

冷冻电镜低温低湿上样工作台的研发

饶桂波

(中国科学院 武汉病毒研究所 分析测试中心, 湖北 武汉 430071)

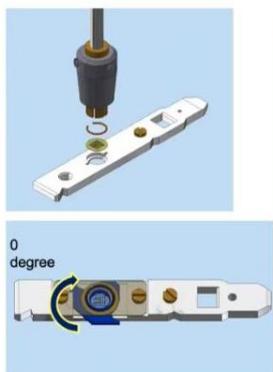
摘要: 冷冻电子显微镜技术是解析生物大分子高分辨率结构信息的主要方法之一, 于 2017 年获得诺贝尔化学奖。该技术是通过快速冷冻, 将生物大分子固定在玻璃态冰层中, 然后利用冷冻透射电镜采集样品图像信息, 通过三维重构算法处理图像, 解析生物大分子的结构信息。该技术主要用于研究生物大分子的工作机制, 筛选及优化作用于大分子的抗体及小分子药物等。

关键词: 冷冻电镜;低温低湿;上样

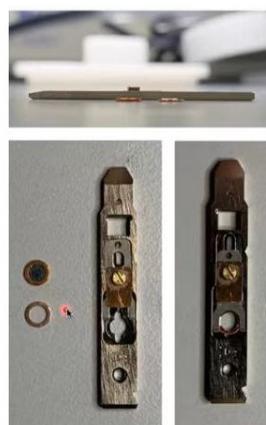
冷冻电镜在样品制备上相较于其他结构解析手段具有显著优势。其通过将生物样品平铺在 3 mm 直径载网上, 形成厚度几十至几百纳米的薄层溶液, 然后迅速插入到-183 °C液态乙烷中进行快速冷冻。液态乙烷具有高热容、高热导和高沸点等特点, 可以在极短的时间内, 将样品水溶液冷冻成玻璃态冰层, 从而将样品以近天然的状态固定在玻璃态冰层里。然后, 利用冷冻透射电镜采集大量随机分布于玻璃态冰层中的生物分子图像, 进而解析大分子结构。

通过快速冷冻制备的样品, 在进入冷冻电镜观察前, 需要固定在特定的装置 Cartridge 上, 如下图 1 所示, 然后通过冷冻电镜自动进样系统, 将样品载网转移到冷冻电镜样品台上观察。冷冻电镜自动进样系统, 最多可以同时存放 12 个固定有载网的 Cartridge。将直径 3 mm 的载网固定到 Cartridge 上是一个比较精细的操作, 为了防止样品冰层升温融化, 从而再结晶, 全程是在-196 °C的液氮中完成的, 操作过程中需要清楚看到液氮中载网状态, 这就要求操作的液氮面较低, 刚好可以淹没过移动中的载网。将多达 12 个样品载网, 合格的固定在 Cartridge 上, 需要操作大概 40 分钟到 1 小时 (根据操作人员的熟练程度)。在这么长的时间里, 液氮与空气的界面和操作所用的工具, 由于低温, 会将周围空气中的水分冷冻成冰晶引入到液氮里或者吸附在操作工具上, 从而在固定载网过程中将冰晶带到样品上。载网上聚集的大量冰晶, 会覆盖样品冰层, 使样品不能用于高分辨率图像采集, 即使样品冰层只有少量冰晶存在, 也会干扰数据自动采集软件的正常运行, 影响采集数据的质量。

- Single tilt & dual axis tilt
- AutoGrids-compatible



Regular cartridges



AG-compatible cartridges

图1 样品装载装置 Cartridge

为了降低样品冰晶污染，应该尽可能降低操作环境湿度，减少含水量。空气中湿度的表示方法有多种：相对湿度、绝对湿度、露点及湿气与干气的比值等。日常生活中我们常用相对湿度表示空气中的湿度。相对湿度是指空气中的水汽压和相同温度下饱和水汽压的百分比。饱和水汽压是指一定温度下，单位容积空气中所能容纳的水汽量的最大限度。如果超过这个限度，多余的水蒸气就会凝结，形成水滴。空气的饱和水汽压不是固定不变的，它随着温度的变化而变化。温度越低，单位容积空气中能容纳的水蒸气就越少，饱和湿度就越小。因此降低环境温度，同时降低相对湿度，可以降低空气含水量。

