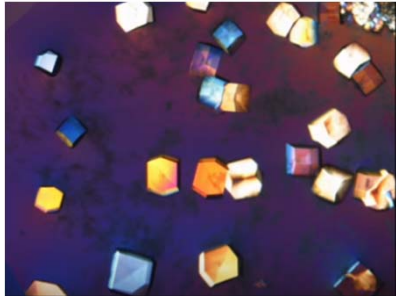


**FBCB**

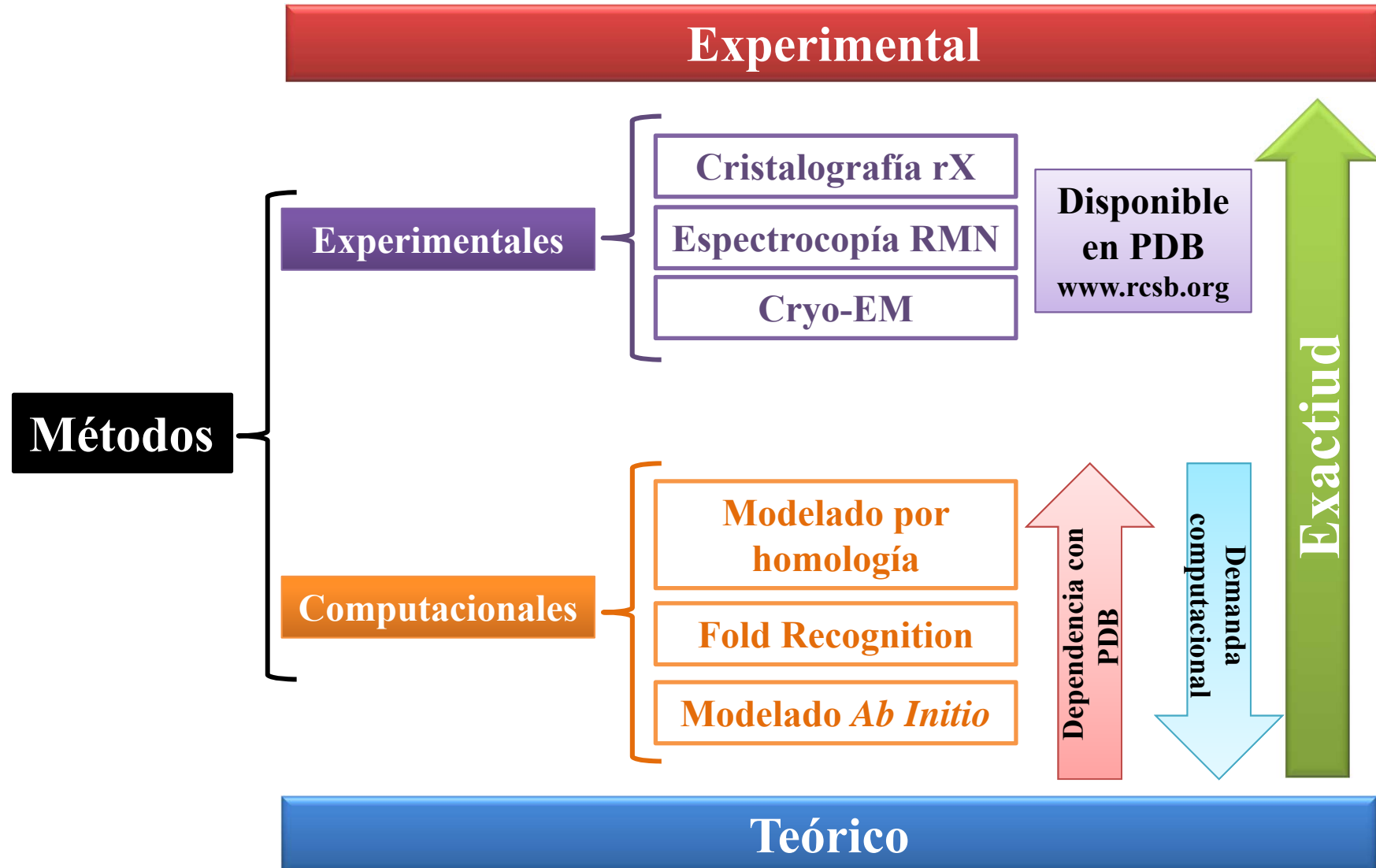
**UNL**

# **Biofisicoquímica de Metaloproteínas**

**Departamento de Física  
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas  
Universidad Nacional del Litoral  
- Santa Fe -  
ARGENTINA**

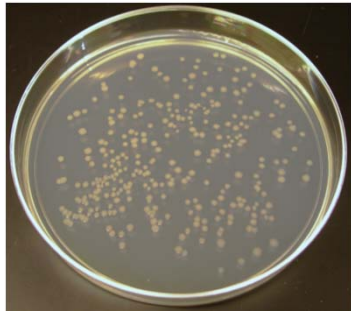


## TEMA 7: Técnicas para la determinación de la estructura de proteínas.

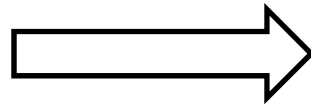


## **TEMA 7: Técnicas para la determinación de la estructura de proteínas.**

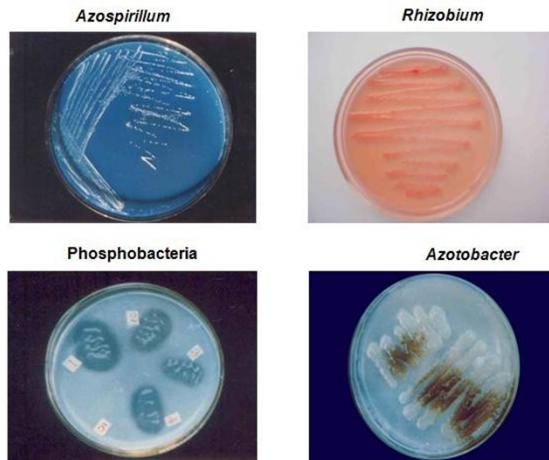
### **- Métodos experimentales: Obtención de la proteína de interés.**



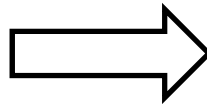
*E. coli*: proteína recombinante



Sobre-expresión → Cultivo escala laboratorio (1 - 10 L).



Aislar proteína(s) desde el organismo original.  
Imposible producir de manera recombinante  
debido a complejidad, inestabilidad, necesidad  
de chaperonas desconocidas, etc.

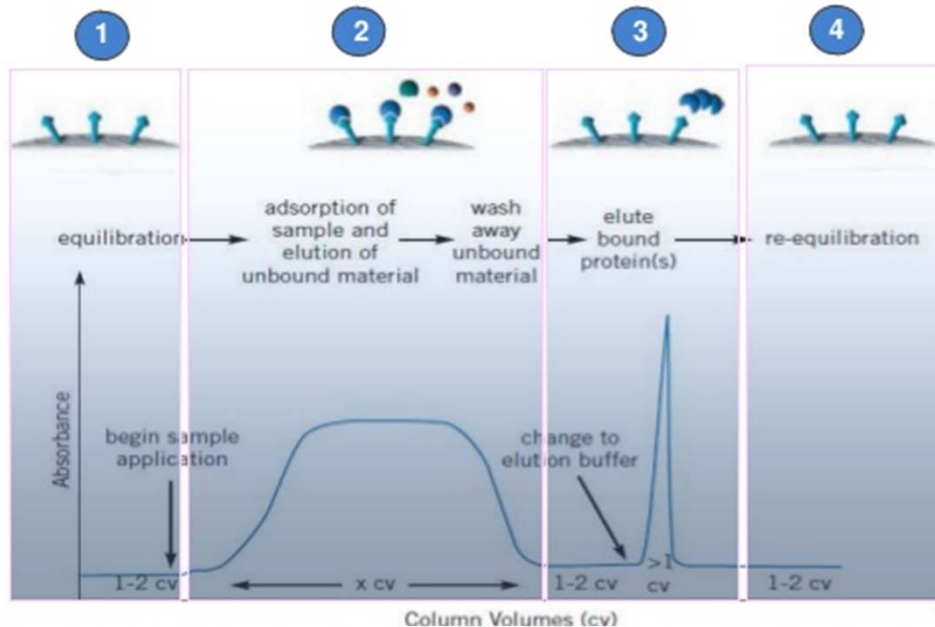


Depende de nivel de expresión bajo las condiciones de cultivo →  
Cultivos escala laboratorio – planta piloto - industrial (1 - 1000 L).

# TEMA 7: Técnicas para la determinación de la estructura de proteínas.

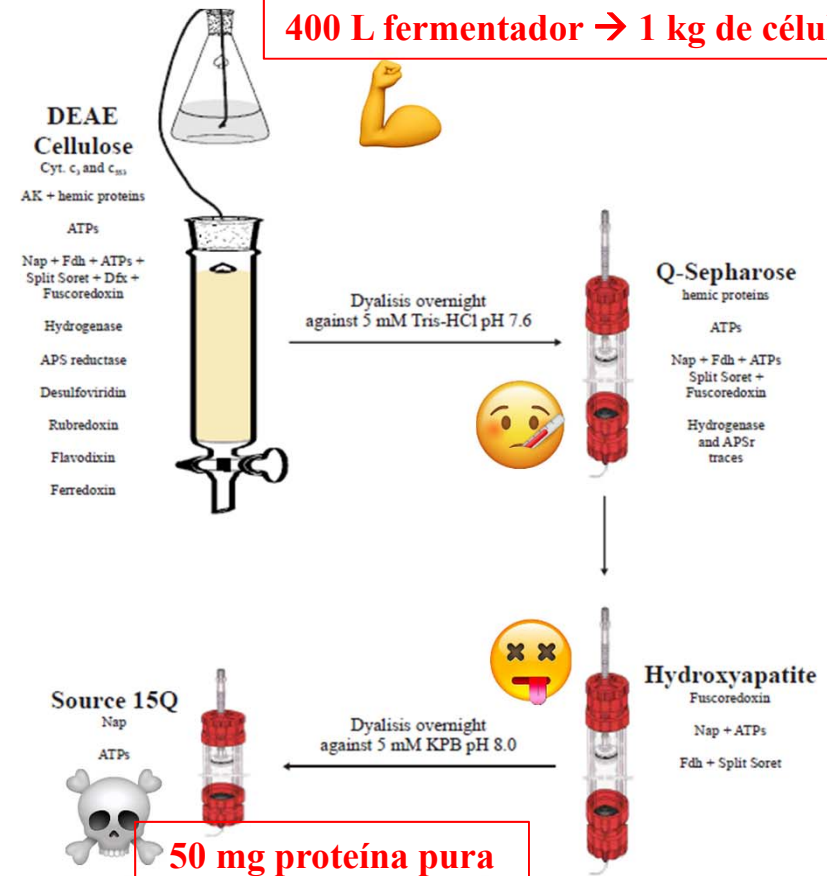
## - Métodos experimentales: Obtención de la proteína de interés.

