

·特约综述·

DOI: 10.13865/j.cnki.cjbmb.2018.01.01

编者按 冷冻电镜技术的突破导致结构生物学发生了革命,在生命科学各领域获得了广泛应用。该文重点介绍了冷冻电镜的发展历程,冷冻电镜技术的突破和冷冻电镜在生命科学中的应用。旨在让我国科学家了解和掌握冷冻电镜技术,加快冷冻电镜技术在生命科学领域的推广和应用。

冷冻电镜技术的突破导致结构生物学发生革命性变化

尹长城*

(北京大学医学部生物物理学系,北京大学蛋白质科学中心,北京 100083)

摘要 最近,冷冻电镜技术的突破引起结构生物学发生了革命。这一革命导致2017年诺贝尔化学奖授予对冷冻电镜技术发展做出开创性贡献的3位科学家 Jacques Dubochet、Joachim Frank 和 Richard Henderson。本文将综述冷冻电镜的发展历程,导致结构生物学革命的冷冻电镜关键技术,包括电镜、图像记录装置和图像处理算法方面的突破,以及中国科学家应用冷冻电镜取得的重要科学成就,涵盖基因表达/调控、蛋白质合成/降解、膜蛋白、免疫、病毒等相关蛋白复合体。最后,对冷冻电镜的未来发展方向进行展望。

关键词 冷冻电镜;结构生物学;蛋白质分子机器

中图分类号 Q3; Q6; Q71

Structural Biology Revolution Led by Technical Breakthroughs in Cryo-electron Microscopy

YIN Chang-Cheng*

(Department of Biophysics, College of Basic Medicine, Peking University Health Science Center, Peking University, Beijing 100083, China)

Abstract Recent technical breakthroughs in cryo-electron microscopy (cryo-EM) revolutionized structural biology, which led to the 2017 Nobel Prize in chemistry award to three scientists Jacques Dubochet, Joachim Frank and Richard Henderson, who had groundbreaking contribution to the development of cryo-EM. In this review, I will give a comprehensive review on the development history of cryo-EM, the technical aspects of the breakthroughs in cryo-EM leading to structural biology revolution, including electron microscope, image recording device and image processing algorithm, and major scientific achievements by Chinese scientists employing cryo-EM, covering protein complexes involved in or related to gene expression and regulation, protein synthesis and degradation, membrane proteins, immunity and viruses. Finally, I will give a perspective outlook on the development of cryo-EM in the future.

Key words cryo-electron microscopy; structural biology; protein molecular machinery

收稿日期: 2017-11-19; 修回日期: 2017-12-13; 接受日期: 2017-12-13
科技部重点研发计划(No. 2017YFA0504700)和国家自然科学基金(No. 31570732, No. 31770785)资助
* 通讯作者 Tel: 010-82801394; E-mail: ccyin@hsc.pku.edu.cn
Received: November 19, 2017; Revised: December 13, 2017; Accepted: December 13, 2017
Supported by The National Key Research and Development Program of China (No. 2017YFA0504700) and National Natural Science Foundation of China (No. 31570732, No. 31770785)
* Corresponding author 010-82801394; E-mail: ccyin@hsc.pku.edu.cn

近年来,在物理学家、计算机科学家和结构生物学家多年协同攻关、共同努力下,冷冻电镜(cryo-electron microscopy, cryo-EM)在技术上取得了关键性突破,在解析以蛋白质“分子机器”为代表的生物大分子复杂体系的结构,进而阐明这些“分子机器”的功能和破解他们的工作机制方面取得了突破性进展。2017年,诺贝尔化学奖授予对冷冻电镜发展做出开创性贡献的3位科学家 Jacques Dubochet、Joachim Frank 和 Richard Henderson,标志着结构生物学进入了新时代。关于3位科学家对冷冻电镜的发展所做的开创性贡献和冷冻电镜技术为什么获得诺贝尔奖,我在本刊有专文评介^[1]。有兴趣者可参考。

冷冻电镜技术的突破,不仅引起了结构生物学家的高度关注,也引起了其它生命科学领域,包括生物化学和分子生物学、细胞生物学、神经生物学等领域的科学家的高度兴趣。科学家们纷纷想知道“冷冻电镜”是何方神器,有如此大的神通。我曾经在冷冻电镜的奠基地——英国剑桥 MRC 分子生物学实验室(MRC Laboratory of Molecular Biology, MRC-LMB)学习和工作,对冷冻电镜的发展历史有一定的了解。在此,对冷冻电镜的发展历程、冷冻电镜近年在关键技术上的突破以及中国科学家应用冷冻电镜所取得的重要科学成就作一总结。旨在引起中国生命科学领域科学家的兴趣,把冷冻电镜应用于各自从事的科学研究,解析各自感兴趣的重要生物学问题中所涉及的生物大分子复杂体系的结构,进而阐明这些生物大分子复杂体系的功能及其执行功能的工作机制。

1 冷冻电镜的发展历程

要了解冷冻电镜,首先要了解结构生物学。结构生物学是应用物理学方法在原子水平阐明生物大分子的三维(three-dimensional, 3D)结构及其动态变化,进而诠释生物大分子的生物学功能及其执行功能的工作机制的科学。结构生物学起源于英国剑桥 MRC-LMB,于上个世纪40年代开始于 Max Perutz 和 John Kendrew 以及 James Watson 和 Francis Crick 应用 X-射线晶体学方法研究蛋白质(血红蛋白)和 DNA 的结构。血红蛋白的结构解析和 DNA 双螺旋结构的破解,导致了生物学的革命——生命科学从对生命现象的宏观定性描述阶段,进入了对

生命现象的分子机制的微观描述阶段,即进入了分子生物学时代。Max Perutz 和 John Kendrew 因此获得 1962 年诺贝尔化学奖,James Watson 和 Francis Crick 则获得了同年的诺贝尔生理学或医学奖。

冷冻电镜是一种结构生物学技术,其解析结构的方法是通过用电子显微镜对冷冻固定在玻璃态的冰中的纯化的生物大分子进行成像,然后应用计算机对所摄取的生物大分子图像进行图像处理和计算,进而重构出生物大分子的三维结构(Fig. 1)。冷冻电镜结构解析的理论基础,是电镜三维重构原理,由 MRC-LMB 的 Aaron Klug 及其同事于上世纪 60 年代建立。该原理基于数学中的傅立叶变换(Fourier transform, FT)相关的中央截面定理和傅立叶变换的性质。中央截面定理可表述如下:一个三维函数的投影函数的傅立叶变换等于该三维函数傅立叶变换通过坐标原点,且垂直于投影方向的截面函数。将这个定理应用于电镜图像:一个三维物体的电镜图像的傅立叶变换等于该三维物体的傅立叶变换通过物体中心(设定为坐标原点)并垂直于摄像方向的截面。傅立叶变换具有如下性质:一个函数的傅立叶变换的逆傅立叶变换,等价于原来的函数。根据中央截面定理和傅立叶变换的性质,一个三维函数的 n 个不同方向的投影函数傅立叶变换的集合,等价于该三维函数的三维傅立叶变换,对此三维傅立叶变换作逆傅立叶变换则等价于恢复原三维函数。将这一原理应用于电镜图像:一个物体(如蛋白质、病毒、细胞器、细胞)的三维结构的不同方向所摄取的 n 个电镜图像的傅立叶变换的集合等价于该物体三维结构的三维傅立叶变换,对此三维傅立叶变换作逆傅立叶变换等价于恢复原物体的三维结构^[2](Fig. 2)。这个原理奠定了电镜解析物体三维结构的基石,所有用电镜解析物体三维结构的方法都是基于这个原理。由于这一奠基性贡献, Aaron Klug 荣获 1982 年诺贝尔化学奖。

