

КРАТКОЕ СООБЩЕНИЕ



УДК 577.322.54

Криоэлектронная микроскопия на биологическом факультете МГУ имени М.В. Ломоносова

А.В. Моисеенко¹ , А.М. Егоров², К.В. Шайтан³ , О.С. Соколова^{3,*}

¹Общесекундарная лаборатория электроннои микроскопии, биологический факультет,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Россия, г. Москва, 119234, Ленинские горы, д. 1, стр. 32;

²Кафедра химической энзимологии, химический факультет, Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова, Россия, г. Москва, 119234, Ленинские горы, д. 1, стр. 11;

³Кафедра биоинженерии, биологический факультет, Московский государственный университет
имени М.В. Ломоносова, Россия, г. Москва, 119234, Ленинские горы, д. 1, стр. 73

*e-mail: sokolova@mail.bio.msu.ru

Продемонстрирован пример успешной модернизации аналитического просвечивающего электронного микроскопа JEOL JEM-2100 до криоэлектронного микроскопа низкого разрешения, предназначенного для решения задач отработки пробоподготовки и оценки качества препарата. В результате модернизации прибор позволяет получать субнанометровое разрешение реконструкций белковых молекул (в пределах 8 Å). Обсуждается влияние подложек из графена и аморфного углерода для предотвращения эффекта преимущественной ориентации белковых частиц в замороженном образце.

Ключевые слова: криоэлектронная микроскопия, структурная биология, анализ единичных частиц, модернизация оборудования, структура, вирус, нуклеосома

DOI: 10.55959/MSU0137-0952-16-78-3S-9

Введение

Криоэлектронная микроскопия (криоЭМ) наряду с рентгеноструктурным анализом и спектроскопией ядерно-магнитного резонанса (ЯМР) является одним из основных методов в структурной биологии. На сегодняшний момент криоЭМ позволяет получать экспериментальные данные о трехмерной организации биологических макромолекул с атомным разрешением [1, 2]. КриоЭМ интенсивно развивается с 2013 г. благодаря появлению быстрых детекторов прямой регистрации электронов (Direct Detector). Количество атомных структур в Protein Data Bank, получаемых ежегодно с помощью криоЭМ, растет в геометрической прогрессии [3], а в 2017 г. создатели основных методов криоЭМ были удостоены Нобелевской премии [4]. КриоЭМ позволяет исследовать макромолекулы, комплексы макромолекул, вирусные частицы и клеточные структуры в нативном состоянии, в то время как другие методы имеют в этой области серьезные ограничения [5].

Для получения экспериментальных данных с высоким разрешением в криоЭМ необходим

просвечивающий криоэлектронный микроскоп, обладающий следующими особенностями. Прежде всего, такой микроскоп должен иметь возможность непрерывно поддерживать температуру образца ниже -170°C в течение всего эксперимента [6]. В противном случае, в аморфном льду начнется кристаллизация, в результате которой рассеяние электронов на кристаллах льда затруднит получение изображений исследуемых объектов, а сами объекты могут потерять нативную структуру. Также в течение всего эксперимента образец должен быть изолирован от атмосферной влаги во избежание ее конденсации на поверхности холодного препарата. Для этого вся пробоподготовка проводится либо в жидком азоте, либо вблизи его поверхности, а вакуумная система микроскопа должна поддерживать давление ниже 10^{-5} Па в течение всего эксперимента [7]. Дополнительно для предотвращения конденсации вблизи объекта в криоэлектронном микроскопе расположены криосорбционные пластины, охлаждаемые жидким азотом до более низкой температуры, чем образец.

