

生物大分子三维重构电镜技术

管汀鹭 程乃乾*

(中国科学院生物物理研究所电镜室)

近年来,电镜技术迅速发展.特别是电镜在生物学中的应用,目前已不仅停留在单纯直观的描述,而且已开展了由定性到定量,由平面到空间的立体研究.这对深入了解生物材料尤其是细胞成分的空间相对位置和生物大分子的空间结构及其与功能关系,都有十分重大的意义.与此同时,电镜技术正在逐渐与数学和物理学的有关领域结合起来,从而给生物科学工作者提供了很多定量的信息.其中,用傅里叶变换法(以下简称傅氏变换法)进行生物大分子三维重构的电镜技术就是一个相当突出的例子。

用普通透射式电镜在正常的工作电压(50—80千伏)下,样品厚度不宜超过0.1微米。因此,在观察组织、器官、大细胞时,需先制成超薄切片。在观察蛋白质分子、病毒时,不需切片,但在制片的干燥过程中,颗粒的细节也会彼此叠加,因此用电镜观察得到的结果实际上是一种平面的二维信息,它不能反映出物体结构中原有的内在的空间关系。如希望得到立体结构的信息,就要进行三维重构,即从二维信息中推导出三维信息。

目前,从电子显微照片进行三维重构的方法除了傅氏变换法外,还有连续切片法(包括图示法、连续切片电影照相术)、立体照相术,立体全息术、光学法以及代数重构、叠代技术等。本文只介绍傅氏变换三维重构法。

一、基本原理

任何一个物体,都可以看作是由无数个小点构成的,每一个小点可以用一个 δ 函数表示。一个小点的傅氏变换就是简单的平面波。一个用电镜观察的物体(如图1a)在空间的三维密

度的分布都可表示为 $f(x, y, z)$ 。根据三维傅氏变换:

$$F(f_x, f_y, f_z) = \iiint_{-\infty}^{\infty} f(x, y, z) \exp[2\pi i(f_x \cdot x + f_y \cdot y + f_z \cdot z)] dx dy dz$$

即任意一个空间函数 $f(x, y, z)$ 都可表示为无穷多个不同的空间频率为 f_x, f_y, f_z 的周期函数 $\exp[2\pi i(f_x \cdot x + f_y \cdot y + f_z \cdot z)]$ 的线性叠加(其中 f_x, f_y, f_z 分别为 x, y, z 方向上的空间频率)。 $F(f_x, f_y, f_z)$ 则称为函数 $f(x, y, z)$ 的频谱。我们习惯地称 $F(f_x, f_y, f_z)$ 为 $f(x, y, z)$ 的傅里叶变换。

当 $f(x, y, z)$ 为已知量时,它的空间频谱 $F(f_x, f_y, f_z)$ 可以由傅里叶积分求得。反之,如果已知空间频谱 $F(f_x, f_y, f_z)$,则可通过下式求得函数 $f(x, y, z)$:

$$\begin{aligned} f(x, y, z) &= \mathcal{F}^{-1}[F(f_x, f_y, f_z)] \\ &= \iiint_{-\infty}^{\infty} F(f_x, f_y, f_z) \exp[-2\pi i(f_x \cdot x + f_y \cdot y + f_z \cdot z)] df_x df_y df_z \end{aligned}$$

通常我们称 $f(x, y, z)$ 为 $F(f_x, f_y, f_z)$ 的傅里叶反变换。

众所周知,电镜十分显著的特点就是焦深很长(可达数千埃);因此,任何一个电镜样品——实际上是一个三维结构的小物体,它的不同层次的结构都同时在一个象平面上成象。所以,一张电镜照片实际上是三维物体在二维平面的投影像,即样品中不同高度上结构的二维象的迭加。