虽然 Aaron Klug 及其同事早在上个世纪 60 年代就提出了电镜三维重构原理,但由于记录电镜图像的电镜硬件和图像处理/三维重构的软件还不成熟,截止到 2013 年,只有在平面形成一层高度有序排列的蛋白质分子样品(在电镜领域称为“二维晶体”,two-dimensional crystal)才能应用冷冻电镜通过电子晶体学方法解析结构。2013 年以后,由于冷冻电镜关键技术的突破,使得分散的蛋白质分子样品

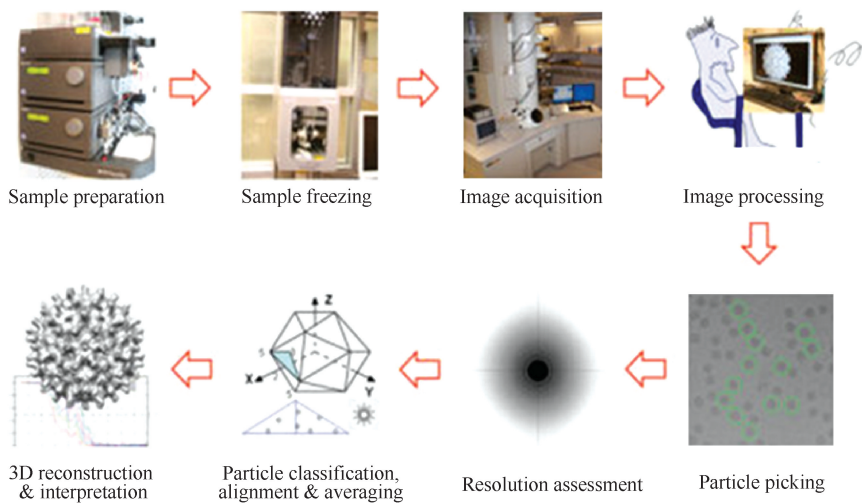


Fig. 1 The structure determination workflow of macromolecule by cryo-EM

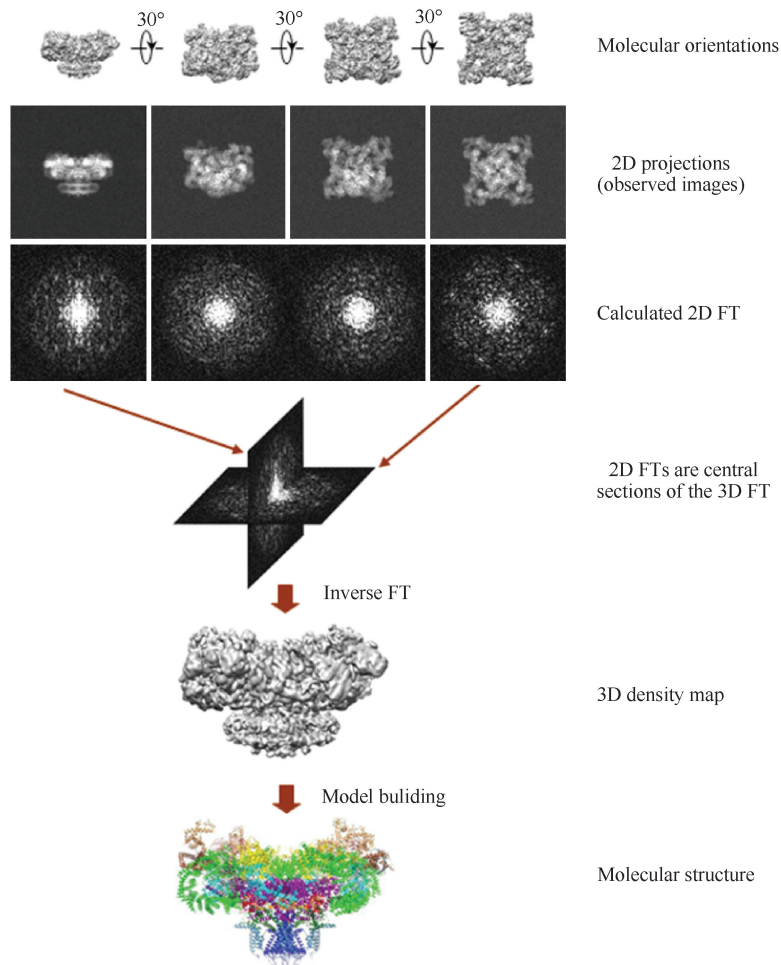


Fig. 2 Principle of 3-D reconstruction of macromolecule from EM images^[2]

(在电镜领域称为“单颗粒”, single particle) 也能应用冷冻电镜解析结构。可以说,冷冻电镜关键技术的突破,导致结构生物学发生革命性变化,并导致生物学研究取得突破性进展。

2 冷冻电镜技术的突破

冷冻电镜技术的突破,来源于电镜硬件和软件上的突破。在硬件方面,有电镜本身的改进特别是

图像记录装置的突破。在软件方面,有图像处理和三维重构算法的突破。下面分别加以阐述。

2.1 电镜

FEI 公司(现合并到 Thermo-Fisher 公司)于 2012 年推出目前最先进的冷冻电镜 Titan Krios (Fig. 3)。该电镜和以前相比,有 3 个方面的改进:1)该电镜采用三级聚光系统,大大提高了电子枪发射出的电子的平行性和相干性,因而提高了成像的分辨率;2)该电镜安装了机器手上样装置,



可以从预装了 12 个冷冻电镜载网盒选择样品上样,因而提高了上样效率和寻找到可以用于收集数据样品的成功率;3)电镜样品载网预装在液氮冷却的样品盒中,上样后载网由液氮冷却并与外界隔绝,既降低了冰污染,又提高了样品在电镜中的稳定性,延长了收集数据的时间。在样品和电镜都处于最佳状态下,1 个电镜载网连续几天收集的数据即可解析出结构,大大提高了结构解析的速率。

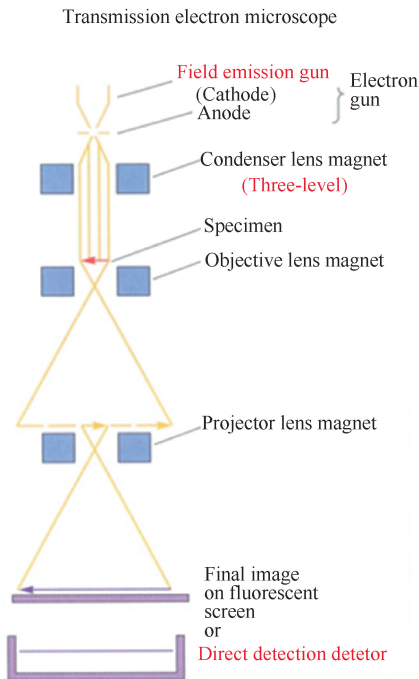


Fig. 3 Thermo-Fisher Titan Krios electron microscope (left); Electronic-optical system of Titan Krios (right)

The Titan Krios electron microscope is a field emission gun-type microscope. It has three-level condenser while other electron microscopes have only two-level, and is equipped with direct detection detector

