

ДИФРАКЦИЯ И РАССЕЯНИЕ ИОНИЗИРУЮЩИХ ИЗЛУЧЕНИЙ

УДК 537.533.73

ЭЛЕКТРОННАЯ ДИФРАКЦИЯ МИКРОКРИСТАЛЛОВ НА ПРИМЕРЕ ЛИЗОЦИМА

© 2021 г. Р. А. Камышинский^{1,2,3}, В. А. Кралин^{1,3}, М. Ю. Чесноков^{1,2},
В. Р. Самыгина^{1,2}, А. С. Орехов^{1,2,3,*}

¹ *Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва, Россия*

² *Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН, Москва, Россия*

³ *Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет),
Долгопрудный, Россия*

*E-mail: Orekhov.anton@gmail.com

Поступила в редакцию 15.12.2020 г.

После доработки 13.01.2021 г.

Принята к публикации 18.01.2021 г.

Электронная дифракция микрокристаллов – новый мощный подход криоэлектронной микроскопии, позволяющий определять структуру трехмерных кристаллов по поворотной серии дифракционных картин. В отличие от рентгеновской кристаллографии настоящий метод позволяет изучать микро- и даже наноразмерные кристаллы, при этом для получения структуры с высоким пространственным разрешением достаточно одного или нескольких кристаллов, что существенно снижает необходимые объемы образца. Рассмотрены методические аспекты применения электронной дифракции микрокристаллов на примере классического модельного белка – лизоцима.

DOI: 10.31857/S0023476121050088

ВВЕДЕНИЕ

Классическим способом получения трехмерных структур белков является рентгеновская кристаллография, основанная на взаимодействии рентгеновских лучей с кристаллической решеткой. Однако ввиду относительно слабого взаимодействия рентгеновского излучения с образцом [1] необходимы кристаллы размером более 20 мкм [2, 3], получение которых является крайне трудоемким и затруднительным для ряда объектов [4], что накладывает ограничения на применимость метода. Для получения наборов дифракционных данных с кристаллов размером более ~5 мкм используются источники синхротронного излучения, а в последние годы большие надежды по решению структур с использованием микрокристаллов меньших размеров возлагаются на серийную микрокристаллографию, в том числе фемтосекундную кристаллографию с использованием лазеров на свободных электронах [5, 6] (например, European XFEL). Данный подход подразумевает получение нескольких тысяч дифракционных картин отдельных микрокристаллов. Несмотря на увеличение количества успешно решенных структур [7], к настоящему моменту подобные установки являются уникальными, а для успешного эксперимента необходимы большие объемы изучаемых образцов [6].

Второе десятилетие двадцатого века отмечено бурным развитием методов просвечивающей криоэлектронной микроскопии (**крио-ЭМ**) и взрывным ростом их использования в клеточной и структурной биологии [8]. Наиболее известные подходы крио-ЭМ – метод анализа одиночных частиц (англ. SPA – Single Particle Analysis) и криоэлектронная томография – подразумевают получение прямых изображений изучаемого объекта с последующей обработкой и восстановлением 3D-структуры [9]. Как правило, для успешной 3D-реконструкции с получением структуры высокого (ниже 4 Å) пространственного разрешения толщина изучаемого объекта не должна превышать 100–200 нм, а его молекулярная масса в зависимости от конфигурации микроскопа и используемого детектора должна быть не менее ~40–150 кДа [10, 11].

Вторая группа подходов крио-ЭМ базируется на использовании данных электронной дифракции. Так, электронная 2D-кристаллография позволяет восстанавливать структуру тонких (менее 1 мкм) белковых кристаллов по двумерным дифракционным картинам [12]. Однако в силу необходимости использования относительно больших доз электронов для получения данных высокого разрешения и, как следствие, радиационных повреждений облучаемых областей [13] необходимо получение больших серий двумерных ди-

фракционных картин от десятков и сотен различных областей двумерных кристаллов с последующей ресурсоемкой обработкой данных.

