

电子显微三维重构技术发展前沿

张 凯¹, 张 艳¹, 胡仲军^{1,2}, 季 刚¹, 孙 飞¹

1. 中国科学院生物物理研究所, 生物大分子国家重点实验室, 北京 100101;

2. 后勤工程学院基础部, 重庆 401311

收稿日期: 2010-04-08; 接受日期: 2010-05-10

基金项目: 科技部 973 “蛋白质机器与机制”(2006BC806506), 蛋白质研究计划“膜蛋白和蛋白质复合体功能与结构研究”(2006CB911001), 中国科学院知识创新工程重大项目“面向蛋白质科学的高性能计算研究”(KGCX1-YW-13), 国家自然科学基金创新群体(30721003)

通讯作者: 孙飞, 电话: (010)64888582, 传真: (010)64888376, E-mail: feisun@ibp.ac.cn

摘要: 本文对电子显微三维重构技术(也称电镜三维重构, electron microscopy 3D reconstruction)进行简要介绍, 并在此基础上对该技术当前研究的发展和前沿进行综述, 包括高分辨率电镜三维重构、仪器设备性能突破、自动化数据收集和处理、高性能计算技术应用、二/三维图像处理技术的发展和基于三维重构图的模型计算等方面, 最后对电子显微三维重构技术的未来进行了展望。

关键词: 电子显微学; 三维重构; 自动化; 高性能计算; 图像处理; 结构建模

中图分类号: Q6-33

0 引言

结构生物学是通过研究生物大分子的结构与运动来阐明生命现象的科学。药物设计、疫苗开发和蛋白质分子性能改造等应用领域都以结构生物学的研究成果为基础。结构生物学的起源可以追溯到上世纪 50 年代 Waston 和 Crick 等发现 DNA 双螺旋结构, 60 年代 Perutz 和 Kendrew 利用 X-射线晶体衍射技术获得肌球蛋白的三维结构, 这些工作开创了结构生物学研究领域。半个多世纪过去了, 随着技术的进步, 结构生物学研究取得了巨大的发展, 在近年来的分子生物学研究中占据了主流地位, 并且逐渐成为生命科学研究的重要组成部分^[1]。

X 射线晶体学、核磁共振波谱学、电子显微三维重构(亦称电镜三维重构)是结构生物学的三大研究手段, 具有不同的优势。核磁共振波谱学可以获得蛋白质在溶液中的三维结构, 能够分析蛋白质的动态变化, 但是研究对象的分子量通常难以超过 20 kD。X 射线晶体学通常可以获得生物大分子原子分辨率的三维结构, 但对于分子量较大、较复杂的生物复合分子体系, 其晶体难以获得, 结构解析难度也较大。当研究对象的尺度越来越大的时候, 电子显微三维重构技术, 特别是低温电子显微三维重构技术, 就显示出其重要的作用, 利用该技术我们可以获得分子量巨大(200 kD 以上)的超分子复合体系的纳米分辨率三维

结构, 弥补晶体学和核磁共振分析技术的不足, 架起从蛋白质、蛋白质复合体、超分子复合体系到亚细胞系统的三维结构研究的桥梁 (图 1)。

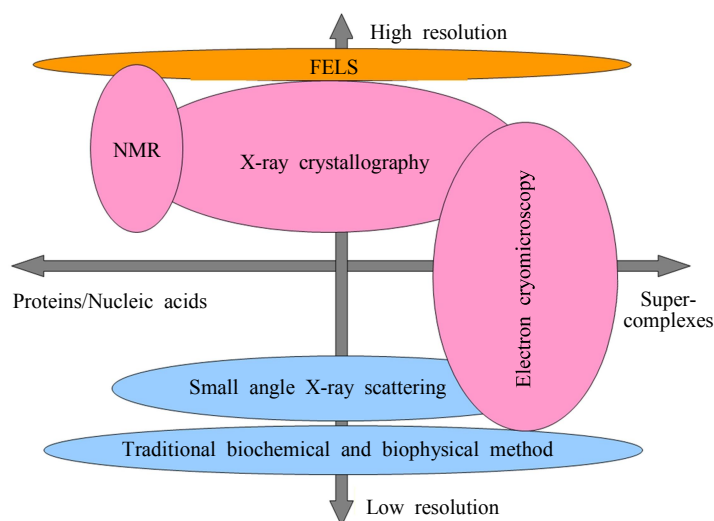


图 1 结构生物学各种研究手段的比较 纵轴表示分辨率 (从下向上, 分辨率逐渐升高), 横轴表示研究尺度 (从左至右, 尺度逐渐增大)。小角散射 (small angle X-ray scattering) 和众多传统生物物理生物化学技术 (traditional biochemical and biophysical method) 能够适于研究各种尺度的生物分子, 但分辨率信息较低; 核磁共振技术 (NMR) 的解析分辨率较高, 但是研究尺度较小; X 射线晶体学 (X-ray Crystallography) 的研究尺度范围较宽, 并能得到较高分辨率的结构 (多数情况下可以得到原子分辨率), 然而其瓶颈是需要结晶; 冷冻电镜技术 (cryo-electron microscopy) 可以获得超大分子复合物的三维结构, 并一般能达到中等分辨率 (纳米级); 自由电子激光散射技术 (free electron laser scattering, FELS) 是目前正在发展的技术, 有望能够在多种尺度上获得生物大分子的接近原子分辨率的三维结构

Fig.1 Comparison among different technologies in structural biology The vertical axis refers to resolution (higher from bottom to top) and the horizontal axis refers to the investigated biological sample scale (larger from left to right). Small angle X-ray scattering is suitable to study biological molecules in multiple scales, but the resolution is relatively low; Nuclear Magnetic Resonance (NMR) can be used to obtain structures with high resolution, but limited to relatively small molecules, eg. below 30 KD. X-ray Crystallography has a wider investigation scale and can be used to gain high resolution, mostly atomic resolution, but crystallization is its bottleneck. Cryo-electron microscopy is powerful to solve super-complexes in medium resolution, usually in nanometer scale, but it can reach near atomic resolution for symmetric structures nowadays. Free electron laser scattering (FELS) is a new technology under development, which is promising to solve the structure of biological samples in multiple scale and high resolution

目前电子显微三维重构技术已成为研究蛋白质三维结构的重要手段, 并处于快速发展中, Sali 等^[2]总结了多年来结构生物学的研究工作, 提出了今后结构生物学研究的发展方向, 即将包括 X 射线晶体学、核磁共振、低温电子显微三维重构、荧光能量共振 (FRET) 等在内的多种生物物理技术联合起来, 弥补彼此之间的不足, 将对蛋白质结构的理解放到蛋白质超分子复合体乃至整个细胞中去, 从而最终在分子水平上理解细胞的结构; 其中低温电子显微三维重构术起到了一个重要的纽带作用。事实上, 当前针对大分子复合物的研

究越来越多地依赖于以上三大研究手段以及其它手段的有机结合, 如此方能得到更加准确精细的结构, 并给出更深刻的功能解释。Sali^[3]实验小组于 2007 年在 *Nature* 上发表了综合多种方法研究酵母核膜孔复合体结构的文章。他们利用超速离心技术获得核膜孔复合体组成蛋白或亚复合物的整体形状, 利用定量免疫分析技术来获得各种组成蛋白的相对丰度, 利用亲和层析技术和质谱技术获得组成蛋白之间的相互作用关系及亚复合物的组成, 利用低温电子显微三维重构技术获得核膜孔复合体的低分辨率三维结构并分析其对称性, 利用免疫电镜技术获得组成蛋白在核膜孔复合体上的定位, 最后综合各种约束条件, 建立初始模型, 并利用计算生物学方法对模型进行迭代优化, 生成一个满足各种实验参数的最优模型, 这个模型给出了核膜孔复合体的各个组成蛋白的位置、相互作用网络以及在三维空间的组织方式。Andrej Sali 的工作表明了未来结构生物学研究的整合性和系统性。

1 电子显微三维重构技术的基本原理

电子显微三维重构技术起源于 1968 年, DeRosier 和 Klug^[4]在 *Nature* 上发表了一篇关于利用电子显微镜照片重构 T4 噬菌体尾部三维结构的著名论文, 提出并建立电子显微三维重构 (3D reconstruction) 的一般概念和方法, 其基本原理基于中央截面定理: 三维物体沿电子束方向投影的傅立叶变换是该物体所对应的傅立叶空间中通过中心且垂直于投影方向的一个截面。那么一个物体的完备投影的二维傅立叶变换一定能够完全填充该物体的三维傅立叶空间, 因此物体的完备投影与物体的三维结构是等价的。实验中, 我们收集到大量全同颗粒在不同方向的投影 (单颗粒), 或同一样品在不同角度的投影 (断层成像), 首先通过等价线 (common line)、投影匹配等方法确定每张投影图像的取向和中心 (断层数据角度已知, 只需精修即可), 然后对每张投影图进行傅立叶变换, 按照投影方向填充到三维傅里叶空间对应的切面, 并进行差值计算得到倒空间的网格点数值, 最后再进行反傅立叶变换, 就可得到实空间的三维结构。三维重构理论的建立使得利用电子显微镜来解析蛋白质等生物大分子的三维结构成为可能, 但是需要解决的问题是电子束打到生物样品上时会带来比较严重的辐射损伤, 从而丢失了许多结构信息, 在低温电镜 (低温电镜的目的是提高生物样品对电子辐射的耐受力, 同时减少图像热噪声) 和低剂量辐照成像技术出现以前, 人们只能采用重金属负染的方法来获得生物大分子的嵌影结构 (不是真正的分子结构)。到了 80 年代, 快速冷冻含水生物样品的制备技术和低温电子显微镜技术的快速发展并实用化, 为利用电子显微技术研究蛋白质三维结构奠定了基础。特别是 1984 年, Dubochet 等^[5]发表了第一张病毒的低温电子显微镜照片, 开创了低温电镜的研究时代。自此, 在低温电子显微术、低剂量辐照成像术和电子显微三维重构理论的基础上, 一门新的学科领域形成了, 即低温电镜结构生物学, 这一领域无论是在方法学上还是在蛋白质结构研究上, 在近二十多年间都获得了快速发展, 取得许多重要成果。利用低温电子显微术和三维重构技术解析蛋白质超分子复合物的结构迄今已分化发展为三种具有不同特点和适用范围的方法: 电子晶体学 (Electron Crystallography), 主要处理二维晶体样品; 单颗粒三维重构技术 (Single Particle Analysis), 主要解析具有全同性的蛋白质分子的三维结构; 电子断层三维重构技术 (Electron Tomography), 主要针对不具有全同性的超分子体系和亚细胞体系。

1.1 电子晶体学

电子晶体学技术利用电子显微镜的成像和电子衍射的功能,从生物大分子的二维晶体获取结构信息,解析其三维结构。生物大分子在空间中有序排列,可以形成三维晶体,也可以形成二维晶体(特别是膜蛋白分子)。对于二维晶体来说,其只在 X-Y 平面内具有平移对称性,电子波照射到二维晶体上时能够发生衍射,根据电子显微镜记录的二维图像来确定相位,利用二维晶体的衍射图谱来确定振幅,从而通过反傅立叶变换计算出大分子的密度投影,之后再利用三维重构技术获得大分子的三维结构图,从而解析出生物大分子的三维结构^[6]。该方法的特点是解析分辨率较高,目前可达到近原子分辨率。Henderson^[7]于 1990 年解出了细菌紫膜蛋白(bacteriorhodopsin)的结构,这是第一次利用电子晶体学技术解析出的蛋白质结构。相对来说膜蛋白更易形成二维晶体,因此电子晶体学在膜蛋白研究中更具有潜力。Tate 等^[8]于 2003 年通过电子晶体学的技术解析了大肠杆菌药物转运膜蛋白 EmrE 的三维结构,分辨率为 7 Å,通过结构分析揭示了该膜蛋白开关机理。迄今已有细菌紫膜蛋白^[9]、植物叶绿素光反应系统 II 反应中心^[10]、甘油通道^[11]、H⁺-ATPase^[12]和水通道^[13]等膜蛋白质的结构测定都是利用该技术完成的。此外,该技术也可用于研究可溶蛋白质的三维结构,比如 Nogales 等^[14]于 1998 年解析了微管蛋白(tubulin)异二聚体的 3.7 Å 的结构。除了二维晶体外,电子晶体学技术还可以处理一类特殊的晶体结构,即具有螺旋对称性的样品结构。在某些条件下,蛋白质等生物大分子能够形成纤维状、具有螺旋对称性的微观结构,这种结构在电子显微镜下是可以观察到的,而且电子束经过这种螺旋结构可以发生衍射(helical diffraction),利用这种衍射现象并结合电镜的成像数据,我们就可以解析出这些大分子的三维结构。这方面最成功的例子就是关于乙酰胆碱受体膜蛋白的三维结构解析,Unwin 等^[15]于 2003 年获得了乙酰胆碱受体膜蛋白的螺旋纤维样品,通过电子显微镜测定了其螺旋衍射数据并解析了该受体膜蛋白 4 Å 分辨率的三维结构。此外,像细菌鞭毛的 4 Å 分辨率结构^[16]和微管的结构^[17]也是通过螺旋衍射技术得到的。

