

# 异军突起的冷冻电镜技术

## ——2017年度诺贝尔化学奖成果简析

雷建林

清华大学生命科学学院, 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, 以表彰他们在开发用于溶液中生物分子高分辨率结构测定的冷冻电镜技术方面的贡献。本文将简述这3位科学家的获奖工作, 并展望冷冻电镜技术的发展前景。

**关键词** 2017年诺贝尔化学奖; 冷冻电镜; 生物大分子结构

2017年10月4日, 瑞典皇家科学院宣布2017年度诺贝尔化学奖授予对冷冻电镜技术发展做出原创性贡献的3位科学家, 他们分别是瑞士洛桑大学的退休荣誉教授 Jacques Dubochet、美国哥伦比亚大学的 Joachim Frank 教授和英国剑桥MRC分子生物学实验室的 Richard Henderson 教授(图1)。



图1 2017年诺贝尔化学奖得主, 从左到右依次为 Jacques Dubochet、Joachim Frank 和 Richard Henderson (图片来源: www.nobelprize.org)

### 1 异军突起的冷冻电镜技术

结构决定功能, 无论是宏观大到宇宙的天文, 还是微观小到细胞内部的生命, 莫不如此。生命科学从宏观到微观, 即从器官、组织、细胞、细胞器到生物大分子等分子层面, 其研究内容无不涉及到结构和功能的关系, 这也是诺贝尔奖持续多次授予生物大分子结构解析的原因。X射线晶体学(X-

ray crystallography)、核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)和冷冻电镜(cryo-electron microscopy, Cryo-EM)三维重构(three-dimensional reconstruction, 3DEM)是结构生物学的3大研究技术。X射线晶体学和核磁共振技术都有着先天性的一些缺陷, 比如, X射线晶体学技术要求必须将样品制作成晶体, 生物分子尤其是分子量大的生物分子结晶非常困难, 对溶液内样品使用的核磁共振技术对样品本身有限制, 它只能应用于相对较小的蛋白质。冷冻电镜技术有着其鲜明的优点: 不需要结晶, 溶液样品通过快速冷冻方法包埋在一层玻璃态冰中更接近于其生理状态, 可同时获得多个状态的结构, 可研究其动态的结构, 所需样品量极少。尽管如此, 长期以来, X射线晶体学技术占据着绝对的统治地位。冷冻电镜技术一直是这3大技术中最弱的一个, 因其结构解析的分辨率低, 甚至有时被嘲笑为blobology(只能看见一堆轮廓的技术), 但一直在不停地进步着, 结构解析分辨率逐渐提升, 直到最后一个障碍被成功突破——直接电子探测器开始被用于记录电镜图像, 从而产生了质的飞跃(图2)。2013年底, 加州大学旧金山分校程亦凡研究组和 David Julius 研究组合作首次利用直接电子探测器K2相机和冷冻电镜单颗粒技术解析了TRPV1膜蛋白3.4 Å近原子分辨率结构<sup>[1-2]</sup>, 一场冷冻电镜技术掀起的结构生物学革命开始了, 冷冻电镜技术迅速取代X射线晶体学技术成为最重要的结构解析手段。

### 2 3位获奖者在这一领域的突出贡献

2013年之前, 冷冻电镜单颗粒技术其实已经相当成熟,

收稿日期: 2017-11-01; 修回日期: 2017-11-24

基金项目: 国家重点研发计划项目(2016YFA0501102)

作者简介: 雷建林, 研究员, 研究方向为冷冻电镜成像技术, 电子信箱: jllel@tsinghua.edu.cn

引用格式: 雷建林. 异军突起的冷冻电镜技术——2017年度诺贝尔化学奖成果简析[J]. 科技导报, 2017, 35(23): 22-27; doi: 10.3981/j.issn.1000-7857.2017.23.003