为了降低样品冰晶污染几率，目前的做法是对整个样品装载房间进行除湿。为了减少样品转移距离，通常样品装载在冷冻电镜主机室完成。冷冻电镜主机室一般比较高，房间层高约4米，面积约50平方米。将这么大空间的环境湿度降下来是很有挑战性的，尤其对坐落于武汉这个全年平均湿度在70%以上的电镜室。武汉病毒研究所郑店园区电镜室，三面环山，周围又有湖泊，全年平均湿度更高，在5-7月份的雨季，环境湿度甚至达到100%。我们利用新风除湿系统，外加内循环除湿机，也只能将环境湿度保持在50%左右。在这个环境湿度下操作上样，会发生明显的冰晶污染，如下图2所示。

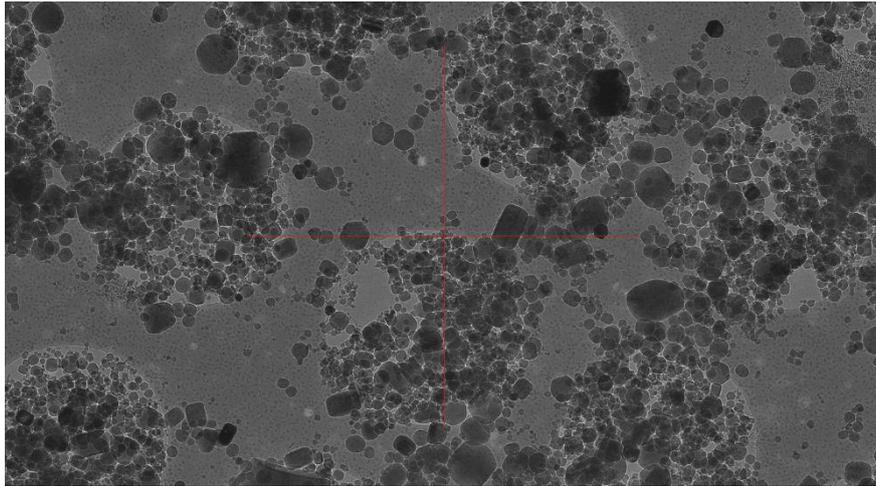


图2 样品载网上污染的冰晶

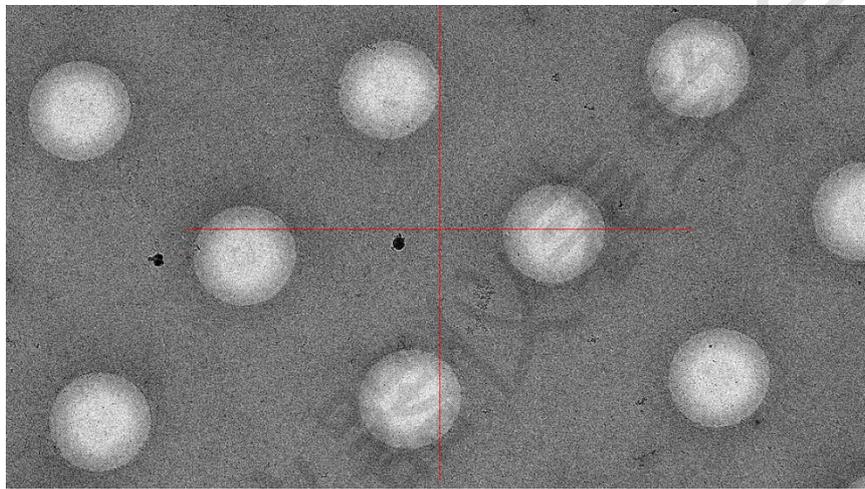
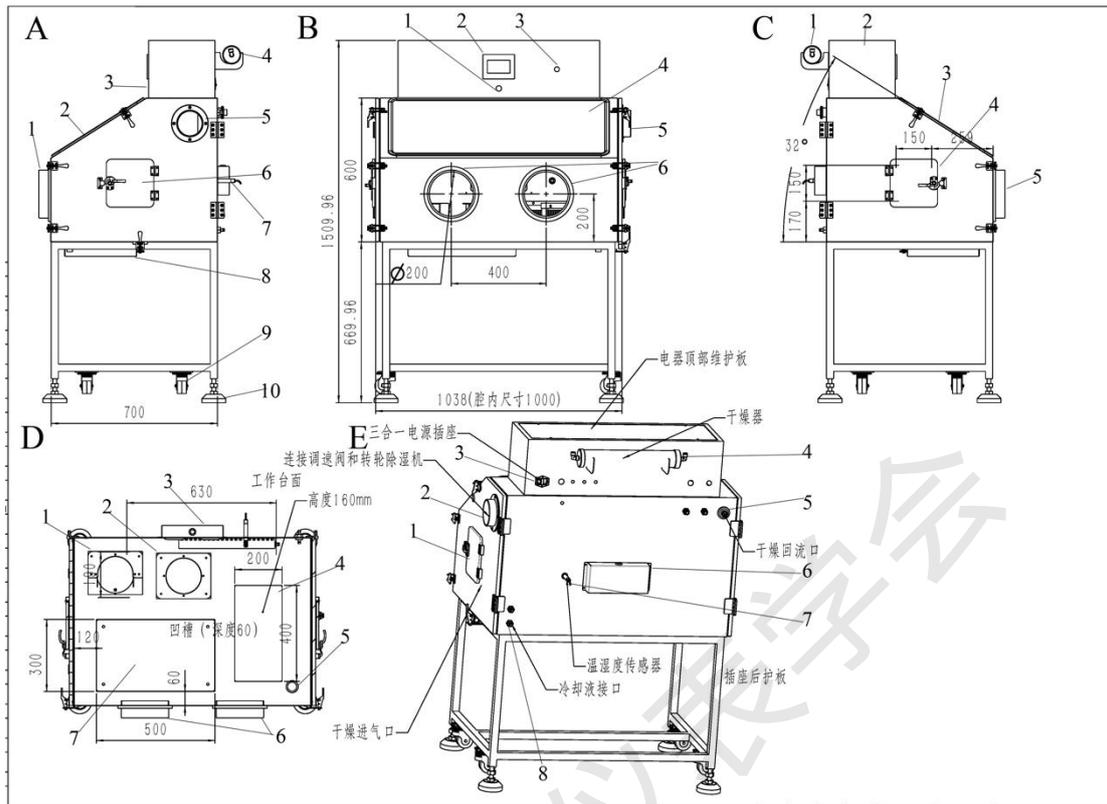


图3 没有污染的样品载网

目前冷冻电镜常用 Multishot 采集策略，其要求样品尽可能干净，如图3所示，像图2那样被冰晶污染的样品，将很难采集到高质量的数据。为此，我们设计一个控温控湿的，用于冷冻电镜样品装载的工作台。市面上目前还没有类似的产品，我们设计的这个工作台将极大的降低电镜样品装载中污染的发生。在结构设计上，首先满足控温和控湿的功能需要，具备温湿度检测、压力检测，气流检测和回温烘干功能，同时能够兼容冷冻电镜样品装载的操作的使用场景，搭配各种台面和照明光源，将极大的方便样品装载操作。除了操作袖口，工作台腔体是密闭的。首先用转轮除湿机将操作台腔体内的相对湿度降到20%以下，同时通过温控装置，将空气温度降到25℃以下，降低空气饱和湿度，再通过内部的循环除湿系统，在保证最小气流扰动的情况下（不影响冷冻上样台里的液氮气氛），将湿度保持在15%以下。经测试在这个低温低湿工作台内完成样品装载，可以极大的减少样品冰晶污染。低温低湿工作台结构设计上，充分考虑了人机工程，可以很方便的完成样品载网的安装固定，整个操作

步骤比较流畅。



经过反复修改，最后成品如下图所示。



