



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111413356 A

(43)申请公布日 2020.07.14

(21)申请号 202010262909.X

(22)申请日 2020.04.07

(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 孙磊 张建国 张丹阳 季刚
徐伟 孙飞

(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 23/04(2018.01)

G01N 1/28(2006.01)

G01N 1/42(2006.01)

G01N 1/06(2006.01)

H01J 37/317(2006.01)

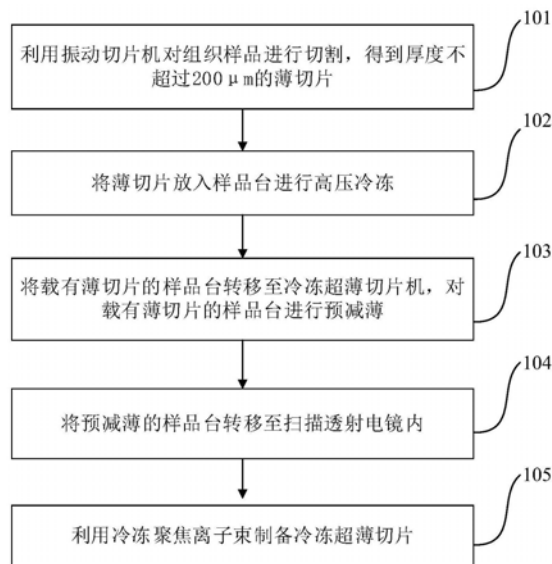
权利要求书2页 说明书5页 附图6页

(54)发明名称

一种冷冻超薄切片的制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种冷冻超薄切片的制备方法,包括:利用振动切片机对组织样品进行切割,得到厚度不超过200 μm的薄切片;将所述薄切片放入样品台进行高压冷冻;将载有薄切片的样品台转移至冷冻超薄切片机,对载有薄切片的样品台进行预减薄;将预减薄的样品台转移至扫描透射电镜内;利用冷冻聚焦离子束制备冷冻超薄切片。因此本公开制备的冷冻超薄切片厚度为200nm左右,不超过300nm,可以很好的满足扫描透射电镜成像的要求。



1. 一种冷冻超薄切片的制备方法,其特征在于,包括:

利用振动切片机对组织样品进行切割,得到厚度不超过200 μm 的薄切片;

将所述薄切片放入样品台进行高压冷冻;

将载有薄切片的样品台转移至冷冻超薄切片机,对载有薄切片的样品台进行预减薄;

将预减薄的样品台转移至扫描透射电镜内;

利用冷冻聚焦离子束制备冷冻超薄切片。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述将所述薄切片放入样品台进行高压冷冻包括:

将所述薄切片放置于现有样品台的空腔内;

用冷冻保护剂填充所述空腔;

在所述现有样品台上覆盖蓝宝石片后,送入至高压冷冻仪中进行冷冻;

所述将预减薄的样品台转移至扫描透射电镜内包括:

将所述预减薄的样品台在液氮中转移至适用于普通扫描透射电镜的冷冻样品转移梭中;

利用所述冷冻样品转移梭将所述预减薄的样品台送入至所述普通扫描透射电镜的真空腔中。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述将所述薄切片放入样品台进行高压冷冻包括:

将所述薄切片放置于样品台的空腔内,所述样品台包括底座和可拆卸的填充部件,所述底座为圆盘状结构,所述底座上设有凸沿,所述凸沿与底座围成用于容置样品的空腔;

用冷冻保护剂填充空腔;

利用所述填充部件对所述凸沿侧壁与底座之间形成的阶梯结构进行填充;

在所述样品台上覆盖蓝宝石片后,送入至高压冷冻仪中进行冷冻;

所述将预减薄的样品台转移至扫描透射电镜内包括:

将预减薄的样品台的填充部件取下;

将所述样品台的底座固定在上样环与上样底座之间,形成整体;

将所述整体放置在适用于带有自动进样系统的扫描透射电镜的冷冻样品转移梭中;

利用所述冷冻样品转移梭将所述整体送入至所述带有自动进样系统扫描透射电镜的真空腔中。

4. 根据权利要求2或3所述的方法,其特征在于,所述将载有薄切片的样品台转移至冷冻超薄切片机,对载有薄切片的样品台进行预减薄包括:

将载有薄切片的样品台在液氮中转移至冷冻超薄切片机,所述冷冻超薄切片机的温度在 -150°C 以下;

将所述蓝宝石片剥离,

利用冷冻钻石修刀将所述样品台及载有的薄切片修剪掉三分之一至二分之一,暴露出冷冻后的组织样品表面;

利用 90° 冷冻钻石修刀将暴露部分修薄至 $20\mu\text{m}$ 。

5. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述利用冷冻聚焦离子束制备冷冻超薄切片包括:

利用气体注入系统将样品的表面覆盖一层有机铂；

在所述有机铂的表面通过离子溅射覆盖一层金属铂；

利用冷冻聚焦离子束对选中区域的样品台上的样品进行减薄，所述冷冻聚焦离子束流强度随着切片厚度逐渐变薄而降低，切片减薄的方向为从样品台上下分别向中部推进，所述切片的切口为梯形；在样品减薄至2~3 μm 时，所述切片的一侧开设有缺口。

一种冷冻超薄切片的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及切片制备领域,特别涉及一种冷冻超薄切片的制备方法。

背景技术

[0002] 冷冻超薄切片是将冷冻后的样品加工成厚度在纳米级别的薄片,从而可以在透射电子显微镜上成像的电镜样品制备技术。对于生物样品来说,不经任何化学固定、仅仅用快速冷冻固定得到的含水化样品,能最大限度的保存样品的生理状态,可以进行原位结构的研究。但这种含水化的样品如果用通常的钻石刀进行超薄切片,无可避免的存在样品沿切割方向有压缩、切片表面刀痕严重、操作难度大切片难于收集等问题,无法广泛用于后续冷冻电镜的成像与数据收集。

[0003] 近十年来,冷冻聚焦离子束技术(cryo-focus ion beam,cryo-FIB)的兴起,有望解决冷冻含水超薄切片的制备问题。FIB可将冷冻后的含水化生物样品减薄成厚度合适的切片,用于透射电镜观察及电子断层成像。这样制备得到的生物样品,其状态更接近生理条件,解析的结构分辨率也更高。最终目的是原位解析生物大分子及分子机器的结构,从而在分子、细胞器、细胞等不同层次上阐述生命活动的本质。

[0004] 目前使用冷冻聚焦离子束技术对生物样品进行减薄大都采用细胞和细菌样品,这类样品体积在十几微米以内,可将它们通过投入式快速冷冻的方式固定,然后用冷冻聚焦离子束减薄后进行冷冻电镜成像。相较于细胞和细菌样品,组织样品中蛋白质复合物的状态更接近于生理条件,可以提供更加丰富的生物学信息。但是由于组织样品厚度过大,通常都在几百个微米左右,单纯的投入式快速冷冻无法冻透,后续的FIB减薄过程也更为困难,现有的投入式冷冻固定—FIB超薄切片—冷冻电镜方法路线无法得到能够解析组织结构的图像。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种冷冻超薄切片的制备方法,以解决现有的投入式冷冻固定—FIB超薄切片—冷冻电镜方法路线无法得到能够解析组织结构的图像的问题。

[0006] 根据本发明的实施例,提供了一种冷冻超薄切片的制备方法,包括:

[0007] 利用振动切片机对组织样品进行切割,得到厚度不超过200 μm 的薄切片;

[0008] 将所述薄切片放入样品台进行高压冷冻;

[0009] 将载有薄切片的样品台转移至冷冻超薄切片机,对载有薄切片的样品台进行预减薄;

[0010] 将预减薄的样品台转移至扫描透射电镜内;

[0011] 利用冷冻聚焦离子束制备冷冻超薄切片。

[0012] 具体地,所述将所述薄切片放入样品台进行高压冷冻包括:

[0013] 将所述薄切片放置于现有样品台的空腔内;

[0014] 用冷冻保护剂填充所述空腔;