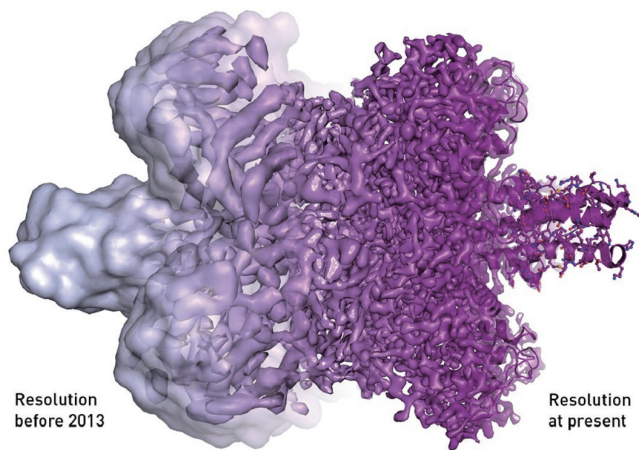


图2 冷冻电镜技术革命引起的分辨率进步  
左:2013年前的分辨率;右:当前的分辨率  
(图片来源:www.nobelprize.org)

正所谓万事俱备,只欠东风,这也是为什么直接电子探测器研发成功投入使用之后,短短4年时间冷冻电镜技术的应用就能迅速催生一系列重要的发现,以及诺贝尔奖如此快地青睐冷冻电镜技术的原因。

冷冻电镜技术的进步是过去几十年众多科学家共同努力的结果,这3位科学家的贡献尤为突出,诺贝尔奖颁给他们自有其原因。

诺贝尔奖一向青睐原创的突破性技术,各种显微成像技术也不例外。1953年荷兰科学家Frits Zernike因发明相衬显微镜获得诺贝尔物理学奖。最近的一次则是2014年Eric Betzig、Stefan W. Hell和William E. Moerner因开发超分辨率荧光显微技术获得诺贝尔化学奖。电子显微镜技术与诺贝尔奖也颇有渊源。1931年德国科学家Ernst Ruska和Max Knoll制造了世界上第一台透射电镜,因其在电子光学领域的基础性工作,Ruska和扫描隧道显微镜的研制者Gerd Binnig及Heinrich Rohrer一起分享了1986年度诺贝尔物理学奖。准晶的发现也要归功于透射电镜。1982年,以色列科学家Dan Shechtman在急冷的铝锰合金中发现5次对称的电子衍射花样,后来被证明为来自于急冷合成的二十面体准晶,他也因这项工作获得了2011年度诺贝尔化学奖。世界上仅有美国Thermo Fisher Scientific(原FEI公司,生产基地在欧洲)、日本电子(JEOL)和日本日立(Hitachi)等知名企业能够生产商业化的透射电子显微镜(注:德国蔡司Zeiss在这场革命来临的前夜于2013年退出透射电镜的制造领域)。电镜在材料研究领域应用非常成功,比较容易获得原子分辨率的结构,但在生物学领域的应用要明显落后于材料科学,原因在于电镜必须在高真空下才能工作,而生物样品含有水分才会稳定,水分的挥发会破坏其真空。因此传统的生物电镜采用负染技术,即让重金属盐包被蛋白表面,然后脱水干燥制作成适合在真空成像的样品。1968年,英国剑桥MRC分子生物

学实验室的Aaron Klug博士和其同事David DeRosier提出了电镜三维重构原理,并用于解析负染的噬菌体病毒的结构<sup>[3]</sup>。Klug博士因此荣获1982年度诺贝尔化学奖。然而负染的方法并不适合,不仅会导致样品分辨率降低,更重要的是当生物分子失水后,它们的结构将坍塌,丧失自然结构特征。因此,必须解决生物样品脱水失活的问题以及不耐电子辐照损伤的问题。

加州大学伯克利分校Lawrence Berkeley国家实验室的Robert Glaeser和他的学生Kenneth Taylor于1974年首次尝试了将生物大分子过氧化氢酶的二维晶体进行冷冻并观察到3 Å的原子分辨率的电子衍射花样,说明通过冷冻的方法可以维持含水样品的高真空以及有效降低辐照损伤对生物样品精细结构的破坏<sup>[4]</sup>。通常的冷冻过程中,样品里的水会结成冰晶,可能使样品结构发生改变。Jacques Dubochet系统研究了冰在各种冷冻条件下的状态,1982年开发出真正成熟可用的快速冷冻制样技术,使水在液态形式下固化,形成一种玻璃态冰而不是冰晶来包埋样品<sup>[5-6]</sup>。他们一开始尝试用液氮直接冷冻但不成功,最后是用乙烷代替液氮后才最终实现,而乙烷本身则需要用液氮进行冷却,这种方法一直被后来者沿用至今。这项工作标志着冷冻电镜技术真正的开始。

