

ТРЕХМЕРНАЯ ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ МАКРОМОЛЕКУЛ

Б. К. Вайнштейн

СОДЕРЖАНИЕ

1. Введение	455
а) Возможности электронно-микроскопического метода (455). б) Интерпретация электронных микрофотографий (458).	
2. Оптическая дифракция, фильтрация и голограмма	460
3. Математический аппарат трехмерной реконструкции	466
а) Объект и его проекции (466). б) Дискретизация (468). в) Свойства симметрии пресекций (469). г) О путях восстановления (470). д) Алгебраический подход (470). е) Метод двойного преобразования Фурье (471). ж) Синтез проектирующих функций (472). з) Точное восстановление в реальном пространстве (474). и) Итерационный метод (477). к) Точность восстановления и разрешение (479).	
4. Экспериментальные исследования	480
а) Исследование каталазы с помощью методики линейных уравнений (481). б) Исследования методом двойного преобразования Фурье (484). в) Исследования, выполненные методом синтеза проектирующих функций (489).	
5. Заключение	493
Цитированная литература	495

1. ВВЕДЕНИЕ

Электронная микроскопия явилась одним из немногих методов, появление которых обусловило качественный скачок в развитии наук о микроструктуре вещества. Особенно это относится к биологии, которая вместо уровня оптической микроскопии — наблюдения клеток, крупных микрорганизмов — получила возможность наблюдать структуры с разрешением до ~ 10 Å, т. е. детали строения органелл клетки, вирусов и, наконец, в последние годы перейти к изучению строения индивидуальных биологических макромолекул (биомолекул). Именно последний вопрос будет предметом нашего рассмотрения, причем в аспекте не просто наблюдения таких молекул, а получения данных об их трехмерной, пространственной структуре на основании электронно-микроскопических снимков.

а) Возможности электронно-микроскопического метода. Разрешение лучших современных серийных электронных микроскопов достигает 2—3 Å, что близко к теоретическому пределу (1,5 Å для 100 keV). Однако, к сожалению, такое разрешение не может быть в настоящее время реализовано в применении к биомолекулам. Дело в том, что они построены из легких атомов С, N, O, H, слабо-рассеивающих и поглощающих электроны, и контраст в электронном изображении самих таких молекул или молекул по сравнению с подложкой (угольной или из органической пленки) оказывается недостаточным.

Поэтому прибегают к методам так называемого *контрастирования*⁴⁻⁷, вводя в препарат вещества, сильно рассеивающие электроны, например, уранилацетат, фосфорно-вольфрамовую кислоту и др. При положительном контрастировании (рис. 1, *a*) поверхность биомолекул или тех или иных их агрегатов покрывают, как бы обволакивают, тонким слоем такого вещества. Более употребителен метод негативного контрастирования (рис. 1, *b*), когда препарат погружен в толщу контрастера. При этом последний образует «слепок» с объекта. Контрастер проникает и в полости исследуемого объекта, например, при исследовании белковых кристаллов

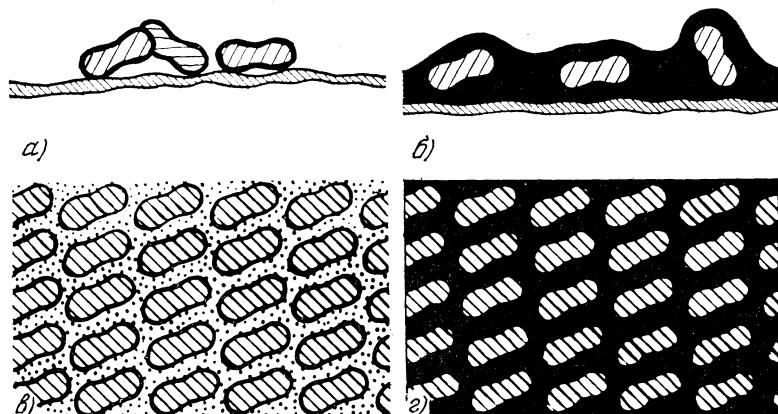


Рис. 1. Позитивное (*a*) и негативное (*b*) контрастирование биомолекул на подложке (контрастер темный); схема строения белкового кристалла — молекулы и маточный раствор между ними (*c*), негативно контрастированный белковый кристалл (*d*).

он замещает кристаллизационную жидкость, располагающуюся между биомолекулами или их субъединицами в таком кристалле (рис. 1, *c*, *d*). Естественно, что при просвечивании электронами контрастированного препарата получаемая картина обязана в основном распределению контрастера, так или иначе отображающего структуру рассеивающего объекта.

Распределение контрастера всегда обладает теми или иными неоднородностями. С другой стороны, поскольку биомолекулы и их ассоциации, например, вирусы, рибосомы, белковые кристаллы, имеют чрезвычайно сложное и в то же время поддерживаемое относительно слабыми силами строение, воздействие контрастера является для них грубым, их структура и форма могут претерпевать некоторые изменения. Все это сводит реально достижаемое разрешение при контрастировании биомолекул до 30—20 Å, в лучших работах — до 15—10 Å.

Другое принципиальное ограничение электронно-микроскопического изображения — это то, что оно является лишь увеличенной «тенью» — проекцией объекта. Вследствие малости апертуры ($\sim 10^{-2}$ rad) глубина фокуса электронного микроскопа составляет около 2000 Å, что примерно соответствует толщинам изучаемых образцов или превышает их. Интенсивность прошедших через объект электронов определяется распределением в нем вещества, т. е. соответствующим поглощением (и рассеянием) $\mu(x, y, z)$ проникающего излучения ($\mu = 1 - Q$, где Q — полное эффективное сечение рассеяния):

$$I(x, z) \sim I_0 \exp \left[\int \mu(x, y, z) dy \right], \quad D(x, z) = f[I(x, z)], \quad (1)$$

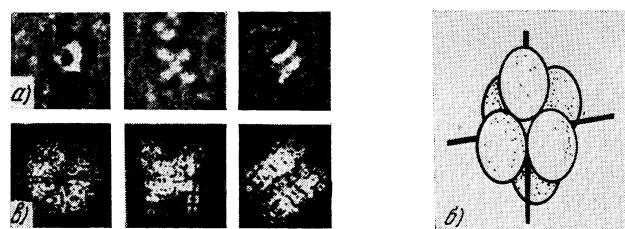


Рис. 2. Молекула глютамат-дегидрогеназы в различиях ориентациях на подложке:
 а) (увеличение 500 000); б) модель; в) имитация проекций модели в тех же ориентациях, рассчитанная на ЭВМ.

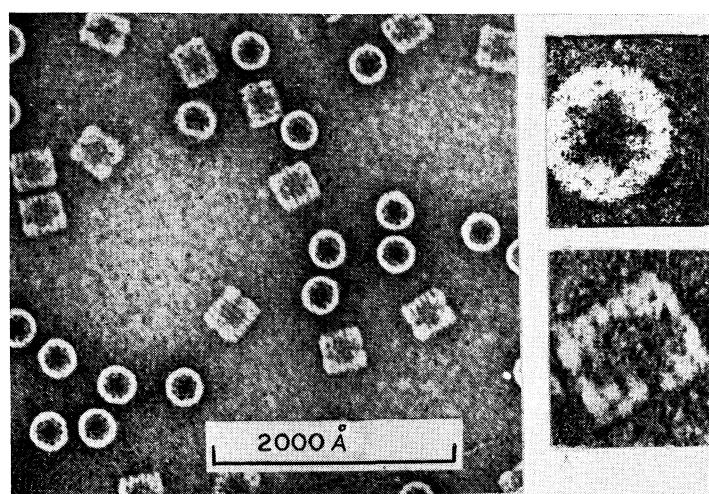


Рис. 3. Молекулы гемоцианина.

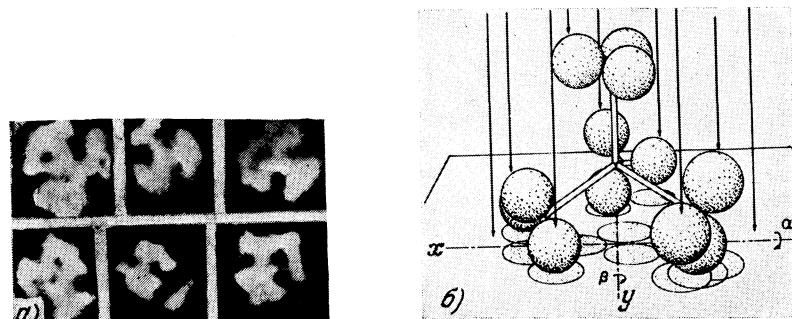


Рис. 4. Глютамат-дегидрогеназный комплекс в различных проекциях (увеличение $1,3 \cdot 10^6$) (а) и его модель (б).

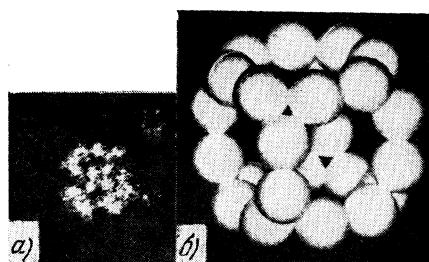


Рис. 5. Пируват-дегидрогеназный комплекс (a) и его модель из 24 субъединиц (b) (увеличение модели $8 \cdot 10^6$).

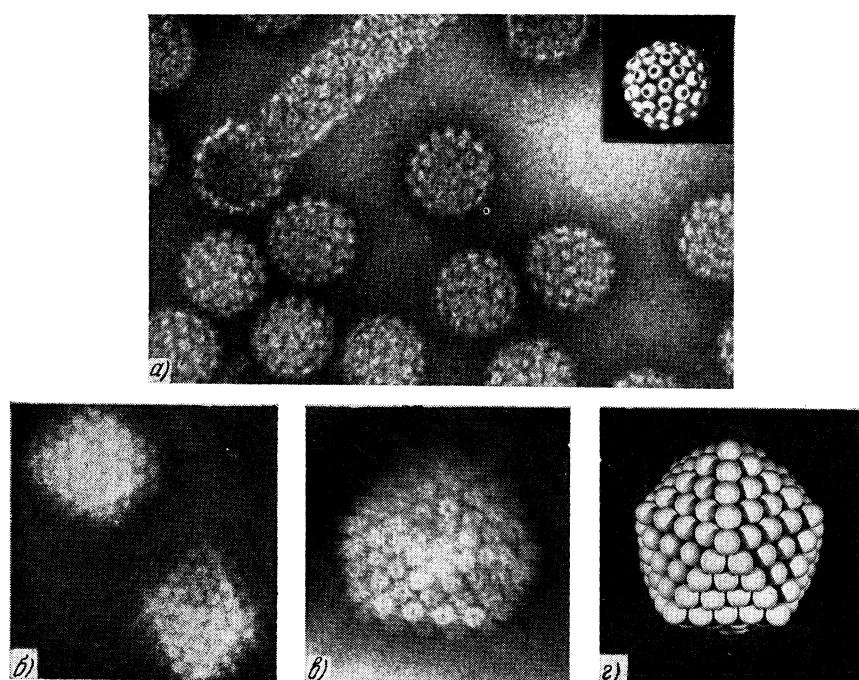


Рис. 6. «Сферические» (икосаэдрические) вирусы: бородавок человека и его шариковая модель из 72 единиц (увеличение 200 000) (a), адено-вирус (252 единицы; увеличение 200 000) (b), вирус герпеса (162 единицы; увеличение 220 000) (c) и его модель (c).

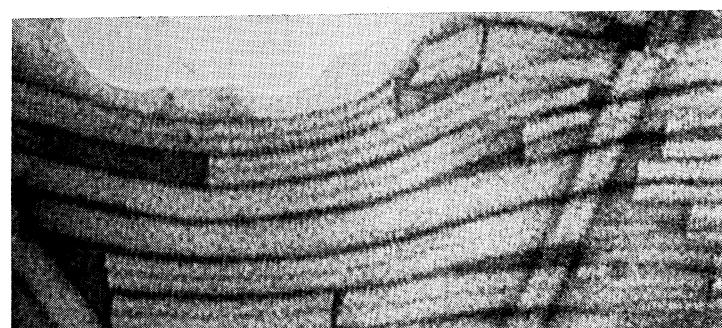


Рис. 7. Вирус табачной мозаики (увеличение 380 000).

где D — почернение. Закон почернения обычно логарифмический. Таким образом, если знать коэффициенты поглощения электронов в контрастере μ_K и белке μ_B (основную роль играет первый — значения μ_B пренебрежимо малы по сравнению с μ_K), можно от наблюдаемых почернений на фотопластиинке перейти к относительным или абсолютным величинам проекции распределения вещества в объекте (см. ниже), но непосредственных, прямых сведений о трехмерной структуре мы не имеем.

Несмотря на указанные ограничения — в разрешении и «плоскостности» изображения, электронная микроскопия биологических препаратов принесла ряд замечательных достижений, вошедших в основы молекулярной биологии. Среди них — открытие симметричного строения сферических и цилиндрических вирусов, молекулярной структуры мышцы и ее белковых компонентов, изучение строения рибосом, митохондрий, строения ряда индивидуальных биомолекул и др.

Что же дают эти исследования, какой уровень организации биомолекул доступен электронной микроскопии? Напомним, что почти все эти молекулы являются полимерными⁸⁻¹⁰. Химическая формула последовательности звеньев в биополимере называется *первичной структурой* — это топологический инвариант множества возможных пространственных конфигураций. Та или иная стабильная конформация определенных участков цепи, — например, α -спираль или растянутая β -структур в белках, двойная спираль в ДНК, — называется *вторичной структурой*. *Третичная структура* — это конкретная конформация данного биополимера, например, пространственная структура полипептидной цепочки, сложенной в компактную глобулу того или иного белка. Молекулы многих белков состоят из нескольких — двух, четырех или большего числа — так называемых *субъединиц*, каждая из которых — это отдельная свернутая полипептидная цепочка. Пространственное объединение субъединиц в сложную молекулу называют *четвертичной структурой*. Сведения о вторичной и третичной структурах, требующие атомного разрешения, дает рентгенографический анализ. Однако он чрезвычайно трудоемок, применим к молекулам, число атомов в которых не превышает $\sim 10^4$, и возможен лишь в тех случаях, когда объект можно закристаллизовать (см., например,^{9, 10}).

Область электронной микроскопии биомолекул в настоящее время — это в основном изучение четвертичной структуры и получение в отдельных случаях некоторых грубых данных о третичной и вторичной структурах. В то же время это область изучения объединений молекул белков, нуклеиновых кислот, нуклеопротеидов в ассоциации — нативные, такие как вирусы, рибосомы, хромосомы, мембранны, или синтетические — плоские мономолекулярные слои, трубы, кристаллы. Можно назвать этот уровень организации уровнем пятого порядка — «пятеричной структурой». Число атомов, объединенных в четвертичную или пятеричную структуру, — порядка 10^6 — 10^7 , и, разумеется, они не наблюдаются по отдельности. Но мы можем получить прямые сведения о размере, форме и взаимном расположении молекул, построенных из этих атомов, о конформационных изменениях четвертичной структуры, если таковые имеют место, и т. п.

Таким образом, как по достигнутому разрешению, так и по уровню организации биосистем электронная микроскопия продолжает «атомный» уровень рентгеноанализа в сторону укрупнения исследуемых объектов. Другие физические методы, дающие дополнительные сведения приблизительно того же уровня — о молекулярном весе, средних размерах макромолекул и т. п., — это рентгеновское малоугловое рассеяние, седиментационный анализ (центрифугирование), исследования вязкости и т. п. Учет их данных всегда желателен, так как естественное состояние биомолекул — в растворе или влажной среде, а приготовление препаратов часто

ведется с высушиванием их в вакууме и само исследование — в вакууме^{4, 5}, хотя имеются разработки, позволяющие обойти это обстоятельство (см., например³).

б) Интерпретация электронных микрографий. На рис. 2—10 приведены электронно-микроскопические фотографии некоторых биологических объектов^{11—25}. В большинстве случаев исследователи ограничиваются измерением размеров изучаемого объекта и качественным его описанием. В ряде случаев, особенно если получено несколько видов, т. е. проекций объекта, пространственное воображение исследователя и его интуиция позволяют построить идеализированную модель объекта. Это облегчается в тех случаях, кстати сказать, весьма типичных для биомолекул и их ассоциаций, когда структура обладает той или иной симметрией. Так, рис. 2 демонстрирует строение

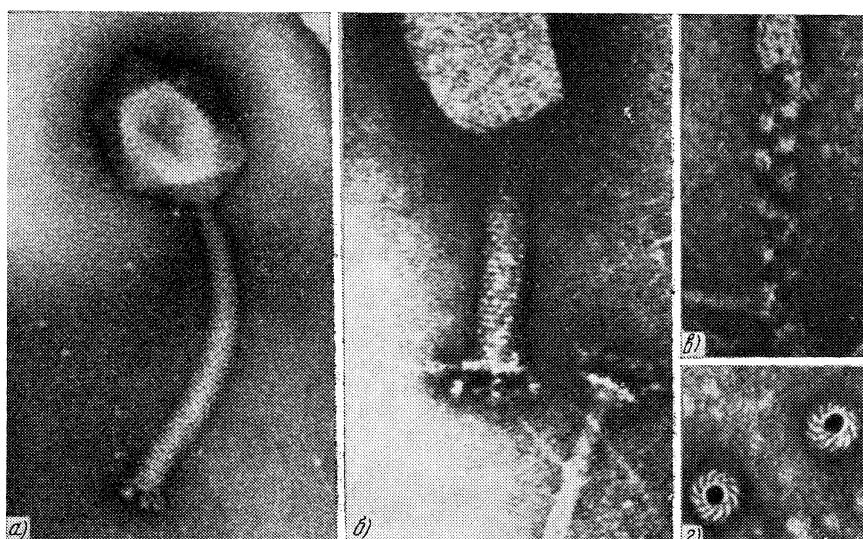


Рис. 8. Бактериофаги *Bacillus M13*. (увеличение 220 000) (а) и T4 (увеличение 300 000) (б), развивающаяся его хвостового отростка (в) и элемент отростка (г).

молекулы глютамат-дегидрогеназы — симметрия 32¹¹, а рис 3 — строение сложной молекулы гемоцианина — голубого, содержащего медь, белка, переносчика кислорода у моллюсков (молекулярный вес 8,6 млн.)¹². Рис. 4 — снимки, позволившие определить четвертичную структуру глютамат-дегидрогеназного комплекса¹³, рис. 5 — пируват-дегидрогеназного комплекса¹⁴. Рис. 6 — «сферические» вирусы бородавок человека, герпеса и адено-вирус^{7, 15, 16, 17}, обладающие икосаэдрической симметрией (см. ниже стр. 486). Рис. 7 — вирус табачной мозаики (ВТМ)^{4, 7, 17, 18}, обладающий спиральной симметрией; на рис. 8 видна такая же симметрия хвостовых отростков бактериофага и полиэдрическое строение их головок^{4, 6, 7, 19, 20}. Мы приводим и идеализированные модели некоторых из этих структур.

Сложнее обстоит дело, если объект асимметричен. Типичным примером являются рибосомальные частицы^{4, 21—23} (см. рис. 9). Ясно, что хотя построение моделей такого рода полезно и дает понимание тех или иных особенностей структуры объекта, оно не свободно от субъективного подхода.

Большие возможности открывает исследование получаемых *in vitro* симметричных ассоциаций белковых молекул, пример которых дан

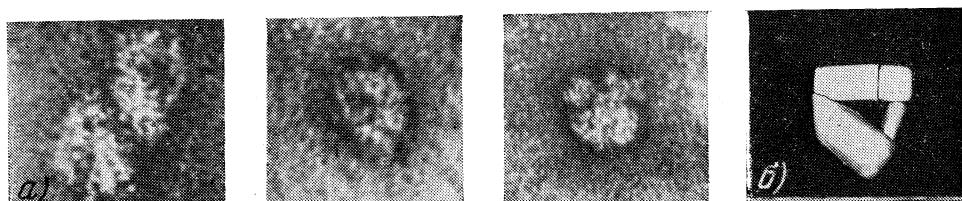


Рис. 9. Рибосомы в различных ориентациях (а) и схема их строения из субчастиц, между которыми имеется канал (б) (увеличение 500 000)

на рис. 10. Определенным шагом вперед является моделирование образования изображения. Например, можно рассматривать «тени» модели той

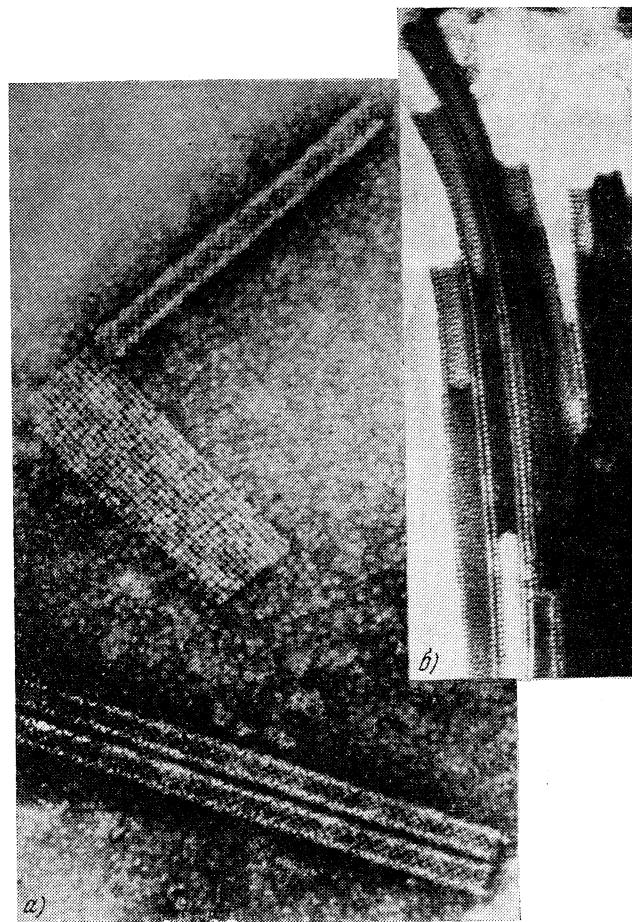


Рис. 10. Мономолекулярные слои (двумерные кристаллы), трубы и индивидуальные молекулы катализы из печени быка (увеличение 150 000) (а) и трубы катализы из эритроцитов человека (увеличение 120 000) (б).