当用 $f(x, y, z)$ 表示三维物体, x 代表电子光学轴的方向,并以 $S(y, z)$ 代表 $f(x, y, z)$

* 北京大学生物系。

在 x 方向上的投影,则根据中央截面定理可知:一物体在某一方向上投影的二维傅氏变换就是此物体的三维傅氏变换在相应方向上的中心截面。所以、 $S(y, z)$ 也就是三维密度的物体 $f(x, y, z)$ 沿着 x 轴往垂直于 x 轴的平面上的投影、即:

$$S(y, z) = \int_{-\infty}^{\infty} f(x, y, z) dx \quad (1)$$

已知 $S(y, z)$ 的傅氏变换为 $S(f_y, f_z)$
 $f(x, y, z)$ 的傅氏变换为 $F(f_x, f_y, f_z)$

则:
$$S(f_y, f_z) = \iint_{-\infty}^{\infty} S(y, z) \exp [2\pi i (f_y \cdot y + f_z \cdot z)] dy \cdot dz \quad (2)$$

$$F(f_x, f_y, f_z) = \iiint_{-\infty}^{\infty} f(x, y, z) \exp [2\pi i (f_x \cdot x + f_y \cdot y + f_z \cdot z)] dx dy dz \quad (3)$$

这里(3)式表示的傅氏变换中、若考虑空间频谱 $f_x = 0$ 的中心截面,则(3)可写为:

$$\begin{aligned} F(0, f_y, f_z) &= \iint_{-\infty}^{\infty} \left[\int_{-\infty}^{\infty} [f(x, y, z) dx] \exp [2\pi i (f_y \cdot y + f_z \cdot z)] dy dz \right. \\ &= \iint_{-\infty}^{\infty} S(y, z) \exp [2\pi i (f_y \cdot y + f_z \cdot z)] dy dz = S(f_y, f_z) \end{aligned} \quad (4)$$

(4)式表示:三维物体在 x 方向上的投影($S(y, z)$)的二维傅氏变换($S(f_y, f_z)$)正好等于三维物体 $f(x, y, z)$ 的三维傅氏变换在空间频率 $f_x = 0$ 方向上的中心截面。所以,如果我们在实验中能够得到充分多的、各个不同方向上的投影图,并对这些投影图进行傅氏变换,我们就可知道与其对应的三维物体在各个不同截面上的空间频率 $F(f_x, f_y, f_z)$, 然后,再对 $F(f_x, f_y, f_z)$ 进行傅氏反变换,便可得到原来物体的空间结构 $f(x, y, z)$ 。

$$f(x, y, z) = \iiint_{-\infty}^{\infty} F(f_x, f_y, f_z) \exp [-2\pi i (f_x \cdot x + f_y \cdot y + f_z \cdot z)] df_x df_y df_z \quad (5)$$

图 1 表示用傅氏变换法重构二维图象的一般步骤:由图 1 A 经过一维傅氏变换得到了三个投影面的频谱 B,为了得到完好的重构象,需

要使用内插法来得到频谱中充分多的数据 (B → C 的过程),最后由 C 到 D 即二维傅氏反变换,从而得到原来物体的重构象 D。

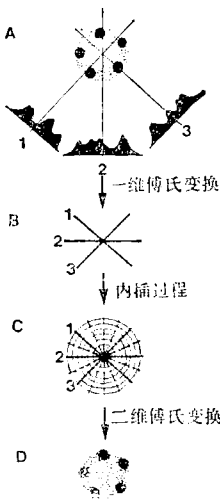


图 1 用傅氏变换重构结构的一般步骤

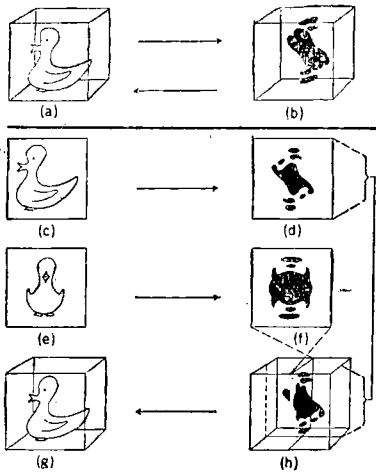


图 2 三维重构数学原理

图 2 说明进行三维重构的数学原理。图 2 (a)代表三维物体——鸭子,(b)是鸭子的三维傅氏变换;(c)是(a)的二维投影,(d)是(c)的二维傅氏变换;(e)是(a)在另一个方向上的投影,(f)是(e)的二维傅氏变换。(b)代表用二维变换(d)和(f)而得到的鸭子的三维空间频谱,(g)代表通过对(b)进行傅氏反变换而得到的重构的三维鸭子。一般,在电镜中不同的观察方向是指从不同的角度(通过样品倾

斜台)拍取到的照片,或者是如果物体具有对称性结构,便可根据同一张照片上处于不同位置的大分子,这些大分子代表不同的投影面,从而可以在计算机上算出原来的三维结构^[1]。

