

Transmissionselektronenmikroskopie

Soft Matter und Biophysik: Experiment und Theorie

Markus Stabrin

Fakultät für Physik
Technische Universität Dortmund

11. Dezember 2014

- 1 Geschichtlicher Verlauf
- 2 Pro/Kontra
- 3 Rückblick Proteine
- 4 Transmissionenelektronenmikroskop
- 5 Kontrast
 - Kontrastentstehung
 - Kontrastierungsmethoden
- 6 Einzelpartikelanalyse

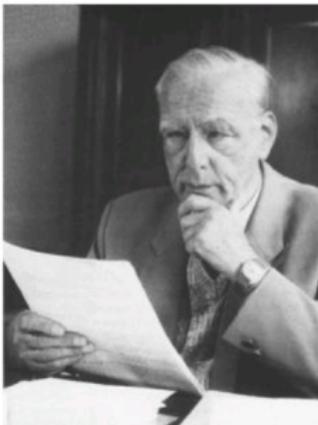
Elektronenmikroskopie

- 17. Jahrhundert erstes Mikroskop (verstellbare Linse, 40x-240x)
- Mitte 19. Jahrhundert erste Industrielle Herstellung
- 1927 Ernst Ruska legt erste Grundsteine.
- 1931 Nachweis, dass Objekte in zwei Stufen vergrößert abgebildet werden können.
- 1933 Erstes, funktionsfähiges EM (Übermikroskop)



Elektronenmikroskopie

- 1939 erstes Seriengerät mit hoher Bedienungsfreundlichkeit
- 1960 Erstmals atomare Auflösung
- 1986 Nobelpreis Physik Ernst Ruska
- 1990 Einsatz von Computern
- 2005 Vollautomatische Bildaufnahme



Cryo-TEM

- 1940 Eis ist nicht Vitrifizierbar
- 1960 Erste Forschung an Vitrifiziertem Eis
- 1974 Erste mit Stickstoff eingefrorene Probe
- 1980 Vitrifizierung mit Ethan
- 1986 3.5nm 3D Modell eines Virus

„you cannot bend nature“

Geschichtlicher Verlauf

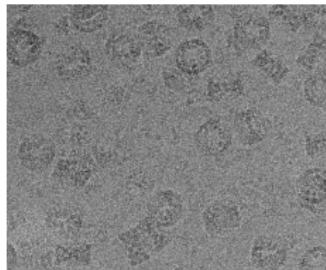


Pro Kryo-TEM

- Hohe Auflösung bei Größen von 0.5 MDa – 100 MDa
- Native Konformation wird beibehalten
- Schnelles lösen von groben Strukturen

Kontra Kryo-TEM

- Probleme bei Größen von 0.1 MDa – 0.5 MDa
- Maximale Auflösung 2 Å – 3 Å
- Sehr viele Partikel voneinander

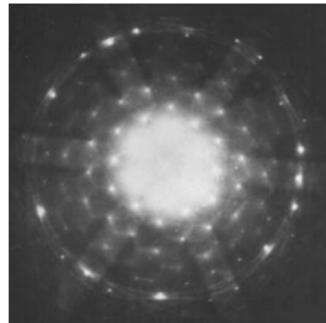


Pro Kristallographie

- Atomare Auflösung
- „Einfaches“ Lösen der Primärstruktur

Kontra Kristallographie

- Nicht alle Proben sind leicht zu kristallisieren
- Keine Aussage über die native Konformation
- Zerstörung der Struktur

