

A number of toxicological and epidemiological studies have been conducted to study the health effects of UFPs. However, the evidences from these studies are not consistent, the hypothesis about the potent health effects of UFPs has not been proved. Further studies are required to reveal the deposition, translocation, and accumulation of UFPs in human body, to overcome the technological challenges in obtaining highly temporal and spatial resolution of exposure, as well as chemical composition of UFPs, and to carry out well designed short term and long term epidemiological studies.

2.12 冷冻电子显微学研究与应用进展

王宏伟 隋森芳

(清华大学生命科学学院)

一、冷冻电子显微学概述

冷冻电子显微学是现代生物学研究中的一种重要技术方法。该技术利用高分辨率透射电子显微镜对迅速冷却于超低温下的生物大分子及其组成的细胞器、细胞等生命单元进行观察,并揭示这些生命单元的高分辨率结构信息。近年来,随着硬件设备及软件算法上取得的长足进展,冷冻电子显微学的结构解析的分辨率显著提高,在生命科学诸多领域中取得越来越广泛的应用,正在成为结构生物学研究的有力手段。在过去的短短两年里(2013~2014年),应用冷冻电子显微学技术解析的近原子分辨率结构增加了3倍之多(图1)。越来越多的结构生物学家开始应用冷冻电子显微学技术作为他们进行生物大分子结构解析工作的主要研究手段。

冷冻电子显微学获得青睐的原因主要在于该技术的一些独特优点:①生物大分子在水溶液环境下被快速冻结,使天然结构最大限度地得以保留,所获得的结构接近于其生理状态;②快速冷冻过程具有较高的时间分辨率(<毫秒),故可用于生物大分子的动态过程研究;③样品需求量少,而且可以对不均一状态的样品进行结构分析;④电子显微学的分辨率解析范围(0.2~10纳米)介于X射线晶体学与光学显微镜之间,适合从蛋白质分子到细胞和组织结构的解析,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。在冷冻电子显微学结构解析的具体实践中,依据不同

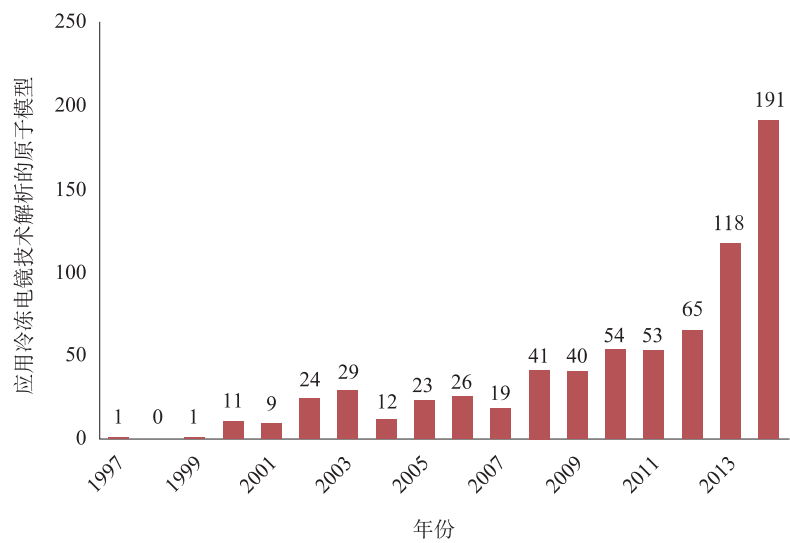


图1 1997~2014 年，应用冷冻电子显微学技术所解析的原子模型变化趋势

生物样品的性质及特点，可以采取不同的显微镜成像及三维重构方法。目前主要使用的几种冷冻电子显微学结构解析方法包括电子晶体学、单颗粒重构技术、电子断层扫描重构技术等，可分别针对不同的生物大分子复合体及亚细胞结构进行解析（表 1）。

表 1 不同冷冻电子显微学技术的目前应用情况

冷冻电子显微学 技术名称	适合样品	分子量范围	目前最高 分辨率/埃
电子晶体学	高度有序的一维、二维及三维晶体	10 千道尔顿~500 千道尔顿	1.9
单颗粒重构	提纯的溶液状态的生物大分子及其复合物	80 千道尔顿~50 兆道尔顿	2.7
电子断层扫描成像技术	细胞、细胞器、超大分子复合体等	1 兆道尔顿以上	8.9

