



## ПОВЫШЕНИЕ КОНТРАСТА ИЗОБРАЖЕНИЯ БИОНАНОЧАСТИЦ

*Е.Печникова<sup>1</sup>, Т.Станишинева-Коновалова<sup>2</sup>, О.Волох<sup>2</sup>,  
О.Соколова<sup>1,2</sup>, д.б.н. / sokolova@mail.bio.msu.ru*

Получение высокого разрешения изображения структуры биологических наночастиц актуально в связи с развитием бионанотехнологии. Для этого традиционно используются рентгеноструктурный анализ, ядерно-магнитный резонанс, спиновые метки, люминесцентные и спектроскопические методы. В последнее десятилетие активно применяется просвечивающая (трансмиссионная) электронная микроскопия (ТЭМ). Авторы обзора обсуждают пути повышения контраста изображения при исследовании бионаночастиц.

ТЭМ превратилась в полноценный метод структурной нанотехнологии в результате улучшения методик, позволяющих с разрешением от 2–5 до 0,2 нм визуализировать трехмерную структуру макромолекул и динамику процессов в биологических объектах [1–6], а также повышения эффективности расчета таких структур [7]. Для получения объективных данных необходимо сохранение нативной структуры изучаемого объекта. Прогресс в данном направлении исследователи связывают с появившейся в 80-е годы прошлого века криомикроскопией, позволившей определять внутреннюю структуру молекул и изучать объекты без окрашивания при их помещении в быстрозамороженный слой (около 0,5 нм) воды [8].

### ПОДГОТОВКА БИОЛОГИЧЕСКИХ НАНОЧАСТИЦ

Для получения ТЭМ-изображения образцы помещаются в колонну электронного микроскопа с высоким вакуумом. Поскольку такие образцы, как правило, гидратированы, их необходимо обезводить или стабилизировать в водном растворе при низкой температуре [9]. При замораживании содержащих бионаночастицы водных растворов водяная пленка для отвода тепла от образца быстро погружается в охлажденный жидким азотом (-182°C) этан или пропан [8]. Бионаночастицы застывают в слое

## INCREASE CONTRAST OF BIONANOPARTICLES IMAGE

*E.Pechnikova<sup>1</sup>, T.Stanisheva-Konovalova<sup>2</sup>, O.Volokh<sup>2</sup>,  
O.Sokolova<sup>1,2</sup>, D.Sc. / sokolova@mail.bio.msu.ru*

Obtaining of high-resolution images of the structure of biological nanoparticles becomes more important with development of bionanotechnology. The methods traditionally used for this purpose are X-ray structure analysis, nuclear-magnetic resonance, spin marks and also luminescent and spectroscopic methods. In the recent decade the transmission electron microscopy (TEM) has been actively applied. The authors of the review discuss the ways of increasing the image contrast of bionanoparticles.

TEM has turned into a full-fledged method of structural nanotechnology as a result of improvement of the techniques allowing us to visualize with a resolution of 2–5 nm a 3-D structure of the molecules and the dynamics of the processes in biological objects [1–6], and also improvement of the efficiency of calculation of such structures [7]. In order to obtain objective data we need to preserve the native structure of the examined object. Researchers' hopes for progress in this field are bound with cryomicroscopy, which appeared in 1980s and allows us to determine the inner structure of the molecules and study objects without coloring of them, just by placing them into a quickly frozen layer (about 0.5 nm) of water [8].

### PREPARATION OF BIOLOGICAL NANOPARTICLES

In order to obtain TEM images the samples are placed into a column of an electronic microscope with high vacuum. Since, as a rule, such samples are hydrated, first, they have to be dehydrated or stabilized in a water solution at a low temperature [9]. During freezing of the water solutions containing bionanoparticles, in order to ensure a heat rejection the water film is quickly submerged into ethane or propane cooled by liquid nitrogen (-182°C) [8]. The bionanoparticles freeze in the layer of the amorphous ice, at that, the crystals capable to damage a sample are not formed. Another advantage

<sup>1</sup>Институт кристаллографии им. А.В.Шубникова РАН.  
<sup>2</sup>Биологический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова.

<sup>1</sup>Institute of Crystallography named after Shubnikov, RAS.  
<sup>2</sup>Biological Faculty of MGU named after M.V.Lomonosov.



аморфного льда, и кристаллы, способные повредить образец, не образуются. Преимущество криоТЭМ состоит также в том, что низкая температура замедляет повреждение образца электронным пучком.

При исследовании биологических объектов наряду с термической нестабильностью серьезной проблемой является их проводимость. Лед сам по себе – диэлектрик, и накопление заряда, вызванное электронным пучком, может повредить образец и ухудшить изображение. Для повышения проводимости используется углеродная подложка либо материалы с более высокой проводимостью, например комплекс титана с кремнием [10].

