

- 1991; **266**: 13804
- 16 Von Feldt J M, Kieber Emmons T, Weiner D B *et al.* DNA Cell Biol, 1992; **11**: 183
- 17 Moonen P, Mermod J J, Ernst J F *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1987; **84**: 4428
- 18 Kaushansky K, O'Hara P J, Hart C E *et al.* Biochemistry, 1987; **26**: 4861
- 19 Ernst J F, Mermod J J, Richman L H. Eur J Biochem, 1992; **203**: 663

- 20 Kaushansky K, Lopez J A, Brown C B. Biochemistry, 1992; **31**: 1881
- 21 Okamoto M, Nakai M, Nakayama C *et al.* Arch Biochem Biophys, 1991; **286**: 562
- 22 Malik F, Delgado C, Knusli C *et al.* Exp Hematol. 1992; **20**: 1028
- 23 Angelotti T P, Clarke M F, Longino M A *et al.* Bioconjug Chem, 1991; **2**: 466

生物高分辨电子显微学进展*

徐 伟

(中国科学院生物物理研究所, 北京100101)

潘东日 邢 力

(中国科学院北京电子显微镜实验室, 北京 100080)

唐静华

(北京大学生物系, 北京 100871)

摘要 生物高分辨电子显微学是近年来发展起来的一种可与X射线晶体学相媲美的测定生物大分子高分辨结构的方法。它克服了一些限制X射线晶体学应用的困难,可以直接对非晶体状态的生物大分子或仅能形成二维晶体的蛋白进行结构测定。这一技术主要包括高分辨电子显微象的获得与电子显微象解析。文章就这一技术应用中的一些问题:自然结构的保持、辐射损伤、低衬度、低信噪比等进行了讨论。

关键词 生物大分子, 高分辨, 电子显微学

高能电子作为一种可以聚焦的短波辐射(加速电压如为100kV,波长为0.037Å)提供了以原子分辨率成像的可能性。电子显微镜分辨本领的提高以及成像理论和方法学的发展,终于使人们在70年代第一次观察到单个金属原子象。长期以来,人们一直致力于研究用高分辨电子显微术观察生物结构,特别是生物大分子结构,然而生物材料的某些特性造成了一些特殊困难:a.电镜中的高真空环境使含有大量水并借助于这些水维系正常结构和功能的生物大分子脱水,以至结构严重破坏;b.生物材料对辐射极其敏感,电子束可迅速造成生物材料的辐射损伤,这种损伤在远不足以形成统计学界定的原子分辨率象的极低的曝光水平时就已

经出现^[1],而过低的剂量又会形成信噪比很低的图象,造成图象解释的困难;c.由超轻元素为主构成的生物材料对电子的散射能力弱,因此它的固有衬度很低,而常规的重金属染色又会产生制备假象等等。

经过几十年来众多学者的努力,在克服上述困难,发展高分辨生物电子显微学理论上已获得一系列突破性进展。英国医学研究会(MRC)分子生物学实验室以Klug为首的学者们对此作出了卓越贡献。他们把衍射理论与电子显微术巧妙结合起来,发展出一整套以样

*国家自然科学基金资助项目。

收稿日期:1993-06-21,修回日期:1994-01-31

品制备、低剂量辐射、高分辨电子显微术到计算机图象处理的生物电子晶体学 (biological electron crystallography) 方法, 从而把用电子显微镜高分辨研究生物大分子结构这一方法提到一个新水平, 并因此荣获1982年诺贝尔化学奖. 近年来糖包埋、冷冻含水制样方法和低温电子显微术的发展^[2]在保存生物材料的高分辨细节和抗辐射损伤方面又获得重大改善; 蛋白质二维结晶技术得到改进^[3]; 点扫描 (spot-scanning) 技术的采用提高了样品稳定性和衬度^[4], 以及计算机图象分析处理程序及生物大分子结构的三维重建方法的日趋完善, 都推动了高分辨生物电子显微学的不断发展并在蛋白质分子结构的研究中取得了许多重大成果. 最近, 某些蛋白质三维结构的测定工作已达到接近 X 射线晶体学的分辨率水平. 例如细菌视紫红质 (bacteriorhodopsin) 二维蛋白质晶体的结构研究已提出原子模型^[5]; 两种体外形成二维结晶的蛋白质, 细菌孔蛋白 (bacterial Porin)^[6]和叶绿素 A/B 蛋白质复合体^[7]的结构研究都达到接近原子分辨率水平. 这证实了这一领域的潜力和发展前景是令人鼓舞的.

