

背景简介:2012 年初,美国劳伦斯伯克利国家实验室(Lawrence Berkeley National Laboratory)头版头条的一则新闻(<http://newscenter.lbl.gov/feature-stories/2012/01/24/3d-protein/>)引起了世界范围的密切关注,相关的报道被 100 多家国际新闻媒体广泛转载和评论。该新闻报道了一篇最新发表在 PLoS ONE 上的论文。该论文提出了一种名为 IPET (Individual-Particle Electron Tomography) 的测定单个蛋白质大分子三维空间结构的方法。文中通过对单个抗体蛋白(IgG)以及单个高密度脂蛋白(HDL)分子的三维密度图的测定,证实了该方法的实用性,同时这也是迄今为止最高分辨率的单个蛋白质大分子的三维空间结构。近半个世纪以来,人们普遍认为“有结构意义的单个蛋白质分子的三维结构是不可能获得的”,而这一论文的发表打破了这种偏见。一些结构生物学家称该方法有望成为解决蛋白质结构测定的终极方法,可以实现结构生物学界长期追寻的测定单个大分子结构的梦想(“... provide a real breakthrough in the field as it would base structure determination on the imaging of a single molecule, a dream long pursued by structural biologists”)。可以预见,通过对单个蛋白质大分子的三维结构的测定,IPET 必将开启对蛋白质动态结构实验研究的大门。凭借此方法,在美国经济日渐萎靡而基金申请竞争日趋白热化的今天,该课题小组以接近满分的成绩接连获得了两项美国国立卫生研究院(NIH)的 R01 的基金。同时,该方法吸引了数家世界顶尖的制药企业的主动联系、基金支持及合作研究,预示 IPET 方法的应用势必会对生物药物研发、设计起到极为积极的促进作用。

IPET 方法论文的两名作者是本文中的最后两位作者,即美国劳伦斯伯克利国家实验室研究员任罡博士(<http://foundry.lbl.gov/rengroup/index.html>)和张磊博士(任罡研究小组博士后)。任罡博士在兰州大学理论物理专业段一士教授的指导下取得硕士学位(1990—1993)后,于北京科技大学材料物理系及中国科学院北京电子显微镜实验室郭可信院士和彭练矛教授的共同指导下攻读博士学位(1993—1997)。1997 年赴美转攻蛋白膜水通道的博士后研究工作,曾作出优异成绩,测定了水通道膜蛋白的原子空间结构;该工作对 2003 年诺贝尔化学奖起到了一定的贡献(详见本刊 2004 年第 16 卷第 2 期 145—152 页)。张磊博士于西安交通大学物理系张胜利教授的指导下取得硕士学位(2003—2006)后,在任罡研究员和张胜利教授的共同指导下于美国加州大学旧金山医学院从事博士论文研究(2008—2010),并于 2010 年赴美国劳伦斯伯克利国家实验室的任罡研究小组,致力于 IPET 方法的开发和应用的博士后研究工作。

IPET:测定单个生物大分子三维空间结构的实验方法*

张 腾^{1,2†} 彭云辉^{1,2†} 童慧敏^{1,2} Matthew J Rames¹ 张 磊¹ 任 罡^{1**}

(1. The Molecular Foundry, Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, CA 94720, USA;

2. 西安交通大学理学院 西安 710049)

摘 要 蛋白质的动态特性和结构活性对于蛋白质功能的调控具有根本意义。传统的结构确定方法(包括 X 射线和电子显微镜单颗粒分析技术等)往往需要成千上万不同蛋白质分子的平均信号,因此难以确定蛋白质分子的动态结构。而电子显微断层成像技术是一种对单个生物个体结构从不同的观测角度照相、并计算来恢复该个体的三维结构密度图的方法。传统的冷冻电子断层成像重构方法采用整个大尺寸电镜图像进行重构计算,通常用来研究细菌、细胞切片等大尺寸生物个体在较低分辨率下的结构;由于分辨率的限制,不足以获得小尺寸的蛋白质分子的结构细节。最近,任罡研究小组提出一种单个生物颗粒的电子显微断层成像方法(individual-particle electron tomography, IPET)。该方法通过减小图像尺寸(直至所选区域只包含

收稿:2012 年 11 月,收修改稿:2012 年 12 月

* 美国能源部基础科学基金项目(No. DE-AC02-05CH11231)和美国国立卫生研究院(NIH)基金项目(No. R01HL115153, R01GM1044227)资助;This work was supported by the Office of Science, Office of Basic Energy Sciences of the United States Department of Energy (No. DE-AC02-05CH11231) and National Institutes of Health, NIH (No. R01HL115153, R01GM104427)

† These author contributed equally to this work

** Corresponding author e-mail: gren@lbl.gov

单个蛋白质分子)的策略,运用提出的 FETR (focused electron tomography reconstruction) 算法来提高单个大分子重构的分辨率。此方法不需要初始模型和大量分子的平均信号,同时能够容忍一定的测角误差。本文综述了 IPET/FETR 方法在确定单个分子结构过程中的具体步骤以及如何应用该方法来研究蛋白动态特性和结构变化特征。期望通过该综述和国内同行交流,分享最新的前沿研究,为赶超世界科技前沿的建设添砖加瓦。

关键词 蛋白质动态结构 单个蛋白质结构 单分子电子断层成像方法 FETR 算法

中图分类号: Q-33, Q6-33, Q71 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-281X(2013)05-0669-08

