生物大分子冷冻电镜结构解析技术研究进展: 2017年诺贝尔化学奖解读

蒋滨, 李从刚, 刘买利*

中国科学院武汉物理与数学研究所, 波谱与原子分子物理国家重点实验室, 武汉 430071

*通讯作者, E-mail: ml.liu@wipm.ac.cn

收稿日期: 2017-11-24; 接受日期: 2017-12-27; 网络版发表日期: 2018-01-26

国家自然科学基金(编号: 21735007, 21475146)、中国科学院(编号: QYZDJ-SSW-SLH027)和国家重点基础研究发展计划(编号: 2017YFA0505400)资助项目

摘要 生物大分子的结构研究是从原子分子水平上阐述生命过程的规律、探索重大疾病发生发展机制和高靶向性药物研发的关键。解析生物大分子三维结构的主要技术有X射线晶体学(X-ray)、核磁共振(NMR)和冷冻电镜(Cryo-EM)。近年来, 冷冻电镜技术发展迅速, 其分辨率可以达到原子水平(约3 Å), 在超大复合物结构解析方面优势明显。2017年三位科学家因发展了冷冻电镜解析生物大分子三维结构的方法获得诺贝尔化学奖。本文简要评析了此次诺贝尔化学奖获奖工作的科学背景及应用前景。

关键词 冷冻电镜, 生物大分子, 结构解析, 诺贝尔化学奖

2017年10月4日, 瑞典皇家科学院决定将2017年诺贝尔化学奖授予瑞士洛桑大学(University of Lausanne)的Jacques Dubochet教授、美国哥伦比亚大学(Columbia University)的Joachim Frank教授和英国MRC分子生物学实验室(MRC Laboratory of Molecular Biology)的Richard Henderson教授, 以表彰他们“发展了测定溶液中生物分子高分辨率结构的冷冻电镜技术”。诺贝尔化学委员会评价道: 这种技术把“生物化学带入了一个新的时代”^[1]。

蛋白质是生命活动的主要执行者和载体, 其生物功能主要由三维结构决定。生物大分子的结构研究是从原子分子水平上阐述生命过程的规律、探索重大疾病发生发展机制和高靶向性药物研发的关键, 早已

成为科学研究的前沿领域, 至今热度不减。解析生物大分子三维结构的主要技术有X射线晶体学(X-ray)、核磁共振(NMR)和冷冻电镜(Cryo-EM)。X射线晶体学可获得分辨率很高(~1 Å)的三维结构, 是结构生物学的主流方法, 但通常需要高质量的蛋白单晶样品。NMR技术则基本不受样品状态的限制, 除液态和固态样品外, 最近已经在活细胞中成功解析了蛋白质的结构^[2-4], 此外, 在动态相互作用研究方面NMR独具优势。近年来, Cryo-EM技术发展迅速, 其分辨率可以达到原子水平(约3 Å), 在超大复合物结构解析方面优势明显。对这3项技术做出杰出贡献的多位科学家已获得诺贝尔奖(表1), 还有很多科学家在其获得诺贝尔奖的成果中使用了这3种技术。

引用格式: Jiang B, Li C, Liu M. Progress in biomolecular cryo-electron microscopy. *Sci Sin Chim*, 2018, 48: 277-281, doi: [10.1360/N032017-00195](https://doi.org/10.1360/N032017-00195)

表 1 X-ray、NMR和EM技术发展相关的诺贝尔奖

获奖年度	获奖者	奖项	技术
1912	M. Laue	物理学奖	X-ray
1915	W.H. Bragg, W.L. Bragg	物理学奖	X-ray
1962	M. Perutz, J. Kendrew	化学奖	X-ray
1964	D. Hodgkin	化学奖	X-ray
1985	J. Karle, H. Hauptman	化学奖	X-ray
1988	J. Deisenhofer, R. Huber, H. Michel	化学奖	X-ray
1946	Rabi	物理学奖	NMR
1952	F. Bloch, E. Purcell	物理学奖	NMR
1991	R. Ernst	化学奖	NMR
2002	K. Wuthrich	化学奖	NMR
2003	P. Mansfield, P. Lauterbur	生理与医学奖	NMR/MRI
1982	A. Klug	化学奖	EM
1986	E. Ruska	物理学奖	EM
2017	J. Dubochet, J. Frank, R. Henderson	化学奖	Cryo-EM

