

生物三维电子显微学进入全新高速发展时期

隋森芳

(清华大学生物科学与技术系, 生物膜与膜生物工程国家重点实验室, 北京 100084)

摘要: 生物三维电子显微学主要由三个部分组成——电子晶体学、单颗粒技术和电子断层成像术, 其结构解析对象的尺度范围介于 X 射线晶体学与光学显微镜之间, 适合从蛋白质分子结构到细胞和组织结构的解析。以冷冻电镜技术与三维重构技术为基础的低温电子显微学代表了生物电子显微学的前沿。低温单颗粒技术对于高度对称的病毒颗粒的解析最近已达到 $3.8 \text{ \AA}$ 分辨率, 正在成为解析分子量很大的蛋白质复合体高分辨结构的有效技术手段。低温电子断层成像技术目前对于真核细胞样品的结构解析已达到约 $40 \text{ \AA}$ 的分辨率, 在今后 5 年有望达到 $20 \text{ \AA}$ 。这样, 把 X 射线晶体学、NMR 以及电镜三维重构获得的蛋白质分子及复合体的高分辨率的结构, 锚定到较低分辨率的电子断层成像图像中, 从而在细胞水平上获得高精度的蛋白质空间定位和原子分辨率的蛋白质相互作用的结构信息。这将成为把分子水平的结构研究与细胞水平的生命活动衔接起来的可行途径。

关键词: 三维电子显微学; 低温电子显微学; 电子晶体学; 单颗粒技术; 电子断层成像术

中图分类号: Q6-33

0 引言

电子显微技术和生物大分子结构三维重构技术在生命科学诸多领域中得到愈来愈广泛的应用, 其结构解析的对象小至仅有几纳米大小的单个蛋白质分子, 大至整个病毒粒子, 甚至是微米尺度的细胞器。自上世纪 80 年代引入生物样品快速冷冻技术之后, 低温显微成像技术与三维重构技术的结合诞生了低温电子显微学 (cryo-electron microscopy, cryo-EM) [1,2], 从此生物电子显微学进入一个全新的高速发展时期, 并且作为一种重要的技术手段在结构生物学领域中扮演着越来越重要的角色。低温电子显微学有如下的优点: 第一, 生物大分子在水溶液环境中被快速冻结, 使得天然结构最大程度地得以保留, 所获得的结构接近于其生理状态; 第二, 快速冷冻过程具有较高的时间分辨率 ($< \text{毫秒}$), 故可用于生物大分子的动态过程研究 [3]; 第三, 电子显微学的分辨率解析范围 (约 $0.5 \text{ nm} \sim 10 \mu\text{m}$) 介于 X 射线晶体学与光学显微镜之间, 适合从蛋白质分子结构到细胞和组织结构的解析, 且分子量越大越有利于结构解析, 尤其适合膜蛋白、蛋白质复合体、病毒、细胞器、细胞和组织的三维结构分析。

目前, 用低温电子显微学研究生物大分子及复合体的中等分辨率结构的技术已经相对成熟, 其技

术门槛的降低使得越来越多的人掌握这一技术而得到广泛应用。更引人注目的是, 最近几年低温电子显微学在两个不同的方面取得了重要的进展。一方面, 高分辨的单颗粒三维结构解析已经得到了接近原子分辨率的结果, 在不远的将来很可能成为继 X 射线晶体学和核磁共振波谱学之后又一种解析生物大分子原子分辨率结构的有效手段。另一方面, 低温电子断层成像 (cryo-electron tomography) 技术的飞速发展, 使人们已经可以得到蛋白质等生物大分子在细胞器中的天然结构。尽管结构分辨率仍然较低, 但足以解释许多重要的生物学基本现象提供强有力的信息。此外, 把 X 射线晶体学和核磁共振波谱学解析得到的蛋白质原子分辨率结构锚定 (docking) 到从电镜获得的较低分辨率的复合体或细胞器结构中, 正在成为从生物大分子的结构向细胞复杂结构层次过渡的一种可行途径。各种结构生物学研究方法的比较请参考图 1。

收稿日期: 2007-07-29

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30330160)

通讯作者: 隋森芳, 电话: (010)62784768,

E-mail: suisf@mail.tsinghua.edu.cn

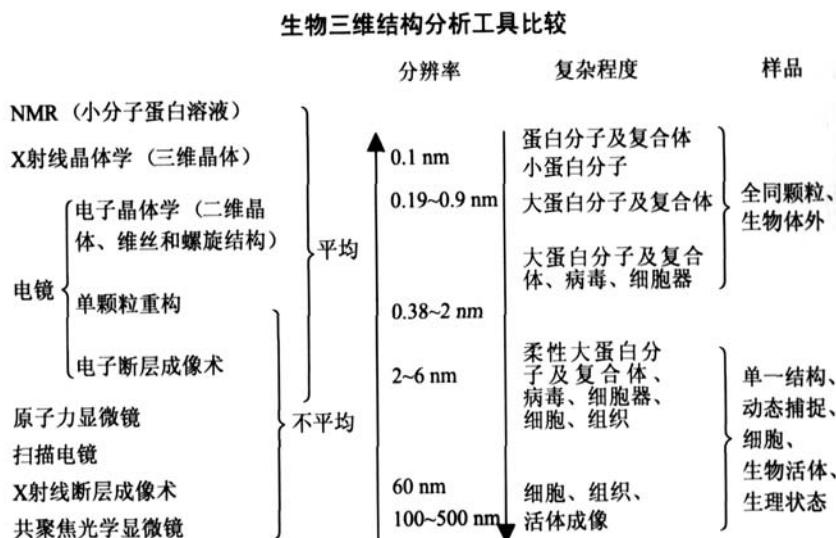


图1 常用的几种生物三维结构分析技术的比较。(该图修改自 Wanzhong He 提供的内部资料)

1 透射电子显微镜在生物学领域的发展简况

1931年德国科学家 Ernst Ruska 研制了第一台透射电子显微镜。此后电子显微镜在科学和技术领域所发挥的无可替代的作用有目共睹。因此,发明电镜50年之后,Ruska 获得1986年诺贝尔物理学奖乃实至名归(图2A)。与此同时,透射电子显微镜在生物学领域的应用大致经历了四个发展阶段:

1) 从20世纪30年代到50年代末期,透射电子显微镜的分辨率第一次超过了光学显微镜的分辨率。比利时细胞生物学家 Albert Claude 及其学生 George Palade 和 Christian de Duve 做出了一系列的开创性工作^[4],利用电子显微镜从离心分离的细胞组分中直接发现了内质网、线粒体、溶菌酶和过氧化物酶体等细胞器。他们三人因此分享了1974年的诺贝尔生理学或医学奖。但由于这个阶段样品制备技术还很落后,电子显微镜并没有得到普遍的应用。

2) 从20世纪50年代末期到60年代末期,电子显微镜的样品制备技术得到了快速发展,其中最重要的是生物样品化学固定以及树脂包埋超薄切片技术的发展。洛克菲勒大学是当时电子显微镜研究的中心,后来这些技术在世界许多研究机构都得到发展。研究人员发现了一系列亚细胞水平的超微结构,如高尔基体、细胞粘连等。电子显微镜成为这个时期细胞生物学的主流研究手段。

3) 从20世纪60年代末期到80年代中期,荧

光显微镜和共聚焦显微镜技术快速发展,人们可以直接观察并跟踪经过特定荧光标记的蛋白质分子,甚至可以观察这些蛋白质在生物活体细胞中的分布及运动。传统的电镜组织切片方法由于受到诸多因素的制约逐渐淡出了细胞生物学的主流研究手段。然而,正是在这个生物电镜发展的低潮阶段,诞生了多项影响深远的技术变革。