1 高分辨电子显微象的获得

在生物样品的高分辨电镜研究中, 人们首先要解决的三个重要问题是, 样品制备造成的结构变化、高能电子束对样品的辐射损伤及生物样品固有的低衬度.

1.1 样品制备及生物结构的保存

在电镜中, 生物样品不得不曝露在高真空环境, 因而通常生物样品都要脱水处理, 然而在气-液界面上的表面张力会造成生物大分子解体或畸变或部分变性. 在高分辨电子显微术中, 要使处于接近自然状态的生物大分子成象, 则必须防止脱水, 并“支撑”生物大分子以防其解体或畸变. 目前通常采用负染色、糖包埋和冷冻含水等样品制备方法. 表1对这三种方法作了比较^[8].

1.1.1 糖包埋法 1975年 Unwin 等人发展了“葡萄糖包埋法”, 该方法是利用葡萄糖的

OH基代替水分子与蛋白质结合成氢键, 在蛋白质周围产生一种非挥发性的类似含水的环境, 给样品以良好的支持. 成功地获得了0.35nm分辨率的紫膜三维结构重建^[5]. 许多种样品正是利用这种方法获得了高质量结果, 这种方法已被证实对样品具有好的保存和高达0.15nm的分辨率, 有的作者用海藻糖包埋法 (trehalose embedding) 以及亚金硫代葡萄糖包埋法 (aurothioglucose embedding) 等. 除用糖包埋方法以外, Kuhlbrandt 等人^[7]还将单宁酸包埋法用于膜蛋白二维结晶的高分辨电子显微术中, 亦获得了分辨率为0.34nm的三维重构.

表1 蛋白质及其组装体的高分辨电子显微术中常用制备方法比较

方法	结构保存	衬度	分辨率	辐射敏感度	结构信息
冷冻含水	非常好	低	高, 现已达0.25nm	高	投影密度
糖包埋	好	非常低	高, 现已达0.15nm	高	投影密度
负染色	好	高	中等, 典型的1.5—3nm	低	大分子包膜的投影

1.1.2 冷冻含水方法 80年代发展起来的冷冻含水技术是一种极有效的样品制备方法^[2]. 它是将悬液样品迅速冷却到近液氮的温度, 使生物大分子包埋在玻璃态冰中. 这一方法避免了生物样品在脱水过程中的表面张力造成的蛋白质分子或其复合体的畸变与解体, 极好地保存了样品的精细结构, 并且获得了高于糖包埋法的衬度. 当然这种方法必须配合以低温样品台及转移系统以及低剂量曝光法等一系列电子显微技术, 这种方法已获得了0.25nm的分辨率^[9].

1.2 减少辐射损伤

生物样品是高度辐射敏感性样品, 蛋白质分子在常温下所能耐受的最大电子辐射剂量——临界剂量仅为50—100e/nm², 而不经过程

色的薄样品在获得统计学界定的高分辨象所需要的临界剂量为上述的 10^3 — 10^4 倍。因此减少样品辐射损伤是高分辨观察的主要环节。

1.2.1 低温电子显微术 减少辐射损伤的一种有效方法就是采用低温样品台。在低温条件下,样品所能耐受的电子辐射剂量会增加,已证实在负170℃或更低温度下,临界剂量可以提高5—7倍。而葡萄糖包埋的紫膜在液氮冷却的电镜下,温度为4.5K,它的临界剂量达到2000e/nm²。

1.2.2 低剂量成像与低剂量曝光技术 显然,减少辐射损伤的根本途径是减低在成像操作和象记录过程中的辐射剂量。为此既要减少照射在样品上的“亮度”,又要缩短样品在电子束下的曝露时间。然而这给成像操作——选择样品区域、聚焦、消象散及曝光记录带来困难。解决这种困难常用的有效方法是低剂量曝光技术,即在感兴趣的样品部位的邻近区域进行聚焦、消象散等操作,并在同样条件下,对感兴趣的样品部位曝光记录。这一方法首先被 Unwin 等人^[10]应用在紫膜研究中,现在已经成为高分辨电子显微术的基本技术。低剂量的象记录还涉及照相材料的特性及其显影处理等方面的问题,这方面已有一些比较成熟的方法,读者可以参考有关文献^[11]。

1.3 提高象的衬度

用电镜对生物大分子进行高分辨率成像,首要的限制就是低衬度。造成这种低衬度的因素包括辐射损伤、非弹性散射及电子束引起的样品运动和充电^[12]。常规的重金属染色不仅造成假象,而且只能获得较低的分辨率。

