

冷冻电镜技术应用于生物分子高分辨结构解析 ——2017 年诺贝尔化学奖浅谈

李治非, 高宁*

北京大学生命科学学院, 北京大学-清华大学生命联合中心, 膜生物学国家重点实验室, 北京 100871

摘要: 2017 年的诺贝尔化学奖颁发给了瑞士洛桑大学的 Jacques Dubochet、美国哥伦比亚大学的 Joachim Frank 和英国医学研究理事会分子生物学实验室的 Richard Henderson, 以表彰他们在发展冷冻电镜技术用来解析处于天然状态的生物分子的高分辨率结构方面的贡献。冷冻电镜技术是在超低温下将含有生物分子样品的薄水膜迅速冷冻成玻璃态的薄冰膜, 使得生物分子样品刚好包埋在薄冰膜中, 再利用电子显微镜照射生物分子样品, 在探测器上采集到生物样品的二维投影或衍射花样图片, 最后通过三维重构的算法将二维投影或衍射花样的图片处理得到生物分子的三维结构的技术。

关键词: 冷冻电镜; 生物大分子; 结构生物学; 诺贝尔化学奖

中图分类号: G64; O6

Cryo-EM Method for High-Resolution Structure Determination: A Brief Introduction to 2017 Nobel Prize in Chemistry

LI Zhifei, GAO Ning*

State Key Laboratory of Membrane Biology, Peking-Tsinghua Joint Center for Life Sciences, School of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, P. R. China.

Abstract: The 2017 Nobel Prize in chemistry was awarded to Jacques Dubochet, Joachim Frank and Richard Henderson for their contribution to developing the cryo-electron microscopy (cryo-EM) method for high-resolution structure determination of biomolecules in solution. In recent years, cryo-EM is leading a revolution in structural biology, and becoming a major tool in studying the structure and function of biomolecular machines. Here, we briefly describe the method development of cryo-EM and the personal contributions of the three Nobel Laureates.

Key Words: Cryo-electron microscopy; Biomolecules; Structural biology; Nobel Prize in chemistry

借助光学显微镜, 自然科学家们发现了诸如线粒体、叶绿体、液泡、(细胞核)等细胞器, 为细胞器的功能研究奠定了基础。进入 20 世纪后, 科学家们鉴定出了越来越多的比细胞器更小的有生物活性的物质——DNA、RNA 以及蛋白质。但是鉴于它们的尺寸小, 利用常规的方法无法“看到”它们的结构, 从而限制了更深入地理解它们的功能。20 世纪 50 年代, 随着 DNA 双螺旋结构的发现和中心法则的提出, 生命科学进入分子时代。科研工作者们更加迫切地希望更深入地了解微观世界里生物分子的功能, 从而更深刻理解生命的本质。空间结构是生物分子行使功能的重要基础, 因此最有效、最直观地了解功能的方法之一是先直接“看到”它们的结构。而传统光学显微镜的分辨本

领有限,无法“看到”如此微小的生物分子结构。一部分科学家将X射线技术方法和NMR技术引入生物学领域,来解决“看不到”这个问题。但这些技术都有无法避免的缺点。X射线技术需要先要将生物分子结晶,这对许多生物分子,尤其是膜蛋白来说难度很大。而NMR技术只能解决相对分子质量较小的水溶蛋白的结构问题。还有一部分科学家将电子显微技术引入生物学领域。1968年,物理学家George Gamow同微生物学家Martynas Yčas共同出版了名为《Mr. Tompkins Inside Himself: Adventures in the New Biology》的科普著作。书中介绍了利用电子显微镜,Mr. Tompkins“看”到了单个细胞和细胞器的结构细节。这使得利用电子显微镜去观察亚细胞精细结构以及在更小的尺度上去理解生命的本质变为可能。此后,无数的科学家们锐意进取,才使得越来越多生物分子的越来越精细的天然结构能用电子显微镜“看”到。其中Jacques Dubochet、Joachim Frank和Richard Henderson三位科学家(图1)的工作在这段进程中举足轻重。因此,在2017年10月,瑞典皇家科学院决定授予这三位科学家诺贝尔化学奖,以表彰他们在发展冷冻电镜技术应用于天然状态下生物分子高分辨结构解析方面的贡献。

