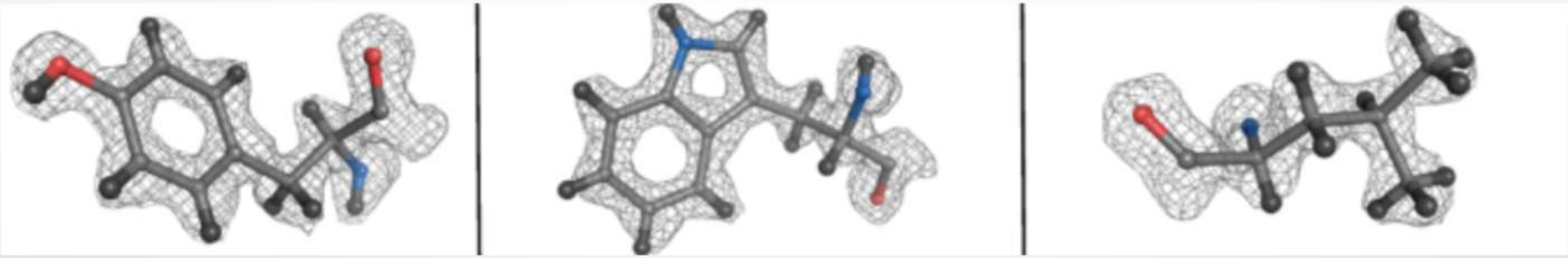
КРИО-ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ ВВЕДЕНИЕ



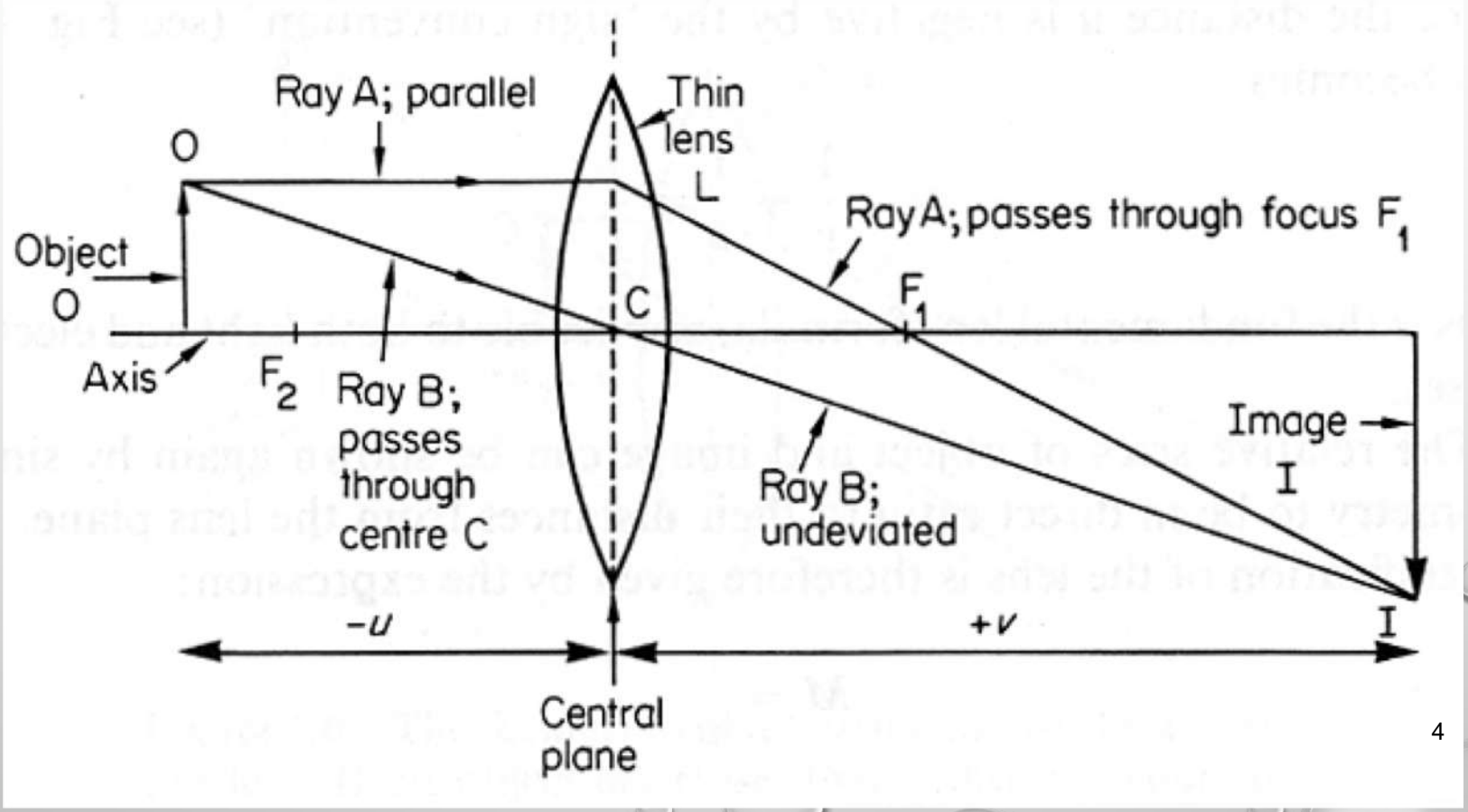
ОЛЬГА СЕРГЕЕВНА СОКОЛОВА
Д.Б.Н., ПРОФЕССОР РАН
SOKOLOVA184@GMAIL.COM

ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ В БИОЛОГИИ

- СТРУКТУРНАЯ БИОЛОГИЯ
- БИОФИЗИКА
- БИОИНЖЕНЕРИЯ
- ЦИТОЛОГИЯ
- ВИРУСОЛОГИЯ
- НАНОБИОТЕХНОЛОГИЯ

1. ПОЧЕМУ ЭЛЕКТРОНЫ?

ПОЛУЧЕНИЕ УВЕЛИЧЕННОГО ИЗОБРАЖЕНИЯ



СРАВНЕНИЕ ВОЛН

	Advantages	Disadvantages
Visible light	Not very damaging Easily focused Eye wonderful detector	Long wavelengths (~400 nm)
X-rays	Small wavelength (Angstroms) Good penetration	Hard to focus Damage sample
Electrons	Small wavelength (pm) Can be focused	Damage sample Poor penetration
Neutrons	Low sample damage Small wavelength (pm)	Hard to produce in controlled ways Hard to focus

СХЕМА МИКРОСКОПА

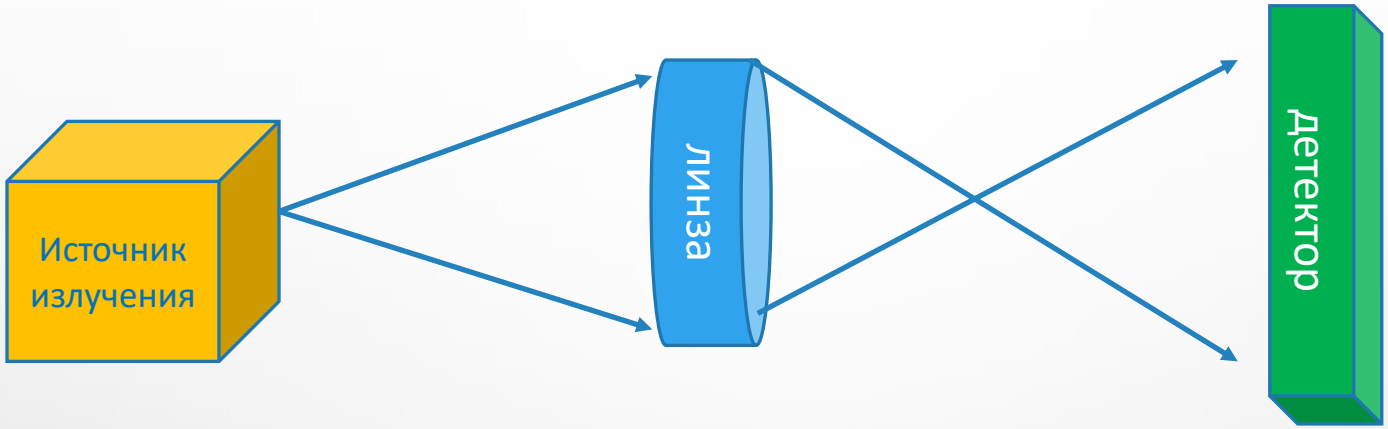


СХЕМА МИКРОСКОПА

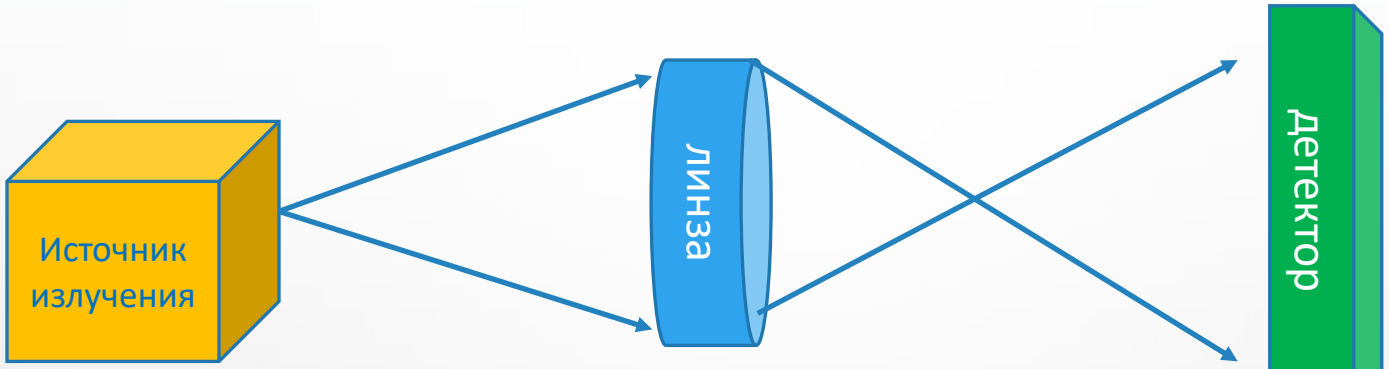


СХЕМА ЭЛЕКТРОННОГО МИКРОСКОПА

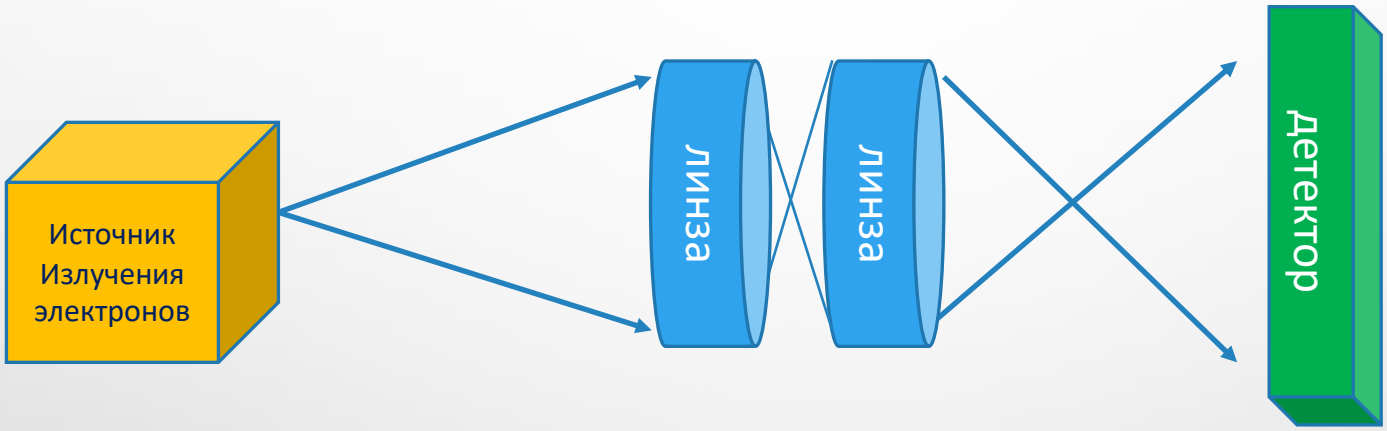


СХЕМА ЭЛЕКТРОННОГО МИКРОСКОПА

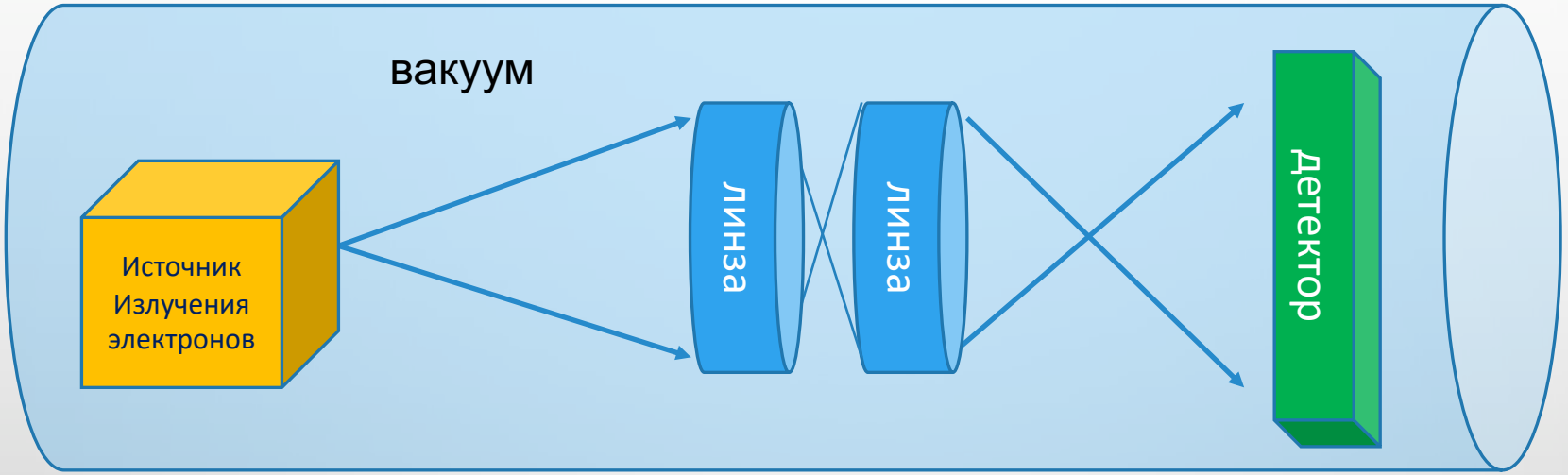
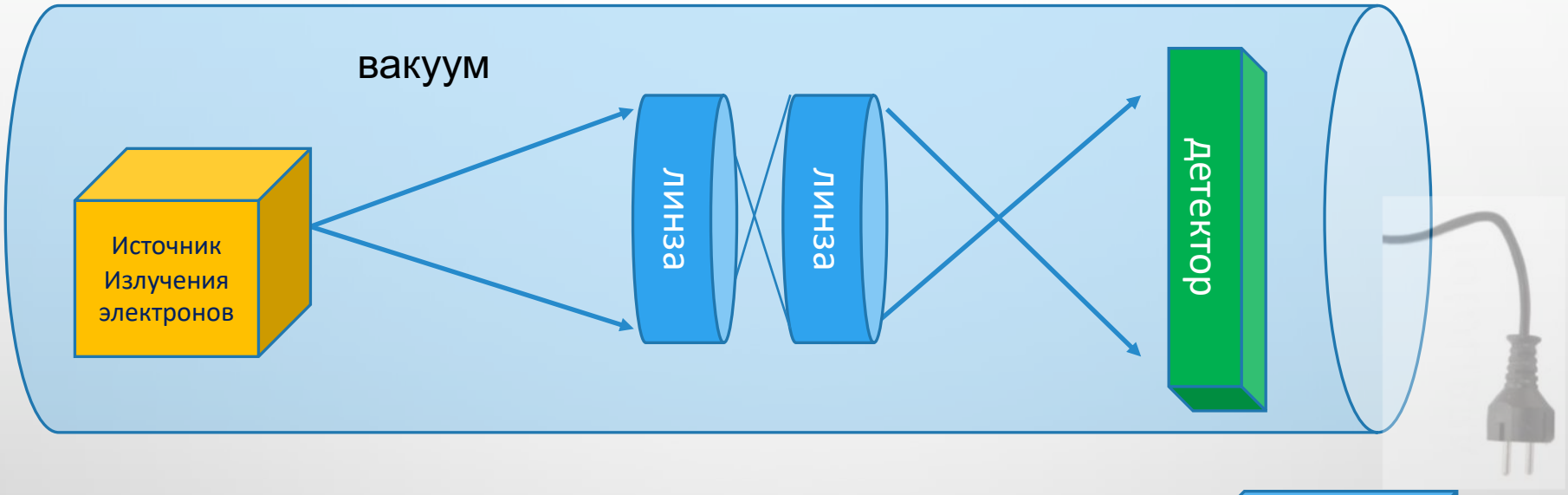