1.2 单颗粒三维重构

该技术也叫做单颗粒分析,主要适用于结构具有全同性的生物大分子的结构解析,这些生物大分子可以是具有高度对称性的病毒颗粒(具有二十面体对称性),也可以是不具有对称性的蛋白质颗粒。蛋白质的分子量通常要求在 100 kD 以上,在颗粒数目足够多的情况下,理论上其分辨率可以达到原子水平^[18]。蛋白质等生物大分子的溶液样品被加载到含有微孔的碳膜上,通过快速冷冻的方法,这些大分子颗粒被包埋在玻璃态的冰层当中,它们具有全同的三维结构,只是方位取向不同,其空间关系可以用一系列的刚体运动来描述^[19]。利用透射电子显微镜大量采集这些大分子的投影图像,通过图像处理和三维重构计算就可以获得该生物大分子的三维结构。通常的计算过程如下:从原始的电镜照片中将颗粒图像挑选出来,对其进行二维图像对中、分类和平均,然后通过计算等价线的方法推算各分类图的取向,利用傅立叶重构法建立初始三维结构模型,通过对原始图片或分类平均图与结构模型投影的匹配,优化取向参数,进而得到更准确的三维结构模型,如此反复对初始结构模型进行修正,直到收敛获得最终的结果(图 2)^[20]。单颗粒三维重构在二维图像分类分析、取向参数求解和三维重构计算等方面根据研究对象特点的不同有不同的算法策略,因

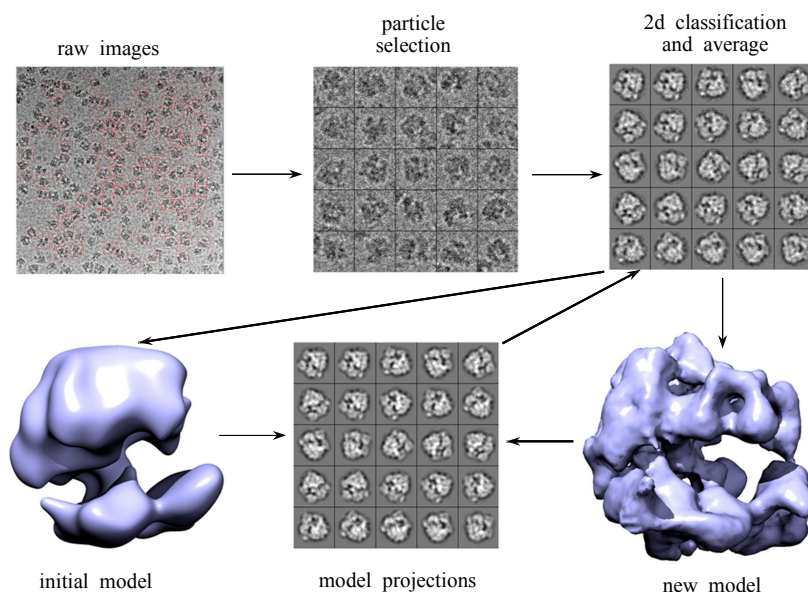


图2 单颗粒三维重构数据处理流程图 通常的处理流程包括：CTF 矫正（图中未展示），颗粒挑选，二维图像匹配、分类和平均，取向计算，初始模型建立，投影匹配，取向修正，新模型建立，直到收敛

Fig.2 Flow chart of data processing for single particle analysis The common procedure includes CTF correction, particle selection, 2-dimensional projection image alignment, classification and average, orientation determination, initial model building, classification and alignment using the projections from model, refinement of the orientation of the raw images and building a new and refined model until convergence

而演化出多种不同的单颗粒分析软件，常用的有 EMAN^[21,22]，SPIDER^[23~25]，IMIRS^[26]，FREALIGN^[27]，IMAGIC^[28,29]，AUTO3DEM^[30]，XMIPP^[31]等。利用该技术已经取得大量的研究成果，众多病毒的结构已经用该方法得到解析，如乙型肝炎病毒^[32]，Semliki 森林病毒^[33]、水稻矮小病毒^[34]、呼肠孤病毒^[35]等，近二十年来，在 *Nature*、*Science*、*Cell* 等刊物不乏这方面的文章。此外单颗粒分析技术在研究核糖体、线粒体 ATP 合酶等关键大分子复合体的结构研究中也发挥了重要的作用，Frank 等^[36]于 2000 年通过分析 73 000 个大肠杆菌核糖体投影照片，利用单颗粒技术重构了该核糖体 11.5 Å 分辨率的密度图，揭示了核糖体各个亚基之间的相互运动关系；Sharma 等^[37]于 2003 年通过冷冻电镜单颗粒技术获得了哺乳动物线粒体核糖体 13.5 Å 分辨率的密度图，揭示了该核糖体特有的蛋白质亚基的功能；Rubinstein, Walker 与 Henderson 合作^[38]于 2003 年发表了完整线粒体 ATP 合成酶的三维电镜结构模型，分辨率为 32 Å，揭示了 F0 和 F1 的相互组装模式和功能关系。

1.3 电子断层三维重构

电子断层三维重构技术就是对样品做微观 CT。具体步骤为：将制备好的样品放在透射电子显微镜中，以一定角度间隔对样品进行旋转，并用 CCD 或胶片记录样品在不同角度下的二维投影图像——样品的倾转范围通常为 $-70^{\circ} \sim +70^{\circ}$ ，间隔角为 1° 或 2° ；然后对收集的这些原始数据进行匹配，利用加权背投影、代数迭代（ART）或同步迭代（SIRT）等方法进行三维重构获得样品的三维图像（图 3）。由于电子断层三维重构的研究尺度可以很

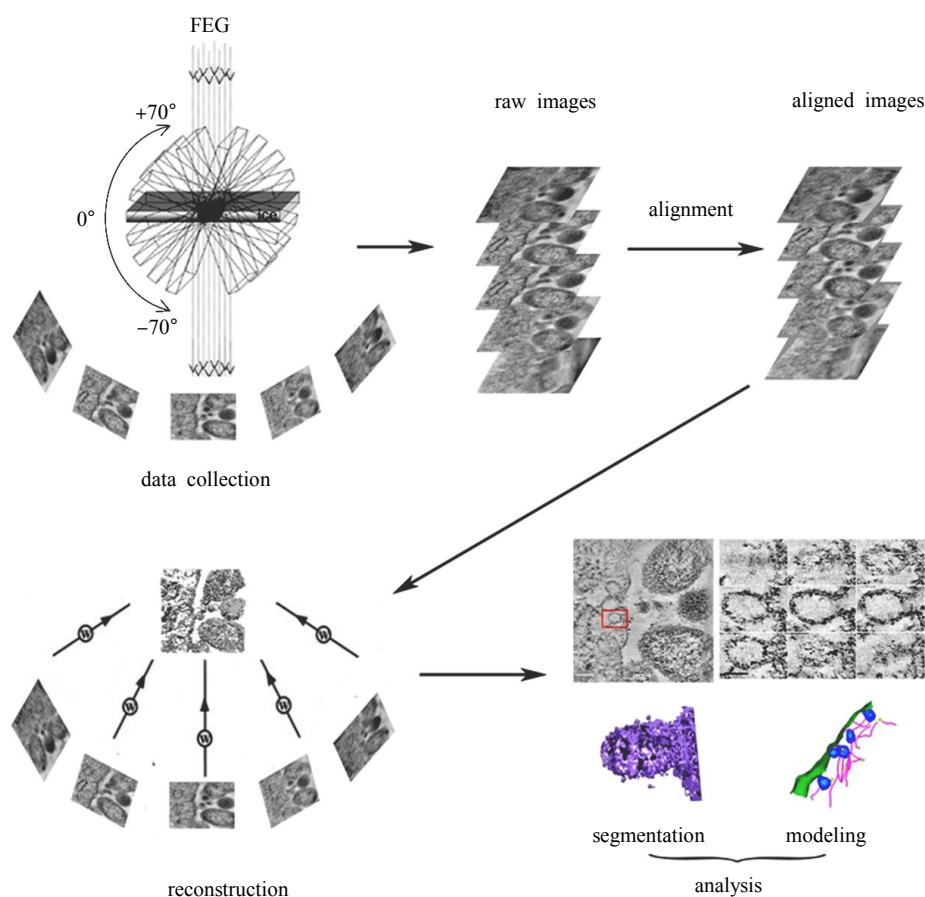


图 3 电子断层三维重构技术原理和流程示意图 以猪动脉内皮细胞胞膜窖电子断层三维重构^[173]为例, 其技术路线主要包括: 从各个投影角度收集原始图像, 图像的匹配和归一化, 空间几何参数的确定, 三维重构, 数据后处理, 数据分析 (密度分割和建模等)

Fig.3 Principle and flow chart of electron tomography Take porcine aorta endothelial cell as an example, the procedure includes data collection from different orientations, normalization and alignment of the micrographs, geometry parameter determination, reconstruction, post-processing and data analysis (eg.segmentation and modeling)

大——可以对细胞水平上的超微结构进行重构、观察和分析, 因此我们也称该技术为电子断层三维成像技术。该技术适宜对细胞器、亚细胞组装体甚至整个细胞的三维结构进行研究^[39], 分辨率为 5~20 nm。低温快速冷冻技术和自动化数据收集技术的发展是电子断层三维重构技术发展过程中的两个关键技术, 尤其是低温快速冷冻技术避开了树脂包埋和负染技术中的假象, 能够保持样品接近天然状态的结构。截至目前, 利用电子断层三维重构技术, 已经有大量文献报导了有关整个细胞、细胞骨架、病毒、细胞器等超微结构。如 Baumeister 等^[40]利用该技术获得了真核细胞 *dictyostelium* 的三维结构, 其分辨率达到了 5~6 nm, 并在原位对核糖体和 26S 蛋白酶体等大分子复合物进行了定位观察。Milne 和 Subramaniam 总结了该方法在完整细菌结构研究中的应用^[41]。

2 面向高分辨率的单颗粒三维重构

在上面所述的多种电子显微三维重构方法中, 发展最快应用最广的是单颗粒三维重构技术, 近年来不断有文章报道利用此技术所获得的大分子复合物的三维结构, 其中许多具有高对称性的病毒颗粒结构已经达到近原子分辨率。Grigorieff 研究^[42]小组于 2008 年报道了轮状病毒 (rotavirus) 内衣壳蛋白 VP6 的 3.8 Å 的电镜结构, 这也是人们利用单颗粒分析方法首次获得的 4 Å 以上近原子分辨率的结构, 在这样的分辨率水平下, 人们已经能够清楚地看到许多较大残基的侧链。紧随 Grigorieff 研究小组之后, Chiu 实验组获得了具有感染性的 epsilon15 病毒衣壳 4.5 Å 的电镜结构^[43], 利用这个结果, 他们成功地对衣壳蛋白的肽链骨架进行了跟踪 (tracing)。同年, Zhou 实验小组^[44]获得了质型多角体病毒 3.88 Å 的电镜结构, 发现了 RNA 包装 (packaging) 时的构象变化, 并阐明了 RNA 释放 (release) 与包装的偶联机制。2009 年 Grigorieff 研究小组^[45]又获得了外衣壳蛋白 VP7 包被的轮状病毒颗粒 4.0 Å 的结构。最近, Grigorieff 与 Harrison 实验组^[46]合作获得了一型牛乳头瘤病毒 (Bovine Papillomavirus Type 1) 3.6 Å 的结构。目前最高分辨率的单颗粒三维重构结构是 Zhang 等^[47]最近报道的 3.3 Å 水生呼肠孤病毒。除了高对称性的病毒颗粒, 类似分子伴侣 (chaperonin) 这样的具有中等对称性 (旋转对称性) 的大分子复合物的电镜结构近年来也取得了重要进展, Chiu 实验组^[48]在 2008 年报道了一型分子伴侣 GroEL 约 4 Å 分辨率的电镜结构, 并且对碳骨架进行了跟踪; 最近该实验组^[49]又报道了二型分子伴侣 Mm-cpn 在 ATP·AlFx 诱导下的闭口构象的 4.3 Å 分辨率结构。无对称性的分子一般很难得到高分辨率的电镜结构, 其中核糖体是这类分子中的典型代表, Frank 等实验组^[50~52]从上个世纪 80 年代就开始核糖体电镜三维结构的研究, 到 90 年代已经能够获得 15 Å~25 Å 左右的电镜结构^[53~55], 这些结构对后来核糖体晶体结构的解析^[56]起到非常重要的作用。近年来, 不断有核糖体高分辨结构被报道, 但 7 Å 以上的结构^[57~60]全部都是在 2009 年以后报道的, 最高分辨率为 Beckmann 小组报道的 5.8 Å 结构^[60]。随着样品制备方法的改进、场发射电镜的应用、自动化大规模数据采集系统的完善、高性能计算的飞速发展, 以及重构算法的改进等, 人们有望得到原子分辨率的非对称样品的原子结构。

3 透射电子显微设备的性能提升

提高电镜三维重构分辨率的一个关键因素就是透射电子显微设备各项性能的改善和提高。针对其在结构生物学领域应用的特点, 透射电子显微镜的性能提升紧紧围绕三个关键问题展开——样品天然结构的保存、图像衬度的提高和高分辨信息的获取。

3.1 样品天然结构的保存

利用透射电子显微镜观察样品, 需要将样品置入高真空的镜筒中, 这对于高度含水的生物学样品来说是不利的, 在低温电镜技术出现之前, 人们利用化学固定脱水包埋和负染色等方法来制备适合电镜研究的样品。此外由于生物学样品主要以碳、氧、氮、磷等对电子散射能力较弱的轻元素构成, 人们通过重金属染色来提高其在电镜下所成图像的对比度

(衬度, contrast)。利用这些方法, 人们获得了大量关于细胞超微结构和病毒形态等方面的认识, 然而由于这些方法在一定程度上破坏了生物样品的天然结构, 并且重金属染色并不能准确反应样品本身的结构信息, 因此为了获得生物样品在天然状态下的高分辨率结构, 必须寻找其他方法。Dubochet 等人^[5]在低温电镜样品制备方面做了开创性的工作, 利用 (高压) 快速冷冻和低温超薄切片技术, 生物样品在生理条件下的结构状态能够很好地固定保存在玻璃态冰中; 此外为了使冷冻含水样品可在电镜中观察, 人们设计了专门的带有防污染器的低温样品台, 通过低温样品台可以将低温固定的样品放入高真空的镜筒中进行直接观察, 因此快速冷冻和低温样品台技术解决了含水生物样品的保存和观察两大难题。利用这些技术, 我们能够直接观察生物学样品的纳米分辨率天然结构和动态变化, 如高尔基体^[61]、线粒体^[62]和核糖体^[63,64]等细胞器的三维结构、T5 噬菌体将 DNA 释放到宿主细胞中的过程^[65]等。