2.2 图像记录装置——直接电子探测器

2013 年以前,电镜图像或者记录在电镜专用胶片上,或者用电镜专用 CCD(charge-coupled device)记录。电镜胶片记录的图像虽然分辨率高,但受到胶片盒容纳胶片数量的限制(FEI 电镜胶片盒的数量为 56 张),胶片盒中的胶片用毕须更换新的胶片盒并抽真空,使得应用胶片记录图像的数量受到限制(一般 1 天只能拍摄 100 张左右)。胶片拍摄后还要显影、冲洗、干燥,干燥后还用高分辨扫描仪转换成数字图像,方能输入计算机进行图像处理。因此,用胶片拍摄图像效率低,应用于冷冻电镜结构解析受到限制。CCD 由于记录的是数字图像,提高了电镜图像的记录效率和结构解析效率。但由于 CCD 是将电子信号转换成光学信号,转换过程由于

点扩散效应(点扩散成圆),使得分辨率下降,而且由于电信号转换成光信号时发生信号损失,使得信号强度下降。此外,冷冻电镜为了降低电子辐射损伤,须用低剂量摄取图像,CCD 摄像需用较长时间(一般 1 秒)摄取一幅图像。由于样品漂移,导致图像模糊。因此,用 CCD 采集的图像信噪比低、分辨率低(低于用胶片纪录的图像)。

2004 年,英国 MRC-LMB 的 Richard Henderson 对冷冻电镜单颗粒技术做了理论分析,指出冷冻电镜单颗粒技术理论上完全可以将结构解析到原子分辨率,并指出了技术上需要克服的关键问题:第一是提高冷冻电镜图像的信噪比,第二是克服冷冻电镜图像在摄像时的漂移。Richard Henderson 的理论分析,为冷冻电镜的发展指明了方向^[3]。2013 年,美

国加州大学旧金山分校的旅美华人学者程亦凡和 David Agard 首次将直接电子探测器(direct detection detector, DDD)用于记录电镜图像。DDD 直接记录电子信号,降低了点扩散效应,由于无需电子——光学信号转换,保持了原始信号的强度。因此,用 DDD 记录的图像分辨率高、信噪比高、信号强,高于用 CCD 摄取的图像,甚至高于用胶片摄取的图像^[4](Fig. 4)。由于 DDD 记录图像的信号强、信噪比高,因而可用较短时间摄取图像,如 FEI 公司的 Falcon II DDD 相机 1 秒钟可摄取 24 帧图像,而 Gatan 公司的 K2 Summit DDD 相机 1 秒钟可摄取 48 帧图像,新一代 K3 DDD 相机更是高达每秒 1 500 帧图像。由于 DDD 摄取的电镜图像信号强、信噪比高、速率快,因此可对图像产生的漂移进行校正后叠加平均,消除由于样品漂移导致的图像模糊,大大提高了电镜图像的分辨率。一般解析结构至原子分辨率需要拍摄上千张图像,收集数十万甚至上百万个蛋白质分子的图像。这用电镜胶片很难实现,而 DDD 相机使之成为现实。在样品和电镜都处于最佳状态下,用一个样品载网连续收集几天数据,就有可能解出结构。应用 DDD 相机,程亦凡及其同事用单颗粒三维重构方法第一次解析了膜蛋白 TRPV1 冷冻电镜高分辨结构^[5](Fig. 5)。

2.3 图像处理和三维重构算法

2013 年以前,冷冻电镜图像处理和三维重构已有若干广泛使用的软件包,如 Joachim Frank 及其同事开发的 SPIDER, Marin van Heel 及其同事开发的 IMAGIC 和 Steve Ludtke 及其同事开发的 EMAN。根据电镜成像原理,电镜图像是物体在垂直于电子束方向的投影图像。在冷冻电镜单颗粒三维重构中,一般用纯化的生物大分子样品,因此假设电镜图像中看到的分子图像为同一分子一系列不同方向的投影。生物大分子在溶液中由于布朗运动具有随机取向,在冷冻固定时,分子被固定在随机取向,其电镜图像的傅立叶变换是分子傅立叶变换的不同取向的中心截面;如果分子的数量足够多(数以万计甚至百万),其电镜图像的傅立叶变换的集合可覆盖三维傅立叶空间,通过逆傅立叶变换即可重构出分子结构。在电镜图像处理中,最关键的步骤是对分子图像进行分类并确定其空间取向。在 SPIDER、IMAGIC 和 EMAN 中,通过分子的电镜图像与模型的不同方向投影进行相关性比较,以相关性最大的方向来确定分子取向,而分类则是通过主成分分析来确定。由于冷冻电镜图像的信噪比极低(一般信

噪比 < 0.1),电镜图像与模型的相关性远小于 1,因此分子取向的正确性存在误差;另外,由于分子存在动态构象变化,多种构象同时存在于样品之中,由于假设电镜图像中看到的分子图像为同一分子不同方向的投影,分类把分子不同构象处理成同一构象的不同取向,三维重构实际上是分子不同构象的混合物的平均结构。由于上述原因,冷冻电镜单颗粒三维重构一直没有达到近原子分辨率。

2013 年,英国 MRC-LMB 的 Sjors Scheres 及其同事将 RELION 软件应用于用 DDD 拍摄的生物大分子冷冻电镜图像,将核糖体三维结构重构至 4.3 Å,并同时解析了核糖体多状态的结构^[6](Fig. 6)。在 RELION 图像处理中,假设多种构象/复合体存在于样品之中,根据主成分分析和贝叶斯概率把分子分配到不同构象/复合体所属的大类中,在同一类构象/复合体的分子中再根据主成分分析和贝叶斯概率确定不同分子投影所属的小类中并确定取向。这样的图像处理方法将不同的分子构象/复合体分开,并大大提高了同一构象/复合体分子取向确定的精确性,使得三维重构的分辨率大大提高,达到了近原子分辨率。RELION 的图像处理方法不仅提高了三维重构的分辨率,更重要的是可以把分子不同构象/复合体分开。如果分子的数量足够多(数十万甚至上百万),分子不同构象/复合体的结构可同时重构到近原子分辨率。如果能结合功能信息,确定这些不同构象/复合体在生物大分子行使功能过程中的时间顺序,人们就可揭示生物大分子执行功能的结构变化,从而阐明生物大分子的工作机制。RELION 的图像处理方法,使结构生物学发生了革命性变化,从“静态结构生物学”变成了“动态结构生物学”,把结构和功能真正对应起来,因此获得了广泛应用。这一图像处理和三维重构算法的突破导致冷冻电镜三维重构的革命,这一突破性进展因此被《Nature》评为 2014 年的科学“十大进展”之一。

3 中国学者应用冷冻电镜取得的成就

随着中国经济的高速发展和综合国力的不断增强,中国政府加大了科技的投入。2005 年,在饶子和、贺福初等的建议下,国家决定加大在蛋白质科学研究的投入,建立国家蛋白质基础设施。2007 年,在贺福初和王志新主持的国家蛋白质基础设施(北京)的规划研讨中,隋森芳提议建立高端冷冻电镜研究平台获得共识,并布局冷冻电镜技术为国家蛋白质基础设施(北京)的发展重点。在隋森芳主持

