

# Электронная микроскопия



# Типы электронных микроскопов

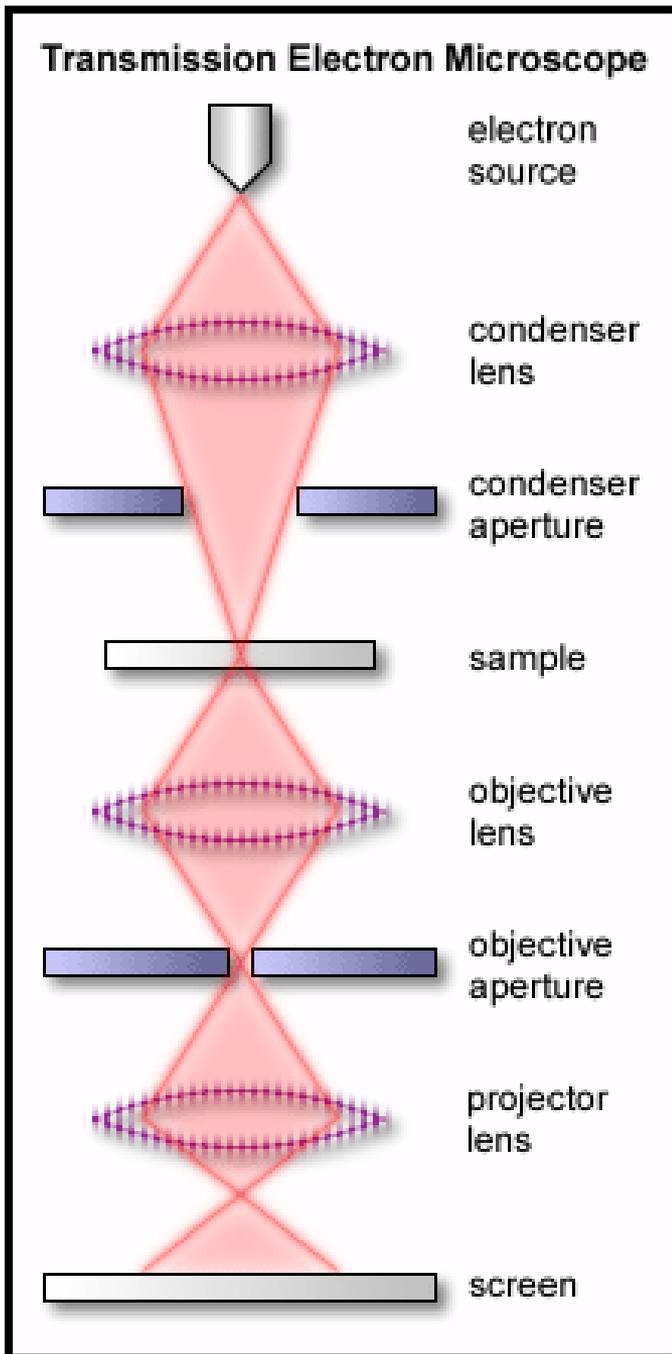
- Сканирующие э.м.

Изучение геометрии поверхности образца и её химического состава

- Просвечивающие э.м.

Определение внутренней структуры образца

# Схема просвечивающего электронного микроскопа



Источник

Конденсорная линза

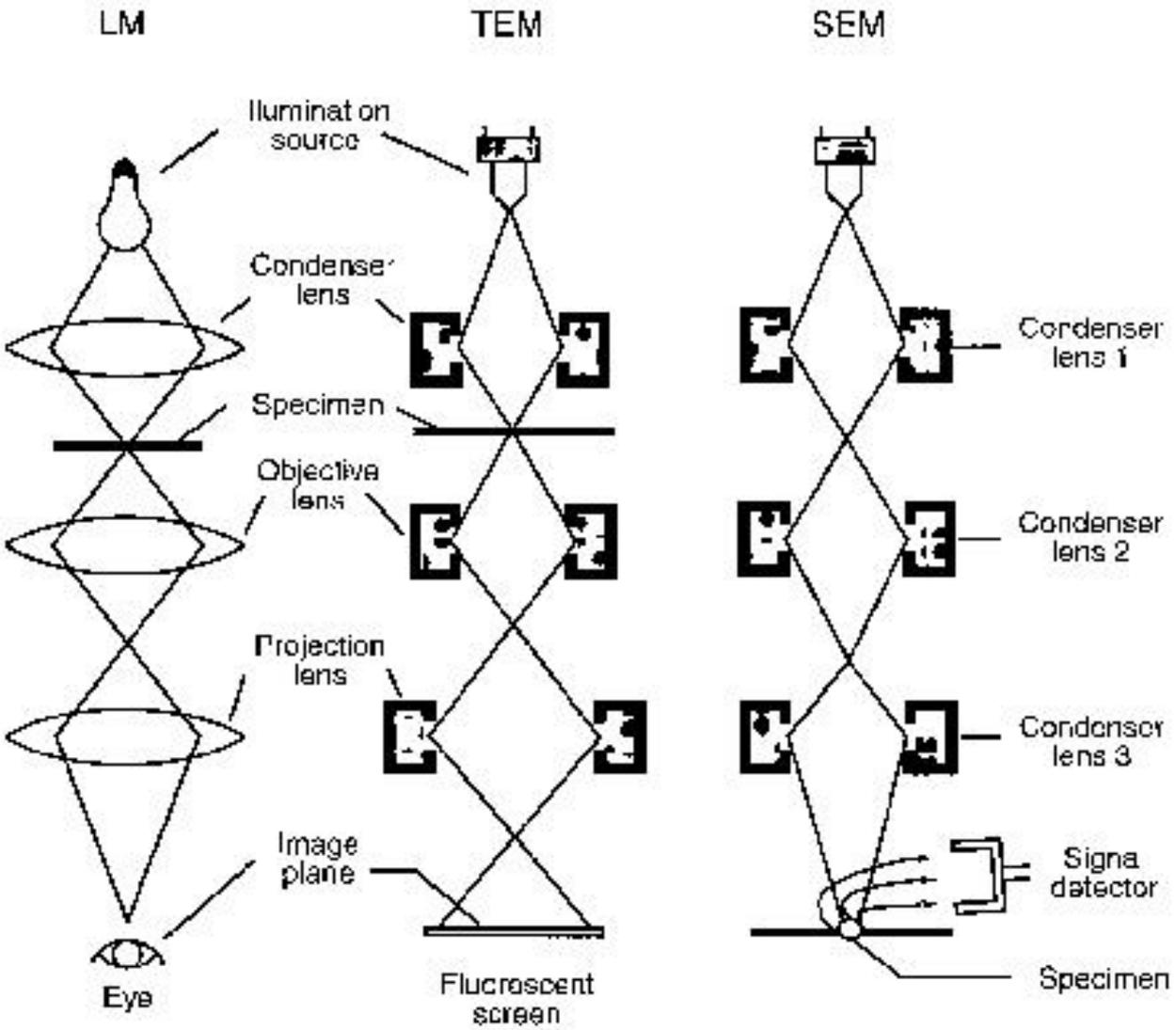
Образец

Объективная линза

Проективная линза

экран

# Сравнение о.м. и э.м.: TEM & SEM



Длина волны электрона зависит от ускоряющего потенциала как:

$$\lambda = \frac{12.5}{\sqrt{U}}$$

где  $U$  в вольтах, длина волны – в Ангстремах.

Отсюда следует, что длина волны электронов, ускоренных до 90 кэВ, равна **0.04 Å**.

***Почему реальная разрешающая способность ЭМ на два порядка больше?***

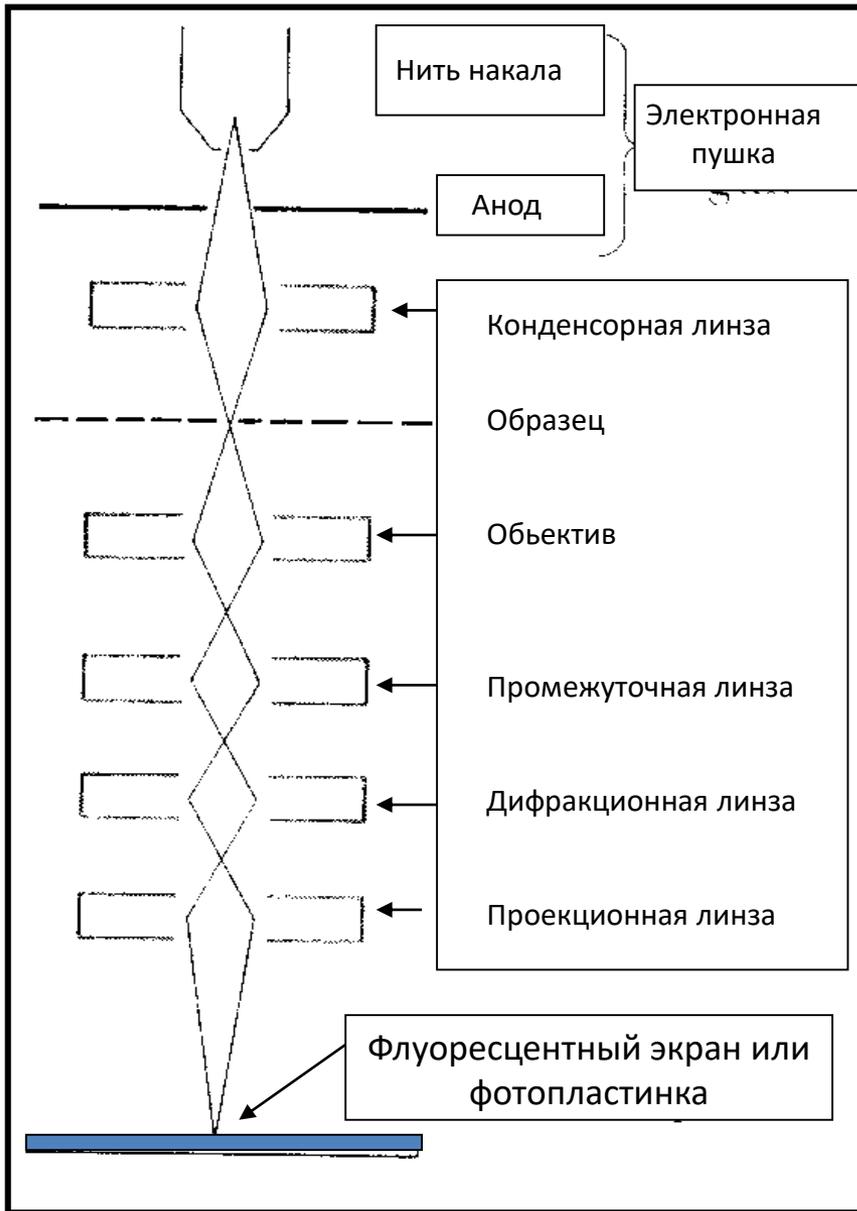
1) Нет линз, способных сфокусировать электроны, рассеянные под большими углами: существующие электромагнитные линзы обладают существенной хроматической и сферической **абберациями**.

2) Нативные биологические частицы в ЭМ наблюдаются в виде нечетких бесструктурных пятен из-за **малости контраста**.

3) Из-за взаимодействия электронов с образцом для предотвращения его разрушения используются малые электронные дозы, что уменьшает **отношение сигнала к шуму**.

Основное различие между формированием изображения в экспериментах по дифракции и в электронном микроскопе состоит в том, что в последнем случае двумерное изображение можно наблюдать непосредственно.

## Оптическая система электронного микроскопа



### Четыре основные отличия ОМ от ЭМ

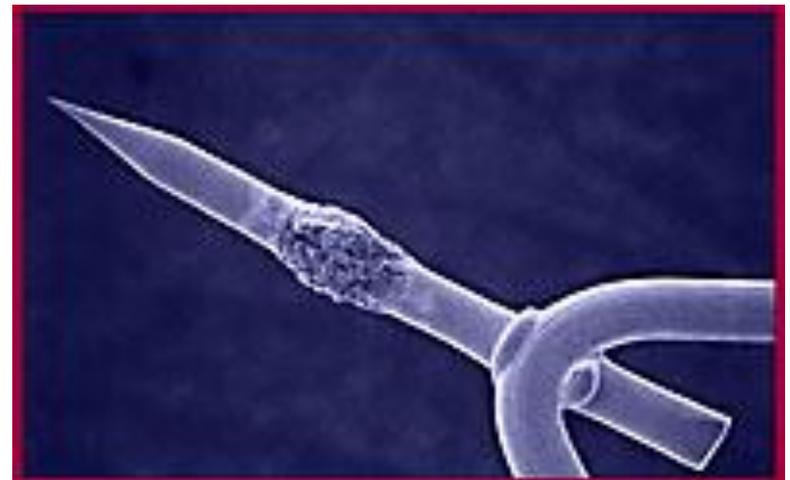
- 1) Электроны сильно взаимодействуют с молекулами воздуха. Поэтому в отличие от светового микроскопа образец в ЭМ всегда должен находиться в глубоком вакууме.
- 2) Увеличение в ЭМ может изменяться за счет изменения тока текущего через линзы; в световом микроскопе увеличение для данной линзы постоянно.
- 3) В силу особенностей построения изображения сегодняшние электромагнитные линзы работают при очень маленькой апертуре (0.0005). Это влечет за собой практический предел разрешения около  $1\text{ \AA}$ .
- 4) Аберрации в той или иной степени всегда присутствуют в электромагнитных линзах

