

150V Plus を使用した常温およびクライオ TEM グリッド用のカーボン薄膜の作成

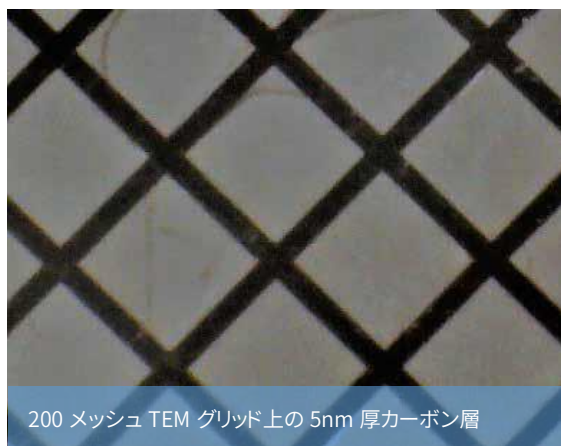
Dr Anna E Walkiewicz

クライオ透過型電子顕微鏡の 2017 年ノーベル賞は、細胞の分子世界の方向観察の重要性を強調した。生体分子の構造を理解すること、そして細胞プロセスに対するそれらの変化を理解することは、疾病の治療や創薬において重要な役割を果たす。

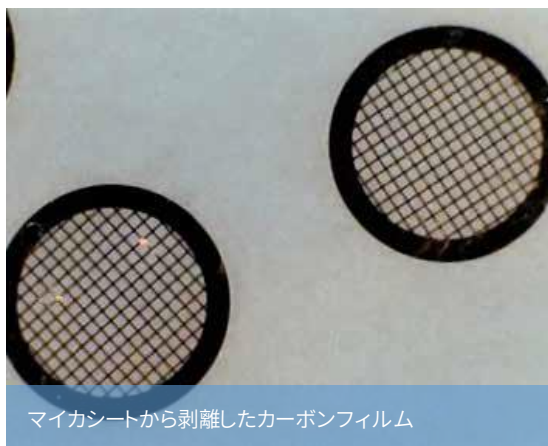
常温 TEM・クライオ TEM の両方で、正確で精密なサンプル前処理が必要であり、サンプルアプリケーション用のカーボン支持膜の品質は非常に重要である。



スライドガラス上のカーボン蒸着膜 (膜厚の連続的な増加を示したもの)



200 メッシュ TEM グリッド上の 5nm 厚カーボン層



マイカシートから剥離したカーボンフィルム

カーボンフィルムを使用する理由

カーボンフィルムは電子ビームを透過させ、導電性があり、作成が容易で、汚染がなく、滑らかで強いものでなければならない。そして何よりも、サンプルの構造要素を画像化する際にコントラストを減衰させないように、十分に薄く作成する必要がある。

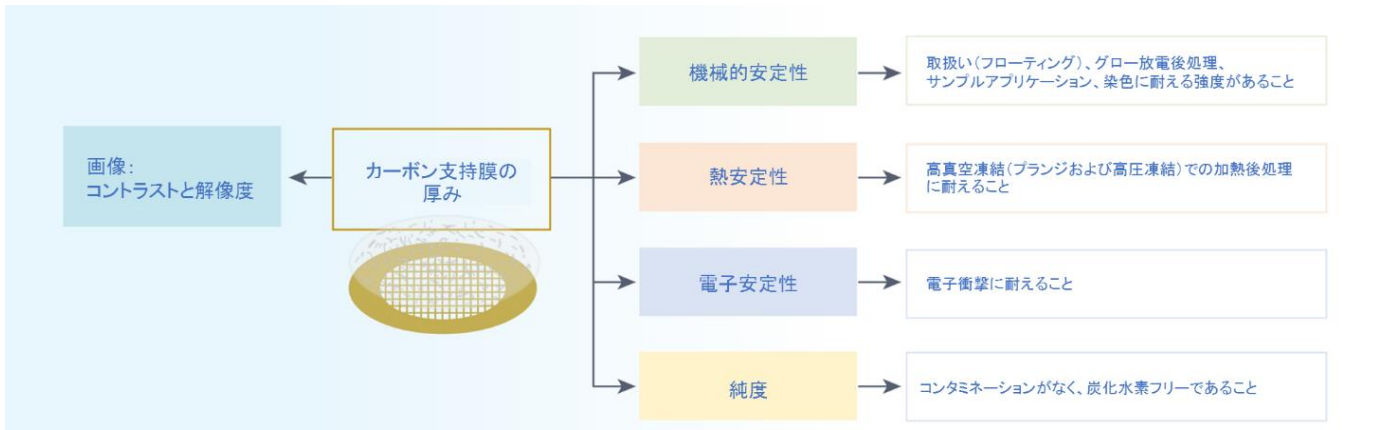
市販の TEM グリッドには、さまざまな種類がある。主に Cu、Ni、Au 等の金属製で、ポリマーフィルムまたは Holey (Lacey) カーボン、もしくはその両方で覆われている。TEM イメージングにおいては、その材料の厚さおよび密度が像の解像度およびコントラストに影響するため、支持層はできるだけ薄くなければならない。支持膜にカーボンを使用することの他の利点は、その表面特性がグロー放電、UV 照射または化学処理のようなプロセスによって変化し得ることである。これにより、カーボンに対する分子の異なる親和性によって引き起こされる問題を克服することができる。TEM イメージングのための試料調製は、いくつかの工程からなり、そしてそれらの各々において、所望の結果を達成するために注意を払わなければならない。