Однако, когда бионаночастицы осаждаются на подложку, она вносит дополнительное рассеяние и снижает контрастность изображения, поскольку такие частицы (вирусы, макромолекулы, изолированные компоненты клеток) состоят из элементов с низкими атомными номерами (O, C, N, S), слабо рассеивающими проходящие электроны. В результате образцы нуждаются в дополнительной контрастирующей обработке.

Наиболее распространены негативное контрастирование и вакуумное оттенение [11]. Суть контрастирования – на сетку с подложкой с частицами капается раствор электронно-плотного вещества (контрастера), равномерно заливающего всю подложку, кроме занятых частицами микроучастков, выглядящих светлыми на темном фоне. Контрастер может добавляться в суспензию в концентрации 0,5–2%, причем электроны в большей степени будут рассеиваться в области его сосредоточения. Вещества для негативного контрастирования не должны вступать в реакцию с объектом, и, имея высокие электронную плотность и точку плавления, не плавиться и не возгоняться под электронным лучом. Для этих целей используются уранилацетат, натриевая или калиевая соли фосфорновольфрамовой кислоты, кремневольфрамовокислый натрий, молибденацетат и некоторые другие соединения [12].

Быстрый (2–5 мин) и простой метод негативного контрастирования обеспечивает повышение контраста исследуемого объекта. Более того, контрастирующий агент защищает его от радиационного поражения, так как пучок электронов в первую очередь взаимодействует с контрастером. Однако из-за искривления молекул при высыхании и потере ими нативной структуры метод может приводить к появлению артефактов. Кроме этого, если на поверхности образца окраска не одинакова, при интерпретации структуры могут возникнуть дополнительные артефакты, причем некоторые области кажутся более контрастными вследствие наличия большего

of cryo-TEM is that a low temperature slows down the damage caused to a sample by an electronic beam.

Besides thermal instability, the most serious problem in the studies of biological objects is their conductivity. Ice itself is a dielectric, and accumulation of the charge caused by an electronic beam can damage a sample and deteriorate the image. For improvement of conductivity a carbonic substrate is used or materials with higher conductivity, e.g. a titanium-silicon complex [10].

However, when the bionanoparticles precipitate on a substrate, it intensifies the dispersion and lowers the picture contrast, because such particles (viruses, macromolecules, isolated components of cells) consist of the elements with low nuclear numbers (O, C, N, S), scattering weakly the passing electrons. As a result, samples require an additional contrast processing.

The most wide-spread methods are negative staining and vacuum shadowing [11]. The method of staining boils down to the following: a solution of an electron-dense substance (contraster) is dropped on the net with a substrate with the particles, the solution spills evenly over the whole of the substrate, except the micro-sites, occupied by the particles, which look bright on a dark background. A contraster can be added to the initial suspension in concentrations of 0.5–2%, and the electrons will be more dispersed in the areas of its concentration. The substances for a negative staining should not react with an object, and having high electronic density and melting point, they should not melt and get sublimated under the influence of an electronic beam. For this purpose uranyl acetate, sodium or potassium salts of phosphotungstic acid, silicotungstic acid, sodium, molybdenum acetate and some other compounds are used [12].

Fast (2–5 min) and simple method of negative staining ensures a substantial increase of contrast of an examined object. Moreover, the contrasting agent protects objects from a radiating defeat, because a beam of electrons first of all interacts with it. However, due to a curvature of the molecules during drying and loss of their native structure this method can lead to occurrence of artefacts.

Besides, if the sample coloring on the surface is not even, additional artefacts can appear during the structure interpretation, and some areas can seem more contrast owing to the presence of a thicker layer of the contrasting agent. The resolution of the objects is limited by the size of the particles of the contraster (2 nm). At that, application of the particles of a smaller size (uranyl formate, molybdenum acetate) allows us to raise this parameter only insignificantly (up to 1.5–1.8 nm).



слоя контрастирующего агента. Разрешение объектов лимитировано размером частиц контрастера (2 нм), причем применение частиц меньшего размера (уранил формиат, молибден ацетат) позволяет лишь незначительно повысить этот параметр (до 1,5-1,8 нм).

### ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЭЛЕКТРОННОГО ПУЧКА С ОБРАЗЦОМ

Изображение, получаемое в электронном микроскопе, благодаря короткой длине волны электронов теоретически имеет высокое разрешение. При взаимодействии ускоренного пучка электронов, сфокусированного осветительной системой микроскопа с исследуемым объектом, возникают вторичные излучения (рис.1).

