

引用格式: 张晓凯, 张丛丛, 刘忠民, 等. 冷冻电镜技术的应用与发展[J]. 科学技术与工程, 2019, 19(24): 9-17

Zhang xiaokai, Zhang congcong, Liu zhongmin, et al. Application and development of cryo-electron microscopy technology [J]. Science Technology and Engineering, 2019, 19(24): 9-17

矿冶工程

冷冻电镜技术的应用与发展

张晓凯¹ 张丛丛¹ 刘忠民^{2*} 刘力嘉¹ 夏 蕾¹

(¹ 山东师范大学物理与电子科学学院¹, 实验室与设备管理处²; 济南 250014)

摘 要 近年来, 冷冻电镜技术获得了突飞猛进的发展, 取得了许多具有开创性意义的成果, 为科学研究起到了积极的推进作用。系统地综述了冷冻电镜技术与方法在科学研究中的应用, 简要介绍了冷冻电镜技术的流程、发展、原理及解析方法, 列举实例说明了冷冻电镜在结构生物学、生物医学、药物筛选方面的研究进展, 分析了冷冻电镜技术与其他技术比较所具备的优越性以及存在的问题, 并展望未来的发展。

关键词 冷冻电镜 结构生物学 生物医学 药物筛选

中图分类号 TG115.21+5.3; **文献标志码** A

冷冻电镜作为一项蓬勃发展的现代科学技术, 可直接观察液体、半液体及对电子束敏感的样品。目前, 冷冻电镜在多个学科领域已经实现具体的应用。例如, Yuzhang Li 和诺贝尔物理学奖得主朱棣文参与的一项项目中, 使用冷冻电子显微镜技术, 获得了锂枝晶原子分辨率级别的结构图像^[1]。锂元素活泼的性质让多种探究技术无法在保持它正常结构的条件下获得有用的信息, 他们利用冷冻电镜技术保留了锂枝晶的原始状态及相关结构, 获得了高分辨的锂枝晶图像。另外, 来自 Laboratory for Multi-scale Imaging 和 Stevens Institute of Technology 的 Liang 等采用冷冻电镜对聚乙二醇-丙烯酸(PEG-AA)水合微凝胶进行了研究^[2], 之后又用冷冻扫描电镜测量了聚乙二醇-丙烯酸共聚物在冻干和完全干燥状态下的微凝胶直径^[3]。来自圣彼得堡理工大学和圣彼得堡大分子化合物研究所的 Ivan Kova 等^[4], 运用冷冻电镜技术研究了壳聚糖海绵, 发现了冷冻后的壳聚糖海绵由带有孔隙的壁和冻结的溶剂填充结构空间组成, 而且将甲壳素纳米纤维和蒙脱石掺入壳聚糖溶液中不会影响孔径和壁的厚度, 还可以促进孔壁层状结构的形成^[4]。最近, 从阿尔茨海默

病患者的脑中分离出了第一个高分辨率结构(3.4~3.5 Å)的 tau 蛋白细丝^[5], 表明冷冻电镜在对神经退行性疾病靶标蛋白的结构理解方面取得很大进展。这些细丝的高分辨率结构测定开启了基于结构的药物发现的新的可能性。依据现有的研究状况, 论述冷冻电镜在科学研究中的应用, 尤其在结构生物学和生物医学等相关领域, 由于冷冻电镜与常规电镜相比突显出极大的优越性, 展望未来, 随着冷冻电镜技术的快速发展, 人类将发现和解决电子显微学领域许多的难题与谜团。

1 冷冻电镜技术概述

1.1 冷冻电镜技术简介及流程

冷冻电镜是生物医学领域的研究者们对冷冻电子显微镜的一种简要的称呼, 该技术首先需要对生物大分子进行快速冷冻, 在低温的环境下使用透射电镜观察生物大分子的结构并拍照成像, 这些关键性的工作完成之后, 还要经过精细的图像处理和缜密的计算以使研究者们对实验观测所得到的图像有一个更加清晰深入的了解, 最终得到生物大分子的空间结构。历经三十多年的发展, 冷冻电镜技术已成为研究结构生物学极为关键的方法, 与 X 射线晶体学和磁共振技术(nuclear magnetic resonance, NMR)共同构成了高解析度的结构生物学研究的必要手段。

冷冻电镜可以分为冷冻透射电镜、冷冻扫描电镜、冷冻蚀刻电镜 3 种类型。

2019年1月21日收到 国家自然科学基金(51173069)和
山东师范大学大型仪器设备开放基金(KFJJ2017008)资助
第一作者简介: 张晓凯(1961—), 男, 汉族, 天津宝坻人, 高级工程师, 硕士生导师。E-mail: minliyil@163.com。

* 通信作者简介: 刘忠民(1965—), 男, 汉族, 内蒙古通辽人, 高级实验师。E-mail: liuzhongmin@sdu.edu.cn。

(1) 冷冻透射电镜(Cryo-TEM)技术一般是在普通透射电镜上加装样品冷冻装置,将样品冷却到液氮温度(77 K)来观测某些对温度敏感的样品,例如蛋白、生物切片的一种技术。它的原理是通过对样品的冷冻,降低电子束对样品的损伤,减小样品的形变,从而得到更加真实的样品形貌。它具有加速电压高、电子光学性能好、样品台稳定、全自动等优点。

(2) 冷冻扫描电镜技术一般是在普通扫描电镜上加装低温冷冻传输系统和冷冻样品台装置,它是在扫描电镜的基础上发展起来的一种技术,可以直接观察液体、半液体的样品,不需要对样品进行干燥处理,最大程度地减少了常规的干燥过程对高度含水样品的影响。其基本原理是使水在低温状态下呈玻璃态,从而减少冰晶的产生,获得合适的样品,再通过传输系统送到冷冻样品台上进行观察,具有防止样品水分丢失、制样快、样品可以重复使用等优点。

(3) 冷冻蚀刻电镜技术是一种将断裂和复型相结合的制备透射电镜样品技术,可以显示细胞、组织微细结构的立体构像。它的原理是将样品置于干冰或液氮中进行冰冻,用冷刀劈开后,在真空中将温度回升到 -100°C ,使断裂面的冰升华,暴露出断面结构,最终得到可以观察的复膜。它具有使微细结构接近于活体状态、能够观察到不同劈裂面的微细结构、能使样品具有很强的立体感且能耐受电子束轰击和长期保存等优点。