СХЕМА ЭЛЕКТРОННОГО МИКРОСКОПА



Вакуумная система

Система охлаждения

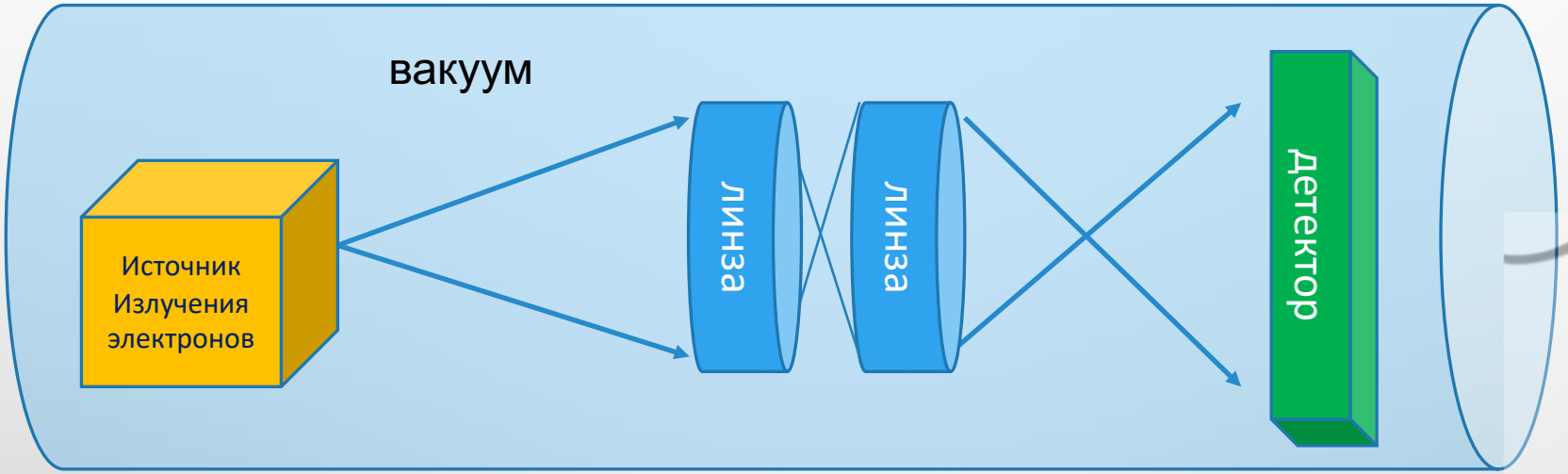
Система Электро-питания

СХЕМА ЭЛЕКТРОННОГО МИКРОСКОПА

Осветительная система

Система формирования увеличенных изображений

Система регистрации изображения



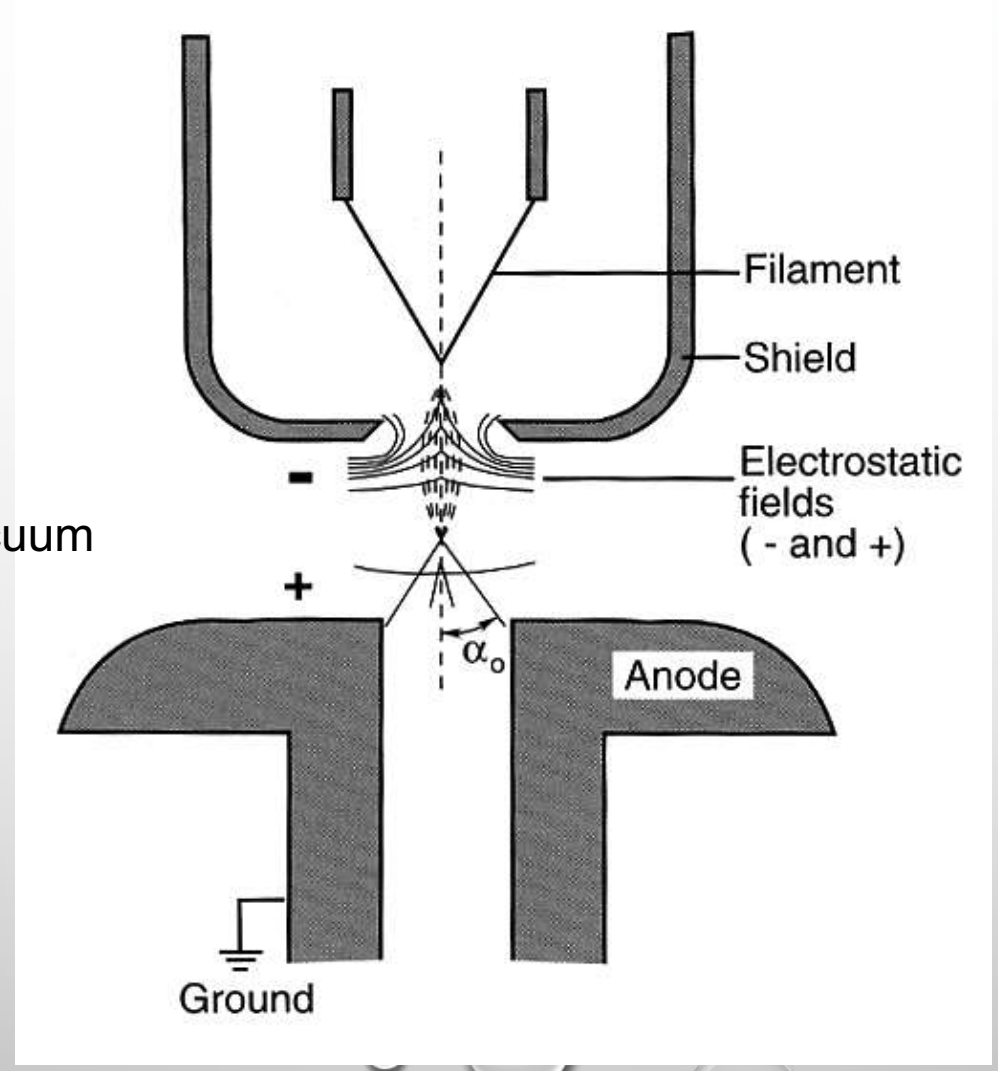
Вакуумная система

Система охлаждения

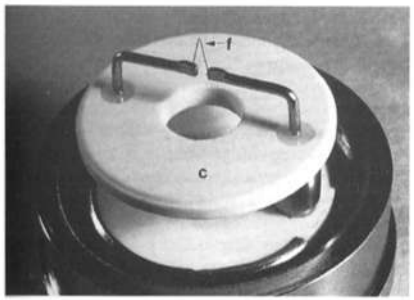
Система Электро-питания

ОСВЕТИТЕЛЬНАЯ СИСТЕМА

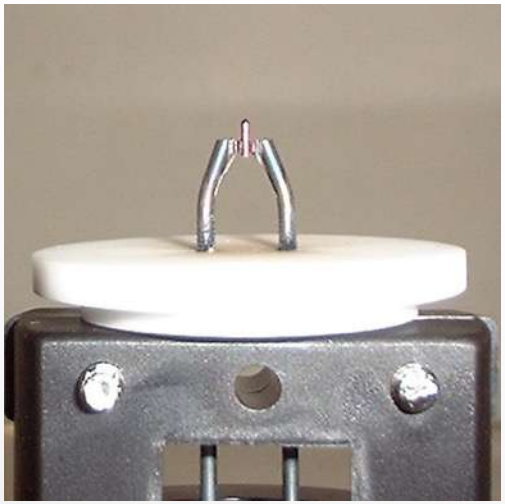
Vacuum



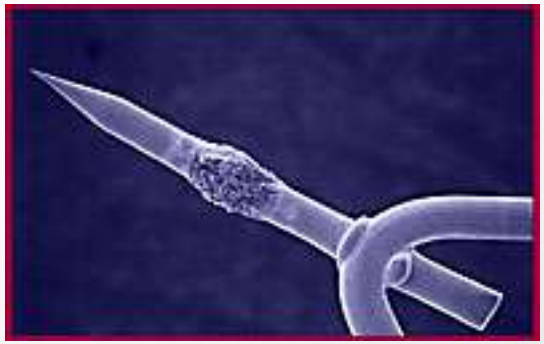
КАТОД



вольфрам



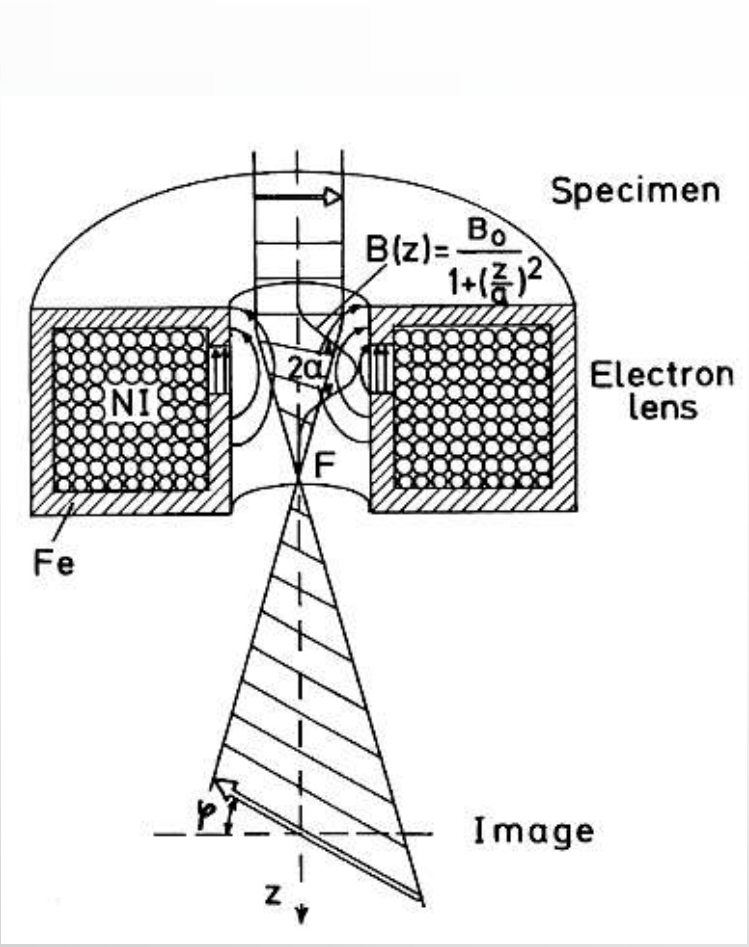
LaB_6

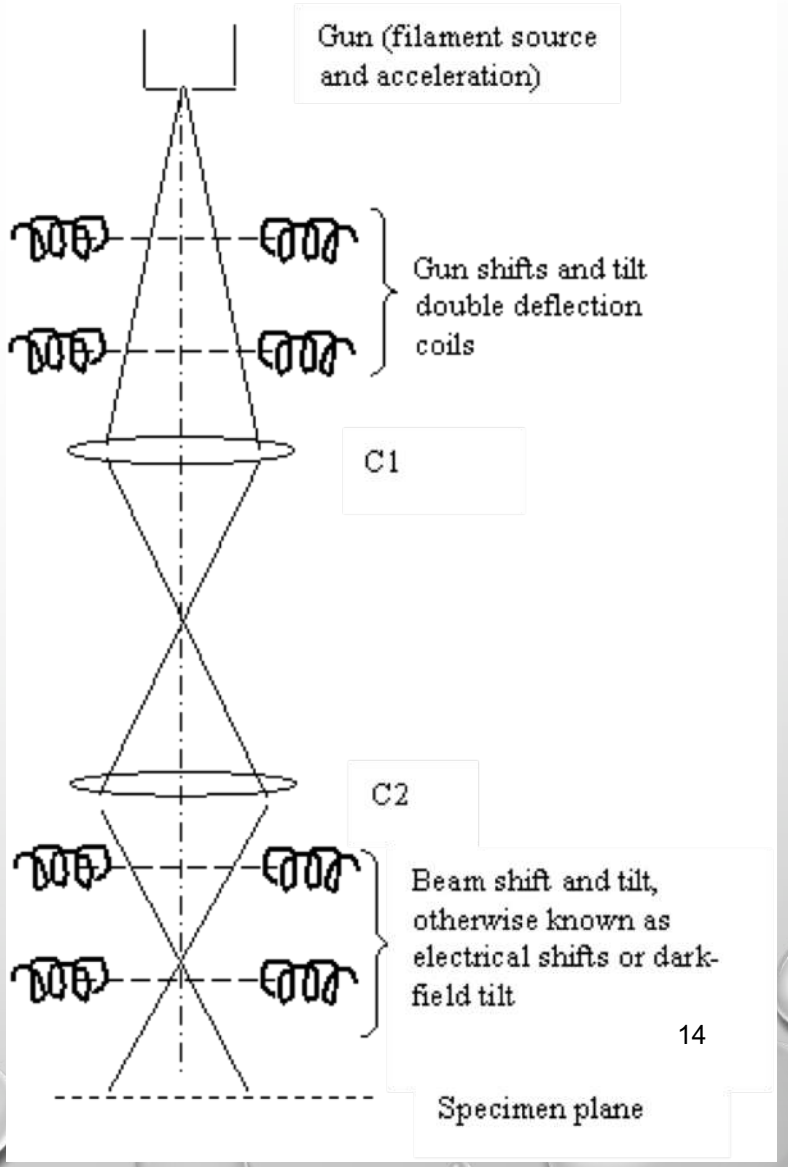


с полевой эмиссией

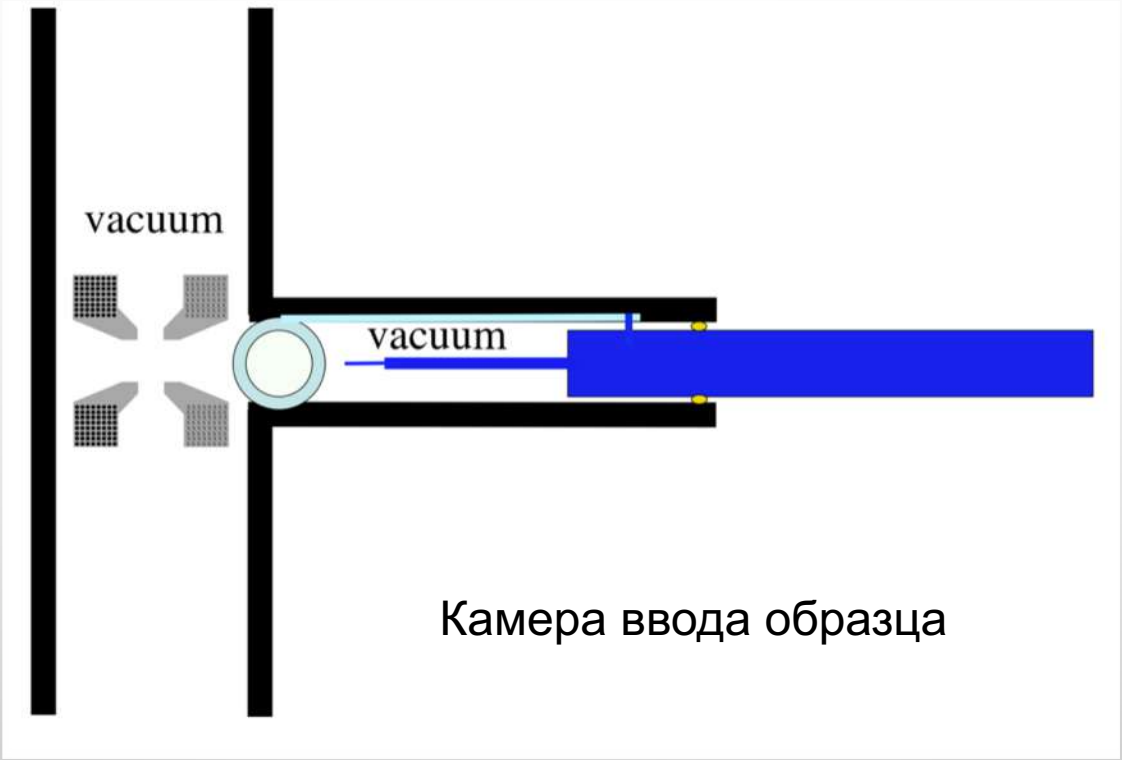
яркость

СИСТЕМА ФОРМИРОВАНИЯ УВЕЛИЧЕННЫХ ИЗОБРАЖЕНИЙ



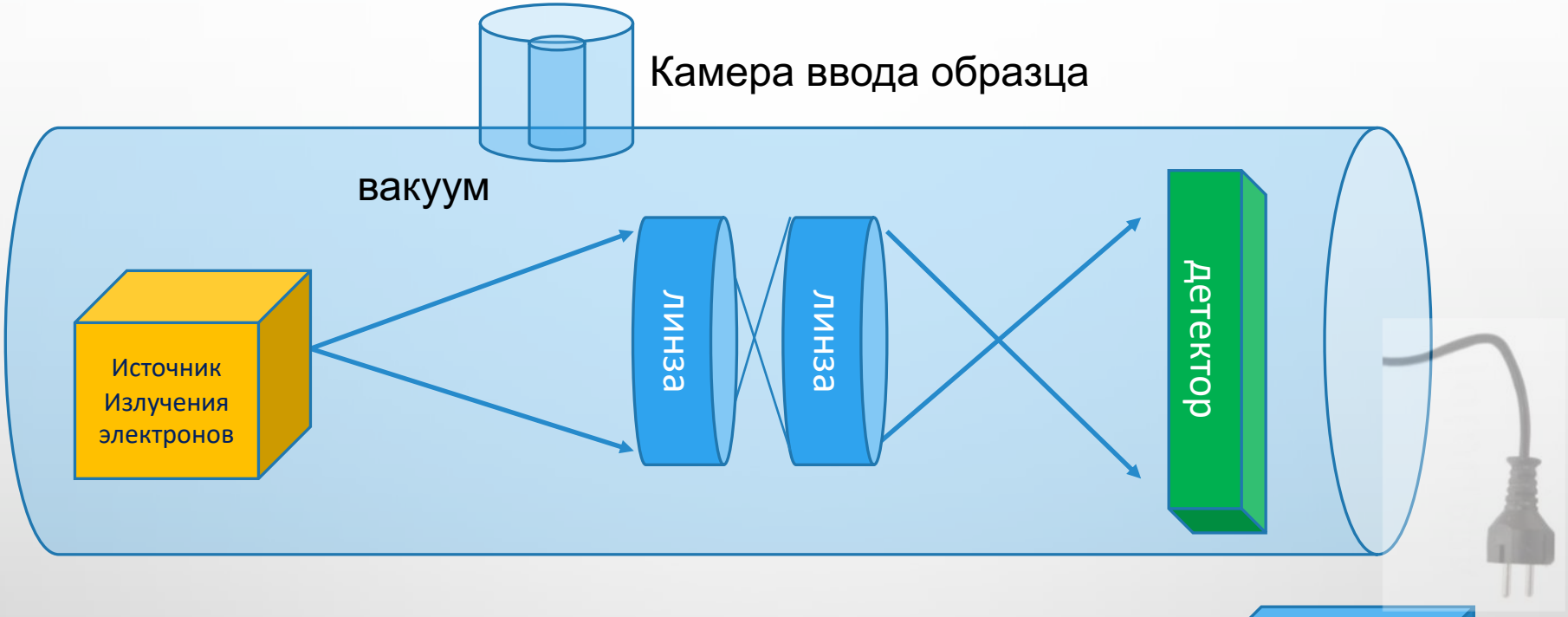


ОБРАЗЕЦ ТОЖЕ ДОЛЖЕН БЫТЬ В ВАКУУМЕ!



Камера ввода образца