Характер такого взаимодействия зависит от их энергии и состава образца. Некоторые электроны проходят без взаимодействия с образцом, другие, сталкиваясь с атомными ядрами, отклоняются электростатическим полем. Часть электронов упруго рассеивается без потери энергии, другая передает часть энергии образцу (неупругое рассеяние). Она может ионизировать атомы образца, вызывая рентгеновское излучение, перегруппировку химических связей, образование свободных радикалов или рассеивая вторичные электроны, что изменяет структуру образца. Следует иметь в виду, что рентгеновское излучение в тысячу раз разрушительнее, чем рассеянных электронов, однако размер пучка при рассеянии электронов в 100 тыс. раз больше, поэтому в электронной микроскопии радиационное повреждение объектов – серьезная проблема (рис.2).

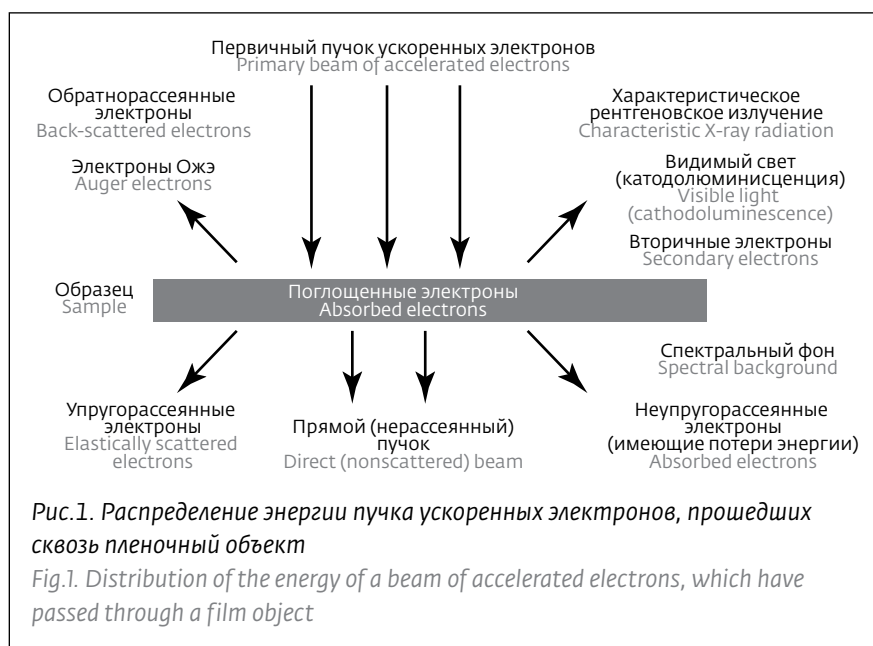
Для предотвращения такого повреждения образец охлаждается, что, к сожалению, не полностью предотвращает его повреждение, поэтому образец стараются не подвергать избыточному электронному излучению (режим низкой дозы). Типичные экспозиции для биологических образцов – 10-20  $e/\text{\AA}^2\text{s}$ . В результате отношение сигнал/шум снижается, что лимитирует количество информации, получаемой от одной молекулы. Вместе с тем, обеспечить высокое разрешение, используя только одну молекулу, практически невозможно. Для этого теоретически требуется 10 тыс. молекул, а на практике еще больше [13].

### INTERACTION OF AN ELECTRON BEAM WITH A SAMPLE

The image obtained in an electronic microscope theoretically has a high resolution due to a short wavelength of the used electrons. Interaction of an accelerated beam of electrons formed by the microscope's lighting system with the examined object generates secondary radiations (Fig.1).

Character of such an interaction depends on their energy and composition of a sample. Some electrons pass without an interaction with a sample, others, colliding with the atom nuclei, are deviated by an electrostatic field. Some electrons are elastically scattered without a loss of energy, others give part of it to the sample (inelastic scattering). This energy may ionize the sample's atoms, causing an X-ray radiation, regrouping of the chemical bonds, formation of free radicals or scattering of the secondary electrons, which changes the sample's structure. We should keep in mind that an X-ray radiation is a thousand times more destructive than that of the scattered electrons. However, the size of the beam of the scattered electrons is 100 thousand times bigger, therefore a radiation damage of objects in electronic microscopy presents a serious problem (Fig.2).

In order to prevent a radiation damage a sample is cooled, which, unfortunately, does not prevent its damage completely, therefore the sample should not be subjected to a superfluous electronic radiation (a low dose mode). Typical expositions for the biological samples are 10-20  $e/\text{\AA}^2\text{s}$ . As a result the signal/noise ratio is decreased, which limits the amount of information received from one molecule. At the same time, it is practically impossible to ensure a high resolution by using only one molecule. Theoretically 10 thousand





### ПОВЫШЕНИЕ КОНТРАСТА ИЗОБРАЖЕНИЯ В ТЭМ

Микроскопические изображения представляют собой изменения интенсивности, вызванные локальными различиями в пропускающей способности образца. Они определяются различными регистрирующими системами (ПЗС-камерами, фотопластинками, другими детекторами). Контраст изображения (отношение разницы наиболее ярких и темных точек к среднему значению интенсивности), получаемый за счет поглощения части падающего луча, называется амплитудным (рис.3а), а за счет рассеивания и изменения фаз – фазовым (рис.3б).