1.2 冷冻电镜仪器的发展

自从冷冻电镜技术作为研究微观的一项新技术出现后,研究者一直在不断寻找提高分辨率的方法。最初,冷冻电镜的分辨率约为 5 \AA ,与其他的分辨技术相比,虽然有着样品处理方面的优势,但分辨率不高导致这项技术的应用并没有取得客观的效果,随着电子束振荡器、传感器和后期成像分析软件的稳步改进,冷冻电镜的分辨率已经可以和X射线和核磁共振的分辨级别相媲美。现在,冷冻电镜分辨率已经达到或接近“原子级”。

近几年,冷冻电镜在分辨率上的提高使研究人员得到部分代表性的主要成果。

1.2.1 3.3 \AA

2013年12月5日,美国加州大学旧金山分校副教授Yifan Cheng与同事David Julius两个实验室合作,采用单电子计数探测器,以近原子分辨率,确定了一种在疼痛和热知觉中起中心作用的膜蛋白TRPV1的结构^[6]。这种结构的确定标志着冷冻电镜分辨率正式进入“原子级”时代。

1.2.2 2.2 \AA

2015年,美国国立癌症研究所(National Cancer Institute, NCI)的Sriram Subramaniam博士所属的研究团队,在2014年分辨精度达到 3.2 \AA 的基础上,利用单颗粒冷冻电镜,对 β -半乳糖苷酶及其抑制子进行了高分辨率成像^[7],获得了小于100 kD的蛋白复合体结构,分辨率达到了 2.2 \AA 。虽然还无法精细到原子级别,但促进了冷冻电镜分辨率的进一步提高。

1.2.3 1.8 \AA

Sriram Subramaniam博士领导的研究团队,利用冷冻电镜,解析了334 000的谷氨酸脱氢酶的结构,分辨率达到了 1.8 \AA ,这是目前运用冷冻电镜单颗粒分析法解析的最高分辨率的蛋白结构。

1.3 冷冻电镜与三维重构技术

冷冻电镜技术已经开展了由定性到定量、由平面到空间的立体研究,产生了多种解析生物分子或细胞结构的方法,这有利于帮助人们了解生物大分子的空间结构。随着电镜硬件的稳定性及自动化程度的稳步提升,超大规模计算的能力的大幅度提高,使单颗粒三维重构技术成为冷冻电镜技术中的佼佼者。它可以在观测复合体或细胞器在活细胞里的原位结构信息时发挥作用^[8],能够对大量离散分布的单个分子的电子显微像进行分析来解析结构。三维重构还有电子断层成像方法,它可以获得同一区域的多个角度的投影图,然后反向重构它的三维结构,适合研究纳米级尺度上不具有均一性的生物大分子及其复合物^[9]。

此外,冷冻电镜技术与数学和物理学已经结合起来。电镜三维重构技术以中央截面定理和傅里叶变换为基础,归根究底就是一个物体的三维投影的傅里叶变换等于该物体三维傅里叶变换中与该投影方向垂直的、通过原点的截面。

目前,冷冻电镜三维重构技术由冷低温制样、低剂量电镜成像和计算机图像处理3部分组成。随着冷冻电子显微镜的自动化、分辨率、直接电子探测技术以及高性能图像处理技术的大幅提高,越来越适合分析大的难以形成三维晶体复合体的三维结构,如膜蛋白以及病毒和蛋白质-核酸复合物等。其方法是对生物样品在电镜中的不同倾角下进行拍照,得到一系列电镜图片后再经傅里叶变换等处理,从而展现出生物大分子及其复合物三维结构的电子密度图。

随着科技的进步,冷冻电镜在三维重构技术上的取得了如下成果。

(1) 样品处理。样品本身比较薄,在液氮温度

下,利用冷冻制样冷却速度快的特性,可以保存样品的原始结构信息及构象状态。

(2) 图像处理的能力的进步。交叉相关函数方法、随机圆锥倾斜法的提出以及方法学体系的建立,为三维重构中图像处理技术提供了原理的依仗,此外,电子直接探测相机^[10]的普及,打破了冷冻电镜三维重构技术的枷锁。相比之前的相机,它的信噪比增大,空间分辨率提高,采集信号快。

(3) 低剂量成像的可行性。在液氮温度下,能够用低电子剂量成像对样品进行数据采集,满足研究需求的微观结构的信息,是冷冻电镜技术应用史的里程碑式的突破。

1.4 冷冻电镜结构解析的 3 种方式

冷冻电镜结构剖析的方式多种多样,而今运用最多的有 3 种: 电子晶体学、单颗粒重构、电子断层扫描重构。这 3 种方法各有优劣,针对多种生物样品各自的性质和特点对其进行成像和三维重构。电子晶体学利用电镜获得生物大分子的多维空间结构图像或对衍射图样进行收集,从而对生物大分子结构进行解析。这种方式适合的样品分子量范围为 10 ~ 500 kD,最高解析度约 1.9 Å^[11]。单颗粒重构的方法,有着自己特定的分子量范围,即是在 50 ~ 80 MD 不在这一范围之内的便不适用,该技术的最高解析度大概是 3 Å。该方法建立在分子结构具有同一性的基础上,先要解析生物大分子的多幅图像,而后通过三维重构获得生物大分子的空间结构。电子断层扫描重构技术也有着自己独特的研究对象,主要有 3 种: 细胞、亚细胞器和生物大分子复合物。其中,复合物的结构是不固定的,并且其分子量大概为 800 kD。这一技术的缺陷在于,解析度较低,仅为 20 Å。

2 冷冻电镜技术在结构生物学中的应用

2.1 冷冻电镜在结构生物学的主要研究成果

冷冻电镜本身是电子显微镜的一种,主要作用是放大微小物体,使之能被人的肉眼看到,而结构生物学则是运用物理学方法,配合生物化学和分子生物学方法来研究生物大分子结构与功能的学科,因为各个层次的生命活动,都需要在分子水平上进行物质结构和功能的研究才能最终阐明其本质,所以学科的发展离不开高效的显微镜的应用。运用冷冻电镜进行生物大分子结构解析时,其不需要大量样品,不需要结晶的优势,使之受到结构生物学领域研究者的青睐。而三维重构技术的发展,使得冷冻电镜能够契合自身的优势来探究物质的结构,对于冷