# Источники электронов

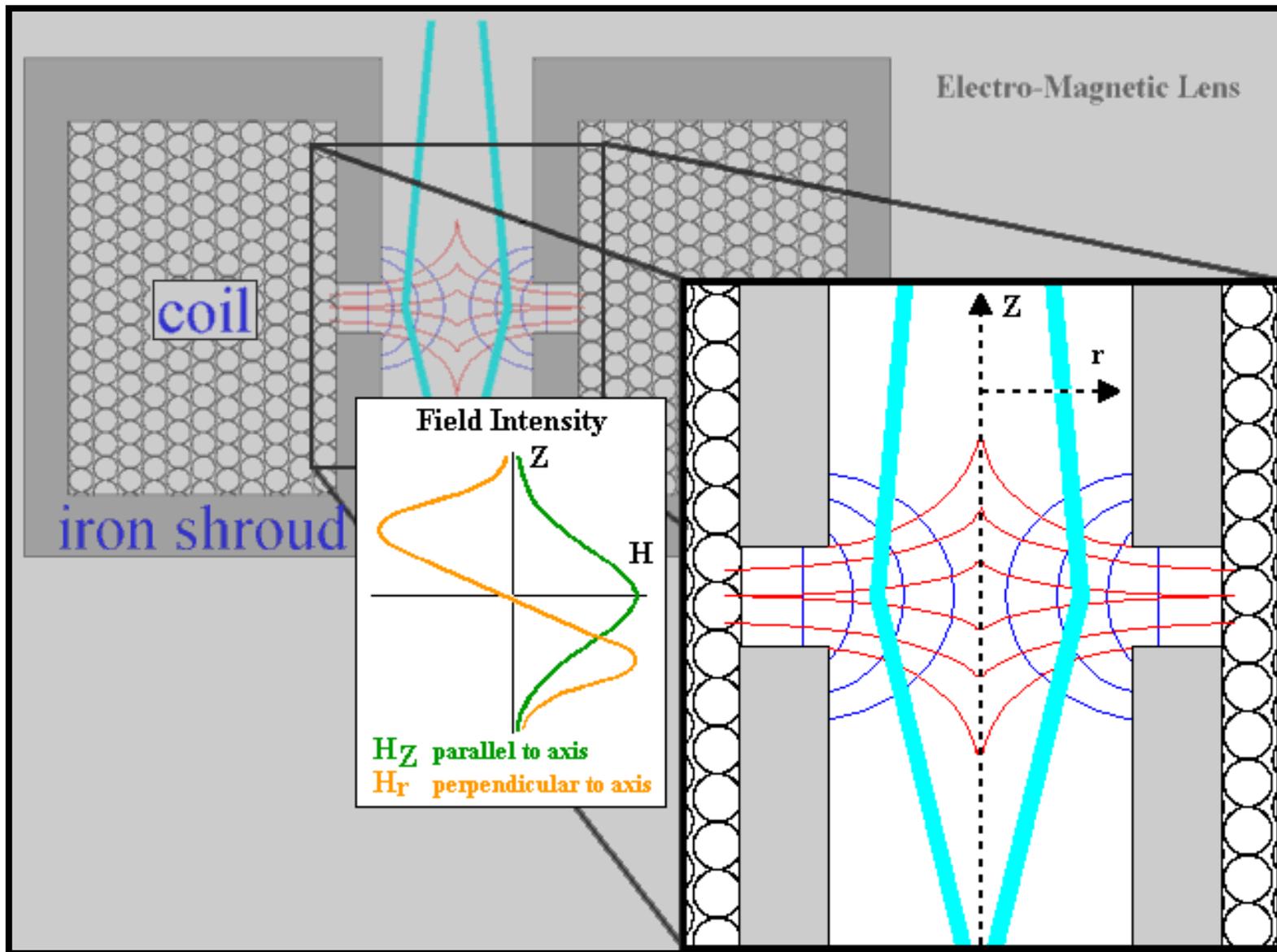
Термоионные



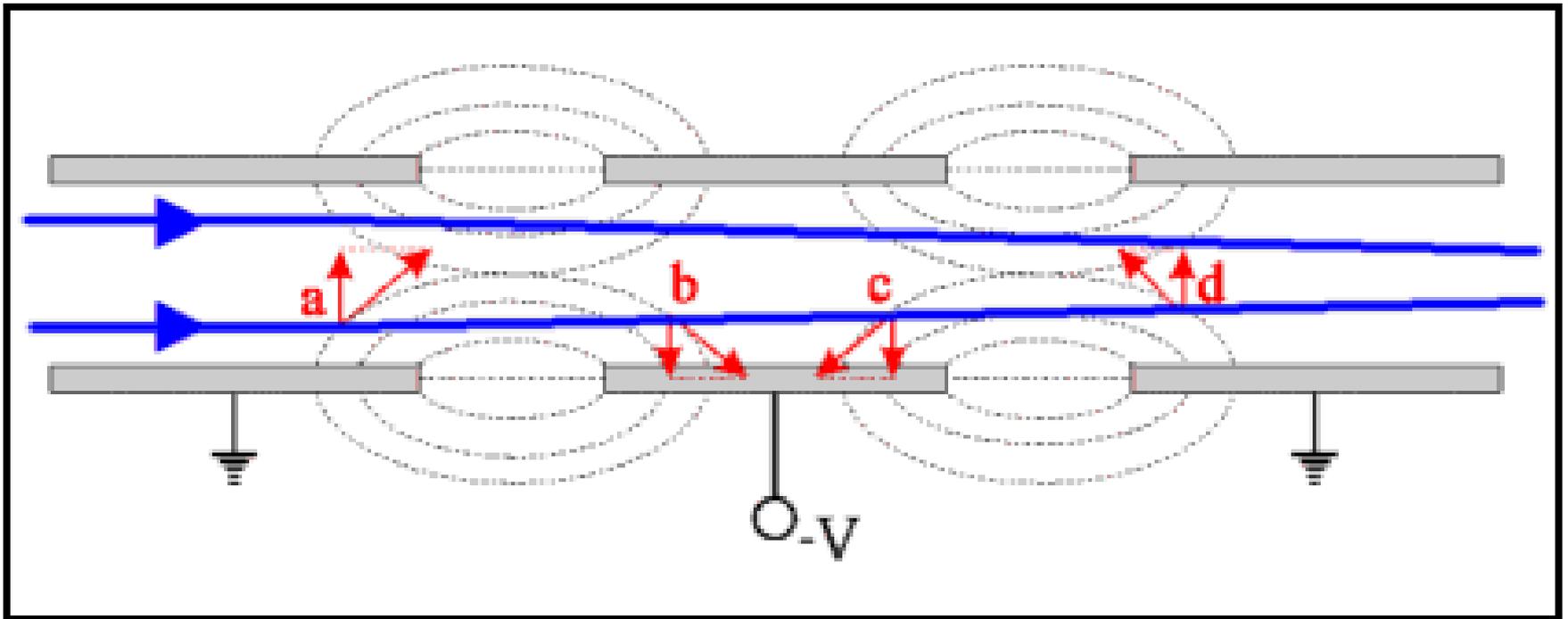
Полевые



# Магнитные линзы

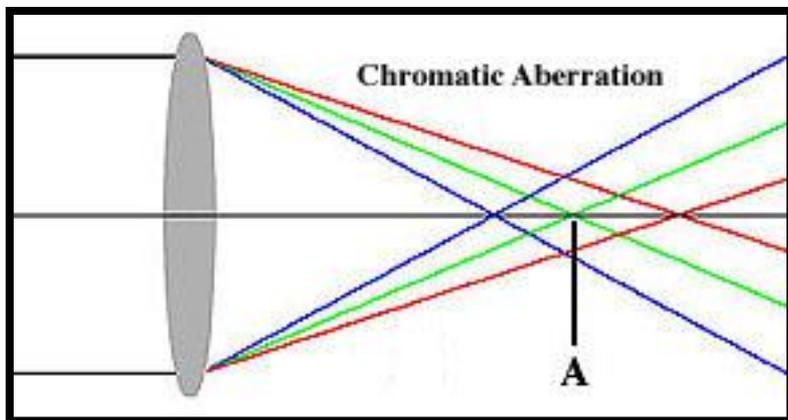


# Электростатическая линза

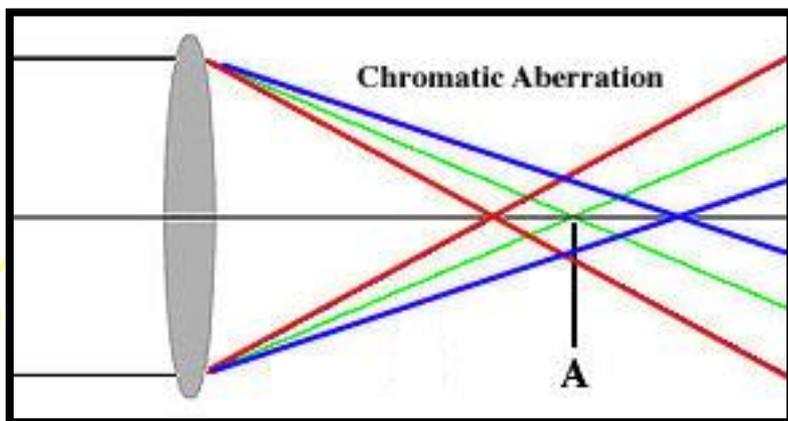


Must have very clean and high vacuum environment to avoid arcing across plates

Аберрация – основная причина ухудшения качества изображения и потери разрешающей способности