1.3.1 离焦相位衬度成像 在生物样品的高分辨观察中,大多采用薄的未经染色的样品,例如糖包埋和冷冻含水的生物大分子(晶体或颗粒材料)。电子波透过样品后,振幅几乎没有损失,相位改变也很小,相位衬度象的形成依赖相位不同的电子波之间相互干涉。除样品外,物镜本身也造成附加的相位移,在物镜后焦平面这种相位移为: $\Delta\varphi = 2\pi\lambda^{-1}(\Delta f * \theta^2/2 - C_s * \theta^4/4)$ 这里的 C_s 为物镜球差, Δf 为物

镜的离焦量, θ 为散射角。这种效应可用衬度传递函数(contrast transfer function, CTF)表证: $\sin\Delta\varphi + Q\cos\Delta\varphi$, 改变物镜的焦长可以改变相位移,当 $\Delta\varphi$ 约为 $(2n-1)\pi/2$ 时(n 为整数),就可以获得电子波之间最好的干涉,即获得良好的相位衬度。为了得到正衬度,通常使物镜欠焦成像,特别应当注意,当 $\Delta\varphi$ 偏离 $(2n-1)\pi/2$ 太远时,相位衬度不够强,甚至完全抑制。也可以看出,一个相位衬度象并未包含电子波从样品中携带的全部信息谱。因此通常需要摄取至少两张不同 $\Delta\varphi$ 的相位衬度象以填补传递函数造成的空缺。

1.3.2 点扫描技术 在常规的 Flood-beam ($D=3\mu\text{M}$) 的照明条件下,低剂量曝光成像的衬度仅为理论值的5%,是因为当电子束打到样品上时,由于对生物分子化学键的破坏,静电积累会使样品内产生各种应力,造成样品变形和漂移,为此人们近年来又发展了点扫描技术,使用场发射电子枪(FEG),并使电子束的直径缩小到50—200nm,可将底片记录下的象的衬度提高3—5倍^[13]。此外把点扫描与动态聚焦(dynamic focusing)结合起来,用于三维重建工作中,可以克服大角度倾斜造成的离焦假象。

2 高分辨电子显微象的解析

生物高分辨电子显微术在生物制样及高分辨象获得上采用了一系列先进技术,目的是追求最大限度地记录生物大分子的结构信息。为此,损失了象的直观可解释性。图象分析则从这些难以直观解释的图象中提取信息,并综合出大分子的结构象,直观地呈现给研究者^[14]。

图象分析对高分辨象缺陷的弥补表现在以下三方面:提高高分辨象信噪比,校正电镜成像系统带来的畸变,得到三维结构而非简单的投影。

光学衍射法是一种快速简便的处理方法,往往被用来检查高分辨象(底片)的效果,而进一步信息处理的方法是数字算法^[15]。图象经过数字化采样成为点阵(象素),每个点的值对

应了照片的亮度,这样就可以为数字计算机所接受,采用一些具体的算法来处理它们。

最有效的处理方法是将图象点阵变换为另一种形式(经富里叶变换到富里叶空间),即样品的各种结构,可用许多不同振幅和空间频率的组分和来描述——富里叶变换。

$$f(x, y) = \sum_{XY} F(X, Y) \exp[-2\pi i(xX + yY)]$$

在富里叶空间处理 $f(x, y)$ 即处理 $F(X, Y)$ 。下面也从电镜成象理论上说明用这种方法的好处。

电子光学线性成象理论^[16]认为,电子波经生物大分子薄样品后,携带了样品沿电子束方向的投影信息,衍射到达物镜后焦面,相当于在数学上是作一次富氏变换,物镜传递函数的影响此时是线性的,电子波传播到象平面相当于在作富氏变换。数学上同时证明物体二维投影的富氏变换,严格等于该物体三维富氏变换中与投影方向垂直的通过原点的截面(中央截面定理)^[15],这两个理论使得富氏变换法在电镜高分辨图象分析中颇受青睐。

2.1 提高信噪比

未染色的生物大分子的低剂量曝光电子显微图象,不但衬度差,而且信号噪音比小,视觉效应很差。直方图均衡化可以增强衬度,提高信噪比则要通过多次迭加,重复出现的基本结构组分 Motifs 会因此而加强,噪音相对减弱。对于随机噪音,平均象的信噪比与参加平均的象数量的平均根成正比。

对于周期性重复结构的平均比较容易实现,在象的富里叶变换中,所有周期性信息都集中在离散的强点上,通过简单过滤运算使之与背景分离,经逆富氏变换即可获得平均单胞结构^[17]。