冻电镜在结构生物学上的应用起到了推动作用。

冷冻电镜在结构生物学的主要研究成果体现在微观结构上。来自中国科学院生物物理研究所生物大分子国家重点实验室的朱平等^[12]运用冷冻电镜技术研究了 30 nm 染色质的高级结构,得出了 30 nm 染色质具有一种和 DNA 右手双螺旋结构类似的左手双螺旋高级结构的研究成果。在这之前,常用的传统晶体结构方法在其高分辨率研究中并不适用,因此 30 nm 的染色质的结构由于精确的研究方法的缺乏存在着不确定性。该研究通过运用冷冻电镜三维重构方法,显示出染色质纤维以四个核小体为结构的基本单元,结构单元之间通过扭曲折叠形成了左手双螺旋的结构,明确了连接组蛋白 H1 对染色质形成的重要作用,使研究结果具备了可信性。在 30 nm 染色质纤维高分辨率结构精细模型的建立上取得了重要的进展。

2.2 结构生物学研究的基本方法介绍

生物大分子有很多种类,常见的有 3 种,包括核酸、蛋白质,这两种大分子再加上它们的复合物就构成了生物学的首要研究对象。研究者们通过剖析生物大分子的近原子解析度的空间结构,对其功能进行说明,进而展现出二者之间的联系,弄清楚分子机器的工作方式,从而为定向药物提供结构基础。结构生物学与细胞生物学、免疫学和遗传学等学科密切相关,处在生命科学的前沿研究领域,其起源可追溯到 20 世纪 50 年代初,沃斯顿和科瑞克发现了脱氧核糖核酸双螺旋结构^[13,14]。如前文所述,而今研究生物结构的方式主要有三种,即电子显微镜、核磁共振、X 射线衍射技术,这三种技术各有缺点,也各有优越之处。

阐明生物大分子的空间结构有许多可供选择的方法,现如今最主要的一种就是 X 射线衍射技术。该技术首先以 X 射线对生物大分子的晶体进行照射,然后对其衍射图像进行分析,计算出晶胞内电子云的分布,最后建立蛋白质分子的 3D 空间模型^[15]。它能够提供某些蛋白质以及核酸片段在原子解析度下完整的结构信息,甚至能够测定核糖体和全病毒等大分子的空间结构,而这将为药物研发提供十分宝贵的信息。当前,蛋白质数据库中有超过十分之九的结构信息是利用 X 射线衍射技术得到的,但是该研究方法存在某些不足之处,想要获得某些分子量特别大、结构较为复杂的生物复合物分子的晶体非常困难。而且,在获得晶体的过程中常要进行各种处理,因此所得到的晶体并非完全处于生理状态。

核磁共振技术是解析分子结构常用的技术,它可以很好地获得分子动力学以及结构方面的信息。

然而,该技术的发展也遇到了极大的阻碍,它需要大量样品,而且样品的分子量往往不能多于 40 ~ 50 kD^[14]。近年来,随着超高磁场技术和超低温探针的发展,通过核磁共振技术,得到了某些小于 100 kD 分子量的大分子蛋白质的空间结构信息,但至今还未得到推广。

电子波粒二象性理论的提出以及电子波在电场和磁场作用下会发生偏转、折射等现象的发现,使对电子束聚焦和偏转进行控制有了实现的可能,这是利用电子显微镜进行观测的基础。冷冻电镜中的三维重构技术是探究生物大分子的结构的重要的方式,目前处于迅速发展的阶段。

2.3 冷冻电子显微学在结构生物学研究中的现状与展望

2.3.1 样品制备技术

种类众多的生物大分子在水溶液中的存在状态彼此不一样,它们与样品支持膜的相互影响也多种多样。在生物大分子的有关结构研究中,只有确保单颗粒分子厚薄均一的分布于厚度恰当的冰层中,方有机会得到合格的电子显微数据以便于结构解析,这些与水溶液中缓冲液的种类和大分子的浓度等各种因素有关。

总之,样品制备在冷冻电镜技术中意义重大,是一切操作的前提。因此,冷冻电镜技术想要在结构生物学的研究领域发挥更加重要的作用,就不得不在样品制备流程上取得重要进展。然而,现在应用的冷冻制样技术仍然存在着一些缺陷,操作的重复性与可移植性太低,通用性有待于进一步提高,总之,样品制备技术的不成熟已经成为限制冷冻电镜技术发展的关键性因素。

另外,在细胞结构研究中,首先必须对样品实施减薄操作,然后才能用冷冻电镜进行观测。因此冷冻切片技术也带来了一定的限制,要自如地应用该技术需要经过长时间的培训和多年的实践经验。不过,近年来逐步发展的聚焦离子束减薄技术将会使观察自然状态下细胞内局部区域的高解析度结构得以实现。

2.3.2 高解析度结构的分析与建模

与常规技术相比,利用冷冻电镜能够得到更高解析度的分子结构,能够显现出更多的细微之处。近两年来,利用冷冻电镜技术得到的近原子解析度(4 Å 以上)的生物大分子结构的数量显著提高,比过去几十年得到的高解析度结构数目之和还要多。单颗粒重构技术与 X 线晶体学方法不同,它不能利用对晶格衍射点的信号强弱得到确定的解析度。所以,怎样巧妙地确定重构技术得到的结果及结构解

析的解析度在生物大分子结构研究中意义重大。之后,便是建造多种解析度的三维重构原子模型。只有这样才能够在原子水平对生物大分子的功能进行更加深刻的说明。目前,解析度大于 4 Å 的三维重构通常能够利用晶体学手段制造模型;而解析度在小于或等于 4 Å 的三维结构却还是缺乏合适的值得推广的操作。不过,一些研究人员尝试通过同源建模和分子动力学模拟等方法来制作小于或等于 4 Å 解析度的原子模型。

