

冷冻电子显微学

——2017年度诺贝尔化学奖成果简析

王宏伟

清华大学生命科学学院;北京结构生物学高精尖创新中心,北京 100084

摘要 2017年诺贝尔化学奖授予 Jacques Dubochet, Joachim Frank 和 Richard Henderson 3位科学家,以表彰他们在发展利用冷冻电子显微学技术解析溶液中生物大分子高分辨率结构方面做出的开创性贡献。本文评述冷冻电子显微学的发展历程、生物大分子三维重构技术的发展、最近导致冷冻电子显微学迅速崛起的技术突破以及该技术未来的发展趋势。

关键词 2017年诺贝尔化学奖;冷冻电子显微学;三维重构;生物大分子结构

2017年10月4日,诺贝尔化学奖评奖委员会宣布,将2017年的诺贝尔化学奖授予3位科学家,表彰他们在发展利用冷冻电子显微学技术解析溶液中生物大分子高分辨率结构方面做出的开创性贡献。这3位科学家分别是瑞士洛桑大学教授 Jacques Dubochet,美国哥伦比亚大学教授 Joachim Frank 以及英国MRC分子生物学实验室教授 Richard Henderson。

1 冷冻电子显微学的发展历程

“Seeing is believing”。自从列文虎克发明光学显微镜以来,人类可以观察生命体的微观结构,并促成了一系列生物学中的重要发现。现代生物学的研究对微观精细结构的观察提出了更高的要求。这是因为,生物体的各种生命活动的机制是由其组成成分之间的空间关系与变化情况决定的;对于细胞及生物大分子结构的认识和理解能够让研究者们对生命过程有更深层的认知。因而,对细胞结构及生物大分子的精细结构的揭示,已经成为现代生物学发展的本质需求以及主要推动力。

光学显微镜受限于可见光波长的衍射极限,能够实现的分辨率有限,主要在200 nm附近。过去十几年发展起来的超高分辨率光学显微镜技术已经可以达到10 nm的分辨率,但是仍然无法看到分子内的精细结构^[1-2]。20世纪初,德国学者 H. Busch 提出可以利用电子束在电磁场中的偏转性质进行成像,1931年德国科学家 Ernst Ruska(1986年度诺贝尔物理学奖获得者)发明了透射电子显微镜,开辟了应用电子光源观察微观世界精细结构的时代^[3]。在透射电子显微镜中,电子枪产生的电子在高压电场中被加速至亚光速并在高真空的

显微镜内部运动。根据高速运动的电子在磁场中发生偏转的原理,透射电子显微镜中的一系列电磁透镜对电子进行汇聚,并对穿透样品过程中与样品发生相互作用的电子进行聚焦成像以及放大,最后在记录介质上形成样品放大几千倍至几十万倍的图像,从而获得样品的精细结构信息。

应用透射电子显微镜观察生物样品需要克服3个技术难点^[4]:1)高真空的显微镜内部环境与生物样品在水化环境中的矛盾;2)生物样品主要由轻元素组成,易于受到高能电子的辐照损伤;3)生物样品的轻元素组成与电子的相互作用较弱,导致成像的衬度低。在20世纪中叶,生物学家开发了一系列技术来绕过上述问题,通过对生物样品进行固定、包埋、切片以及重金属染色等过程,使得应用透射电子显微镜观察细胞精细结构成为可能,并因此发现了许多重要的细胞器,如叶绿体、高尔基体、线粒体、核糖体、内质网、细胞膜、中心和细胞骨架等。但这样制备的生物样品都是处于脱水状态的,是对附着于生物大分子表面的重金属染料成像,而不是对生物大分子直接成像,因此无法保持和获得生物样品中的生物大分子高分辨率结构信息。

如何在透射电子显微镜内观察含水状态的生物样品并获得高分辨率的结构信息,成为20世纪70年代部分科学家试图努力解决的科学问题。Donald Parsons 提出应用较低真空的样品台保持一定的水分从而在透射电镜里观察生物样品^[5]。Richard Henderson 与 Nigel Unwin 采用葡萄糖包埋技术替代水分首次解析了细菌视紫红质蛋白二维晶体的7 Å分辨率的三维结构^[6]。Robert Glaeser 与 Kenneth Taylor 发现将 catalase 蛋白的薄晶体冷冻在近液氮温度下,可以大大减少电子的辐照损伤,保持了蛋白质的高分辨率结构信息^[7]。Jacques

