



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110823931 A

(43)申请公布日 2020.02.21

(21)申请号 201910984577.3

(22)申请日 2019.10.16

(71)申请人 中国科学院生物物理研究所  
地址 100101 北京市朝阳区大屯路15号

(72)发明人 章新政 吴春玲 石会刚

(74)专利代理机构 北京中强智尚知识产权代理  
有限公司 11448

代理人 黄耀威

(51)Int.Cl.

G01N 23/2005(2018.01)

G01N 1/42(2006.01)

G01N 23/20(2018.01)

G01N 23/04(2018.01)

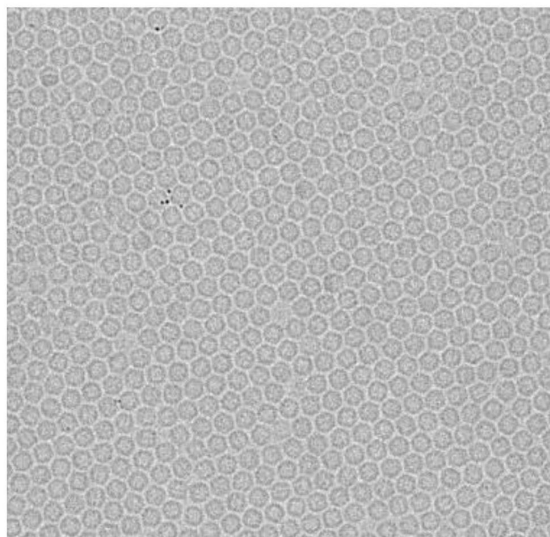
权利要求书1页 说明书6页 附图3页

(54)发明名称

一种冷冻电镜样品制备方法

(57)摘要

本发明提供了一种冷冻电镜样品制备方法,步骤如下:预先设置冻样装置的湿度、温度和吸水时间并更换干燥滤纸;向冻样装置内加入液氮使后续加入到冻样装置内的气态乙烷或/和丙烷液化为 $-160^{\circ}\text{C}^{-}40^{\circ}\text{C}$ 液态乙烷或/和丙烷;用镊子夹取预处理的冷冻载网,将镊子固定在冻样装置的冻样杆上,在冷冻载网上添加含水样品使含水样品在冷冻载网上形成超薄液膜;通过提高所述液态乙烷或/和丙烷与形成液膜的冷冻载网的相对运动速率来提高冷却速率对冷冻载网上的液膜进行冷冻,使液膜中的水在 $-160^{\circ}\text{C}^{-}40^{\circ}\text{C}$ 条件时在冷冻载网上形成高温玻璃态水,将样品包埋在玻璃态水中。本发明提供的冷冻电镜样品制备方法,能够更容易获得更高质量冷冻样品。



1. 一种冷冻电镜样品制备方法,其特征在于,包括如下步骤:  
预先设置冻样装置的湿度、温度和吸水时间并更换干燥滤纸;  
向冻样装置内加入液氮预冷使后续加入到冻样装置内的气态乙烷或/和丙烷液化为 $-160^{\circ}\text{C}$ ~ $-40^{\circ}\text{C}$ 液态乙烷或/和丙烷;  
用镊子夹取预处理的冷冻载网,将镊子固定在冻样装置的冻样杆上,在冷冻载网上添加含水样品使含水样品在冷冻载网上形成超薄液膜;  
通过提高所述液态乙烷或/和丙烷与形成液膜的冷冻载网的相对运动速率来提高冷却速率对冷冻载网上的液膜进行冷冻,使液膜中的水在 $-160^{\circ}\text{C}$ ~ $-40^{\circ}\text{C}$ 条件时在冷冻载网上形成高温玻璃态水,将样品包埋在玻璃态水中;  
把包埋样品的冷冻载网放入液氮中保存待用。
2. 根据权利要求1所述的冷冻电镜样品制备方法,其特征在于:所述通过提高液态乙烷或/和丙烷与形成液膜的冷冻载网的相对运动速率来提高冷却速率对冷冻载网上的液膜进行冷冻,可把形成水膜的冷冻载网插入以1-50m/s的速度流动的所述液态乙烷或/和丙烷中进行冷冻。
3. 根据权利要求1所述的冷冻电镜样品制备方法,其特征在于:所述通过提高液态乙烷或/和丙烷与形成液膜的冷冻载网的相对运动速率来提高冷却速率对冷冻载网上的液膜进行冷冻,可使所述冻样杆以1-50m/s速度竖直下落、并在所述液态乙烷或/和丙烷中下落0.5-50cm的距离进行冷冻。
4. 根据权利要求1所述的冷冻电镜样品制备方法,其特征在于:所述通过提高液态乙烷或/和丙烷与形成液膜的冷冻载网的相对运动速率来提高冷却速率对冷冻载网上的液膜进行冷冻,可将所述冻样杆一端固定,连有镊子的另一端水平释放,使冻样杆靠自身重力或/和通过机械弹簧在冻样杆的固定端、或中间位置、或样品端竖直施加外力,实现冻样杆从水平位置开始在竖直平面内带动冷冻载网沿冻样杆的固定端做高速的圆周运动,使冷冻载网划过所述液态乙烷或/和丙烷进行冷冻。
5. 根据权利要求2-4所述的冷冻电镜样品制备方法,其特征在于:所述液态乙烷或/和丙烷的温度也可为 $-180^{\circ}\text{C}$ ~ $-160^{\circ}\text{C}$ 。
6. 根据权利要求1所述的冷冻电镜样品制备方法,其特征在于:所述通过提高液态乙烷或/和丙烷与形成液膜的冷冻载网的相对运动速率来提高冷却速率对冷冻载网上的液膜进行冷冻,可对冻样装置的制样室或对所述冷冻载网施加10-2100bar的压强对置于所述液态乙烷或/和丙烷中的冷冻载网上的液膜进行冷冻。
7. 根据权利要求1所述的冷冻电镜样品制备方法,其特征在于:所述通过提高液态乙烷或/和丙烷与形成液膜的冷冻载网的相对运动速率来提高冷却速率对冷冻载网上的液膜进行冷冻,可向所述形成液膜的冷冻载网上以10-200m/s的速度喷射所述液态乙烷或/和丙烷进行冷冻。
8. 根据权利要求3和4所述的冷冻电镜样品制备方法,其特征在于:所述镊子尖端细长,其尖端长1-10cm,宽0.01-0.5cm。

