



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103940791 A

(43) 申请公布日 2014. 07. 23

(21) 申请号 201410027787. 0

(22) 申请日 2014. 01. 22

(30) 优先权数据

13152215. 3 2013. 01. 22 EP

(71) 申请人 FEI 公司

地址 美国俄勒冈州

(72) 发明人 B. 布伊塞 L. F. 范德里伊

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 胡莉莉

(51) Int. Cl.

G01N 21/64(2006. 01)

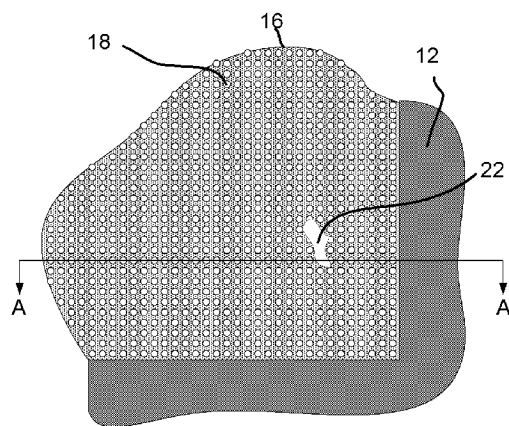
权利要求书2页 说明书4页 附图2页

(54) 发明名称

用荧光显微镜观测样本的方法

(57) 摘要

本发明公开了用荧光显微镜观测样本的方法。本发明涉及用荧光显微镜检查 TEM 格栅(12)上的样本的部分的方法,如当执行关联显微镜检查时出现的,更具体地针对在有孔碳格栅上的样本。当使在其中具有样本材料(22)的玻璃化冰(20)成像时出现问题,因为冰被所使用的光加热。本发明基于如下认识:碳支撑膜(16)中的吸收尤其是造成加热的原因,因为冰几乎不吸收光。通过使荧光显微镜的照射局部化至在碳中的孔洞(18)上面的样本部分,对冰的加热得以减少。该局部化能够通过例如使光通过 LCD 型空间光调制器来实现。



1. 用荧光显微镜检查样本(22)的部分的方法,样本的至少部分被支撑碳膜(16)支撑,荧光显微镜利用激发光照射样本以产生荧光或磷光,所述样本易受由温度升高引起的损坏,所述支撑碳膜显示出孔洞(18)或厚度变化,

其特征在于,

• 所述支撑碳膜显示出导致激发光的位置相关吸收率的孔洞(18)或厚度变化,从而导致具

有激发光的高吸收的部分和具有激发光的低吸收的部分,

• 样本的待检查部分位于孔洞(18)或支撑膜的具有激发光的低吸收的部分上;以及
• 利用激发光进行的照射是局部化照射,该局部化使得支撑膜的具有激发光的高吸收且与样本的待检查部分邻接的部分不被激发光照射。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中,通过扫描在样本上的激发光束并对所述束的强度进行调制来实现照射的局部化。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中,通过矢量扫描在样本上的激发光束来实现照射的局部化。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中,通过使激发光通过空间光调制器而引起强度调制来实现照射的局部化。

5. 根据权利要求4所述的方法,其中,所述空间光调制器是在样本上成像的LCD型空间光调制器。

6. 根据前述权利要求中的任一项所述的方法,其中,所述样本是玻璃化低温样本。

7. 根据前述权利要求中的任一项所述的方法,其中,具有高吸收的部分吸收1%以上的激发光,更具体而言吸收10%以上的激发光,最具体而言吸收90%以上的激发光,并且具有低吸收的部分吸收不足1%的激发光。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中,具有高吸收的部分包括至少5 nm的碳层,更具体而言包括至少11 nm的碳层,最具体而言包括至少65 nm的碳层,并且具有低吸收的部分包括至多5 nm的碳层或者根本不包括碳层。

