

文章编号:1000-6281(2003)05-0449-08

电子显微镜学在结构生物学研究中的新进展

王大能¹, 陈 勇², 隋森芳²

(1 Skirball Institute of Biomolecular Medicine, New York University School of Medicine,
New York, NY 10016, USA;

2 清华大学生物科学与技术系,北京 100084)

摘 要: 电子显微镜学是结构生物学的重要分支,已经成为一种公认的研究生物大分子、超分子复合体及亚细胞结构的有力手段。本文先回顾了近期电子显微镜学在技术上的新进展,后概述了生物电子显微镜学的三个组成部分——电子晶体学、单颗粒技术、电子断层成像术的基本原理、技术方法与研究现状。最后,对电子显微镜学与其他结构生物学研究手段的结合以及电子显微镜学的未来发展做了简单的展望。

关键词: 结构生物学;电子显微镜学;电子晶体学;单颗粒技术;电子断层成像术

中图分类号: Q617;Q336 **文献标识码:** A

随着人类基因组计划的初步完成和一系列模式生物全基因组计划的完成,生物学进入了后基因组时代。虽然大量的基因序列被阐明,但是生物大分子如何从这些基因转录、翻译、加工、折叠、组装,形成有功能的结构单元,尚需进一步研究。而揭示生物大分子在细胞和细胞器中的排列与相互作用,则是人们理解细胞活动的必经之路。以 X 射线晶体学、核磁共振技术(NMR)、电子显微镜学、计算生物学为基本研究手段的结构生物学显然将在其中扮演越来越重要的角色。

电子显微镜学是通过电子显微镜技术并结合图像处理技术发展起来的,在直接提供生物大分子的形貌信息上具有很大的优越性。电子显微镜学在本质上有提供原子分辨率的能力,但由于生物样品易受辐照损伤、图像衬度低、信噪比低的特点,使其对生物大分子的高分辨率结构解析非常困难。1968 年,DeRosier 和 Klug 第一次用电子显微镜对生物大分子的结构(T4 噬菌体的尾部)进行了解析^[1]。在随后的 35 年里,随着生物大分子样品制备技术的完善,电子显微镜在设备和技术上的进步,计算机与图像处理技术的发展,使得应用电子显微镜对生物大分子进行结构解析的方法日益成熟,并逐渐发展成为解析生物大分子空间结构的重要学科——生物电子显微镜学。目前电子显微镜学已经成为一种公认的研究生物大分子、超分子复合体及亚细胞结构的有力手段。

生物电子显微镜学相对于其他两种成熟的结构生物学研究手段——X 射线晶体学和核磁共振技术,

主要有以下一些优势:1. 可以直接获得分子的形貌信息,即使在较低分辨率下,电子显微镜学也可给出有意义的结构信息;2. 适于解析那些不适合应用 X 射线晶体学和核磁共振技术进行分析的样品,如难以结晶的膜蛋白,大分子复合体等;3. 适于捕捉动态结构变化信息;4. 易同其他技术相结合得到分子复合体的高分辨率的结构信息;5. 电镜图像中包含相位信息,所以在相位确定上要比 X 射线晶体学直接和方便。

本文首先介绍近年来生物电子显微镜学在研究技术方法上的发展;其后将对三种主要方法:电子晶体学、单颗粒技术及电子断层成像术的主要原理、技术方法、研究现状分别做简单介绍,并列举相应的实例说明;最后介绍电子显微镜学和其他结构生物学研究手段的结合,以及展望。希望更深入地了解电子显微镜学的读者,可以参考文献^[2-6]。

1 电子显微镜学技术进展

用电子显微镜研究生物大分子的结构必须解决以下几个问题:保持样品的天然含水状态;尽量减少样品漂移及辐照损伤,提高图像衬度,提高信噪比。

首先,低温电子显微术(electron cryomicroscopy)的出现及完善使得人们对天然状态的样品研究成为可能,且能提高样品对电子辐照的耐受度,有效地提高了分辨率。冰冻电镜的开创性工作是由 Taylor 和 Gaeser^[7]首先建立的,经过近二十年的发展,尤其是得益于 Dubochet 实验室对冰冻技术深入系统的研

收稿日期:2003-03-01;修订日期:2003-05-09

作者简介:王大能(1961-),男(汉族),辽宁人,教授。

究^[8],冰冻技术已经成为高分辨电子显微学研究的常规技术。它包括冰冻制样技术、低温冷台技术和低剂量曝光技术。主要步骤是把含水样品快速冷冻,使之包埋在玻璃态的冰中(vitrification),然后将冰冻样品转移到液氮或液氮冷却的低温冷台进行电镜观测。对于冰冻样品的观察、聚焦、拍照要在低剂量模式下进行。因为温度越低,样品所能承受的电子辐照量越高,所以目前最高分辨率的电子显微镜已应用液氮冷却^[9]。另一个最近发展起来的技术是底物混合冰冻技术(spray-freezing)^[10]。利用这种技术可以把两种溶液在极短的时间内混合起来(几个毫秒),然后快速冷冻。这样能对生物大分子在结合底物时或其他生化反应中的快速的结构变化进行测定。