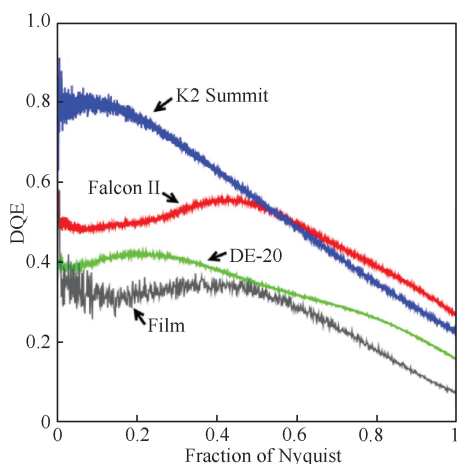


Fig. 4 The detective quantum efficiency (DQE) of direct detection detectors (DDD) Large DQE represents stronger detective electron signal for EM imaging. Figure from Ref. 4 by courtesy of Richard Henderson (MRC-LMB, Cambridge, UK) [4]

下,我参与了国家蛋白质基础设施(北京)冷冻电镜平台的规划,设计了冷冻电镜平台电镜的配置方案。我还协助规划了国家蛋白质基础设施(上海)冷冻电镜平台、中国科学院生物物理研究所生物成像中心冷冻电镜平台和北京大学、浙江大学、南方科技大学等大学的冷冻电镜平台。这些高端冷冻电镜平台的建立,为中国学者应用冷冻电镜研究重要蛋白质复合物的结构并取得一系列重要成果奠定了坚实的基础。由于篇幅所限,现对我国学者以冷冻电镜为主要技术取得的标志性成果及其科学/医学意义进

行简介,并将截止到2017年11月所取得的重要成果及其科学/医学意义总结于Table 1。对某一领域感兴趣的读者,建议阅读表中所列原始文献。

3.1 基因表达/调控相关复合物

3.1.1 剪接体 (spliceosome) 根据 Frances Crick 提出的分子生物学“中心法则”,储存在 DNA 中的遗传信息先要转录成 mRNA,再以 mRNA 为模版将遗传信息翻译成蛋白质,由蛋白质行使生物学功能。转录将 DNA 序列转变成 RNA 序列(前体 RNA)。由于 DNA 中含有编码蛋白质的序列(外显子, exon)和不编码蛋白质的序列(内含子, intron),因此在翻译之前,必须把不编码蛋白质的序列切除,并把编码蛋白质的序列拼接成成熟 mRNA,方能以成熟 mRNA 为模版翻译成蛋白质。这一过程由一个超级蛋白质酶复合体——剪接体来执行。由于缺乏这一过程的精细结构信息,因此,剪接体如何组装、如何识别并切除内含子,再把外显子拼接为成熟 mRNA 的工作机制,仍是分子生物学中心法则未解之谜。分子生物学中心法则中的转录和翻译工作机制都已破解。破解转录工作机制的科学家 Roger Kornberg 荣获2006年诺贝尔化学奖,揭示翻译工作机制的3位科学家 Venkatraman Ramakrishnan、Thomas Steitz 和 Ada Yonath 荣获2009年诺贝尔化学奖。剪接过程的工作机制是分子生物学中心法则工作机制的“缺失中间环节”,是生命科学的一个重大科学问题。2016年伊始,清华大学施一公团队以冷冻电镜为主要技术,解析了关键剪接过程所涉及的剪接体复合体的结

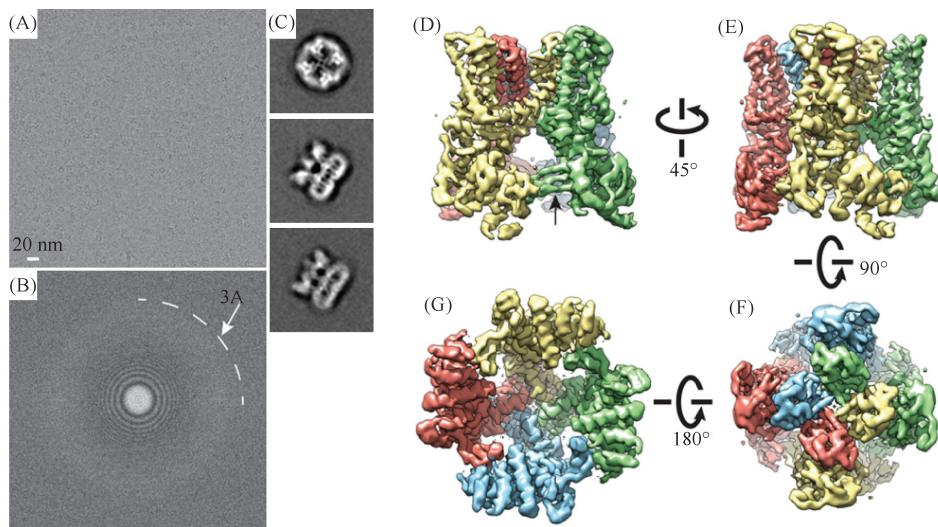


Fig. 5 The first near-atomic resolution structure (TRPV1) determined by single particle cryo-EM recorded by DDD (A) is an original photo; (B) is the power spectrum (Fourier transform) of image (A) after correction for image shift; (C) displays 3 typical projection views (2D averaged images) of TRPV1 with detailed structural information; (D-E) display the reconstructed density maps of TRPV1 in side (D and E), bottom (G) and top (F) views. The protein structural features (α -helices and β -sheets) are clearly identifiable. Figure from ref. 5 by courtesy of Yifan Cheng (UCSF, USA) [5]

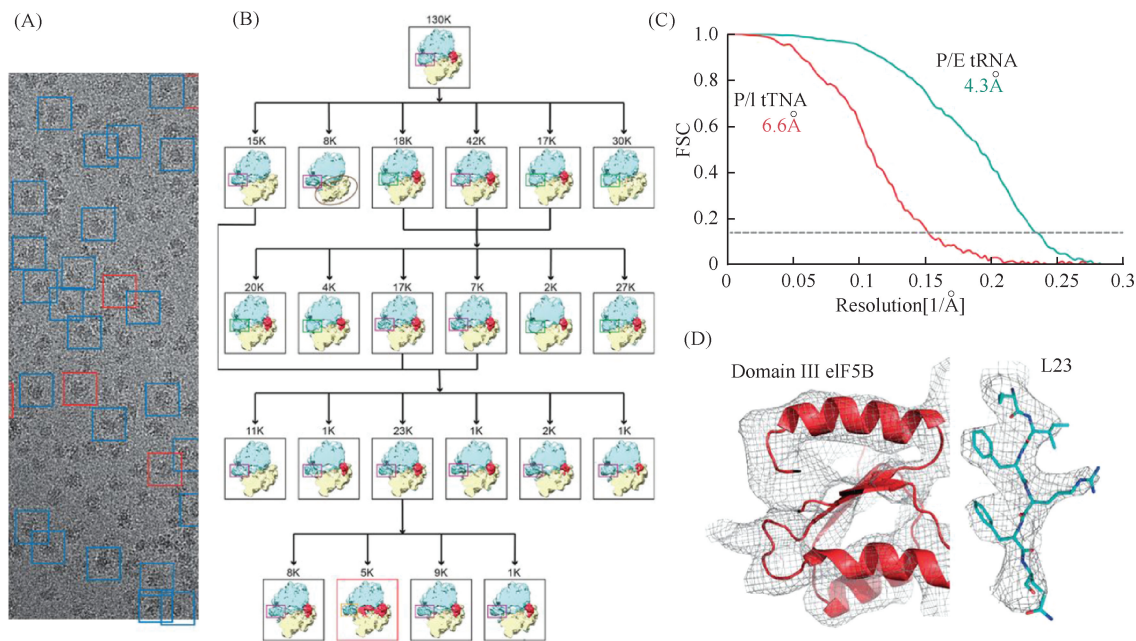


Fig. 6 The first near-atomic resolution structure (ribosome) determined by single particle cryo-EM by software RELION (A) is an original photo; (B) is the classification for different complexes/conformers existing in the original photos; (C) displays the resolution assessment by FSC 0.143 for two ribosome complexes (P/E tRNA and P/I tRNA complexes) with resolutions 4.3 Å and 6.6 Å, respectively; (D) display structural model (coloured ribbons/sticks) fitting into EM density maps (grey mesh). Figure from ref. 6 by courtesy of Sjors Scheres (MRC-LMB, Cambridge, UK) [6]