9. 根据前述权利要求中的任一项所述的方法,其中,在照射样本以激发样本同时检测荧光或磷光之前,利用反射的或透射的光来拍摄图像以确定支撑碳膜的边界。

10. 根据前述权利要求中的任一项所述的方法,其中,所述方法还包括使样本在透射电子显微镜中成像。

11. 根据权利要求10所述的方法,其中,所述透射电子显微镜配备有样本室,并且当样本在所述透射电子显微镜的样本室上时获取荧光图像和电子光学图像两者。

12. 包括荧光显微镜和检测器的设备,所述荧光显微镜配备有用于利用激发光照射玻璃化样本的照射系统,所述检测器用于检测从样本出现的荧光辐射,所述照射系统包括用于对激发光的强度进行调制的空间光调制器,所述荧光显微镜包括用来控制空间光调制器以使照射局部化的控制器,

其特征在于,

所述设备还包括电子显微镜。

13. 根据权利要求12所述的设备,其中,所述设备配备有用来使样本保持在低温温度的装置。

-
14. 根据权利要求 13 所述的设备,其中,电子显微镜镜筒是透射电子显微镜镜筒。

用荧光显微镜观测样本的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及用荧光显微镜检查样本的部分的方法,样本的至少部分被支撑碳膜(supporting carbon film)支撑,荧光显微镜利用激发光照射样本以产生荧光或磷光,所述样本易受由温度升高引起的损坏,支撑碳膜显示出孔洞(hole)或厚度变化。

背景技术

[0002] 从SCHWARTZ Cindy L等人在J. Microsc. 2007年8月 227 (Pt 2)、第 98 - 109 页中的“Cryo-fluorescence microscopy facilitates correlations between light and cryo-electron microscopy and reduces the rate of photobleaching”中已知此方法。

[0003] 已知方法描述了在用于低温荧光显微镜(cryo-fluorescence microscopy)的设置中,用光来照射低温玻璃化(vitrified)样本,并观测荧光。

[0004] 低温玻璃化样本是例如被冷冻以使样本停止(arrest)在给定状态的生物样本。在冷冻期间冰晶的形成是应避免的,因为这些晶体例如通过刺穿细胞膜而损坏样本的结构。通过以诸如在 10^5 K/s 范围内的超高冷却速率将样本冷冻至低于水的约 130 K 的玻璃转变温度的温度或通过用高冷却速率和高压(10^3 K/s @ 2000 bar)的结合将其冷却来避免结晶。这些技术本身是已知的,并且在例如美国专利文献 US 7, 413, 872 B2 和美国专利文献 US 6, 758, 362 B2 中被描述,并且(可能在例如使用低温切片机(cryo-microtome)之后)导致样本的典型厚度为 1 μ m 或更薄。

[0005] 已知的是当将样本暴露于光时,荧光标记(fluorescent marker)对光的响应随时间推移而减弱。这被称为光致漂白。要注意的是,光致漂白的效果在低温温度下与在室温下相比而言较不显著。

[0006] 在用光学显微镜观测样本并观测荧光之后,可在透射电子显微镜(TEM)中检查样本以使用下至 10 nm 或更小的分辨率来观测细节。因此,通常在 TEM 支撑格栅(support grid)上制备样本。TEM 支撑格栅可从例如美国加利福尼亚州莱丁市的 TED PELLA 公司获得,参见 http://www.tedpella.com/supflm_html/suptfilm.htm。

[0007] 一种流行的格栅是所谓的有孔碳格栅(holey carbon grid),其中使用碳支撑膜,碳支撑膜显示出孔洞。能够在没有碳支撑膜的干扰(衍射)的情况下用例如透射电子来检查悬浮在孔洞上且嵌入于冰中的样本材料。要注意的是有孔碳格栅是已知的,其中孔洞并不是通孔(through-hole),而是例如 3 nm 或更薄的非常薄碳膜。

[0008] 要注意已知的是在 TEM 中产生的不是样本的 2D 图像,而是 3D 断层照片(tomogram)。这例如在 SARTORI Anna 等人在 J. Struct. Biol. 160 (2007)、第 135-145 页中的“Correlative microscopy: Bridging the gap between fluorescence light microscopy and cryo-electron tomography”中被描述。这导致样本的 3D 图像而不是 2D 图像。