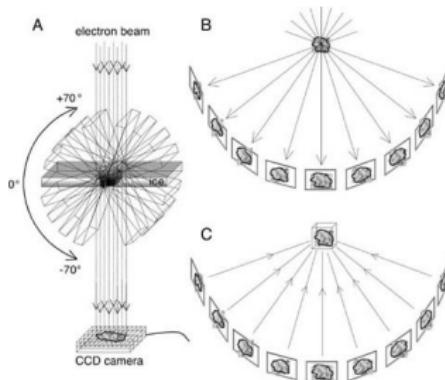


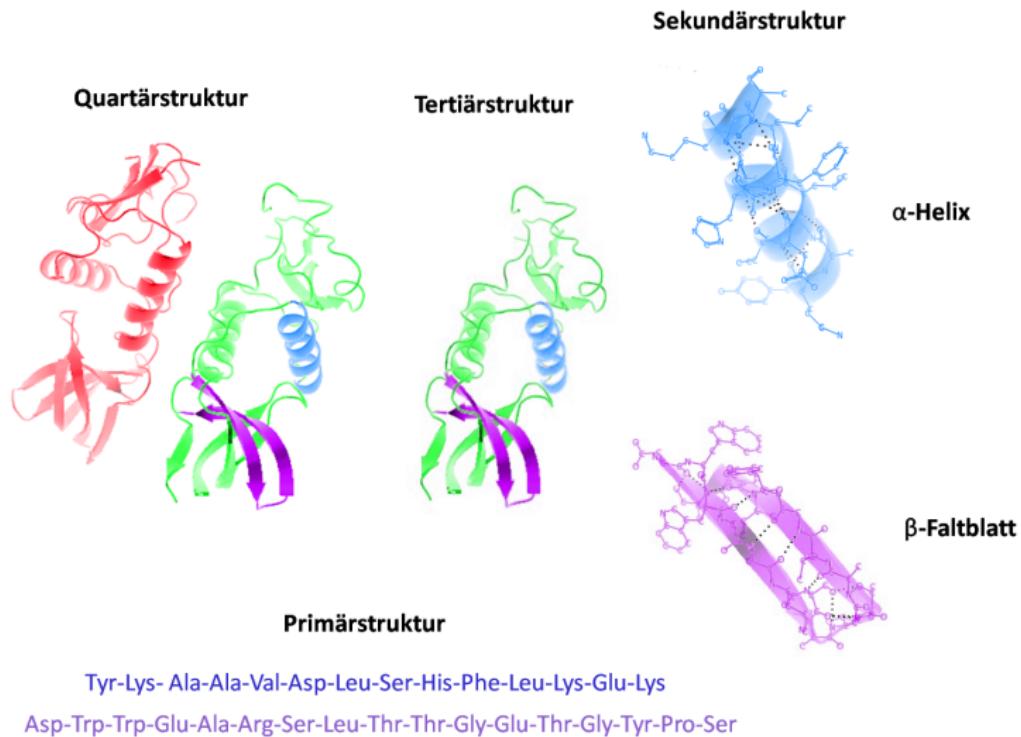
Pro Tomographie

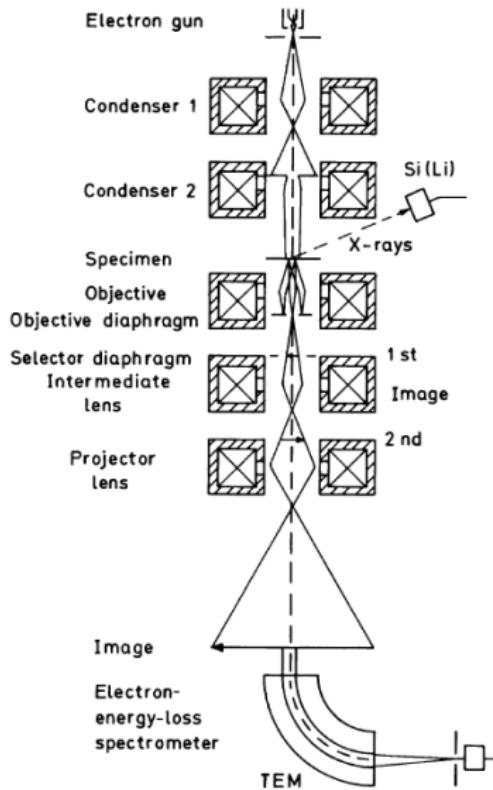
- Bekannte Projektionsparameter
- Geeignet für Zellen oder Organellen