1968年,英国剑桥大学 MRC 实验室 Aaron Klug 博士领导的研究小组,首次提出利用二维电镜照片恢复出生物大分子的三维结构的方法^[5],为电子显微学成为三维结构解析的有效手段奠定了理论基础,Klug 因此获得1982年诺贝尔化学奖(图2B)。与此同时,低温冷冻制样技术^[1]、Tokuyasu 低温切片^[6]、免疫标定^[7]和低温刻蚀技术^[8]等生物电镜技术的产生,孕育着生物电子显微学新的高速发展时期的到来。

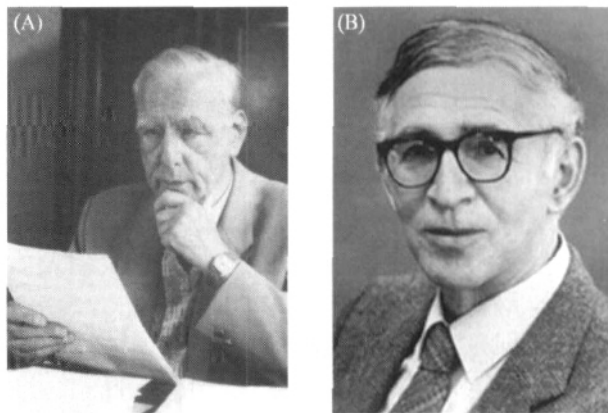


图2 (A) 1986年诺贝尔物理学奖获得者 Ernst Ruska; (B) 1982年诺贝尔化学奖获得者 Aaron Klug

4) 从 20 世纪 80 年代末期到现在, 计算机辅助的图像处理、自动控制和图像采集等技术与电子显微镜逐步结合, 高压冷冻 (high pressure freezing) 制样^[9]、低温去水以及冷冻切片^[10]等技术迅速发展, 并且普及到了许多实验室中。从此以低温电镜技术为代表的生物电子显微学进入了一个新的高速发展阶段。图 3 所统计的是与低温电子显微学相关的学术论文的发表数目。可以看出从 1996 年以后, 这个领域的论文数目迅速增加, 目前仍在快速增长。这是由于, 一方面基于图像平均技术 (单颗粒、病毒、二维晶体和管状螺旋结构晶体) 的低温

电镜三维结构重构方法弥补了传统的 X 射线蛋白质晶体结构解析的许多不足 (例如需要生长高质量的三维晶体), 日益成为结构生物学领域不可或缺的研究手段; 另一方面, 随着近些年来电子断层成像技术的迅速发展, 为纳米尺度的细胞基本结构的研究带来了革命性的突破。通过快速冷冻技术可以捕捉到活体细胞中的动态过程 (如发育、信号传导、感染及免疫反应等), 在细胞原位直接观察各种蛋白质分子及复合体之间在三维空间中的定位及相互作用, 从而在分子水平上揭示蛋白质分子在细胞生命活动中的功能。

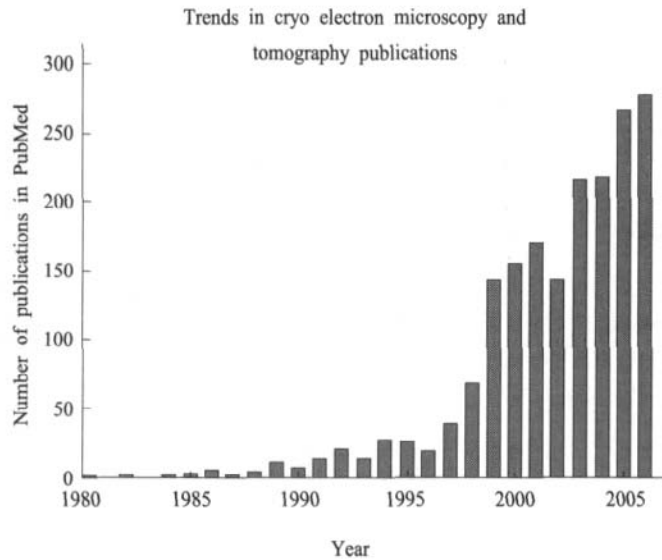


图 3 1980~2006 年低温电子显微学论文发表趋势图。利用关键词 “cryo electron microscopy” 或 “electron tomography” 检索 PubMed 数据库, 截至 2007 年 6 月 25 日, 共有 2014 篇论文, 其中高水平 (Cell/Nature/Science) 论文约占总论文数的 1/10

2 三维电子显微学基本原理

三维电子显微学是电子显微镜技术与计算机图像处理技术相结合而产生的, 它利用电镜样品的一系列二维投影图像, 经过计算机图像处理重构出样品的三维空间结构。1968 年, 英国剑桥大学 MRC 实验室 Aaron Klug 博士领导的研究小组首次用该技术重构出了 T4 噬菌体尾部的三维空间结构^[5]。在 20 世纪 70 到 80 年代发展成三种独立的三维重构技术: 电子晶体学 (electron crystallography)、

单颗粒分析技术 (single particle analysis) 和电子断层成像术 (electron tomography)。这三种技术, 只是在样品制备、数据收集和处理方式上有所不同, 其三维重构计算的数学本质完全相同, 都是基于中心截面定理^[11]: 任何实空间的三维物体, 沿入射光线方向的二维投影的傅立叶变换, 是该物体三维傅立叶变换后, 在倒易空间中垂直于该入射光线方向的一个过中心点的二维截面。根据中心截面定理, 收集物体在各个方向的二维投影照片后, 经过傅立叶变换及反傅立叶变换就可以恢复该物体的三维结构 (图 4)。

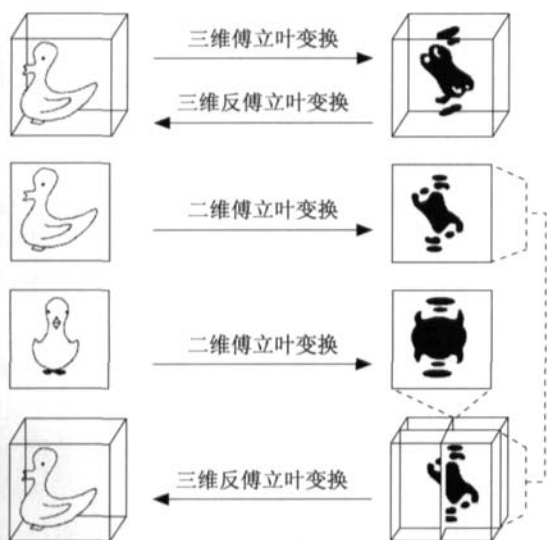


图 4 中心截面定理示意图。(该图修改自 Lake J, Biological Structures. London: Academic Press, 1971, p174)

下面我们对中心截面定理进行简单的数学推导：

假设在笛卡儿坐标系中物体的密度分布函数为 $\phi(x,y,z)$ ，则其在三维空间的傅立叶变换为

$$F(h,k,l)=F(f)=\iiint_{-\infty}^{\infty} \phi(x,y,z) \cdot \exp[-2\pi i(hx+ky+lz)] dx dy dz \quad (1)$$

物体在某方向上的投影（设为 z 方向上的投影）是其密度分布函数沿该方向的线积分

$$\sigma_z(x,y)=\int_{-\infty}^{+\infty} \phi(x,y,z) dz \quad (2)$$

对其做二维傅立叶变换，得

$$F_l(h,k)=\iint_{-\infty}^{\infty} \sigma_z(x,y) \cdot \exp[-2\pi i(hx+ky)] dx dy \quad (3)$$

