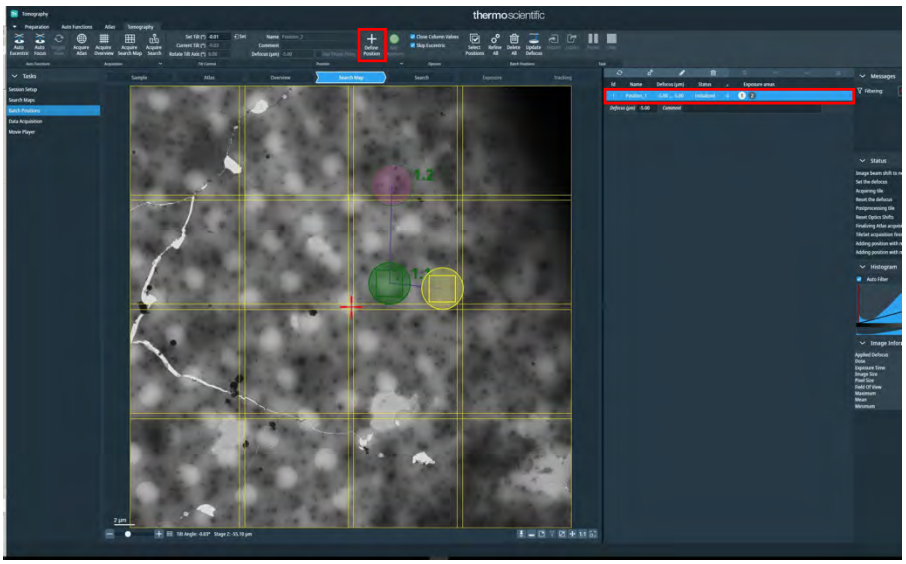
*追加の照射位置については、AFIS でデータ収集が行われる

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

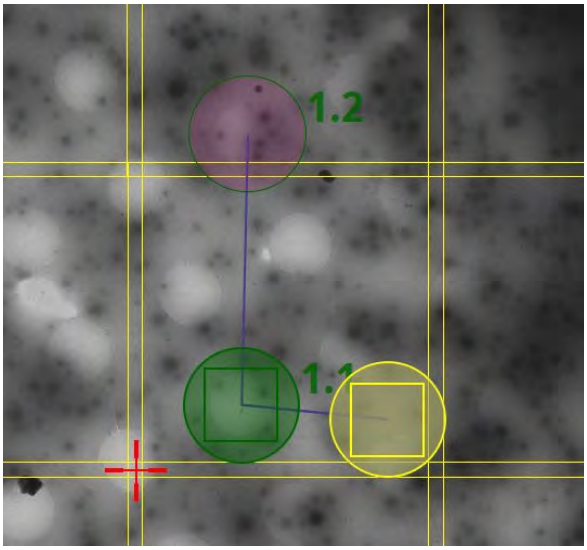
20 μm 程度なら問題無くデータ収集できた

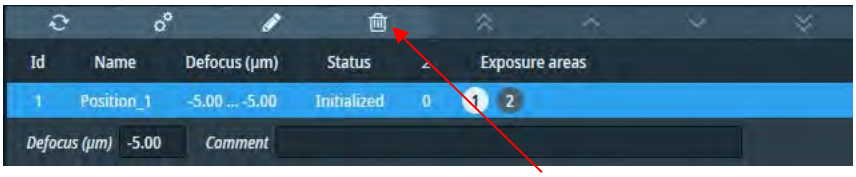
□ 照射位置、focus 位置の配置ができたら Add Position 

で queue にはいる



*照射位置の順序が表示され、queue に反映される



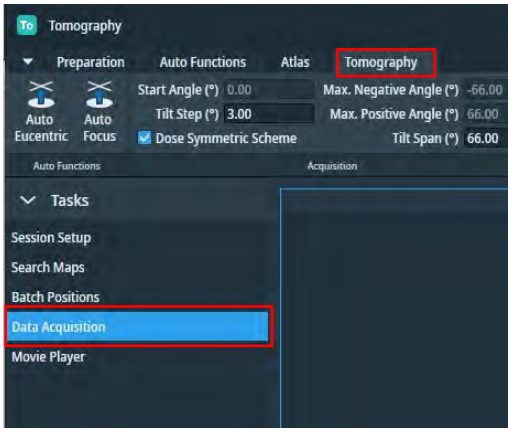


*Queue を削除したいときは、選択してゴミ箱アイコン

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

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

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



・Tilt step (°) : 何度おきに撮影するか

・Tilt Span (°) : ±何度までのデータを撮影するか

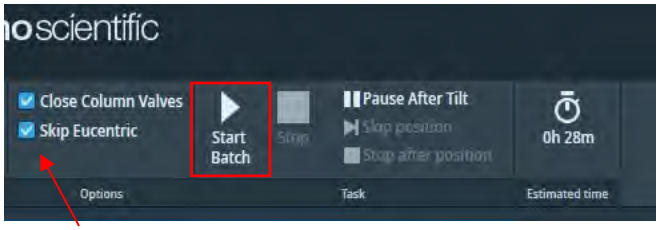
・Dose Symmetric Scheme : チェックを入れる

・Track Before Acquisition : チェックを入れる

・Focus Before Acquisition : チェックを入れる

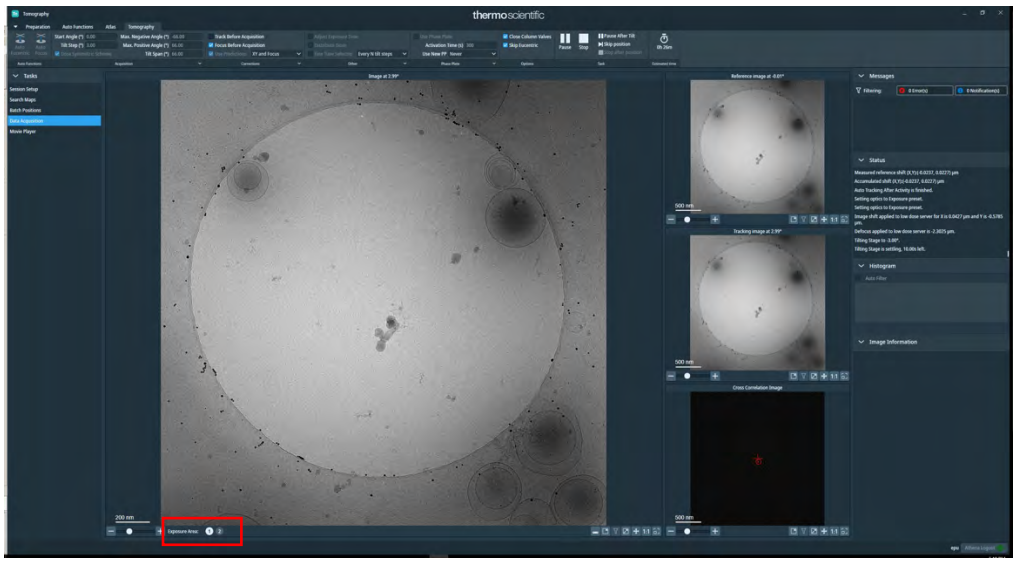
・Use Predictions : 今の撮影条件で Holder Calibration がされていればチェックを入れる