Kontra Tomographie

- Zerstört leicht biologische Proben
- Nicht alle Raumwinkel abdeckbar

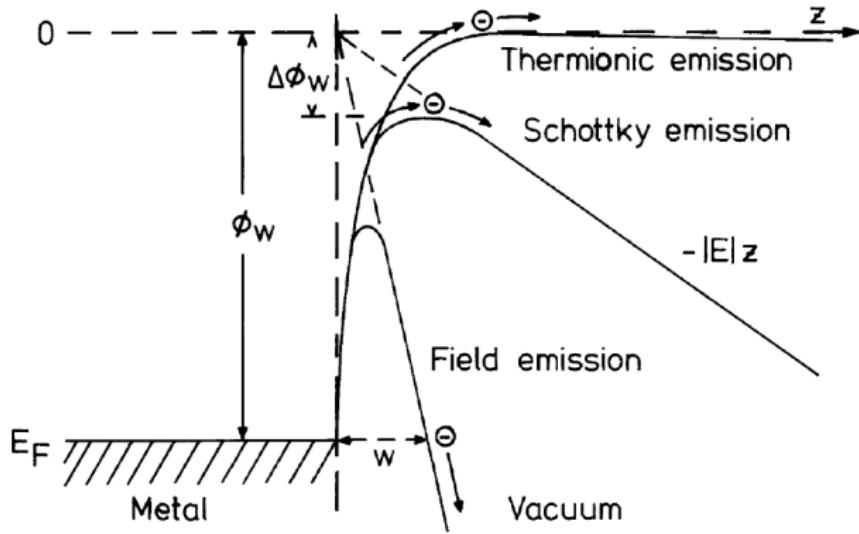






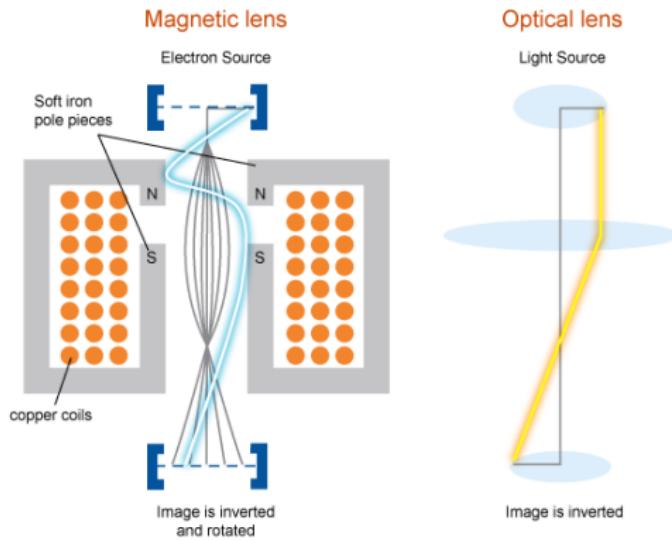
Elektronenquelle

- Thermische Elektronen
- Schottky-Diode
- Feldemissionsquelle



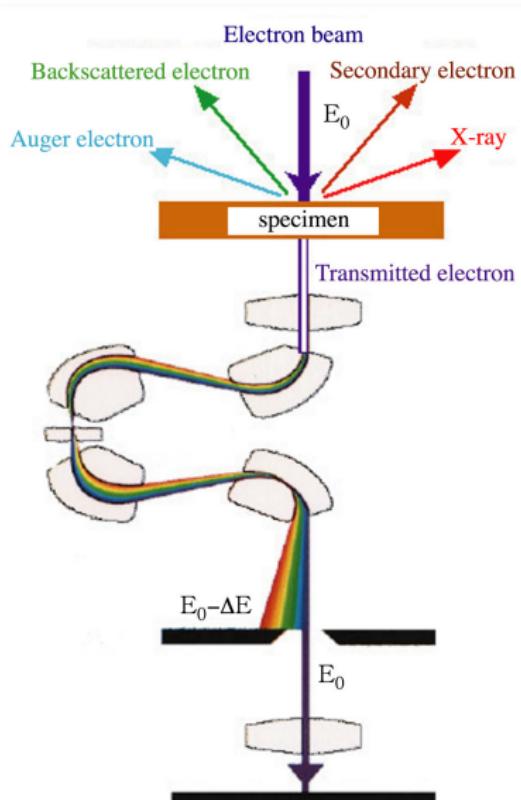
Linsen

- Kondensorsystem
- Objektsystem



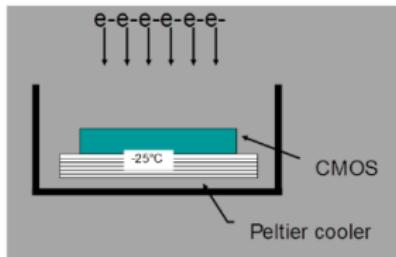
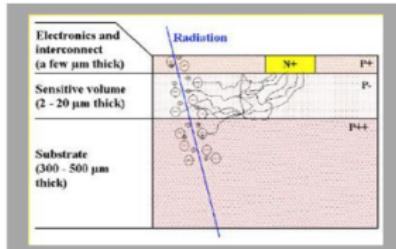
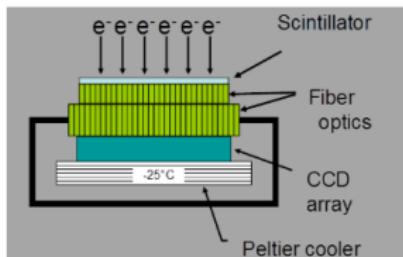
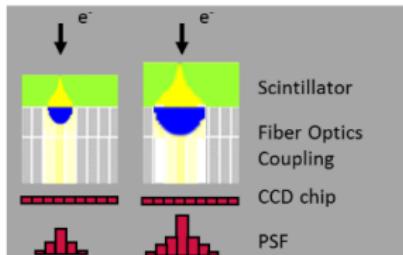
Filter

- Kontrastblenden
- Omega Energiefilter



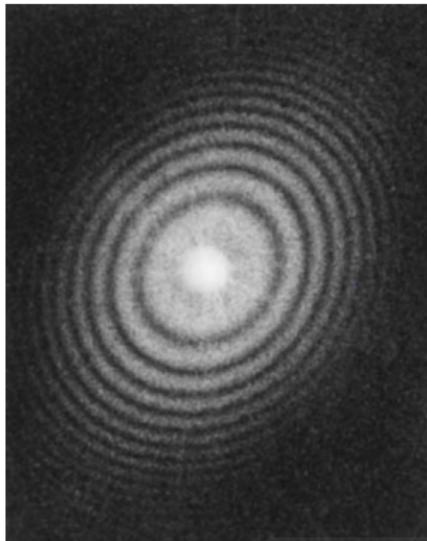
Detektoren

- Fluoreszenzschirm