冷冻电镜技术主要包括3种不同的方法:单颗粒分析(single particle analysis),电子断层术(electron tomography),电子晶体学(electron crystallography)。本次诺贝尔奖的颁发主要还是源于单颗粒分析技术最近几年的广泛应用催生了一系列重要发现。而Joachim Frank则是当之无愧的单颗粒分析技术鼻祖。1975年,Richard Henderson和Nigel Unwin提出了电子晶体学方法,但是二维晶体非常难以获得<sup>[7]</sup>。Joachim Frank开发了更加普适的单颗粒方法。生物大分子都是由轻元素构成,与高能电子相互作用较弱,同时还不耐电子辐照,不能接受很高的剂量,因此图像的信噪比很低。Joachim Frank提出可基于各个分散的全同颗粒的二维投影照片,经过分类对位(alignment)及平均来降低噪音,从而获取准确取向,最终得到更高分辨率的三维立体图像<sup>[8]</sup>。他还开发了冷冻电镜第一个单颗粒三维重构软件SPIDER<sup>[9]</sup>。另外Joachim Frank将该方法应用于核糖体结构机理方面的研究并作出了重要开创性工作,可惜囿于当时冷冻电镜结构解析分辨率不够高,遗憾地与2009年授予核糖体结构解析的诺贝尔化学奖失之交臂。此次因单颗粒分析方法获得诺贝尔奖,终于没有再留下遗憾。

Richard Henderson是冷冻电镜技术的引领者,1975年首次提出电子晶体学方法,用其获得细菌视紫红质7 Å分辨率的结构,并于1990年推进到3.5 Å<sup>[7,10]</sup>。首次证明了利用冷冻电镜技术是可以获得原子级分辨率的,尽管只是二维晶体还没有普适性。他1995年从理论上预言冷冻电镜技术未来完全有能力解析到原子级分辨率<sup>[11]</sup>,2004年进一步指出达到这个目标需要克服的关键问题,一是提高图像的信噪比,二是

克服图像的漂移<sup>[12]</sup>。其理论分析为冷冻电镜技术的发展指明了方向,其中一个最重要的方向是直接电子探测器的开发。他还亲自参与了Falcon直接电子探测器的研发。直接电子探测器的引入,解决了他指出的问题。Richard Henderson还独具慧眼,提携当时还不太知名的Sjors Scheres,将其引进至MRC分子生物学实验室,后者开发的基于概率统计分析的三维重构软件Relion能更有效地处理低信噪比的冷冻电镜图像<sup>[13]</sup>。硬件与软件的快速发展,掀起了结构生物学的一场革命。

3位获奖者多次到中国进行交流访问,其中Joachim Frank和Richard Henderson和中国颇有渊源。Joachim Frank实验室有许多华人学生和学者,为中国培养了不少该领域的研究人员。北京大学的高宁教授2002—2006年跟随Frank攻读博士学位,2006—2008年又在其实验室做博士后,随后回到清华大学建立实验室,后于2017年4月转至北京大学工作。清华大学雷建林2000年11月—2009年2月在Frank实验室先后做博士后和副研究员(associate research scientist),后回到清华大学协助建设国内首个顶级冷冻电镜平台,目前任清华大学冷冻电镜平台总管(图3)。北京大学医学部教授尹长城早年在剑桥MRC分子生物学实验室学习,其导师Nigel Unwin和Richard Henderson一起发展了电子晶体学方法。



图3 Joachim Frank(前排右二)、高宁(左上角)实验室成员、雷建林2011年一起爬金山岭长城

### 3 中国冷冻电镜领域发展现状

在这场冷冻电镜技术引起的结构生物学革命中,华人学者也做出了重要贡献。从2008年开始,在直接电子探测器问世之前,美国Brandeis大学Nikolaus Grigorieff研究组的张兴博士(后加入周正洪研究组),德克萨斯大学休斯敦医学院/加州大学洛杉矶分校的周正洪教授和他实验室的余学奎、张兴博士利用Kodak SO-163胶片或CCD相机解析了多个病毒近原子级分辨率的结构,最高的分辨率达到3.3 Å,这是首批利用单颗粒冷冻电镜技术重构出的生物大分子的原子结构<sup>[14-16]</sup>。但是利用传统的胶片或CCD相机只有病毒等个别具有高对称的生物大分子有可能利用单颗粒方法做到原子级分辨