因此，

$$F_l(h,k)=\iiint_{-\infty}^{\infty} \phi(x,y,z) \cdot \exp[-2\pi i(hx+ky)] dx dy dz \quad (4)$$

由式(1)，若 $l=0$ ，则

$$F(h,k,l)|_{l=0}=\iiint_{-\infty}^{\infty} \phi(x,y,z) \cdot \exp[-2\pi i(hx+ky)] dx dy dz \quad (5)$$

可见，式(4)与(5)完全相同，所以

$$F_l(h,k)=F(h,k,l)|_{l=0}=F(h,k,0) \quad (6)$$

上式说明，在三维实空间中，物体沿 z 方向的投影的傅立叶变换是该物体三维傅立叶变换后倒易空间的一个中心截面，而且这个中心截面垂直于投影方向。

应用这一定理，如果我们能获得物体三维傅立叶变换沿各个不同方向的中心截面，并把它们在三维倒易空间中整合起来，获得整个物体三维结构在倒易空间中的三维傅立叶函数 $F(h,k,l)$ ，将此函数进行反傅立叶变换，即获得了整个物体在实空间中的三维结构 $\phi(x,y,z)$ 。此过程称为三维重构。

3 低温电镜技术 (cryo-electron microscopy)

早期的电镜三维重构工作，主要用 1%~2%醋酸铀或其他重金属盐溶液对蛋白质分子进行染色制作电镜样品，称为负染技术 (negative staining) [12]。负染样品的缺点是分辨率低（低于 1.5 nm），不直接反映蛋白质分子的电荷分布，对样品还往往有压扁效应，因此无法得到高分辨率的三维结构。实际上，蛋白质必须在天然含水环境下才能保持其结构，因此要得到高分辨率电镜结构，就必须维持这种含水环境。这就意味着需要制作这样的含水样品并且在电镜中维持这种条件，但是电镜需要在高真空条件下工作，因而无法维持样品含水环境。另一方面，由于生物样品主要由轻元素（如 H、C、O、N）构成，极易受到辐照损伤而丢失高分辨率结构信息[13]。虽然提高电子的加速电压可以减小辐照损伤，但提高加速电压意味着电镜造价的提高，加速电压太高还会导致图像的衬度降低，尤其是 CCD 采集数据的衬度会大幅下降，因此这不是一个可行的解决办法。用电子显微术获得生物大分子的高分辨率结构，还需满足如下条件：增加样品的导电导热稳定性、提高图像衬度（制作超薄样品，选用场发射电镜及合适的加速电压）、提高采集数据的信噪比（如高质量 CCD，能量过滤）等[14]。

1974 年，Taylor 和 Glaeser 利用低温电镜技术完美地解决了维持天然含水条件的难题[1]。低温冷冻既保持样品含水条件又能维持电镜高真空环境，同时还大幅度减小辐照损伤（通过低温原位俘获辐照损伤产物，避免结构的迅速改变）。在 20 世纪 80 年代，Dubochet 实验室对低温电镜技术进行了深入研究[2]，使得生物低温电镜技术成为了研究生物大分子的常规技术，90 年代世界各地逐步普及了低温电镜技术（见图 3 所统计的低温电镜领域发表的论文趋势）。

低温电镜主要涉及低温冷冻制样技术、低温冷

台技术和低剂量曝光及图像采集技术。下面分别简介这些技术：

低温冷冻制样技术是生物低温电镜的核心技术。对于蛋白质二维晶体和单颗粒样品，主要通过快速冷冻 (plunge freezing) 技术制备。当水以超过 10^5 K/s 的速度快速冷冻时，会形成无序冰而不是晶体冰，可以避免冰冻结晶过程中对蛋白质结构的损伤。对于较厚的生物样品，如细胞或组织样品，则通常采用高压冷冻和低温切片技术制备。

低温冷台的热稳定性直接关系到能否拍摄到高分辨率图像。侧插式冷台附件可以使普通电镜进行低温电镜工作。一些高性能的冷台可以直接整合到特定型号的电镜中去，这些新型号的内置式液氮/液氦低温冷台，具有更高的热稳定性，可以获得超高分辨率的电镜图像，并且可以同时装载多个低温样品以极大地提高电镜的利用率^[15]。

生物样品不耐辐照，因此需要严格控制样品的观察、聚焦和拍摄所需要的电子曝光剂量。一般来说，高分辨率的二维晶体或单颗粒样品，曝光剂量控制在 $10\sim 20\text{ e}/\text{\AA}^2$ ；较低分辨率的低温电子断层成像术控制在 $40\sim 200\text{ e}/\text{\AA}^2$ 。在低剂量曝光条件下，拍摄的电镜图像噪声非常大，需要很好的数据采集设备。传统的方法是使用底片照相，而目前更多的工作采用高质量慢扫描 CCD 直接采集数字化图像，其优点是可以连续收集大量图像并实时观察和评估样品和图像的质量。随着 CCD 像素值的增加（目前 $4\text{ K}\times 4\text{ K}$ 像素 CCD 逐渐普及）和性能的改进（电子计数转化率提高）以及与能量过滤设备相结合，很多原本由底片完成的工作已经逐步被 CCD 取代^[16]。

目前，计算机技术与电镜技术完美结合，电镜的控制调节、样品寻找、样品倾转、数据收集等都实现了自动化操作，甚至遥控操作^[17]。这不仅大幅度减小曝光剂量、简化操作培训所需时间而且极大地提高了电镜的使用效率。自 20 世纪 90 年代以来，低温电镜的数据处理越来越离不开高性能的计算机，尤其是复杂单颗粒分析需要高性能的并行计算机^[16,18]，低温电子断层成像术也需要高性能的计算机来提高重构图像的信噪比。

4 生物电镜成像相关的几个基本概念

当入射电子与样品发生相互作用时，由于原子核电势的作用使入射电子的运动方向发生改变，这

种现象称为电子散射；一部分电子未与任何原子发生作用直接穿过样品，称为非散射电子或者透射电子。依据散射是否伴随电子能量损失将其分为弹性散射和非弹性散射。在电镜成像中，非弹性散射把电子能量传递给样品造成样品损伤，而且非弹性散射电子不携带样品的相位信息，这些电子形成照片中低分辨率的背景噪声并且影响图像质量，不过非弹性散射电子可以用能量过滤器滤除。而弹性散射电子“附加”了样品中原子的电势信息，在弱相位近似 (weak-phase-object approximation) 和一定欠焦的条件下，弹性散射电子与非散射电子相干成像，会在投影照片上形成明暗衬度，直接反映样品中原子的电势投影位置和强度，这就是所谓结构像。因为这种衬度来自弹性散射电子携带的相位信息，所以这种图像衬度被称为相位衬度。高分辨率电子显微像的衬度主要来自相位衬度（一般大于 90%），且样品愈薄衬度愈高。另一种成像衬度，则是由于大角度散射电子被电镜物镜光阑吸收而形成的明暗变化，称为振幅衬度。重原子对电子的散射角度大，轻原子则较小，样品厚度的变化通常会表现为振幅衬度的变化，尤其在低分辨图像中，图像衬度主要来自振幅衬度。