收稿日期:2017-11-15;修回日期:2017-11-23

作者简介:王宏伟,教授,研究方向为冷冻电子显微学,电子邮箱:hongweiwang@tsinghua.edu.cn

引用格式:王宏伟. 冷冻电子显微学——2017年度诺贝尔化学奖成果简析[J]. 科技导报, 2017, 35(23): 16-21; doi: 10.3981/j.issn.1000-7857.2017.23.002

Dubochet 研究组根据 Robert Glaeser 实验室发现的原理对快速冷冻水溶液的过程进行了深入的研究,发明了将含有生物大分子的溶液迅速冷冻于液氮温度下的实用技术(图1),并首次在透射电子显微镜内观察到了快速冷冻在无序冰中的病毒颗粒^[8-9]。Jacques Dubochet 发明的方法因为降温迅速($\sim 10000^\circ\text{C/s}$),可以将生物大分子在溶液中的结构状态迅速固定;液氮温度下无序冰的蒸汽压远低于透射电子显微镜内部的真空气压;液氮温度可以降低高能电子对生物大分子的辐照损伤,因此,Dubochet 方法解决了透射电子显微镜观察含水生物样品的关键技术瓶颈。在透射电子显微镜中保持冷冻样品的低温状态也是若干科学家努力解决的技术难题,其中包括 Richard Henderson 在 1990 年代设计的采用 Dewar 罐保持样品处于液氮温度下的冷冻样品杆^[10],Yoshinory Fujiyoshi 发明的直接对透射电镜中样品台进行低温冷却的技术^[11]。后者的技术甚至可以实现将样品的温度降低到液氮的温度下(绝对温度 -269.15°C)进行透射电子显微学观察,从而进一步降低高能电子的辐照损伤^[11-12]。这种利用低温制备样品及进行透射电子显微镜观察的技术在过去的 30 年里日臻成熟,成为现在普遍使用的冷冻电子显微学技术(简称“冷冻电镜”)。

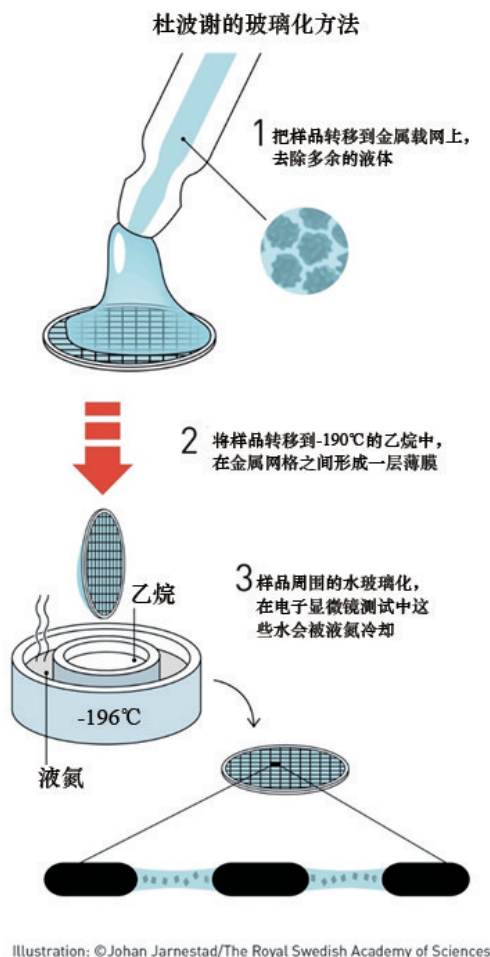


图1 杜波谢的玻璃化方法示意

2 生物大分子三维重构技术的发展

透射电子显微镜的成像是电子束穿透样品,将样品的三维电势密度分布函数沿着电子束的传播方向投影至与传播方向垂直的二维平面上。生物大分子的三维结构信息则隐藏在分子沿不同角度的二维投影中。1968年, Aaron Klug (1982年度诺贝尔化学奖获得者)发现了中心截面定理(图2),提出了三维物体沿一个角度的二维投影的 Fourier 变换等同于三维物体 Fourier 变换的一个与投影角度垂直方向的中心截面^[13]。因此如果可以确定一个分子结构多个不同角度二维投影之间的相对空间关系,即可以在 Fourier 空间中获得多个中心截面的叠加;当投影角度数目足够多时,即可以填满 Fourier 三维空间,从而实现分子结构的三维重构(reconstruction)^[13]。根据这一原理,利用透射电子显微镜采集生物样品多个角度的放大电子显微图像,即可能在计算机里重构出它的三维空间结构。