17世纪英国科学家Hobert Hooke设计制造了光学显微镜,并用其观察到细胞的存在,打开了人类观察微观世界的大门.此后的数百年中,科学家们不断寻求新的途径和技术来提高显微镜质量,以期看得更清楚,看得更细小.1873年德国光学家Ernst Abbe发现了显微镜的空间分辨率与检测光线波长之间的关系,这就是著名的Abbe公式($d \approx \lambda/2$).可见光波长最短为390 nm,因此,光学显微镜只能看到大于0.2 μm 的物体.由德布罗意关系($\lambda=h/p$)可知,电子经100 kV电压加速后,其德布罗意波长小于4 pm,较可见光小约5个数量级.尽管目前主流电子显微镜(简称电镜,EM)的加速电压一般高于100 kV,但由于物镜孔径的限制,其空间分辨率最高约为0.5 Å^[5],足以看到分子中的一个原子.电子显微镜的发明者Ernst Ruska获得了1986年诺贝尔物理学奖.

虽然电镜具有原子分辨的能力,但是,当科学家将其用于解析生物大分子结构时,却遇到了重重困难.最为突出的困难有:(1)生物分子的结构容易被电子束的轰击所破坏;(2)电镜测试样品需处于真空环境中,而生物分子在真空中会由于失去水的包裹而变性;(3)被

测分子会由于电子的撞击或温度的改变而发生位置偏移,出现虚影而影响成像精度.

事实上,自EM技术刚出现,Marton^[6]就指出高强度的电子轰击会破坏生物组织中的细胞,因此EM不能直接用于研究生物材料.Marton^[6]给出的解决方案是采用低温冷冻和类似于负染的技术,以及两者的结合.负染技术用重金属盐对生物粒进行包埋,在其表面形成一层薄膜,这样既能保护样品免于电子束的破坏,又能避免样品在真空干燥时塌缩变形.Glaeser等^[7]提出,为将电子散射对负染样品的损伤降至最低,需要使用尽量低的电子剂量,将电子辐射分散到整个颗粒系统中,这一原则也适用于负染样品之外的样品体系.负染技术分辨率较低,适用于观察细菌、病毒等的形态学研究,对于生物大分子而言则只能获得外形轮廓,尽管如此,科学家基于负染样品,开始发展了生物大分子的电镜三维重构技术.

英国科学家Klug等^[8,9]建立了用不同方向的二维投射电镜图像重构生物分子晶体三维结构的革命性方法,将EM技术从二维推向了三维,并成功获得了DNA-蛋白质复合体的三维结构.Klug的新技术的原理源于中心截面定理:一个三维物体沿某方向投影的傅里叶变换,等于该物体三维傅里叶变换中与该投影方向垂直且通过原点的截面.这就意味着,通过获得物体不同方向的投影,可以获得物体三维结构的傅里叶变换,进而可由傅里叶逆变换得到该物体的三维结构.有趣的是,Klug因EM技术革新获得了1982年诺贝尔化学奖,比设计出第一台EM仪器的Ruska早4年获奖.

Henderson等^[10]将溶剂由水替换为葡萄糖溶液,制成了无负染的二维晶体样品,再基于Klug发展的三维结构解析方法,于1975年成功地解析了细菌视紫红质蛋白的三维结构,分辨率达7 Å.经过不断地改进方法,1990年Henderson等^[11]将细菌视紫红质蛋白的结构分辨率提高到3.5 Å.这一具有里程碑意义的工作,证明了冷冻电镜解析出的结构可获得原子水平的分辨率.但是二维晶体的样品制备困难,使得这种方法的应用受到很大局限.

冷冻样品以阻止水分蒸发,并保护生物分子免受电子辐射造成的损伤,则是样品制备方法的另外一条发展路径.然而水在冷冻结冰的过程中会对生物分子的结构造成影响,并且冰晶对电子也有很强的散射,这对样品信号也有显著的影响.对于该问题,解决之

道是极快地冷冻生物样品,使水分呈无定型玻璃态^[12].但所需的冷冻速度非常之快,以至于该技术在20世纪80年代之前一直无显著进展.直到1981年Jacques Dubochet等^[13]才发展出成熟方法:将水喷在装配于金属框架上的带孔碳膜上,然后迅速浸没于温度约为 -190°C 的液态乙烷或丙烷中冷冻,如此即可制得一层玻璃状水层.这种玻璃状水在电镜实验中对电子的吸收是近乎均匀的,并且当升温至 -140°C 左右时会转化为冰晶.由该方法制得的无定型玻璃状水层很好地符合电镜实验的需要:将生物分子保持在水合环境中,避免了结冰过程对生物分子结构的改变,对电子的衍射各向同性,且对比度也大为改善.至此生物分子电镜结构解析的样品制备问题得以最终解决.