电子在经过样品过程中，电子与多个原子发生相互作用，称为多重散射。多重散射的电子不再直接反映样品中原子的投影位置并且会影响图像的质量，因此要尽量避免。由于生物样品主要由轻元素（如 H、C、O、N）构成，其原子量比较小，通常只有样品厚度比较大时才容易发生多重散射。多重散射还与电子的加速电压有关，加速电压低时多重散射的概率更高。在一定加速电压条件下，从物理统计意义来说，只发生一次散射的最大样品厚度，称为弹性散射平均自由行程 (Mean-Free-Path)。例如，120 kV 加速电压时生物样品的平均自由行程大约 200 nm 左右，200 kV 时为 250 nm 左右，300 kV 时为 350 nm 左右^[19,20]。因此，样品制作时越薄越好，或者选择更高加速电压的电镜。此外，电子与生物样品作用过程中，尤其是非弹性散射情况下，还会发生样品化学键的破坏和样品的加热现象，通常称为辐照损伤。辐照损伤与电子的加速电压、样品的温度和元素原子序数有关，提高电子加速电压和降低样品温度可以减小辐照损伤。

电镜图像的质量还与入射电子束的相干性有关，包括时间相干性（电子能量分布范围，即单色性）和空间相干性（光源的尺寸）。场发射电镜电

子束的相干性和亮度远高于普通热发射枪（钨灯丝和 LaB6 灯丝）电镜，被誉为电子激光，它所形成的电子显微像在高低分辨率区域信号失真都很小，因而是目前高分辨率电镜的必要配置。

5 生物三维电镜应用领域

5.1 电子晶体学（electron crystallography）

电子晶体学的主要研究对象是生物大分子的二维晶体和螺旋晶体^[24]。二维晶体是生物大分子在二

维平面上的规则排列，而螺旋晶体可以看作是二维晶体形成纤维或管状对称排列的一种特殊形式。

二维晶体的傅立叶变换在倒易空间中表现为一系列的衍射点，晶体的结构信息就存在于这些衍射点中。将衍射点中的振幅和相位信息取出，对此进行反傅立叶变换就获得了晶体的结构电子密度图（图 5）。而螺旋晶体的傅立叶变换则是一系列的衍射层线，同样的，根据这些衍射层线的振幅和相位信息可以得到螺旋晶体的结构。

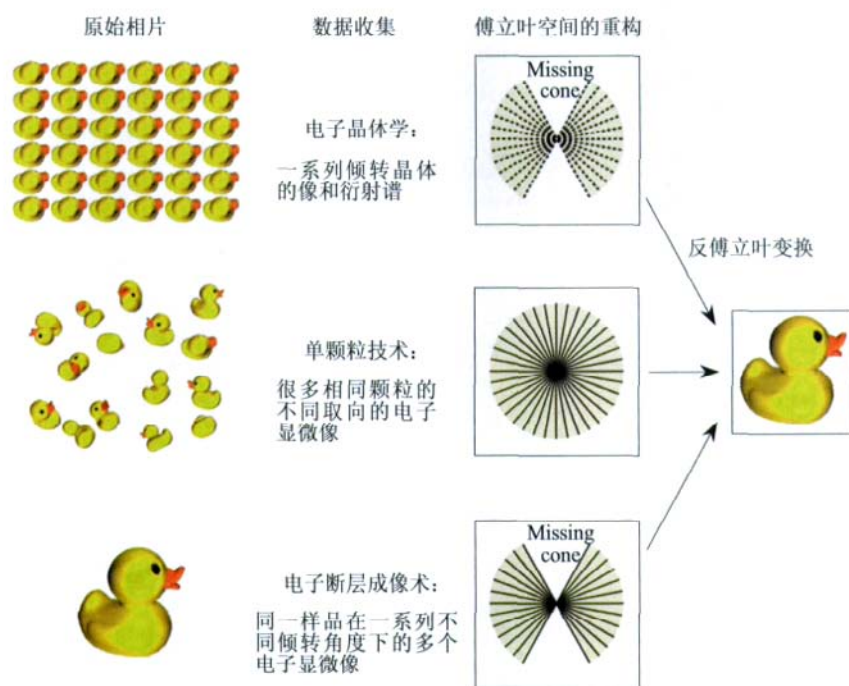


图 5 电子显微学方法中三种研究对象和三维重构方法。Missing cone（缺失锥），是指由于样品倾转角度范围的限制，使得倒易空间中有一个锥形区域的信息丢失

电子晶体学是电子显微学中获得原子分辨率结构的有效方法，目前蛋白质二维晶体结构解析最高分辨率已达到 $1.9\text{\AA}$ ^[22]（图 6）。自从 DeRosier 和 Klug 于 1968 年第一次用该技术重构出了 T4 噬菌体尾部的三维空间结构以来^[9]，已有若干个膜蛋白的原子分辨率的结构通过电子晶体学方法确定下来，如细菌视紫红质（bacteriorhodopsin）^[23]、植物捕光复合体（plant light-harvesting complex）^[24]和水通道蛋白（aquaporin）^[25]等。目前电子晶体学研究的关键步骤在于得到有序度很好的二维晶体或管状晶体。有一些膜蛋白，它们在天然的膜环境中就以二维晶体的形式存在，比如细菌视紫红质等。但对于大部分的膜蛋白和水溶性蛋白，需要

表达纯化，在体外实现二维结晶。对于膜蛋白最常用的方法是将蛋白重组到脂双层中形成二维晶体^[25]；而对于水溶性蛋白，最常用的是在脂单层膜上实现蛋白的二维有序组装^[26]。有一些蛋白并不形成这种片层状的二维晶体，而是形成螺旋对称的管状晶体，如肌质网钙 ATP 酶、乙酰胆碱受体等。另有一些蛋白在体内就以螺旋对称的纤维形式存在，如肌动蛋白，以及一些病毒粒子（如烟草花叶病毒）。这类呈螺旋对称的结构的优势在于一张照片中包含了各个角度的蛋白像，因此不需要倾转样品，在数据收集上相对简单；而缺点就是含有的晶胞数比较少，信噪比低，分辨率没有典型的二维晶体高，至今最高分辨率的结构是乙酰胆碱受体

4.6 Å 分辨率的结构^[27]。

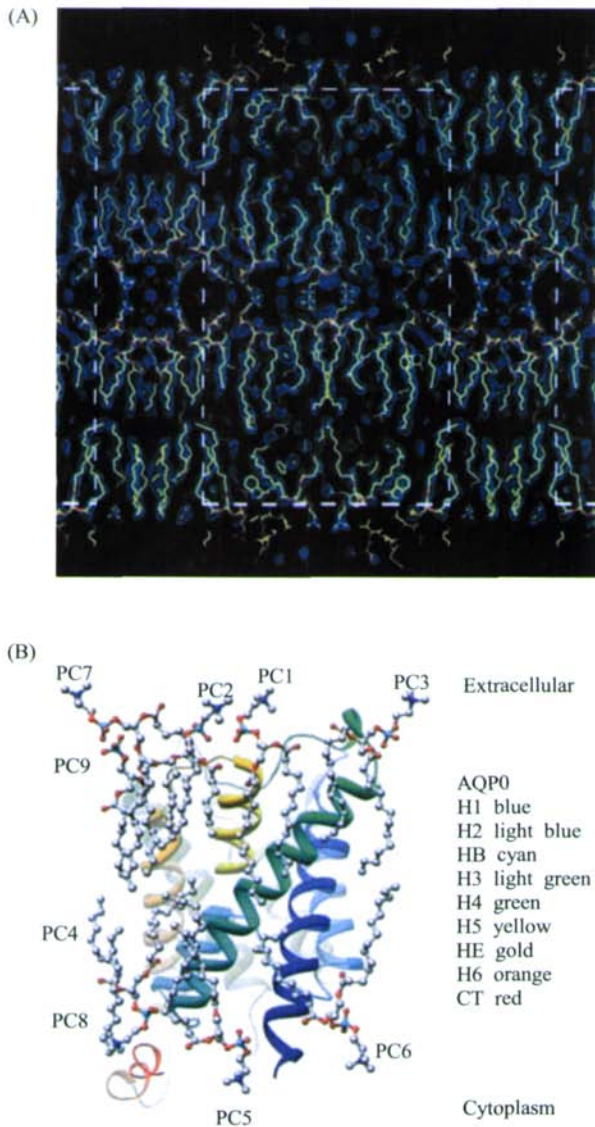


图6 分辨率为1.9 Å的AQP0二维晶体结构。(A) 二维晶体的垂直剖面图,展示了二层的AQP0二维晶体和结合在其中的两层磷脂双层膜。(B) 在二维晶体中环绕在AQP0单体周围的9个磷脂分子(PC1-9)。(该图引用自Gonen T等人, Nature 2005;438(7068):633-863^[22])