构,根据这些结构推导了剪接体识别并切除内含子,再把外显子拼接为成熟 mRNA 的工作机制。

3.1.2 30 nm 染色质(30 nm chromatin) 人体细胞中的基因组 DNA 长度加起来长达 2 米,而贮存基因的细胞核只有几个微米。仅有几微米的细胞核如何容纳长达 2 米的 DNA? 这一过程是通过 DNA 经 4 步多层次折叠成染色体来实现的。4 步折叠分别对应着染色质的四级结构:第一级结构是核小体,它是 DNA 双螺旋缠绕在组蛋白上而形成的;第二级结构是 30 nm 染色质,由核小体进一步螺旋化形成;第三级结构为超螺旋体,由 30 nm 染色质进一步螺旋化形成;第四级结构是染色体,由超螺旋体进一步折叠盘绕形成。由于缺乏精细结构信息,DNA 如何组装成 30 nm 染色质纤维,这一过程如何调控都是未解之谜,也是现代分子生物学领域面临的重大挑战之一。2014 年,中国科学院生物物理研究所朱平和李国红团队以冷冻电镜为主要技术,解析了体外组装的 30 nm 染色质纤维的结构。这个结构不仅揭示了 30 nm 染色质的折叠模式,更重要的是为理解表观遗传调控提供了结构基础。

3.2 蛋白质合成/降解相关复合物

核糖体(ribosome)是细胞合成蛋白质的“工厂”,是生物体生命活动的源泉。在真核细胞中,核

糖体由 60S 大亚基和 30S 小亚基组成。完整的核糖体行使以成熟 mRNA 为模版,将 DNA 的遗传信息翻译成蛋白质的功能。核糖体的装配和功能受多个辅助蛋白质的精密调控。由于缺乏精细的结构信息,核糖体如何装配,核糖体的装配和功能如何受辅助蛋白质的调控尚有众多未解之谜。2016 年,清华大学高宁团队及其合作者以冷冻电镜为主要技术,解析了酵母细胞核内的一系列组成上和结构上不同的核糖体 60S 亚基前体复合物的结构,确定了近 20 种装配因子在核糖体上的结合位置及其原子结构。该结构所含有的丰富的结构信息为详细分析真核核糖体装配过程中的多种装配因子的功能和分子机制提供了基础。

3.3 膜蛋白

膜蛋白(membrane proteins)是生物体最重要的蛋白质。多种生命活动,如神经兴奋、物质转运、信号转导、光合作用、能量转换都是由膜蛋白行使的。膜蛋白的三维结构是阐明膜蛋白工作机制的关键。相对于水溶性蛋白,膜蛋白难以结晶,因此,难以应用传统的 X-射线晶体学技术解析结构。冷冻电镜技术的突破,为解析膜蛋白三维结构提供了强有力的手段。从 2015 年开始,我国学者以冷冻电镜为主要技术,解析了一系列与神经兴奋、物质转运、信号

转导、光合作用、能量转换相关的膜蛋白三维结构,揭示了这些膜蛋白的工作机制。其中,标志性工作有清华大学施一公团队及其合作者解析的人 γ -secretase,清华大学颜宁团队及其合作者解析的钠通道 Na(v)1.4-beta 1 复合体,钙通道 Ca(v)1.1,钙释放通道 RyR1、RyR2,人脂质转运蛋白 ABCA1, Ebola 病毒感染相关的胆固醇转运蛋白;清华大学杨茂君团队及其合作者解析的人线粒体呼吸链超级复合物 I1III2IV1、I2III2IV2,哺乳类呼吸体 (respirasome),哺乳类机械敏感通道 Piezo1;中国科学院生物物理研究所章新政/柳振峰团队及其合作者解析的植物光合反应超级复合物 PSII-LHCII (C2S2M2),菠菜光系统 II-LHCII 超级复合物;清华大学李雪明团队及其合作者解析的真核环核苷酸门控通道;清华大学隋森芳团队解析的藻类捕光复合体藻胆体等。

3.4 病毒及相关蛋白复合体 (viruses and related protein complexes)

病毒是导致人类多种重大疾病,如流感、肝炎、脑炎、艾滋病的病原体。解析病毒的结构,不仅对阐明病毒如何感染细胞和如何在细胞中繁殖的工作机制至关重要,而且对基于结构的理性药物和疫苗设计提供指导。由于病毒比蛋白质大得多,在冷冻电镜下容易看到,因此是冷冻电镜研究的理想对象。2015 年以来,我国学者以冷冻电镜为主要技术,解析了一系列人类重大疾病相关病毒及相关蛋白复合体的三维结构,揭示了病毒如何感染细胞和如何在

细胞中繁殖的工作机制,对基于结构的理性药物和疫苗设计提供了理论指导。其中,标志性工作有中国科学院生物物理研究所/清华大学饶子和团队解析的日本脑膜炎病毒,甲肝病毒/中和性抗体复合体,人 Aichi 病毒;清华大学向烨团队解析的 Ebola 病毒表面蛋白-中和性抗体复合体,SARS-CoV 病毒表面糖蛋白;中国科学院微生物所高福团队解析的冠状病毒表面糖蛋白等。

4 展望

冷冻电镜在技术上突破导致结构生物学发生了革命,在解析以蛋白质“分子机器”为代表的生物大分子复杂体系的结构,进而阐明这些“分子机器”的功能和破解它们的工作机制方面取得了突破。中国越来越多的大学和研究所意识到了冷冻电镜的潜力,纷纷建立高端冷冻电镜平台。可以预期,中国在未来几年将会以冷冻电镜为主要技术,取得更多的重要成果。目前,我国学者取得的成果局限于体外分离纯化的蛋白质的分子机器。结构生物学的下一个发展方向将是“原位结构生物学”,即在细胞、组织原位研究蛋白质分子机器的结构和相互作用及其与生物学功能的关系,把结构与功能在细胞中统一起来。中国学者充分意识到冷冻电镜技术上的突破对于结构生物学的革命性意义,正在致力发展原位冷冻电镜技术^[66-76]。希望中国学者在原位冷冻电镜技术上取得突破,为原位结构生物学的革命做出原创性贡献。

Table 1 Important protein complex structures determined by Chinese scientists employing cryo-EM