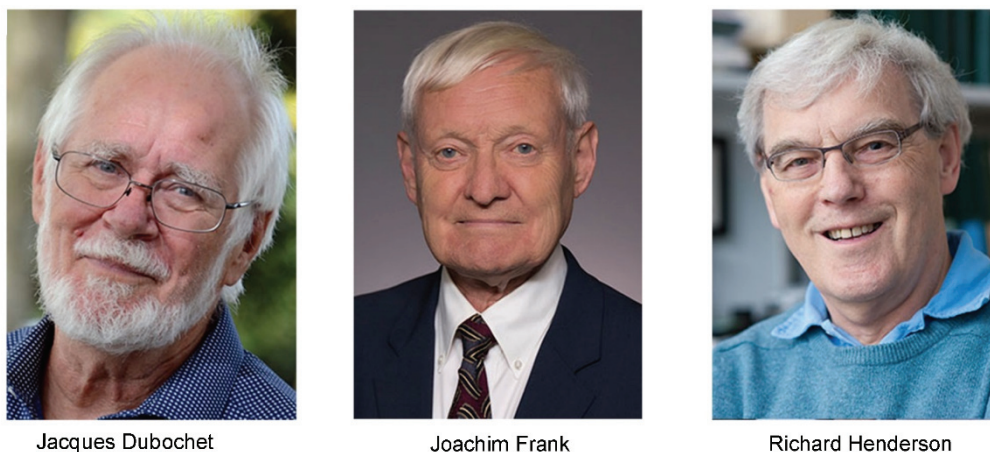


图1 2017年诺贝尔化学奖三位获奖者

图片来源于 https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2017/

生物分子主要由C、H、O、N、P、S组成,这些元素相对较“轻”,在同电子相互作用时,对电子的散射作用小。大部分高能电子可以直接穿过生物样品而几乎没有振幅损失,同时产生的相位变化也很小,从而形成的图像中生物分子的投影与周围“环境”的投影对比度(即后文所说的衬度)小。采用高剂量的电子照射样品可以改善成像的衬度,但会引起生物分子发生电离,破坏生物分子的空间结构,在生物电镜中一般不采用这种方法。早在1934年电子显微镜诞生的时候,Marton^[1]就撰文评论:电子显微镜是不能用于研究生物样品的,除非能解决“细胞在高强度电子束轰炸下不受损害”这个问题。Marton也“空”想出可以解决这个问题的对策:(1)利用类似负染的方法对生物样品染色;(2)让生物样品处于低温状态。但当时他并没有对他“空”想的方法进行进一步的发展和完善。后来,在众多科学家不断地努力下,这两个“空”想的对策被一一实现。

20世纪40年代创造并在之后逐渐完善起来的负染样品制备的方法就是Marton设想的第一种方法的实现。这种方法将生物分子镶嵌在一层由重金属盐离子组成的非晶体膜内,但生物分子不与重金属盐离子发生反应,因此样品本身不会被染色。重金属盐离子和生物分子对电子的散射能力不同,反映在图片上就是白色的生物分子样品散布在黑色的背景中。但是这种方法对生物样品能够达到的分辨率被重金属盐粒子的颗粒大小所限制,无法获得高分辨结构。尽管负染方法只能得到分辨率很低的结构,在早期电镜结构生物学领域,这个方法在一些生物分子的三维结构解析(如:T4噬菌体

尾部结构^[2], 二十面体病毒囊膜蛋白结构^[3])以及三维重构技术的发明发展(如: 共同线^[3], common line)方面发挥了重要的作用。如今这种方法仍广泛应用于样品前期筛选及初始模型构建等方面。