生物样品的快速冷冻是一门特殊的技术^[66], 如果处理不当将会导致样品结构的破坏和冰晶的产生等严重问题。按照冷冻方法进行分类, 其包括浸入式快速冷冻、喷射快速冷冻、金属镜面快速冷冻及高压快速冷冻, 对于生物大分子复合体等纳米尺度样品的研究, 主要采用浸入式快速冷冻 (cryo-plunge) 的方法——将含有生物大分子样品的溶液分散在含有微孔的碳支持膜上, 利用滤纸吸附 (blotting) 多余的液体使得支持膜表面形成一层非常薄的溶液, 然后将其以非常快的速度送入被液氮冷却的液态乙烷中, 液态乙烷的高热容保证了样品温度快速下降并防止冰晶的产生 (图 4)。过去人们通过自制的装置来实现浸入式快速冷冻, 只有经验丰富的实验员才能够根据环境温度和湿度恰当掌握吸附强度和吸附时间, 制备出适合电镜观察的低温样品; 近两年来, 随着该技术的广泛应用, 一些商用的自动化快速冷冻装置得到推广, 如 FEI 公司的 Vitrobot 和 Gatan 公司的 CP3 等 (图 4)。利

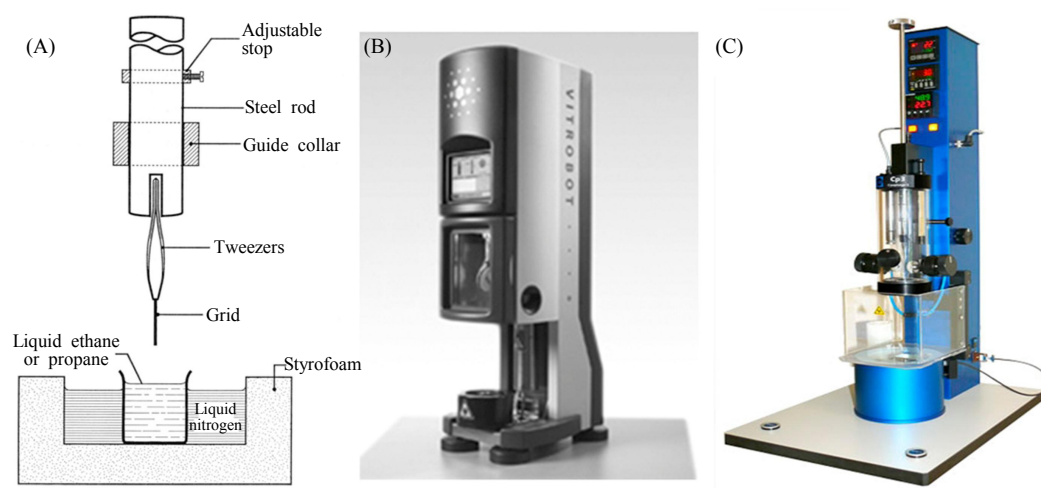


图 4 用于电镜制样的快速冷冻装置 (A) 浸入式快速冷冻方法示意图; (B) Vitrobot, FEI 公司的一款全自动的冷冻样品制备装置; (C) CP3, Gatan 公司生产的半自动冷冻样品制备装置

Fig.4 Cryo-plunge for cryoEM sample preparation (A) Schematic diagram of a cryo-plunge apparatus^[19,174]. (B) Vitrobot, a fully automatic equipment for cryoEM sample preparation from FEI company. (C) CP3, a semiautomatic cryoEM sample preparation instrument from Gatan company

用 Vitrobot, 研究人员可以精确控制环境温度和湿度, 实现严格可控的吸附强度和吸附时间, 这大大增加了低温样品制备的成功率和可充分性, 学生经过简单的培训就可以利用这些自动化装置制备出高质量的样品; 相对于 Vitrobot, CP3 提供了一个半自动的解决方案, 虽然不能精确控制环境温度和湿度, 但其提供了更加灵活的吸附方式, 在一些特殊样品的制备上具有优势。

过去一段时间, 研究人员通过装有液氮杜瓦瓶的低温样品杆将制备的低温样品送入电镜中进行观察和数据采集, 样品的低温通过镜筒外的杜瓦瓶得以维持, Gatan 公司提供了适合不同电镜型号和不同需要的精密低温样品杆, 如 Gatan Cryo-Transfer 626 和 CT3500 等, 目前世界多数低温电镜实验室仍然在使用这些样品杆。使用这些样品杆存在的问题有: 1) 样品装载过程比较复杂, 并且一次只能装载 1 个样品 (多的可以 3 个); 2) 更换样品过程比较复杂, 并且容易产生冰污染; 3) 杜瓦瓶中液氮需要人工加注, 自动化程度不高; 4) 样品杆内部的不稳定热传导将产生机械漂移, 影响高分辨率图像收集; 5) 环境中空气的流动容易通过杜瓦瓶振动传递给样品, 影响高分辨率图像收集。针对这些问题, 一些整合了低温样品台的新型高性能透射电子显微镜被设计生产出来, 如 JOEL 公司的 JEM 3200FSC, FEI 公司的 Polara 以及 FEI 公司的 Titan Krios 等, 这些电镜能够实现一次多个样品的装载和液氮的自动添注, 样品直接固定在镜筒内, 最大程度上减少了外界环境和温度传导对样品漂移的影响。值得一提的是, FEI 公司的 Titan Krios 设计安装了一套完整的自动进样系统 (autoloader system), 一次可装入 12 个冷冻样品, 大大提高了实验的效率, 且装载样品非常方便, 最大程度上减少了人为因素的影响并消除了冰晶的污染, 当然这套全新的系统还需要进一步进行优化改进, 使其成熟完善。需要补充的是, 以上所提到的低温样品杆和低温样品台都是在液氮下工作的, 实际上温度越低, 样品耐受电子辐照剂量的阈值就越高, 根据这一想法, Fujiyoshi 等^[67]最先研制了可以在液氮下工作的低温样品台, 并且将样品的载入方式从侧插式改进成顶插式, 进一步提高了样品台的稳定性, 目前 FEI 公司的 Polara、Titan Krios 与 JOEL 公司的 JEM 3200FSC 都可以提供液氮冷台的安装方案。目前的应用研究证明, 液氮冷台在利用电子晶体学研究膜蛋白二维晶体结构方面具有非常明显的优势^[13,68]; 然而由于在液氮温度下出现的低衬度和电荷积累 (charging) 等问题, 液氮冷台在低温单颗粒分析和低温电子断层三维重构等方面没有表现出明显的技术优势, Jensen^[69]研究组通过比较认为在液氮温度下进行的低温电子断层三维重构结果反而不如在液氮温度下得到的结果。

3.2 图像衬度的提高

低温电镜技术使得冷冻的含水生物样品可以在低温下进行观察和成像, 由于没有进行任何包埋保护, 低温下的生物学样品耐受电子辐照的能力依然有限, 一般在 $20 \text{ e}/\text{\AA}^2$ 以下, 为了保持样品的天然结构, 必须采用低剂量成像技术进一步控制辐照剂量。由于生物学样品的弱电子散射能力和低剂量成像两方面原因, 含水冷冻生物样品的成像衬度一般都很差, 通常采用增大欠焦量和加入物镜光阑的方法来提高图像衬度 (注: 为了保证获得样品的本身天然结构信息, 不能使用重金属染色的方法), 但这两种方法都是以损失高分辨率结构信息为代价。如何在保持高分辨率信息的前提下增加图像的衬度一直是低温电镜领域方法学

研究的重点：长焦距物镜和高反差极靴（pole piece）的设计和使用让生物样品的图像衬度大大提高；能量过滤成像技术可以屏蔽掉非弹性散射电子的影响，进一步提高图像衬度，对于厚样品的观察非常有效；相位板（phase plate）技术将有望成为极大提高图像衬度的有效方法，它通过改变物镜后焦面透射电子束或散射电子束的相位来显著提高生物样品的相位衬度，同时提高了图像信噪比，相位板的实现可以用多种方法，如微孔薄膜相板、静电场相板等，Nagayama 研究组^[70]在微孔薄膜相板（Zernike phase plate）的研究和应用方面做了很多工作，最近他们研究小组利用该技术成功对高压冷冻的细胞样品进行了观察，在零欠焦的情况下清楚地拍摄到细胞骨架结构^[71]。

3.3 高分辨信息的获取

通过低温透射电子显微三维重构技术获取生物大分子的原子分辨率三维结构一直是结构生物学家所梦寐以求的，而近年来仪器性能的不断提升使得人们看到了可能性。要得到原子分辨率的三维结构，所拍摄的电镜显微照片中必需包含高分辨率的信息，引起高分辨率信息损失的因素有很多，包括电子束的时空相干性、电子光路的平行性、透镜系统的稳定性、物镜球差系数和图像采集器的性能等方面。场发射电子枪（field emission gun, FEG），特别是高亮度场发射电子枪的应用大大提高了电子束的时空相干性；单色器的使用则增强了电子束的单色性，减少了物镜色差的影响；FEI 公司的 Titan Krios 上使用了三级聚光镜，可在很大的照明范围内实现平行光路，并且该电镜上的透镜恒定功率技术（constant power）使得透镜系统的温度和电流更加稳定；球差校正器的应用将消除物镜球差系数的影响，与相位板技术联合使用将有可能直接获取极限分辨率信息；在低剂量下成像模式下，传统的 CCD 相机所收集的图像信噪比较差，并且 CCD 较差的点扩散函数严重影响了高分辨信息的采集，因此 CCD 是目前限制获得高分辨率结构信息的重要因素，这一瓶颈将有望在未来几年内通过一种新型图像探测器——直接电子探测器（direct electron detector, DED）的应用而被突破，该探测器无论从灵敏度、动态范围，还是读取速度上都大大超过 CCD，更重要的是 DED 没有 CCD 所固有的点扩散效应，获取图像的分辨率大大提高^[72]。目前 FEI 公司（<http://investor.fei.com/releasedetail.cfm?ReleaseID=399045>）和 Direct Electron 公司（<http://www.directelectron.com/products.html>）都推出了各自的 DED 产品。

以上就样品天然结构的保存、图像衬度的提高和高分辨信息的获取三个方面综述了近年来生物样品低温电子显微技术方面的发展。此外，一项新的电子显微技术——扫描透射电子显微术（scanning transmission electron microscopy）近两年来也在生物学对象的研究上表现出独特的优势，可以研究非常厚的生物样品的三维结构^[73]，并且其点扫描的特点可以实现动态聚焦，从而避免了样品倾斜时样品不同区域具有不同欠焦量的问题。在研究大尺度样品（组织、多细胞生物）的三维结构时，具有样品在线加工功能的扫描电镜表现出了用武之地，利用双束扫描电镜（dual beam SEM）上的离子束（FIB）对样品进行切片，然后通过扫描电子束的背散射电子对样品切面进行成像^[74]，这项技术可以获得微米级样品的三维图像，对于神经细胞系统的研究非常有用。

4 低温电镜原始数据收集与处理的自动化

4.1 单颗粒分析原始数据的自动化收集

如上所述, 蛋白质等生物大分子样品固定在玻璃态冰层中, 对电子束辐射非常敏感, 其原始图像数据的收集需要在低剂量 (low dose) 模式下进行, 常用的电子剂量为 $10 \sim 30 \text{ e}/\text{\AA}^2$ ^[75], 在该模式下的图像采集分为三步: 首先在低倍 (search 模式, 辐照剂量非常低) 下寻找冰层厚度合适的区域; 然后进行第二步操作——聚焦 (focus 模式), 将放大倍数设置为曝光时所需倍数或者更大, 在选定曝光区域的 $1 \sim 2 \text{ }\mu\text{m}$ 附近的碳膜上确定正焦点; 然后设定合适的欠焦值 ($-1 \sim -3 \text{ }\mu\text{m}$) 和曝光时间; 最后完成第三步操作——曝光 (exposure 模式), 在选定区域进行曝光记录图像。由于整个过程中目标区域只经过一次电子束低剂量照射, 只有在成像后才能获知图像的质量以及所包含颗粒的数目和分布情况, 因此要完成单颗粒分析, 必须收集大量的原始图像。Rosenthal 和 Henderson^[76,77]经过理论分析, 认为单颗粒三维重构的分辨率与所收集颗粒的数目有密切的联系, 并且推测——要到达原子分辨率, 至少需要一百万个颗粒。目前的实验条件和计算机处理能力还无法满足这个要求, 通常需要处理的颗粒数目在几万个到十几万个, 要收集如此大数目的颗粒, 手动数据收集方式将成为瓶颈, 必须寻找有效的自动化收集方法。近五年来, 单颗粒原始数据的自动化收集技术得到很快发展, 一方面适合于自动化数据收集的含有有序排列微筛的碳支持膜被开发出来并实现了商业化, 如 QuantifoilTM (<http://www.quantifoil.com/>) 和 C-flatTM (<http://www.emsdiasum.com/microscopy/products/grids/cflat.aspx>); 另一方面若干单颗粒自动化数据收集软件被开发出来并逐渐成熟, 主要有 Legimon^[78~80], AutoEM^[81]和 JADAS^[82]等软件, 这些自动化软件能够自动识别成像区域, 自动完成样品对中和自动对焦, 经过一定的参数设置后可以实现大量数据的自动化收集, 一个典型的例子是 Scripps 研究所的 Carragher 研究组^[83]利用 Legimon 系统在 25 小时内自动完成了 284 742 个分子伴侣 GroEL 的低温单颗粒数据收集工作, 并且非常轻松地获得了好于 8 \AA 分辨率的三维重构结果。