IPET: An Experimental Method to Determine the 3-Dimensional Structure of An Individual Macromolecule

Zhang Teng^{1,2†} Peng Yunhui^{1,2†} Tong Huimin^{1,2} Matthew J Rames¹ Zhang Lei¹ Ren Gang^{1* *}

(1. The Molecular Foundry, Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, CA 94720, USA;

2. School of Science, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China)

Abstract Dynamic personalities and structural heterogeneities of proteins are essential for understanding their proper functions. However, structure determination of dynamic/heterogeneous protein is limited by current technologies, such as X-ray crystallography and electron microscopy (EM) single particle analysis, both of which generally require averaging from thousands of different proteins based on an assumption that these thousand proteins are structurally identical. Electron tomography (ET) provides a tool for visualization of a unique biological object from a series of tilted viewing angles. Conventional reconstruction methods using whole micrographs provide tools for 3-dimensional (3D) reconstructions of a large biological object, such as bacteria, and sections of cell. However, for small and low-symmetry proteins, these methods have limited power in reconstruction resolution. Recently, Ren's group reported a so-called individual-particle electron tomography (IPET) method, in which, a "focused electron tomography reconstruction (FETR)" algorithm was proposed to improve the reconstruction resolution by decreasing the image size so that it only contains a single-instance protein. IPET method requires no pre-given initial model or average of multiple molecules, but also can tolerate certain levels of measuring tilt errors. In this review, we demonstrate the IPET/FETR method in detail to share this current progress with the researchers in China. We believed IPET is a new and robust approach to determine the structure of a single/individual molecule that is a basis for studying the dynamic character and structural heterogeneity of macromolecule via comparison and structural analyses of structures determined from different individual macromolecules.

Key words protein dynamics; an individual protein structure; individual-particle electron tomography (IPET); focused electron tomography reconstruction (FETR) algorithm

Contents

1 Introduction	real experimental data
2 IPET method and FETR algorithm	3.1 3D reconstruction of a human IgG antibody by negative-staining ET
2.1 Generating simulated cryoET data	3.2 3D reconstruction of a high-density lipoprotein by cryoET
2.2 Basic tools for image processing	4 Conclusion and outlook
2.3 Focused electron tomography reconstruction (FETR) algorithm	1 引言
3 Validation of focused ET reconstruction method by	蛋白质的动力学特性决定了它们的功能特征。

通过对蛋白质结构的研究,可以确定其多种功能的特性。通常来讲,蛋白质的高分辨(甚至原子分辨率)的三维结构是通过晶体学的方法获得的^[1,2];而所得到的晶体结构通常作为研究蛋白功能的结构蓝本。但是由于结晶过程的限制,人们往往只能获得蛋白质在高盐浓度和晶体约束状态下的单一结构,无法真正获得蛋白质动态结构特征以及功能转换过程。为了揭示此动态过程,近年来,逐渐发展并完善的分子动力学模拟技术(molecular dynamics simulations)得到了广泛应用。借助分子动力学模拟,通过对蛋白结构和相应能量变化的计算和分析,科研工作者得以研究生物大分子动态结构和功能之间的关系。然而,由于软硬件条件的限制,分子动力学模拟面临许多挑战,比如难以跨越较大的能量势垒从而完成较大的蛋白整体构象的变化,以及无法模拟由外部环境的微小变化而导致的构型的根本变化等^[1,2]。

电子显微镜是一种可以直接观察单个大分子物体的强有力的工具;将蛋白质物体瞬间冷冻在玻璃态冰中的冷冻电子显微镜技术又进一步提供了一种直接观测接近自然态的蛋白质的方法^[3]。由于冷冻电镜所得图像的衬度较低,现在冷冻电镜领域内广泛应用对成百上千的不同蛋白质图像进行平均的方法来增强图像衬度^[4,5]。但是,分类平均的方法受到了以下限制:(1)在溶液中,生物大分子结构是动态震动和扰动的;(2)分子的二维投影图像理论上不足以充分地确定其三维方向;(3)在分类平均运算过程中,人为的经验和判断对结果的影响很大。理论上讲,当物体存在结构动态性时,是无法有效进行二维分类平均计算的,从而无法进行三维结构重构。

对动态性生物大分子结构测定的根本方法应该建立在对每个单个大分子的结构测定的基础上,而不是通过对成百上千个不同颗粒的平均而获得单一结构。冷冻电子断层成像技术(cryo-electron tomography, cryoET)作为一种对同一观测对象从一系列不同的倾转角度进行透射成像的实验方法^[6,7],无疑就成为达到这一目的的首选技术。人类历史上第一个单个单体蛋白质的三维结构是1974年Walter Hoppe等获得的;这一成就标志着电子断层成像技术的开始^[8]。但是随之而来的,却是领域内的高度质疑和各种争论。究其缘由,是因为成像过程中,蛋白质分子承受的电子辐射剂量远远超过了Unwin和Henderson发现的辐射剂量的极限值^[8],使得Walter Hoppe等的研究结果被认为不具

