Новый инструмент для структурной биологии – просвечивающий полевой электронный микроскоп высокого разрешения CRYO ARM 300*

С. Мотоки,
EM Business Unit, JEOL, Япония
vladimir@jeolrus.com

УДК 53.085

Представлен недавно разработанный криоэлектронный микроскоп CRYO ARM 300 (JEM-Z300FSC). Его отличают технологические решения, которые позволяют эффективно проводить анализ отдельных частиц (single particle analysis, SPA) с высоким разрешением и большой пропускной способностью. Подробно описаны особенности и преимущества конструкции электронной пушки с холодной полевой эмиссией, предметного криостолика, автоматического загрузчика криообразцов CRYO SPECPORTER (SPA), безапертурной фазовой пластины (HFPP). Отмечена важная роль в интерпретации полученных результатов системы автоматического сбора данных JADAS (JEOL Automated Data Acquisition System). Приведен пример – реконструкция 3D-структуры апоферритина.

ВВЕДЕНИЕ

Свойства биологических макромолекул (белки, ДНК, РНК и т. д.) определяются их структурой, знание и понимание которой помогает, например, при разработке новых лекарственных препаратов. Ранее для структурного анализа белков с высоким разрешением в основном использовалась рентгеновская кристаллография. Совсем недавно привлекла к себе внимание криоэлектронная микроскопия (CRYO EM, крио-ЭМ) как инструмент для структурного анализа благодаря быстрому техническому прогрессу программного обеспечения и камер для получения изображений [1].

В 1983 году в сотрудничестве с профессором Йошинори Фудзидзи (Y. Fujiyoshi, Токийский медицинский и стоматологический университет) мы начали разработку микроскопа Крио-ЭМ, оснащенного предметным столиком с верхней загрузкой и охлаждением жидким гелием. Крио-ЭМ первого поколения увидел свет в 1986 году [2]. Микроскоп позволил получать изображения с высоким

разрешением при температуре образца 4,2 К. С тех пор технология крио-ЭМ постоянно совершенствуется: машины седьмого поколения оснащены автоматическим загрузчиком образцов и встроенным в электронную колонну энергетическим омега-фильтром. Такие микроскопы внесли большой вклад в развитие структурной биологии. Это, например, выяснение структуры и функции аквапорина-1 [3], ацетилхолинового рецептора [4] и других мембранных белков [5–7]. В последние годы широко применяется метод анализа отдельных частиц (SPA) для реконструкции структуры белка без формирования кристаллического образца.

С появлением камер прямого детектирования электронов, которые обеспечивают формирование изображения при низкой дозе облучения и позволяют компенсировать дрейф образца, SPA теперь обладает способностью строить трехмерные карты электронной плотности белков с разрешением, близким к атомному [8, 9].

Однако для качественной реконструкции 3D-структуры с помощью SPA требуется большой объем данных, поскольку статистическая обработка множества изображений необходима, кроме прочего, для увеличения

* Перевод статьи, опубликованной в JEOL NEWS2019. V. 54. № 1. Р. 68–71.

Рис. 1. CRYO ARM 300

отношения сигнал / шум (S / N). Сбор большого количества данных – процесс очень трудоемкий, поэтому мы сконцентрировались на его автоматизации, когда в 2011 году совместно с профессором К. Намба из Университета Осаки начали разработку нового 200 кВ крио-ЭМ (JEM-Z200FSC), оснащенного термополевым пушкой Шоттки (TFEG). Прототип был завершен в 2016 году.

В 2017 году мы начали разработку крио-ЭМ 300 кВ CRYO ARM 300 (JEM-Z300FSC) (рис. 1). Ранее разработанный микроскоп с коррекцией аберраций JEM-ARM300F оснастили высокостабильной электронной колонной и высококогерентной и стабильной электронной пушкой с холодной полевой эмиссией (CFEG), что значительно улучшило разрешение прибора. Для удобства работы на микроскопе добавили автоматический загрузчик криообразцов (CRYO SPECPORTER: CSP), который был ранее разработан в качестве прототипа для JEM-Z200FSC. Через дверцу в центральной части кожуха микроскопа специальный контейнер с образцами устанавливается в позицию загрузки. После нажатия кнопки на сенсорной панели образцы автоматически загружаются в CSP. Внутри звукоизолированного кожуха, кроме колонны микроскопа, находится автоматическая система подачи жидкого азота. В табл. 1 приведены основные характеристики CRYO ARM 300.

