

JEM-2100Plusを用いたクライオ電子顕微鏡観察について

2021.04.01-02

日本電子株式会社

EMアプリケーション部 細木 直樹

クライオTEM法とは

[トップ](#) > [用語集](#) > 透過電子顕微鏡 基本用語集

透過電子顕微鏡 基本用語集

■ クライオ電顕

cryo-electron microscopy

[目次: [理論](#)]

氷包埋法や凍結切片法等の各種凍結技法により、染色等を行わずに、作製した生物系試料(細胞、精製タンパク質、ウイルス、脂質分子等)を、凍結状態のまま電子顕微鏡内に挿入して観察する手法。観察は液体窒素温度、もしくは液体ヘリウム温度で行う。生物系の試料は軽元素から構成されるものがほとんどで、散乱コントラストは生じない。そのため、数 μm 程度のデフォーカスすることで生じる位相コントラストにより観察を行う。

低温状態の試料を透過電子顕微鏡内に挿入し観察できるクライオトランスファホルダを使用する場合と、低温状態の試料を自動搬送する機能を有した専用のクライオ電子顕微鏡装置を用いる場合がある。

なお、クライオ電顕法を用いた三次元構造解析手法には、単粒子解析やトモグラフィーなどがある。

"Cryo-electron microscopy" is a microscopy method used for the observation of biological specimens at the temperature of liquid nitrogen or liquid helium. The biological specimens of purified proteins, viruses, lipid molecules, etc. are prepared by various freezing methods (ice embedding, freeze sectioning, etc.) without staining, and are inserted into a microscope with the specimens kept frozen. Since biological specimens are mostly composed of light elements, scattering contrast is extremely weak to observe. Thus, the specimen is observed using phase contrast produced at a defocus of a few μm .

For inserting the low-temperature (frozen) specimens, two techniques are available: the use of a cryo-transfer holder or a dedicated cryo-electron microscope which has an automatic specimen transfer mechanism.

3D structure analysis methods using cryo-electron microscopy include single particle analysis and tomography.

<https://www.jeol.co.jp/words/emterms/>

JEM-2100Plusを用いたクライオTEM観察



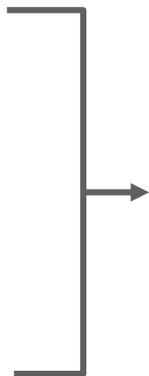
試料ホルダ予備排気装置



自動浸漬凍結装置



クライオトランスファホルダ



JEM-2100Plus

クライオTEMの実験時に使用するもの



液体窒素デューワー



液体窒素用容器
(通常のポットの
パッキンを外したもの)



ヘアドライヤー
(用具の乾燥)



エタノール
(霜の拭き取り)



ピンセット、ドライバー、
ペンライト等



液体窒素取り扱い用手袋

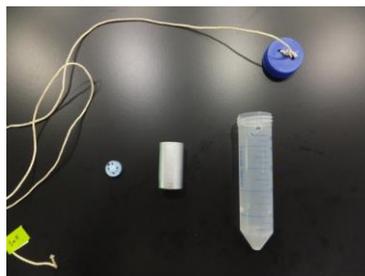


防護マスク

クライオTEM試料の保管方法



グリッドケース



グリッドケース
保管ツール



液体窒素搬送瓶



試料保管デュ



ドライシッパー
(長距離輸送用)

■構造図

■容器内温度分布図

① 内 槽
② ネットチューブ
③ 外 槽
④ 断熱材

⑤ 吸着材A
⑥ 吸着材B
⑦ ハンドル
⑧ キャッププラグ

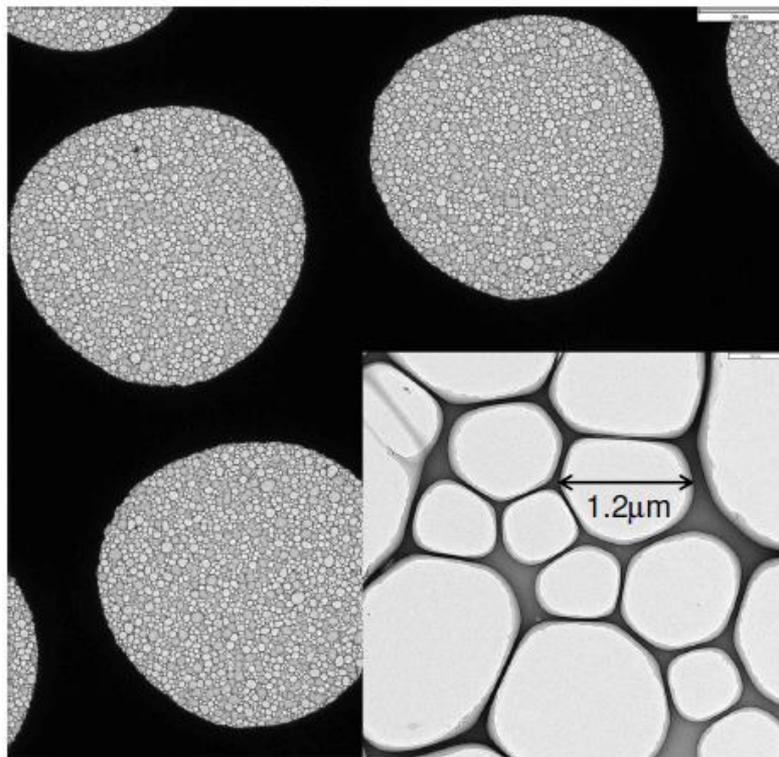
⑨ キャニスター
⑩ 液体窒素吸着材

※キャニスターは
DR-10のみが付属します。
※ハンドルは
DR-20のみが付属します。

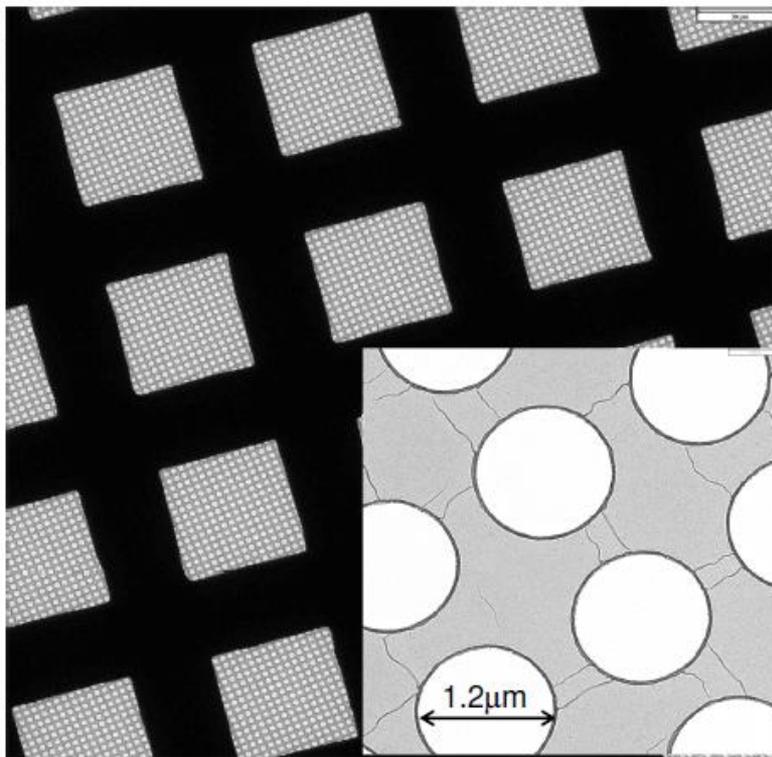
<https://www.wakenbtech.co.jp/product/post-5361>

<https://www.wakenbtech.co.jp/product/post-5361>

クライオTEM試料のための支持膜



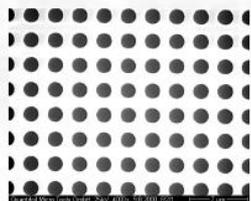
マイクログリッド
(Lacey carbon film)



Quantifoil, C-flat
(Holey (carbon) film)

Holey (carbon) gridの種類

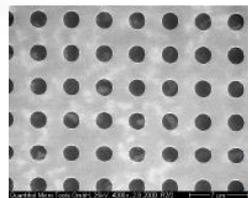
QUANTIFOIL® R 2/1



4000x

Hole diameter ~2 μm
Bar ~1 μm
Period 3 μm

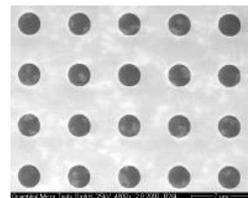
QUANTIFOIL® R 2/2



4000x

Hole diameter ~ 2 μm
Bar ~ 2 μm
Period 4 μm

QUANTIFOIL® R 2/4

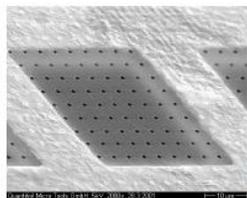


4000x

Hole diameter ~ 2 μm
Bar ~ 4 μm
Period 6 μm

Holey films with 2 μm circular holes are used at magnifications between 30,000x and 40,000x. QUANTIFOIL® R 2/4 may be preferred over R 2/2, when an increased tolerance with respect to the position of beam, and a larger beam diameter are desired, such as in the case of automated image acquisition. QUANTIFOIL® R 2/1 has more open area than R 2/2. It is used when focussing is carried out on the edge of a hole burnt in the ice in a neighbouring hole instead of on the foil adjacent to the hole.