Одно из различий светового и электронного микроскопов – механизм формирования контраста изображения. В световом микроскопе он больше соответствует абсорбционной решетке, поскольку окрашенный препарат избирательно поглощает свет определенных участков спектра. В электронном микроскопе механизм формирования контраста изображения соответствует фазовой решетке, так как происходит отклонение электронов от их первоначального направления.

Биологические молекулы создают очень низкий амплитудный контраст. Они не поглощают электроны падающего луча, а отклоняют их. В результате число электронов в выходящей волне остается прежним. Следовательно, детали изображения слабо различимы. Амплитудный контраст может быть увеличен с применением диафрагмы объектива [14]. Электроны, рассеянные на большие углы, задерживаются диафрагмой в задней фокальной плоскости объектива и не участвуют в формировании изображения, причем, чем меньше диаметр диафрагмы, тем больше рассеянных электронов задерживается и тем выше контраст изображения.

При взаимодействии электронного пучка с образцом происходит изменение фаз электронов, что обеспечивает фазовый контраст. Фазовые изменения видимы при превращении их в регистрируемые вариации амплитуды. На практике это достигается с применением четвертьволновой фазовой пластинки, производящей фазовый сдвиг рассеянных электронов (см. рис.3б).

Другая возможность повысить контраст – использование несовершенства микроскопа, например аберрации. Основные аберрации линзы объектива ТЭМ – сферическая, хроматическая и астигматизм. Сферическая аберрация возникает вследствие того, что участки магнитного поля имеют разную преломляющую способность вблизи оси линзы и на периферии, а также вследствие

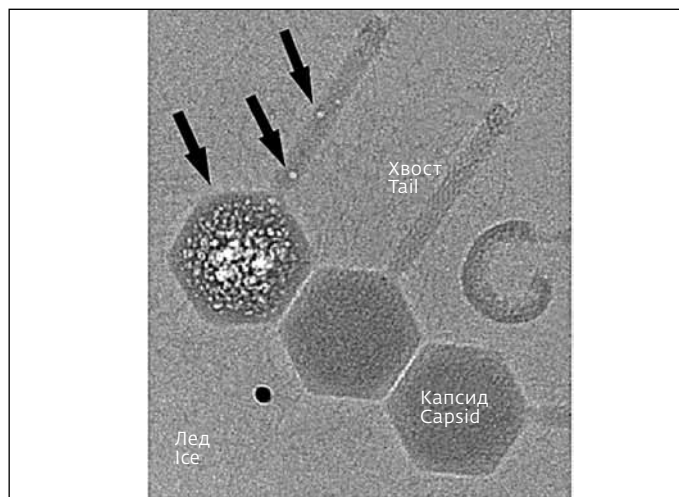


Рис.2. Частицы бактериофага EL в слое аморфного льда (криомикроскоп Titan Krios – FEI). Черные стрелки – радиационное повреждение в области капсида и хвоста одной из частиц (масштаб – 100 нм)

Fig.2. Particles of EL bacteriophage in the layer of an amorphous ice (Titan Krios cryomicroscope – FEI). Black arrows mean radiation damage in the area of the capsid and tail of one of the particles (scale – 100 nm)

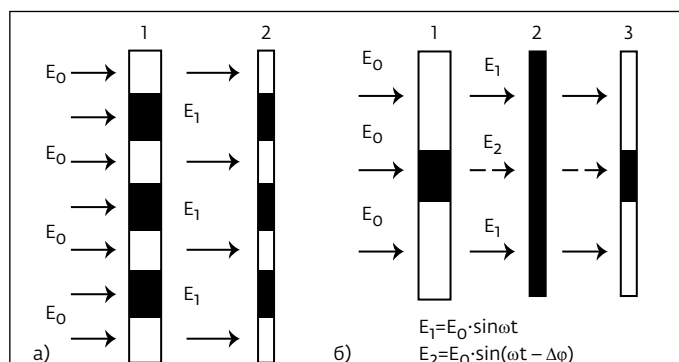


Рис.3. Формирование контраста изображения: а) – амплитудный контраст: 1 – объект освещен параллельным пучком электронов интенсивностью  $E_0$ ; 2 – изображение объекта. Некоторые электроны поглотились, в результате интенсивность пучка уменьшилась ( $E_1$ ); б) – фазовый контраст: 1 – объект освещен параллельным пучком электронов интенсивностью  $E_0$ ; 2 – кольцевая четвертьволновая фазовая пластинка, производящая фазовый сдвиг рассеянных электронов ( $E_2$ ); 3 – различия волн по фазе превращаются в различия по амплитуде



нестабильности тока линз во времени. Именно коэффициент сферической аберрации  $C_s$  линзы объектива в первую очередь определяет разрешающую способность ТЭМ. Корректоры сферической аберрации ( $C_s$ -корректоры) – дополнительные системы линз, сложные и дорогостоящие – устанавливаются специально для исследования параметров кристаллических решеток и используются в сочетании с автоэмиссионными (полевыми) электронными пушками.