说服力。尽管随后的几年中,Hoppe等几经努力,然而由于缺乏理论根据以及受限于当时的实验条件,导致其他后续实验结果匮乏,该方法的发展渐趋停滞,甚而使人们下了一个颇有偏见的结论:有效的单个大分子的三维结构是无法测定的。受此思想的禁锢,尽管电子显微镜仪器和计算机系统软硬件设备水平比几十年前有了长足的提高,迄今为止,电子断层重构技术还是主要在细胞、细菌以及其他超大生物分子等结构确定领域中应用,而且得到的三维密度图的分辨率仍然很难超过 30\AA ^[9],远远无法获得单个蛋白大分子的有效空间结构信息。最近,为了提高分辨率,部分科研工作者开始尝试使用三维分类平均方法,即对成百上千个大分子的三维密度图进行相似度比较和归类。这种方法可将重构结果的分辨率提高到 20\AA ^[10]。然而,该方法仍然要求不同大分子的结构必须一致,从而消除噪音,因此这种方法对非对称性和动态性蛋白结构的测定是几乎不可能的,也就无法研究蛋白的结构动态变化。至此,在经过了近30年的停滞,客观的需求和技术的进步又将电子断层成像技术的发展牢牢地指向确定单个大分子的结构这一方向;而提高重构结果的分辨率,就成为关键中的关键。

通过研究,任罡小组发现在传统的重构方法中,图像畸变和倾转角的测量误差是限制大尺度重构分辨率的主要因素^[11-13];传统的cryoET重构方法利用大尺寸(即全CCD尺寸)的显微图像进行重构,认为大尺寸图像(特别对衬度极弱的冷冻电镜图像)可以提供更多的信号,有利于寻找各倾转角度图像的中心;但这种大图像却限制了分辨率。任罡小组指出,正是大尺寸图像的畸变限制了确定倾转角度的精确性,从而直接导致重构结果的质量降低。对于同样的倾转角误差,在图像边缘引起的位移误差要远大于图像中心的位移误差,从而降低了偏离重构中心的大分子的重构质量。为了减小这一误差,减小重构图像的尺寸将是根本途径之一。但随着重构区域的减小,又会造成其他诸多困难,其中之一就是确定被重构的大分子在各倾转角度透射图上的中心位置,尤其是对图像信噪比极低的冷冻电镜图像。为了解决这些难题,任罡小组发展了IPET方法和FETR算法来进行三维重构。通过IPET/FETR,可以有效地限制这种由倾角误差引起的不良效果,较为精确地寻找大分子中心,从而大大提高了重构结果的分辨率^[14]。

由于该方法受到了较大范围的关注,接下来,我

们将用模拟 cryoET 图像^[15]对 IPET 方法和 FETR 算法进行简要描述(图 1)。之所以应用模拟数据,是因为其在验证算法的正确性时有着不可或缺的作用;来源于已知结构的模拟数据可以用来与算法的结果进行有效比对;可以避免实验中永远存在着的由实际实验条件带来的无法确定的因素,从而有利于分析算法的有效性;可以很方便地检测算法的进程等等。在模拟之外,为了进一步验证此三维重构方法对实际实验样品的有效性,任昱小组还对 4 组实验数据进行了重构,包括两组负染 IgG 抗体蛋白样品和两组冷冻高密度脂蛋白(high-density lipoprotein, HDL)^[15]。所有这 4 组三维重构结果都显示了丰富的结构细节,比如蛋白质的结构域。值得注意的是,此方法最吸引人的特点就是可以观察到每一个大分子的任何状态;不受制于特殊的样品制备工艺以及其他因素影响;通过观察同种大分子的不同结构形态,使得研究大分子的动态结构成为可能^[16-19]。

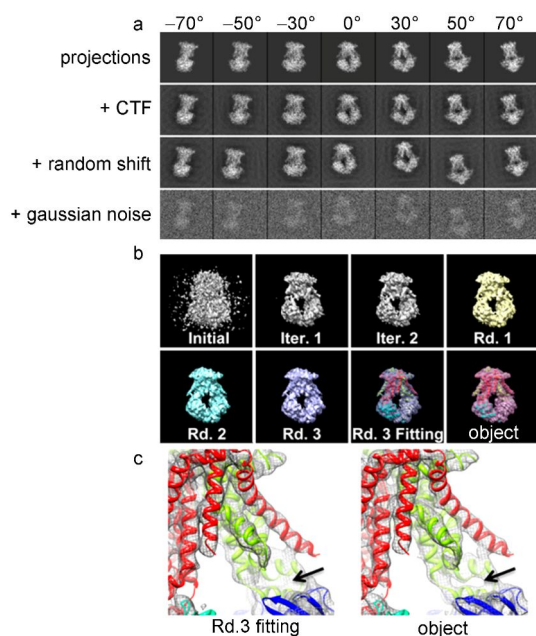


图 1 模拟 cryo-ET 图像和通过 IPET/FETR 实现的三维重构^[20]。(a)模拟 cryoET 图像的二维投影(第一行);模拟 CTF(第二行);模拟随机平移误差(第三行);模拟信噪比为 0.2 的 Gaussian 噪声(第四行)。(b)不同迭代次数后的三维重构图。(c)最终重构结构与模型之间的放大对比图

Fig. 1 Simulating cryo-ET images and 3D reconstruction by IPET/FETR^[20]

2 IPET 方法及 FETR 算法

2.1 生成模拟 cryoET 数据

在模拟中所选取的蛋白质是 *Archaeoglobus*

fulgidus (PDB entry 2ONK^[21]) 蛋白的一个片段 (A—D 链, 分子质量为 108 kDa)。该蛋白的三维密度图是通过 EMAN 软件^[4]中的“*pdb2mrc*”命令在分辨率为 2 Å 的 160 × 160 × 160 像素方格点阵中获得的(每一个像素对应 1 Å 的样品尺寸,大致相当于放大率为 100 k 倍的电子显微镜图像)。