Protein complexes	Biological/medical function	Biological/medical significance	Research group	References
Gene expression/regulation complexes				
Spliceosome	Splice introns out of pre-mRNA and joint the exons into mature mRNA	Illuminate the working mechanism of spliceosome; reveal the complete working mechanism of central dogma	Yigong Shi	[7-14]
30 nm chromatin	Higher order structure of chromatin; epigenetic regulation	Reveal the folding mode of 30 nm chromatin; illuminate the mechanism of epigenetic regulation	Ping Zhu/ Guohong Li	[15]
Acetylation enzyme of nucleosome NuA4	Epigenetic regulation	Reveal the mechanism of histone recognition	Ping Zhu/ Zhucheng Chen	[16]
chromatin remodeller Snf2	Regulation of gene expression	Reveal the mechanisms of DNA recognition and chromatin remodelling	Xueming Li/ Zhucheng Chen	[17]
Transcription mediator	Transcription regulation	Reveal the assembly mode of transcription mediator	Gang Cai	[18]

Continued Table 1

Protein complexes	Biological/medical function	Biological/medical significance	Research group	References
MCM helicase	Replication regulation	Reveal the assembly mode of MCM helicase	Ning Gao	[19]
Influenza RNA polymerase	Gene replication/transcription	Illuminate the mechanism of replication of influenza gene	Yingfang Liu/Hongwei Wang	[20]
DNA recombinase RAD51	gene homologous recombination	Illuminate the mechanism of DNA homology search and strand-exchange	Hongwei Wang	[21]
Bacterial group II intron	gene splicing and retrotranscription	Illuminate the mechanisms of splicing and retrotranscription	Hongwei Wang	[22]
DNA-dependent protein kinase	DNA repair	Illuminate the mechanisms of DNA recognition and protection	Yanhui Xu	[23]
RNA exosome complex	RNA processing	Illuminate the mechanism of RNA-induced exosome activation	Hongwei Wang	[24]
Protein synthesis/degradation complexes				
Ribosome	Protein synthesis	Illuminate the mechanisms of protein synthesis and regulation	Ning Gao	[25-29]
Proteasome regulatory particle	Protein degradation	Illuminate the regulation mechanism of proteasome assembly	Youdong Mao	[30]
Protease HtrA	Protein degradation	Illuminate the mechanism of protein degradation	Senfang Sui	[31]
Membrane proteins				
Human γ -secretase	Alzheimer disease	Reveal the enzyme action mechanism; guide drug design	Yigong Shi	[32-34]
Sodium channel Na(v)1.4-beta 1	Neural excitation	Illuminate the mechanisms of channel gating and ion selectivity	Ning Yan	[35,36]
Calcium channel Ca(v)1.1	Calcium signaling; Muscle cell excitation	Illuminate the mechanisms of channel gating and ion selectivity	Ning Yan	[37,38]
Calcium release Channel RyR	Calcium signaling; Muscle cell excitation	Illuminate the mechanisms of channel gating, regulation, and ion selectivity	Ning Yan Changcheng Yin/Fei Sun	[39-41] [42]
Human Lipid Exporter ABCA1	Lipid transport	Illuminate the mechanisms of lipid banding and transport	Ning Yan	[43]
Ebola virus receptor	Cholesterol transport; Eblola virus infection	Illuminate the mechanisms of cholesterol trafficking and Ebola virus infection; guide drug design	Ning Yan/George F Gao	[44]
Mammalian respiratory supercomplex I1III2IV1	Energy conversion	Illuminate the mechanisms of electron transfer and energy conversion	Maojun Yang	[45]
Human respiratory Megacomplex I2III2IV2	Energy conversion	Illuminate the mechanisms of electron transfer and energy conversion	Maojun Yang	[46]
Mammalian respirasome	Energy conversion	Reveal the assembly mode of mammalian respirasome	Maojun Yang	[47]
Mammalian mechano-Sensitive Piezo1 channel	Mechanical force sensing	Illuminate the mechanisms of mechanical force sensing and channel gating	Maojun Yang/Bailong Xiao/Ning Gao	[48]

Continued Table 1

Protein complexes	Biological/medical function	Biological/medical significance	Research group	References
Eukaryotic cyclic-nucleotide-gated channel	Vission and olfaction	Illuminate the mechanisms of channel gating and ion selectivity	Xueming Li/ Jan Yang	[49]
Bacterial type II secretion channel GspD	Substance transport	Illuminate the mechanisms of channel gating and substance transport	Xueming Li/ Yongqun Zhu	[50]
Photosystem II-LHCII supercomplex	Photosynthesis	Illuminate the mechanism of energy transfer	Zhenfeng Liu/ Xinzheng Zhang	[51]
Plant C2S2M2-type PSII-LHCII supercomplex	Photosynthesis	Illuminate the mechanisms of light harvesting and energy Transfer	Xinzheng Zhang/ Zhenfeng Liu/ Mei Li	[52]
Light-harvesting super-complex phycobilisome	Photosynthesis	Illuminate the mechanisms of complex assembly and energy transfer	Senfang Sui	[53]
Membrane remodelling complex Vps4	Membrane remodelling	Illuminate the disassembly mechanism of endosomal sorting complex	Senfang Sui	[54]
SNAP-SNARE complex	Membrane fusion	Illuminate the disassembly mechanism of SNARE	Senfang Sui/ Hongwei Wang	[55]
Immunity related complexes				
Inflammasome NLRC4	Innate immunity	Illuminate the assembly mechanism of NLRC4	Senfang Sui/ Jijie Chai	[56]
Inflammasome complex NAIP-NLRC4	Innate immunity	reveal the mechanism of signal amplification in inflammasomes	Youdong Mao	[57]
Viruses and related complexes				
Japanese encephalitis Virus	Cause encephalitis	Identify structural elements that modulate stability and virulence; guide drug design	Zihe Rao/ David Stuart	[58]
Hepatitis A virus-antibody complex	Cause hepatitis	Reveal the mechanism of neutralization; guide vaccine/drug design	Zihe Rao/ David Stuart	[59]
Human Aichi virus	Cause gastroenteritis in children	Reveal receptor binding site; guide drug design	Zihe Rao/ David Stuart	[60]
Ljungan virus	Cause diabetes and myocarditis	Illuminate the mechanism of virus genome encapsidation	Zihe Rao/ David Stuart	[61]
Spike glycoproteins of coronaviruses	Virus infection	Illuminate the mechanism of receptor binding; guide vaccine/drug design	George F Gao/ Xinzheng Zhang/ Yi Shi	[63]
Spike glycoprotein of SARS-CoV virus	Virus infection	Illuminate the mechanism of receptor binding; guide vaccine/drug design	Ye Xiang/ Xinquan Wang	
Ebola virus glycoprotein -antibody complex	Virus infection	Reveal the mechanism of neutralization; guide vaccine design	Ye Xiang	
dsRNA viruse	Architecture of dsRNA viruse	Illuminate the mechanisms of the replication and transcription in dsRNA viruses	Hongrong Liu/ Lingpeng Cheng	[65]

致谢 北京大学医学部生物物理学系张雷博士协助制作 Fig. 2, Drs. Richard Henderson, Sjors Scheres (MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK) 和程亦凡博士 (UCSF, USA) 提供了原始图片, 特此致谢。

参考文献 (References)