□ Start Batch でデータ収集開始

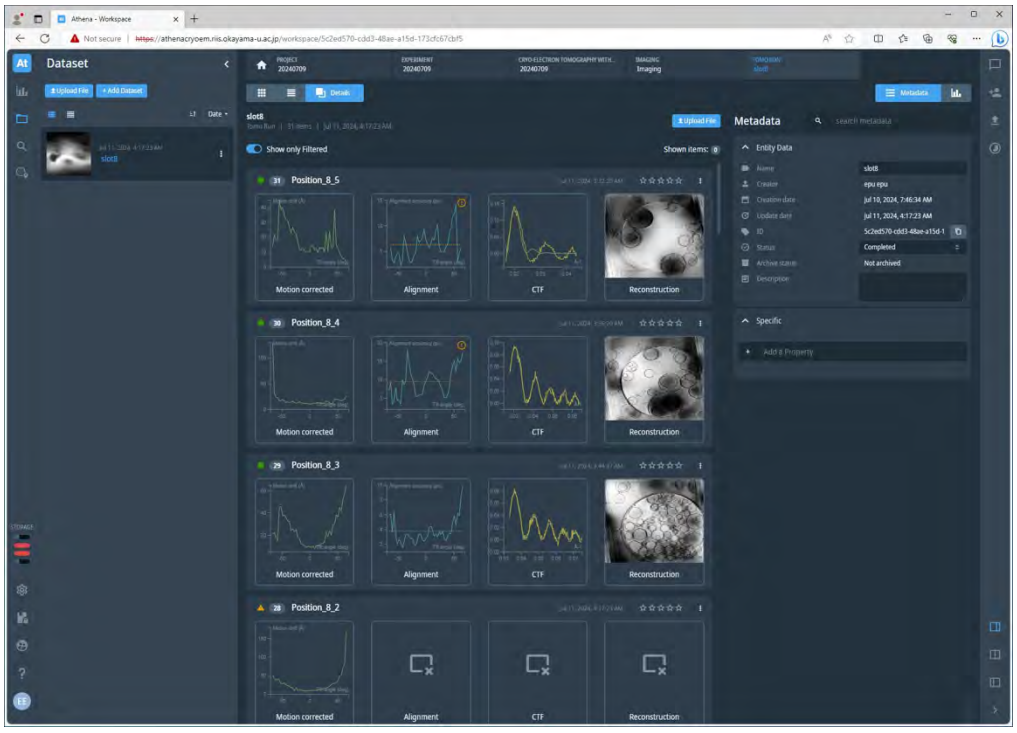


*両方ともチェックを入れておく

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



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

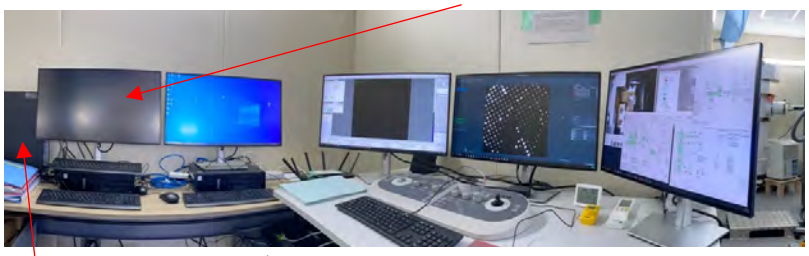


*Tilt series のデータ取得完了から 10-20 分後には三次元再構成が出来ている

IV. データ解析（Inspect 3D）

1. 画像の相関による三次元再構成

□ Inspect 3D がインストールされた PC にログイン



*本体は、タワー型のデスクトップ

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

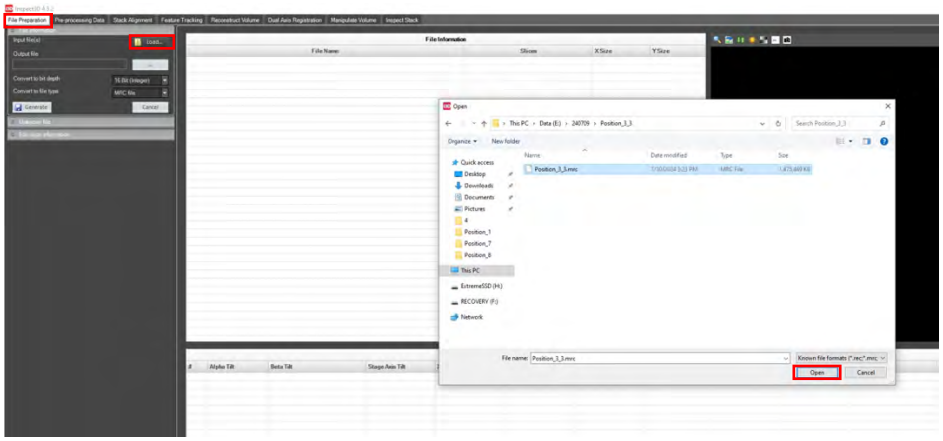
E:/YYMMDD/Position_X_Y　など

*.mrc ファイルのあるフォルダがデータ処理のフォルダとなる

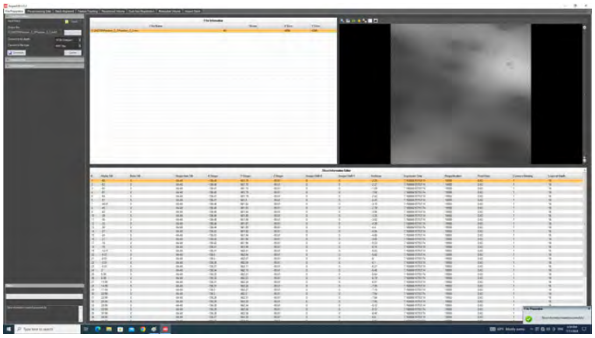
□ Inspect 3D のアイコン

をダブルクリックして起動

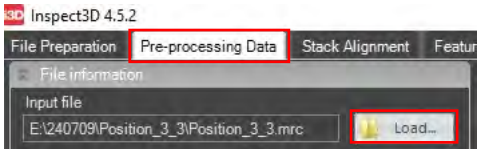
Inspect 3D > File Preparation tab > Load で.mrc ファイルを選択して Open