模拟 cryoET 图像^[20]: cryoET 图像是通过摄取一系列处于不同倾转角的同一生物样品而获得的。模拟中所用的倾转角范围是 -70° — 70° , 步长为 1° ; 每个角度的图像加入了 $\pm 0.5^\circ$ 范围内的随机几何倾转误差。考虑到电子显微图像总是会受到衬度传递函数(contrast transfer function, CTF)的影响,在模拟中对每一个投影模拟图像卷积了欠焦为 $1.5 \mu\text{m}$ 的 CTF^[4,22]。

由于实验中蛋白颗粒的中心并不是完全与图像中心重合,为了模拟这种误差,各个倾转角度的图像被分别在 30 像素的范围内随机移动。考虑到整个图像的大小只有 160 像素,30 像素已经是相当大的平移量,足够模拟平移误差。

为了模拟 cryoET 图像中的噪声,模拟中采用了 Gaussian 型的噪声。尽管它在表达 cryoET 图像之中具有局限性,但考虑到使用 cryoET 数据来模拟只是为了更好地介绍三维重构方法,而且 Gaussian 噪声在单颗粒分析方法中经常被使用,所以在这里采用了 Gaussian 型白噪声^[4,22]。最后,所有图像中都引入信噪比约为 0.2 的 Gaussian 噪声,而这个水平的噪声相当于实验所测量的噪声^[4,5,22]。

最终的模拟 cryo-EM 图像包括了几何倾转误差 $\pm 0.5^\circ$, 在 30 像素之内的平移误差,信噪比为 0.2 的噪声;由于倾转角只能达到 $\pm 70^\circ$ 而带来的楔形缺失(missing wedge)以及欠焦 $1.5 \mu\text{m}$ CTF 带来的误差。尽管模拟图像有它自身的局限性,比如由于倾转造成的欠焦梯度分布、信噪比分布的不均匀,无法完全模拟真实的 CTF 以及噪声的影响,但是模拟图像在验证程序的正确性和分析重构图像和真实图像二者之间的差异过程中仍然有着不可或缺的作用。

2.2 图像处理的基本工具

IPET 方法和 FETR 算法包括迭代计算过程。每一步迭代都包含若干步图像处理过程(图 2),比如生成过滤器和掩模(mask)来减小噪声;在每一步迭代之前还需要重新计算参数以及计算三维重构图像的收敛性和误差。以下着重介绍其中几个要点。

(1) 傅里叶壳相关(Fourier shell correlation, FSC):为了定量地分析每一次迭代后的三维重构结

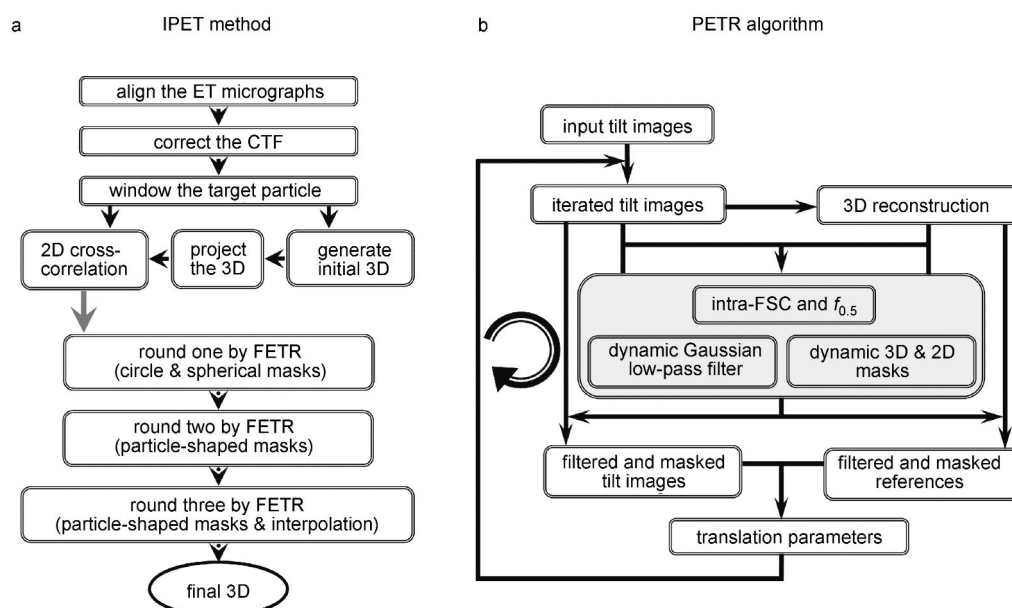


图 2 IPET 方法和 FETR 算法流程图

Fig. 2 Flow diagram of IPET method and FETR algorithm

果的收敛性和其与真实结构的偏离程度, FSC 方法^[23-25]被广泛地应用在单颗粒分析重构方法中^[4,5,26]。在 IPET/FETR 中, 任昱等根据倾转角图像编号的奇偶性将初始 ET 图像分为两组, 每一组都各自生成三维重构密度图, 然后计算两个重构结果在 Fourier 空间不同频率壳层的相关性。由于这里提到的 FSC 计算用到了同一物体位于不同角度的图像, 因而称之为 intra-FSC 方法, 以区别于一般的 FSC 方法。当 FSC 曲线相关系数的值下降到一半 (即 0.5) 时对应的频率称之为 $\text{intra-}f_{0.5}$, 它代表了迭代后的三维重构结果的分辨率^[4,5,27]。

