## Vakuový systém mikroskopu

- EM potřebuje vysoký stupeň vakua ve vzduchu je elektron absorbován do 1 m ve směru šíření
- molekuly ve vzduchu (O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O) kontaminují tubus a vzorek
  - antikontaminátor s LN<sub>2</sub> pomáhá udržet vakuum při výměně vzorků (kondenzace nečistot na studeném povrchu antikontaminátoru okolo vzorku)
- jednotlivé části TEM jsou různě náročné vyžadují jiný stupeň vakua (3 oddělené vakuové komory)
- řada ventilů spojených se speciálními vývěvami pracuje v logickém sledu s automatickým řízením



#### Vakuový systém mikroskopu - antikontaminátor



## Vakuový systém mikroskopu

# Schema vakuového systému moderního TEM



V (valve) – uzavírací ventily

<u>Vývěvy:</u> **PVP** – rotační vývěva **ODP** – oil diffusion pump **IGP** – ion getter pump **Turbo** – turbomolekulární pumpa

<u>Měření vakua:</u> **Pir** – měrka Piraniho typu **Pen** – měrka Penning typu

<u>Snížení stupně vakua:</u> **Air** (N<sub>2</sub>) – pro zvýšení tlaku (snížení vakuua) (např. při výměně vzorku)

- rychlá vizuální kontrola vakua stupeň vakua je vyjádřen odstínem tmavý odstín ⇒ vysoké vakuum
- PVP vyčerpá buffer tank (neběží pořád hlučná) buffer tank využívá ODP
- ODP umožní postupné spuštění IGP a Turbo pumpy

# <u>Vakuový systém mikroskopu – typy vývěv</u>

# <u>Rotační vývěva (PVP)</u>

- vývěva, ne jejímž výstupu může být atm. tlak
- excentricky umístěný rotor s lopatkami
- lopatky jsou pružinami tlačeny na stěnu komory
- na vstupu je vzduch nasáván a stlačený je přes tlakový ventil vypuštěn ven
- otočný systém je ponořen v olejové lázni

# Difúzní olejová vývěva (ODP)

- nutné napojení na rotační vývěvu
- trysky pod tlakem rozstřikují olejové výpary směrem ke stěně komory ⇒
   výpary absorbují molekuly vzduchu
- výpary oleje kondenzují a ztékají dolů ⇒ postupně uvolňují absorbované plyny
- v dolní části se molekuly plynu hromadí a odčerpávají se napojenou vývěvou ven





## <u>Vakuový systém mikroskopu – typy vývěv</u>

# lontová vývěva (IGP)

- ionty plynu jsou v silném elektrickém poli přitahovány katodami ⇒ reagují s materiálem katody
- uvolněné elektrony z katody ve spirálové trajektorii putují směrem k anodě a dále ionizují molekuly vzduchu
- na katodách se akumulují sloučeniny plynů ⇒ při poklesu účinnosti vývěvy je nutné vyměnit/regenerovat katody



# Turbomolekulární vývěva

• lopatky rotoru (až 100000 rpm) sráží molekuly vzduchu přes stator k výfukové části





## <u>Vakuový systém mikroskopu – typy vakuometrů</u>

# <u>Typ Pirani</u>

- určené pro měření vakua do 10<sup>-5</sup> Torr
- proud zahřívá vlákno ⇒ tepelná ztráta oproti referenci závisí na tlaku (vyšší tlak ⇒ více interakcí s molekulami plynu ⇒ vyšší tepelná ztráta)
- měřeno přes změnu odporu (závisí na teplotě)



A schematic sketch of a Pirani Gauge



# Základní pracovní režimy TEM

 TEM lze používat v několika různých režimech – závisí na typu vzorku a na tom, jaké informace o vzorku chceme získat

Rozlišujeme několik základních metod:

- 1. Světlé pole
- 2. Temné pole
- 3. Difrakce
- 4. Low dose
- 5. TEM vysokého rozlišení
- 6. STEM
- 7. Kryogenní TEM
- 8. Kryogenní elektronová tomografie

#### 1. metoda světlého pole

• nejběžnější metoda pro pozorování vzorku v TEM



- zařazena objektivová clona v zadní ohniskové rovině objektivové čočky (zvyšuje kontrast)
- SAD (selected area diffraction) clona je vysunutá
- první čočka projektoru je zaostřena na primární obraz tvořený objektivovou čočkou

 čočka projektoru dále zvětšuje a promítá obraz na stínítko, příp. na detekci

#### 2. metoda temného pole

- vysunutím objektivové apertury excentricky mimo optickou osu TEM necháme procházet pouze difraktované paprsky ⇒ používá se např. pro zvýšení kontrastu krystalických materiálů
- pro eliminaci aberací lze použít nakloněný svazek ⇒ difraktované svazky pak prochází středem objektivové čočky



# 3. difrakční režim TEM

• difrakční režim pro identifikaci krystalů



- objektivová clona je vyřazena
- SAD clona je zařazena
- první projektorová čočka je zaostřena na zadní ohniskovou rovinu objektivu – difrakční obraz

#### **Difraktogram Si**



#### 4. low dose TEM

- používá se pro snímkování biologických vzorků
- biologický vzorek je náchylný na radiační poškození  $\Rightarrow$  degradace, změna struktury
- snaha minimalizovat expozici vzorku elektronovým svazkem v místě snímkování ⇒ "low dose" -TEM pracuje v "search, focus a exposure" modu

#### SEARCH

 malé zvětšení (např. 3kx) – nízká hustota e<sup>-</sup>/A<sup>2</sup> (minimální radiační poškození)

# FOCUS

 vychýlení svazku ⇒ hodnota fokusu je nastavena na jiném místě (neexponujeme oblast vzorku určenou pro snímkování)

# EXPOSURE

 snímek je nahrán na místě, které nebylo vystaveno elektronovému svazku při vysokém zvětšení ⇒ eliminace radiačního poškození



## 4. low dose TEM pro studium biologických vzorků

# PROBLEM

- biologický materiál citlivý na radiační poškození
- nízká intenzita elektronového svazku ⇒ nízký poměr signál/šum

# ŘEŠENÍ

snímkování v "low dose" režimu s nízkou intenzitou elektronového svazku

obrazová analýza velkého počtu projekcí (automatické snímkování velkého počtu obrázků)



# LOW DOSE MODE (search, focus, exposure)



selection of positions



LOW DOSE MODE (search, focus, exposure)



výběr pozic pro snímkování

RECORDING

přesun na vybrané pozice



#### LOW DOSE MODE (search, focus, exposure)



Jakým způsobem zvýšit poměr signál/šum v projekci?



<u>Řešení:</u> srovnání a průměrování velkého počtu individuálních projekcí







Snímky izolovaných komplexů fotosystému II – nízký S/N, náhodná orientace projekcí

Výběr projekcí – datový soubor > 20,000 projekcí



Snímky izolovaných komplexů fotosystému II – nízký S/N, náhodná orientace projekcí

Výběr projekcí – datový soubor > 20,000 projekcí

Srovnání projekcí – translace, rotace



Snímky izolovaných komplexů fotosystému II – nízký S/N, náhodná orientace projekcí

Výběr projekcí – datový soubor > 20,000 projekcí

Srovnání projekcí – translace, rotace

Průměrování srovnaných projekcí – zlepšení S/N poměru



Snímky izolovaných komplexů fotosystému II – nízký S/N, náhodná orientace projekcí