Marton 设想的第二种方法是让生物样品处于低温状态。低温下, 生物样品耐受电子辐照剂量增强^[4], 同时生物样品在电镜镜筒高真空环境中脱水变形的问题也得以解决。但在低温下, 水溶液会形成晶体冰, 而形成的晶体冰会使得电子发生强烈的衍射, 从而导致探测器几乎只能收集到晶体冰的信号, 无法收集到来源于生物分子的信号。另外, 晶体冰还会影响蛋白的天然空间结构。鉴于绝大部分的生物分子要维持其天然的空间结构必须处在水溶液中, 因此要想实现让生物样品在低温状态下仍保持天然构象, 就必须解决晶体冰形成的问题。

理论上, 可以通过将液态水快速冷却成玻璃态(非晶体态)从而克服结晶冰形成的问题。但 20 世纪 80 年代以前的理论预测表明, 大量的水相变形成玻璃态冰所需要的冷却速度是很难达到的。1980 年 Mayer 研究组^[5]的研究证实了快速冷冻尺寸在微米级别的微滴可以将其转化成玻璃态冰。

在 20 世纪 80 年代, Dubochet 研究组^[6]在冷冻样品制备方面的成果对冷冻电镜的发展至关重要。他们较为系统地研究了在不同冷却速度下冷却到不同温度时薄水膜的性质变化, 并设计出了将薄水膜冷冻成玻璃态薄冰膜的可行性方案(图 2)。将含有样品的溶液滴到亲水化处理后的铜网上, 用滤纸吸掉多余的液体, 使得铜网上有一层尺寸在纳米级到微米级的薄水膜; 然后迅速将此铜网浸没到液态乙烷或者液态丙烷中(温度约在 -180°C 左右), 此时铜网上的薄水膜就被迅速冷冻成了玻璃态的薄冰膜, 而生物样品就固定在玻璃态的薄冰膜中了。为了让液态乙烷(丙烷)保持在液体状态并且温度足够低, 一般会在液态乙烷周围用液氮(常压下沸点为 -196°C)保温。利用这种方法, Dubochet 等^[7]成功制备出了噬菌体冷冻样品、DNA 冷冻样品。之后他们又成功制备出了许多不同种类的生物分子的冷冻样品, 如病毒冷冻样品、核糖体冷冻样品等^[8], 显示出了这种方法可实施性好、可重复性高。但在实际操作中, 铜网上样品溶液的体积以及薄水膜蒸发速度都可能影响薄水膜快速冷冻形成玻璃态薄冰膜的厚度, 有时可能发生形成的玻璃态薄冰膜太薄或者太厚。为了克服这些问题, 部分厂商生产出半自动化冷冻制样仪, 如 FEI 公司生产的 VITROBOT, Gatan 公司生产的 CP3 以及 Leica 公司的 EM GP 等。这些仪器在一定程度上克服了上述缺点, 使得冷冻样品的制备可重复性更好一些。

