

Κρυσταλλογραφία

Μέρος 7ο

Ηλεκτρονική μικροσκοπία : τρισδιάστατη επανασύσταση.

Ηλεκτρονική μικροσκοπία :

Αρχή λειτουργίας

Η αρχή της λειτουργίας του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου βρίσκεται στην θεωρία de Broglie για την κυματική φύση ταχέως κινουμένων σωματιδίων :

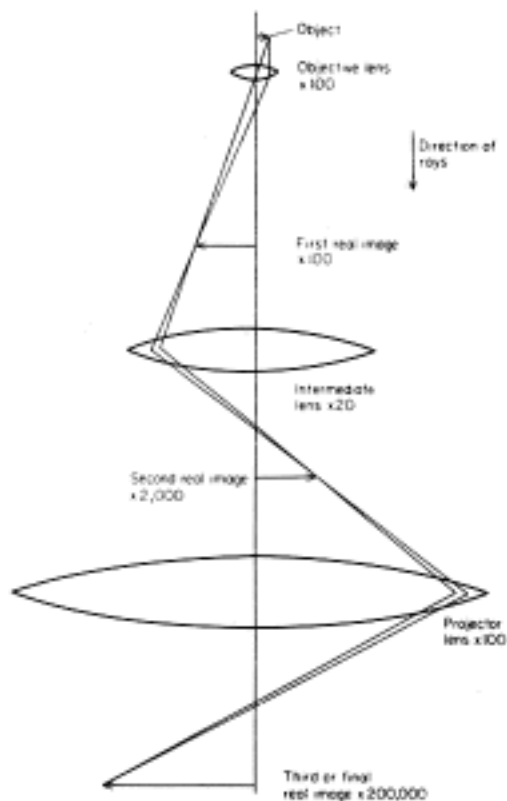
$$\lambda = h / (m \cdot u)$$

όπου λ είναι το ισοδύναμο μήκος κύματος των σωματιδίων, h είναι η σταθερά του Planck, m είναι η μάζα ηρεμίας των σωματιδίων και u η ταχύτητά τους. Για τα συνηθισμένα ηλεκτρονικά μικροσκόπια (100 KV) το ισοδύναμο μήκος κύματος των ταχέως κινουμένων ηλεκτρονίων είναι 0.037Å.

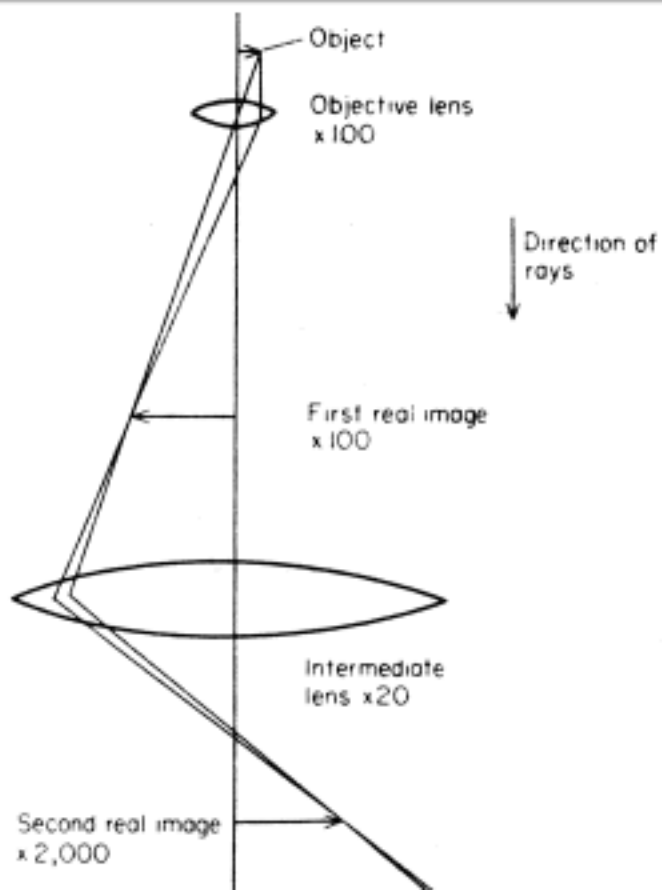
Δομή ΗΜ

Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο είναι δομικά ανάλογο με ένα οπτικό μικροσκόπιο με τη διαφορά ότι αντί για ορατή ακτινοβολία χρησιμοποιούνται ταχέως κινούμενα ηλεκτρόνια, οι φακοί είναι στην πραγματικότητα μαγνητικά πεδία παραγόμενα από ηλεκτρομαγνήτες, και ότι ολόκληρο το σύστημα βρίσκεται σε υψηλό κενό (της τάξης των 10^{-7} Torr).