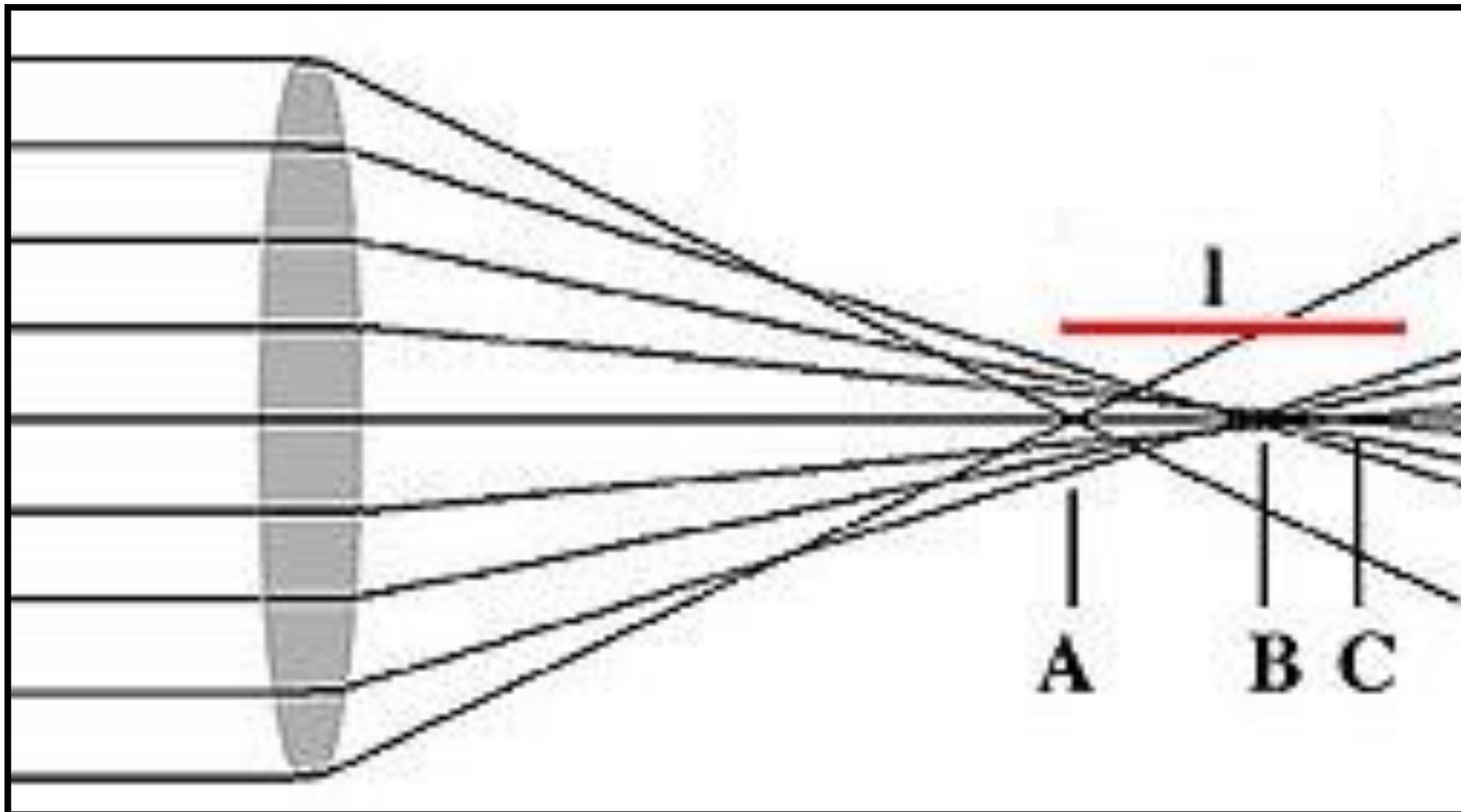


Хроматическая аберрация в классической микроскопии



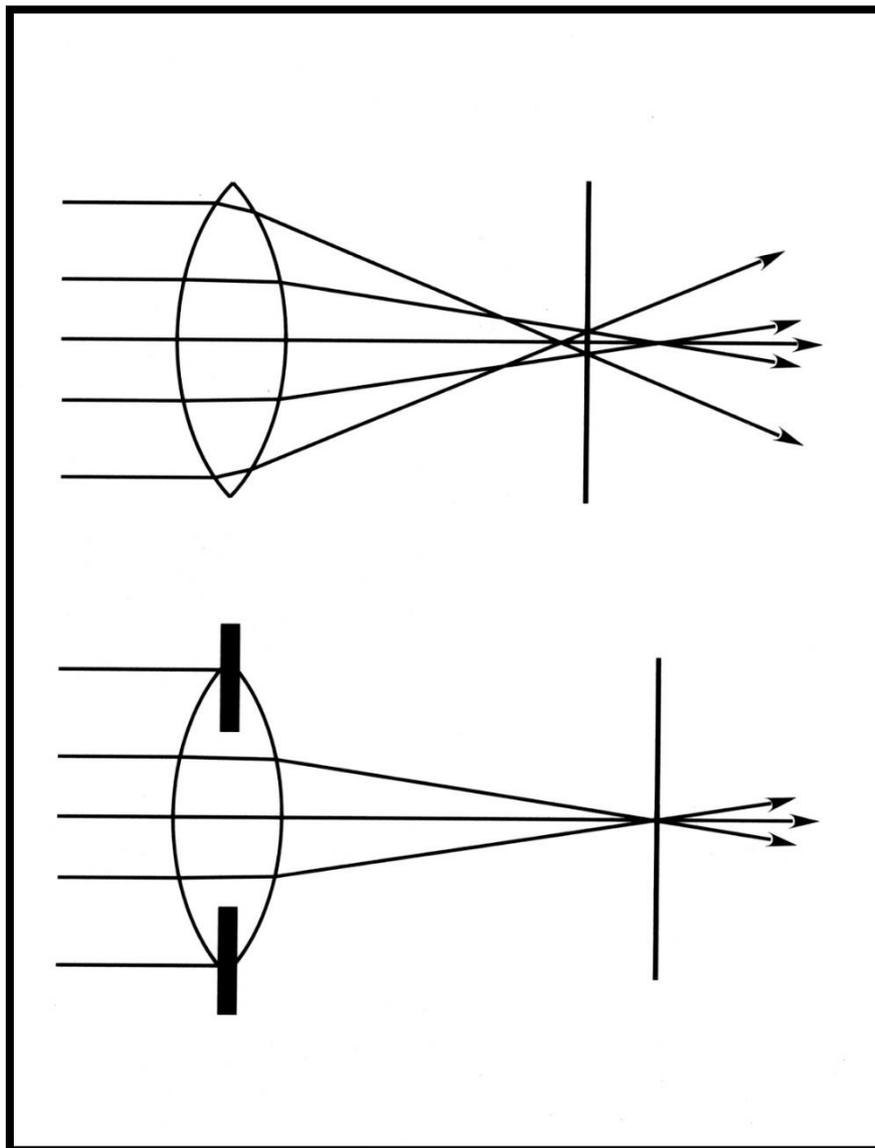
В ЭМ – все наоборот

Сферическая абберация – основной враг для  
высокого разрешения

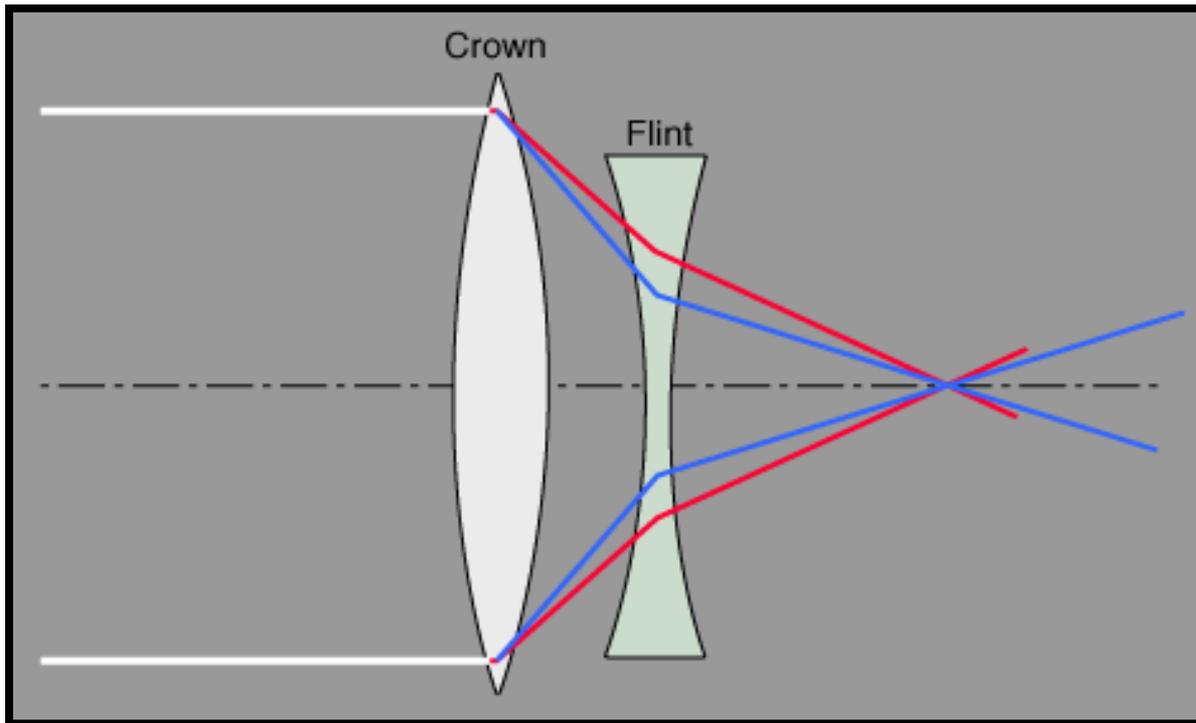


# Методы борьбы с аберрациями

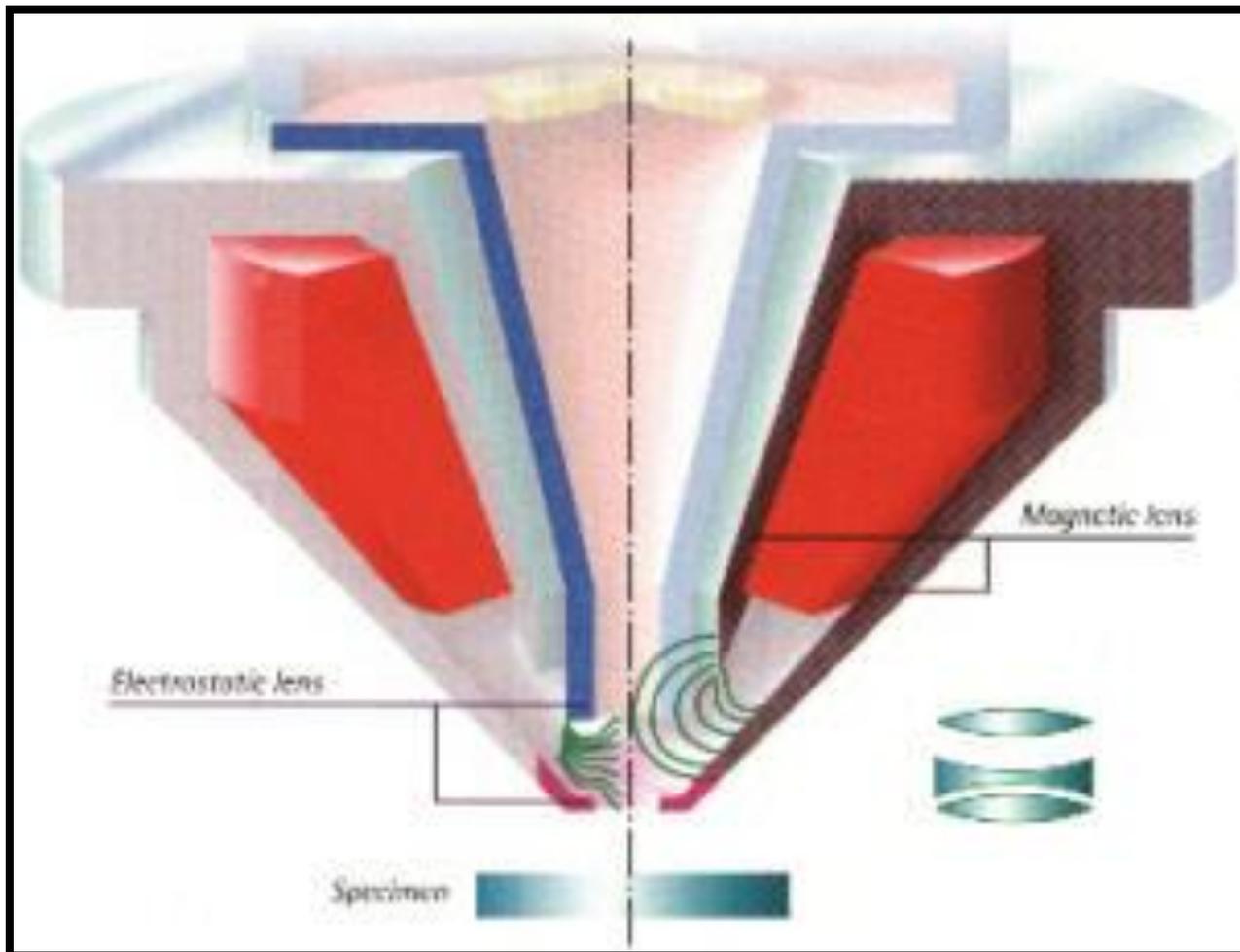
## 1) Апертура

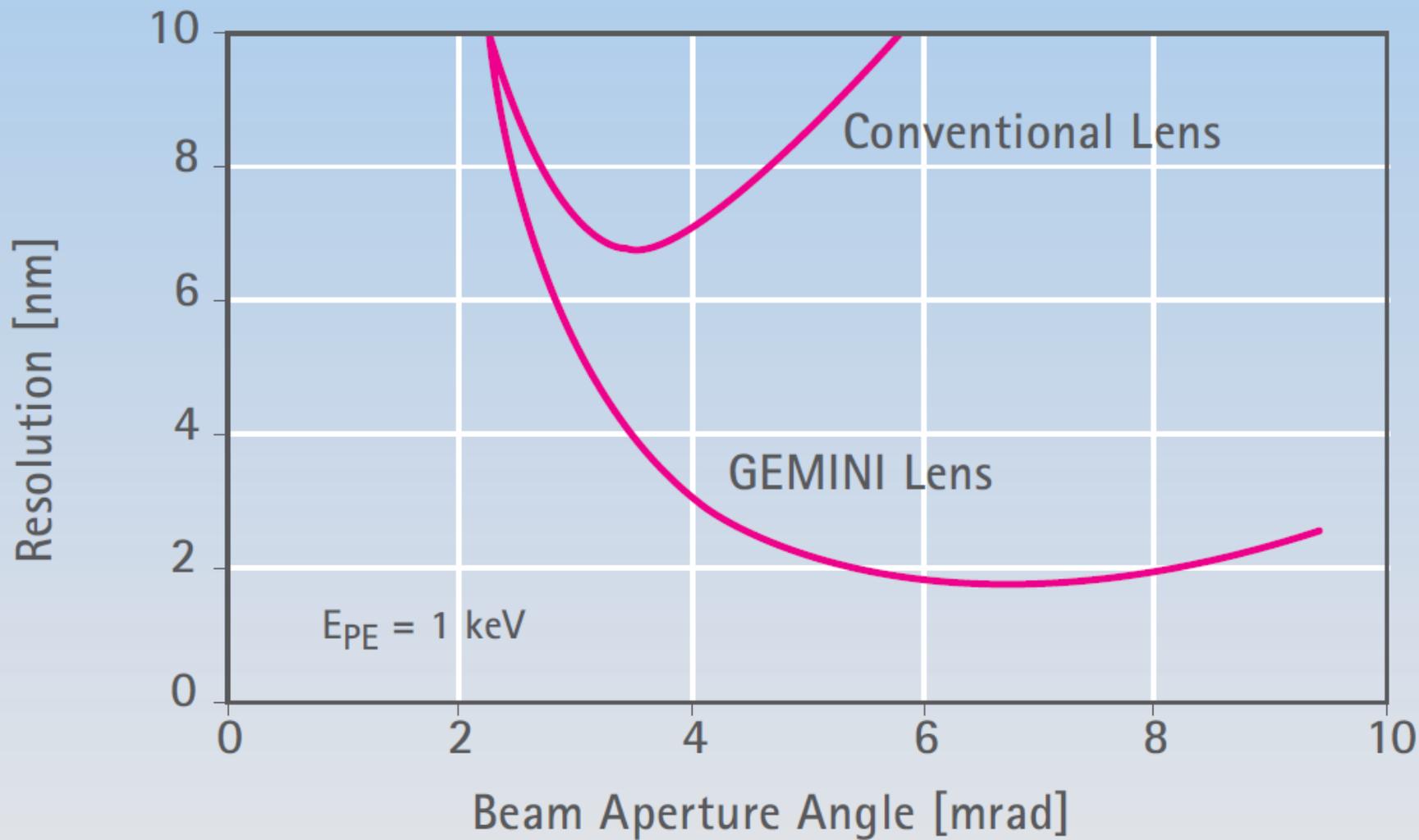


## 2) Компенсация аберраций за счет комбинации линз

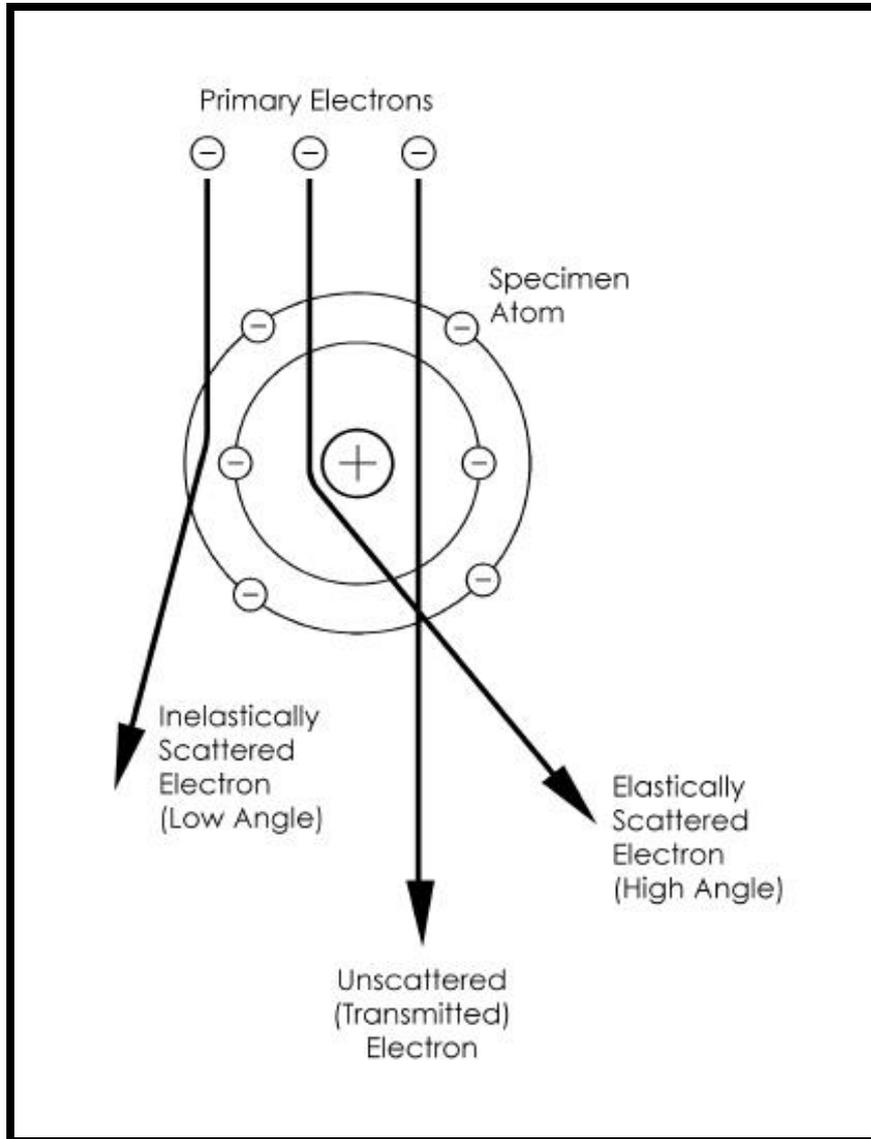


Собирающая магнитная + рассеивающая электростатическая линза = уменьшение хроматической аберрации





## Взаимодействие быстрых электронов с атомами:



- 1) Отсутствие взаимодействия – нерассеянные электроны
- 2) Упругое рассеяние – без потери энергии – информация о структуре
- 3) Неупругое взаимодействие – обмен энергии, образование вторичных электронов, рентгеновского излучения. Результат – ненужная химия, разрушающая образец и ухудшение изображения

# Особенности взаимодействия электронов с веществом

**Сечение взаимодействия в  $10^5$  раз выше, чем для рентгеновских лучей**

Для уменьшения повреждения образца и получения информации о его структуре используют тонкие срезы ( от десятков до сотен нанометров).

Криоэлектронная микроскопия позволяет существенно увеличить время облучения образца электронами, а также изучать макромолекулярные комплексы в их нативном состоянии

## Методы увеличения контраста в ПЭМ

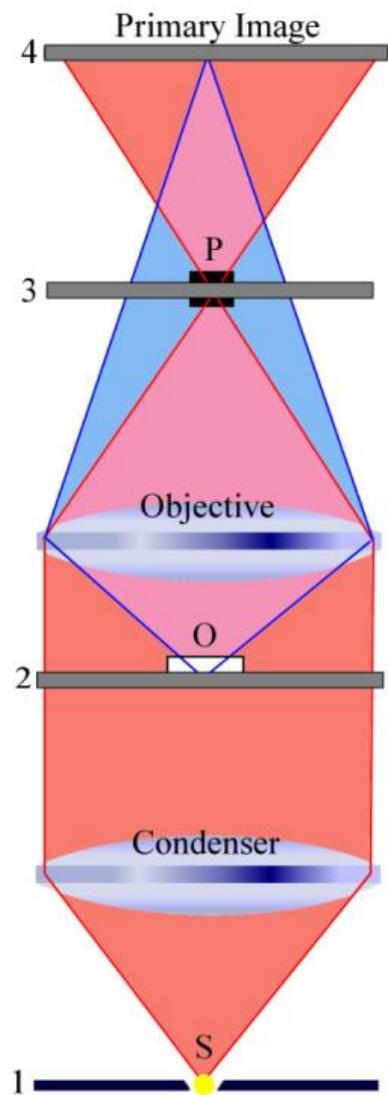
За счет изменения конфигурации микроскопа:

1. Контрастирование дефокусировкой (аналог фазового контраста, но при дефокусировке падает разрешение)
2. Фазовое контрастирование за счет добавления фазовых пластинок на пути электронного пучка

За счет изменения химического состава образца:

1. Негативный контраст
2. Позитивный контраст

# Принцип фазового контрастирования в классической оптике

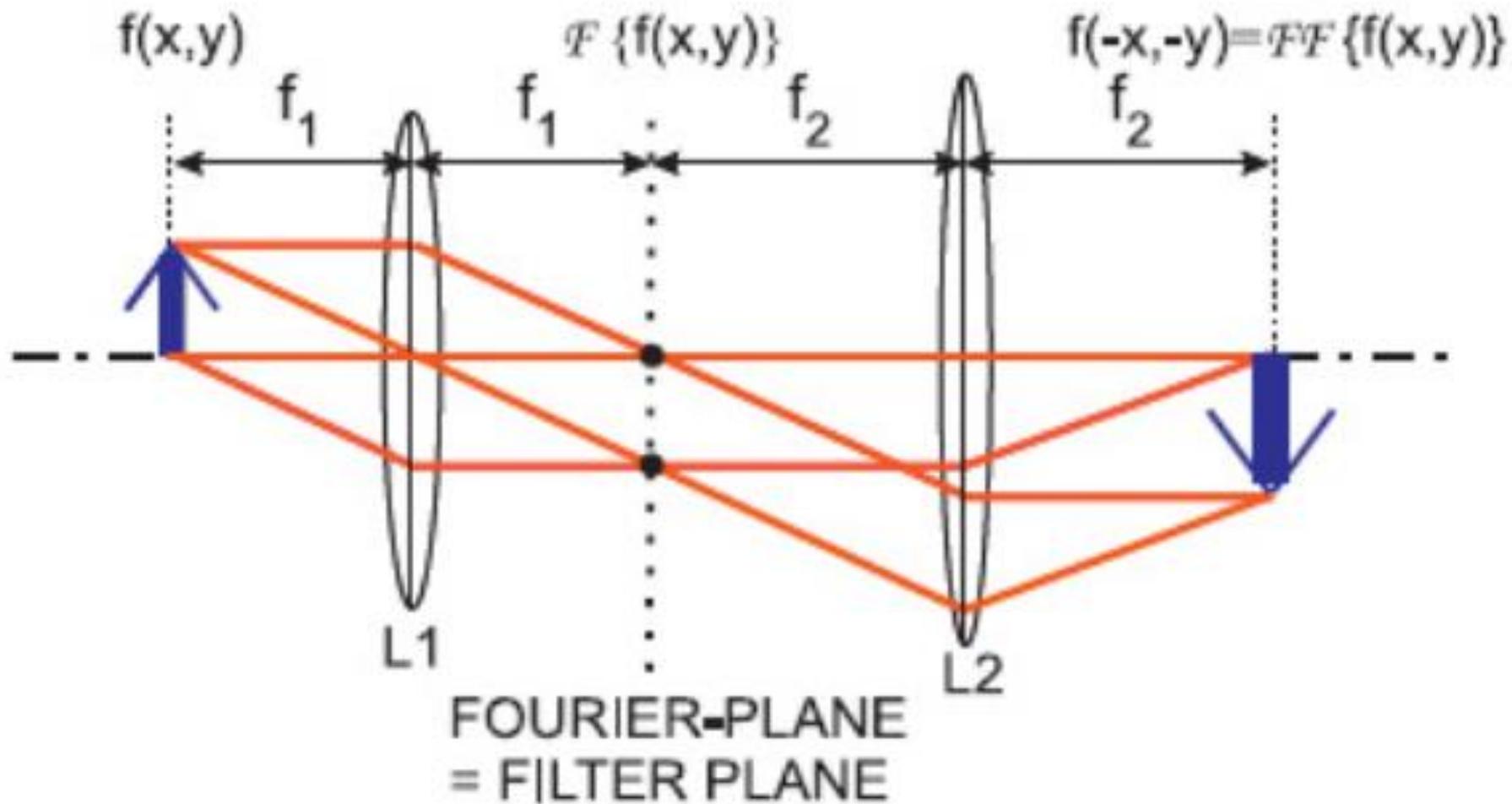


Фриц Цернике 1888-1966 г.