- CCD - Kameras
- Direkte Elektronen Detektion



Bildfehler

- Drift
- Astigmatismus (Objekt, Kondensor)
- Rauschen



Auflösungsvermögen

- Wellenlänge
- Abbe Kriterium
- Größe der Pixel
- Bildfehler

$$\text{Auflösung}_{\max} = 2 \cdot \frac{\text{Pixelgröße}}{\text{Vergrößerung}}$$

Amplitudenkontrast

- Elastische Streuung der Elektronen
- Stark gestreute Elektronen werden nicht detektiert
- Kontrast im Realraum

Phasenkontrast

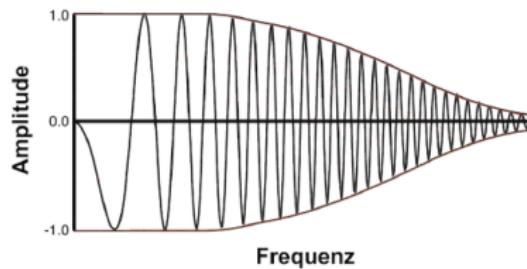
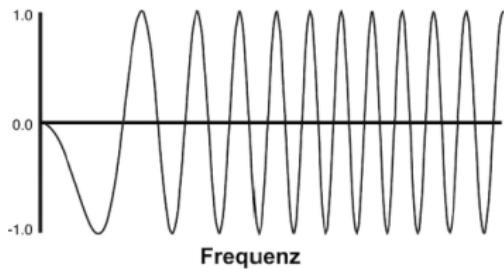
- Elastisch und inelastische Streuung der Elektronen
- Phasenverschiebung der Elektronenwellen
- Kontrast im Fourierraum