ЭЛЕКТРОННАЯ ПУШКА С ХОЛОДНОЙ ПОЛЕВОЙ ЭМИССИЕЙ (CFEG)

Биологические образцы, такие как белки, состоят из легких элементов. Трудно получить достаточный контраст изображения из-за их малой рассеивающей способности. Кроме того, изображения имеют низкое отношение сигнал-шум, так как получены при малой дозе облучения, чтобы предотвратить повреждение образца электронным пучком. Для

Таблица 1. Технические характеристики CRYO ARM 300

Электронная пушка	Электронная пушка с холодной полевой эмиссией (ColdFEG)
Ускоряющее напряжение	300 кВ
Энергетический фильтр	Омега-фильтр
Охлаждающий предметный столик	
Хладагент	Жидкий азот
	Встроенная система автоматической подачи жидкого азота
Рабочая температура образца	100 К и ниже
Контроль температуры	Около образца, криоэкранов, дюзера с азотом
Гониометр	
X, Y	Моторизированное движение ±1мм
	Пьезопривод ±0,5мм
Z	Моторизированное движение ±0,2мм
Наклон по X	Моторизированное движение ±70°
Вращение в плоскости образца	Устанавливается 0° или 90°
CRYO SPECPORTER	
Система загрузки образца	С предварительной откачкой
Система замены образца	Встроенная автоматическая система загрузки криообразцов
Температура охлаждения (камера замены образца)	105 К и ниже
Кассета замены образцов	Четырехместная
Магазин для хранения образцов	Двенадцатиместный

Рис. 2. Расчетная передаточная функция фазового контраста (PCTF) CFEG с ускоряющим напряжением 300 кВ, 200 кВ и Schottky-FEG – 300 кВ

повышения контрастности на низкой пространственной частоте*, как правило, изображения получают с большой расфокусировкой ~1 мкм. Увеличенный контраст на низкой частоте необходим для выбора частиц, без которого мы не можем перейти к следующему этапу SPA. Однако при заданной большой расфокусировке функция временной когерентности (ϵ_c) по пространственной частоте, ограничивающая амплитуду передаточной функции фазового контраста (PCTF), быстро затухает с увеличением частоты, что приводит к потере информации высокого разрешения. CFEG улучшает ситуацию, благодаря малому разбросу электронов по энергии (рис. 2). Разброс энергии CFEG при 300 кВ ускоряющего напряжения составляет 0,35 эВ, что более чем в два раза меньше, чем у TFEG Шоттки. Это смягчает быстрое падение ϵ_c в высокочастотной области и позволяет получать информацию на более высокой пространственной частоте, что видно из графика PCTF. Сравнивая графики, мы можем видеть, что CFEG при 200 кВ немного, а при 300 В CFEG значительно превосходят Schottky-FEG при 300 кВ ускоряющего напряжения.

ПРЕДМЕТНЫЙ КРИОСТОЛИК CRYO STAGE

На рис. 3 схематически показан предметный столик CRYO ARM 300. Для охлаждения образца до температуры 100 К и ниже гониометр соединен гибким теплопроводом с резервуаром жидкого азота, расположенным вне колонны ПЭМ. Эта гибкость предотвращает передачу на предметный столик вибраций, возникающих в резервуаре. Чтобы не допустить нарастание льда на поверхности образца, он окружен криоэкранами, охлажденными жидким азотом до температуры 95 К и ниже. Для повышения адсорбции льда один из криоэкранов выполнен в форме «печной трубы»,

направленной вдоль электронного луча. Отверстие «печной трубы» располагается как можно дальше от образца, чтобы уменьшить телесный угол, под которым виден образец. Такая конструкция эффективно снижает вероятность попадания молекул воды на образец. В результате микроскоп уверенно обеспечивает скорость нарастания льда не больше 0,5 нм/ч.

АВТОМАТИЧЕСКИЙ ЗАГРУЗЧИК КРИОБРАЗЦОВ CRYO SPESPORTER

На рис. 4 показана структура автоматического загрузчика образцов CSP. Эта система оснащена двумя (продольным и поперечным) стержнями, которые перемещают картридж с образцом между камерами предварительной откачки, CSP и местом для исследования в колонне микроскопа. В камере CSP установлен 12-местный магазин для хранения образцов. Транспортировка происходит в закрытом контейнере, содержащем специальную четырехместную кассету. После откачки транспортировочного контейнера открывается затвор, и кассета с образцами загружается в CSP. Картриджи помещаются в любое свободное место магазина для хранения. Иными словами, можно загрузить от одного до четырех картриджей с образцами за один раз в любое из 12 мест магазина, не потревожив остальные. Система CSP сохраняет охлажденные образцы в вакууме (10^{-5} Па) между сеансами,

Рис. 3. Схема расположения предметного столика в колонне CRYO ARM 300

* Волновое число. – Прим. ред.

Рис. 4. Схема CRYO SPECPORTER

что очень удобно для объемных и многопользовательских исследований.