以玻璃态冷冻样品为观测对象,单颗粒电镜技术获得样品中大量生物颗粒不同角度的二维图像,再经分析重建获得三维结构.在检测过程中,为了将辐射破坏降到最低,应当尽量降低电子照射剂量,但这会使得电镜图像信噪比很低.将大量图像叠加平均,可获得信噪比的改善,但这需要从大量随机取向的分子图像中挑选出同一角度的图像,因此图像分析的第一步是要对大量低信噪比的颗粒图像作对齐和平均操作,以得到高分辨图像.20世纪70年代, Frank^[14]发展了基于交叉相关函数的方法,实现了在低剂量电子条件下,通过对图像对齐和平均来提高信噪比和分辨率.该方法随即被用于负染的谷氨酰胺合成酶电镜图像的重建^[15].生物大分子往往具有多个构象,如不能对这些构象做归类识别,将影响图像的对齐和平均.针对这一问题, Frank等^[16]发展了基于多元统计的分析方法予以解决.1986年 Frank等^[17]建立了由不同角度的二维图像重构三维图像的处理方法,并获得了大肠杆菌核糖体亚基的三维结构.尽管该结构分辨率相对较低(约 $40\text{ \AA}$),但该重构方法却是如今冷冻电镜结构解析技术的基础.单颗粒电镜技术可以解析非晶体、非对称、随机取向的生物颗粒三维结构,到今日已经成为冷冻电镜技术的主流.

结合Dubochet发展的样品冷冻技术,单颗粒电镜技术能够更方便、快捷地解析生物大分子的三维结构,并已获得一些大分子量蛋白质复合物的近原子分辨率结构^[18,19],但对于多数蛋白质,尤其是相对较小的蛋白质,其分辨率仍长期徘徊在纳米级^[20-22].直到2013年,由于信号检测技术的显著改善,冷冻电镜的分

率有了质的飞跃,甚至可获得媲美X射线晶体学的分辨水平($1.8\text{ \AA}$)^[23].此后,生物大分子的高分辨电镜结构出现井喷现象^[24-26].这次“分辨率革命”^[27]的发生,主要原因是电镜检测部件的显著改进.此前冷冻电镜采用CCD (charge-coupled device)检测电子透射信号,在检测过程中先将接收到的电子信号转换为光信号,然后再转换为电信号予以记录,这个迂回的过程导致了信噪比和分辨率受到损失. Henderson与Faruqi^[28]探讨了直接电子检测器(direct electron detector, DED; 又称direct detector device, DDD^[29])的可能,并参与了DED的设计研制.冷冻电镜装备DED后,检测灵敏度和速度都得到显著提高.电镜图像信噪比和分辨率直接获益于检测灵敏度的提高,而且更高的检测速度能够持续捕捉到样品分子由于电子照射和温度漂移造成的运动轨迹,进而可在后期数据处理中对计算结果予以相应的矫正,使得重建三维结构更为清晰. Agard与Gatan公司^[30]合作开发了单电子计数检测器K2 Summit,该新型电镜镜头可检测单个电子事件,消除了电荷积分方法难以避免的朗道噪声,进一步提高了检测效率.华人科学家程亦凡^[31]发展了运动矫正算法,利用K2检测器获得了分辨率为 $3.4\text{ \AA}$ 的膜蛋白TRPV1的三维结构.

除直接电子检测器外,近年来冷冻电镜在其他方面,如自动数据采集^[32],以及图像处理算法^[33]等也有非常重要的进展.

正如本文开始时所述,如今的冷冻电镜生物大分子结构解析,具有以下两个突出优势:(1)样品制备更为简化方便,无需结晶蛋白质,所需样品量也大为减少;(2)能够解析的分子量跨度巨大,小至分子量为 64 kDa 的血红蛋白,大至核糖体甚至细胞器或者病毒颗粒.这使得人们更容易更快捷地获得生物大分子高分辨结构.例如,人们利用冷冻电镜仅需数月就获得了寨卡病毒的近原子分辨率($\sim 3.8\text{ \AA}$)的三维结构^[25,26],这在数年前简直不可想象.