(2) 动态 Gaussian 低通滤波器: 确定平移误差的策略是先采用低频率信息进行位置搜索, 然后逐步增加高频率信息进行更精确的搜索。为了控制每次迭代产生的大量信息, IPET/FETR 中自动生成不同的 Gaussian 低通滤波器来过滤不必要的结构细节 (图 2b)。滤波器按照各自的顺序作用于图像。两个重要的边界频率定义如下:

$$f_{\text{low}}(i) = \frac{2}{3} \times f_{0.5} + \frac{i}{20} \times \left(f_{\text{Nyquist}} - \frac{2}{3} \times f_{0.5} \right)$$

$$f_{\text{cut}}(i) = \frac{2}{3} \times f_{0.5} + \frac{i+2}{20} \times \left(f_{\text{Nyquist}} - \frac{2}{3} \times f_{0.5} \right)$$

这里 $i = 1, 2, \dots$, $\text{intra-}f_{0.5}$ 是前一次迭代完成之后计算出的频率。

值得注意的是, 这里采用的动态滤波器, 其边界频率是 $\text{intra-}f_{0.5}$ 的函数, 该频率可以反映出前一次

迭代后三维重构的图像质量。如果前一次迭代的收敛性很好, 动态滤波器在平移搜索中自动包含更多高频信息; 而如果前一次收敛性不好, 则会提高低分辨率所占的权重。总之, 动态滤波器通过调节参数可以实现对前一次迭代的修正。

(3) 圆形掩模: 掩模技术被广泛地应用在 X 射线晶体衍射学^[28]和单颗粒重构方法中^[4,29,30]。在重构过程的第一次迭代中, 带有 Gaussian 边界的圆形掩模可以用来减小噪声和去除多余的背景区域 (图 2)。这个 mask 是基于粗略的图像大小和目标形状而生成, 并应在保持目标物体区域密度的同时减小目标外区域的密度, 从而降低背景噪声。

(4) 动态颗粒形状掩模: 在迭代中还用到一个与大分子颗粒形状相似的三维掩模和其二维投影掩模来进一步消除不必要的背景噪声 (图 2a)。这个颗粒形状的掩模是基于低分辨率重构图像生成的, 因为这里的掩模是根据 Gaussian 低通滤波器的参数 (由前次迭代的 $\text{intra-}f_{0.5}$ 决定) 和前次迭代收敛性决定, 所以称之为动态掩模。

2.3 FETR 图像重构算法

2.3.1 图像畸变是传统 ET 技术在追求高分辨率时遇到的主要障碍

图像的变形限制了 cryoET 重构技术的分辨率^[31]。图像的畸变有多种原因, 包括散光^[11]、投影棱镜^[32]、枕形效应^[33,34]以及电子束的不平行等^[12,13,35]。这种畸变将会导致无法消除的轴和物体

倾斜角度的误差,从而限制了分辨率。

如前所述,传统的 cryoET 重构方法需要完整的显微图像,因为人们相信信号越多,对倾转角度和中心位置的确定就会更加精确。任罡小组则认为图像的畸变会限制倾转角度确定的精确性,而这种误差会直接降低重构图像中目标物体的重构质量。对于同样的倾转角误差,在图像中心引起的位移要小于图像边缘的位移,于是减小重构图像的尺寸将会提高三维重构图像的质量。比如,如果目标颗粒中心位于 $4k \times 4k$ 像素大小图像的边缘, 0.5° 的倾角误差会带来约 25 像素的误差 ($0.5^\circ \times \pi/180^\circ \times 4096/\sqrt{2}$) 这会对重构结果造成致命的影响。如果颗粒中心位于 256×256 像素大小的图像边缘,同样的 0.5° 的倾角误差只会带来小于 1.6 像素的误差 ($0.5^\circ \times \pi/180^\circ \times 256/\sqrt{2}$), 相比之下误差就小了很多。

2.3.2 FETR 重构算法概述

优化重构图像所基于的原理与传统的单颗粒重构方法相似。在传统单颗粒重构方法中,有 5 个参数需要确定,包括 3 个欧拉角 (φ, ψ, θ) 和 2 个平移参数 (Δx 和 Δy)^[4,5,26,36,37]。FETR 重构方法是通过减小图像尺寸以减弱由倾转角的误差导致的不良效果。FETR 中关键的一步就是准确地确定出每一幅图像中目标蛋白颗粒的中心平移参数 Δx 和 Δy (图 2)。迭代得出的图像通过对不同倾转角度反投影可以获得三维重构图。由三维重构结果生成的投影图像又可以作为参考图像进一步修正实验图像的中心平移。