или иной структуры в различных ориентациях (см. рис. 4) путем сравнения получаемых картин с электронно-микроскопическими снимками.

Такую работу можно поручить и ЭВМ. На рис. 11 приведены рассчитанные ЭВМ и выданные на экран различные проекции вируса типа полиомы (к нему относится и вирус бородавок человека (см. рис. 6, а), построенный из 72 морфологических единиц)²⁴. Эти проекции хорошо имитируют соответствующие фотографии. Также получена проекция молекулы глютаматдегидрогеназы (см. рис. 2, в).

Анализ структуры молекул облегчается, если они образуют *in vitro* регулярные симметричные структуры. Например, белок каталазы может

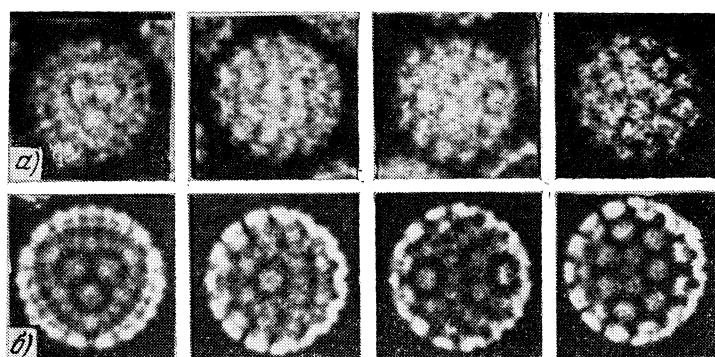


Рис. 11. Вирус типа полиомы из 72 морфологических единиц (а) и имитация его в соответствующих ориентациях, полученная на ЭВМ (б).

образовывать двумерные мономолекулярные слои. На его примере впервые были открыты также трубчатые цилиндрические белковые кристаллы (см. рис. 10)²⁵⁻²⁷. Каталазу, как и ряд других белков, можно закристаллизовать и в трехмерный кристалл (см. ниже рис. 28).

В последние пять лет в лаборатории молекулярной биологии в Кембридже, в Институте кристаллографии АН СССР в Москве и в других местах были выполнены работы, позволяющие решать количественно задачу определения трехмерной структуры объектов по их электронным микрофотографиям. Рассмотрение их и является главным предметом нашего обзора. Вместе с тем мы остановимся сначала и на красивом физическом методе «оптической фильтрации», дающем ряд сведений о трехмерной структуре.

2. ОПТИЧЕСКАЯ ДИФРАКЦИЯ, ФИЛЬТРАЦИЯ И ГОЛОГРАФИЯ

Как уже указывалось, в ряде случаев биологические объекты являются симметричными. Таковы двумерные (слои) или трехмерные кристаллы белков. Таковы обладающие спиральной цилиндрической симметрией, периодические в одном направлении палочкообразные вирусы, хвосты фагов (см. рис. 7, 8, 10). Такой же симметрией обладают «цилиндрические кристаллы» глобулярных белков, представляющие собой трубы с мономолекулярными стенками (реже — толщиной в две или более молекулы)²⁵⁻²⁸. При освещении электронной микрофотографии такого объекта пучком когерентного света (лазера) от нее можно получить оптическую дифракцию²⁹⁻³¹. Схема оптического дифрактометра, которая в сущности есть схема микроскопа по Аббе, приведена на рис. 12, а. Дифракционная картина определяется интегралом Фурье от оптической плотности

снимка $D(x, y)$:

$$\Phi(X, Y) = \int D(x, y) \exp[2\pi i(xX + yY)] dx dy = \mathfrak{F}[D]. \quad (2a)$$

Эта картина (с интенсивностью $I \sim |\Phi|^2$) может быть наблюдена в оптической плоскости дифрактометра. Значения Φ в общем случае непрерывно распределены в этой плоскости. Оптическая плотность есть наложение изображения периодической структуры $D_{\text{п}}$ и фона («шума») D_{Φ} :

$$D = D_{\text{п}} + D_{\Phi}. \quad (3)$$

В фон входит изображение подложки, отклонения от периодичности в самом объекте. Дифракция от периодической составляющей

$$\mathfrak{F}[D_{\text{п}}] = \int D_{\text{п}}(x, y) \exp[2\pi i(hx + ky)] dx dy = \Phi_{hk} = |\Phi_{hk}| e^{i\alpha_{hk}} \quad (2b)$$

сосредоточена в узлах ячейки hk обратной решетки объекта с координатами $x = h/a$, $y = k/b$ (a, b — периоды). На рис. 12, б в качестве примера

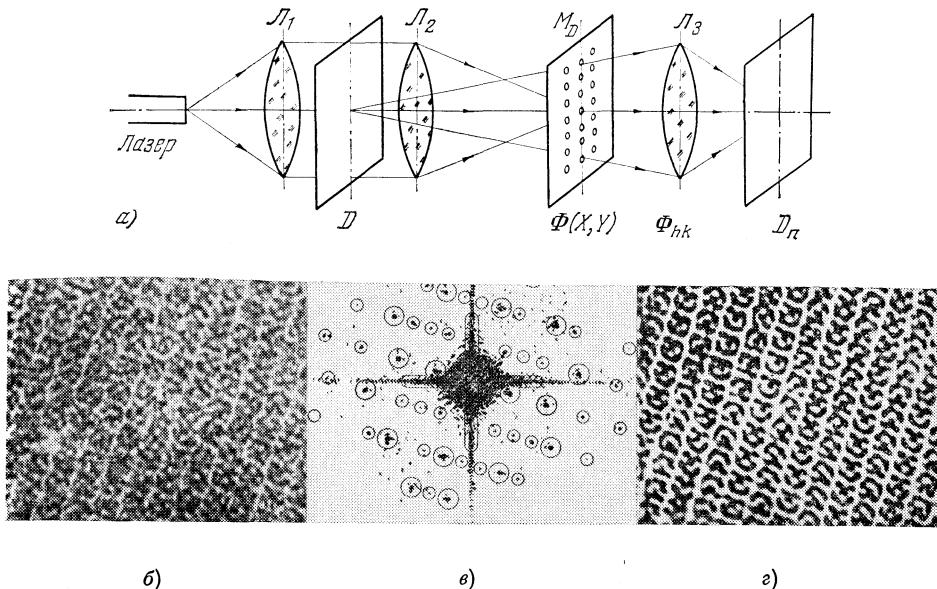


Рис. 12. а) Схема оптического дифрактометра ($L_1 - L_3$ — линзы оптической системы, D — объект (электронная микрофотография), M_D — дифракционная плоскость и маска, пропускающая лишь Φ_{hk} , $D_{\text{п}}$ — плоскость (фильтрованного) изображения); б) электронная микрофотография кристаллического слоя белка фосфорилазы В; в) дифракция от нее (кружки соответствуют отверстиям в маске, пропускающей лишь дифракцию Φ_{hk} от периодической составляющей изображения); г) фильтрованное изображение.

дана электронная микрофотография мономолекулярного слоя «двумерного кристалла» белка фосфорилазы В²⁸, а на рис. 12, в — оптическая дифракция от этого слоя. Если собрать дифрагированные пучки (2а) линзой, чему соответствует обратное преобразование Фурье

$$\mathfrak{F}^{-1}[\Phi(X, Y)] = D(x, y), \quad (4)$$

то мы вновь получим изображение микрофотографии. Однако если воспользоваться тем, что дифракционные пучки Φ_{hk} от периодической составляющей $D_{\text{п}}$ пространственно обособлены, в дифракционной плоскости

можно поставить экран с отверстиями («маску») с координатами, соответствующими узлам обратной решетки, т. е. осуществить оптическую фильтрацию³² (рис. 12, *г*). Маска изготавливается согласно дифракционной картине. Тогда в образование изображения даст вклад только составляющая (2б), причем пропущенные Φ_{hk} сохраняют, как и в любом оптическом приборе, присущие им фазы. (Они были бы потеряны при фотографировании в дифракционной плоскости, так как фотопластинка фиксирует $I \sim |\Phi|^2$.) Дифрагированные же пучки $\mathcal{D}[\Phi]$ будут задержаны. Таким образом, мы получим очищенную («отфильтрованную») картину лишь периодической структуры

$$\mathcal{D}^{-1}[\Phi_{hk}] = D_{\pi}(x, y). \quad (5)$$

Кроме задачи усовершенствования изображения, оптическая дифрактометрия позволяет наиболее точно определять периоды решетки.

Но наиболее изящное применение этого метода, подводящее к выявлению строения объекта в третьем измерении, — это дифракция от спиральных цилиндрических структур типа цилиндрических вирусов, хвостов фагов, мономолекулярных труб. Эти объекты обладают периодичностью вдоль главной оси (период *c*), их симметрия чаще всего описывается группами

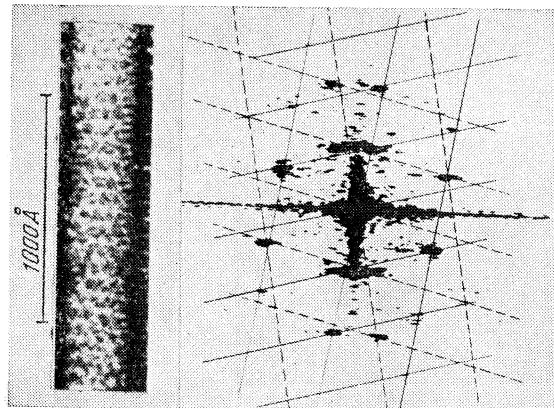


Рис. 13. Труба каталазы и дифракционная оптическая картина от нее (ср. рис. 10 *а*).

вида $s_{p/q}N$ ³³⁻³⁶. Здесь $s_{p/q}$ — операция винтового смещения на угол $\alpha = 2\pi q/p$ (составляющий *p*-ю часть от *q* полных оборотов) с одновременным сдвигом вдоль оси на *c/p*. Кроме этой симметрической операции, переводящей единицы упаковки спиральной структуры (например, белковые молекулы) в себя, такие структуры часто обладают еще простой поворотной осью симметрии порядка *N* (обычно *N* = 2, 3, 6, . . .), которая определяет «заходность» спирали. Дифракция от таких структур с периодичностью *c* и рассеивающей плотностью $\rho(r, \psi, z)$ определяется трансформантой Фурье — Бесселя³³⁻³⁶

$$\Phi(R, \Psi, Z) = \sum_{n=-\infty}^{+\infty} \exp \left[in \left(\Psi + \frac{\pi}{2} \right) \right] \int_0^{\infty} \int_0^{2\pi} \int_0^c \rho(r, \psi, z) \times \\ \times J_n(2\pi rR) \exp[-i(n\psi + 2\pi zZ)] r dr d\psi dz. \quad (6)$$

Электронно-микроскопический снимок есть проекция структуры $\rho(r, \psi, z)$.

По общим свойствам трансформант (см. ниже, (21), (22)) дифракция от проекции определяется сечением трансформанты (6) при некотором Ψ . Аналогом обратной решетки кристалла здесь является так называемая *цилиндрическая обратная решетка*, максимумы которой соответствуют максимумам входящих в (6) функций Бесселя J_n , определяемых *правилом отбора*

$$l = mp + (nq/N), \quad (7)$$

где *q* и *p* — параметры симметрии спирали, *l* — номер слоевой линии дифрактограмм, так что $Z = l/c$; $m = 0, \pm 1, \pm 2$ и т. п. Примеры оптической дифракции на такого рода структурах даны на рис. 13—14. Рис. 13

иллюстрирует дифракцию от мономолекулярной трубы каталазы на рис. 10, *a*; ее параметры $c = 540 \text{ \AA}$, $p/q = 70/11$, $N = 1$; внешний диаметр трубы 290 \AA ³⁷. Аналогичные трубы образует фосфорилаза В — рис. 14, *a* (молекулярный вес 350 000, $c = 840 \text{ \AA}$, $p/q = 27/7$, $N = 4$, $d = 320 \text{ \AA}$)²⁸. На рис. 14, *b* приведена оптическая дифракционная картина с нанесенной на нее координатной сеткой плоского сечения цилиндрической обратной решетки. Важно отметить, что это плоское сечение распадается фактически на две сетки (условно обозначенные на рис. 13 — 14, *b* одна — сплошными,

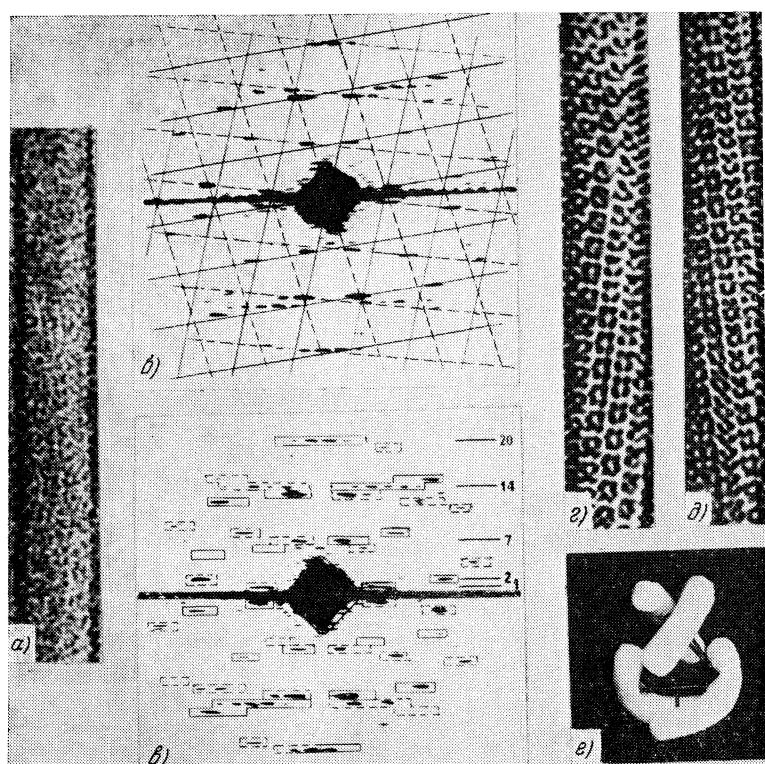


Рис. 14. Электронная микрофотография трубы фосфорилазы В (*a*), оптическая дифракция с двумя семействами дифракционных пятен, соответствующими передней и задней сторонам трубы (*b*), та же картина с прорезями двух соответствующих масок (*c*, *d*) и отфильтрованные изображения передней и задней сторон трубы (*c*, *d*) и модель молекулы (*e*).

другая — штриховыми линиями), причем одна из них соответствует дифракции от «передней», а другая — от «задней» стенки трубы из спирально уложенных молекул.

Это обстоятельство позволяет использовать идею оптической фильтрации, изготовив маску с отверстиями, соответствующими одной из сеток (см. рис. 14, *e*). Прорези в маске удлинены соответственно профилю дифракционных максимумов, определяемых радиальной растянутостью пиков функций Бесселя J_n . Нулевой пик ослабляют фильтром до половинной интенсивности. Получаемое изображение — рис. 14, *c* — представляет собой, таким образом, одну сторону трубы; оно отфильтровано и от фона. Зеркально равная маска (см. рис. 14, *e*) пропускает дифрак-

ционные пучки от другой стороны трубы и соответственно дает ее изображение (см. рис. 14, *д*). На таких изображениях четко видна спиральная укладка и уже выявляется строение индивидуальных белковых молекул, образующих упаковку. Вид их в разной угловой ориентации в трубе позволил построить модель молекулы: она построена из четырех изогнутых субъединиц, расположенных по вершинам тетраэдра (см. рис. 14, *е*). Таким же способом был изучен ряд других объектов со спиральной симметрией. Таким образом, с помощью этого оптического (в лучах видимого света) метода был сделан шаг из плоскости электронно-оптического снимка в третье измерение изучаемых объектов.

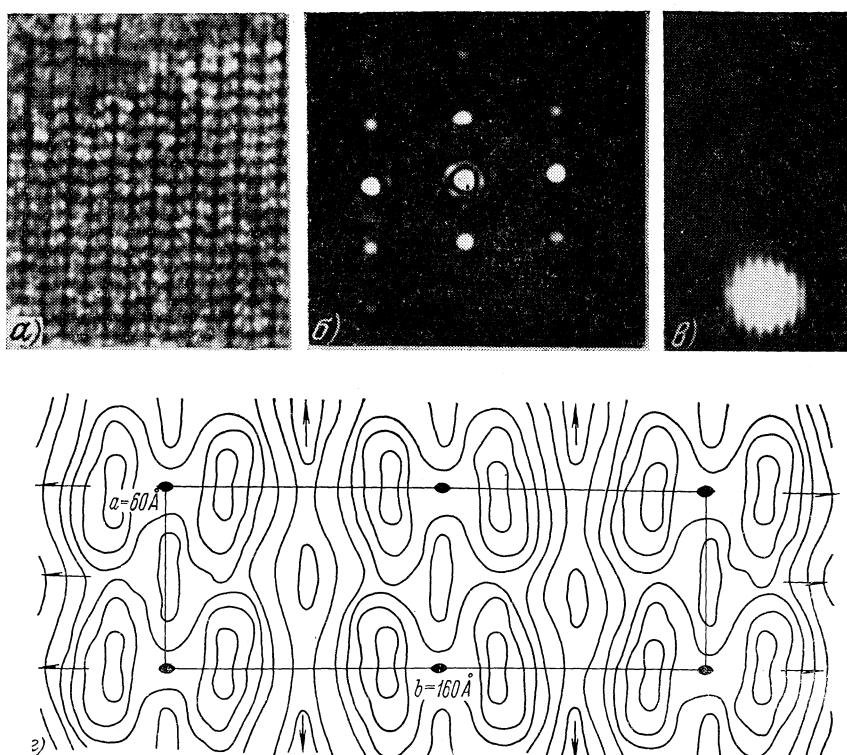


Рис. 15. Моимолекулярий слой каталазы (*а*), ее фазограмма (*б*), увеличенное изображение рефлексов (*в*) и рассчитанное по найденным из (*б*, *в*) интенсивностям и фазам изображение молекул (*г*).

Вся оптическая процедура фильтрации от шумов, или выделения части изображения, может быть заменена вычислением на ЭВМ согласно написанным выше формулам (2) — (7). Исходным материалом для этого служит измерение оптической плотности снимка D . Этот путь более сложен, но он дает точные количественные результаты. При этом можно также избежать затруднений в интерпретации вторичного (фильтрованного) изображения, связанных с фотометодикой (учет «световых» кривых почернения и т. п.). В расчет (5) при указанной процедуре должны войти модули $|\Phi_{hk}|$ и их фазы α_{hk} .

Возможен другой путь — комбинация оптических и расчетных методов на основе принципов голографии ³⁸. Для этого, как известно, на плоскости голограммы смешивают когерентно рассеянное объектом излучение с когерентным ему же опорным пучком. Интерференционная картина — голограмма — содержит в себе запись фаз и при освещении когерентным

светом воспроизводит изображение объекта. В голограмии апериодических объектов измерение самой голограммы не производится, и значения фаз, соответствующие каждой ее точке, практически определить невозможно. Однако голограмма от периодического объекта, полученная вблизи дифракционной плоскости, позволяет определить фазы пятен hk . Назовем такую голограмму «фазограммой». На рис. 15, *a* показан участок микрофотографии двумерного мономолекулярного слоя каталазы, на рис. 15, *b* — фазограмма, а на рис. 15, *c* — ее увеличенные рефлексы. Мы видим, что каждое пятно рассечено интерференционными полосами. Наложение опорной волны $\Phi_0 = e^{i\omega x}$ ($\omega = (2\pi/\lambda) \sin \varphi$, φ — угол падения на фотопластинку) и Φ_{hk} даст³⁹

$$I_{\text{ср}} \sim (1/2) + (1/2) |\Phi_{hk}|^2 + |\Phi_{hk}| \cos(\alpha - \omega X). \quad (8)$$

Измерение величины сдвига полос интерференции в пятнах $\Delta X = \Delta\alpha/\omega = \lambda/2 \sin \varphi$ определяет относительные фазы α в (2б), а $|\Phi_{hk}| = I_{hk}^{1/2}$. При использовании этих величин можно теперь по (5) рассчитать синтез Фурье — он представлен на рис. 15, *г* в изолиниях. Мы получаем здесь, таким образом, количественное описание периодической составляющей изображения (рис. 15, *а*).

Разумеется, можно восстановить изображение по голограмме и оптически³⁸, а если сочетать принцип фазограммы с принципом фильтрации³² одной из составляющих изображения (накладывая на нее «маску»), то должна восстановиться одна такая составляющая подобно рис. 14, *в, г*.

В связи с тем, что мы коснулись здесь вопросов оптической дифракции и голограмии — пока применительно к светооптической интерпретации электронно-оптических изображений, уместно сказать несколько слов о возможностях применения этих же идей в самой электронной оптике. В принципе, разумеется, все это осуществимо и для электронных волн, но практически создание аналогичных электронно-оптических систем с необходимым минимумом присущих им многочисленных aberrаций пока еще осуществить не удалось. Если дифракция электронов от кристаллов давно стала рабочим методом структурного анализа³⁹, то получение дифракционных картин от белков, которые вследствие громадных межплоскостных расстояний сосредоточены при очень малых углах, представляет собой сложную задачу. Она решается с помощью электронно-оптических схем, увеличивающих углы отклонения дифрагированных пучков, т. е. как бы увеличивающих эффективную длину прибора. На рис. 16 дан пример дифракции от всей той же каталазы в электронном микроскопе⁴⁰.