Нобелевская премия по физике  
1953 года

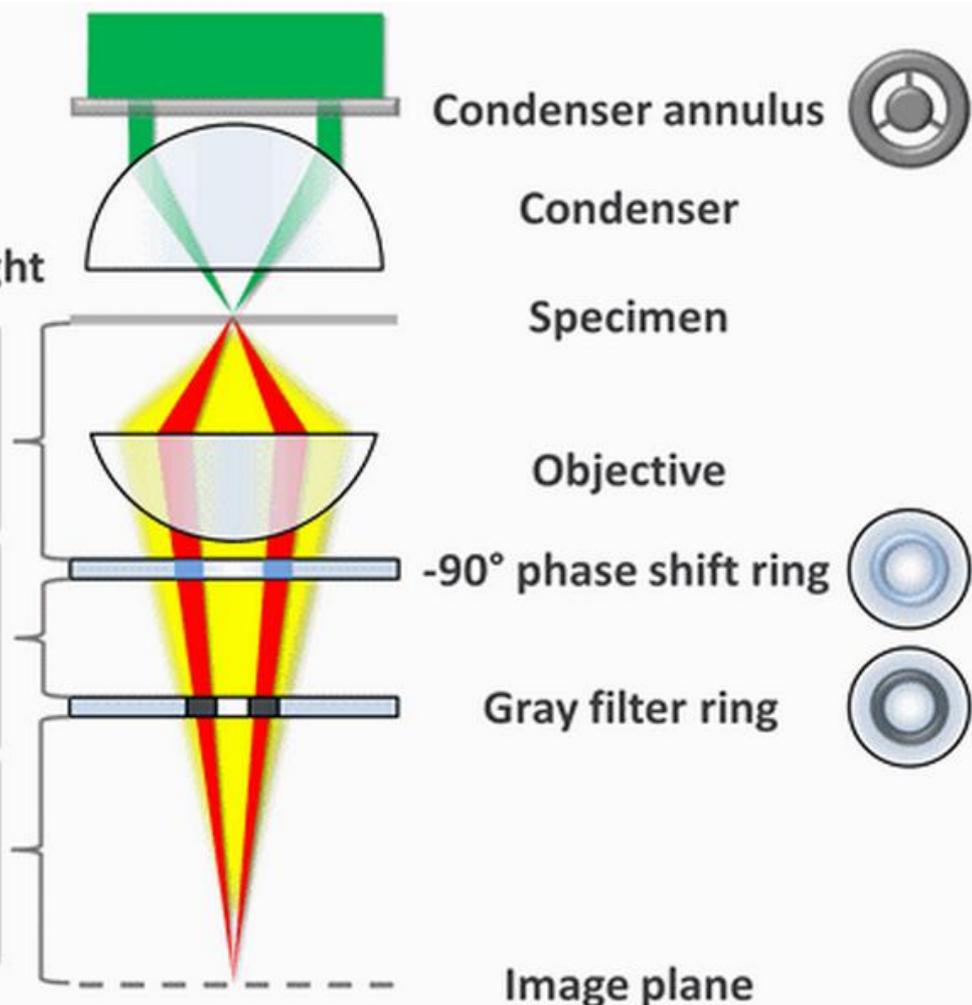
# Принцип Фурье-оптики

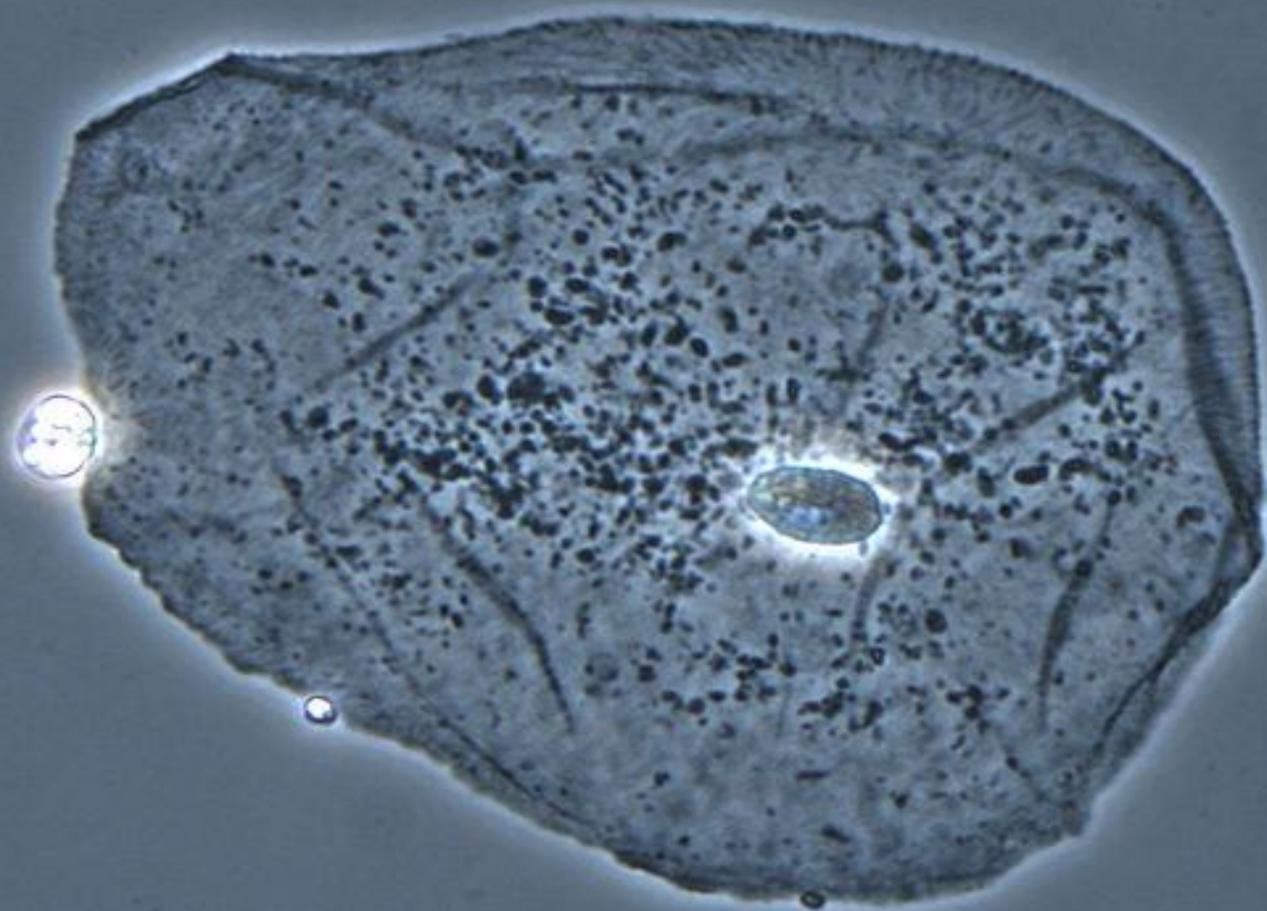


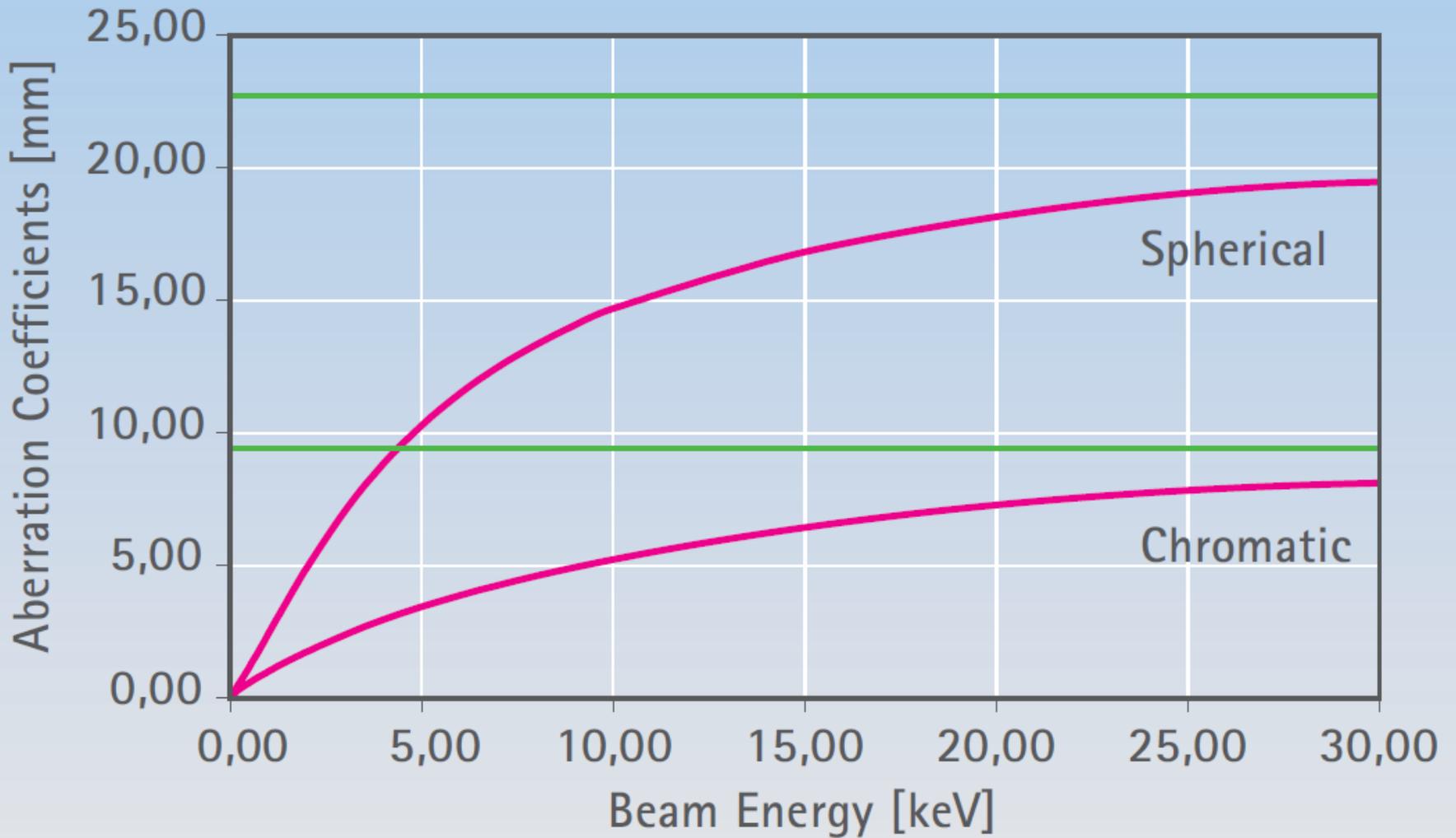
- Illuminating light
- Background light
- Specimen scattered light
- Foreground = background + scattered light



Vector length and direction respectively corresponds to light intensity and phase difference



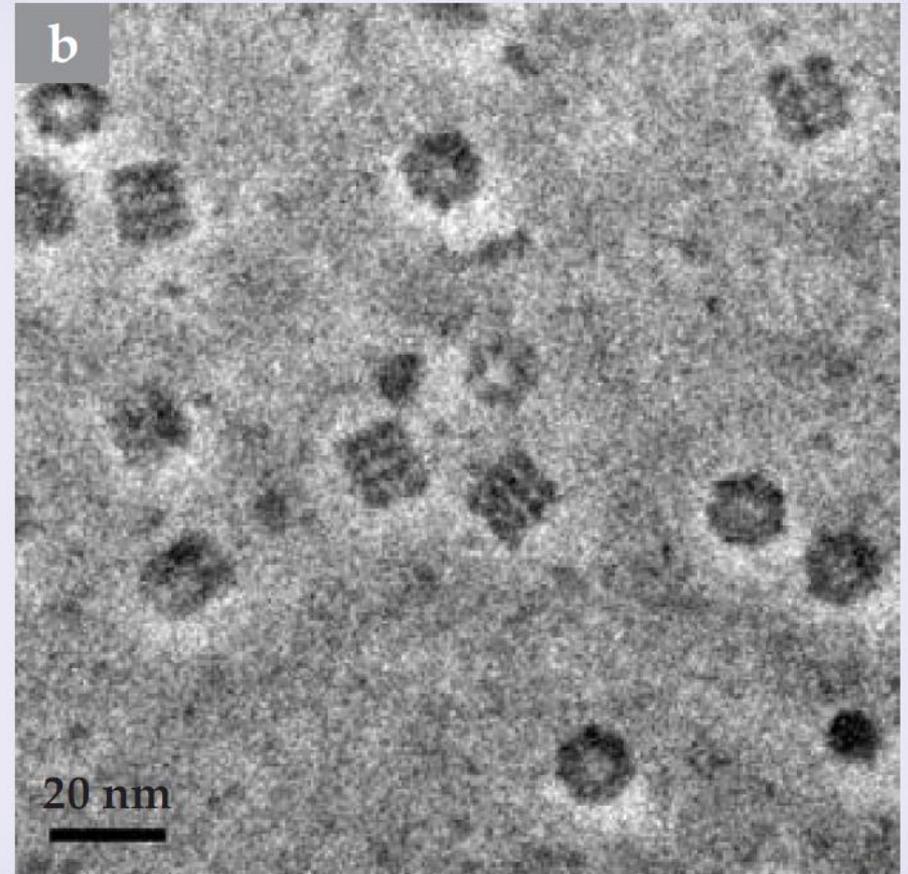
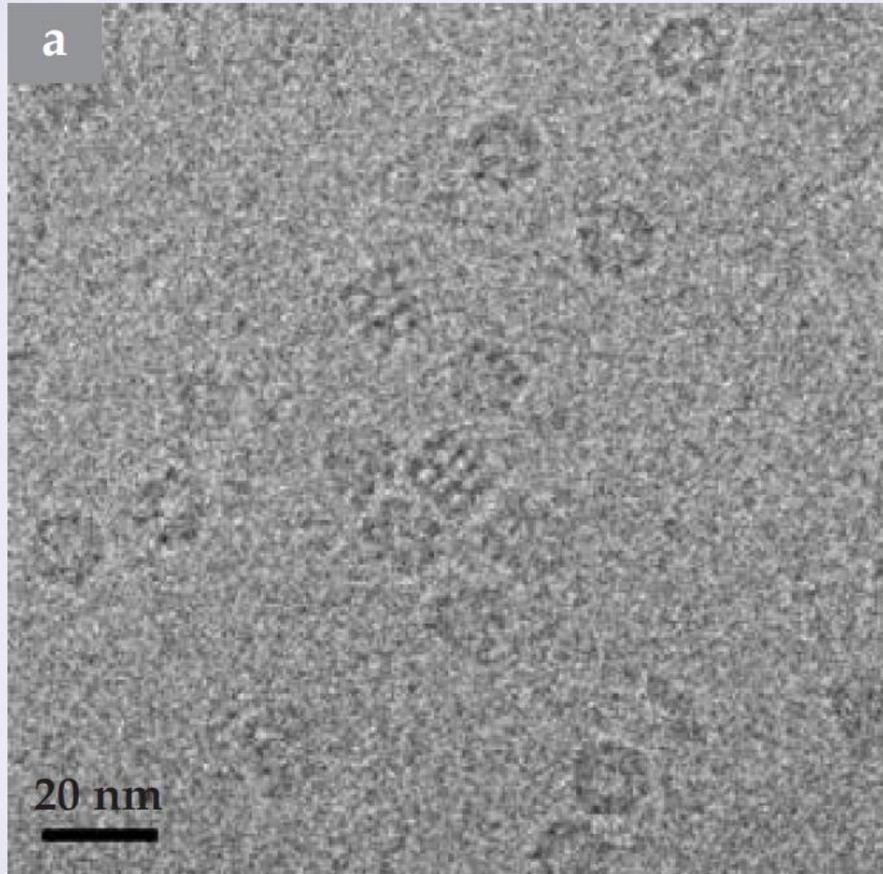




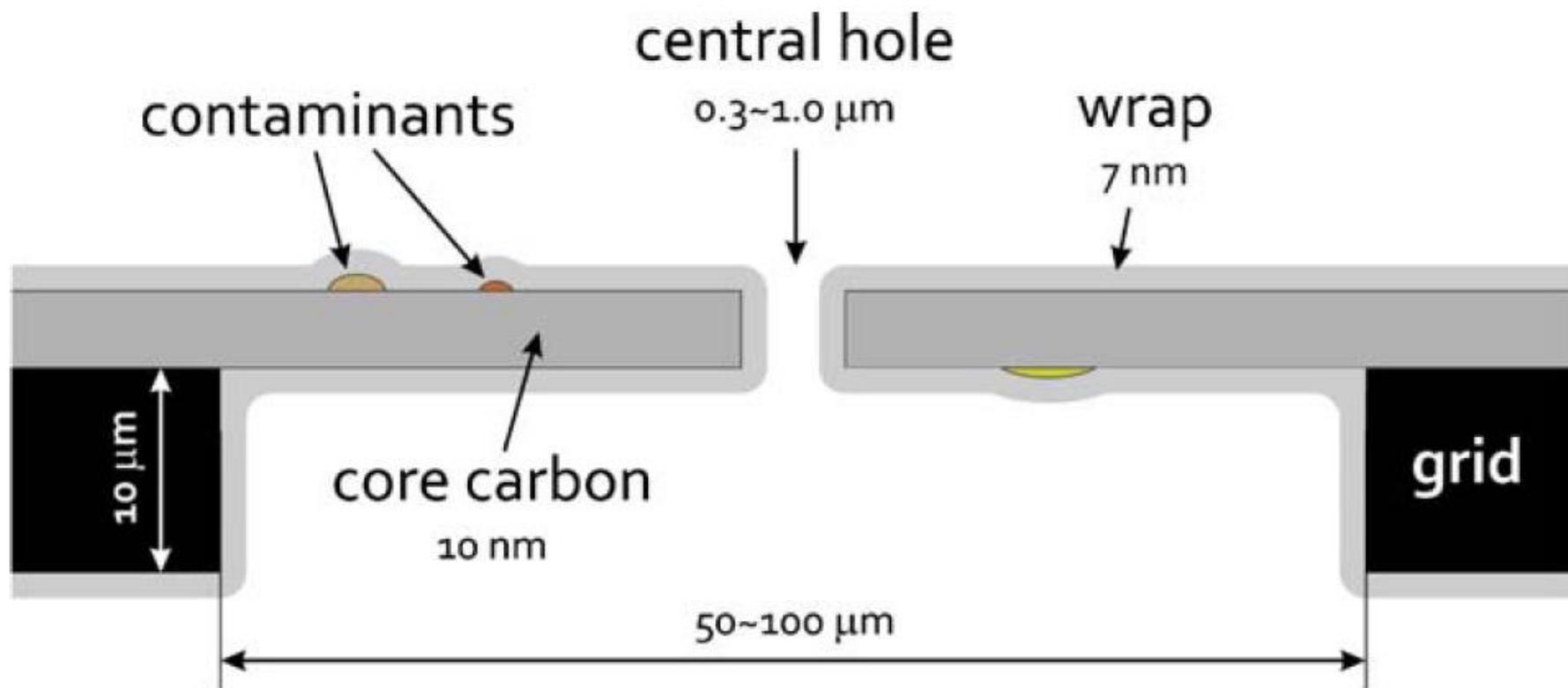
# Фазовое контрастирование в ЭМ:

Дефокусировка (падение разрешения)

углеродная пластинка  $\lambda/4$



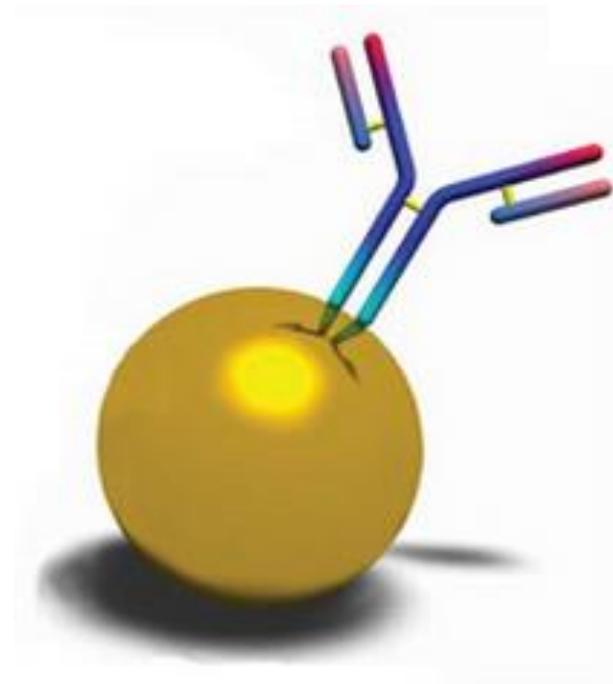
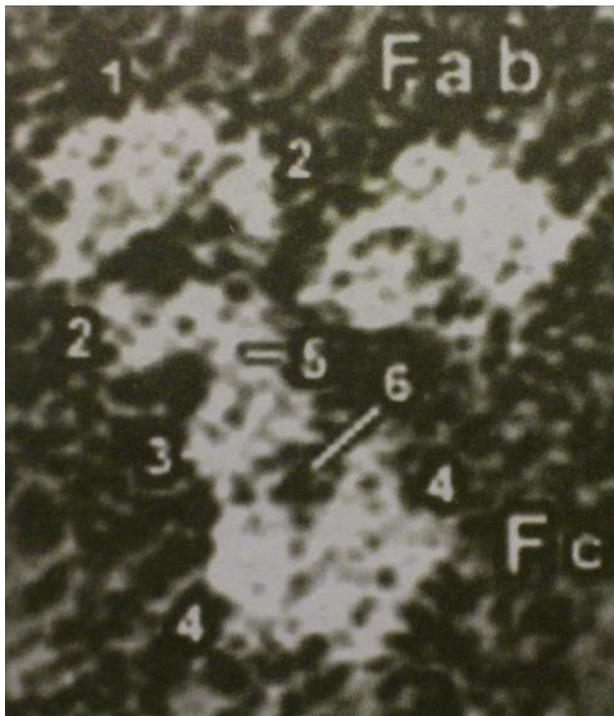
# Фазовая углеродная пластинка $\lambda/4$ – вид сбоку



## Классические методы увеличения контраста

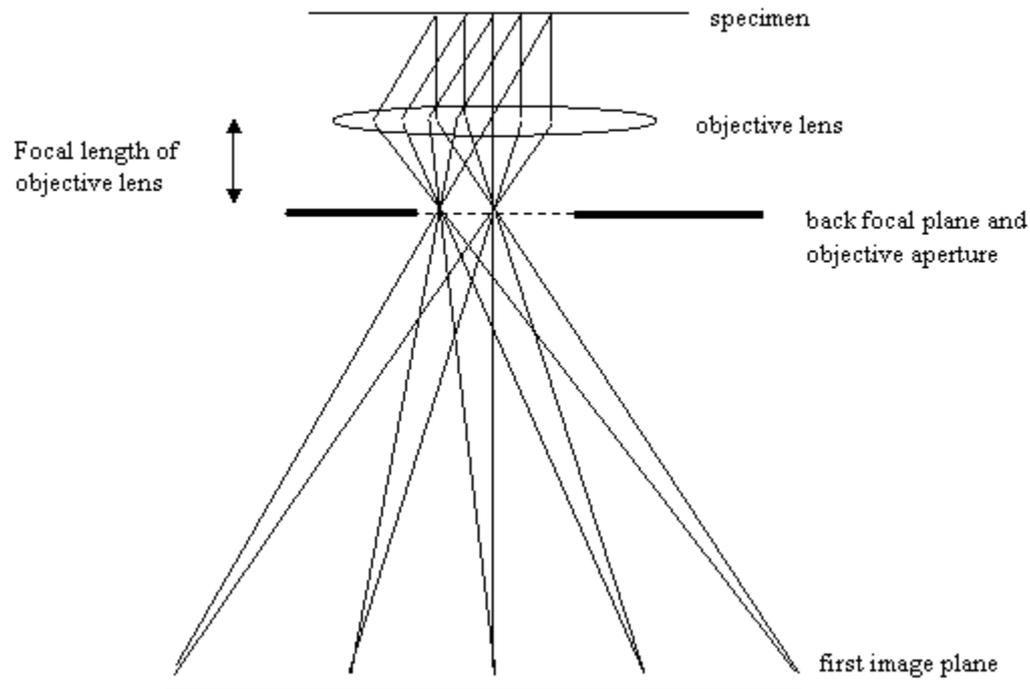
Негативное контрастирование: добавление солей тяжелых металлов (например уранилацетата)

Возможно специфическое контрастирование определенных объектов за счет добавления комплексов антител с наночастицами золота.