## 一种冷冻电镜样品制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及透射电镜样品制备技术领域,特别涉及一种冷冻电镜样品制备方法。

### 背景技术

[0002] 冷冻电镜技术是利用透射电子显微镜对包埋在低温玻璃态冰中样品进行成像和结构解析的技术。20世纪80年代, Jacques • Dubochet博士发现利用液态乙烷可将快速插入的超薄生物样品(小于1微米)包埋在玻璃态冰中。该样品制备技术将生物样品包埋在低温玻璃态冰中,使得生物样品在近生理环境中成像同时能够减轻辐照损伤对生物样品的影响。低温虽然能减轻电子对生物样品的辐照损伤,但并不能完全抑制辐照损伤。在冷冻电镜单颗粒三维重构技术的数据收集过程中,生物样品受高能电子的照射,在前 $3^{-4} e^{-}/\text{\AA}^2$ 时会经历一个被称为rapid“burst”的电子束引起的样品漂移阶段,在这个阶段样品漂移速度很快以至于无法使用现有的矫正软件来矫正,进而大大降低了该阶段数据的质量而得不到此阶段的高分辨结构。但是前 $3^{-4} e^{-}/\text{\AA}^2$ 的样品却又是受电子辐照损伤最小的,包含样品最多的结构信息。由于此阶段电子束引起的剧烈的漂移现象,目前还没有任何有效的办法来获得前 $3^{-4} e^{-}/\text{\AA}^2$ 的高分辨信息。

### 发明内容

[0003] 本发明所要解决的技术问题是提供一种能够更容易获得更高质量冷冻样品的冷冻电镜样品制备方法。

[0004] 为解决上述技术问题,本发明提供了一种冷冻电镜样品制备方法,包括如下步骤:

[0005] 预先设置冻样装置的湿度、温度和吸水时间并更换干燥滤纸;

[0006] 向冻样装置内加入液氮预冷使后续加入到冻样装置内的气态乙烷或/和丙烷液化为 $-160^{\circ}\text{C}^{-} - 40^{\circ}\text{C}$ 液态乙烷或/和丙烷;

[0007] 用镊子夹取预处理的冷冻载网,将镊子固定在冻样装置的冻样杆上,在冷冻载网上添加含水样品使含水样品在冷冻载网上形成超薄液膜;

[0008] 通过提高所述液态乙烷或/和丙烷与形成液膜的冷冻载网的相对运动速率来提高冷却速率对冷冻载网上的液膜进行冷冻,使液膜中的水在 $-160^{\circ}\text{C}^{-} - 40^{\circ}\text{C}$ 条件时在冷冻载网上形成高温玻璃态水,将样品包埋在玻璃态水中;

[0009] 把包埋样品的冷冻载网放入液氮中保存待用。

[0010] 进一步地,所述通过提高液态乙烷或/和丙烷与形成液膜的冷冻载网的相对运动速率来提高冷却速率对冷冻载网上的液膜进行冷冻,可把形成水膜的冷冻载网迅速插入以1-50m/s的速度流动的所述液态乙烷或/和丙烷中进行冷冻。

