

冷冻电镜铺碳膜装置

田原

(中国科学院上海巴斯德研究所 公共技术服务中心电镜平台, 上海 200031)

摘要: 简要介绍了一种冷冻电镜铺碳膜装置。

关键词: 冷冻电镜铺碳膜装置

1 背景和意义

冷冻电镜是当下生物结构学领域最重要的仪器之一, 利用冷冻透射电镜解析单颗粒样品三维结构是当下最热门的生物学研究领域之一。

在电镜学科发展起来后, 科研人员对各种蛋白样品进行结构解析, 将各类蛋白逐一进行了尝试, 解析出一大批蛋白的结构, 使生物结构学的意义凸显出来。这些结构的解析, 帮助我们深入理解蛋白质如何在生命活动中完成复杂的工作, 如何通过构象变化、特异位点的识别完成特异精准的反应, 进而为了解人类、了解生命开辟道路, 更为寻找疾病根源、设计新药提供结构基础。

虽然如此, 但对于很多结构不稳定, 构象复杂的大蛋白, 科研人员无法顺利的解析结构。也恰恰是这些复杂的大蛋白复合物担负着最重要、最核心的作用, 有着最精准、最细微的调节, 而这也是生命科学的研究方向。

在这些课题中, 在载网上铺薄的连续碳膜, 有助于得到质量更高的冷冻样品。在制备样品所用的支撑载网上, 铺上一层薄的连续碳膜, 用来吸附样品颗粒, 既可以使样品远离气液界面的破坏, 在一定程度上固定样品颗粒中的柔性部分; 同时对样品颗粒起到支撑作用, 防止样品颗粒受到挤压。这样可以保证样品颗粒在玻璃态冰中的稳定存在, 提升样品的均一性等级, 得到更高的分辨率, 这也是被认为在冷冻电镜中最关键的点。

2 原理和现状

所以我开发装置主要用于, 在电镜载网上铺碳膜(或者石墨烯材料)这一过程。

国内外铺碳膜的原理基本一致, 即先用镀膜仪利用电阻热蒸发镀膜原理, 将镀膜材料碳棒蒸发, 然后在云母片上, 形成连续薄膜; 然后将载着碳膜的云母片以合适角度缓慢放入水中, 使云母片沉入水中, 而碳膜浮在水面上; 接着调整碳膜位置, 使它们相互对齐, 然后

将水缓缓排出，水面下降，直至碳膜覆盖在水下的电镜载网上；将水排干，拿出铺上碳膜的载网，晾干，然后可以使用。

因为目前市面上没有专门的用来铺碳膜的仪器；多数课题组是手工铺碳膜，操作过程耗时较长，且成功率不是很高。

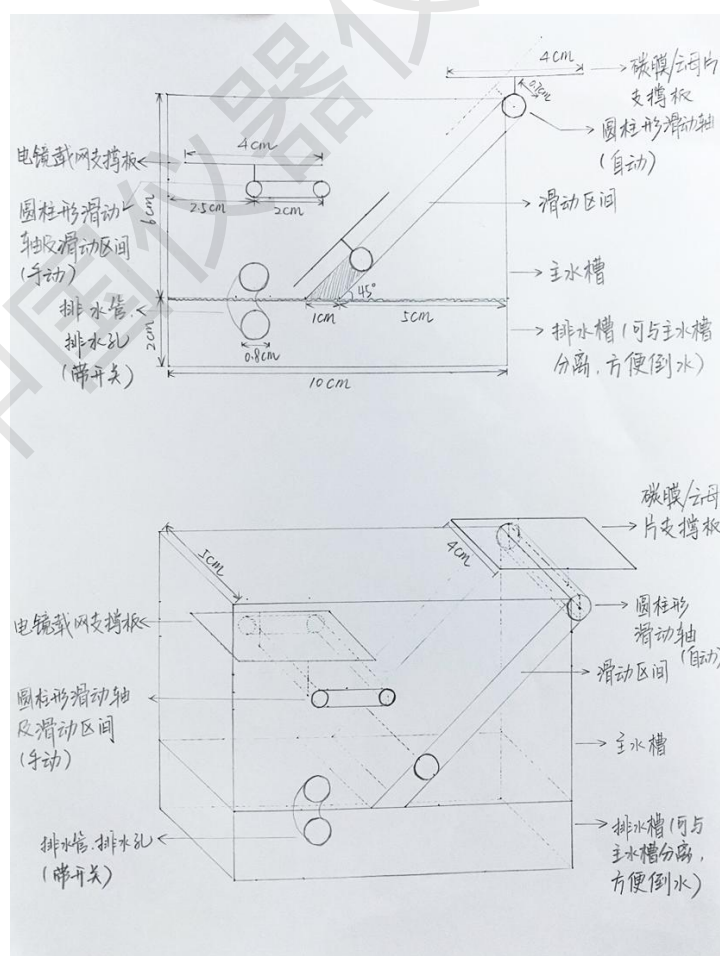
且市面上目前只有一种成品铺碳膜的载网和一种成品铺石墨烯的载网，均来自德国公司 Quantifoil。铺碳膜的载网成品价格 9000-10000 元/盒，100 个；铺石墨烯的载网成品价格 200-300 元/个。

每个利用冷冻电镜解析结构的课题，都要用几十个甚至上百个这样的载网，成本无疑是很高的；这些载网是进口而来，订货周期两三周到两三个月不等，尤其现在处于疫情期间，这类载网处于严重缺货状态；且由于质量没有统一标准，批次间质量无法保证一样。