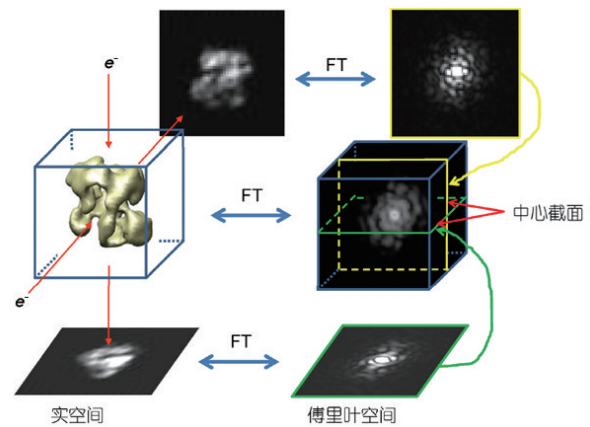


图2 中心截面定理示意

根据中心截面定理,具有螺旋对称的分子组装体系其单张电子显微镜照片即包含了分子多个不同角度的二维投影,因此可以利用螺旋对称性质重构出三维结构。Aaron Klug 最初就是对具有螺旋对称性的噬菌体杆状尾部电子显微镜照片进行了三维重构,在随后的几年里又对具有螺旋对称性的 TMV、微管等应用电子显微学进行了三维重构^[14-15]。Richard Henderson 与 Nigel Unwin 利用高度有序的二维晶体,通过获得二维晶体的不同倾转角度的电子显微照片与电子衍射图,首次实现了二维晶体的三维重构^[6]。随后, Richard Henderson 致力于改进解析二维晶体的计算机软件算法和提高二维晶体的冷冻电镜图像与衍射图谱质量,于 1990 年首次实现了应用冷冻电子显微学解析蛋白质分子的原子分辨率结构,即细菌视紫红质的 3.2 \AA 分辨率三维重构^[16]。Nigel Unwin 则致力于对乙酰胆碱受体所形成的螺旋排列管状晶体的结构进行解析,并开发了一系列螺旋三维重构的算法,并最终解析出了该蛋白的近原子分辨率三维结构^[17]。具有正二十面体对称性的病毒颗粒只需要较少的几个方向的投影照片,也可以利用中心截面定理进行三维重构。

对于绝大多数生物大分子,尤其是生物大分子复合体,并不具备高对称性,也不容易形成螺旋对称性或二维晶体的有序排列。这些分子在溶液中处于分散分布的状态,当制备了电子显微镜样品后,各个分子以随机的取向分布在样品中,称为单颗粒。Joachim Frank从20世纪70年代起,开始致力于对这种状态的分子结构进行电子显微学解析,从而开发了单颗粒三维重构算法。单颗粒重构的一个重要假设是分散分布于溶液中的同一种生物大分子具有相似的结构,因此它们的电子显微照片可以被认为是同一种三维结构的不同角度的投影。因为生物大分子在样品中的包埋介质形成的背景噪音,以及为了减少高能电子对样品的辐照损伤所采用的很低电子剂量的成像条件导致信号很弱,生物大分子的电子显微照片的信噪比很低,是不能用单颗粒的照片直接获得可靠的三维重构的。Joachim Frank开创性地将统计学方法引入到电子显微镜图像分析中,通过对多个单颗粒的图像进行统计分析,并通过对正、加和平均等图像操作手段从多个颗粒图像中提取信号,提高信噪比^[18-21]。Joachim Frank以及Marin van Heel各自领导的研究组又发展了一系列方法,可以确认高信噪比的二维图像之间的空间投影关系从而获得正确的三维重构(图3)。这些方法包括等价线方法、随机圆锥重构法、随机初始模型迭代收敛重构等方法^[22-23]。