[0011] 进一步地,所述通过提高液态乙烷或/和丙烷与形成液膜的冷冻载网的相对运动速率来提高冷却速率对冷冻载网上的液膜进行冷冻,可使所述冻样杆以1-50m/s速度竖直下落、并在所述液态乙烷或/和丙烷中下落0.5-50cm的距离进行冷冻。

[0012] 进一步地,所述通过提高液态乙烷或/和丙烷与形成液膜的冷冻载网的相对运动速率来提高冷却速率对冷冻载网上的液膜进行冷冻,可将所述冻样杆一端固定,连有镊子的另一端水平释放,使冻样杆靠自身重力或/和通过机械弹簧在冻样杆的固定端、或中间位置、或样品端竖直施加外力,实现冻样杆从水平位置开始在竖直平面内带动冷冻载网沿冻样杆的固定端做高速的圆周运动,使冷冻载网划过所述液态乙烷或/和丙烷进行冷冻。

[0013] 进一步地,所述液态乙烷或/和丙烷的温度也可为 $-180^{\circ}\text{C}$ ~ $-160^{\circ}\text{C}$ 。

[0014] 进一步地,所述通过提高液态乙烷或/和丙烷与形成液膜的冷冻载网的相对运动速率来提高冷却速率对冷冻载网上的液膜进行冷冻,可对冻样装置的制样室或对所述冷冻载网施加10-2100bar的压强对置于所述液态乙烷或/和丙烷中的冷冻载网上的液膜进行冷冻。

[0015] 进一步地,所述通过提高液态乙烷或/和丙烷与形成液膜的冷冻载网的相对运动速率来提高冷却速率对冷冻载网上的液膜进行冷冻,可向所述形成液膜的冷冻载网上以10-200m/s的速度喷射所述液态乙烷或/和丙烷进行冷冻。

[0016] 进一步地,所述液态乙烷或/和丙烷的温度为 $-160^{\circ}\text{C}$ ~ $-40^{\circ}\text{C}$ 。

[0017] 进一步地,所述镊子尖端细长,其尖端长1-10cm,宽0.01-0.5cm。

[0018] 本发明提供一种冷冻电镜样品制备方法,通过提高冻样温度以及增加降温速率来获得更高温度的玻璃态冷冻样品,这种高温玻璃态的冷冻样品会大大减弱前 $3^{-4} \text{e}^{-}/\text{\AA}^2$ 阶段的电子束引起的剧烈的样品漂移现象,进而可获得生物冷冻样品在前 $3^{-4} \text{e}^{-}/\text{\AA}^2$ 的高分辨结构。前 $3^{-4} \text{e}^{-}/\text{\AA}^2$ 数据的恢复也使得数据整体的分辨率提升,且和一般低温样品相比高温样品相当于增加了60%的数据量。同时,高温玻璃态冷冻样品的性质也显著高于一般低温玻璃态样品。但是用现在的冷冻电镜样品制备设备和技术很难获得需要的高温玻璃态冷冻样品,所以我们设计了多种高温样品的制备办法,用来更容易地获得更高质量的高温玻璃态冷冻样品。

## 附图说明

[0019] 图1为本发明实施例提供的在 $-110^{\circ}\text{C}$ 制备的人源铁蛋白的高温玻璃态冷冻样品图;

[0020] 图2为本发明实施例提供的在 $-110^{\circ}\text{C}$ 制备的人源铁蛋白的高温玻璃态冷冻样品的三维重构密度图;

[0021] 图3为本发明实施例提供的不同温度下制样得到的人源铁蛋白的分帧重构的分辨率信息图;

[0022] 图4为本发明实施例提供的高温下制备人源铁蛋白样品和一般低温制备的人源铁蛋白样品分别重构后的密度图比较;

[0023] 图5为本发明实施例提供的高温玻璃态冷冻样品的全部电子重构和去掉前三帧电子重构结果的b-因子分析图。

## 具体实施方式

[0024] 现在将参照附图来详细描述本发明的各种示例性实施例。应注意到:除非另外具

体说明,否则在这些实施例中提供的样品图片和数值不限制本发明的范围。

[0025] 同时,应当明白,为了便于描述,附图中所示出的各个部分的尺寸并不是按照实际的比例关系绘制的。

[0026] 以下对至少一个示例性实施例的描述实际上仅仅是说明性的,决不作为对本发明及其应用或使用的任何限制。

[0027] 对于相关领域普通技术人员已知的技术、方法和数据可能不作详细讨论,但在适当情况下,所述技术、方法和数据应当被视为说明书的一部分。

[0028] 本发明实施例提供一种冷冻电镜样品制备方法,在一般冷冻电镜样品制备流程的基础上,对冷冻剂、冷冻温度及冷冻速度进行了优化选择,本发明采用液态乙烷、或液态丙烷、或液态乙烷和丙烷的混合液做冷冻剂,通过提高冷冻剂的冷冻温度,并通过加快冷冻剂和样品的相对运动速率来提高样品在高温制备时的冷却速率,从而更容易地获得了更高质量的高温玻璃态冷冻样品。其具体包括如下步骤:

[0029] 首先,选取合适的冷冻载网,一般选用的冷冻载网的厚度在3.5mm左右,对冷冻载网选择合适的放电条件使冷冻载网带上特定电荷而具有亲水性质。选用合适的冻样装置,例如可以选择EMGP或Gatan cryo plunge等冻样仪,提前设置好冻样装置的湿度、温度和吸水时间,并更换干燥滤纸。

[0030] 然后,向冻样装置中加入液氮对冻样装置进行预冷,待冻样装置的温度降到所需温度时,在冻样装置中加入气态乙烷、或气态丙烷、或气态乙烷和气态丙烷的混合物,使其在低温液化。等液态乙烷、或液态丙烷、或液态乙烷和丙烷混合液的温度达到 $-160^{\circ}\text{C}$ ~ $-40^{\circ}\text{C}$ 即可开始制样。

[0031] 制样时,用镊子夹取带有特定电荷的冷冻载网,然后将镊子固定在冻样装置内的冻样杆的指定位置,再通过手动在冷冻载网上加入3微升的含水样品,作为本发明的具体实施方式,含水样品在此使用的是含水的人源铁蛋白。通过提前设置好的湿度、温度和吸水时间用滤纸把含水样品多余的水分吸干,使样品溶液在载网上只剩一层纳米量级的超薄液膜。

[0032] 经研究发现,含水样品的降温速率会影响样品最终形成的相态。如果缓慢降温,含水样品会以晶体冰的形式固化;如果降温速率足够快,含水样品将形成玻璃态冰。因此提高生物样品的降温速率可以在更容易制备高温玻璃态冷冻样品。常温状态下的生物样品和低温冷冻剂接触的时候会使冷冻剂局部升温,且冷冻剂在接触温度相对高的样品时会在接触面迅速汽化产生莱顿弗罗斯特效应,而降低样品的降温速率。因此,为了提高样品的降温速率,在冷冻载网上加入样品后,通过提高 $-160^{\circ}\text{C}$ ~ $-40^{\circ}\text{C}$ 液态乙烷或/和丙烷与形成液膜的冷冻载网的相对运动速率来提高冷却速率对冷冻载网上的液膜进行冷冻,使液膜中的水在冷冻载网上形成高温玻璃态水,将样品包埋在玻璃态水中。

[0033] 作为本发明的一种具体实施方式,为了提高液态乙烷或/和丙烷与形成液膜的冷冻载网的相对运动速率以提高样品的冷却速率,先将 $-160^{\circ}\text{C}$ ~ $-40^{\circ}\text{C}$ 的液态乙烷或/和丙烷盛装在冷冻剂承载装置中,并使液态乙烷或/和丙烷在冷冻剂承载装置中以1-50m/s的速度流动,然后把形成水膜的冷冻载网迅速插入以1-50m/s的速度流动的液态乙烷或/和丙烷中进行冷冻。通过将形成水膜的冷冻载网快速插入流动的液态乙烷或/和丙烷中,流动的冷冻剂可以带走样品传递出来的热量,使样品一直接触到冷的冷冻剂,从而提高了样品的降温

速率,可使液膜中的水迅速在冷冻载网上形成高温玻璃态水,可获得更高质量的高温玻璃态冷冻样品。此方法在液态乙烷或/和丙烷为 $-180^{\circ}\text{C}$ ~ $-160^{\circ}\text{C}$ 制备一般低温样品时也同样适用。