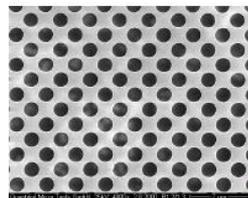
QUANTIFOIL® R 1/4



2000x

Hole diameter ~ 1 μm
Bar ~ 4 μm
Period 5 μm

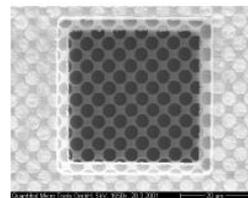
QUANTIFOIL® R 1.2/1.3



4000x

Hole diameter ~ 1.2 μm
Bar ~ 1.3 μm
Period 2.5 μm

QUANTIFOIL® R 3.5/1

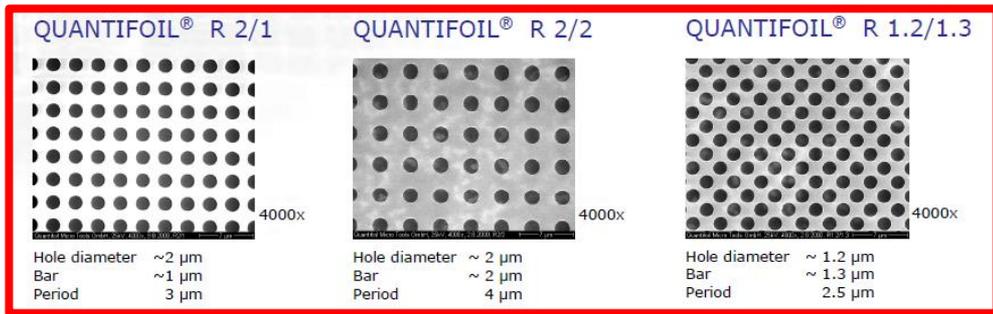


1650x

Hole diameter ~ 3.5 μm
Bar ~ 1 μm
Period 4.5 μm

| QUANTIFOIL® type | Hole size in μm | Spacing in μm | Period in μm |
|------------------|----------------------------|--------------------------|-------------------------|
| R 0.6/1 | 0.6 | 1.0 | 1.6 |
| R 1/1 | 1.0 | 1.0 | 2.0 |
| R 1/2 | 1.0 | 2.0 | 3.0 |
| R 1/4 | 1.0 | 4.0 | 5.0 |
| R 1.2/1.3 | 1.2 | 1.3 | 2.5 |
| R 1.2/20 | 1.2 | 20.0 | 21.2 |
| R 2/1 | 2.0 | 1.0 | 3.0 |
| R 2/2 | 2.0 | 2.0 | 4.0 |
| R 2/4 | 2.0 | 4.0 | 6.0 |
| R 3/3 | 3.0 | 3.0 | 6.0 |
| R 3/5 | 3.0 | 5.0 | 8.0 |
| R 3.5/1 | 3.5 | 1.0 | 4.5 |
| R 5/10 | 5.0 | 10.0 | 15.0 |
| R 5/20 | 5.0 | 20.0 | 25.0 |
| R 6/6.5 | 6.0 | 6.5 | 12.5 |
| R 6/100 | 6.0 | 100.0 | 106.0 |
| R 10/5 | 10.0 | 5.0 | 15.0 |
| R 10/10 | 10.0 | 10.0 | 20.0 |
| R 10/20 | 10.0 | 20.0 | 30.0 |
| R 17/5 | 17.5 | 5.0 | 22.5 |

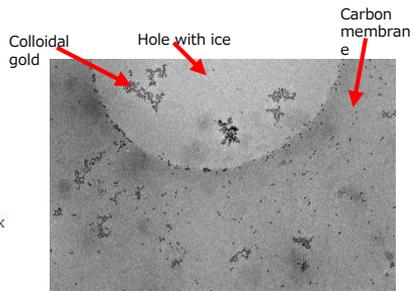
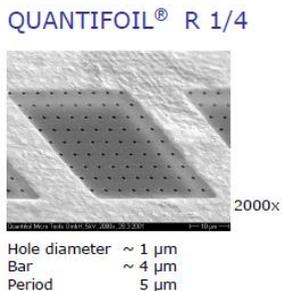
Typical types of holey carbon grid



It's should be better to use grids which have many holes in one field of view for high-throughput.

I usually use them for **SPA**.

以前の観察時には2/1を使用。上記どのグリッドでも問題ないと思われる。



Colloidal gold (black dots in upper image) is used for fiducial marker.

Gold particles tend to exist on carbon membrane.

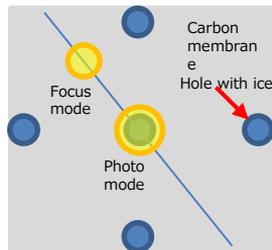
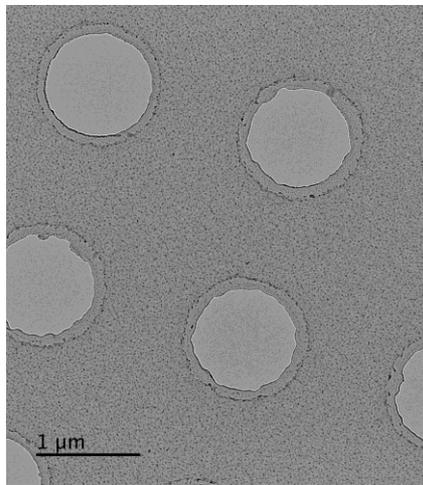


Photo mode and Focus mode must be exist on stage tilting axis.

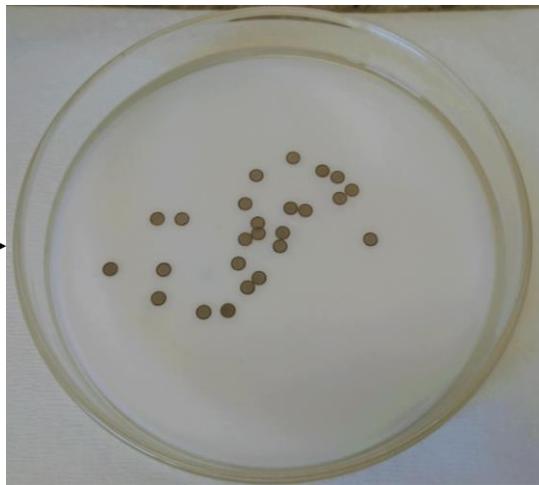
I usually use it for **tomography**.

It's should be better to use grids which have wide area carbon membrane.

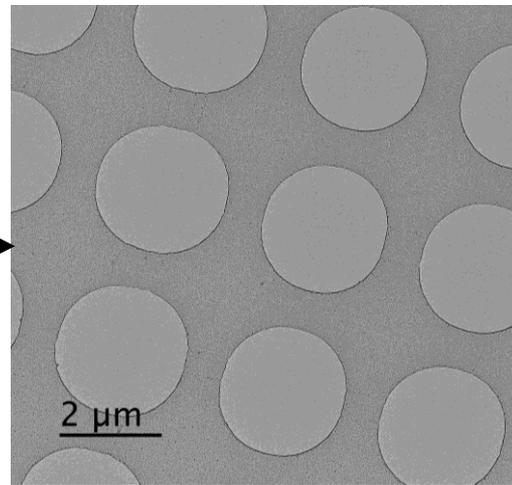
試料作製前処理：グリッドの洗浄



洗浄前のグリッド



アセトン浸漬(数時間以上)



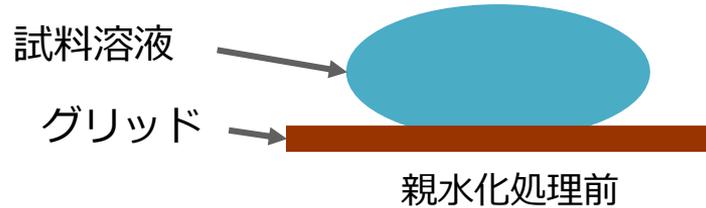
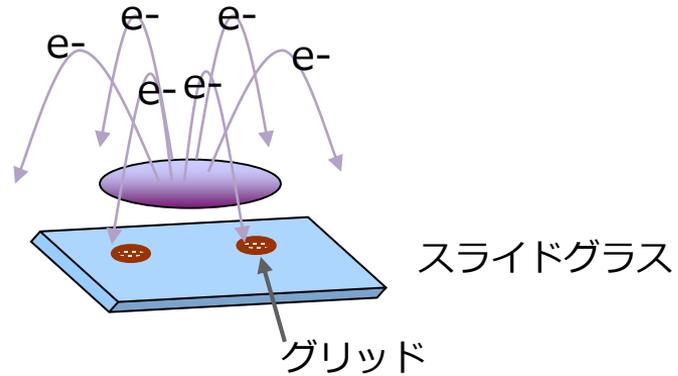
洗浄後のグリッド

稀に孔の辺縁部に汚れがある。

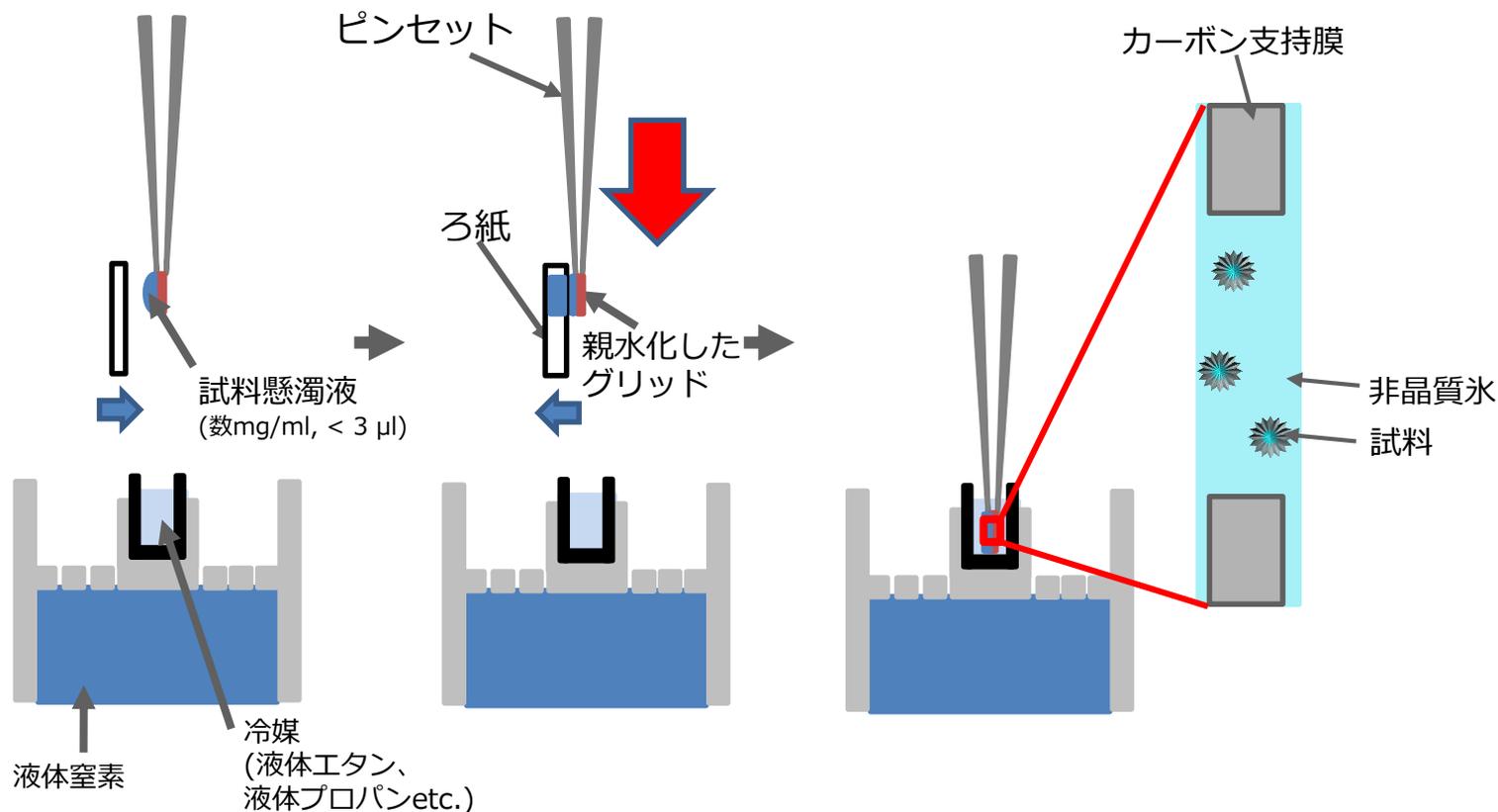
試料作製前処理：グリッドの親水化



DII-29020HD (グロー放電装置)