Kontrast-Transfer-Funktion

- Verbindung zwischen Amplitudenkontrast und Phase

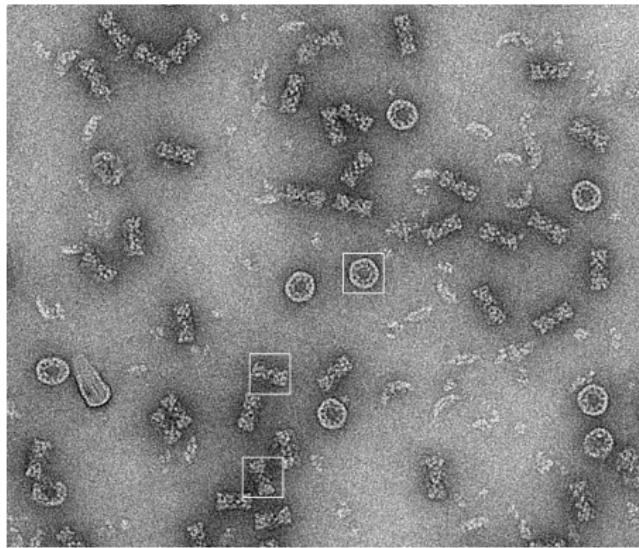
$$\text{KTF}(\vec{k}) = \sqrt{1 - A^2} \cdot \sin(\gamma(\vec{k})) + A \cdot \cos(\gamma(\vec{k}))$$

$$\gamma(\vec{k}) = -\frac{\pi}{2} C_s \lambda^3 |\vec{k}|^4 + \pi \lambda z(\theta) |\vec{k}|^2$$



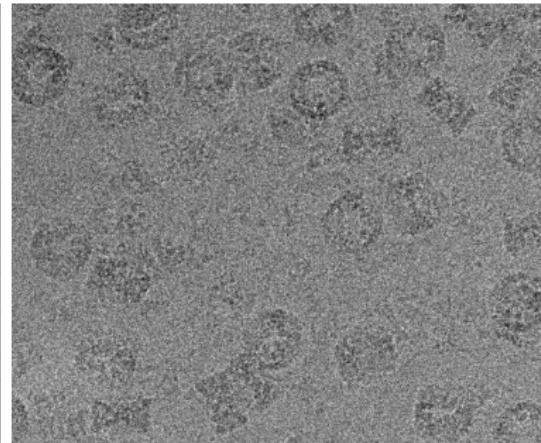
Negativkontrastierung

- Schwermetalllösung
- Hoher Kontrast
- Deformation der Probe



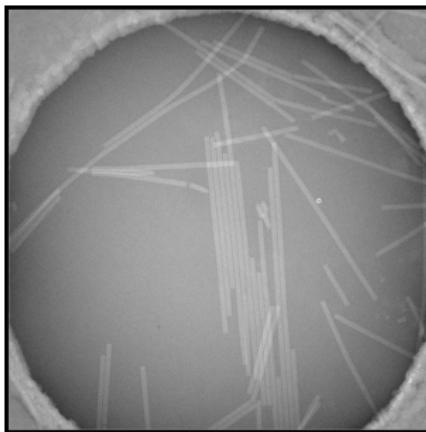
Kryo-Fixierung

- Wasserlösung
- Geringer Kontrast
- Erhalt der Konformation

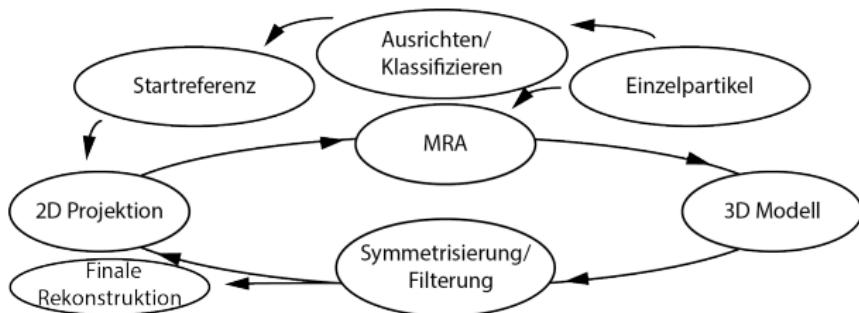
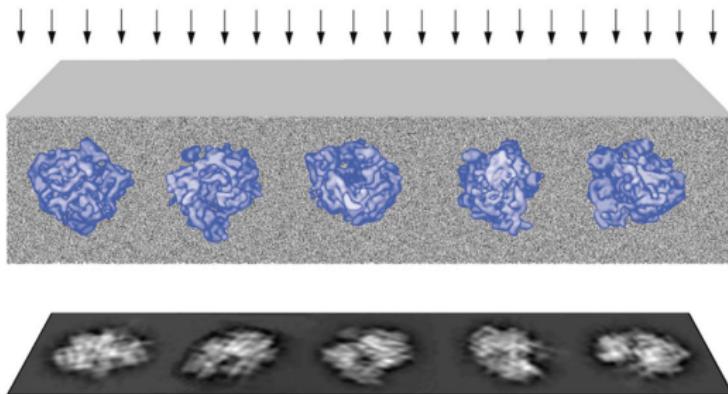