СХЕМА ЭЛЕКТРОННОГО МИКРОСКОПА



Вакуумная система

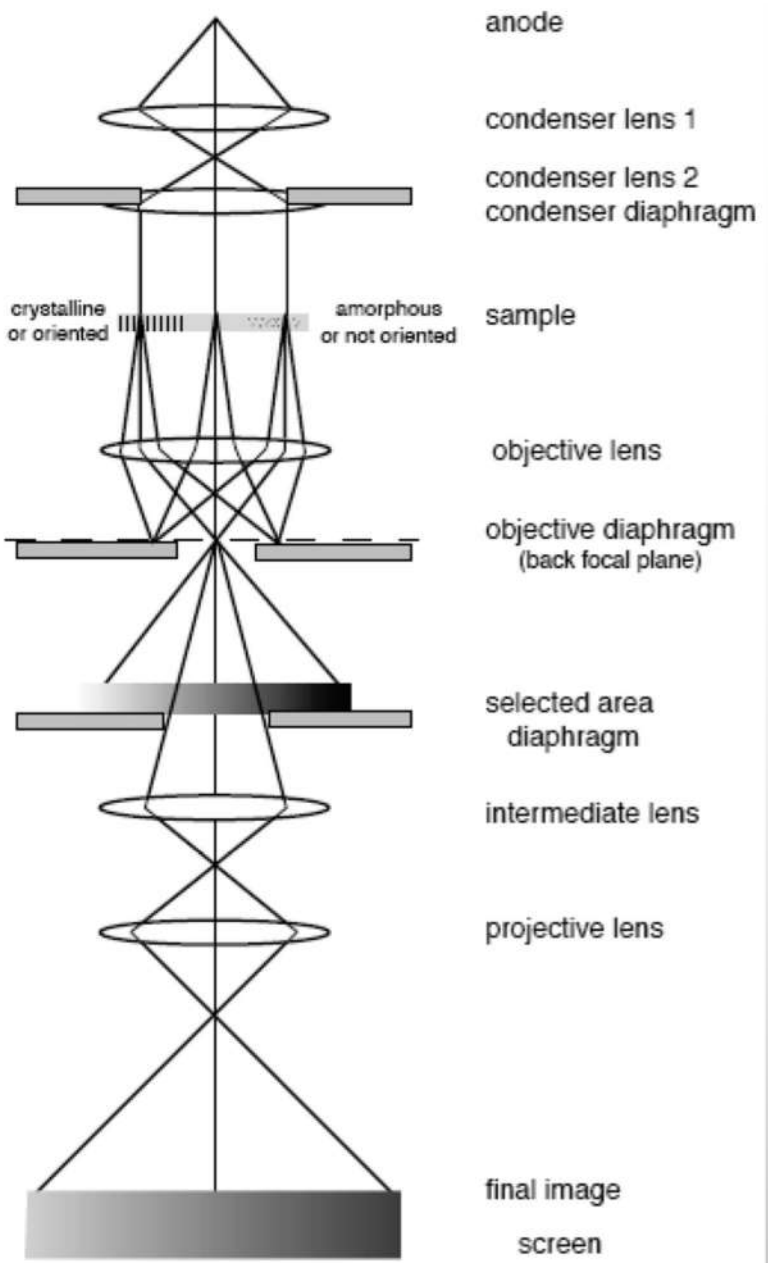
Система охлаждения

Система Электро-питания

Осветительная система

Система формирования увеличенных изображений

Камера наблюдения и регистрации изображений



ИСТОРИЧЕСКИЕ МИКРОСКОПЫ

СОВРЕМЕННЫЕ МИКРОСКОПЫ

Hitachi

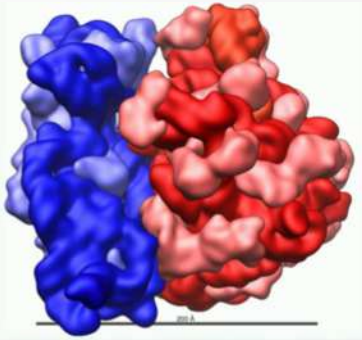
JEOL JEM-Z200FSC
CRYO ARM™ 200

2. ПОЧЕМУ КРИО?

ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ В БИОЛОГИИ: СХЕМА

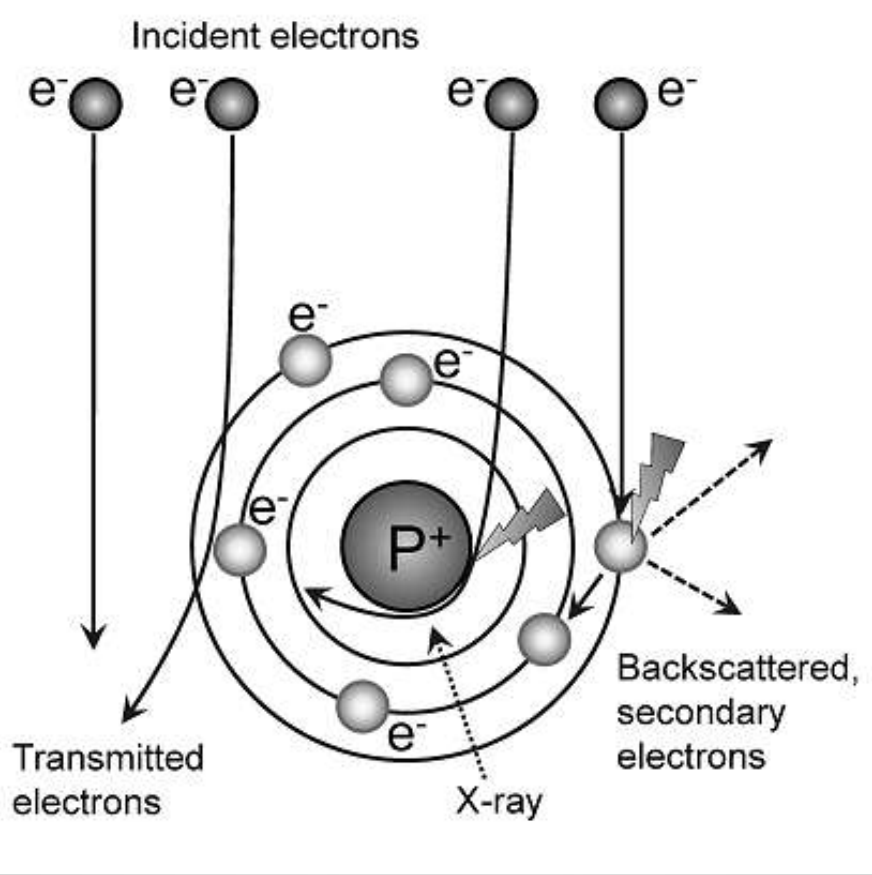
Очистка белка

Получение изображений



Структура белка

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЭЛЕКТРОНОВ С ОБРАЗЦОМ



Orlova & Saibil, 2011

ВОДА?

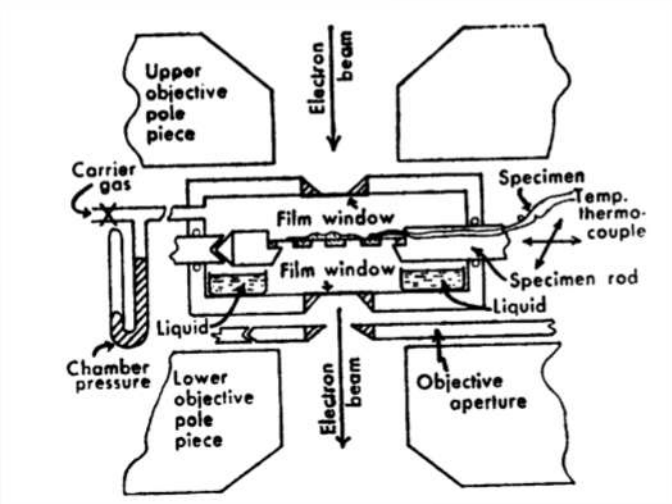
Structure of Wet Specimens in Electron Microscopy

Improved environmental chambers make it possible to examine wet specimens easily.

