



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105140083 A

(43) 申请公布日 2015. 12. 09

(21) 申请号 201510355339. 8

(22) 申请日 2015. 06. 24

(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 黄小俊 季刚 孙飞

(74) 专利代理机构 北京华沛德权律师事务所
11302

代理人 刘杰

(51) Int. Cl.
H01J 9/00(2006. 01)

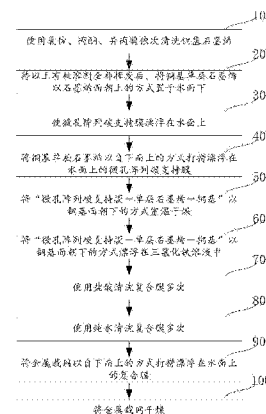
权利要求书1页 说明书4页 附图4页

(54) 发明名称

透射电子显微镜载网制备方法

(57) 摘要

本发明提供了一种透射电子显微镜载网制备方法,包括使用氯仿、丙酮、异丙醇依次清洗铜基石墨烯;待以上有机溶剂全部挥发后,将铜基单层石墨烯以石墨烯面朝上的方式置于水面下;使微孔阵列碳支持膜漂浮在水面上;将铜基单层石墨烯以自下而上的方式打捞漂浮在水面上的微孔阵列碳支持膜;将“微孔阵列碳支持膜—单层石墨烯—铜基”以铜基面朝下的方式室温干燥;将“微孔阵列碳支持膜—单层石墨烯—铜基”以铜基面朝下的方式漂浮在三氯化铁溶液中;使用盐酸清洗复合膜多次;使用纯水清洗复合膜多次;将金属载网以自下而上的方式打捞漂浮在水面上的复合膜;将金属载网干燥。本发明制备的载网单层石墨烯覆盖率 70% 以上,适合应用在透射电子显微镜样品制备中。



1. 一种透射电子显微镜载网制备方法,其特征在于,包括:
使用氯仿、丙酮、异丙醇依次清洗铜基石墨烯;
待以上有机溶剂全部挥发后,将铜基单层石墨烯以石墨烯面朝上的方式置于水面下;
使微孔阵列碳支持膜漂浮在水面上;
将铜基单层石墨烯以自下而上的方式打捞漂浮在水面上的微孔阵列碳支持膜;
将“微孔阵列碳支持膜—单层石墨烯—铜基”以铜基面朝下的方式室温干燥;
将“微孔阵列碳支持膜—单层石墨烯—铜基”以铜基面朝下的方式漂浮在三氯化铁溶液中;
使用盐酸清洗复合膜多次;
使用纯水清洗复合膜多次;
将金属载网以自下而上的方式打捞漂浮在水面上的复合膜;
将金属载网干燥。
2. 根据权利要求1所述的透射电子显微镜载网制备方法,其特征在于,所述使用氯仿、丙酮、异丙醇依次清洗铜基石墨烯包括:
首先使用氯仿清洗铜基石墨烯,时间为10秒;
其次使用丙酮清洗铜基石墨烯,时间为10秒;
最后使用异丙醇清洗铜基石墨烯,时间为10秒。
3. 根据权利要求1所述的透射电子显微镜载网制备方法,其特征在于,所述将“微孔阵列碳支持膜—单层石墨烯—铜基”以铜基面朝下的方式漂浮在三氯化铁溶液中是将“微孔阵列碳支持膜—单层石墨烯—铜基”以铜基面朝下的方式漂浮在1.5M三氯化铁溶液中。
4. 根据权利要求3所述的透射电子显微镜载网制备方法,其特征在于,其特征在于,所述漂浮在1.5M三氯化铁溶液中的时间为20min。
5. 根据权利要求1所述的透射电子显微镜载网制备方法,其特征在于,所述使用盐酸清洗复合膜的次数为两次。
6. 根据权利要求1所述的透射电子显微镜载网制备方法,其特征在于,所述单层石墨烯是先与微孔阵列碳支持膜形成复合膜再铺设至透射电镜金属载网上。
7. 根据权利要求1所述的透射电子显微镜载网制备方法,其特征在于,所述单层石墨烯的铺设方式是位于微孔阵列碳支持膜和透射电镜金属载网之间。
8. 根据权利要求1所述的透射电子显微镜载网制备方法,其特征在于,所述使用纯水清洗复合膜的次数为四次。
9. 根据权利要求1所述的透射电子显微镜载网制备方法,其特征在于,所述铜基单层石墨烯的来源是经由化学气相沉积法合成的铜基单层石墨烯,单层率大于90%,方阻为500—800。铜基底纯度99.99%,厚度30um。