其次,电子显微镜性能的不断f提高和各种新技术的应用也推动了电子显微学对生物大分子结构的研究。场发射电子源在新一代的电子显微镜中得到了广泛的应用。这种电子源发射的电子相干性更好,信号失真更小,从而有效地提高了图像衬度。能量过滤器的配备,能去除非弹性散射电子,从而减小背底噪音。更高精度和更大倾转角度的样品台使之能够收集尽可能完整的空间结构信息。点扫描成像技术的应用,能够减小电子束造成的样品漂移,从而

有效提高了信噪比^[11]。CCD相机在电子显微镜上的广泛应用使得实时拍摄图像,评估样品质量好坏成为可能。而最近出现的全自动化电镜^[12],使电镜调节、样品寻找、图像记录都可通过计算机控制的电子显微镜自动进行,从而可迅速获得大量高质量的生物样品电子显微图像,这种技术的成熟必将极大地提高电子显微学研究的效率。

最后,进一步提高图像信噪比,通过后期的图像处理提取有用的结构信息。近年来,运算速度、存储能力、图形显示功能等迅猛提高的计算机系统大大提高了后期图像分析处理的效率。而图像处理技术和相应软件的成熟和完善,使得后期图像处理逐渐成为一个程序化的常规工作。目前处理各种样品,如二维晶体、螺旋对称结构、病毒粒子、单颗粒及进行断层成像重构都有相应免费或商业化的软件包^[13](见表1)。

2 电子显微学基本原理和分类

电子显微学方法包含以下三种独立的技术(表2):电子晶体学(Electron crystallography)、单颗粒技术(Single particle analysis)、电子断层成像技术(Electron tomography)。虽然它们所面对的研究对象不同,但图像处理的基本原理都相同,即中心截面定理:在三

表 1 常用电子显微学图像处理软件

Table 1 Packages for electron microscopy image analysis

软件分类	软件名称	主要用途	下载或联系地址	软件类型
图像处理软件	MRC	二维晶体,螺旋结构	http://iims.ebi.ac.uk/3dem/mrc-maps/mrc.html	免费
	MAGIC-5	二维晶体,单颗粒,断层成像	http://www.imagescience.de/	商业
	Phoelix/Suprim	螺旋结构	http://ami.scripps.edu/software/phoelix/	免费
	Brandeis_Helical Package	螺旋结构	http://www.rose.brandeis.edu/users/derosier/BHP/brandeis-helical-package/	免费
	Spider/WEB	单颗粒	http://www.wadsworth.org/resnres/frank.htm	1500 美元
	EMAN	单颗粒	http://ncmi.bcm.tmc.edu/~stevel/EMAN/doc/	免费
	IMIRS	病毒	http://hub.med.uth.tmc.edu/~hong/IMIRS/	免费
	IMOD	断层成像	http://bio3d.colorado.edu/imod/index.html	免费
	EM-MENU	断层成像	http://www.tvips.com/Software_en.htm	商业
	Situs	Docking	http://situs.scripps.edu/	免费
图像操作及显示软件	EMTOOL	图像格式转化	http://sal.kachinatech.com/E/5/EMTOOL.html	免费
	Suprim	图像运算操作	http://ami.scripps.edu/software/suprim	免费
	O	三维图像显示	http://origo.imsb.au.dk/~mok/o/	免费
	AVS	三维图像显示	http://www.avs.com/	商业
	CCP4	蛋白质晶体学	http://www.ccp4.ac.uk/main.html	免费