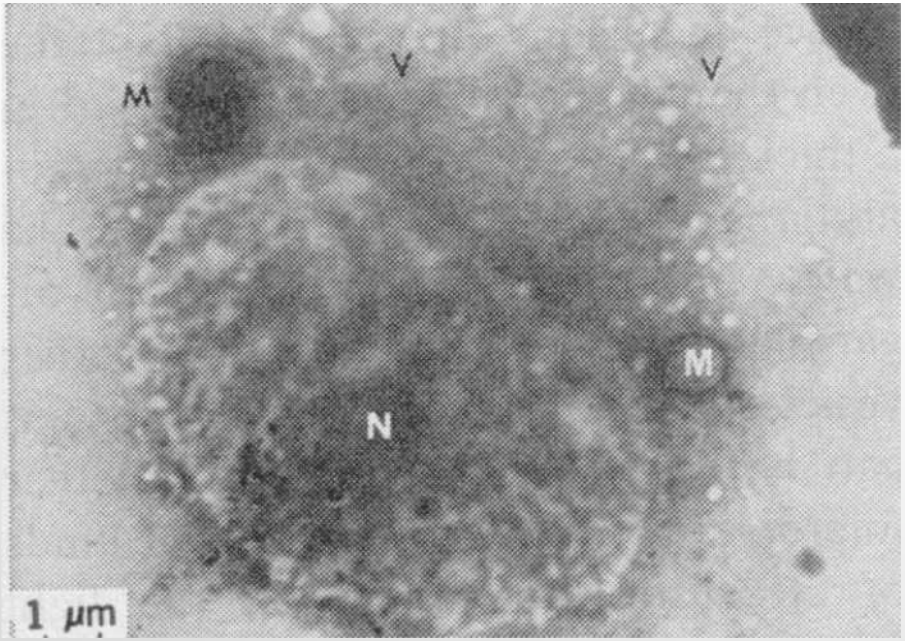
D. F. Parsons

- ВСЕ ЖИВЫЕ ОРГАНИЗМЫ И КЛЕТКИ СОДЕРЖАТ ВОДУ
- ВОДА НЕ МОЖЕТ БЫТЬ ВНЕСЕНА В КАМЕРУ МИКРОСКОПА
- ЗАМЕНИТЕЛЬ ВОДЫ – ЭПОКСИДНАЯ СМОЛА
- ИССЛЕДОВАТЕЛИ ПЫТАЛИСЬ ИЗУЧАТЬ ВЛАЖНЫЕ ОБРАЗЦЫ
- СЕЙЧАС СКОНСТРУИРОВАНЫ МИКРОСКОПЫ С ГАЗОВОЙ СРЕДОЙ

Thin Film Window Chamber



ВОДА?

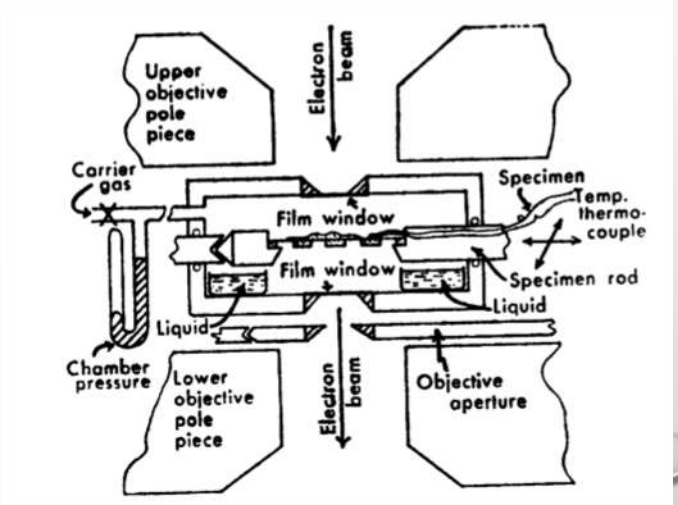


Structure of Wet Specimens in Electron Microscopy

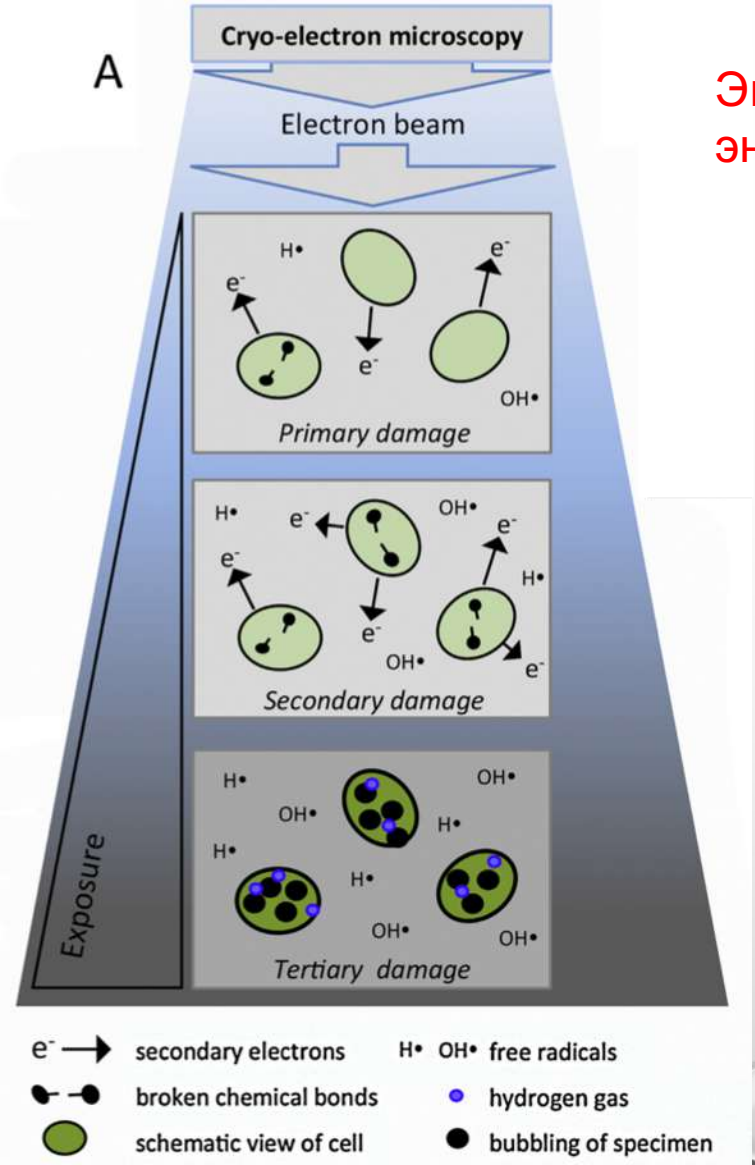
Improved environmental chambers make it possible to examine wet specimens easily.

D. F. Parsons

Thin Film
Window Chamber



РАДИОАКТИВНОЕ ПОВРЕЖДЕНИЕ



Энергия электронов значительно выше энергии ковалентных связей

первичный ущерб:

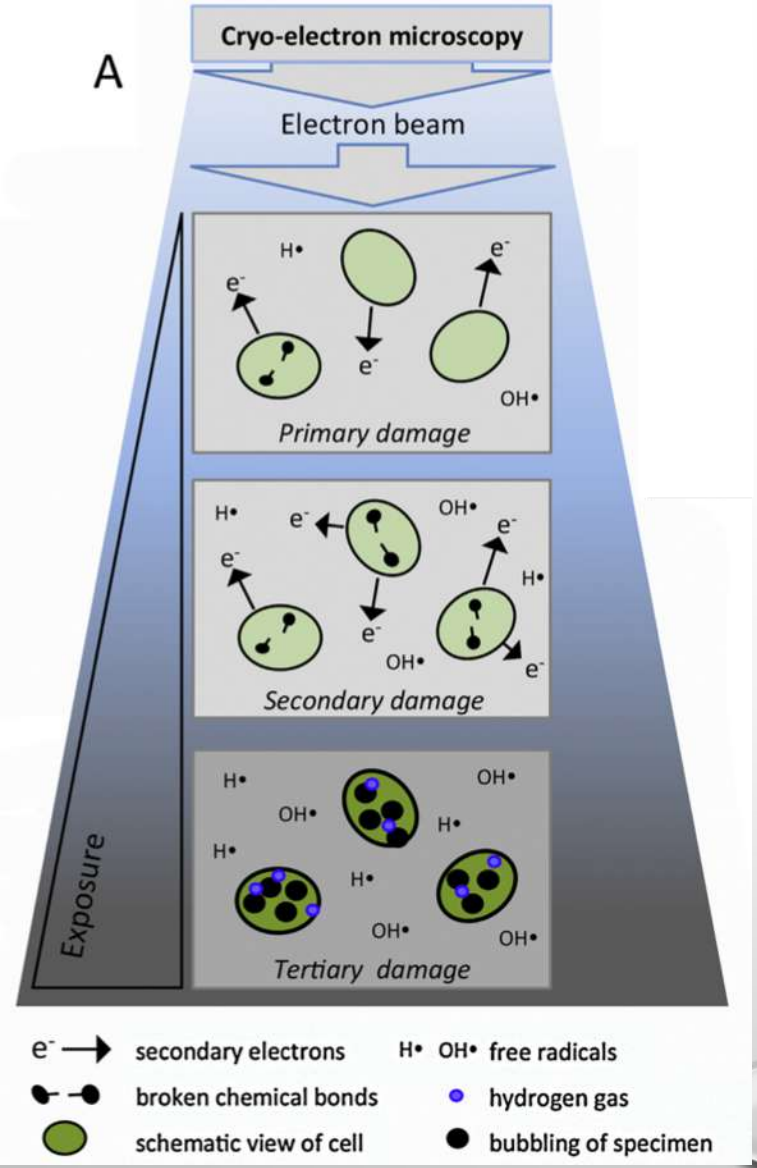
- разрыв связи,
- испускание вторичных электронов,
- появление свободных радикалов

вторичный ущерб

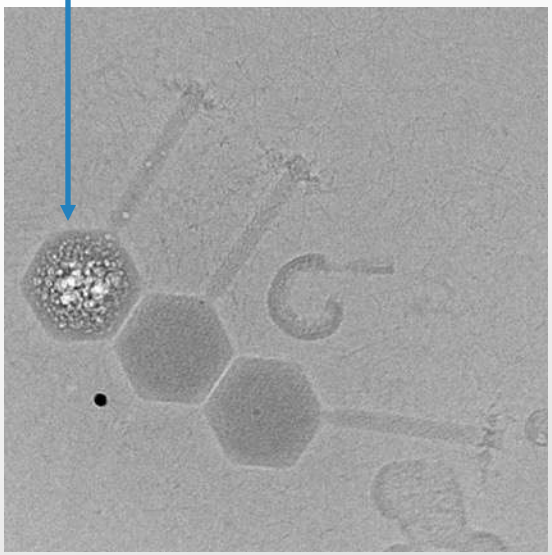
третичный ущерб:

- радиолиз воды $H_2O \Rightarrow H^+ + OH^-$
- выделение водорода

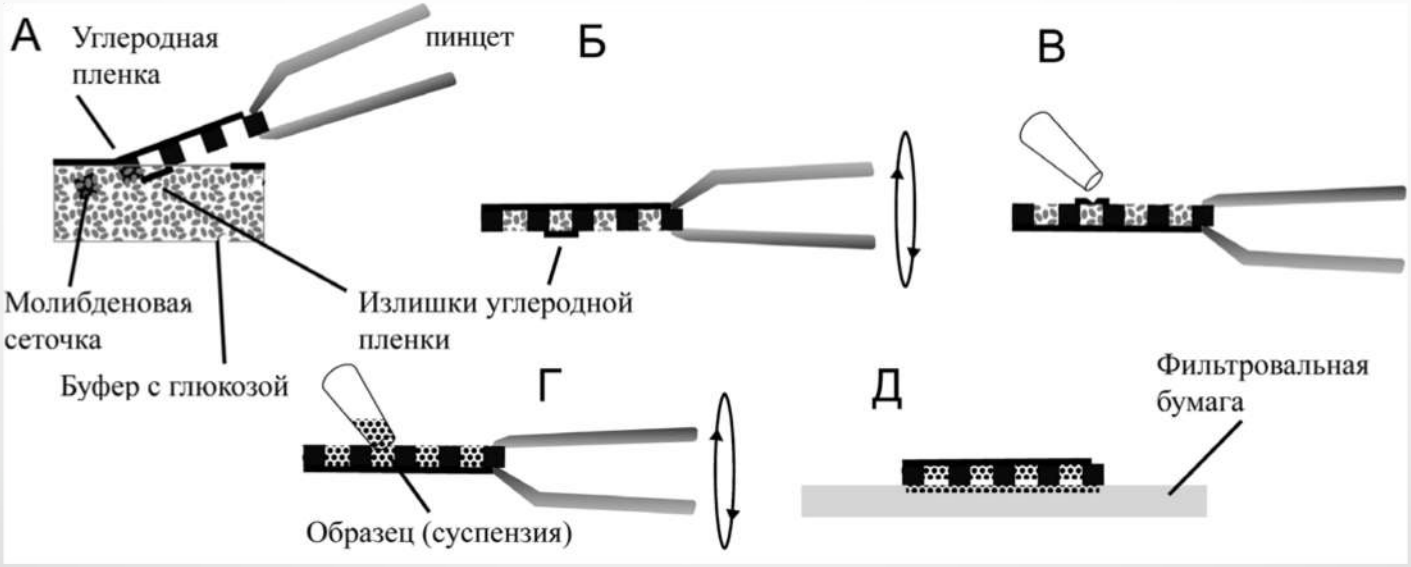
РАДИОАКТИВНОЕ ПОВРЕЖДЕНИЕ



damage!