Výběr projekcí – datový soubor > 20,000 projekcí

Srovnání projekcí – translace, rotace

Průměrování srovnaných projekcí – zlepšení S/N poměru



# Final averaged projection of PSII supercomplex



## 5. TEM vysokého rozlišení (HRTEM)

- používá se ve studiu nanomateriálů, polovodičů, atd.
  - pro kontrast detailů je důležitý fázový kontrast nutné nastavit správný defocus
    - využívá se tzv. Scherzerův defocus:  $\Delta f_{Scherzer} = -1.2\sqrt{C_s\lambda}$
    - bodové rozlišení TEM:  $d_{res}(Scherzer) = 0.6\lambda^{3/4}C_s^{1/4} \Rightarrow závisí pouze na vlnové délce a C_s$
    - používají se TEM s malou C<sub>s</sub> a vyšší urychlovací napětí (300 kV)
    - náklon vzorku tak, aby umožnil průchod elektronového svazku podél uspořádaných atomů
    - interpretace snímku HRTEM není přímočará (interpretace interference, srovnání s modely)







- TEM obraz atomů Si s vysokým rozlišením
- vzdálenost mez atomy 0.14 nm

Azbestová vlákna na síťce Struktura azbestu s vysokým rozlišením

#### 6. Skenovací transmisní elektronová mikroskopie (STEM)



- TEM doplněný o skenovací cívky a STEM detektory
- elektronový svazek skenuje vzorek pomocí vychylovacích cívek
- bod otáčení (pivot point) je v ohnisku třetí kondenzorové čočky ⇒ skenující paprsek je paralelní s optickou osou TEM
- rozlišení závisí na velikosti fokusovaného svazku

# 6. STEM detektory



- obraz je zobrazován postupně, detekcí prošlých elektronů během skenování
- používají se polovodičové detektory detekující difrakční obrazec (bright field, dark field)
- intenzita signálu závisí na fázovém posuvu (Braggova difrakce, bright field) a je úměrná protonovému číslu prvků (Z-kontrast, dark field) ⇒ STEM představuje analytickou metodu
- STEM se využívá v kombinaci s dalšími analytickými detektory (EELS, EDX)

# 7. kryogenní TEM

- využívá se pro studium 3D struktury biologických vzorků izolované proteinové komplexy •
- strukturní analýza vzorku ve zmraženém stavu (teplota 77K)
- nejmodernější kryo TEM dosahuje atomárního rozlišení konkurence X-ray krystalografii

Top model kryogenní TEM – např. Krios (FEI)

- vybaven FEG zdrojem, přímým detektorem elektronů, C<sub>s</sub> korekcí, fázovou destičkou
- energetický filtr snižuje šum a zvyšuje kontrast
  - odfiltruje elektrony po neelastickém rozptylu mají menší energii (rychlost) a po průchodu zakřiveným magnetickým polem jsou vychýleny mimo štěrbinu filtru a následnou detekci





## 7. Kryogenní TEM – příprava vzorku

# <u>Problém</u>

- při zmražení vzorku dochází k tvorbě krystalů vody (kubické a hexagonální krystaly)
- krystaly vody jsou velké a neprůchodné pro elektronový svazek  $\Rightarrow$  znehodnocují vzorkek

# <u>Řešení</u>

- rychlé zmražení vzorku (vitrification) může předejít krystalizaci vody ⇒ *amorfní led*
- pro mražení je využit zkapalněný plyn, nejčastěji kapalný ethan
- kapalný ethan je lepší než kapalný dusík (ethan: bod tání: -183°C, bod varu: -89°C)
  (dusík: bod tání: -210°C, bod varu: -196°C)
- rychlé zmražení zabrání krystalizaci vody
- mražení ruční nebo s využitím automatu Vitrobot (FEI)

# 7. Kryogenní TEM – zmražení vzorku pomocí Vitrobotu



## 7. Kryogenní TEM – zmražení vzorku pomocí Vitrobotu

#### Rychlé zmražení pomocí Vitrobotu





Polara FEI

#### 7. Kryogenní TEM – snímkování a 3D rekonstrukce



## 7. kryogenní TEM – ukázka studia 3D struktury fotosystému II ze smrku ztepilého



Opatíková a kol. (článek v přípravě)

#### 7. kryogenní TEM – studium struktury viru SARS-CoV-2 způsobující onemocnění COVID-19



Model koronaviru s charakteristickými výběžky S proteinů (glykoproteiny), které využívají pro interakci a navázání na hostitelskou buňku. SARS-CoV-2 způsobující onemocnění COVID-19, patří do této skupiny koronavirů.