率。2011年左右,一种全新的图像记录设备直接电子探测器开始揭开其神秘的面纱<sup>[17]</sup>。2013年初,程亦凡课题组(第一作者李雪明博士)和英国MRC分子生物学实验室的Sjors Scheres课题组(第一作者白晓晨博士)分别独立发表论文,证明利用直接电子探测器并结合新的图像处理工具可以解析生物大分子的原子分辨率结构<sup>[18-19]</sup>。2013年底加州大学旧金山分校程亦凡研究组和David Julius研究组合作首次利用直接电子探测器和冷冻电镜单颗粒技术解析了TRPV1膜蛋白3.4 Å的结构,一夜之间直接掀起了这一场结构生物学革命<sup>[1-2]</sup>。李雪明、张兴、余学奎博士分别回到清华大学、浙江大学、中国科学院上海药物研究所组建独立实验室。

20世纪90年代中期,清华大学隋森芳教授、中山大学张景强教授、中国科学院生物物理研究所徐伟研究员等人开始利用冷冻电镜开展研究。隋森芳院士是中国冷冻电镜领域的先驱,不仅利用冷冻电镜技术与生物膜相关的重要蛋白质复合物的结构与功能做出了非常重要的工作,还培养了一批冷冻电镜领域的优秀青年科学家,这些科学家各自建立了独立的实验室,包括清华大学的王宏伟、上海科技大学的沈庆涛、西安交通大学的武一、天津大学的米立志、美国Wadsworth中心的刘铮、NIH的江健森、西南医学中心的白晓晨和普渡大学的畅磊福。

中国早期的冷冻电镜设备非常落后,2008年以前没有一台场发射冷冻透射电镜。真正的发力开始于2008年,清华大学率先订购亚洲第一台Titan Krios高端冷冻电镜,该仪器于2009年3月到货,几个月后中国科学院生物物理研究所的Titan Krios也到货。其后,随着国家蛋白质科学研究基础设施的启动,蛋白质科学研究(上海)设施以及清华大学分别在2013年和2015年第4季度各有1台和2台Titan Krios电镜投入使用。近年,随着冷冻电镜技术的革命,中国科学院生物物理研究所、北京大学、浙江大学纷纷购置了Titan Krios电镜并投入使用,更多的高校与科研机构也都已经或计划购置高端冷冻电镜。截止到2017年11月,中国将共有各种型号的冷冻电镜近50台,其中最高端的冷冻电镜约14台(含已到货暂未完成安装的)。到2018年年底,最高端冷冻电镜的数字将可能增至近30台(表1)。

近年来,在冷冻电镜技术的应用方面,中国科学家取得了优异的成绩。如,清华大学施一公研究组首次报道了通过单颗粒冷冻电镜方法解析的酵母剪接体近原子分辨率的三维结构,并阐述了剪接体对前体信使RNA执行剪接的基本工作机理(图4)<sup>[20-21]</sup>;随后又陆续解析了酵母剪接体多个处于不同状态的结构<sup>[22-27]</sup>;2017年施一公课题组又首次解析了人源剪接体近原子分辨率的三维结构<sup>[28]</sup>。清华大学隋森芳课题组获得了第一个完整藻胆体的近原子分辨率的三维结构,也是迄今为止报道过的分辨率好于4 Å的最大的蛋白复合体结构<sup>[29]</sup>。清华大学颜宁课题组解析了一系列不同的离子通道的冷冻电镜结构<sup>[30-36]</sup>。清华大学杨茂君课题组解析了一系列线粒体呼吸链蛋白质复合物的结构<sup>[37-39]</sup>。中国科学院生物物理

表1 中国 300 KV Titan Krios 冷冻透射电镜分布(截至2017年11月)

科研机构	Titan Krios 电镜数目	状态
清华大学	3	已运行
生物物理所	2	已运行
蛋白质科学研究(上海)设施	1	已运行
浙江大学	1	已运行
北京大学	1	已运行
上海药物所	1	安装中
上海科技大学	2	待安装
南方科技大学	2	待安装
复旦大学	>2	计划采购
四川大学	1	已订货
上海交通大学	1	已订货
中国科技大学	2	计划采购
中山大学	1	计划采购
哈尔滨工业大学	1	计划采购
天津大学	1	计划采购
山西高等创新研究院	2	计划采购