Второй особенностью высокоразрешающего криоэлектронного микроскопа является быстрый детектор электронов в сочетании с системой контроля дозы облучения образца [8]. Биологические препараты чрезвычайно чувствительны к облучению электронами, поэтому даже небольшая электронная доза приводит к существенным радиационным повреждениям [9–11]. Эти повреждения выражаются как в ухудшении потенциально возможного разрешения трехмерной реконструкции за счет разрушения макромолекул, так и в смещениях образца во время съемки изображений. Детекторы прямого обнаружения электронов (Direct Electron Detectors) позволяют решить обе эти проблемы, снимая с каждого поля зрения последовательности изображений в режиме низкой дозы с очень короткой выдержкой и последующей коррекцией смещений. Специальное программное обеспечение, сочетая управление микроскопом и детектором, позволяет автоматизировать эксперимент для получения больших наборов данных [12].

Для получения данных с высоким разрешением микроскоп должен быть оснащен источником электронов с полевой эмиссией: холодным катодом или катодом Шоттки для обеспечения высокой пространственной и энергетической когерентности электронного пучка, для возможности снимать изображения при типичных для криоЭМ значениях дефокуса от $-0,5$ до $-3,0$ мкм. Также микроскоп должен иметь высокое ускоряющее напряжение: 200 или 300 кВ [13].

Подготовка препаратов для криоЭМ может представлять существенные сложности, требующие специальной пробоподготовки для получения требуемого результата [14]. В связи с этим высокоразрешающий микроскоп целесообразно использовать для получения финального набора данных, в то время как отработку пробоподготовки и оценку качества препарата можно производить на более простом приборе. В настоящей работе продемонстрирован пример успешной модификации аналитического просвечивающего электронного микроскопа до криоэлектронного микроскопа низкого разрешения, предназначенного для решения такого класса задач.

Материалы и методы

Модификация просвечивающего электронного микроскопа

Просвечивающий электронный микроскоп JEM-2100 (Jeol, Japan) с ускоряющим напряжением 200 кВ и источником электронов на основе катода из гексаборида лантана (LaB_6) был модифицирован для работы в качестве криоэлектронного микроскопа. Вакуумная система этого микроскопа удовлетворяет минимальным требованиям для криоЭМ: поддерживает вакуум $5 \cdot 10^{-6}$ – 10^{-5} Па

с помощью ионно-геттерного насоса и оснащена криосорбционной ловушкой, что существенно ограничивает темпы нежелательной конденсации на поверхности холодного образца.

Микроскоп в процессе модификации был оснащен криотрансферным объектодержателем Elsa (Gatan, США) позволяющим работать с образцами, охлажденными до криотемператур. Образец закрепляется в атмосфере холодного азота для уменьшения контаминации конденсируемой влагой и безопасно переносится внутрь электронного микроскопа, избегая контакта с атмосферным воздухом и нежелательного нагрева. В процессе эксперимента автоматический контроллер поддерживает температуру образца ниже -170°C для предотвращения девитрификации, перекристаллизации льда.

К микроскопу присоединен детектор прямого обнаружения электронов DE-20 (Direct Electron, США). Он позволяет использовать для записи изображений крайне низкую дозу облучения образца, а также имеет возможность сохранять серии изображений – фреймов – с частотой 32 Гц для последующей коррекции дрейфа. Управление детектором и микроскопом, автоматизация сбора данных в режиме низкой дозы осуществляется с помощью программного обеспечения SerialEM [15].

Прибор дополнен минимальным набором оборудования для пробоподготовки: установкой для витрификации образцов в жидком этане EM GP2 (Leica Microsystems, Германия), а также установкой для обработки подложек тлеющим разрядом EasyGlow (Pelco, США).

Получение криоЭМ изображений и построение реконструкций

Для всех представленных ниже препаратов использовался стандартный подход к витрификации: 3 мкл препарата наносились на стандартную медную сеточку, предварительно обработанную тлеющим разрядом 25 мА в остаточной атмосфере в течение 30 с в приборе EasyGlow (Pelco, США). Для препаратов вирусных частиц AR9 и инаktivированного вируса клещевого энцефалита использовались сеточки 300 mesh с дырчатой углеродной подложкой Lacey. Для препаратов нуклеосом были использованы сеточки с дырчатой подложкой Quantifoil R1.2/1.3 (Quantifoil, Германия), а также сеточки с дополнительно нанесенным слоем оксида графена по описанной ранее методике [16]. Для препаратов РНК-полимеразы использовались сеточки 300 mesh Lacey со слоем ультратонкого углерода толщиной 3–5 нм.

