装置の始動

LENS の電源を入れる(その他のボタンは触らないこと)



TEM の PC を起動する Password: JEMUser (TEM Center が起動する)



Valve/Vacuum Monitor ウィンドウの Penning Gauge、Value を使用ノートに記入する



必要に応じて、試料汚染防止装置(Anti-Contamination Device 以下 ACD)に液体窒素を入れる(別添参照)

加速電圧の印加(100 k V まで)

SIP 電源で鏡筒の圧力が1×10⁻⁴Pa以下であることを確認する(真中の青の数値)



「Beam Controller」ウィンドウの HT Voltage100 k V をクリックする 「Target」が 100 k V であることを確認し「Beam Controller」ウィンドウの HT Voltage 「ON」をクリックする

Beam controller ×	Beam controller
Voltage Current HT : ON OFF 0.00 [kV] 80 100 120 160 200 Target : 100.00 ▲ [kV] 1.0 ✔ [kV] 1.1 ✔ [kV] HT Scheduling HT Scheduling HT Scheduling HT Scheduling	HT Voltage ON OFF Current HT : 100.00 [kV] 80 100 120 160 200 Target : 100.00 ¥ [kV] 1.0 ¥ [kV] HT Scheduling
Filament OFF Beam Current : ON OFF 0.00 [uA] Target : 61.0 ▲ [%] 1.0 ✓ [%] Max : 70 [%] ✓ [%]	Filament ON OFF Bear Current: 50.50 [1]A] Target: 61.0 ↓ [%] Max: 70 [%]
0 [%] 0.0 [%] 100 [%] Filament Normal Image	0 (%) 0.0 (%) 100 (%) Filament Normal
Bias Coarse: 4 A V Bias Fine: 4 A V	Bias Coarse: 4 Bias Fine: 4

加速電圧の印加(200 k V まで)

100 k V まで昇圧した後「HT Scheduling」ウィンドウで昇圧する

「Beam Controller」ウィンドウの「HT Scheduling」をクリックする

「HT Scheduling」ウィンドウの「Step Volt」を 0.1 k V、「Interval Time」を 2sec、「Target HT Voltage」を 160 k V に設定する。

「Total Time」が 20min であることを確認し「Start」をクリックする

160 k V まで昇圧が終わったら「Step Volt」を 0.1 k V、「Interval Time」を 6sec、「Target HT Voltage」を 200 k V に設定する。

「Total Time」が 40.1min であることを確認し「Start」をクリックする

「HT/Beam Condition」ウィンドウの「Beam Current」の値が設定電圧値の半分の値±10% の値で安定することを確認する(安定しない場合 EA 道木まで)

	2	
	Linear Step	
[kV]	Step Voit : 0.1 ~	[kV]
[s]	Interval Time : 6 ~	[5]
[min]	Total Time : 40.1	[min]
) [kV]	Current HT Voltage : 160.0	0 [kV]
0 <mark>÷</mark> [kV]	↓ Target HT Voltage : 200.0	10 🗧 [kV]
Remain		Remain
[min]	ldle	 [mi
HT OFF	Start Stop	HT OFF
	[kV] [s] [min] [kV] (kV] Remain [min]	[KV] Linear Step [s] Step Volt: 0.1 [s] Interval Time: 6 [min] Total Time: 40.1 [kV] Current HT Voltage: 160.0 ↓ Target HT Voltage: 200.0 ↓ Start Stop

Gatan の PC を起動し、GMS3 ソフトを立ち上げる



試料ホルダーの鏡筒からの取り出し(必ず両手で作業すること) F6(Exchange specimen)(右操作盤)を2回押す Stage の右横に Holder Exchange OK! と表示される

4

F1 Screen	F2 Off Axis Camera	F3	F4GUN Align	F5IL STIG	F6 * Exchange Specil
t 🤶 🚍	🏥 🖻 🧕 🚳	5			
AIR にせず	に引き抜くとリー	クして数時	間使用できなくな	るので注意す	トること‼
調	「料ホルダーの取り出し				1
\mathbf{i}			11/00	4	1
)止まるまで引き出す		8 . C .		
	2		PUMP		1/
5	 ②反時計万向に止 ③止まるまで引き出す ④止まるまで左方向に回す 	まるまで回す			
	⑤PUMP/AIRスイッチをAIRI ⑥約 30 秒待って試料ホル・ 」出す	cする ダーを引き		IF	

B

試料の試料ホルダーへの装填

カートリッジ取り外し工具を試料ホルダー先端のカートリッジ固定金具に差し込み、固定 金具を引き上げながらカートリッジを取り外す



試料押さえプレートを固定しているねじを 1 回転半ほど緩め、試料押さえプレートをスラ イドさせる(ねじは抜かないこと)