[0009] 在荧光显微镜检查期间,期望强烈的照射,以使得能够在短时间段内收集到荧光信号。这在信噪比方面是有利的(短时间段期间的噪声小于长时段期间的噪声),而且将使

检测期间的样品漂移(specimen drift)最小化。并且这样改善了使用容易性,高质量图像的快速可用性对于搜索并聚焦到感兴趣区域上是有利的。

[0010] 使用强烈照射时的问题是可能出现加热(heating),从而损坏或毁坏样品。

发明内容

[0011] 本发明意图提供针对在使用强烈照射时的加热的技术方案。

[0012] 为此,根据本发明的方法的特征在于

- 支撑碳膜显示出导致激发光的位置相关吸收率(absorbance)的孔洞或厚度变化,从而导致具有激发光的高吸收的部分和具有激发光的低吸收的部分;
- 待检查的样本的部分位于孔洞或支撑膜的具有激发光的低吸收的部分上;以及
- 照射是局部化(localized)的,以使得支撑膜的具有激发光的高吸收且与样本的待检查部分邻接(bordering)的部分未被照射。

[0013] 显然,加热是由激发光的吸收引起的。本发明基于如下认识:由薄样本进行的该光的吸收常常是可忽略的,但由碳进行的吸收不是。作为示例:玻璃化冰仅吸收非常少的光。在碳中产生的热通过热传导而到达样本区域,并且以这样的方式引起样本的温度升高。例如 LARSON D. M. 等人在 J. Struct. Biol. (2011) 中的“The surface of evaporated carbon films is an insulating, high-bandgap material”中描述了薄碳膜的吸收率。

[0014] 根据光密度描述吸收率,其中,将光密度 $A(\lambda)$ 定义为 $A(\lambda) = \log_{10}(I_0/I_1)$, 其中 I_0 为入射光(impinging light)的量而 I_1 为透射光的量。LARSON 在图 2 中示出对于超过 5 nm 的膜厚度而言,相当准确地近似为 $A(\lambda) = [(D-5) \times 0.016] \text{ nm}^{-1}$, 其中 D 是以 nm 为单位的碳膜的厚度。换言之:一层 11 nm 的碳已经具有光密度 $A(\lambda) = 0.1$, 并且因此吸收入射光的 21%, 而 65 nm 的层吸收入射光的约 90% ($A(\lambda) = 1$)。

[0015] 冰的典型吸收数字在 300–600 nm 域中约为 0.1 m^{-1} 量级,并且 —假设存在吸收碳层— 因此这与由碳层进行的吸收相比是可忽略的。

[0016] 通过使用显示出导致激发光的位置相关吸收率的孔洞或厚度变化的格栅,并使具有强烈照射的检查局限于在其中格栅未显示出吸收率或显示出很小吸收率的部分上放置的感兴趣区域,并避免对支撑膜的具有激发光的高吸收率且与样本的待检查部分(定位于具有低的或没有光吸收率的区域上)邻接的部分的进行照射,从而避免由于强烈照射而引起的耗散。因此,能够在不损坏样本的情况下使用强烈照射。

[0017] 要注意的是,当研究玻璃化低温样本时这些效果是非常显著的,其中,温度升高导致结晶和 / 或升华并且因此样本损坏。

[0018] 要注意本领域技术人员将理解的是,可用强光来照射与感兴趣区域相距甚远的膜的部分,亦即:其中允许加热(导致例如结晶或升华)的部分,即使那些部分显示出高吸收率。并且可照射与例如格栅的铜网(或显示出高导热率的材料)直接接触的部分,而不会出现冰结晶。

[0019] 还要注意的是可使整个样本暴露于低照度,例如以确定低和高吸收率之间的边界在哪里,只要这并未导致其中发生损坏的温度升高(例如,使得发生冰结晶的温度增加)即可。