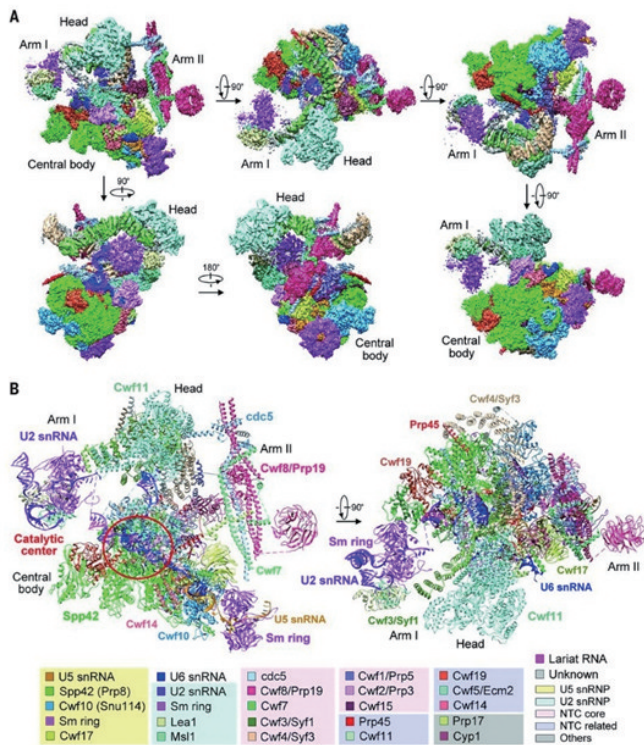


图4 酵母剪接体 3.6 Å 的三维结构<sup>[21]</sup>

研究所朱平研究组和李国红研究组合作解析了 30 nm 染色质左手双螺旋高清晰三维结构<sup>[40]</sup>。中国科学院生物物理研究所柳振峰研究组、章新政研究组与常文瑞、李梅研究组合作,先后报道了菠菜和豌豆光系统-捕光复合物的超级膜蛋白复合体的高分辨率电镜结构<sup>[41-42]</sup>。中国科技大学的蔡刚课题组解析了 3.9 Å 分辨率的 ATR-ATRIP 复合物的结构,该结构揭示了 ATR 激酶活性在同源二聚体中活性抑制和激活的分子机制<sup>[43]</sup>。

在冷冻电镜技术的开发方面,中国科学家也取得了一系列成果。如,清华大学的王宏伟课题组和合作者首次提出并使用过焦成像技术获得高分辨率蛋白质结构,是冷冻电镜成像理论方面的新方法,同时此方法也为球差矫正技术和相位板技术在生物冷冻电镜领域的应用提供了新思路<sup>[44]</sup>。清华大学的李雪明课题组和合作者开发了基于深度学习技术的自动挑颗粒软件 DeepPicker、单颗粒重构软件 Thunder 以及单颗粒、微晶衍射(MicroED)数据收集软件<sup>[45]</sup>。清华大学王佳伟和其合作者开发了为高分辨率冷冻电镜三维重构密度图自动建模的程序 EMBUILDER<sup>[46]</sup>。清华大学的雷建林在原有开发基础上<sup>[47]</sup>,发展了全新的高通量单颗粒自动化数据收集软件 AutoEMation 2.0 并广泛使用<sup>[26-28,33,36,38-39,44]</sup>。中国科学院生物物理研究所的孙飞和其合作者得出以下成果:1) 提出了一种全新的高真空光学冷台设计思想,自行研发了一套基于高真空

光学冷台的光电关联成像系统 HOPE<sup>[48]</sup>; 2) 开发了连续超薄切片扫描电镜成像 AutoCUTS-SEM 大尺度生物样品电镜三维重构新技术<sup>[49]</sup>; 3) 提出了一种改进的冷冻聚焦离子束切割方法<sup>[50]</sup>; 4) 开发了新型的电子断层三维重构新方法<sup>[51-53]</sup>。湖南师范大学的刘红荣和其合作者提出了一种基于二维电子显微图像重构对称失配生物大分子三维结构的新方法,首次揭示了病毒内部基因组及其聚合酶的三维结构<sup>[54]</sup>。