2.3.3 生物大分子构象不均一性的分析

与 X 晶体学方法不同,冷冻电镜单颗粒结构解析技术有着自己的特点——溶液中的生物大分子不必非得形成周期性的晶体排列。能够直接得到生物大分子结构。其缺点在于生物大分子特别是其复合体的构象柔性没有被显示在结构中,而这些构象柔性会出现在冷冻电镜显微图像中,最终使得三维重构难以得到高解析度结构。为了改善重构解析度,就要把各不相同构象的分子分别解析。另外,所观测到的分子的不同构象与分子发挥作用的不同结构形态有关,弄清楚其间的差别更有利于解释分子功能的机制。现在,有些算法依靠聚类分析和最大似然法分析等方式对生物大分子复合物进行结构剖析,并获得了不错的效果。然而,对生物大分子构象不均一性的分析仍然是利用冷冻电镜进行结构解析的一大难题,需要人们付出更多的努力,以创新型的思维开辟新道路。

2.3.4 电子光学新技术

现在,应用世界上最为先进的电子光学成像技术,使分辨率达到了 0.5 Å。然而,进一步提升解析度仍然是冷冻电镜技术更好发展的必然追求,也是所有冷冻电子显微学研究者致力于解决的挑战。近十几年来,电子显微镜光学系统变得日益完备。新的成像手段,新的技术不断出现,对于提高结构解析度具有重要的意义,如球面相差矫正、色像差矫正等。此外,新的技术如 volta 相位板的使用已经被证明对于提升解析度有着重大的推动作用。这对于冷冻电镜技术的进步与成长显然具有非同一般的意义。

2.3.5 体内细胞结构的研究

细胞生物学处于现代生命科学的前沿领域,其主要研究对象是细胞。就层次而言,可以分为三层:细胞整体、细胞亚显微结构和分子结构。它从动态角度把握细胞和细胞器的结构和功能、细胞的生命旅程和各种生命活动。

结构生物学与细胞生物学之间存在着很大的空隙,而冷冻电镜技术正是连接二者的桥梁,能够从不

同维度更加全面地了解生命。

利用冷冻电镜技术对生物大分子进行结构解析,首先需要将生物大分子与生物体分离,而后进一步纯化。目前,已知的生物大分子结构的总数已经达到十万,这为生物大分子研究提供了前提条件。直到现在,还是没有能够直接观察细胞内或体内大分子的原子解析度结构的方法。然而,冷冻电镜技术三维断层扫描重构的进步为人类带来了新的希望。其电子显微镜装置更加稳定、数据采集系统更加完善、计算机处理软件能发挥更好的作用,有希望在细胞内某些特殊的生物大分子的空间结构重构和数量统计分析方面大展宏图,进而得到高解析度结构。当然,对细胞中这些分子进行标记则成为应用冷冻电镜研究细胞结构所要面对的另一挑战。

3 冷冻电镜技术在生物医学中的应用

冷冻电镜技术在生物医学中发挥了很大的作用,利用该技术能够得到生物大分子的原子解析度结构,从而能够对其进行解析,这对于了解生命体的微观活动具有重要意义。利用冷冻电镜技术得到的一系列成果可以进一步应用到生物医学中,在该领域发挥巨大的作用。具体来说,冷冻电镜主要用于对病毒、细胞及细胞内的微观结构、大分子复合物进行高解析度剖析,如对病毒进行三维重建。

对病毒进行三维重建的研究有很多,其中一个范例是利用冷冻电镜对哺乳动物呼肠孤病毒(mammalian orthoreovirus, MRV) MPC/04 株进行三维重建。MRV 可从很多哺乳动物身体里得到,是无囊膜病毒的范例。对该病毒进行研究,能够对病毒入侵、复制的过程和其致病的原理有一个更深入的了解。这类病毒更高频率的作用于幼龄动物^[15]。近年来,由于生物科学尤其是冷冻电镜单颗粒重构技术快速成熟,实现了能够得到天然状态下有着超高解析度的病毒的空间结构。有关研究者通过冷冻电镜技术中的单颗粒三维重构的方法剖析了一株分离于果子狸的 3 型呼肠孤病毒(MPC/04)的空间结构。第一步要探究该种病毒主要结构蛋白的彼此影响方式,而后与已知的同源病毒结构信息进行对比,分析探讨病毒结构的主要构成,深入探究病毒的入侵过程和病毒疫苗的研制。经过艰苦的努力,研究者得到了具有完整结构和较高纯度的均一性良好的呼肠孤病 MPC/04 株病毒粒子,利用冷冻电镜单颗粒重构的方法第一次得到了解析度为 9 Å 的该病毒的空间结构。并推断出了该病毒 σ1 蛋白的二级结构,初次剖析了其 N 端部分结构。该项研究还发现 MPC/04 株病毒和人源 MRV3D 有着十分显著的相似性。

4 冷冻电镜技术在药物筛选中的应用

技术进步使得冷冻电镜得以分辨包括小分子的复合物等体积更小、分辨率更高的物体。大型动态复合物和膜蛋白等不适合结晶的蛋白也得益于单颗粒冷冻电镜的发展而有了其高分辨结构。冷冻电镜在药物结构筛选中的应用做如下介绍。

4.1 膜蛋白 GPCRs

4.1.1 G 蛋白偶联受体

G 蛋白偶联受体(G protein-coupled receptors, GPCRs)是最丰富的细胞表面受体蛋白,并且被市场上 30% 的药物所靶向^[16,17]。尽管 GPCR 的 X 射线晶体学研究取得了重大进展,但由于需要获得高质量晶体和纯化过程中相对较低的稳定性,X 射线对该家族的一些成员仍然难以应付^[18]。冷冻电镜解决了以前构象不稳定且不能结晶的大复合物无法成像的问题,并且可以确定 GPCRs 的不同构象以及与 G 蛋白复合物的结构,从而用于配体筛选或设计药物。2016 年,单颗粒冷冻电镜解析了第一个 GPCR 的冷冻电镜结构(4.1 Å),确定了激活状态下蛙降钙素、G 蛋白和人降钙素受体(B 类 GPCR)的异源三聚体结构^[19]。此后不久,结合兔胰高血糖素样肽(glucagon-like peptide 1, GLP1)、G 蛋白和 GLP1 受体(B 类 GPCR)4.1 Å 的冷冻电镜结构被解析,解释了 B 类受体如何通过激素活化结合^[16]。人类 GLP1 受体结合的激动剂和 G 蛋白异源三聚体的 3.3 Å 的冷冻电镜结构,给出了偏向激动作用(biased agonism)的见解^[17]。最近这些 GLP1 受体结构也被解析出来,打破了分子量为 150 kD 时这种重要的药物靶点几乎不可能在近原子分辨率下使用冷冻电镜成像的假说。这些侧链清晰可辨的结构可帮助解决更高分辨率 GPCR 蛋白复合物的解析,同时也可帮助设计治疗 II 型糖尿病和肥胖症的新药。