Cryo-Negativkontrastierung

- Schwermetalllösung
- Vitrifizierung
- Beobachtung kleiner Komplexe
- Keine normale Umgebung der Probe

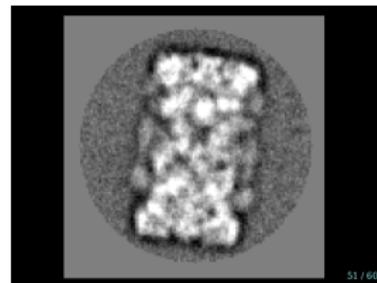
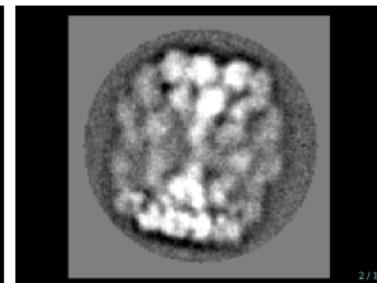
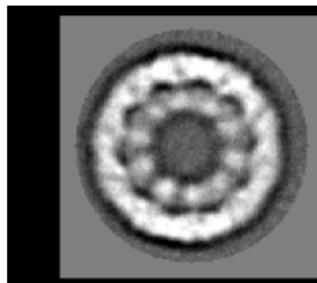


Einzelpartikelanalyse



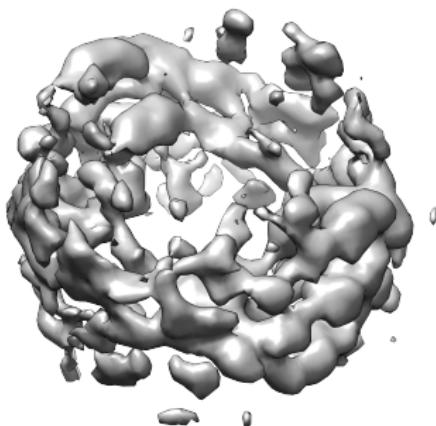
Auswahl und Klassifizierung

- Manuelle Auswahl der Partikel
- Gleiche Ausrichtung aller Partikel
- Klassifizierung