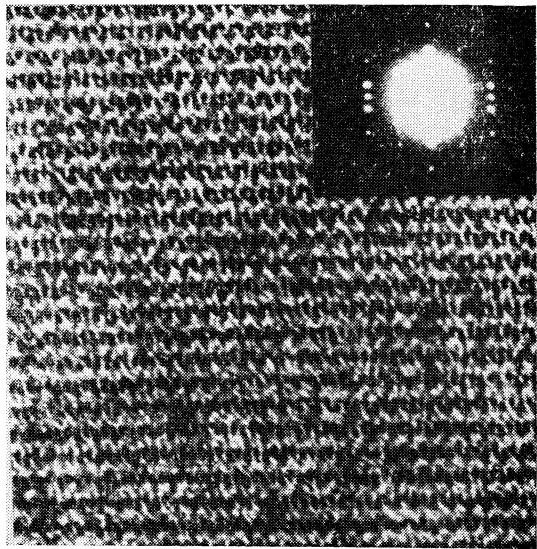


Рис. 16. Трехмерный кристалл ромбической каталазы и соответствующая картина дифракции электронов.

Идеи голограммии при своем возникновении во многом имели прицел на электронную микроскопию^{3, 41-43}. Проблема упирается в когерентность источника электронов. Кроме того, избежать увеличивающей электронной оптики с ее аберрациями все равно нельзя, так как голограмма должна быть зафиксирована на пластиинке, имеющей разрешающую способность, сравнимую с той, которая необходима для электронных волн с $\lambda \sim 0,05 \text{ \AA}$. Тем не менее делаемые в настоящее время оценки показывают, что можно надеяться с помощью голограммических принципов повысить разрешение (небиологических препаратов) до $\sim 0,4 \text{ \AA}$ ³. Восстановление изображения по голограмме можно произвести оптико-аналоговым методом или расчетом на ЭВМ^{3, 44, 45}. Однако пока реальных работ по изучению тех или иных конкретных, в том числе и биологических объектов, таким путем здесь нет.

Отметим в заключение этой главы, что электронно-микроскопические снимки биологических препаратов, кроме амплитудного контраста изображения, обязанного поглощению электронов в образце, могут иметь еще и так называемый *фазовый контраст*, обязаный разности фаз при рассеянии в образце и подложке, дефокусировка и сферической аберрации. Разработаны методы учета и устранения такого рода искажений⁴⁶⁻⁵⁰.

3. МАТЕМАТИЧЕСКИЙ АППАРАТ ТРЕХМЕРНОЙ РЕКОНСТРУКЦИИ

а) **Объект и его проекции.** Мы уже говорили, что получаемые в просвечивающей электронной микроскопии микрофотографии пересчитанные соответствующим образом, представляют собой двумерную проекцию объекта.

Пусть $\rho(\mathbf{r})$ — функция, описывающая строение объекта — распределение в нем плотности. $\rho(\mathbf{r})$ может описывать отдельную макромолекулу либо их совокупность — форму и взаимное расположение, например, их ассоциацию в вирусной частице или в кристаллической решетке. В общем случае эта функция описывает, таким образом, различные непрерывные или дискретные распределения с переменной плотностью и задана в ограниченной области^{51, 52}.

Мы будем подразумевать под ρ распределение вещества в биомолекуле, — скажем, белка, которое является «негативом» от общего распределения рассеивающей плотности в препарате, состоящего из белка и контрастера.

Таким образом, $\rho(\mathbf{r}) > 0$ ^{*}). Поскольку контрастер не проникает внутрь белка, то для описания контрастированных препаратов можно использовать функцию $\rho^k(\mathbf{r})$ специального вида, которая равна единице внутри граничной поверхности белка $S(\mathbf{r})$ и нулю вне ее (рис. 17):

$$\rho^k(\mathbf{r}) = \begin{cases} 1 & \text{внутри } S(\mathbf{r}), \\ 0 & \text{вне } S(\mathbf{r}). \end{cases} \quad (9)$$

$S(\mathbf{r})$ описывает и внутренние поверхности, если они есть.

^{*}) Теория восстановления, о которой речь идет ниже, не требует, вообще говоря (за исключением специально оговоренных случаев), положительности функции $\rho(\mathbf{r})$, но, разумеется, применима и в этом частном случае.

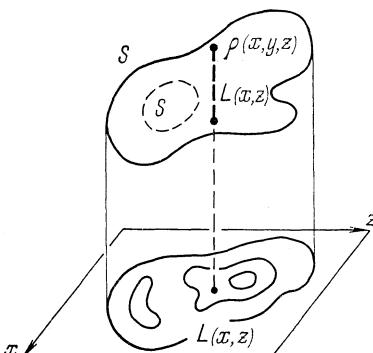


Рис. 17. Функция $\rho(x, y, z)$ и ее проекция $L(x, z)$.

Проекция $\rho(\mathbf{r})$ вдоль некоторого направления y на перпендикулярную к y в двумерном случае прямую x , а в трехмерном — плоскость x , определяется формулой

$$L(\mathbf{x}) = \int \rho(\mathbf{r}) dy. \quad (10)$$

Функция $L(\mathbf{x})$ является простейшим интегральным представлением функции $\rho(\mathbf{r})$ (см. рис. 17). Непрерывно меняя направление проектиро-

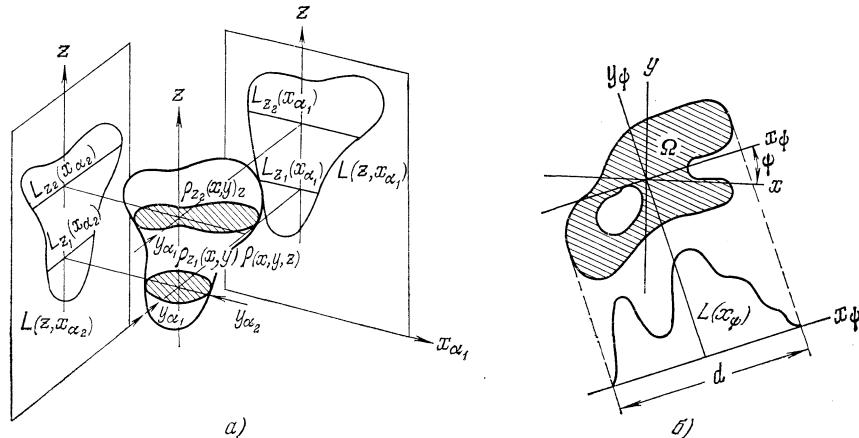


Рис. 18. Коаксиальное проектирование (а) и одномерная проекция $L(x_{\psi})$ двумерной функции (б).

вания y , мы получим непрерывный набор $L(\mathbf{x})$; $\rho(\mathbf{r})$ однозначно определяет совокупность $L(\mathbf{x})$. Очевидно и обратное: совокупность $L(\mathbf{x})$ определяет исходную функцию $\rho(\mathbf{r})$.

Трехмерная задача сводится к двумерной, если все проектирующие направления y_i компланарны, — скажем, все перпендикулярны к z . Такие проекции можно назвать коаксиальными (рис. 18, а); в них двумерные сечения функции $\rho(x, y, z)$ проектируются в одномерные функции $L^{i, k}(x_i, z_k)$, и трехмерная задача сводится к набору двумерных для $z_k = \text{const}$.

Для двумерного случая, если (x_{ψ}, y_{ψ}) — повернутая на угол ψ относительно (x, y) система координат, проекция вдоль прямой y_{ψ} имеет вид

$$L(\psi, x_{\psi}) = \int \rho(\mathbf{r}) dy_{\psi} \quad (11)$$

и ψ является переменным параметром, определяющим $L(x_{\psi})$ (рис. 18, б).

Непрерывную совокупность проекций $L(\psi, x_{\psi})$ объекта $\rho(\mathbf{r})$ можно назвать его *проекционной трансформантой*. На рис. 19 изображен двумерный асимметричный объект — «гаечный ключ» и его проекционная

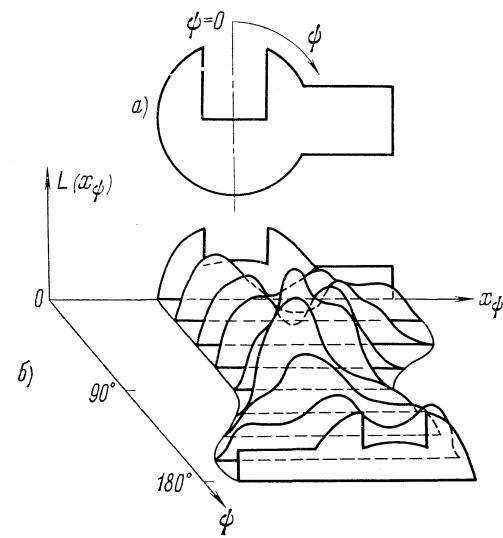


Рис. 19. Гаечный ключ (а) и его проекционная трансформанта (б).

трансформанта, представленная в виде набора «сечений» с $\Delta\psi = \pi/8 = 22,5^\circ$.

Таким образом, наша задача может быть сформулирована так: по проекционной трансформанте $L(\psi, x_\psi)$, а практически по некоторому набору из p проекций $L^i (i = 1, 2, \dots, p)$ восстановить строение $\rho(\mathbf{r})$. Совершенно такая же задача ставится и в (макроскопической) радиографии (рентгеноскопии)⁵³⁻⁵⁵, аналогичные задачи решаются в радиоастрономии⁵⁶⁻⁵⁸, в области передачи изображений⁵⁹.

Для функции $\rho(\mathbf{r})$ и любой ее проекции имеет место условие нормировки⁵²

$$\Omega = \int \rho(\mathbf{r}) dv_r = \int L^i(\psi_i, x_i) dx_i. \quad (12)$$

В приближении $\rho = \rho^k$ (9), Ω — это не что иное, как объем объекта (в двумерном случае — его площадь; рис. 18, б). Объем объекта, например, молекул, вирусов и т. п., обычно известен из данных о плотности или молекулярном весе. При использовании (12) относительные значения L , полученные из электронно-микроскопического эксперимента, можно выразить в абсолютных значениях. Абсолютные значения L можно при некоторых условиях найти и непосредственно из измерений относительных почернений на фотопластинке⁶⁰.

Восстановление ρ практически производится в некотором объеме (в двумерном случае — на площадке) v . Если поперечник функции $|\rho| > 0$ равен D , то восстановление можно вести на площадке со стороной $a \geq D$, так что

$$\bar{\rho} = \Omega/a^2, \quad (13)$$

где $\bar{\rho}$ — среднее значение⁵².

б) Дискретизация. Получаемые из опыта проекции L^i либо сразу измеряются как набор дискретных величин $L_j^i(x_{\psi_i})$ с некоторым шагом по x_ψ , либо переводятся в таковые для ввода в ЭВМ. С другой стороны, восстановление $\rho(\mathbf{r})$ ведется по некоторой дискретной системе точек. В этом случае, рассматривая двумерный случай и имея в виду условие (13), рассечем квадратную область со стороной $a \geq D$ на m^2 узлов с весами $\rho_{jl} = \rho(ja/m, la/m)$. (Можно работать и на гексагональной сетке.) Выберем для проекции тот же шаг a/m , и тогда при косом проектировании

$$L(\psi_i, x_{\psi_i}) \approx L_k^i(ka/m) = \sum' \rho_{jl}, \quad (14a)$$

где \sum' берется по точкам ρ_{jl} , попавшим в полоску шириной a/m с осью y_{ψ_i} , упирающейся в точку $x_{\psi_i} = ka/m$. Нужно отметить, что величины L_k^i чувствительны к шагу сетки разбиения и при его увеличении могут отклоняться от истинных L^i (11).

Условия нормировки (12), (13) принимают вид

$$\Omega = \sum_{j, l} \rho_{jl} = \sum_k L_k^i, \quad (14b)$$

$$\bar{\rho} = \Omega/m^2. \quad (14c)$$

Для контрастных функций ρ^k (9)

$$\rho_{jl}^k = 0 \text{ или } 1, \quad (15a)$$

$$\Omega^k = w, \quad (15b)$$

$$\bar{\rho}^k = w/m^2, \quad (15c)$$

где w — число точек сетки внутри границы S . Тогда искомая функция (15а) описывается просто как квадратная матрица из единиц и нулей.

в) Свойства симметрии и проекций. Для асимметричных объектов получение сведений о трехмерной структуре возможно лишь при наличии различных проекций объекта. Они могут быть зафиксированы, если объект случайно ложится на подложку в разных ориентациях, но эти ориентации нужно определить. Систематические сведения может дать съемка асимметричного объекта с разными наклонами к пучку — коаксиальное проектирование (см. рис. 18, а).

Для асимметричного объекта всегда

$$L(\psi, x_\psi) = L(\psi + \pi, -x_\psi), \quad (16a)$$

т. е. проекции при повороте на π равны, но отсчитываются в противоположных направлениях (см. рис. 19, б).

Мы уже указывали, что многие биомолекулы и их ассоциации симметричны. Если объект обладает поворотной осью порядка N , то

$$L(\psi, x_\psi) = L(\psi + i(2\pi/N), x_{\psi+i(2\pi/N)}) \quad (i = 1, 2, \dots, N) \quad (16b)$$

при одновременном соблюдении (16а). В качестве примера на рис. 20 дан объект с $N = 6$. Проекции вдоль его направлений ψ_i , отличающихся на $2\pi/6 = 60^\circ$, одинаковы. Нужно еще иметь в виду свойство проекций объектов с осью второго порядка $N = 2$ (и вообще с четными осьми симметрии $N = 2k$). Поскольку при этом $\rho(x, y) = \rho(-x, -y)$, то

$$L(\psi, x_\psi) = L(\psi, -x_\psi), \quad (16c)$$

опять же при соблюдении и (16а). Другими словами, проекции таких объектов содержат независимую информацию лишь в области $(0, x_\psi)$ (см. рис. 20). Учитывая (16б) и (16в), мы можем теперь сказать, что одна проекция симметричного объекта может оказаться достаточной для восстановления, поскольку она эквивалентна $p = N$ (для N нечетных) или $p = N/2$ (для N четных) проекциям асимметричного объекта. Действительно, в таком объекте независимая асимметричная область находится в p ориентациях по отношению к направлению проектирования. Если объект содержит винтовую ось симметрии $s_{p/q}$, то (при проектировании перпендикулярно к этой оси) выполняются условия, аналогичные (16б) и (16в), но с разнесением проекций на разные уровни по z :

$$L(\psi, x_\psi, z) = L(\psi + i(2\pi/p), x_{\psi+i(2\pi/p)}, z + i(c/p)) \quad (i = 1, 2, \dots, p) \quad (16d)$$

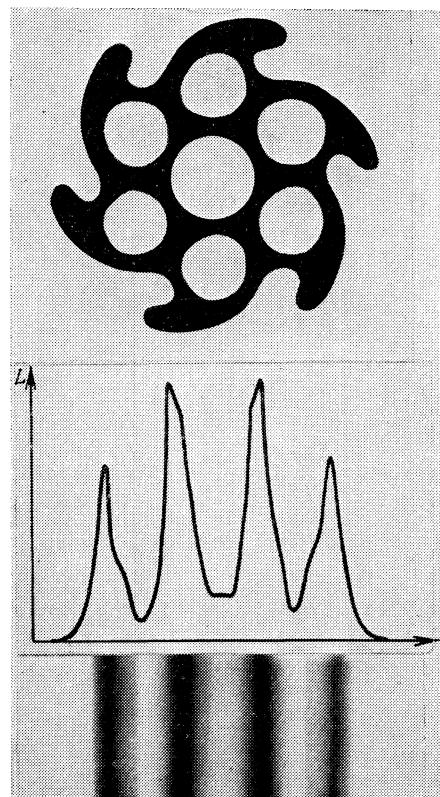


Рис. 20. Фигура с симметрией $N = 6$ и ее проекция.

Если группа симметрии $s_{p/q}N$, то порядок группы $\mathcal{N} = pN$, и одна проекция эквивалентна \mathcal{N} или $\mathcal{N}/2$ (для четных \mathcal{N}) проекциям. Так, для хвоста фага T6 группы симметрии $s_{7/2}6$, и одна микрофотография (см. также ниже, рис. 49) эквивалентна 21 проекции.

Объекты типа сферических вирусов или индивидуальные молекулы описываются точечными группами симметрии. Например, эти вирусы имеют икосаэдрическую симметрию 532. Их проекция вдоль осей симметрии имеет соответствующую симметрию. Такая проекция эквивалентна \mathcal{N}/\mathcal{N}' независимым проекциям, где \mathcal{N} и \mathcal{N}' — соответственно порядки групп объекта и его проекции.

г) О путях восстановления. Математическая задача восстановления функции по ее проекциям получила решение уже давно — как с позиций преобразования Фурье, так и непосредственно путем операций в пространстве г. Но, как это нередко бывает в современной науке, результаты математиков и специалистов других областей не сразу попали в поле зрения электронных микроскопистов, ряд методов был разработан ими заново, но в то же время внесены некоторые новые идеи и в математическую теорию.

Нужно также отметить близость в определенном аспекте этой задачи к проблеме рентгеноструктурного анализа — кристаллов или спиральных структур, где по дифракционным данным определяется трехмерное строение объекта. Однако различие состоит в том, что в случае рентгеноанализа в обратном пространстве Фурье есть все данные о модулях структурных амплитуд, но нет данных об их фазах, здесь же есть непосредственные изображения проекций, а значит, в обратном пространстве данные и о модулях, и о фазах, но не во всем его объеме.

д) Алгебраический подход. Был предложен и реализован в работах^{51,52, 61-63} и рассматривался также в работах⁶⁴⁻⁶⁸. Он заключается в следующем. В дискретном представлении ρ_{jl} проектируются в L_k^i и (11) переходит в линейные уравнения (14а)

$$L_k^i = \sum' \rho_{jl} \quad (i = 1, 2, \dots, p). \quad (17)$$

Число неизвестных ρ_{jl} в каждом уравнении (17) приблизительно равно m .

Если есть p проекций L_k^i ($i = 1, 2, \dots, p$), то есть pm известных L_k^i и m^2 неизвестных ρ_{jl} . Условие однозначной разрешимости (17) таково:

$$pm \geq m^2, \text{ т. е. } p \geq m. \quad (18a)$$

Условие (18а) может оказаться излишне жестким. Так, ясно, что в случае $L_k^i = 0$ все $\rho_{jl} = 0$, что сразу дает выпуклый огибающий контур, окаймляющий внешний контур S . Решение дается обращением матриц линейных уравнений (17).

Для контрастных функций ρ^k (0,1) разработаны алгоритмы восстановления, действующие по принципу перебора^{61-63, 67, 68}. Здесь критерий (18а) достаточен, но не необходим, и, как показывают оценки, удовлетворительное восстановление получается при

$$m^k \approx (3-5) p. \quad (18b)$$

Условия (18а) и (18б) определяют оптимальный выбор m , т. е. ячейки сетки разбиения a/m , дающей однозначное решение. Величина a/m в определенном смысле (см. ниже стр. 479) соответствует «разрешению» восстанавливаемой структуры.

Эксперимент может оказаться неполным в том смысле, что число p полученных проекций может быть малым, недостаточным для достижения желаемого разбиения a/m по (18а) или (18б). В этом случае уравнения (17) становятся неопределенными. Тогда можно с помощью того или иного алгоритма найти их все и отбирать из них некоторые, пользуясь дополнительными критериями. Нужно отметить, что при этом сумма любых t решений

$$\sum_{n=1}^t \rho_{jl}^{(n)}/t \quad (19)$$

является также решением. Но для контрастных функций ρ_{jl}^k такая сумма уже не является сама контрастной функцией, т. е. не удовлетворяет условию (15а). При использовании условия дискретной нормировки (15б) можно оконтурить сумму решений такой линией уровня, чтобы внутрь нее попало w точек. Это будет контур наиболее вероятного решения.

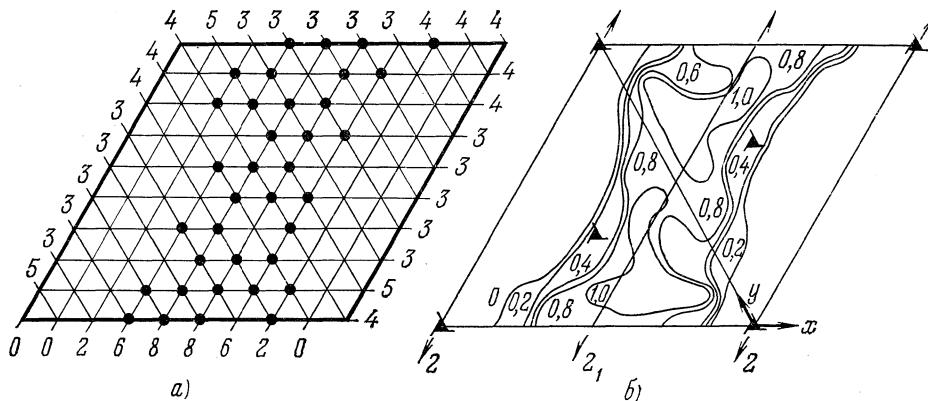


Рис. 21. Алгебраическое решение для одного из сечений элементарной ячейки гексагональной каталазы (а) (сбоку даны числовые значения проекций; точки соответствуют $\rho^k = 1$, пустые узлы — $\rho^k = 0$; имеется пять таких решений) и их сумма (19) в изолиниях (б).