Напротив, для получения дифракционной картины с высоким разрешением от трехмерных белковых кристаллов достаточно крайне низких электронных доз ($\sim 1 \text{ э}/\text{Å}^2$). Основываясь на сказанном выше, в 2013 г. группа под руководством Т. Гонена предложила новый метод — электронную дифракцию микрокристаллов (ЭДМ, англ. MicroED — Microcrystal Electron Diffraction) [14–16], которая заключается в получении непрерывной поворотной дифракционной серии от витрифицированных белковых кристаллов в широком угловом диапазоне [17] (как правило, в пределах $\pm 70^\circ$). Такой подход позволяет использовать белковые кристаллы существенно меньшего размера, чем в рентгеновской кристаллографии. При этом ввиду сходства экспериментальных процедур [18] обработка полученных данных осуществляется в стандартных кристаллографических программных пакетах [19], а достигаемое пространственное разрешение подчас превосходит результаты, полученные с помощью XFEL [20].

Безусловно, для метода ЭДМ сохраняется основное ограничение крио-ЭМ — толщина образца не должна превышать нескольких сотен нанометров. Однако метод применим для кристаллов и большего размера — например, для кристаллов толщиной до 100 мкм возможно получение тонких срезов толщиной до 100–200 нм травлением с помощью фокусированного ионного пучка в криогенном режиме (**крио-ФИП**). Кроме того, метод ЭДМ позволяет успешно восстанавливать 3D-структуры белков и белковых комплексов существенно меньшей молекулярной массы, чем требуется для других методов крио-ЭМ [21]. Для реализации метода используется то же оборудование, что и для других методов крио-ЭМ: источник с полевой эмиссией, быстрый и высокочувствительный детектор [22] (Falcon 3/Falcon 4, Gatan K2/K3) и энергетический фильтр [20, 23]. Можно предположить, что с ростом популярности крио-ЭМ по всему миру и увеличением доступности соответствующего оборудования метод ЭДМ может стать одним из основных методов структурной биологии уже в ближайшие годы. Так, к настоящему времени с помощью ЭДМ решены более 100 структур, причем некоторые из них — впервые [21]. В представленной работе впервые в России методом ЭДМ получены дифракционные картины тонких срезов кристаллов модельного белка лизоцима, приготовленных с использованием крио-ФИП.

ПОЛУЧЕНИЕ МИКРОКРИСТАЛЛОВ ЛИЗОЦИМА

Для кристаллизации использовали белок лизоцим из куриного яйца производства Sigma-Aldrich (CAS № 12650-88-3). Белок растворяли в 0.1 М натрий-ацетатном буфере, pH 4.5, в концентрации 200 мг/мл. Кристаллы размером 20–50 мкм выращены методом кристаллизации в объеме. Перед кристаллизацией раствор белка центрифугировали и смешивали в соотношении 1 : 1 с кристаллизационным раствором (300 мМ хлорида натрия, 0.1 М натрий-ацетатного буфера, pH 4.5). Кристаллы размером 15–35 мкм вырастали при температуре 4°C и имели классическую морфологию кристаллов тетрагональной кристаллической формы лизоцима.

ВИТРИФИКАЦИЯ МИКРОКРИСТАЛЛОВ

На первом этапе в течение 30 с осуществляли обработку электронно-микроскопической медной сетки с углеродной подложкой тлеющим разрядом с помощью прибора Pelco EasiGlow при силе тока 25 мА и давлении в камере 0.26 мбар. Далее на подготовленную сетку, помещенную в камеру прибора Vitrobot Mark IV (температура 4°C , влажность $\sim 95\%$), наносили 3 мкл раствора кристаллов лизоцима, после чего излишки раствора удаляли двусторонним сжатием фильтровальной бумагой и осуществляли процедуру витрификации — быстрое погружение сетки с образцом в жидкий этан при температуре жидкого азота с образованием тонкого слоя аморфного льда (рис. 1а). В процессе нанесения образца на сетку температура в камере системы Vitrobot составляла 4°C , влажность — не менее 95%.

ПОЛУЧЕНИЕ ТОНКОГО СРЕЗА МИКРОКРИСТАЛЛОВ

Полученную сетку с витрифицированным раствором микрокристаллов лизоцима переносили в предварительно откачанную до высокой степени вакуума ($\sim 10^{-5}$ Па) камеру растрового электронно-ионного микроскопа Versa 3D, оснащенного криогенной приставкой QuorumPRT3010. Далее с помощью газовой-инжекционной системы осуществляли четыре последовательных цикла напыления защитного проводящего слоя платины при температуре 26°C на поверхность сетки в течение 3–5 с. Пауза между циклами составляла не менее 10 с, что позволило избежать артефактов напыления, снизить накопление заряда и защитить поверхность образца от радиационных повреждений в процессе эксперимента (рис. 1б).