БОРЬБА С РАДИАЦИОННЫМ ПОВРЕЖДЕНИЕМ



Встраивание в сахара

НАЧАЛО КРИО-ЭМ

Journal of Microscopy, Vol. 124, *Pt* 3, *December* 1981, *pp. RP3–RP4.*
Rapid Publication accepted 9 *November* 1981

VITRIFICATION OF PURE WATER FOR ELECTRON MICROSCOPY

J. Dubochet and A.W. McDowall
European Molecular Biology Laboratory (EMBL)
Postfach 10.2209, D-6900 Heidelberg, F.R.G.

Quarterly Review of Biophysics **21**, 2 (1988), pp. 129–228
Printed in Great Britain

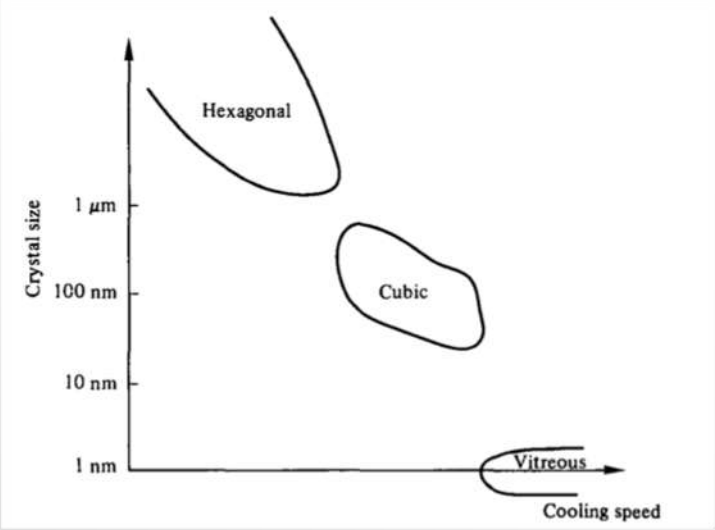
Cryo-electron microscopy of vitrified specimens

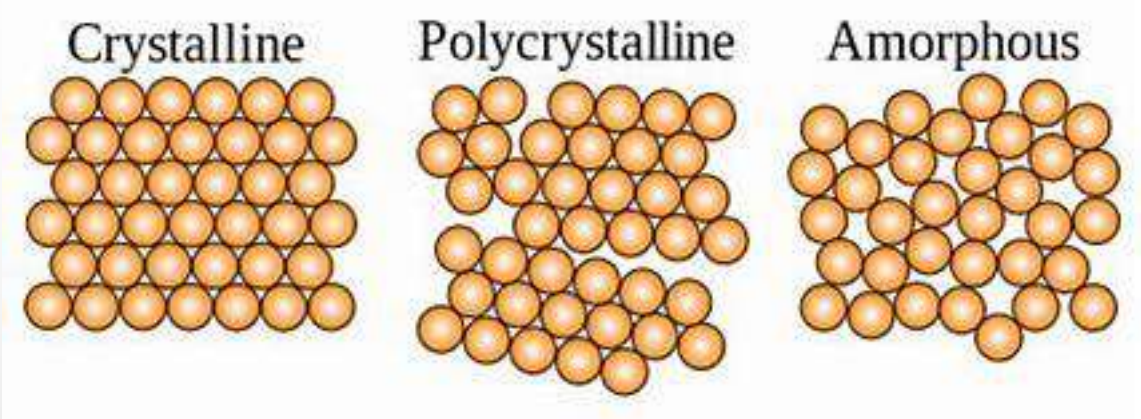
JACQUES DUBOCHET[1], MARC ADRIAN[2], JIIN-JU CHANG[3], JEAN-CLAUDE HOMO[4], JEAN LEPAULT[5], ALASDAIR W. McDOWALL[6] AND PATRICK SCHULTZ[4]
European Molecular Biology Laboratory (EMBL), Postfach 10. 2209, D-6900 Heidelberg, FRG

Jacques Dubochet

"for developing cryo-electron microscopy for the high-resolution structure determination of biomolecules in solution"

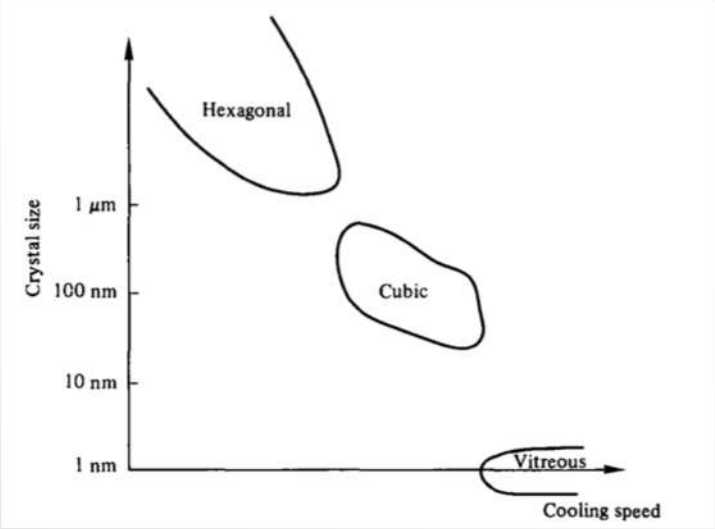
ВИТРИФИЦИРОВАННЫЙ ЛЕД



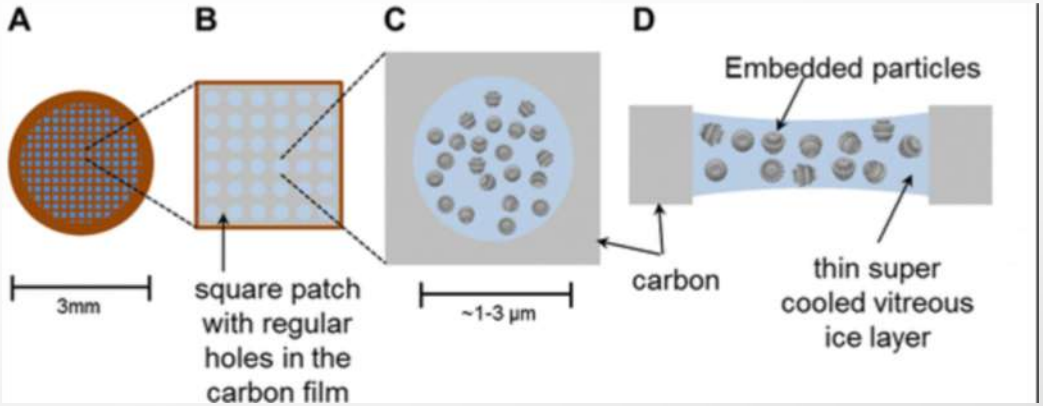


Dubochet et al, 1988

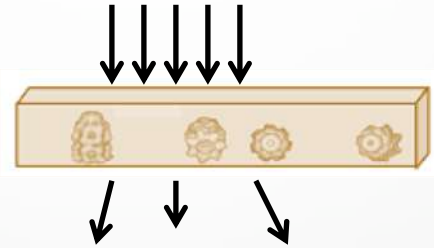
ВИТРИФИЦИРОВАННЫЙ ЛЕД

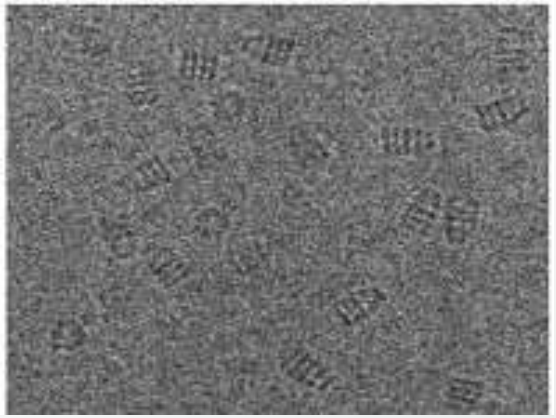


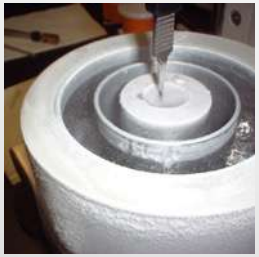
Dubochet et al, 1988



КРИОЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ







КРИОЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ

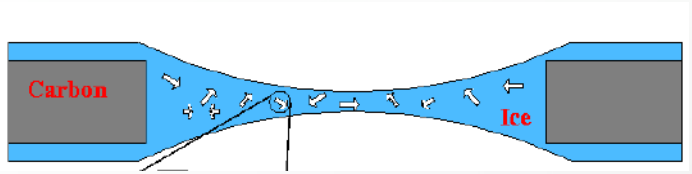
TFS

Gatan

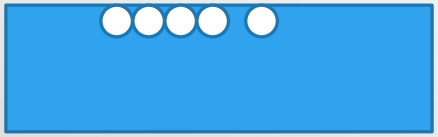
Leica

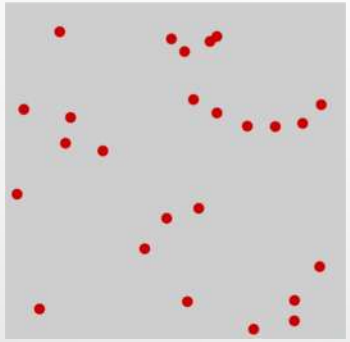
ПРОБЛЕМЫ С ВИТРИФИКАЦИЕЙ

1. Концентрация



2. Ориентация





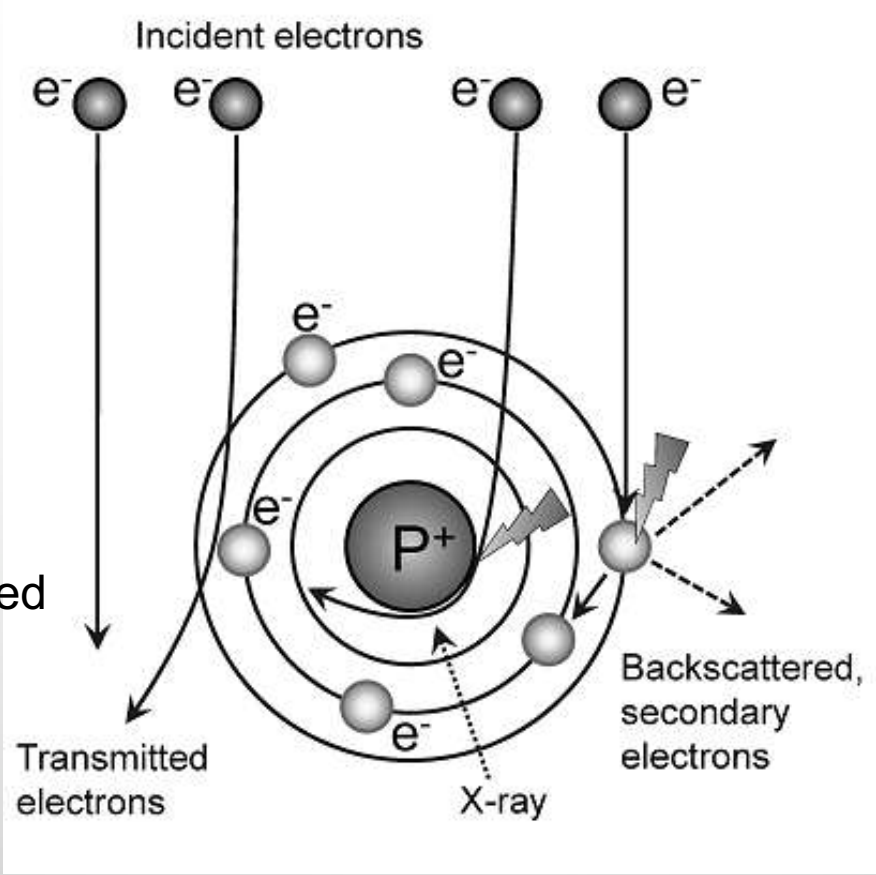
Идеальная толщина образца: Менее 100 nm (предотвращает множественное рассеяние электронов) но не меньше, чем размеры частицы: 10–30 nm.

Preferred orientation

3. НА ПУТИ К ВЫСОКОМУ РАЗРЕШЕНИЮ

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЭЛЕКТРОНОВ С ОБРАЗЦОМ

Elastically scattered



Inelastically scattered

Orlova & Saibil, 2011

ВЫСОКОЕ РАЗРЕШЕНИЕ

Signal
is limited by the size of an object and by the degree of **electron scattering**

radioactive damage

Noise
Is determined by the **electron irradiation**

Henderson, R. *Q. Rev. Biophys.* **28**, 171–193 (1995).

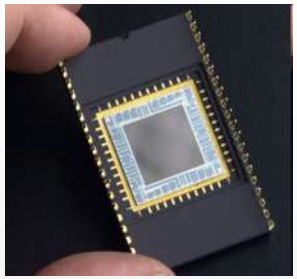
estimated that structures could be determined at ~3-Å resolution by merging data from images of as few as ~12,000 particles, and this could be done for particles as small as ~40 kDa

СПОСОБЫ РЕГИСТРАЦИИ ИЗОБРАЖЕНИЯ

- ПЛЕНКА

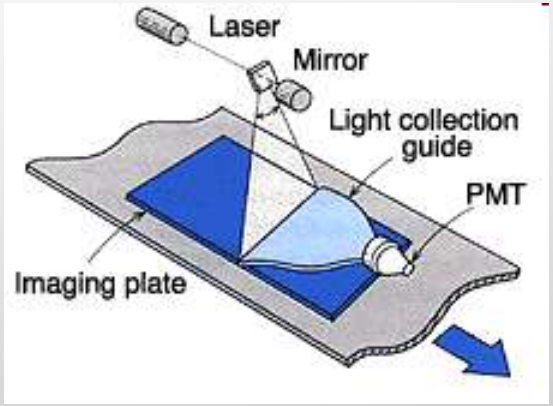
Химическая (проявление, фиксирование, промывка, сушка). Сканирование с сохранением файла.