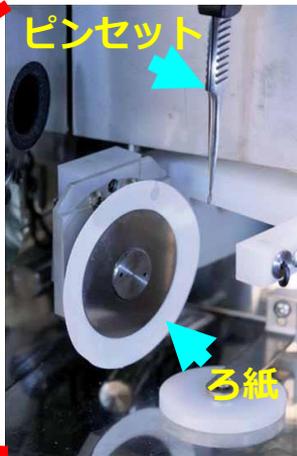
クライオTEM試料作製法:氷包埋法(Plunge freezing)



各種冷媒の凍結効果

| Cryogen | FP(°C) | BP(°C) | LH(evap/Cal/g) |
|--------------------------------------------------|-----------------|--------|----------------|
| Ethane (C ₂ H ₆) | -172 | -93 | |
| Propane (C ₃ H ₈) | -190 | -45 | 102 |
| Propylene (C ₃ H ₆) | -185 | -48 | 105 |
| iso-pentane (C ₅ H ₁₂) | -131 | 36 | 28 |
| iso-butane (C ₄ H ₁₀) | -135 | -10 | 82 |
| Helium (He) | -272 (26 気圧) | -269 | |
| Nitrogen (N ₂) | -210 | -196 | |
| Oxygen (O ₂) | -219 | -183 | - |

クライオTEM試料作製法：環境制御式浸漬急速凍結装置



制御項目

- ・ 温度、湿度
- ・ ブロッキング時間
- ・ ブロッキング回数
- ・ ブロッキング位置
- ・ ピンセットの回転
(グリッドの表裏のブロッキング)



確認項目

- ・ 温度
- ・ 液体窒素残量

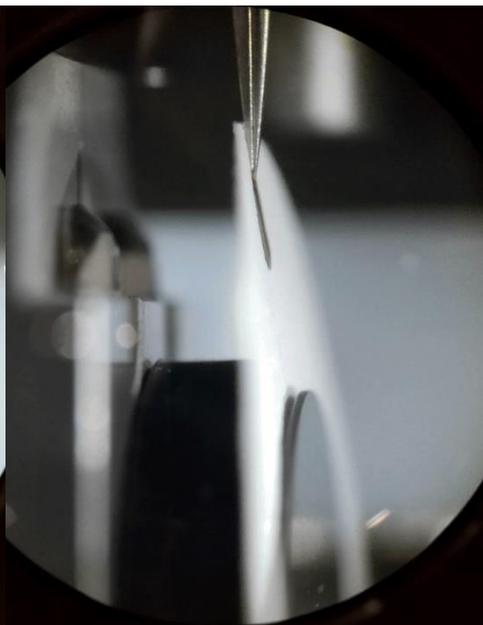
EMGPのろ紙位置の参考画像



My setting



Tweezer is too high.
ピンセット位置が高すぎてグリッドがろ紙と平行になっていない。



Tweezer is too close.
ろ紙位置が近すぎてグリッドを押しすぎている。

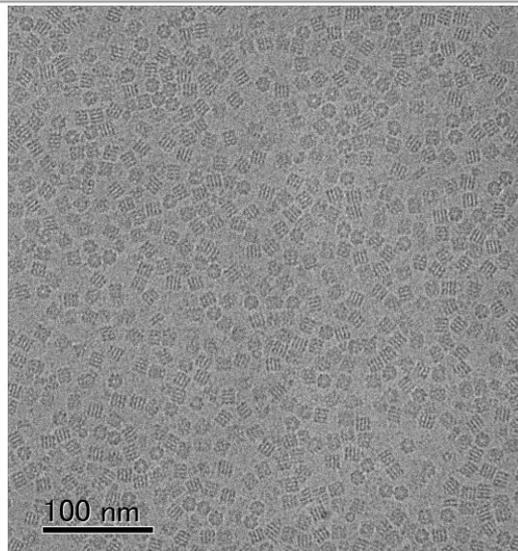
試料作製時に最適化すべきこと

試料側

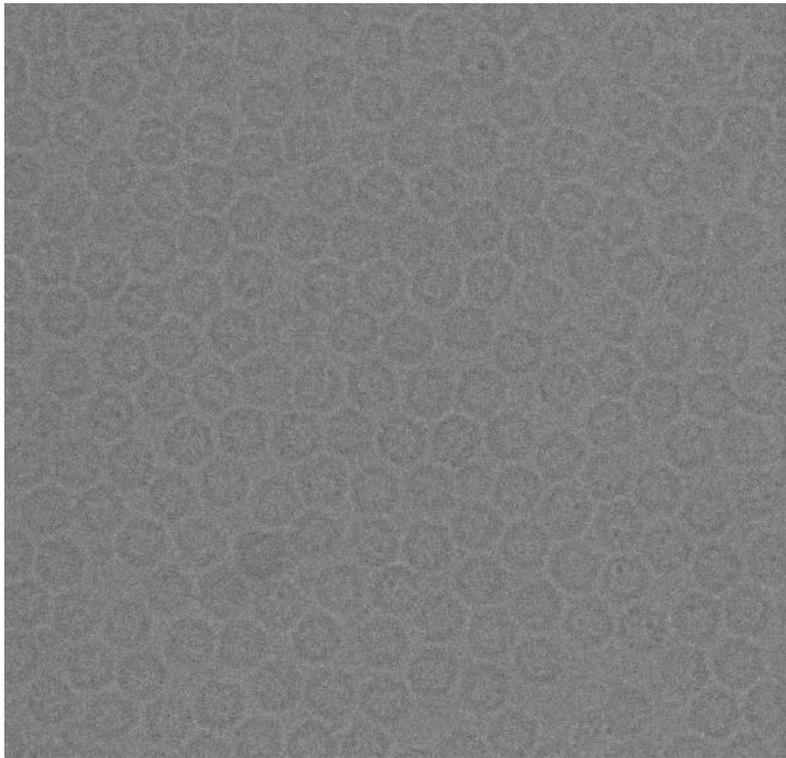
- ・ 試料の均一性
- ・ 試料の濃度
- ・ 溶媒の種類
(塩濃度、pH、界面活性剤の有無・種類)

支持体側

- ・ 支持膜の種類(金薄膜、酸化グラフェン)
- ・ 支持膜の孔径
- ・ 親水性の度合い
- ・ 試料の滴下量
- ・ ブロッキング時間・回数・強さ
- ・ 表吸いか裏吸いか
etc...



良い試料



氷の厚さの最適化。

→薄すぎると粒子の居場所がなくなり、厚すぎると像がぼける。

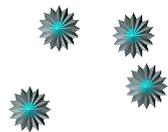
デフォーカス(Z)のばらつきを抑える。

試料の分散の最適化。→様々な向きで一様に分散している。

粒子がきれいに肉眼で判別できなければ、データ収集を行わない。

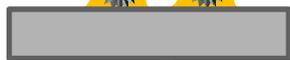
懸濁試料のTEM観察

精製タンパク質、ウィルス、
細胞、リポソーム、ミセル etc.



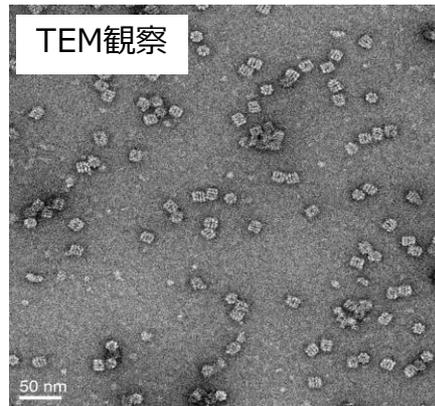
- ・ネガティブ染色
:試料への電子線ダメージの
染色剤による軽減効果

染色液 (酢酸ウラン、
リンタングステン酸 etc.)



カーボン支持膜

TEM観察



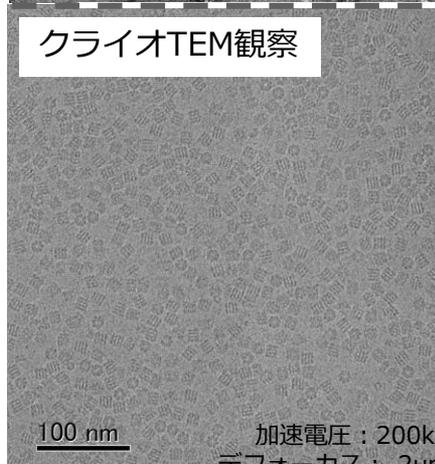
- ・氷包埋
:試料への電子線ダメージの
氷による軽減効果



非晶質氷

カーボン支持膜

クライオTEM観察



加速電圧：200kV
デフォーカス：-2 μ m
試料：GroEL 照射電子線量：20 e⁻/Å²

ネガティブ染色観察とクライオTEM観察

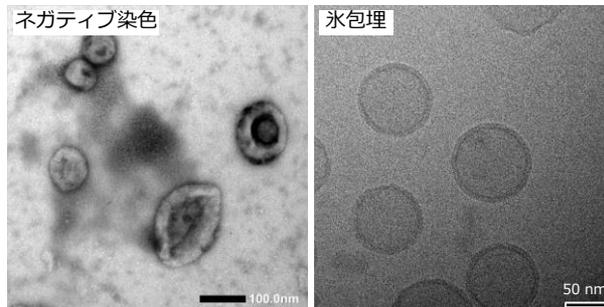
●ネガティブ染色観察

- 重金属を含む染色剤が電子を散乱するため、高コントラストな像が得られる。
- 簡便。安価。
- 吸着・乾燥ストレスによる構造の変化。

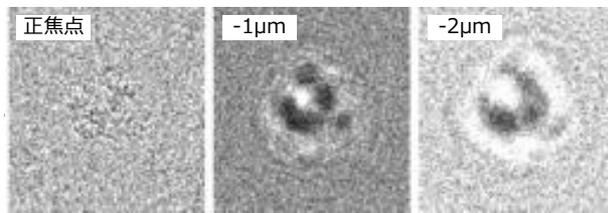
●クライオTEM観察

- 軽元素のため、位相コントラストによる像観察。
 - 正焦点ではコントラストがつかない。
 - デフォーカスによりコントラストをつける。
- 氷が溶けてしまうため、電子線照射量に制限有り
- 煩雑。高コスト。
- 溶液中の分子形態に近い形での観察。