二、傅氏三维重构法的步骤及设备

根据投影原理用傅氏变换法进行生物大分子(或其它生物材料)的三维重构时一般包括四个步骤:

1. 样品制备 指从取样到拍成电子显微照片的整个过程,在这个过程中的每一步都会对最后结果产生直接的影响。因此,如果得不到能够反映或近似反映真实结构的照片,那么后面的处理即使再周密仔细也无济于事。这个过程包括:

1) 支持膜 用电镜观察样品时,一般需要将样品安放在某种有机膜上,以它作支撑物,目前常用的是火棉胶膜和 Formvar 膜。但是这两种物质噪声较大,热稳定性又差,不适于高分辨率工作。较为理想的是碳膜(也有人用镀膜),碳膜的噪声较小,能够制成又薄又均匀的膜,而且在强电子束轰击下稳定度较高。碳膜的制备方法是:在新劈开的云母片上喷一层薄碳层(约 150 Å),把它漂到水面上,再捞到载网上;或者把碳直接喷到覆盖有火棉胶膜的载网上,然后再除去(用 80℃ 烘箱、或醋酸异戊酯溶解)火棉胶膜,便得到碳膜。

还有人用微筛碳膜,最薄处可达 40—50 Å。做法是先制成火棉胶微筛膜、把它转移到载网上,然后喷一层厚度为 200—300 Å 碳,再如上述法除去火棉胶膜后,再喷一层极薄的碳层(约 50 Å)即可使用。

2) 负染 把分离并提纯的生物材料的悬液与一定浓度及 pH 值恰当的负染溶液相互混合后,用吸管把混合溶液滴到微筛碳膜上(或者把大分子悬液和负染液分别滴到载网上),用滤纸吸去多余的液体,留待空气干燥,或冰冻干燥或临界点干燥。

可用的负染剂有多种,常用的有醋酸铀、磷钨酸、硅钨酸、钼酸钠等。这些负染剂能够增

加物体的反差,但是它们在电子束的轰击下会发生变化,因而影响了生物大分子的细结构。目前负染的样品分辨率一般限在 15—20 Å 左右。

N. Unwin 曾用醋酸铀进行了电子照射的定量实验。他发现染料在照射后出现还原现象,从最初的 6 价还原为 4 价。由电子衍射图上测得的数据表明,醋酸铀体积减小可高达 15%。他发现硅酸铀也有类似情况^[2]。这就是说:负染剂受电子照射后收缩,引起蛋白质的表面发生移动。因此,为了能更真实地反映原来的结构,有人直接观察不染色的样品。例如 N. Unwin 等人成功地重构出紫膜分子,其中一个重要条件就是不染色,而是把紫膜保存在稀葡萄糖溶液中,当葡萄糖干燥时,表面看起来很象水,但是不挥发,这就大大减轻了材料在镜体内的脱水问题。又因为葡萄糖内不含有重原子,不会妨碍膜的内部结构成像。目前,除了葡萄糖法外,还有两种方法可用来观察不染色的含水样品。一种是用环境小室(有多种设计方案),另一种是用低温电镜观察液氮冰冻的样品。这两种方法可保存 2—3 Å 的细节结构。

3) 照相 电子束是一种短波长的辐射流,它能够聚焦产生高分辨率图象。但是,从辐射生物学或放射化学的角度看来,电子束就是一种离子辐射流,它能引起各种靶材料发生结构变化。有时这些改变如此严重,以致观察到的终象已不能反映和代表原来结构的真实形状。对于蛋白质,辐射损伤主要表现为形成交链、切断或某些特殊基团的丢失。此外由于高能电子的存在,在受照射区域温度可高达摄氏百度以上,还会产生热损伤。

又由于镜体内残存气体及其它杂质如真空油脂等与电子束的作用,致使一些碳化钠会迅速沉积到样品上,从而模糊了样品的细节。对重构本身来说,由于在电镜中需要从多个方向对单个颗粒作系统倾斜拍片,这就会大大延长样品与电子束相互作用的时间。为了克服上述不利的因素,必须把通过样品的电子数目尽可能地限制在许可的辐射水平之下,而且用尽可