[0034] 作为本发明的另一种具体实施方式,为了提高液态乙烷或/和丙烷与形成液膜的冷冻载网的相对运动速率以提高样品的冷却速率,也可使冻样装置的冻样杆以 $1\text{--}50\text{m/s}$ 速度竖直下落、并在冷冻剂承载装置中的 $-160^{\circ}\text{C}$ ~ $-40^{\circ}\text{C}$ 的液态乙烷或/和丙烷中下落 $0.5\text{--}50\text{cm}$ 的距离进行冷冻。在增加样品在冷冻剂中的移动距离时,夹取冷冻载网的镊子浸没在冷冻剂中的部分自然也会增多,如果镊子的尖端较短,那么镊子尖端后部比较粗的部分会成为一个新的大热源去加热冷冻剂,进而降低样品的降温速率,影响高质量玻璃态冷冻样品的制备。为了使冻样杆以 $1\text{--}50\text{m/s}$ 速度竖直下落、并在冷冻剂承载装置的液态乙烷或/和丙烷中下落 $0.5\text{--}50\text{cm}$ 的距离过程中,能够获得更高质量的冷冻样品,将固定在冻样杆下部用于夹持冷冻载网的镊子的细长尖端的长设定为 $1\text{--}10\text{cm}$ ,宽设定为 $0.01\text{--}0.5\text{cm}$ 。这样镊子细长尖端会大大减少镊子浸没到冷冻剂中产生的热量。并且,为了保证冻样杆下落的深度,将冻样装置的冷冻剂承载装置设计为拥有合适内外直径,深度高达 $3\text{--}50\text{cm}$ 的筒形装置。通过加快样品的下落速度和延长样品的移动距离,可使样品一直接触新的冷冻剂,其降温速率随之提高,从而提高了样品的降温速率,可使液膜中的水迅速在冷冻载网上形成高温玻璃态水,获得更高质量的高温玻璃态冷冻样品。此方法在液态乙烷或/和丙烷为 $-180^{\circ}\text{C}$ ~ $-160^{\circ}\text{C}$ 制备一般低温样品时同样适用。

[0035] 作为本发明的另一种具体实施方式,为了提高液态乙烷或/和丙烷与形成液膜的冷冻载网的相对运动速率以提高样品的冷却速率,也可将冻样装置的冻样杆一端固定,将连有镊子的另一端水平释放,使冻样杆靠自身重力、或通过机械弹簧的弹力、或同时依靠冻样杆的自身重力和借助机械弹簧的弹力在冻样杆的固定端、或中间位置、或样品端部竖直施加外力,实现冻样杆从水平位置开始在竖直平面内带动冷冻载网沿冻样杆固定端做高速的圆周运动,使冷冻载网划过 $-160^{\circ}\text{C}$ ~ $-40^{\circ}\text{C}$ 的液态乙烷或/和丙烷对样品进行冷冻。为了使样品杆能在冷冻剂承载装置内做圆周运动而带动镊子上的冷冻载网做快速圆周运动,将冷冻剂承载装置的长设计为 $2\text{--}50\text{cm}$ ,宽设计为 $1\text{--}10\text{cm}$ ,高设计为 $2\text{--}10\text{cm}$ 。同时,还将镊子设计为拥有长 $1\text{--}10\text{cm}$ 、宽 $0.01\text{--}0.5\text{cm}$ 的细长尖端。这样冷冻载网上的样品在接触到冷冻剂时会产生很快的水平速度,样品会在冷冻剂中横向移动更远的距离,可使样品一直接触新的冷冻剂,其降温速率随之提高,从而提高了样品的降温速率,可使液膜中的水迅速在冷冻载网上形成高温玻璃态水,获得更高质量的高温玻璃态冷冻样品。此方法在液态乙烷或/和丙烷为 $-180^{\circ}\text{C}$ ~ $-160^{\circ}\text{C}$ 制备一般低温样品时同样适用。

[0036] 上述三种具体实施方式中,虽然也可采用与目前一般冷冻电镜样品制备流程中用到的较低温度(即 $-180^{\circ}\text{C}$ )的乙烷做冷冻剂,但上述三种具体实施方式中都通过提高样品的降温速率,使冷冻载网液膜中的水更迅速地在冷冻载网上形成玻璃态水,将冷冻载网上的样品迅速包埋在玻璃态水中,从而获得更高质量的玻璃态冷冻样品,提高了冷冻样品的质量。

[0037] 需要说明的是,以上三种具体实施方式仅为本发明在 $-180^{\circ}\text{C}$ ~ $-160^{\circ}\text{C}$ 或 $-160^{\circ}\text{C}$ ~ $-40^{\circ}\text{C}$ 的液态乙烷或/和丙烷中通过提高降温速率对样品进行冷冻的示例,本发明的实施例并不以此为限。本领域技术人员应当了解,只要是在 $-180^{\circ}\text{C}$ ~ $-160^{\circ}\text{C}$ 或 $-160^{\circ}\text{C}$ ~ $-40^{\circ}\text{C}$ 的液态

乙烷或/和丙烷中通过提高冷冻剂与冷冻载网的相对运动速率以提高降温速率对样品进行冷冻的方法均包含于本发明实施例。

[0038] 作为本发明的另一种具体实施方式,在提高液态乙烷或/和丙烷与形成液膜的冷冻载网的相对运动速率以提高样品的冷却速率的同时,本发明实施例还使用了喷射高温冷冻剂的方法,本发明实施例的具体措施是,向形成液膜的冷冻载网上以10-200m/s的速度喷射温度为 $-160^{\circ}\text{C}$ - $-40^{\circ}\text{C}$ 的液态乙烷或/和丙烷对液膜中的样品进行冷冻。高速的温度相对较高的冷冻剂可以打破莱顿弗罗斯特效应,并带走样品传递出来的热量,显著提高样品的降温速率,可使液膜中的水迅速在冷冻载网上形成高温玻璃态水,获得更高质量的高温玻璃态冷冻样品。