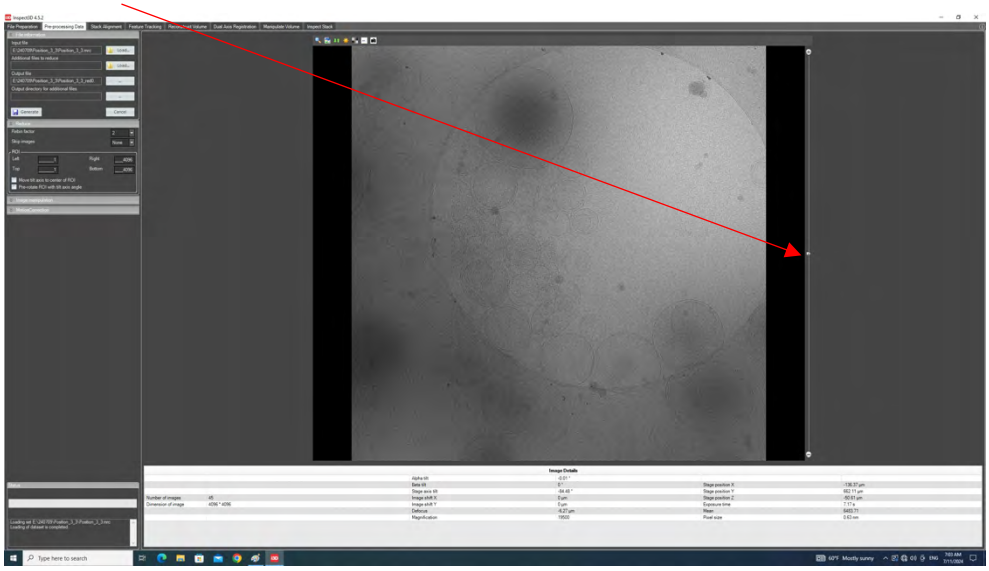
正しく読み込まれたら、ヘッダー情報などが表示される



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

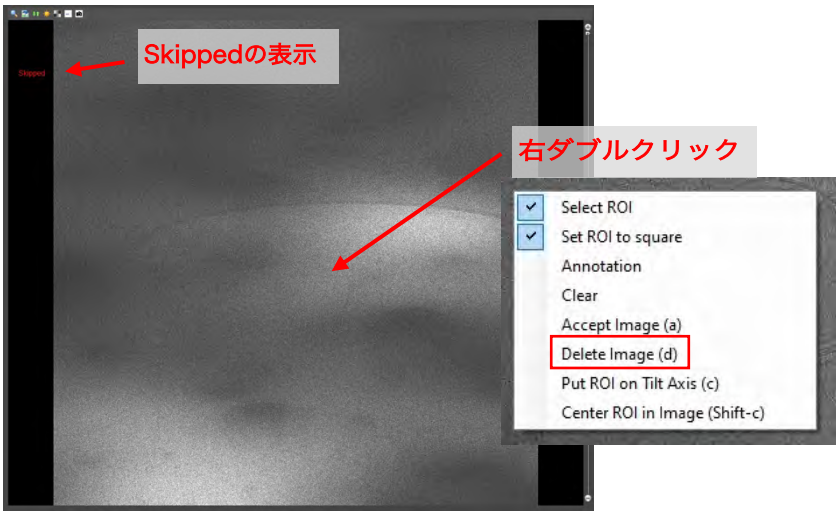


スライドバーを上下に動かし、各フレームを確認する



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

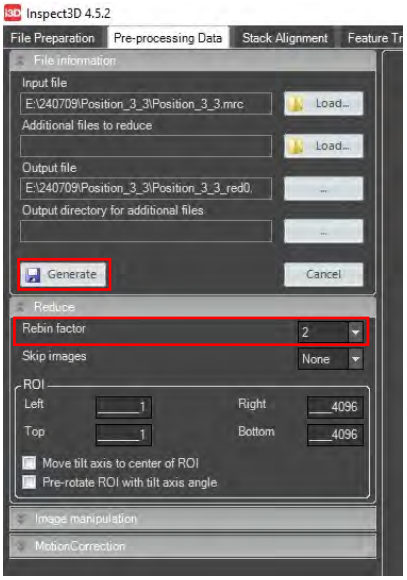
*外したフレームは、左側に赤字で Skipped と表示される



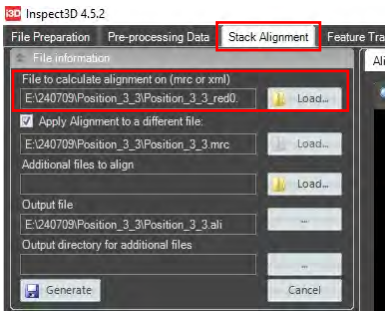
*一度外したフレームを戻すには、右ダブルクリック -> Accept Image

* をクリックして、画像上でマウスを左クリックで上下左右にドラッグすると（または、画像上で右クリックでドラッグ）画像の明るさ、コントラストの調整ができる（以下の各タブでも同様）

□ Inspect 3D > Pre-processing Data tab > Reduce window で Rebin factor を 2（4K -> 2K）にして Generate