整个 FETR 过程包括 3 个回合,即粗优化、细优化和过采样优化等三轮。每轮过程中又包括多个迭代过程(图 2)。

2.3.3 FETR 重构方法

第一轮粗优化过程中采用动态滤波器和圆/球形掩模,一共生成了 21 个动态 Gaussian 低通滤波器和 Gaussian 边界掩模。在第一次迭代中,先利用初始模型获得参考投影图,然后进行滤波(此时 $i = 0$) 和屏蔽,再通过计算其互相关(cross-correlation)来确定平移参数。然后将平移之后的三维重构图像按照前面所述的方法分为两组,计算其与真实图像的偏离值和第一次迭代的 $\text{intra-}f_{0.5}$ (图 3a), 进而可以用 $\text{intra-}f_{0.5}$ 来确定下一次迭代的参数。更深入的分析计算得出,第一次迭代的平均平移量是 14.45 像素,这说明第一次迭代明显地修正了目标中心位置。

第二次迭代方法与第一次基本相同,在这里采用的是第一次迭代后才生成的 $\text{intra-}f_{0.5} (i = 1)$, 而不是初始的 $\text{intra-}f_{0.5}$, 这一点有效地提高了分辨率。计算表明第二次迭代的三维重构具有更高的分辨率和明显减小的与真实图像的偏差(图 3b)。

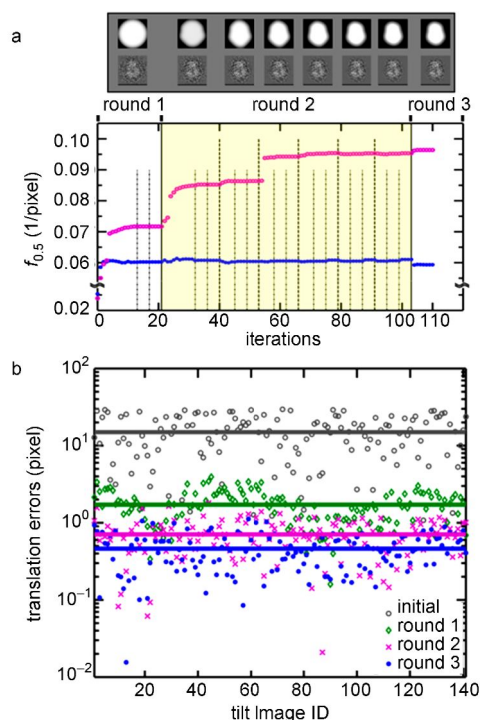


图 3 迭代的收敛性的监测^[20] (a) 两种不同的 $f_{0.5}$ 用来监测迭代的进程, 蓝点表示 $\text{intra-}f_{0.5}$, 紫圈表示传统的 $f_{0.5}$, 图像上方展示了迭代过程中使用的不同大小和形状的掩模, (b) 平移误差的分布

Fig. 3 Monitoring the convergence of the iterations^[20]

在计算过程中,以上迭代过程被不停重复,直至平均平移量小于 0.01 像素。模拟中,在 13 次迭代之后,平均平移量从 14.45 像素减小到小于 0.01 像素。之后动态滤波器自动改变其参数,迭代过程重新启动,此时 ($i = 2$) 采用更加精细的 Gaussian 低通滤波器。在第 17 次迭代结束之后,平均平移量再次达到判定条件(小于 0.01 像素)。虽然可以继续使用更加精细的动态滤波器,但由于在当前参数条件下过于精细的高分辨率信息对确定平移参数并没有太大贡献,在第一个粗优化回合中,基于算法的定义,共进行了 21 次迭代过程。

此时的三维重构已经展示出了清晰的结构细节,比如蛋白中心的孔状结构和 α -螺旋。Intra-FSC 分析也表明三维重构逐渐收敛并且准确地确定了平移参数。

第二个回合是更加精细的优化回合。其基本原理与第一回合一致,但这里是采用颗粒形状的掩模而不是第一回合中的圆/球形掩模。

在第二回合中,利用这样的颗粒形状掩模,重复在第一回合中描述的步骤,一共进行了 82 次迭代。分析计算表明平均平移量使用最大掩模时仅有 0.32 像素而使用最小掩模时仅仅 0.05 像素。尽管 intra-FSC 分析表示 $\text{intra-}f_{0.5}$ 没有明显改善,但图像的对比度已经有了明显提高^[20],三维重构图像比第一回合包含了更多的结构细节。

第三个回合是过采样优化过程。在前两个回合中,为了避免插值带来的误差,在采用平移参数之前都先将其舍入为整数。这种舍入限制了平移参数的准确性。在第三回合中确定的平移误差将不限于整数,而是采用过采样技术来更进一步的提高重构图像的质量(图 2)。任罡课题组利用三角插值法在每

个方向上将图像放大 10 倍,并将相应的二维掩模也通过插值放大(图 3a),然后进行迭代直至连续两次的平移量小于 0.001 像素,最终的三维重构图像显示出了更高的对比度和更多的结构细节,这说明了过采样技术的确进一步提高了重构的质量。

3 IPET 方法有效性的实际验证

3.1 在负染色(negative-staining)方法中应用 IPET 对人类 IgG 抗体的三维重构

为了证明 FETR 算法及 IPET 方法的有效性,任罡研究小组将这种方法应用到一系列抗体负染色图像中^[20,38-40]。由于抗体具有高度结构活性和非均匀性,这使得在目前技术条件下,运用其他方法很难获得单个抗体有效的高分辨率结构信息,然而结果表明,FETR 算法及 IPET 方法可以有效克服传统方法遇到的困难,获得高分辨率的重构图像(图 4a—c)。