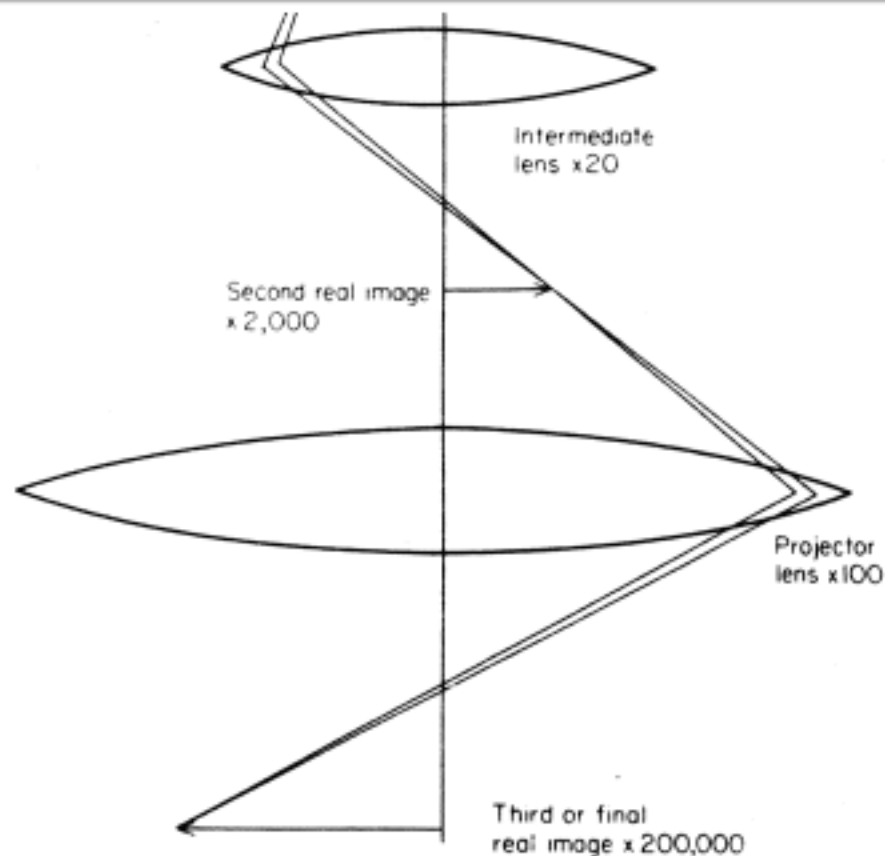
HM : Αναλογία με ΟΠΤΙΚΟ



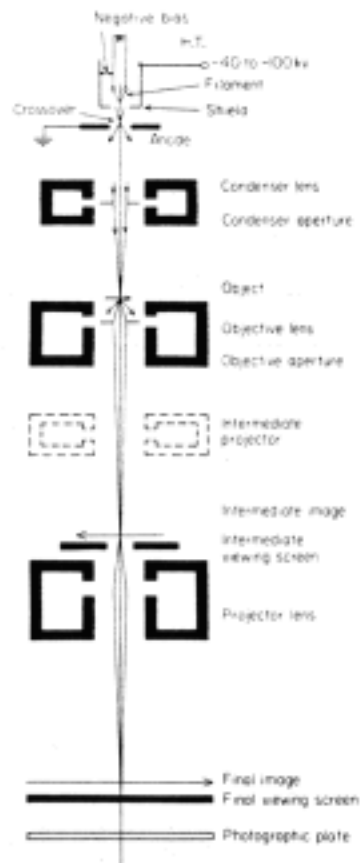
HM : Αναλογία με οπτικό



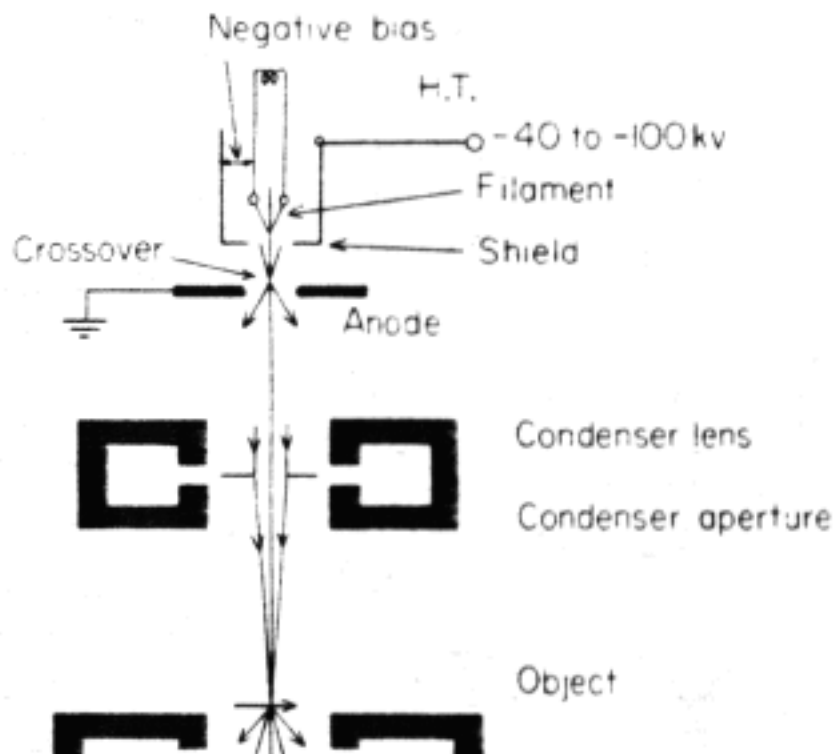
HM : Αναλογία με οπτικό



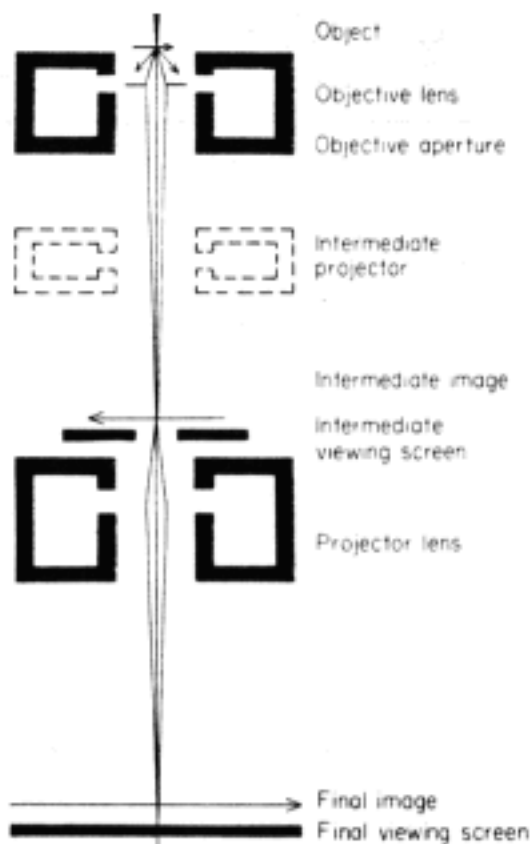
Δομή ΗΜ



Παραγωγή ηλεκτρονίων



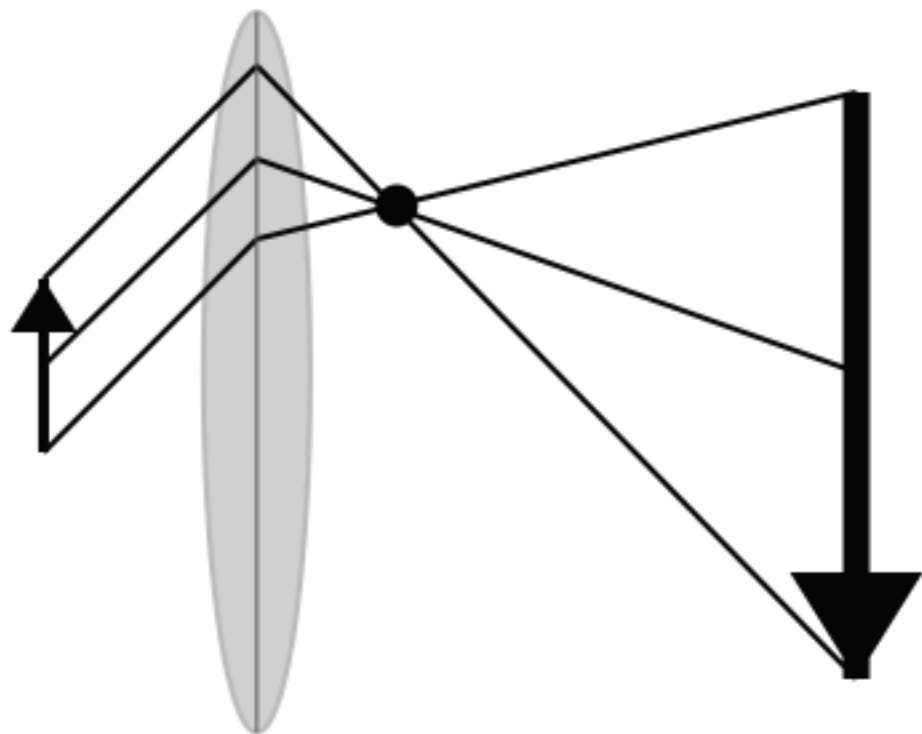
Δημιουργία ειδώλου



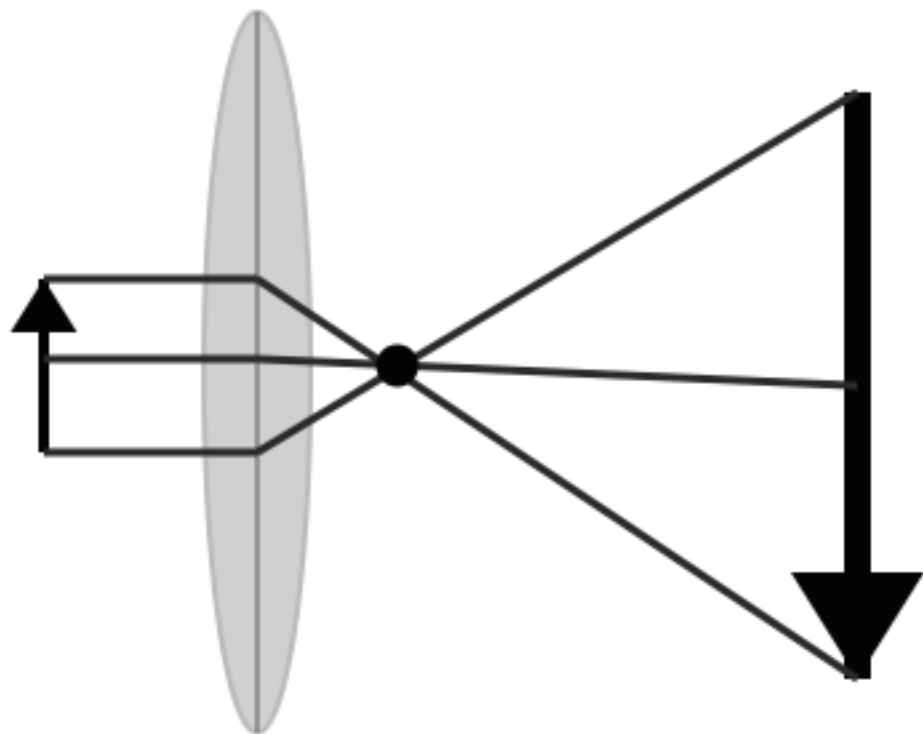
Φάσμα περίθλασης

Το φάσμα περίθλασης (ηλεκτρονίων) του αντικειμένου μπορεί να ανακτηθεί με αυτούσιο τον εξοπλισμό που παρέχει το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο. Ο λόγος είναι ότι το φάσμα περίθλασης ενός αντικειμένου είναι ένα εγγενές τμήμα της διαδικασίας σχηματισμού του ειδώλου του αντικειμένου και αντιστοιχεί στο επίπεδο εκείνο του οπτικού άξονα στο οποίο συγκλίνουν όσες ακτίνες είχαν σκεδαστεί παράλληλα από το αντικείμενο. Προκειμένου να ανακτηθεί το φάσμα περίθλασης αρκεί ο φακός που ακολουθεί τον αντικειμενικό (ο ενδιάμεσος) να εστιαστεί όχι στο επίπεδο του ειδώλου (του αντικειμενικού) αλλά στο επίπεδο περίθλασης.