Примером применения метода линейных уравнений явилось исследование каталазы. На рис. 21 дано одно из решений и их сумма для одного из сечений трехмерного кристалла (см. также ниже рис. 30, б—в). Таким образом, общая схема алгебраических методов такова:

$$\text{набор } L^i \rightarrow \rho. \quad (20)$$

е) Метод двойного преобразования Фурье. Этот метод был предложен для трехмерного восстановления в электронной микроскопии де Розье и Клугом^{64, 69, 70} (о двумерном случае см. также^{56, 57}) и является, по сути дела, математическим расширением метода оптической фильтрации. Как известно, трансформанты Фурье функции ρ (r) и ее проекции L (x) связаны между собой:

$$\int \rho(r) \exp(2\pi i r S) dx dy dz = \tilde{\Phi}[\rho] = \Phi(S), \quad (21)$$

где $S(X, Y, Z)$ — вектор обратного пространства. В то же время

$$\int L(x) \exp[2\pi i (x S_x)] dx dz = \tilde{\Phi}[L] = \Phi(X, 0, Z) \quad (22)$$

— это двумерное сечение трехмерной трансформанты $\Phi(S)$ по плоскости S_x , т. е. при $Y = 0$. Обратным преобразованием Фурье можно

восстановить функции ρ и L по их трансформантам:

$$\mathfrak{F}^{-1} [\Phi (S)] = \rho (r), \quad (23a)$$

$$\mathfrak{F}^{-1} [\Phi (S_x)] = L (x). \quad (23b)$$

Соответственно в двумерном случае трансформанта проекции есть одномерное сечение двумерной трансформанты. Если нам известно несколько проекций, то мы можем рассчитать соответствующие сечения обратного пространства (рис. 22) и если таких сечений много, то интерполяция между ними дает представление о структуре трансформанты $\Phi (S)$, от которой уже по (23a) можно перейти к $\rho (r)$.

Таким образом, схема восстановления⁶⁴, в отличие от (20), здесь такова:

$$\text{набор } L^i \rightarrow \text{набор } \mathfrak{F}^i (X_{\Psi_i}) \rightarrow \Phi (S) \rightarrow \rho (r). \quad (24)$$

Трансформанта (6) спирального объекта $\rho (r, \psi, z)$ в цилиндрических координатах может быть переписана в виде

$$\Phi (R, \Psi, Z) = \sum_n G_n (R, Z) \exp [in(\Psi + \pi/2)], \quad (25a)$$

а обратное преобразование имеет вид

$$\rho (r, \psi, z) = \sum_n \int g_n (r, Z) \exp (in\Psi) \exp (2\pi izZ) dZ, \quad (25b)$$

так что g_n и G_n — взаимные трансформанты Бесселя:

$$G_n (R, Z) = \int_0^\infty g_n (r, Z) J_n (2\pi r R) (2\pi r) dr. \quad (25b)$$

Нужно отметить, что ввиду действия правила отбора (7) каждая слоевая l с $z = l/c$ практически определяется одной функцией J_n с наиболее низким n , вкладом же остальных пренебрегают.

Схема расчета состоит в следующем^{64, 69, 70}. От наблюдаемой проекции $L (x, z)$ рассчитывается двумерная трансформанта вида (2a), но она эквивалентна сечению функции $\Phi (R, \Psi, Z)$ (25a) при $\Psi = 0$ и π , так что $X_0 = R_{\Psi=0}$, — $X_0 = X_{\Psi=\pi} = R_{\Psi=\pi}$. Радиальная составляющая преобразуется по (25b). Если объект обладает симметрией, то при использовании условий (16a) — (16g) можно размножить это сечение на другие углы $\Psi \neq 0, \pi$:

$$\Phi (R, 0, Z), \Phi (R, \Psi_1, Z), \dots, \Phi (R, \Psi_{N-1}, Z). \quad (26)$$

Пользуясь специальной процедурой интерполяции между этими сечениями, получают заданную в достаточном числе точек трехмерную трансформанту $\Phi (R, \Psi, Z)$, преобразование которой (25b) даст $\rho (r, \psi, z)$. На рис. 23 в качестве иллюстрации даны значения модуля и фазового угла для одной из гармоник полученной таким образом трансформанты изображения хвоста бактериофага T4⁶⁹. Расчеты требуют довольно большого количества машинного времени. Тем не менее метод позволил получить ряд ценных результатов, которые описаны ниже.

ж) Синтез проектирующих функций^{52, 71}. Этот метод, как и другие рассматриваемые ниже методы, не требует при своем применении перехода (24) в обратное пространство, т. е. осуществляется

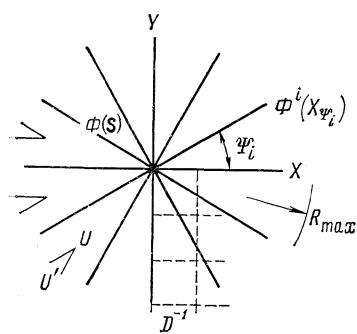


Рис. 22. Трансформанта $\Phi (S)$ и ее сечения $\Phi^i (X_{\Psi_i})$.

по прямой схеме (20). Интуитивно ясно, что наложение растянутых вдоль направления проектирования, как на рис. 20, проекций друг на друга должно дать сведения о строении искомой функции. Какие же?

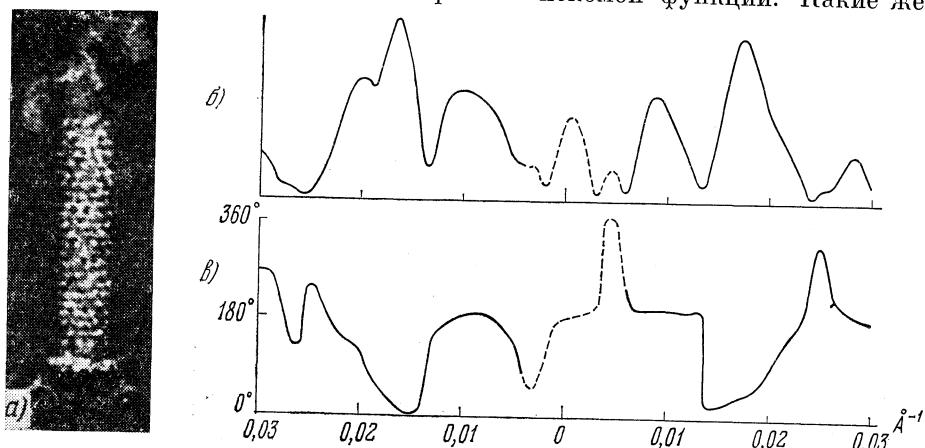


Рис. 23. Хвостовой отросток фага T4 (a), модуль (б) и фаза (в) одной из гармоник его цилиндрической трансформанты (25).

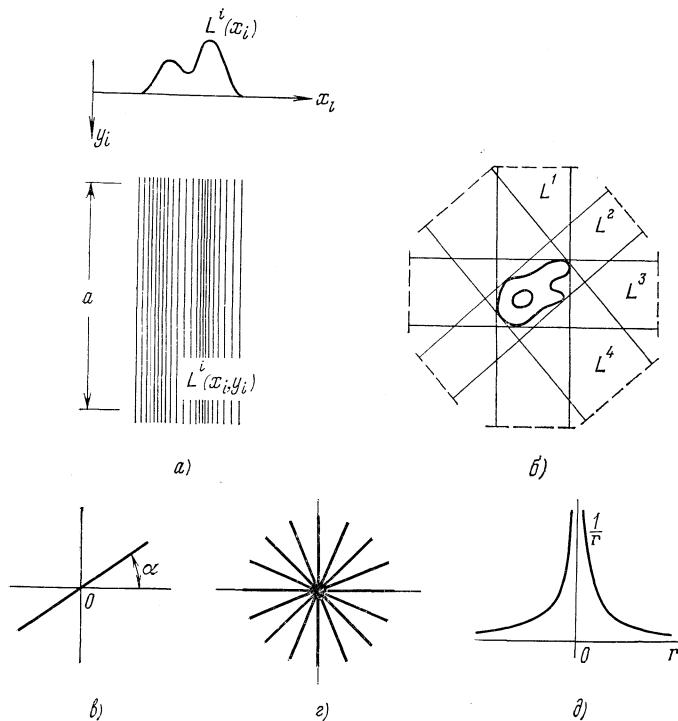


Рис. 24. Образование проектирующей функции (а), наложение таких функций (б), проектирующая функция точки (в), наложение таких функций (г) и образование функции $|r|^{-1}$ (д).

Рассмотрим двумерный случай. Растянем каждую проекцию $L^i(x_i)$ вдоль y_i в двумерную «проектирующую функцию» $L^i(x_i, y_i)$ (рис. 24, а):

$$L^i(\mathbf{r}) = (1/a) L^i(x_i) u(y_i), \quad u(y_i) = \begin{cases} 1 & \text{внутри } b, \\ 0 & \text{вне } b, \end{cases} \quad (27)$$

где $b (> a)$ — некоторая длина. Наложим теперь на плоскости x, y друг на друга p функций $L^i(x_i y_i)$ (рис. 24, б):

$$\sum_{i=1}^p L^i(\mathbf{r}) = \Sigma_p(\mathbf{r}). \quad (28)$$

Аналогично непрерывный синтез множества $L(\psi, \mathbf{r})$ дает

$$\int_0^\pi L(\psi, \mathbf{r}) d\psi = \Sigma(\mathbf{r}). \quad (29)$$

Рассмотрим, во что отображается точка, т. е. δ -функция $\delta(\mathbf{r})$ при проведении процедуры (27) — (29). Проектирующей функцией для точки $\delta(\mathbf{r} = 0)$ будет проходящая через нее прямая (рис. 24, в). Наложение дискретного множества таких прямых даст «звезду» (рис. 24, г), а наложение их непрерывного множества эквивалентно вращению прямой вокруг точки $\mathbf{r} = 0$, в результате чего возникает функция $|\mathbf{r}|^{-1} = r^{-1}$ (рис. 24, д). Это и есть образ $\delta(\mathbf{r})$. Следовательно, образом любой двумерной функции $\rho(\mathbf{r})$ будет свертка ее с $|\mathbf{r}|^{-1}$ *):

$$\int \rho(\mathbf{r}') \frac{1}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} ds_{\mathbf{r}'} = \widehat{\rho(\mathbf{r})} |\mathbf{r}|^{-1} = \Sigma^{\text{двумерн}}(\mathbf{r}). \quad (30)$$

Так как $|\mathbf{r}|^{-1}$ обращается в бесконечность при $\mathbf{r} = 0$, свертка с ней хорошо воспроизведет исходную функцию $\rho(\mathbf{r})$. Однако вокруг каждой точки $\rho(\mathbf{r})$ и пропорционально $\rho(\mathbf{r})$ в этой точке возникает спадающий по закону r^{-1} фон, что даст и некоторый суммарный фон $B(\mathbf{r})$; $B(\mathbf{r})$ быстро спадает по мере удаления от области значений $\rho(\mathbf{r})$, не равных нулю. Совершенно аналогично можно найти, что в трехмерном случае роль функции $|\mathbf{r}|^{-1}$ играет функция $|\mathbf{r}|^{-2}$:

$$\Sigma^{\text{трехмерн}}(\mathbf{r}) = \widehat{\rho(\mathbf{r})} |\mathbf{r}|^{-2}. \quad (31)$$

Таким образом, и в двумерном, и в трехмерном случаях

$$\Sigma(\mathbf{r}) = \rho(\mathbf{r}) + B(\mathbf{r}) \approx \Sigma_p(\mathbf{r}). \quad (32)$$

Для контрастных функций $\rho^k(\mathbf{r})$ (9) фон легко отделяется от изображения. По (11) и (13) среднее значение

$$\bar{B}_p(\mathbf{r}) = (p - 1) \Omega/a^2. \quad (33)$$

Пример восстановления этим методом фигуры рис. 19 дан на рис. 25. Способы расчета описаны в работе ⁷². Наглядным способом является фотосуммирование проектирующих функций ⁷³. Образование такой функции показано на рис. 20, формирование соответствующего изображения для разных p иллюстрирует рис. 29, а. Можно восстанавливать и сложные асимметричные изображения (см. рис. 29, б — д). С помощью этого метода была определена структура ряда фагов (см. ниже).

3) Точное восстановление в реальном пространстве. От функции $\Sigma(\mathbf{r})$ (29) можно прямо перейти к $\rho(\mathbf{r})$ ⁷⁴. Обратим внимание на то, что в двумерном случае функции $|\mathbf{r}|^{-1}$ и $|\mathbf{S}|^{-1}$ являются взаимными трансформантами:

$$|\mathbf{r}|^{-1} = \mathfrak{F}[|\mathbf{S}|^{-1}]. \quad (34)$$

*) См. также споску на стр. 475.

Теперь, образуя самосвертку \tilde{r}^2 и применяя оператор Лапласа, найдем, что

$$\Delta \tilde{r}^{-1} = \Delta \int \frac{ds_{r'}}{|\mathbf{r}'| |\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} = \Delta \int |\mathbf{S}|^{-2} \exp(2\pi i \mathbf{r} \cdot \mathbf{S}) ds_{\mathbf{S}} = -(2\pi)^2 \delta(\mathbf{r}). \quad (35)$$

В синтезе $\Sigma(\mathbf{r})$ (30) точка $\delta(\mathbf{r})$ отображается в $|\mathbf{r}|^{-1}$, и аналитической записью этого отображения является (35). Следовательно, интегральное

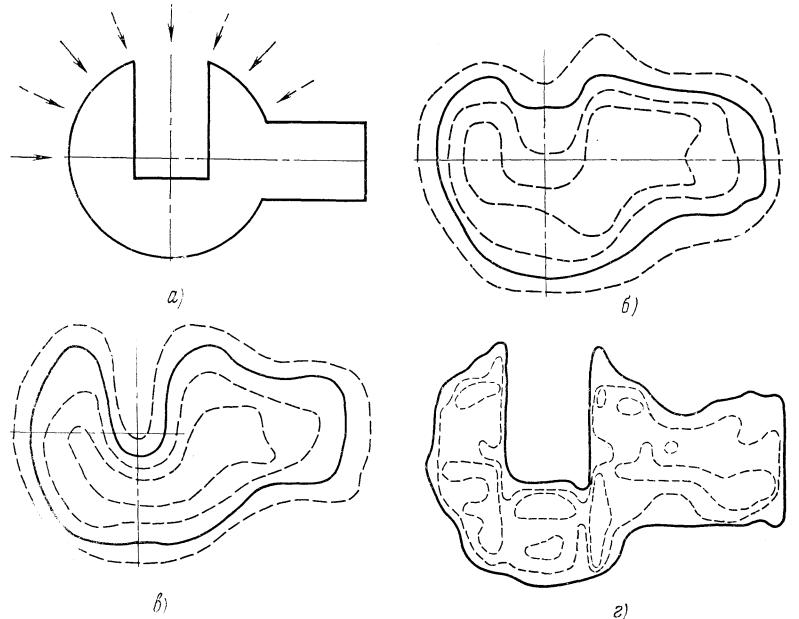


Рис. 25. Восстановление гаечного ключа рис. 19 (a) по четырем (b), восьми (c) проекциям и восстановление по восьми модифицированным проекциям (46) (e).

уравнение (30) относительно $\rho(\mathbf{r})$ решается выражением

$$\rho(\mathbf{r}) = -\frac{1}{(2\pi)^2} \Delta \int \frac{\Sigma(\mathbf{r}')}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|} ds_{\mathbf{r}'} = \frac{1}{(2\pi)^2} \int \frac{\Sigma(\mathbf{r}) - \Sigma(\mathbf{r}')}{|\mathbf{r} - \mathbf{r}'|^3} ds_{\mathbf{r}'} \quad (36)$$

При использовании его можно по $\Sigma_p(\mathbf{r})$ восстановить точные значения $\rho(\mathbf{r})$. Однако это можно сделать и не строя $\Sigma_p(\mathbf{r})$, а прямо по набору проекций L^i ^{55, 58, 74-78}. Для этого, имея в виду (21) — (23), запишем двумерную трансформанту Фурье объекта $\Phi(\mathbf{S})$ через ее сечения $\Phi(X_{\Psi})$ в виде

$$\int_0^{\pi} \Phi(X_{\Psi})(2\pi R) d\Psi = \Phi(\mathbf{S}), \quad (37)$$

где $R = |X_{\Psi}| = |\mathbf{S}|^*$.

⁵⁵⁾ По аналогии с (37) можно дать иной вывод формулы (30). Синтезу проектирующих функций $\Sigma(\mathbf{r})$ (29) в обратном пространстве согласно (22) соответствует выражение

$$\int_0^{\pi} \Phi(X_{\Psi})(2\pi) d\Psi = \int_0^{\pi} R^{-1} \Phi(X_{\Psi})(2\pi R) d\Psi, \quad (37')$$

отличающееся от (37) множителем R^{-1} . Трансформанта от $R^{-1} = |\mathbf{S}|^{-1}$ равна $|\mathbf{r}|^{-1}$

Трансформанта $\Phi(S)$ есть $\rho(\mathbf{r})$ (23а). Трансформанте произведения под интегралом (37) соответствует свертка трансформант от $\Phi(X_\Psi)$ и $|R|$:

$$\mathcal{L}(X_\Psi) = \widehat{\mathcal{F}}[\Phi(X_\Psi)] \widehat{\mathcal{F}}[|R|] = \widehat{L(x_\Psi)} K(x), \quad (38)$$

где первая свертываемая функция — это исходная, известная нам проекция $L(x_\Psi)$, а вторая,



Рис. 26. Функция $K(x, R_{\max})$.

одинакова для всех углов. Произведение в (37) становится близким к нулю при $|\Phi(X_\Psi)| \approx 0$, и эти значения $|X_\Psi|_{\max} = R_{\max}$ определяются «размером неоднородностей» d функции $\rho(\mathbf{r})$, так что $R_{\max} \geq d^{-1}$. Беря (38) в этих пределах, получим

$$K(x, R_{\max}) = R_{\max} [\sin(2\pi x R_{\max})/\pi x] - [\sin^2(\pi x R_{\max})/(\pi x)^2]. \quad (40)$$

Эта функция показана на рис. 26. Следовательно, «модифицированную проекцию» $\mathcal{L}(x_\Psi)$ (38) можно рассчитать как^{58, 74, 75}

$$\mathcal{L}(x_\Psi) = \int L(x_\Psi) K(x_\Psi - x_\Psi) dx_\Psi. \quad (41)$$

Теперь по (23а) с учетом (37) — (40) можно построить $\rho(\mathbf{r})$ интегрированием по углам функций $\mathcal{L}(x_\Psi)$ в реальном пространстве:

$$\rho(\mathbf{r}) = \int_0^\pi \mathcal{L}(\psi, \mathbf{r}) d\psi \approx \quad (42a)$$

$$\approx \sum_{i=1}^p \mathcal{L}^i(\psi_i, \mathbf{r}). \quad (42b)$$

При этом $\mathcal{L}(x_\Psi)$ нужно растянуть вдоль y , как в (27), превратив их в $\mathcal{L}(\psi, \mathbf{r})$. Таким образом, формулы (41) и (42) дают путем оперирования в реальном пространстве, аналогично синтезу проектирующих функций (29), теперь уже точное восстановление $\rho(\mathbf{r})$. Для этого нужно предварительно образовать свертку каждой проекции L с функцией K .

Можно поступить по-иному⁷⁴. Представим выражение (39) в виде

$$K(x) = \frac{1}{2\pi i} \frac{\partial}{\partial x} \int_{-R_{\max}}^{R_{\max}} \text{sign } R \exp(-2\pi i Rx) dR \quad (43)$$

(34), что можно записать и в виде трансформанты Фурье — Бесселя от функции R^{-1} : $\int_0^\infty R^{-1} J_n(2\pi r R) (2\pi R) dR = \int_0^\infty J_n(2\pi r R) (2\pi) dR = r^{-1}$ (в частности, и при $n = 0$). Поэтому обратная трансформанта от (37') будет сверткой обратных трансформант от $\Phi(S)$ и R^{-1} , т. е. равна $\widehat{\rho(\mathbf{r})} |r|^{-1}$. Это дает вывод (30) на языке обратного пространства.

и перейдем к пределу $R_{\max} \rightarrow \infty$. Теперь, исходя из (37), используя (21) и (23), получим для $\mathbf{r} = 0$

$$\rho(0) = -(1/2\pi^2) \int_0^\pi d\psi \oint dx_\psi [\dot{L}(x_\psi)/x_\psi], \quad (44)$$

или

$$\rho(0) = -(1/2\pi^2) \int_0^\pi d\psi \oint dx_\psi \{[L(x_\psi) - L(0)]/x_\psi^2\}. \quad (45)$$

В (44), (45) интеграл берется в смысле главного значения. Другими словами, $\mathcal{L}(x_\psi)$ вместо (41) может быть вычислено по формуле

$$\mathcal{L}(x_\psi) = -\frac{1}{2\pi^2} \int_0^\infty \frac{L(x'_\psi + x_\psi) + L(x'_\psi - x_\psi) - 2L(x'_\psi)}{(x'_\psi - x_\psi)^2} dx'_\psi, \quad (46)$$

и далее $\rho(\mathbf{r})$ восстанавливается по (42). Пример преобразования $L \rightarrow \mathcal{L}$ (46) для одной из изображенных на рис. 19 проекций ключа приведен на рис. 27. Видно, что $\mathcal{L}(x_\psi)$ приобретает минимумы, которые «срезают» положительный фон, возникающий при интегрировании по углам ψ от других $\mathcal{L}(x_\psi)$. Практически интегрирование по углам в (42a) заменяется суммированием (42б) конечного числа модифицированных проектирующих функций $\mathcal{L}^i(\psi_i, \mathbf{r})$. Формула (45) известна как формула Радона ⁷⁶, впервые решившего задачу восстановления функции по ее проекциям. Отметим, что максимальный вклад в $\rho(\mathbf{r})$ (42) вносит $\Sigma(\mathbf{r})$ (39), ввиду наличия x_ψ^2 в знаменателе (45), (46).

Мы дали вывод формул (42) — (47) в общем контексте теории восстановления в связи с методом преобразования Фурье и синтезом проектирующих функций *). Они могут быть получены и без перехода в пространство Фурье в теории обобщенных функций разложением δ -функции на плоские волны ⁷⁷. На рис. 25, г дан пример восстановления уже известной нам фигуры рис. 19 по (42), (46).