試料(グリッドメッシュ)の試料面を上にして試料カートリッジの溝に入れる 試料押さえ板を元の位置に戻してねじを締める(試料押さえプレートがきちんと溝にはま っていることを確認する)(ねじは柔らかいので強く締めすぎないこと)

カートリッジ取り外し工具を試料ホルダー先端のカートリッジ固定金具に差し込み、固定 金具を引き上げながら、カートリッジのガイド穴をガイドピンに合わせ試料固定金具を元 に戻す

試料ホルダーの鏡筒への挿入(必ず両手で作業すること)



試料ホルダーの O リングに糸くず等が付いていないことを確認する

ゴニオメーターの緑ランプが点灯したら試料ホルダーを時計方向に少し回す さらに時計方向に回し止まるところまで挿入する(手を離すと試料ホルダーが勢い良く吸 い込まれゴニオメーターが破損する恐れがあります)

Specimen ウィンドウで Holder の選択をする



電子線の発生

SIP 電源で鏡筒の圧力が 1×10⁻⁴Pa 以下であることを確認する Beam controller ウィンドウの Filament ON をクリックする

Beam controller		*
HT Voltage		
ON C	FF	Irrent HT : 200.00 [kV]
80 100	120	160 200
Target : 200 H	.00 T Scheduli	Step : 1.0 V [kV]
El C		
ON C	FF	am Current : 106.20 [uA]
\smile	_	Sten :
Target : 6	1.0 🛔 [%]	1.0 ~ [%]
Max:	70 [%]	
		y
0 [%]	61.0 [%]	100 [%]
Filament Normal		Filament Image
Bias		
Bias Coarse:	4	
Bias Fine:	4	

対物絞り、制限視野絞りが抜けていることを確認する 上から集束絞り、対物絞り、制限視野絞り 赤丸が本体側の黒目印とあっている



LOW MAG(右操作盤)をオンにする BRIGHTNESS(左操作盤)を左右に回してみる

電子線が見えない場合 EA 道木まで

対物レンズ基準電流呼び出し

MAG モードで倍率を 40K 程度にする STD FOCUS スイッチ(右操作盤)を 2 回続けて押す

集束絞りを選択する(通常は1番が挿入されている) BRIGHTNESS でビームを集束させ、SHIFT X,Y でビームを中心に移動する BRIGHTNESS でビームを広げる 集束絞りのノブでセンタリングする 同心円状に広がるまでセンタリングを繰り返す



集束レンズの非点補正

BRIGHTNESS つまみで電子線を最も小さくなるように集束する COND STIG(左操作盤)スイッチをオンにする BRIGHTNESS つまみを前後にゆっくり回したときに電子線の形状が円形になるように、 DEF/STIG X,Y つまみで調整する COND STIG(左操作盤)スイッチをオフにする

試料の高さ調整 低倍率:IMAGE WOBB X または Y をオンにする Z△▽スイッチ(右操作盤)で、像がずれない方向に調整する

高倍率:小蛍光版を入れ、双眼鏡で観察しながら Z△▽スイッチ(右操作盤)で、エッジの コントラストが小さくなる方向に調整する



電圧中心合わせ(加速電圧を変化させても、像が蛍光板中心に位置するようにする)

MAG モードにし、倍率を×100K以上にする

OBJ FOCUS つまみで焦点を合わせる

BRIGHTNESS つまみで電子線を蛍光板いっぱいに広げ、目印になる像が観察できるように 試料を移動させて、蛍光板中心に合わせる

「Wobbler Controller」ウィンドウの「HT WOBB」をクリックしてオンにする BRIGHT TILT スイッチをオンにする

DEF/STIG X,Y つまみで像の伸縮の中心が蛍光板の中心になるように調整する 「Wobbler Controller」ウィンドウの「HT WOBB」をクリックしてオフにする



像が中心から収縮伸張するようにあわせる。

電圧軸調整中にビームが中心から移動する場合は、TILT/SHIFT バランスの調整を行う

より精密な軸合わせ

集束レンズの軸合わせ

「TEM Center」で「Control」「Alignment Panel」を選択する SPOT SIZE つまみでスポットサイズを1にし、BRIGHTNESS つまみで電子線を集束する 「Alignment Panel」ウィンドウの「Gun Align」を選択する SHIFT X,Y つまみで電子線を蛍光板中心に合わせる SPOT SIZE つまみでスポットサイズを5にし、BRIGHTNESS つまみで電子線を集束する 「Alignment Panel」ウィンドウの「Bright Tilt」を選択する SHIFT X,Y つまみで電子線を蛍光板中心に合わせる スポットサイズを変えても電子線が蛍光板中心からずれなくなるように、繰り返す **電流中心合わせ**(対物レンズの電流を変化させても、像が蛍光板中心に位置するようにする) MAG モードにし、適当な倍率にする