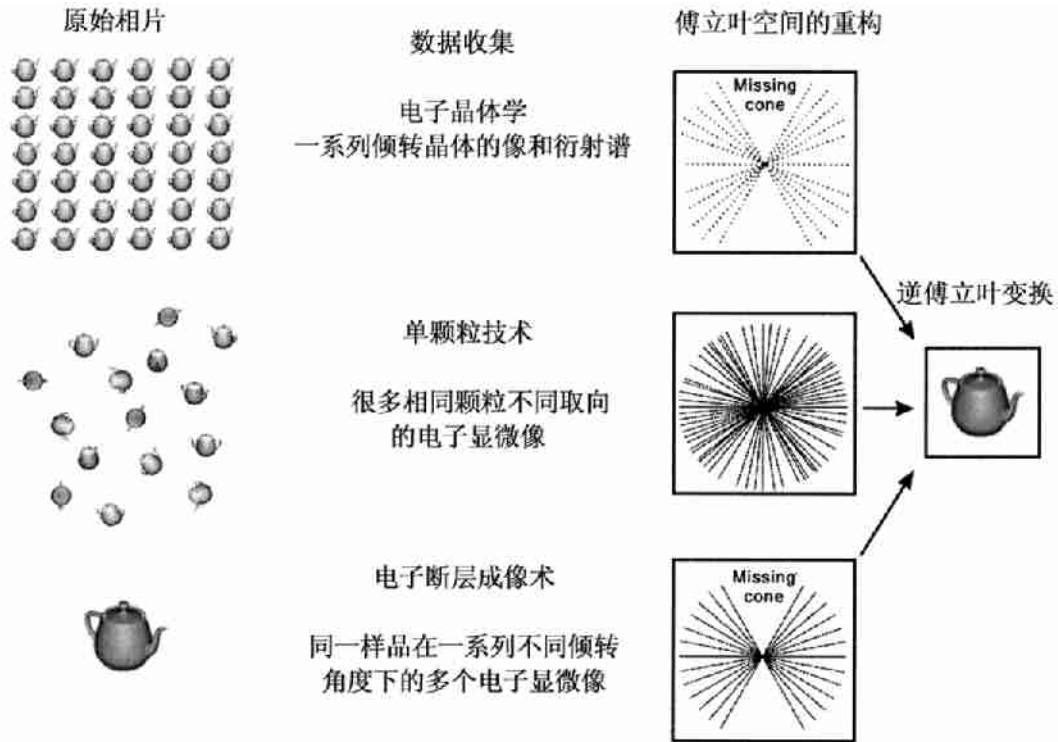


图 1 电子显微镜方法中三种研究对象和三维重构方法。Missing cone(缺失锥),是指由于样品倾转角度范围的限制,使得倒易空间中有一个锥形区域的信息丢失。

Fig. 1 The diagram illustration of three methods in electron microscopy. Missing cone means the information of a cone in the reciprocal space is missing, due to the limitation of tilt angle of the sample.

表 2 生物电子显微镜研究方法分类
Table 2 The classification of techniques in biological electron microscopy

方法分类	研究对象	对象特点	目前最高分辨率
电子晶体学	(1) 二维晶体或三维薄晶 (2) 纤维或管状晶体	周期排列	二维晶体: 细菌视紫红质 0.3nm ^[14] 管状晶体: 乙酰胆碱受体 0.40nm ^[15]
单颗粒技术	(1) 病毒 (2) 单颗粒生物大分子及复合体	全同粒子	病毒: 乙肝病毒 0.74nm ^[16] 复合体: 核糖体 1.15nm ^[17]
电子断层成像术	超分子复合体, 细胞器, 细胞	单一结构	细胞: 影泡细胞 (phantom cell) 0.40nm ^[18]

维实空间中,物体沿电子束方向投影的傅立叶变换是该物体三维傅立叶变换后倒易空间的一个中心截面,而且,中心截面垂直于投影方向。由于一般的生物样品满足弱相位近似 (weak-phase-object approximation) 的条件,只要在成像时选择适当的欠焦量,得到的电子显微图像即可直接表示样品中原

子势场分布即原子密度分布的投影。此投影的傅立叶变换就是样品三维空间密度分布的傅立叶变换在垂直于入射电子束方向的中心截面。如果我们能获得样品相对电子束不同方向的电子显微像,也就等于获得了样品在其三维空间的傅立叶变换的各个方向的中心截面,当所取的投影方向足够多时,就可以将这些中心截面合并起来,并通过逆傅立叶变换获得实空间中样品的三维结构信息。根据不同的样品性质,各种技术应用了不同的三维重构方法,如图 1 所示。

电子晶体学是通过对二维晶体在各个倾转角度下投影的衍射谱在倒易空间的信息提取和整合来解析生物大分子的结构。单颗粒方法是对若干个取向不同的全同蛋白分子或复合体进行分类,平均和重构来解析生物大分子的结构。断层成像术是对单个细胞器、细胞或超分子复合体进行多角度的倾转成像,最终进行重构。欲深入了解这三类方法的读者,请参考文献^[19],电子晶体学;文献^[20, 21],单颗粒技术;文献^[22],电子断层成像术。