[0039] 与上述几种具体实施方式的原理有所不同的另一种具体实施方式,还可以为,在对冻样装置的制样室或对所述冷冻载网施加10-2100bar的压强的条件下,对置于 $-160^{\circ}\text{C}$ - $-40^{\circ}\text{C}$ 液态乙烷或/和丙烷中的冷冻载网上的液膜进行冷冻。通过对冷冻剂额外施加较高的压强来加快样品的降温速率,从而实现在更高温度下制备高质量的高温玻璃态冷冻样品。在此过程中,冷冻剂温度升高时冷冻载网的液膜中的水倾向于形成晶体冰,但额外施加的高压能抑制水的结晶,促进含水样品向玻璃态冰状态转化,从而可使液膜中的水迅速在冷冻载网上形成玻璃态水,获得更高质量的高温玻璃态冷冻样品。

[0040] 需要说明的是,以上两种具体实施方式仅为本发明在 $-160^{\circ}\text{C}$ - $-40^{\circ}\text{C}$ 的较高温度的液态乙烷或/和丙烷中通过提高降温速率对样品进行冷冻的示例,本发明的实施例并不以此为限。本领域技术人员应当了解,只要是在 $-160^{\circ}\text{C}$ - $-40^{\circ}\text{C}$ 的液态乙烷或/和丙烷中通过提高降温速率对样品进行冷冻的方法均包含于本发明实施例。

[0041] 在冷冻载网上的液膜中的水在冷冻载网上形成玻璃态水,将样品包埋在玻璃态水中后,再把包埋样品的冷冻载网放入 $-196^{\circ}\text{C}$ 的液氮中保存待用。

[0042] 本发明在 $-110^{\circ}\text{C}$ 制备的人源铁蛋白的高温玻璃态冷冻样品如图1所示,在 $-110^{\circ}\text{C}$ 制备的人源铁蛋白的高温玻璃态冷冻样品的三维重构密度如图2所示,图2其分辨率达到了 $1.88 \text{ \AA}$ 。

[0043] 参见图3,为本发明实施例在不同温度下制样得到的人源铁蛋白的分帧重构信息。从图3中可以看出,前几帧的数据的分辨率,高温下制备样品的性质明显好于一般 $-180^{\circ}\text{C}$ 制备的样品。并且,参见图4,冷冻电镜的照片是有一系列单帧的图对并加权齐叠加生成的。由于高能电子的辐照损伤,越靠前的帧辐照损伤越小(前 $3^{-4} \text{ e}^{-}/\text{\AA}^2$ ),越靠后的帧辐照损伤越大。但是前 $3^{-4} \text{ e}^{-}/\text{\AA}^2$ 帧的数据受电子束照射引起的剧烈漂移现象的影响,一般低温冷冻样品无法获得前几帧的数据,而且太靠后帧的数据由于辐照损伤非常严重,能用的信息很少,所以一般低温冷冻样品的数据主要来自于 $5^{-15} \text{ e}^{-}/\text{\AA}^2$ 的信息。通过本发明实施例高温下制备人源铁蛋白样品(frame2, frame5)和一般低温制备的人源铁蛋白样品(emd\_9599)分别重构后的密度图比较:图4中第5帧为 $-110^{\circ}\text{C}$ 下制备的高温玻璃态冷冻样品 $5^{-6} \text{ e}^{-}/\text{\AA}^2$ 的信息,其在一般低温冷冻样品中对整个图的贡献最大,所以第5帧的重构密度图与emd\_9599的重构密度图更接近,这验证了辐照损伤理论。而图4中第2帧为 $-110^{\circ}\text{C}$ 下制备的高温玻璃态冷冻样品 $1^{-2} \text{ e}^{-}/\text{\AA}^2$ 的信息,是辐照损伤理论中损伤最小的,但是一般低

温冷冻样品无法获得前 $3^{-4} \text{ e}^{-}/\text{\AA}^2$ 的信息。用我们高温冻样的方法第一次获得了生物冷冻样品在前 $3^{-4} \text{ e}^{-}/\text{\AA}^2$ 的高分辨结构(第2帧)。从图4中可以看出,第二帧的辐照损伤明显小于第五帧和一般的低温制备的样品。

[0044] 参见图5,分析比较高温玻璃态冷冻样品的全部电子重构和去掉前三帧电子重构结果的b-因子,已知去掉前三帧的重构等效于一般低温样品的数据。通过计算可以得到:高温玻璃态冷冻样品和一般低温样品相比相当于增加了60%的数据量。