После нанесения образец инкубировался 30 с в климатической камере установки для витрификации EM GP2 при температуре 4°C и относительной влажности 95%. Затем каплю необходимо было промокнуть фильтровальной бумагой

Whatman #1 и немедленно заморозить в жидком этане при температуре -180°C . После переноса (криотрансфера) в криоэлектронный микроскоп JEM-2100 производилась серийная съемка с дефокусом в диапазоне от $-0,5$ до $-3,0$ мкм, с суммарной дозой на изображение в диапазоне $50\text{--}100\text{ е/}\text{\AA}^2$.

Результаты и обсуждение

С помощью метода криоЭМ были получены несколько наборов данных, характеризующих возможности модифицированного микроскопа. Эти наборы включают в себя как отдельные микрографии, позволяющие изучать морфологические особенности препаратов в нативном виде, так и серии изображений для анализа единичных частиц и трехмерной реконструкции.

Для препаратов гигантского бактериофага AR9 были получены отдельные микрографии, позволившие подтвердить сохранность вирионов перед проведением эксперимента на высокоразрешающем криомикроскопе. Подтверждено наличие отдельных штопорообразных фибрилл (рис. 1А), что позволит сравнить их структуру с опубликованной ранее реконструкцией с низким разрешением [17].

Построена трехмерная реконструкция инактивированных вирионов вируса клещевого энцефалита, используемых в качестве вакцины (рис. 1Б). Произведен анализ гетерогенности препарата, подтверждена сохранность более чем 95% вирусных частиц [18]. Разрешение карты плотности, полученной из 5 тыс. проекций отдельных ча-

стиц, составляет 8 \AA , что позволило встроить в плотность атомные модели для Е и М белков — структурных компонентов оболочки вируса (PDB5O6A) [19]. Таким образом визуализирована общая структурная организация оболочек инактивированных вирионов, которая в данном случае не отличается от нативных вирусов.

Продемонстрирована возможность использования микроскопа для скрининговых исследований отдельных белковых частиц. В частности, получены трехмерные реконструкции для нуклеосомы (рис. 2А) и для РНК-полимеразы *Escherichia coli* (рис. 2В), в которые вписаны модели PDB 3LZ0 и 7МКР соответственно [20, 21]. Реконструкции построены из 13 тыс. проекций отдельных частиц в случае нуклеосомы и из 35 тыс. проекций в случае РНК-полимеразы. В обоих случаях построение трехмерной реконструкции позволило выявить особенности при подготовке образцов и оптимизировать параметры витрификации. Одной из серьезнейших проблем для получения высоко разрешающих реконструкций в криоЭМ является предпочтительная ориентация [22]. В случае заморозки нуклеосом их адгезия к границе раздела жидкость-газ приводит к появлению предпочтительной ориентации, в результате которой в наборе данных оказываются представлены проекции только вдоль оси сверхспирали. Для решения этой проблемы были изготовлены поддерживающие подложки из оксида графена и оптимизированы параметры заморозки. Большинство нуклеосом электростатически закрепля-