### Purificación de proteínas con TAGs ☺

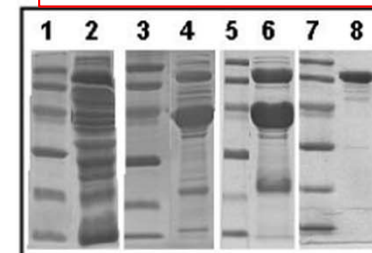


### Purificación de proteínas sin TAGs ☹

400 L fermentador → 1 kg de células



50 mg proteína pura

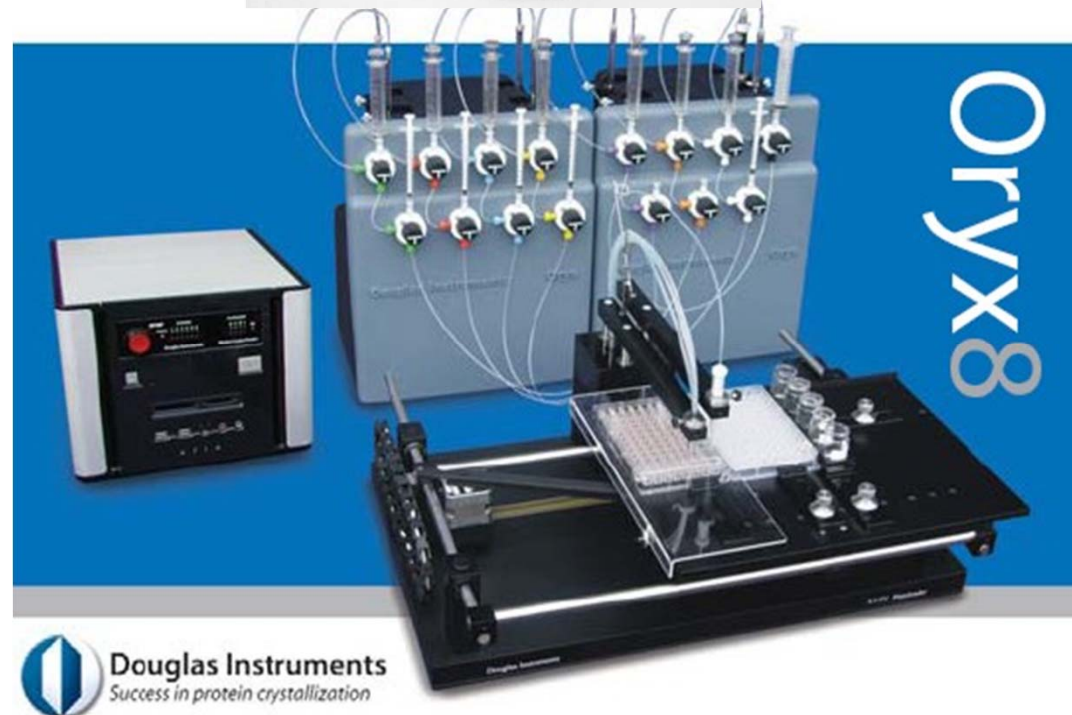
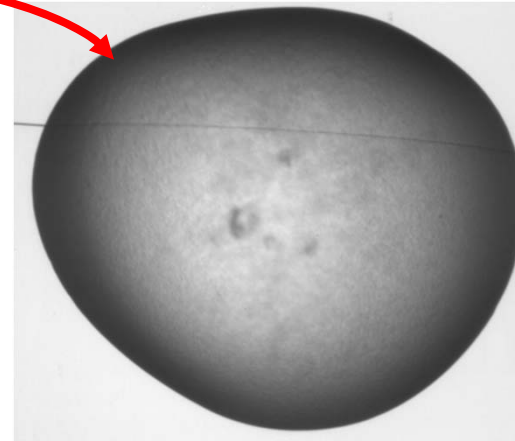
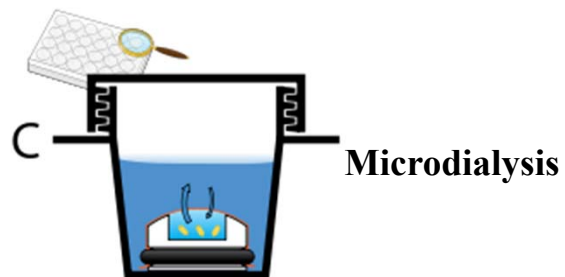


Lanes 1, 3, 5, 7: Low range molecular weight standards.  
 Lane 2: Nap containing fraction after DEAE-cellulose.  
 Lane 4: Nap containing fraction after Q-Sepharose.  
 Lane 6: Nap containing fraction after Hydroxyapatite.  
 Lane 8: Nap containing fraction after Resource Q.



## **TEMA 7: Técnicas para la determinación de la estructura de proteínas.**

**- Métodos experimentales: Cristalografía de rayos X (rX).**

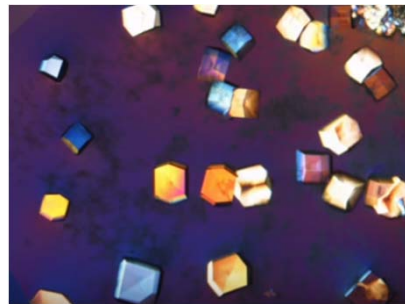
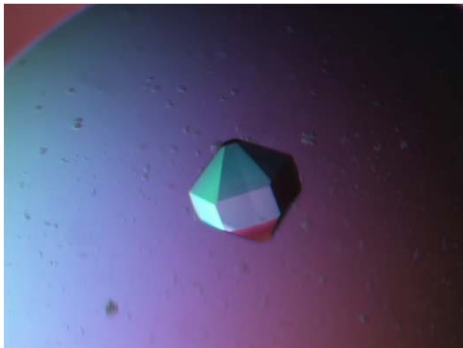
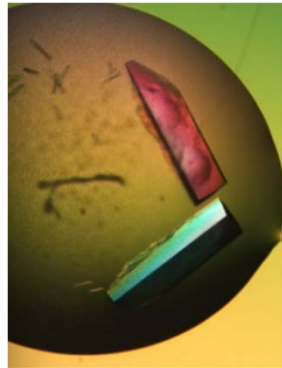
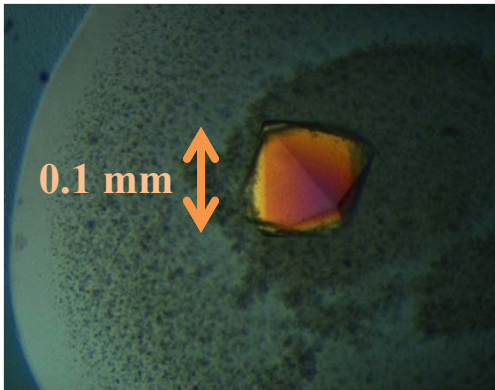
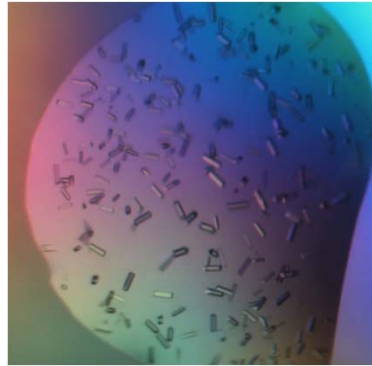
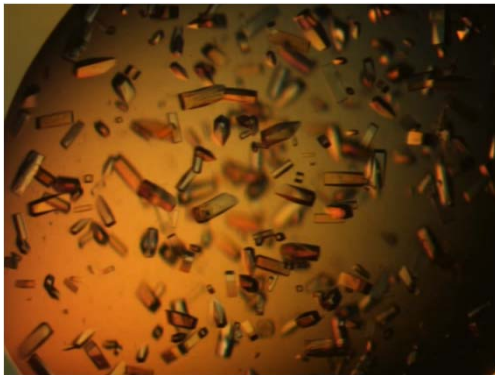


**Condiciones iniciales de la muestra para cristalizar**

**Pureza > 95%**  
**Concentración 10 mg/mL**

## **TEMA 7: Técnicas para la determinación de la estructura de proteínas.**

### **- Métodos experimentales: Cristalografía de rayos X (rX).**



*Crystal picking*

**TEMA 7: Técnicas para la determinación de la estructura de proteínas.**  
**- Métodos experimentales: Cristalografía de rayos X (rX)**

**Difractómetro**





# **TEMA 7: Técnicas para la determinación de la estructura de proteínas.**

## **- Métodos experimentales: Cristalografía de rayos X (rX)**

### **Synchrotron**



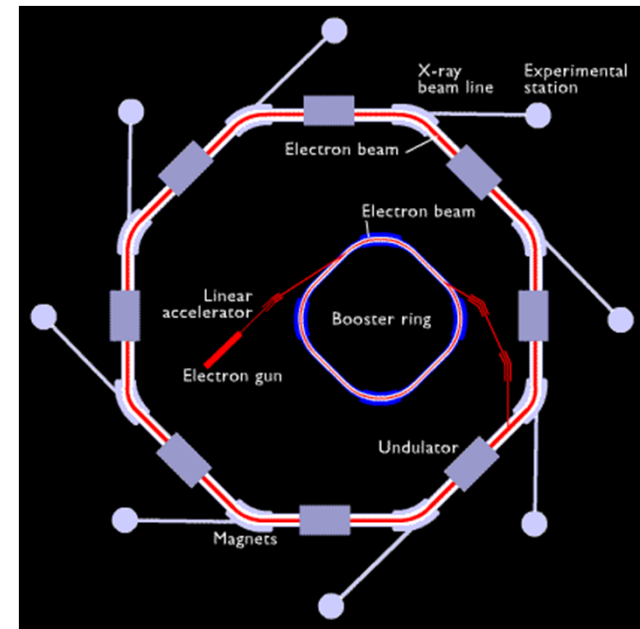
ESRF, Grenoble (Francia)



DIAMOND, Oxfordshire (UK)



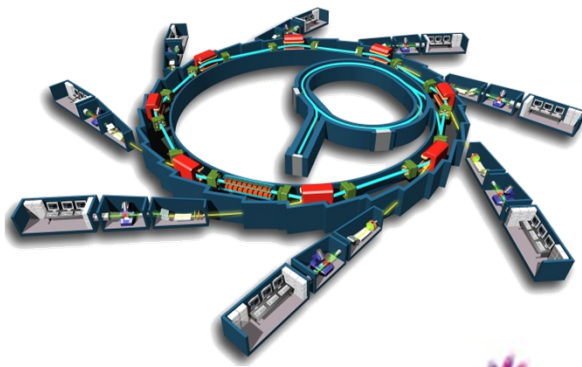
ALBA, Barcelona (España)



## **TEMA 7: Técnicas para la determinación de la estructura de proteínas.**

## - Métodos experimentales: Cristalografía de rayos X (rX)

# Synchrotron



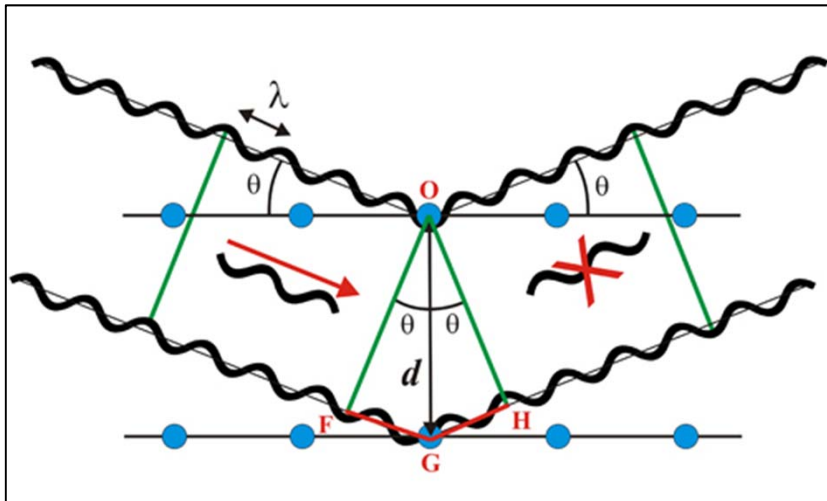
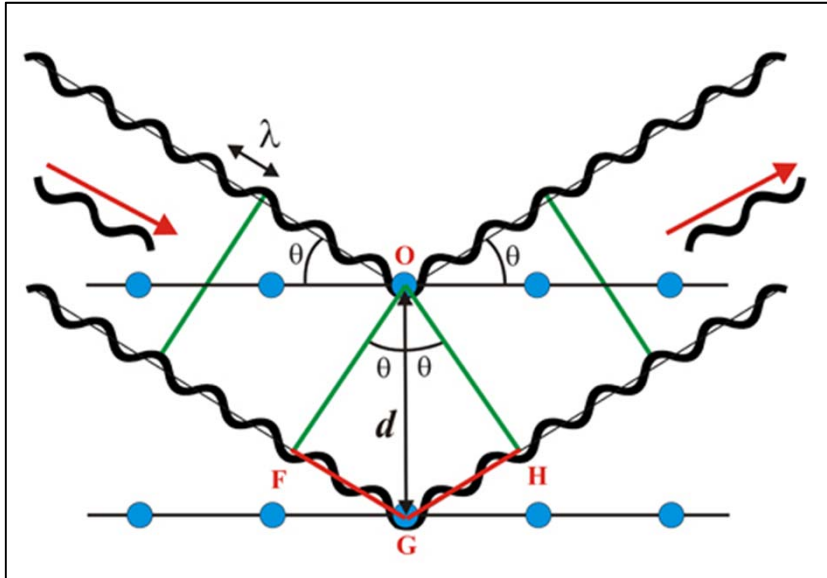
**Image Source:** <http://www.vecter.co.uk/residual-stress-measurement/synchrotron-diffraction>



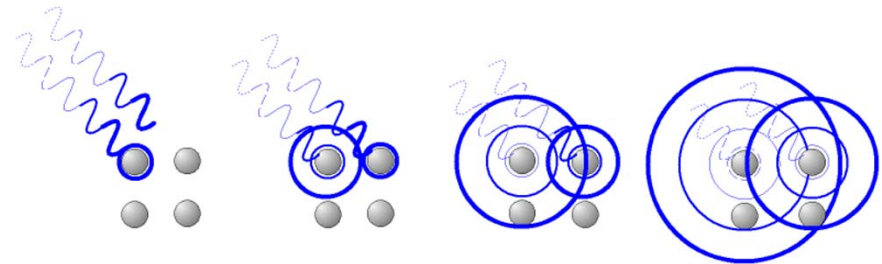
## **TEMA 7: Técnicas para la determinación de la estructura de proteínas.**

### **- Métodos experimentales: Cristalografía de rayos X (rX)**

#### **Patrón de difracción: Ley de Bragg**



- La ley de Bragg (William Henry Bragg y William Lawrence Bragg, 1913) permite predecir las direcciones (ángulos) en las que la difracción de rayos X sobre la superficie de un cristal produce interferencias constructivas.
- Cuando los rayos X alcanzan un átomo, interactúan con sus e- exteriores. Estos re-emiten la radiación EM incidente en diferentes direcciones y con la misma frecuencia (dispersión de Rayleigh o elástica).