3 电子晶体学

电子晶体学的主要研究对象是生物大分子的二

维晶体和呈螺旋对称的纤维或管状晶体。二维晶体是生物大分子在二维平面上的规则排列,而呈螺旋对称的纤维或管状晶体可以看作是二维晶体的一种特殊形式。二维晶体的三维傅立叶变换在倒易空间中表现为一系列的衍射点,晶体的结构信息就存在于这些衍射点中。晶体结构因子的振幅可直接从电子衍射谱测出,而相位可以从电子显微像的傅立叶变换得到,将两者整合并进行逆傅立叶变换就获得了晶体相应投影方向的结构密度图。其三维重构则是通过倾转样品,拍摄不同转角下的电子衍射谱和电子显微像,获取不同转角下的振幅和相位信息,最后将这些信息在三维倒易空间中拟合,并加入相应的晶体学对称,通过逆傅立叶变换得到实空间的晶体结构。电子晶体学是电子显微学中迄今为止唯一能得到原子分辨率结构的解析方法。自从 DeRosier 和 Klug 于 1968 年第一次用该技术重构出 T4 噬菌体尾部的三维空间结构以来^[1],共有 4 种膜蛋白的原子分辨率的结构通过电子晶体学方法确定下来,即细菌视紫红质 (bacteriorhodopsin)^[14]、植物捕获光能复合体 II (plant light-harvesting complex II)^[23]、水通道 (aquaporin)^[24] 和乙酰胆碱受体 (acetylcholine receptor)^[15]。还有一些膜蛋白得到了 0.4~0.9 nm 分辨率的三维结构,如视紫红质 (rhodopsin)^[25]、植物光系统 II 反应中心 (plant photosystem II reaction centre)^[26]、H⁺-ATP 酶^[27]、微体谷胱转移酶 (microsomal glutathion transferase)^[28]、蛋白转运通道 (Sec YEG)^[29]、间隙连接子 (gap junction)^[30] 及 Na⁺-H⁺ 转运蛋白 (NhaA)^[31] 等。还有一些水溶性蛋白,如微管蛋白 (tubulin)^[32] 也通过电子晶体学的方法得到了高分辨率 (0.35 nm) 的三维结构。另外一大批膜蛋白或水溶性蛋白获得了 1~2 nm 低分辨率的结构。以上高分辨率的结构都是以片状的二维晶体为对象解析出来的。但有一些蛋白并不形成这种片状的二维晶体,而是形成螺旋对称的管状晶体,如肌质网钙 ATP 酶及乙酰胆碱受体等。另有一些蛋白在体内就以螺旋对称的纤维形式存在,如肌动蛋白及一些病毒粒子(如烟草花叶病毒)。这类呈螺旋对称的结构其优势在于一张照片中包含了各个角度的蛋白像,因此不需要倾转样品,在数据收集上相对简单。而缺点就是含有的晶胞数较少、信噪比低,分辨率没有典型的二维晶体高,至今最高分辨率是乙酰胆碱受体 0.40 nm 分辨率的三维结构^[15]。

目前电子晶体学研究的关键步骤在于得到好的二维晶体或管状晶体。有一些膜蛋白,它们在天然

的膜环境中就以二维晶体的形式存在,如细菌视紫红质等。但对于大部分的膜蛋白和水溶性蛋白,需要纯化并在体外进行二维结晶。对于膜蛋白最常用的方法是将蛋白重组到脂双层中实现二维结晶化^[33];而对水溶性蛋白,最常用的是在脂单层膜上实现蛋白的二维有序组装^[34]。过去认为电子晶体学的优势在于一些难以三维结晶化的膜蛋白相对容易得到二维晶体,但事实上蛋白质的二维结晶至今仍然是一个非常困难的工作。随着膜蛋白三维结晶技术的成熟,越来越多的膜蛋白结构通过 X 射线晶体学得到了解析。目前国际蛋白质晶体学数据库中已有 60 种膜蛋白的结构数据,其中只有三种是通过电子晶体学的方法得到解析的,且其中的两种蛋白(细菌视紫红质,水通道)在随后的工作中也得到了三维晶体的高分辨结构解析。所以在蛋白质的结构测定上,电子晶体学仍将只是 X 射线晶体学的一个辅助手段。但电子晶体学一个不可比拟的优势在于通过这种方法得到的是膜蛋白和膜相关的水溶性蛋白在膜环境中的结构信息,和 X 射线晶体学相比更反映生理状态下的真实结构。下面,我们将以植物的光系统 II 捕光叶绿素 a/b 蛋白复合体为例说明电子晶体学研究的优势。植物的光系统 II 捕光叶绿素 a/b 蛋白复合体 (LHCII) 是高等植物及绿藻体叶绿体中类囊体膜上含量最多的整合型膜蛋白复合体,它最重要的生物学功能是吸收光能并传递到光反应中心,这是光合作用的第一阶段。解析 LHCII 的结构对于从本质上探索光合作用的过程和机理具有非常重要的意义。到目前为止,还没有植物 LHCII 的三维结晶化及结构解析的报道,对于该结构解析最好的结果来自于电子晶体学。Kühlbrandt 等人从豌豆的叶绿体中分离纯化了 LHCII,采用重组脂双层法得到了大面积的高度有序的 LHCII 的二维晶体。通过对冷冻样品的电子晶体学分析得到了 0.34 nm 分辨率的原子模型^[23](图 2),此分辨率下的模型可提供大量的原子间位置关系和相互作用的信息,能帮助人们了解这个蛋白复合体光能吸收和能量传递的机制。

4 单颗粒技术

单颗粒方法是对分离纯化的颗粒状大分子进行结构解析。颗粒可具有某种对称性,如二十面体的病毒,也可不具有任何对称性的蛋白分子或复合体,如核糖体。其基本原理是通过将相同的生物大分子某方向的投影显微像在实空间中经过调整后进行叠