#### 7. kryogenní TEM – studium struktury viru SARS-CoV-2 způsobující onemocnění COVID-19

- přelom roku 2019/2020 objevení spojitosti mezi koronaviry (SARS-CoV-2) a nákazou COVID-19
- 15.2. 2020 zveřejnění 3D struktury SARS-CoV-2 "spike" proteinu (S protein) pomocí cryo EM za méně něž 2 týdny (Wrapp D. et al. (2020) Sicence 367 (6484))



#### 7. kryogenní TEM – studium struktury viru SARS-CoV-2 způsobující onemocnění COVID-19

 19. 2. 2020 – zveřejnění struktury SARS-CoV-2 a jeho vazby na lidský receptor ACE2, což umožnilo začátek vývoje vakcín a protilátek (Yan R. et al. (2020) Science 367 (6485))



## 8. Kryogenní elektronová tomografie

- metoda pro určení 3D obrazu studovaného objektu
- vhodná pro studium buněčných organel, větších objektů, ale i proteinových komplexů, či tenkých řezů

Princip metody

- objekt je v mikroskopu natáčen u širokém úhlovém intervalu a snímkován
- ze získaných 2D snímků je rekonstruován 3D tomogram



Back-projection of weighted projections

## 8. Kryogenní elektronová tomografie

## Experimentální postup



Lučič et al. (2013) JCB 202: 407

- způsob rychlého zmražení závisí na tloušťce vzorku
- u silnějších vzorků se provádí zeslabení vrstvy vzorku pomocí techniky "ion beam milling" nebo je zmražený vzorek na kryo-mikrotomu nařezán na kryo řezy

## IMOD software

業 ⊙ BB - Etomo	$\odot$	$\otimes$
<u>F</u> ile <u>T</u> ools <u>V</u> iew <u>O</u> ptions <u>H</u> elp		
Axis A: No process		
Avis P Roth	Kill Process	
PARS D BOOK		
Pre-processing		
Not Started		
Coarse Alignment		
Not Started		
Fiducial Model Gen.		
Fine Alignment		
Not Started		
Tomogram Positioning		
Not Started		
Final Aligned Stack		
Not Started		
Tomogram Generation		
Tomogram Combination		
Not Started		
Post-processing		
Not Started		
Clean lin		
Not Started		
Data file: /home/sueh/tutorials/version4-6/tutorialData/	BB.edf	



Data file: /home/sueh/tutorials/version4-6/tutorialData/BB.edf





Data file: /home/sueh/Tutorials/version4-8/tutorialData/BB.edf









Data file: /home/sueh/Tutorials/version4-8/tutorialData/BB.edf



Granální membrány s označenými pozicemi fotosystému II

# 8. Kryogenní elektronová tomografie – řezy tomogramem



#### 8. Kryogenní elektronová tomografie – sub-tomogram 3D analýza



#### 3D analýza fotosystému II



Kouřil a kol. (2011) Biochim Biophys Acta 1807:368-374.

#### Model granální membrány



#### 8. Kryogenní elektronová tomografie – template matching

- obtížná identifikace objektů v tomogramu
- metoda "template matching" umožňuje lokalizovat pozici daného proteinu v tomogramu
- je nutné znát 3D strukturu daného proteinu



Förster et al, Methods in Enzymology, 2010

## 8. Kryogenní elektronová tomografie – ukázky tomogramů

Aktinová vlákna v Dictyostelium discoideum Ribozomy b a

Identifikace proteinů v tomogramu pomocí metody Template matching