透射电子显微镜载网制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及透射电镜制备技术领域,特别涉及透射电子显微镜载网制备方法。

背景技术

[0002] 在冷冻透射电镜技术,特别是冷冻电镜单颗粒三维重构技术的样品制备中,不少样品由于浓度不高、偏好粘附在碳膜上等原因,必须在微孔阵列碳支持膜上平铺一层连续的超薄碳支持膜(厚度约 3-5nm),才能制备出适合图像数据收集的样品。而对于那些可在孔中观察到足够多颗粒的样品,由于连续薄膜可以减少气液界面对样品的挤压而引起的样品变性,所以冷冻样品制备过程中也添加连续超薄碳膜。而超薄碳膜的使用在图像采集中引入了额外噪音,从而使分子量小于 1MDa 样品图像衬度不高,影响最后的三维重构分辨率。单层石墨烯以其高导电性、超薄(背景噪音低)以及机械性能优的特点使其具有替代超薄碳膜的潜质。与超薄碳膜相比,使用单层石墨烯做为连续支持膜制备的冷冻样品,图像背景噪音低至接近无连续支持膜的状态,且导电性能强(超薄碳膜导电性随温度降低而下降)使液氮温度下电子束引发图像漂移现象减少,有助于拍摄出清晰的电镜照片。唯一的缺点是石墨烯自身为疏水材料,但通过辉光放电的方法可将其部分转化为氧化石墨烯或石墨烷,以达到亲水化处理的目的。

[0003] 目前,将石墨烯引入透射电镜载网的制备方法主要有以下两种:

[0004] 一种方法报道在《nature method》11,649-652,2014中。主要原理是使已铺设好微孔阵列碳支持膜的透射电镜载网(Quantifoil)的碳支持膜面紧密贴附通过化学气相沉积法制备的铜基石墨烯膜上,然后使用三氯化铁溶液蚀刻铜基,经过多次清洗,最终将石墨烯膜平铺至微孔阵列碳支持膜上。这个方法制备的石墨烯膜覆盖率低(50%),且它铺设的石墨烯膜位于微孔阵列碳支持膜上方。另一种方法报道在专利中(专利号 CN 102142348A)。主要原理是将氧化石墨烯纳米片的水溶液和多孔微栅支持膜以溶液浇铸法制备出单层氧化石墨烯膜-微栅复合膜,并将其做为透射电镜载网支持膜使用。这个方法是彼此分离的单层氧化石墨烯,而且是氧化石墨烯和微栅的复合膜。

发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是提供一种透射电子显微镜载网制备方法。

[0006] 为解决上述技术问题,本发明提供了一种透射电子显微镜载网制备方法,其包括:

[0007] 使用氯仿、丙酮、异丙醇依次清洗铜基石墨烯;

[0008] 待以上有机溶剂全部挥发后,将铜基单层石墨烯以石墨烯面朝上的方式置于水面下;

[0009] 使微孔阵列碳支持膜漂浮在水面上;

[0010] 将铜基单层石墨烯以自下而上的方式打捞漂浮在水面上的微孔阵列碳支持膜;

[0011] 将“微孔阵列碳支持膜-单层石墨烯-铜基”以铜基面朝下的方式室温干燥;