冷冻电镜不仅能提供生物大分子的高分辨结构,近年还被用于生物大分子的动态构象研究.由于样品冷冻速度极快,生物大分子的不同构象被瞬间冻结,通过电镜图像即可捕捉到这些不同的构象^[34].利用该方法,人们观察到核糖体的多个构象^[35],观察到钠离子激活的钾离子通道蛋白Slo2.2的开合状态随钠离子浓度的变化^[36].

目前冷冻电镜技术面临的一大挑战, 是小分子量蛋白质的结构解析。Glaeser^[37]认为冷冻电镜解析蛋白结构的分子量下限约为20 kDa。Henderson^[38]定量分析过冷冻电镜技术的分辨率极限, 他认为对于分子量高于50 kDa的生物大分子, 分辨率可能达到原子水平(约3 Å)。可喜的是, 最近冷冻电镜在小分子量蛋白质的结构解析发方面已经取得很大的进展。例如, Willbold等^[39]利用Cryo-EM获得分子量约为40 kDa的Aβ蛋白纤维结构, 其分辨率为4.0 Å。对于难以用冷冻电镜解析结构的小分子量蛋白, 可由X射线晶体学或核磁共振技术来解析结构。从目前来看, 冷冻电镜还不能代替X射线晶体学或者核磁共振。尤其是核磁共振技术, 在研究蛋白质动态结构和分子间相互作用方面, 仍然

具有独特的优势。

需要指出的是, 华人科学家在冷冻电镜方法学及应用上做出了重要贡献。近期清华大学王宏伟、雷建林和施一公^[40]撰文, 系统介绍了中国生物Cryo-EM研究的现状。

总之, 经过几十年的发展, 冷冻电镜已经成为解析生物大分子三维结构的有力工具。对于分子量高于50 kDa的生物大分子及其复合物, 冷冻电镜能提供近原子分辨率的三维结构, 并且样品制备更为容易。随着技术的进一步发展, 或许可以利用冷冻电镜实现细胞中蛋白质机器的原位结构解析。正如诺贝尔奖委员会在介绍材料中引用的评价那样: “(冷冻电镜)天空才是极限^[1]”。

参考文献

- 1 The nobel prize in physics 2017—popular information: they captured life in atomic detail. http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2017/popular.html
- 2 Sakakibara D, Sasaki A, Ikeya T, Hamatsu J, Hanashima T, Mishima M, Yoshimasu M, Hayashi N, Mikawa T, Wälchli M, Smith BO, Shirakawa M, Güntert P, Ito Y. *Nature*, 2009, 458: 102–105
- 3 Pan BB, Yang F, Ye Y, Wu Q, Li C, Huber T, Su XC. *Chem Commun*, 2016, 52: 10237–10240
- 4 Li C, Zhao J, Cheng K, Ge Y, Wu Q, Ye Y, Xu G, Zhang Z, Zheng W, Zhang X, Zhou X, Pielak G, Liu M. *Annu Rev Anal Chem*, 2017, 10: 157–182
- 5 Erni R, Rossell MD, Kisielowski C, Dahmen U. *Phys Rev Lett*, 2009, 102: 096101
- 6 Marton L. Electron microscopy of biological objects. *Nature*, 1934, 133: 911
- 7 Kuo IAM, Glaeser RM. *Ultramicroscopy*, 1975, 1: 53–66
- 8 Klug A, de Rosier DJ. *Nature*, 1966, 212: 29–32
- 9 de Rosier DJ, Klug A. *Nature*, 1968, 217: 130–134
- 10 Unwin PNT, Henderson R. *J Mol Biol*, 1975, 94: 425–440
- 11 Henderson R, Baldwin JM, Ceska TA, Zemlin F, Beckmann E, Downing KH. *J Mol Biol*, 1990, 213: 899–929
- 12 Schmidt PJ, Basile J. *Transfusion Med Rev*, 2006, 20: 242–246
- 13 Dubochet J, McDowell AW. *J Microscopy*, 1981, 124: 3–4
- 14 Frank J. *Ultramicroscopy*, 1975, 1: 159–162
- 15 Frank J, Goldfarb W, Eisenberg D, Baker TS. *Ultramicroscopy*, 1978, 3: 283–290
- 16 Van Heel M, Frank J. *Ultramicroscopy*, 1981, 6: 187–194
- 17 Radermacher M, Wagenknecht T, Verschoor A, Frank J. *J Microscopy*, 1986, 141: RP1–RP2
- 18 Cheng L, Sun J, Zhang K, Mou Z, Huang X, Ji G, Sun F, Zhang J, Zhu P. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2011, 108: 1373–1378
- 19 Zhang X, Jin L, Fang Q, Hui WH, Zhou ZH. *Cell*, 2010, 141: 472–482
- 20 Dunkle JA, Wang L, Feldman MB, Pulk A, Chen VB, Kapral GJ, Noeske J, Richardson JS, Blanchard SC, Cate JHD. *Science*, 2011, 332: 981–984
- 21 Moeller A, Kirchdoerfer RN, Potter CS, Carragher B, Wilson IA. *Science*, 2012, 338: 1631–1634
- 22 Moiseenkova-Bell VY, Stanciu LA, Serysheva II, Tobe BJ, Wensel TG. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 7451–7455
- 23 Merk A, Bartesaghi A, Banerjee S, Falconieri V, Rao P, Davis MI, Pragani R, Boxer MB, Earl LA, Milne JLS, Subramaniam S. *Cell*, 2016, 165: 1698–1707