БЕЗАПЕРТУРНАЯ ФАЗОВАЯ ПЛАСТИНА (HFPP) И ОМЕГА-ФИЛЬТР

Проведение SPA небольших белковых молекул (~100 кДа) вызывает определенные сложности: по мере того, как молекулы становятся меньше, относительная толщина льда увеличивается, разница в массовой плотности между льдом и частицами уменьшается, что затрудняет их

идентификацию. Кроме того, крио-ЭМ-изображение, полученное при низкой дозе для предотвращения повреждения электронным пучком, имеет низкое отношение сигнал / шум. Если положение частицы не может быть распознано, становится невозможным вывести трехмерную структуру или выбрать частицы для SPA-анализа.

Для таких маленьких белков безапертурная фазовая пластина (Hole Free Phase Plate, HFPP) – наиболее подходящее решение. HFPP представляет собой углеродную пленку толщиной 15 нм, которая устанавливается в заднюю фокальную

Рис. 5. Снимок экрана интерфейса JADAS GUI. Графический интерфейс: а – в режиме настройки, б – в режиме сбора данных

Рис. 6. а – трехмерная карта плотности апоферритина мыши; б – справа: результаты получены путем подстановки атомной структуры аминокислот к полученной трехмерной карте плотности; б – слева: карта электронной плотности триптофана показывает четкие отверстия в их пяти- и шестичленных кольцах; в – корреляция Фурье по оболочке (FSC), которая показывает разрешение 1,54 Å при FSC = 0,143

плоскость объективной линзы, где формируется дифракционное пятно 0-го порядка. Оно создает локализованный потенциал на HFPP из-за вторичной электронной эмиссии. Этот потенциал сдвигает фазу электрона в прошедшей волне на $\pi/2$, в результате чего увеличивается контраст в области низких пространственных частот в РТСФ, представляющих форму частицы.

Кроме того, при визуализации с нулевыми потерями, в которой электроны, испытавшие неупругое рассеяние, обрезаются омега-фильтром, может быть уменьшена фоновая составляющая в фазово-контрастном изображении, что улучшает соотношение сигнал / шум.

СИСТЕМА АВТОМАТИЧЕСКОГО СБОРА ДАННЫХ JADAS

Для получения результатов SPA с высоким разрешением необходимо набирать сотни и тысячи изображений крио-ЭМ, для чего требуется специальное программное обеспечение.

Перед началом автоматического сбора данных необходимо установить параметры системы для работы с низкой дозой MDS (Minimum Dose System). Все настройки и установки предварительно записаны в виде рецептов в JADAS. Их можно редактировать с помощью графического интерфейса пользователя (GUI) JADAS в режиме настройки. Для этого надо, следуя меню навигации, выбрать соответствующие элементы из списка. К каждому элементу могут быть показаны анимированные пояснения (рис. 5).

Как только оператор выберет регион на глобальной карте (TEM-изображение малого увеличения) (см. рис. 5б), JADAS автоматически строит изображение среднего увеличения (локальную карту), определяет положение Quantifoil®, позиции отверстий в сетке, находит подходящую площадку с хорошей толщиной льда и выбирает место сбора данных. Исходя из заданной последовательности действий, указанной в рецепте, JADAS перемещает образец в позицию каждого подходящего отверстия, выполняет автофокусировку и собирает данные.

РЕЗУЛЬТАТЫ ПРИМЕНЕНИЯ

На рис. 6б представлен результат SPA апоферритина, полученный с помощью CRYO ARM 300 в центре Riken SPring-8 (Япония). Биологический образец, полученный из мыши, состоит только из выделенных и очищенных тяжелых цепей апоферритина. 120295 частиц с 840 изображениями были отобраны JADAS и использованы для создания 3D-модели в компьютерной программе RELION (MRC Laboratory of Molecular Biology), используемой для расчета крио-ЭМ-структур. Разрешение при корреляции Фурье по оболочке (FSC) = 0,143 составляет 1,54 Å (рис. 6в).

* Quantifoil – перфорированная углеродная пленка, которой покрывают сеточки для образцов в ТЕМ. – Прим. переводчика.

Тот факт, что центральные отверстия шести- и пятичленных колец триптофана хорошо видны, свидетельствует о высоком разрешении реконструированного изображения.

ВЫВОД

Новый крио-ЭМ CRYO ARM 300 / JEM-Z300FSC с ускоряющим напряжением 300 кВ, в основном, предназначен для 3D-структурного анализа SPA. В работе показана эффективность каждого технического решения CRYO ARM 300 для SPA и представлен результат его применения. Конечно, по мере увеличения числа пользователей CRYO ARM 300 возникнут новые запросы в соответствии с целями, поставленными для решения других задач. Мы готовы работать по дальнейшему улучшению и развитию CRYO ARM 300.