- CCD КАМЕРА



Оцифровка непосредственно в процессе микросъемки, сохранение файла

- IMAGING PLATES: ФОТОСЛОЙ С ЭЛЕКТРОННЫМИ ЛОВУШКАМИ
- DIRECT DETECTORS



Сканирование IP пластин, сохранение файла

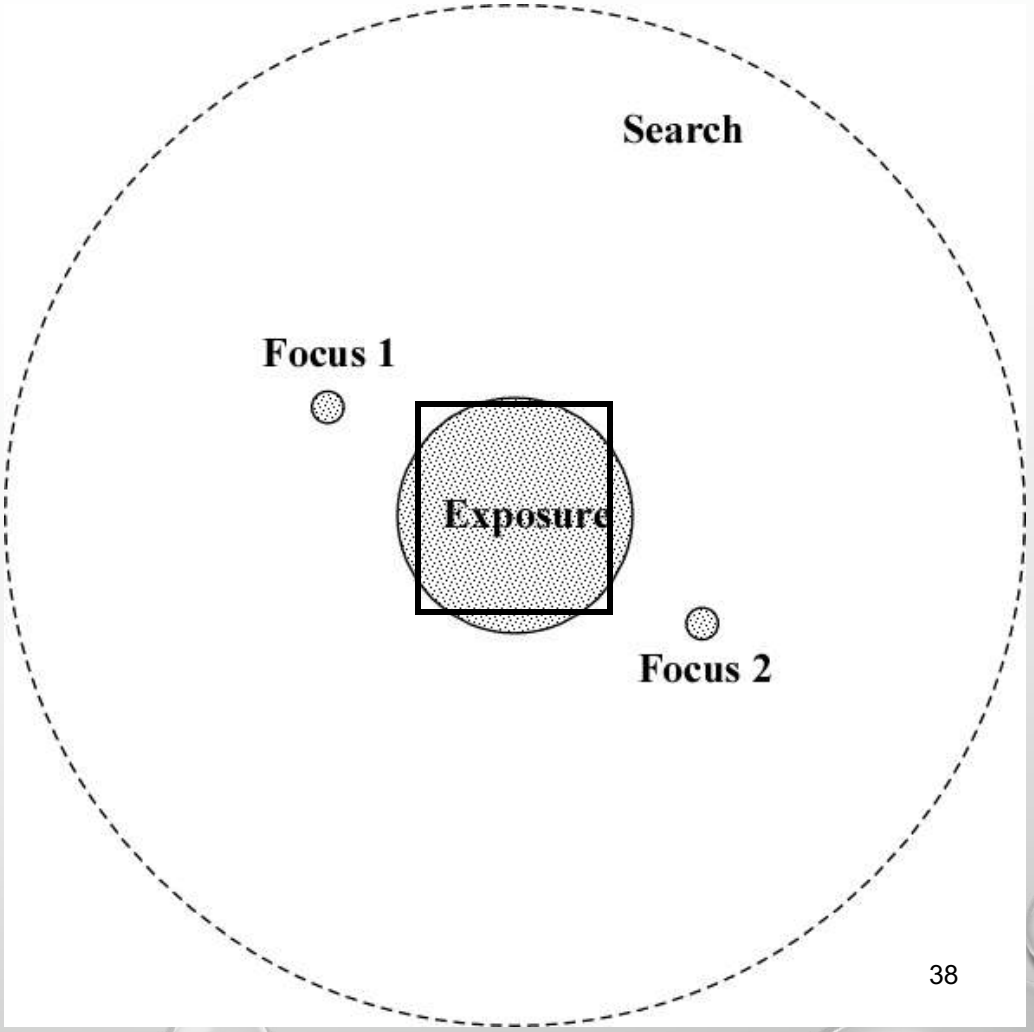
НИЗКАЯ ДОЗА ЭЛЕКТРОНОВ

Три режима:

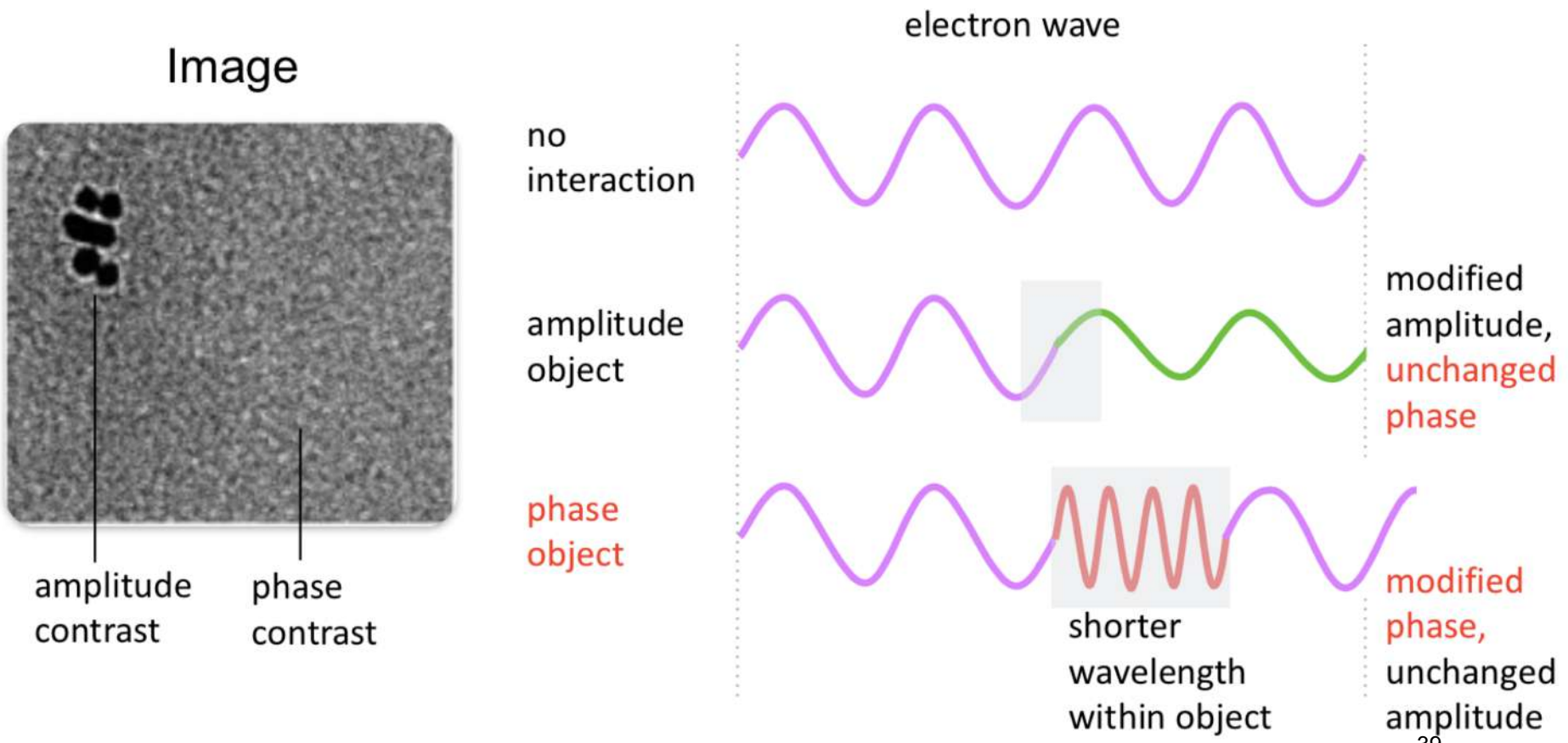
Поиск: небольшое увеличение (x5000), низкая интенсивность, большое поле зрения.

Фокус: большое увеличение (x230000), высокая интенсивность, небольшое поле зрения.

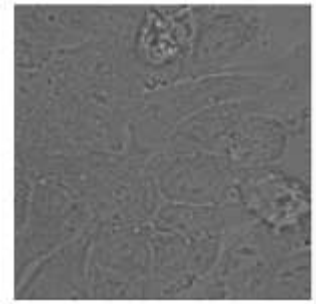
Экспозиция: ~ 1 секунда экспозиции, среднее увеличение (60 000-80 000), размер освещенного поля ~ равен размеру детектора



Contrast mechanisms

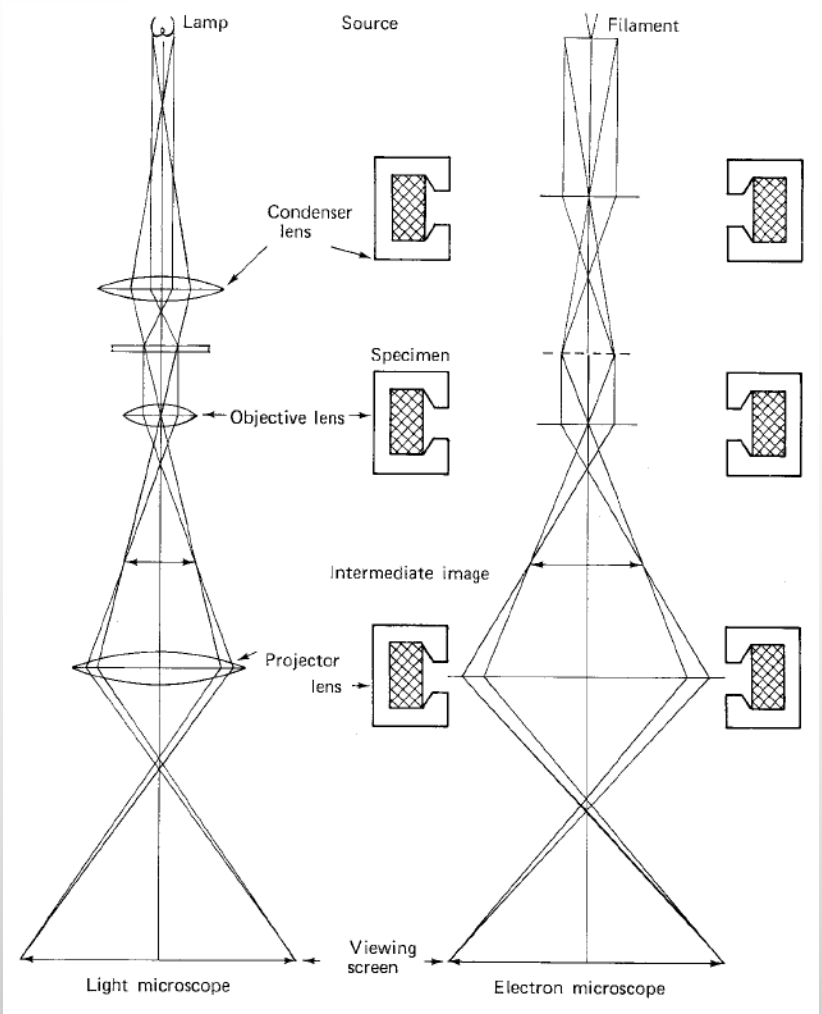


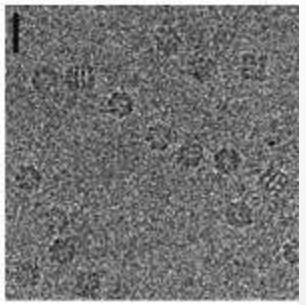
КОНТРАСТ В ПЭМ



В световом микроскопе свет от определенных частей спектра избирательно поглощается –

Амплитудный контраст



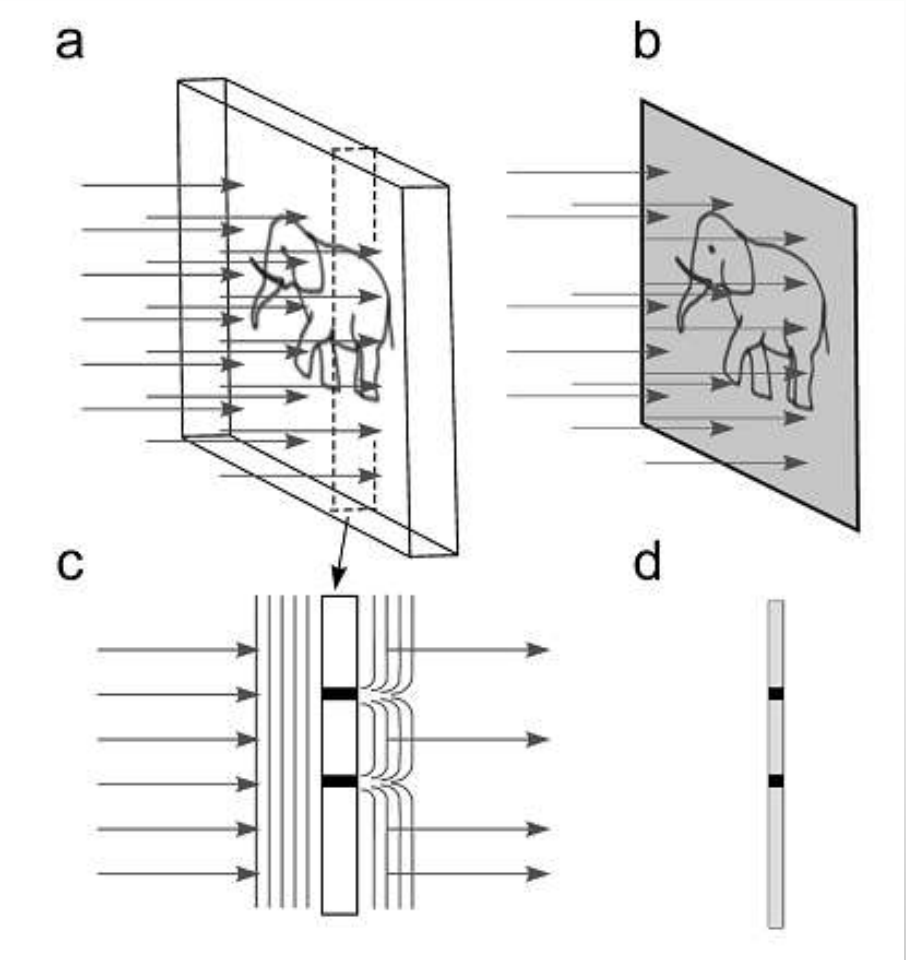


В электронном микроскопе траектории электронов отклоняются от исходного направления –

Фазовый контраст

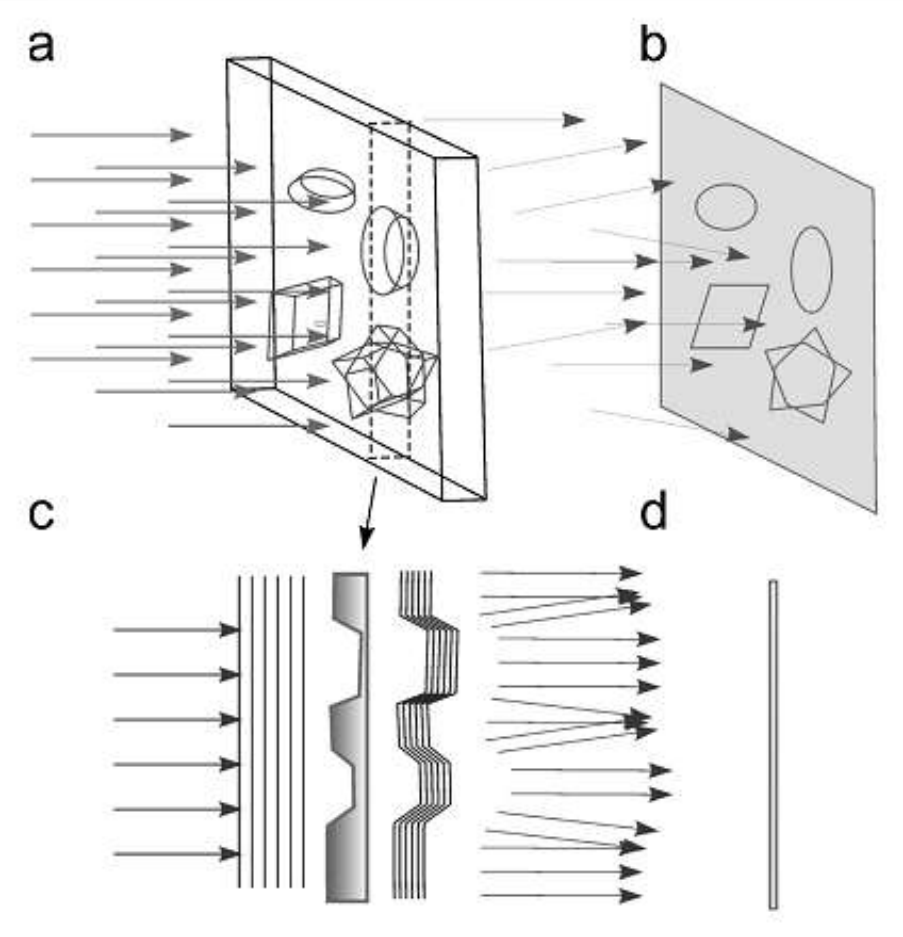
АМПЛИТУДНЫЙ КОНТРАСТ

Амплитудный контраст обеспечивается изменением интенсивности электронного пучка, проходящего через образец