- [0012] 将“微孔阵列碳支持膜—单层石墨烯—铜基”以铜基面朝下的方式漂浮在三氯化铁溶液中；
- [0013] 使用盐酸清洗复合膜多次；
- [0014] 使用纯水清洗复合膜多次；
- [0015] 将金属载网以自下而上的方式打捞漂浮在水面上的复合膜；
- [0016] 将金属载网干燥。
- [0017] 进一步地,所述使用氯仿、丙酮、异丙醇依次清洗铜基石墨烯包括：
- [0018] 首先使用氯仿清洗铜基石墨烯,时间为 10 秒；
- [0019] 其次使用丙酮清洗铜基石墨烯,时间为 10 秒；
- [0020] 最后使用异丙醇清洗铜基石墨烯,时间为 10 秒。
- [0021] 进一步地,所述将“微孔阵列碳支持膜—单层石墨烯—铜基”以铜基面朝下的方式漂浮在三氯化铁溶液中是将“微孔阵列碳支持膜—单层石墨烯—铜基”以铜基面朝下的方式漂浮在 1.5M 三氯化铁溶液中。
- [0022] 进一步地,所述漂浮在 1.5M 三氯化铁溶液中的时间为 20min。
- [0023] 进一步地,所述使用盐酸清洗复合膜的次数为两次。
- [0024] 进一步地,所述单层石墨烯是先与微孔阵列碳支持膜形成复合膜再铺设至透射电镜金属载网上。
- [0025] 进一步地,所述单层石墨烯的铺设方式是位于微孔阵列碳支持膜和透射电镜金属载网之间。
- [0026] 进一步地,所述使用纯水清洗复合膜的次数为四次。
- [0027] 进一步地,所述铜基单层石墨烯的来源是经由化学气相沉积法合成的铜基单层石墨烯,单层率大于 90%,方阻为 500 — 800。铜基底纯度 99.99%,厚度 30um。
- [0028] 本发明提供的透射电子显微镜载网制备方法是以前述石墨烯为连续膜、微孔阵列碳支持膜为支持膜的透射电镜载网制备方法。其优点在于石墨烯膜覆盖率高,铺设方式位于微孔阵列碳支持膜和金属载网之间,以及铺设后的石墨烯膜可通过辉光放电转变为氧化石墨烯或石墨烷等亲水形式。

附图说明

- [0029] 图 1 为本发明实施例提供的透射电子显微镜载网制备方法的流程示意图；
- [0030] 图 2 为本发明实施例提供的通过图 1 所示方法制备的复合膜载网的流程示意图；
- [0031] 图 3 为透射电镜检查石墨烯覆盖情况示意图。
- [0032] 图 4 是电镜检查辉光放电处理前后石墨烯的覆盖情况示意图；
- [0033] 图 5(a) 是冷冻电镜检查石墨烯复合膜载网制备的样品的示意图；
图 5(b) 超薄连续碳膜制备的样品的示意图。

具体实施方式

- [0034] 参见图 1,本发明实施例提供一种透射电子显微镜载网制备方法,其包括：
- [0035] 步骤 10、使用氯仿、丙酮、异丙醇依次清洗铜基石墨烯。其中,铜基石墨烯来源于商业化出售的通过化学气相沉积法制备单层铜基石墨烯。使用氯仿、丙酮、异丙醇依次清洗铜

基石墨烯包括首先使用氯仿清洗铜基石墨烯,时间为 10 秒;其次使用丙酮清洗铜基石墨烯,时间为 10 秒;最后使用异丙醇清洗铜基石墨烯,时间为 10 秒。

[0036] 步骤 20、待以上有机溶剂全部挥发后,将铜基单层石墨烯以石墨烯面朝上的方式置于水面下;

[0037] 步骤 30、使微孔阵列碳支持膜漂浮在水面上;其中,微孔阵列支持膜来自于专利号 CN 103528866A 描述的方法制备。

[0038] 步骤 40、将铜基单层石墨烯以自下而上的方式打捞漂浮在水面上的微孔阵列碳支持膜;

[0039] 步骤 50、将“微孔阵列碳支持膜—单层石墨烯—铜基”以铜基面朝下的方式室温干燥,并储存在阴凉干燥处;