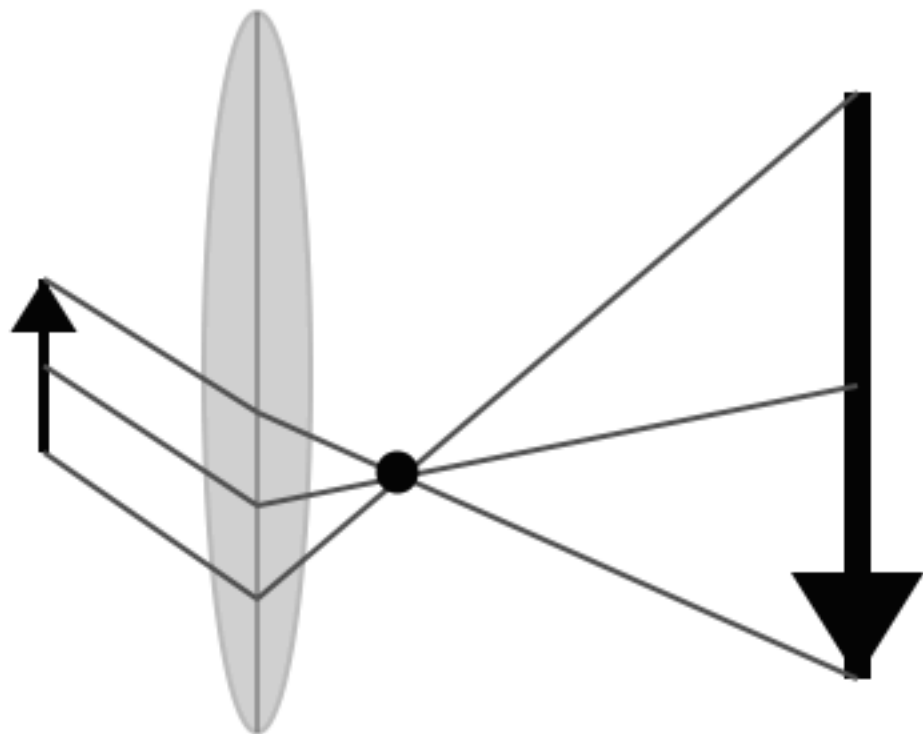
Φάσμα περίθλασης



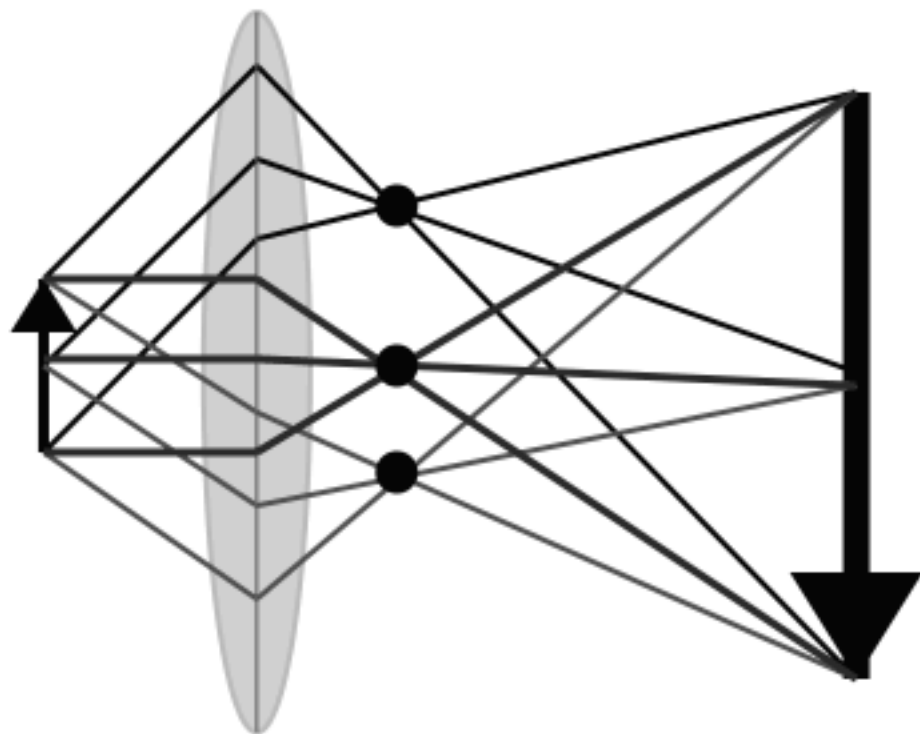
Φάσμα περίθλασης



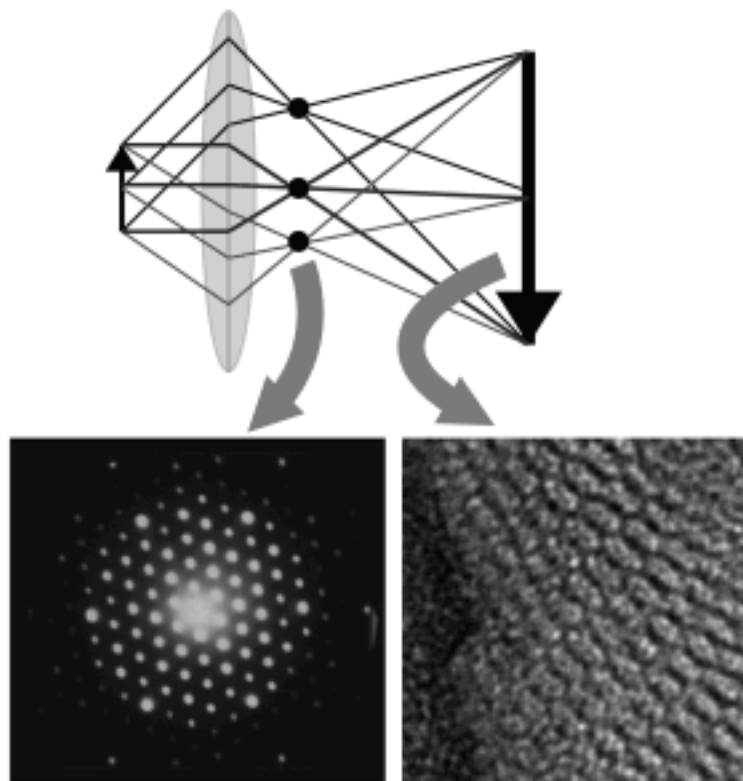
Φάσμα περίθλασης



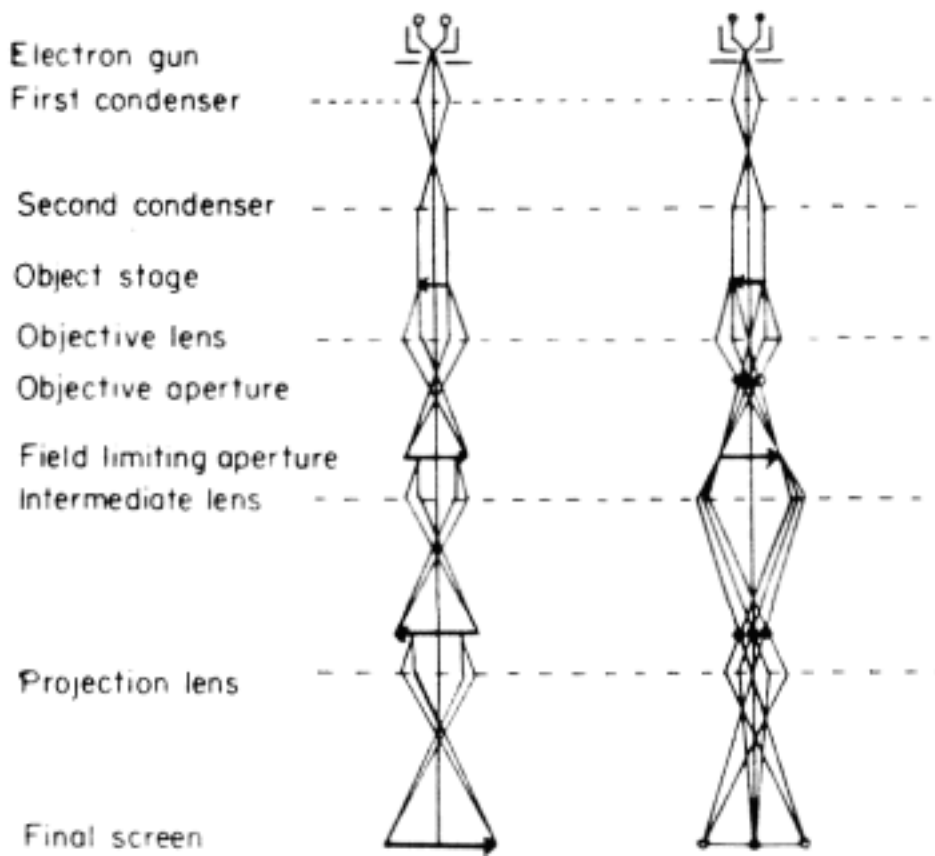
Φάσμα περίθλασης



Φάσμα περίθλασης



Φάσμα περίθλασης



Εξοπλισμός ΗΜ.



Αλληλεπίδραση με την ύλη

Τα ηλεκτρόνια αλληλεπιδρούν ισχυρά με την ύλη και κυρίως με τους πυρήνες των ατόμων (για την ακρίβεια με το ηλεκτροστατικό δυναμικό τους).

Λόγω της ισχυρής αλληλεπίδρασης, μόνο πολύ λεπτά δείγματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν, κάνοντας την μέθοδο ιδανική για 'δισδιάστατους' κρυστάλλους (για παράδειγμα κρύσταλλοι διαμεμβρανικών πρωτεϊνών ενσωματωμένων σε λιπιδική διπλοστοιβάδα),

αλλά ...

Εστιακό μήκος & προβολές

- Επειδή τα δείγματα είναι πολύ λεπτά σε σχέση με το εστιακό βάθος των φακών, είναι αδύνατο να εστιάσουμε σε διαφορετικά επίπεδα του αντικειμένου.
- Το αποτέλεσμα είναι ότι το είδωλο του αντικειμένου είναι η προβολή του αντικειμένου σε ένα επίπεδο κάθετο στον οπτικό άξονα του μικροσκοπίου.
- Αυτό σημαίνει ότι στο είδωλο του αντικειμένου η πληροφορία για την κατανομή της ύλης συμπιέζεται από τις τρεις διαστάσεις, σε δύο (η πληροφορία για το βάθος χάνεται).

Εστιακό μήκος & προβολές

Ένα από τα βασικά προβλήματα του προσδιορισμού δομών βιολογικών μακρομορίων με τη χρήση ΗΜ είναι λοιπόν η επανάκτηση της τρισδιάστατης δομής από τις δισδιάστατες προβολές της. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται τρισδιάστατη επανασύσταση.