能短的曝光时间进行拍照。有人采用系列拍照法或盲摄法（拍照前先用别的物体代替样品聚焦,再换上样品拍照),或用扫描透射电镜观察。

另一方面,由于大大减少了通过样品的电子数目,这就给聚焦带来很大困难,也许会使样品象根本无法辨认。通常,在正焦时,反差很低,有时故意用欠焦来增加象的反差,结果又丢失了分辨率。

Erickson 等用计算机计算欠焦并补偿终象中的畸变,可以恢复物体的最大反差。 Glaeser 等人为了提高电子记录过程的灵敏度,用象增强器和核子示踪照相乳胶,有一定效果。

Henderson 等^[3]在重构紫膜分子时正是应用了计算机补偿方法,在不降低放大倍数的情况下,大大降低了电子束流,使曝光量为 0.5 电子/ $\text{\AA}^2$ (通常的曝光量为 500 电子/ $\text{\AA}^2$), 这比能够明显损伤样品结构的辐射剂量要低。在这样低的曝光水平下,实际上得不到可以直接辨认的象。幸好紫膜分子是按二维方式排列而存在的,所以每个“晶胞”都相同,这样,便可以用傅氏变换法从几千个晶胞中求出单个晶胞的平均象。然而,生物分子中,以二维周期性结构方式排列或者以这种形式结晶的毕竟很少。因此,这个方法在实用上存在不少困难,还有待改进。

2. 选片 当得到能够近似反映样品真实结构的照片时,需要用光子衍射仪进行挑选,因为人眼很难辨别极小的细节,而光学衍射仪能够对它进行傅氏变换,产生光学衍射图样,根据衍射图上衍射点距中心的距离、衍射点的分布形状以及衍射点的数量就可以判断出结构保存的细节大小及保存程度。在分析衍射图的基础上,挑选出细节保存得最好的照片,准备作下一步分析。

为了“填满”傅氏立体空间,要得到多方面的投影。需要观察面的数目 n 取决于希望达到的分辨率 d 和颗粒本身的尺寸 D ^[4]。它们之间的关系可以表示为:

$$n = \frac{\pi D}{d}$$

如果粒子具有对称性的结构,则观察面的数目

可以大大减少,因为不同方位的粒子有着相同的投影。下面给出几种情况所需要的观察数。假定粒子大小为 $250 \text{\AA}$, 预期的重构的分辨率为 $30 \text{\AA}$ 。

样 品	观 察 数
螺旋性对称 (T4 噬菌体尾部)	1
20 面体对称 (西红柿杆状病毒)	2
无对称	30

注意: 这里指的观察面应在 $\pm 90^\circ$ 内按等空间来收集。在电镜镜体中的实际范围比这小得多。另外,对于具有对称结构的粒子来说,也必须事先算出粒子的方位,然后才能计算。

3. 照片数值化 在进行傅氏三维重构时,使用的函数是光密度,因而要先把照片上的每一点的密度用数值标出。每张照片可以划分成规则排列(方形或矩形)的许多小格(称为单元面积),每个格点上的光密度(实际上是单元面积上的平均)用联机自动扫描微显象测密计测出。这时,象便由许多相应的光密度数值组成,这些数值送进计算机转换成傅氏振幅和相位集合。为了使密度分布 $f(\vec{r})$ 以一定的分辨率可靠地重构,正确选择单元面积很重要。根据抽样理论,对傅氏空间的取样点 $f\vec{r}_i$ 有如下要求:

(1) $f\vec{r}_i$ 为傅氏空间中按一定规律分布的点,而不是无规则分布的点;

(2) 抽样点之间的间隔由被研究的颗粒的大小决定,颗粒越大,抽样点的间隔越小;

(3) 所要求达到的分辨率决定在多大的傅氏空间内进行抽样;分辨率越高,对应的抽样空间越大,抽掉点就越多。一般来说,取样间隔在 25 微米或 50 微米为宜。现在,可以完成照片数值化的仪器种类很多,其中速度最快的一种是圆筒形扫描仪。照片记录到照相软片上,软片卷到圆筒上,圆筒匀速度转动。每转一圈,给出一排测量点的值,同时沿圆筒的长轴移动一小格。还有一种平底型仪器,可以测量平板和软片两种象。这种仪器的测量速度比圆筒形扫描仪慢得多,但精度较高。测量的光密度范围也大得多。