カーボンフィルムの厚さ、グリッドの品質、所望の表面特性を達成するための転写方法および後処理方法、そして最終的にサンプルを適用する方法の選択を誤ると、観察や分析を失敗させてしまう恐れがある。これは各工程での正確な操作の省略や、調製に使用するカーボンフィルムの品質が最終的な像形成に多大な影響を与えるためである。

バッキングカーボンフィルムを用いて TEM グリッドを作製する際に考慮すべき点

1. 正しい厚みを選択する

用途に適した厚みを選択することがイメージングのコントラストを左右する。構造生物学のサンプルでは通常、5nm のカーボン層が塗布されるが、より良いイメージングコントラストを得るために薄いカーボン層を塗布する必要がある分子も存在する。そのような場合、コントラストとカーボン層の安定性の間にはトレードオフ(二律背反)が伴う。



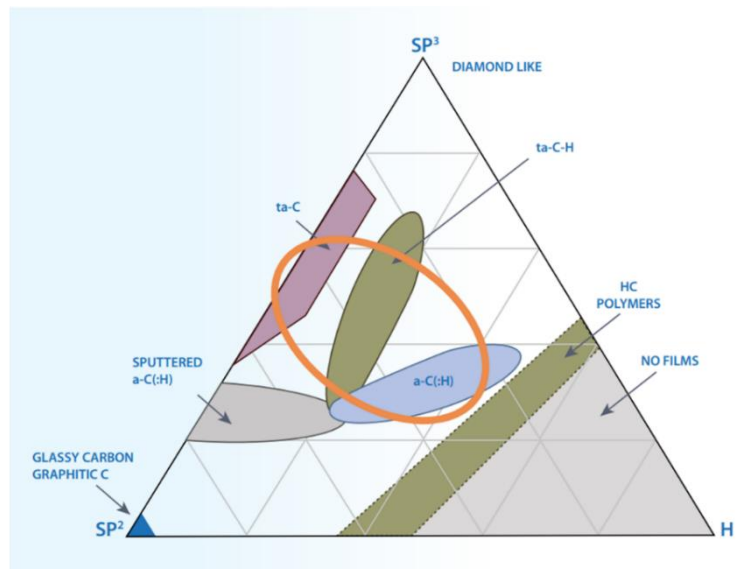
カーボンフィルムの厚みと安定性の間のトレードオフ

2. カーボンフィルム作製のための正しい方法とパラメータの選択

TEM イメージングに使用されるカーボン層は高品質でなければならない。それらは、緻密で、介在物およびテクスチャがなく、高純度で、安定していて、そして非晶質(アモルファス)である必要がある。これは通常、水素を含まないカーボン源を使用することによって達成される。そのようなカーボン層は、製造に使用される方法およびパラメータに応じた異なる種類(様々な割合)のカーボンからなる。