Η αρχή στην οποία στηρίζεται η διαδικασία είναι το θεώρημα των προβολών (projection theorem), το οποίο προκύπτει άμεσα από τη θεωρία των μετασχηματισμών Fourier. Μια εικονογραφημένη επεξήγηση της μεθόδου είναι :

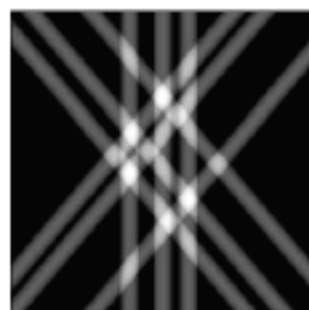
Θεώρημα προβολών



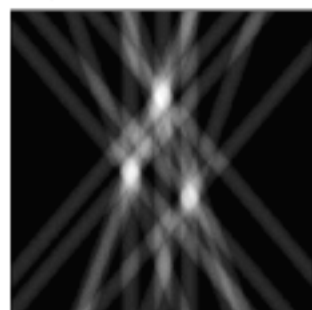
Object



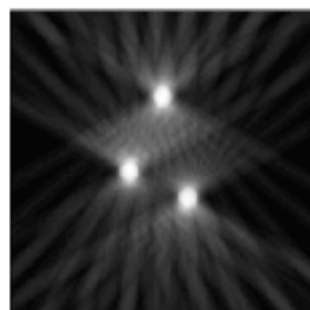
1 Proj.



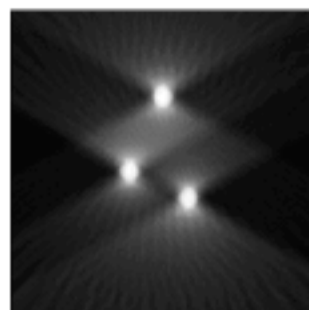
3 Proj./40 deg.



5 Proj./20 deg.



13 Proj./10 deg.



25 Proj./5 deg.

Τρισδιάστατη επανασύσταση

Ανάλογα με τον τύπο του δείγματος που χρησιμοποιείται για την ανάλυση, διακρίνονται τρεις περιπτώσεις :

- Επανασύσταση από μεμονωμένα σωμάτια (single particle averaging).
- Επανασύσταση από ινίδια και σωληνίσκους με ελικοειδή συμμετρία.
- Επανασύσταση από δισδιάστατους κρυστάλλους (για την ακρίβεια, κρυστάλλους με πάχος μίας μόνο στοιχειώδους κυψελίδας).

Επανασύσταση: απλά σωμάτια.

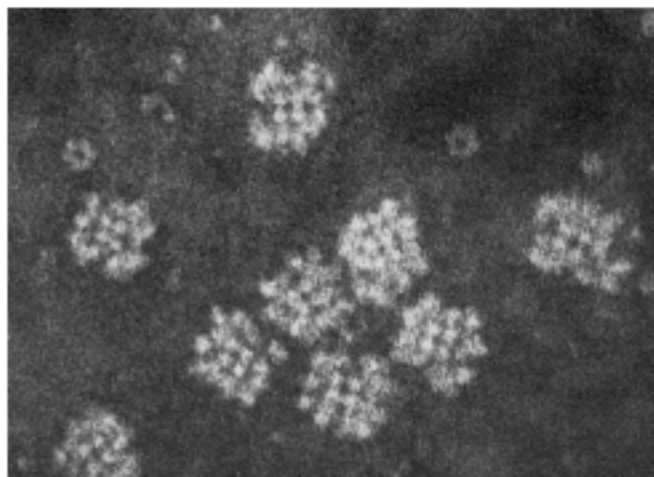
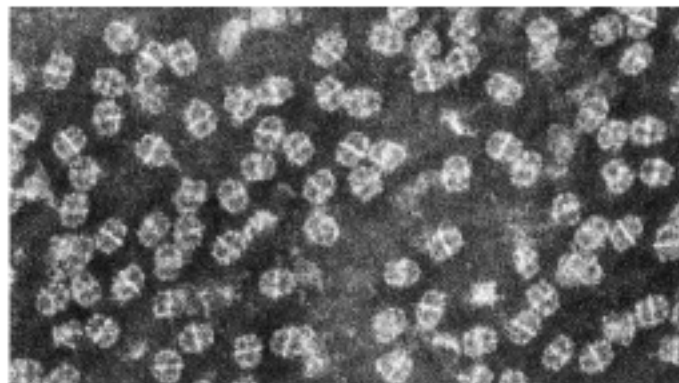
Από την άποψη προετοιμασίας του δείγματος, αυτή είναι η πλέον απλή μέθοδος (που στην περίπτωση της κρύο-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας το μόνο που απαιτεί είναι ένα διάλυμα του μορίου ή συμπλόκου). Η μέθοδος στηρίζεται στο ότι σε ένα είδωλο του αντικειμένου (δηλ. μεμονωμένων μορίων) διαφορετικά μόρια θα έχουν τυχαίους (και συνεπώς διαφορετικούς) προσανατολισμούς. Από τους διαφορετικούς προσανατολισμούς προσδιορίζονται διαφορετικές προβολές του μορίου, οι οποίες συνδυάζονται μεταξύ τους προκειμένου να επανασυσταθεί η τρισδιάστατη δομή.