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

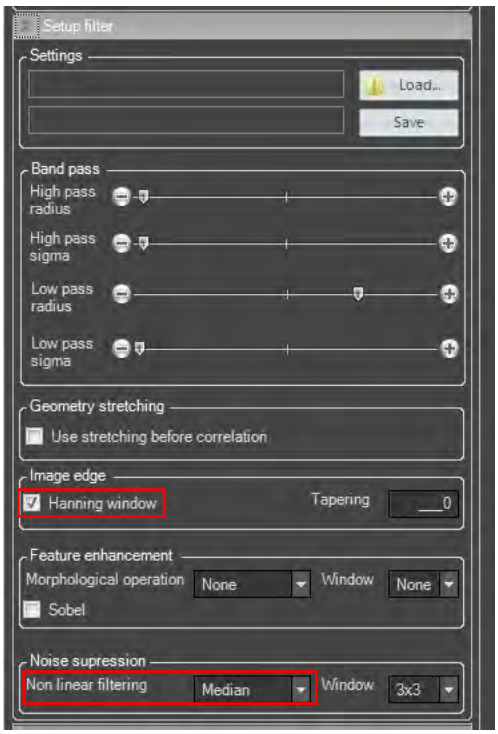


自動的に開かれる？

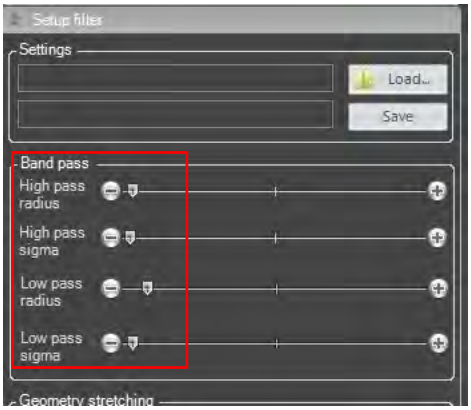
□ Setup filter window で

*Image edge > Hanning window にチェック

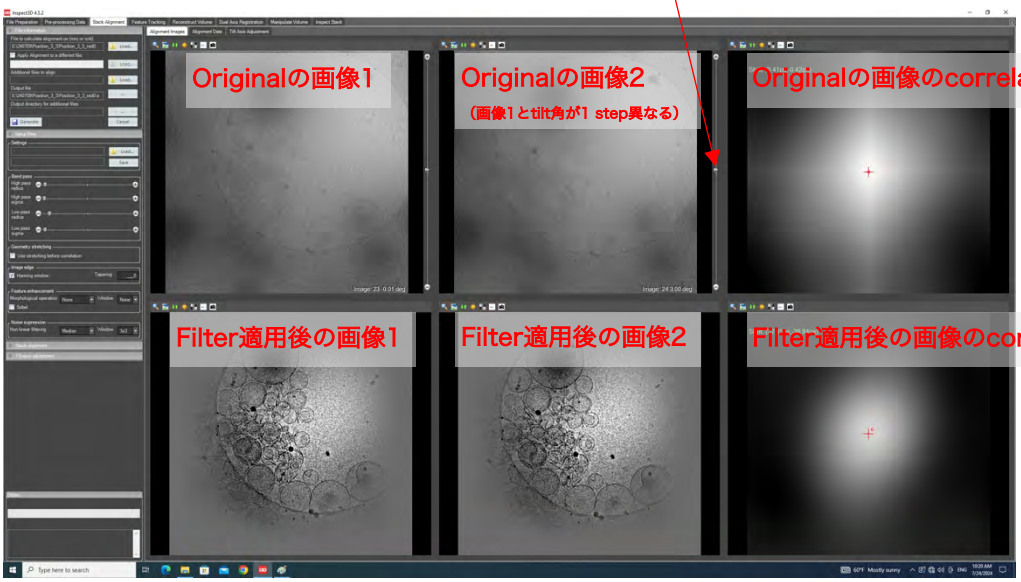
*Noise suppression > Non linear filtering で Median を選択



□ 引き続き Setup filter window で Band pass > High pass, Low pass を少しずつ動かして、correlation のピークがわかりやすいように調整する



スライドバーで画像切り替え
なるべく真ん中の（tilt角の浅い）
画像を使う



ボヤッとした中にピークが確認
できる程度がよいみたい

□ Stack alignment window の設定

*Maximum number of iteration -> 2-4 回

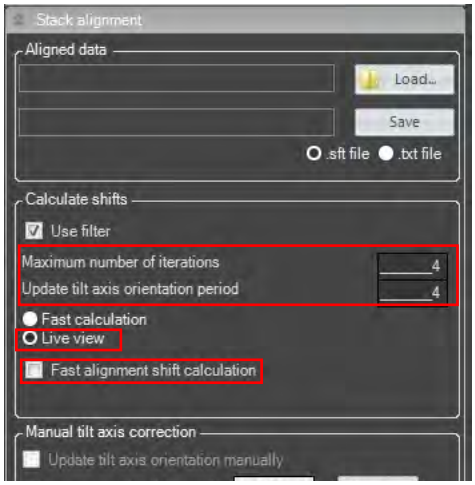
*Update tilt axis orientation period

-> 2-4 回

（どちらもとりあえず 4 回くらいがよい？）

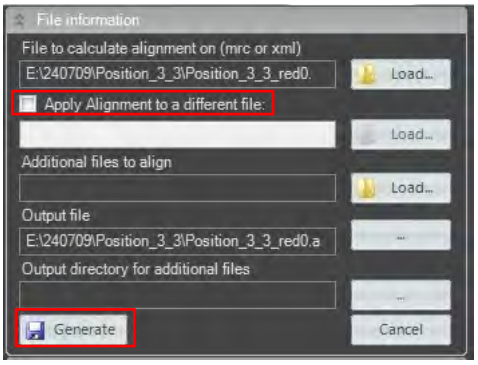
*Live view にチェック

*Fast alignment shift calculation のチェックは外す

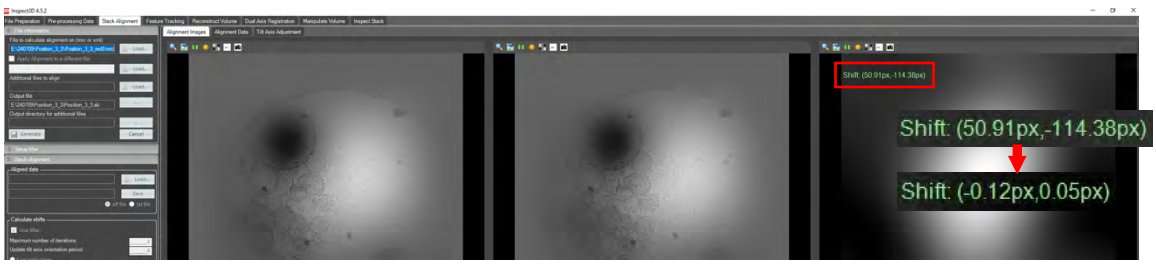


□ File information window で「Apply Alignment to a difference file」のチェックを外して Generate

画像の correlation による位置合わせが行われる



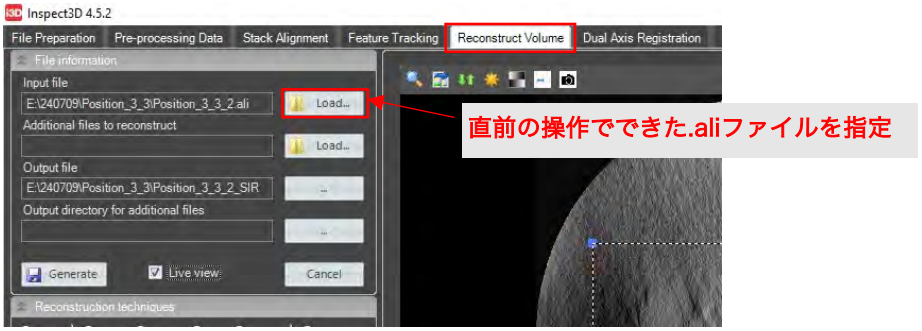
*画面右上の shift 量が、iteration が進むにつれ下がる（ほぼ 0 になる）事を確認