- [0015] 在所述现有样品台上覆盖蓝宝石片后,送入至高压冷冻仪中进行冷冻;
- [0016] 所述将预减薄的样品台转移至扫描透射电镜内包括:
- [0017] 将所述预减薄的样品台在液氮中转移至适用于普通扫描透射电镜的冷冻样品转移梭中;
- [0018] 利用所述冷冻样品转移梭将所述预减薄的样品台送入至所述普通扫描透射电镜的真空腔中。
- [0019] 具体地,所述将所述薄切片放入样品台进行高压冷冻包括:
- [0020] 将所述薄切片放置于样品台的空腔内,所述样品台包括底座和可拆卸的填充部件,所述底座为圆盘状结构,所述底座上设有凸沿,所述凸沿与底座围成用于容置样品的空腔;
- [0021] 用冷冻保护剂填充空腔;
- [0022] 利用所述填充部件对所述凸沿侧壁与底座之间形成的阶梯结构进行填充;
- [0023] 在所述样品台上覆盖蓝宝石片后,送入至高压冷冻仪中进行冷冻;
- [0024] 所述将预减薄的样品台转移至扫描透射电镜内包括:
- [0025] 将预减薄的样品台的填充部件取下;
- [0026] 将所述样品台的底座固定在上样环与上样底座之间,形成整体;
- [0027] 将所述整体放置在适用于带有自动进样系统的扫描透射电镜的冷冻样品转移梭中;
- [0028] 利用所述冷冻样品转移梭将所述整体送入至所述带有自动进样系统扫描透射电镜的真空腔中。
- [0029] 具体地,所述将载有薄切片的样品台转移至冷冻超薄切片机,对载有薄切片的样品台进行预减薄包括:
- [0030] 将载有薄切片的样品台在液氮中转移至冷冻超薄切片机,所述冷冻超薄切片机的温度在 -150°C 以下;
- [0031] 将所述蓝宝石片剥离,
- [0032] 利用冷冻钻石修刀将所述样品台及载有的薄切片修剪掉三分之一至二分之一,暴露出冷冻后的组织样品表面;
- [0033] 利用 90° 冷冻钻石修刀将暴露部分修薄至 $20\mu\text{m}$ 。
- [0034] 具体地,所述利用冷冻聚焦离子束制备冷冻超薄切片包括:
- [0035] 利用气体注入系统将样品的表面覆盖一层有机铂;
- [0036] 在所述有机铂的表面通过离子溅射覆盖一层金属铂;
- [0037] 利用冷冻聚焦离子束对选中区域的样品台上的样品进行减薄,所述冷冻聚焦离子束流强度随着切片厚度逐渐变薄而降低,切片减薄的方向为从样品台上下分别向中部推进,所述切片的切口为梯形;在样品减薄至 $2\sim 3\mu\text{m}$ 时,所述切片的一侧开设有缺口。
- [0038] 本发明实施例提供了一种冷冻超薄切片的制备方法,首先对组织样品进行切割,得到厚度不超过 $200\mu\text{m}$ 的薄切片,再进行高压冷冻;由于高压冷冻壁快速冷冻的冷冻固定深度大的多,因此可以保证冷冻质量。然后预减薄步骤可提高冷冻超薄切片制备效率,避免耗费太多冷冻聚焦离子束的减薄时间;并且可暴露出组织样品,避免后续只切到或过多的切到冷冻保护剂而不是样品;同时避免冷冻聚焦离子束减薄过程中,从低角度入射的冷冻聚

焦离子束受到遮挡。因此本公开制备的冷冻超薄切片厚度为200nm左右,不超过300nm,可以很好的满足扫描透射电镜成像的要求。

附图说明

[0039] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

- [0040] 图1为本发明一实施例提供的一种冷冻超薄切片的制备方法的流程图;
- [0041] 图2为本发明另一实施例提供的一种冷冻超薄切片的制备方法的流程图;
- [0042] 图3为本发明又一实施例提供的一种冷冻超薄切片的制备方法的流程图;
- [0043] 图4为步骤103的流程图;
- [0044] 图5为步骤105的流程图;
- [0045] 图6为本发明实施例提供的样品台的结构图;
- [0046] 图7为底座的结构图;
- [0047] 图8为填充部件的结构图;
- [0048] 图9为样品台的使用状态图。

具体实施方式

[0049] 下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整的描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有作出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0050] 根据本发明的实施例,如图1所示,提供了一种冷冻超薄切片的制备方法,包括:

[0051] 步骤101:利用振动切片机对组织样品进行切割,得到厚度不超过200 μm 的薄切片。

[0052] 高压冷冻比快速投入式冷冻的冷冻固定深度大的多,可以冷冻生物组织样品,但是其深度也有一定限制,通常在100-200 μm 之间才能保证冷冻质量。因此,首先使用振动切片机将大块组织样品切割成小片,最后得到样品厚度在200 μm 以内的组织切片。

[0053] 步骤102:将薄切片放入样品台进行高压冷冻。

[0054] 步骤103:将载有薄切片的样品台转移至冷冻超薄切片机,对载有薄切片的样品台进行预减薄。

[0055] 步骤104:将预减薄的样品台转移至扫描透射电镜内。

[0056] 步骤105:利用冷冻聚焦离子束制备冷冻超薄切片。

[0057] 由于扫描透射电镜分为普通扫描透射电镜,即没有自动进样系统的扫描透射电镜,如FEI Tecnai F20、FEI Spirit 120kv、FEI Talos 200kv FEG等;高端冷冻透射电镜,即带有自动进样系统的扫描透射电镜,如FEI Titan Krios 300kv、Talos Arctica 200Kv等。具体地,对于普通扫描透射电镜而言,如图2所示,本发明一实施例提供了一种冷冻薄切片的制备方法,对于将薄切片放入样品台进行高压冷冻包括:

[0058] 步骤201:利用振动切片机对组织样品进行切割,得到厚度不超过200 μm 的薄切片。

- [0059] 步骤202:将薄切片放置于现有样品台的空腔内。
- [0060] 步骤203:用冷冻保护剂填充空腔。
- [0061] 步骤204:在现有样品台上覆盖蓝宝石片后,送入至高压冷冻仪中进行冷冻。
- [0062] 步骤205:将载有薄切片的样品台转移至冷冻超薄切片机,对载有薄切片的样品台进行预减薄。
- [0063] 步骤206:将预减薄的样品台转移至扫描透射电镜内。
- [0064] 步骤207:将预减薄的样品台在液氮中转移至适用于普通扫描透射电镜的冷冻样品转移梭中。
- [0065] 步骤208:利用冷冻样品转移梭将预减薄的样品台送入至普通扫描透射电镜的真空腔4中。
- [0066] 步骤209:利用冷冻聚焦离子束制备冷冻超薄切片。
- [0067] 对于带有自动进样系统的扫描透射电镜而言,如图3所示,本发明一实施例提供了一种冷冻薄切片的制备方法,包括:
- [0068] 步骤301:利用振动切片机对组织样品进行切割,得到厚度不超过200 μm 的薄切片。
- [0069] 步骤302:将薄切片放置于样品台的空腔4内,样品台包括底座1和可拆卸的填充部件2,底座1为圆盘状结构,底座1上设有凸沿3,凸沿3与底座1围成用于容置样品的空腔4,。
- [0070] 其中,如图6至图8所示,凸沿3和填充部件2均为环状结构,填充部件2能够套设在凸沿3的外侧壁上,方便工作人员安装和取下填充部件2。凸沿3的中心与底座1的中心相重合。填充部件2的高度与凸沿3外侧壁的高度相同。底座1和填充部件2采用导热的金属材料制成,导热的金属材料可为采用纯铜/银/铜镀金等,但不限于上述导热材料,本实施例不做限定。样品台的尺寸可由实际需求设置,本实施例不做限定。
- [0071] 步骤303:用冷冻保护剂填充空腔4。
- [0072] 步骤304:利用填充部件2对凸沿3侧壁与底座1之间形成的阶梯结构进行填充。
- [0073] 填充部件2填充了蓝宝石片与底座1之间形成的空间,提高冷冻效果及冷冻速度。
- [0074] 步骤305:在样品台上覆盖蓝宝石片后,送入至高压冷冻仪中进行冷冻。
- [0075] 步骤306:将载有薄切片的样品台转移至冷冻超薄切片机,对载有薄切片的样品台进行预减薄。
- [0076] 步骤307:将预减薄的样品台的填充部件2取下。
- [0077] 步骤308:将样品台的底座1固定在上样环6与上样底座5之间,形成整体,具体参见图9。
- [0078] 步骤309:将整体放置在适用于带有自动进样系统的扫描透射电镜的冷冻样品转移梭中。
- [0079] 步骤310:利用冷冻样品转移梭将整体送入至带有自动进样系统扫描透射电镜的真空腔4中。
- [0080] 步骤311:利用冷冻聚焦离子束制备冷冻超薄切片。
- [0081] 在上述实施例中,如图4所示,步骤103包括:
- [0082] 步骤401:将载有薄切片的样品台在液氮中转移至冷冻超薄切片机,冷冻超薄切片机的温度在-150 $^{\circ}\text{C}$ 以下。
- [0083] 步骤402:将蓝宝石片剥离。

[0084] 步骤403:利用冷冻钻石修刀将样品台及载有的薄切片修剪掉三分之一至二分之一,暴露出冷冻后的组织样品表面。

[0085] 步骤404:利用90°冷冻钻石修刀将暴露部分修薄至20 μm 。

[0086] 预减薄可提高冷冻超薄切片制备效率,避免耗费太多冷冻聚焦离子束的减薄时间;并且可暴露出组织样品,避免后续只切到或过多的切到冷冻保护剂而不是样品;同时避免冷冻聚焦离子束减薄过程中,从低角度入射的冷冻聚焦离子束受到遮挡。

[0087] 在上述实施例中,如图5所示,步骤105包括:

[0088] 步骤501:利用气体注入系统将样品的表面覆盖一层有机铂。

[0089] 步骤502:在有机铂的表面通过离子溅射覆盖一层金属铂。

[0090] 步骤503:利用冷冻聚焦离子束对选中区域的样品台上的样品进行减薄,冷冻聚焦离子束流强度随着切片厚度逐渐变薄而降低,切片减薄的方向为从样品台上下分别向中部推进,切片的切口为梯形;在样品减薄至2~3 μm 时,切片的一侧开设有缺口。

[0091] 减薄方向遵循从样品平台上下分别向中央推进,以避免离子束打掉的样品碎屑堆积在切口表面。切片的切口处需剪切成梯形,以避免后续透射电镜倾转数据收集时两侧遮挡切片。在样品减薄至2~3 μm 时,在切片一侧打开一个缺口,释放切片内部的应力,以避免由应力造成切片的扭曲。减薄后的样品厚度在200nm左右,可以满足扫描透射电镜成像的要求。