华人科学家在这个领域的影响力越来越大, 3DEM Gordon Research Conference 是这个专业领域最重要的国际会议, 2016年的大会主席是加州大学旧金山分校程亦凡教授, 2019年将由清华大学王宏伟教授担任。首届 Kuo KH International Symposium on 3D Cryo-EM Molecular Imaging 于 2008 年由清华大学承办, 这也正式标志着中国冷冻电镜群体的快速崛起。两年一度的该研讨会越来越成为该领域仅次于 3DEM Gordon Research Conference 的国际盛会, 3 位诺贝尔奖获得者过去曾多次参加该会。下一届将于 2018 年 8 月在杭州举行由浙江大学承办, Joachim Frank 教授早就明确表示将参加。2016 年成立了中国生物物理学会冷冻电镜分会, 到目前为止, 国内从事冷冻电镜相关工作的课题组约有 50 个, 相信今后几年会员数会迅速增长。

#### 4 展望

2015 年 Nature Methods 将冷冻电镜技术评为年度最受关注的技术, 2017 年冷冻电镜技术获得诺贝尔化学奖实至名归。今后, 冷冻电镜单颗粒技术的应用必然会更加普及, 对于重要生物大分子的结构解析课题组之间的竞争将更加白热化。冷冻电镜技术是一门交叉学科, 相当多的本领域华人科学家来自于物理和材料等领域也证明了这一点。本次颁奖很多人笑言是物理学家为了解决生物学问题而获得了诺贝尔化学奖。未来技术的发展需要生物、物理、化学、数学、计算机、材料、工程等领域的科学家通力合作。冷冻电镜技术在未来仍有许多重要技术问题尚待解决。如: 1) 如何获得生物大分子结构在细胞乃至组织原位的更接近生理状态的精细结构信息? 2) 如何获得生物大分子的动态结构信息? 3) 超大规模数据的快速处理, 这需要更好的数据处理软件和计算机硬件的共同发展。4) 如何进一步提高结构解析分辨率, 虽然相位板、能量过滤器、物镜球差校正装置等新硬件设备的开发应用进一步推进了冷冻电镜技术的极限, 目前单颗粒技术仍然难以获得好于 2 Å 分辨率的结构, 除了需要更好的算法外, 相关的电镜和相机硬件设备需要更深入的开发应用。5) 如何将冷冻电镜技术与其它技术, 如超分辨率荧光显微技术、质谱技术、测序技术等有机整合。6) 如何发展更加成熟的 MicroED 技术。冷冻电镜领域目前人才缺口很大, 冷冻电镜技术在未来大有可为。

#### 参考文献 (References)

[1] 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.