それぞれの手法で観察したリポソーム

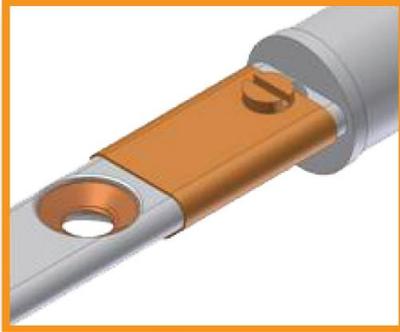


異なるデフォーカス量で観察した試料



Structure 18, 17-27, 2010

クライオトランスファホルダー



通常観察用



トモグラフィ用

凍結試料装填のステップ (1)

使用前日からElsaホルダーのベークをしておきます。

ベーク終了後、室温近くまで戻ったらデュワー部のねじを締め、ポンピングステーションから外します。

Elsaホルダーをワークステーションにセットします。
先端に前回観察したグリッドがあれば外します。

温度コントローラーを接続し、立ち上げます。

ホルダー先端、デュワーにLN2を注ぎ冷却します。

LN2量が減ると注ぎ足し、 -170°C 程度になるまで待ちます。
LN2量は先端に少しかぶる程度です。

凍結試料装填のステップ (2)

凍結試料の入ったグリッドケースをワークステーション左下の所定の場所に置き、蓋のねじを緩めます。

グリッドケースは常にLN2に浸っていることを確認してください。
LN2量が減ると適宜注ぎ足します。

ホルダー先端のシャッターを開けます。

ホルダーの角度を作業しやすいように斜めにします。
この際にデュワーからLN2がこぼれるので注意してください。

専用の治具を用いてホルダー先端の試料押さえ爪を開いてください。

凍結グリッドをホルダー先端と試料押さえ爪の間に滑り込ませるように装填します。

専用の治具を用いてホルダー先端の試料押さえ爪を閉じます。

ホルダー先端のシャッターを閉めます。
ホルダーの角度をまっすぐに戻します。

凍結試料装填のステップ (3)

ホルダーを素早くワークステーションから引き抜き、TEMのホルダー装填口に入れ、予備排気スイッチをonにします。

この際にデュワーからLN2がこぼれるので注意してください。

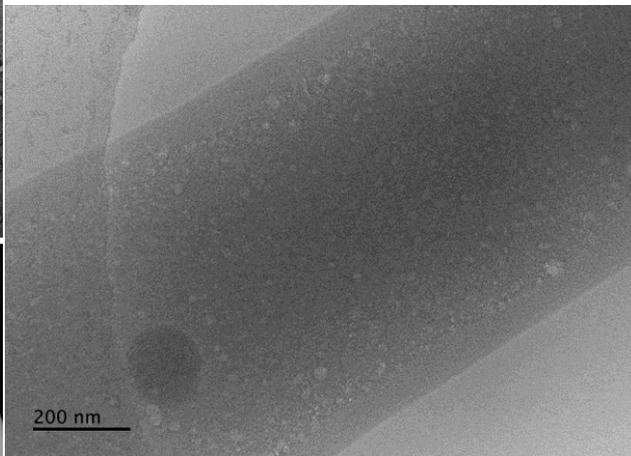
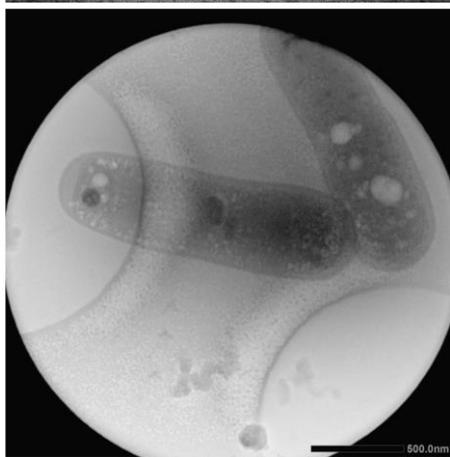
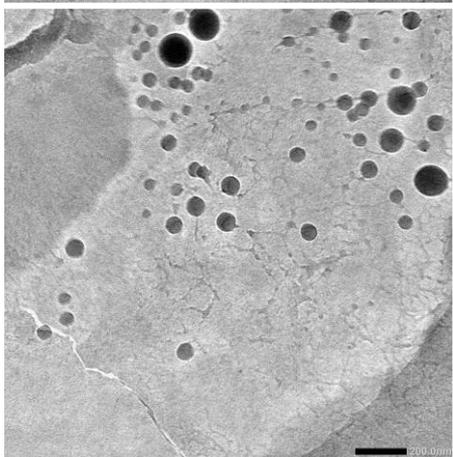
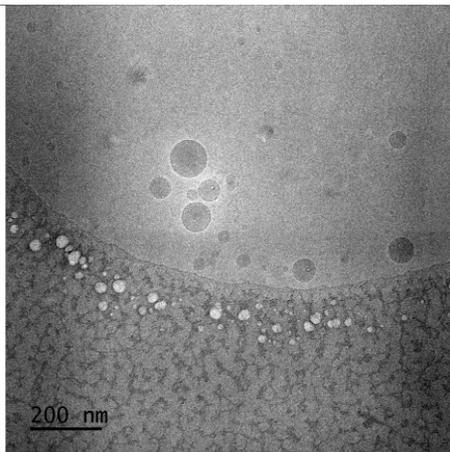
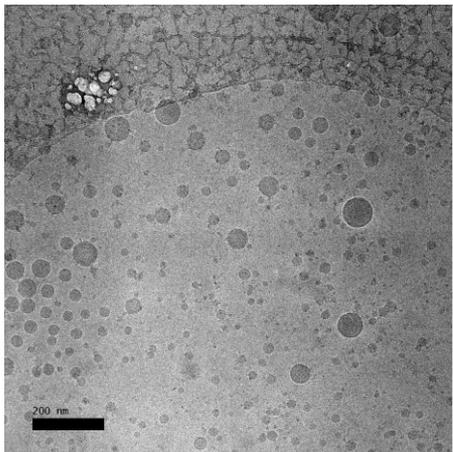
予備排気が終わると、通常のホルダーと同じ要領で装填します。

デュワーにLN2を注ぎ足し、デバブラーで数秒デュワーに入れて液面を落ち着かせます。

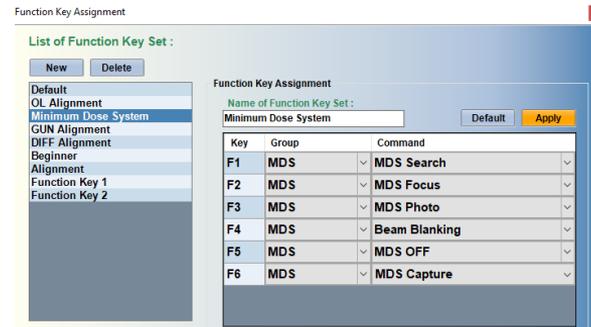
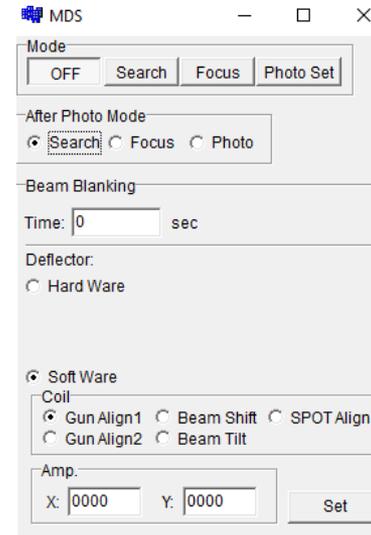
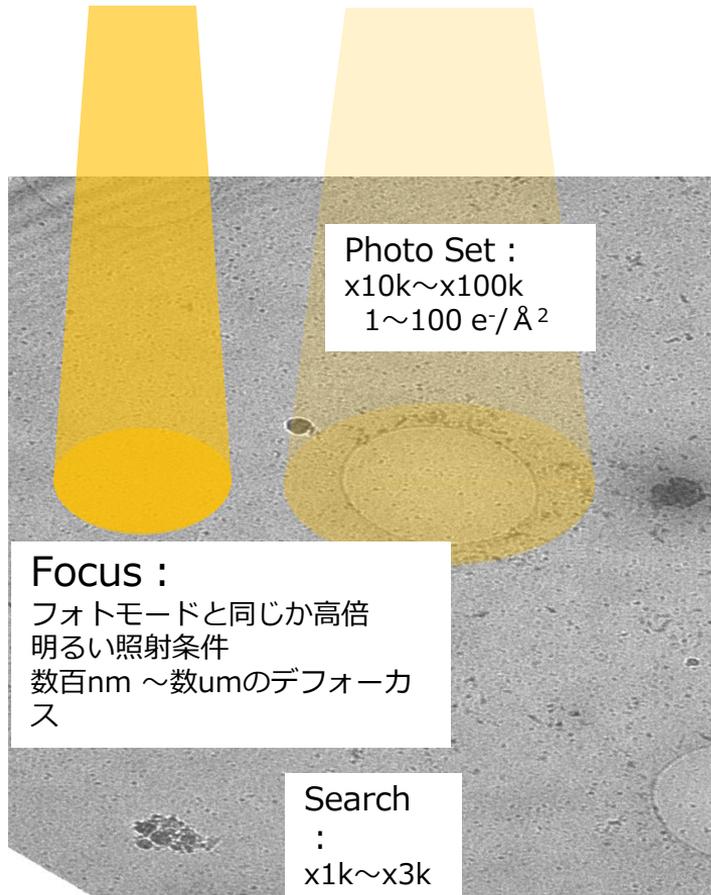
真空が落ち着いたらホルダーのシャッタを開け、ビームを出します。