TEM 用途のためのカーボン層は、炭化水素の存在が大いに影響し、イメージングを損なうため、その含有率は最小限に抑えなければならない。このような膜は、炭化水素を含まないカーボン源を使用して、高真空(1×10^{-6} mbar 以上)でのみ製造することができた。水素含有量、ならびに sp^2 対 sp^3 比は、そのような堆積中に得られるダイヤモンドライクカーボン(DLC)膜の構造および特性を決定する。それは使用される堆積方法のパラメータにも依存する。

Quorum Q150V コーターで利用されている Bradley 法、カーボンロッド真空蒸発法を使用して、さまざまな EM 用途で使用できる品質を有する非晶質カーボンの薄層を作成することができる。



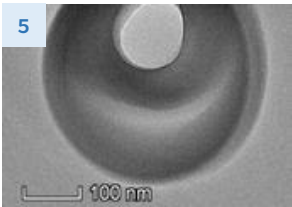
非晶質炭化水素合金、ダイヤモンド上非晶質炭素、材料科学および EN R 37 9202 129-281 における結合の三相図



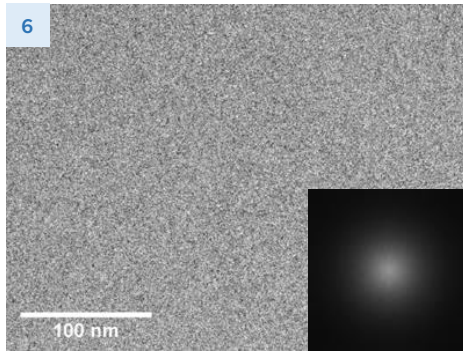
3
カーボンロッド蒸着インサート



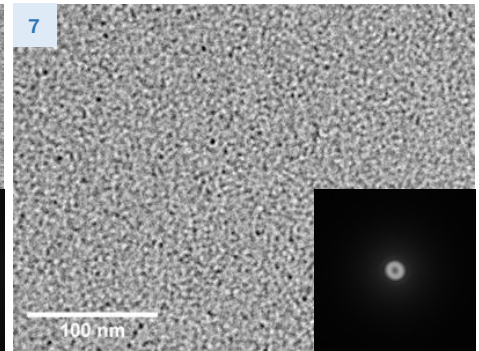
4
蒸着用に成形されカーボンロッド



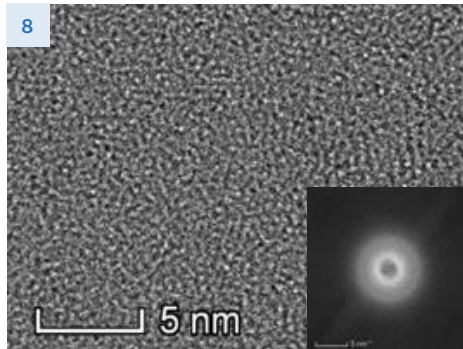
5
 4×10^{-5} mbar の真空中で作製された 10nm カーボンフィルム(マイカから剥離)中のビームによって生じた焼尽の TEM 画像



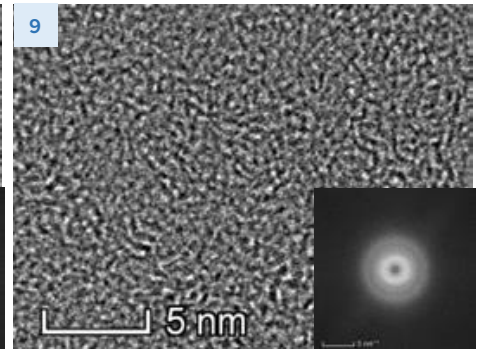
6
カーボン層なしの 200 メッシュグリッドの TEM 画像



7
 7×10^{-7} mbar(Q150V plus)の真空中で作製された TEM グリッド上に剥離した 5nm カーボンの TEM 画像



8
マイカカーボン層から剥離させた、 8×10^{-7} mbar の真空中で作製された 10nm カーボンの TEM 画像

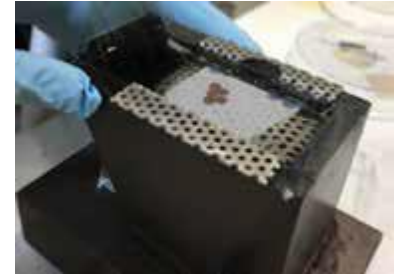
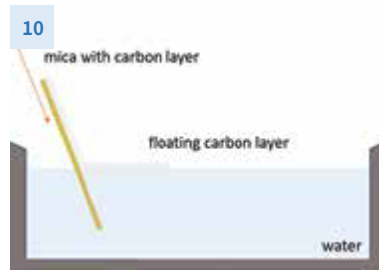