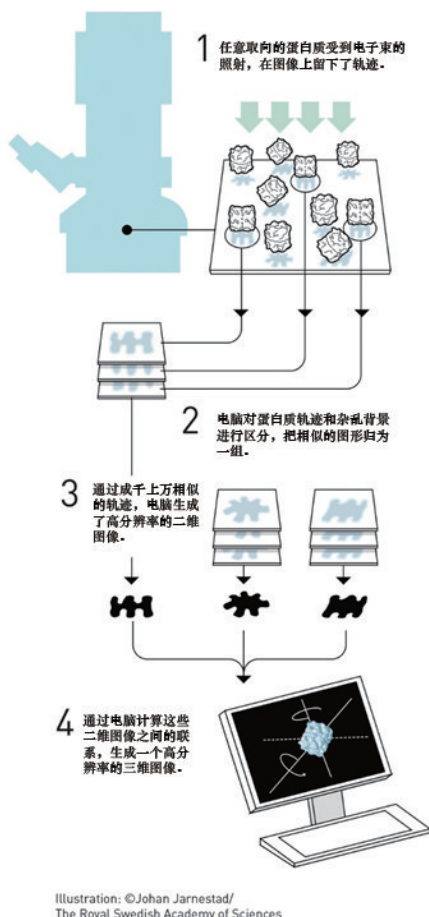


图3 冷冻电镜单颗粒重构原理示意

Joachim Frank组开发的软件SPIDER以及Marin van Heel组开发的软件IMAGIC成为最早进行单颗粒三维重构的软件包。从1986年Joachim Frank组获得第一个50 Å分辨率的核糖体的三维重构到2000年获得10 Å分辨率的核糖体三维重构,单颗粒重构技术逐渐被冷冻电镜领域所接受。Steven Ludtke开发了较为方便的图形操作界面EMAN,进一步推动了单颗粒技术的应用^[24]。利用冷冻样品,Tony Crowther与Alasdair Stevens等采用类似的单颗粒重构原理开始对正二十面体病毒颗粒的冷冻电镜照片进行三维重构分析,在1996年同时独立解析了乙肝病毒衣壳的亚纳米分辨率结构^[25-26]。Nikolaus Grigorieff,Z. Hong Zhou和Wah Chiu领导的研究组分别在2008年解析了正二十面体病毒的原子分辨率结构,首次证明了单颗粒技术可以作为完全独立的结构生物学手段解析生物大分子复合体的原子模型^[27-29]。

3 冷冻电镜硬件技术的革命性突破

冷冻电子显微镜的技术进步离不开显微镜本身硬件的发展。在过去的几十年中,主要的透射电子显微镜厂家(FEI、JEOL、Zeiss等)一直在努力提高冷冻电子显微镜的机械及光学稳定性、自动化程度以及冷冻样品的特殊需求性能等指标。不断改进的透射电子显微镜仪器为冷冻电子显微学技术的发展提供了坚实的保障,也为革命性技术的诞生奠定了良好的基础。冷冻电子显微镜的高分辨率图像采集设备的技术革新是冷冻电镜过去10年来最重要硬件技术突破之一,直接导致了冷冻电镜技术在分辨率水平上的迅速跃迁。

传统的电子显微学图像采集介质一直使用基于化学感光的黑白底片,然后经过复杂的显影、定影等过程后使用专门的扫描仪将电子显微照片数字化之后在计算机里进行图像处理。从20世纪末开始,CCD相机(电荷耦合元件,将高能量的电子信号通过荧光板先转变为光信号,再将光信号通过光纤传导至半导体芯片上转变为数字信号)开始被应用于电子显微镜的图像采集系统^[30]。相比于底片,CCD相机的一个优势是可以实时获得数字化的电子显微图像,从而使对图像质量的评估以及样品采样效率大大提升,并促成了初步的冷冻电子显微学自动化软件的诞生(Leginon^[31], SerialEM^[32], AutoEMation^[33]等)。但是CCD的缺陷是其高分辨率信息丢失严重,导致DQE(detective quantum efficiency,探测量子效率)在图像高频区域的显著下降,比底片记录的数据的质量差很多。

2005年,A. R. Faruqi和Richard Henderson提出可以使用基于CMOS(互补金属氧化物半导体)技术开发的直接电子探测装置来提高电子显微镜图像采集设备的DQE^[34]。2005同年,第一个对电子直接进行探测成像的采集设备Direct Detection Device在美国San Diego实验室诞生,可以进行高速成像,从而实现样品的不间断连续采样^[35]。2011和2012年,Nikolaus Grigorieff和Bridget Carragher首次应用Direct Electron公司生产的DDD相机拍摄了处于液氮温度下病毒冷冻

样品的电子显微电影,并发现在液氮温度下冷冻样品的漂移现象可以通过对电影中不同帧之间的变化情况分析及后处理来进行校正,从而极大地提高获取高质量图像的成功率^[36-37]。2013年,两篇工作独立地报道了应用直接电子探测装置获得大分子复合体原子分辨率的三维重构^[38-39]。在一个工作中,英国MRC分子生物学实验室的Sjors Scheres和Richard Henderson研究组与FEI公司合作开发了Falcon相机,通过拍摄连续电影及后续的图像处理,解析了核糖体的原子分辨率结构。在另一个工作中,UCSF的David Agard和Yifan Cheng研究组与Lawrence Berkeley National Laboratory的Peter Denes研究组协同美国的Gatan公司开发了K2相机,实现了单电子计数成像技术,并通过拍摄连续电影及后续的图像处理,解析了20S蛋白酶体复合体的原子分辨率结构。2013年12月《Nature》上发表了Yifan Cheng研究组与David Julius研究组应用最新型的K2相机对结构完全未知的膜蛋白TRPV1利用冷冻电镜单颗粒三维重构技术解析出来的原子模型,标志着冷冻电镜技术全面进入原子分辨率时代^[40-41]。这些最新的研究成果同时应用了Sjors Scheres开发的基于概率论的单颗粒三维重构分析算法及其程序Relion^[42]。这种基于概率论的单颗粒三维重构算法原理最早由耶鲁大学的Frederick Sigworth教授于1998年提出^[43],由Sjors Scheres完善并开发成为实用的图像处理软件,今天已经成为冷冻电镜单颗粒结构解析的主流软件包。