Практически мы располагаем конечным числом p проекций L^i (которым соответствует p сечений Φ^i), что ограничивает разрешение восстановленной ρ . Возможно улучшение «гладкости» решений путем интерполяции между проекциями с использованием или без использования обратного пространства ⁷⁴.

и) Итерационный метод. В предыдущем разделе мы видели, что накопление сведений в точке \mathbf{r} восстанавливаемой области от падающих на нее «лучей», прямых от каждой проекции, дает картину $\Sigma(\mathbf{r})$, близкую к $\rho(\mathbf{r})$. Аналогично можно было бы строить функцию произведения $\Pi(\mathbf{r})$ или минимума $M(\mathbf{r})$ от этих накопленных в точке \mathbf{r} данных ⁵¹.

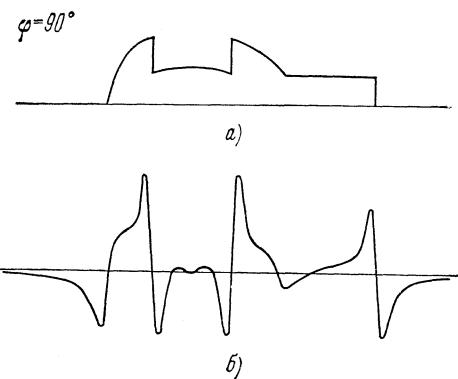


Рис. 27. Исходная L (a) и соответствующая ей модифицированная по (46) функция \mathcal{L} (b).

*) На эту тему, рассматриваемую в статьях ^{58, 74, 75, 78}, недавно появилась еще одна работа ^{79a}.

Гордон, Бендер, Герман и др.^{65, 66, 80-82} рассмотрели возможность восстановления ρ (г) путем итераций, приближающих некоторое исходное распределение к такому, которое удовлетворяет близости его проекций к набору L^i («алгебраическая реконструкционная техника», АРТ). На дискретной сетке ρ_{jl} зададим в качестве нулевого приближения равномерное распределение средних значений (см. (14в))

$$\rho_{jl}^0 = \bar{\rho} = \Omega/m^2.$$

Проекция q -го приближения ρ_{jl}^q под углом ψ_i (взятая с учетом дискретности по (14а)) есть $L_k^{i, q}$.

Следующее приближение ρ_{jl}^{q+1} для каждой точки jl можно получить процедурой «умножения»

$$\rho_{jl}^{q+1} = (L_k^i / L_k^{i, q}) \rho_{jl}^q \quad (47a)$$

или «сложения»

$$\rho_{jl}^{q+1} = \max [\rho_{jl}^q + (L_k^i - L_k^{i, q}) / N_{L_k^i}; 0], \quad (47b)$$

где $N_{L_k^i}$ — число точек в проекции L_k^i . Менее чувствительна к ошибкам измерений проекций вторая процедура. Мы видим, что одна итерация «подтягивает» проекцию L_k^q предыдущего распределения ρ^q к L_k^i . Один цикл итераций состоит в «обегании» ρ_{jl}^q по всем углам ψ_i . При этом, однаждо, переход к другому углу может ухудшить результаты, полученные

итерациями по предыдущим углам. Согласно⁶⁵ процесс итерирования приводит к получению при некотором $q = Q$ ($Q \approx 10-20$) некоторого распределения

$$\rho_{jl}^Q \approx \rho_{jl}.$$

На рис. 30, а приведен пример восстановления, который свидетельствует, что получаемые изображения близки к истинной функции. Восстановление при этом проводится при $m > p$, т. е. не удовлетворяет условию (18а) однозначной разрешимости. Точные решения имеют «скакучий» характер (рис. 30, б), хотя их сумма вида (19) — более гладкая (рис. 30, в). Авторы не смогли указать точный смысл получаемых функций (47а) — (47б).

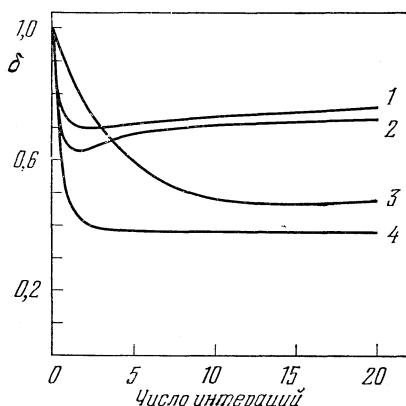
Недавно Гилберт^{79б} выяснил, что итерационный процесс АРТ зависит от

Рис. 28. Зависимость δ (48) от числа итераций для разных вариантов итерационного метода (объяснение нумерации кривых — в тексте).

применения в нем вначале дискретизированных проекций L_k^i (14а), а не истинных (11). Применение истинных проекций (11) дает сначала некоторый минимум отклонения δ получаемой функции от исходной

$$\delta = [\sum (\rho_{jl} - \rho_{jl}^q)^2 / \sum (\rho_{jl} - \bar{\rho})^2]^{1/2}, \quad (48)$$

который может быть принят за «наилучшее» восстановление по АРТ, но далее итерации ухудшают результат (рис. 28, кривые 1—2). Применение дискретизированных L_k^i (14а) вначале дает хорошую сходимость, но при этом истинная функция восстанавливается хуже (рис. 28, кривая 3).



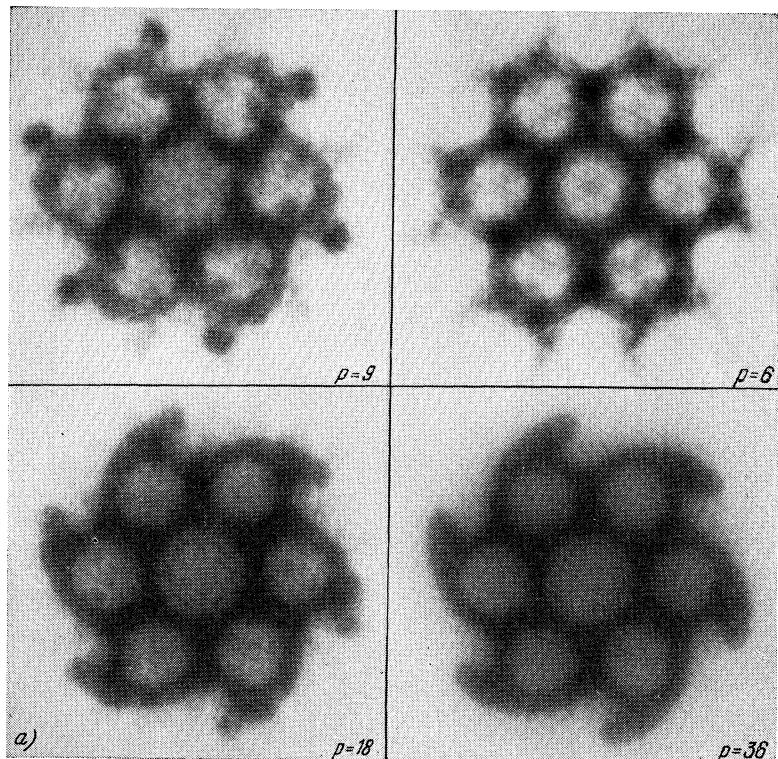


Рис. 29. Функция Σ , полученная фотосуммированием для фигуры на рис. 20 при $p = 6, 9, 18$ и 36 (а), примеры асимметричных изображений (б, г) и их восстановление для $p = 18$ (ϵ, δ).

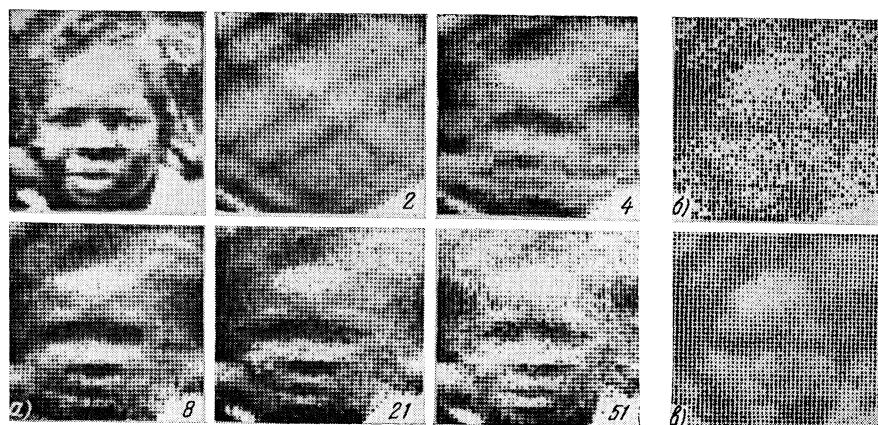


Рис. 30. Объект и его изображения, полученные итерационным методом (a) (указано число использованных проекций), одно из точных решений уравнений (17) при $p = 8$, $m = 50$ (b) и усреднение совокупности таких решений (в).

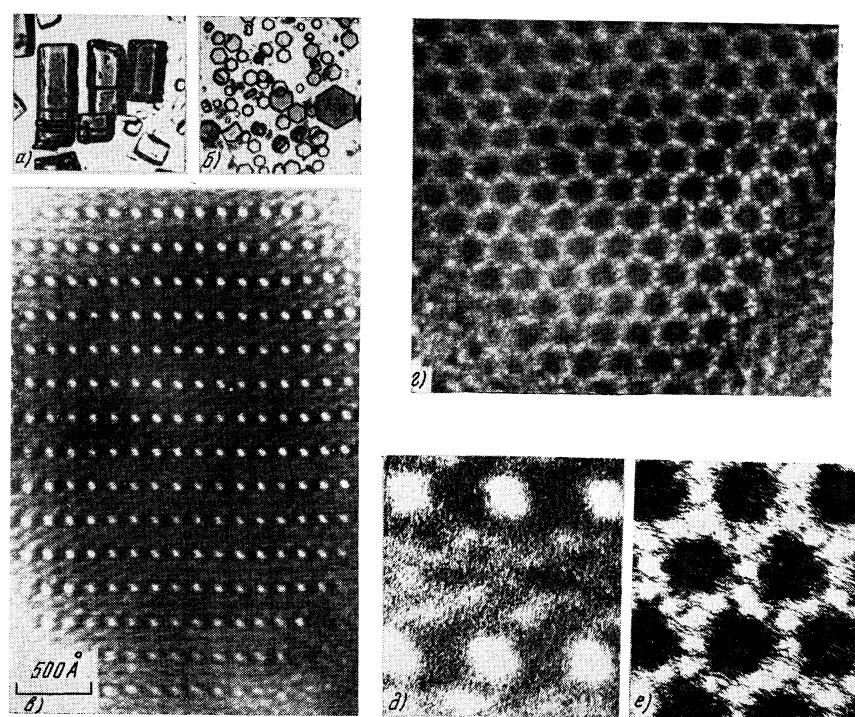


Рис. 31. Кристаллы гексагональной каталазы в двух ориентациях (оптический микроскоп, увеличение 200) (a, б), соответствующие электронно-микроскопические снимки (в, г) и их увеличенные участки (д, е).

Однако, если согласно ^{79б} при итерациях использовать вначале истинные проекции L^i (11) и учитывать вклад не только данной, но и всех остальных проекций (метод SIRT) согласно формуле

$$\rho_{jl}^{q+1} = \max [\rho_{jl}^q + (\sum L^i / \sum l_i) - (\sum L_k^{iq} / \sum N_{L_k^i}), 0] \quad (49)$$

(l_i — длина вдоль y_{ψ_i}), то процесс становится сходящимся (см. рис. 28, кривая 4) и начальная функция восстанавливается достаточно четко.

к) Точность восстановления и разрешение ^{52, 58, 64, 73, 75, 81, 82}. Очевидно, что эти характеристики ρ зависят от числа p имеющихся проекций и ошибок эксперимента. Восстановление ведется на дискретной сетке из $m \times m$ узлов с шагом $a \geq D/m$, где D — поперечник функции ρ . Условие алгебраической разрешимости имеет в общем случае вид $p = m$ (18а), а для контрастных ρ^k — вид $p \leq m$ (18б). Это означает, что могут быть определены различающиеся значения ρ_{jk} на расстоянии

$$\lambda = D/p, \lambda \leq D/p. \quad (50a)$$

Эти условия определяют оптимальный выбор шага сетки разбиения. Функция ρ может быть охарактеризована размером d своих неоднородностей — «полушириной» ее наиболее мелких пиков, которые и разрешаются (между ними наблюдаем минимум), если расстояние между ними составляет $\approx d$. На дискретной сетке такое разрешение можно получить, если пик покрывает несколько узлов, например, линейный ряд ... 010100... «разрешает» пики, находящиеся на расстоянии $2a$. Таким образом, в этом случае

$$\lambda \geq 2D/p. \quad (50b)$$

Нужно отметить, что в электронной микроскопии при негативном контрастировании мы имеем дело с контрастной функцией ρ^k (9), и нужно определить ее границу S , которая в дискретном представлении представляется разрывом вида ...000111... Для этого достаточно критерий (50а). Оценку разрешения можно получить и на языке обратного пространства. Трансформанта $\Phi = \mathfrak{F}[\rho]$ спадает к $|\Phi(S)| \approx 0$ при $|S| \approx d^{-1}$. С другой стороны, для восстановления ρ с поперечником D нужно иметь сетку в обратном пространстве с шагом D^{-1} (см. рис. 22). Сечения Φ расходятся на расстояние больше D^{-1} (т. е. перестают покрывать сетку) при $\pi d^{-1}/p \approx \approx D^{-1}$, откуда

$$\lambda \approx \pi D/p. \quad (50b)$$

Это почти та же оценка, что и (50б). Правда, условие вывода (50в) излишне жестко, так как на расстоянии d^{-1} значения $|\Phi^i|$ малы и вносят малый вклад в трансформанту $|\Phi|$. Более строгая оценка может быть произведена при задании конкретного вида неоднородностей d (\mathbf{r}), а значит, и хода $\Phi(S)$ в обратном пространстве (см. ниже уравнение (51)).

Изучаемые в электронной микроскопии биомолекулы объекты имеют обычно размеры $D \approx 200-400 \text{ \AA}$. При экспериментальном разрешении контрастированных препаратов $\approx 20 \text{ \AA}$ число необходимых для восстановления проекций составляет, следовательно, $p \approx 10-20$.

Если проекции L^i распределены по углам резко неравномерно, скажем, — они сосредоточены в некотором угловом интервале, то разрешение будет анизотропно — больше в направлении, перпендикулярном к направлению «сосредоточения», и меньше — вдоль его.

За меру точности восстановления можно принять корреляционные функции отклонения восстановленной ρ^* от истинной ρ :

$$R_1 = \Omega^{-1} \int |\rho - \rho^*| ds_r, \quad R_2 = \int |\rho - \rho^*|^2 ds_r / \int \rho^2 ds_r$$

(в дискретном представлении, где интегралы заменяются на суммы, можно использовать и (48)). Величина R_1 — аналог фактора достоверности в рентгеноанализе⁸³. «Процедурная» точность зависит от числа проекций p и вычислительных операций (интерполяция и т. п.). «Экспериментальная» точность определяется средней относительной ошибкой b определения проекций $\bar{L} = \overline{|L - L_{\text{эксп}}|} = b\bar{L}$. Процедурную точность можно оценить, если взять какую-либо модельную функцию ρ . Для колоколообразной ρ получается оценка $R_1 \approx 1/2p$ ⁵⁸. $R_{\text{эксп}} \approx b$, в силу чего в итоге получим приблизительно

$$R_1 \approx b + (1/2p).$$

Эта величина порядка 10 %. Для оценки R_2 , аналогично тому, как это делается в структурном анализе кристаллов^{37, 52, 84}, можно использовать теорему полноты

$$\int \rho^2 ds_r = \int |\Phi|^2 ds_S.$$

Средняя ошибка $|\Phi^i|$ соответствующих L^i также равна b . Восстановлению соответствует использование этих Φ^i в «звездообразной» области U обратного пространства (см. рис. 22), а область u' вообще не используется. Следовательно,

$$\int |\rho - \rho^*|^2 ds_r = \int_U b^2 \Phi^2 ds_S + \int_{U'} \Phi^2 ds_S. \quad (51)$$

Отсюда

$$R_2 \approx b^2 + f(p),$$

где f — величина, близкая к нулю при выполнении (50в). Если $p < m$, то это скажется в увеличении $f(p)$.

4. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование того или иного объекта включает в себя ряд стадий. Первая — биохимическая: выделение и очистка интересующего нас препарата. Для подготовки к электронной микроскопии проводятся специальные процедуры осаждения на подложку, контрастирования, иногда кристаллизации^{4, 5}. Далее получают электронные микрофотографии, если объект асимметричен — под разными углами наклона⁸⁵. Обычное электронно-микроскопическое увеличение — порядка 50—100 тыс. Большое значение имеет отбор хороших снимков, которые далее используются для трехмерной реконструкции. Общая схема проведения исследования дана на рис. 32.

Основной процесс трехмерной реконструкции представлен на ней слева. После получения проекций L^i восстановление может вестись либо методом Фурье, либо прямыми методами в реальном пространстве. Штриховыми линиями указаны процедуры, которые могут дополнить реконструкцию в узком смысле слова. Справа указана возможность использова-

ния рентгенографии в комбинации с данными электронной микроскопии, на чем мы остановимся подробнее ниже. Рассмотрим теперь ряд конкретных исследований.

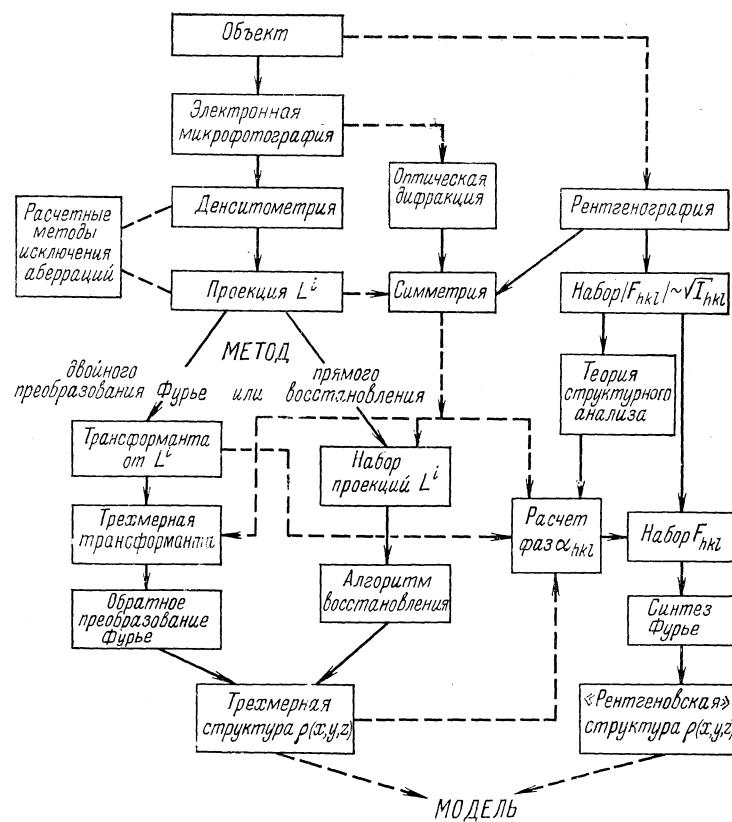


Рис. 32. Блок-схема трехмерной реконструкции.

Слева — основные операции перехода к r от электронных микрофотографий, которые могут быть проведены прямым восстановлением либо методом Фурье (показано возможное использование оптической дифракции); справа — сочетание с рентгенографическим методом.

а) Исследование каталазы с помощью методики линейных уравнений (17). Каталаза — фермент, катализирующий разложение перекиси водорода на воду и кислород. Молекулярный вес каталазы — около 240 тыс. Биохимически показано, что она может быть подвергнута диссоциации на 2 и далее 4 субъединицы. Этот белок легко кристаллизуется, образуя трехмерные или двумерные кристаллы^{61-63, 86-88}, а также трубы²⁵⁻²⁷. Была исследована гексагональная модификация каталазы из печени быка. Электронно-микроскопическое и рентгенографическое исследование позволило определить размеры элементарной ячейки влажных (I — II) и сухих (III) кристаллов, приведенные в табл. I. В ячейке шесть молекул. Пространственная группа структуры $P3_121$. Объем молекулы каталазы Ω_m , найденный из измерений плотности, равен 300 000 \AA^3 . На рис. 31 показаны кристаллы каталазы и соответствующие снимки структуры в состоянии II, близком к III, в ориентациях вдоль [1010] (e) и [0001] (z) (см. табл. I). Рис. 33, a — значения $L(x, z)$ в изолиниях, найденные из рис. 31, e, d. Вследствие наличия винтовой оси 3_1 эта проекция эквивалентна трем, т. е. для каждого

Таблица I

Параметры модификаций гексагональной каталазы

Параметры	Рентгенография		Электронная микроскопия	
	Тип кристалла:			
	влажные (I)	промежуточные (II)	сухие (III)	
$a, \text{ \AA}$	173,3	165—155	130	
$c, \text{ \AA}$	237,4	240—235	200—180	
$\Omega, 10^6 \text{ \AA}^3$	6,14	5,5—4,7	2,9—2,6	
$x_0 = \Omega_M n / \Omega$	0,30	0,36—0,4	0,67—0,75	

двумерного сечения $\rho(x, y, z)$ при $z = \text{const}$ имеются три одномерные проекции. Восстановление велось как для контрастной функции ρ^k (9), и в соответствии с (18б) было выбрано $m = 9$. Интервал Δz был выбран $c/24 = 10 \text{ \AA}$, т. е. восстанавливались 4 независимых сечения. Алгоритм перебора позволил для каждого из них найти ряд решений. При $i > 1$ в качестве критерия отбора наиболее вероятного решения была принята близость решений в соседних сечениях, что эквивалентно выбору моле-

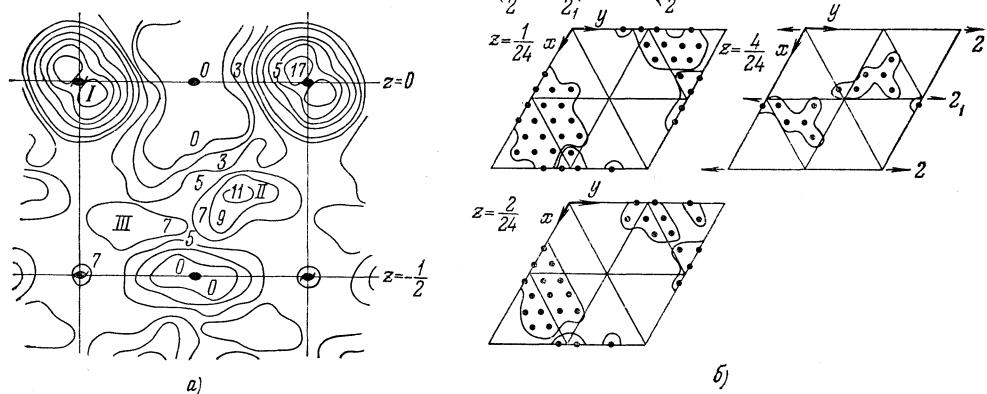


Рис. 33. Проекция в изолиниях, соответствующая рис. 31, ∂ (симметрически-независимая область) (а), и решения для пяти независимых сечений катализы (б).