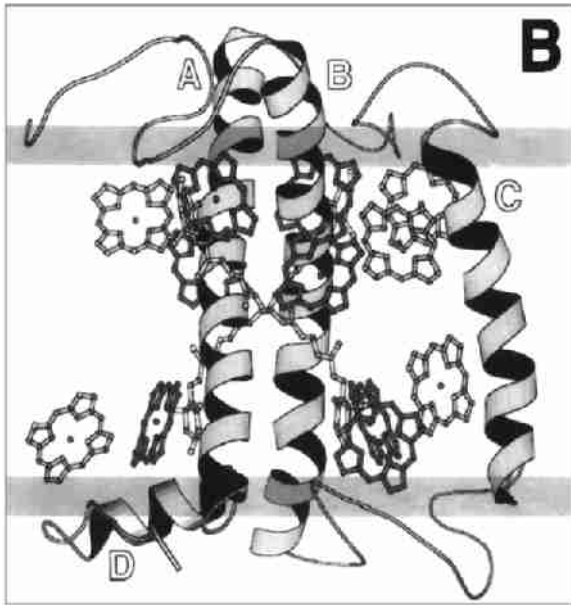


图2 豌豆的光系统 II 捕光叶绿素 a/b 蛋白复合体 (LHCII) 亚基的结构模型图,这是通过电子晶体学得到的^[23]。图中的双条带代表脂双层的位置。LHCII 一个亚基包括四段跨膜 alpha 螺旋 A-D,和 12 个叶绿素分子及 2 个叶黄素分子。

Fig. 2 Atomic model of LHCII from pea. This is solved by electron crystallography^[23]. Double bands indicate the approximate position of the lipid bilayer. Four helices labeled A to D, and chlorophyll, luteins.

加平均,从而提高信噪比,使粒子中共同部分的结构信息得到加强,最后对各种不同投影方向的单颗粒显微像在三维空间中进行重构,从而获得单颗粒大分子的三维结构信息。由于它处理的是同一大分子随机散布的电镜照片,所以没有形成晶体的要求。这是单颗粒研究方法的最大优点。从对正的准确度考虑,单颗粒方法研究的粒子的最小分子量约为 100kD^[3],且分子量越大,结果越好。事实上,单颗粒技术在核糖体等用传统技术不易研究的大分子复合体结构研究中作用尤为突出^[35]。目前单颗粒样品解析最好的分辨率已达到 1nm 左右,但需要积累大量的数据(近 10 万个颗粒的图像),如大肠杆菌 70S 核糖体 1.15 nm 分辨率的结构就是来自于 73 523 个颗粒的图像^[17]。限制单颗粒技术分辨率的主要因素是样品的均一性。因为单颗粒技术的基础是假设所有的分子都是全同的,只是投影方向的不同。而在实际生物样品中,绝大多数样品具有一定的结构柔性,所以只有数据量足够大,才能保证结构的有效性。限制单颗粒技术分辨率的另一个主要原因是定位颗粒的投影方向时存在误差。随着计算机图像处

理技术的进一步发展及电子显微镜技术的进展,尤其是自动拍摄电子显微镜的发明^[12],单颗粒数据的收集速度将会大大提高,同时新的分类和颗粒取向定位方法的出现必将使单颗粒技术解析生物大分子结构的分辨率得到提高。病毒重构技术是单颗粒技术的一种特殊形式^[21]。具有二十面体对称性的病毒颗粒是一种理想的单颗粒研究对象,一个颗粒就包含了全同的亚基在若干个已知方向上的投影信息,因此具有高度对称性的病毒颗粒的重构相比于完全无序的单颗粒来说分辨率要高一些,现在已有几种病毒获得了 0.7 ~ 0.9 nm 分辨率的结构^[36-40]。目前最好的结果是稻矮病病毒 (rice dwarf virus) 0.68 nm 分辨率的结构^[36],从中可以清楚地分辨指出二级结构。

单颗粒技术目前在结构生物学研究中得到了非常广泛的应用。一方面其解析生物大分子结构的分辨率日益提高,理论上单颗粒技术可以达到原子分辨率^[3],从而能够提供大的蛋白分子或复合体系的精细结构;另一方面,其在方法学上的独特优势为它揭示生物学规律提供了很多重要信息。单颗粒技术可以解析生物大分子在不同功能状态时的结构,比如结合不同的底物后研究结构有何变化,这对于揭示蛋白或复合体发挥功能过程中的结构变化和作用机理都有着重要作用。目前单颗粒研究中最经典的例子是核糖体。核糖体是生物体内蛋白质合成的机器,对其结构,尤其是在肽链形成过程中的动态结构变化的解析,有助于人们了解蛋白质合成中一系列的复杂过程和机理。从 70 年代 Frank 开始对核糖体进行单颗粒分析以来,二十多年的努力使得大肠杆菌 70S 核糖体 1.15 nm 分辨率的三维结构已经得到揭示(图 3)。从这个三维结构模型中我们可以清楚地分辨出各 RNA、蛋白组分和它们之间的连接关系。虽然一系列核糖体的三维晶体结构已有报道^[41-43],但单颗粒分析对于研究核糖体在蛋白合成过程中的结构变化仍是唯一有效的手段^[35]。