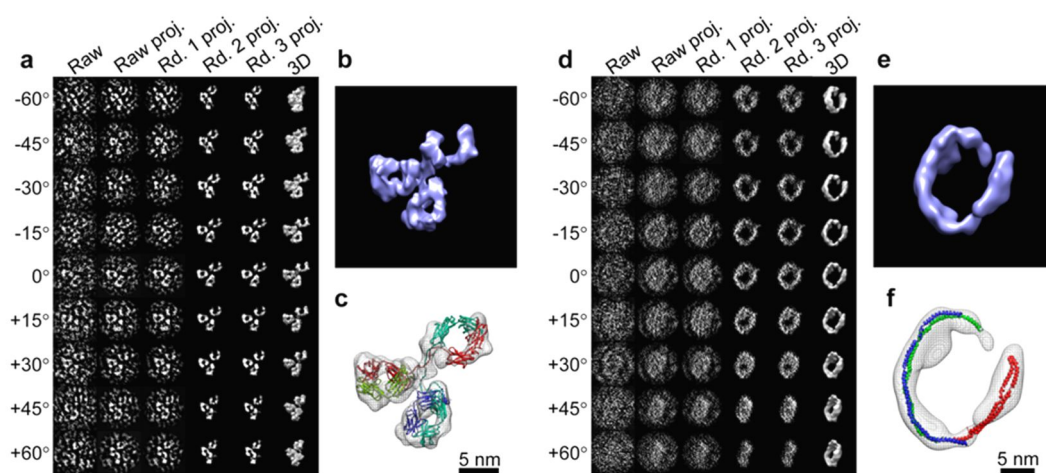


图 4 采用 IPET 和 FETR 算法的蛋白质颗粒三维重构^[20]。(a—c) 利用负染色方法的单颗粒 IgG 抗体蛋白三维重构。(d—f) 冷冻方法下的单颗粒 17 nm HDL 蛋白质三维重构。

Fig. 4 3 D reconstruction of proteins by IPET and FETR^[20]

以上对人类 IgG 抗体通过 IPET/FETR 得到的三维密度图包含了丰富的结构细节,包括整体的形状以及每个结构域中部的孔洞。Intra-FSC 分析显示重构图像的分辨率达到到了 15 Å,远远高于传统方法所能达到的分辨率。

3.2 在 cryoET 方法中应用 FETR 对高密度脂蛋白 HDL 的三维重构

为了证明 FETR 在高噪声 cryoET 数据条件下的有效性,任罡小组还应用 FETR 对 17 nm 高密度脂蛋白(HDL)进行了三维重构^[41,42]。17 nm HDL 是一种盘型蛋白,每个颗粒包含 2 到 3 个 apolipoprotein A-I 蛋白。在传统方法中,由于 HDL

的动态本质以及非均匀性,确定这种蛋白质的结构十分困难^[15,38]

任罡课题组应用 IPET 对嵌入玻璃态冰中的 17 nm HDL 颗粒进行了三维结构重构(图 4d—f)。通过 IPET 方法和 FETR 算法,最终投影图像上的噪声得到了迅速的降低,而蛋白质信号得到了快速的提升(图 4d—f)。应用 FETR 得到的两个颗粒的重构图像都显示了很多一致的结构特征,例如:盘状形态和环状结构中的高密度成分。

4 研究意义与展望

通过对生物电镜图像重构的传统方法和新型

IPET 方法的比较,我们发现:在传统方法中,由于应用大尺寸图像来决定几何倾转角度与平移参数,图像畸变产生的误差使得传统方法得到的图像分辨率很难超过 30 Å。然而,新型 IPET 方法可以有效地容忍倾角误差,减少图像畸变带来的影响,从而大大提高了重构图像的分辨率。在对模拟 cryoET 图像重构所得到的结果分辨率甚至高于 10 Å,并且在 100 幅高噪声图像下,IPET 方法依然可以获得高质量的图像^[3,43,44]。我们知道,在总辐射剂量为 5—20e⁻/Å²和溶剂对比因子为 0.28 的条件下,理论计算得到的电镜分辨率极限是 20 Å^[45]。然而,任罡课题组在实验中发现,cryoET 可以容忍的总辐射剂量可以达到 140 e⁻/Å²^[15],远远高于传统总辐射剂量极限,并且在电子散射的情况下溶剂对比因子也可以达到 0.42^[45],高于传统理论中应用的数值。因此,我们相信,理论计算得到的传统电镜分辨率极限并非不可突破,通过对 IPET 新型重构方法进一步的研究,在不久的将来,获得分辨率高于 20 Å 的冷冻电镜重构结构将成为现实。