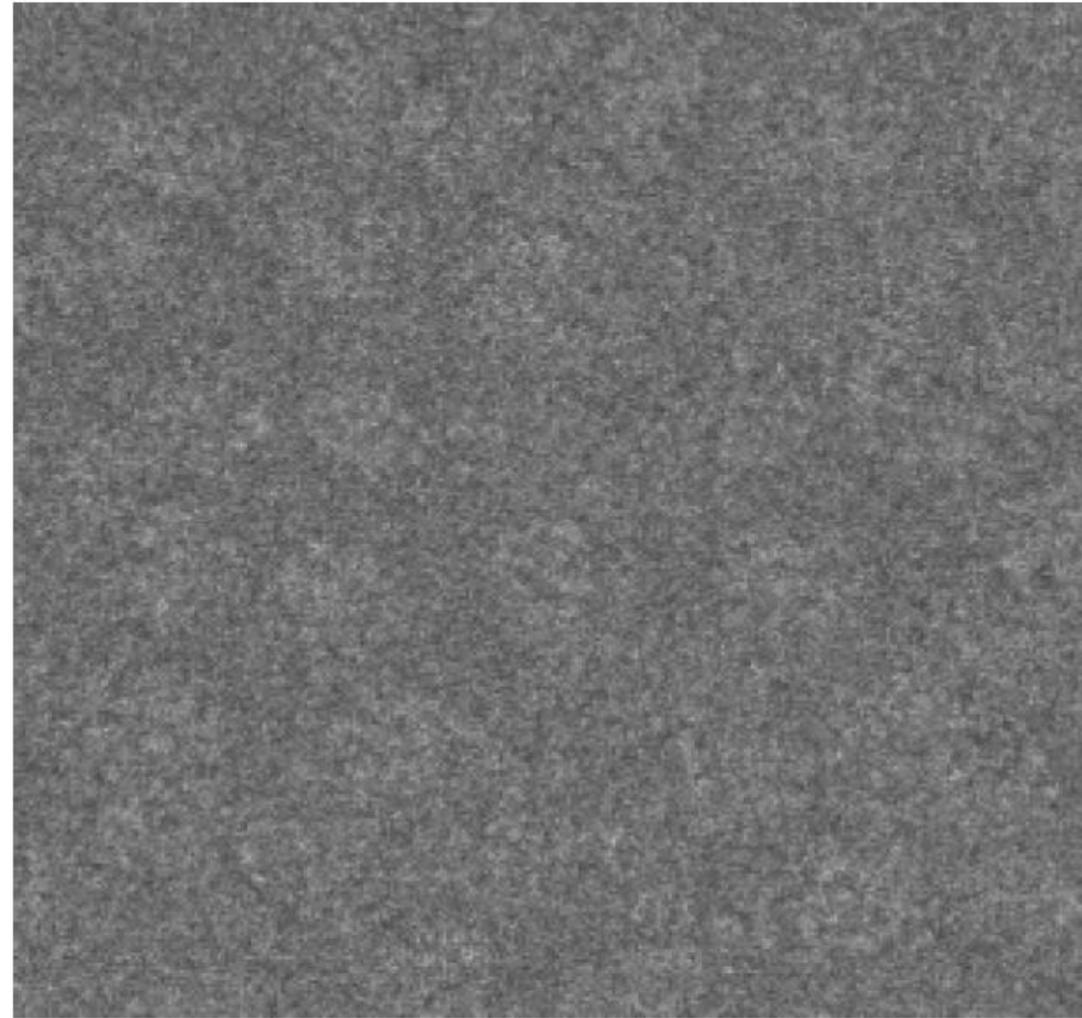
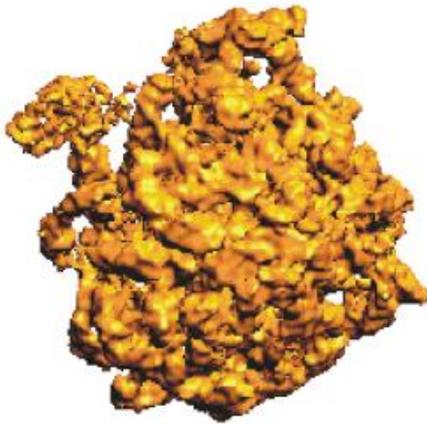


# Основные методы восстановления трехмерной структуры:

- 1) Анализ дифракции на двумерном кристалле
- 2) Анализ проекций одиночных макромолекул
- 3) Анализ дифракции на трехмерных микрокристаллах
- 4) (Крио)электронная томография



# Single molecule Electron Microscopy.



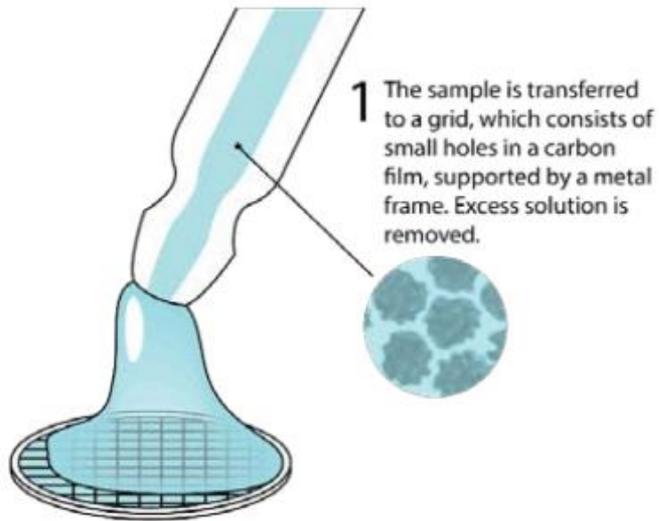
Freeze thousands of copies  
of your sample in vitreous ice.

Randomly oriented.

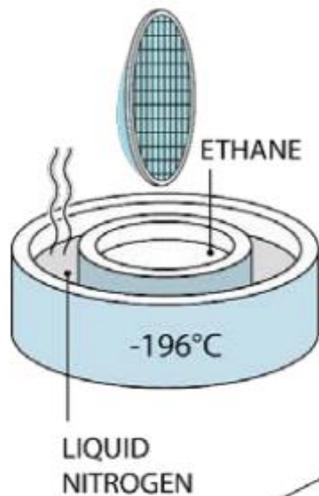
Take EM images.

Must find molecules.

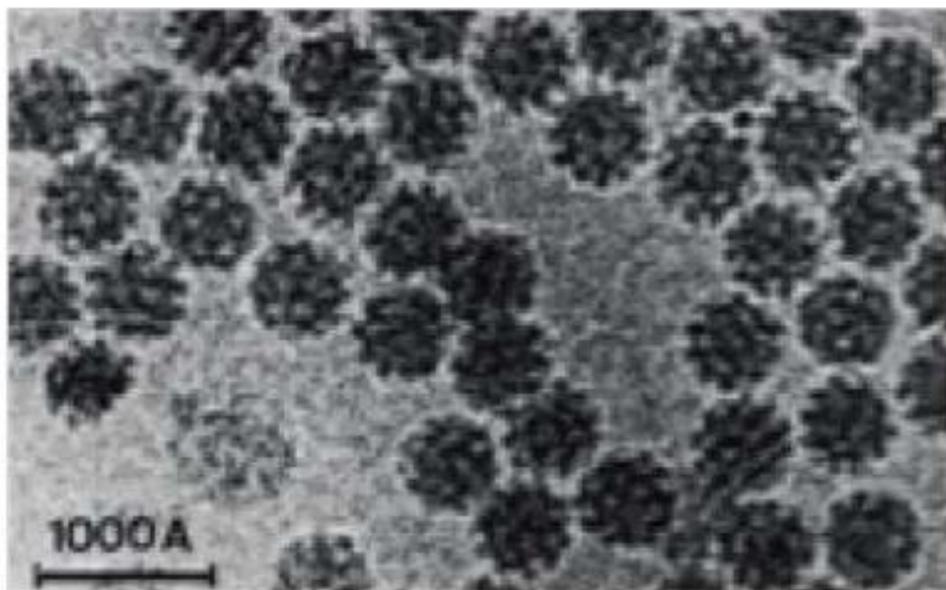
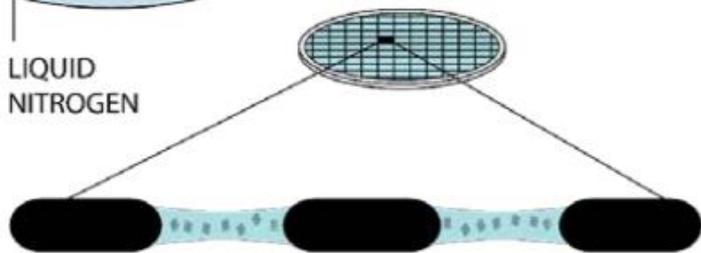
Pick molecules with similar orientations,  
average them to reduce noise.  
Analyze projections to infer 3d structure

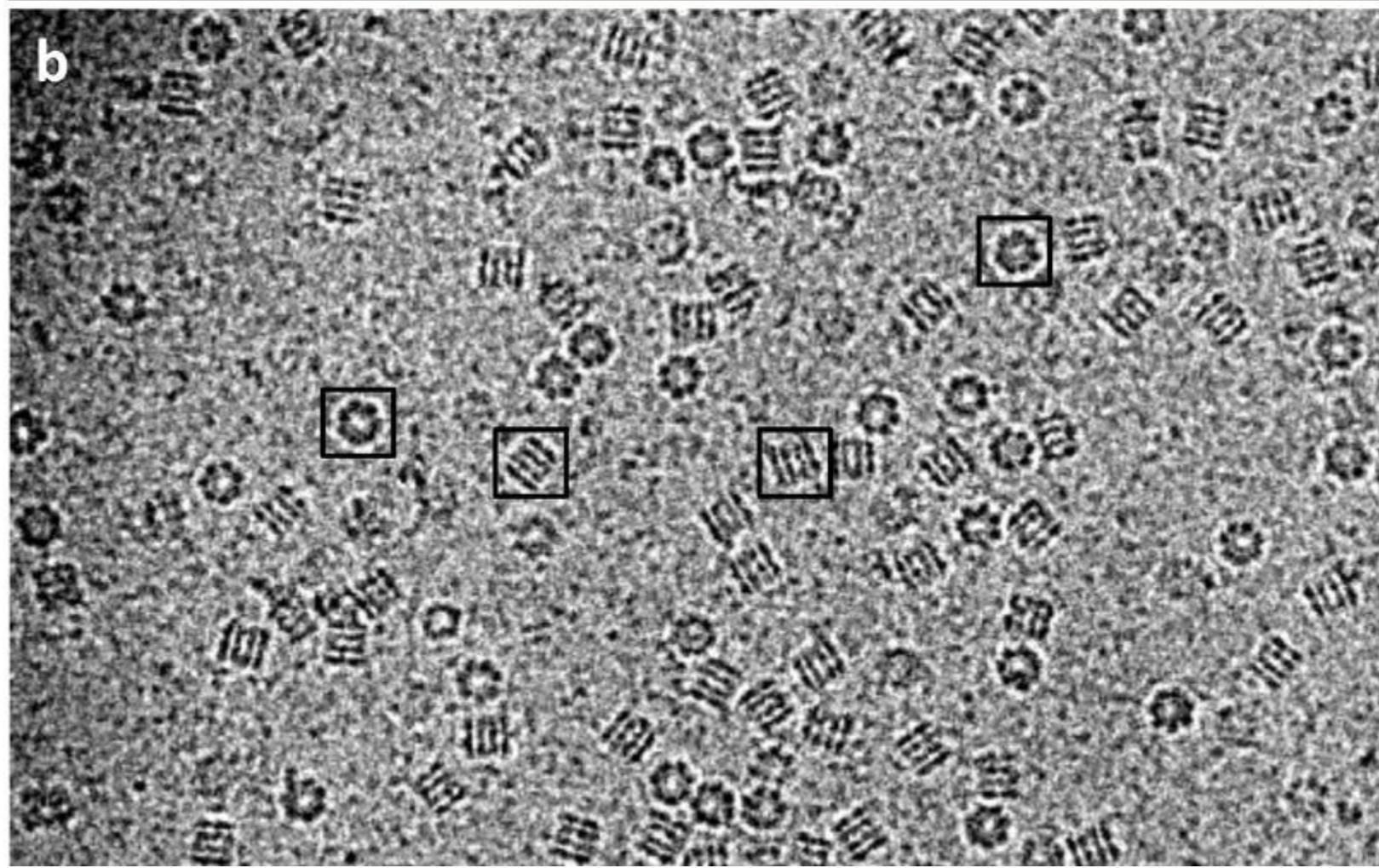
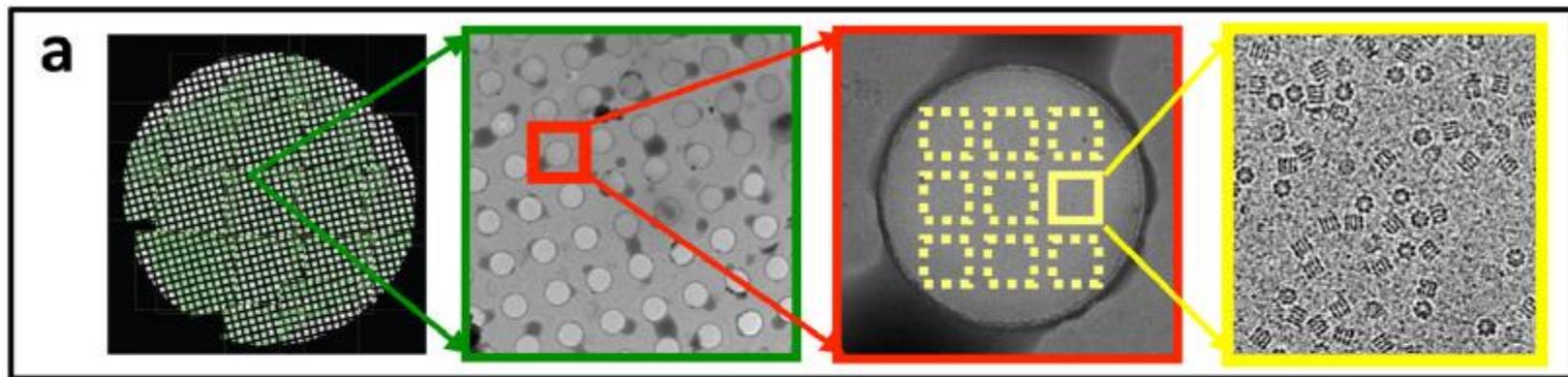


**2** A thin film of randomly oriented particles in water spans the grid holes.

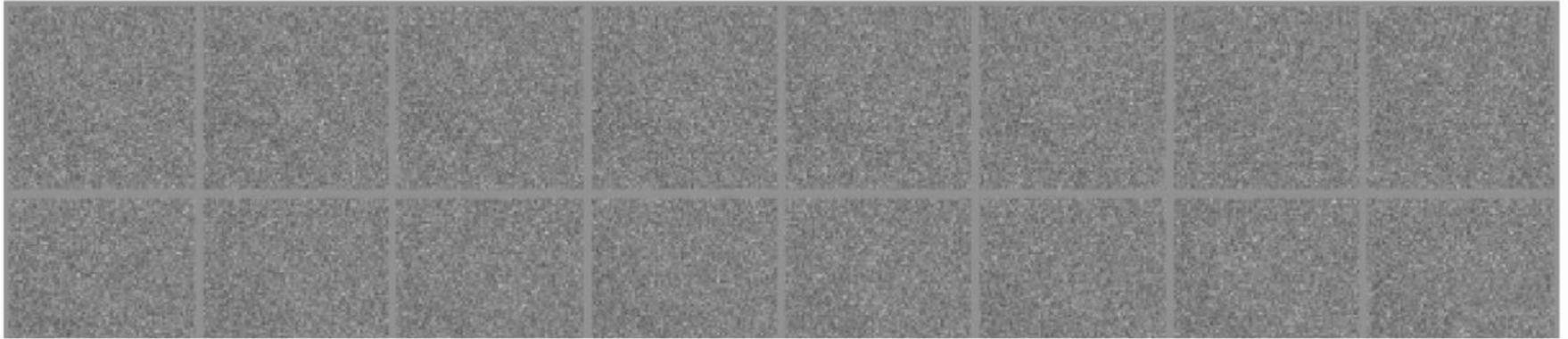


**3** The grid is rapidly plunged into ethane, cooled by liquid nitrogen. A film of particles in vitrified water is formed across the grid holes.





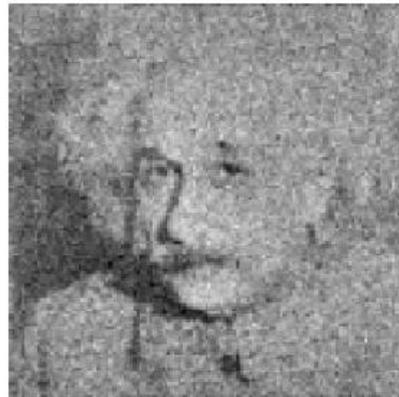
# Анализ отдельных изображений: усреднение по ансамблю