- [2] Cao E, Liao M F, Cheng Y F, et al. TRPV1 structures in distinct conformations reveal activation mechanisms[J]. Nature, 2013, 504(7478): 113-118.
- [3] DeRosier D J, Klug A. Reconstruction of 3 dimensional structures from electron micrographs[J]. Nature, 1968, 217(5124): 130-134.
- [4] Taylor K A, Glaeser R M. Electron-diffraction of frozen, hydrated protein crystals[J]. Science, 1974, 186(4168): 1036-1037.
- [5] Dubochet J, Lepault J, Freeman R, et al. Electron-microscopy of frozen water and aqueous-solutions[J]. Journal of Microscopy-Oxford, 1982, 128(3): 219-237.
- [6] Adrian M, Dubochet J, Lepault J, et al. Cryo-electron microscopy of viruses[J]. Nature, 1984, 308(5954): 32-36.
- [7] Henderson R, Unwin P N T. 3-dimensional model of purple membrane obtained by electron-microscopy[J]. Nature, 1975, 257(5521): 28-32.
- [8] Frank J. Three-dimensional electron microscopy of macromolecular assemblies[M]. New York: Oxford University Press, 2006.
- [9] Frank J, Shimkin B, Dowse H. SPIDER-A modular software system for electron image-processing[J]. Ultramicroscopy, 1981, 6(1): 343-357.
- [10] Henderson R, Baldwin J M, Ceska T A. Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryomicroscopy[J]. Journal of Molecular Biology, 1990, 213(4): 899-929.
- [11] Henderson R. The potential and limitations of neutrons, electrons and x-rays for atomic-resolution microscopy of unstained biological molecules[J]. Quarterly Reviews of Biophysics, 1995, 28(2): 171-193.
- [12] Henderson R. Realizing the potential of electron cryo-microscopy[J]. Quarterly Reviews of Biophysics, 2004, 37(1): 3-13.
- [13] Scheres SHW. RELION: Implementation of a bayesian approach to cryo-EM structure determination[J]. Journal of Structural Biology, 2012, 180(3): 519-530.
- [14] Zhang X, Settembre E C, Xu C, et al. Near-atomic resolution using electron cryomicroscopy and single-particle reconstruction[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(6): 1867-1872.
- [15] Yu X K, Jin L, Zhou Z H. 3.88 angstrom structure of cytoplasmic polyhedrosis virus by cryo-electron microscopy[J]. Nature, 2008, 453(7193): 415-419.
- [16] Zhang X, Jin L, Fang Q, et al. 3.3 angstrom cryo-EM structure of a nonenveloped virus reveals a priming mechanism for cell entry[J]. Cell, 2010, 141(3): 472-482.
- [17] Milazzo A, Cheng A C, 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.
- [18] Li X M, Monner 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.
- [19] Bai X C, Fernandez IS, McMullan G, et al. Ribosome structures to near-atomic resolution from thirty thousand cryo-EM particles[J]. eLife, 2013, 2, doi:10.7554/eLife.00461.
- [20] Yan C Y, Hang J, Wan R X, et al. Structure of a yeast spliceosome at 3.6-angstrom resolution[J]. Science, 2015, 349(6253): 1182-1191.
- [21] Hang J, Wan R X, Yan C Y, et al. Structural basis of pre-mRNA splicing[J]. Science, 2015, 349(6253): 1191-1198.
- [22] Wan R X, Yan C Y, Bai R, et al. The 3.8 angstrom structure of the U4/U6.U5 tri-snRNP: Insights into spliceosome assembly and catalysis [J]. Science, 2016, 351(6272): 466-475.
- [23] Wan R X, Yan C Y, Bai R, et al. Structure of a yeast catalytic step I spliceosome at 3.4 angstrom resolution[J]. Science, 2016, 353(6302): 895-904.
- [24] Yan C Y, Wan R X, Bai R, et al. Structure of a yeast activated spliceosome at 3.5 angstrom resolution[J]. Science, 2016, 353(6302): 904-