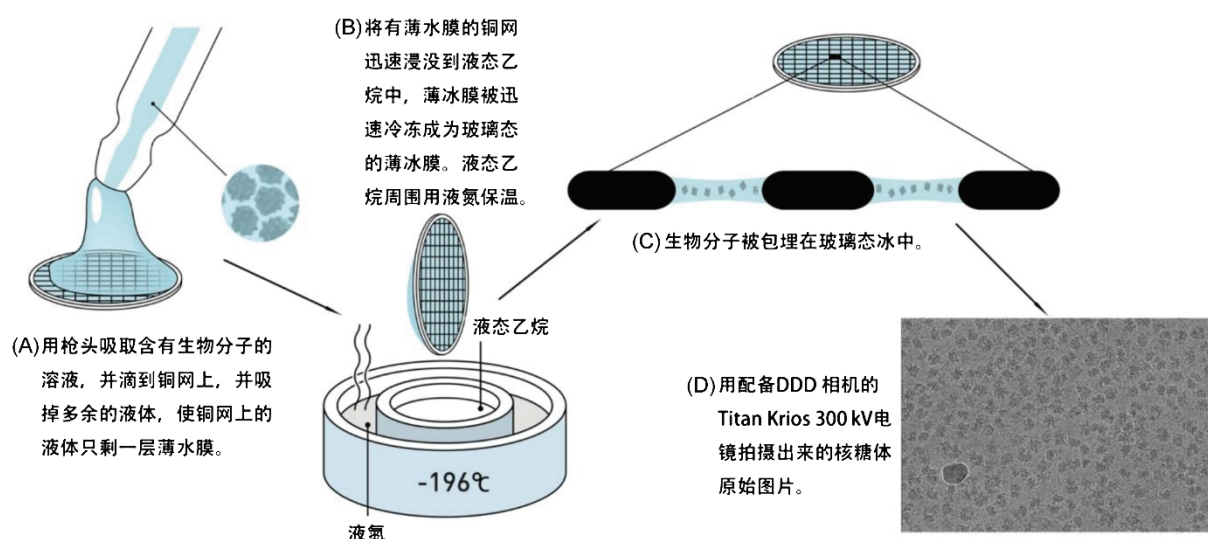


图 2 Dubochet 设计出的冷冻制样方法及用这种方法可以采集到的图片

(A)–(C)来源于 https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2017/fig_ke_en_17_

[dubochetspreparationmethod.pdf](#)

Dubochet 发明的制样方法使得电镜生物学进入了冷冻电镜时代,为解析高分辨结构奠定了基础。1990 年, Henderson 等^[9]在冷冻制样方法的基础上,利用二维晶体的方法成功将细菌视紫红质的分辨率推进到了原子分辨率(图 3)。早在 20 世纪六七十年代, Henderson 就开始利用电子显微镜来研究细菌视紫红质的结构了。其实 Henderson 早期是利用 X 射线技术来解析生物分子结构的。但很多生物分子,尤其是膜蛋白分子结晶异常困难。在多次尝试结晶膜蛋白均以失败告终的情况下, Henderson 转而使用电子显微技术这种不需要将生物分子结晶的技术来解析膜蛋白的结构。Henderson 感兴趣的来源于 *Halobacterium halobium* 的细菌视紫红质十分有特点。在一定条件下,这种蛋白会整齐地镶嵌在膜上形成紫膜。这种紫膜就是一种二维晶体,因为蛋白只在一个平面上整齐排列,不会向立体第三个方向堆叠。因此 Henderson 以及他的同事^[10]在制备这个膜蛋白样品时另辟蹊径,直接将紫膜制成样品。但在那时冷冻样品制备方法还未被提出, Henderson 制作的是常温样品。为了防止常温样品在电子显微镜镜筒的真空环境下变干,他们在样品上加了 0.5%葡萄糖溶液。这种巧妙的制样方法绕过了结晶的难题,同时也防止了蛋白的天然构象因变干而遭到破坏。之前我们有提到生物分子能耐受的电子剂量低,因此在收集样品数据时使用较低电子剂量。低的电子剂量导致生物样品成像时衬度低。但同时我们也说过,细菌视紫红质可以形成二维晶体。二维晶体会使入射电子产生衍射。通过衍射花样,可以利用计算的方法来提高信噪比。而通过倾转样品,可以采集到样品不同角度的衍射花样。从而就可以利用类似晶体学解析结构的方法来重构细菌视紫红质的三维结构了。通过以上的方案,1975 年 Henderson 将这个膜蛋白结构的分辨率解析到了 0.7 nm,人类终于第一次“看”到了膜蛋白的跨膜螺旋结构(图 3)。之后的 15 年时间里,冷冻电镜技术得到了大力发展。在此基础上, Henderson 在铜网的前期处理、电镜类型选择等方面做出了大量尝试。为了制出高质量的二维晶体样品, Henderson 研究了在铜网上碳膜新旧程度与碳膜亲疏水性之间关系,以及碳膜亲疏水性跟二维晶体完整性之间的关系;为了采集到一套高质量的数据, Henderson 到多个地方去测试不同的冷冻电子显微镜。终于在 1990 年, Henderson 等^[9]将细菌视紫红质这个蛋白的分辨率提高到了 0.35 nm。Henderson 工作的意义不仅是将一个膜蛋白解析到了近原子水平分辨率,还给冷冻电镜领域的科研工作者解析原子水平分辨率结构增强了信心。利用类似的方法,捕光复合物^[11]、 $\alpha\beta$ 二聚微管蛋白^[12]、水通道蛋白^[13]等膜蛋白高分辨结构也被解析出来。