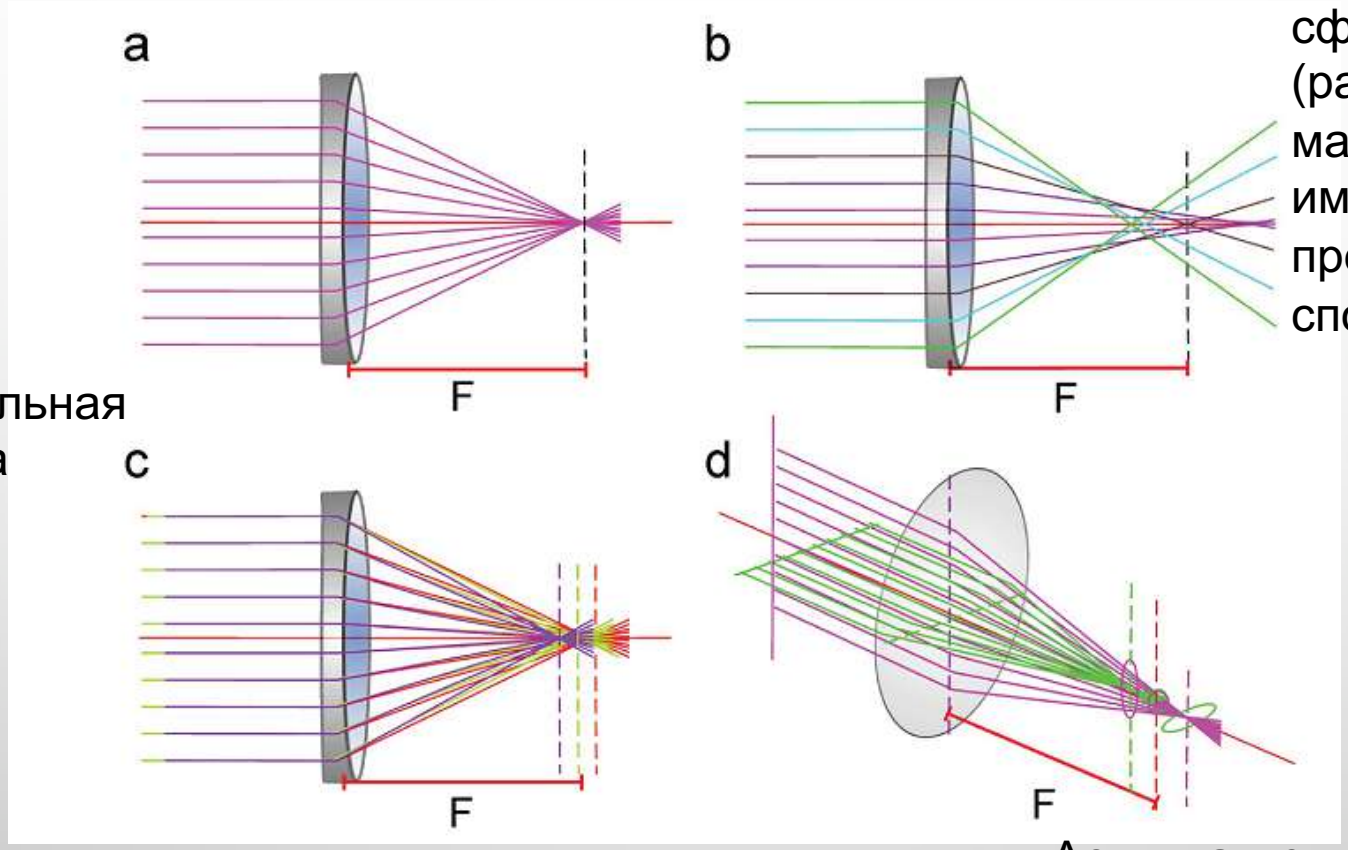
некоторые электроны адсорбировались

ФАЗОВЫЙ КОНТРАСТ



некоторые электроны рассеялись

АБЕРРАЦИИ МИКРОСКОПА



Идеальная линза

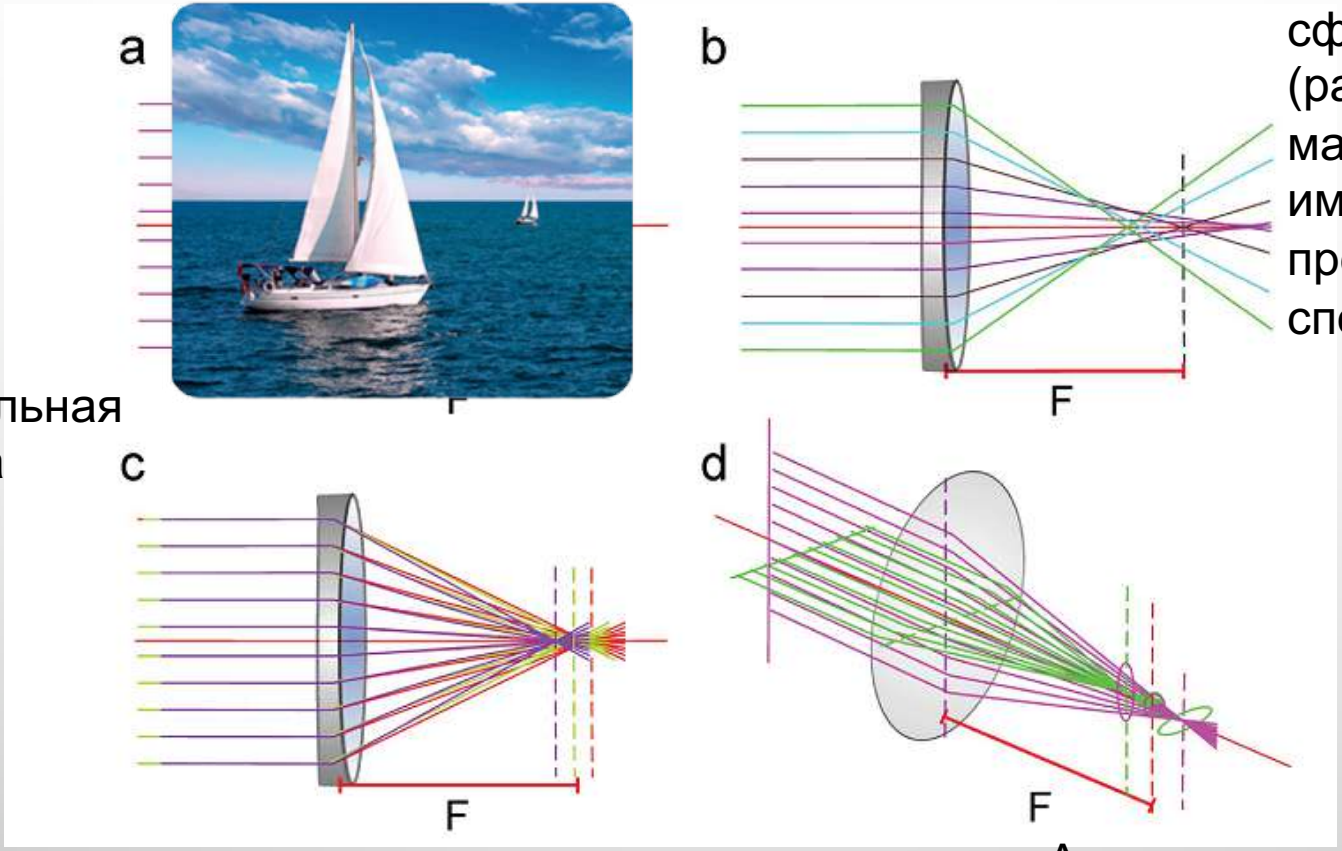
сферическая (разные части магнитного поля имеют разную преломляющую способность)

Хроматическая (различия в скоростях электронов, проходящих через объект)

Астигматизм (аксиальная асимметрия полей магнитной линзы)

АБЕРРАЦИИ МИКРОСКОПА

Идеальная линза

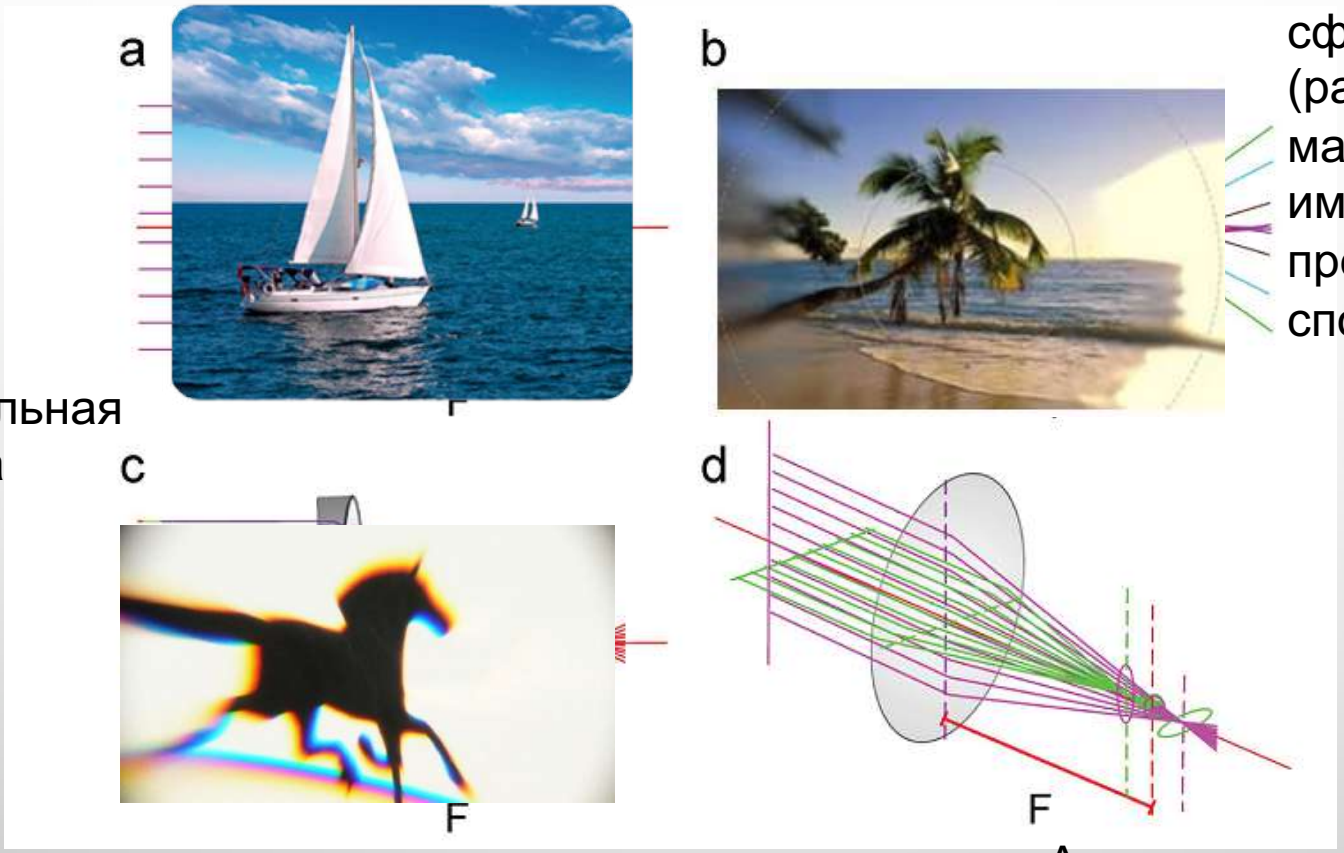


сферическая (разные части магнитного поля имеют разную преломляющую способность)

Хроматическая (различия в скоростях электронов, проходящих через объект)

Астигматизм (аксиальная асимметрия полей магнитной линзы)

АБЕРРАЦИИ МИКРОСКОПА



Идеальная линза

сферическая (разные части магнитного поля имеют разную преломляющую способность)

Хроматическая (различия в скоростях электронов, проходящих через объект)

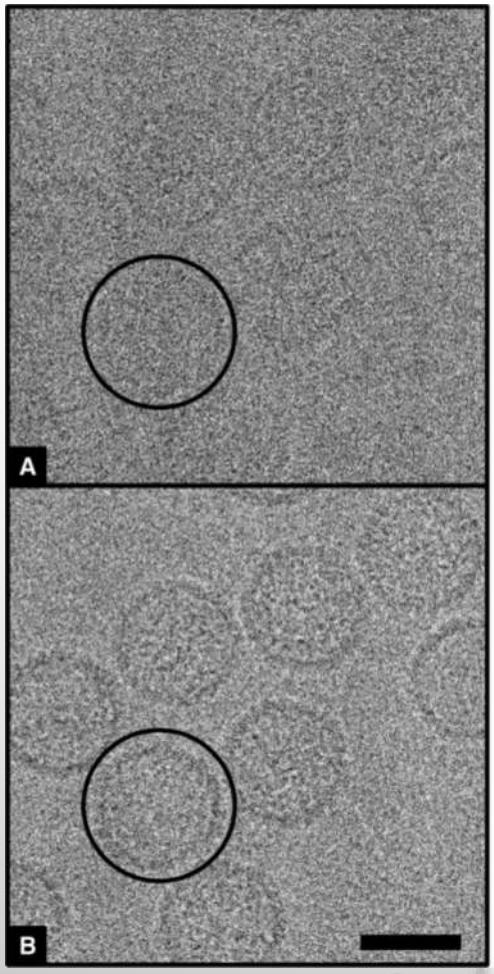
Астигматизм (аксиальная асимметрия полей магнитной линзы)