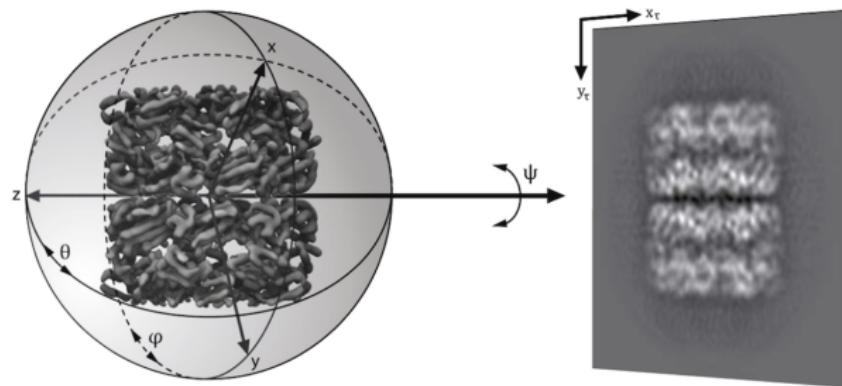
Erste Rekonstruktion

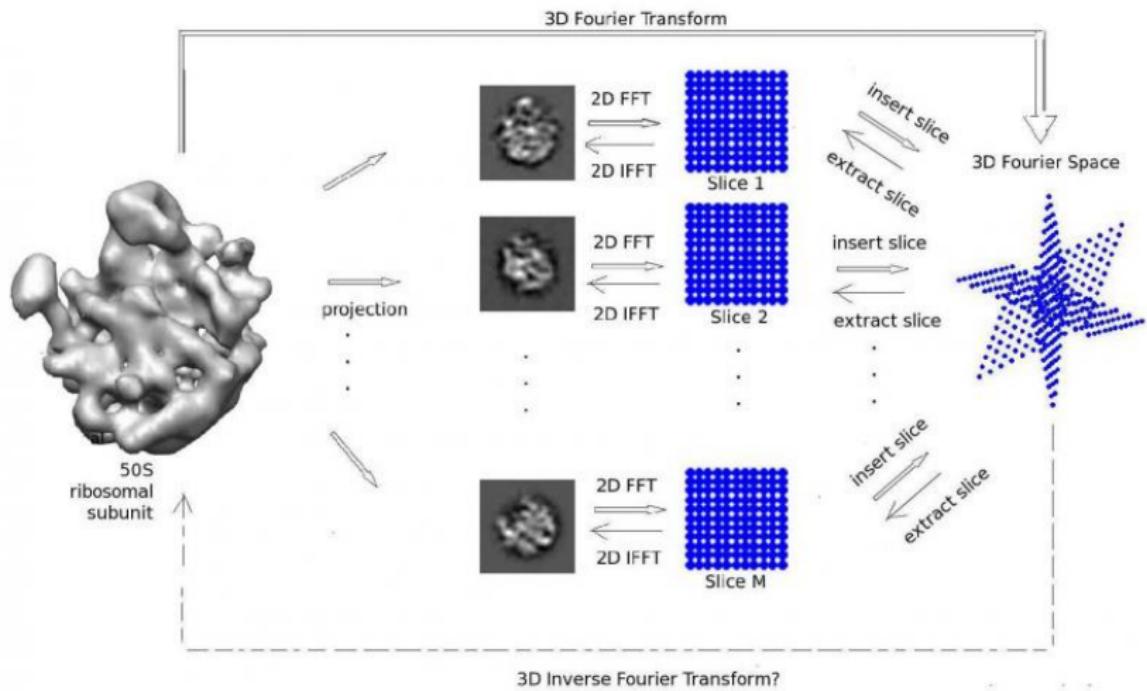
- Klassensummen als Projektionen
- Startmodell aus Gaußschem Rauschen
- Kreuzkorrelation



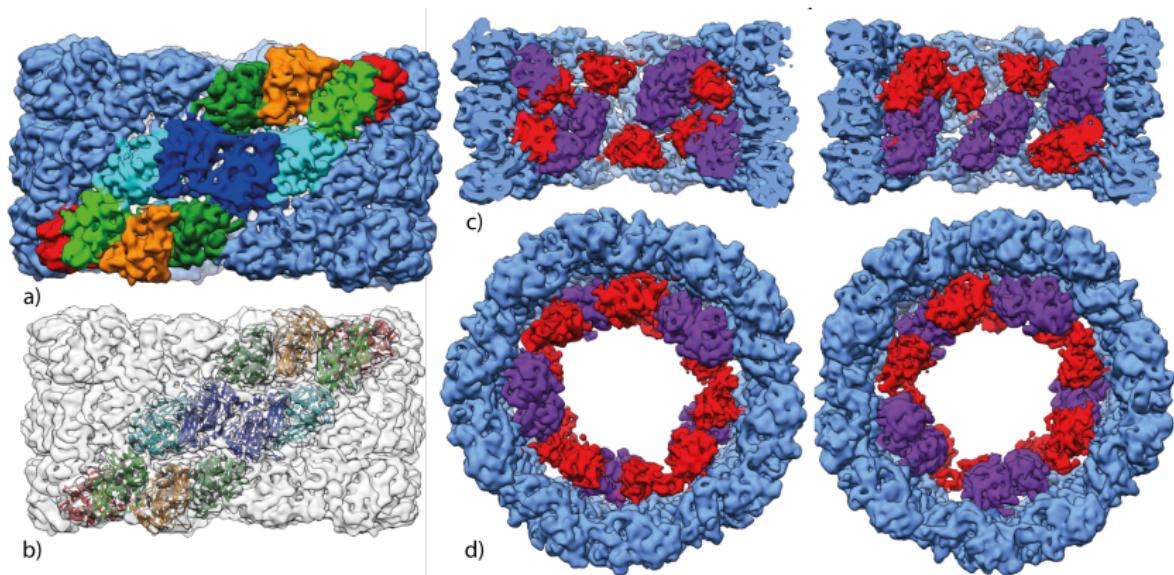
3D Refinement

- Simulation von 2D Projektionen
- Vergleich und Ausrichtung der Partikel
- Radon Transformation