кулы с наименьшей поверхностью; кроме того, принималась во внимание и экспериментальная проекция вдоль [0001] (рис. 31, *г, е*), к которой должна была быть близкой проекция найденного распределения белка $\rho(x, y, z)$ в ячейке. По «выкройкам» типа рис. 33, *б* были изготовлены пластины толщиной $c/24$, их наложение дало трехмерную модель структуры (рис. 34, *а*)⁶¹. Полученное распределение ρ описывает и упаковку молекул в кристалле, и их собственное строение с разрешением $\sim 20-30 \text{ \AA}$.

Молекулы образуют ажурную упаковку, они как бы нанизаны на оси 2₁. Форма такова, что четко выявляются две субъединицы с молекулярным весом $\sim 120\ 000$. Рассмотрение расположения субъединиц и формы молекулы в целом показывает, что она обладает тетраэдрической симметрией

222, что согласуется с числом субъединиц 4. Намечается и граница между наименьшими субъединицами с молекулярным весом 60 000. Модель молекулы, усредненной по собственным осям симметрии, приведена на рис. 34, б⁶³. Размеры молекулы вдоль трех ее осей — около 70, 80 и 95 Å. Координаты центра тяжести молекулы $x = 0,64 \pm 0,06$, $y = 0,14 \pm 0,06$, $z = 0,05 \pm 0,03$. Субъединицы 60 тыс. имеют размер около $55 \times 47 \times 40$ Å³, центры тяжести их образуют плоский тетраэдр с ребрами 55, 47 и 35 Å.

Таким образом, электронно-микроскопическое исследо-

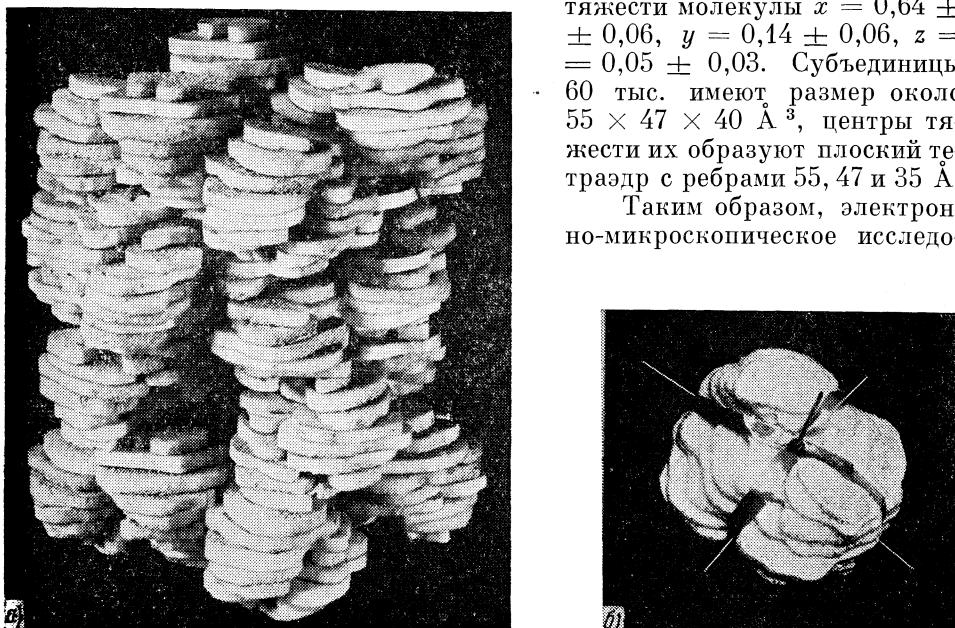


Рис. 34. Структура кристаллов гексагональной каталазы (трехмерная реконструкция) (а) и ее отдельной молекулы (б).

вание дало количественный результат, который до настоящего времени рентгенографически даже при низком $\sim 20-30$ Å разрешении можно было бы получить несравненно более долгим путем.

Дело в том, что рентгеноструктурный анализ белковых кристаллов, кроме колоссальной трудоемкости эксперимента, требует для своего проведения сложной процедуры введения в белок тяжелых атомов и съемки таких изоморфных кристаллов с целью определения фаз отражений⁸⁻¹⁰. Однако несомненным преимуществом рентгеноструктурного анализа является возможность получить высокое разрешение и анализировать не только четвертичную, но и третичную и вторичную структуры. Тем не менее электронная микроскопия, во всяком случае при невысоких разрешениях, может стать важной ступенькой и в рентгеноструктурном анализе, так как вычисленное распределение $\rho(x, y, z)_{\text{эм}}$ может быть использовано для расчета по (21) фаз рентгеновских отражений α_{hkl} , модули которых определяются экспериментально.

Для этого нужно прежде всего убедиться, что $\rho_{\text{эм}}$ в контрастированных кристаллах, исследуемых электронно-микроскопически, и $\rho_{\text{рентг}}$ во влажных кристаллах белка, близки друг к другу. Это можно сделать путем сравнения амплитуд $|\Phi_{hkl}|$ для обоих распределений. На рис. 36 приведена картина оптической дифракции от электронной микрофотографии рис. 31, г и соответствующая ей рентгенограмма. Они ясно свидетельствуют о том, что структуры близки и что можно, следовательно, вычислять фазы по $\rho_{\text{эм}}$. Такой расчет был проделан в различных

предположениях и дал в итоге возможность построить синтез Фурье электронной плотности по $|\Phi|$ рентг. эксп⁸⁸. Он дал более детальную картину строения кристаллов и четвертичной структуры молекулы катализы (рис. 37), в основных чертах близкую к электронно-микроскопической модели на рис. 34, б.

Таким образом, мы видим, что единственная возможность изучения строения белковых кристаллов — рентгеноструктурный анализ с введением тяжелых атомов — теперь может быть дополнена и, пока при низких разрешениях, даже заменена электронной микроскопией.

б) Исследования методом двойного преобразования Фурье. Серия работ де Розье, Клуга и др., проведенная

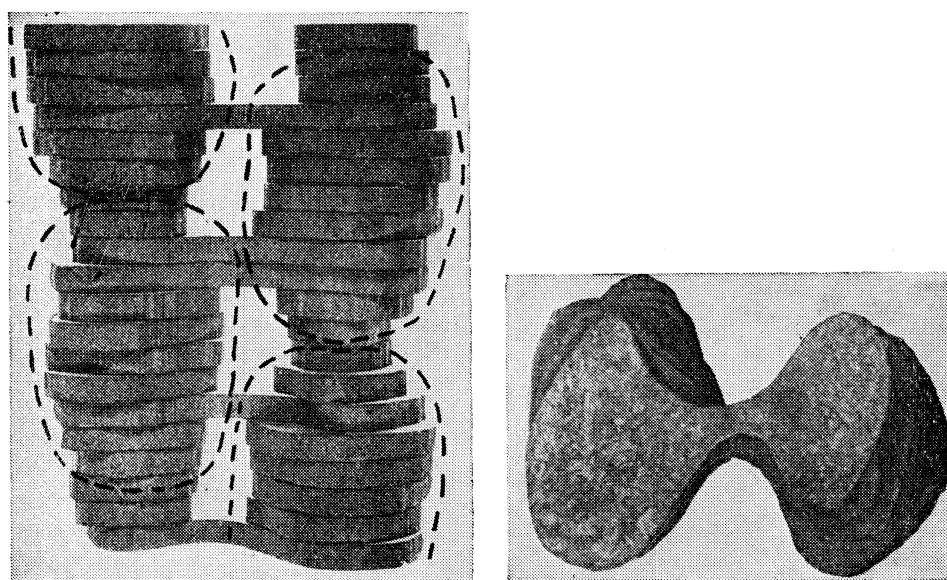


Рис. 35. Реконструкция элемента нити актина.

этим методом, посвящена изучению структур цилиндрической, а также икосаэдрической симметрии. Исследовались и асимметричные объекты — рибосомы.

Рассмотрим данные изучения белков мышц^{19, 89, 90}. Как известно, мышца построена из волокнистых белков — актина и миозина, их нити, взаимодействуют между собой и обеспечивают функционирование сократительного механизма мышцы. Нити актина могут быть выделены отдельно (рис. 38, а). Они имеют диаметр около 80 Å и построены из глобулярных субъединиц (молекулярный вес 45 000), расположенных в двойную спираль с симметрией s_{13} , $c/p = 55$ Å. Очищенный препарат можно приготовить и в виде «паракристалла» из таких нитей (рис. 38, б). На рис. 35 показана реконструкция нити актина, выявляющая глобулярные субъединицы и связи между ними⁸⁹. Более сложную структуру имеют выделенные прямо из мышцы нити актина, «декорированные» так называемыми *субфрагментами* миозина (рис. 38, в). Симметрия их та же. Молекула субфрагмента имеет толщину около 45 Å и длину около 150 Å. Реконструкция дана на рис. 40, а, а на рис. 40, б представлена модель такой нити. Принципиальным фактом является наклонность субфрагментов, а значит,

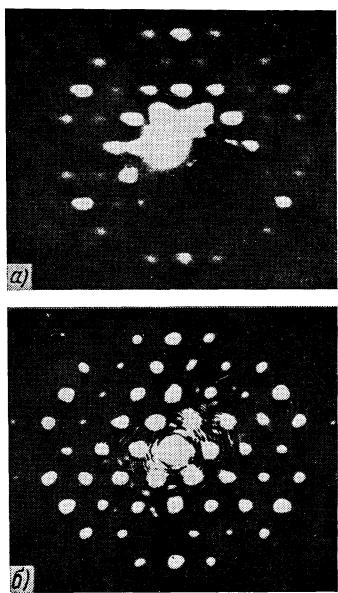


Рис. 36. Сравнение рентгенограммы (зона $hk0$) (а) и оптической дифрактограммы (б) каталазы от снимка рис. 31, г.

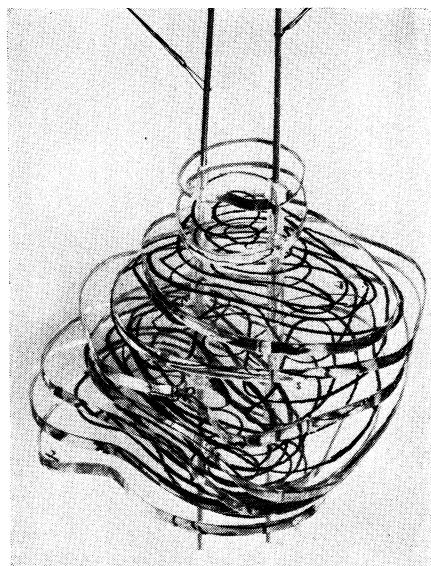


Рис. 37. Электронная плотность молекулы каталазы при разрешении около 30 \AA , найденная согласно правой части блок-схемы рис. 32.

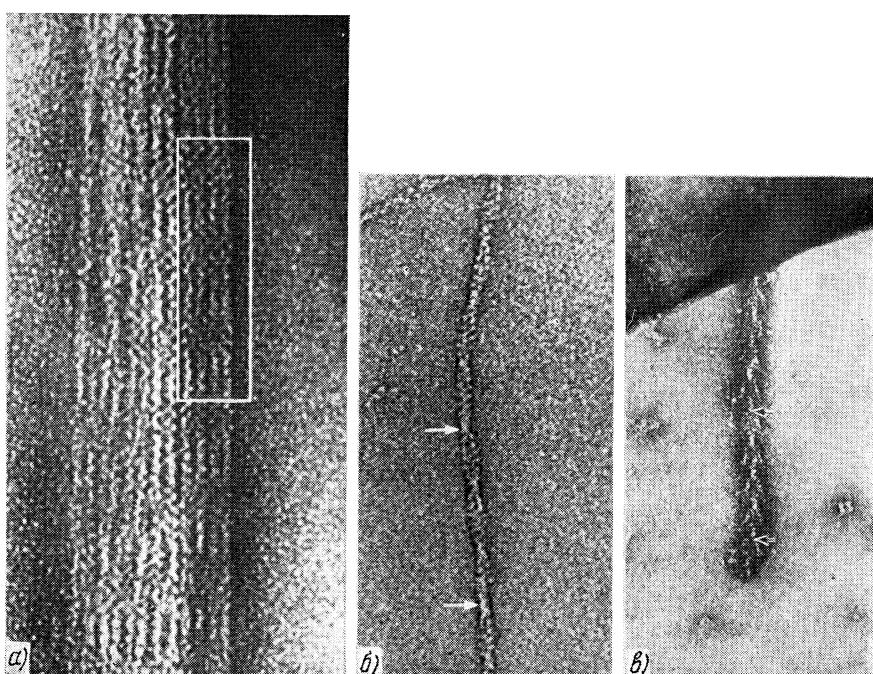


Рис. 38. Электронные микрофотографии паракристалла мышечного белка актина (а), отдельной нити этого белка (стрелками указан период $\sim 715 \text{ \AA}$) (б) и нити с субфрагментами миозина (с).

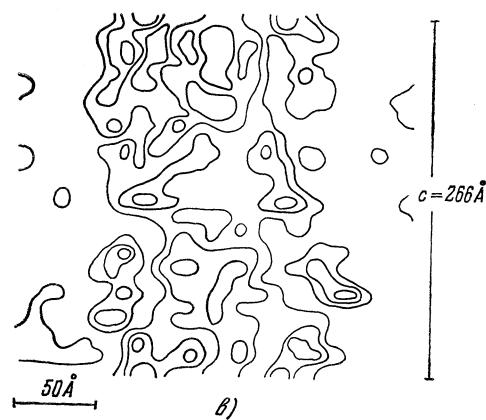
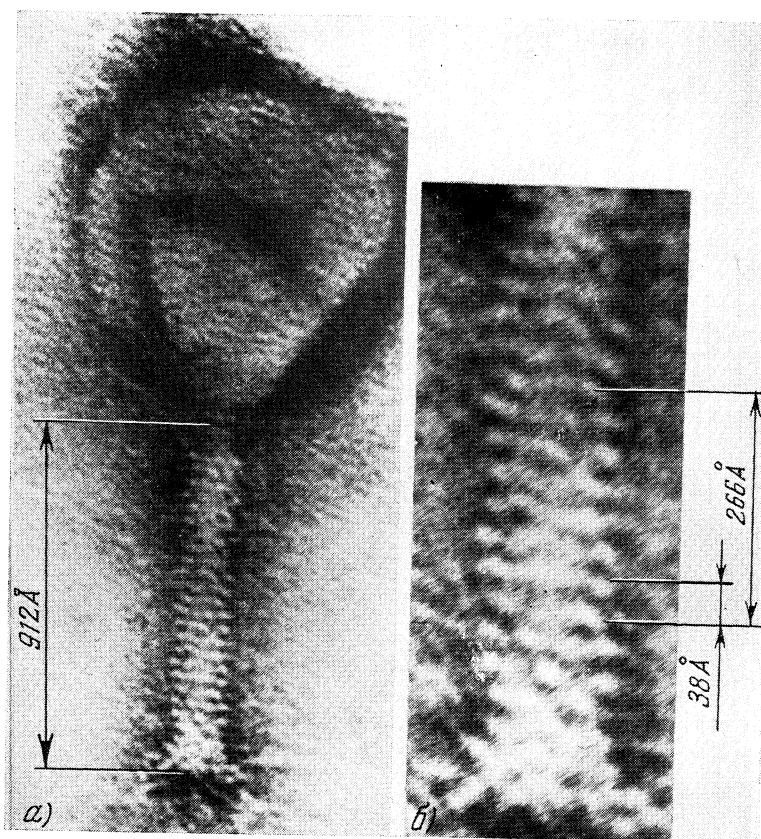


Рис. 39. Электронная микрофотография фага T6 (а), увеличенный участок хвостового отростка (б) и его денситограмма (в).

и полярность, «стреловидность» структуры, что дает возможность конкретизировать молекулярный механизм мышечного сокращения.

Метод Фурье был использован и для исследования сферических вирусов животных и растений^{91, 92}. Эти вирусы, например, вирус герпеса,

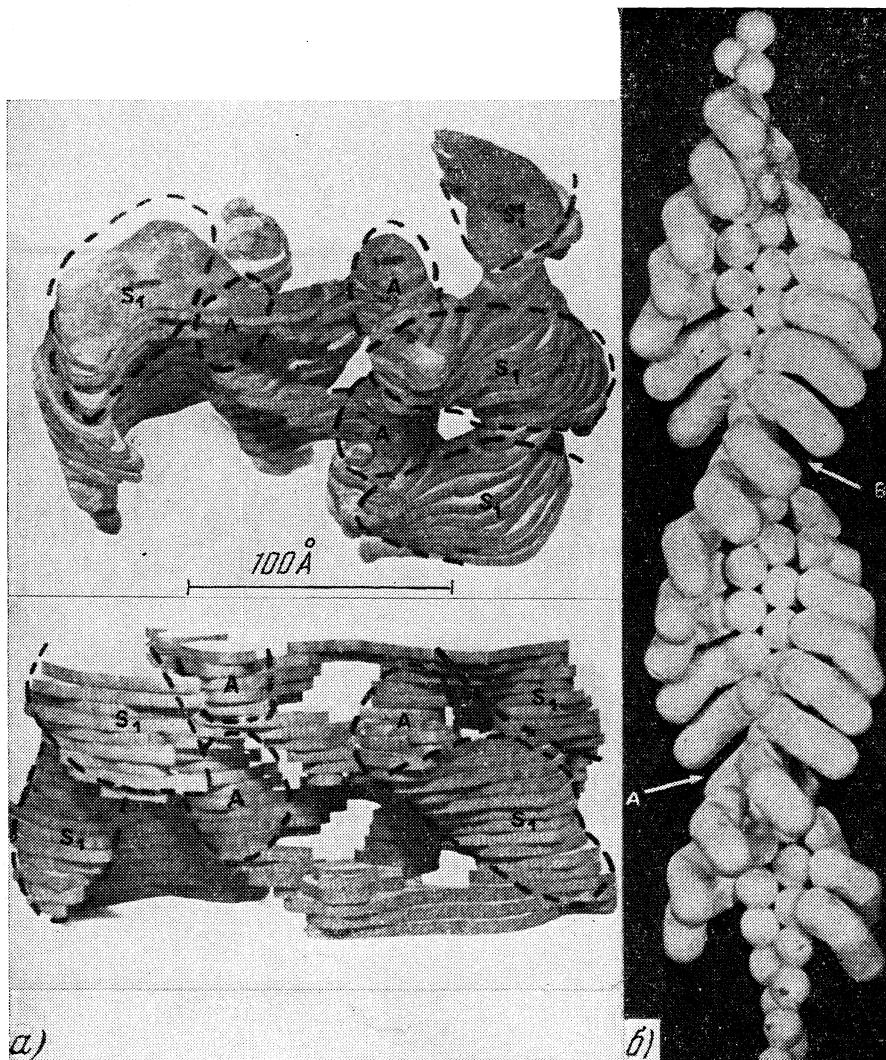


Рис. 40. Реконструкция элемента нити актина с субфрагментом миозина (а) и модель такой двусpirальной нити (б).

полиомы, полиомиэлита, желтой мозаики репы и др., построены из белковой оболочки, внутри которой заключена РНК — носитель генетической информации, входящая в клетку хозяина и заставляющая ее информационно-синтезирующую систему работать на воспроизведение вируса, а не белков, нужных самой клетке.

Замкнутая белковая оболочка построена из мономолекулярного слоя белковых морфологических единиц, которые в первом приближении могут быть представлены шариками (см. рис. 6, г). Эта оболочка построена

как бы из плотноупакованного слоя таких единиц^{7, 17}. Реализуется наиболее экономный принцип построения оболочки, когда отношение внутреннего объема к поверхности максимальна. Плотная упаковка морфологических единиц на поверхности сферы невозможна, но ближе всего к ней — икосаэдрическая. Икосаэдрическая точечная группа симметрии имеет символ 532, т. е. характеризуется наличием 6-ти осей пятого порядка, 10-ти осей третьего порядка, 15-ти осей второго порядка, а точек

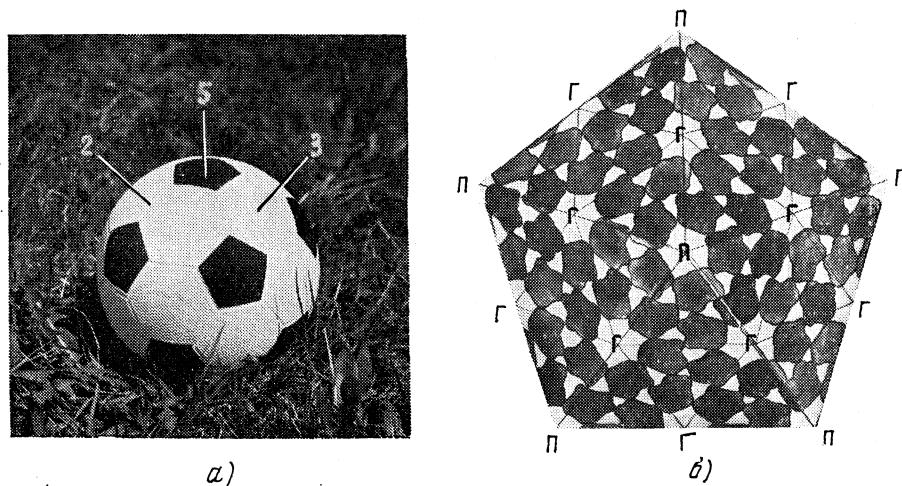


Рис. 41. Футбольный мяч, выкроенный согласно икосаэдрической симметрии 532 (а) (показаны выходы соответствующих осей), и схема образования морфологических единиц в оболочке вируса — пентамеров Π и гексамеров Γ — из асимметричных белковых молекул (б).