9
マイカから剥離させた、 4×10^{-5} mbar の真空中で作製された 10nm カーボンフィルムの TEM 画像

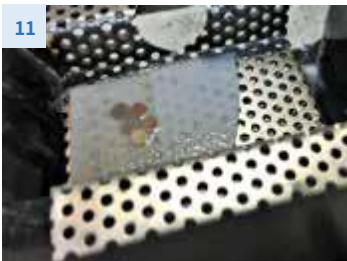
作成した層の品質を試験する最も一般的で最も簡単な方法は、得られたフィルムの非晶性、密度および構造を示す FFT 分析を用いた高分解能 TEM イメージングである。真空度は堆積プロセスにおいて重要な役割を果たす。つまり、不純物の少ない緻密で頑丈な非晶性カーボン層の作成にはより高い真空が必要である。低真空下で作成されたカーボン薄層は、図5に示されるように電子ビームにおいてより優れた安定性を有さないだろう。

3. TEM グリッドにカーボン層を転写する正しい方法

TEM グリッド上にカーボン薄膜を転写するための最も一般的な方法は、マイカからカーボン薄膜を剥離させることである。その原理は非常に単純だが、手順が適切に実行されないと成功につながらない。薄いカーボン層を有するマイカシートが 30°以下の角度で水中にゆっくり挿入されると、カーボン層が支持体から離れて水面上に浮遊する。このようにして、TEM グリッドをカーボン層のある水面まで上昇させるか、または水をゆっくりと排出してカーボン層を TEM グリッド上に置けるようにすることによって、剥離したカーボン層を TEM グリッド上に容易に堆積できる(図 10 参照)。



マイカシートから剥離させたカーボンフィルム: TEM グリッドを膨脹紙上に置き、剥離したカーボン層の下に移動させて、ゆっくりと水を排出しながらセットする。



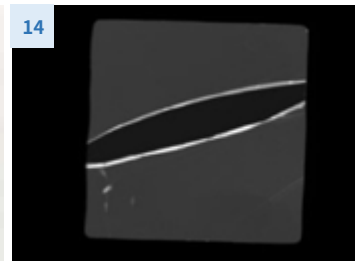
11 TEM グリッド上にセットされた 5nm カーボン層



12 マイカから剥離したカーボンで覆われた TEM グリッド (5×10^{-7} 、 7×10^{-7} mbar の真空中で蒸着)



13 真空中 4×10^{-5} mbar で調製した 10 nm カーボンで覆われた TEM グリッド、カーボン層に亀裂が見られる



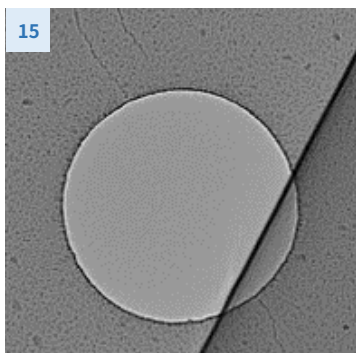
14 4×10^{-5} mbar の真空中で蒸着した 10nm のカーボン層を有する 200TEM グリッドメッシュの TEM 画像、亀裂が見られる

4. 後処理と機械的安定性および熱安定性

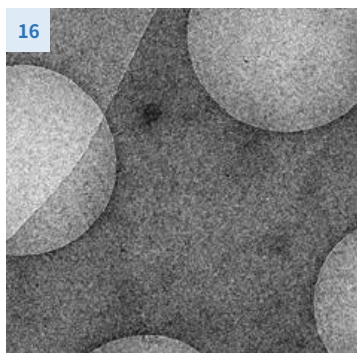
TEM グリッド上へのカーボン薄膜の転写が成功した後、多くの場合、カーボンフィルムの後処理が必要とされる。グロー放電または UV 処理はカーボンフィルムに大きな損傷を与えないかもしれないが、熱処理—加熱または凍結もしくはその両方はカーボンフィルムの安定性にとって困難である傾向がある。これは特に、極度の損傷を引き起こす傾向があるクライオ TEM 用のサンプルを凍結および調製する場合に当てはまる。サンプルを適用する前に TEM グリッドの適応範囲を確認することを推奨する。このような選別によって、グリッドに欠陥が生じるのを防ぐことができる。