4.2 单颗粒三维重构的自动化颗粒挑选和图像处理流水线

单颗粒三维重构技术需要从原始图片中将蛋白质等生物大分子颗粒选取出来, 手动挑选数十万的颗粒是一项非常耗时费力的工作, 因此自动化的颗粒挑选显得十分重要。到目前为止, 已经有很多颗粒自动挑选的软件 (表 1), 主要算法有基于模板的方法 (template-based methods)、基于边缘检测的方法 (edge detection-based)、灰度值比较的方法 (intensity comparison)、基于纹理的方法 (texture-based) 和神经网络方法 (neural network) 等^[84,85], 识别率能够达到 $80\% \sim 90\%$ 左右。在本研究组的协作下, 中国科学院计算技术研究所张法等人也发展了一套新的颗粒自动化挑选软件 Picker (待发表), 目前的测试表明优于其他相关软件。此外, 针对过去只有专门经过训练的人才能进行单颗粒数据处理的情况, Lander 等^[86]开发了一套单颗粒三维重构图像处理流水线系统 Appion, 从欠焦量求解与 CTF 校正、颗粒自动化挑选、二维图像分析分类、初始模型构建到三维模型修正, 实现了全自动的数据处理, 研究人员只需要一些简单的单颗粒分析知识, 就通过网页完成整

个数据处理流程，这是将单颗粒三维重构技术推向自动化的一个有益的尝试。

表 1 常用的自动挑颗粒的软件

Table 1 Common softwares for automatic particle selection

软件名称	算法及特点
TYSON ^[87]	局部平均，模板匹配，局部方差等三种
SLEUTH ^[88]	模式识别
FindEM ^[89]	基于模板匹配
SwarmPS ^[90]	互相关和边缘检测
DoG Picker ^[91]	高斯差分图像变换 (Difference of Gaussians)
Cyclops ^[92]	自动排除碳膜区域，基于旋转空间采样
SIGNATURE ^[93]	基于模板，分等级筛选 (hierarchical screening)
ETHAN ^[94]	以及灰度值强度比较，适用于球形颗粒
Xmipp ^[95]	机器学习技术
SPIDER ^[96]	基于模板匹配，局部标准化相关系数算法

4.3 电子断层三维重构的自动化数据收集

电子断层成像时要在样品的特定部位连续收集上百张不同角度的照片，这就要求数据收集必须在极低剂量下进行，否则样品将被电子束损伤。一般而言在进行数据收集时，先在低倍下寻找样品，然后在高倍下样品周围的区域聚焦，最后在准备收集数据的区域曝光，这样可以有效地减少辐射损失。电子断层数据收集存在许多实际问题：1) 样品由一个角度转向另一个角度时，由于机械原因，往往会有一定的偏移，在数据收集过程中要进行匹配对中 (alignment)，所以实际在收集过程中必须额外拍摄一些用于匹配的图像，这势必造成额外的剂量增加；2) 由于样品和仪器本身的特点，电子断层只能收集到 $\pm 70^\circ$ 左右的数据，在数据收集时应采用合理的策略以使所得的数据包括尽量多的信息，基于这样的考虑产生了等角度、等斜率以及 saxton 三种常用的收集策略；3) 由于冷冻样品的成像衬度较低，从高角度开始收集数据有可能无法找到样品，所以一般采用从 0 度开始逐渐向高角度收集数据，然后再退回 0 度向反方向收集数据；4) 在数据收集过程中，样品不同部位欠焦量并不一致，甚至可能某些部位处于过焦而另一些区域处于正焦或欠焦，并且欠焦量也可能随着角度的变化而不同；5) 样品厚度也是影响电子断层数据收集的一个重要因素，厚样品能够包含更丰富的结构信息，尤其是对一些较大的细胞器，但厚样品衬度不如薄样品好，而且随着角度增大，衬度会越来越差，这为数据收集带来困难，重构分辨率也比薄样品低，所以样品厚度要在两者之间权衡。针对这些实际问题，开发自动化的电子断层数据收集软件就非常有必要，目前广泛使用的软件有 UCSF tomography^[97]，TOM software toolbox^[98]，SerialEM^[99]，Leginon^[80]以及 FEI 公司的 Explor3D 等，这些自动化数据收集程序（如 Xplore3D^[100~102]）能够利用最初几张图像的偏移算出整个数据收集过程中图像的偏移轨迹，从而大大降低了额外增加的剂量对样品的损伤，并且能够比较精确地控制电镜和 CCD 相机，完成自动聚焦功能，能够实现多种收集策略和模式。

5 高性能计算在数据处理中的应用

自动化数据收集系统的成功应用使得电镜三维重构的数据规模急剧增大, 但要获得较高分辨率的电镜结构, 除了样品质量和仪器性能的提高, 大规模的数据量是一个至关重要的因素, 这决定了电镜三维重构的计算量非常巨大。尽管上个世纪六七十年代三维重构方法就已建立, 但高性能计算一直是限制其广泛应用的一个瓶颈, 只有随着近些年高性能计算机的普遍应用, 电镜三维重构才进入了一个全新的阶段, 并且随着电镜自动化数据收集技术的发展以及数据量的逐步增大, 高性能计算在电镜三维重构的应用也会越来越广泛^[103]。

集群技术是传统高性能计算机发展的基础。目前, 千万亿次 (Petaflops) 级别的高性能计算集群正在融入到低温电镜三维重构计算等生命科学领域中。预计 100 Petaflops 的系统将于 2016 年出现, 而百亿亿次 (Exascale) 级别的高性能计算系统有可能于 2019 年出现。多核和众核技术的发展使得未来的集群系统将包含数百个至数百万个计算内核, 这些技术的发展将为超大规模的电镜三维重构计算带来更广阔的前景。另一方面, 固态存储器 (SSD) 的应用使得数据存储速度大大提高, 这将大大缓解电镜三维重构技术中的数据读写压力, 从而提高了计算机集群的整体性能。

近几年, GPU 技术的发展, 开辟了高性能并行计算的新纪元。2007 年 Nvidia 公司发布基于 GPU 计算的编程语言 CUDA 1.0, 引发了 GPU 通用计算的革命。不到三年的时间, GPU 技术已经取得了巨大的发展, 目前专门用于计算的 Tesla C1060 单块卡的单精度浮点运算能力已经达到 1TFlops, 相当于 25 个高端 4 核 CPU 的运算能力总和。由于电镜三维重构特别是电子断层三维重构的计算特点特别适合 GPU 的并发处理模式, 所以 GPU 通用计算有望在电镜结构生物学领域得到极其广泛的应用。

常见的并行计算方式有任务级 (多进程) 并行、MPI、OpenMP、Pthreads 以及 GPU 等。许多电镜三维重构程序目前是实现的任务级别的并行, 如 BSOFT^[104,105]、FREALIGN^[27]、IMOD^[106,107]和 PRIISM/IVE^[108]等。而 AUTO3DEM^[30]、IMAGIC^[28,29]、UCSF TOMOgraphy^[97]等则完全采用了 MPI 并行方式。著名的单颗粒三维重构软件 EMAN^[21,22]目前除了 GPU 外, 其它几种并行手段都已实现, 中国科学院计算技术研究所张佩衡、谭光明所带领的团队目前正在完成 EMAN 程序的 GPU 移植工作, 目前已经实现 3~4 倍的加速比。SPIDER^[23~25]和 IMIRS^[26]程序则采用了 OpenMP 和 MPI 并行方式, 但 SPIDER 保留了任务级的并行方式, 而 IMIRS 程序没有。XMIPP^[31]采用了 MPI 和 pthreads 方式。表 2 例举了比较常用的电镜三维重构软件的并行任务及并行方式。

GPU 技术由于是近些年才发展起来的高性能计算手段, 其应用相当有限, 目前还没有完全基于 GPU 的十分成熟的重构软件发行。Castano-Diez 等^[109]在 2007 年最先将 GPU 通用计算技术应用到电镜三维重构当中, 将三维重构速度大大提高, 其单块 NVIDIA QuadroFX4500 显卡的计算速度最高可达到 3.4 GHz Intel Xeon 处理器的 80 倍左右。

表 2 三维重构常用程序及其并行方式^[103]

Table 2 Common software packages and their HPC capabilities in cryoEM

程序包	方法	并行任务	并行方式
AUTO3DEM ^[30]	单颗粒	定取向; 重构	MPI
BSOFT ^[104,105]	单颗粒	重构	任务级
	电子断层	重构; 滤波; 分辨率估计	任务级
EMAN ^[21,22]	单颗粒	分类; 定取向; 重构; 结构识别	任务级; MPI; OpenMP; 多线程
FREEALIGN ^[27]	单颗粒	定取向	任务级
IMAGIC ^[28,29]	单颗粒	定取向; 重构	MPI
IMIRS ^[26]	单颗粒	定取向; 重构	MPI; OpenMP
IMOD ^[106,107]	电子断层	CTF校正; 重构; 滤波; 双轴数据合并	任务级
PRIISM/IVE ^[108]	电子断层	重构; 双倾数据匹配	任务级; GPUs
SPIDER ^[23~25]	单颗粒	重构; 定取向; 模板匹配	OpenMP; MPI; 任务级
	电子断层	重构; 模板匹配	OpenMP; 任务级
UCSF TOMOGRAPHY ^[97]	电子断层	重构	MPI
XMIPP ^[31]	单颗粒	分类和匹配; 定取向; 重构	MPI; 多线程

6 二维图像处理技术

6.1 衬度传递函数校正

透射电镜成像时, 记录像是真实像经过了衬度传递函数 (contrast transfer function, CTF) ^[110]和包络衰减函数 (envelope decay function, EDF) ^[111]的调制, 再加上一些噪音 (Noise)^[112]的结果。因此, 观察到的生物大分子结构因子可以表示为:

$$F_{\text{obj}}(S)=F(S) \cdot CTF(s) \cdot E(s)+\text{Noise}(s) \quad (1)$$

其中 $F(s)$ 是真实结构因子, $CTF(s)$ 是电镜衬度传递函数, $E(s)$ 是包络衰减函数, $\text{Noise}(s)$ 是噪音项。衬度传递函数调制了图像的相位信息, 包络衰减函数引起高分辨结构信息的衰减。在进行三维重构前, 必须对图片进行衬度传递函数 (CTF) 校正, 包络衰减函数校正 (B 因子校正) 一般在重构后进行, 细节不再赘述。能否得到高分辨率的重构结果, CTF 校正至关重要。由衬度传递函数可知, CTF 校正的关键在于求到准确的欠焦值。一般重构软件都自带有欠焦值估计和 CTF 校正程序, 比较常用的程序有 CTFFIND3^[113], ACE^[114]和 CTFFIT^[21]等。此外, 在样品倾斜的情况下, 所成图像在各处的欠焦值并不一样, 需要求出各个区域的局部欠焦值, 目前 CTFTILT^[113]、ACE^[114]、TOMOCTF^[115]、CTFPLTTER 和 CTFPHASEFLIP^[116]等程序可以处理这种情况。

6.2 二维图像匹配

在单颗粒分析中, 求解单颗粒二维投影的取向参数对于进行正确的三维重构是至关重要的, 而投影取向参数的求解主要是通过二维图像的匹配来完成的: 通过旋转和平移尽可能将两个颗粒图像进行相似性匹配, 并计算相关系数 (cross correlation coefficient), 如果相关系数超过某个域值, 则认为这两个颗粒图像具有相同的取向参数; 通常是将颗粒原始

图像与三维模型的投影图像进行匹配分析, 从而求解颗粒原始图像的取向参数。由于在二维图像分类计算和三维重构模型修正过程中, 需要进行大量的二维图像匹配计算, 因此二维图像匹配算法的优劣和快慢对于整个三维重构计算的影响巨大, 经过多年研究, 人们开发了多种快速算法, 包括 RPC (re-sampling to polar coordinate) /PFT (polar Fourier transform)、SCF (self-correlation function) 和 FRM2D。RPC 算法^[117~119]是将图像在极坐标中进行重新采样并且在极坐标中对角度进行傅立叶展开, 基于傅立叶卷积理论, 两张图片之间的旋转关系可以通过一维快速傅立叶变换 (FFT) 计算得出, 但是计算相对平移量需要用穷尽搜索的方法。SCF^[120~122]算法叫做自相关函数法, 这种算法的优点在于一个图片的自相关函数具有平移不变性, 因此对旋转量的搜索和对平移量的搜索可以分开进行, 旋转角可以用与 RPC/PFT 相同的方法得到, 平移量可以基于傅立叶卷积理论用二维快速傅立叶变换 (2D FFT) 计算得到。在上述方法中, 如果平移搜索被限制在一个小区域内, RPC 是最为精确且有效的方法, 如果平移搜索范围较大, SCF 方法更为有效^[118]。2003 年, Cong 等^[119]提出了一种新的二维快速旋转匹配算法——FRM2D, 这种算法拥有一个平移参量和两个旋转参量, 可以利用两个旋转自由度 (degrees of freedom, DOF) 进行二维快速傅立叶变换 (2D FFT), 避免了一维线性空间中为了得到稳定的傅立叶卷积而进行的零值扩展 (zero padding) 能够显著提高计算速度, FRM2D 算法已经整合到 EMAN 软件包里。