30分から1時間程度はホルダーの温度が落ち着かないため、ドリフトが大きいです。ドリフトが落ち着くまでは高倍観察は不可能であるため、Lowmagでグリッドの様子を観察したり、MDSの設定を行います。

そのまま観察してしまうと…



電子線照射損傷低減システム : Minimum Dose System (MDS)



MDS設定のステップ (1)

MDS PhotoをクリックしてMDSを有効にします。

これ以降Photo→Search→Focus→Photo・・・の順番は崩しません。

Photoモードの倍率(x10k-x60k程度), 明るさ(1~100 $e^-/\text{\AA}^2$:アプリケーションや試料による), 照射領域(一つの孔より少し大きい程度)等の撮影条件を設定します。

軸合わせ(電流軸)、非点補正も行います。

Searchモードにします。

倍率(<x2 k程度若しくはDiff shadow image), 明るさ(できるだけ暗く), 照射領域(ビームを最大に開く)等の視野探し条件を設定します。

PhotoとSearchモード両方で確認できる物(霜等)を見つけます。

目標物をPhotoモードの視野中心にステージで持ってきます。

Searchモードにして目標物を見つけます。

視野ずれがある場合、「Alignment Panel」ウィンドウで [PLA] をクリックしてONにします。

DEF/STIG X, Yノブで目標物を視野中心に移動します。

MDS設定のステップ (2)

孔の中心にステージ移動します。

Focusモードにします。

倍率(Photoモードと同じか高い倍率), 明るさ, 照射領域(支持膜上のみ照射して周囲の孔に照射しない範囲)等、焦点合わせ条件を設定します。

「Alignment Panel」ウィンドウで [Image Shift] をクリックしてONにする。

Shift X, Yノブで電子線を焦点合わせのための視野(支持膜上)にビームを動かします。

DEF/STIG X, Yノブでビームが当たっている領域を視野中心に移動します。

Photosetモードの照射領域と重ならないようにしてください。

周囲の孔にビームが当たらないようにしてください。

軸合わせ(電流軸)も行います。

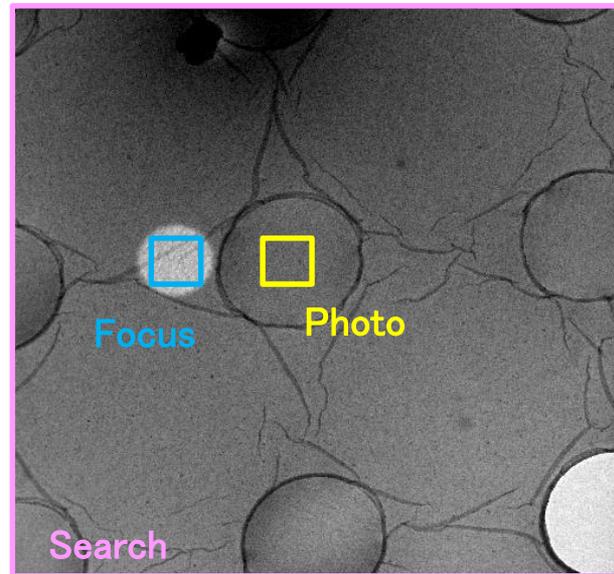
Search→Focus→Photoを何度か繰り返し、再度調整を繰り返し、ビームの逃げ、視野ずれを最小限にします。

観察終了後はMDSをoffにします。

MDS撮影の基本ステップ

MDS撮影では3つの撮影モードを切り替えながら投影像を撮影

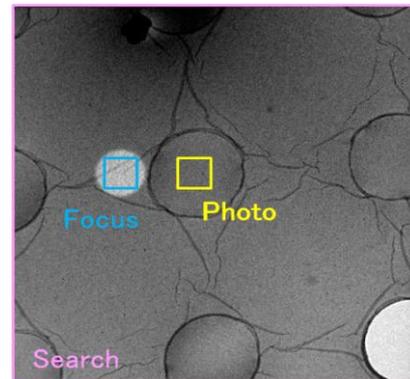
- (1) Searchモードで視野探し
- (2) Focusモードで焦点合わせ
観察したい領域の近傍で焦点合わせする
- (3) Photoモードで撮影