如今,冷冻电镜单颗粒重构技术已经成为结构生物学的主流方法,众多过去应用其它结构生物学手段无法解析的重要生物大分子复合体的结构被解析出来,如剪接体^[44]、光系统-捕光复合物超复合体^[45]、呼吸链超复合体^[46]和藻胆体^[47]。有越来越多的研究组利用冷冻电镜技术去尝试无对称性,低分子量和柔型较大的生物大分子或复合体。目前能够利用冷冻电镜技术解析的最高分辨率是1.8 Å(GDH)^[48],而能够成功解析到近原子分辨率的最小生物分子是64 kD的血红蛋白^[49]。

4 中国冷冻电镜的发展及现状

中国科学家从20世纪90年代开始从事冷冻电镜的研究工作。其中,清华大学隋森芳领导的课题组在磷脂单层膜上生长蛋白质的二维晶体,并利用透射电镜来研究这些蛋白的结构以及它们与膜的相互作用。中国科学院生物物理研究所的徐伟开始研究膜蛋白的二维晶体。中山大学的张景强与湘潭大学的杨奇斌利用冷冻电镜技术解析病毒的结构。材料科学领域的郭可信与李方华也开始开展冷冻电镜的研究工作。这些研究组尝试着自己开发搭建相应的硬件和软件工具来进行开创性的研究,并发表了若干篇全部在国内完成的冷冻电镜研究论文,同时也培养出了中国第一批从事冷冻电镜研究的青年学生。

自2000年以来,随着国家开始投入更多的资源升级电镜设施,并加大科研经费的支持力度,一些经过良好训练的年

轻科学家回到中国,建立了一批冷冻电镜实验室,开始了他们的独立研究工作。这些实验室分布在清华大学、北京大学、中山大学、中国科技大学、浙江大学、上海科技大学、南开大学、复旦大学、厦门大学、中国科学院生物物理研究所、北京生命科学研究所以及上海生物化学与细胞生物学研究所、上海药物所等学术机构。中国冷冻电镜研究的群体逐渐成长、成熟,高速的发展吸引了全世界科研界的关注。如今,中国从事冷冻电镜开发与应用研究的课题组已经超过40个,形成了近500人的中国冷冻电子显微学分会,在国内正在建设10多个大型冷冻电镜平台设施,并在过去的几年中发表了几十篇国际一流水平的科研成果,为世界瞩目。

5 冷冻电镜的技术难点与未来发展趋势

1) 样品制备技术。样品制备已经成为冷冻电子显微学结构解析的限速步骤。冷冻电子显微学要成为结构生物学研究的主要应用手段,必须在样品制备这一步骤取得重要的突破。类似的,对于细胞结构研究来说,将本身很厚的细胞样品进行减薄处理,才适合冷冻电镜观察。在过去的10多年里,冷冻切片技术一直在稳步发展,至今已经成为相对成熟的技术,但是对该技术的熟练掌握仍然需要长期的培训与实践经验。最近发展起来的聚焦离子束减薄技术在未来可能会对冷冻细胞样品的结构研究带来新的契机。

2) 高分辨率结构的分析与建模。应用冷冻电子显微学技术在过去的两年里所获得的近原子分辨率(4 Å埃以上)三维结构的数目几乎超过了前面几十年所获得的高分辨率结构数目之和。更多的在4~8 Å分辨率范围内的结构在很短的时间内被解析出来。不同的分辨率结构可以揭示出的结构细节亦不同。而与晶体学手段不同,冷冻电子显微学单颗粒重构无法通过对晶格衍射点的信号强弱来判断分辨率。如何客观地对三维重构的结果进行检验、对结构解析分辨率进行明确的确定是目前高分辨率冷冻电镜研究中的重要问题。在此基础上,需要对不同分辨率水平的三维重构进行原子模型的构建,从而实现在原子水平上对分子功能的解释。对于分辨率在4 Å以内的三维重构基本可以应用X射线晶体学现有的方法进行建模。对分辨率在4 Å以外的三维结构如何建立较为可信的模型,则仍缺少相对成熟并被普遍接受的方法。一些研究组正在利用同源建模、分子动力学模拟等手段来进行这一分辨率水平的原子模型搭建的尝试。