4.1.2 γ-分泌酶

科学家尝试将 γ-分泌酶作为潜在的药物靶标,因为发现 γ-分泌酶不仅是早发性阿尔茨海默病(Alzheimer disease, AD)患者身体中 γ-secretase 的功能障碍是促进患者大脑中淀粉样斑块形成的原因,同时在癌症的形成方面 γ-分泌酶扮演 Notch 信号传导的关键介质。在分辨率为 3.4 Å 的 γ-secretase 的冷冻电镜结构中发现,四跨膜束内核的两个热点突变,削弱了蛋白酶活性,从而引起早发性阿尔茨海默病。这个原子模型可以帮助设计更具选择性的化合物。值得注意的是,γ-secretase 糖基化对冷冻电镜数据集的结构重建几乎没有影响,而它却可能妨碍 X 射线的结晶^[20]。

4.1.3 离子通道

在过去的4年里冷冻电镜约解析出50个感受器电位(transient receptor potential, TRP)通道蛋白的冷冻电镜结构。TRP通道晶体由于其在细胞中基因表达水平低和对物化刺激敏感的特性,在历史上获得良好衍射的TRP通道晶体非常困难。结合激动剂的瞬时受体电位香草受体1(transient receptor potential vanilloid subfamily member 1, TRPV1)(2.9 Å)^[21], TRPML3(2.9 Å)^[22]和TRPM4(2.9 Å)^[23]结构是目前为止由冷冻电镜解析的膜蛋白的最高分辨率结构。与此同时,冷冻电镜在研究大离子通道复合物方面也做出巨大贡献,如Ryandine受体(RyRs)^[24-25]。这些解析出来的离子通道蛋白结构,将成为药物设计的重要靶点,同时也再次证明了冷冻电镜技术的强大。

4.1.4 ATP结合蛋白(ABC)转运蛋白

X射线衍射难以处理的部分其他膜蛋白复合物,冷冻电镜同样能够给出其结构。例如,解析并阐明真核ABC转运蛋白多药耐药相关蛋白1(multi-drug resistance-associated protein 1, MRP1)识别底物以及底物结合如何刺激ATP水解的机制^[26]。ABC转运蛋白在多种药物的吸收、分布、代谢和消除中发挥关键作用,可导致药物相互作用,因此,有关其结构的信息可能对药物开发同样具有重要价值。

4.2 抗体和疫苗

近年来,负染和冷冻电镜已用于抗体的线性和构象表位作图以分析阐明单克隆抗体(mAb)的活性从而理解潜在生物治疗剂作用机制。最近,Long等^[27]使用冷冻电镜阐明了病毒中和人mAb是如何结合病毒样颗粒,并阻断病毒和宿主膜融合的机制。Ciferri等^[28]使用负染技术研究HTRA1(一种与年龄相关的黄斑变性有关的丝氨酸蛋白酶)形成独特复合物并抑制其酶活性的抗体的结构。该研究突出了IgG-HTRA1复合物的笼状结构,其较不紧凑的螺旋桨状排列,具有比Fab对应物更高的效力。最新的冷冻透射电镜技术更可以通过表位作图的方式对mAb设计的辅助功能更上一层楼。冷冻电镜技术关于促进抗体和疫苗研究的报道还有很多,由此可见这类技术在药物筛选方面的巨大推力。

5 存在的问题

在冷冻电镜及相关技术近十年的发展中,虽然相比诞生初期有了跨越式的进步,但仍然存在着需要解决的问题。

5.1 制样的问题

在生物细胞中,含水量可达80%~90%,不同

于脱水获得样品的步骤,冷冻电镜制样能够保持细胞原有的结构,并保留可溶性物质,有助于做细胞质的元素分析,这是冷冻电镜技术本身的优势之一。

但是制样时,细胞中的水由于冷冻低温可能会形成冰晶,产生强烈电子衍射掩盖样品信号,甚至改变样品结构,因此避免形成冰晶是冷冻制样的关键。而且每次冷冻电镜制样也并不是100%成功的,动物细胞制样问题不大,植物细胞因为细胞壁的存在较为困难,因此要控制好温度,尤其是-137℃和-70℃这两个温度。其中,-137℃是水的重结晶点,达到这一温度能使样品中的水形成玻璃态的冰;-70℃则是玻璃态的冰形成二次冰晶的温度节点。

5.2 分辨率的问题

提高电镜的分辨率对于科学研究来说意义重大,超高分辨率有利于解析分子中的电势,更好的探究生物大分子的化学本质和量子本质。虽然冷冻电镜和过去相比在分辨率方面有了很大提升,但目前还是徘徊在2 Å左右,而更进一步地提高分辨率,与从3 Å过渡到2 Å相比,难度几乎是成几何倍增。限制冷冻电镜分辨率的因素可能以下几点:①仪器;②相机;③软件;④样品的制备。由此可见,冷冻电镜分辨率提高需要多方面的合力。

5.3 常用的三维重构技术的问题

作为冷冻电镜目前火热的三维重构技术,目前在颗粒图像识别算法和计算上仍存在着不足点。

首先,需要更自动、快速、准确的颗粒图像识别算法。得到一个样品的结构需要数十万张的原始颗粒图像数据,手工挑选是非常困难的办法,必须设计出自动筛选的算法来解决问题。其次,在获得图像后,需要更高性能的计算来确定投影方向,计算能力不足则会导致数据无法进行处理,从而影响到整个实验的进展。

5.4 应用范围的问题

冷冻电镜在生物学中的重要性已经得到了体现,研究成果如雨后春笋般涌现,而其他领域起步较晚。而且2017年冷冻电镜诺贝尔化学奖的公布,让人们调侃冷冻电镜是授予物理学家以奖励他们对生物领域的杰出贡献的化学奖,与化学研究不怎么沾边。实际上,像纳米材料的尺寸和微观结构就已经可以通过冷冻电镜技术来研究,利用冷冻电镜可以保持含水纳米材料的结构的优势,去获得清晰的实验结果,因此在分析化学、材料化学里的应用还需要去进一步拓展。