OBJ FOCUS つまみ(右操作盤)で焦点を合わせる

BRIGHTNESS つまみで電子線を蛍光板いっぱいに広げ、目印になる像が観察できるように 試料を移動させて、蛍光板中心に合わせる

「Wobbler Controller」ウィンドウの「Object Lens」をクリックしてオンにする

BRIGHT TILT スイッチをオンにする

DEF/STIG X,Y つまみで像の伸縮の中心が蛍光板の中心になるように調整する 「Wobbler Controller」ウィンドウの「Object Lens」をクリックしてオフにする



目標物が中心からずれなくなるように調整する。

傾斜調整(Tilt 二段偏向調整)

MAG モード×40K にする

BRIGHT TILT スイッチをオンにする

SHIFT X,Y つまみで電子線を蛍光板中心に移動する

「Alignment panel」ウィンドウの Tilt をクリックしてオンにする

「Wobbler Controller」ウィンドウの Tilt X をクリックしてオンにする

DEF/STIG X つまみを回して 2 つに分かれた電子線を 1 つに重ねる

「Wobbler Controller」ウィンドウの Tilt X をクリックしてオフにする

電子線が蛍光板中心からずれている場合 BRIGHT TILT スイッチを押して SHIFT X,Y つま

みで電子線を蛍光板中心に移動する

Tilt Y も同様に調整する

「Alignment panel」ウィンドウの Tilt をクリックしてオフにする

水平調整(Shift 二段偏向調整)

SA DIFF をオンにし、カメラ長を100 cmにする

BRIGHTNESS つまみを時計方向一杯に回す

DIFF FOCUS つまみでカウスティックスポットを得る

「Alignment panel」ウィンドウの Shift をクリックしてオンにする

「Wobbler Controller」ウィンドウの Shift X をクリックしてオンにする

DEF/STIG X つまみを回して 2 つに分かれたカウスティックスポットを 1 つに重ねる

「Wobbler Controller」ウィンドウの Shift X をクリックしてオフにする

カウスティックスポットが蛍光板中心からずれている場合 BRIGHT TILT スイッチを押し

て DEF/STIG X,Y つまみで電子線を蛍光板中心に移動する

Shift Y も同様に調整する

DigitalMicrograph の TEM Imaging をクリックする Oneview Camera の View をクリック



DigitalMicrograph の蛍光板をクリックする



Live FFT of Oneview Image を見ながら対物レンズの非点収差補正を行う OBJ STIG スイッチ(左操作盤)をオンにする OBJ FOCUS つまみ(右操作盤)で焦点を合わせる DEF/STIG X つまみで補正する OBJ FOCUS つまみ(右操作盤)で焦点を合わせる DEF/STIG Y つまみで補正する





非点収差あり

非点収差補正後

Capture で撮影する 必要な画像は適宜保存する(何枚も撮りためないこと) Save Gatan Format(.dm4)



終了操作

F6 (Exchange specimen) (右操作盤)を2回押す Stage の右横に Holder Exchange OK! と表示される 試料ホルダーを鏡筒から取り出し、グリッドメッシュを回収する (グリッドメッシュを紛失した場合作業を中断する) 試料ホルダーの O リングに糸くず等が付いていないことを確認する 試料ホルダーの鏡筒への挿入(必ず両手で作業すること)

加速電圧の印加を停止する

「Beam Controller」ウィンドウの HT Voltage「OFF」をクリックする 「Beam Controller」ウィンドウの HT Voltage100 k V をクリックする

Beam controlle	r		
HT Voltage			
ON	OFF	Current	HT : 0.00 [kV]
80 1	00 12	0 160	200
Target :	100.00	[kV] 1.0	: ~ [kV]
	HT Sch	eduling	
Filament			
ON	OFF	Beam Cu	urrent : 0.00 [uA]
_		Step	<u>. </u>
Target :	61.0	[%] 1.0	× [%]
Max:	70	[%]	
0 [%]	0.0	D [%]	100 [%]
Filament		[Filament
Normal		, l	пнаде
Bias			
Bias Coars	se: 4		T
Bias Fine:	4		

ACD の温度を室温に戻す

Gatan の GMS3 を終了する

Warm to 20.0 をクリックする



Gatan の PC を終了する

TEM の PC を終了する(ACD Bake している場合は Bake が終わってから終了する)