3) 构象不均一性的分析。冷冻电子显微学单颗粒结构解析技术与晶体学技术的一个重要差异是不需要溶液中的生物大分子形成高度有序的晶体排列,因而可以直接获得溶液中的生物大分子结构。但生物大分子尤其是大分子复合体本身的构象柔性因此没有被固定在晶体结构中。这些构象柔性反映在电子显微图像中,常常是导致三维重构无法获得高分辨率结构的根源。将不同构象的分子分开分析,是提高重构分辨率的重要过程。此外,分子在溶液中的不同构象很可能反映了分子发挥功能的不同结构形态,理解这些构象

差异对于解释分子功能的机制非常重要。目前对生物大分子构象不均一性的分析是冷冻电子显微学结构解析中的技术难点和热点。对这个问题的解决需要更多的新思路和新算法。

4) 电子光学新技术方法在生物样品研究中的应用。材料科学超高分辨率研究在过去十几年里也出现了很多重要的技术进步,主要是电子显微镜光学系统的不断完善和提高,以及新的成像手段的进步。新的技术诸如球差校正、色差校正、扫描透射电子显微镜系统等都在材料科学领域结构分辨率的显著提高中发挥了重要作用。目前,利用最新的电子光学成像系统,物理学和材料科学研究者已经可以获得 0.5 Å 的分辨率。随着对生物样品近原子分辨率结构解析能力的逐渐普及,更高的分辨率必然成为冷冻电子显微学发展的下一个目标。如何应用材料科学领域证明对超高分辨成像卓有成效的电子显微学方法来提高生物样品的结构解析分辨率,使所有冷冻电子显微学家面临着新的机遇和挑战。此外,新的技术如电子显微镜相位板(phase-plate)的开发与应用已经被证明对于利用单颗粒技术解析小分子量的蛋白质结构以及利用电子断层扫描三维重构技术研究细胞结构具有重大的促进作用^[49]。该项技术很可能在未来几年里引起冷冻电子显微学的另一次新的重大突破。

5) 体内结构的研究。自从 20 世纪中期建立以来,结构生物学主要是通过对分离纯化至体外的生物大分子结构进行解析。至今解析出来的多达 10 万的生物大分子结构对于理解生物学过程的分子机制发挥了重要的作用。但迄今为止,科学家仍很难通过直接观察获得细胞内乃至体内的生物大分子的原子分辨率结构。冷冻电子显微学尤其是三维断层扫描重构的发展给我们提供了这样的契机。通过更稳定的电子显微镜系统、更高效的数据采集装置、更强大的计算机处理工具,三维断层扫描重构已经可以帮助我们对细胞内的特定分子结构进行重构和统计分析,从而获得它们的高分辨率结构^[50]。如何对细胞中特定分子的标定则是目前冷冻电子显微学细胞结构研究面临的一个主要技术问题。如果能实现以上目标,冷冻电子显微学将可能真正填补结构生物学与细胞生物学之间的空隙,使得我们从不同空间与时间尺度上对生物体的理解更加完整。冷冻电镜未来将可能带给我们更多的惊喜。

参考文献(References)

[1] Ehrenberg M. Scientific background on the Nobel Prize in Chemistry 2014[EB/OL]. Super-resolved fluorescence microscopy 2014. www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2014/advanced-chemistry-prize2014. pdf.
[2] Xu K, Babcock H P, Zhuang X. Dual-objective STORM reveals three-dimensional filament organization in the actin cytoskeleton[J]. Nature Methods, 2012, 9(2): 185-188.
[3] Gosta Ekspong G. Physics 1981—1990[M]. World Scientific, 1993.
[4] Taylor K A, Glaeser R M. Retrospective on the early development of