Επανασύσταση: απλά σωμάτια.

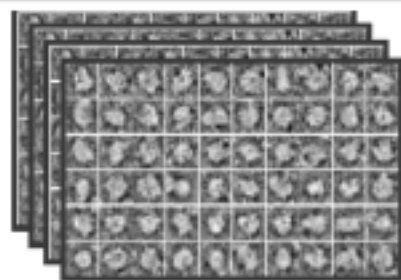
Η ευκολία προετοιμασίας του δείγματος αντισταθμίζεται από τα προβλήματα επεξεργασίας των δεδομένων και τη σχετικά χαμηλή διακριτικότητα (7Α) που είναι εφικτή με αυτή τη μέθοδο. Τα βασικότερα προβλήματα είναι :

- Ο μεγάλος αριθμός σωματιδίων που πρέπει να αναλυθούν.
- Χαμηλή αντίθεση (και συνεπώς αυξημένος θόρυβος) στην περίπτωση της κρύο-ηλεκτρονικής μικροσκοπίας.
- Επειδή δεν επιλέγεται (μέσω κρυστάλλωσης) ένας μόνο πληθυσμός μορίων, η μέθοδος είναι στο έλεος τυχόν φαινομένων ανομοιογένειας, πολυμορφισμού και συσσωμάτωσης των μορίων του δείγματος.

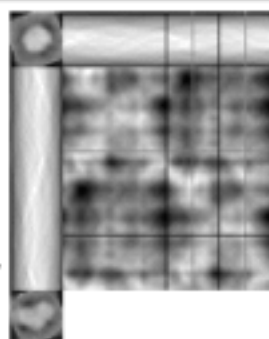
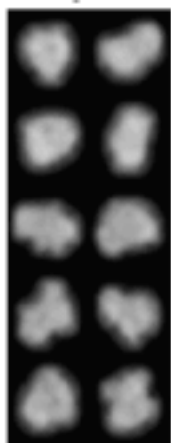
Επανάσταση: απλά σωμάτια.



Επανασύσταση: απλά σωμάτια.

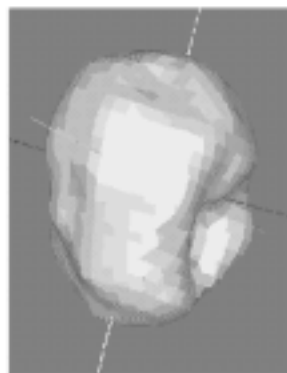


Ομαδοποίηση



Εύρεση γωνίας προβολής

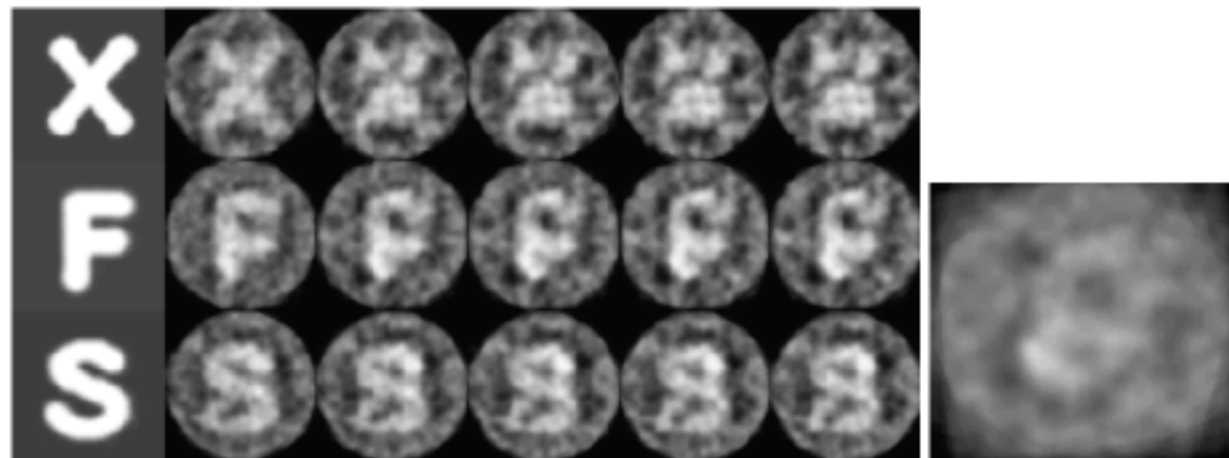
Επανασύσταση



Επανασύσταση: απλά σωματίια.

Σωματίδια αναφοράς και προβλήματα.

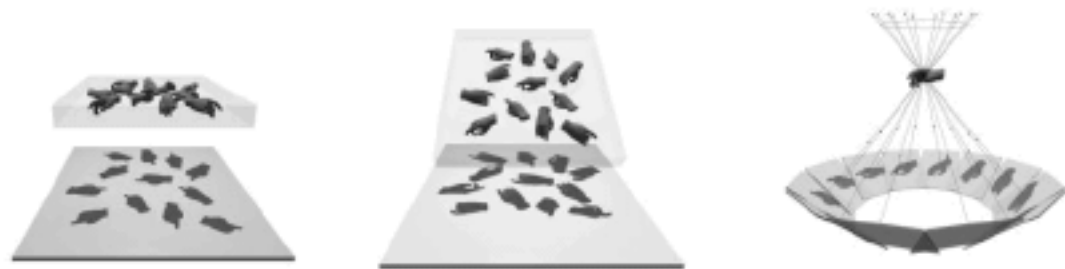
Προκειμένου να γίνει η ομαδοποίηση των διάφορων προβολών, πολλοί αλγόριθμοι απαιτούν την ύπαρξη ενός σωματιδίου αναφοράς. Η επιλογή του σωματιδίου αναφοράς μπορεί να εισαγάγει συστηματικά σφάλματα στην επανασύσταση.



Επανασύσταση: απλά σωμάτια.

Η μέθοδος των τυχαίων κωνικών περιστροφών.

Εάν τα σωμάτια λόγω της δομής τους έχουν έναν προτιμώμενο προσανατολισμό, η μέθοδος των τυχαίων κωνικών περιστροφών (random conical tilts) επιτρέπει τον προσδιορισμό και άλλων προβολών της δομής.



Ελικοειδής επανασύσταση

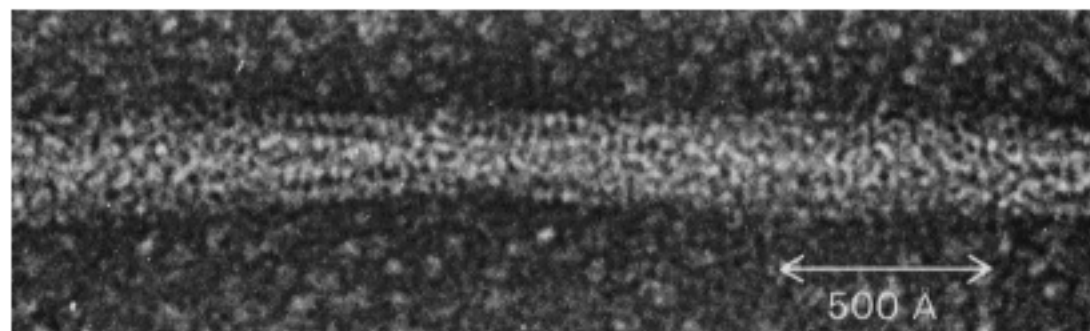
Η ελικοειδής συμμετρία είναι από τις συνηθέστερες στη βιολογία. Το γεγονός μπορεί να αποδοθεί στην αρχή της φειδωλότητας : το προϊόν ενός μόνο γονιδίου αρκεί (μέσω της απλής επανάληψης του) για την δημιουργία μίας υπερδομής. Στην περίπτωση της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας, δεν είναι μόνο οι εγγενώς ελικοειδείς δομές που μελετούνται : σε πολλές περιπτώσεις απόπειρες για τη δημιουργία δισδιάστατων κρυστάλλων οδηγούν (απρόσμενα συνήθως) σε ελικοειδείς δομές.