清华大学施一公课题组将冷冻电镜和质谱分析结合起来,在获得酿酒酵母剪接体组装过程中的一个高达3.8 Å分辨率的关键复合物U4/U6.U5 tri-

snRNP 的基础上,再利用交联质谱技术对剪接体复合物组成蛋白的分子间相互作用进行分析,为进一步理解剪接体的激活及前体信使剪接反应的催化机制提供了重要分子基础^[29]。这就是将冷冻电镜技术与其他技术结合起来获得科研成果的鲜明范例。

6 未来的发展前景

经过上述对冷冻电镜成果和问题的分析,说明了冷冻电镜的发展日臻完善。研究者^[30-37]在不断取得成果的过程中,也在用实践推动着冷冻电镜技术的进步。

冷冻电镜在未来的发展前景有以下几方面。

(1) 开发新的算法与设备。算法和设备的更新换代是冷冻电镜领域发展的主旋律,用系统的方法和先进的仪器能够为实验的成功进行打下基础,可以在有限的时间内获得理想的结果。

(2) 优化样品制备方法。如今制备样品常用的方法,一种是通过冷冻使样品处于玻璃态,保持组织的原始状态结构;另一种方法是把喷雾冷冻装置和底物混合冰冻技术结合起来,快速冷冻,将两种溶液保持在某种反应的中间状态,可以对某一时刻的变化进行研究。未来还可以进一步在冷冻技术与方法上进行改良,去探索更符合实验要求的冷冻方法^[38-44]。

(3) 开发新的技术。目前,单颗粒三维重构技术是冷冻电镜中的热门,自冷冻电镜技术由 Taylor 和 Glaeser 创建后,几十年来的发展使其成为解析生物大分子结构的有效方法。在三维重构技术上的进步必定能够为研究者解析多种复杂的结构^[45-53],开发更行之有效的工具,化繁为简,化难为易,探索物质结构背后更深层次的含义。

(4) 建立高档次冷冻电镜中心。冷冻电镜是解析物质或组织结构的利器,冷冻电镜技术的运用离不开大型的实验室,因此需建设高端冷冻电镜平台,配套装置齐全和配备技术全面的工程技术人员,发挥高超的操作技术水平,提供高质量的冷冻电镜分析数据与结果,使冷冻电镜在科学研究领域^[54-64]的应用得到技术保障。

7 结论

尽管冷冻电镜近几年的快速发展中存在着不少的问题,但不可否认它已经逐渐走向成熟。在分析大分子生物结构方面成为了首选的技术。冷冻扫描电镜、冷冻蚀刻电镜、冷冻透射电镜的研发与改善打开了微观世界更深层次的大门,为更为深度的研究提供了技术方法。纵观当今国内外前沿领域的研究成

果,与冷冻电镜技术的应用和发展密切相关,因此,综述了近几年冷冻电镜出现后不同学科研究领域的最新研究成果与实际应用中涉及的技术问题,探讨和列举了使用冷冻电镜在材料科学与生物医学两大科学领域研究成果的具体实例,并且展望了未来的发展前景。由于冷冻电镜与常规电镜相比所具有的优势,随着冷冻电镜技术的快速发展,人类将发现和解决科学领域中更深层次的许多难题与谜团。

参 考 文 献

- 1 Li Y Z, Li Y B, Pei A, et al. Atomic structure of sensitive battery materials and interfaces revealed by cryo-electron microscopy [J]. *Science*, 2017, 358(6362): 506-510
- 2 Liang J, Teng F Y, Chou T M, et al. Cryo-SEM imaging and analysis of frozen-hydrated PEG-AA microgel [J]. *Microscopy and Microanalysis*, 2016, 22: 1898-1899
- 3 Liang J, Teng F Y, Chou T M, et al. Measuring microgel swellratio by cryo-SEM [J]. *Polymer*, 2017, 116: 1-4
- 4 Ivan Kova E M, Dobrovol'skaya I P, Popryadukhin P V, et al. *In-situ*, cryo-SEM investigation of porous structure formation of chitosan sponges [J]. *Polymer Testing*, 2016, 52: 41-45
- 5 Fitzpatrick A W P. Cryo-EM structures of tau filaments from Alzheimer's disease [J]. *Nature*, 2017, 547(7662): 185-190
- 6 Liao M F, Cao E, Julius D, et al. Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy [J]. *Nature*, 2013, 504(7478): 107-112
- 7 Bartesaghi A, Merk A, Banerjee S, et al. 2.2 Å resolution cryo-EM structure of β -galactosidase in complex with a cell-permeant inhibitor [J]. *Science*, 2015, 348(6239): 1147-1151
- 8 程凌鹏. 生物大分子高分辨率冷冻电镜三维重构技术 [J]. *实验技术与管理*, 2018, 35(6): 17-22, 26
Cheng Lingpeng. 3D reconstruction technology of high-resolution cryo-electron microscope for biological macromolecules [J]. *Experimental Technology and Management*, 2018, 35(6): 17-22, 26
- 9 李雪明. 冷冻电镜: 在原子尺度上观察生命 [J]. *物理*, 2017, 46(12): 809-816
Li Xueming. Electron cryo-microscopy: observing life at the atomic level [J]. *Physics*, 2017, 46(12): 809-816
- 10 柳 正, 张景强. 结构生物学研究方法的重大突破——电子直接探测相机在冷冻电镜中的应用 [J]. *生物物理学报*, 2014, 30(6): 405-415
Liu Zheng, Zhang Jingqiang. Revolutionary breakthrough of structure determination recent advances of electron direct detection device application in cryo-EM [J]. *Acta Biophysica Sinica*, 2014, 30(6): 405-415
- 11 王宏伟. 冷冻电子显微学在结构生物学研究中的现状与展望 [J]. *中国科学*, 2014(44): 1020-1028
Wang Hongwei. Current status and future perspective of cryo-electron microscopy in structural biology [J]. *Scientia Sinica (Vita)*, 2014(44), 1020-1028
- 12 朱 平, 李国红, 许瑞明. 利用冷冻电镜技术解析 30 nm 染色质高级结构 [J]. *中国科学基金*, 2014(3): 200-203
Zhu Ping, Li Guohong, Xu Ruiming. Higher order structure of