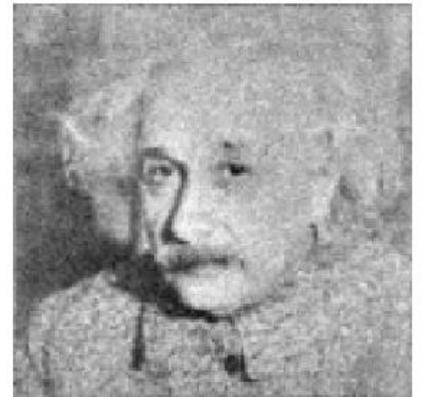
Sum of 16



Sum of 64

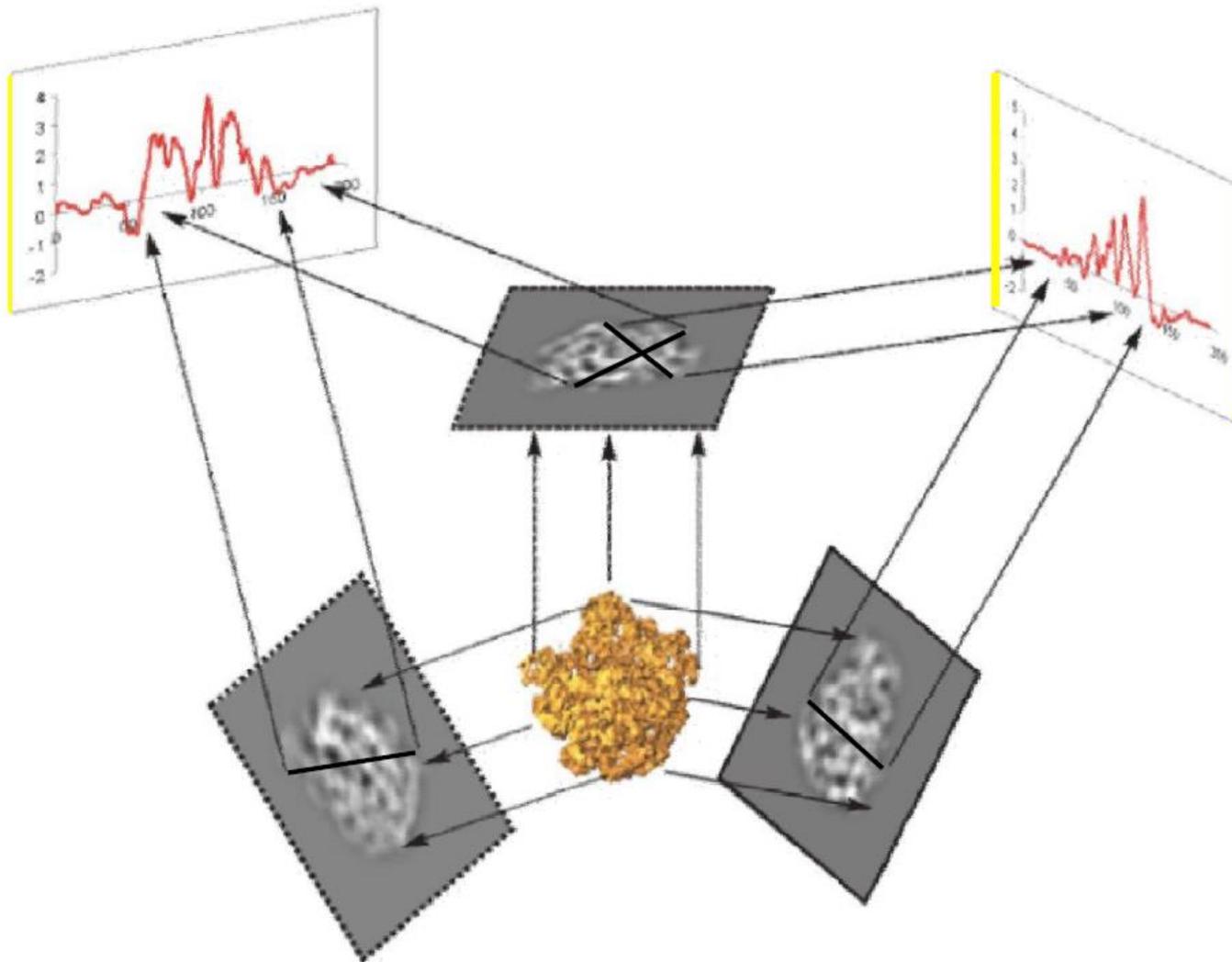


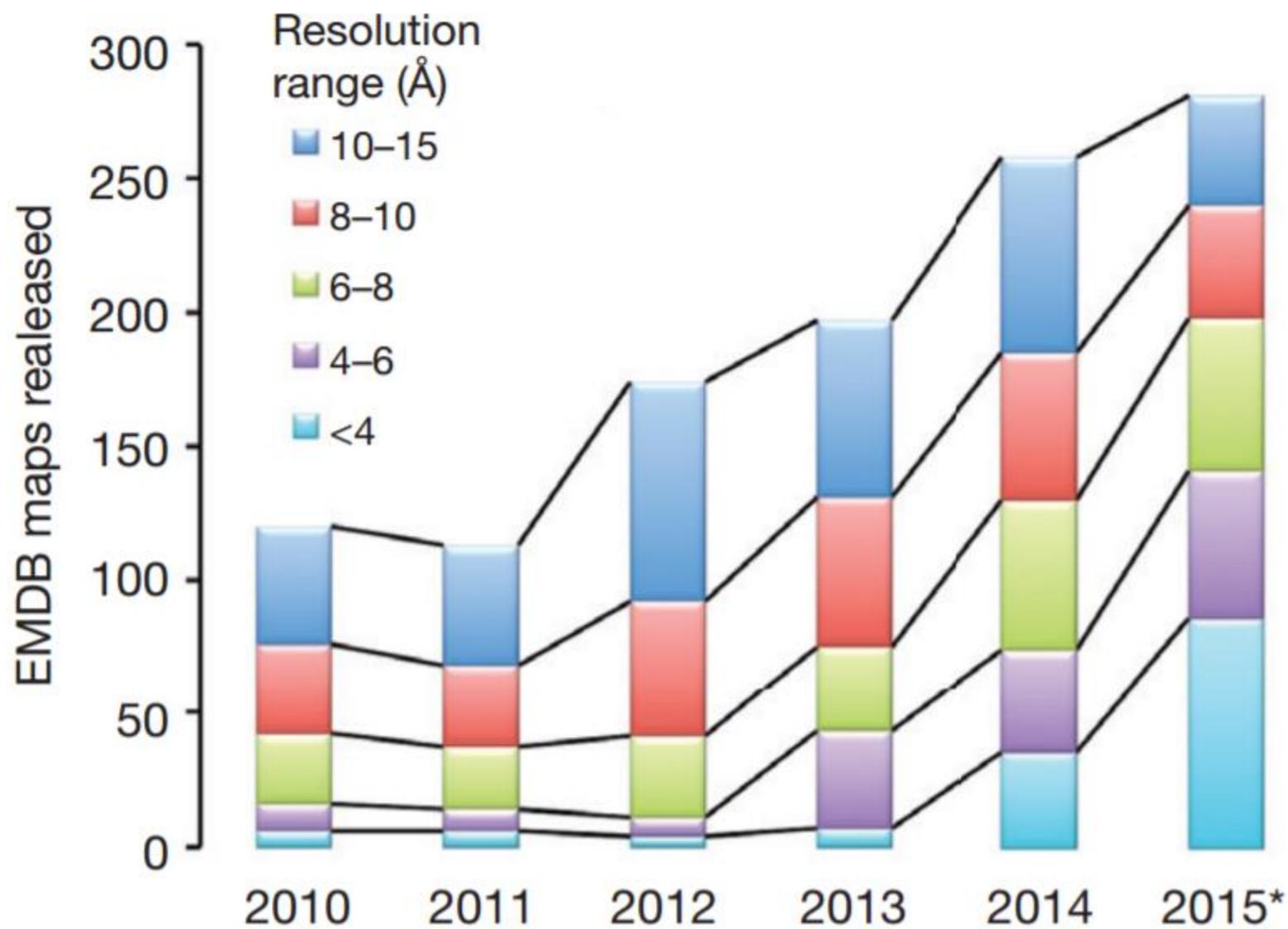
Sum of 256

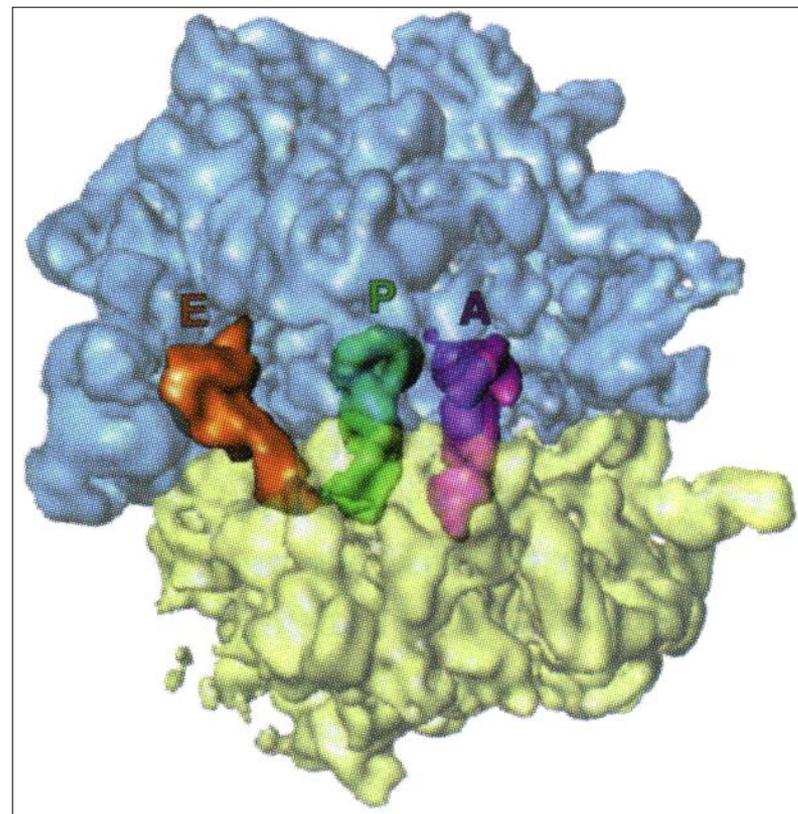
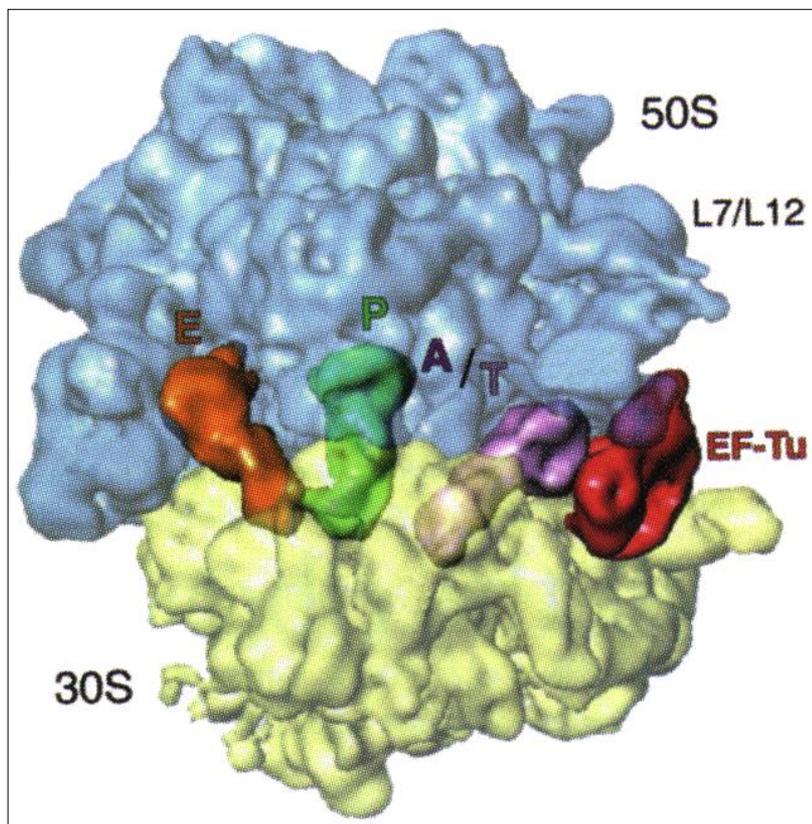


Sum of 1024

# Сортировка по ориентациям и построение 3d модели



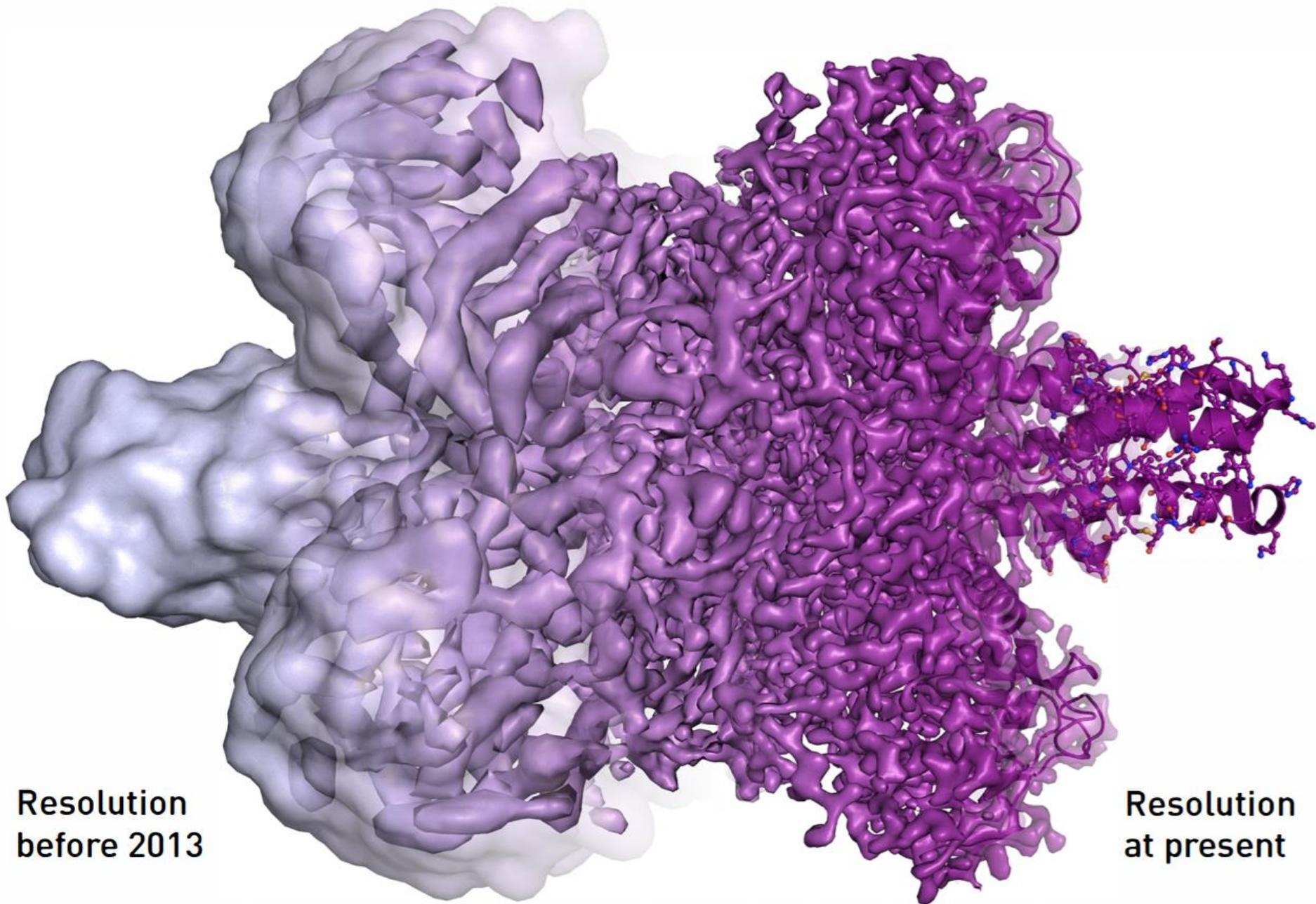




Крио-ЭМ-структуры комплекса 70S рибосомы с аминокил тРНК в рибосомном А участке. Обе субчастицы показаны полупрозрачными (50S светло-голубая и 30S светло-желтая) с тем, чтобы оттенить положение т-РНК на поверхности субъединиц.

а) Комплекс 70S-fMet-tRNA<sup>fMet</sup>-Phe-tRNA<sup>Phe</sup>- EF-Tu – GDP – kir с разрешением в 9Å.

Элонгационный фактор EF-Tu показан красным, т-РНК в А/Т участке – бледно-розовым, в Р-сайте – зеленым, в Е-сайте – оранжевым. kir – антибиотик киромицин (Valle *et al.*, 2003a)

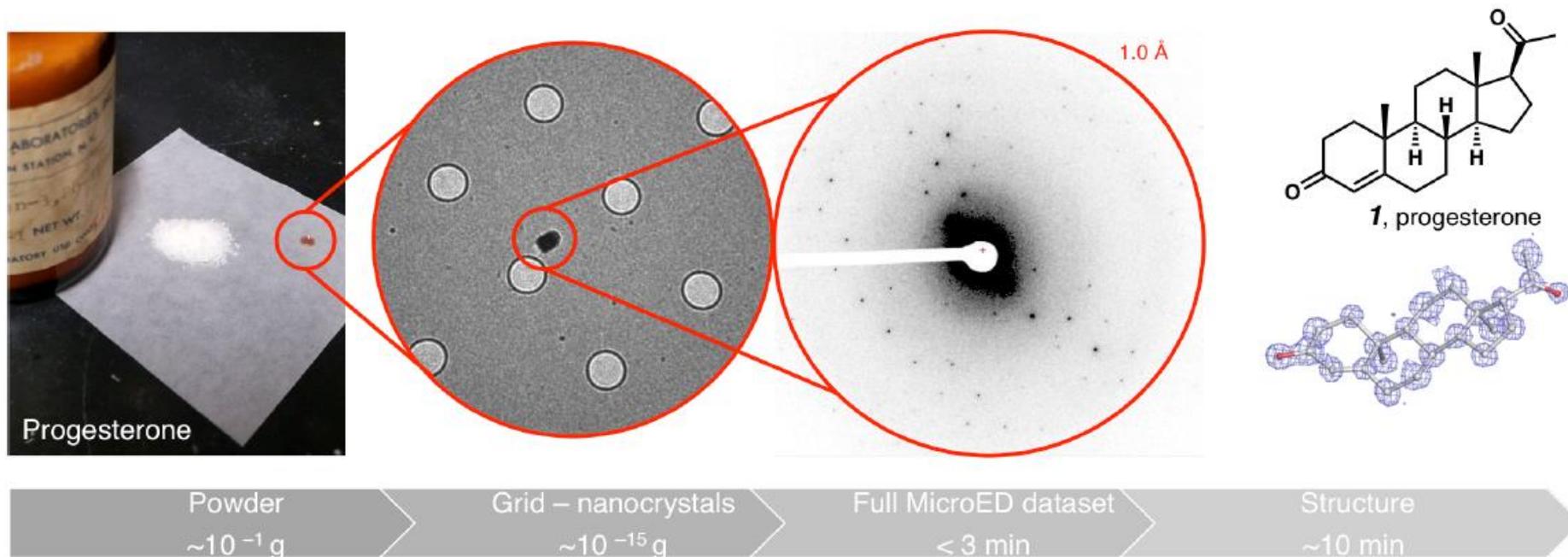


Resolution  
before 2013

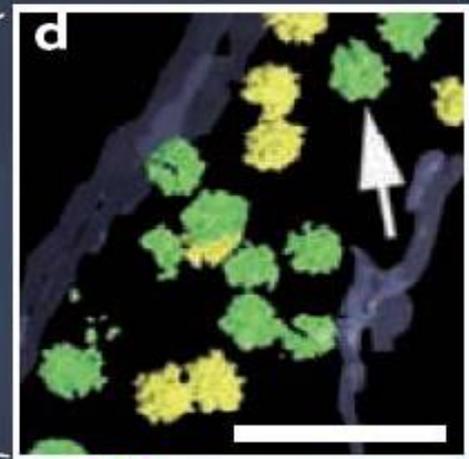
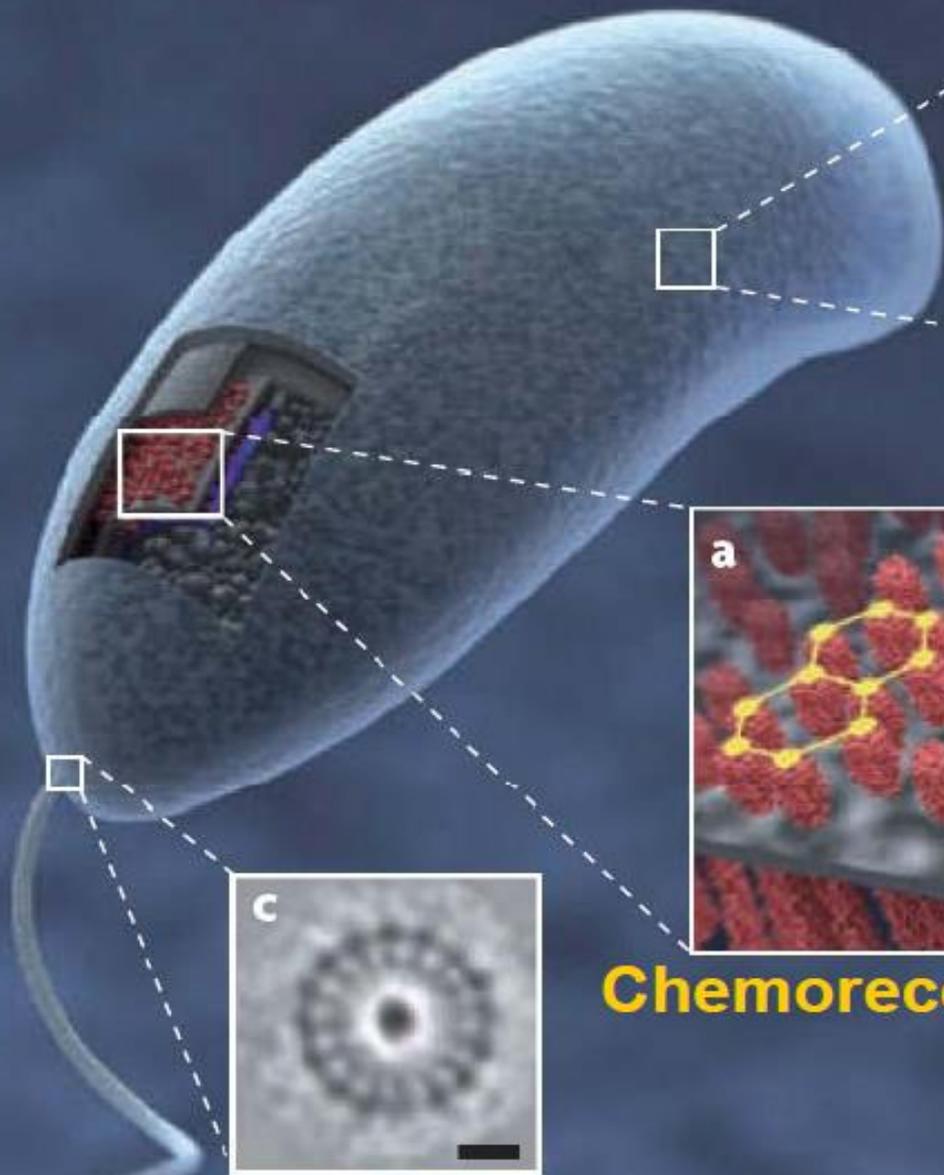
Resolution  
at present