Ελικοειδής επανασύσταση

Για επανασύσταση από ηλεκτρονιοφωτογραφίες συνήθως χρησιμοποιούνται δυο κατηγορίες ελικοειδών δομών : ινίδια και σωληνίσκοι. Η διαφορά τους είναι ότι στην περίπτωση των σωληνίσκων τα μακρομόρια διευθετούνται στην επιφάνεια ενός εσωτερικά κενού κυλίνδρου (ο χώρος που δημιουργείται στο εσωτερικό του κυλίνδρου μπορεί κάλλιστα να έχει βιολογική σημασία, π.χ. ελικοειδείς ιοί).

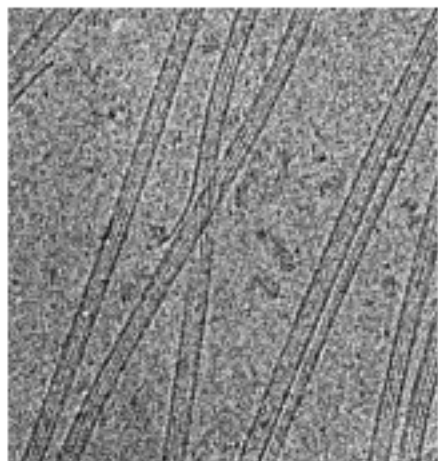
Ελικοειδής επανασύσταση

Ινίδια



Ελικοειδής επανασύσταση

Ινίδια



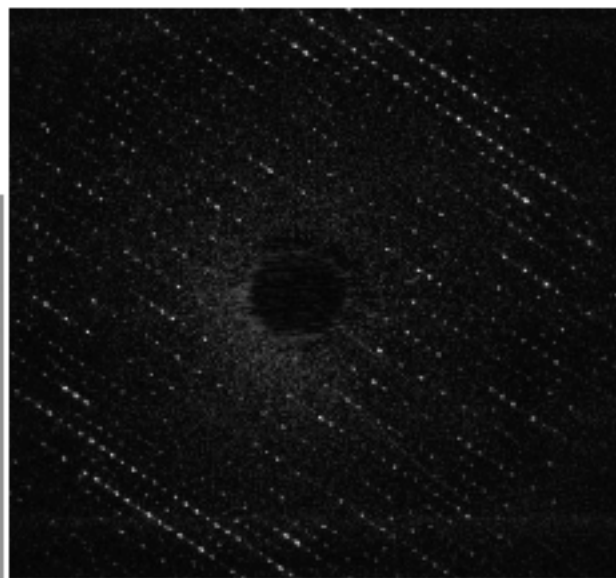
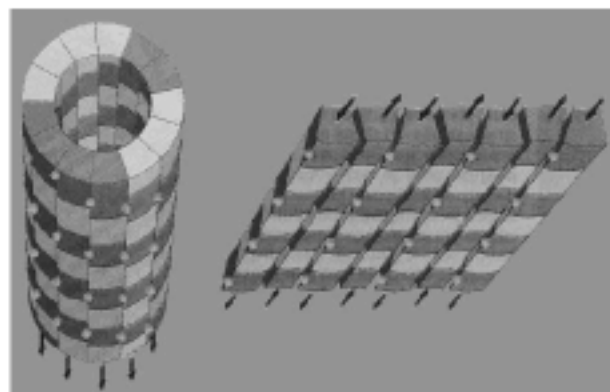
Ελικοειδής επανασύσταση

Ινίδια



Ελικοειδής επανασύσταση

Σωληνίσκοι και μετατροπή τους σε 2D κρυστάλλους



Ελικοειδής επανασύσταση

Η διαδικασία της επανασύστασης από ελικοειδείς δομές γίνεται μέσω του φάσματος περίθλασης τους. Η θεωρία της περίθλασης από ελικοειδείς δομές αναπτύχθηκε από τον F.H.C.Crick (και ήταν αυτή που του επέτρεψε να προσδιορίσει την δομή του DNA).

Η ανάπτυξη της θεωρίας προϋποθέτει μια οικειότητα με τους μετασχηματισμούς Fourier και συνεπώς η παρουσίαση της ανήκει στα πλαίσια των ειδικών κεφαλαίων της δομικής.

Ελικοειδής επανασύσταση

Σωληνίσκοι και διάγραμμα περίθλασης

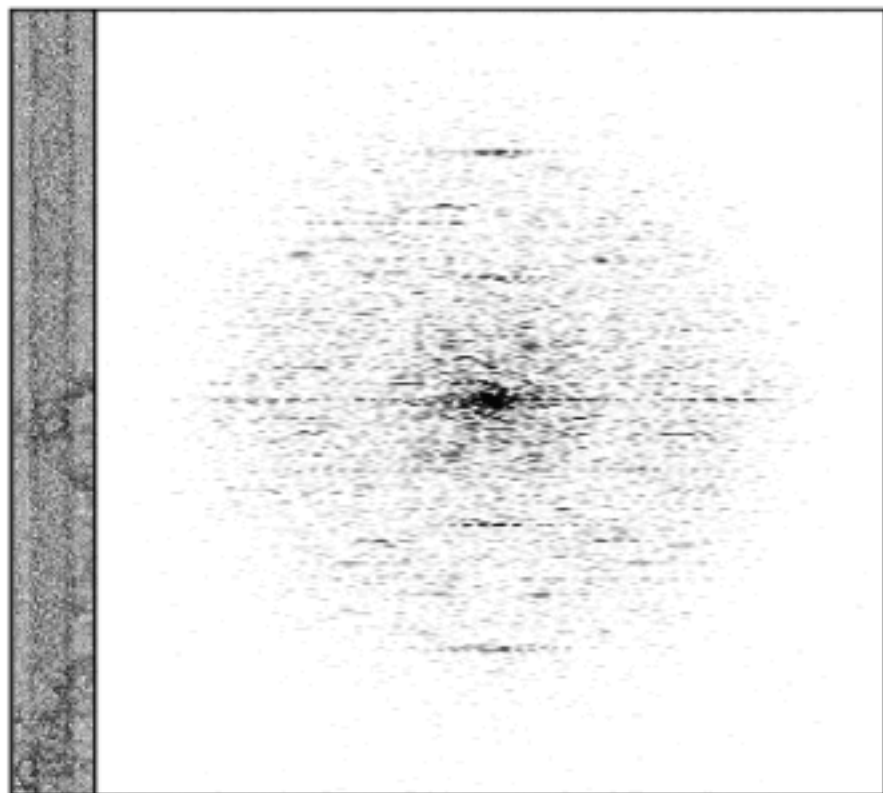
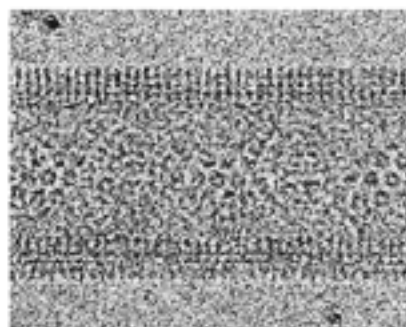
ΔΕΙΓΜΑ ΣΕ ΠΑΓΟ



ΑΡΝΗΤΙΚΗ ΧΡΩΣΗ



ΣΚΙΑΣΗ



Ελικοειδής επανασύσταση

Τα κυρίως πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι δίδει ισότροπα δεδομένα (σε αντίθεση με την επανασύσταση από κρυστάλλους). Αυτό σημαίνει ότι τα δεδομένα (ηλεκτρονιοφωτογραφίες) περιέχουν πληροφορία για όλες τις προβολές του μορίου.