6.3 二维图像分类

在单颗粒分析中, 二维图像分类有两个重要的作用: 一是对图像分类可以将具有相同取向参数的原始颗粒图片进行求和平均, 提高图像的信噪比和对比度, 从而有利于下一步更加准确的取向参数求解; 二是生物大分子复合体往往具有多种构象, 自动化挑选出来的颗粒往往会掺杂一些“错误”和“损坏”的颗粒, 对原始图像数据集进行有效的分类可以剔除“不好”的颗粒, 并且可以将多种复合体颗粒的构象进行分离和分析, 这对于下一步获得高分辨率的三维重构是至关重要的。利于计算机对二维图像进行分类就是对图像之间进行相似度分析, 对于单颗粒原始图片, 其相似度的定义必须严格基于点对点的比较——即计算两张图片的均方根 (root of mean square), 这又称作图片之间的欧氏距离; 形象的讲, 可以将 $N \times N$ 大小的图片看作 $N \times N$ 维空间中的一个点, 在这个空间中, 相互临近的点可以视作“相似”, 因为这两个点之间的欧氏距离短。二维图像分类的算法常用的有两种——基于参考的分类算法 (reference based classification, RBC) 和无参考的分类算法 (reference-free classification, RFC), RBC 算法是计算分类图片与参考图片之间的相似度, 而 RFC 算法是对原始图片集进行统计分析, 寻找该集合中基本元素和属性, 并在此基础上对集合中的图片进行分类。RFC 算法主要基于多元变量分析技术^[123]。由于 RBC 算法存在模板依赖性的问题, 因此 RFC 算法在理论上是最优的。然而在低信噪比情况下, RFC 算法是很难奏效的, 故现在常用的算法还是 RBC 算法^[124~128]。近年来关于 RFC 算法的研究有了一些新的突破, 如 Scheres 等^[129]提出了最大似然概率算法 (maximum likelihood based classification), 用这种算法成功区分了核糖体的两种构象状态: 结合三个 tRNA 的 unratcketed 状态和结合一个 tRNA 和一个 EF-G 因子的 ratched 状态。

6.4 多变量统计分析技术(multivariate statistical analysis, MSA)

MSA 技术最早于 1980 年被引入电镜三维重构领域^[123], 现在已经成为许多程序的重要组成部分^[130]。利用 MSA 技术, 可以对原始图片 ($N \times N$ 大小) 集合进行统计分析, 计算出该集合的特征值和特征向量 (特征图片) 集, 每一张原始图片可以分解为部分 “显著” (特征值很大) 特征向量的线性组合, 由于 “显著” 特征向量的数目远远小于图片的 $N \times N$ 大小, 从而可以显著减少数据处理的空间维数, 方便分析。目前常用的 MSA 分析技术有两种——对应分析 (correspondence analysis) 方法和主成分分析 (principal component analysis) 方法。在用 MSA 技术对原始图片集合进行处理后, 就可以在维数较小的空间中对各个图片进行相似度 (欧氏距离) 计算, 并依据这些距离进行聚类分析, 通常采用自动分级上升归类算法 (automatic hierarchical ascendant classification) 对图片分类^[131~133]。

7 三维重构算法

7.1 三维重构常用算法

目前三维重构算法有三种——傅立叶重构、加权背投影重构和代数重构。最早的三维重构原理是 1917 年 Randon 提出的 randon 变换, 但是直接利用 randon 变换重构是不现实的, 基于与 randon 变换等价的中央截面定理进行的傅立叶重构是切实可行的方法 (其原理前面已经提到)。后来出现了背投影相关的诸多算法, 包括直接背投影 (back projection, BP)、滤波背投影 (filtered back projection, FBP) 和加权背投影 (weighted back projection, WBP)。背投影算法简单描述如下: 三维物体某一点的密度等于通过该点所有射线密度的总和, 这些射线垂直于该物体的某个投影, 射线上的密度值等于该射线交在该投影上的点的密度值。背投影是一种非常有用而且快速的算法, 但是它有一个严重的缺陷就是容易产生假象——在实空间, 该算法使得重构结果产生点扩散效果; 在频谱空间中就是低频区过采样而高频区采样不足, 或者说该算法有自带的低通滤波特性。针对这个问题出现了各种改进的算法, 最直接的方式就是对重构结果进行点扩散函数的去卷积处理 (对于已知空间几何参数的样品, 如果其投影角度等参数也已知的話, 就可以计算出其理论上的点扩展函数, 但是实际情况是样品的空间几何参数是未知的); 更常用的方法是对二维投影图的傅里叶变换的不同频率进行加权处理, 然后在实空间中进行反投影操作, 这就是著名的加权背投影算法。代数重构算法 (algebraic reconstruction technique, ART) 基于与傅立叶重构、背投影算法截然不同的重构思想, 是完全在实空间中进行的, 其基本的出发点就是建立三维物体中所有点的密度与投影图中所有点的密度之前的线性方程组, 通过求解线性方程组得到三维模型, 使得该模型从各个方向的投影图像与实测二维投影图像尽量接近。ART 算法的重构过程可以这样来描述: 建立一定重构条件下的初始模型, 对初始模型从各个方向进行投影 (计算值, 与真实的投影角度对应), 然后比较计算投影图和真实投影图, 根据差值对模型进行修正, 如此反复迭代得到最终重构结果, 因此 ART 算法也叫做代数迭代算法。通常的代数迭代特指逐线迭代, 其典型的迭代公式如下:

$$x_j^{k+1} = x_j^k + \lambda w_y (p_i - \sum_{j=1}^N w_y x_j^k) / \sum_{j=1}^N w_i^2 \quad (2)$$

式中, λ 为松弛参数, w_{ij} 代表像素值 x_j 对射线投影 p_i 的贡献。该迭代算法在校正过程中只考虑一条射线的投影和该射线所经过的像素点, 更新原则为逐线校正, 其收敛速度快, 但随机误差较大。在此基础上, Gilbert 等提出了同步迭代算法 (SIRT), 其典型的迭代公式如下:

$$x_j^{k+1} = x_j^k + \frac{\lambda}{\sum_{j=1}^M w_{ij} x_j^k} \sum_{j=1}^M \frac{w_{ij} (p_i - \sum_{j=1}^N w_{ij} x_j^k)}{\sum_{j=1}^N w_{ij}} \quad (3)$$

迭代过程中, 每个像素点的更新都用到所经过该点的射线, 所以 SIRT 的校正过程为逐点校正, 收敛速度极慢, 但该算法能有效抑制单条射线引入的随机误差, 在数据不完整或误差较大时, 该算法是所有重构技术中性能最优的。

7.2 柱坐标与球坐标下的傅立叶三维重构

在对具有二十面体对称性的病毒结构进行三维重构计算中, 二十面体对称性的特点可以被有效利用。传统的二十面体三维重构算法是由 Crowther 教授提出的, 其基本原理是将傅立叶从直角坐标下变换到柱坐标下进行, 这个变换就是著名的傅立叶-柱贝塞尔变换^[110,134]。在柱坐标下, 被选做 z 轴的二十面体五次旋转轴可以被有效利用, 然而二十面体的三次和二次旋转轴的特性没有充分发挥出来, 因此湘潭大学的刘洪荣和杨奇斌等将三维重构过程放到球坐标中进行, 用二十面体对称性匹配函数替代传统算法中的指数函数对傅立叶空间进行内插, 变传统的傅立叶-柱贝塞尔变换为傅立叶-球贝塞变换, 在此基础上, 他们提出了一种基于球坐标的二十面体三维重构算法 ISAF^[135], 从测试数据上来看, 相对于 Crowther 等的传统算法, ISAF 能够显著抑制噪声并提高重构分辨率。在本研究组的合作下, 中国科学院计算技术研究所的王功明和张法等目前也独立完成了 ISAF 的算法实现, 并在刘洪荣的算法基础上做了大量改进, 计算速度大大加快 (待发表)。

7.3 缺失椎问题

在单颗粒分析当中, 如果大分子颗粒的取向分布不均匀, 具有明显的取向优势, 或者在电子断层三维重构当中, 只能收集从 $-70^\circ \sim +70^\circ$ 度的数据, 以上两种情况都会导致一个相同的问题——进行三维重构时, 傅立叶空间中的点不能被完全填充, 产生了信息缺失。这种信息缺失会导致单颗粒三维重构得到不正确的模型, 以致电子断层三维重构的结果表现出各向异性。它在电子断层三维重构中叫做缺失椎 (missing cone) 或者缺失楔 (missing wedge), 通过收集双轴旋转的数据可以在一定程度上弥补这个问题, 但不能完全消除。对于大分子颗粒的单颗粒分析, 用传统的办法很难解决其取向优势问题, 需要使用 RCT (random-conical tilt) 的办法收集数据^[136]: 倾斜样品至 $45^\circ \sim 60^\circ$ 度, 采集第一张图片, 然后在 0° 度采集同一位置的第二张图片, 分别挑出水平和倾斜时图片中的颗粒, 并一一对应, 利用水平图片中的颗粒进行图像匹配分类并求解取向参数, 然后利用倾斜图片中的颗粒进行三维重构。RCT 方法常用于获得正确的初始模型, 但在取向优势严重的情况下, 也存在做缺失椎问题。现在可以利用电子断层三维重构技术结合三维图像分类平均技术来替代 RCT 方法获得准确度更高的初始模型。

8 三维图像分子识别、分类与平均技术

电镜三维密度图的分子识别、分类与平均技术是进一步拓展电子断层技术应用范围与提高重构分辨率的强大手段。这些手段的成功应用弥补了活体细胞或细胞器三维结构与离体的生物分子高分辨率结构之间的沟壑,使人们能够获得生物大分子复合体在细胞内部的天然结构。

分子识别技术主要借鉴了工程学上诸多模式识别的方法,其中比较常用的是交互相关法(cross-correlation techniques)。这种方法通常需要模板才能完成,一般来说模板来自于其他手段(如 X 射线晶体学和单颗粒三维重构)获得的较高分辨率的三维结构;在没有任何已知高分辨结构时,也可以用电子断层三维重构得到的密度图中生物大分子颗粒作为模板进行识别。由于电子断层数据分辨率较低、图像噪音大、并且具有各向异性,这三维分子识别带来诸多困难。2002 年, Baumeister 研究小组^[137]发表了基于模板的相关识别算法,成功区分了囊泡内的不同组分复合物,证明了这种方法的可行性;同年该研究组还报道了真核细胞 *Dictyostelium* 的电子断层三维结构,观察到生物大分子在细胞内的复杂网络构架,并对核糖体和 26S 蛋白酶体进行了原位识别^[40]。

对电子断层三维图像进行分类分析,最普通的方法就是对单颗粒三维重构中二维图像多元统计分析的拓展^[138,139],但这类方法都是在实空间中进行处理,无法考虑缺失锥的问题。近年不断有文章报道针对缺失锥问题而设计的三维图像分类方法: Frangakis 等^[137]采用了将相关函数值限制在非缺失锥区域的方法,以此来减少缺失锥造成的匹配错误; Forster^[140,141]和 Schmid 等^[142]在后来报道的方法中采用了类似的处理手段。但这些方法都是采用穷尽搜索的方法,非常耗时。Bartesaghi 等^[143]在 2008 年报道了基于谐波分析的分类方法,使得分类速度大大提高,同时他们采用了一种迭代匹配的方法,这是一种无参照(reference-free)的分类算法。无参照的分类方法由于能够直接从重构结果中得到不同结构的生物分子或同一分子的不同构象,所以在三维密度的分类问题上具有重要意义。

对成功识别和分类的三维密度进行同类颗粒的密度平均可以有效的提高重构分辨率。密度平均可以在实空间或傅里叶空间中进行,在傅立叶空间可以有效处理缺失楔问题。2003 年 Grunewald 等^[144]获得单纯疱疹病毒(herpes simplex virus)电子断层结构并利用三维密度平均的技术对核蛋白壳(nucleocapsid)进行计算处理,极大的提高了重构分辨率,保证了结构分析的可靠性。Forster 等^[140]发展了一种迭代三维平均算法并考虑缺失楔,利用此方法他们获得了小鼠白血病逆转录酶病毒(moloney murine leukemia retrovirus)包膜蛋白(envelope protein)三聚体复合物 2.7 nm 分辨率的三维结构。生物物理所朱平研究员^[145]2006 年利用电子断层和三维平均技术获得 AIDS 病毒包膜糖蛋白突起(envelope glycoprotein spikes)的三维结构及其分布。

随着电子断层技术的发展,三维密度的分子识别、分类和平均等技术将获得更广泛的应用和推广。

9 三维密度图的后处理与分析技术

9.1 滤波技术

由于电镜图像在数据收集时剂量很低、三维重构过程中参数计算存在误差、电子断层数据信息不全等原因, 最终的三维重构图像具有非常大的噪音, 这些噪音可以通过滤波的方法得到抑制。一般来说, 滤波可以在重构前或重构后进行。重构前滤波处理是针对二维投影图的, 比如在挑颗粒前对图像进行滤波处理可以降低噪音、增加图像对比度、减少出错几率^[146]。对重构后的三维图像进行适当的滤波处理是非常重要的, 常用的滤波技术有均值滤波、中值滤波、高斯平滑、高通和低通滤波、各向异性滤波、双边滤波以及小波滤波等^[147~150]。非线性各向异性滤波综合了噪音抑制和边界增强两种优势, 在电子断层三维重构图的后期处理中得到广泛应用。

9.2 振幅校正技术

在电镜成像过程中, 样品的结构因子被衬度传递函数调制, 重构时需要校正。上面讲到的 CTF 校正仅仅完成了原始图像的结构因子相位校正, 最终的三维重构模型由于高分辨率处的结构因子振幅严重衰减, 导致高分辨率细节信息无法凸显, 因此必须对三维重构模型进行振幅校正。一种有效的方法是: 根据 X 射线小角散射实验或者基于同源结构模型的理论计算所获得的结构振幅对不同分辨率壳层的分布曲线对三维重构结果进行振幅校正^[151]; 另外一种办法是 Rosenthal 等^[76,152]提出的温度因子校正法, 他们开发的程序 EM-BFACTOR 可以直接根据三维重构密度图计算出合适的负温度因子, 并用该负温度因子来调制结构因子在高频的振幅信息, 以达到锐化三维重构密度图的目的。