[0040] 步骤 60、将“微孔阵列碳支持膜—单层石墨烯—铜基”以铜基面朝下的方式漂浮在三氯化铁溶液中;具体是将“微孔阵列碳支持膜—单层石墨烯—铜基”以铜基面朝下的方式漂浮在 1.5M 三氯化铁溶液中 20min,以去除铜基;

[0041] 步骤 70、使用盐酸清洗复合膜多次;使用 1% 盐酸清洗复合膜两次,每次 10min,以清除残留的重金属;

[0042] 步骤 80、使用纯水清洗复合膜多次;使用纯水清洗复合膜四次,每次 10min,以除掉酸和残留的蚀刻液;

[0043] 步骤 90、将金属载网以自下而上的方式打捞漂浮在水面上的复合膜;

[0044] 步骤 100、将金属载网干燥。

[0045] 图 3 为电镜检查石墨烯覆盖情况,图 3(a) 为复合膜在金属载网上的覆盖情况。图 3(b) 为一个金属网格中拍摄的高倍照片,显示石墨烯膜在复合膜上的覆盖情况,其中黑色“*”标注石墨烯覆盖不完全的位点;从图可见石墨烯覆盖面平整,且覆盖率达到 70% 以上。

[0046] 冲入式冷冻前半小时将覆盖了复合膜的金属载网以复合膜朝上的方式放置于 6cm 直径培养皿中,除去培养皿上盖,送入由 Gatan 公司制作的 Solarus 型等离子清洗机(型号为 950) 样品腔室底部中;该等离子清洗机连接高纯氢气发生器(氢气纯度 99.999%) 和瓶装高纯氧气(纯度 99.999%),参数设置为 H_2 gas flow 6.4sccm, O_2 gas flow 11.5sccm, Forward RF Target 5W, Forward RF Range 2W, Maximum Reflected RF 2W, 处理 30 秒;图四为电镜检查辉光放电处理前后石墨烯情况;a, b, c 反应辉光放电处理前的石墨烯覆盖情况, d, e, f 反应辉光放电处理后的石墨烯覆盖情况。其中 a, d 为低倍电镜照片;b, e 为 a, d 其中一个孔的高倍照片,反应其中石墨烯的覆盖完整度;c, f 是在 b, e 的孔中进行选区电子衍射的照片,显示出石墨烯的特征衍射点;

[0047] 使用 Leica EM GP 进行冲入式冷冻样品制备,3 μ l 核糖体样品加在复合膜面,单面吸附 3 秒后冲入液态乙烷中快速冷冻,最后转移至液氮中保存;制备好的冷冻样品用 Gatan 626 冷冻传输杆传送到 FEI Talos 200kV 场发射透射电镜上在液氮温度下进行低电子剂量成像和电子衍射拍摄。图 5 为冷冻电镜检查石墨烯复合膜载网制备的样品与超薄连续碳膜制备的样品的对比图。图 5(a) 为石墨烯复合膜载网制备的核糖体冷冻样品,图像欠焦值 -2.1 μ m;图 5(b) 为超薄连续碳膜制备的核糖体冷冻样品,图像欠焦值 -2.2 μ m。两图的左上框中为该图的部分放大。这两张照片拍摄自冰层厚度相似,且拍摄条件完全相同(FEI Talos, Ceta camera, pixel size 1.42 \AA , 30 $e/\text{\AA}^2$)。从此对比图可看出,经过氢/氧等

离子体辉光放电处理的石墨烯复合膜已具备足够的亲水性能,可用于冷冻电镜样品制备。在同等拍摄条件下,使用石墨烯复合膜制备的冷冻样品背底噪音低,样品颗粒更清晰,这意味着对大分子量样品使用石墨烯复合膜制备,得到的图像数据质量更好,对分子量稍小样品也可使用石墨烯复合膜制备,将可使用连续支持膜制备样品的分子量界限向更小方向推进。