# Microcrystal electron diffraction: MicroED

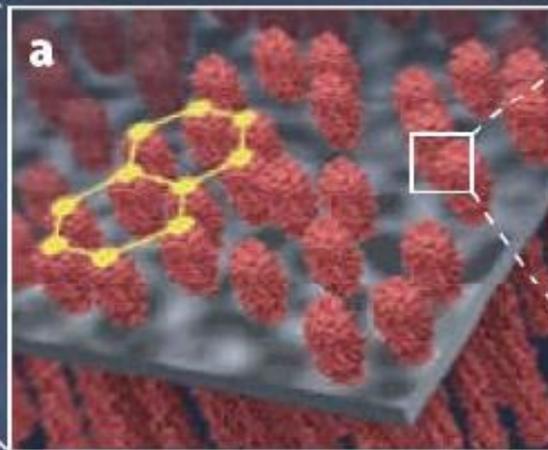
We initially tested the applicability of MicroED to a model system, progesterone (**1**) (Fig. 1). The sample was obtained as a powder from chemical supplier Preparations Laboratories Inc. Small quantities of this amorphous solid were placed in between two glass cover slides and crushed. The fine powder was deposited on a holey carbon copper grid, cooled to liquid nitrogen temperatures, and transferred to a cryo electron microscope operating at an acceleration voltage of 200kV (Thermo Fisher Talos Arctica). An overview of the preparation is shown in Figure 1. Thousands of nano crystals were easily discernable and were investigated for diffraction. Typically, for samples such as these, the vast majority of nano crystals diffracted to  $\sim 1\text{\AA}$



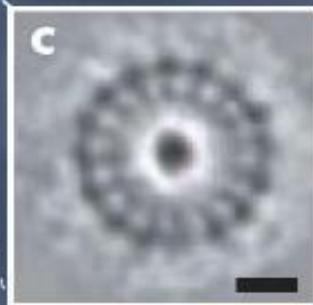
# Electron Tomography:



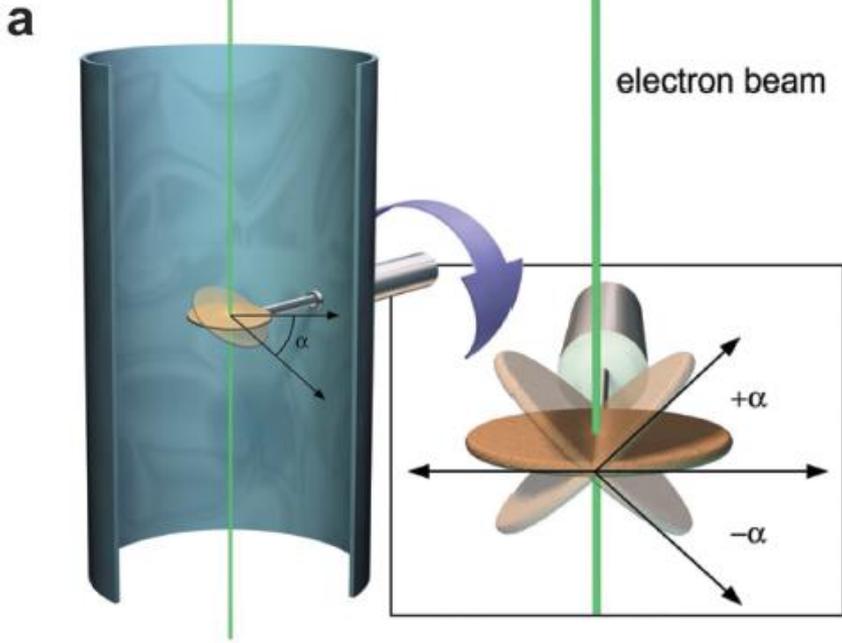
**Ribosomes**



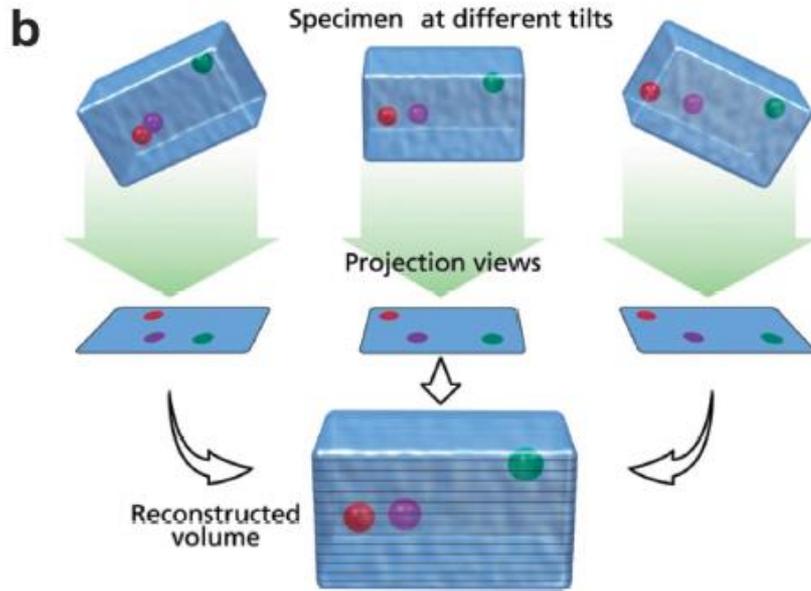
**Chemoreceptor arrays**

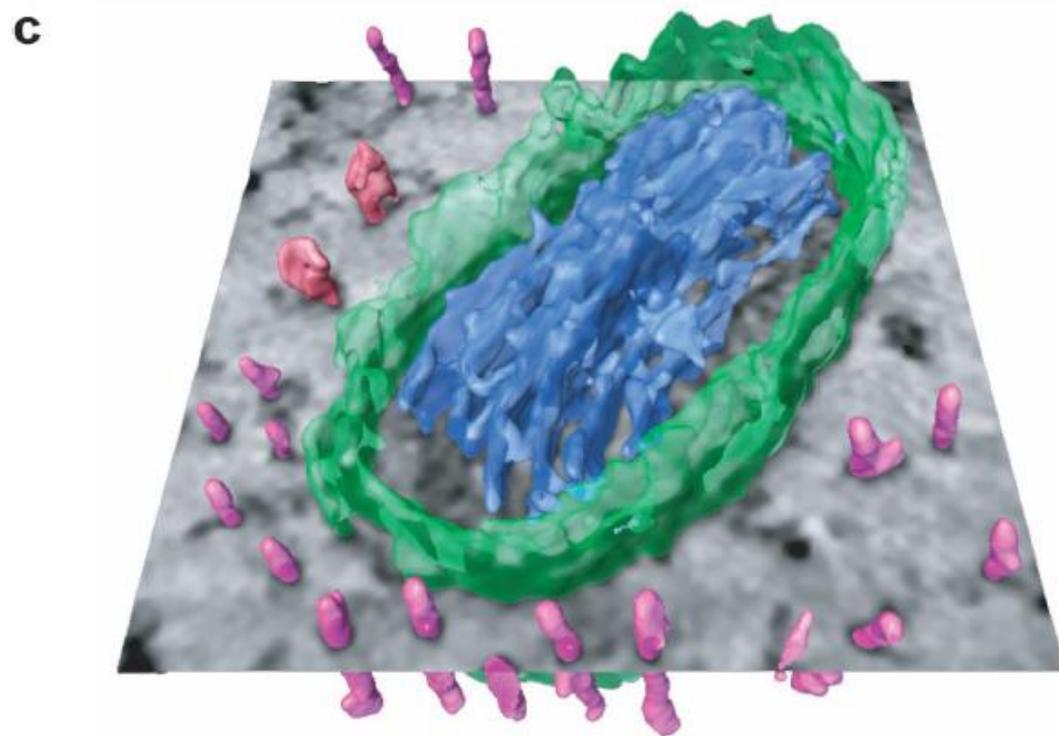
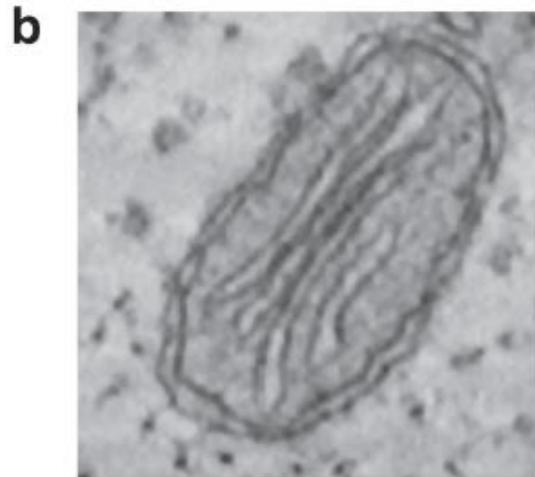
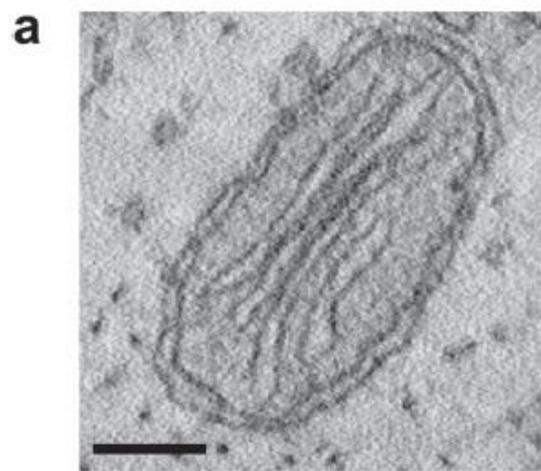


**Flagellar motor**

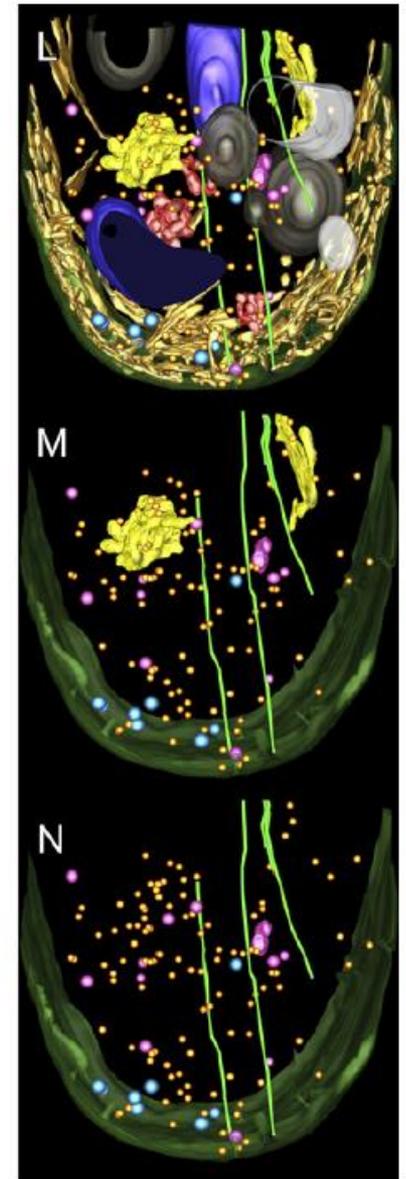
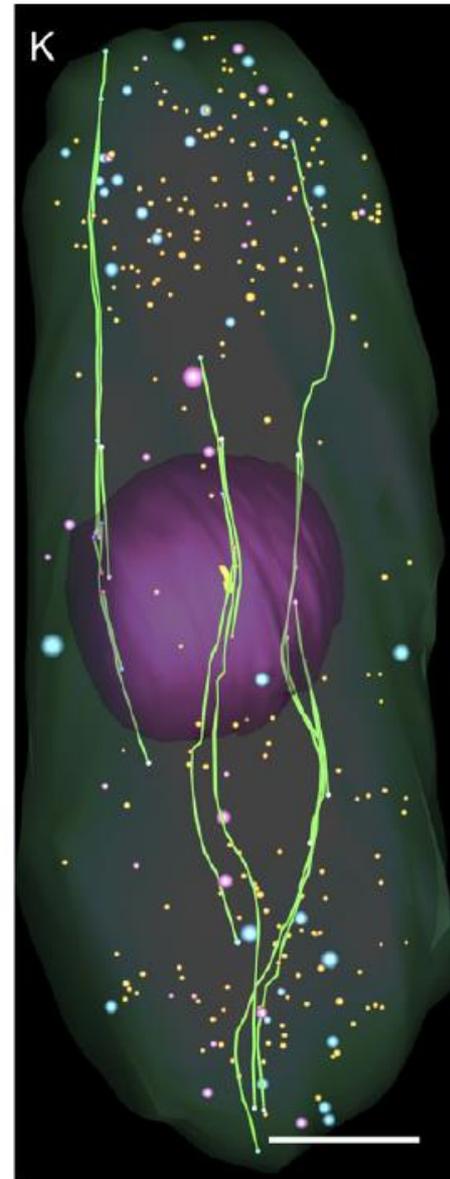
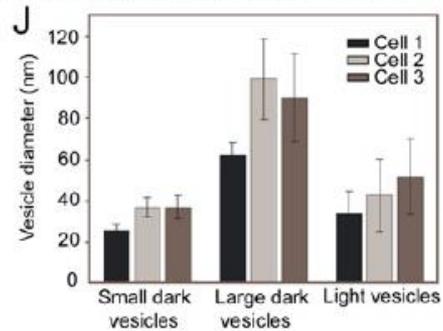
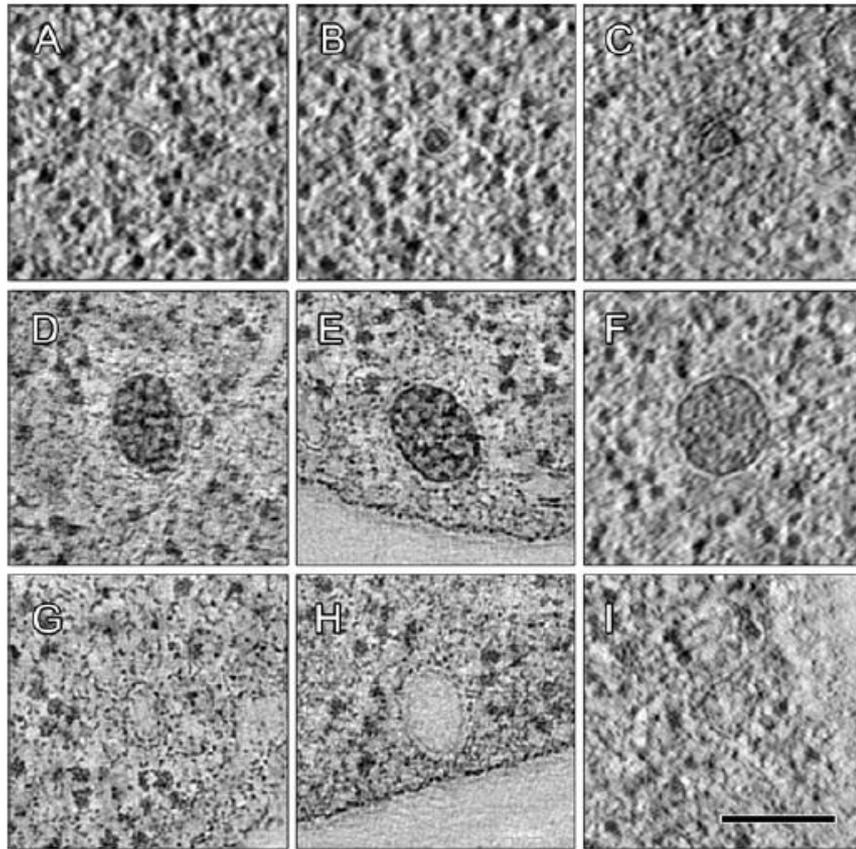


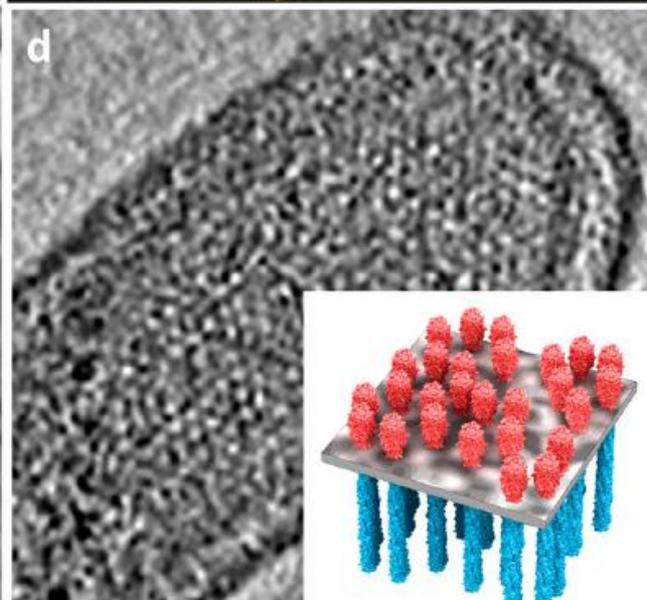
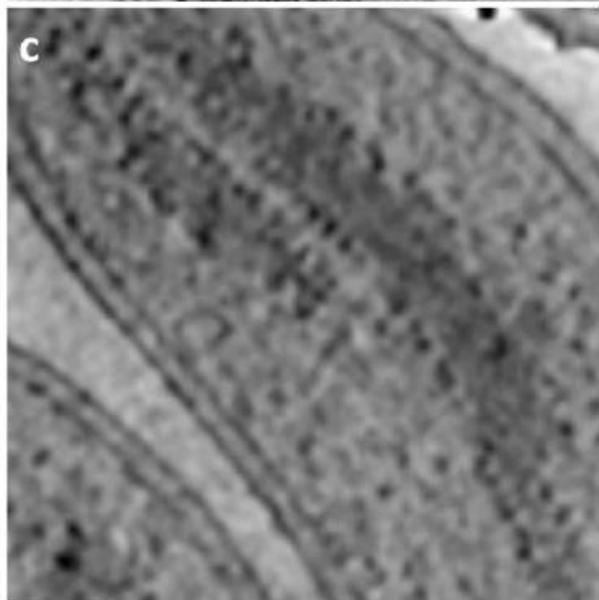
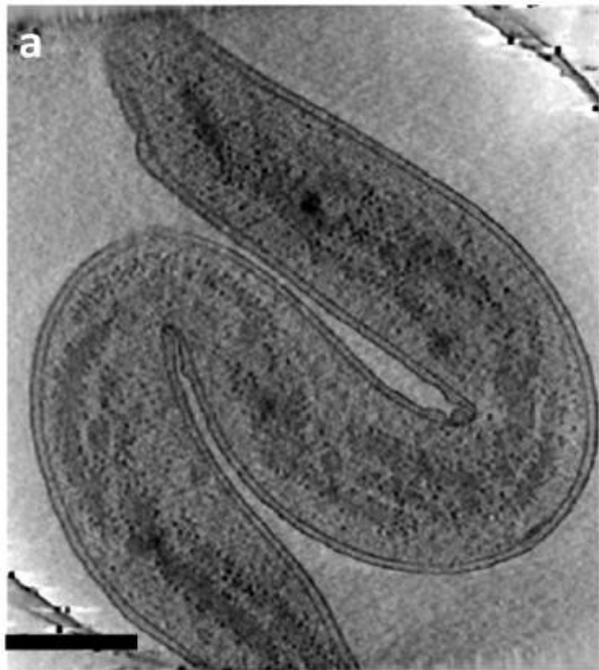
Вращение образца с шагом в  $1-2^\circ$  на углы до  $70^\circ$  позволяет получать массив проекций, необходимый для восстановления трехмерной структуры: в настоящее время разрешение томографии составляет около 5 нм