9.3 密度分割与显示技术

电镜三维重构得到的密度图是一个整体, 如何有效地将这个整体的每一个部分准确地分割出来历来都是研究人员关心的问题。密度分割有手动和自动两种方式。IMOD 程序^[107]采用了手动建模的分割方式, 这种方式的最大优势是用户可以凭借先验知识对电子断层得到的密度图通过肉眼来识别和区分不同的细胞器或细胞器不同组成部分。Chimera 是 UCSF 开发的一个功能强大的三维重构密度图可视化和分析软件包^[153,154], 该软件提供了非常方便的三维密度图手动分割功能。在本研究组的指导协作下, 中国科学院网络中心的单桂华、刘俊等设计了针对电镜三维重构密度的可视化和分析程序 (VAT4M), 尤其是实现了针对病毒二十面体对称性结构的自动密度分割 (待发表)。

对电镜三维重构得到的密度进行有效显示对于研究人员分析生物分子的结构特征和相互作用关系至关重要。显示分为体绘制和面绘制: 面绘制只描绘三维密度在特定值下的等势面, 并不关心整个物体的密度分布情况; 而体绘制则要在显示时考虑整个物体各个部分的密度信息, 计算比较耗时。Chimera 是一款比较常用的面绘制的显示软件。VAT4M 除了能够实现类似于 Chimera 的面绘制功能以外, 还整合了最新的体绘制技术^[155~157], 本研究组和中国科学院网络中心利用 VAT4M 软件对兔出血症病毒的低温单颗粒三维重构图进行绘制和分析, 相关效果图作为 Protein & Cell 杂志的创刊封面被发表^[158]。

10 基于三维重构密度图的结构建模

生物大分子的晶体结构只能反映其在特定环境下的一种稳定构象,其多种功能态的构象很难通过晶体学方法获得,这一点可以被电镜三维重构技术所弥补,然而电镜三维重构得到的三维结构目前还难以达到原子分辨率,直接通过三维密度来分析复合体的组织方式、各亚基之间相互作用模式、不同功能态之间的构象变化等还比较困难。同源建模与分子动力学在没有实验数据约束的情况下可以得到生物大分子的原子模型及其构象变化,但由于理论模型的局限、计算能力的有限,所得到的模型在没有实验数据辅助的情况下,往往不是非常令人信服。最近几年,将高分辨晶体结构(或 NMR 结构)、电镜三维重构密度图和计算生物手段相结合的建模方法被发展出来,这些方法以高分辨原子结构为基础,同时以电镜密度图作为约束,保证了所搭建的原子模型的可靠性,极大地拓展了人们从电镜密度图中所能获取的信息。

Gao 等^[159,160]发展了一种实空间修正的结构建模方法,该方法以结构修正程序 RsRef^[161]和 TNT^[162]为基础来实现基于电镜密度图的原子模型修正,通过交互相关系数、R 因子以及密度残差来评价实空间修正的结果;利用这种方法, Gao 等对大肠杆菌核糖体电镜密度图进行结构建模,发现了核糖体翻译过程不同功能态之间类似齿轮运动的结构变化,揭示了核糖体蛋白在翻译过程中帮助核糖体运动的重要作用^[159]。Wriggers 等^[163]于 1999 年发表了将高分辨晶体结构拟合到较低分辨率电镜密度图的 Situs 程序,之后他们利用 Normal mode 方法^[164]又进一步将程序改进,以修正与电镜密度有偏离的原子结构模型。Tama 等^[165]于 2004 年在 Normal mode 基础上进行改进,将生物分子看作一个可塑弹性网络(deformable elastic network, DEN)以实现基于低分辨电镜密度图的较精确的原子结构建模,他们发现这种方法可以应用到多尺度分辨率的结构模型中而不失其准确性。Schroder 等^[166]又于 2007 年报道了一种将可塑弹性网络模型与几何构象采样算法(geometry-based conformational sampling algorithm)结合的实空间修正方法。Chiu 研究小组^[167]利用 Schroder 等的程序 DirX 构建了二型分子伴侣 Mm-cpn 4.3Å 电镜结构的原子模型,这是目前中等对称性样品最高分辨率的电镜模型。将结构预测和电镜密度结合建模也是一种十分有效的方法:Velazquez-Muriel 等将蛋白超家族在结构进化上的信息利用到基于密度图的结构建模上;Baker 研究小组^[168]利用其开发的结构预测软件 Rosetta,在电镜密度图约束下进行建模,对 4Å~10Å 分辨率的电镜密度图能够得到比较精确的原子模型。另一类基于电镜密度的建模方法是与分子动力学结合:这类方法中比较典型的是 Modeller 程序^[169]以及 Trabuco 等开发的 MDFF 程序^[170,171]。最近, Zhu 等^[172]报道了与同源建模和多尺度结构修正相结合的电镜密度建模方法(electron microscopy-iterative modular optimization, EM-IMO),这个方法允许用户自己根据观察结果设置修正参数,大大加速了结构修正速度。

以上就是对电镜三维重构技术当前发展和前沿的总结,可以看出无论在样品制备、仪器性能和数据收集处理自动化水平,还是在图像处理技术、计算规模和能力以及重构结果分析处理技术上,电镜三维重构技术在近年来取得了重大进展,在生命科学研究领域进行了大量而重要的应用。非常明显,获取高分辨率(原子分辨率)的三维结构是电镜三维重

构技术发展的重要目标, 要实现这个目标, 还需要在样品制备 (提高样品的均一性)、仪器性能 (增强获取高分辨率信息的能力) 和图像处理算法 (更加有效的分类算法, 三维重构算法在高分辨率时的 Ewald 校正, 厚样品的电子衍射动力学校正等) 等方面做出新的突破, 可以预计, 这样的突破在未来的 4~6 年内是有可能的。此外, 在拓展研究尺度方面, 目前正在发展的光电联合技术 (correlative light microscopy and electron microscopy)、扫描透射电子显微技术 (scanning transmission electron microscopy) 和双束扫描电子显微技术 (dual beam scanning electron microscopy) 将成为电镜三维重构研究的新的增长点, 未来几年内这些技术将在生命科学研究领域产生众多应用, 进一步拉近结构生物学与细胞生物学在研究尺度上和研究分辨率上的距离。

参考文献:

1. 邹承鲁. 结构生物学的时代已经开始. *科技导报*, 1995, 4
2. Sali A, Glaeser R, Earnest T, Baumeister W. From words to literature in structural proteomics. *Nature*, 2003, 422 (6928): 216~225
3. Alber F, Dokudovskaya S, Veenhoff LM, Zhang W, Kipper J, Devos D, Suprpto A, Karni-Schmidt O, Williams R, Chait BT, Rout MP, Sali A. Determining the architectures of macromolecular assemblies. *Nature*, 2007, 450(7170): 683~694
4. DeRosier D J KAN. Reconstruction of Three Dimensional Structures from Electron Micrographs. *Nature*, 1968, 217: 130~134
5. Adrian M, Dubochet J, Lepault J, McDowell AW. Cryo-electron microscopy of viruses. *Nature*, 1984, 308(5954): 32~36
6. De Rosier WC, J.Frank. Electron Crystallography of Biological Macromolecules. 2007
7. Henderson R, Baldwin JM, Ceska TA, Zemlin F, Beckmann E, Downing KH. An atomic model for the structure of bacteriorhodopsin. *Biochem Soc Trans*, 1990, 18(5): 844
8. Ubarretxena-Belandia I, Baldwin JM, Schuldiner S, Tate CG. Three-dimensional structure of the bacterial multidrug transporter EmrE shows it is an asymmetric homodimer. *EMBO J*, 2003, 22(23): 6175~6181
9. Leifer D, Henderson R. Three-dimensional structure of orthorhombic purple membrane at 6.5 Å resolution. *J Mol Biol*, 1983, 163(3): 451~466
10. Rhee KH, Morris EP, Barber J, Kuhlbrandt W. Three-dimensional structure of the plant photosystem II reaction centre at 8 Å resolution. *Nature*, 1998, 396 (6708): 283~286
11. Stahlberg H, Braun T, de Groot B, Philippsen A, Borgnia MJ, Agre P, Kuhlbrandt W, Engel A. The 6.9-Å structure of GlpF: a basis for homology modeling of the glycerol channel from *Escherichia coli*. *J Struct Biol*, 2000, 132(2): 133~141
12. Auer M, Scarborough GA, Kuhlbrandt W. Three-dimensional map of the plasma membrane H⁺-ATPase in the open conformation. *Nature*, 1998, 392(6678): 840~843
13. 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
14. Nogales E, Wolf SG, Downing KH. Structure of the alpha beta tubulin dimer by electron crystallography. *Nature*, 1998, 391(6663): 199~203
15. Miyazawa A, Fujiyoshi Y, Unwin N. Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature*, 2003, 423(6943): 949~955
16. Yonekura K, Maki-Yonekura S, Namba K. Complete atomic model of the bacterial flagellar filament by electron cryomicroscopy. *Nature*, 2003, 424(6949): 643~650
17. Li H, DeRosier DJ, Nicholson WV, Nogales E, Downing KH. Microtubule structure at 8 Å resolution. *Structure*, 2002, 10(10): 1317~1328
18. 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
19. Frank J. Single-particle imaging of macromolecules by cryo- electron microscopy. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 2002, 31: 303~319
20. Llorca O. Introduction to 3D reconstruction of macromolecules using single particle electron microscopy. *Acta Pharmacol Sin*, 2005, 26(10): 1153~1164
21. Ludtke SJ, Baldwin PR, Chiu W. EMAN: semiautomated software for high-resolution single-particle reconstructions. *J Struct Biol*, 1999, 128(1): 82~97
22. Tang G, Peng L, Baldwin PR, Mann DS, Jiang W, Rees I, Ludtke SJ. EMAN2: an extensible image processing suite for electron microscopy. *J Struct Biol*, 2007, 157(1): 38~46
23. Frank J, Radermacher M, Penczek P, Zhu J, Li Y, Ladjadj 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
24. Baxter WT, Leith A, Frank J. SPIRE: the SPIDER reconstruction engine. *J Struct Biol*, 2007, 157(1): 56~63
25. Yang C, Penczek PA, Leith A, Asturias FJ, Ng EG, Glaeser RM, Frank J. The parallelization of SPIDER on distributed-memory computers using MPI. *J Struct Biol*, 2007, 157(1): 240~249
26. Liang Y, Ke EY, Zhou ZH. IMIRS: a high-resolution 3D reconstruction package integrated with a relational image database. *J Struct Biol*, 2002, 137(3): 292~304
27. Grigorieff N. FREALIGN: high-resolution refinement of single particle structures. *J Struct Biol*, 2007, 157(1): 117~125
28. van Heel M, Keegstra W. IMAGIC: a fast, flexible and friendly image analysis software system. *Image formation and image analysis in electron microscopy*, 1981: 63
29. van Heel M, Harauz G, Orlova E, Schmidt R, Schatz M. A new generation of the IMAGIC image processing system. *Journal of Structural Biology*, 1996, 116(1): 17~24
30. Yan X, Sinkovits RS, Baker TS. AUTO3DEM—an automated and high throughput program for image reconstruction of icosahedral particles. *J Struct Biol*, 2007, 157(1): 73~82
31. Sorzano CO, Marabini R, Velazquez-Muriel J, Bilbao-Castro JR, Scheres SH, Carazo JM, Pascual-Montano A. XMIPP: a new generation of an open-source image processing package for electron microscopy. *J Struct Biol*, 2004, 148(2): 194~204
32. 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
33. Mancini EJ, Clarke M, Gowen BE, Rutten T, Fuller SD. Cryo-electron microscopy reveals the functional organization of an enveloped virus, Semliki Forest virus. *Mol Cell*, 2000, 5(2): 255~266
34. 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
35. Zhang X, Walker SB, Chipman PR, Nibert ML, Baker TS. Reovirus polymerase lambda 3 localized by cryo-electron microscopy of virions at a resolution of 7.6 Å. *Nat Struct Biol*, 2003, 10(12): 1011~1018
36. 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
37. Sharma MR, Koc EC, Datta PP, Booth TM, Spremulli LL, Agrawal RK. Structure of the mammalian mitochondrial ribosome reveals an expanded functional role for its component proteins. *Cell*, 2003, 115(1): 97~108
38. Rubinstein JL, Walker JE, Henderson R. Structure of the mitochondrial ATP synthase by electron cryomicroscopy. *EMBO J*, 2003, 22(23): 6182~6192
39. McEwen BF, Marko M. The emergence of electron tomography as an important tool for investigating cellular ultrastructure. *J Histochem Cytochem*, 2001, 49(5): 553~564
40. 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
41. Milne JL, Subramaniam S. Cryo-electron tomography of bacteria: progress, challenges and future prospects. *Nat Rev Microbiol*, 2009, 7(9): 666~675
42. Zhang X, Settembre E, Xu C, Dormitzer PR, Bellamy R, Harrison SC, Grigorieff N. Near-atomic resolution using electron cryomicroscopy and single-particle reconstruction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(6): 1867~1872
43. Jiang W, Baker ML, Jakana J, Weigle PR, King J, Chiu W. Backbone structure of the infectious epsilon15 virus capsid revealed by electron cryomicroscopy. *Nature*, 2008, 451(7182): 1130~1134
44. Yu X, Jin L, Zhou ZH. 3.88 Å structure of cytoplasmic polyhedrosis virus by cryo-electron microscopy. *Nature*, 2008, 453(7193): 415~419
45. Chen JZ, Settembre EC, Aoki ST, Zhang X, Bellamy AR, Dormitzer PR, Harrison SC, Grigorieff N. Molecular interactions in rotavirus assembly and uncoating seen by high-resolution cryo-EM. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(26): 10644~10648
46. Wolf M, Garcea RL, Grigorieff N, Harrison SC. Subunit interactions in bovine papillomavirus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010
47. Zhang X, Jin L, Fang Q, Hui WH, Zhou ZH. 3.3 Å cryo-EM structure of a nonenveloped virus reveals a priming mechanism for cell entry. *Cell*, 2010, 141(3): 472~482
48. Ludtke SJ, Baker ML, Chen DH, Song JL, Chuang DT, Chiu W. De novo backbone trace of GroEL from single particle electron cryomicroscopy. *Structure*, 2008, 16(3): 441~448
49. Zhang J, Baker ML, Schroder GF, Douglas NR, Reissmann S, Jakana J, Dougherty M, Fu CJ, Levitt M, Ludtke SJ, Frydman J, Chiu W. Mechanism of folding chamber closure in a group II chaperonin. *Nature*, 2010, 463(7279): 379~383
50. Frank J, Verschoor A, Boublik M. Multivariate statistical analysis of ribosome electron micrographs. L and R lateral views of the 40 S subunit from HeLa cells. *J Mol Biol*, 1982, 161(1): 107~133
51. Frank J, Breaudiere JP, Carazo JM, Verschoor A, Wagenknecht T. Classification of images of biomolecular assemblies: a study of ribosomes and ribosomal subunits of *Escherichia coli*. *J Microsc*, 1988, 150(Pt 2): 99~115
52. Wagenknecht T, Carazo JM, Radermacher M, Frank J. Three-dimensional reconstruction of the ribosome from *Escherichia coli*. *Biophys J*, 1989, 55(3): 455~464
53. Frank J, Zhu J, Penczek P, Li Y, Srivastava S, Verschoor A, Radermacher M, Grassucci R, Lata RK, Agrawal RK.