[0048] 本发明将石墨烯膜铺设在微孔阵列碳支持膜和金属载网之间有以下好处:一、使高导电性的石墨烯膜与同样高导电性的金属载网直接贴合,更有利于石墨烯导电能力发挥;二、根据目前普遍使用的冲入冷冻方式的移除多余溶液的方式(使用滤纸贴至载网的两面吸取多余溶液,仅剩下薄薄的水膜进行冷冻),滤纸吸取多余溶液时,石墨烯膜位于微孔阵列碳支持膜的下方(并未与滤纸直接接触),有利于保持石墨烯膜在冷冻过程中的完整;三、石墨烯膜和微孔阵列碳支持膜相对于滤纸吸附面,形成一个个下凹的区间,这为通过调整微孔阵列碳膜的厚度控制最终样品冰层的厚度带来便利。

[0049] 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。

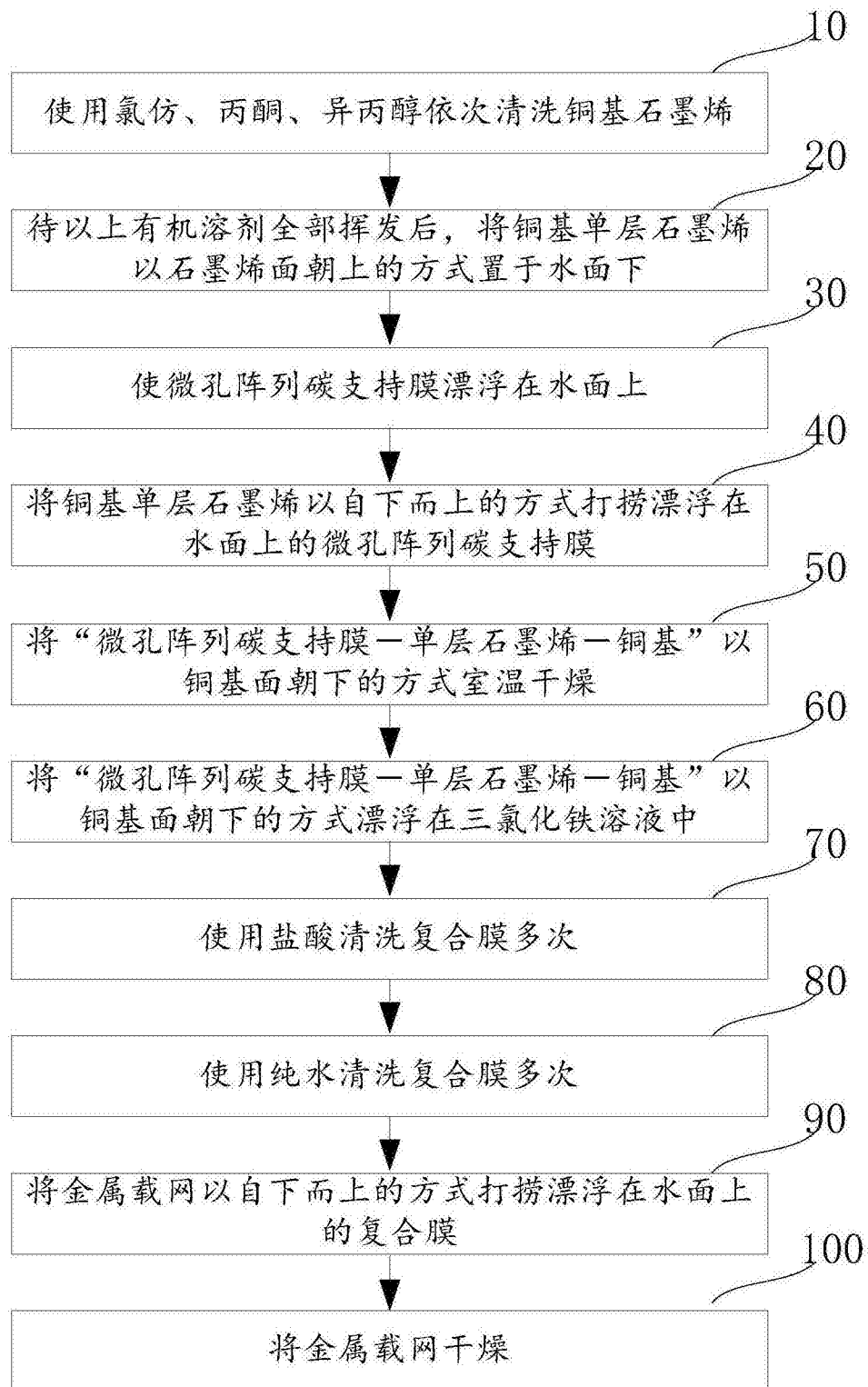


图 1

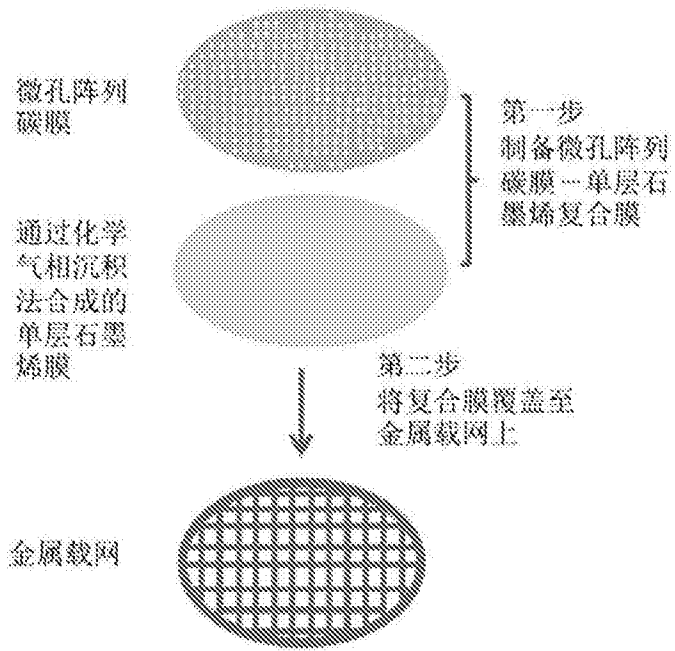


图 2

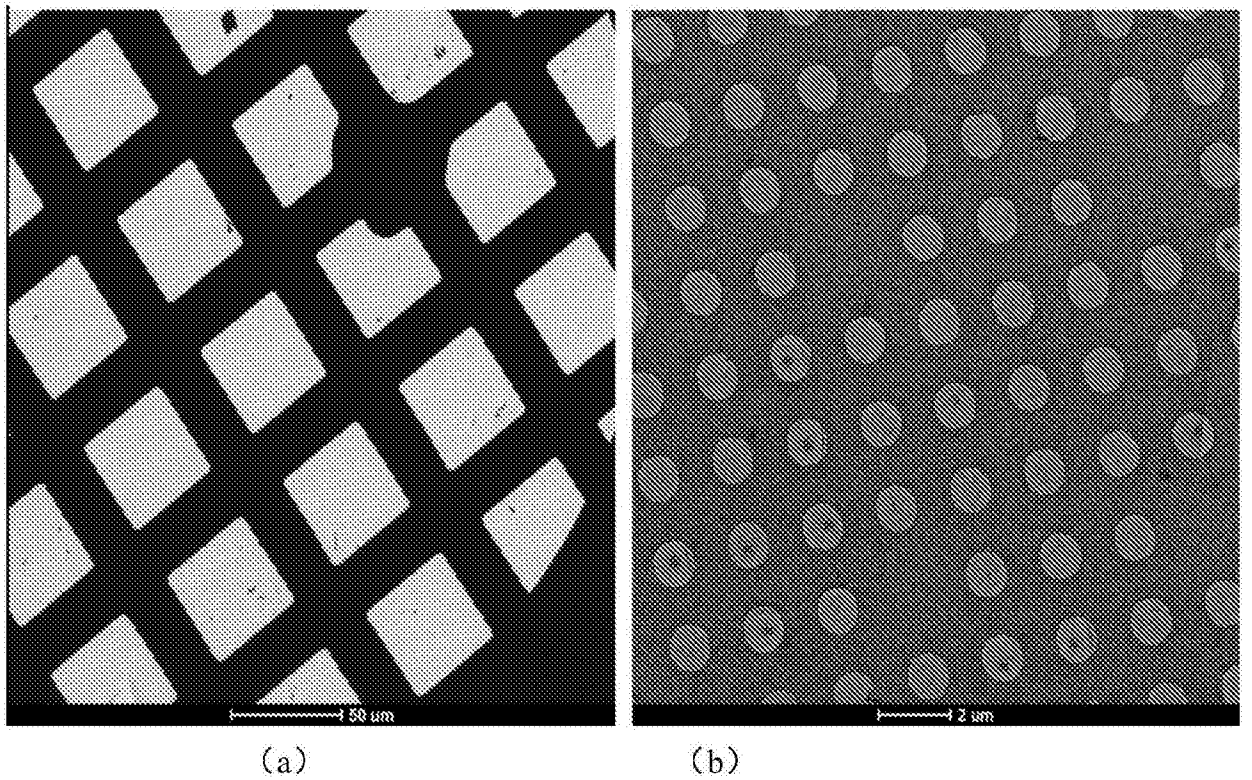