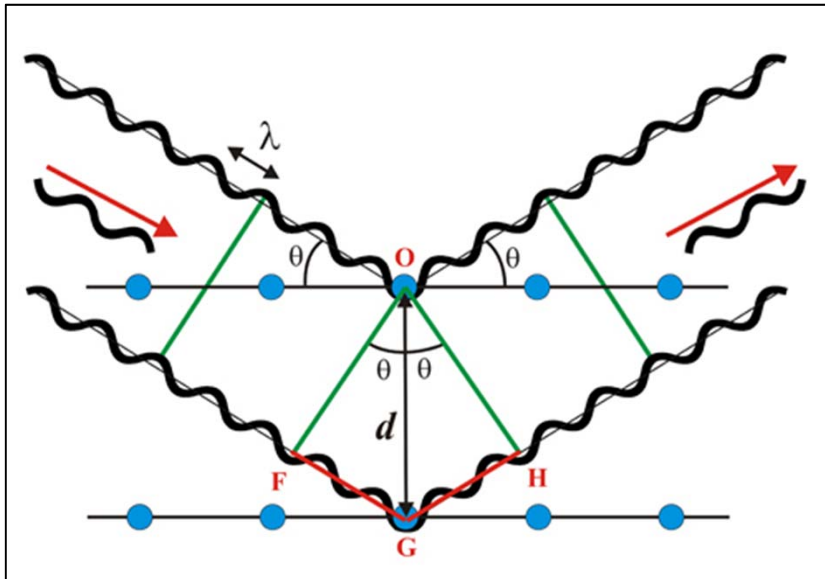
- Los rayos X re-emitidos desde átomos cercanos interfieren entre sí constructivamente (figura superior) o destructivamente (figura inferior), en función del ángulo de incidencia de los haces de rayos X, o de la distancia entre los planos (d).



## TEMA 7: Técnicas para la determinación de la estructura de proteínas.

### - Métodos experimentales: Cristalografía de rayos X (rX)

#### Patrón de difracción: Ley de Bragg



- En un arreglo periódico de átomos, cuando rX paralelos inciden sobre el cristal, son reflejados/dispersados.
- Si tenemos en cuenta dos haces de rX, podemos ver que el segundo haz tiene que recorrer una distancia extra denotada por los tramos FG y GH.
- Teniendo en cuenta que la distancia entre los planos (d) es la hipotenusa de los triángulos FOG y HOG, y además  $\theta$  es el ángulo con el que el haz de rX incide, esa distancia extra puede ser determinada por trigonometría:

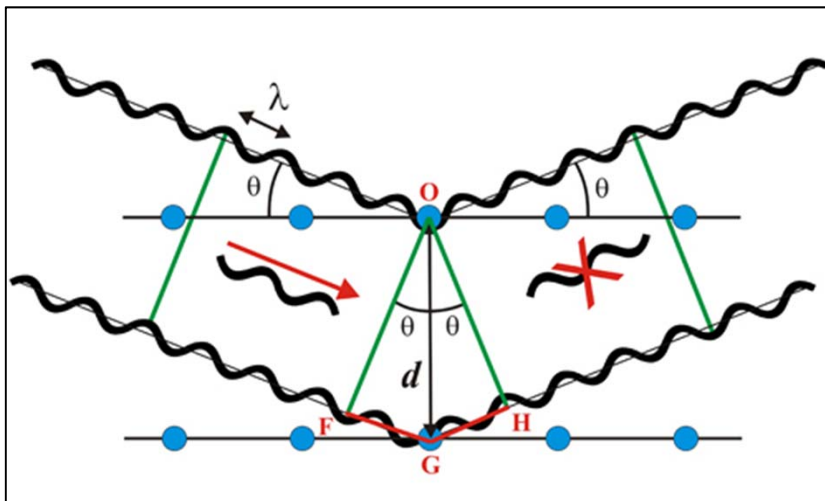
$$\text{sen } \theta = \frac{FG}{d} \Rightarrow FG = d \times \text{sen } \theta$$

$$\text{sen } \theta = \frac{GH}{d} \Rightarrow GH = d \times \text{sen } \theta$$

$$(FG + GH) = d \times \text{sen } \theta + d \times \text{sen } \theta = 2d \times \text{sen } \theta$$

- Cuando esa distancia extra (FG+GH) sea un múltiplo de la longitud de onda ( $m\lambda$ ) de los rX usados en el experimento, se producirá interferencia constructiva:

$$n\lambda = 2d \times \text{sen } \theta \rightarrow \text{Ley de Bragg}$$



## **TEMA 7: Técnicas para la determinación de la estructura de proteínas.**

### **- Métodos experimentales: Cristalografía de rayos X (rX)**

#### **Patrón de difracción: Ley de Bragg**

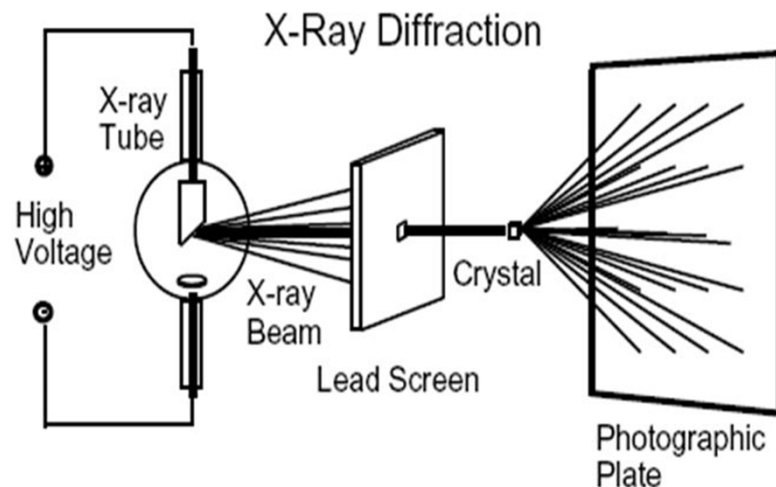
**En 3D...**

$$n\lambda = 2d \times \sin \theta \Rightarrow \lambda^2 = 4d^2 \times \sin^2 \theta \Rightarrow \frac{\lambda^2}{4d^2} = \sin^2 \theta \Rightarrow \sin^2 \theta = \frac{\lambda^2}{4 \left( \frac{a^2}{h^2} + \frac{b^2}{k^2} + \frac{c^2}{\ell^2} \right)}$$

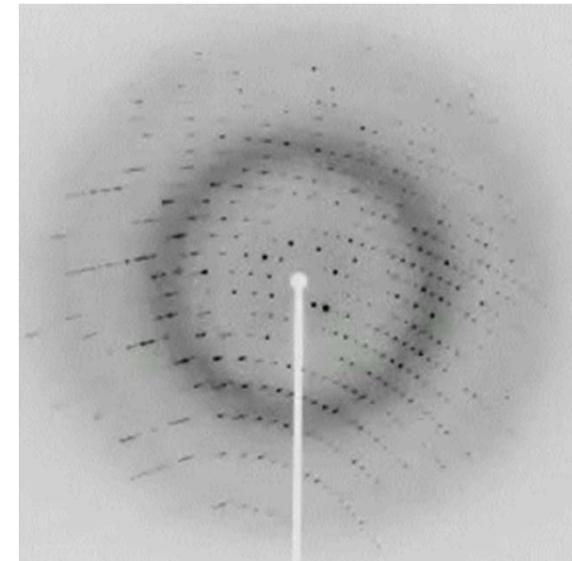
→ a, b y c son los parámetros de la celda unitaria.

→ h, k y l son los índices de Miller.

$$d^2 = \frac{a^2}{h^2} + \frac{b^2}{k^2} + \frac{c^2}{\ell^2}$$



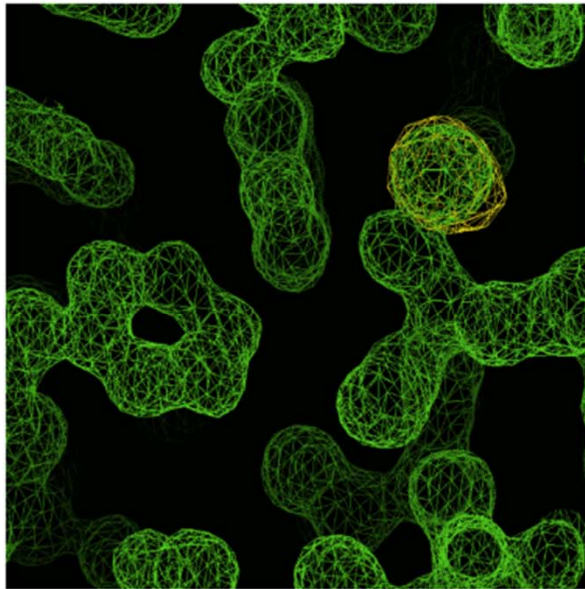
→ Rotando el cristal se obtiene información 3D



## TEMA 7: Técnicas para la determinación de la estructura de proteínas.

- Métodos experimentales: Cristalografía de rayos X (rX)

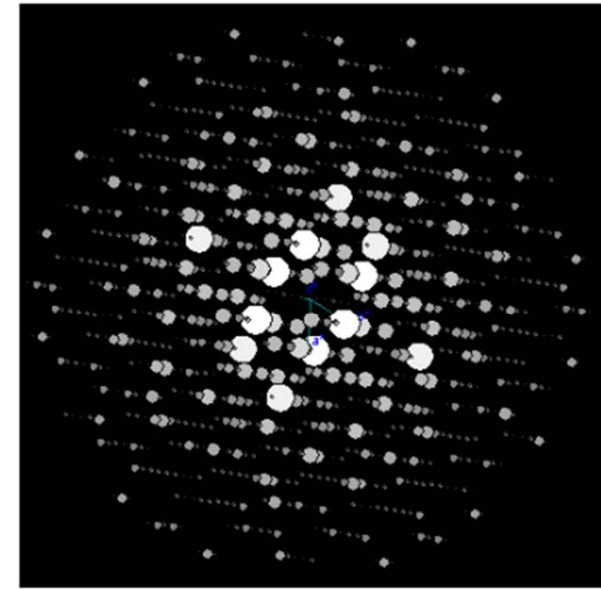
Patrón de difracción: Ley de Bragg



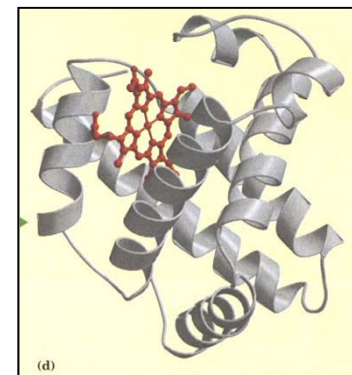
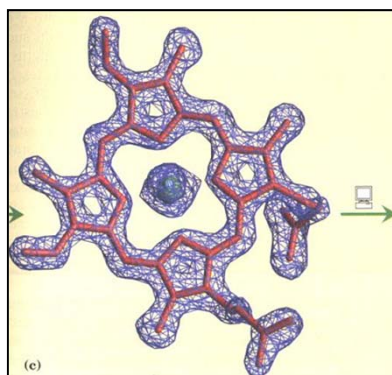
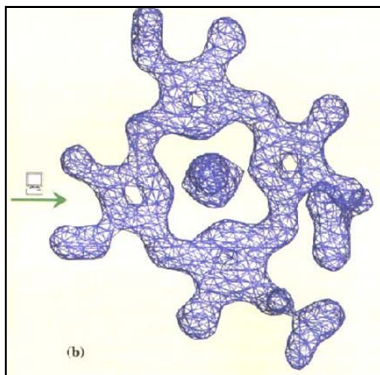
Real space - Electron density