对于没有周期性或周期性不够好的样品,样品本身所具有的对称性显得很重要,用相关运算确定两恒等大分子的位置和取向,再施以迭加运算,提高信噪比。

2.2 校正 CTF 带来的系统畸变

我们已知相位衬度成象为生物高分辨成象的工作模式,但因 CTF 是一个振荡性函数,特

别是在高空间频率时振荡加快,有大有小,有正有负,造成衬度反转,黑白颠倒,不能直观解释。

决定 CTF (详见 1.3.1) 的电子波长可以求出,物镜球差可以测量且相对稳定,样品成象时相位 CTF 与振幅 CTF 的比例也相对稳定,对于各高分辨象只须求得欠焦量,即可以得到 CTF。一般用 Thon 环法,求出 CTF,再解调出信号。然而 CTF 零点附近的结构信息在成象过程中丢失了,完整的结构还原要求综合不同欠焦量下记录的信息^[2]。

2.3 生物大分子三维重建^[15,18]

经过以上处理的象,也只不过是样品的二维投影,高要求的处理是得到样品三维结构,从二维到三维象的处理困难,一般在于各二维投影象的组合时彼此取向位置关系的确定。较低分辨率要求的处理,类似于计算机断层扫描中的 X 线断层术 (Tomography),从单独一个样品收集各二维投影象重建出三维结构。高分辨率时,由于辐射限制一个样品的辐射剂量,各二维投影象只能来源于不同个体,所以取向位置关系的确定就困难了。参照样样品本身的条件,晶体和各种单颗粒状大分子,人们采用不同的算法。对于晶体样品,一般要求二维晶体(即单胞只在一个平面内扩展),厚的晶体不适合于用高分辨电子显微术定结构。二维晶体的电子衍射有所谓的晶格线,利用它得到不同晶体之取向关系^[19]。关于单颗粒大分子样品,国内有徐伟等^[20]的详细综述,计算出生物大分子的高分辨三维结构,就可以方便地在计算机屏上显示出任何方向或剖面结构。

图象处理的作用甚至能将不同来源的信息综合运用,有些研究者已将 X 射线获得的振幅信息与电子显微术获得的相位信息结合起来,扬长避短,得到更好的结果。

参 考 文 献

- 1 Glaeser R M. J Ultrastruct Res, 1971; 36: 466

(下转第371页)

处理,亲和柱可连续使用数十次。

2.6 去激素血清的鉴定

2.6.1 用 TSH 放免药盒检测血清中 TSH 抗体含量。

2.6.2 用 TSH 放免药盒检测血清中 TSH 含量。

2.6.3 用紫外分光光度计检测血清中蛋白含量(血清稀释50倍,检测 A_{280} , A_{260} 值)。

3 结 果

所得去激素血清用 TSH 放免药盒检测无 TSH 抗体存在。用 TSH 放免药盒检测无 TSH 存在。用紫外分光光度计检测 A 值,证明蛋白损失量较小(上柱前后蛋白变化量见表1)。上述三方面实验证明,所得去激素血清符合 TSH 放免药盒的要求。

表1 上柱前后蛋白变化量

	(mg/ml)		
	A_{280}	A_{260}	蛋白量
上柱前	1.400	0.995	6.47
上柱后	1.120	0.750	5.33

4 讨 论

去激素血清的制备方法目前已知有三种,

一为活性碳法,二为右旋糖苷包被的活性碳法,三为亲和层析法。前两种方法激素去除的不完全,蛋白损失量较大,最大可达到50%。由于 TSH 放免药盒对“0”标准点的要求非常高,只有亲和层析法去激素较为完全,且此法较为简便,蛋白损失量较小,处理过的血清符合 TSH 放免药盒的要求。亲和柱可长期连续使用,适于大批量生产。

据文献报导,亲和柱上的抗体易脱落,作者在实验中也遇到这个问题,这与抗血清和珠子的偶联条件有关,作者用大量缓冲液及适量正常人血清淋洗柱子后,可将抗体的脱落降至最小(用现有方法检测不到 TSH 抗体的存在),但这个问题仍有待于解决。