[0092] 本发明实施例提供了一种冷冻超薄切片的制备方法,首先对组织样品进行切割,得到厚度不超过200 μm 的薄切片,再进行高压冷冻;由于高压冷冻快速冷冻的冷冻固定深度大的多,因此可以保证冷冻质量。然后预减薄步骤可提高冷冻超薄切片制备效率,避免耗费太多冷冻聚焦离子束的减薄时间;并且可暴露出组织样品,避免后续只切到或过多的切到冷冻保护剂而不是样品;同时避免冷冻聚焦离子束减薄过程中,从低角度入射的冷冻聚焦离子束受到遮挡。因此本公开制备的冷冻超薄切片厚度为200nm左右,不超过300nm,可以很好的满足扫描透射电镜成像的要求。

[0093] 本领域技术人员在考虑说明书及实践这里公开的发明后,将容易想到本发明的其它实施方案。本申请旨在涵盖本发明的任何变型、用途或者适应性变化,这些变型、用途或者适应性变化遵循本发明的一般性原理并包括本发明未公开的本技术领域中的公知常识或惯用技术手段。说明书和实施例仅被视为示例性的,本发明的真正范围和精神由下面的权利要求指出。

[0094] 应当理解的是,本发明并不局限于上面已经描述并在附图中示出的精确结构,并且可以在不脱离其范围进行各种修改和改变。本发明的范围仅由所附的权利要求来限制。