[0045] 最后所应说明的是,以上具体实施方式仅用以说明本发明的技术方案而非限制,尽管参照实例对本发明进行了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的精神和范围,其均应涵盖在本发明的权利要求范围当中。



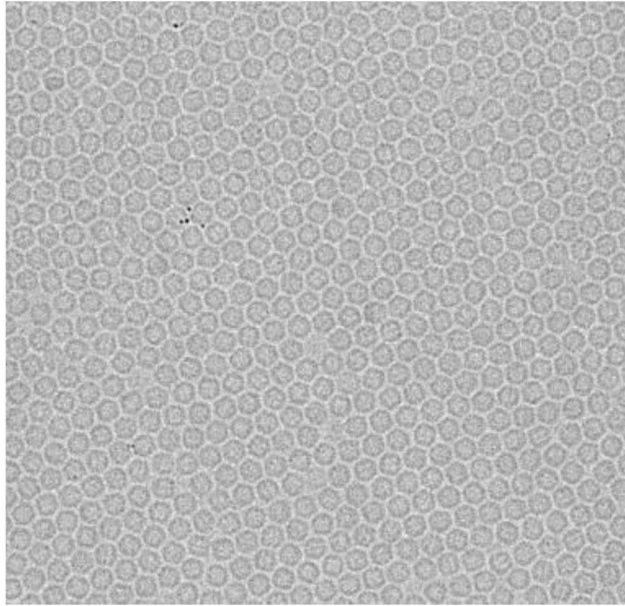


图1