5 电子断层成像技术

电子断层成像术主要用于研究那些单一结构,比如细胞或细胞器,以及一些巨大的超分子复合体。这些体系的特点是粒子本身并不具有全同性,不可能采取单颗粒研究中的平均方法来提高信噪比,所以这种方法的分辨率并不高,现在最好只是 4 ~ 5nm^[18, 44]。它的主要策略是对同一个粒子每隔一定的角度间隔拍一幅照,这样就得到了几十幅代表同

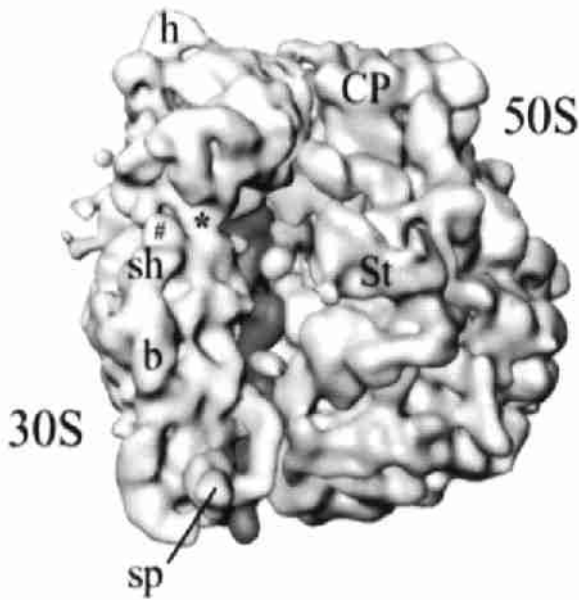


图 3 大肠杆菌 70S 核糖体 1.15nm 分辨率的结构模型, 这是通过对 73 523 个颗粒进行单颗粒分析得到的^[17]。图中所示是从沿着大小亚基分界的侧视图。30S 和 50S 亚基已标示出来, 图中 b 代表主体, h 代表头部, sp 代表突起, sh 代表肩部, St 代表柄部, CP 代表中心突起。引用该图得到了 Cell 杂志社的授权。

Fig. 3 The 1.15nm resolution cryo-EM map of the *E. coli* 70S ribosome shown in subunit-subunit side view. This map is obtained from 73 523 ribosomes through single particle analysis^[17]. Domains and features of the 30S subunit and 50S subunit are as follows: b, body; h, head; sp, spur; sh, shoulder; St, stalk base; and CP, central protuberance. * and # mark sites of the shoulder contacting the head. Reprinted with permission from 《Cell》.

一结构在不同角度下的投影像, 然后再对这一系列的投影对正后, 用加权背投影的方法得到原来粒子的结构。这个方法本身有一对矛盾: 一方面为了保证信息的完备, 需要样品在较大的倾转角度范围内以较小的步长拍照, 这就不可避免地要使用较大的电子辐照剂量; 另一方面, 为了保证图像反映真实结构, 需要样品承受尽可能少的电子辐照。这对矛盾只有在现在自动控制的电子显微镜和自动数据采集系统的运用后才得到较好地解决^[45]。电子断层成像术的主要优势在于解决不具备周期性或全同性的生物大分子复合体系或细胞器的结构, 如线粒体^[46]、高尔基体^[47]、细胞^[18, 44]等, 这些不具全同性的粒子结构是无法用其他方法解析的。而低温技术在电子断层成像术上的应用, 使得人们可以直接看

到整个细胞内的结构和动态变化, 从而可以用于研究亚细胞量级的生物学过程。如 Bohm 等人对 T5 噬菌体是如何将 DNA 释放到宿主细胞中的过程进行了研究^[48], 他们对体外重组的噬菌体—脂质体系统进行了低温电子断层成像和结构分析, 揭示了噬菌体尾部在和膜上受体结合后的结构变化和一些结构细节。最近 Medalia 等人^[44]用电子断层成像术重构了网柄菌细胞 (*Dictyostelium cell*) 的胞质结构, 从中可清楚地看到以肌动蛋白为主的细胞骨架系统和细胞膜以及胞质里的一些大分子的空间连接关系。

6 电子显微学和其它结构研究手段的结合

电子显微学是一门研究范围非常广泛的学科, 从单个蛋白分子到整个细胞系统都可以是它的研究对象。在结构生物学研究的三种方法中, 电子显微学的优势和劣势都很明显^[3, 5]。其优势在于能解析复杂体系在近生理环境下的结构; 劣势则由于生物样品的特性, 结构解析对大多数样品不可能达到原子分辨率的水平。如果能够把低分辨率的电子显微学重构的结构和通过 X 射线晶体学和核磁共振技术得到的单个组分的高分辨率结构结合起来, 就有可能得到高分辨率的复合体结构^[49]。基于这个思想, 人们已经发展了多种算法把已知三维空间的结构拟合到电子显微学得到的电子密度图中, 这个技术称锚定 (docking)。目前, 锚定技术已广泛应用于研究蛋白复合体的结构中。如将微管蛋白的原子分辨率的结构锚定到从电子显微学中得到的低分辨率的微管结构中, 就得到了整个微管的高分辨率结构^[50]。