过去认为电子晶体学的优势在于一些难以三维结晶化的膜蛋白相对容易得到二维晶体,但事实上膜蛋白的二维结晶至今仍然是一个非常困难的工作。然而电子晶体学一个不可比拟的优势在于通过这种方法得到的是膜蛋白或膜相关的水溶性蛋白在膜环境中的结构信息,和X射线晶体学解析的结构相比更能反映生理状态下的真实构象。

5.2 单颗粒分析技术(single particle analysis)

单颗粒分析技术是对分离的、非有序排列、但是全同的颗粒进行结构解析^[28-30]。颗粒可以具有某

种对称性,如二十面体的病毒,也可以是不具有任何对称性的蛋白质分子或复合体,如核糖体。其采用的基本原理是通过对相同的生物大分子某一方向上的投影显微像在实空间中经过调整后进行叠加平均,从而提高信噪比,使粒子中共同部分的结构信息得到加强,最后对各种不同投影方向的单颗粒显微像在三维空间中进行重构,从而获得单颗粒大分子的三维结构信息(图5)。由于它处理的是同一大分子随机散布的电镜照片,所以没有形成晶体的要求,这是单颗粒分析技术的最大优点。从对准(alignment)的准确度考虑,单颗粒方法研究的粒子的最小分子量为100 kD^[31],没有质量上限,而且分子越大,结果越好。事实上,单颗粒技术在核糖体等用传统技术不易研究的大分子复合体结构研究中作用尤为突出^[32]。

目前已发表的对无序冰包埋的蛋白质样品进行单颗粒结构解析最好的分辨率已经达到6 Å^[16],得到的三维结构模型中已经可以清晰地辨认出α螺旋和β折叠等二级结构,但是这需要积累大量的数据(超过50万个颗粒不对称单元的图像)。二十面体病毒三维重构技术是单颗粒技术的一种特殊形式^[28]。高度对称的病毒颗粒是一种理想的单颗粒研究对象,一个颗粒就包含了全同的亚基在若干个已知方向上的投影信息,因此病毒颗粒的重构相比于没有对称性或对称性很低的蛋白质颗粒来说分辨率要高一些^[33-37],目前达到了3.8 Å的分辨率(个人通信),已经可以辨认出较大的氨基酸侧链。

限制单颗粒技术分辨率提高的主要因素之一是样品的均一性。因为单颗粒技术的基础是假设所有的分子都是全同的,只是投影方向具有不同。而在实际的生物样品中普遍具有一定的结构柔性。所以只有数据量足够大,才能保证结构的有效性。另一个主要因素是计算颗粒的投影方向和颗粒对准时存在的误差。随着电子显微镜技术的进展,尤其是自动数据收集技术的发展,海量数据收集的速度将会大大提高。同时新的分类和颗粒取向定位方法的出现,必将使单颗粒技术解析生物大分子结构的分辨率得到提高。

单颗粒技术目前在结构生物学研究中得到了非常广泛的应用并取得了巨大的成功。例如它可以解析生物大分子在不同功能状态时的结构,比如结合底物前后结构的变化,这对于揭示蛋白质或复合体发挥功能过程中的结构变化和作用机理都有着重要作用。它在方法学上的这一独特优势为揭示生物学

规律提供了很多重要信息。单颗粒技术的一个成功应用就是解析了 DNA 从转录到翻译成蛋白质过程中的一系列复合体的结构, 包括 RNA 聚合酶 / 转录因子复合体 (RNA polymerase/transcription factor complex) [39]、剪接体 (spliceosome) [39] 和核糖体 (ribosome) [40,41] 等, 其中核糖体的结构研究最为深入。Frank 等人经过 20 多年的努力, 得到了一系列的核糖体三维结构模型, 在这些模型中可以清楚地分辨出各 RNA、蛋白质组分和它们之间的连接关系, 以及核糖体与其他相关蛋白质的联系等 (图 7)。

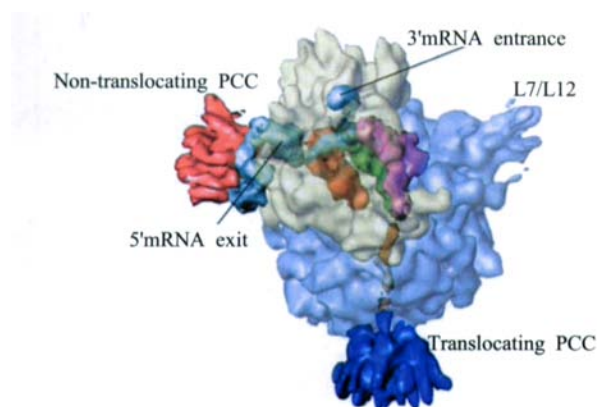


图 7 由冷冻电镜单颗粒三维重构得到的核糖体 - 新生肽链-SecYEG 多元复合体的结构。图中展示出了核糖体小亚基 (30S, 黄色)、大亚基 (50S, 浅蓝色) 和 A-、P- 和 E-site tRNA (分别为紫色、绿色和桔黄色)。转运和非转运的肽链传输孔道 (PCC) 分别用深蓝色和红色标出。(该图引用自 Mitra K 等人, Nature 2005;438(7066):318~324[41])

虽然目前单颗粒结构解析对于大多数样品都不可能达到原子分辨率的水平, 但是如果能够把低分辨率的电子显微学重构的结构和通过 X 射线晶体学和核磁共振技术得到的蛋白质亚基的高分辨率结构结合起来, 就有可能得到高分辨率的复合体的结构[42]。基于这个思想, 人们已经发展了多种算法, 把已知的原子分辨率的结构拟合到电子显微学得到的电子密度图中, 我们将这个技术叫做锚定 (docking)。在目前研究蛋白复合体的结构中, 锚定技术已经广泛应用。比如将微管蛋白的原子分辨率的结构锚定到从电子显微学中得到的低分辨率的微管结构中, 就得到了整个微管的高分辨率结构[43]。冷冻电镜单颗粒三维重构以及晶体结构锚定的基本流程请参考图 8。

5.3 电子断层成像术 (electron tomography)

电子断层成像术主要用于研究那些单一结构, 比如细胞或细胞器, 以及一些巨大的超分子复合体[44]。这些体系的特点是粒子本身并不具有全同性, 不可能采取单颗粒研究中的平均方法来提高信噪比, 所以这种方法的分辨率还不高, 目前达到 40~50 Å [45,46]。它的主要策略是对同一个粒子每隔一定的角度间隔拍一次照, 这样就得到了几十张代表同一结构在不同角度投影的像片, 然后在对这一系列的投影对正后, 用加权背投影的方法得到原来粒子的结构 (图 5)。这个方法本身有一对矛盾: 一方面为了保证信息的完备, 需要样品在较大的倾转角度范围内以较小的增加步长拍照, 这就不可避免