4. 计算机及处理 由自动扫描微显象测密计测出的数据可直接送进计算机作处理。理想的象处理装置应有储存量大、高速信息处理机,一个或多个直观显示器(阴极射线管)以供计数过程中的任何一步观察用。此外,还需要一些外围装置:如储存设备(包括磁带盘和磁带箱)。因为磁带是保存待处理或将来需要的档案象的最为方便的方法,因此至少要有一个大磁盘,最好有两个磁带箱,一个供暂时存放用,另一个供永久保存。此外,还需要浮点信息处理机(大大减少计算时间)及其它的信息处理机,特别是进行傅氏变换的组件。电传打字机也是必不可少的,它是进行人一机对话的主要部件,与电传打字机相连的记录方式可以是卡片阅读器或纸带阅读器。图 3 是 Toulouse 电子光学实验室用于象处理的计算机配置:

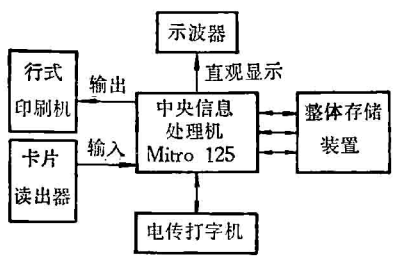


图 3 象处理计算机的一种配置

中央信息处理机的存储量为 64 K,可以扩展到 512 K。

三、应用实例

尽管傅氏三维重构法目前还没有成为普遍实用的技术,但是用它已重建成了某些生物大分子的三维结构。现举两例略作说明。

1. 紫膜分子 紫膜是生长在热带海边盐洼地或死水池中的一种好盐菌细胞膜中的特化部分。它是椭圆形片状结构,直径 1 微米,厚度为 45 Å,这种好盐菌是目前已知的世上唯一不含叶绿体但却能进行光合作用的生物。多年来,它一直是科研人员注意的对象。紫膜组分的 80% 以上是蛋白质,它不能长成晶体,无法用 X 衍射技术分析其结构。然而,Henderson 等从电子显微照片用傅氏变换法重构出表面蛋白质

分子结构(图 4)。蛋白质分子由 7 个与膜平面垂直的 α 螺旋体组成,三个蛋白质分子形成一个“晶胞”。每个蛋白质中的 3 个螺旋体在一起组成膜的内环,其余 4 个螺旋体形成膜的外环(图 4)。有人推测:在日光刺激下,紫膜分子越过细胞膜抽取质子,而且这种结构也许是具有分子泵作用的膜上许多种蛋白所特有的。科学工作者正在努力探索紫膜的结构与功能,以期阐明一些细胞活动过程,重构紫膜的分辨率高达 7 Å。

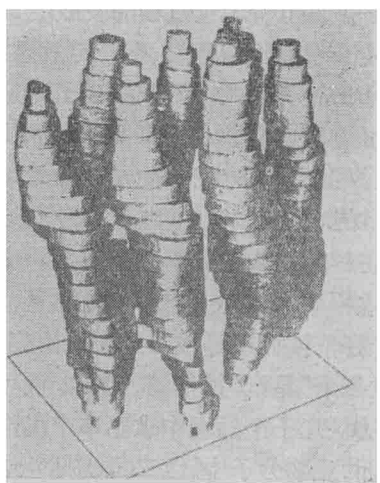
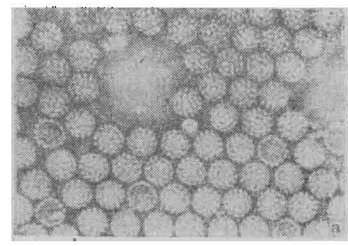
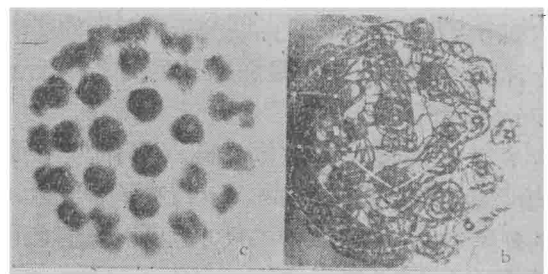


图 4 重构成的紫膜分子



(a)



(b)

(c)