Fourier Transform  
--->  
<---  
Inverse Fourier Transform

Bragg diffraction



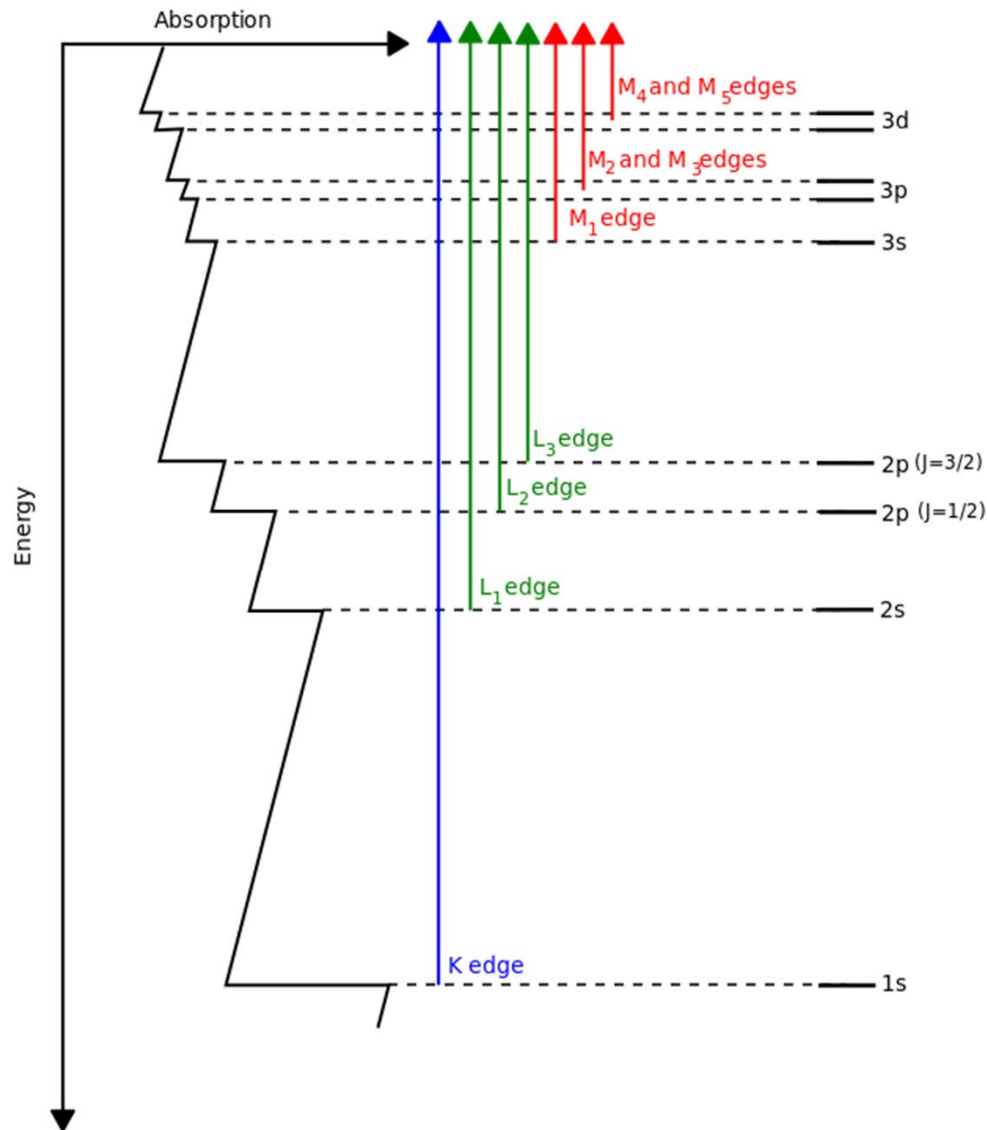
Reciprocal space - Diffraction pattern



**PDB**  
**Publicar**

## TEMA 7: Técnicas para la determinación de la estructura de proteínas.

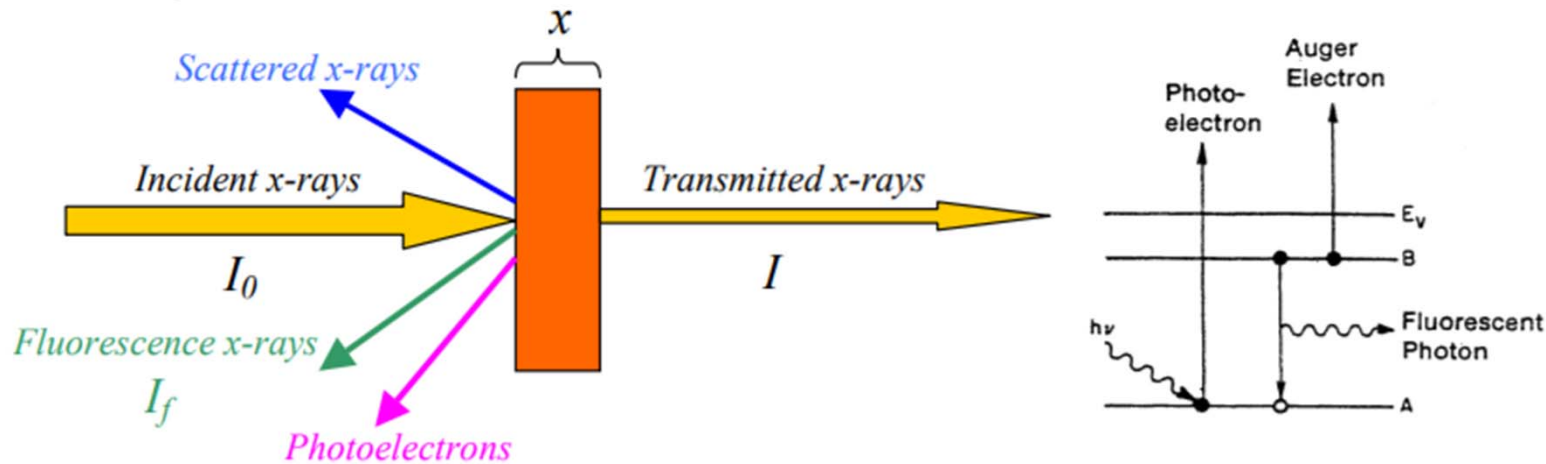
### - Métodos experimentales: Absorción de rayos X (**XAS**)



- La espectroscopia de absorción de rayos X (XAS) es una técnica ampliamente utilizada en metaloenzimas para determinar la estructura local de un sitio metálico.
- El experimento generalmente se realiza en un sincrotrón que puede proporcionar rayos X intensos con  $\lambda$  sintonizable.
- Las muestras tienen que ser soluciones de la proteína muy concentradas.
- Los datos XAS se obtienen variando la energía del fotón (longitud de onda) utilizando un monocromador cristalino en un rango tal (0.1-100 keV) que se pueden excitar los electrones del cercanos al núcleo (1s, 2s, 2p).
- Los "edges" son nombrados de acuerdo a la capa (número cuántico principal  $n$ ) de la cual se "arranca" el electrón, de acuerdo al **modelo de Bohr**.
- $n = 1, 2$  y  $3$  corresponden a K, L y M, respectivamente.

## **TEMA 7: Técnicas para la determinación de la estructura de proteínas.**

### **- Métodos experimentales: Absorción de rayos X (XAS)**



- Cuando rayos X inciden en una muestra, el campo eléctrico oscilante de la radiación electromagnética interactúa con los electrones unidos en un átomo.
- La radiación se dispersará por los dipolos eléctricos de los electrones en la muestra, o se absorberá para excitar los electrones presentes en la muestra.
- Un haz de rayos X monocromático paralelo estrecho de intensidad  $I_0$  que pasa a través de una muestra de espesor  $x$  obtendrá una intensidad reducida  $I$  de acuerdo con la expresión:

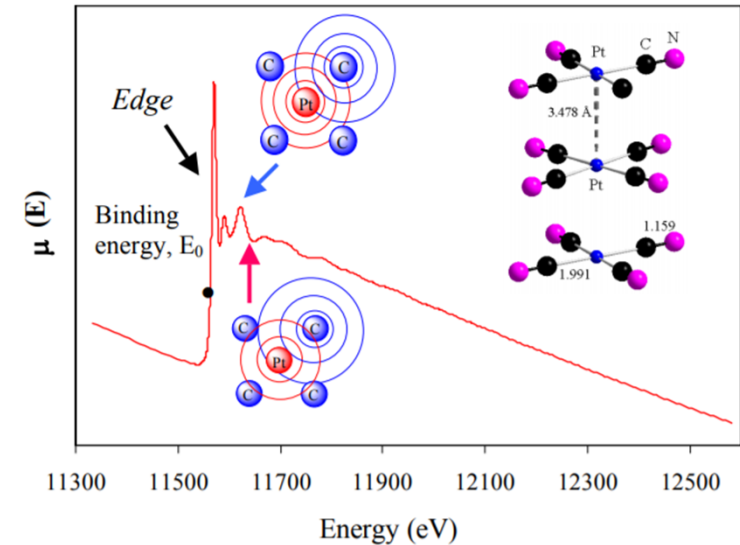
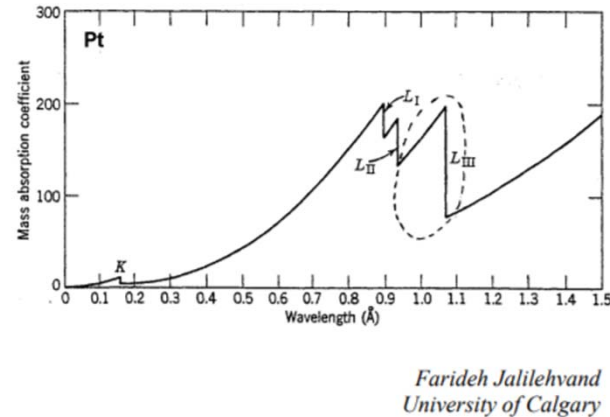
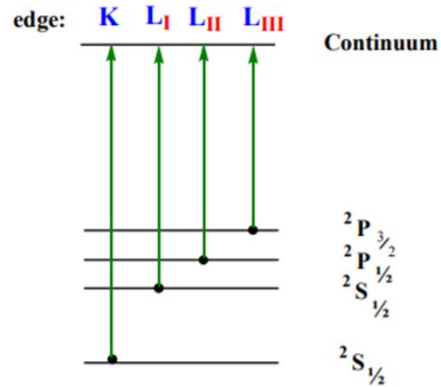
$$\ln(I_0/I) = \mu x$$

donde  $\mu$  es el coeficiente de absorción lineal, y depende del tipo de átomo y la densidad  $\rho$  del material.