На рис. 2а представлено изображение, полученное в криогенном растворе электронном микроскопе (крио-РЭМ), микрокристаллов лизоцима на поверхности сетки. Большинство кри-

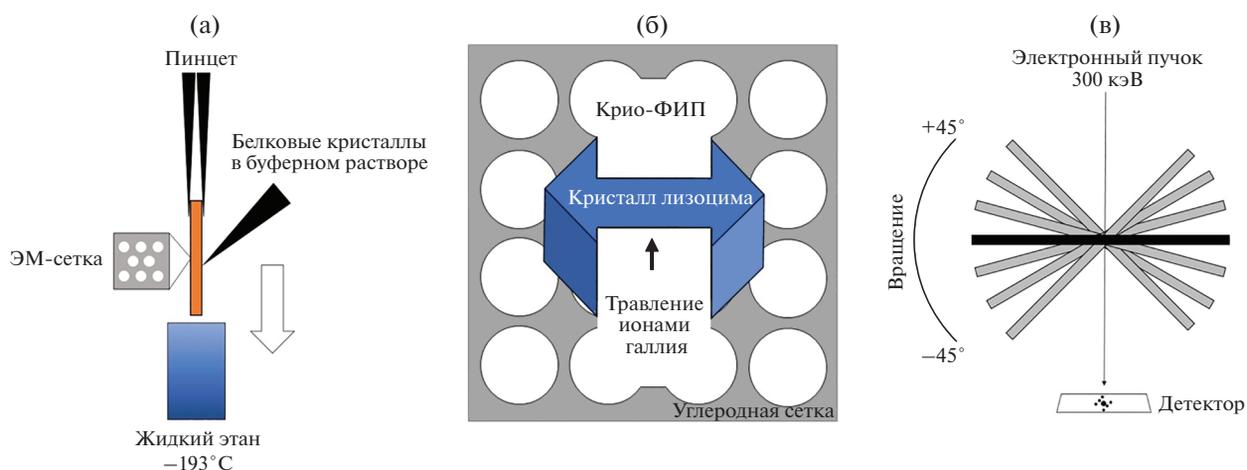


Рис. 1. Схемы экспериментов: а – заморозка кристаллов, б – приготовление тонкого среза замороженного образца с помощью крио-ФИП, в – получение поворотной серии изображений.

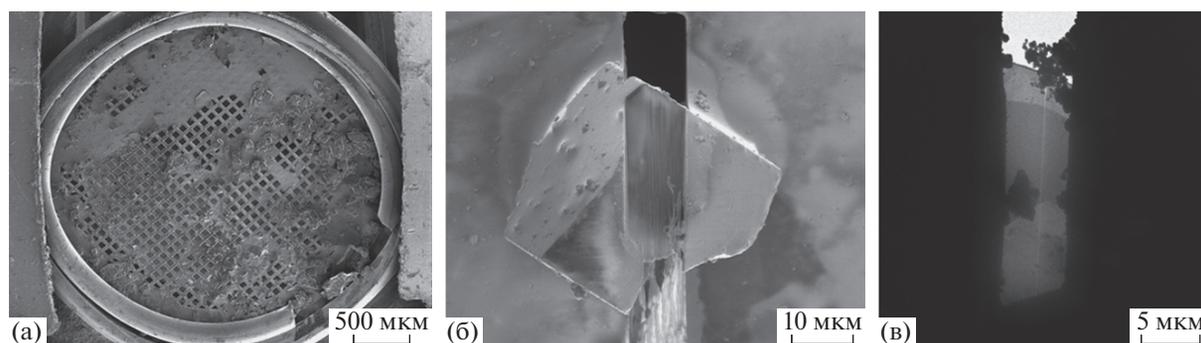


Рис. 2. Подготовка тонкого среза микрокристалла с помощью крио-ФИП: а – общий вид сетки, б – промежуточный этап приготовления тонкого среза кристалла, в – крио-ЭМ-изображение полученного среза.