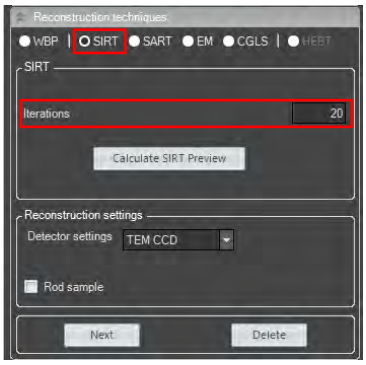
*下がらない場合は、Setup filter window の値を調整してやり直し

Iteration 数を増やすのもよいかも

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

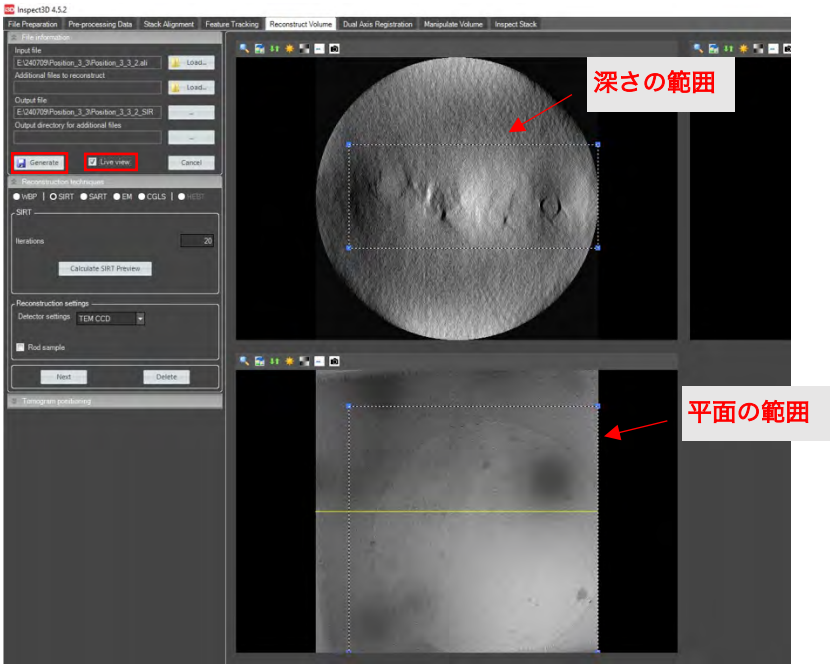


□ Reconstruction techniques window で「SIRT」を選択、Iteration を 20 にする

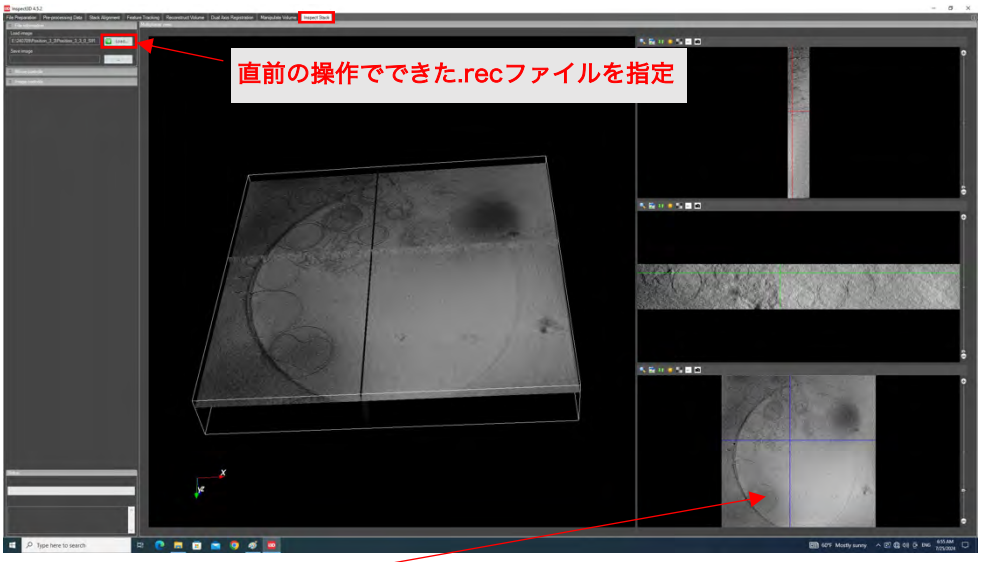


□ 右の画面で再構成に使う範囲を指定する

Live view にチェックを入れて Generate

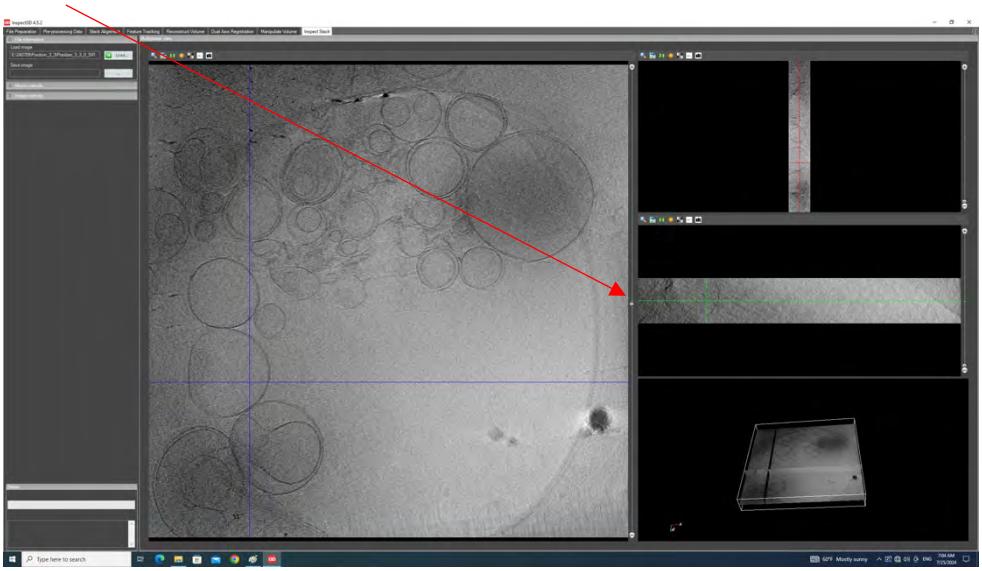


□ Inspect 3D > Inspect stack tab > Load で.rec ファイルを開く



□ 画面右下をダブルクリックして画像を入れ替える

□ サイドバーを動かして、三次元再構成を確認する