cryoelectron microscopy of macromolecules and a prospective on opportunities for the future[J]. Journal of Structural Biology, 2008, 163(3): 214-223.
[5] Parsons D. Structure of wet specimens in electron microscopy[J]. Science, 1974, 186(4162): 407-414.
[6] Henderson R, Unwin P N. Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy[J]. Nature, 1975, 257(5521): 28-32.
[7] Taylor K A, Glaeser R M. Electron diffraction of frozen, hydrated protein crystals[J]. Science, 1974, 186(4168): 1036-1037.
[8] Dubochet J, McDowell A. Vitrification of pure water for electron microscopy[J]. Journal of Microscopy, 1981, 124(3): 3-4.
[9] Adrian M, Dubochet J, Lepault J, et al. Cryo-electron microscopy of viruses[J]. Nature, 1984, 308(5954): 32-36.
[10] Henderson R, Raeburn C, Vigers G. A side-entry cold holder for cryo-electron microscopy[J]. Ultramicroscopy, 1991, 35(1): 45-53.
[11] Fujiyoshi Y, Morikawa K, Mizusaki T, et al. Cryo-electron microscopy (V)-development of superfluid-helium stage for hrem[J]. Journal of Electron Microscopy, 1988, 37(5): 258-259.
[12] Kume N, Fujiyoshi Y. 2 morphologically distinct architectures of envelopes in influenza-virus elucidated under liquid helium-cooled cryo-stage[J]. Journal of Electron Microscopy, 1988, 37(5): 259.
[13] De Rosier D, Klug A. Reconstruction of three dimensional structures from electron micrographs[J]. Nature, 1968, 217(5124): 130-134.
[14] Crowther R, DeRosier D J, Klug A. The reconstruction of a three-dimensional structure from projections and its application to electron microscopy[J]. Proceedings of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences, 1970, 317(1530): 319-340.
[15] Crowther R, Amos L A, Finch J, et al. Three dimensional reconstructions of spherical viruses by Fourier synthesis from electron micrographs[J]. Nature, 1970, 226(5244): 421-425.
[16] Henderson R, Baldwin J M, Ceska T A, et al. Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy[J]. Journal of Molecular Biology, 1990, 213(4): 899-929.
[17] Unwin N. Nicotinic acetylcholine receptor an 9 Å resolution[J]. Journal of Molecular Biology, 1993, 229(4): 1101-1124.
[18] Frank J. Averaging of low exposure electron micrographs of non-periodic objects[J]. Ultramicroscopy, 1975, 1(2): 159-162.
[19] Frank J, Al-Ali L. Signal-to-noise ratio of electron micrographs obtained by cross correlation[J]. Nature, 1975, 256(5516): 376-379.
[20] Saxton W, Frank J. Motif detection in quantum noise-limited electron micrographs by cross-correlation[J]. Ultramicroscopy, 1976, 2: 219-227.
[21] Frank J, Goldfarb W, Eisenberg D, et al. Reconstruction of glutamine synthetase using computer averaging[J]. Ultramicroscopy, 1978, 3(3): 283-290.
[22] Van Heel M, Frank J. Use of multivariate statistics in analysing the images of biological macromolecules[J]. Ultramicroscopy, 1981, 6(2): 187-194.
[23] Frank J, Van Heel M. Correspondence analysis of aligned images of biological particles[J]. Journal of Molecular Biology, 1982, 161(1): 134-137.
[24] Ludtke S J, Baldwin P R, Chiu W. EMAN: Semiautomated software for high-resolution single-particle reconstructions[J]. Journal of Structural Biology, 1999, 128: 82-97.
[25] Böttcher B, Wynne S, Crowther R. Determination of the fold of the core protein of hepatitis B virus by electron cryomicroscopy[J]. Nature,