- [1] 尹长城. 君欲善其事, 必先利其器! ——2017 年诺贝尔化学奖评介[J]. 中国生物化学与分子生物学报 (Yin C C. Right tool for the right job! —A survey review on 2017 Nobel Prize in chemistry[J]. Chin J Biochem Mol Biol), 2017, **33**(10):979-984
- [2] De Rosier DJ, Klug A. Reconstruction of three dimensional structures from electron micrographs [J]. Nature, 1968, **217** (5124):130-134
- [3] Henderson R. Realizing the potential of electron cryo-microscopy [J]. Q Rev Biophys, 2004, **37**(1):3-13
- [4] McMullan G, Faruqi AR, Clare D, et al. Comparison of optimal performance at 300keV of three direct electron detectors for use in low dose electron microscopy[J]. Ultramicroscopy, 2014, **147**:156-163
- [5] 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
- [6] Fernández IS, Bai XC, Hussain T, et al. Molecular architecture of a eukaryotic translational initiation complex [J]. Science, 2013, **342**(6160):1240585
- [7] Yan C, Hang J, Wan R, et al. Structure of a yeast spliceosome at 3.6-angstrom resolution [J]. Science, 2015, **349**(6253):1182-1191
- [8] Wan R, Yan C, Bai R, et al. The 3.8 Å structure of the U4/U6.U5 tri-snRNP: Insights into spliceosome assembly and catalysis[J]. Science, 2016, **351**(6272):466-475
- [9] Yan C, Wan R, Bai R, et al. Structure of a yeast activated spliceosome at 3.5 Å resolution [J]. Science, 2016, **353**(6302):904-911
- [10] Wan R, Yan C, Bai R, et al. Structure of a yeast catalytic step I spliceosome at 3.4 Å resolution [J]. Science, 2016, **353**(6302):895-904
- [11] Yan C, Wan R, Bai R, et al. Structure of a yeast step II catalytically activated spliceosome [J]. Science, 2017, **355**(6321):149-155
- [12] Zhang X, Yan C, Hang J, et al. An Atomic Structure of the Human Spliceosome[J]. Cell, 2017, **169**(5):918-929. e14
- [13] Wan R, Yan C, Bai R, et al. Structure of an Intron Lariat Spliceosome from *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Cell, 2017, **171**(1):120-132. e12
- [14] Bai R, Yan C, Wan R, et al. Structure of the Post-catalytic Spliceosome from *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Cell, 2017. pii: S0092-8674(17)31264-3
- [15] Song F, Chen P, Sun D, et al. Cryo-EM study of the chromatin fiber reveals a double helix twisted by tetranucleosomal units[J]. Science, 2014, **344**(6182):376-380
- [16] Xu P, Li C, Chen Z, et al. The NuA4 Core Complex Acetylates Nucleosomal Histone H4 through a Double Recognition Mechanism[J]. Mol Cell, 2016, **63**(6):965-975
- [17] Liu X, Li M, Xia X, et al. Mechanism of chromatin remodelling revealed by the Snf2-nucleosome structure [J]. Nature, 2017, **544**(7651):440-445
- [18] Wang X, Sun Q, Ding Z, et al. Redefining the modular organization of the core Mediator complex[J]. Cell Res, 2014, **24**(7):796-808
- [19] Li N, Zhai Y, Zhang Y, et al. Structure of the eukaryotic MCM complex at 3.8 Å [J]. Nature, 2015, **524**(7564):186-191
- [20] Chang S, Sun D, Liang H, et al. Cryo-EM structure of influenza virus RNA polymerase complex at 4.3 Å resolution [J]. Mol Cell, 2015, **57**(5):925-935
- [21] Xu J, Zhao L, Xu Y, et al. Cryo-EM structures of human RAD51 recombinase filaments during catalysis of DNA-strand exchange[J]. Nat Struct Mol Biol, 2017, **24**(1):40-46
- [22] Qu G, Kaushal PS, Wang J, et al. Structure of a group II intron in complex with its reverse transcriptase [J]. Nat Struct Mol Biol, 2016, **23**(6):549-557
- [23] Yin X, Liu M, Tian Y, et al. Cryo-EM structure of human DNA-PK holoenzyme[J]. Cell Res, 2017, **27**(11):1341-1350
- [24] Liu JJ, Niu CY, Wu Y, et al. CryoEM structure of yeast cytoplasmic exosome complex[J]. Cell Res, 2016, **26**(7):822-837
- [25] Feng B, Mandava CS, Guo Q, et al. Structural and functional insights into the mode of action of a universally conserved Obg GTPase[J]. PLoS Biol, 2014, **12**(5):e1001866
- [26] Wu S, Tutuncuoglu B, Yan K, et al. Diverse roles of assembly factors revealed by structures of late nuclear pre-60S ribosomes [J]. Nature, 2016, **534**(7605):133-137
- [27] Ma C, Kurita D, Li N, et al. Mechanistic insights into the alternative translation termination by ArfA and RF2[J]. Nature, 2017, **541**(7638):550-553
- [28] Ma C, Wu S, Li N, et al. Structural snapshot of cytoplasmic pre-60S ribosomal particles bound by Nmd3, Lsg1, Tif6 and Reh1 [J]. Nat Struct Mol Biol, 2017, **24**(3):214-220
- [29] Li Z, Guo Q, Zheng L, et al. Cryo-EM structures of the 80S ribosomes from human parasites *Trichomonas vaginalis* and *Toxoplasma gondii* [J]. Cell Res, 2017, **27**(10):1275-1288
- [30] Lu Y, Wu J, Dong Y, et al. Conformational Landscape of the p28-Bound Human Proteasome Regulatory Particle [J]. Mol Cell, 2017, **67**(2):322-333. e6
- [31] Zhang L, Wang X, Fan F, et al. Cryo-EM structure of Nma111p, a unique HtrA protease composed of two protease domains and four PDZ domains [J]. Cell Res, 2017, **27**(4):582-585
- [32] Lu P, Bai XC, Ma D, et al. Three-dimensional structure of human γ -secretase [J]. Nature, 2014, **512**(7513):166-170
- [33] Sun L, Zhao L, Yang G, et al. Structural basis of human γ -secretase assembly [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, **112**(19):6003-6008
- [34] Bai XC, Yan C, Yang G, et al. An atomic structure of human γ -secretase [J]. Nature, 2015, **525**(7568):212-217
- [35] Shen H, Zhou Q, Pan X, et al. Structure of a eukaryotic voltage-gated sodium channel at near-atomic resolution [J]. Science, 2017, **355**(6328). pii: eaal4326
- [36] Yan Z, Zhou Q, Wang L, et al. Structure of the Na_v1.4- β 1 Complex from Electric Eel [J]. Cell, 2017, **170**(3):470-482. e11
- [37] Wu J, Yan Z, Li Z, et al. Structure of the voltage-gated calcium channel Cav1.1 complex [J]. Science, 2015, **350**(6267):aad2395
- [38] Wu J, Yan Z, Li Z, et al. Structure of the voltage-gated calcium channel Ca(v)1.1 at 3.6 Å resolution [J]. Nature, 2016, **537**(7619):191-196
- [39] Yan Z, Bai X, Yan C, et al. Structure of the rabbit ryanodine receptor RyR1 at near-atomic resolution [J]. Nature, 2015, **517**(7532):50-55
- [40] Peng W, Shen H, Wu J, et al. Structural basis for the gating mechanism of the type 2 ryanodine receptor RyR2 [J]. Science, 2016, **354**(6310). pii: aah5324
- [41] Bai XC, Yan Z, Wu J, et al. The Central domain of RyR1 is the transducer for long-range allosteric gating of channel opening [J]. Cell Res, 2016, **26**(9):995-1006
- [42] Wei R, Wang X, Zhang Y, et al. Structural insights into Ca(2+) -activated long-range allosteric channel gating of RyR1 [J]. Cell Res, 2016, **26**(9):977-994
- [43] Qian H, Zhao X, Cao P, et al. Structure of the Human Lipid Exporter ABCA1 [J]. Cell, 2017, **169**(7):1228-1239. e10
- [44] Gong X, Qian H, Zhou X, et al. Structural Insights into the