不幸的是,能形成二维晶体的生物分子屈指可数,更多的生物分子是无法形成二维晶体,只能以单个分子的形式分散在溶液体系中。那么,分散在溶液中的单个分子是否也能通过电镜的方法解析得到它的三维结构呢?答案是肯定的,这就是如今最常用的单颗粒冷冻电镜三维重构。而这部分

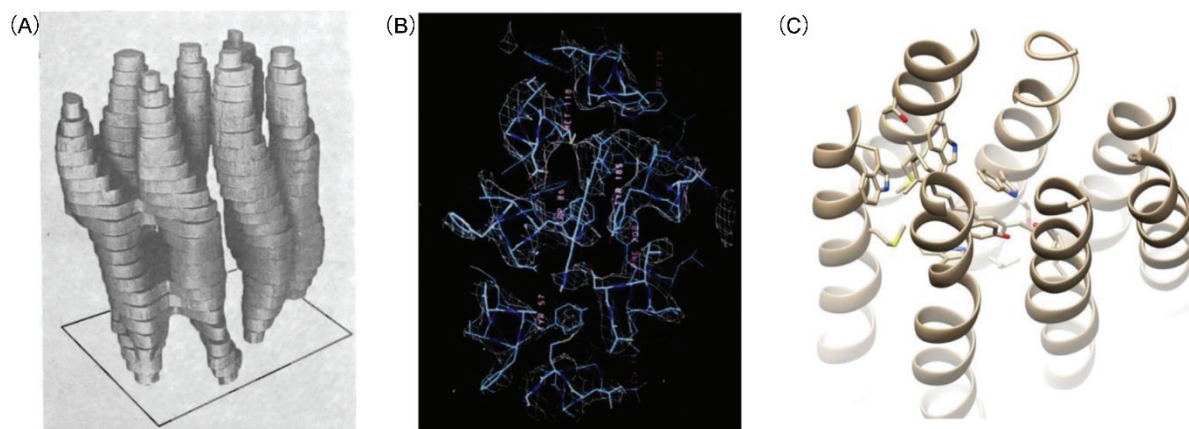


图 3 细菌视紫红质蛋白结构示意图

(A) 1975 年论文中细菌视紫红质 0.7 nm 结构模式图^[10]; (B) 1990 年论文中原子模型与密度图的吻合程度示意图^[9];

(C) 1990 年论文中细菌视紫红质模型图(PDB: 1brd)^[9]