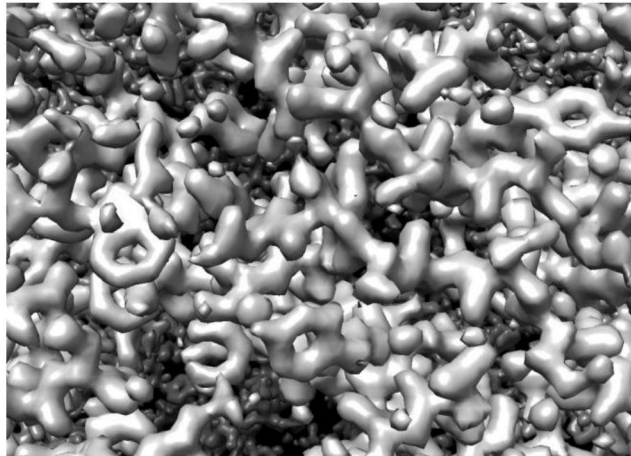


图2

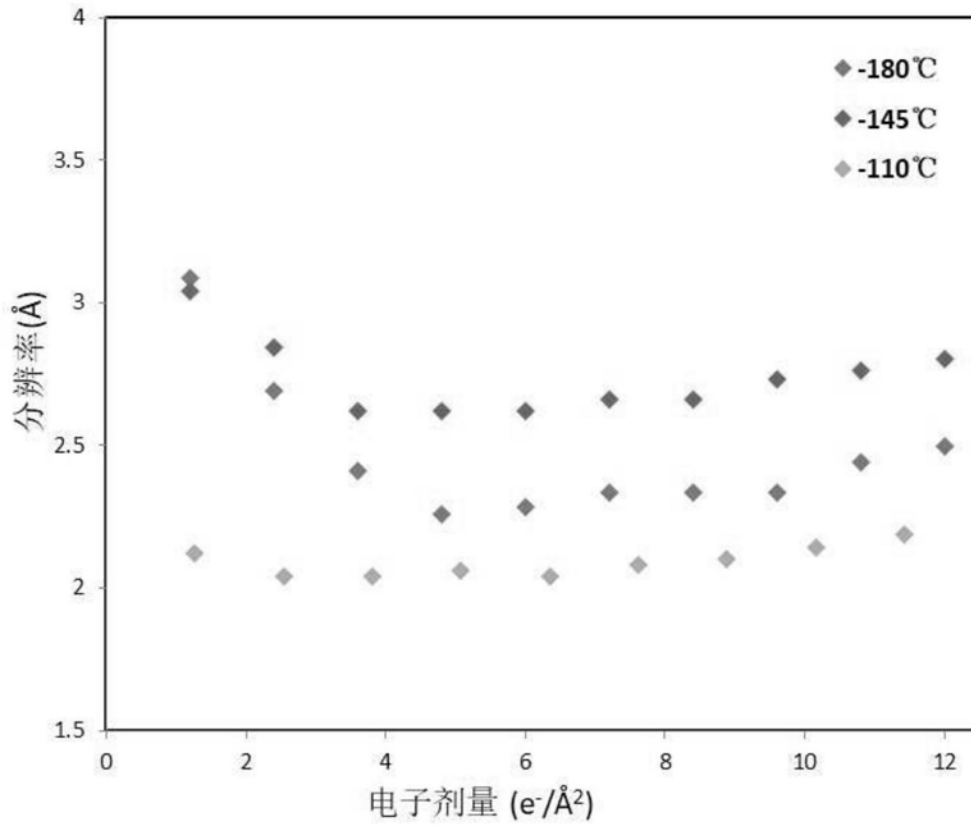


图3

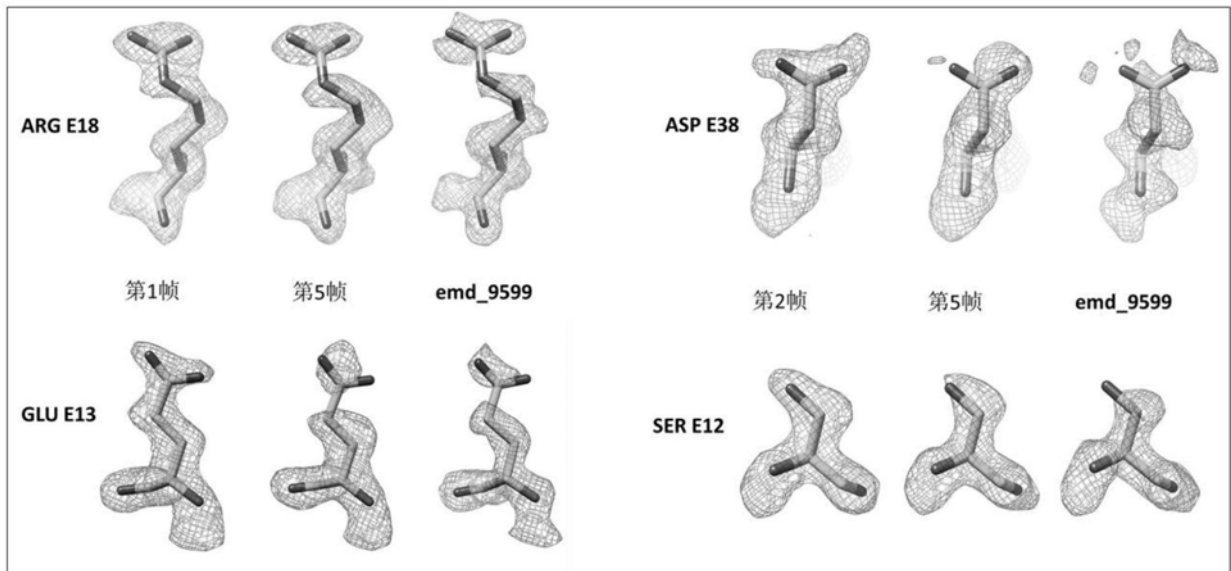


图4

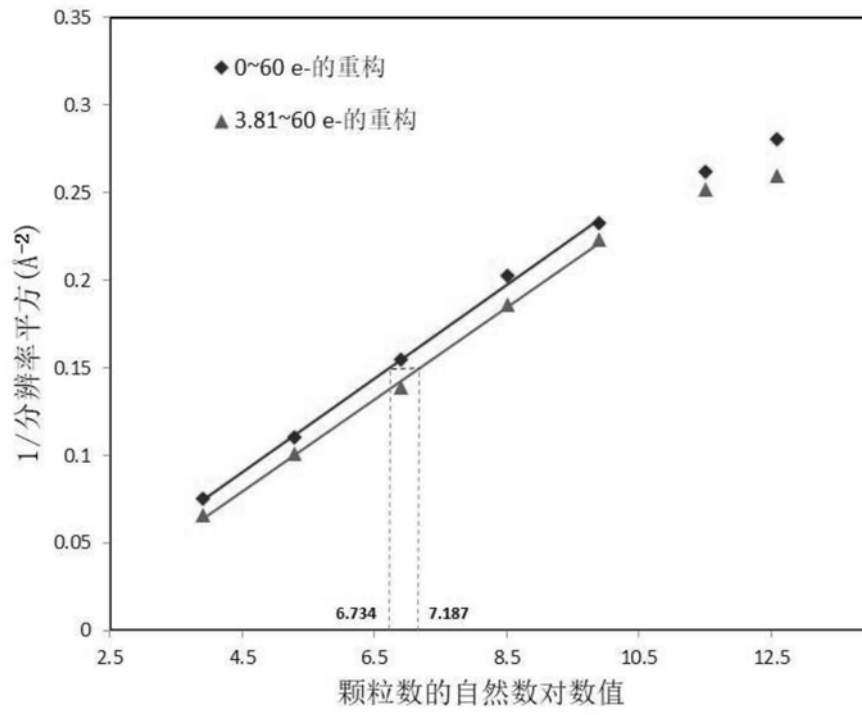


图5