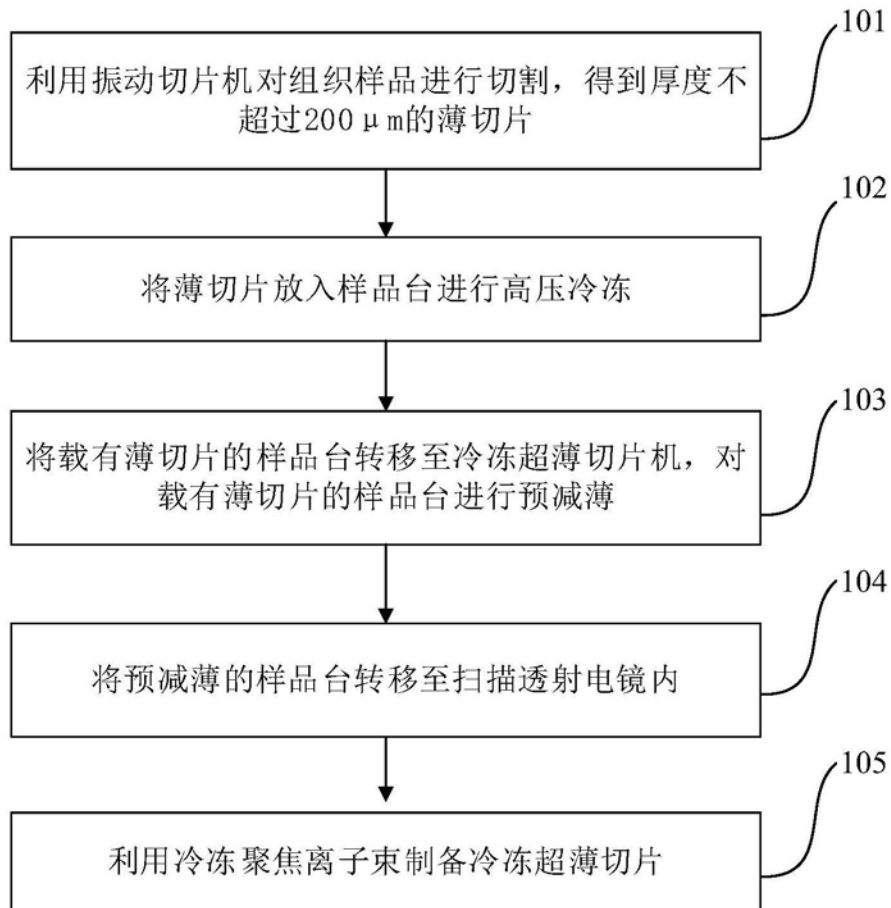


图1

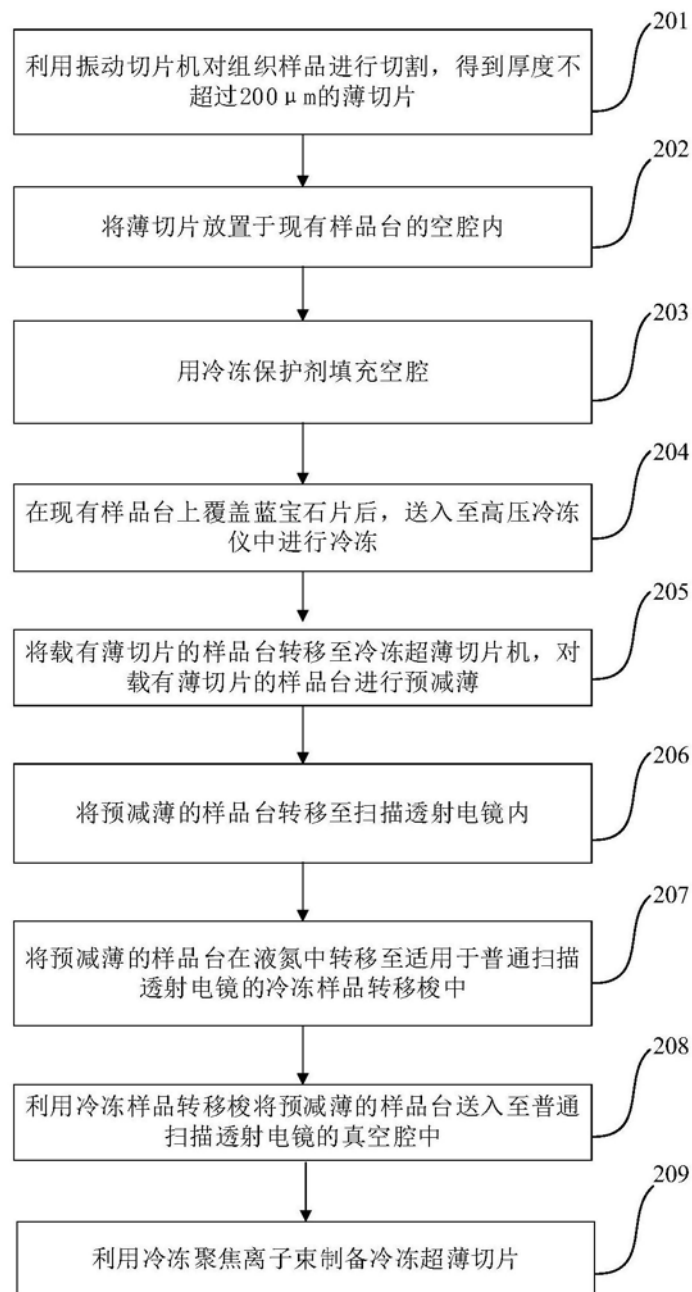


图2

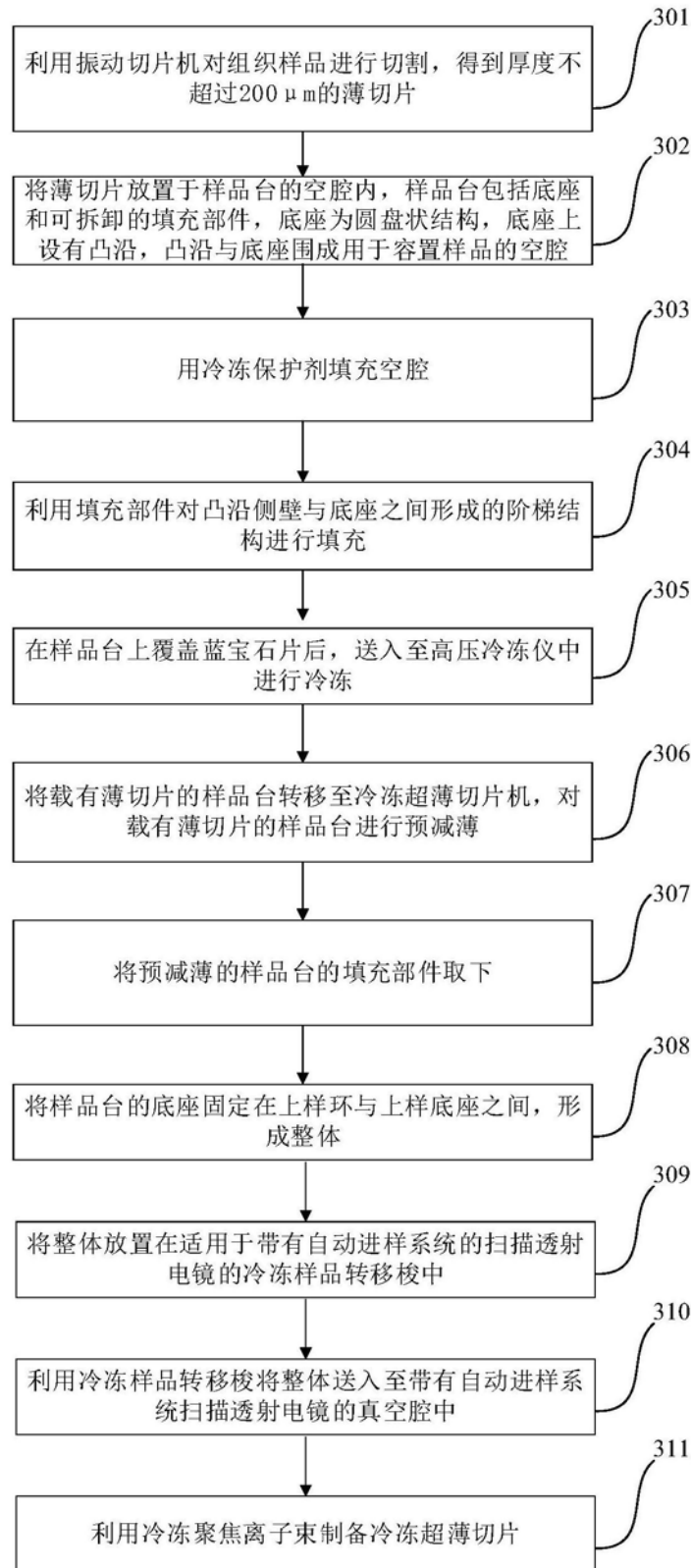


图3