## TEMA 7: Técnicas para la determinación de la estructura de proteínas.

### - Métodos experimentales: Absorción de rayos X (**XAS**)

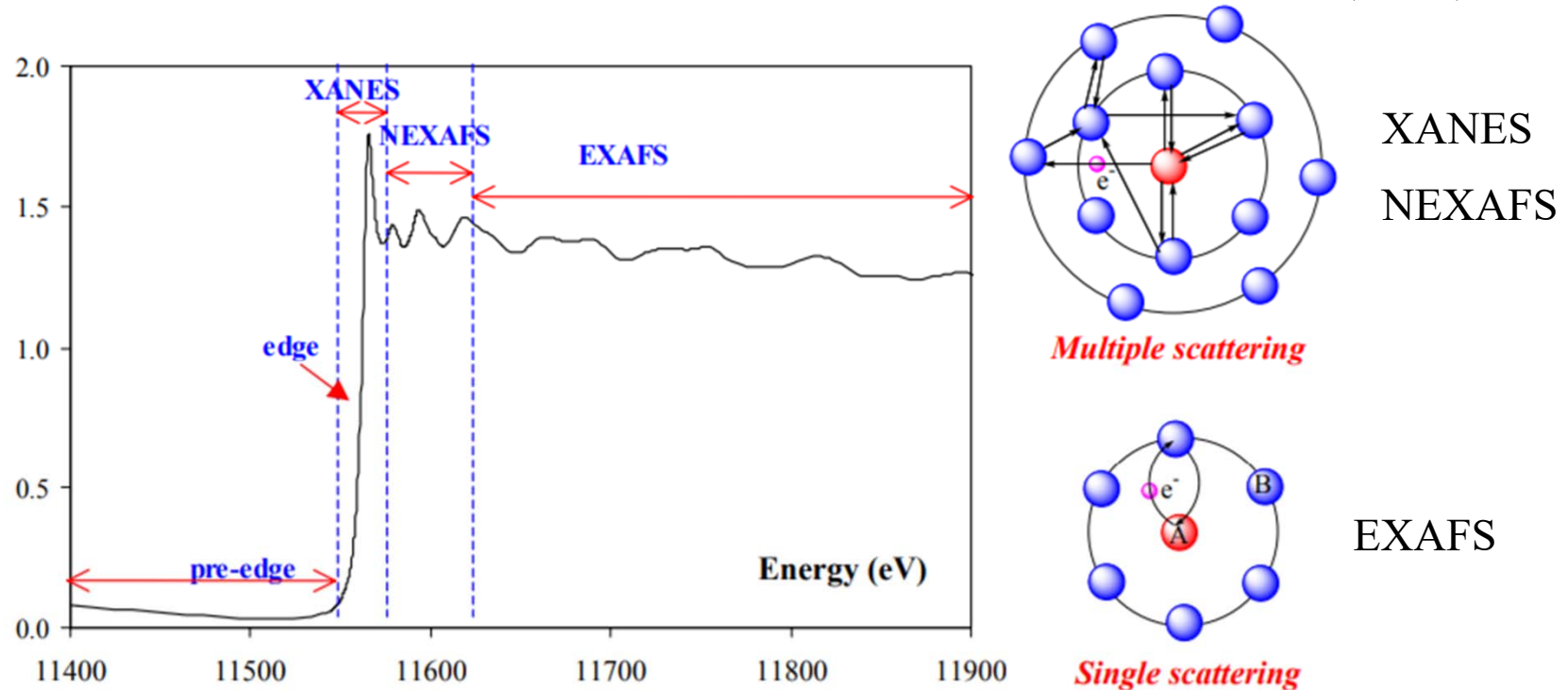


- A ciertas energías donde la absorción aumenta drásticamente, se da un *edge* de absorción.
- Cada *edge* se produce cuando la energía de los fotones incidentes es suficiente para provocar la excitación de un electrón central del átomo absorbente a un estado continuo, es decir, produce un fotoelectrón.
- Cuando el fotoelectrón abandona el átomo absorbente, su onda es retro-dispersada (*back-scattered*) por átomos vecinos.
- La figura de la derecha muestra el aumento repentino en la absorción de rayos X del *edge* de platino Pt-L<sub>III</sub> en K<sub>2</sub>[Pt(CN)<sub>4</sub>] al aumentar la energía del fotón.
- Los máximos y mínimos después del *edge* corresponden a la interferencia constructiva y destructiva entre la onda del fotoelectrón saliente y la onda retrodispersada.



## **TEMA 7: Técnicas para la determinación de la estructura de proteínas.**

### **- Métodos experimentales: Espectroscopía de absorción de rayos X (**XAS**)**



**Hay 4 regiones principales que se encuentran en un espectro de XAS:**

- 1) Pre-edge ( $E < E_0$ =energía de ionización).
- 2) X-ray absorption near edge structure (XANES), donde la energía del haz de rayos X incidente es  $E = E_0 \pm 10$  eV.
- 3) Near edge x-ray absorption fine structure (NEXAFS), en la región entre 10 eV hasta 50 eV por encima del borde.
- 4) Extended x-ray absorption fine structure (EXAFS), que comienza aproximadamente desde 50 eV y continúa hasta 1000 eV por encima del *edge*.

# TEMA 7: Técnicas para la determinación de la estructura de proteínas.

## - Métodos experimentales: Espectroscopía de absorción de rayos X (XAS)

FEBS Letters 580 (2006) 6187–6194

### Transient binding of plastocyanin to its physiological redox partners modifies the copper site geometry

Irene Díaz-Moreno<sup>a,\*</sup>, Antonio Díaz-Quintana<sup>a</sup>, Sofía Díaz-Moreno<sup>b</sup>, Gloria Subías<sup>c</sup>, Miguel A. De la Rosa<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Bioquímica Vegetal y Fotosíntesis, Universidad de Sevilla y Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Américo Vespucio 49, 41092 Sevilla, Spain

<sup>b</sup> Diamond Light Source Ltd., Rutherford Appleton Laboratory, Chilton, Didcot, Oxfordshire OX11 0QX, United Kingdom

<sup>c</sup> Instituto de Ciencia de Materiales de Aragón, Universidad de Zaragoza y Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Departamento de Física de la Materia Condensada, Plaza San Francisco s/n, 50009 Zaragoza, Spain

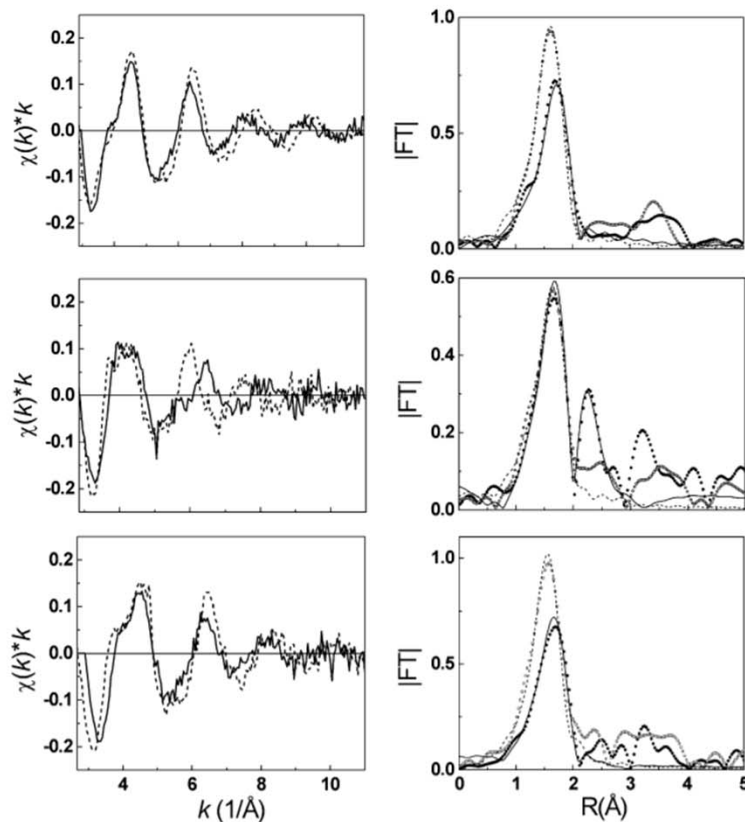


Fig. 2. EXAFS data and FT modules at the Cu K-edge of free Pc (upper), as well as of Pc bound either to Cf (middle) or to PSI<sup>Hs</sup> (lower). The EXAFS spectra (left panels) of reduced proteins (Pc<sup>I</sup>, Pc<sup>I</sup>-Cf<sup>II</sup> and Pc<sup>I</sup>-PSI<sup>Hs</sup>) are in continuous line, while those of the oxidised species (Pc<sup>II</sup>, Pc<sup>II</sup>-Cf<sup>III</sup> and Pc<sup>II</sup>-PSI<sup>Hs</sup>) are in dashed line. The corresponding FT modules of the EXAFS spectra (right panels) for both reduced and oxidised forms are represented by closed and open circles, respectively. The best fits of the FT data for both reduced and oxidised states are represented by continuous and dashed lines, respectively.

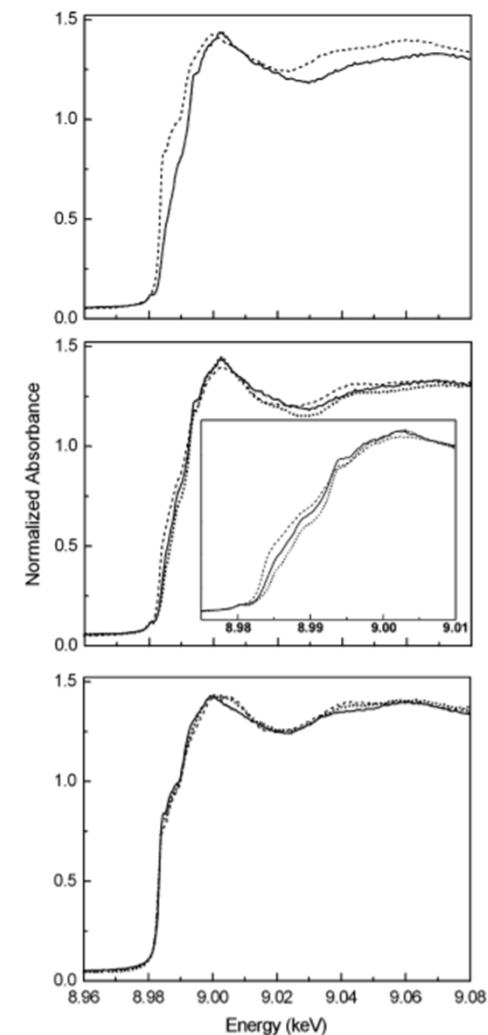


Fig. 1. XANES region of the Cu K-edge XAS spectra of free Pc, as well as of Pc bound either to Cf or to PSI<sup>Hs</sup>. Upper, experimental data for oxidised and reduced forms of free proteins, Pc<sup>II</sup> (continuous line) and Pc<sup>I</sup> (dashed line). Middle, data for Pc<sup>II</sup>, Pc<sup>II</sup>-Cf<sup>III</sup> and Pc<sup>II</sup>-PSI<sup>Hs</sup> represented by continuous, dashed and dotted lines, respectively. Lower, experimental data after sample reduction, with the same line code being used. Enlarged absorption edge spectra from 8.975 to 9.010 keV are shown in the inset in middle panel.

## **TEMA 7: Técnicas para la determinación de la estructura de proteínas.**

### **- Métodos experimentales: Espectroscopía de RMN en biología estructural**

- La resonancia magnética nuclear (RMN, o NMR en inglés) es un fenómeno físico donde se miden las propiedades magnéticas de núcleos de átomos en un campo magnético.
- Todos los núcleos que contienen números impares de nucleones tiene un momento magnético intrínseco. También los que contienen números pares de nucleones, pero la carga impar.
- RMN funciona aplicando un campo magnético fuerte (cuanto más fuerte es el campo, mayor es la resolución) a una muestra y luego se mide cómo responde el sistema cuando este se irradia con ondas de radiofrecuencia.