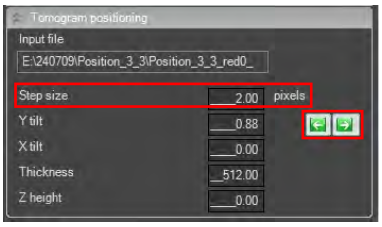


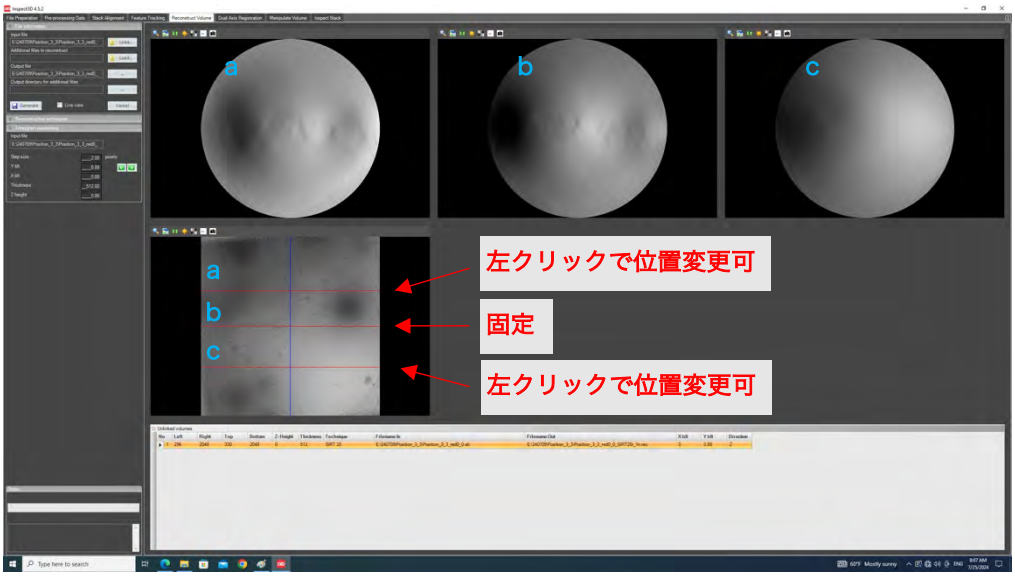
2. 三次元再構成の傾き補正

*以下、前項の続きであることが前提

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

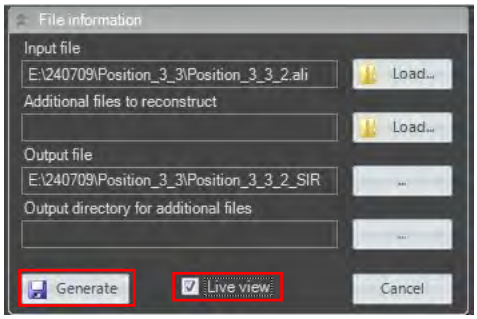
必要に応じて Step size を調整して、Y-tilt の矢印ボタンをクリック



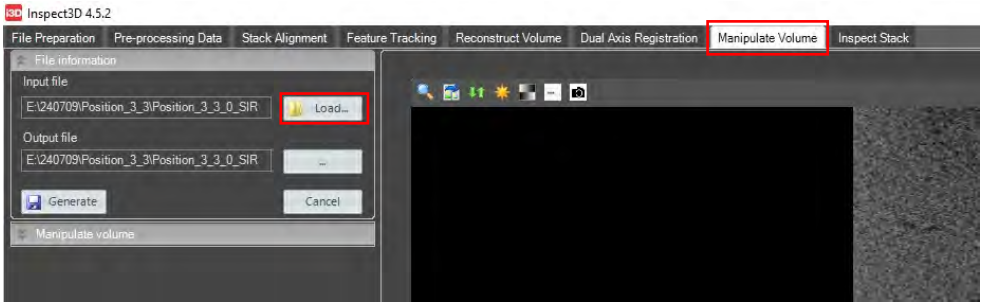


*a, b, c の画面を見て、水平になるようにする

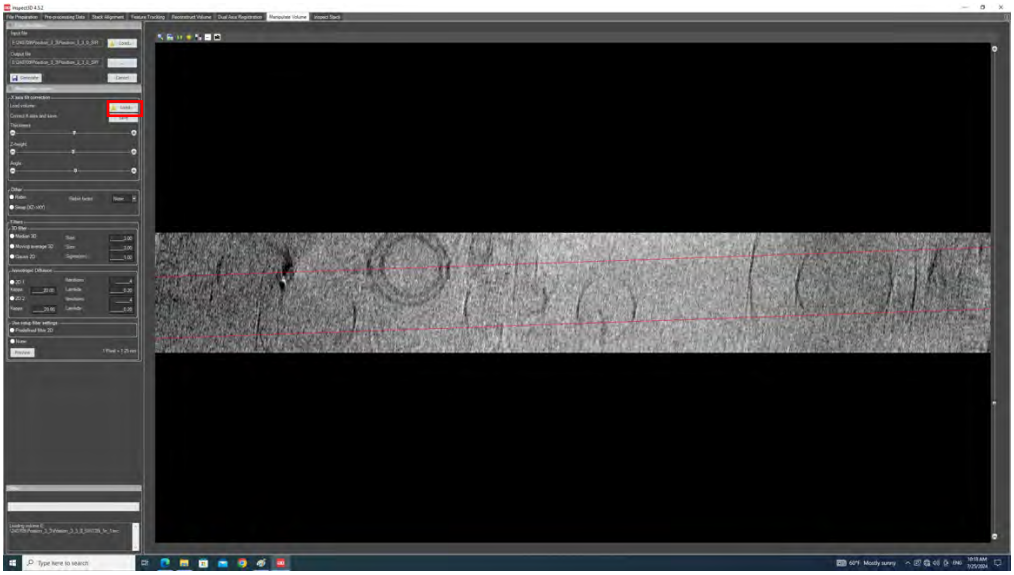
□ Live view にチェックを入れて Generate



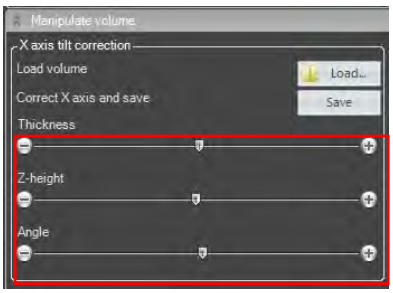
□ Inspect 3D > Manipulate volume tab で.rec ファイルを開く