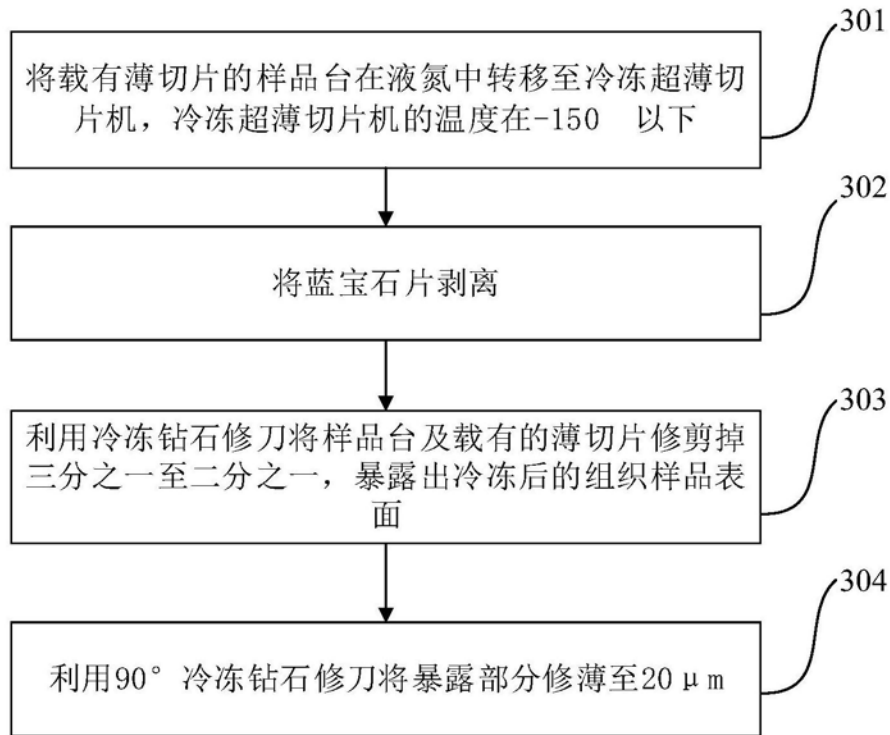


图4

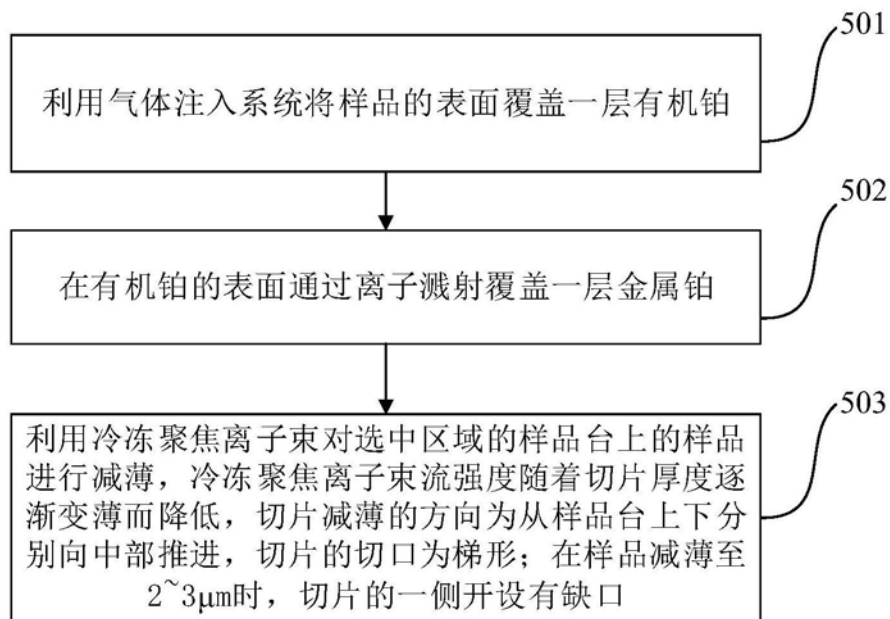


图5

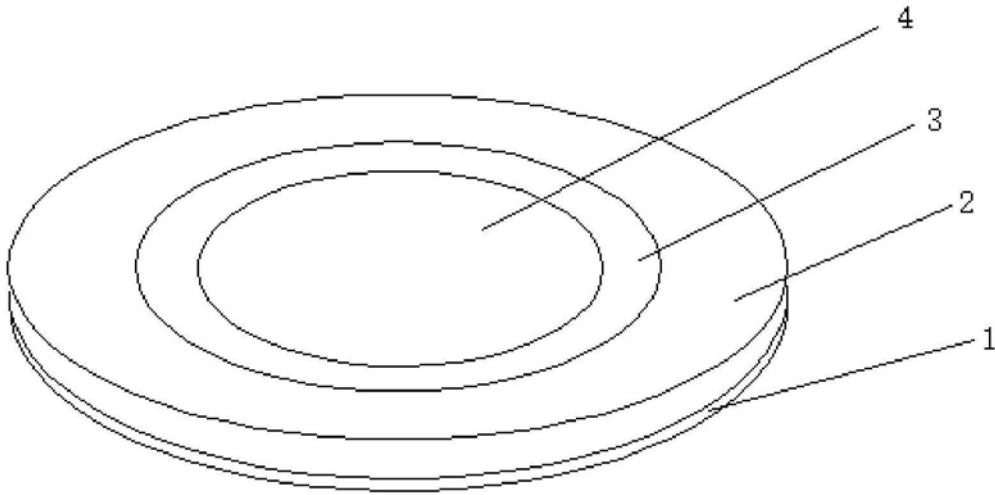


图6