Хроматическую аберрацию вызывают различия в прошедших сквозь объект скоростях электронов. Она проявляется тем сильнее, чем толще исследуемый срез, а также при недостаточно стабильном ускоряющем напряжении. Электроны с большей скоростью отклоняются тем же магнитным полем линзы на меньшие углы. В результате линза имеет различное фокусное расстояние для разных фракций электронного пучка. При хроматической аберрации точка объекта изображается в виде кружка рассеяния. Для ее снижения важно работать с ультратонкими срезами, однако, если они тоньше 10–20 нм, контраст недостаточен.

Осевая асимметрия магнитного поля линзы вызывает астигматизм изображения, причем фокусное расстояние линзы для лучей, проходящих через объект в различных вертикальных плоскостях, различно. Точка на изображении растянута, причем при переходе от положения ниже фокуса (дефокуса) к состоянию выше фокуса (перефокусу) направление изменяется на перпендикулярное, а в положении фокуса четкость изображения снижается. Причин астигматизма несколько: неточное центрирование диафрагм, накопление заряда на сетке, диафрагмах и других элементах оптики вследствие их загрязнения.

Контраст изображения биологических объектов можно улучшить комбинированным воздействием сферической аберрации и дефокусировки – перемещением плоскости изображения от фокуса. Основание для повышения контрастности – сферические аберрации в сочетании с дефокусировкой индуцируют фазовый сдвиг между рассеянными и нерассеянными электронами, причем, чем больше сдвиг, тем выше контрастность.

Характеристики изображения описываются частотно-контрастной характеристикой (ЧКХ). Эта функция имеет чередующиеся полосы позитивного и негативного контраста, проявляющиеся в дифракционных кольцах (рис.4). Для воссоздания структурной информации необходима коррекция ЧКХ, а для получения высокого разрешения изображения должны быть сфотографированы с различной

molecules are required for this purpose, and in practice even more [13].

### INCREASE OF THE IMAGE CONTRAST IN TEM

Microscopic images result from the intensity changes caused by local distinctions in the passing ability of a sample. They are determined by various microscope recording systems (CCD cameras, photographic plates, and other detectors). The image contrast (relation of the difference between the brightest and the darkest points to an average intensity value) obtained due to absorption of a part of the falling beam are called amplitudes (Fig. 3a), and due to dispersion and phase changes – phases (Fig.3b).

One of the differences between the light and electronic microscopes is determined by the mechanism for a contrast image formation. In a light microscope a colored preparation corresponds more to an absorption grid, because it absorbs selectively the light of certain parts of the spectrum. In an electronic microscope it corresponds to the phase grid, because the electrons are deviated from their initial direction.

Biological molecules create a very low amplitude contrast. They do not absorb the falling beam's electrons, but deviate them. As a result the total number of electrons in the outgoing wave remains the same. Hence, the image details are hardly distinguishable. An amplitude contrast can be increased with application of a lens diaphragm [14]. The electrons scattered in big angles are detained by the diaphragm in the back focal plane of the lens and do not participate in the image formation, at that, the less is the diameter of a diaphragm, the more the scattered electrons are detained, and the higher is the image contrast.

An interaction of an electronic beam with a sample changes the electron phases, which ensures a phase contrast. The phase changes are visible when transformed into recorded amplitude variations. In practice this is achieved with application of a quarter-wave phase plate, which causes a phase shift of the scattered electrons (Fig.3b).

Another way to increase the contrast is to use imperfections of a microscope, for example, aberrations. The basic aberrations of a lens of a TEM objective are spherical, chromatic aberrations and astigmatism. The spherical aberration arises because the magnetic field sites have different refracting ability near the axis of a lens and in periphery, and also owing to instability of a lens current in time. It is exactly the coefficient of the spherical aberration of lens  $C_s$ , which first of all determines the resolution of a TEM. Correctors of the spherical aberrations ( $C_s$ -correctors) are additional lens systems, very complex and expensive, which are



дефокусировкой. Это позволяет заполнить недостающие данные, соответствующие нулям на ЧКХ, позиции которых изменяются в зависимости от дефокуса. При обработке данные с различными дефокусами объединяются в один массив.