Searchモード：視野探し

Searchモードが満たすべき要件:低倍

- (1) 低ドーズであること
- (2) 広い視野を観察できること



MDS撮影の一例

Focusモード：焦点合わせ

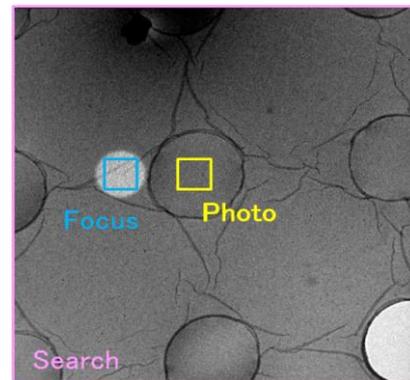
Focusモードが満たすべき要件

(1) 撮影したい視野の近傍であること

☞ ただし撮影したい視野にはビームは当てない

(2) 高倍率

☞ 支持膜のカーボンの非晶質リングパターンが見える



MDS撮影の一例

Photoモード：画像取得

Photoモードが満たすべき要件

(1) 撮影したい視野であること

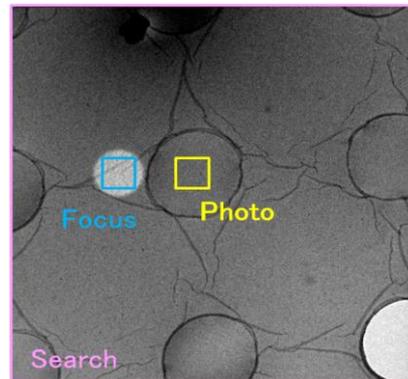
☞ ただし周囲の孔にはビームは当てない

(2) 低ドーズであること

☞ 1~100 e-/Å²程度の照射電子線量であること

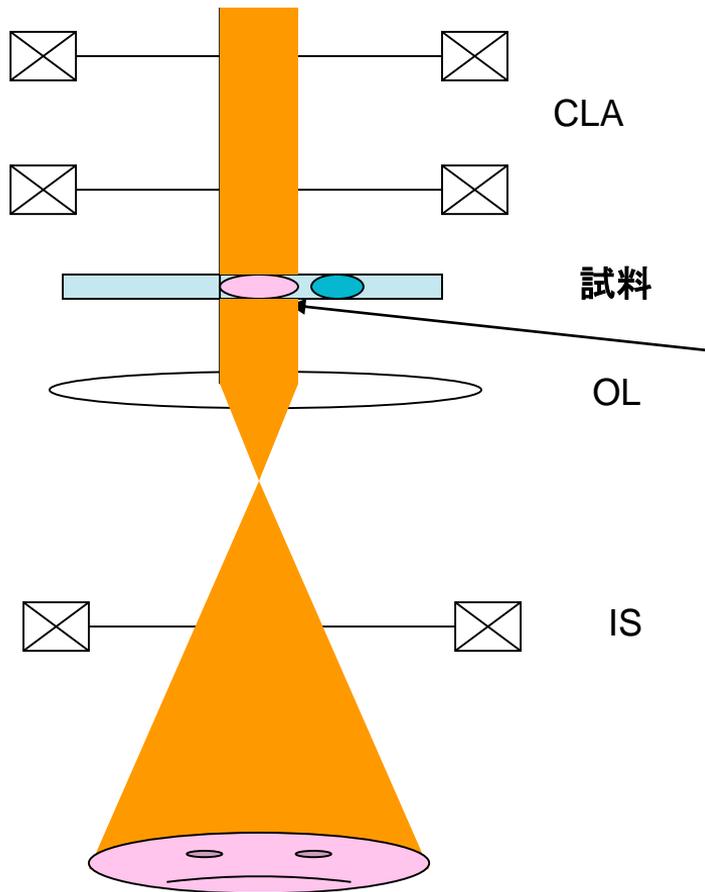
(3) 光軸上であること

☞ もっとも収差の影響の小さい状態で撮影を行うこと



MDS撮影の一例

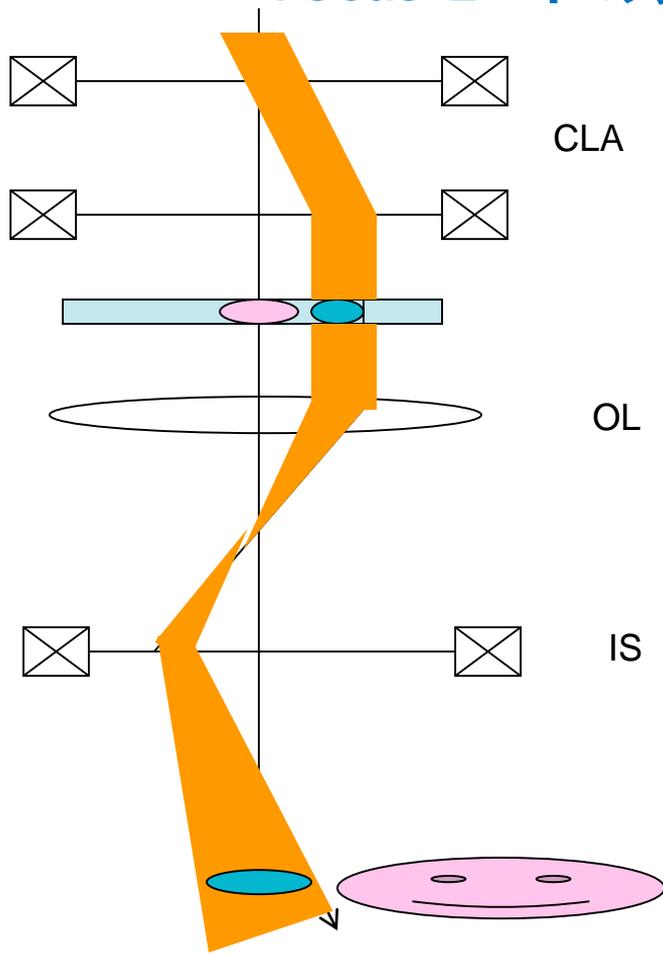
Focusモードの条件設定



撮影したい視野

※視野に絞った強いビームが照射されているのでこのままではすぐに試料は壊れる

Focusモードの条件設定



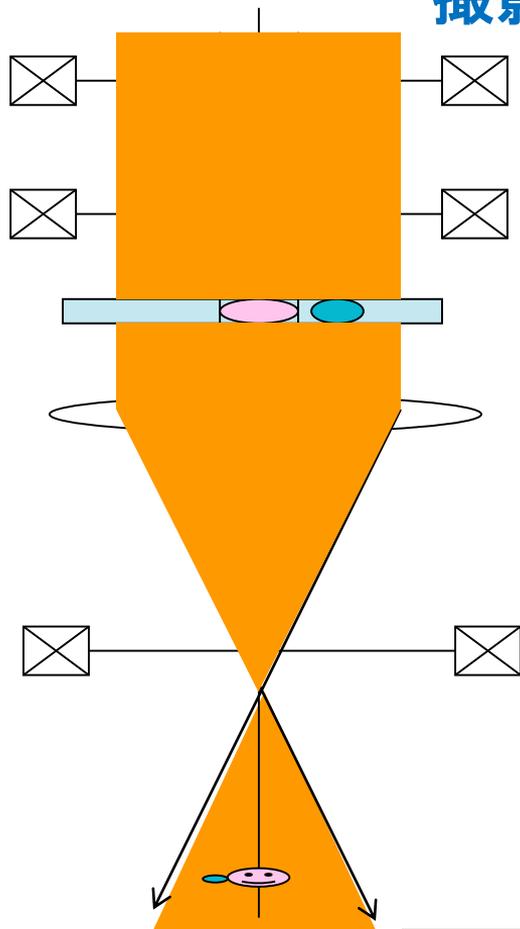
CLA

OL

IS

イメージシフトを用いてビームを蛍光板の中心に持ってくる

撮影の流れ



CLA

試料

OL

IS

Searchモードで視野探し



Focusモードで焦点合わせ



ビームブランクon



Photoモードへ移行



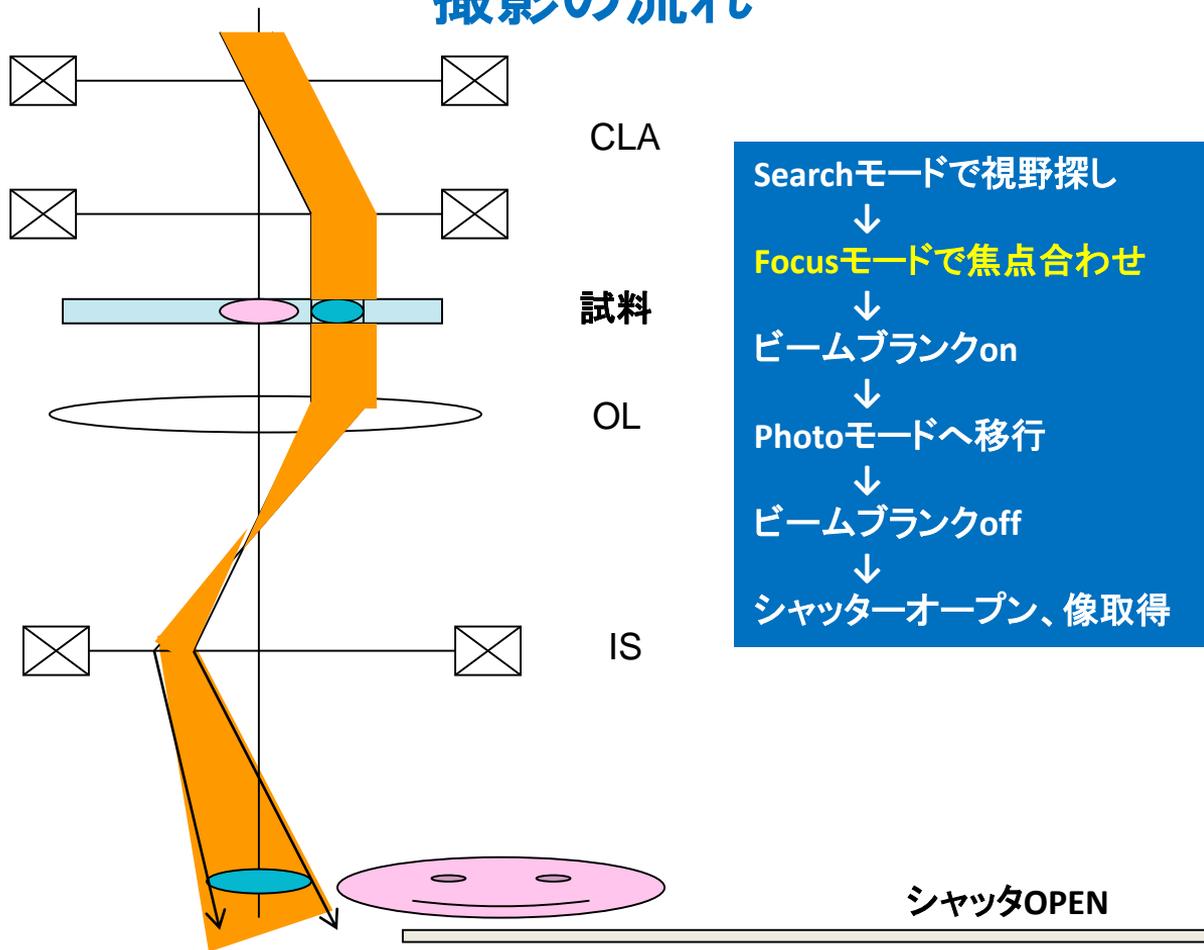
ビームブランクoff



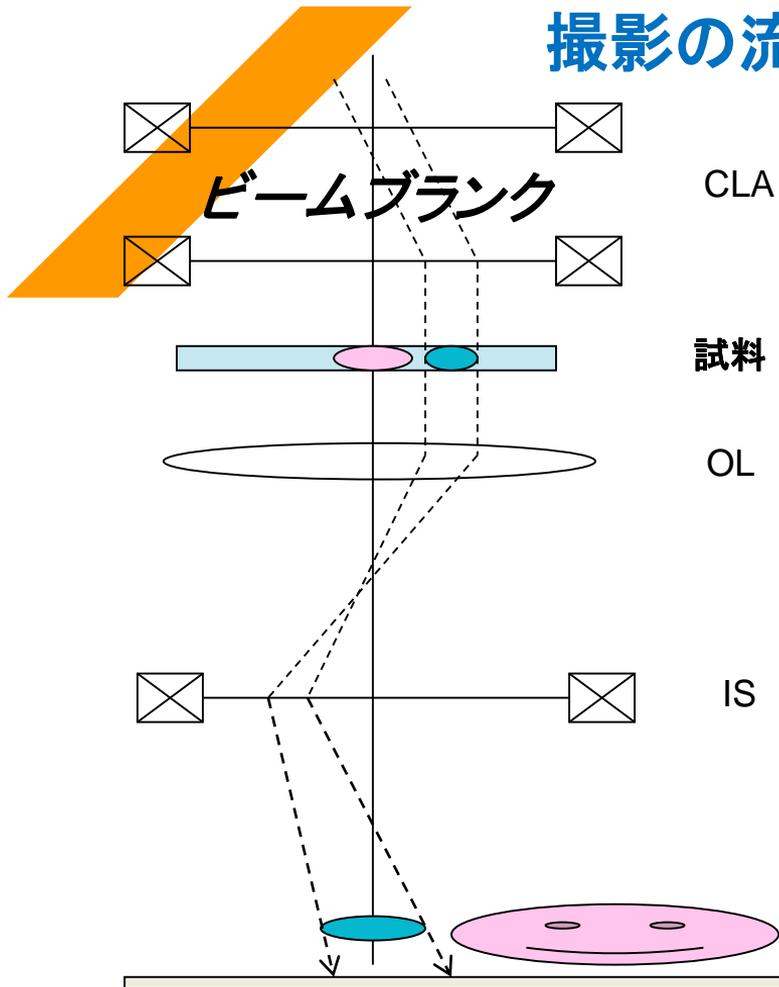
シャッターオープン、像取得

シャッターOPEN

撮影の流れ



撮影の流れ

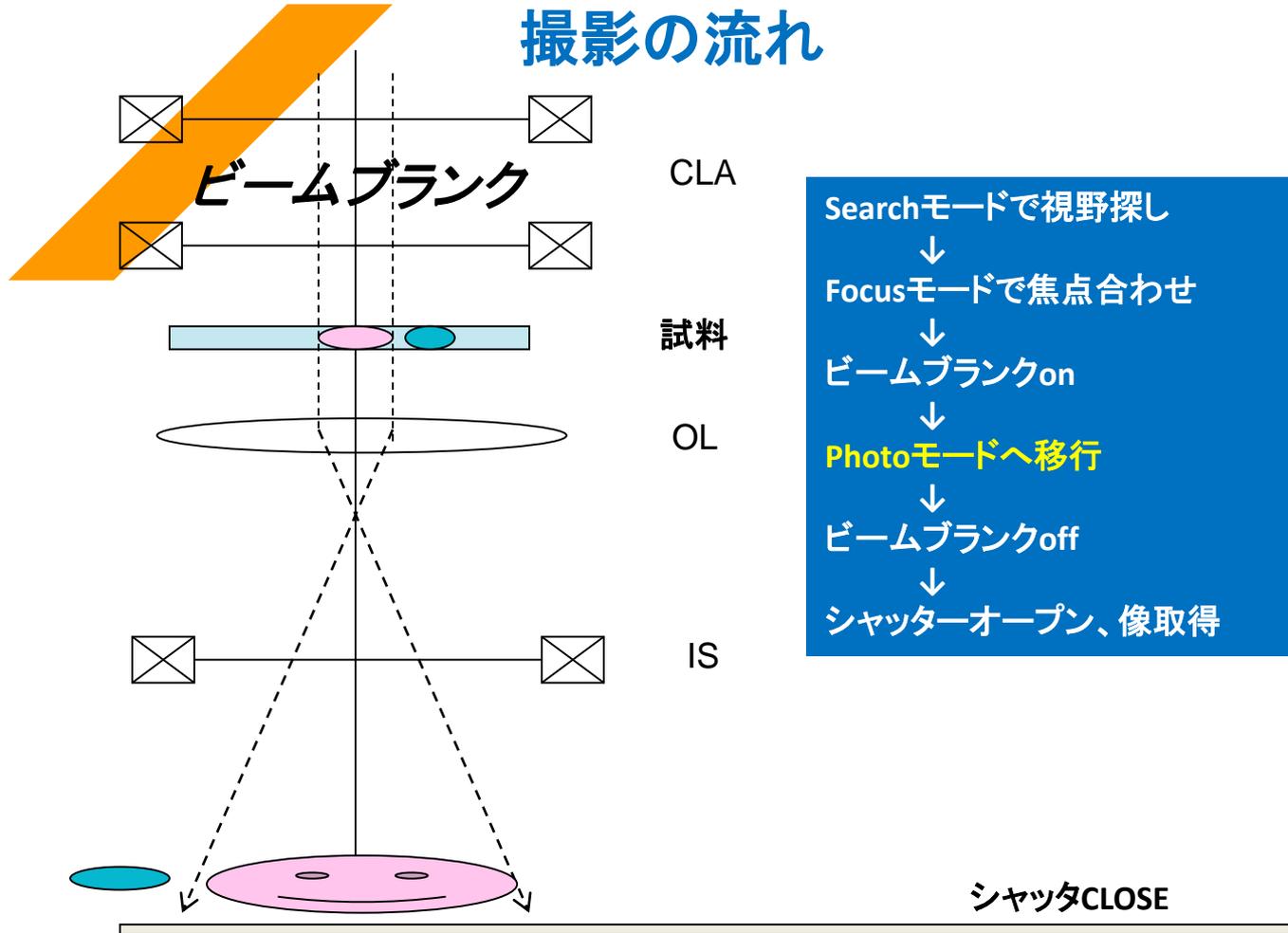


Searchモードで視野探し
↓
Focusモードで焦点合わせ
↓
ビームブランクon
↓
Photoモードへ移行
↓
ビームブランクoff
↓
シャッターオープン、像取得