锚定中一个主要问题是, 单个蛋白的结构在形成复合体时可能会有细微的变化, 这样会给锚定带来误差。这只有通过提高电子显微学结构的分辨率来解决。如果蛋白分子里的结构域能在电子密度图里准确定位, 这样锚定的准确率就会提高。但这个缺点在某些情况下也可成为这个技术独特的优势, 通过锚定结构的调整可以清楚地看到在复合体系中各个组分发生了什么样的结构变化。如 Adair 等人^[51]通过电子显微学得到了整合蛋白 β_3 (Integrin β_3) 2nm 分辨率的电子密度图, 他们将胞外片断的高分辨率结构锚定进去, 发现链接区有一个移动后才能和电子密度图相吻合, 从而提出了整合蛋白在活化过程中的结构变化模型。

很久以来, 生物学家有个梦想: 在原子水平上研

究整个细胞的活动。把通过电子显微镜学得到的分子分辨率的结构和通过 X 射线晶体学或核磁共振技术得到的原子分辨率结构结合起来,从理论上来说,这是可以实现的。通过电子断层成像术得到的细胞结构,现在已能到 4~5nm 的分辨率,在这个分辨率下分子量大于 400kD 的结构可以精确定位在细胞中^[22]。如果能将分辨率提高到 2~3nm,结合 X 射线晶体学得到的细胞内所有蛋白的精细结构,我们就可以构筑这个细胞的基本结构体系。现在看来是完全可能的。

Henderson 和 Unwin 在 1975 年用电子晶体学方法测出紫膜蛋白 0.7nm 分辨率的三维结构^[52],在世界上首次观察到膜蛋白的跨膜螺旋,所用的是 Philips 301 电镜和 PDP 11/10 计算机。本文所描述的几种电子显微镜学技术并不都需要十分尖端的仪器。更为关键的是选择有重要生物学意义的题目,结合细胞生物学、分子生物学和生物化学的手段做出合适的样品来,并对一个样品静下心来做长期的系统研究。

参考文献:

- [1] DeRosier D J, Klug A. *Nature*, 1968, 217: 130-134.
- [2] Frank J. *Three-dimensional electron microscopy of micromolecular assemblies*. California: Academic Press, Inc., San Diego, 1996.
- [3] Henderson R. *Quart Rev Biophys*, 1995, 28: 171-193.
- [4] Kuhlbrandt W, Williams K A. *Curr Opin Chem Biol*, 1999, 3: 537-543.
- [5] Frank J. *Annu Rev Biophys Biomol Struct*, 2002, 31: 303-319.
- [6] 李慧林, 施丹, 任罡, 隋海心, 谏东华, 王大能. 生物大分子的电子显微镜学[M]. 见: 叶恒强, 王元明编. 电子显微镜学进展. 北京: 科学出版社, 2003.
- [7] Taylor K A, Gaeser R M. *Science*, 1974, 186: 1036-1037.
- [8] Dubochet J, Adrian M, Chang J J, Homo J C, Lepault J, McDowell A W, Schultz P. *Quart Rev Biophys*, 1988, 21: 129-228.
- [9] Fujiyoshi Y, Mizusaki T, Morikawa K, Yamagishi H, Aoki Y, Kihara H, Harada Y. *Ultramicroscopy*, 1991, 38: 241-251.
- [10] Beriman J, Unwin N. *Ultramicroscopy*, 1994, 56: 241-252.
- [11] Downing K H. *Science*, 1991, 251: 53-59.
- [12] Carragher B, Kisseberth N, Kriegman D, Milligan R A, Potter C S, Pulokas J, Reilein A. *J Struct Biol*, 2000, 132: 33-45.
- [13] Carragher B, Smith P R. *J Struct Biol*, 1996, 116: 2-8.
- [14] Walz T, Grigorieff N. *J Struct Biol*, 1998, 121: 142-161.
- [15] van Heel M, Gowen B, Matadeen R, Orlova E V, Finn R, Pape T, Cohen D, Stark H, Schmidt R, Schatz M, Patwardhan A. *Quart Rev Biophys*, 2000, 33: 307-369.
- [16] Chiu W, Baker M L, Jiang W, Zhou Z H. *Curr Opin Struct Biol*, 2002, 12: 263-269.
- [17] Baumeister W. *Curr Opin Struct Biol*, 2002, 12: 679-684.
- [18] Mitsuoaka K, Hirai T, Murata K, Miyazawa A, Kidera A, Kimura Y, Fujiyoshi Y. *J Mol Biol*, 1999, 286: 861-882.
- [19] Kuhlbrandt W, Wang D N, Fujiyoshi Y. *Nature*, 1994, 367: 614-621.
- [20] Murata K, Mitsuoaka K, Hirai T, Walz T, Agre P, Heymann J B, Engel A, Fujiyoshi Y. *Nature*, 2000, 407: 599-605.
- [21] Miyazawa A, Fujiyoshi Y, Unwin N. *Nature*, 2003, 423: 949-955.
- [22] Davies A, Gowen B E, Krebs A M, Schertler G F, Saibil H R. *J Mol Biol*, 2001, 314: 455-463.
- [23] Rhee K H, Morris E P, Barber J, Kuhlbrandt W. *Nature*, 1998, 396: 283-286.
- [24] Auer M, Scarborough G A, Kuhlbrandt W. *Nature*, 1998, 392: 840-843.
- [25] Holm P J, Morgenstern R, Hebert H. *BBA Protein Struct M*, 2002, 1594: 276-285.
- [26] Bessonneau P, Besson V, Collinson I, Duong F. *EMBO J*, 2002, 21: 995-1003.
- [27] Unger V M, Kumar N M, Glula N B, Yeager M. *Science*, 1999, 283: 1176-1180.
- [28] Williams K A. *Nature*, 2000, 403: 112-115.
- [29] Lowe J, Li H, Downing K H, Nogales E. *J Mol Biol*, 2001, 313: 1045-1057.
- [30] Mosser G. *Micron*, 2001, 32: 517-540.
- [31] Ellis M J, Hebert H. *Micron*, 2001, 32: 541-550.
- [32] Frank J. *Bioessays*, 2001, 23: 725-732.
- [33] Gabashvili I S, Agrawal R K, Spahn C M, Grassucci R A, Svergun D I, Frank J, Penczek P. *Cell*, 2000, 100: 537-549.
- [34] Zhou Z H, Baker M L, Jiang W, Dougherty M, Jakana J, Dong G, Lu G Y, Chiu W. *Nat Struct Biol*, 2001, 8: 868-873.
- [35] Zhou Z H, Dougherty M, Jakana J, He J, Rixon F J, Chiu W. *Science*, 2000, 288: 877-880.
- [36] Bottcher B, Wynne S A, Crowther R A. *Nature*, 386, 88-91.
- [37] Conway J F, Cheng N, Zlotnick A, Wingfield P T, Stahl S J, Steven A C. *Nature*, 1997, 386: 91-94.
- [38] Tao Y Z, Olson N H, Xu W, Anderson D L, Rossmann M G, Baker T S. *Cell*, 1998, 95, 431-437.
- [39] Yusupov M M, Yusupova G Z, Baucom A, Lieberman K, Earnest T N, Cate J H, Noller H F. *Science*, 2001, 292: 883-896.