参 考 文 献

- [1] Frauenfelder H, Chen G, Berendzen J, Femimore P W, Jansson H, McMahon B H, Stroe I R, Swenson J, Young R D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2009, 106: 5129—5134
- [2] Karplus M, Kuriyan J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2005, 102: 6679—6685
- [3] Ren G, Rudenko G, Ludtke S J, Deisenhofer J, Chiu W, Pownall H J. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2010, 107: 1059—1064
- [4] Ludtke S J, Baldwin P R, Chiu W. *J. Struct. Biol.*, 1999, 128: 82—97
- [5] Frank J, Radermacher M, Penczek P, Zhu J, Li Y, Ladjadj M, Leith A. *J. Struct. Biol.*, 1996, 116: 190—199
- [6] Milne J L, Subramaniam S. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2009, 7: 666—675
- [7] Koning R I, Koster A J. *Ann. Anat.*, 2009, 191: 427—445
- [8] Frank J. *Electron Tomography: Methods for Three-Dimensional Visualization of Structures in the Cell*. 2nd ed. NY: Springer, 2006. 17—216
- [9] Frey T G, Perkins G A, Ellisman M H. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 2006, 35: 199—224
- [10] Liu J, Bartesaghi A, Borgnia M J, Sapiro G, Subramaniam S. *Nature*, 2008, 455: 109—113
- [11] Fernando K V. *J. Struct. Biol.*, 2008, 164: 49—59
- [12] Schaffer B, Kothleitner G, Grogger W. *Ultramicroscopy*, 2006, 106: 1129—1138
- [13] Ren G, Zuo J M, Peng L M. *Micron*, 1997, 28: 459—467
- [14] Zhang L, Ren G. *Biophys. J.*, 2010, 98: 441a, 2278-Pos
- [15] Jones M K, Zhang L, Catta A, Li L, Oda M N, Ren G, Segrest J P. *J. Biol. Chem.*, 2010, 285: 41161—41171
- [16] Zhang L, Kaspar A, Woodnutt G, Ren G. *Biophys. J.*, 2010, 98: 440a—441a, 2276-Pos
- [17] Zhang L, Cavigliolo G, Wang J, Rye K A, Oda M, Ren G. *Biophys. J.*, 2010, 98: art. no. 440a
- [18] Zhang L, Ren G. *Biophys. J.*, 2010, 98: 441a, 2277-Pos
- [19] Ren G, Zhang L. *Biophys. J.*, 2012, 102: 394a, 2003-Pos
- [20] Zhang L, Ren G. *PLoS ONE*, 2012, 7: art. no. e30249
- [21] Hollenstein K, Frei D C, Locher K P. *Nature*, 2007, 446: 213—216
- [22] Leschziner A E, Nogales E. *J. Struct. Biol.*, 2006, 153: 284—299
- [23] Van Heel M, Stoffler-Meilicke M. *EMBO J.*, 1985, 4: 2389—2395
- [24] Unser M, Trus B L, Steven A C. *Ultramicroscopy*, 1987, 23: 39—51
- [25] Saxton W O, Baumeister W. *J. Microsc.*, 1982, 127: 127—138
- [26] Van Heel M, Harauz G, Orlova E V, Schmidt R, Schatz M. *J. Struct. Biol.*, 1996, 116: 17—24
- [27] Bottcher B, Wynne S A, Crowther R A. *Nature*, 1997, 386: 88—91
- [28] Xiang S, Carter C W Jr, Bricogne G, Gilmore C J. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, 1993, 49: 193—212
- [29] Jiang W, Li Z, Zhang Z, Baker M L, Prevelige P E Jr, Chiu W. *Nat. Struct. Biol.*, 2003, 10: 131—135
- [30] Jiang W, Baker M L, Jakana J, Weigele P R, King J, Chiu W. *Nature*, 2008, 451: 1130—1134
- [31] Cantele F, Zampighi L, Radermacher M, Zampighi G, Lanzavecchia S. *J. Struct. Biol.*, 2007, 158: 59—70
- [32] Hue F, Johnson C L, Lartigue-Korinek S, Wang G, Buseck P R, Hytch M J. *J. Electron. Microsc. (Tokyo)*, 2005, 54: 181—190
- [33] Stokroos I, Oosterbaan J A, Arends J. *J. Biol. Buccale*, 1983, 11: 339—345
- [34] Henderson R, Baldwin J M, Ceska T A, Zemlin F, Beckmann E, Downing K H. *J. Mol. Biol.*, 1990, 213: 899—929
- [35] Frank J, Wagenknecht T, McEwen B F, Marko M, Hsieh C E, Mannella C A. *J. Struct. Biol.*, 2002, 138: 85—91
- [36] Grigorieff N. *J. Struct. Biol.*, 2007, 157: 117—125
- [37] Hohn M, Tang G, Goodyear G, Baldwin P R, Huang Z, Penczek P A, Yang C, Glaeser R M, Adams P D, Ludtke S J. *J. Struct. Biol.*, 2007, 157: 47—55
- [38] Zhang L, Song J, Cavigliolo G, Ishida B Y, Zhang S, Kane J P, Weisgraber K H, Oda M N, Rye K A, Pownall H J, Ren G. *J. Lipid Res.*, 2011, 52: 175—184
- [39] Zhang L, Song J, Newhouse Y, Zhang S, Weisgraber K H, Ren G. *J. Lipid Res.*, 2010, 51: 1228—1236
- [40] Zhang L, Tong H, Garewal M, Ren G. *Biochim. Biophys. Acta*, 2012, 1830: 2150—2159
- [41] Cavigliolo G, Shao B, Geier E G, Ren G, Heinecke J W, Oda M N. *Biochemistry*, 2008, 47: 4770—4779
- [42] Chen B, Ren X, Neville T, Jerome W G, Hoyt D W, Sparks D, Ren G, Wang J. *Protein Sci.*, 2009, 18: 921—935
- [43] Ren G, Reddy V S, Cheng A, Melnyk P, Mitra A K. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2001, 98: 1398—1403
- [44] Ren G, Cheng A, Reddy V, Melnyk P, Mitra A K. *J. Mol. Biol.*, 2000, 301: 369—387
- [45] Rosenthal P B, Henderson R. *J. Mol. Biol.*, 2003, 333: 721—745