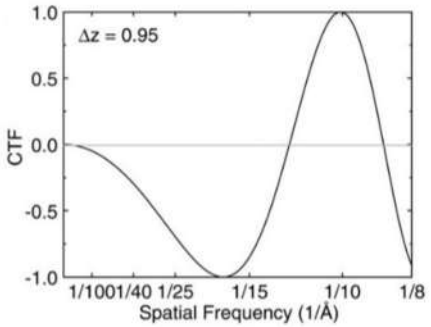
ЧАСТОТНО-КОНТРАСТНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА

image

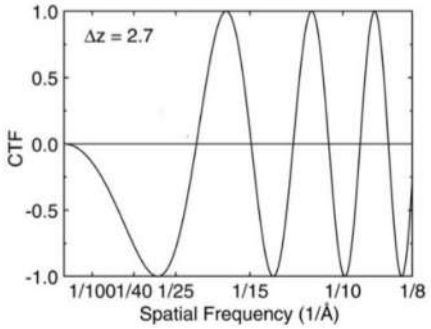
ЧКХ

дефокус 0.95 um



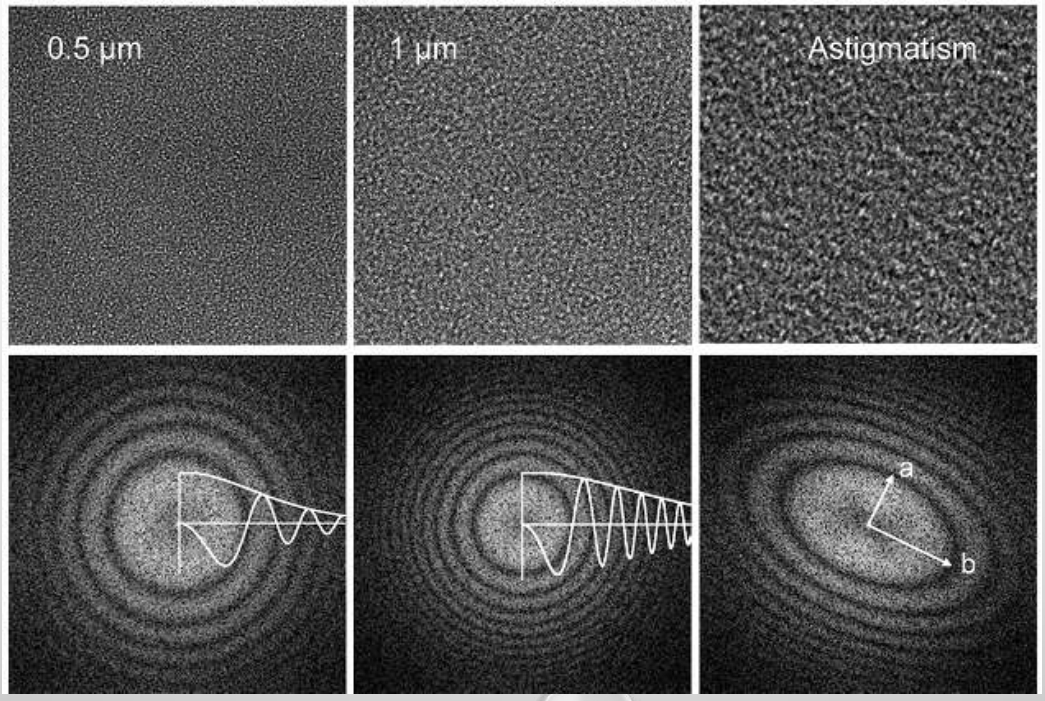


дефокус 2.7 um



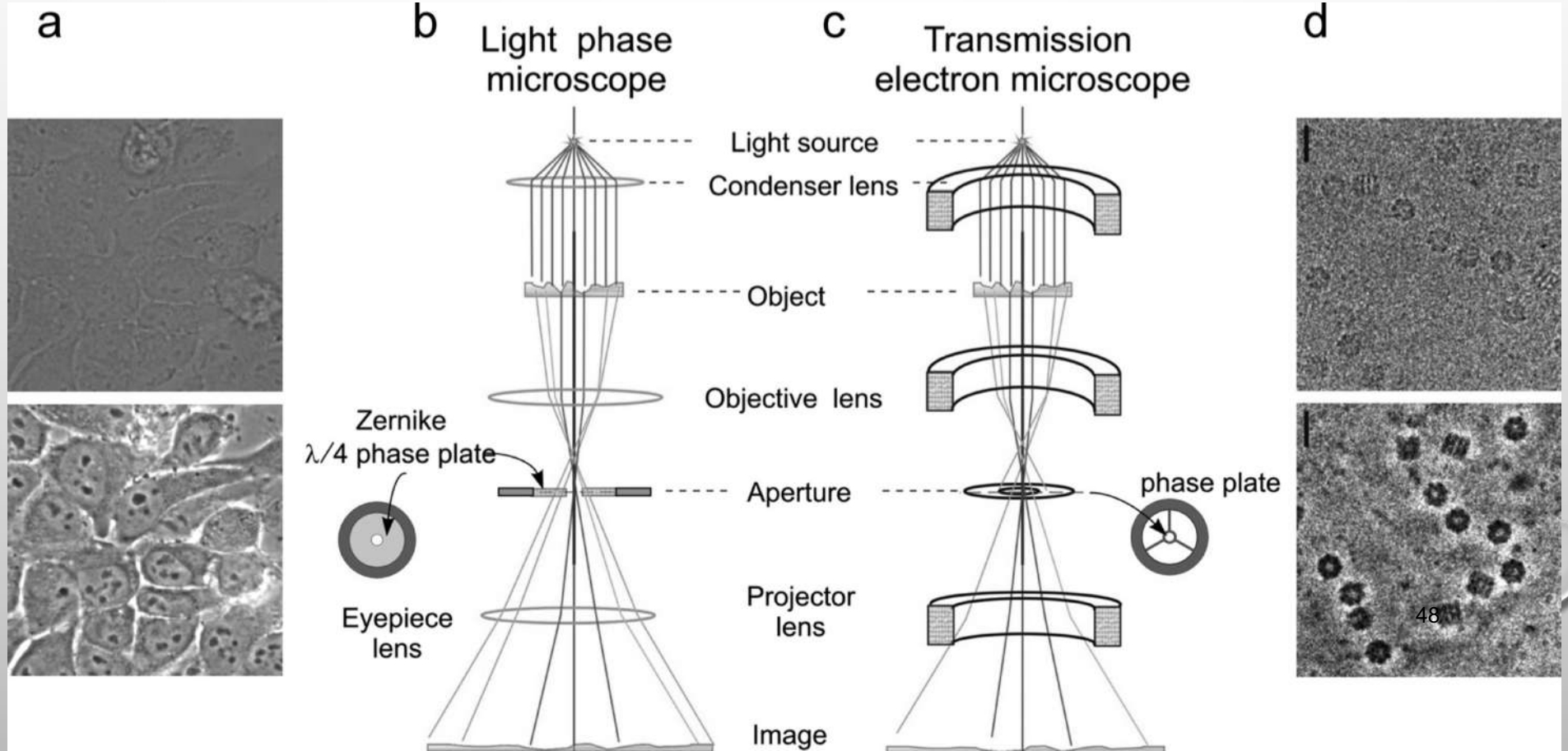
УЛУЧШЕНИЕ КОНТРАСТА

Контраст изображения биологических объектов может быть улучшен комбинированным эффектом сферической аберрации и расфокусировки, то есть перемещением плоскости изображения от точного фокуса



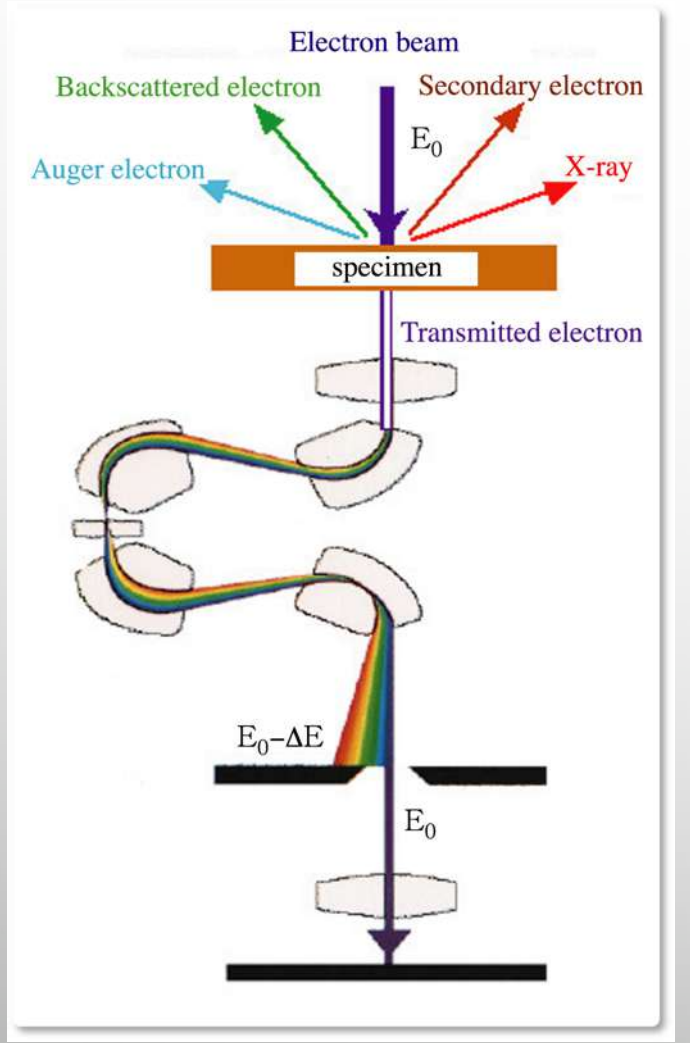
УСИЛЕНИЕ КОНТРАСТА

Чтобы увеличить контраст, необходимо превратить невидимые изменения фазы световой волны в видимые изменения амплитуды. Это достигается с помощью фазовой пластинки

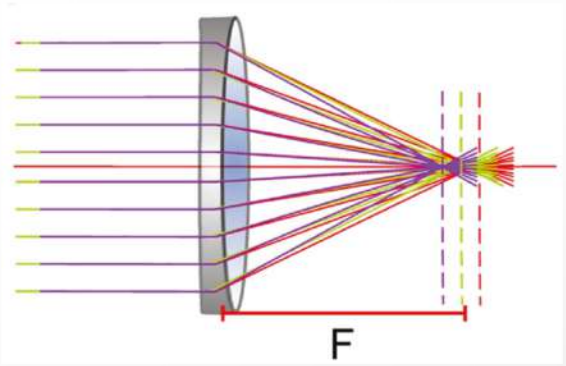


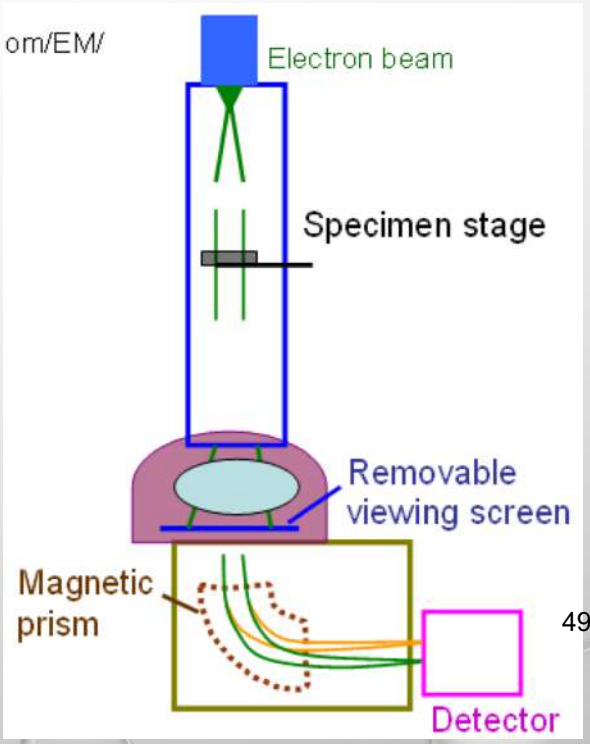
ФИЛЬТРАЦИЯ ЭНЕРГИИ

omega-filter

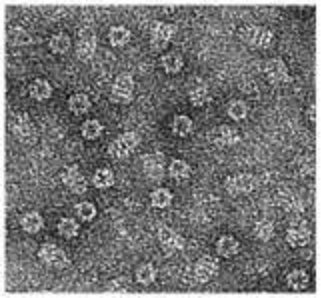


электроны с разными длинами волн (разные величины энергии) могут отклоняться по разным траекториям

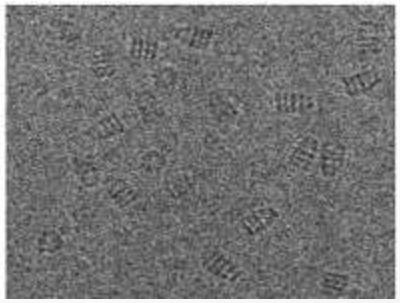




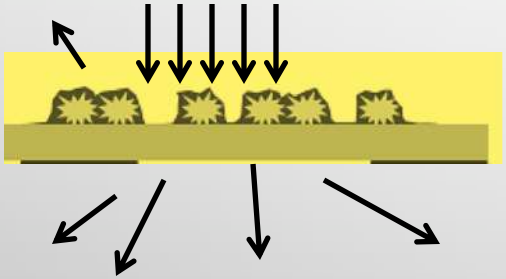
УСИЛЕНИЕ КОНТРАСТА

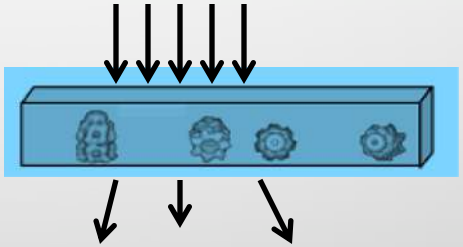


негативный контраст



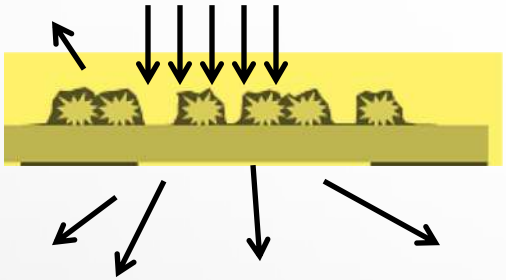
крио





НЕГАТИВНОЕ ОКРАШИВАНИЕ ИЛИ КРИО?

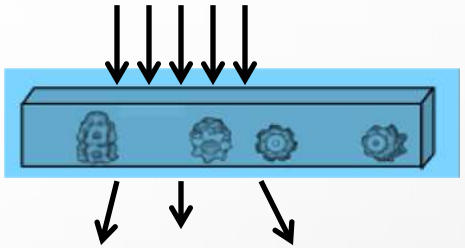
негативный контраст



Pro:
- высокий контраст
- Может быть выполнен при комнатной температуре
- Действует как ссылка для высокого разрешения
- быстрый

Contra:
- низкое разрешение
- частицы могут быть сплющены

крио



Pro:
- высокое разрешение
- нативная конформация

Contra:
- низкий контраст
- частицы могут быть повреждены на границе между водой и воздухом