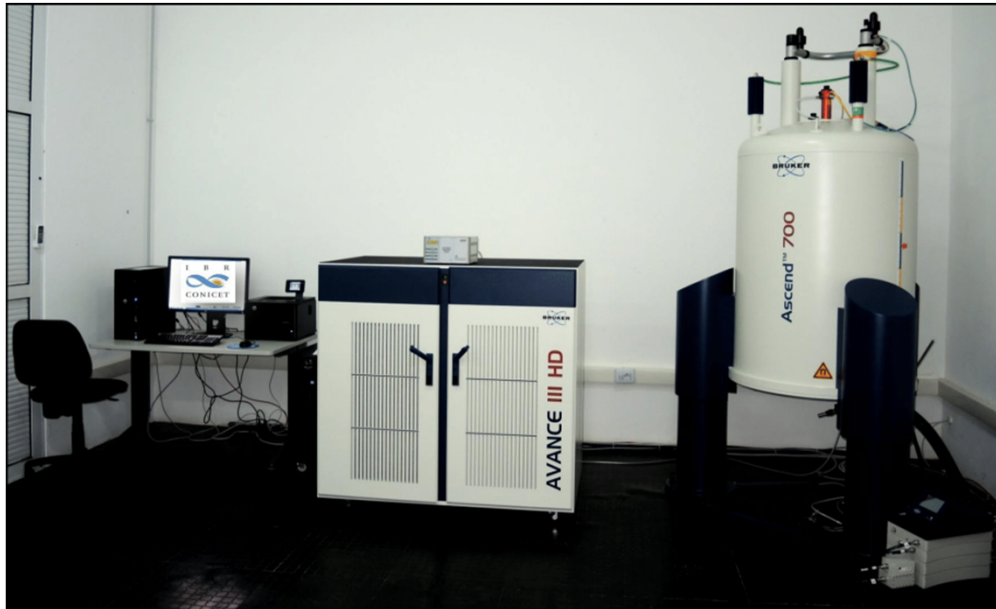


Espectrómetro de RMN operando a una frecuencia de  $^1\text{H}$  de 600 MHz

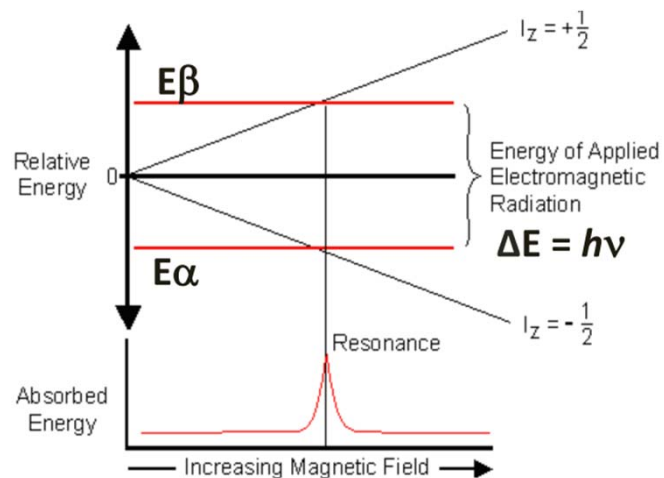
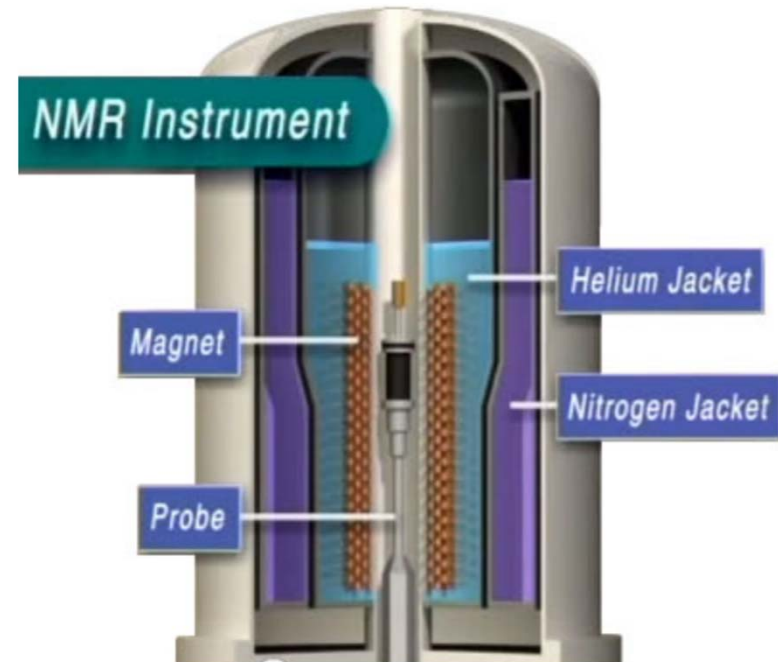
- La onda de radiofrecuencia es radiación electromagnética con una frecuencia apropiada que puede ser absorbida por un núcleo y cambiar su spin.
- Actualmente, la espectroscopía de RMN y la cristalografía de rayos X son las únicas técnicas capaces de determinar las estructuras tridimensionales de las macromoléculas con resolución atómica.

## TEMA 7: Técnicas para la determinación de la estructura de proteínas.

### - Métodos experimentales: **Espectroscopía de RMN en biología estructural**



Espectrómetro de RMN del IBR-CONICET (Rosario)



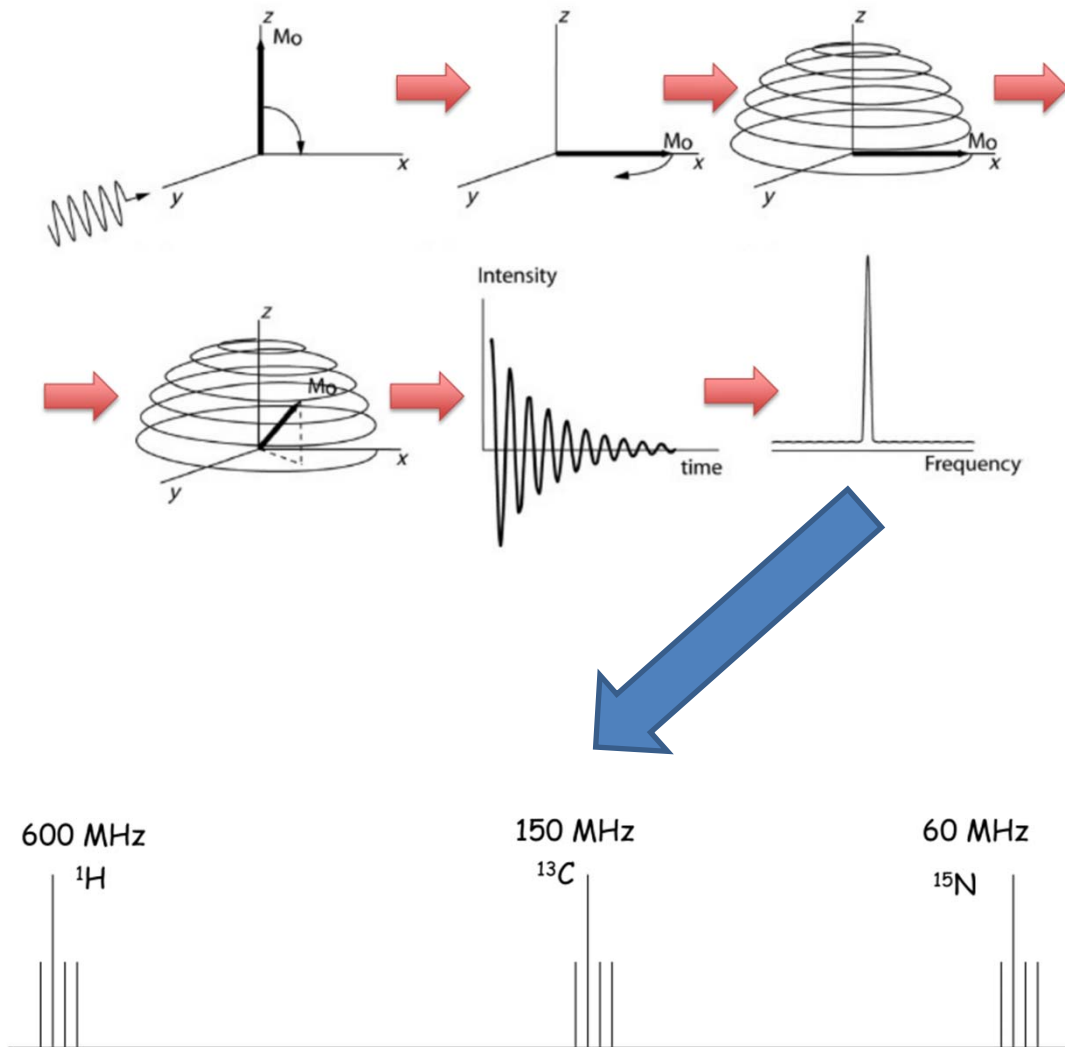
$$\begin{array}{l}
 \beta \\
 \alpha
 \end{array}
 \begin{array}{l}
 E_\alpha = -1/2\gamma h B_0 / 2\pi \\
 E_\beta = +1/2\gamma h B_0 / 2\pi
 \end{array}$$

$B_0 = 0$

$B_0 > 0$

## TEMA 7: Técnicas para la determinación de la estructura de proteínas.

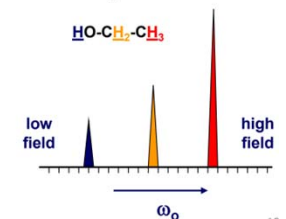
### - Métodos experimentales: **Espectroscopía de RMN en biología estructural**



- En RMN se miden transiciones de spin nuclear
- Las diferencias de energía son bajas ( $10^5$  veces menos que en espectroscopía óptica)
  - Baja S/N
  - Alta precisión
- En proteínas trabajamos con núcleos de spin  $\frac{1}{2}$ :  $^1\text{H}$  (natural),  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$  (precisan enriquecimiento isotópico)
- Cada núcleo resuena a una frecuencia particular, dependiendo de su  $\gamma$

### Desplazamiento químico ( $\delta$ )

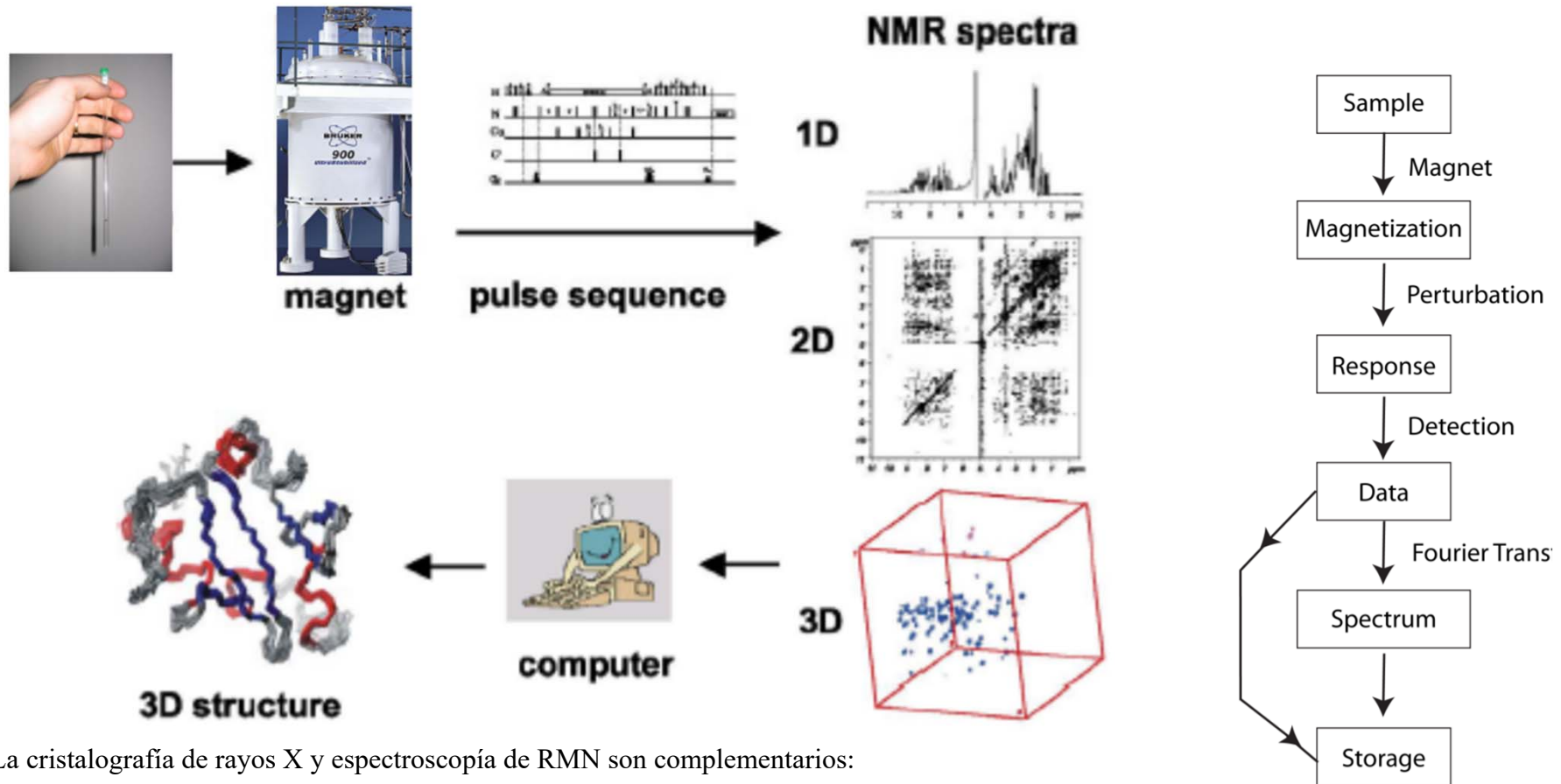
- No todos los núcleos del mismo tipo ( $^1\text{H}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{13}\text{C}$ ) resuenan a la misma frecuencia  $\rightarrow$  experimentan un entorno diferente
- Electrones  $\rightarrow$  spin  $I = 1/2$ . Producen pequeños campos magnéticos que se oponen a  $B_0$
- El desplazamiento químico depende del entorno químico que experimenta el núcleo