Photoモードに移行する前にビームブランクする(ドーズディレイ)

シャッタCLOSE

撮影の流れ



Searchモードで視野探し



Focusモードで焦点合わせ



ビームブランクon



Photoモードへ移行



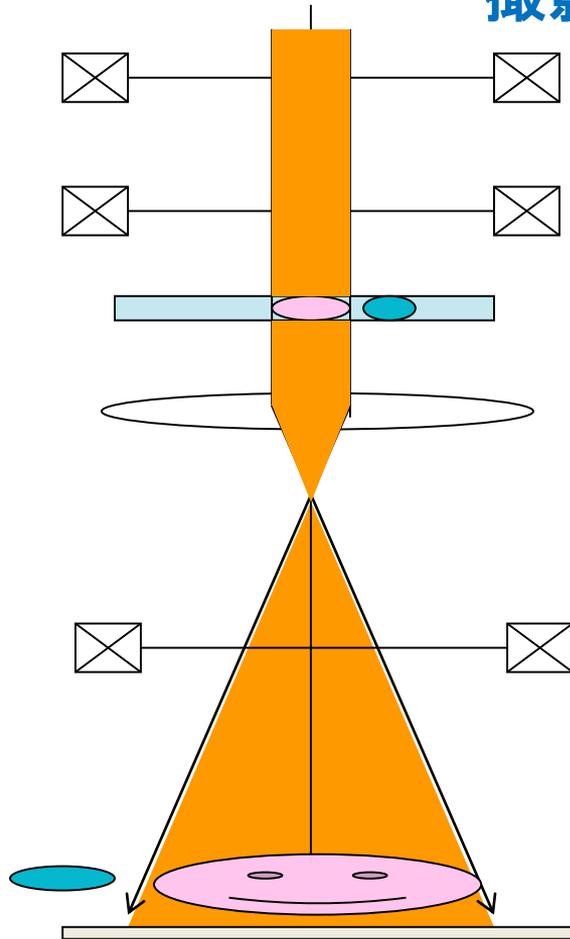
ビームブランクoff



シャッターオープン、像取得

シャッタCLOSE

撮影の流れ



CLA

試料

OL

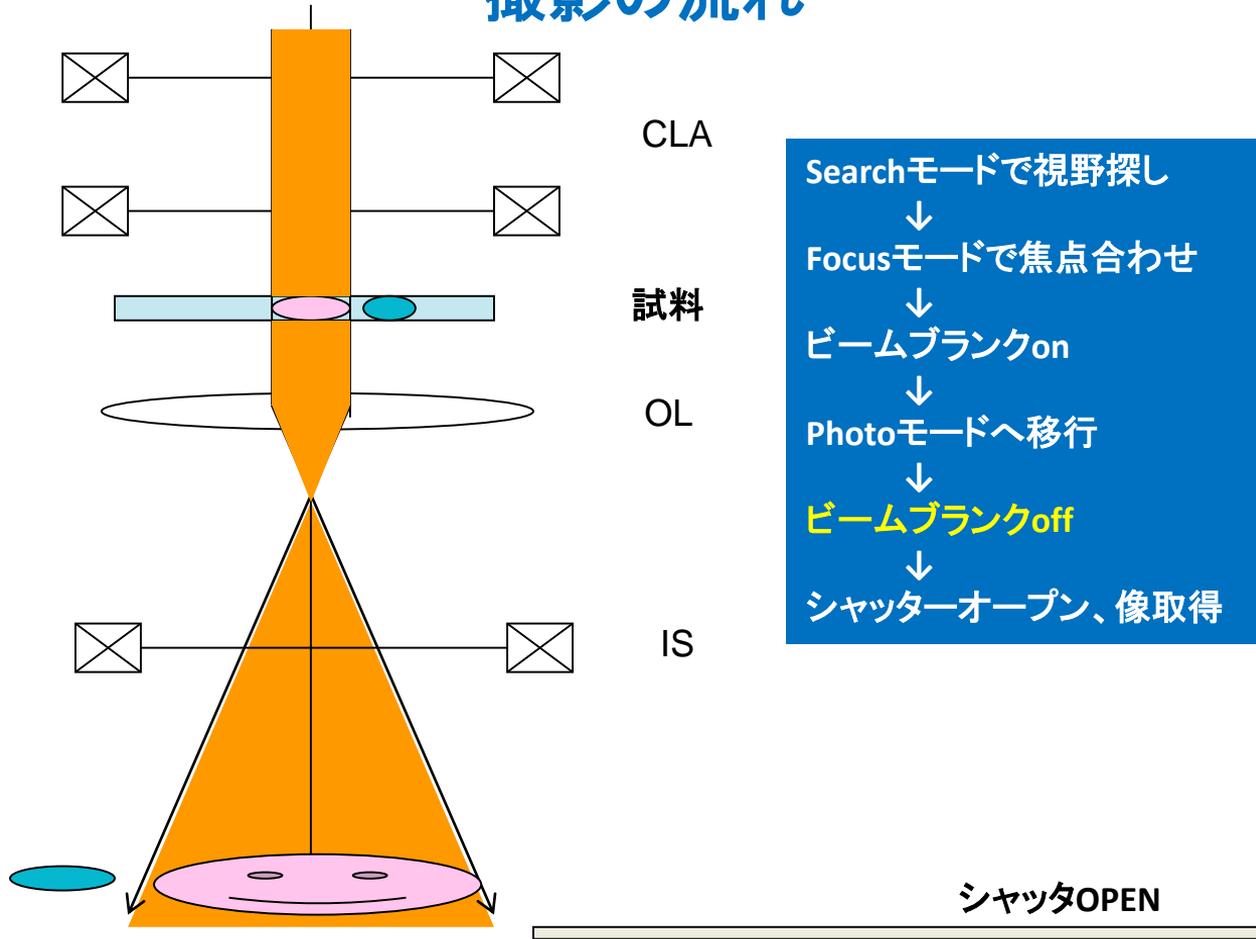
IS

Searchモードで視野探し
↓
Focusモードで焦点合わせ
↓
ビームブランクon
↓
Photoモードへ移行
↓
ビームブランクoff
↓
シャッターオープン、像取得

ドーズ開始する。だがシャッターは閉じたまま(シャッターディレイ)

シャッタCLOSE

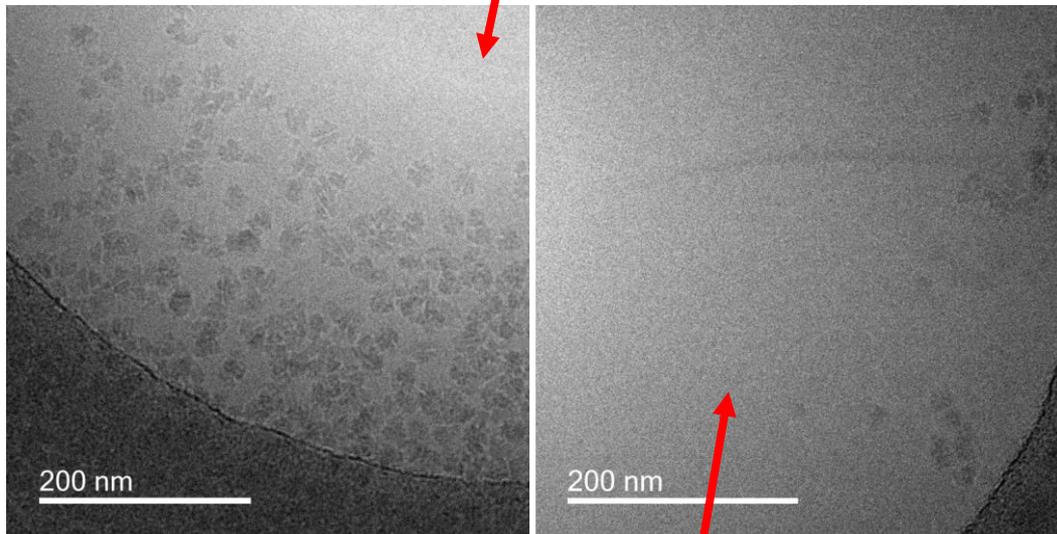
撮影の流れ



Searchモードで視野探し
↓
Focusモードで焦点合わせ
↓
ビームブランクon
↓
Photoモードへ移行
↓
ビームブランクoff
↓
シャッターオープン、像取得

試料の良し悪し

界面活性剤が溶媒に含まれていると表面張力が低くなり、中心が薄くなりやすいが、粒子が排除されやすい。



ブロット前、ブロット後の時間により、水の蒸発量、乾燥量が変わり氷の厚さを左右する。
水の蒸発によりpH等が変化し、タンパクの構造が変わってしまうことがあるので注意。