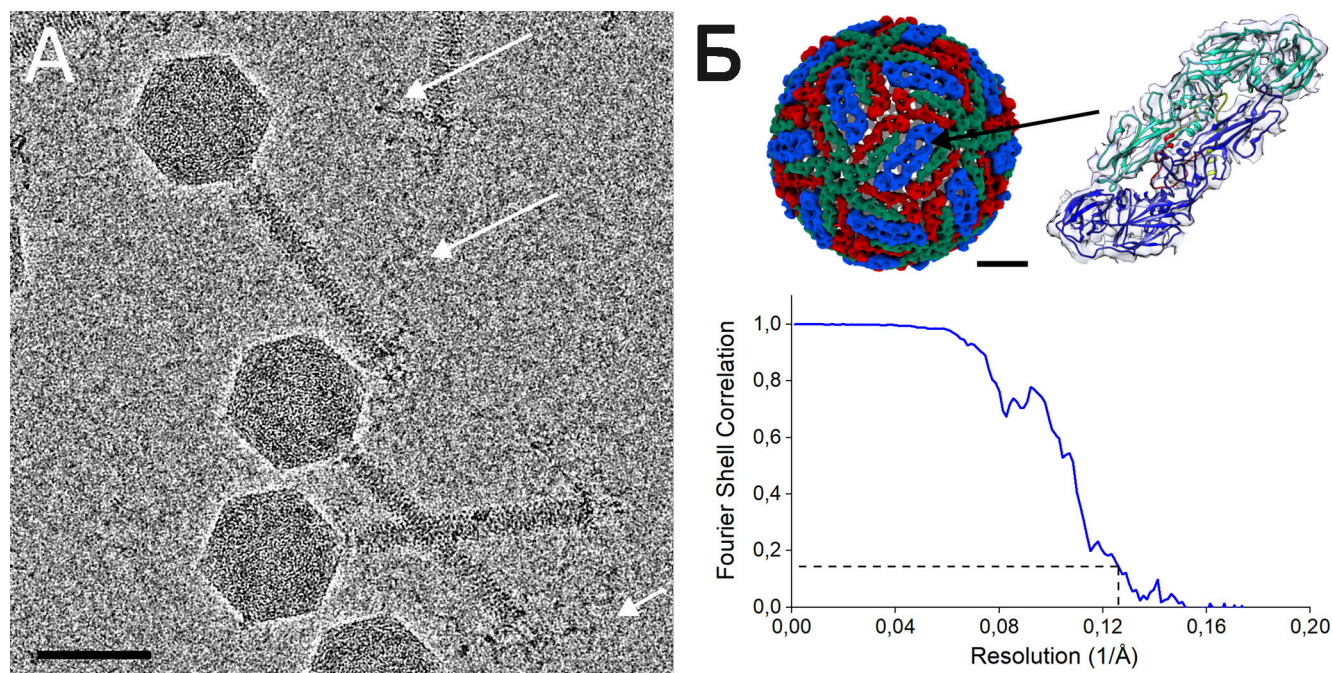


Рис. 1. Изображения и трехмерные реконструкции вирусных частиц, полученные с использованием модифицированного криомикроскопа. А — визуализация штопороподобных фибрилл гигантского бактериофага AR9 (стрелки), масштабный отрезок 100 нм. Б — трехмерная реконструкция (слева) и атомная модель (справа) частицы инактивированной вакцины против вируса клещевого энцефалита [18] (сверху). Масштабный отрезок 10 нм. Кривая оценки разрешения реконструкции по Фурье-корреляции с отсечкой 0,143 (снизу).

ются на поверхность графена, при этом предпочтительная ориентация исчезает (рис. 2Б). Аналогичный эффект наблюдается для препаратов РНК-полимеразы, однако в этом случае витрификация с использованием дополнительных подложек не уменьшает влияние предпочтительной ориентации (рис. 2Г).

Заключение

В настоящей работе продемонстрированы возможности модифицированного микроскопа JEM-2100 для проведения экспериментов с помощью метода криоЭМ. Микроскоп может использоваться для получения изображений широкого спектра витрифицированных биологических препаратов: от крупных вирусных частиц до отдельных белков. Автоматизированные методы сбора и обработки данных позволяют не только анализировать микроморфологию препарата по отдель-

ным изображениям, но и проводить статистическую обработку данных методами анализа единичных частиц, а также строить трехмерные реконструкции белковых комплексов с разрешением до 8 Å.