### ПОВЫШЕНИЕ КОНТРАСТА С ПОМОЩЬЮ ПРИСТАВОК

Контраст изображения в ТЭМ зависит от условий взаимодействия электронов с образцом (наличие подложки, льда, контрастера) и режима работы микроскопа (ускоряющее напряжение, фокусное расстояние объектива, диаметр диафрагмы). Для получения контрастного изображения объекта можно использовать дополнительные приспособления.

Так, например, в фазово-контрастной световой микроскопии визуализация объектов осуществляется с помощью фазовой пластинки, создающей видимый контраст за счет сдвига фазы рассеянного света относительно прошедшего нерассеянного света на  $90^\circ$  и их интерференции [15]. Эквивалентное решение было предложено для ТЭМ. Первые попытки создать устройство, изменяющее фазы центрального пучка относительно рассеянного, были сделаны посредством электростатической фазовой пластинки, вставленной в систему линз [16]. Лишь недавно микротехнологии позволили создать миниатюрные фазовые пластинки, размещаемые в задней фокальной плоскости линзы электронного микроскопа. Пластика работает, как электростатическая линза, находящаяся на пути рассеянных электронов и смещающая их фазу на  $90^\circ$ . Это позволяет им объединиться с нерассеянными электронами в плоскости изображения ТЭМ [17]. В результате контрастность изображения увеличивается в широком диапазоне разрешений.

30 лет назад был предложен подход к повышению контрастности — фильтрация энергии электронов. Часть из них, достигающих объектива, — неупругорассеянные, потерявшие энергию при взаимодействии с атомами образца. Электроны с низкой энергией (большей длины волны) фокусируются с упругорассеянными электронами в различных плоскостях, вызывая хроматические aberrации. В результате неупругорассеянные электроны ухудшают изображение, создавая помимо повреждения образца (см. рис.2) дополнительный фон и размытие. Для их отсеивания от создания изображения после взаимодействия с образцом используются энергетические фильтры. Фильтрация основана на том, что электроны с различными длинами волн могут отклоняться по разные траектории, причем из-за большой длины пути пучка электронов при наклоне образца

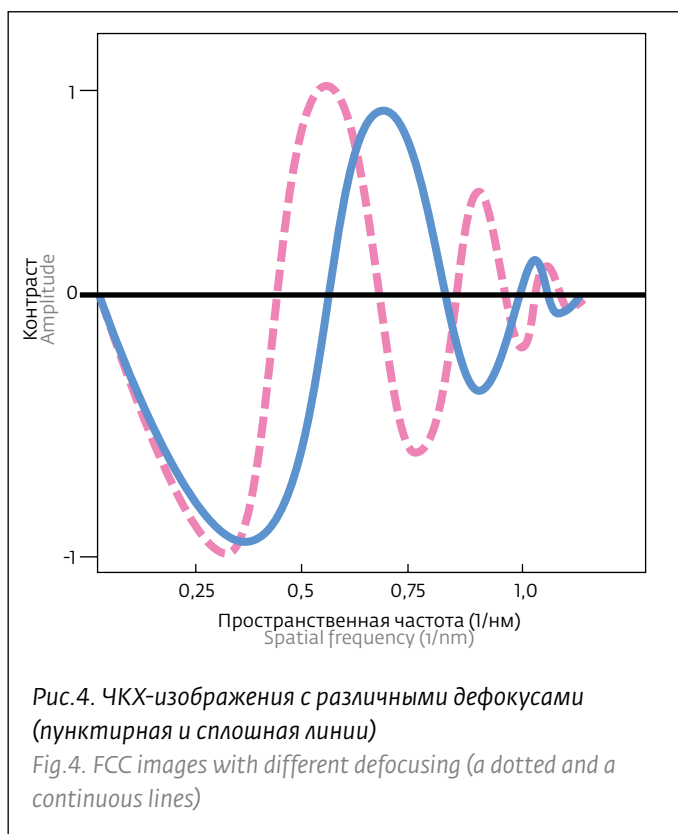


Рис.4. ЧКХ-изображения с различными дефокусами (пунктирная и сплошная линии)

Fig.4. FCC images with different defocusing (a dotted and a continuous lines)

installed especially for examination of the parameters of the crystal grids and used in a combination with field-emission electron guns.

A chromatic aberration is caused by the difference in speeds of the electrons, which pass through an object. The thicker is an examined cut, the more it is pronounced, and it also appears because of an insufficiently stable accelerating pressure. Electrons with a higher speed are deviated by the same magnetic field of a lens at smaller angles. As a result the lens has a varied focal length for different fractions of an electronic beam. In case of a chromatic aberration an object point is depicted as a circle of dispersion. In order to decrease a chromatic aberration we should use ultrathin cuts, however, if they are thinner than 10-20 nm, the contrast is insufficient.