- 30 nm chromatin fiber revealed by cryo-electron microscopy [J]. Bulletin of National Natural Science Foundation of China, 2014 (3): 200-203
- 13 尹长城. 冷冻电镜技术的突破导致结构生物学发生革命性变化[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2018, 34(1): 1-12
Yin Changcheng. Structural biology revolution led by technical breakthroughs in cryo-electron microscopy [J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2018, 34(1): 1-12
 - 14 尹长城. 君欲善其事, 必先利其器! ——2017 年诺贝尔化学奖评介[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2017, 33(10): 979-984
Yin Changcheng. Cryo-electron microscopy, the technique revolutionized structural biology: a survey review on 2017 Nobel Prize in chemistry [J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2017, 33(10): 979-984
 - 15 陈振国. 分辨率革命——冷冻电子显微镜在结构生物学研究中的进展[J]. 复旦学报, 2017, 44(6): 799-805
Chen Zhenguo. Resolution revolution: Advances and prospects of cryo-EM in structural biology [J]. Fudan University Journal of Medical Sciences, 2017, 44(6): 799-805
 - 16 Zhang Y, Sun B F, Feng D, et al. Cryo-EM structure of the activated GLP-1 receptor in complex with a G protein [J]. Nature, 2017, 546(7657): 248-253
 - 17 Liang Y L, Khoshouei M, Glukhova A, et al. Phase-plate cryo-EM structure of a biased agonist-bound human GLP-1 receptor-Gs complex [J]. Nature, 2018, 555(7694): 121-125
 - 18 Renaud J P, Chari A, Ciferri C. CryoEM in drug discovery: Achievements, limitations and prospects [J]. Nature Reviews Drug Discovery, 2018, 17: 471-492
 - 19 Liang Y L, Khoshouei M, Radjainia M, et al. Phase-plate cryo-EM structure of a class B GPCR-G-protein complex [J]. Nature, 2017, 546(7656): 118-123
 - 20 Bai X C, Yan C Y, Yang G H, et al. An atomic structure of human gamma-secretase [J]. Nature, 2015, 525(7568): 212-217
 - 21 Gao Y, Cao E, Julius D, et al. TRPV1 structures in nanodiscs reveal mechanisms of ligand and lipid action [J]. Nature, 2016, 534(7607): 347-351
 - 22 Hirschi M, Herzik Jr M A, Wie J H, et al. Cryo-electron microscopy structure of the lysosomal calcium-permeable channel TRPML3 [J]. Nature, 2017, 550(7676): 411-414
 - 23 Guo J T, She J, Zeng W Z, et al. Structures of the calcium-activated, non-selective cation channel TRPM4 [J]. Nature, 2017, 552(7684): 205-209
 - 24 Yan Z, Bai X C, Yan C Y, et al. Structure of the rabbit ryanodine receptor RyR1 at near-atomic resolution [J]. Nature, 2015, 517(7532): 50-55
 - 25 Georges A, Clarke O B, Zalk R, et al. Structural basis for gating and activation of RyR1 [J]. Cell, 2016, 167(1): 145-157
 - 26 Johnson Z L, Chen J. Structural basis of substrate recognition by the multidrug resistance protein MRP1 [J]. Cell, 2017, 168(6): 1075-1085
 - 27 Long F, Rachel H, Austin F S K, et al. Cryo-EM structures elucidate neutralizing mechanisms of anti-chikungunya human monoclonal antibodies with therapeutic activity [C]// Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington DC, USA: National Academy of Sciences, 2015, 112(45): 13898-13903
 - 28 Ciferri C, Lipari M T, Liang W C, et al. The trimeric serine protease HtrA1 forms a cage-like inhibition complex with an anti-HtrA1 antibody [J]. Biochemical Journal, 2015, 472(2): 169-181
 - 29 Wan R, Yan C, Bai R, et al. The 3.8 Å structure of the U4/U6.U5 tri-snRNP: insights into spliceosome assembly and catalysis [J]. Science, 2016, 351(6272): 466-475
 - 30 Richert-Pöggeler K R, Franzke K, Hipp K, et al. Electron microscopy methods for virus diagnosis and high resolution analysis of viruses [J]. Frontiers in Microbiology, 2019, 9: 1-8
 - 31 Dong Y C, Zhang S W, Wu Z L, et al. Cryo-EM structures and dynamics of substrate-engaged human 26S proteasome [J]. Nature, 2019, 565: 49-55
 - 32 Bonomi M, Hanot S, Greenberg C H, et al. Bayesian weighing of electron cryo-microscopy data for integrative structural modeling [J]. Structure, 2019, 27(1): 175-188
 - 33 Heymann J B. Single-particle reconstruction statistics: a diagnostic tool in solving biomolecular structures by cryo-EM [J]. Acta Crystallographica Section F-Structural Biology Communications, 2019, 75: 33-44
 - 34 Mitra A K. Visualization of biological macromolecules at near-atomic resolution: cryo-electron microscopy comes of age [J]. Acta Crystallographica Section F-Structural Biology Communications, 2019, 75: 3-11
 - 35 Mitra A K, van Raaij M. Acta crystallographica section F-crystallographica section F-another home for cryo-electron microscopy contributions [J]. Acta Crystallographica Section F-Structural Biology Communications, 2019, 75: 1-2
 - 36 Boyko K M, Baymukhametov T N, Chesnokov Y M, et al. 3D structure of the natural tetrameric form of human butyrylcholinesterase as revealed by cryoEM, SAXS and MD [J]. Biochimie, 2019, 156: 196-205
 - 37 Matyszewski M, Zheng W L, Lueck J, et al. Cryo-EM structure of the NLRC4 (CARD) filament provides insights into how symmetric and asymmetric supramolecular structures drive inflammasome assembly [J]. Journal of Biological Chemistry, 2019, 293(52): 20240-20248
 - 38 Myers J B, Haddad B G, O'Neill S E, et al. Structure of native lens connexin 46/50 intercellular channels by cryo-EM [J]. Nature, 2018, 564(7736): 372-377
 - 39 Park Y J, Lacourse K D, Cambillau C, et al. Structure of the type VI secretion system TssK-TssF-TssG baseplate subcomplex revealed by cryo-electron microscopy [J]. Nature Communications, 2018, 9: 2898
 - 40 Pintilie G, Chiu W. Assessment of structural features in Cryo-EM density maps using SSE and side chain Z-scores [J]. Journal of Structural Biology, 2018, 204(3): 564-571
 - 41 Steenackers A, Wang H B, Hinshaw J, et al. Optimization of expression of O-GlcNAc cycling enzymes for cryo-electron microscopy [J]. Glycobiology, 28(12): 1008-1008
 - 42 Chubunov V, Mittermeier L, Gudermann T. TRPM7 reflected in cryo-Emirror [J]. Cell Calcium, 2018, 76: 129-131
 - 43 Sui X W, Arlt H, Brock K P, et al. Cryo-electron microscopy structure of the lipid droplet-formation protein seipin [J]. Journal of Cell Biology, 2018, 217(12): 4080-4091