- A model of protein synthesis based on cryo-electron microscopy of the *E. coli* ribosome. *Nature*, 1995, 376(6539): 441~444
54. Frank J, Verschoor A, Li Y, Zhu J, Lata RK, Radermacher M, Penczek P, Grassucci R, Agrawal RK, Srivastava S. A model of the translational apparatus based on a three-dimensional reconstruction of the *Escherichia coli* ribosome. *Biochem Cell Biol*, 1995, 73 (11-12): 757~765
 55. Stark H, Mueller F, Orlova EV, Schatz M, Dube P, Erdemir T, Zemlin F, Brimacombe R, van Heel M. The 70S *Escherichia coli* ribosome at 23 Å resolution: fitting the ribosomal RNA. *Structure*, 1995, 3(8): 815~821
 56. Ban N, Freeborn B, Nissen P, Penczek P, Grassucci RA, Sweet R, Frank J, Moore PB, Steitz TAA. A 9 Å resolution X-ray crystallographic map of the large ribosomal subunit. *Cell*, 1998, 93(7): 1105~1115
 57. Villa E, Sengupta J, Trabuco LG, LeBarron J, Baxter WT, Shaikh TR, Grassucci RA, Nissen P, Ehrenberg M, Schulten K, Frank J. Ribosome-induced changes in elongation factor Tu conformation control GTP hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(4): 1063~1068
 58. Schuette JC, Murphy FVt, Kelley AC, Weir JR, Giesebrecht J, Connell SR, Loerke J, Mielke T, Zhang W, Penczek PA, Ramakrishnan V, Spahn CM. GTPase activation of elongation factor EF-Tu by the ribosome during decoding. *EMBO J*, 2009, 28(6): 755~765
 59. Becker T, Bhushan S, Jarasch A, Armache JP, Funes S, Jossinet F, Gumbart J, Mielke T, Berninghausen O, Schulten K, Westhof E, Gilmore R, Mandon EC, Beckmann R. Structure of monomeric yeast and mammalian Sec61 complexes interacting with the translating ribosome. *Science*, 2009, 326 (5958): 1369~1373
 60. Seidelt B, Innis CA, Wilson DN, Gartmann M, Armache JP, Villa E, Trabuco LG, Becker T, Mielke T, Schulten K, Steitz TA, Beckmann R. Structural insight into nascent polypeptide chain-mediated translational stalling. *Science*, 2009, 326(5958): 1412~1415
 61. 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
 62. Perkins G, Renken C, Martone ME, Young SJ, Ellisman M, Frey T. Electron tomography of neuronal mitochondria: three-dimensional structure and organization of cristae and membrane contacts. *J Struct Biol*, 1997, 119(3): 260~272
 63. Zhao Q, Ofverstedt LG, Skoglund U, Isaksson LA. Morphological variation of individual *Escherichia coli* 30S ribosomal subunits *in vitro* and *in situ*, as revealed by cryo-electron tomography. *Exp Cell Res*, 2004, 297 (2): 495~507
 64. Zhao Q, Ofverstedt LG, Skoglund U, Isaksson LA. Morphological variation of individual *Escherichia coli* 50S ribosomal subunits *in situ*, as revealed by cryo-electron tomography. *Exp Cell Res*, 2004, 300(1): 190~201
 65. 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
 66. 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
 67. Fujiyoshi Y. High resolution cryo-electron microscopy for biological macromolecules. *J Electron Microsc (Tokyo)*, 1989, 38 Suppl: S97~101
 68. Fujiyoshi Y. The structural study of membrane proteins by electron crystallography. *Adv Biophys*, 1998, 35: 25~80
 69. Iancu CV, Wright ER, Heymann JB, Jensen GJ. A comparison of liquid nitrogen and liquid helium as cryogens for electron cryotomography. *J Struct Biol*, 2006, 153(3): 231~240
 70. Danev R, Nagayama K. Transmission electron microscopy with Zernike phase plate. *Ultramicroscopy*, 2001, 88(4): 243~252
 71. Fukuda Y, Fukazawa Y, Danev R, Shigemoto R, Nagayama K. Tuning of the Zernike phase-plate for visualization of detailed ultrastructure in complex biological specimens. *J Struct Biol*, 2009, 168(3): 476~484
 72. Faruqi AR, Henderson R. Electronic detectors for electron microscopy. *Curr Opin Struct Biol*, 2007, 17(5): 549~555
 73. de Jonge N, Peckys DB, Kremers GJ, Piston DW. Electron microscopy of whole cells in liquid with nanometer resolution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106 (7): 2159~2164
 74. Hekking LH, Lebbink MN, De Winter DA, Schneijdenberg CT, Brand CM, Humbel BM, Verkleij AJ, Post JA. Focused ion beam-scanning electron microscope: exploring large volumes of atherosclerotic tissue. *J Microsc*, 2009, 235(3): 336~347
 75. Chen JZ, Sachse C, Xu C, Mielke T, Spahn CM, Grigorieff N. A dose-rate effect in single-particle electron microscopy. *J Struct Biol*, 2008, 161(1): 92~100
 76. Rosenthal PB, Henderson R. Optimal determination of particle orientation, absolute hand, and contrast loss in single-particle electron cryomicroscopy. *J Mol Biol*, 2003, 333(4): 721~745
 77. Henderson R. Realizing the potential of electron cryo-microscopy. *Q Rev Biophys*, 2004, 37(1): 3~13
 78. 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
 79. Suloway C, Pulokas J, Fellmann D, Cheng A, Guerra F, Quispe J, Stagg S, Potter CS, Carragher B. Automated molecular microscopy: the new Leginon system. *J Struct Biol*, 2005, 151(1): 41~60
 80. Suloway C, Shi J, Cheng A, Pulokas J, Carragher B, Potter CS, Zheng SQ, Agard DA, Jensen GJ. Fully

- automated, sequential tilt-series acquisition with Leginon. *J Struct Biol*, 2009, 167(1): 11~18
81. Lei J, Frank J. Automated acquisition of cryo-electron micrographs for single particle reconstruction on an FEI Tecnai electron microscope. *J Struct Biol*, 2005, 150(1): 69~80
82. Zhang J, Nakamura N, Shimizu Y, Liang N, Liu X, Jakana J, Marsh MP, Booth CR, Shinkawa T, Nakata M, Chiu W. JADAS: a customizable automated data acquisition system and its application to ice-embedded single particles. *J Struct Biol*, 2009, 165(1): 1~9
83. Stagg SM, Lander GC, Pulokas J, Fellmann D, Cheng A, Quispe JD, Mallick SP, Avila RM, Carragher B, Potter CS. Automated cryoEM data acquisition and analysis of 284742 particles of GroEL. *J Struct Biol*, 2006, 155(3): 470~481
84. Nicholson WV, Glaeser RM. Review: automatic particle detection in electron microscopy. *J Struct Biol*, 2001, 133(2-3): 90~101
85. Mallick SP, Zhu Y, Kriegman D. Detecting particles in cryo-EM micrographs using learned features. *Journal of Structural Biology*, 2004, 145(1-2): 52~62
86. Lander GC, Stagg SM, Voss NR, Cheng A, Fellmann D, Pulokas J, Yoshioka C, Irving C, Mulder A, Lau PW, Lyumkis D, Potter CS, Carragher B. Appion: an integrated, database-driven pipeline to facilitate EM image processing. *J Struct Biol*, 2009, 166(1): 95~102
87. Plaisier JR, Koning RI, Koerten HK, Heel Mv, Abrahams JP. TYSON: Robust searching, sorting, and selecting of single particles in electron micrographs. *Journal of Structural Biology*, 2004, 145(1-2): 76~83
88. Short JM. SLEUTH-a fast computer program for automatically detecting particles in electron microscope images. *Journal of Structural Biology*, 2004, 145(1-2): 100~110
89. Roseman AM. FindEM--a fast, efficient program for automatic selection of particles from electron micrographs. *Journal of Structural Biology*, 2004, 145(1-2): 91~99
90. Woolford D, Erickson G, Rothnagel R, Muller D, Landsberg MJ, Pantelic RS, McDowall A, Pailthorpe B, Young PR, Hankamer B, Banks J. SwarmPS: rapid, semi-automated single particle selection software. *J Struct Biol*, 2007, 157(1): 174~188
91. Voss NR, Yoshioka CK, Radermacher M, Potter CS, Carragher B. DoG Picker and TiltPicker: software tools to facilitate particle selection in single particle electron microscopy. *J Struct Biol*, 2009, 166(2): 205~213
92. Plaisier JR, Jiang L, Abrahams JP. Cyclops: new modular software suite for cryo-EM. *J Struct Biol*, 2007, 157(1): 19~27
93. Chen JZ, Grigorieff N. SIGNATURE: a single-particle selection system for molecular electron microscopy. *J Struct Biol*, 2007, 157(1): 168~173
94. Kivioja T, Ravantti J, Verkhovsky A, Ukkonen E, Bamford D. Local average intensity-based method for identifying spherical particles in electron micrographs. *J Struct Biol*, 2000, 131(2): 126~134
95. Sorzano CO, Recarte E, Alcorlo M, Bilbao-Castro JR, San-Martin C, Marabini R, Carazo JM. Automatic particle selection from electron micrographs using machine learning techniques. *J Struct Biol*, 2009, 167(3): 252~260
96. Rath BK, Frank J. Fast automatic particle picking from cryo-electron micrographs using a locally normalized cross-correlation function: a case study. *Journal of Structural Biology*, 2004, 145(1-2): 84~90
97. Zheng SQ, Keszthelyi B, Branlund E, Lyle JM, Braunfeld MB, Sedat JW, Agard DA. UCSF tomography: an integrated software suite for real-time electron microscopic tomographic data collection, alignment, and reconstruction. *J Struct Biol*, 2007, 157(1): 138~147
98. Nickell S, Forster F, Linaroudis A, Net WD, Beck F, Hegerl R, Baumeister W, Plitzko JM. TOM software toolbox: acquisition and analysis for electron tomography. *J Struct Biol*, 2005, 149(3): 227~234
99. Mastronarde D. SerialEM A Program for Automated Tilt Series Acquisition on Tecnai Microscopes Using Prediction of Specimen Position. *Microscopy and Microanalysis*, 2003, 9(S02): 1182~1183
100. Spiegelhalter C, Tosch V, Hentsch D, Koch M, Kessler P, Schwab Y, Laporte J. From dynamic live cell imaging to 3D ultrastructure: novel integrated methods for high pressure freezing and correlative light-electron microscopy. *PLoS One*, 2010, 5(2): e9014
101. Boncompagni S, Rossi AE, Micaroni M, Beznoussenko GV, Polishchuk RS, Dirksen RT, Protasi F. Mitochondria are linked to calcium stores in striated muscle by developmentally regulated tethering structures. *Mol Biol Cell*, 2009, 20(3): 1058~1067
102. Hurbain I, Geerts WJ, Boudier T, Marco S, Verkleij AJ, Marks MS, Raposo G. Electron tomography of early melanosomes: implications for melanogenesis and the generation of fibrillar amyloid sheets. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(50): 19726~19731
103. Fernandez JJ. High performance computing in structural determination by electron cryomicroscopy. *J Struct Biol*, 2008, 164(1): 1~6
104. Heymann JB, Belnap DM. Bsoft: image processing and molecular modeling for electron microscopy. *J Struct Biol*, 2007, 157(1): 3~18
105. Heymann JB, Cardone G, Winkler DC, Steven AC. Computational resources for cryo-electron tomography in Bsoft. *J Struct Biol*, 2008, 161(3): 232~242
106. Mastronarde DN. Dual-axis tomography: an approach with alignment methods that preserve resolution. *Journal of Structural Biology*, 1997, 120(3): 343~352
107. Kremer JR, Mastronarde DN, McIntosh JR. Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD. *J Struct Biol*, 1996, 116(1): 71~76
108. Chen H, Hughes DD, Chan TA, Sedat JW, Agard DA. IVE (Image Visualization Environment): a software