工作的理论的建立和方法的实现主要是由 Frank 及其同事完成的。在前面我们多次提到因为低电子剂量原因,电子显微镜拍摄出来的图片信噪比差。如何增强图片的信噪比是第一个需要解决的问题。20 世纪 70 年代, Frank 和他的同事在解决这个问题上做了大量的工作。他们提出了利用互相关函数(cross-correlation function)来对齐弱信噪比图片的方法^[14],并在 1977 年发表的文章里将互相关函数这种方法定量化,还推导出了允许检测到的模体(motif)的最小电子剂量、分辨率、对比度关系的理论表达式,并通过模拟低信噪比球形病毒图像证实了理论表达式,也证明了这种定量化的互相关方法的可行性^[15]。这也暗示了将低信噪比图片对齐后,可将多张内含相同信息的低信噪比的图片叠加平均用来增强图片的信噪比。随后,1978 年他们利用了对齐后叠加平均的方法得到了谷氨酰胺合成酶清晰的二维投影平均图^[16]。但一般而言,生物分子不同角度的投影产生的二维投影是不同的,直接进行对齐平均并不能得到我们希望的效果。并且生物分子在行使功能时会发生一系列的构象变化,即使是同一个方向的投影,处于不同构象状态的生物分子产生的二维投影也是不同的。那么如何将同样的生物分子相同角度的投影归为一类,不同角度投影分别归类,即分类问题也是需要解决的。这个问题的思路也比较简单,找到投影特征点或特征区域,通过比较特征点或特征区域进行分类。我们之前也多次提到了电镜是低信噪比的图片,如何在低信噪比的图片中找到特征点或者特征区域?1981 年, Frank 同 van Heel^[17]将一种多维数据分析方法(correspondence analysis)应用在低信噪比图片的特征识别上。通过这种分析方法将生物分子投影中的特征提取出来,再依据这些特征间的差异将投影分类。这样就可以通过分类将不均一的样品在二维投影上进行了分类。可以看到, Frank 及其同事在低信噪比图片对齐、平均和分类的方法上做出了很大贡献。但从二维投影重构出三维结构需要确定每个二维投影在三维结构中的相对位置。在这方面, Frank 也做出了自己的贡献。1986 年, Frank 和 Radermacher 等^[18]创造了一种名为随机圆锥倾转(Random Conical Tilt)的方法。通过这种方法可以确定二维投影在三维结构中的相对位置,从而给那些还没有相似结构的生物分子确定二维投影在三维空间位置提供了一种可能。Frank 不仅在理论层面上对电镜生物学发展做出了贡献,在应用上,他还创造了很多用于分析低信噪比图片的数学工具。这些工具基本上都集成在了由他主导开发的电镜数据处理软件 SPIDER^[19] (System for Processing Image Data from Electron microscopy and Related field)软件包里。这个软件包开源给电镜结构生物学工作者免费使用。除此之外, Frank 一直致力于核糖体结构与功能方面的研究,在蛋白质翻译方面亦做出了重大的贡献。

除了上述三位科学家的贡献外,21 世纪初发明的直接电子探测相机(Direct Electron Detector, DED)在发展冷冻电镜解析高分辨结构方面也功不可没^[20]。相比以前的 CCD (Charge-Coupled Device) 相机,这种新型相机不需要先将电子信号转化为光信号,而是直接去检测电子信号,减少了电子信号向光信号转化时引入的多余噪音。2012 年, DED 被引入冷冻电子显微镜领域。2013 年末,利用单颗粒冷冻电镜的方法,使用 DED 相机采集图片,跨膜蛋白 TRPV1 的结构被解析到 0.38 nm,更是让广大的生物分子结构科研工作者看到了冷冻电镜的潜力^[21]。近年来,随着相位板^[22]、能量过滤器等设备的引入,冷冻电镜技术继续蓬勃发展,突破了一个又一个的极限。如今,利用单颗粒冷冻电镜技术,334 kDa 的蛋白结构分辨率可以达到 0.18 nm^[23],64 kDa 的蛋白结构分辨率可以达到 0.32 nm^[24]。

三位诺贝尔化学奖的获得者在冷冻电镜技术发展方面起到了奠基作用。可以说没有这三位科学家的工作,冷冻电镜今天的辉煌就可能推迟来临。但同时我们也要意识到,冷冻电镜发展到今天,除了这三位科学家的贡献,无数冷冻电镜结构生物学的科研工作者的辛勤付出也是不可或缺的。笔者相信,这只是冷冻电镜结构生物学的发端,未来的风景会更好。