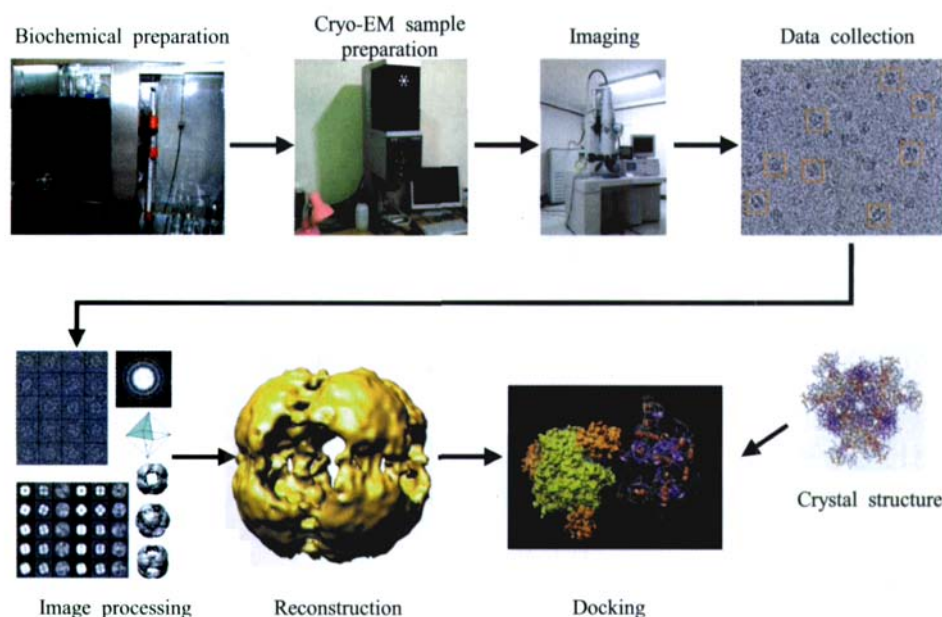


图 8 冷冻电镜单颗粒三维重构以及晶体结构锚定的基本流程示意图。(该图数据根据作者实验室尚未发表结果)

地要使用较大的电子辐照剂量；而另一方面，为了保证图像反映真实结构，需要样品承受尽可能少的电子辐照。这对矛盾只有在现在自动控制的电子显微镜和自动数据采集系统的运用后才得到了比较好的解决^[47]。电子断层成像术的主要优势在于解决不具备周期性或全同性的生物大分子复合体系或细胞器的结构研究问题，如线粒体^[48]、高尔基体^[49]、细胞^[45,46]等，这些不具全同性的粒子结构是无法用其他方法解析的。而冰冻技术在电子断层成像术上的应用，使得人们可以直接看到整个细胞内的结构和动态变化，从而可以用于研究亚细胞量级的生物学

过程。比如 Bohm 等人^[50]对 T5 噬菌体是如何将 DNA 释放到宿主细胞中的过程进行了研究，他们对体外重组的噬菌体-脂质体系统进行了冰冻电子断层成像和结构分析，揭示了噬菌体尾部和膜上受体结合后的结构变化和一些结构细节。最近 Medalia 等人^[45]用电子断层成像术重构了网柄菌细胞 (*Dictyostelium cell*) 的胞质结构，从中可以清楚地看到以肌动蛋白为主的细胞骨架系统，与细胞膜以及胞质里的一些大分子的空间连接关系 (图 9)。

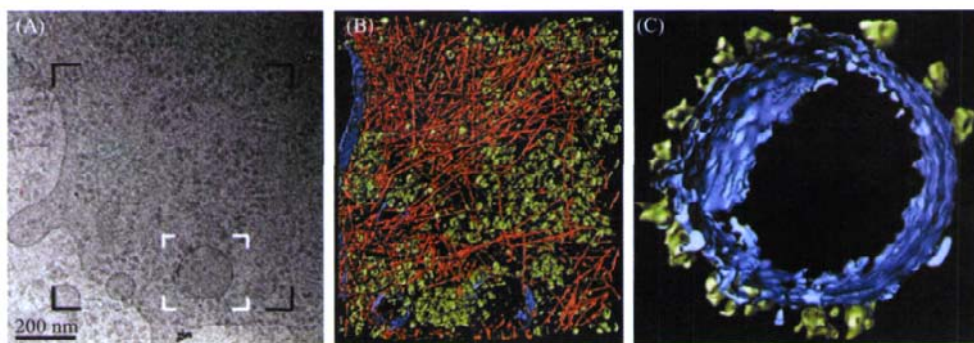


图9 网柄菌细胞的电子断层成像结构解析。(A) 网柄菌细胞的冷冻电镜透射照片。(B) 网柄菌细胞内肌动蛋白细胞骨架的在 55 Å 分辨率下的结构模型，图像尺寸为 815 nm×870 nm×97 nm。(C) 结合了核糖体的内质网的结构。图中红色的表示肌动蛋白纤维，蓝色的表示磷脂膜，绿色的表示核糖体。(该图修改自 Medalia O 等人, Science, 2002, 298(5596):1209~1213^[45])

6 展 望

生物物理学当前面临的新挑战既有理论问题也有技术方法问题。目前的研究表明，组成生命系统的生物大分子完全遵守已知的物理、化学规律。但是，生物体系具有一个在物理、化学中看不到的特征，那就是“功能”。生物物理学家最终需要回答的问题是，组成生物系统的每一个生物大分子的物化性质是怎么导致它们集合到一起具有了生理功能并进而产生了生命活动？要回答这个问题，人们就必须把分子水平的结构和功能与细胞水平的生命活动衔接起来，构筑“细胞地图”。

近半个世纪以来，X 射线晶体学作为一种强大的工具解析了数以万计的蛋白质原子分辨率结构，其成就不可磨灭。但是，人们对于在细胞水平上的生物大分子结构及相互作用仍所知甚少。生物电子显微学虽然分辨率相对较低，但是它的研究对象从单个蛋白质分子一直扩展到整个细胞，它的这种独

特的优势，正好在分子结构与细胞结构之间架起一座连通的桥梁。一方面，电子断层成像技术目前可得到分辨率约 40 Å 的细胞或细胞器的结构，在今后 5 年有望达到 20 Å。结合已有的利用 X-射线晶体学、NMR 以及电镜三维重构获得的蛋白质分子及复合体的结构，通过模式识别技术可以将这些高分辨的结构锚定到低分辨的电子断层成像图中，从而获得在细胞水平上的蛋白质相互作用的原子分辨率信息。

时至今日，数以万计的蛋白质的原子分辨的空间结构的数据库已经建立，而且进入数据库的蛋白质的数目与日俱增，这为对更高更复杂的结构体系的构筑提供了必要的“原料”来源。另一方面，单颗粒技术解析蛋白质分子或复合体的分辨率日益提高，已经有不少达到 7~8 Å 分辨率的例子，也就是可以解析出蛋白质的二级结构。在高分辨单颗粒结构解析中，具有二十面体对称性的病毒颗粒的解析分辨率发展最快，已经达到 3.8 Å 的分辨率。在今

后的发展中,单颗粒结构解析的分辨率将进一步逼近原子分辨率。低温电子显微学已经成为结构生物学中不可或缺的一部分,特别是对于解析分子量很大的蛋白质或复合体的高分辨结构,是目前最为有效的一种技术手段。

虽然目前用电子显微学进行结构解析需要较长的周期,但是随着技术方法的日益成熟,一旦一些操作流程标准化后这一周期将大大缩短。此外,由于自动化技术与电子显微学的紧密结合,最近几年电子显微镜自动数据收集和分析技术的研究取得了许多进展。电子显微学有着充分的潜力在不远的将来能够进行高通量的结构解析。可以预计,在分子水平上构筑“细胞地图”将是未来20年人类为了探索生命的奥秘而必将进行的最伟大的长征之一。