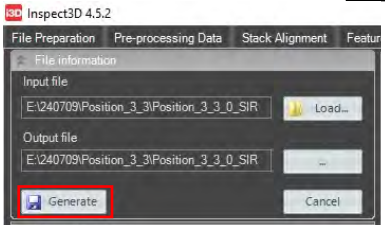
□ Manipulate volume window で Load を押す



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



□ File information window で Generate

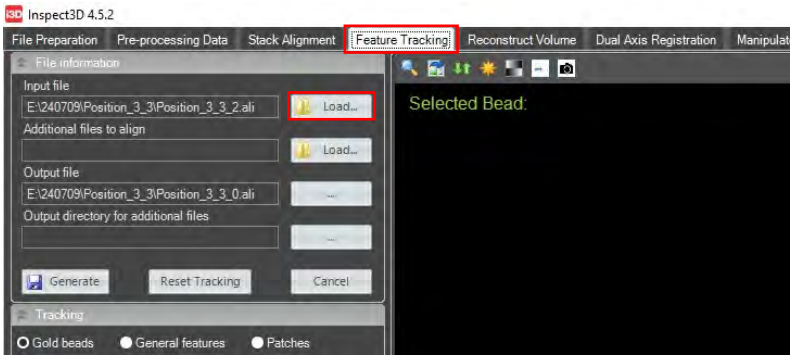


-> できた.rec ファイルを Inspect stack tab で確認

3. 金コロイドなどのマーカーを使った tracking

*以下、p. 48 まで行ってあることが前提

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

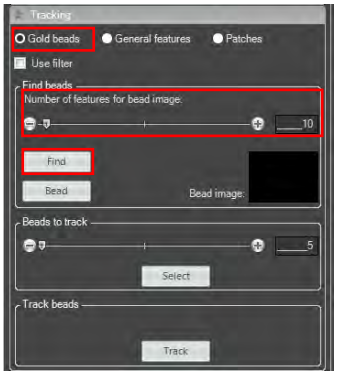


□ Inspect 3D > Feature Tracking tab > Tracking window で

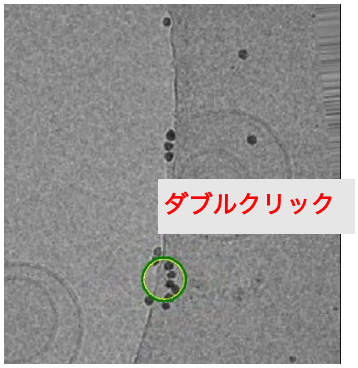
Gold beads にチェック

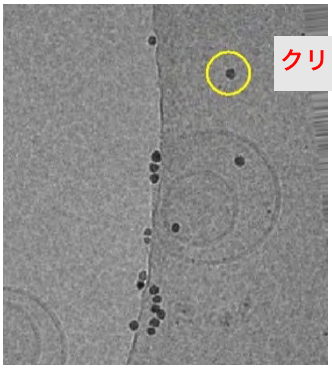
Number of features for bead image を

適当な数値にして Find



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

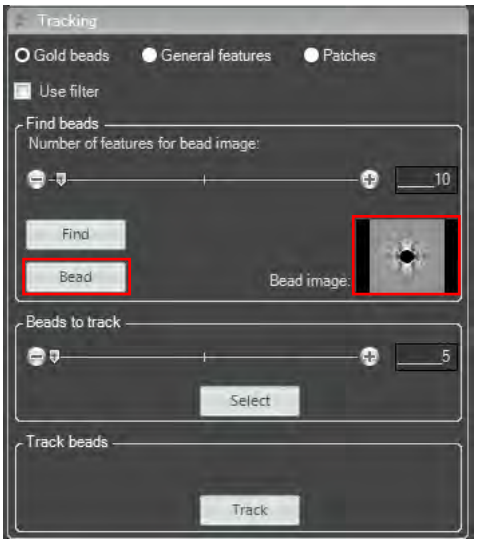




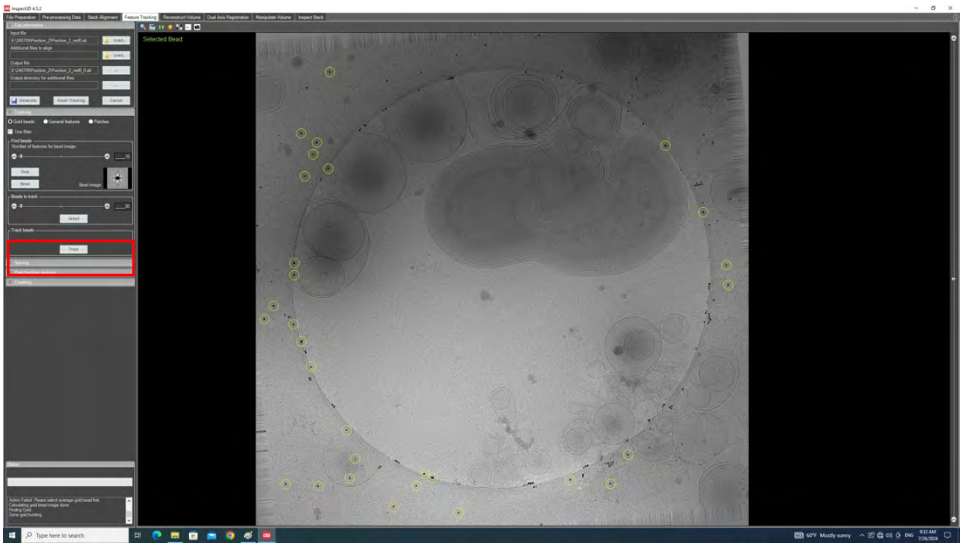
□ Tracking window で Bead

*拾った金コロイドの平均画像が生成され、教師データとなる

*楕円状などの場合、きちんと中心に拾えていないので戻って修正

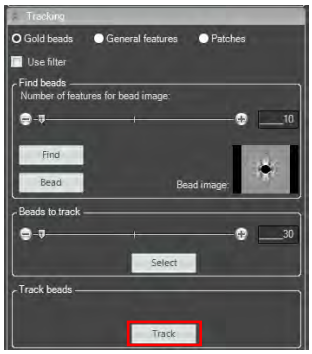


□ Tracking window > Beads to track に適当な値（何個くらい拾えそうか）を入れて Select

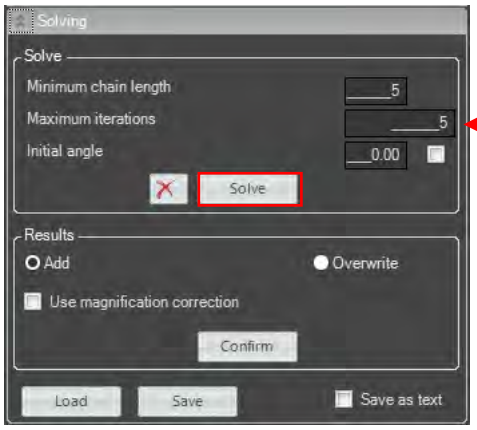


*ヘンなところを拾っていたら、前ページのやり方で修正

□ Tracking window > Track beas > Track

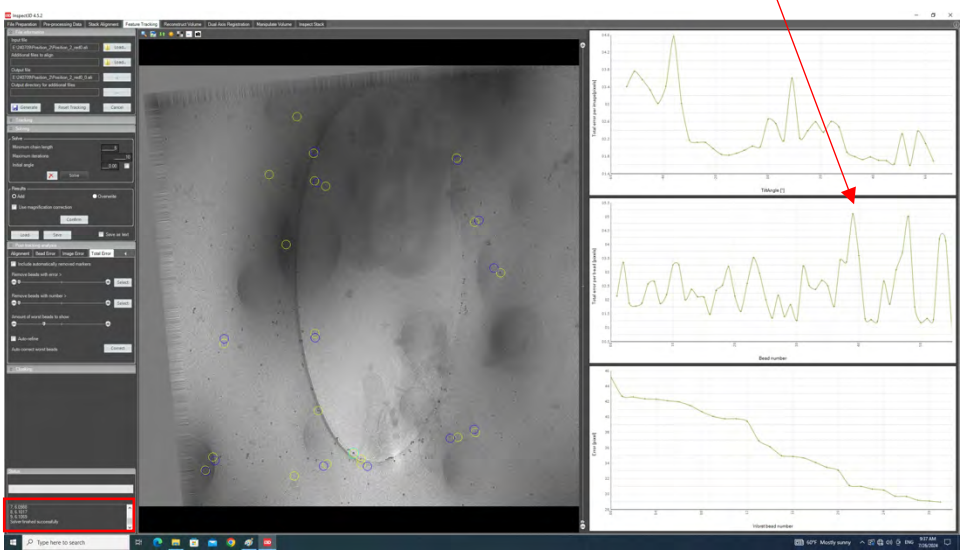


□ Solving window > Solve > Solve



必要に応じてiteration回数を調整

クリックで、対応するbeadが
ハイライトされる