图 3

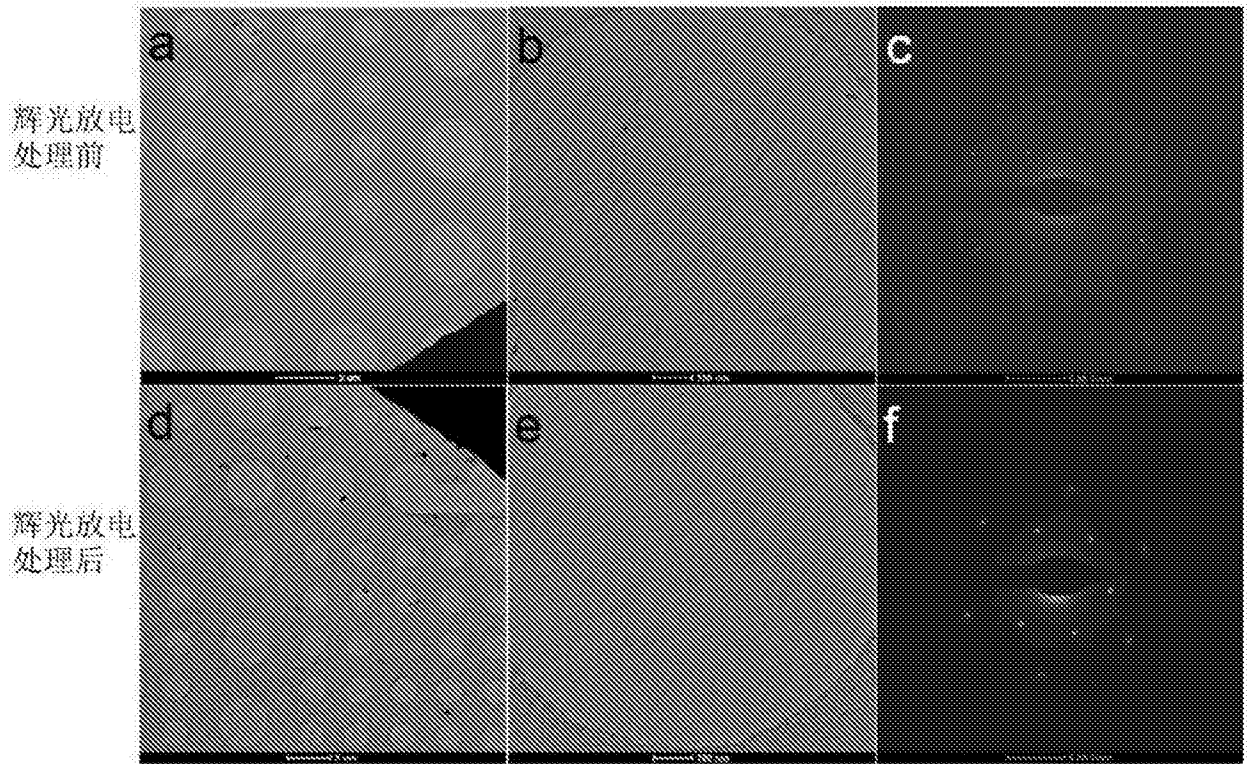


图 4

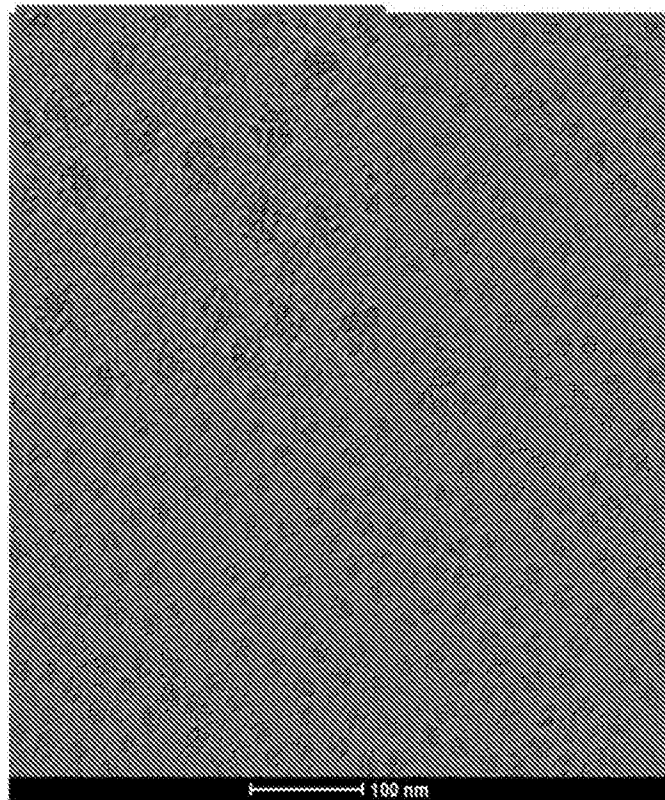


图 5(a)

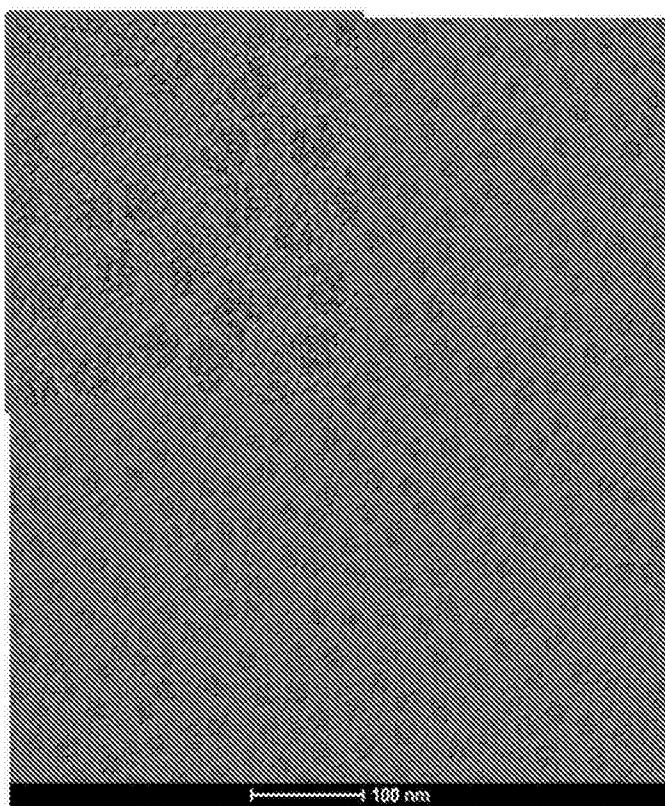


图 5(b)