- platform for all three-dimensional microscopy applications. *J Struct Biol*, 1996, 116(1): 56~60
109. Castano Diez D, Mueller H, Frangakis AS. Implementation and performance evaluation of reconstruction algorithms on graphics processors. *J Struct Biol*, 2007, 157(1): 288~295
 110. Erickson H, Klug A. The Fourier transform of an electron micrograph: effects of defocussing and aberrations, and implications for the use of underfocus contrast enhancement. *Phil Trans Roy Soc Lond B*, 1970, 261: 105~118
 111. Brink J, Chiu W. Contrast analysis of cryo-images of n-paraffin recorded at 400 kV out to 2.1 Å resolution. *Journal of Microscopy*, 1991, 161(Pt 2): 279
 112. Glaeser R, Downing K. Assessment of resolution in biological electron crystallography. *Ultramicroscopy*, 1992, 47(1-3): 256
 113. Mindell JA, Grigorieff N. Accurate determination of local defocus and specimen tilt in electron microscopy. *J Struct Biol*, 2003, 142(3): 334~347
 114. Mallick SP, Carragher B, Potter CS, Kriegman DJ. ACE: automated CTF estimation. *Ultramicroscopy*, 2005, 104(1): 8~29
 115. Fernandez JJ, Li S, Crowther RA. CTF determination and correction in electron cryotomography. *Ultramicroscopy*, 2006, 106(7): 587~596
 116. Xiong Q, Morphew MK, Schwartz CL, Hoenger AH, Mastronarde DN. CTF determination and correction for low dose tomographic tilt series. *J Struct Biol*, 2009, 168(3): 378~387
 117. Penczek P, Radermacher M, Frank J. Three-dimensional reconstruction of single particles embedded in ice. *Ultramicroscopy*, 1992, 40(1): 33~53
 118. Joyeux L, Penczek PA. Efficiency of 2D alignment methods. *Ultramicroscopy*, 2002, 92(2): 33~46
 119. Cong Y, Kovacs JA, Wriggers W. 2D fast rotational matching for image processing of biophysical data. *J Struct Biol*, 2003, 144(1-2): 51~60
 120. Frank J, Goldfarb W, Eisenberg D, Baker T. Reconstruction of glutamine synthetase using computer averaging. *Ultramicroscopy*, 1978, 3: 283~290
 121. Schatz M, Van Heel M. Invariant recognition of molecular projections in vitreous ice preparations. *Ultramicroscopy*, 1992, 45(1): 15~22
 122. van Heel M, Schatz M, Orlova E. Correlation functions revisited. *Ultramicroscopy*, 1992, 46(1-4): 307~316
 123. Van Heel M, Frank J. Use of multivariate statistics in analysing the images of biological macromolecules. *Ultramicroscopy*, 1981, 6(2): 187~194
 124. Gao H, Valle M, Ehrenberg M, Frank J. Dynamics of EF-G interaction with the ribosome explored by classification of a heterogeneous cryo-EM dataset. *J Struct Biol*, 2004, 147(3): 283~290
 125. Yang S, Yu X, VanLoock MS, Jezewska MJ, Bujalowski W, Egelman EH. Flexibility of the rings: structural asymmetry in the DnaB hexameric helicase. *J Mol Biol*, 2002, 321(5): 839~849
 126. Heymann JB, Cheng N, Newcomb WW, Trus BL, Brown JC, Steven AC. Dynamics of herpes simplex virus capsid maturation visualized by time-lapse cryo-electron microscopy. *Nat Struct Biol*, 2003, 10(5): 334~341
 127. Valle M, Sengupta J, Swami NK, Grassucci RA, Burkhardt N, Nierhaus KH, Agrawal RK, Frank J. Cryo-EM reveals an active role for aminoacyl-tRNA in the accommodation process. *EMBO J*, 2002, 21(13): 3557~3567
 128. Heymann JB, Conway JF, Steven AC. Molecular dynamics of protein complexes from four-dimensional cryo-electron microscopy. *Journal of Structural Biology*, 2004, 147(3): 291~301
 129. Scheres SH, Gao H, Valle M, Herman GT, Eggermont PP, Frank J, Carazo JM. Disentangling conformational states of macromolecules in 3D-EM through likelihood optimization. *Nat Methods*, 2007, 4(1): 27~29
 130. van Heel M, Gowen B, Matadeen R, Orlova E, Finn R, Pape T, Cohen D, Stark H, Schmidt R, Schatz M. Single-particle electron cryo-microscopy: towards atomic resolution. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 2001, 33(04): 307~369
 131. Van Heel M. Multivariate statistical classification of noisy images (randomly oriented biological macromolecules). *Ultramicroscopy*, 1984, 13(1-2): 165
 132. van Heel M. Classification of very large electron microscopical image data sets. *Optik*, 1989, 82(3): 114~126
 133. Borland L, van Heel M. Classification of image data in conjugate representation spaces. *Journal of the Optical Society of America A*, 1990, 7(4): 601~610
 134. Crowther R, DeRosier D, Klug A. The reconstruction of a three-dimensional structure from projections and its application to electron microscopy. Proceedings of the Royal Society of London. *Series A, Mathematical and Physical Sciences*, 1970, 317(1530): 319~340
 135. Liu H, Cheng L, Zeng S, Cai C, Zhou ZH, Yang Q. Symmetry-adapted spherical harmonics method for high-resolution 3D single-particle reconstructions. *J Struct Biol*, 2008, 161(1): 64~73
 136. Radermacher M, Wagenknecht T, Verschoor A, Frank J. Three-dimensional reconstruction from a single-exposure, random conical tilt series applied to the 50S ribosomal subunit of *Escherichia coli*. *Journal of Microscopy*, 1987, 146(Pt 2): 113
 137. 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
 138. Winkler H. 3D reconstruction and processing of volumetric data in cryo-electron tomography. *J Struct Biol*, 2007, 157(1): 126~137

139. Walz J, Typke D, Nitsch M, Koster AJ, Hegerl R, Baumeister W. Electron Tomography of Single Ice-Embedded Macromolecules: Three-Dimensional Alignment and Classification. *J Struct Biol*, 1997, 120(3): 387~395
140. Forster F, Medalia O, Zauberman N, Baumeister W, Fass D. Retrovirus envelope protein complex structure in situ studied by cryo-electron tomography. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(13): 4729~4734
141. Forster F, Pruggnaller S, Seybert A, Frangakis AS. Classification of cryo-electron sub-tomograms using constrained correlation. *J Struct Biol*, 2008, 161(3): 276~286
142. Schmid MF, Booth CR. Methods for aligning and for averaging 3D volumes with missing data. *J Struct Biol*, 2008, 161(3): 243~248
143. Bartesaghi A, Sprechmann P, Liu J, Randall G, Sapiro G, Subramaniam S. Classification and 3D averaging with missing wedge correction in biological electron tomography. *J Struct Biol*, 2008, 162(3): 436~450
144. Grunewald K, Desai P, Winkler DC, Heymann JB, Belnap DM, Baumeister W, Steven AC. Three-dimensional structure of herpes simplex virus from cryo-electron tomography. *Science*, 2003, 302(5649): 1396~1398
145. Zhu P, Liu J, Bess J, Jr., Chertova E, Lifson JD, Grise H, Ofek GA, Taylor KA, Roux KH. Distribution and three-dimensional structure of AIDS virus envelope spikes. *Nature*, 2006, 441(7095): 847~852
146. Nicholson WV, Malladi R. Correlation-based methods of automatic particle detection in electron microscopy images with smoothing by anisotropic diffusion. *J Microsc*, 2004, 213(Pt 2): 119~128
147. Narasimha R, Aganj I, Bennett AE, Borgnia MJ, Zabransky D, Sapiro G, McLaughlin SW, Milne JL, Subramaniam S. Evaluation of denoising algorithms for biological electron tomography. *J Struct Biol*, 2008, 164(1): 7~17
148. Bazan C, Miller M, Blomgren P. Structure enhancement diffusion and contour extraction for electron tomography of mitochondria. *J Struct Biol*, 2009, 166(2): 144~155
149. Pantelic RS, Erickson G, Hamilton N, Hankamer B. Bilateral edge filter: photometrically weighted, discontinuity based edge detection. *J Struct Biol*, 2007, 160(1): 93~102
150. Saad AS. Wavelets filtering for classification of very noisy electron microscopic single particles images--application on structure determination of VP5-VP19C recombinant. *BMC Struct Biol*, 2003, 3: 9
151. Schmid MF, Sherman MB, Matsudaira P, Tsuruta H, Chiu W. Scaling structure factor amplitudes in electron cryomicroscopy using X-Ray solution scattering. *J Struct Biol*, 1999, 128(1): 51~57
152. Fernandez JJ, Luque D, Caston JR, Carrascosa JL. Sharpening high resolution information in single particle electron cryomicroscopy. *J Struct Biol*, 2008, 164(1): 170~175
153. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem*, 2004, 25(13): 1605~1612
154. Goddard TD. Visualizing density maps with UCSF Chimera. *Journal of Structural Biology*, 2007, 157: 281~287
155. Wang Y, Chen W, Dong T, Shan G, Chi X. Volume Exploration using Elliptical Gaussian Functions. In *Proceedings of IEEE Pacific Visualization Symposium*, 2010
156. Wang Y, Chen W, Shang G, Chi X. Analogy-Based Volume Exploration using Elliptical Gaussian Functions. *Invited to IEEE Transactions on Visualization and Computer Graphics (TVCG)*
157. Wang Y, Wu Y, Qu H, Chen W, Chi X. Interactive Visual Analysis of Surface Deformation. submitted to *IEEE Visualization*, 2010
158. Hu Z, Tian X, Zhai Y, Xu W, Zheng D, Sun F. Cryo-electron microscopy reconstructions of two types of wild rabbit hemorrhagic disease viruses characterized the structural features of Lagovirus. *Protein & Cell*, 2010, 1(1): 48~58
159. Gao H, Sengupta J, Valle M, Korostelev A, Eswar N, Stagg SM, Van Roey P, Agrawal RK, Harvey SC, Sali A, Chapman MS, Frank J. Study of the structural dynamics of the E coli 70S ribosome using real-space refinement. *Cell*, 2003, 113(6): 789~801
160. Gao H, Frank J. Molding atomic structures into intermediate-resolution cryo-EM density maps of ribosomal complexes using real-space refinement. *Structure*, 2005, 13(3): 401~406
161. Chapman MS. Restrained real-space macromolecular atomic refinement using a new resolution-dependent electron-density function. *Acta Crystallogr A*, 1995, 51: 69~80
162. Tronrud DE, Ten Eyck LF, Matthews BW. An efficient general-purpose least-squares refinement program for macromolecular structures. *Acta Crystallogr A*, 1987, 43: 489~501
163. Wriggers W, Milligan RA, McCammon JA. Situs: A package for docking crystal structures into low-resolution maps from electron microscopy. *J Struct Biol*, 1999, 125(2-3): 185~195
164. Wriggers W, Birmanns S. Using situs for flexible and rigid-body fitting of multiresolution single-molecule data. *J Struct Biol*, 2001, 133(2-3): 193~202
165. Tama F, Miyashita O, Brooks CL, 3rd. Flexible multi-scale fitting of atomic structures into low-resolution electron density maps with elastic network normal mode analysis. *J Mol Biol*, 2004, 337(4): 985~999.
166. Schroder GF, Brunger AT, Levitt M. Combining efficient conformational sampling with a deformable elastic network model facilitates structure refinement at low resolution. *Structure*, 2007, 15(12): 1630~1641
167. Velazquez-Muriel JA, Carazo JM. Flexible fitting in 3D-EM

- with incomplete data on superfamily variability. *J Struct Biol*, 2007, 158(2): 165~181
168. DiMaio F, Tyka MD, Baker ML, Chiu W, Baker D. Refinement of protein structures into low-resolution density maps using rosetta. *J Mol Biol*, 2009, 392(1): 181~190
169. Sali A, Blundell TL. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. *J Mol Biol*, 1993, 234(3): 779~815
170. Trabuco LG, Villa E, Mitra K, Frank J, Schulten K. Flexible fitting of atomic structures into electron microscopy maps using molecular dynamics. *Structure*, 2008, 16(5): 673~683
171. Trabuco LG, Villa E, Schreiner E, Harrison CB, Schulten K. Molecular dynamics flexible fitting: a practical guide to combine cryo-electron microscopy and X-ray crystallography. *Methods*, 2009, 49(2): 174~180
172. Zhu J, Cheng L, Fang Q, Zhou ZH, Honig B. Building and Refining Protein Models within Cryo-electron Microscopy Density Maps Based on Homology Modeling and Multiscale Structure Refinement. *J Mol Biol*, 2010
173. Sun S, Zhang K, Xu W, Wang G, Chen J, Sun F. 3D Structural Investigation of Caveolae From Porcine Aorta Endothelial Cell by Electron Tomography. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2009, 36(6): 729~735
174. Stewart M. Transmission electron microscopy of vitrified biological macromolecular assemblies. *Electron Microscopy in Biology-A Practical Approach*, 1991: 229~242

Development and Frontier of Electron Microscopy 3D Reconstruction

ZHANG Kai¹, ZHANG Yan¹, HU Zhongjun^{1,2}, Ji Gang¹, SUN Fei¹

1. National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2. Department of Physics, Logistics Engineering University, Chongqing 401311, China

This work was supported by grants from The '973' program of the Chinese Ministry of Science and Technology (2006CB911001 and 2006CB806506), Chinese Academy of Sciences (KGCX1-YW-13) and the National Natural Science Foundation of China (30721003)

Received: Apr 8, 2010 Accepted: May 10, 2010

Corresponding author: SUN Fei, Tel: +86(10)64888582, Fax: +86(10)64888376, E-mail: feisun@ibp.ac.cn

Abstract: The technology combining cryo-electron microscopy and three-dimensional reconstruction could be simply called electron microscopy 3D reconstruction and this technology has been developed quickly and applied widely in life science research recently. Here we gave a brief introduction of 3D reconstruction electron microscopy and then reviewed its current development and frontier such as high resolution electron microscopy 3D reconstruction, improved performance and innovation of electron microscopes, automatic data collection and processing pipeline, application of high performance computing technology, new progress on 2D/3D image processing techniques, structure modeling based on electron microscopy maps and etc. Finally, we concluded the perspective of electron microscopy 3D reconstruction.

Key Words: Electron microscopy; 3D reconstruction; Automation; High performance computing; Imaging processing; Structure modeling