二、冷冻电子显微学国际发展现状

冷冻电子显微学作为结构生物学与细胞生物学的研究手段，其目前的国际发展状况如下。

1. 研究对象更加多样化

冷冻电子显微学在分子水平上的研究对象更加广泛，越来越多地包括无对称性的、分子量较低的、柔性较大的生物大分子及其复合体。至今，对分子量在 300 千道尔顿以上的生物大分子复合体，冷冻电子显微学单颗粒技术几乎都可以进行高分辨率

结构解析。最近的一些工作报道了分子量在 200 千道尔顿以下的蛋白质分子的冷冻电镜结构。其中,清华大学的施一公研究组与英国医学研究委员会(Medical Research Council, MRC)的余瑞斯(Sjors Scheres)研究组合作,获得了 γ -分泌酶复合物的 4.5 埃分辨率结构,解析了该酶复合物中 170 千道尔顿的蛋白质部分,取得了新的突破^[1]。在细胞水平,随着冷冻样品制备技术的进步,细胞、亚细胞结构的高分辨率解析正在迅速发展,冷冻电子显微学技术作为膜蛋白及其复合体的结构研究手段,越来越受到重视。我国科学家在 2014 年里利用冷冻电镜技术分别解析了 r 分泌酶与 RyR 钙通道等膜蛋白复合物的高分辨率结构,已经在该领域占据制高点。最近的工作已经可以对细胞内的未成熟病毒衣壳蛋白结构解析至亚纳米分辨率^[2]。

2. 结构解析分辨率的大大提高

冷冻电子显微学在近几年里的一个革命性技术突破是高分辨率图像采集设备的开发与应用。基于互补金属氧化物半导体(complementary metal-oxide-semiconductor transistor, CMOS)技术开发的直接探测电子成像的装置(direct electron detection device)使电子显微放大图像的信噪比大大提高,从而提高了成像质量^[3]。这项重要的技术突破导致过去短短的一年里十几个生物大分子复合体的结构解析突破 4 埃的分辨率,从而直接获得原子模型。美国加利福尼亚大学旧金山分校的程亦凡研究组利用该技术对瞬时受体电位香草酸亚型-1(transient receptor potential vanilloid 1, TRPV1)的结构解析达 3.4 埃分辨率,标志着该技术的里程碑式突破^[4]。对病毒及核糖体的冷冻电镜三维结构解析目前已经突破 3 埃^[5],很多更高分辨率的结构不断涌现。

3. 冷冻电子显微学与其他技术的融合

正在发展中的微晶体电子衍射技术将几百纳米大小的生物大分子微晶体置于冷冻电子显微镜内并利用电子衍射技术获得这些微小晶体的衍射图谱从而进行结构解析^[6]。该技术将大大扩展目前蛋白质晶体学可以研究的样品范围,使结构解析效率更高。光学显微镜与电子显微镜的耦联(correlative microscopy)正在成为细胞生物学的一个重要分支手段。通过对细胞样品的荧光显微镜与冷冻电子显微镜的分别观察并将图像相关联,可以使研究者同时获得细胞中荧光标记分子的细胞定位及其细胞定位附近的高分辨率结构信息,甚至可以将细胞中该分子的动态过程与其高分辨率结构信息联系起来,有助于更深入地理解相关生物学过程^[7]。

三、冷冻电子显微学的未来发展与展望

过去几年,在软硬件方面的长足进展解决了冷冻电子显微学很多关键性的技术难

点,使该技术的应用普及成为趋势。在未来几年,冷冻电子显微学技术如果在以下问题上取得进一步突破,将有可能成为结构生物学的主要技术手段。

1. 样品制备技术

样品制备一直是冷冻电子显微学研究的关键步骤。对于生物大分子结构研究来说,需要保证单颗粒分子以合适的密度均匀分布于厚度合适的无序冰中,才有可能获得良好的电子显微数据从而进行结构解析。类似地,对于细胞结构研究来说,需将本身很厚的细胞样品进行减薄处理,才适合冷冻电镜观察。目前,样品制备已经成为冷冻电子显微学结构解析的限速步骤。因此,冷冻电子显微学要成为结构生物学研究的主要应用手段,必须在样品制备这一步骤取得重要的突破。