## TEMA 7: Técnicas para la determinación de la estructura de proteínas.

### - Métodos experimentales: **Espectroscopía de RMN en biología estructural**



La cristalografía de rayos X y espectroscopía de RMN son complementarios:

- RMN mide directamente  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  y  $^{15}\text{N}$ .
- La RMN se puede aplicar a moléculas para las que no hay cristales. Se pueden obtener nuevas estructuras, que no están disponibles a través de cristalografía de rX.
- La espectroscopía de RMN es una técnica poderosa para investigar la dinámica intramolecular en muchas escalas de tiempo, p. picosegundos a segundos. Además, para una caracterización de la dinámica interna de las estructuras biomacromoléculas



## **TEMA 7: Técnicas para la determinación de la estructura de proteínas.**

- **Métodos experimentales: Espectroscopía de RMN en biología estructural**  
**Preparación de la muestra**

### Isótopos útiles en bio-RMN

**<sup>1</sup>H**

**<sup>13</sup>C**

**<sup>15</sup>N**

**<sup>31</sup>P**

**Table 1** Comparison of different expression systems

	Cell growth	Expression level	Post-translational modification			Cost for <sup>13</sup> C/ <sup>15</sup> N-labeling
			N-linked glycosylation	Phosphorylation	Acetylation	
<i>E. coli</i>	Rapid	High	No	No	No	Low
Yeast cells ( <i>P. pastoris</i> , <i>K. lactis</i> )	Rapid	Low–high	Yes <sup>a</sup>	Yes	Yes	Low–medium
Insect cells (BVES)	Slow	Low–high	Yes <sup>b</sup>	Yes	Yes	High
Mammalian cells	Slow	Low–moderate	Yes	Yes	Yes	High

## TEMA 7: Técnicas para la determinación de la estructura de proteínas.

### - Métodos experimentales: **Cryo-EM (Microscopía Electrónica Criogénica)**

Freezing Method

Image Processing

First TEM on Protein

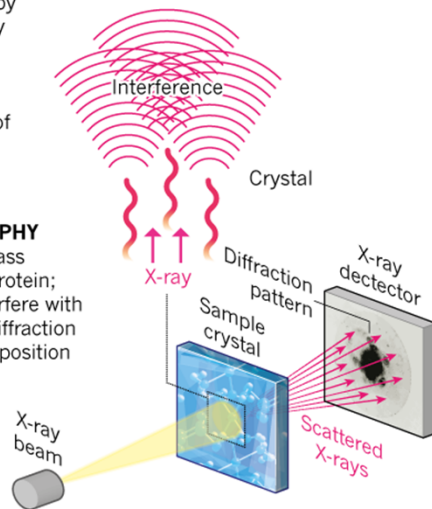
Jacques Dubochet, Joachim Frank and Richard Henderson → Nobel Prize 2017

#### THE RISE OF CRYO-ELECTRON MICROSCOPY

Cryo-electron microscopy is taking over from X-ray crystallography as a method to deduce high-resolution protein structures, particularly of large molecules.

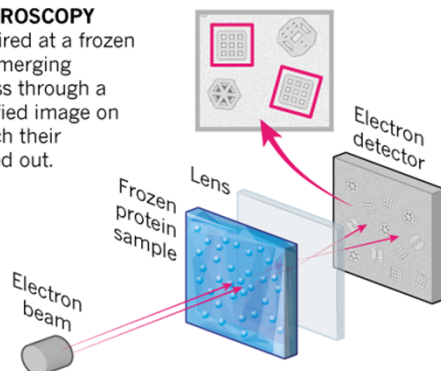
##### X-RAY CRYSTALLOGRAPHY

X-rays scatter as they pass through a crystallized protein; the resulting waves interfere with each other, creating a diffraction pattern from which the position of atoms is deduced.

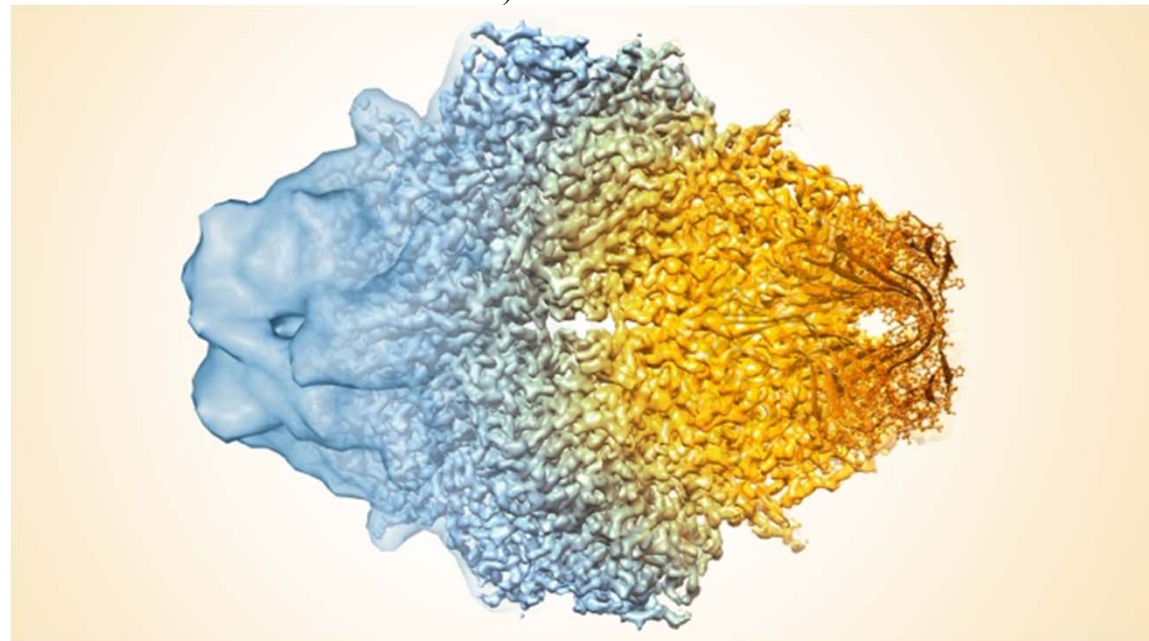


##### CRYO-ELECTRON MICROSCOPY

A beam of electron is fired at a frozen protein solution. The emerging scattered electrons pass through a lens to create a magnified image on the detector, from which their structure can be worked out.



- La solución de proteína se enfría tan rápidamente que las moléculas de agua no tienen tiempo para cristalizar, formando un sólido amorfo que hace poco o ningún daño a la estructura de la muestra (un proceso conocido como vitrificación).
- La muestra se analiza para determinar concentración, distribución y orientación de las partículas.
- Luego se adquieren imágenes y las capas bidimensionales se extraen computacionalmente.
- En el paso final, los datos son procesados por software (reconstrucción) produciendo modelos precisos y detallados en 3D de las estructuras biológicas (de escala sub-celular hasta molecular).




Cryo-electron microscopy of proteins such as this  $\beta$ -galactosidase enzyme has progressed from the low-resolution density map on the left to the atomic coordinates on the right.

## **TEMA 7: Técnicas para la determinación de la estructura de proteínas.**

### **- Métodos experimentales: Cryo-EM (Microscopía Electrónica Criogénica)**

Hay uno en la FIQ-UNL (No es Cryo-EM!!!)

#### **Equipamiento:** Transmission Electron Microscopy → Cryo-EM

- Los microscopios electrónicos de transmisión (TEM) usan un haz de electrones para examinar las estructuras de moléculas y materiales a escala atómica.
  - A medida que el rayo pasa a través de una muestra muy delgada, interactúa con las moléculas, que proyecta una imagen de la muestra en el detector (a menudo un *charge-coupled device*, CCD).
  - Debido a que la longitud de onda de los electrones incidentes es mucho más corta (1 nm) que la de la luz visible (380-800 nm), puede revelar detalles mucho más finos que la microscopía óptica de súper resolución (Premio Nobel de Química en 2014).
  - Las biomoléculas no son compatibles con las condiciones de alto vacío y los haces de electrones intensos utilizados en los TEM tradicionales → el agua que rodea las biomoléculas se evapora y los electrones de alta energía queman y destruyen las biomoléculas.
  - Cryo-EM utiliza muestras congeladas, haces de electrones menos intensos y sistemas procesamiento de imágenes más sofisticado para superar estos problemas.
- 
- *Ventaja* vs. cristalografía rX: Cryo-EM no requiere cristales, ve cómo las biomoléculas se mueven e interactúan mientras realizan sus funciones.
  - RMN también puede proporcionar estructuras muy detalladas y ver cambios conformacionales, pero está limitado a proteínas relativamente pequeñas.
  - Cryo-EM: Proteínas más grandes, receptores en membrana o complejos de varias biomoléculas en conjunto.