Μειονεκτήματα :

- Λόγω των αδύναμων δεδομένων, της αλληλοεπικάλυψης των μορίων και των διορθώσεων που απαιτούνται για τυχόν παραμορφώσεις των σωληνίσκων, η διακριτικότητα είναι σχετικά χαμηλή (~8Å).

Επανασύσταση: κρύσταλλοι

Καλά οργανωμένοι δισδιάστατοι κρύσταλλοι είναι το ιδανικό δείγμα για τον προσδιορισμό δομών με ηλεκτρονική μικροσκοπία. Η επανασύσταση βασίζεται στην περίθλαση από περιοδικές δομές (τους δισδιάστατους κρυστάλλους) για την ανάκτηση του ειδώλου των διαφόρων προβολών, και στην χρήση του θεωρήματος των προβολών για την ανάκτηση της τρισδιάστατης δομής από τις προβολές της.

Υπάρχουν δύο βασικές διαδικασίες επανασύστασης ανάλογα με το εάν χρησιμοποιείται αρνητική χρώση (πειράματα χαμηλής διακριτικότητας) ή κρύο-ηλεκτρονική μικροσκοπία (υψηλή διακριτικότητα).

Επανασύσταση: κρύσταλλοι

Κρύο-ηλεκτρονική μικροσκοπία

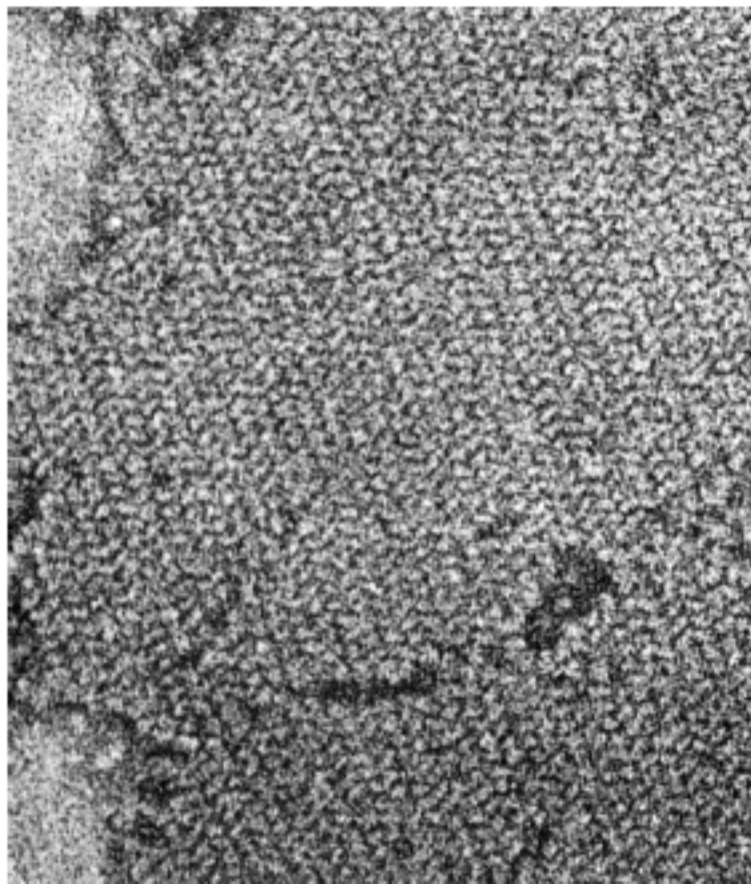
Σε αυτή την περίπτωση ο προσδιορισμός των πλατών των περιθλώμενων κυμάτων γίνεται μέσω ενός πειράματος περίθλασης ηλεκτρονίων ακριβώς όπως παρουσιάστηκε στην προηγούμενη διάλεξη. Για τον προσδιορισμό των φάσεων, καταγράφεται ένα είδωλο των κρυστάλλων, από αυτό το είδωλο προσδιορίζονται (υπολογιστικά) οι φάσεις των περιθλώμενων κυμάτων, και τέλος, τα πλάτη (από το πείραμα περίθλασης) και οι φάσεις (από το είδωλο) συνδυάζονται για την ανάκτηση ενός ειδώλου υψηλότερης ποιότητας απ'ότι θα ήταν εφικτό από το είδωλο μόνο του.

Επανασύσταση: κρύσταλλοι

Αρνητική χρώση

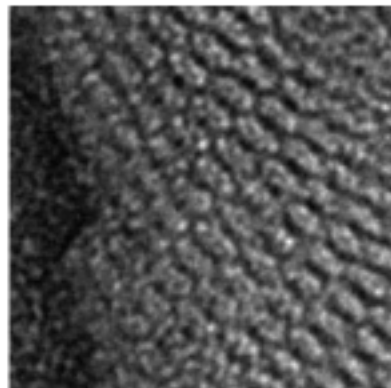
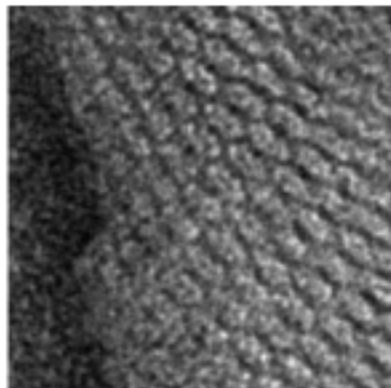
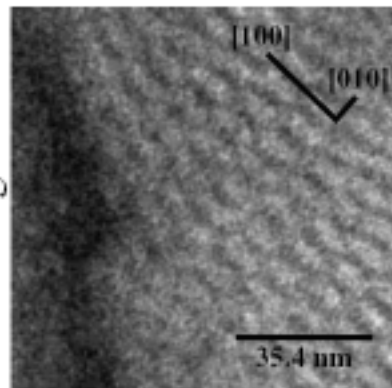
Σε αυτή την περίπτωση η περίθλαση χρησιμοποιείται ως μέσο ενίσχυσης του σήματος. Η βασική αρχή είναι ότι ο τυχαίος θόρυβος είναι (ταυτολογικά) μη περιοδικός, και συνεπώς σε ένα φάσμα περίθλασης συνεισφέρει ομοιόμορφα σε όλη την έκταση του φάσματος. Αντίθετα, το περιοδικό σήμα συνεισφέρει μόνο σε συγκεκριμένα σημεία του φάσματος. Επιλέγοντας μόνο την πληροφορία που περιέχεται στο περιοδικό τμήμα του φάσματος αυξάνει σημαντικά το λόγο σήματος/θορύβου στο τελικό είδωλο.

Επανάσταση: κρύσταλλοι

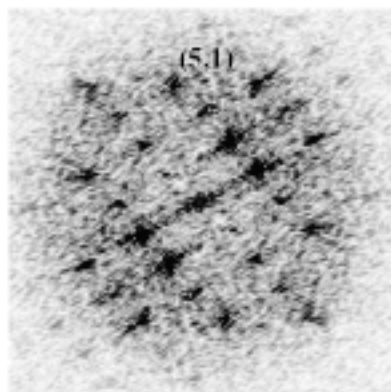
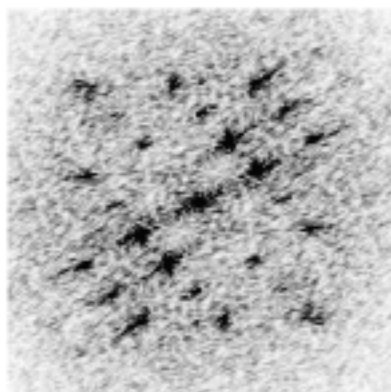
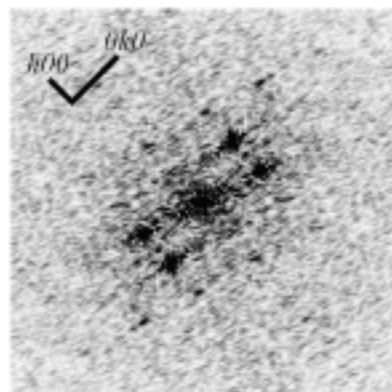