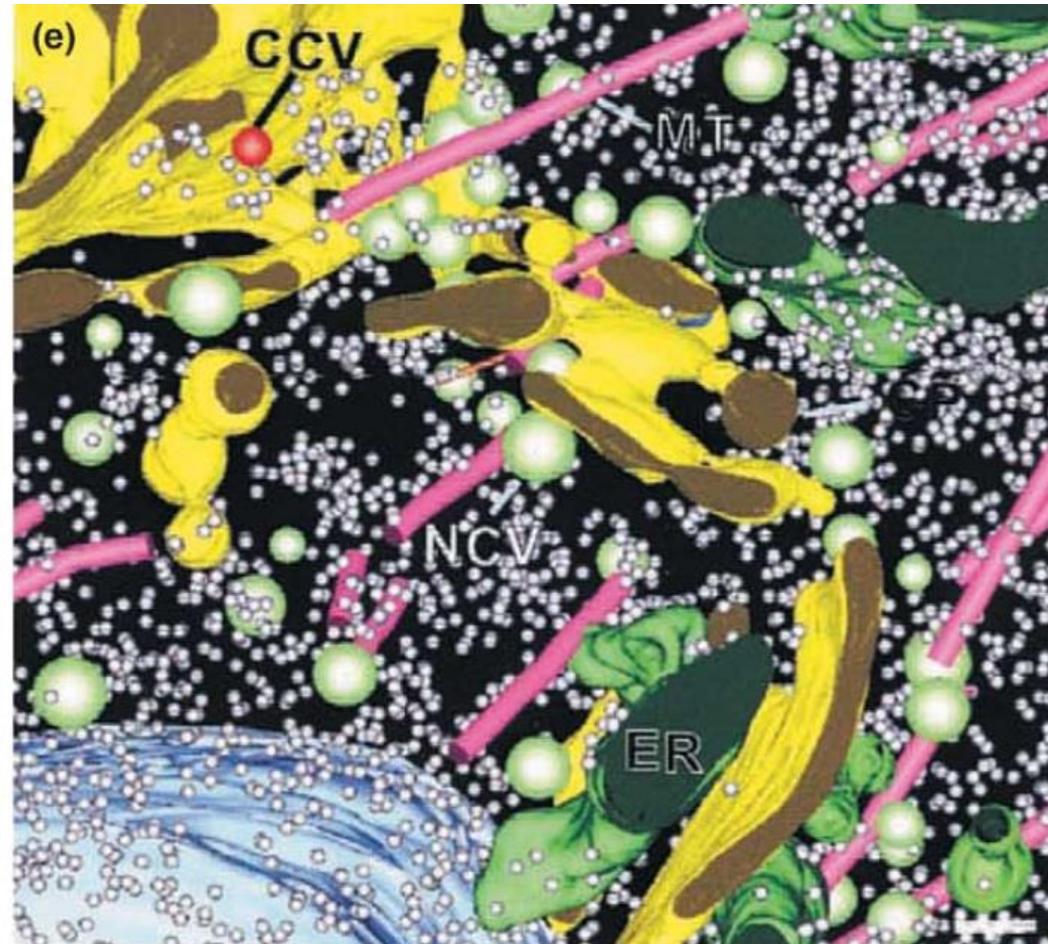
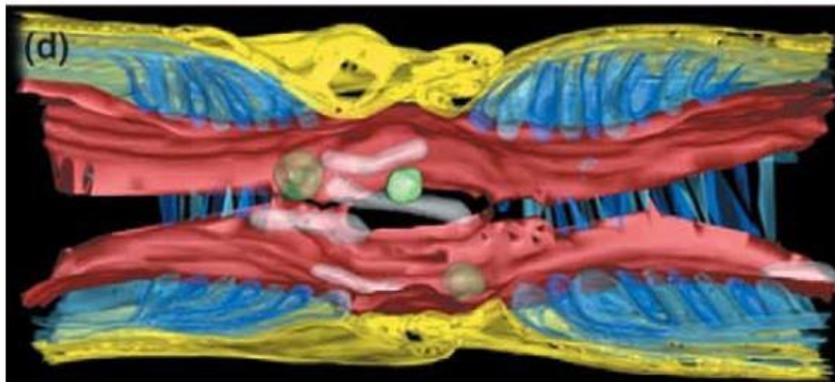
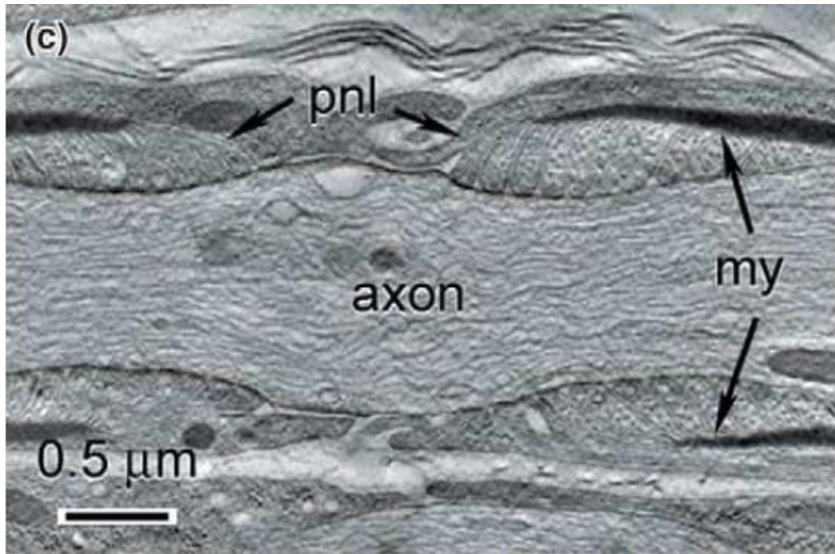


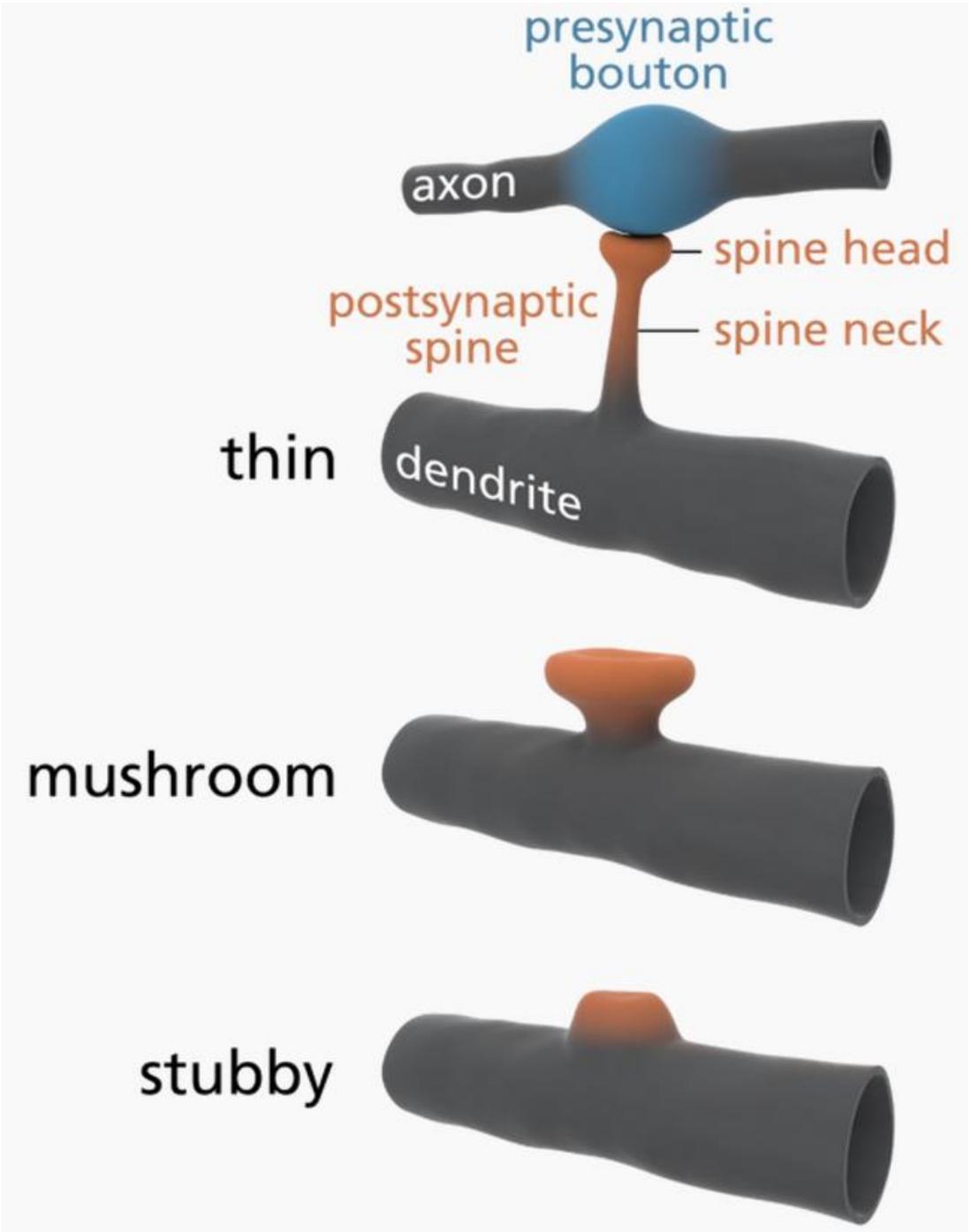
# Структура дрожжей: Science, 2007



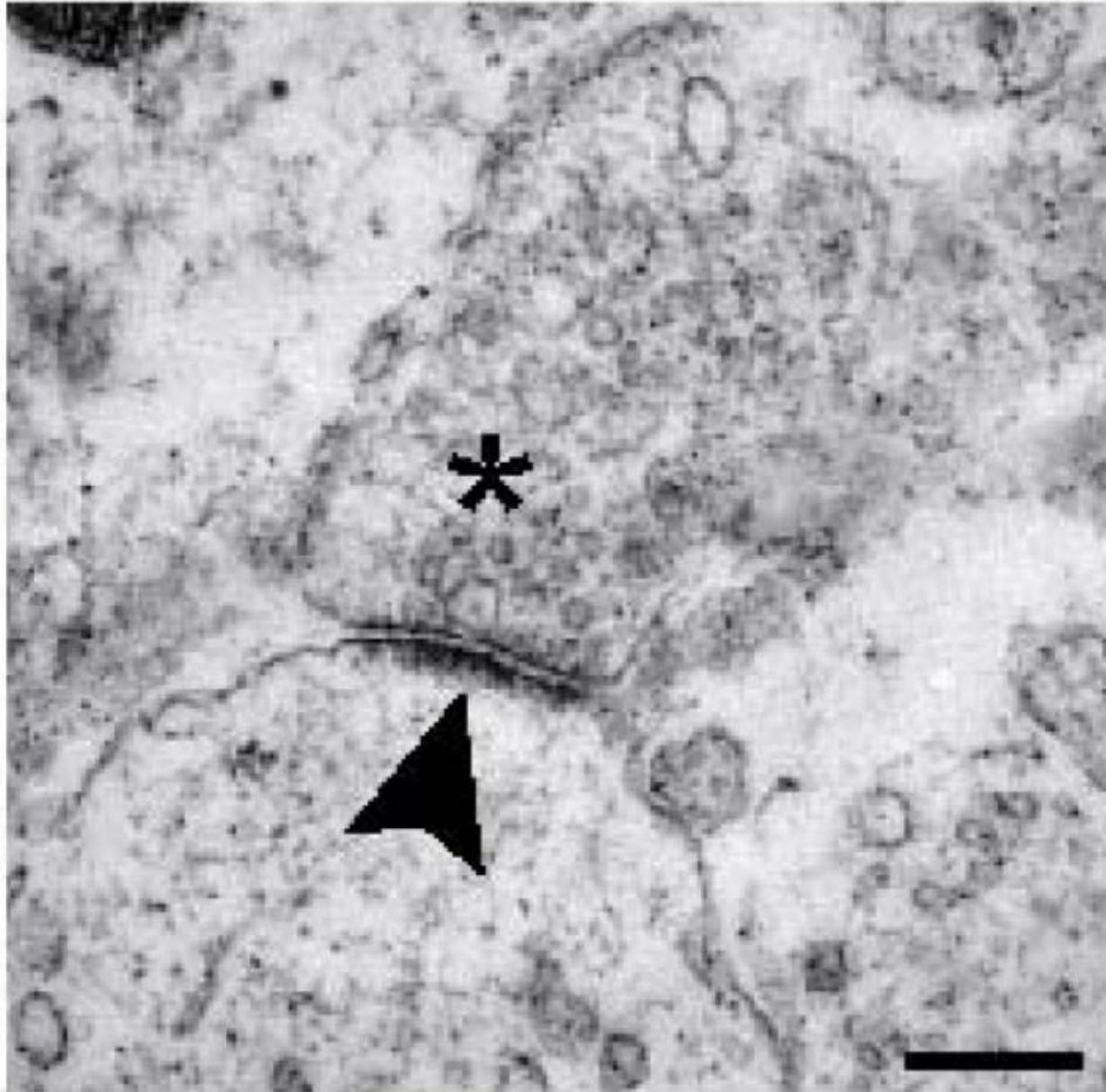


# Перехват Ранвье и внутренние органеллы клетки

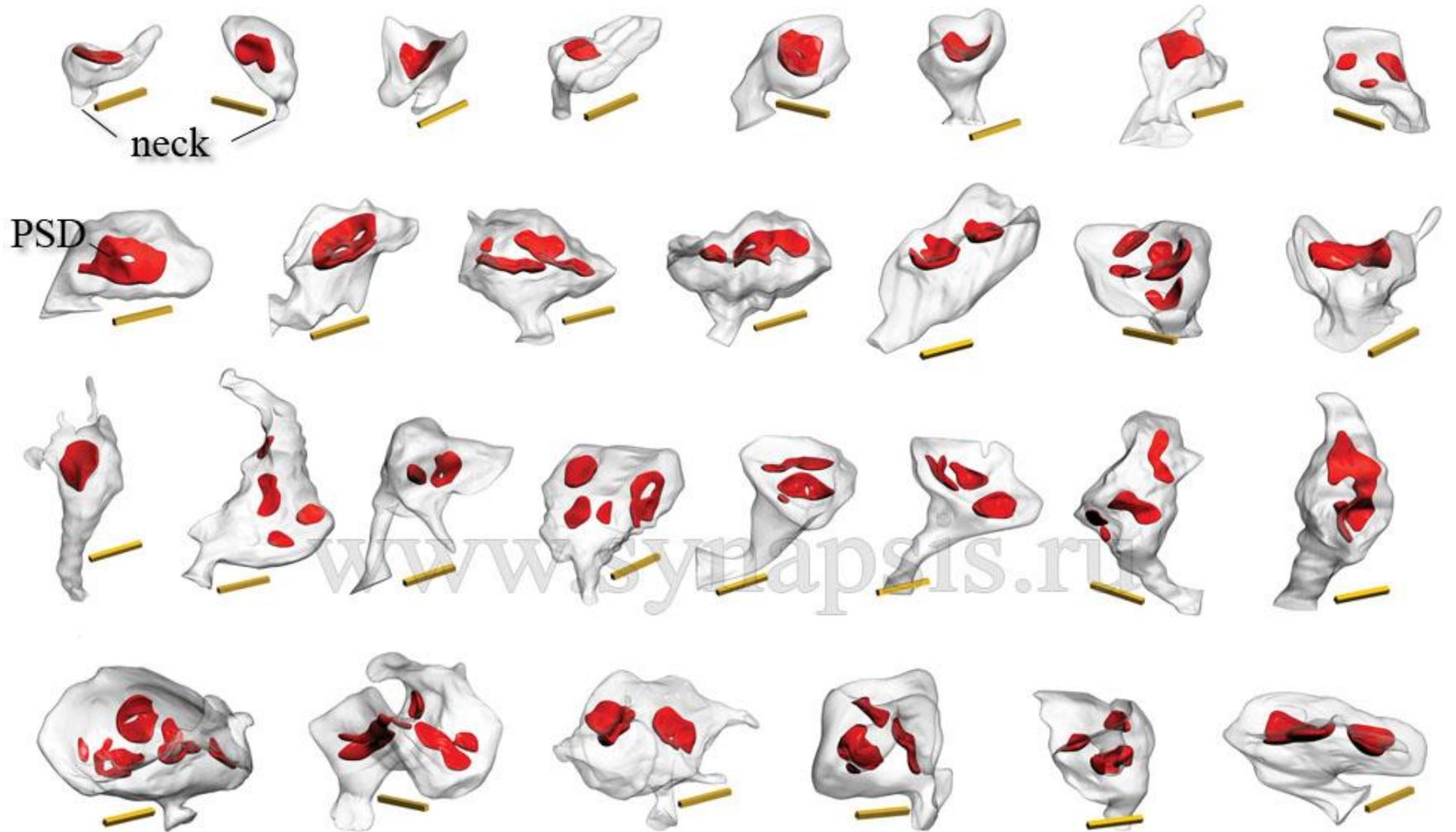




# Postsynaptic density - PSD



# 3D reconstructed mushroom dendritic spines from middle molecular layer of rat hippocampal dentate gyrus



Scale bar (yellow) = 500 nm

Сравнение  
кристаллографии и  
крио-электронной  
микроскопии

Рентгеновская  
кристаллография на  
одиночных кристаллах

Крио-электронная  
микроскопия на  
молекулах

• Число молекул в образце

$\sim 10^{15}$

$\sim 10^4$

• Эффективность рассеяния

очень низкая

очень высокая

• Падающий поток

очень высокий

очень высокий

• Реальное изображение

отсутствует

двумерное

• Радиационная опасность

присутствует

ярко выражена

• Контраст

средний - высокий

очень низкий