[0020] 注意,膜的温度升高不仅取决于被吸收光,而且取决于膜的导热率。虽然较薄的膜

比厚的膜吸收较少的光,但较薄的膜的热传导也减小,因此温度升高仍能够是非常高的。

[0021] 能够以多种方式实现照射的局部化:通过与光束的强度调制相结合使在样本上的所述光束光栅化(rastering);通过使该光束矢量化;或者通过用通过例如空间光调制器(SLM)的宽光束来照射样本。SLM本身是已知的,并被用来改变透射光的相位和/或振幅。其使用示例例如在LCD投影仪中。

[0022] 要注意的是,SLM在FM的光学照射系统(optical illumination system)中的使用是已知的且在美国专利号US 7,884,337 B2中被描述。然而,SLM在本文中用来对激光的相位进行局部调制且不改变样本上的入射光的量(入射在样本上的光强)。

[0023] 重要的是要认识到,可能被视为支撑膜的作为碳的备选的任何其他材料很可能具有与碳相同的高吸收率。这与希望具有的导电支撑膜有关。导电的材料通常具有高光吸收率。

[0024] FM与TEM的结合导致强大的关联显微镜检查(correlative microscopy),其中,两个不同显微镜技术的信息被结合。FM用荧光标记(诸如绿色荧光蛋白质[GFP]或免疫标签)对区域进行定位,而TEM能够用于高得多的分辨率并对重金属标记进行定位。并且,FM能够对大型结构进行定位并以高得多的放大倍数来标识将在TEM中检查的感兴趣区域。

[0025] 优选地,在包括安装在TEM的可抽空样本室上的FM的仪器中执行检查。此类仪器可作为“Tecnai with iCorr”在商业上从美国希尔巴罗市的FEI公司获得。

[0026] 在本发明的一方面,一种设备包括:配备有照射系统以用激发光照射玻璃化样本的荧光显微镜以及用于检测从样本出现的荧光的检测器,该照射系统包括用于对激光光的强度进行调制的空间光调制器,并且该荧光显微镜包括用以控制空间光调制器以对照射进行局部化的控制器,其特征在于,所述设备还包括电子显微镜镜筒(electron microscope column)。

[0027] 通过为荧光显微镜的照射系统配备用于调制样本上的激光光的强度的空间光调制器并向该荧光显微镜添加用于所述空间光调制器的控制器,能够执行之前所述的方法。

[0028] 这与电子显微镜镜筒、优选地与透射电子显微镜镜筒结合。

[0029] 该设备应配备有用以使样本保持在低温温度的装置。

附图说明

[0030] 现在使用附图来阐述本发明,其中相同的附图标记标识相应的特征。为此:

图1A示意性地示出TEM格栅的顶视图;

图1B示意性地示出图1A的细节;以及

图1C示意性地示出图1B中所示的细节的截面。

具体实施方式

[0031] 图1A示意性地示出TEM格栅的顶视图。

[0032] TEM格栅10是具有约25 μm 的厚度和3.05 mm的直径的圆形薄铜箔(copper foil)12。该箔显示出大量孔洞14(例如每英寸400个)和能够在其上面放置样本的薄碳膜16。铜和碳不仅提供支撑,而且提供导电性以避免充电。

[0033] 要注意的是,已知具有较粗或较细网格(mesh)的格栅、其他材料(金、镍、(碳涂覆)

塑料)、其他形式的孔洞(狭缝、六边形)或不同于薄圆形箔的形式(参见例如美国专利号 US 7, 767, 979 和 US7, 034, 316)。

[0034] 还要注意的,孔洞可显示出薄碳层,例如 3 nm 的层。这是根据 LARSON 不足以吸收光或提供从样本到接地(格栅的支持架(holder))的导电路径。