Axial asymmetry of the lens' magnetic field causes astigmatism of the image, at that, the focal length of the lens is different for the rays passing through an object in different vertical planes. A point on the image is stretched, and in transition from a position below focus (defocusing) to the one above the focus (overfocusing) the direction is changed for a perpendicular one, and in the focus point the image sharpness is decreased. There are several reasons causing astigmatism: inaccurate centering of the diaphragms, accumulation of a charge on the grid,



энергетическая фильтрация наиболее важна для томографии.

В середине 1980-х годов фирма OPTON (Германия) выпустила EELS-систему, в которой омега-фильтр располагается между двумя промежуточными линзами, а не в нижней части колонны ТЭМ. Фильтр состоит из двух магнитных призм, электростатического зеркала и щели, причем траектория электронного луча напоминает букву омега. Этот результат стал началом новой эры в аналитической микроскопии. В 2000-е годы фирмой GATAN переработана конструкция энергетического фильтра нижнего расположения, что позволило практически уравнивать его характеристики с омега-фильтрами. Благодаря использованию в качестве электронного детектора ПЗС-матрицы со сцинтиллятором этот фильтр тоже стал изображающим.

Наряду с новыми аналитическими возможностями энергетическая фильтрация сняла многие ограничения классических ТЭМ. В томографии она, в частности, дала возможность устранить хроматическую aberrацию при просвечивании толстых (1-2 мкм) срезов.

Эта фильтрация позволила также гибко регулировать контраст ТЭМ-изображений, что невозможно на обычном микроскопе без ухудшения разрешения. Важно отметить, что, плавно настраивая фильтр на характерные для них пики потерь (Contrast tuning), удается контрастировать изображение отдельных микроструктур. Наконец, фильтрация энергии позволяет отказаться от химического контрастирования срезов и ограничиться высокоспецифичным контрастированием, например введением связанных с антителами электронно-плотных меток.

*Авторы искренне благодарят Н.Киселева за предоставленное изображение бактериофага ЕL, А.Богданова – за помощь в подготовке данного материала. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 13-04-01326.*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. **Вассерман А.М., Коварский А.Л.** Спиновые метки и зонды в физико-химии полимеров. – М.: Наука, 1986.
2. **Tyszka J.M., Fraser S.E. and Jacobs R.E.** Magnetic resonance microscopy: recent advances and applications. – Current opinion in biotechnology, 2005, v. 16(1), p. 93–99.
3. **Blow D.** Outline of Crystallography for Biologists 2002, Oxford: Oxford University Press.
4. **Al-Amoudi A. et al.** Cryoelectron microscopy of vitreous sections. – The EMBO journal, 2004, v. 23(18), p. 3583–8.
5. **Ziegler A., Kisielowski C. and Ritchie R.O.**

diaphragms and other optical elements as a result of their dirtying.

The image contrast of the biological objects can be improved by a combined influence of a spherical aberration and defocusing – movement of the image plane from the focus. A contrast increase is based on the following principle – the spherical aberrations in combination with defocusing induce a phase shift between the scattered and nonscattered electrons and, the bigger is this shift, the higher is the contrast.

Image characteristics are described by a frequency-contrast characteristic (FCC). This function has alternating strips of positive and negative contrasts, which show themselves in the diffraction rings (Fig.4). For reconstruction of the structural information a correction of FCC is necessary, and in order to achieve a high resolution images should be photographed with a varied defocusing. This allows us to fill in the missing data corresponding to zeros on FCC, the positions of which change depending on defocusing. During processing the data with different defocusing are integrated into a single array.

#### IMPROVEMENT OF CONTRAST WITH THE HELP OF ATTACHMENTS

Image contrast in TEM depends on the conditions of interaction of the electrons with a sample (availability of a substrate, ice and contrast) and the mode of operation of a microscope (accelerating voltage, focal length of lens, diameter of a diaphragm). For obtaining of a contrast image of an object additional attachments can be used.

So, for example, in a phase-contrast light microscopy visualization of objects is carried out by means of a phase plate creating a visible contrast due to a phase shift of the scattered light in relation to the passed nonscattered light at 90° and their interference [15]. An equivalent solution was proposed for TEM. The first attempts to create a device changing the phases of the central beam in relation to the scattered one were made by means of a simple electrostatic phase plate installed into the lens system [16].

Only recently microtechnologies have allowed us to develop tiny phase plates to be placed in the back focal plane of the lens of an electronic microscope. Such a plate works as an electrostatic lens situated on the way of the scattered electrons and shifting their phase by 90°. This allows them to integrate with the nonscattered electrons in the image plane of TEM [17]. As a result the picture contrast is increased within a wide range of resolutions.