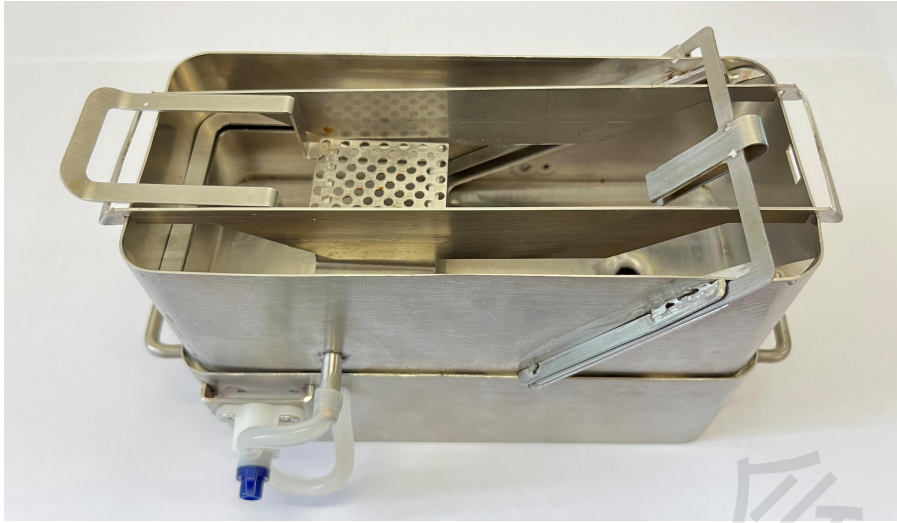
这个装置设计制作完成后，可以改善以上现状，方便电镜学科科研人员更好的利用电镜解析生物样本结构。

3 设计和成果

下图是铺碳膜装置最初的设计图：



经过多次的修改，最终形成实物，如下图：



本项目研发的半自动铺碳膜装置完成后，与手工铺碳膜相比，铺碳膜所用时间减少，成功率提高；购买碳棒、云母片等材料进行铺碳膜的价格，或者购买石墨烯液体的价格，远低于直接购买成品铺碳膜载网或者铺石墨烯载网的价格。节约科研活动的成本；使用这类电镜载网，不受进口限制，可以更快的推进科研项目；自己制作铺碳膜载网或铺石墨烯载网，可以更好的控制质量。

4 专业技术人才介绍

4.1 个人简介

2020年10月-至今，中国科学院上海巴斯德研究所，公共技术服务中心电镜平台，高级技术主管（高级工程师）

2014年9月-2020年8月，复旦大学，生物化学与分子生物学，研究生，博士，导师：徐彦辉

2010年9月-2014年7月，中国农业大学，生命科学，本科，学士

本人在博士研究生阶段，做了很多电镜相关课题，其中最具有代表性的一个课题 BAF-核小体复合物的高分辨结构，在使用未铺碳膜的载网解析蛋白结构时，总是因为蛋白颗粒容易碎掉以及灵活性较强，而不能得到高分辨结构。后来尝试使用铺碳膜的载网制样，蛋白颗粒碎掉的概率大幅度减少，同时碳膜帮助稳定蛋白构象。在铺碳膜载网的帮助下，很快确定了蛋白结构，为后续拿到高分辨结构奠定了基础，这项工作发表在 science 期刊，一作。

同时在博士研究生期间，自行制备了大量铺碳膜载网、用透射电镜检测这些载网的质量，并且使用载网制备冷样，然后解析结构，这推动了很多课题的进展。项目负责人熟悉铺碳膜工作的整个流程，并深知其中的关键步骤与技巧，也深知铺碳膜载网对蛋白颗粒的影响，在

此方面做过技术上的尝试，经验丰富。

4.2 专业技术研究方向

生物结构学，冷冻电镜

4.3 承担科技项目及代表论著

承担科技项目：

2021年9月获批“中国科学院仪器设备功能开发项目”，题目“电镜载网的半自动铺碳膜装置的开发和应用”，经费22.5万元。

2022年1月获批“2021年度中国科学院技术支撑人才项目”，经费30万元。

和复旦大学合作国家自然科学基金面上项目，“USP7通过去泛素化UHRF1/DNMT1调控DNA甲基化在肾脏纤维化中的作用机制研究”，获得经费55万元。

代表论著：

1. He S[#], Wu Z[#], **Tian Y[#]**, Yu Z, Yu J, Wang X, Li J, Liu B, Xu Y*. Structure of nucleosome-bound human BAF complex. *Science*. 2020 Feb 21;367(6480):875-881. doi: 10.1126/science.aaz9761. Epub 2020 Jan 30. (IF:41.846)
2. Feng Y[#], **Tian Y[#]**, Wu Z, Xu Y*. Cryo-EM structure of human SRCAP complex. *Cell Res*. 2018 Nov;28(11):1121-1123.
3. Chen X[#], Liu M[#], **Tian Y**, Li J, Qi Y, Zhao D, Wu Z, Huang M, Wong CCL, Wang HW, Wang J, Yang H*, Xu Y*. Cryo-EM structure of human mTOR complex 2. *Cell Res*. 2018 May;28(5):518-528.
4. Rao Q[#], Liu M[#], **Tian Y**, Wu Z, Hao Y, Song L, Qin Z, Ding C, Wang HW*, Wang J*, Xu Y*. Cryo-EM structure of human ATR-ATRIP complex. *Cell Res*,2018,28(2):143-156.
5. Yin X[#], Liu M[#], **Tian Y**, Wang J, Xu Y*. Cryo-EM structure of human DNA-PK holoenzyme. *Cell Res*,2017,27(11):1341-1350.

4.4 获奖及荣誉

2022年1月被中科院上海巴斯德研究所评为“2021年度优秀员工”

2022年3月8日被中科院上海巴斯德研究所授予“三八红旗手”称号。