- 911.
- [25] Yan C Y, Wan R X, Bai R, et al. Structure of a yeast step II catalytically activated spliceosome[J]. *Science*, 2017, 355(6321): 149–155.
- [26] Wan R X, Yan C Y, Bai R, et al. Structure of an intron lariat spliceosome from *saccharomyces cerevisiae*[J]. *Cell*, 2017, 171(1): 120–132.
- [27] Bai R, Yan C Y, Wan R X, et al. Structure of the post-catalytic spliceosome from *saccharomyces cerevisiae*[J]. *Cell*, 2017, doi: org/10.1016/j.cell.2017.10.038.
- [28] Zhang X F, Yan C Y, Hang J, et al. An atomic structure of the human spliceosome[J]. *Cell*, 2017, 169(5): 918–929.
- [29] Zhang J, Ma J F, Liu D S, et al. Structure of phycobilisome from the red alga *Griffithsia pacifica*[J]. *Nature*, 2017, 551(7678): 57–63.
- [30] Wu J P, Yan Z, Li Z Q, et al. Structure of the voltage-gated calcium channel Ca(v)1.1 complex[J]. *Science*, 2015, 350(6267): 2395.
- [31] Wu J, Yan Z, Qian X, et al. Structure of the voltage-gated calcium channel Ca(v)1.1 at 3.6 angstrom resolution[J]. *Nature*, 2016, 537(7619): 191–196.
- [32] Gong X, Qian H W, Zhou X H, et al. Structural insights into the niemann-pick C1 (NPC1)-mediated cholesterol transfer and ebola infection[J]. *Cell*, 2016, 165(6): 1467–1478.
- [33] Peng W, Shen H Z, Wu J P, et al. Structural basis for the gating mechanism of the type 2 ryanodine receptor RyR2[J]. *Science*, 2016, 354(16): 5324.
- [34] Shen H Z, Zhou Q, Pan X J, et al. Structure of a eukaryotic voltage-gated sodium channel at near-atomic resolution[J]. *Science*, 2017, doi: 10.1126/science.aal4326.
- [35] Qian H W, Zhao X, Cao P P, et al. Structure of the human lipid exporter ABCA1[J]. *Cell*, 2017, 169(7): 1228–1239.
- [36] Yan Z, Zhou Q, Wang L, et al. Structure of the Na(v)1.4-beta 1 complex from electric eel[J]. *Cell*, 2017, 170(3): 470–482.
- [37] Gu J, Wu M, Guo R Y, et al. The architecture of the mammalian respiratory[J]. *Nature*, 2016, 537(7622): 639–643.
- [38] Wu M, Gu J, Guo R Y, et al. Structure of mammalian respiratory supercomplex I1III2IV1[J]. *Cell*, 2016, 167(6): 1598–1609.
- [39] Guo R Y, Zong S, Wu M, et al. Architecture of human mitochondrial respiratory mega-complex I2III2IV2[J]. *Cell*, 2017, 170(6): 1247–1257.
- [40] Song F, Chen P, Sun D P, et al. Cryo-EM study of the chromatin fiber reveals a double helix twisted by tetranucleosomal units[J]. *Science*, 2014, 344(6182): 376–380.
- [41] Wei X, Su X, Cao P, et al. Structure of spinach photosystem II-LHCII supercomplex at 3.2 angstrom resolution[J]. *Nature*, 2016, 534(7605): 69–74.
- [42] Su X D, Ma J, Wei X P, et al. Structure and assembly mechanism of plant C2S2M2-type PSII-LHCII supercomplex[J]. *Science*, 357(6353): 815–820.
- [43] Wang X J, Ran T T, Zhang X, et al. 3.9 Å structure of the yeast Mec1-Ddc2 complex, a homolog of human ATR-ATRIP[J]. *Science*, 358(6367): 1206–1209.
- [44] Fan X, Zhao L Y, Liu C, et al. Near-atomic resolution structure determination in over-focus with volta phase plate by Cs-corrected cryo-EM[J]. *Structure*, 2017, 25(10): 1623–1630.
- [45] Wang F, Gong H C, Liu C C, et al. DeepPicker: A deep learning approach for fully automated particle picking in cryo-EM[J]. *Journal of Structural Biology*, 2016, 195(3): 325–336.
- [46] Zhou N, Wang H, Wang J. EMBUILDER: A template matching-based automatic model-building program for high-resolution cryo-electron microscopy maps[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 2664.
- [47] 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.
- [48] Li S G, Ji G, Shi Y, et al. High-vacuum optical platform for cryo-CLEM (HOPE): A new solution for non-integrated multiscale correlative light and electron microscopy[J]. *Journal of Structural Biology*, 2017, doi: org/10.1016/j.jsb.2017.11.002.
- [49] Li X X, Ji G, Chen X, et al. Large scale three-dimensional reconstruction of an entire *Caenorhabditis elegans* larva using AutoCUTS-SEM [J]. *Journal of Structural Biology*, 2017, 200(2): 87–96.
- [50] Zhang J G, Ji G, Huang X J, et al. An improved cryo-FIB method for fabrication of frozen hydrated lamella[J]. *Journal of Structural Biology*, 2016, 194(2): 218–223.
- [51] Chen Y, Zhang Y, Zhang K, et al. FIRT: Filtered iterative reconstruction technique with information restoration[J]. *Journal of Structural Biology*, 2016, 195(1): 49–61.
- [52] Deng Y C, Chen Y, Zhang Y, et al. ICON: 3D reconstruction with ‘missing-information’ restoration in biological electron tomography[J]. *Journal of Structural Biology*, 2016, 195(1): 100–112.
- [53] Han R M, Wan X H, Wang Z H, et al. AuTom: A novel automatic platform for electron tomography reconstruction[J]. *Journal of Structural Biology*, 2017, 199(3): 196–208.
- [54] Liu H R, Cheng L P. Cryo-EM shows the polymerase structures and a nonspooled genome within a dsRNA virus[J]. *Science*, 2015, 349(6254): 1347–1350.

## Emerging technique-cryo-electron microscopy: Commentary on the 2017 Nobel Prize for Chemistry

LEI Jianlin

School of Life Sciences, Tsinghua University, 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. In this paper their work on the development of cryo-electron microscopy technique is briefly introduced and an outlook for the future development of this technique is also presented.

**Keywords** 2017 Nobel Prize for Chemistry; cryo-electron microscopy; structure of macromolecules

(责任编辑 祝叶华)