- 24 Amunts A, Brown A, Bai XC, Llcer JL, Hussain T, Emsley P, Long F, Murshudov G, Scheres SHW, Ramakrishnan V. *Science*, 2014, 343: 1485–1489
- 25 Kostyuchenko VA, Lim EXY, Zhang SJ, Fibriansah G, Ng TS, Ooi JSG, Shi J, Lok SM. *Nature*, 2016, 533: 425–428
- 26 Sirohi D, Chen Z, Sun L, Klose T, Pierson TC, Rossmann MG, Kuhn RJ. *Science*, 2016, 352: 467–470
- 27 Khlbrandt W. *Science*, 2014, 343: 1443–1444
- 28 Faruqi AR, Henderson R. *Curr Opin Struct Biol*, 2007, 17: 549–555
- 29 Smith MTJ, Rubinstein JL. *Science*, 2014, 345: 617–619
- 30 Li X, Mooney P, Zheng S, Booth CR, Braunfeld MB, Gubbens S, Agard DA, Cheng Y. *Nat Meth*, 2013, 10: 584–590
- 31 Liao M, Cao E, Julius D, Cheng Y. *Nature*, 2013, 504: 107–112
- 32 Suloway C, Pulokas J, Fellmann D, Cheng A, Guerra F, Quispe J, Stagg S, Potter CS, Carragher B. *J Struct Biol*, 2005, 151: 41–60
- 33 Scheres SHW, Gao H, Valle M, Herman GT, Eggermont PPB, Frank J, Carazo JM. *Nat Meth*, 2007, 4: 27–29
- 34 Rubinstein JL. *Cell*, 2017, 168: 341–343
- 35 Fernndez IS, Bai XC, Hussain T, Kelley AC, Lorsch JR, Ramakrishnan V, Scheres SHW. *Science*, 2013, 342: 1240585
- 36 Hite RK, MacKinnon R. *Cell*, 2017, 168: 390–399
- 37 Glaeser RM. *J Struct Biol*, 1999, 128: 3–14
- 38 Henderson R. *Quart Rev Biophys*, 1995, 28: 171–193
- 39 Gremer L, Schlzel D, Schenk C, Reinartz E, Labahn J, Ravelli RBG, Tuschke M, Lopez-Iglesias C, Hoyer W, Heise H, Willbold D, Schrder GF. *Science*, 2017, 358: 116–119
- 40 Wang HW, Lei J, Shi Y. *Protein Sci*, 2017, 26: 16–31

Progress in biomolecular cryo-electron microscopy

Bin Jiang, Conggang Li, Maili Liu*

State Key Laboratory of Magnetic Resonance and Atomic and Molecular Physics, Wuhan Institute of Physics and Mathematics, the Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China

*Corresponding author (email: ml.liu@wipm.ac.cn)

Abstract: Biomolecular structure is the basis of discovering life procedure on atom level, exploring disease mechanism, and developing targeting drugs. The main techniques to resolve biomolecular structure are X-ray crystallography, NMR spectroscopy, and cryo-electron microscopy (Cryo-EM). Recently, there was dramatical progress in Cryo-EM, the resolution of which reached atom level (ca. 3). The Nobel Prize in Chemistry 2017 was awarded to three scientists for developing cryo-electron microscopy for the high-resolution structure determination of biomolecules in solution. This paper introduced the scientific background and application perspective of cryo-electron microscopy.

Keywords: cryo-electron microscopy, biomacromolecule, structure determination, Nobel Prize in Chemistry

doi: [10.1360/N032017-00195](https://doi.org/10.1360/N032017-00195)