图 5

- (a) 人肉瘤病毒电子显微照片;
- (b) 单个病毒粒子的电子密度分布图;
- (c) 计算机重构的病毒粒子结构图

2. 人肉瘤病毒 这是一种呈 20 面体对称的小病毒, 重构时有两个方向的观察面就够了。病毒直径为 560 Å, 有 420 个亚单位排列在 $T=3$ 的 20 面体表面晶格上, 以 5, 6 邻体形成 72 个形态单位^[5]。图 5 (a)、(b)、(c) 分别是这种病毒的电镜照片。注意: 亚单位在电镜照片上(白)与计算机重构象(黑)正好相反。

傅氏变换三维重构技术是在 60 年代末才发展起来的。1968 年 De Rosier 等首次用计算机重构了 T_4 细菌噬菌体尾鞘象。因为尾鞘是螺旋性对称结构, 只需要一个观察面就可以得到三维重构的全部信息。尾鞘外层由 42 个亚单位组成, 因而一张照片就相当于 21 张从等空间角度观察到的照片, 大大简化了重构步骤。随后, James Lake (1970) 把这种方法应用到切片的电子显微照片上, 重构了核糖核蛋白体的结构^[6]。从那时以来, 用傅氏变换法已构成的生物大分子还有烟草花叶病毒^[7]、血蓝蛋白^[8]、肌丝^[9]、细菌鞭毛、各种球状病毒^[10]以及谷氨酰胺合成酶。

总之, 电镜技术在分析生物材料的结构方面起着十分重要的作用。

虽然目前 X 衍射技术分辨率很高(1 Å), 但

是, 只适用于能长成晶体的生物样品, 又由于晶体生长条件不易掌握等原因, 使 X 衍射技术的应用受到限制。而电子显微照片进行象重构技术比 X 衍射技术更为迅速、也更加省事。如果今后找出新的样品制备方法, 减轻辐射损伤, 并研究出重构非对称性物体的方法, 可以断定, 电镜中的三维重构技术与 X 衍射技术相互配合下, 必将对生物科学作出重要的贡献。

参 考 文 献

- [1] Crowther, R. A. et al.: *Proc. Roy. Soc. Lond. A*, **317**, 319, 1970.
- [2] Unwin, P. N. T.: *J. Mol. Biol.*, **87**, 657, 1974.
- [3] Henderson, R. P. N. T. Unwin: *Nature*, **257**, 58, 1975.
- [4] De Rosier, A. Klug: *ibid.*, **217**, 130, 1968.
- [5] Crowther, R. A.: *ibid.*, **226**, 421, 1970.
- [6] Lake, J. A. *ibid.*, **227**, 1032 1970.
- [7] Unwin, P. N. T. A. Klug: *J. Mol. Biol.*, **87**, 641, 1974.
- [8] Melloma, J. E., A. Klug: *Nature*, **239**, 146, 1972.
- [9] Wakabayashi, T. et al.: *J. Mol. Biol.*, **93**, 477, 1975.
- [10] Crowther, R. A.: *Phyil. Trans. Roy. Soc. (Ser. b)*, **261**, 221. 1971.

[本文于 1979 年 9 月 20 日收到]

用核磁共振研究生物活组织 (一)

许 健 生

高 联 佩

(中国科学院生物物理研究所) (清 华 大 学)

1946 年 F. Bloch 等物理学家为研究中子等基本粒子的特性, 发现了核磁共振 (NMR) 现象, 从而把波谱学推进到射频区。开始, NMR 仅是物理学家的工具, 但很快就被应用于有机化学, 极大地推动了有机化学的发展。五十年代后期, 它又扩展到生物学的研究领域, 从而对 NMR 技术本身也提出了更高的要求。七十年代以来, 引入了超导磁体、傅氏变换和计算机, 使核磁共振在生物学中的应用得到迅速发展, 成为生物物理学的一个重要分支。目前在生物学

中应用 NMR 的研究对象日趋广泛, 从大分子、细胞到活组织、器官甚至部分人体都得到应用。研究内容也更丰富, 从结构到代谢途径, 从静态到动态, 从鉴定生物制品到医学临床诊断等。

用 NMR 研究生物对象, 有三方面的突出优点:

1. 研究生物分子结构长期以来一直以 X 射线衍射为主要工具。它有较高分辨率, 但也有较多的局限性。如要求研究对象为晶体, 而大量生物分子目前还无法长成晶体, 而且生命活