致谢:江健森和白晓辰参与本文的整理。本文部分内容参考《电子显微学在结构生物学研究中的新进展》(王大能,陈勇,隋森芳,电子显微学报2003);《生物低温电子显微学大型设备》(Wanzhong He,内部资料2006)。

参考文献:

- [1] Taylor KA, Glaeser RM. Electron diffraction of frozen, hydrated protein crystals. *Science*, 1974,186(4168):1036-1037
- [2] Dubochet J, Adrian M, Chang JJ, Homo JC, Lepault J, McDowell AW, Schultz P. Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Q Rev Biophys*, 1988,21(2):129-228
- [3] Berriman J, Unwin N. Analysis of transient structures by cryo-microscopy combined with rapid mixing of spray droplets. *Ultramicroscopy*, 1994,56(4):241-252
- [4] Claude A. Fractionation of mammalian liver cells by differential centrifugation: I. Problems, methods and preparation of extract. *J Exp Med*, 1946,84(1):51-59
- [5] DeRosier DJ, Klug A. Reconstruction of three dimensional structures from electron micrographs. *Nature*, 1968,217(5124):130-134
- [6] Tokuyasu KT. A technique for ultracyotomy of cell suspensions and tissues. *J Cell Biol*, 1973,57(2):551-565
- [7] Liou W, Geuze HJ, Slot JW. Improving structural integrity of cryosections for immunogold labeling. *Histochem Cell Biol*, 1996,106(1):41-58
- [8] Hirokawa N, Heuser JE. Quick-freeze, deep-etch visualization of the cytoskeleton beneath surface differentiations of intestinal epithelial cells. *J Cell Biol*, 1981,91(2 Pt 1):399-409
- [9] Dahl R, Staehelin LA. High-pressure freezing for the preservation of biological structure: theory and practice. *J Electron Microsc Tech*, 1989,13(3):165-174
- [10] Richter K, Gnagi H, Dubochet J. A model for cryosectioning based on the morphology of vitrified ultrathin sections. *J Microsc*, 1991,163(Pt 1):19-28
- [11] Radon J. Über die bestimmung von funktionen durch ihre integralwerte langs gewisser mannigfaltigkeiten. *Ber Ver Sachs Akad Wiss Leipzig Math-Phys Kl*, 1917,69:262-277
- [12] Hayat MA, Miller SE. *Negative Staining*. New York: McGraw-Hill, 1990
- [13] Glaeser RM. Limitations to significant information in biological electron microscopy as a result of radiation damage. *J Ultrastruct Res*, 1971,36(3):466-482
- [14] 王大能, 陈勇, 隋森芳. 电子显微学在结构生物学研究中的新进展. *电子显微学报*, 2003,22(5):449-456
- [15] Fujiyoshi Y, Mizusaki T, Morikawa K, Yamagishi H, Aoki Y, Kihara H, Harada Y. Development of a superfluid helium stage for high-resolution electron microscopy. *Ultramicroscopy*, 1991,38:241-251
- [16] Booth CR, Jiang W, Baker ML, Zhou ZH, Ludtke SJ, Chiu W. A 9 angstroms single particle reconstruction from CCD captured images on a 200 kV electron cryomicroscope. *J Struct Biol*, 2004,147(2):116-127
- [17] Carragher B, Kisseberth N, Kriegman D, Milligan RA, Potter CS, Pulokas J, Reilein A. Leginon: an automated system for acquisition of images from vitreous ice specimens. *J Struct Biol*, 2000,132(1):33-45
- [18] Frank J, Radermacher M, Penczek P, Zhu J, Li Y, Ladjadi M, Leith A. SPIDER and WEB: processing and visualization of images in 3D electron microscopy and related fields. *J Struct Biol*, 1996,116(1):190-199
- [19] Grimm R, Typke D, Barmann M, Baumeister W. Determination of the inelastic mean free path in ice by examination of tilted vesicles and automated most probable loss imaging. *Ultramicroscopy*, 1996,63(3-4):169-179
- [20] Grimm R, Singh H, Rachel R, Typke D, Zillig W, Baumeister W. Electron tomography of ice-embedded prokaryotic cells. *Biophys J*, 1998,74(2 Pt 1):1031-1042
- [21] Walz T, Grigorieff N. Electron crystallography of two-dimensional crystals of membrane proteins. *J Struct Biol*, 1998,121(2):142-161
- [22] Gonen T, Cheng Y, Sliz P, Hiroaki Y, Fujiyoshi Y, Harrison SC, Walz T. Lipid-protein interactions in double-layered two-dimensional AQP0 crystals. *Nature*, 2005,438 (7068): 633-638
- [23] Mitsuoka K, Hirai T, Murata K, Miyazawa A, Kidera A, Kimura Y, Fujiyoshi Y. The structure of bacteriorhodopsin at 3.0 Å resolution based on electron crystallography: implication of the charge distribution. *J Mol Biol*, 1999,286 (3): 861-882
- [24] Kuhlbrandt W, Wang DN, Fujiyoshi Y. Atomic model of plant light-harvesting complex by electron crystallography. *Nature*, 1994,367(6464):614-621
- [25] Mosser G. Two-dimensional crystallography of transmembrane proteins. *Micron*, 2001,32(5):517-540