Модернизация микроскопа проводилась в рамках проекта Министерства науки и высшего образования Российской Федерации. Анализ образцов и получение трехмерных структур вируса клещевого энцефалита выполнен при финансовой поддержке Программы развития МГУ (проект №23А-Ш04-01). Разработка методик измерений нуклеосом производилась при поддержке Российского научного фонда (проект №19-74-30003). Работа проведена без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

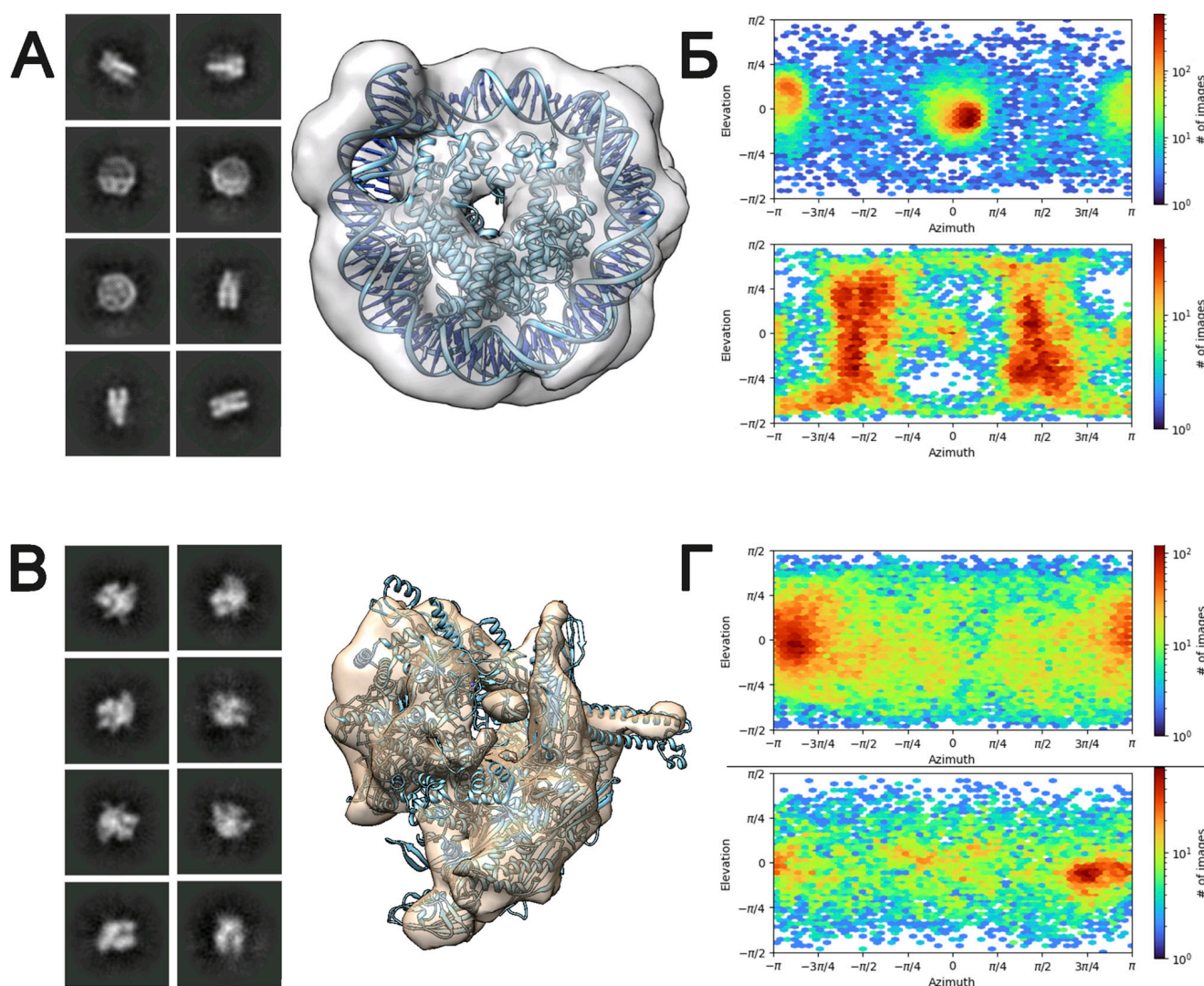


Рис. 2. Реконструкции отдельных частиц, полученные с использованием модифицированного криоэлектронного микроскопа. **А** — двумерные классовые суммы и трехмерная реконструкция нуклеосомы. **Б** — распределение проекций нуклеосом по углам Эйлера для препарата, витрифицированного на стандартных подложках Quantifoil (сверху) и на подложках из оксида графена (снизу). **В** — трехмерная реконструкция и модель РНК-полимеразы *Escherichia coli*. **Г** — распределение проекций РНК-полимеразы по углам Эйлера на стандартных подложках (сверху) и на ультратонком углероде (снизу).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nakane T., Kotecha A., Sente A., et al. Single-particle cryo-EM at atomic resolution. *Nature*. 2020;587(7832):152–156.
2. Yip K.M., Fischer N., Paknia E., Chari A., Stark H. Atomic-resolution protein structure determination by cryo-EM. *Nature*. 2020;587(7832):157–161.
3. Number of Released PDB Structures per Year [Electronic resource]. 2023. URL: <https://www.rcsb.org/stats/all-released-structures> (accessed: 05.07.2023).
4. Cressey D., Callaway E. Cryo-electron microscopy wins chemistry Nobel. *Nature*. 2017;550(7675):167.
5. Glaeser R.M., Nogales E., Chiu W. Single-particle cryo-EM of biological macromolecules. IOP Publishing; 2021. 120 pp.
6. Dubochet J., Adrian M., Chang J.J., Homo J.C., Lepault J., McDowell A.W., Schultz P. Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Quart. Rev. Biophys.* 1988;21(2):129–228.
7. Frederik P.M., Busing W.M. Cryo-transfer revised. *J. Microsc.* 1986;144(2):215–221.
8. McMullan G., Faruqi A.R., Henderson R. Chapter one – Direct electron detectors. *Methods in Enzymology*, vol. 579. Ed. R.A. Crowther. Elsevier; 2016:1–17.
9. Glaeser R.M. Retrospective: Radiation damage and its associated “Information Limitations.” *J. Struct. Biol.* 2008;163(3):271–276.
10. Glaeser R.M. Specimen behavior in the electron beam. *Methods in Enzymology*, vol. 579. Ed. R.A. Crowther. Elsevier; 2016:19–50.