LENS 電源を切る



 APERTURE CONTROL
 モーター駆動式の稼働絞り装置を制御する

 本装置では対物レンズ絞り(OL)が有効

 PROBE CONTROL

・SPOT SIZE つまみ

DEF/STIG スイッチ

- ・IMAGE SHIFT 高倍率における電磁視野移動に使用
- ・PLA 回折スポットや透過像を移動するときに使用
- ・COND STIG 電子ビームの形状を補正するときに使用
- ・BRIGHT TILT 通常の明視野像を観察する際の電子線の光軸合わせに使用
- ・NTRL 選択されている DEF/STIG スイッチに対応するデータをクリアする
- ・OBJ STIG 対物レンズ非点補正コイルの電流が可変できる
- ・DARK TILT 主に電子線を傾斜させて暗視野像を観察するときに使用

BRIGHTNESS つまみ 電子線を集束・発散させ、輝度を調節する

SHIFT X つまみ 電子線を X 方向に移動させる

DEF/STIG X つまみ DEF/STIG スイッチで選択されたコイルの X 電流を変える



$Z (\triangle \bigtriangledown) CON$	Γ スイッチ 試料を上下方向に移動する
IMAGE WOBB X	【(Y) 焦点がずれていると像が X(Y)方向に振動する
HT WOBB	結像系レンズの光軸の電圧中心合わせに使用
MAG 1	
MAG 2	
LOW MAG	
SA MAG	
SA DIFF	
SHIFT Y	電子線を Y 方向に移動させる
DEF/STIG Y	DEF/STIG スイッチで選択されたコイルの Y 電流を変える
MAG/CAM	倍率、カメラ長を変更する
OBJ FOCUS	像の焦点を合わせる
DIFF FOCUS	制限視野絞りの焦点合わせ、回折像の焦点合わせ
STD FOCUS	連続して2回押すと、対物レンズ電流が固有の基準電流になる
Fスイッチ	

F1 Screen	F2 Off Axis Camera F3	F4 GUN Align	F5IL STIG	F6 * Exchange Specil
i 🤶 I	🗟 🔒 🕿 🚺 🚿			

別添

ACD の利用について ACD の使用で電子線照射による試料の汚染が軽減できる

準備

観察窓に蓋をする、観察窓、ACD 下部の操作パネルに液体窒素が直接かからないように緩 衝材等でカバーする



冷媒注入口の蓋を外して漏斗を取り付ける



液体窒素を注ぎ入れタンクを満たす

沸騰が落ち着いてから再びタンクを満たす 漏斗を外して注入口に蓋をする

(ACD が冷えて効果が出るまで1時間程度かかる)

以後、定期的に液体窒素を補給する(液体窒素が蒸発しトラップが冷却されなくなると、 トラップから多量のガスが放出されスパッタイオンポンプ(以下 SIP)の劣化につながりま す)

終了

観察終了後、冷却剤タンクに冷媒排出器を入れ ACD Bake を行う(残っている冷媒が噴き 出すので注意すること)



Cryo-TEM

測定前日

☆クライオホルダーの Bake Out

①試料ホルダー予備排気装置の電源を入れ、クライオホルダーにシリコンチューブが接続 されていることを確認し前面のスイッチを押して START UP する (スイッチが点滅し、V1 OPEN、ACC が点灯する)



②スイッチと TMP の NORMAL ランプが点灯したら、クライオホルダーの排気の黒い栓 を開く



③温度コントローラーのコネクターを接続する(太いケーブルを使用、本体側の細いケーブ ルは観察時のみ使用)

④温度コントローラーのGボタンを長押し>Reconnect to 698>Mode>Bake Out>スタート(温度上昇確認)



当日

TEM の立ち上げ (TEM 本体の取扱説明書参照)

- 1 TEM の立ち上げ、標準ホルダーを取り外す
- 2 ACD に液体窒素を充填する(観察窓に蓋をし、テーブルに緩衝材シートを被せる(写 真)

(以後、定期的に補充する)



グリッドの親水化処理

(親水化時間は通常 30 秒に設定してある、変更した場合は元に戻しておくこと)

- 1 HD Treatment の電源を ON にし、支持膜側を上面にして中央付近に載せる
- 2 O-リングを挟まないようにチャンバーを押し付ける>親水化処理終了後チャンバーが 少し浮く



<u>クライオ TEM 試料作製</u>

1 EM GP2 本体立ち上げ



2 超純水と液体窒素の充填



3 グリッドホルダーのセット(液体窒素を充填する)