致谢 本工作得到我室王玉肖副研究员的指导,在此表示感谢。

参 考 文 献

- 1 Pekonen F P, Williams D M, Weintraub B D. *Endocrinology*, 1980; **106** (5): 1327
- 2 Erhardt F W, Scriba P C. *Acta Endocrinology*, 1977; **85**: 698
- 3 Chiu W. *Ann Rev Biophys Chem*, 1986; **15**: 237
- 4 Henderson R. *Ultramicroscopy*, 1992; **46**: 1
- 5 Downing K H. *Ultramicroscopy*, 1988; **24**: 387
- 6 Moody M. *Biophysical electron microscopy*. San Diego: Academic Press, 1991: 168
- 7 DeRosier D, Klug A. *Nature*, 1968; **217**: 130
- 8 郭可信,叶恒强. *高分辨电子显微学*, 北京: 科学出版社, 1985: 20
- 9 Henderson R, Baldwin J M, Downing K H *et al.* *Ultramicroscopy*, 1986; **19**: 147
- 10 Amos L A, Henderson R, Unwin P N T. *Biophys Mol Biol*, 1982; **39**: 183
- 11 Henderson R, Unwin P N T. *Nature*, 1975; **257**: 28
- 12 徐 伟,潘东日. *电子显微学报*, 1992; **11**: 415

(上接第333页)

- 2 Dubochet J, Adrian M, Chang J-J *et al.* *Quar Rev Biophys*, 1988; **21**: 4
- 3 Jap B K, Zulauf M, Scheybani T *et al.* *Ultramicroscopy*, 1992; **46**: 45
- 4 Downing K H, Glaeser R. *Ultramicroscopy*, 1986; **20**: 269
- 5 Henderson R, Baldwin J, Ceskaetal T A. *J Mol Biol*, 1990; **213**: 899
- 6 Jap B K. *Nature*, 1990; **350**: 167
- 7 Kühlbrandt W, Wang D N. *Nature*, 1990; **350**: 130
- 8 Bremer A. *Ultramicroscopy*, 1992; **46**: 85
- 9 Brink J, Chiu W, Dougherty M. *Ultramicroscopy*, 1992; **46**: 229
- 10 Unwin P N T, Henderson R. *J Mol Biol*, 1975; **94**: 425

rized.

Key words electroporation, electrofusion, biotechnology

Structure and Function of Recombinant Human Granulocyte-macrophage Colony-Stimulating Factor. Ling Mingsheng, Xu Mingbo, Ma Xiankai. (*Institute of Basic Medical Sciences, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (4): 326—330

Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rhGM-CSF) has been expressed in prokaryotic and eukaryotic cells. Purified to homogeneity, which facilitates to study the structure and function of this factor. Recently, the study of structure and function of rhGM-CSF has been mainly focused on crystal structure, including chemical modification, conformation and stability in solution, mutation and molecular design. The progress in study the structure-function relationship and the mechanism of interaction of GM-CSF with its receptor is discussed.

Key words rhGM-CSF, structure and function, crystal structure, chemical modification, conformation and stability in solution

Advances in Biological High Resolution Electron Microscopy. Xu Wei, Pan Dongri, Xing Li, Tang Jinghua. (*Institute of Biophysics, Academia Sinica, Beijing 100101*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (4): 330—333, 371

Biological high resolution electron microscopy, a method developed recently, is comparable to X-ray crystallography for determination of high resolution structure of biological macromolecules. It overcomes some difficulties confronted by X-ray crystallography and can apply

directly to the non-crystal biological macromolecules or to those proteins which can only form two-dimensional crystals. This method contains mainly experimental recording of real structure information and image analysis of the electron micrographs. Several problems which will be encountered in the application of these techniques, e. g. natural structure preservation, radiation damage, poor contrast, and low signal-noise ratio are discussed.

Key words biological macromolecule, high resolution, electron microscopy

Expression of the Gene of the 58kD Subunit of the Vacuolar H⁺-ATPase From Human Kidney in *E. coli*. Zhang Ying, Peng Shengbin, Stone D. K., Xie Xiaosong. (*Department of Internal Medicine, Division of Molecular Transport, the University of Texas Southwestern Medical Center at Dallas, Dallas, TX 75235, U. S. A.*). *Prog. Biochem. Biophys. (China)*, 1994; **21** (4): 334—338

The 58kD subunit gene of the human kidney vacuolar H⁺-ATPase has been successfully expressed in *E. coli*. The fragment of 58kD subunit gene was obtained by polymerase chain reaction (PCR). A clone encoding 58kD subunit was obtained by directly joining PCR product into the plasmid for expression by T7 RNA polymerase (PET). Sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide gel electrophoresis and Western blot analysis of cultured transformants demonstrated high expression of 58kD subunit gene. The product of 58kD subunit accounted for 50% of cytoplasmic proteins.

Key words H⁺-ATPase, 58kD subunit, bacteria expression

Expression and Secretion of Salmon Growth Hormone From an *Escherichia coli* Secretion