11. Campbell M.G., Cheng A., Brilot A.F., Moeller A., Lyumkis D., Veasles D., Pan J., Harrison S.C., Potter C.S., Carragher B., Grigorieff N. Movies of ice-embedded particles enhance resolution in electron cryo-microscopy. *Structure*. 2012;20(11):1823–1828.
12. Cheng A., Tan Y.Z., Dandey V.P., Potter C.S., Carragher B. Strategies for automated CryoEM data collection using direct detectors. *Methods in Enzymology*, vol. 579. Ed. R.A. Crowther. Elsevier; 2016:87–102.
13. Koh A., Khavnekar S., Yang W., Karia D., Cats D., Van Der Ploeg R., Grollios F., Raschdorf O., Kotecha A., Němeček D. Routine collection of high-resolution cryo-EM datasets using 200 KV transmission electron microscope. *J. Vis. Exp.* 2022;(181):e63519.
14. Passmore L.A., Russo C.J. Specimen preparation for high-resolution Cryo-EM. *Methods in Enzymology*, vol. 579. Elsevier; 2016:51–86.
15. Mastronarde D.N. Automated electron microscope tomography using robust prediction of specimen movements. *J. Struct. Biol.* 2005;152(1):36–51.
16. Palovcak E., Wang F., Zheng S.Q., Yu Z., Li S., Betegon M., Bulkley D., Agard D.A., Cheng Y. A simple and robust procedure for preparing graphene-oxide cryo-EM grids. *J. Struct. Biol.* 2018;204(1):80–84.
17. Nazarov S. Structure of viral membrane-penetrating machines by electron cryo-microscopy and tomography. 2015; URL: <http://infoscience.epfl.ch/record/206115> (accessed: 04.07.2023).
18. Moiseenko A.V., Bagrov D.V., Vorovitch M.F., Uvarova V.I., Veselov M.M., Kashchenko A.V., Ivanova A.L., Osolodkin D.I., Egorov A.M., Ishmukhametov A.A., Shaitan K.V., Sokolova O.S. Size distribution of inactivated tick-borne encephalitis virus particles revealed by a comprehensive physicochemical approach. *Biomedicine*. 2022;10(10):2478.
19. Füzik T., Formanová P., Růžek D., Yoshii K., Niedrig M., Plevka P. Structure of tick-borne encephalitis virus and its neutralization by a monoclonal antibody. *Nat Commun*. 2018;9(1):436.
20. Vasudevan D., Chua E.Y.D., Davey C.A. Crystal structures of nucleosome core particles containing the ‘601’ strong positioning sequence. *J. Mol. Biol.* 2010;403(1):1–10.
21. Qayyum M.Z., Molodtsov V., Renda A., Murakami K.S. Structural basis of RNA polymerase recycling by the Swi2/Snf2 family of ATPase RapA in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 2021;297(6):101404.
22. Glaeser R.M., Han B.G. Opinion: hazards faced by macromolecules when confined to thin aqueous films. *Biophys. Rep.* 2017;3(1–3):1–7.