- [26] Chiu W, Avila-Sakar AJ, Schmid MF. Electron crystallography of macromolecular periodic arrays on phospholipid monolayers. *Adv Biophys*, 1997,34:161-172
- [27] Miyazawa A, Fujiyoshi Y, Stowell M, Unwin N. Nicotinic acetylcholine receptor at 4.6 Å resolution: transverse tunnels in the channel wall. *J Mol Biol*, 1999,288(4):765-786
- [28] Chiu W, Baker ML, Jiang W, Zhou ZH. Deriving folds of macromolecular complexes through electron cryomicroscopy and bioinformatics approaches. *Curr Opin Struct Biol*, 2002,12(2):263-269
- [29] van Heel M, Gowen B, Matadeen R, Orlova EV, Finn R, Pape T, Cohen D, Stark H, Schmidt R, Schatz M, Patwardhan A. Single-particle electron cryo-microscopy: towards atomic resolution. *Q Rev Biophys*, 2000,33(4):307-369
- [30] Frank J. Three-dimensional electron microscopy of macromolecular assemblies. New York: Oxford University Press, 2006
- [31] Henderson R. The potential and limitations of neutrons, electrons and X-rays for atomic resolution microscopy of unstained biological molecules. *Q Rev Biophys*, 1995,28 (2): 171-193
- [32] Frank J. Cryo-electron microscopy as an investigative tool: the ribosome as an example. *Bioessays*, 2001,23(8):725-732
- [33] Zhou ZH, Baker ML, Jiang W, Dougherty M, Jakana J, Dong G, Lu G, Chiu W. Electron cryomicroscopy and bioinformatics suggest protein fold models for rice dwarf virus. *Nat Struct Biol*, 2001,8(10):868-873
- [34] Zhou ZH, Dougherty M, Jakana J, He J, Rixon FJ, Chiu W. Seeing the herpesvirus capsid at 8.5 Å. *Science*, 2000, 288(5467):877-880
- [35] Bottcher B, Wynne SA, Crowther RA. Determination of the fold of the core protein of hepatitis B virus by electron cryomicroscopy. *Nature*, 1997,386(6620):88-91
- [36] Conway JF, Cheng N, Zlotnick A, Wingfield PT, Stahl SJ, Steven AC. Visualization of a 4-helix bundle in the hepatitis B virus capsid by cryo-electron microscopy. *Nature*, 1997, 386(6620):91-94
- [37] Tao Y, Olson NH, Xu W, Anderson DL, Rossmann MG, Baker TS. Assembly of a tailed bacterial virus and its genome release studied in three dimensions. *Cell*, 1998, 95(3):431-437
- [38] Chung WH, Craighead JL, Chang WH, Ezeokonkwo C, Bareket-Samish A, Kornberg RD, Asturias FJ. RNA polymerase II/TFIIF structure and conserved organization of the initiation complex. *Mol Cell*, 2003,12(4):1003-1013
- [39] Stark H, Dube P, Luhrmann R, Kastner B. Arrangement of RNA and proteins in the spliceosomal U1 small nuclear ribonucleoprotein particle. *Nature*, 2001,409(6819):539-542
- [40] Gabashvili IS, Agrawal RK, Spahn CM, Grassucci RA, Svergun DI, Frank J, Penczek P. Solution structure of the E. coli 70S ribosome at 11.5 Å resolution. *Cell*, 2000,100(5):537-549
- [41] Mitra K, Schaffitzel C, Shaikh T, Tama F, Jenni S, Brooks CL, 3rd, Ban N, Frank J. Structure of the E. coli protein-conducting channel bound to a translating ribosome. *Nature*, 2005,438(7066):318-324
- [42] Rossmann MG, Bernal R, Pletnev SV. Combining electron microscopic with x-ray crystallographic structures. *J Struct Biol*, 2001,136(3):190-200
- [43] Li H, DeRosier DJ, Nicholson WV, Nogales E, Downing KH. Microtubule structure at 8 Å resolution. *Structure*, 2002,10(10):1317-1328
- [44] Baumeister W. Electron tomography: towards visualizing the molecular organization of the cytoplasm. *Curr Opin Struct Biol*, 2002,12(5):679-684
- [45] Medalia O, Weber I, Frangakis AS, Nicastro D, Gerisch G, Baumeister W. Macromolecular architecture in eukaryotic cells visualized by cryoelectron tomography. *Science*, 2002,298(5596):1209-1213
- [46] Frangakis AS, Bohm J, Forster F, Nickell S, Nicastro D, Typke D, Hegerl R, Baumeister W. Identification of macromolecular complexes in cryoelectron tomograms of phantom cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002,99(22):14153-14158
- [47] Baumeister W, Grimm R, Walz J. Electron tomography of molecules and cells. *Trends Cell Biol*, 1999,9(2):81-85
- [48] Nicastro D, Frangakis AS, Typke D, Baumeister W. Cryo-electron tomography of neurospora mitochondria. *J Struct Biol*, 2000,129(1):48-56
- [49] Marsh BJ, Mastronarde DN, Buttle KF, Howell KE, McIntosh JR. Organellar relationships in the Golgi region of the pancreatic beta cell line, HIT-T15, visualized by high resolution electron tomography. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(5):2399-2406
- [50] Bohm J, Lambert O, Frangakis AS, Letellier L, Baumeister W, Rigaud JL. FhuA-mediated phage genome transfer into liposomes: a cryo-electron tomography study. *Curr Biol*, 2001,11(15):1168-1175

THREE-DIMENSIONAL ELECTRON MICROSCOPY IN BIOLOGY ENTERS A PERIOD OF RAPID DEVELOPMENT AND WIDESPREAD APPLICATIONS

SUI Sen-fang

(Department of Biological Sciences and Biotechnology, State-Key Laboratory of Biomembrane and Membrane Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: Three-dimensional biological electron microscopy includes three major aspects: electron crystallography, single particle analysis and electron tomography. The size range of the objects resolved by electron microscopy falls between X-ray crystallography and light microscopy, which covers anything from the structures of protein molecules to the structures of cells and tissues. Cryo-electron microscopy, based upon a combination of cryo-techniques and three dimensional reconstruction methods, represents the frontier of current biological electron microscopy. Using the cryo-single particle technique, the resolution of a virus structure having high symmetry has recently reached to 3.8 Å, indicating this technique is becoming effective in solving structures to high resolution, particularly those of large protein complexes. Using cryo-electron tomography, the resolution of eukaryotic cells has reached to around 40 Å and, with confidence, is expected to approach to 20 Å in 5 years. Thus, by docking the high-resolution component structures obtained from X-ray, NMR and cryo-electron crystallography into the low resolution images obtained by cryo-electron tomography, we can gain high positional accuracy of the components in cells and therefore reach to atomic resolution for subcellular structures. This will become a practical approach to build a link between the component structures at molecular level and the biological functions at the cell level.

Key Words: Three-dimensional electron microscopy; Cryo-electron microscopy; Electron crystallography; Single particle analysis; Electron tomography

This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China (30330160)

Received: July 29, 2007

Corresponding author: SUI Sen-fang, Tel : +86(10)62784768 , E-mail : suisf@mail.tsinghua.edu.cn

(下转第 295 页)

TWO SUBJECTS IN THE FIELD OF GENOME RESEARCH
——NONCODING SEQUENCE AND BIOLOGICAL NETWORK

CHEN Run-sheng

(Institute of Biophysics , The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract : This article summarized two subjects in the field of genome research which is progressing quickly, one is about noncoding sequences, especially noncoding RNAs and their genes, and another is about bio-networks and systems biology. The impact of the progressing in these two subjects upon bioinformatics was also discussed.

Key Words : Noncoding sequence ; Noncoding gene ; Noncoding RNA ; Biological network

Received: Aug 6, 2007
Corresponding author: CHEN Run-sheng, Tel : +86(10)64888543 , E-mail : crs@ibp.ac.cn

(上接第 239 页)

附录：电子显微学常用图像处理软件列表

软件分类	软件名称	下载或联系地址	授权类型
单颗粒技术	Spider/Web	http://www.wadsworth.org/spider_doc/spider/docs/master.html	免费
	EMAN	http://blake.bcm.edu/EMAN/	免费
	Frealign	http://emlab.rose2.brandeis.edu/grigorieff/downloads.html	免费
	IMAGIC	http://www.imagescience.de/	商业
	Bsoft	http://www.niams.nih.gov/rcn/labbranch/labr/software/bsoft/	免费
	EMStudio	http://emlab.rose2.brandeis.edu/grigorieff/downloads/EMStudio/index.html	开发中
	SPARX	http://macro-em.org/sparxwiki/SparxWiki	免费
二维晶体	2dx	http://2dx.org/	免费
	MRC	http://www2.mrc-lmb.cam.ac.uk/image2000.html	免费
	Iplt	http://www.iplt.org/wiki	免费
螺旋晶体	Phoelix	http://nramm.scripps.edu/software/phoelix/	免费
	Ruby-Helix	http://cryoem.swmed.edu/	免费
	BrandeisHelical-Package	http://www.rose.brandeis.edu/users/derosier/BHP/brandeis-helical-package/	免费
病毒	AUTO3DEM	http://cryoem.ucsd.edu/programs.shtm	免费
	IMIRS	http://hub.med.uth.tmc.edu/~hong/IMIRS/	免费
电子断层成像	IMOD	http://bio3d.colorado.edu/imod/	免费
	protomo	http://www.electrontomography.org/	免费
	TOM	http://wwwex.biochem.mpg.de/tom/	免费
	UCSF Tomography	http://www.msg.ucsf.edu/em/EMNEW2/tomography_page.html	免费
	EM3D	http://em3d.stanford.edu/index.html	免费
	SerialEM	http://bio3d.colorado.edu/SerialEM/	免费