2. 构象不均一性的分析

冷冻电子显微学单颗粒结构解析技术可以直接获得溶液中的生物大分子结构。但生物大分子尤其是大分子复合体本身的构象柔性亦因此反映在电子显微图像中,这常常是导致三维重构无法获得高分辨率结构的根源。将不同构象的分子分开分析,是提高重构分辨率的重要过程。此外,分子在溶液中的不同构象很可能反映了分子发挥功能的不同结构形态,理解这些构象差异对于解释分子功能的机制非常重要。目前,对生物大分子构象不均一性的分析是冷冻电子显微学结构解析中的技术难点和热点。

3. 电子光学新技术方法在生物样品研究中的应用

材料科学超高分辨率研究在过去十几年里发生了很多重要的技术进步,包括电子显微镜光学系统的不断完善和提高,以及新的成像手段的进步。新的技术(如球差矫正、色差矫正、扫描透射电子显微镜系统等)都在材料科学领域结构分辨率的显著提高中发挥了重要作用。如何应用材料科学领域证明对超高分辨成像卓有成效的新的电子显微学方法来提高生物样品的结构解析分辨率,是摆在所有冷冻电子显微学家面前的新机遇和挑战。

4. 体内结构的研究

自20世纪中期建立以来,结构生物学主要是通过对分离纯化的生物大分子结构进行解析。至今解析出来的多达10万个的生物大分子结构对于我们理解生物学过程的分子机制发挥了重要的作用。但迄今,我们仍无法通过直接观察获得细胞内乃至体内的生物大分子的原子分辨率结构。如何利用冷冻电子显微学尤其是三维断层扫描重构技术对细胞内的特定分子的结构进行重构和统计分析,从而获得它们的高分辨率结

构,是冷冻电子显微学结构研究面临的下一个主要技术问题。如果能实现以上目标,冷冻电子显微学将可能真正填补结构生物学与细胞生物学之间的空隙,使得我们从不同空间与时间尺度上对生物体的理解更加完整。

参考文献

- [1] Lu P, Bai X C, Ma D, et al. Three-dimensional structure of human gamma-secretase. *Nature*, 2014, 512(7513): 166-170.
- [2] Schur F K, Hagen W J, Rumlová M, et al. Structure of the immature HIV-1 capsid in intact virus particles at 8.8 Å resolution. *Nature*, 2015, 517(7535): 505-508.
- [3] Li X, Mooney P, Zheng S, et al. Electron counting and beam-induced motion correction enable near-atomic-resolution single-particle cryo-EM. *Nature Methods*, 2013, 10(6): 584-590.
- [4] Liao M, Cao E, Julius D, et al. Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature*, 2013, 504(7478): 107-112.
- [5] Fischer N, Neumann P, Konevega A L, et al. Structure of the *E. coli* ribosome-EF-Tu complex at <3 Å resolution by Cs-corrected cryo-EM. *Nature*, 2015, 520(7548): 540-567.
- [6] Shi D, Nannenga B L, Iadanza M G, et al. Three-dimensional electron crystallography of protein microcrystals. *eLife*, 2013, 2: e01345.
- [7] Zhang P. Correlative cryo-electron tomography and optical microscopy of cells. *Curr Opin Struct Biol*, 2013, 23(5): 763-770.

Cryo-Electron Microscopy is Becoming the Major Research Tool of Structural Biology

Wang Hongwei, Sui Senfang

Recently, significant technical breakthroughs in both hardware equipment and software algorithms have enabled cryo-electron microscopy (cryo-EM) to become one of the most important techniques in biological structural analysis. The technical aspects of cryo-EM define its unique advantages and the direction of development. As a rapidly emerging field, cryo-EM has benefited from highly interdisciplinary research efforts. Here we review the current status of cryo-EM in the context of structural biology and discuss the technical challenges. It may eventually merge structural biology and cell biology at multiple scales.