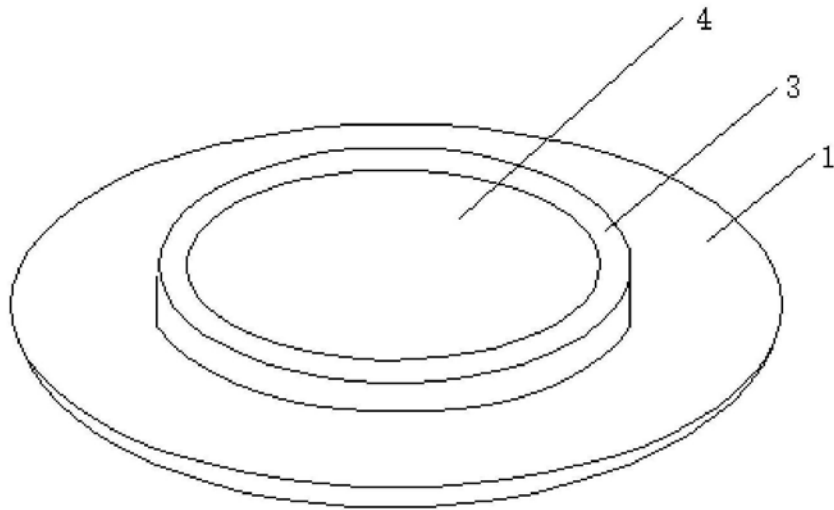


图7

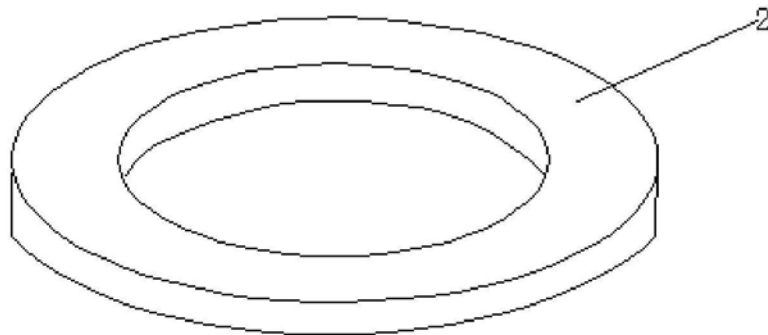


图8

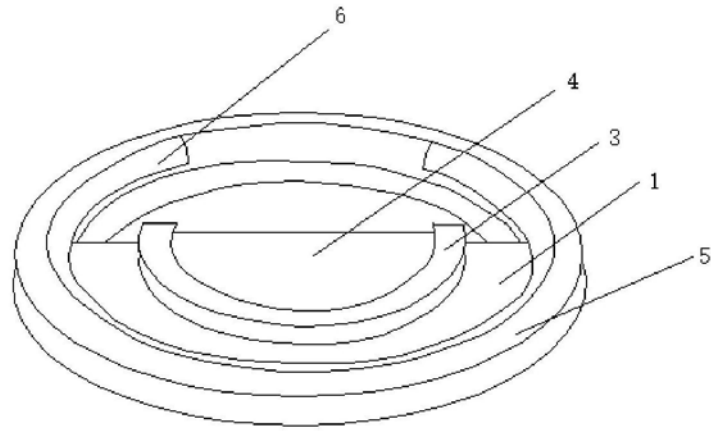


图9