сталлов расположено непосредственно на медной поддерживающей сетке, что существенно ограничивает выбор возможных областей для проведения эксперимента. Микрокристаллы размером до ~ 50 мкм, расположенные на некотором удалении от медных перемычек сетки, подвергались травлению с помощью крио-ФИП в условиях “скользящего пучка”. Для этого столик с образцом поворачивали на угол 12° – 20° и осуществляли утонение (рис. 1б, 2б) при ускоряющем напряжении 30 кВ с последовательным понижением силы тока от 1 нА до 30 пА для минимизации радиационных повреждений и снижения области аморфизации приповерхностного слоя. Температура столика с образцом в процессе эксперимента составляла -175°C .

ЭЛЕКТРОННАЯ ДИФРАКЦИЯ МИКРОКРИСТАЛЛОВ

Полученные сетки с тонкими срезами микрокристаллов лизоцима (рис. 1в) переносили в крио-ЭМ Titan Krios 60-300, оснащенный корректором сферических aberrаций (Image corrector). Исследование проводили при ускоряющем

напряжении 300 кВ и длине камеры 1.35 м. В результате с помощью камеры Ceta было получено видео дифракционной серии при непрерывном повороте сетки в диапазоне от -45° до 45° и со скоростью вращения держателя $1.5^\circ/\text{с}$. Поток электронов составил $\sim 0.2 \text{ э}/\text{Å}^2/\text{с}$, а полная доза $\sim 12 \text{ э}$. Набор данных осуществлялся в течение 60 с, частота обновления изображений составила ~ 4 кадра/с.

На рис. 3 приведены примеры дифракционных картин микрокристаллов лизоцима, полученные при наклоне держателя на -30° (рис. 3а), 0° (рис. 3б), 30° (рис. 3в). Наблюдается падение пространственного разрешения дифракционных картин от 2.2 Å при -30° до 2.9 Å при 30° во время съемки поворотной серии, вызванное накоплением радиационных повреждений на облучаемой области.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получен набор дифракционных данных методом электронной дифракции микрокристаллов от монокристалла размером ~ 35 мкм. Продемонстрированы основные технические аспекты мето-

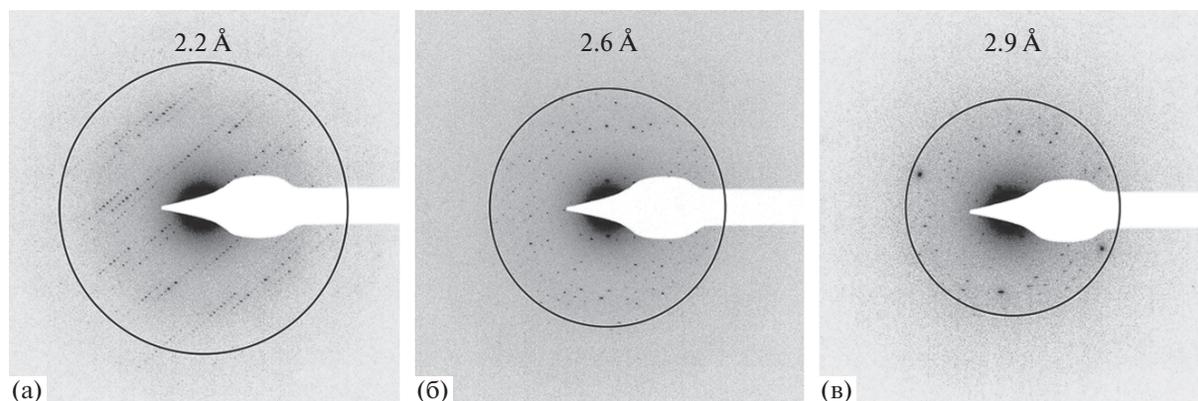


Рис. 3. Электронная дифракция микрокристаллов. Изображения поворотной дифракционной серии, полученные под углами -30° (а), 0° (б), 30° (в).

да – витрификация и препарирование микрокристаллов методом фокусирования ионного травления, а также получение поворотной дифракционной серии в режиме облучения образца малыми дозами электронов с помощью крио-ЭМ. Качество полученных экспериментальных данных указывает на возможность расшифровки структуры лизоцима. Помимо определения структуры трехмерных кристаллов при помощи крио-ЭМ ЭДМ актуальна для предварительной характеристики микрокристаллических суспензий для экспериментов по серийной кристаллографии с использованием синхротронного излучения или лазеров на свободных электронах.