# TEMA 7: Técnicas para la determinación de la estructura de proteínas.

## - Métodos experimentales: Cryo-EM (Microscopía Electrónica Criogénica)

	Light Microscope	Electron Microscope
Radiation Type	Visible light	Beams of Electrons
Approx. wavelength of radiation	400–700 nm	effective wavelength < 1 nm
Radiation focussed by ...	Lenses - usually glass lenses	electromagnets
Image formed by ...	Light (of all colours whose wavelengths are supplied by the source of illumination) scatters from the various parts of the specimen and some of that scattered light reaches the objective lens (above the specimen) and is then re-directed through the objective and eyepiece lenses to form a focussed image.	Re. TEM: <u>Selective absorption of electrons by the specimen</u> . (There must be a vacuum inside an operating electron microscope because otherwise the electrons would be absorbed by air molecules before they could reach the specimen.) Parts of the specimen absorb electrons and therefore appear dark on the micrograph, while other areas of the specimen allow electrons to pass through - causing those areas to appear bright on the micrograph.
Image formed on ...	The human eye can view a real image directly by looking into the eyepiece of the microscope. An image is then projected onto the retina of the eye.	An image is formed by projecting a focussed image of the specimen onto a surface coated with electron-sensitive compounds. It may be labelled "fluorescent screen" on simple diagrams.
Typical resolution	200 nm  1 nanometre is $10^{-9}$ m so $200 \text{ nm} = 200 \times 10^{-9}\text{m} = 2 \times 10^{-7}\text{m}$	Reported values vary from a typical 0.2-0.5 nm for TEMs, through 0.1 nm for STM, down to 50 pm (= 0.5 ångström = 0.05 nm) for FE-TEM. 1 pm = 1 picometre is $10^{-12}$ m 1 Å (1 ångström) = $1 \times 10^{-10}$ m  0.5 nm is the figure cited in AS Biology books  1 nm (1 nanometre) = $1 \times 10^{-9}$ m, so 0.5 nm = $0.5 \times 10^{-9}\text{m} = 5 \times 10^{-10}\text{m}$

Compare the resolution of an electron microscope with that of a light microscope:

	=	=	... means that in very general terms, an electron microscope can detect and display around 400x as much detail as a light microscope, e.g. by imaging a line of 200 particles spaced with gaps whose size is equal to the particle size when the particle size is so small that the entire line is seen a single item when using a light microscope.
<u>resolution of electron microscope</u>	0.5 nm	1	
resolution of light microscope	200 nm	400	

Typical useful magnification	Sources state between x1000 and x2000  less than <b>x2000</b> usable image quality "at best" <b>x1500</b> useful image quality typically up to <b>x1000</b>	Some sources state up to x10,000,000  <b>approx x100,000 in SEM</b> <b>approx x250,000 in TEM</b>
------------------------------	---	--

Compare the magnification of an electron microscope with that of a light microscope:

	=	100,000x	... means that in very general terms, an electron microscope can produce magnifications of at least 100 times greater than a typical light microscope
<u>magnification of electron microscope</u>		1000x	
magnification of light microscope			

	Light Microscope (LM)	Electron Microscope (EM)
Living cells & tissues	Can <u>watch living processes</u> take place e.g. microscopic pond life in action, and even <b>cell division</b> .	Not possible to view any living material due to vacuum inside EM
Thickness of specimen	Specimen must be thin but can adjust focus to different positions (heights) within thin specimen on glass slide	<u>Very thin</u> sections only in <b>TEM</b> Images <u>surfaces</u> (only) in <b>SEM</b>
Depth: 2D or 3D ?	Image plane approx "flat" (2D) but, as above, can adjust focus <b>through</b> specimen	2D only in <b>TEM</b> ; <b>SEM</b> images surfaces - hence shows depth info that <i>seems like</i> 3D
Specimen preparation / artefacts	Simpler preparation (staining still required)	Harsher preparation procedures incl. use of corrosive chemicals that may cause "artefacts" in the resulting micrographs
Magnification	Lower Magnification	Higher Magnification - so several micrographs may be needed per specimen
Resolution	Lower Resolution	Higher Resolution - good for measuring sizes of smaller features



## **TEMA 7: Técnicas para la determinación de la estructura de proteínas.**

### **- Métodos experimentales: Cryo-EM (Microscopía Electrónica Criogénica)**

#### **Equipamiento: Cryo - Electron Microscopy**

##### DUBOCHET'S VITRIFICATION METHOD

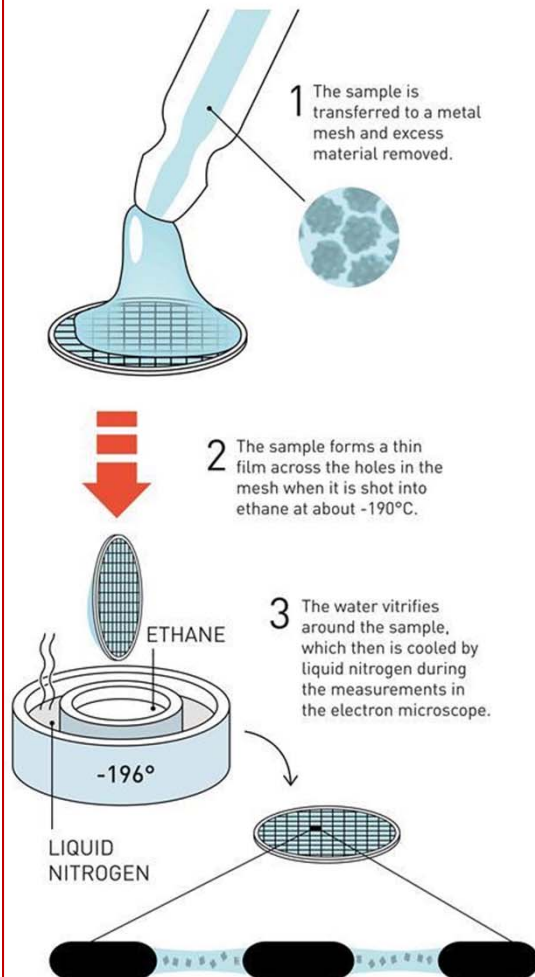


Illustration: ©Johan Jarnestad/The Royal Swedish Academy of Sciences

##### FRANK'S IMAGE ANALYSIS FOR 3D STRUCTURES

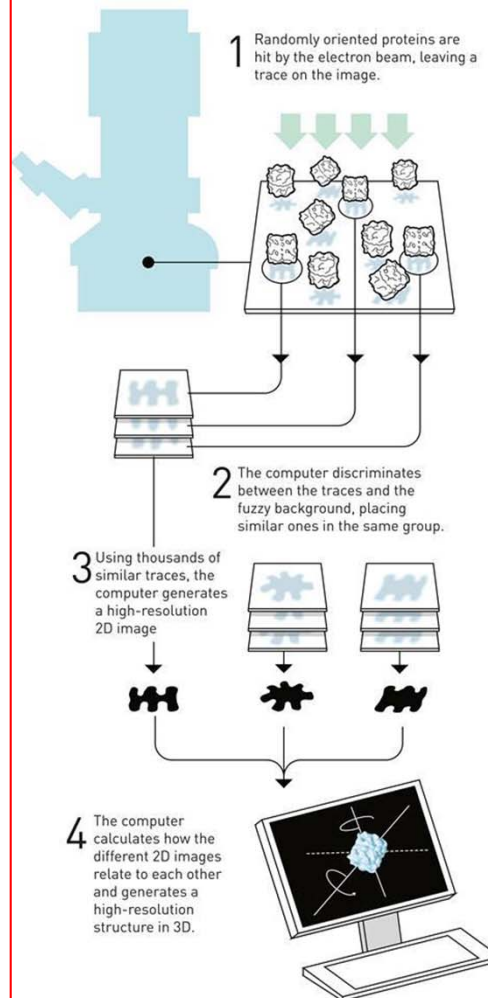
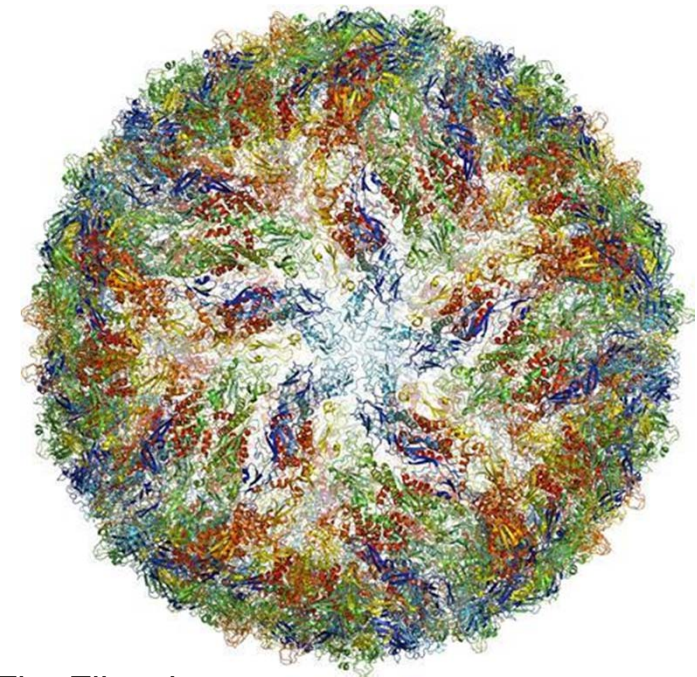
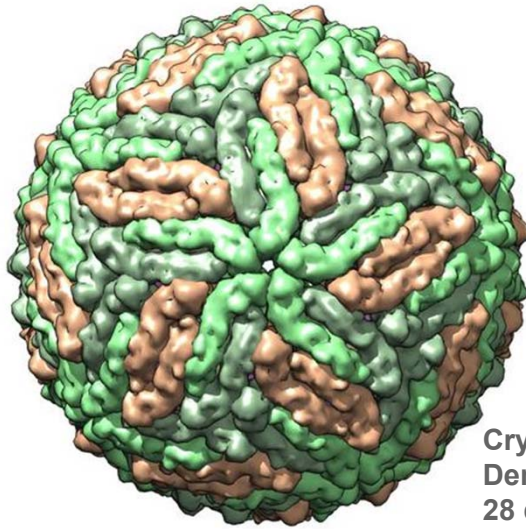


Illustration: ©Johan Jarnestad/  
The Royal Swedish Academy of Sciences



The Zika virus

Source: © Johan Jarnestad/The Royal Swedish Academy of Sciences



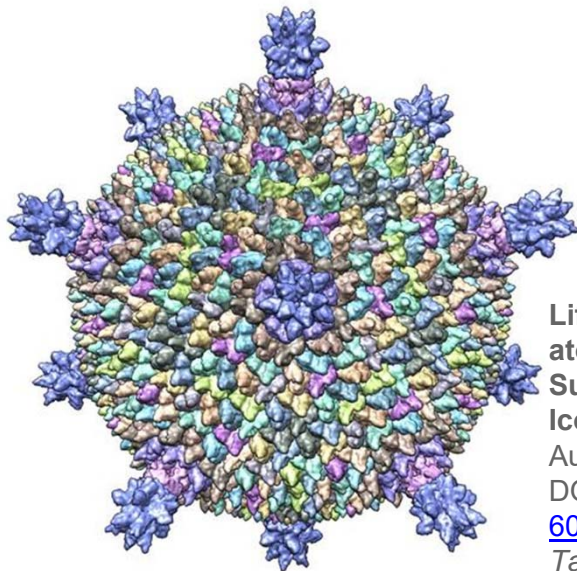
**Cryo-EM structure of  
Dengue virus serotype 3 at  
28 degrees C**

Author: *Fibriansah, G. et al.*

DOI: [10.1038/ncomms7341](https://doi.org/10.1038/ncomms7341)

Taken on a [FEI TITAN](#)

[KRIOS](#) at 6.0 Å resolution



**Life in the extremes:  
atomic structure of  
Sulfolobus Turreted  
Icosahedral Virus**

Author: *Veesler, D. et al.*

DOI: [10.1073/pnas.1300](https://doi.org/10.1073/pnas.1300601110)

[601110](#)

Taken on a [FEI TITAN](#)

[KRIOS](#) at 4.5 Å  
resolution

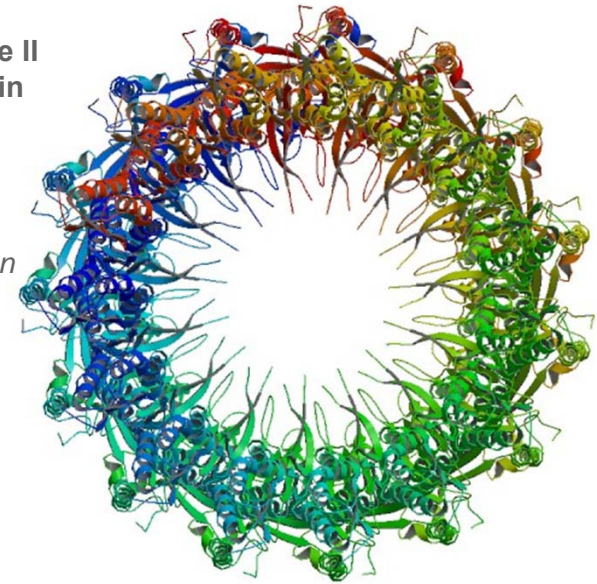
**CryoEM structure of type II  
secretion system secretin  
GspD in E.coli K12**

Author: *Yan, Z. et al.*

DOI: [10.1038/nsmb.3350](https://doi.org/10.1038/nsmb.3350)

Taken on a [FEI TITAN](#)

[KRIOS](#) at 3.04 Å resolution



**Cryo-EM structure of the  
flagellar hook of  
Campylobacter jejuni**

Author: *Matsunami, H. et al.*

DOI: [10.1038/ncomms13425](https://doi.org/10.1038/ncomms13425)

Taken on a [FEI TITAN](#)

[KRIOS](#) at 3.5 Å resolution