しわのあるカーボン層もしくは重なったカーボン層は、サンプルの広がり不均一にし、イメージングコントラストに影響を与えるため、理想的ではない。常温およびクライオ TEM 用に製造されたカーボン薄膜の品質は、行われる試料調製工程によって大きく影響される。

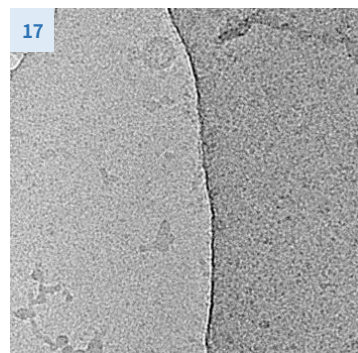
Q150V Plus コーターで作られた緻密で丈夫な純度の高いフィルムは、TEM グリッドへのカーボンフィルムの転写、後処理、サンプル塗布、そして最終的なイメージングステップまでのプロセスを通して一貫したシンプルなサンプル調製を保証します。Quorum Technologies の Q150V Plus を使用して高真空下で作成したカーボン薄膜は、緻密で頑丈なため、剥離の際に亀裂が発生しにくくなります。また再現性があり、均一で良質な層は、クライオ TEM イメージングのためのサンプル前処理に非常に役立ちます。欠陥のない完全に覆われたグリッドは、エンドユーザーがバックアップフィルムの品質を気にすることなく、貴重な構造生物学サンプルを画像化することを可能にします。



15
4×10⁻⁵ mbar の真空を用いて作成した 10nm のカーボンで覆われた TEM グリッド膜に亀裂と重なりが見られる



16
DNA 複製複合体のクライオ TEM 画像
マイカから剥離した holey カーボンおよび 5nm カーボンを有する TEM グリッド
7×10⁻⁷ mbar の真空で作成された



17
図 17 の 200m-in, mag × 92K

Q150V Plus には 3 種のラインナップがあります

Q150V S PLUS

超微粒子サイズで金属を成膜するための自動スパッタコーター

すべての貴金属および、クロム・イリジウムのような酸化する金属をスパッタリングターゲットとして利用可能です



Q150V E PLUS

自動カーボンコーター
(ロッド/ファイバー両用)

主に TEM グリッドのカーボンコーティング用途のほか、EDS や WDS の導電膜コーティングに利用できます



Q150V ES PLUS

スパッタリングとカーボン蒸着が
1 台で可能なマルチモデル

インサート(ヘッド)は簡単に交換できます
オプションで金属蒸着/アパーチャークリーニング用インサートを利用可能です



Q150V Plus は、Quorum Technologies の国際的に高い評価を得ている Q シリーズコーターの一部であり、世界中で 1000 社以上のお客様に使用されています。SEM、TEM、および薄膜アプリケーション用の高品質コーティングソリューションを提供するように設計され、汎用性が高く簡単に操作できます。

国内総代理店

株式会社 アド・サイエンス

〒273-0005 千葉県船橋市本町 2-2-7 船橋本町プラザビル

TEL:047-434-2090 FAX:047-434-2097 <http://www.ads-img.co.jp/>

製造元

Quorum

+44 (0)1323 810981

sales@quorumtech.com

quorumtech.com

これらの製品は研究用途に限られます。正確性を保証するために努力を払っていますが、誤記や脱落については責任を負うことはありません。データは変更されることがあるので、最新版の規定、規格、指針を入手することを強く推奨します。この文書は契約の基礎をなすものではありません。Quorum は、継続的に製品を改良しており、仕様は予告なしに変更する権利を有します。© 2018 Quorum Technologies Limited. 著作権所有。Technologies Limited. All rights reserved.