- Niemann-Pick C1 (NPC1)-Mediated Cholesterol Transfer and Ebola Infection[J]. *Cell*, 2016, **165**(6):1467-1478
- [45] Wu M, Gu J, Guo R, *et al.* Structure of Mammalian Respiratory Supercomplex I₁III₂IV₁ [J]. *Cell*, 2016, **167**(6):1598-1609. e10
- [46] Guo R, Zong S, Wu M, *et al.* Architecture of Human Mitochondrial Respiratory Megacomplex I₂III₂IV₂ [J]. *Cell*, 2017, **170**(6):1247-1257. e12
- [47] Gu J, Wu M, Guo R, *et al.* The architecture of the mammalian respirasome[J]. *Nature*, 2016, **537** (7622):639-643
- [48] Ge J, Li W, Zhao Q, *et al.* Architecture of the mammalian mechanosensitive Piezo1 channel [J]. *Nature*, 2015, **527** (7576):64-69
- [49] Li M, Zhou X, Wang S, *et al.* Structure of a eukaryotic cyclic-nucleotide-gated channel[J]. *Nature*, 2017, **542**(7639):60-65
- [50] Yan Z, Yin M, Xu D, *et al.* Structural insights into the secretin translocation channel in the type II secretion system [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2017, **24**(2):177-183
- [51] Wei X, Su X, Cao P, *et al.* Structure of spinach photosystem II-LHCII supercomplex at 3.2 Å resolution[J]. *Nature*, 2016, **534** (7605):69-74
- [52] Su X, Ma J, Wei X, *et al.* Structure and assembly mechanism of plant C₂S₂M₂-type PSII-LHCII supercomplex [J]. *Science*, 2017, **357**(6353):815-820
- [53] Zhang J, Ma J, Liu D, *et al.* Structure of phycobilisome from the red alga *Griffithsia pacifica*[J]. *Nature*, 2017, **551**(7678):57-63
- [54] Sun S, Li L, Yang F, *et al.* Cryo-EM structures of the ATP-bound Vps4_{E233Q} hexamer and its complex with Vtal at near-atomic resolution[J]. *Nat Commun*, 2017, **8**:16064
- [55] Zhou Q, Huang X, Sun S, *et al.* Cryo-EM structure of SNAP-SNARE assembly in 20S particle[J]. *Cell Res*, 2015, **25**(5):551-560
- [56] Hu Z, Zhou Q, Zhang C, *et al.* Structural and biochemical basis for induced self-propagation of NLRC4[J]. *Science*, 2015, **350** (6259):399-404
- [57] Zhang L, Chen S, Ruan J, *et al.* Cryo-EM structure of the activated NAIP2-NLRC4 inflammasome reveals nucleated polymerization[J]. *Science*, 2015, **350**(6259):404-409
- [58] Wang X, Li SH, Zhu L, *et al.* Near-atomic structure of Japanese encephalitis virus reveals critical determinants of virulence and stability[J]. *Nat Commun*, 2017, **8**(1):14
- [59] Wang X, Zhu L, Dang M, *et al.* Potent neutralization of hepatitis A virus reveals a receptor mimic mechanism and the receptor recognition site[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, **114**(4):770-775
- [60] Zhu L, Wang X, Ren J, *et al.* Structure of human Aichi virus and implications for receptor binding[J]. *Nat Microbiol*, 2016, **1**(11):16150
- [61] Zhu L, Wang X, Ren J, *et al.* Structure of Ijungan virus provides insight into genome packaging of this picornavirus[J]. *Nat Commun*, 2015, **6**:8316
- [62] Yuan Y, Cao D, Zhang Y, *et al.* Cryo-EM structures of MERS-CoV and SARS-CoV spike glycoproteins reveal the dynamic receptor binding domains[J]. *Nat Commun*, 2017, **8**:15092
- [63] Gui M, Song W, Zhou H, *et al.* Cryo-electron microscopy structures of the SARS-CoV spike glycoprotein reveal a prerequisite conformational state for receptor binding[J]. *Cell Res*, 2017, **27**(1):119-129
- [64] Misasi J, Gilman MS, Kanekiyo M, *et al.* Structural and molecular basis for Ebola virus neutralization by protective human antibodies[J]. *Science*, 2016, **351**(6279):1343-1346
- [65] Liu H, Cheng L. Cryo-EM shows the polymerase structures and a nonspooled genome within a dsRNA virus[J]. *Science*, 2015, **349**(6254):1347-1350
- [66] Wei DY, Yin CC. An optimized locally adaptive non-local means denoising filter for cryo- electron microscopy data [J]. *J Struct Biol*, 2010, **172**(3):211-218
- [67] Han R, Zhang F, Wan X, *et al.* A marker-free automatic alignment method based on scale-invariant features[J]. *J Struct Biol*, 2014, **186**(1):167-180
- [68] Han R, Wang L, Liu Z, *et al.* A novel fully automatic scheme for fiducial marker-based alignment in electron tomography[J]. *J Struct Biol*, 2015, **192**(3):403-417
- [69] Liu B, Xue Y, Zhao W, *et al.* Three-dimensional super-resolution protein localization correlated with vitrified cellular context[J]. *Sci Rep*, 2015, **5**:13017
- [70] Deng Y, Chen Y, Zhang Y, *et al.* ICON: 3D reconstruction with ‘missing-information’ restoration in biological electron tomography[J]. *J Struct Biol*, 2016, **195**(1):100-112
- [71] Chen Y, Zhang Y, Zhang K, *et al.* FIRT: Filtered iterative reconstruction technique with information restoration[J]. *J Struct Biol*, 2016, **195**(1):49-61
- [72] Zhang J, Ji G, Huang X, *et al.* An improved cryo-FIB method for fabrication of frozen hydrated lamella [J]. *J Struct Biol*, 2016, **194**(2):218-223
- [73] Han R, Wan X, Wang Z, *et al.* AuTom: A novel automatic platform for electron tomography reconstruction [J]. *J Struct Biol*, 2017, **199**(3):196-208
- [74] Chen Y, Wang Z, Zhang J, *et al.* Accelerating electron tomography reconstruction algorithm ICON with GPU [J]. *Biophys Rep*, 2017, **3**(1):36-42
- [75] Li S, 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]. *J Struct Biol*, 2017, pii: S1047-8477(17)30181-30188
- [76] Fan X, Zhao L, 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. e3

尹长城教授简介

尹长城 英国剑桥 MRC 分子生物学实验室博士,北京大学医学部教授,博士生导师。《中国生物化学与分子生物学报》编委,中国生物物理学会冷冻电镜分会副理事长,中国电镜学会低温电镜专业委员会主任。曾任北京大学医学部基础医学院生物物理学系主任;北京大学医药卫生分析中心电镜分析室主任;中国生物物理学会理事;中国晶体学会理事;中国电镜学会常务理事。长期从事生物大分子结构与功能研究,研究重点集中在应用冷冻电镜技术结合生物化学技术研究肌肉兴奋-收缩偶联的分子机制。