Thirty years ago a new approach to a contrast increase was proposed – electron energy filtration. A



- Imaging of the crystal structure of silicon nitride at 0.8 Angstrom resolution. – *Acta Materialia*, 2002, v.50(3), p.565–574.
6. **Gonen T. et al.** Lipid-protein interactions in double-layered two-dimensional AQP0 crystals. – *Nature*, 2005, v.438(7068), p.633–8.
  7. **Zhang X. et al.** 3.3 A cryo-EM structure of a nonenveloped virus reveals a priming mechanism for cell entry. – *Cell*, 2010, v.141(3), p.472–82.
  8. **Dubochet J. et al.** Cryoelectron microscopy of vitrified specimens. *Quarterly reviews of biophysics*, 1988, v.21(2), p.129–228.8. Bhushan S. et al. SecM-stalled ribosomes adopt an altered geometry at the peptidyl transferase center. – *PLoS biology*, 2011, v.9(1), p.e1000581.
  9. **Jensen G.J.** A description of the instruments, samples, protocols, and analyses that belong to the growing field of cryo-EM. – *Methods in enzymology*, 2010, v.483, p.xv–xvi.
  10. **Rhinow D. and Kuhlbrandt W.** Electron cryo-microscopy of biological specimens on conductive titanium-silicon metal glass films. – *Ultramicroscopy*, 2008, v.108(7), p.698–705.
  11. **Saibil H.** Molecular chaperones: containers and surfaces for folding, stabilising or unfolding proteins. – *Current opinion in structural biology*, 2000, v.10(2), p.251–8.
  12. **Harris J.R.** In vitro fibrillogenesis of the amyloid beta 1-42 peptide: cholesterol potentiation and aspirin inhibition. – *Micron*, 2002, v.33(7–8), p.609–26.
  13. **Henderson R. and Unwin P.N.** Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy. – *Nature*, 1975, v.257(5521), p.28–32.
  14. **Spence J.C.H. et al.** Solving non-periodic structures using direct methods: phasing diffuse scattering. – *Acta Crystallographica Section A*, 2003, v.59, p.255–261.
  15. **Nagayama K. and Danev R.** Phase contrast electron microscopy: development of thin-film phase plates and biological applications. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. – Series B, Biological sciences*, 2008, v.363(1500), p.2153–62.
  16. **Unwin P.N.** Phase contrast and interference microscopy with the electron microscope. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. – Series B, Biological sciences*, 1971, v.261(837), p.95–104.
  17. **Majorovits E. et al.** Optimizing phase contrast in transmission electron microscopy with an electrostatic (Boersch) phase plate. – *Ultramicroscopy*, 2007, v.107(2–3), p.213–26.

part of the electrons reaching the lens are inelastically scattered ones, which lost their energy in interaction with the sample's atoms. Low energy electrons (of a bigger wavelength) are focused with the elastically scattered electrons in various planes, causing chromatic aberrations.

As a result the inelastically scattered electrons worsen the image, damage a sample (Fig.2) and cause additional background and blurring. In order to isolate such electrons from creation of image after their interaction with the sample power filters are used. The filtration is based on the fact that electrons with varied wavelengths can deviate by various trajectories, at that, because of a long way passed by a beam of electrons with an inclination of a sample the energy filtration is most important for tomography.

In mid-1980s OPTON Co. (Germany) introduced EELS-system with Omega-filter installed not in the bottom part of TEM column, but between the two intermediate lenses. The filter consists of two magnetic prisms, an electrostatic mirror and a slot, at that, the trajectory of an electronic beam reminds the Greek letter Omega. This result marked the beginning of a new era in the analytical microscopy. In 2000 GATAN Co. changed the design of the energy filter of the bottom position, which made possible to practically achieve the level of characteristics of the Omega-filter. Thanks to the use of a CCD-matrix with a scintillator as an electronic detector, this filter, too, became imaging.

The energy filtration not only opened new analytical opportunities, but also removed many restrictions inherent in classical TEM. In particular, in tomography it made possible to eliminate a chromatic aberration during transmission of thick cuts (1–2 microns).

The energy filtration allowed us to adjust flexibly the contrast of TEM images, which is impossible with a regular microscope without deterioration of its resolution. It is important to notice, that due to a smooth contrast tuning it is possible to contrast images of separate microstructures. At last, the energy filtration allows us to do away with chemical contrasting of cuts and limit ourselves to highly specific contrasting, for example, to introduction of the electron-dense marks connected with antibodies.

---

*The authors express their sincere gratitude to N.Kiselev for the provided image of EL bacteriophage, and A.Bogdanov for his assistance in preparation of the given material. The research has been done with the financial support of RFFI within the framework of scientific project №13-04-01326.*