- 386(6620): 88–91.
- [26] Conway J, Cheng N, Zlotnick A, et al. Visualization of a 4-helix bundle in the hepatitis B virus capsid by cryo electron microscopy[J]. *Nature*, 1997, 386: 91–94.
- [27] Zhang X, Settembre E C, Xu Chen, et al. Near-atomic resolution using electron cryomicroscopy and single-particle reconstruction[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105(6): 1867–1872.
- [28] Yu X, Jin L, Zhou Z H. 3.88 Å structure of cytoplasmic polyhedrosis virus by cryo-electron microscopy[J]. *Nature*, 2008, 453(7193): 415–419.
- [29] Jiang W, Baker M, Jakana J, et al. Backbone structure of the infectious ϵ 15 virus capsid revealed by electron cryomicroscopy[J]. *Nature*, 2008, 451(7182): 1130–1134.
- [30] Krivanek O, Mooney P. Applications of slow-scan CCD cameras in transmission electron microscopy[J]. *Ultramicroscopy*, 1993, 49: 95–108.
- [31] Potter C S, Chu H H, Frey B, et al. Leginon: A system for fully automated acquisition of 1000 electron micrographs a day[J]. *Ultramicroscopy*, 1999, 77: 153–16
- [32] Mastronarde D N. SerialEM a program for automated tilt series acquisition on tecnai microscopes using prediction of specimen position[J]. *Microscopy & Microanalysis*, 2003, 9: 1182–1183.
- [33] Lei J L, Frank J. Automated acquisition of cryo-electron micrographs for single particle reconstruction on an FEI Tecnai electron microscope [J]. *Journal of Structural Biology*, 2005, 150(1): 69–80.
- [34] Faruqi A R, Henderson R, Pryddetch M, et al. Direct single electron detection with a CMOS detector for electron microscopy[J]. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section A: Accelerators, Spectrometers, Detectors and Associated Equipment*, 2005, 546(1): 170–175.
- [35] Milazzo A, Leblanc P C, Duttweiler F, et al. Active pixel sensor array as a detector for electron microscopy[J]. *Ultramicroscopy*, 2005, 104(2): 152–159.
- [36] Milazzo A, Cheng A, Moeller A, et al. Initial evaluation of a direct detection device detector for single particle cryo-electron microscopy[J]. *Journal of Structural Biology*, 2011, 176(3): 404–408.
- [37] Brillot A F, Chen J Z, Cheng, et al. Beam-induced motion of vitrified specimen on holey carbon film[J]. *Journal of structural biology*, 2012, 177(3): 630–637.
- [38] Li X M, Mooney P, Zheng S Q, et al. Electron counting and beam-induced motion correction enable near-atomic-resolution single-particle cryo-EM[J]. *Nature Methods*, 2013, 10(6): 584–590
- [39] Bai X C, Fernandez I S, McMullan G, et al. Ribosome structures to near-atomic resolution from thirty thousand cryo-EM particles[J]. *eLife*, 2013, 2: e00461.
- [40] Liao M, Cao E, Julius D, et al. Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy[J]. *Nature*, 2013, 504(7478): 107–112.
- [41] Cao E, Liao M, Cheng Y F, et al. TRPV1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms[J]. *Nature*, 2013, 504(7478): 113–118.
- [42] Scheres S H W. RELION: Implementation of a bayesian approach to cryo-EM structure determination[J]. *Journal of Structural Biology*, 2012, 180(3): 519–530.
- [43] Sigworth F J. A maximum-likelihood approach: To single particle image refinement[J]. *Journal of Structural Biology*, 1998, 122: 328–339.
- [44] Hang J, Wan R X, Yan C Y, et al. Structural basis of pre-mRNA splicing[J]. *Science*, 2015, 349(6253): 1191–1198.
- [45] Wei X P, Su X D, Cao P, et al. Structure of spinach photosystem II-LHCII supercomplex at 3.2 Å resolution[J]. *Nature*, 2016, 534(7605): 69–74.
- [46] Guo R Y, Zong S, Wu M, et al. Architecture of human mitochondrial respiratory megacomplex I2III2IV2[J]. *Cell*, 2017, 170(6): 1247–1257.
- [47] Zhang J, Ma J F, Liu D S. Structure of phycobilisome from the red alga *Griffithsia pacifica*[J]. *Nature*, 2017, 551(7678): 57–63.
- [48] Merk A, Bartesaghi A, Banerjee S, et al. Breaking cryo-EM resolution barriers to facilitate drug discovery[J]. *Cell*, 2016, 165(7): 1698–1707.
- [49] Khoshouei M, Radjainia M, Baumeister W et al. Cryo-EM structure of haemoglobin at 3.2 Å determined with the Volta phase plate[J]. *Nature Communications*, 2017, doi:10.1038/ncomms16099.
- [50] Schur F K M, Obr M, Hagen W J H, et al. An atomic model of HIV-1 capsid-SPI reveals structures regulating assembly and maturation [J]. *Science*, 2016, 353(6298): 506–508.

Cryo-electron microscopy: Commentary on the 2017 Nobel Prize in Chemistry

WANG Hongwei

School of Life Sciences Tsinghua University; Beijing Advanced Innovation Center for Structural Biology, Beijing 100084, China

Abstract The 2017 Nobel Prize for Chemistry was awarded to three scientists (Jacques Dubochet, Joachim Frank and Richard Henderson) for developing cryo-electron microscopy for high-resolution structure determination of biomolecules in solutions. This commentary describes the development of cryo-electron microscopy, three-dimensional reconstruction of macromolecules, major technology breakthroughs leading to the recent uprising of cryo-electron microscopy, and the future perspective of the field.

Keywords 2017 Nobel Prize in Chemistry; cryo-electron microscopy; three-dimensional reconstruction; structure of macromolecules

(责任编辑 祝叶华)