- 44 Sgro G G , Costa T R D , Cenens W , et al. Cryo-EM structure of the bacteria-killing type IV secretion system core complex from *Xanthomonas citri* [J]. *Nature Microbiology* , 2018 , 3 (12) : 1429-1440
- 45 Manolaridis I , Jackson S M , Taylor N M I , et al. Cryo-EM structures of a human ABCG2 mutant trapped in ATP-bound and substrate-bound states [J]. *Nature* , 2018 , 563 (7731) : 426-430
- 46 Herzik M , Wu M Y , Lander G. Exploring the size and resolution limits of single particle cryo-electron microscopy [J]. *Protein Science* , 2018 , 27 : 228-229
- 47 Terwilliger T C , Adams P D , Afonine P V , et al. A fully automatic method yielding initial models from high-resolution cryo-electron microscopy maps [J]. *Nature Methods* , 2018 , 15 (11) : 905-908
- 48 Sugita Y , Matsunami H , Kawaoka Y , et al. Cryo-EM structure of the Ebola virus nucleoprotein-RNA complex at 3.6 angstrom resolution [J]. *Nature* , 2018 , 563 (7729) : 137-140
- 49 Heimowitz A , Anden J , Singer A. APPLE picker: automatic particle picking , a low-effort cryo-EM framework [J]. *Journal of Structural Biology* , 2018 , 204 (2) : 215-227
- 50 Abe K , Fujiyoshi Y. Cryo-electron microscopy for structure analyses of membrane proteins in the lipid bilayer [J]. *Current Opinion in Structural Biology* , 2016 , 39 : 71-78
- 51 Anoshina N A , Sagindykov T B , Sorokin D V. A method for generation of synthetic 2D and 3D cryo-EM images [J]. *Programming and Computer Software* , 2018 , 44 (4) : 240-247
- 52 Asano S , Engel B D , Baumeister W. In situ cryo-electron tomography: a post-reductionist approach to structural biology [J]. *Journal of Molecular Biology* , 2018 , 428 (2) : 332-343
- 53 Bai X C , McMullan G , Scheres S H W. How cryo-EM is revolutionizing structural biology [J]. *Trends in Biochemical Sciences* , 2015 , 40 (1) : 49-57
- 54 Baker M. Cryo-electron microscopy shapes up [J]. *Nature* , 2018 , 561 (7724) : 565-567
- 55 Barad B A , Echols N , Wang R Y , et al. EMRinger: side chain directed model and map validation for 3D cryo-electron microscopy [J]. *Nature Methods* , 2015 , 12 (10) : 943-946
- 56 Barnett A , Greengard L , Pataki A , et al. Rapid solution of the cryo-EM reconstruction problem by frequency marching [J]. *Siam Journal on Imaging Sciences* , 2017 , 10 (2) : 1170-1195
- 57 Bartesaghi A , Merk A , Banerjee S , et al. 2.2 angstrom resolution cryo-EM structure of beta-galactosidase in complex with a cell-permeant inhibitor [J]. *Science* , 2015 , 348 (6239) : 1147-1151
- 58 Binshtein E , Ohi M D. Cryo-electron microscopy and the amazing race to atomic resolution [J]. *Biochemistry* , 2015 , 54 (20) : 3133-3141
- 59 Butan C , Filman D J , Hogle J M. Cryo-electron microscopy reconstruction shows poliovirus 135S particles poised for membrane interaction and RNA release [J]. *Journal of Virology* , 2014 , 88 (3) : 1758-1770
- 60 Carroni M , Saibil H R. Cryo electron microscopy to determine the structure of macromolecular complexes [J]. *Methods* , 2016 , 95 : 78-85
- 61 Cleverley R M , Kean J , Shintre C A , et al. The cryo-EM structure of the CorA channel from *Methanocaldococcus jannaschii* in low magnesium conditions [J]. *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes* , 2015 , 1848 (10) : 2206-2215
- 62 Glaeser R M , Han B G , Csencsits R , et al. Factors that influence the formation and stability of thin , cryo-EM specimens [J]. *Biophysical Journal* , 2016 , 110 (4) : 749-755
- 63 Glaeser R M. How good can cryo-EM become? [J]. *Nature Methods* , 2016 , 13 (1) : 28-32
- 64 Gutsche I , Desfossez A , Effantin G , et al. Near-atomic cryo-EM structure of the helical measles virus nucleocapsid [J]. *Science* , 2015 , 348 (6235) : 704-707

Application and Development of Cryo-electron Microscopy Technology

ZHANG Xiao-kai¹ , ZHANG Cong-cong¹ , LIU Zhong-min^{2*} , LIU Li-jia¹ , XIA Lei¹

(School of Physics and Electronics¹ , Management Office of Laboratory and Equipment² , Shandong Normal University , Jinan 250014 , China)

[Abstract] In recent years , the rapid development of cryo-electron microscopy has been made by leaps and bounds , and many pioneering achievements have been achieved , which have played an active role in scientific research. The application of cryo-electron microscopy techniques and methods in scientific research is summarized , and the process , development , principle and analytical methods of cryo-electron microscopy are briefly introduced. The progress of cryo electron microscopy in structural biology , biomedicine and drug screening is illustrated by examples. Compared with other technologies , the advantages and existing problems of cryo electron microscopy and its future development are also pointed out.

[Key words] cryo-electron microscopy structural biology biomedicine drug screening