Επανάσταση: κρύσταλλοι

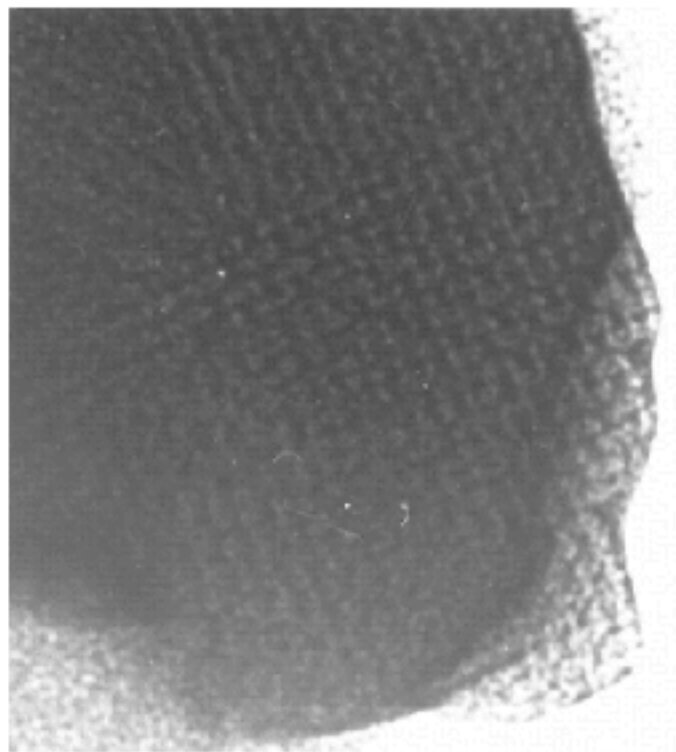
Images



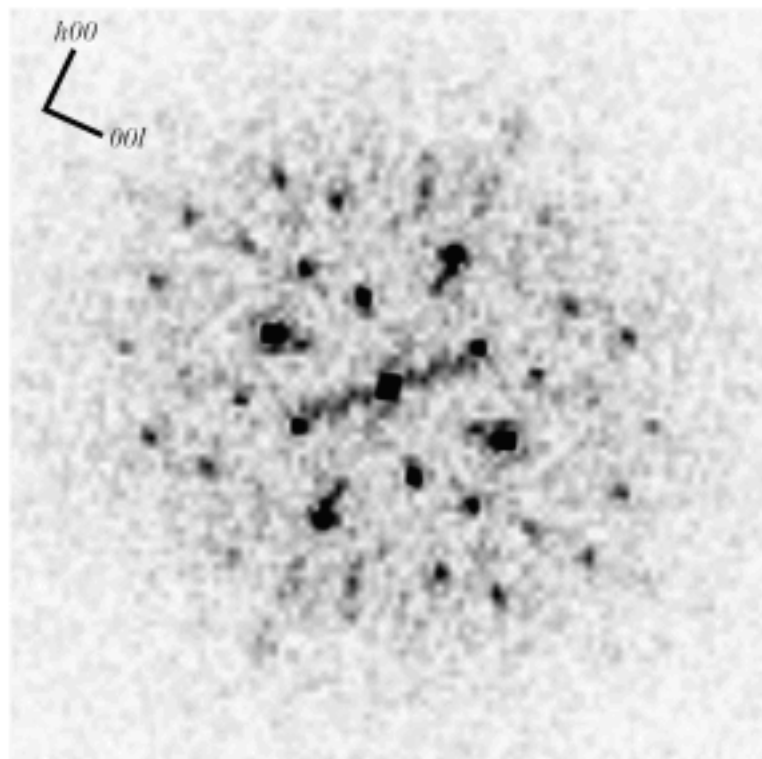
Fourier transforms



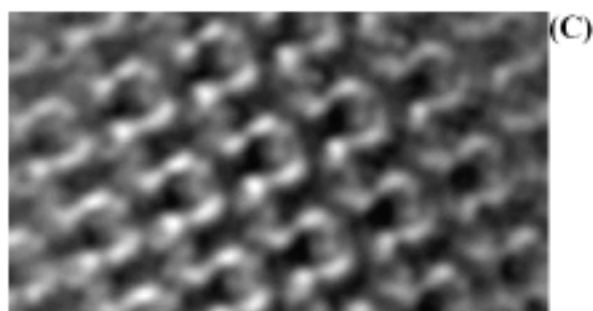
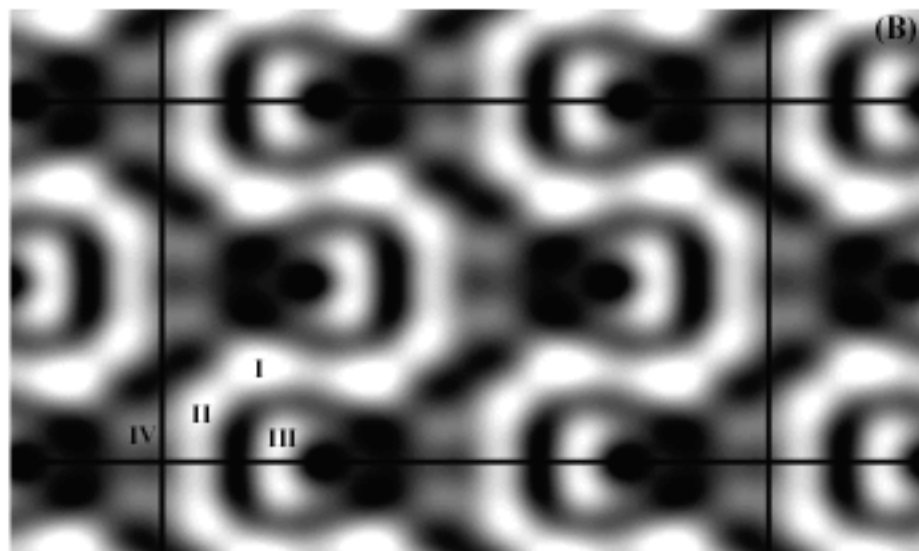
Επανάσταση: κρύσταλλοι



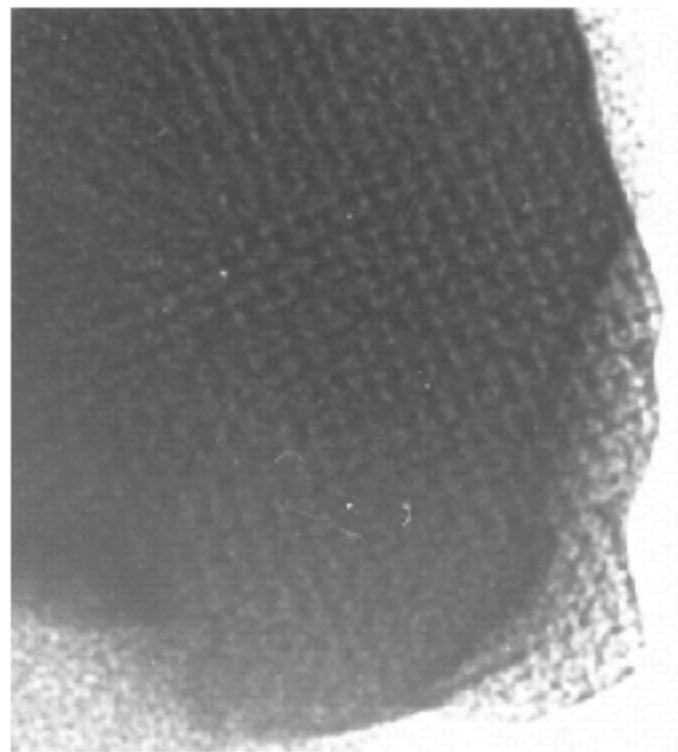
Επανάσταση: κρύσταλλοι



Επανάσταση: κρύσταλλοι



Επανάσταση: κρύσταλλοι



Επανασύσταση: κρύσταλλοι

Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η δυννητικά υψηλότερη διακριτικότητα που προσφέρει σε σχέση με τις άλλες μεθόδους (μέχρι $\sim 3A$). Αυτό είναι συνέπεια της ύπαρξης ισχυρότερων και ακριβέστερων δεδομένων (λόγω περίθλασης).

Τα βασικά μειονεκτήματα είναι :

- Η απαίτηση για καλά οργανωμένους δισδιάστατους κρυστάλλους.
- Η ανισοτροπία των δεδομένων λόγω του 'τυφλού' κώνου δεδομένων.