выхода этих осей на поверхность — соответственно вдвое больше. Взаимное положение осей видно на рис. 41, а. Морфологические единицы, находящиеся на выходах осей 5, имеют координацию 5, остальные — координацию 6. Как и у любых биологических структур, которые построены все из «левых» аминокислот, здесь невозможны плоскости симметрии.

Индивидуальная белковая глобула (субъединица) всегда асимметрична, поэтому морфологическая белковая единица, условно изображенная шариком на рис. 5—6, должна на «плоских» участках оболочки и на ее ребрах состоять из шести белковых молекул, т. е. представлять собой так называемый гексамер. В то же время для образования замкнутой икосаэдрической оболочки следует допустить, что морфологические единицы, располагающиеся на оси 5 и имеющие пятерную координацию, и являются ассоциациями молекул субъединиц в пентамеры (рис. 41, б). Пентамеры и гексамеры бывают различимы на электронных микрофотографиях (см. рис. 6). Возможное число M морфологических единиц в икосаэдрических вирусах и число B белковых субъединиц в оболочках определяется формулами

$$M = 12_{(\text{пент})} + 10 (T - 1)_{(\text{гекс})}, \quad B = 60T + 6(M - 12),$$

где число T может принимать некоторые целые значения: $T = 1, 3, 4, 7$ ¹⁷. Так, для фага ϕ $T = 1$, т. е. $M = 12$ и $B = 60$ (простейший случай), для вируса желтой мозаики репы $T = 3$, $M = 32$ и $B = 180$, для герпеса (см. рис. 6, в), варциллы $T = 16$, $M = 162$ и $B = 1500$. Все эти закономерности были установлены прямым наблюдением и анализом электронных микрофотографий вирусов и их пустых (без РНК) белковых оболочек. Прямое подтверждение симметрии 532 дает и рентгеноструктурный анализ.

Методы трехмерного восстановления позволили уточнить идеализированные модели таких вирусов^{91, 92}. Восстановление велось в цилиндрических координатах, при этом наиболее выгодное положение частицы на подложке — с осью 5 параллельно ей, что согласно (16б) эквивалентно наблюдению $p = 10$ проекций. Фактически для увеличения набора Φ в (25а) бралась еще одна частица, так же с осью 5 параллельно подложке, но в иной азимутальной ориентации. В итоге эффективное число $p = 20$.

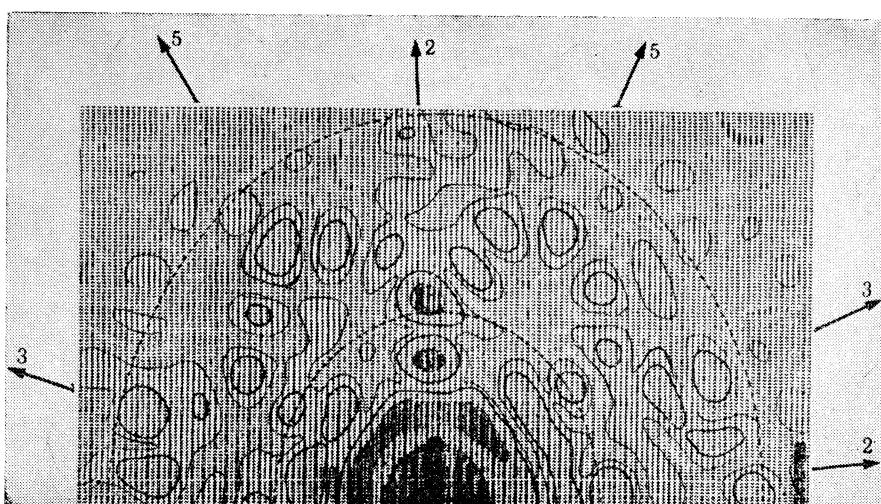


Рис. 42. Участок двумерной трансформанты Фурье вириуса кустистой карликовости томата (сечение, перпендикулярное к оси 2), на котором нанесены значения $\lg |F|$.

Распознавание ориентаций производилось на основании модельных расчетов проекций⁴ (см. рис. 11). Была использована так называемая *интерполяция Уиттекера — Шеннона*⁹³, позволяющая распределить данные измерений по регулярной дискретизированной в цилиндрических координатах сетке, что необходимо для преобразования Фурье (рис. 42). Результаты вычислений усредняются согласно икосаэдрической симметрии.

Одним из объектов явился вирус бородавок человека (см. рис. 6, а). Его диаметр — 560 Å, $T = 7$, $M = 72$, $B = 420$. Результат реконструкции при относительно низком разрешении 60 Å (рис. 43, а) четко выявил икосаэдрическую симметрию и характер упаковки частиц. При разрешении до 40 Å гексамеры и пентамеры выступают как «кольца» из белковых глубул.

Вирус кустистой карликовости томата имеет диаметр 330 Å, $T = 3$ и $B = 180$. В этом случае группировка на пентамеры и гексамеры оказывается выраженной не ясно, а четче определены димеры; число их равно 90. Реконструкция с разрешением ~ 30 Å дана на рис. 43, б. Ясно выступают сгустки плотности, соответствующие димерам; часть их расположена на выходах осей 2. Эти димеры выглядят более массивными, их радиус больше на 10 Å. Димерные единицы группируются пятерками вокруг осей 5, но они же входят и в шестерки вокруг осей 3.

Трехмерная реконструкция икосаэдрических вирусов весьма перспективна. Естественнее, конечно, использовать здесь их собственную симметрию, а не цилиндрические координаты, в которых вели вычисления.

Метод двойного преобразования Фурье был использован и для изучения асимметричных частиц — рибосом⁹⁴. Эти удлиненные частицы

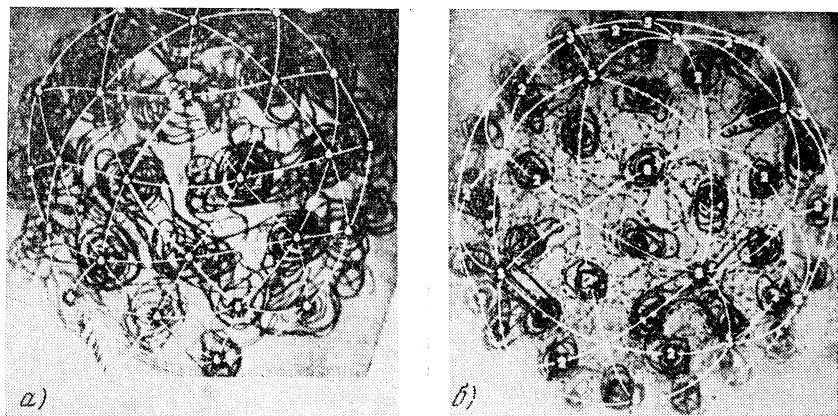


Рис. 43. Реконструкция структуры вируса бородавок (а) и вируса кустистой карликовости томата (б).

построены по типу «грибка»: из «шляпки», так называемой 40S-субъединицы, на эллипсоидальном основании, так называемой 60S-субъединице.

Высота частиц — около 260 Å, «диаметр» — около 220 Å (см. рис. 9²¹⁻²³).

В данном случае симметрия отсутствует, и для получения набора проекций контрастированного образца, т. е. различных его наклонов, было построено специальное устройство, вмонтированное в прибор «Филипс EM-300»⁸⁵. Число проекций составило $p = 15$. Весьма трудоемкие расчеты дали в итоге картину, показанную на рис. 44. В общих чертах она соответствует известной модели, но пока ее следует рассматривать лишь как свидетельство возможностей применения метода к асимметричным объектам.

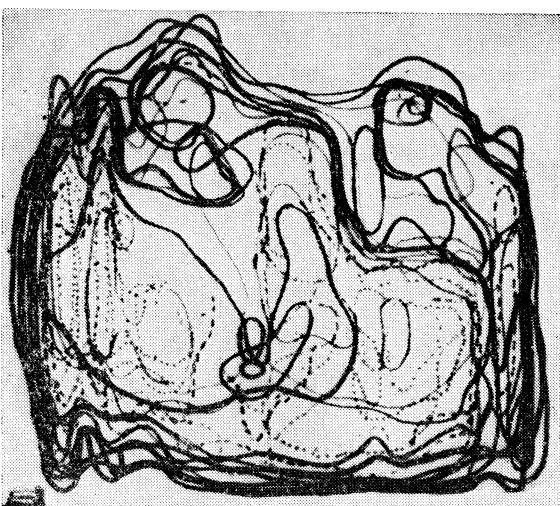


Рис. 44. Реконструкция тетрамера из рибосом.

Рибосомальные частицы укладываются в спиральные «жгуты», образующие паракристаллическую упаковку в так называемых хроматоидных телах некоторых амеб (рис. 45, а)⁹⁵. Были найдены несколько различающиеся жгуты с симметриями $s_{12/5}$, $s_{17/5}$ и $s_{19/7}$ и соответственно диаметрами 410, 500 и 560 Å. Была проведена трехмерная реконструкция методом Фурье, с предварительной математической фильтрацией изображения (рис. 45, б). Одно из сечений (перпендикулярных к оси спирали) дано на рис. 45, в.

Разрешение восстановленной картины ~ 50 Å. Трехмерная модель хроматоидного жгута дана на рис. 45, *ε*; частицы укладки имеют форму, близкую к форме рибосом, исследовавшихся другими методами *).

в) Исследования, выполненные методом синтеза проектирующих функций. С помощью этого метода была исследована структура хвостовых отростков *T*-четных фагов *E. coli*

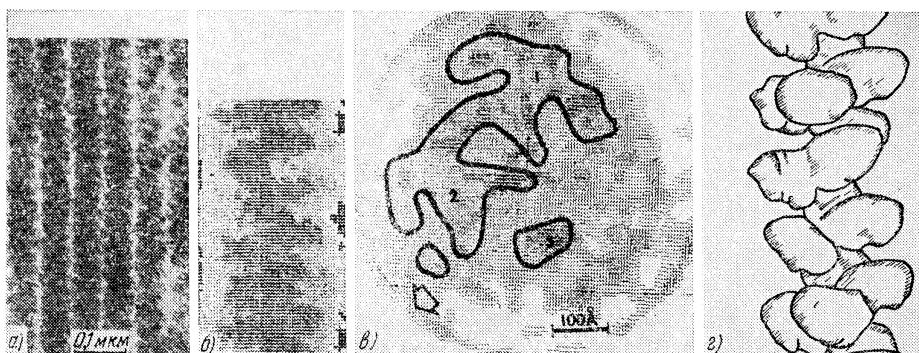


Рис. 45. Электронная микрофотография хроматоидных жгутов (*a*), плотность жгута, «отфильтрованная» от фона на ЭВМ (*b*), одно из реконструированных сечений (*c*) и трехмерная модель хроматоидного жгута (*d*).

B — *T*2, *T*6, *ДД*6^{72, 97}. Фаг *T*4 этой же группы был изучен методом двойного преобразования Фурье⁶⁹, и здесь мы сопоставим полученные данные. Рис. 39 — микрофотография хвоста фага *T*6 и его денситограмма. Эти бактериальные вирусы относятся к группе сложных вирусов. Основными морфологическими компонентами их являются: головка, содержащая нуклеиновую кислоту; отросток, выполняющий функцию введения нуклеиновой кислоты в поражаемую клетку, и аппарат прикрепления отростка к бактериальной клетке. Отросток состоит из полого цилиндрического стержня с молекулярным весом $2,3 \cdot 10^6$ — $3,2 \cdot 10^6$ и чехла, молекулярный вес которого $7,8 \cdot 10^6$ — $8,0 \cdot 10^6$. Чехол отростка является сократительным органом и может находиться как в сокращенном, так и в растянутом, характерном для интактной частицы, состоянии. Отростки этих бактериофагов обладают спиральной симметрией.

Определение параметров *p*, *q*, *N* спирали было проведено с помощью оптической дифракции⁹⁸ (рис. 46, *a*). В образовании рефлексов дифракционной картины согласно правилу отбора (*7*)^{34, 36} участвуют функции Бесселя, порядок которых кратен порядку *N* поворотной оси объекта. Было найдено, что *N* = 6. Таким образом, эти структуры могут быть описаны как стопка дисков с шестерной осью (объект приблизительно такой конфигурации дан на рис. 20), которые уложены друг на друга с поворотом, определяемым параметрами *p* и *q*. Эти параметры также определяются по картине оптической дифракции: $p/q = 7/2$ и симметрия $s_{7/2}6$. Таким образом, поворот элементарного диска относительно следующего равен $4\pi/7 \approx 103^\circ$. Каждый восьмой диск трансляционно равен первому, т. е. расположен точно под (над) ним в той же угловой ориентации. Элементарная группировка — наименьшая по объему группировка,

*) Более полные данные приведены в недавно появившихся работах⁹⁶.

трансляционным повторением которой описывается весь объект, — в соответствии с порядком группы содержит асимметричные группировки. В соответствии с (16в) — (16г) одна проекция отростка (а значит, и элементарного диска) эквивалентна $p = 21$ проекции, что достаточно для восстановления. Диаметры отростков, их периоды и некоторые другие

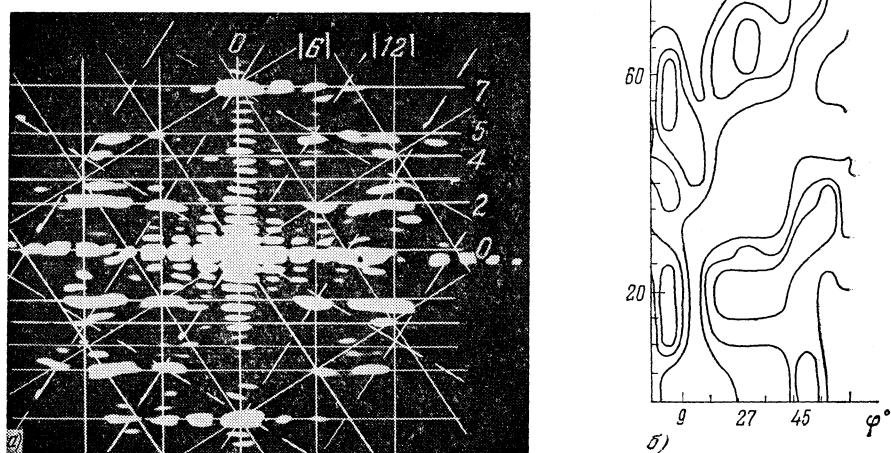


Рис. 46. Оптическая дифракция от хвостового отростка бактериофага T6 (a) (сбоку указаны номера слоевых линий, на вертикалях — порядок функций Бесселя главных максимумов) и проекционная трансформанта одного из четырех независимых сечений T6 (b).

исходные данные приведены в табл. II. Таким образом, для определения пространственной структуры отростка достаточно определить структуру одного диска. Толщина диска составляет около 40 Å. Структура их была рассчитана в четырех сечениях, отстоящих друг от друга по высоте на $c/4p$, т. е. около 10 Å. Из денситограммы рис. 39, в было взято $4 \times 7 = 28$

Таблица II

Основные параметры растянутых хвостовых отростков фагов T2, T4, T6, ДД6 *E. coli* B

Параметр	T2	T6	ДД6	T4
p/q	7/2	7/2	7/2	7/2
N	6	6	6	6
$c/p, \text{\AA}$	40	38	41,5	38
Длина хвоста, Å	960	812	996	812
Число асимметричных единиц	144	144	144	144
Внешний диаметр хвоста, Å	165—170	170	206	240
Диаметр осевого канала стержня, Å	20—25	25—30	35—40	30
Внешний диаметр стержня, Å	70—80	85	90—100	100
Диаметр спиральных каналов, Å	20	20—30	30	30
Расстояние от оси хвоста до центральных каналов, Å	40—45	45	60—65	65
Ω	1,3	1,5	1,5	
чехол				
стержень	1,5	1,1—1,4	1,1—1,5	
отросток	1,3	1,3—1,4	1,6	

соответствующих сечений; их можно представить как проекционные трансформанты (11) для каждого из четырех сечений; одна из них приведена на рис. 46, б.

На рис. 47 даны четыре функции Σ (28), представляющие сечения элементарного диска в изолиниях. Поскольку внешний радиус фага известен, известно и значение краевой изолинии, соответствующей наличию

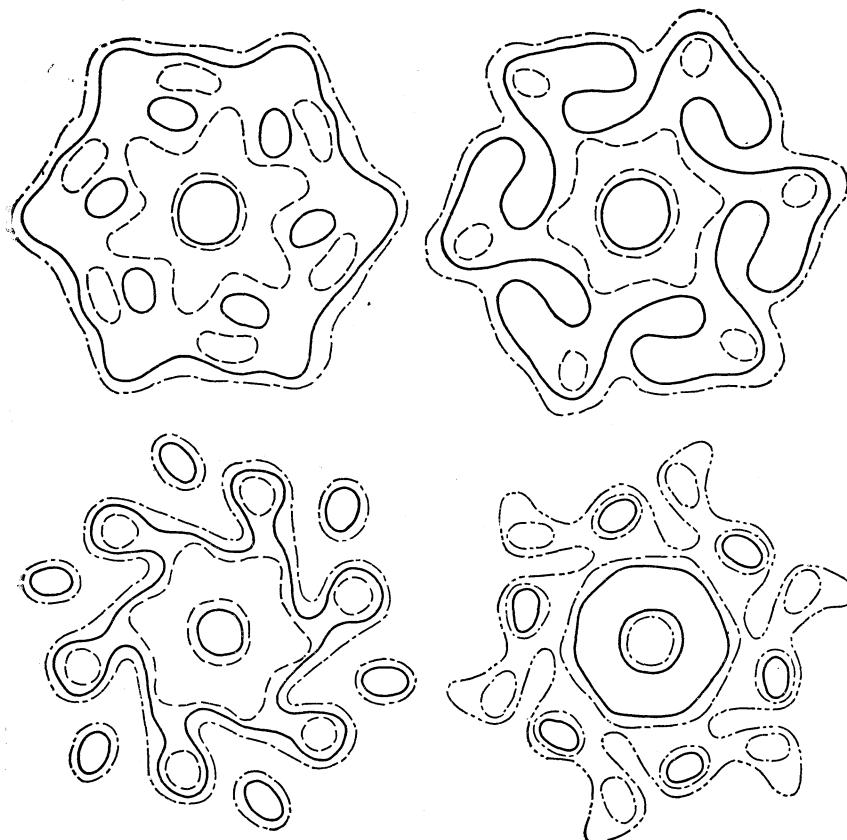


Рис. 47. Функции Σ (28) для четырех независимых сечений элементарного диска.

белка в объекте. Это (или учет объема объекта) дает возможность выбирать изолинию, соответствующую границе белка.

Растянув каждое сечение ρ_j на 9.5 \AA вдоль оси z , образовав тем самым пластины и наложив такие пластины друг на друга, мы получаем модель элементарного диска (рис. 48, а). Наложение таких дисков друг на друга с поворотом на 103° дает трехмерную структуру (рис. 48, б).

На рис. 49 приведены модели полученных тем же путем хвостовых отростков фагов T2 и ДД6. Отростки имеют сходное строение, отличаясь лишь своими размерами. Диаметр T6 составляет 170 \AA , других фагов — близкую величину (см. табл. II). На наружной поверхности отростка наблюдаются два семейства спиральных желобов, образующих на поверхности цилиндра как бы параллелограммы — элементарные ячейки так называемой *радиальной проекции*. На экваторе моделей имеется по шесть элементарных ячеек, соответствующих числу асимметричных единиц в дисках. По оси идет центральный, цилиндрический канал ($d \approx 30-35 \text{ \AA}$);

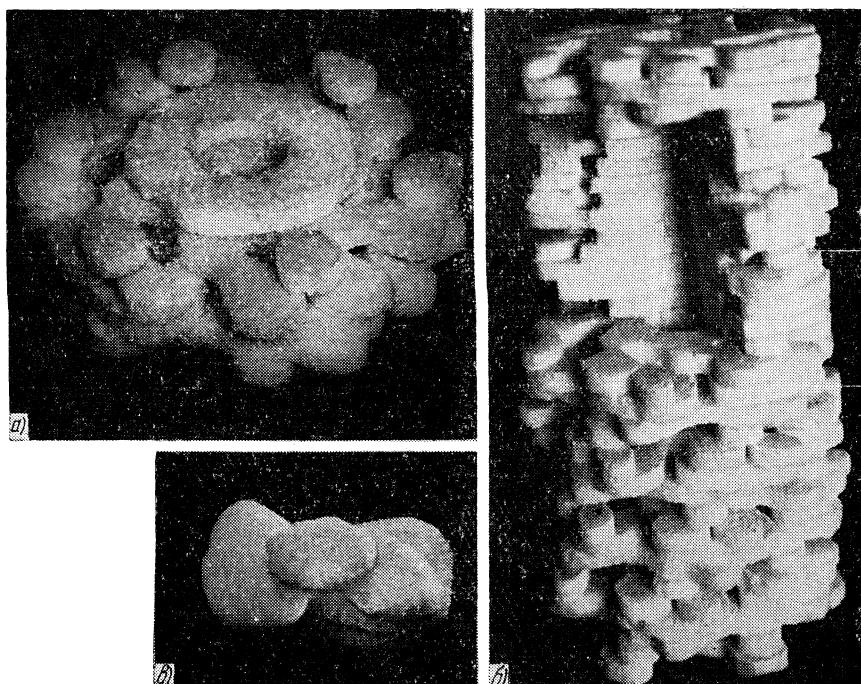


Рис. 48. Элементарный диск (a), трехмерная структура хвостового отростка фага T6 (вырезанный участок показывает осевой и один из спиральных каналов) (b) и строение субъединиц чехла (c).