Поступила в редакцию 06.07.2023

После доработки 11.09.2023

Принята в печать 19.09.2023

SHORT COMMUNICATION

Cryo-electron microscopy at the Faculty of Biology of Lomonosov Moscow State University

A.V. Moiseenko¹ , A.M. Egorov², K.V. Shaitan³ , O.S. Sokolova^{3,*} 

¹*Electron Microscopy Laboratory, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 1–32 Leninskie Gory, 119234, Moscow, Russia;*

²*Department of Chemical Enzymology, Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, 1–11 Leninskie Gory, 119234, Moscow, Russia;*

³*Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 1–73 Leninskie Gory, 119234, Moscow, Russia*
*e-mail: sokolova@mail.bio.msu.ru

This paper demonstrates an example of a successful upgrade of a JEOL JEM-2100 analytical transmission electron microscope to a low-resolution cryo-electron microscope designed for routine tasks of sample preparation and quality evaluation. As a result of the upgrade, the

instrument allows the subnanometer resolution of protein molecule reconstructions (within 8 Å). The influence of graphene and amorphous carbon support films to prevent the effect of preferred orientation of protein particles in the frozen sample is discussed.

Keywords: *Cryo-electron microscopy, structural biology, single particle analysis, equipment upgrading, structure, virus, nucleosome*

Funding: The modernization of the microscope was carried out as part of a project of the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation. The analysis of samples and the acquisition of three-dimensional structures of the tick-borne encephalitis virus were performed with financial support from the Development Program of Moscow State University, project number 23A-SH04-01. The development of nucleosome measurement techniques was conducted with the support of the Russian Science Foundation, project number 19-74-30003.

Сведения об авторах

Моисеенко Андрей Владимирович — вед. инженер лаборатории электронной микроскопии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-33-59; e-mail: postmoiseenko@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1112-2356>

Егоров Алексей Михайлович — докт. биол. наук, академик РАН, гл. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: aegorov@enz.chem.msu.ru

Шайтан Константин Вольдемарович — докт. физ.-мат. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: shaytan49@yandex.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5137-303X>

Соколова Ольга Сергеевна — докт. биол. наук, проф. кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ. Тел.: 8-495-939-57-38; e-mail: sokolova@mail.bio.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4678-232X>