参 考 文 献

- [1] Marton, L. *Nature* **1934**, *133*, 911.
- [2] De Rosier, D. J.; Klug, A. *Nature* **1968**, *217*, 130.
- [3] Crowther, R. A.; Amos, L. A.; Finch, J. T.; De Rosier, D. J.; Klug, A. *Nature* **1970**, *226*, 421.
- [4] Taylor, K. A.; Glaeser, R. M. *J. Ultrastruct. Res.* **1976**, *55*, 448.
- [5] Bruggeller, P.; Mayer, E. *Nature* **1980**, *288*, 569.
- [6] Dubochet, J.; McDowell, A. W. *J. Microscopy* **1981**, *124*, Rp3.
- [7] Dubochet, J.; Chang, J. J.; Freeman, R.; Lepault, J.; McDowell, A. W. *Ultramicroscopy* **1982**, *10*, 55.
- [8] Dubochet, J.; Adrian, M.; Chang, J. J.; Homo, J. C.; Lepault, J.; McDowell, A. W.; Schultz, P. Q. *Rev. Biophys.* **1988**, *21*, 129.
- [9] Henderson, R.; Baldwin, J. M.; Ceska, T. A.; Zemlin, F.; Beckmann, E.; Downing, K. H. *J. Mol. Biol.* **1990**, *213*, 899.
- [10] Henderson, R.; Unwin, P. N. *Nature* **1975**, *257*, 28.
- [11] Kuhlbrandt, W.; Wang, D. N.; Fujiyoshi, Y. *Nature* **1994**, *367*, 614.
- [12] Nogales, E.; Wolf, S. G.; Downing, K. H. *Nature* **1998**, *391*, 199.
- [13] Murata, K.; Mitsuoka, K.; Hirai, T.; Walz, T.; Agre, P.; Heymann, J. B.; Engel, A.; Fujiyoshi, Y. *Nature* **2000**, *407*, 599.
- [14] Frank, J.; Alali, L. *Nature* **1975**, *256*, 376.
- [15] Saxton, W. O.; Frank, J. *Ultramicroscopy* **1977**, *2*, 219.
- [16] Frank, J.; Goldfarb, W.; Eisenberg, D.; Baker, T. S. *Ultramicroscopy* **1978**, *3*, 283.
- [17] Frank, J.; Vanheul, M. *J. Mol. Biol.* **1982**, *161*, 134.
- [18] Radermacher, M.; Wagenknecht, T.; Verschoor, A.; Frank, J. *J. Microscopy* **1986**, *141*, Rp1.
- [19] Frank, J.; Shimkin, B.; Dowse, H. *Ultramicroscopy* **1981**, *6*, 343.
- [20] Faruqi, A. R.; Cattermole, D. M.; Raeburn, C. *Nucl. Instrum. Meth. A* **2003**, *513*, 317.
- [21] Liao, M.; Cao, E.; Julius, D.; Cheng Y. *Nature* **2013**, *504*, 107.
- [22] Danev, R.; Buijsse, B.; Khoshouei, M.; Plitzko, J. M.; Baumeister, W. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111*, 15635.
- [23] Merk, A.; Bartesaghi, A.; Banerjee, S.; Falconieri, V.; Rao, P.; Davis, M. I.; Pragani, R.; Boxer, M. B.; Earl, L. A.; Milne, J. L. S.; Subramaniam, S. *Cell* **2016**, *165*, 1698.
- [24] Khoshouei, M.; Radjainia, M.; Baumeister, W.; Danev, R. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, (in press). doi: 10.1038/ncomms16099

[封面介绍] 以水滴组成的中国结为主画面。封面设计的灵感来自于化学的主要对象之一——水，灵动的水滴从右上方倾泻而下，恰好构成了中国民俗文化的代表性图案——中国结，寓意植根于中华文化体系中的化学以及化学教育。

(设计者：王京伟)