Благодарим всех сотрудников JEOL за их усилия по созданию и совершенствованию CRYO ARM. Так же мы благодарим докторов Т. Като, Ф. Макино, Т. Накане, К. Ёнекура и К. Намба за предоставленные результаты применения и докторов Х. Янагисава и М. Киккава за предоставление плазмид мышинного апоферритина.

Перевод статьи – инженер-консультант компании «ДЖЕОЛ (РУС)» В. С. Башкирцев.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Subramaniam S., Earl L. A., Falconieri V., Milne J. L., Egelman E. H. Resolution advances in cryo-EM enable application to drug discovery // Curr. Opin. Struct. Biol. 2016. 41. P. 194–202.
2. Fujiyoshi Y. Observation of membrane proteins through an electron beam // JEOL NEWS. 2009. V. 44. No. 1. P. 23–31.
3. Fujiyoshi Y. The structural study of membrane proteins by electron crystallography // Adv. Biophys. 1998. 35, P. 25–80.
4. Murata K., Mitsuoka K., Hirai T., Walz T., Agre P., Heymann J. B., Engel A., Fujiyoshi Y. Structural determinants of water permeation through aquaporin-1 // Nature. 2000. V. 407. P. 599–605.
5. Kimura Y., Vassilyev D. G., Miyazawa A., Kidera A., Matsushima M., Mitsuoka K., Murata K., Hirai T., Fujiyoshi Y., Unwin N. Surface of bacteriorhodopsin revealed by high-resolution electron crystallography // Nature. 1997. V. 389. P. 206–211.
6. Miyazawa A., Fujiyoshi Y., Unwin N. Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore // Nature. 2003. V. 423. P. 949–955.
7. Gonen T., Cheng Y., Sliz P., Hiroki Y., Fujiyoshi Y., Harrison S. C., Walz T. Lipid-protein interactions in double-layered two-dimensional AQP0 crystals. // Nature. 2005. V. 438. 633–638.
8. Bartesaghi A., Merk A., Banerjee S., Matthies D., Wu X., Milne J. L. S., Subramaniam S. 2.2 Å resolution cryo-EM structure of b-galactosidase in complex with a cell-permeant inhibitor // Science. 2015. V. 348. P. 1147–1151.
9. Liao M., Cao E., Julius D., Cheng Y. Structure of TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy // Nature. 2013. V. 504. P. 107–112.
10. Namba K., Kato T. Technical development of electron cryomicroscopy and contributions to life sciences // JEOL News. 2018. 53. P. 18–24.
11. Hosogi N. Introduction of a Next-Generation 200 kV Cryo TEM // JEOL News. 2017. 52. P. 49–52.

НАСТРАИВАЕМЫЕ САМОВОССТАНАВЛИВАЮЩИЕСЯ КРАСИТЕЛИ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНЫХ УСТРОЙСТВАХ СЛЕДУЮЩЕГО ПОКОЛЕНИЯ

Двухкомпонентный краситель, синтезированный в Йокогамском Национальном университете, демонстрирует самовосстанавливающееся высококонтрастное механохромное свечение в диапазоне длин волн от фиолетовой до оранжевой. Вопрос состоит в том, как циклически контролировать реакцию веществ на воздействие и возвращать их к исходным свойствам? Это позволило бы создать циклические сенсорные системы.

Ученые создали соединение, производное от тиофена, представляющее собой краситель с механохромными свойствами свечения, изменяющий цвет в зависимости от физических воздействий. Он излучает фиолетовое свечение под воздействием УФ-излучения, а при механических воздействиях фиолетовое свечение слегка смещается в синий цвет. Другое внешнее воздействие приводит к «зажиганию» красителя и излучению им фиолетового свечения.

По словам руководителя научной группы механохромно-люминесцентные (MCL) красители вызывают интерес в связи с их потенциальными применениями, хотя еще очень трудно разработать MCL-красители с желаемыми характеристиками. Двухкомпонентный краситель обладает самовосстанавливающимся высококонтрастным механохромным свечением от фиолетового до оранжевого. Обнаружено, что при добавлении вещества DMQA длина волны излучения красителя смещается в оранжевую область. В дополнительных воздействиях для возвращения к исходному состоянию краситель не нуждается. Поведение красителя при восстановлении объясняется длинной алкильной группы в соединении – более длинная цепь атомов углерода и водорода в красителе позволяет ему заново перекристаллизоваться. При смешивании с DMQA цветовой диапазон исходного и основного состояний сильно отличается.

Следующий шаг состоит в управлении чувствительностью красителя к механическим воздействиям. Разрабатывается инновационная система измерения давления на основе материала, способного дискретно изменять цвет излучения, реагируя на механические воздействия различной интенсивности для использования в следующих поколениях интеллектуальных устройств.

Источник: phys.org