Работа выполнена при финансовой поддержке НИЦ “Курчатовский Институт” (приказ от 02.07.2020 № 1056) и Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-29-12054).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Henderson R. // *Q. Rev. Biophys.* 1995. V. 28. № 2. P. 171. <https://doi.org/10.1017/S003358350000305X>
- Diederichs K., Wang M. // *Protein Crystallography. Methods and Protocols* / Eds. Wlodawer A. et al. New York: Humana Press, 2017. P. 239. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7000-1_10
- Sliz P., Harrison S.C., Rosenbaum G. // *Structure.* 2003. V. 11. № 1. P. 13. [https://doi.org/10.1016/S0969-2126\(02\)00910-3](https://doi.org/10.1016/S0969-2126(02)00910-3)
- McPherson A., Gavira J.A. // *Acta Cryst. F.* 2014. V. 70. № 1. P. 2. <https://doi.org/10.1107/S2053230X13033141>
- Chapman H.N., Fromme P., Barty A. et al. // *Nature.* 2011. V. 470. № 7332. P. 73. <https://doi.org/10.1038/nature09750>
- Zatsepin N.A., Li C., Colasurdo P., Nannenga B.L. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2019. V. 58. P. 286. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2019.06.004>
- Johansson L.C., Stauch B., Ishchenko A., Cherezov V. // *Trends Biochem. Sci.* 2017. V. 42. № 9. P. 749. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.06.007>
- Kuhlbrandt W. // *Science.* 2014. V. 343. № 6178. P. 1443. <https://doi.org/10.1126/science.1251652>
- Камышинский Р.А., Чесноков Ю.М., Орехов А.С. // *Кристаллография.* 2020. Т. 65. № 5. С. 774. <https://doi.org/10.31857/S0023476120050094>
- Fan X., Wang J., Zhang X. et al. // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. № 1. P. 2386. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10368-w>
- Wu M., Lander G.C. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2020. V. 64. P. 9. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2020.05.007>
- Gonen T., Cheng Y., Sliz P. et al. // *Nature.* 2005. V. 438. № 7068. P. 633. <https://doi.org/10.1038/nature04321>
- Glaeser R.M. // *J. Ultrastruct. Res.* 1971. V. 36. № 3–4. P. 466. [https://doi.org/10.1016/S0022-5320\(71\)80118-1](https://doi.org/10.1016/S0022-5320(71)80118-1)
- Shi D., Nannenga B.L., Iadanza M.G., Gonen T. // *eLife.* 2013. V. 2. <https://doi.org/10.7554/eLife.01345>
- Nannenga B.L., Shi D., Leslie A.G.W., Gonen T. // *Nat. Methods.* 2014. V. 11. № 9. P. 927. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3043>
- Nannenga B.L., Gonen T. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2016. V. 40. P. 128. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2016.09.007>
- Shi D., Nannenga B.L., de la Cruz M.J. et al. // *Nat. Protoc.* 2016. V. 11. № 5. P. 895. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.046>
- Gemmi M., Mugnaioli E., Gorelik T.E. et al. // *ACS Cent. Sci.* 2019. V. 5. № 8. P. 1315. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.9b00394>
- Hattne J., Reyes F.E., Nannenga B.L. et al. // *Acta Cryst. A.* 2015. V. 71. № 4. P. 353. <https://doi.org/10.1107/S2053273315010669>
- Nannenga B.L., Gonen T. // *Nat. Methods.* 2019. V. 16. № 5. P. 369. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0395-x>
- Nguyen C., Gonen T. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2020. V. 64. P. 51. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2020.05.018>
- Hattne J., Martynowicz M.W., Penczek P.A., Gonen T. // *IUCrJ.* 2019. V. 6. № 5. P. 921. <https://doi.org/10.1107/S2052252519010583>
- Maki-Yonekura S., Hamaguchi T., Naitow H. et al. // *Microscopy.* 2021. V. 70. № 2. P. 232. <https://doi.org/10.1093/jmicro/dfaa052>