[0035] 膜不必是碳膜,对于本发明而言基本上该膜是吸收膜,并且通过不照射箔的其中照射导致热耗散的部分来避免吸收。

[0036] 图 1B 示意性地示出图 1A 的细节。

[0037] 图 1B 示意性地示出一条铜箔 12、碳膜 16 和碳膜中的大量孔洞 18。在碳膜和孔洞上提供玻璃化冰中的玻璃化样本 22。

[0038] 图 1C 示意性地示出沿着图 1B 中所示的细节的线 AA' 的截面。

[0039] 图 1C 示意性地示出铜条(copper bar)12 的一部分和碳箔 16 的截面。箔 16 显示出大量孔洞 18。在碳膜 16 的顶部上示出一层玻璃化冰 20,其中存在样本 22。因此感兴趣区域将是样本 22 位于孔洞上的部分。

[0040] 当用强光照射格栅时,孔洞 18 被照射且孔洞周围(邻接)的部分不被照射。

[0041] 要注意的是,铜箔还能够是另一材料,例如镍、金、(碳涂覆)塑料等。还要注意的,孔洞可显示出薄碳层,例如 3 nm 的层。这是根据 LARSON 不足以吸收光或提供从样本到接地(格栅的支持架)的导电路径。

[0042] 还要注意的,虽然仅在玻璃化低温样本方面解释了本发明,但当研究比如刚好在相变温度以下的化学过程时或者当研究例如蛋白质时,会出现类似效果。

[0043] 要提及的是,在其他应用中也能够使用局部化照射,其中需要在给定边界外面的照射或避免某些区域的照射。

[0044] 非专利文献

[-1-] SCHWARTZ, Cindy L. et al.; 'Cryo-fluorescence microscopy facilitates correlations between light and cryo-electron microscopy and reduces the rate of photobleaching', J. Microsc. 2007 Aug 227(Pt 2), pp 98-109.

[-2-] Internet catalogue TED PELLA, Redding, California, USA, <http://www.tedpella.com/supflm.html/suptfilm.htm>, created Jan. 21th, 2013.

[-3-] SARTORI, Anna et al., 'Correlative microscopy: Bridging the gap between fluorescence light microscopy and cryo-electron tomography', J. Struct. Biol. 160 (2007), p. 135-145.

[-4-] LARSON, D.M. et al., 'The surface of evaporated carbon films is an insulating, high-bandgap material.', J. Struct. Biol. (2011).