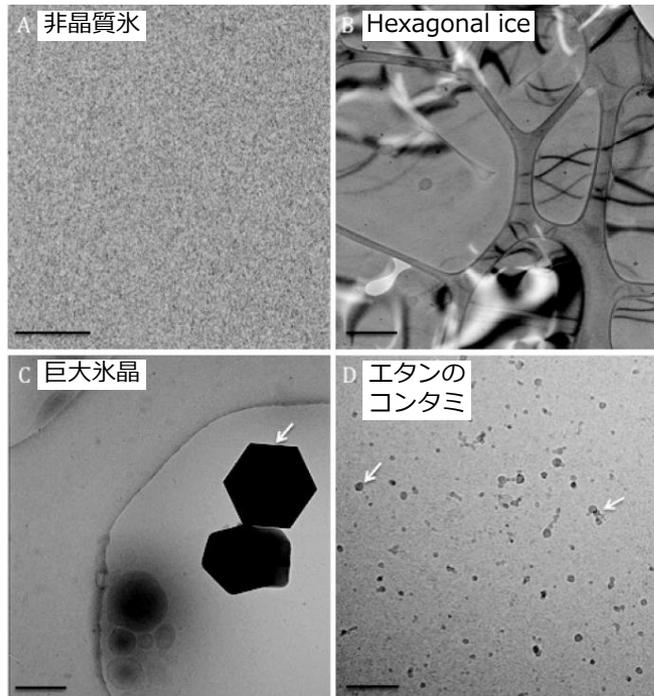
濃度は十分なはずなのに孔の中に粒子が見当たらない。→支持膜に吸着している。→一度滴下して吸い取り、もう一度滴下する。→一度目の滴下でカーボン膜上の吸着が飽和し、二度目の滴下では孔に粒子が残る。

continuousな支持膜を張る。

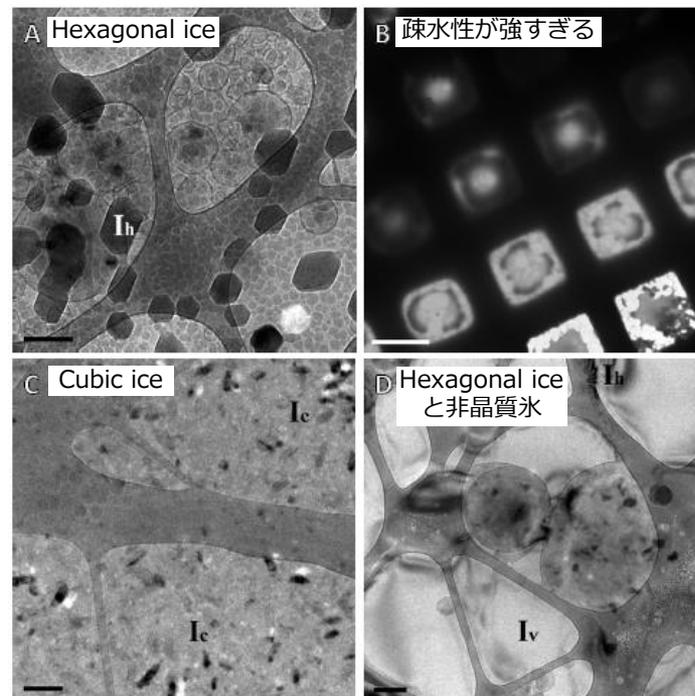
カーボン、グラフェン、脂質。グラフェン以外はコントラストが落ちる。

粒子の向きが固定されやすい。

氷の結晶化・霜の混入

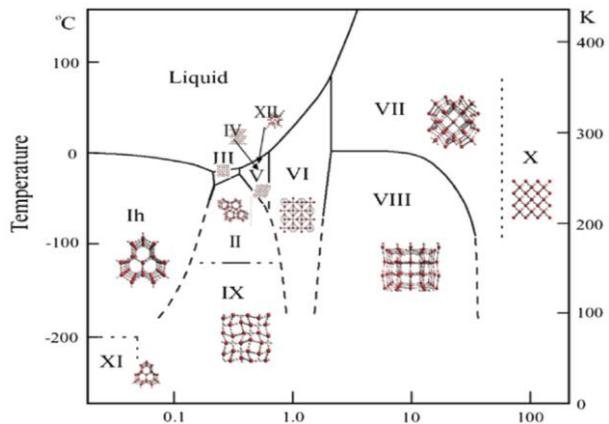
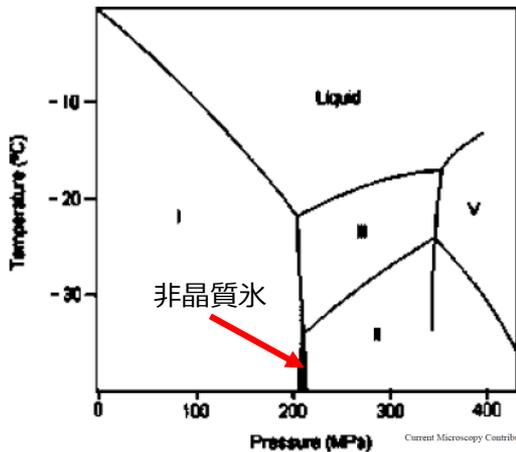


R.F. Thompson et al. / Methods 100 (2016) 3–15

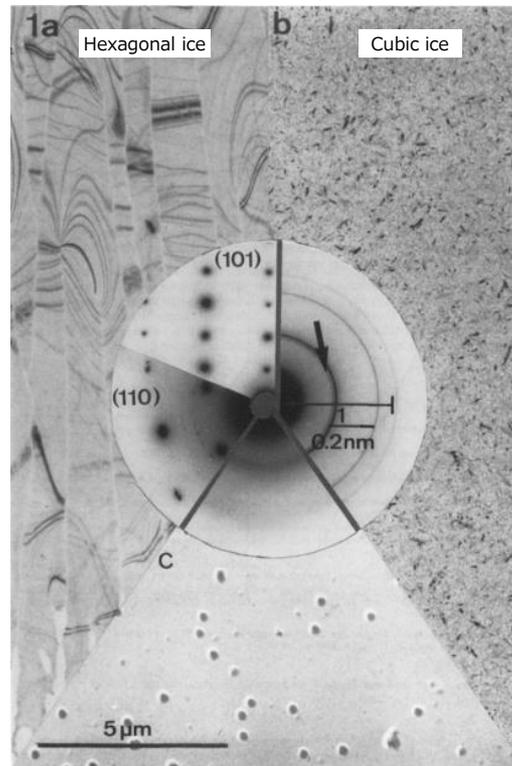


Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology (A. Méndez-Vilas, Ed.)

氷の結晶化

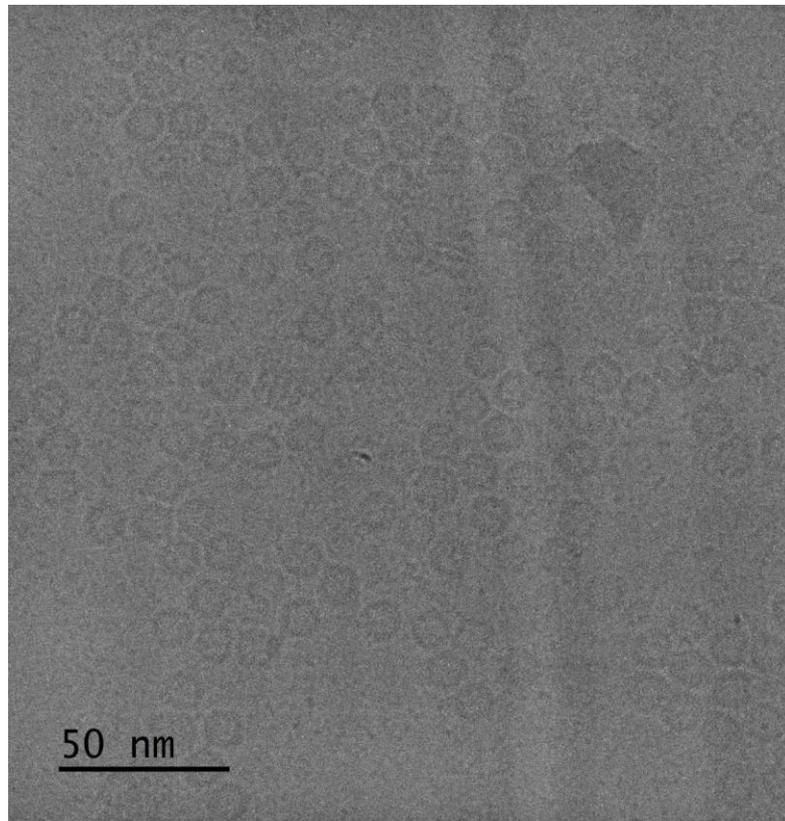


Rev Mod Phys 2012;84:885

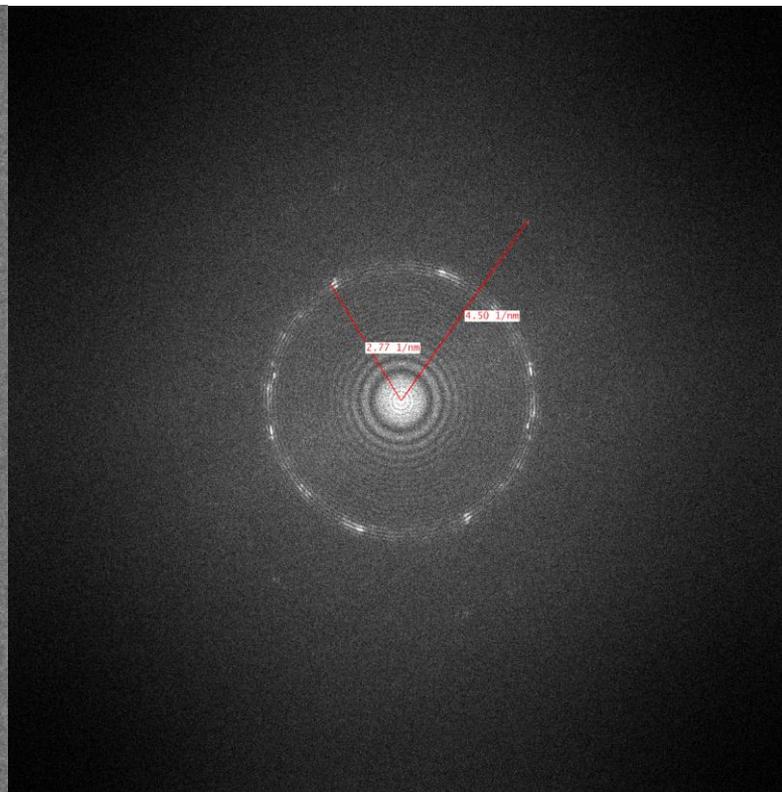


Journal of Microscopy, Vol. 128, Pt 3, December 1982, pp. 219-237.

氷の結晶化



注) 画像はgain normalizeを行っていない。



注) $2.77 \text{ 1/nm} = 3.6 \text{ \AA}$
 $4.5 \text{ 1/nm} = 2.2 \text{ \AA}$