- [40] Schluenzen F, Tocilj A, Zarivach R, Harms J, Guehmann M, Janell D, Bashan A, Bartels H, Agmon I, Franceschi F, Yonath A. *Cell*, 2000, 102:615-623.
- [41] Ban N, Nissen P, Hansen J, Moore P B, Steitz T A. *Science*, 2000, 289:905-920.
- [42] Medalia O, Weber I, Frangakis A S, Nicastro D, Gerisch G, Baumeister W. *Science*, 2002, 298:1209-1213.
- [43] Frangakis A S, Bohm J, Forster F, Nickell S, Nicastro D, Typke D, Hegerl R, Baumeister W. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99:14153-14158.
- [44] Baumeister W, Grimm R, Walz J. *Trends Cell Biol*, 1999, 9:81-85.
- [45] Nicastro D, Frangakis A S, Typke D, Baumeister W. *J Struct Biol*, 2000, 129:48-56.
- [46] Marsh B J, Mastrorade D N, Buttle K F, Howell K E, McIntosh J R. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98:2399-2406.
- [47] Bohm J, Lambert O, Frangakis A S, Letellier L, Baumeister W, Rigaud J L. *Curr Biol* 11, 2001, 1168-1175.
- [48] Rossmann M G, Bernal R, Pletnev S V. *J Struct Biol*, 2001, 136:190-200.
- [49] Li H, DeRosier D J, Nicholson W V, Nogales E, Downing K H. *Structure (Camb)*, 2002, 10:1317-1328.
- [50] Adair B D, Yeager M. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99:14059-14064.
- [51] Henderson R, Unwin P N. *Nature*, 1975, 257:28-32.
- [52] Mancini E J, de Haas F, Fuller S D. *Structure (Camb)*, 1997, 5:741-750.

Advances of electron microscopy and its applications in structural biology

WANG Da-neng¹, CHEN Yong², SUI Sen-fang²

(1 Skirball Institute of Biomolecular Medicine, New York University School of Medicine, New York, NY 10016, USA;

2 Department of Biological Sciences and Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: Electron microscopy is an important tool in structural biology and can be used to elucidating the structures of macromolecular complexes and assemblies, subcellular organelles and cells. Here we described recent advances in techniques and methodology of biological electron microscopy in three areas: electron crystallography, single particle analysis and electron tomography. Both basic principles and respective advantages of these techniques were reviewed, and examples of their recent applications to biological problems were presented. In addition, possible combination of electron microscopy and other structural biology techniques was discussed.

Key words: structural biology; electron microscopy; electron crystallography; single particle analysis; electron tomography