Einzelpartikelanalyse



-  LI, X., MOONEY, P., ZHENG, S., BOOTH, C., BRAUNFELD, M., GUBBENS, S., AGARD, D., AND CHENG, Y., '*Electron counting and beam-induced motion correction enable near-atomic-resolution single-particle cryo-EM*', Nature Methods, Vol. 10(6):584-593 (2013)
-  PENCZEK, P., '*Fundamentals of three-dimensional reconstruction from projections*', Methods Enzymol, Vol. 482:1-33 (2010)
-  BR DOKU, '*Meilensteine der Naturwissenschaft und Technik- Ernst Ruska und das Elektronenmikroskop*'
-  DUBOCHET, J., '*Cryo-EM - the first thirty years*', Journal of Microscopy, Vol. 245:221-224 Pt 3 (2012)
-  SCHERZER, O., '*The Theoretical Resolution Limit of the Electron Microscope*', Journal of Applied Physics, Vol. 20:20 (1949)
-  ORLOVA, E.V., SAIBIL, H.R., '*Structreue Analysis of Macromolecular Assemblies by Electron Microscopy*', Chemical Reviews, Vol. 111:7710-7748 (2011)
-  REIMER, L., KOHL, H., '*Transmission Electron Microscopy*', Physiscs of Image Formation, Springer, Vol. 5 (2008), ISBN:978-0-387-40093-8

-  [Geschichte S.1] , 'http://www.musoptin.com/literatur/zeiss_1889_stativla_1.jpg', 10.12.14
-  [Geschichte S.2] , '<http://www.amuseum.de/MikSchaffhaus/Folie50.JPG>', 10.12.14
-  [Geschichte S.4] , '<http://www.jeolusa.com/portals/2/prodshots/EO/jem-3200fsc.jpg>', 10.12.14
-  [Pro/Kontra S.2] REIMER, L., KOHL, H., '*Transmission Electron Microscopy*', Physicscs of Image Formation, Springer, Vol.5:324 (2008), ISBN:978-0-387-40093-8
-  [Pro/Kontra S.3] , '<http://www.ana.unibe.ch/exmo/bilder/figure3.jpg>', 10.12.14
-  [Protein] , '<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/2/20/Protein-Struktur.png>', 10.12.14
-  [TEM S.1] REIMER, L., KOHL, H., '*Transmission Electron Microscopy*', Physicscs of Image Formation, Springer, Vol.5:2 (2008), ISBN:978-0-387-40093-8
-  [TEM S.2] REIMER, L., KOHL, H., '*Transmission Electron Microscopy*', Physicscs of Image Formation, Springer, Vol.5:78 (2008), ISBN:978-0-387-40093-8
-  [TEM S.3] , 'http://www.ammrf.org.au/myscope/images/tem/tem_magneticlens_vs_optical.png', 10.12.14
-  [TEM S.5] , '<http://www.museum.kyushu-u.ac.jp/publications/PP/PP2002/06/06-e-1.jpg>', 10.12.14
-  [TEM S.6] , 'http://www.fei.com/uploadedImages/FEISite/Pages/Products/Specialty_Products/Metrios/Models/falcon-II-CCD-CMOS_003_960x.png', 10.12.14

-  [Kontrast S.2] BEHRMANN, E., '*Structure of the Actin/Tropomyosin/Myosin Rigor Complex as Revealed by Cryo-Electron Microscopy*', 2012
-  [Kontrast S.6] , '<https://www.mcb.ucdavis.edu/cryoem/images/tmvncns.jpg>', 10.12.14
-  [EPA S.1 Oben] FRANK, J., '*Single-particle imaging of macromolecules by cryo-electron microscopy*', Annu Rev Biophys Biomol Struct, Vol.31:303-19 (2002)
-  [EPA S.4] BEHRMANN, E., '*Structure of the Actin/Tropomyosin/Myosin Rigor Complex as Revealed by Cryo-Electron Microscopy*', 2012
-  [EPA S.5] , '<http://spr.math.princeton.edu/sites/spr.math.princeton.edu/files/u4/inversion.jpg>', 10.12.14
-  [Anhang] , '<http://labsoft.pl/wordpress/wp-content/uploads/2013/08/Titan-krios1.jpg>', 10.12.14

Vielen Dank für Ihre Aufmerksamkeit!