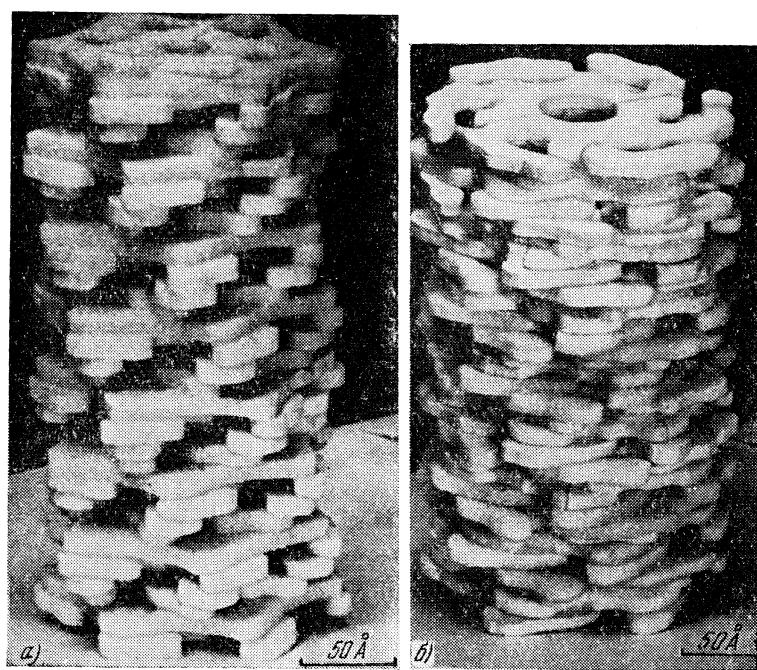


Рис. 49. Трехмерная структура хвостовых отростков фагов T2 (a) и ДД6 (б).

кроме него обнаружено по шесть спиральных каналов несколько меньшего размера, которые находятся на некотором расстоянии от оси отростка (см. табл. II). Вдоль радиусов отростков наблюдается по два максимума плотности. Один из них непосредственно примыкает к осевому каналу, а второй находится на периферии отростка. Приосевые максимумы соответствуют молекулам белка, образующим так называемый *стержень фага*, а периферийные — *чехол*. Синтез позволяет предположить, что асимметричные единицы чехла, по-видимому, состоят из двух белковых субъединиц (рис. 48, *в*). Каждый из шести периферийных максимумов плотности на собранной модели предстает в виде «гантеля» неправильной формы, объем которой приблизительно равен 50 000 Å³ (см. рис. 48, *в*).

«Полипептидное вещество» собственно белковых молекул удобно описывать величиной, численно равной отношению объема Ω (в Å³) полипептидного вещества к его молекулярному весу M . Эта величина должна иметь значение

$$\Omega/M = m_H/\rho \approx 1, 3, \quad (52)$$

где m_H — масса атома водорода, равная $1,65 \cdot 10^{-24}$ г; ρ — плотность белка, равная $1,27 \cdot 10^{-24}$ г/Å³. Значение (52) хорошо подтверждается по данным рентгеноструктурного анализа ряда белков. В табл. II даны соответствующие значения Ω/m .

В табл. II приведены числовые характеристики и для фага T4, полученные де Розье и Клугом⁶⁹ методом Фурье. Они в основном близки, кроме значения диаметра для T4 240 Å, что расходится и с другими литературными электронно-микроскопическими данными⁶: $2R = 160-180$ Å. По-видимому, это расхождение можно отнести за счет двойного преобразования Фурье (обрыв ряда, введение функции, сглаживающей «края» экспериментальной микрофотографии).

Оценка разрешения по (50а) дает ~12 Å. Однако микрофотографии контрастированных фагов по данным оптической дифракции имеют разрешение ~25 Å. Эту величину и следует принять за разрешение полученных моделей.

Таким образом, методы реконструкции дали прямые количественные сведения о трехмерной структуре хвостовых отростков, о форме и взаимном расположении образующих их белковых молекул. Разумеется, это несравненно больше, чем можно было извлечь только из рассмотрения микрофотографий типа рис. 39, *а*, *б*. В частности, наличие спиральных внутренних каналов установлено только реконструкцией.

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Мы находимся сейчас в начале развития нового направления в электронной микроскопии, которое уже дало ряд существенных результатов. Теория и алгоритмы восстановления трехмерной структуры обеспечивают необходимую обработку экспериментальных данных.

Интересно отметить, что теория восстановления функций по проекциям и сходные алгоритмы, как уже говорилось, разрабатывались в ряде других областей. Так решалась задача нахождения распределения интенсивности радиоисточников по данным о сканировании (т. е. проектировании) этой интенсивности⁵⁶⁻⁵⁸. В сущности, та же, но на макроскопическом уровне проблема существует в медицинской радиографии⁵³⁻⁵⁵. Сходные проблемы рассматриваются в областях кодирования и передачи изображений⁵⁹. Проблема зрительного восприятия, стереовидения и создания мозгом пространственных образов⁶⁰ также близка к рассматриваемому кругу вопросов.

Что касается собственно электронной микроскопии, следует сказать, что вопросы дальнейшего изучения трехмерной структуры биомолекул и их ассоциаций — это вопросы биохимии и техники электронно-микроскопического эксперимента. Биохимические процедуры должны обеспечить выделение, очистку и подготовку необходимых объектов. Электронно-микроскопическая техника будет развиваться по линии улучшения методов препарирования, увеличения разрешения контрастированных объектов, съемки непосредственно биопрепараторов без контрастирования.

В обычной схеме просвечивающего электронного микроскопа изображение формируется согласно (1) из начального пучка за счет поглощения

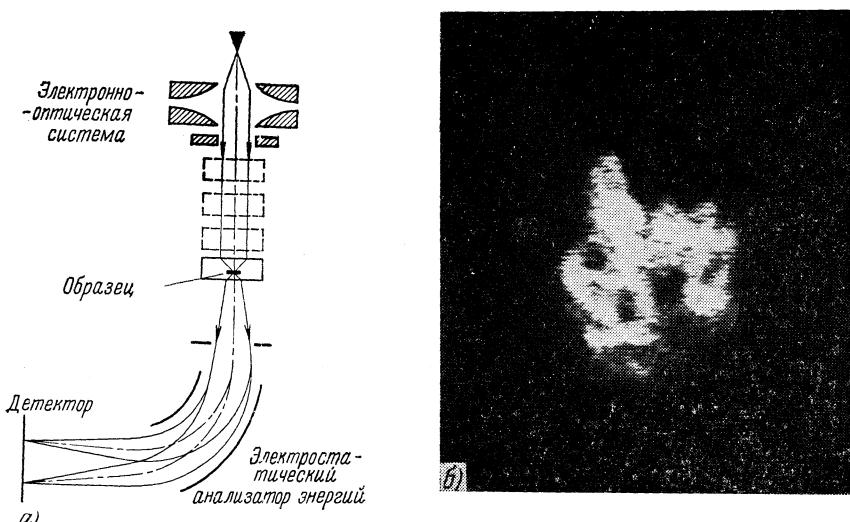


Рис. 50. Принципиальная схема просвечивающего сканирующего электронного микроскопа (a) и изображение молекулы гемоглобина, полученное в таком микроскопе (b).

и рассеяния его электронов образцом. Однако возможно и использование «темнопольного» метода, когда изображение формируется из рассеянных под некоторым углом ϑ электронов $^{1-5}, 100$. Такая методика может быть применена и к неконтрастированным препаратам.

Весьма перспективным представляется метод просвечивающей сканирующей электронной микроскопии, предложенный Кру $^{101}, 102$. Хорошо известный метод сканирования на отражение («стереоскан») 103 дает разрешение порядка 100—200 Å. После преодоления весьма серьезных экспериментальных трудностей Кру удалось построить прибор, в котором диаметр электронного пучка на образце составляет 5 Å. Сканирование таким просвечивающим электронным зондом по образцу и измерение его интенсивности (рис. 50, a) с последующим выводом на телевизор дает возможность получить изображение. Можно показать, что оптическая схема такого микроскопа эквивалентна формально-геометрической «обращенной» схеме обычного микроскопа. Однако хотя разрешение его меньше, он имеет преимущества, заключающиеся в легкой возможности анализировать дифференциальное распределение $f(\vartheta, E)$ прошедших электронов по углам ϑ и энергиям E (см. рис. 50, a), например, измерять упругую и неупругую составляющие, чистое поглощение и т. п. Таким путем можно подобрать по абсолютным измерениям или, например, по отношениям сигналов от упругой и определенной неупругой составляющих выгод-

ные режимы для детектирования тяжелых атомов, отделения рассеяния образца от рассеяния подложкой и т. п. В качестве примера на рис. 50, б дано изображение молекулы гемоглобина (не контрастированной)¹⁰². Такая изолированная молекула, конечно, деформировалась при препарировании, однако полученное изображение позволяет различить некоторые детали ее третичной и четвертичной структур. Разумеется, вопрос о трехмерной реконструкции актуален и для сканирующей просвечивающей электронной микроскопии, поскольку и здесь изображение является проекцией.

Новые возможности в изучении биомолекул даст применение высоковольтной (до 1 МэВ) электронной микроскопии¹⁰⁴.

Сочетание идей оптической дифракции, голографических методов, комбинирование данных электронной микроскопии и рентгенографии (а все это одна и та же дифракционная оптика, но на волнах разной длины), широкое использование ЭВМ, безусловно, расширит возможности анализа строения биомолекул и вещества вообще.

Институт кристаллографии
АН СССР

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

1. З. Лейзеганг, Электронная микроскопия, М., ИЛ, 1960.
2. R. D. Heidenreich, Fundamentals of Transmission Electron Microscopy, N. Y., Interscience, 1964.
3. И. Г. Стоянова, И. Ф. Анаскин, Физические основы просвечивающей электронной микроскопии, М., «Наука», 1972.
4. Н. А. Киселев, Электронная микроскопия биологических макромолекул, М., «Наука», 1965.
5. Техника электронной микроскопии, под ред. Д. Кэя, М., «Мир», 1965.
6. А. С. Тихоненко, Ультраструктура вирусов и бактерий, М., «Наука», 1968.
7. Б. К. Вайнштейн, Н. А. Киселев, сборник «Вирусология и иммунология», М., «Наука», 1964.
8. M. F. Perutz, Proteins and Nucleic Acids, Amsterdam — London — New York, Elsevier, 1962.
9. Б. К. Вайнштейн, УФН 88, 527 (1966).
10. R. E. Dickerson, I. Geiss, Structure and Action of Proteins, N. Y., Harper and Row, 1969.
11. R. Josephs, J. Mol. Biol. 55, 147 (1971).
12. A. P. B. D'Engleisen, F. G. Elliot, W. J. Bartels, E.F.J. van Bruggen, Comp. Biochem. Physiol. B40, 1045 (1971).
13. A. M. Fiskin, E.F.J. van Bruggen, H. F. Fisher, Biochem. 10, 2396 (1971).
14. D. J. de Rosier, R. M. Oliver, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 36, 199 (1971).
15. P. Wildy, W. C. Russell, R. W. Horne, Virology 12, 204 (1960).
16. R. W. Horne, S. Brenner, A. P. Waters, P. Wildy, J. Mol. Biol. 1, 84 (1959).
17. D. L. Caspary, A. Klug, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 27, 1 (1962).
18. R. W. Horne, P. Wildy, Virology 15, 348 (1961).
19. Б. Ф. Поглазов, Структура и функции сократительных белков, М., «Наука», 1965.
20. M. F. Moody, Phil. Trans. Roy. Soc. (L.), B261, 181 (1971).
21. H. E. Huxley, G. Zubay, J. Mol. Biol. 2, 10 (1960).
22. V. I. Bruskov, N. A. Киселев, ibid. 37, 367 (1968).
23. Y. Nonomura, G. Blobel, D. Sabatini, J. Mol. Biol. 60, 303 (1971).
24. A. Klug, J. T. Finch, ibid. 31, 1 (1968).
25. Б. К. Вайнштейн, Н. А. Киселев, И. Л. Шпилберг, ДАН ССР 167, 212 (1966).
26. N. A. Kiselev, C. L. Shpitzberg, B. K. Vainshtain, J. Mol. Biol. 25, 433 (1967).
27. B. K. Vainshtain, N. A. Kiselev, J. Electron Microsc. 16, 70 (1967).

28. N. A. Kiselev, F. Ya. Legpere, N. B. Livanova, *J. Mol. Biol.* **62**, 537 (1971);
29. C. A. Taylor, H. Lipsom, *Optical Transforms*, L., Bell, 1964.
30. Б. К. Вайнштейн, Г. И. Косуров, *Кристаллография* **11**, 921 (1966).
31. Г. И. Косуров, И. Е. Лифшиц, Н. А. Киселев, *Кристаллография* **16**, 813 (1971).
32. A. Klug, D. J. de Rosier, *Nature* **212**, 29 (1966).
33. A. Klug, F. H. C. Crick, H. W. Wyckoff, *Acta Cryst.* **11**, 199 (1958).
34. W. Cochran, F. H. C. Crick, V. Vand, *Acta Cryst.* **5**, 581 (1952).
35. Б. К. Вайнштейн, *Кристаллография* **4**, 842 (1959).
36. Б. К. Вайнштейн, *Дифракция рентгеновских лучей на цепных молекулах*, М., Изд-во АН СССР, 1963.
37. N. A. Kiselev, D. J. de Rosier, A. Klug, *J. Mol. Biol.* **35**, 433 (1967).
38. Б. К. Вайнштейн, В. Н. Зайцев, Г. И. Косуров, *Кристаллография* **13**, 594 (1968).
39. Б. К. Вайнштейн, *Структурная электронография*, М., Изд-во АН СССР, 1956.
40. P. P. Ferriger, *Adv. Opt. and Electron Microsc.* **3**, 155 (1968).
41. D. Gaborg, *Proc. Roy. Soc. A197*, 545 (1949) (см. перевод в виде приложения I в книге Дж. Строука «Введение в когерентную оптику и голограмию», М., «Мир», 1967).
42. D. Gaborg, *Proc. Phys. Soc. B64*, 449 (1951) (см. перевод по ⁴¹, приложение II).
43. G. W. Strook, *New Scientist and Sci. J.* **51**, 671 (1971).
44. М. А. Кронрод, Н. С. Мерзляков, Л. И. Ярославский, *ЖТФ* **42**, 414, 419 (1972).
45. J. Frank, P. Bubler, K. Langer, W. Hoppe, *Ber. Bunsenges.* **74**, 1105 (1970).
46. W. Hoppe, *Optik* **29**, 617 (1969).
47. W. Hoppe, *Acta Cryst.* **A26**, 414 (1970).
48. W. Hoppe, K. Langer, F. Thon, *Optik* **30**, 538 (1970).
49. W. Hoppe, *Phil. Trans. Farad. Soc. (L.) B261*, 71 (1971).
50. Н. Р. Egickson, A. Klug, *ibid.*, p. 105.
51. Б. К. Вайнштейн, Некоторые вопросы дифракционных методов. Препринт ИКАН СССР, 1968.
52. Б. К. Вайнштейн, *Кристаллография* **15**, 894, (1970).
53. D. G. Grant, J. B. Garrison, R. J. Johns, *APL Techn. Digest* **10**, 9 (1970).
54. D. E. Kuhl, R. Q. Edwards, *Radiology* **96**, 563 (1970).
55. A. M. Cormack, *J. Appl. Phys.* **34**, 2722 (1963); **35**, 2908 (1964).
56. R. N. Bracewell, *Austr. J. Phys.* **9**, 198 (1956).
57. J. H. Taylor, *Astrophys. J.* **150**, 421 (1967).
58. R. N. Bracewell, A. C. Riddle, *ibid.* p. 427.
59. W. K. Pratt, J. Kanne, M. C. Anderson, *Proc. IEEE* **57**, 66, (1969) (см. перевод: ТИИЭР **57** (1), 66 (1969)).
60. В. В. Барынин, *Кристаллография* **16**, 887 (1971).
61. Б. К. Вайнштейн, В. В. Барынин, Г. В. Гурская, *ДАН СССР* **182**, 569 (1968).
62. Б. К. Vainshtein, V. V. Barynin, G. V. Gurskaya, *Acta Cryst.* **A25**, 184 (1969).
63. В. В. Барынин, Б. К. Вайнштейн, *Кристаллография* **16**, 751 (1971).
64. R. A. Grootenhuis, D. J. de Rosier, A. Klug, *Proc. Roy. Soc. (L.) A317*, 319 (1970).
65. R. Gordon, R. Bender, G. T. Hermann, *J. Theor. Biol.* **29**, 471 (1970).
66. R. Gordon, G. T. Hermann, *The Center for Theor. Biol. Quart. Bull.* **4**, 71 (1971).
67. S. K. Chang, *Comm. ACM* **14**, 21 (1971).
68. S. K. Chang, G. L. Shelton, *IEEE Trans. on Systems, Man and Cybernetics* **1**, 90 (1971).
69. D. J. de Rosier, A. Klug, *Nature* **217**, 130 (1968).
70. D. J. de Rosier, P. B. Moore, *J. Mol. Biol.* **52**, 355 (1970).
71. Б. К. Вайнштейн, *ДАН СССР* **196**, 1072 (1971).
72. А. М. Михайлов, Б. К. Вайнштейн, *Кристаллография* **16**, 408 (1971).
73. Б. К. Вайнштейн, А. М. Михайлов, *Кристаллография* **17**, 258 (1972).
74. Б. К. Вайнштейн, С. С. Орлов, *Кристаллография* **17**, 253 (1972).
75. C. N. Ramachandran, A. V. Lashina, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **68**, 2236 (1971).
76. J. Radon, *Ber. Verhandl. Sachs. Ges., Math.—Phys. Kl.* **69**, 262 (1917).
77. И. М. Гельфанд, Г. Б. Шилов, *Обобщенные функции и действия над ними*, М., Физматгиз, 1958, стр. 114.
78. M. V. Begg, D. F. Gibbs, *Proc. Roy. Soc. (L.) A314*, 143 (1970).

79. P. F. Gilbert, *a*) *ibid.* **B182**, 89 (1972); *б*) *J. Theor. Biol.* **36**, 105 (1972).
80. G. Frieder, G. T. Hermann, *ibid.* **33**, 189 (1971).
81. G. T. Hermann, S. Rowlan, *ibid.*, p. 213.
82. R. Bender, S. H. Bellman, R. Gordon, *ibid.* **29**, 483 (1970).
83. М. А. Порай-Кошиц, Практический курс рентгеноструктурного анализа, М., Изд-во, МГУ, 1960.
84. Б. К. Вайнштейн, *ЖЭТФ* **27**, 44 (1954).
85. J. Thalen, J. Spoelstra, J. F. L. van Breeman, J. E. Mellema, *J. Phys.* **E3**, 499 (1970).
86. Б. К. Вайнштейн, В. В. Барынин, Г. В. Гурская, В. Я. Никитин, *Кристаллография* **12**, 860 (1967).
87. Г. В. Гурская, С. Я. Карпухина, Г. М. Лобанова, *Биофизика* **16**, 553 (1971).
88. Г. В. Гурская, Г. М. Лобанова, Б. К. Вайнштейн, *Кристаллография* **16**, 764 (1971).
89. P. B. Moore, H. E. Huxley, D. J. de Rosier, *J. Mol. Biol.* **50**, 279 (1970).
90. M. Watanabe, S. Sasaki, N. Anasawa, *JEOL News* **9e** (1), 9 (1971).
91. R. A. Crowther, L. A. Amos, J. T. Finch, D. J. de Rosier, A. Klug, *Nature* **226**, 421 (1970).
92. R. A. Crowther, *Phil. Trans. Roy. Soc. (L.)* **B261**, 221 (1971).
93. E. T. Wittaker, *Proc. Roy. Soc. (Edinburg)* **35**, 181 (1915); C. E. Shannon, *Proc. IRE (N.Y.)* **37**, 10 (1949), (см. перевод в сборнике: К. Шеннон, Работы по теории информации и кибернетике, М., ИЛ, 1963, стр. 433).
94. J. E. Mellema, E. F. J. van Brugge, Thesis (University of Groningen, 1970), p. 78.
95. J. A. Lake, H. S. Slatyer, *Nature* **227**, 1032 (1970).
96. J. A. Lake, *J. Mol. Biol.* **66**, 255 (1972); J. A. Lake, H. S. Slatyer, *ibid.*, p. 271.
97. А. М. Михайлов, Б. К. Вайнштейн, *ДАН СССР* **203**, 253 (1972).
98. А. М. Михайлов, Н. Н. Беляева, *Мол. биол.* **5**, 318 (1971).
99. D. A. Polle, J. R. Lee, J. H. Tullor, *Science* **173**, 74 (1971); J. L. Harris, *J. Opt. Soc. Amer.* **56**, 569 (1966).
100. A. K. Kleinschmidt, *Phil. Trans. Roy. Soc. (L.)* **B261**, 143 (1971).
101. A. W. Crewe, *Phil. Trans. Farad. Soc. (L.)* **B261**, 61 (1971).
102. A. W. Crewe, *Scientific American* **224** (4), 26 (1971).
103. Г. В. Спивак, Г. В. Сапарин, М. В. Быков, *УФН* **99**, 636 (1969).
104. V. E. Cosslett, *Phil. Trans. Roy. Soc. (L.)* **B261**, 35 (1971).