4 冷媒コンテナをセットし液化エタンを充填する



5 グリッドを挟んだピンセットのセット(向かって左側が上面)



6 ろ紙をセットし LOAD SPECIMEN、グリッドにサンプルを塗布



7 BLOT>TRANSFER>グリッド&ピンセットの取り外し、グリッドホルダーに移す



8 グリッドホルダーを液体窒素中で保管する

クライオホルダーへのグリッドの装填

- 1 クライオホルダーの黒い栓を閉じる
- 2 スイッチを押し SHUT DOWN する
- 3 SHUT DOWN ランプが点灯したらシリコンチューブを外し、クライオホルダーをクラ イオワークステーションにセットする(シャッターを開けて前利用者のグリッドが残 っていないか確認し、残っていた場合はグリッドを取り出す)







4 温度コントローラーのコネクターを接続し、Cryo Transfer モードにする



5 クライオホルダー、クライオワークステーションの冷却(上面までひたひたにする、適 宜注ぎ足す)



6 -170°C程度になったらグリッドホルダーをクライオワークステーションにセットする (グリッドホルダーが常に液体窒素に浸っている状態にする)



- 7 シャッターを開ける(凍ってしまって開かない場合は作業を中断する)
- 8 ホルダーを奥に傾けて液体窒素を回収する(紙コップを準備)
- 9 専用の治具を使いホルダー先端部の試料押さえバネを開ける(この状態でホルダーを 引き抜かない、シャッターを閉じない)



- 10 試料押さえバネの間に滑り込ませるようにグリッドをセットする
- 11 専用の治具を使いホルダー先端部の試料押さえバネを閉じる(**凍ってしまって閉じな** い場合作業を中断する)
- 12 シャッターを閉じる(閉まらない場合作業を中断する、シャッターをピンセット等で無 理に動かさないこと)
- 13 クライオホルダーを本体にセットする
- 14 TEM モニタのソフトウェア上でクライオホルダーを選択する (Specimen→G698 GATAN ELSA HOLDER: Cryo Transfer Holder→OK)
- 15 TEMのテーブルに緩衝材シートを被せ保護する>クライオホルダーに液体窒素を充填



- 16 温度コントローラーの細いコネクターを接続する
- 17 シャッターを開ける

観察

- 1 GATAN OneView を起動する
- 2 Filament をオンにする
- 3 MDS を使用して撮影する
- 4 MDS Photo をクリックする(Photo > Search > Focus > Photo の順番を崩さない)
- 5 Photo モードの倍率(×10k~×60k程度)、明るさ(1~100e⁻/Å²)、照射領域(一つの孔より少し大きい程度)等の撮影条件を設定する、電流軸、非点補正も行う
- 6 Search モードにし、倍率(×2k以下程度)、明るさ(できるだけ暗く)、照射領域(ビ ームを最大に開く)等を設定する
- 7 Photo モードと Search モード両方で確認できる物を見つけ、Photo モードで視野中心 に移動する
- 8 Search モードで目標物を確認し、ずれがある場合 Alignment Panel「PLA」をオンにし DEF/STIG X, Y ノブで視野中心に移動する
- 9 孔の中心に移動し、Focus モードにする
- 10 Focus モードの倍率 (Photo モードと同じか少し高い倍率)、明るさ、照射領域等を設 定する
- 11 Alignment Panel 「Image Shift」をオンにする
- 12 Shift X, Y ノブで電子線を焦点合わせのための視野に動かす

- 13 DEF/STIG X, Y ノブでビームが当たっている領域を視野中心に移動する (Photoset モードの照射領域、周囲の孔にビームが当たらないようにする)
- 14 Search>Focus>Photo を何度か繰り返し、ビームの逃げ、視野ずれを最小限にする
- 15 Search モードで観察視野を探し、Focus モードで焦点を合わせる
- 16 View を止め Photo モードに切り替えてから Capture を行う

終了操作

- 1 ホルダー取り出し(手前に傾けるとき液体窒素がこぼれるので紙コップで回収する)
- 2 クライオワークステーションにセットしグリッドを取り出す
- 3 液化エタンコンテナは発泡スチロール容器に入れ、準備室1のドラフトへ運び、気化さ せる
- 4 超純水を抜き出す
- 5 EM GP2 の顕微鏡を左側に移動させ、扉を開けて SETTING から Bake Out を実行す る
- 6 ホルダーをステーションに挿して温度コントローラーのコネクターを接続
 →mode→Warm Up
- 7 ACD に $\varphi \delta \pi \psi$ が 得止し 2 時間 30 分後に自動で復旧する)