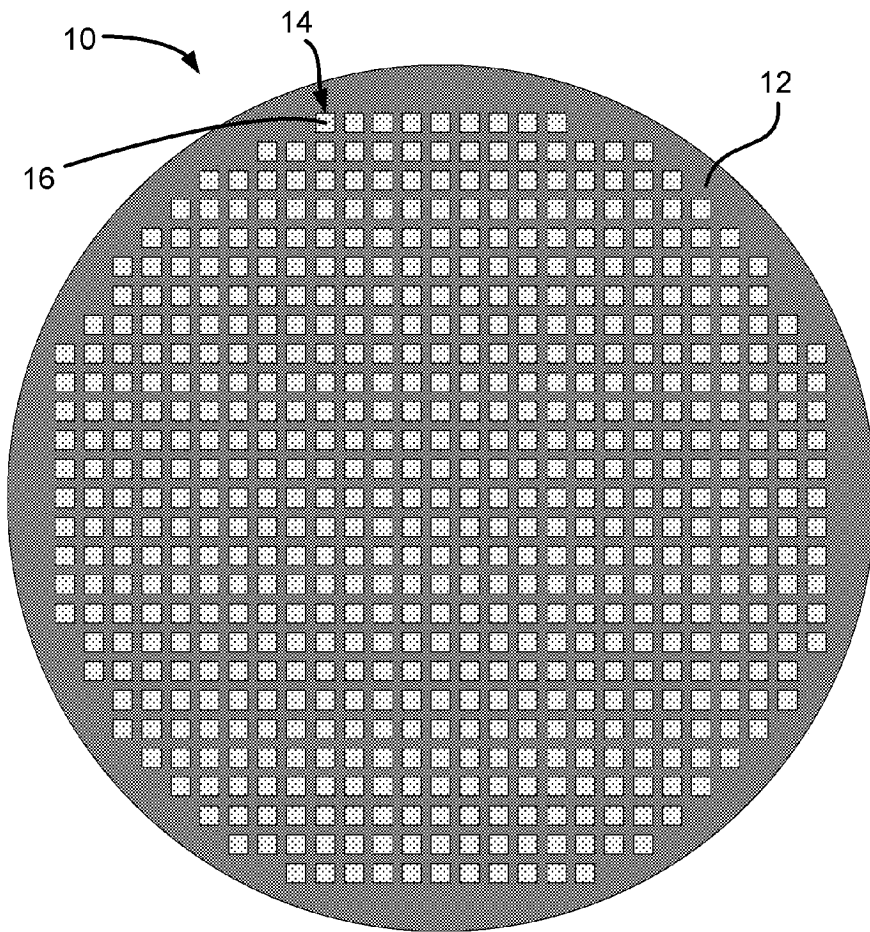


图 1A

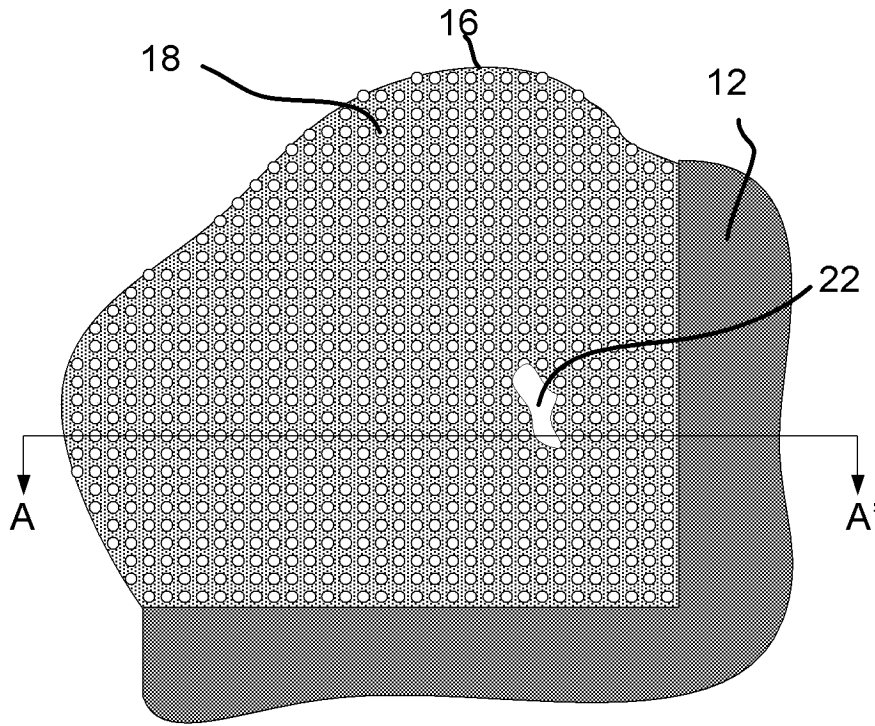


图 1B

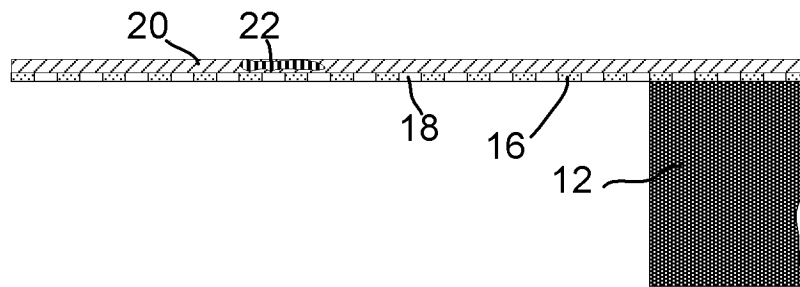


图 1C