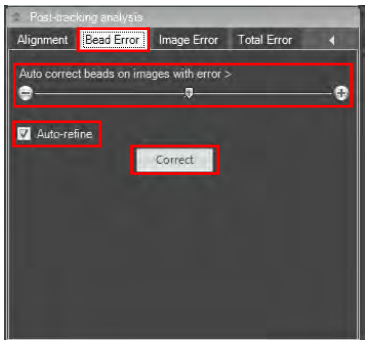


*左下のログを確認。0.1%以下（2K なら 2 pixel）に落ち着いているのが理想

*この段階ではそんなに低い値にはならないので、以下で refine する

□ Post-tracking analysis window > Bead Error tab

*バーを真ん中にもってきて、Auto-refine にチェックを入れ Correct

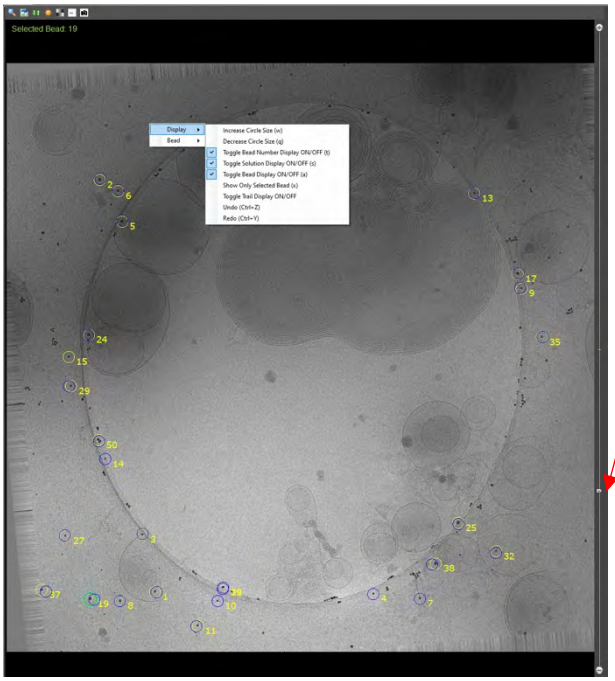


□ Post-tracking analysis window > Image Error tab

*同様にバーを真ん中にもってきて、Auto-refine にチェックを入れ Correct

*画像の window で右ダブルクリック > Display >

Toggle Bead Number Display でビーズの番号を表示できる



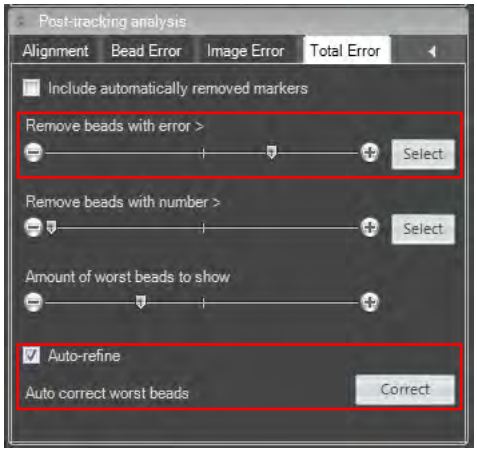
tilt角によってtrackできていない

ものがないかなど確認

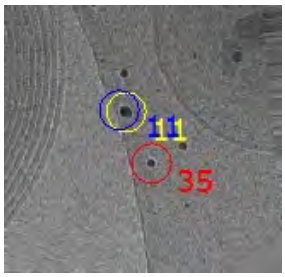
□ Post-tracking analysis window > Total Error tab

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

*Auto-refine にチェックを入れ Correct

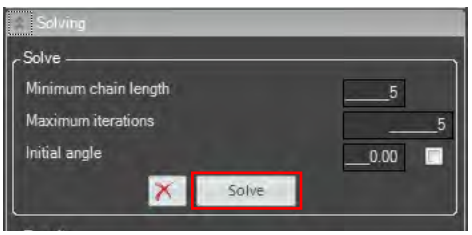


*削除された bead は赤く表示される



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

□ Solving window > Solve > Solve



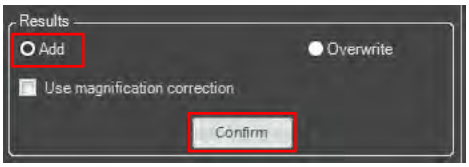
*この段階で、Total Error で削除した bead が復活できなくなるので注意

*Solve してしまってから復活はできないので、.ali ファイルを開くところからやり直し

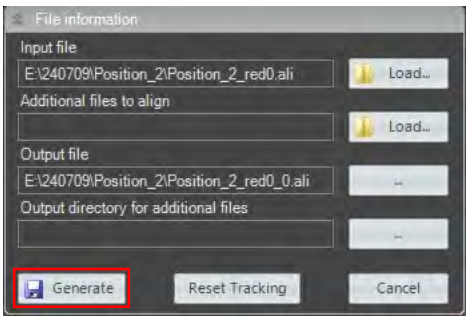
*左下のログを確認。0.1%以下（2K なら 2 pixel）に落ち着いているのが理想

□ Solving window > Results

*Add にチェックして Confirm



□ File information window > Generate



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

以上