

使用电子断层技术对 IgG1 抗体逐个分子的三维重构与结构分析*

张 星^{1,2)} 廖雨恒^{1,2)} 童慧敏²⁾ 张 磊¹⁾ 张胜利^{1)**} 任 罡^{2)**}

(¹⁾ 西安交通大学理学院, 应用物理系, 西安 710049;

²⁾ The Molecular Foundry, Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, CA 94720, USA)

摘要 抗体(antibody)又称免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig), 是人体免疫反应的重要参与者。了解抗体的结构和结构动态特征, 是理解人体免疫作用机理、修复或提高免疫能力、定向设计抗体以治疗各种疾病的基础。本文以人体 IgG1 抗体为对象, 综述了使用透射电子显微学方法研究 IgG1 抗体结构方向的最新进展。详细介绍了使用逐个分子的电子断层三维重构技术(individual-particle electron tomography, IPET)对抗体进行结构研究的方法, 包括样品制备、图像处理和数据分析等。并描述了利用该技术, 在研究抗体结合肽分子后的结构形变和通过收集不同构象来研究抗体动态结构特征方面所取得的阶段性成果。最后, 对尚待解决的关键问题与该技术未来的发展方向进行了讨论与展望。

关键词 抗体, 免疫球蛋白, 透射电子显微学, 电子断层三维重构技术

学科分类号 O469, Q-33, Q71

DOI: 10.16476/j.pibb.2015.0389

抗体(antibody), 又称免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig), 指人类机体免疫系统在抗原的刺激下, 由人体 B 淋巴细胞或者记忆细胞增殖分化而成的浆细胞所产生的、可与相应抗原发生特异性结合的免疫球蛋白。抗体按照其物理、化学性质和生物功能, 可划分为 IgM、IgG、IgA、IgE 和 IgD 等 5 类, 其中以 IgG 抗体在人体血清内的含量最大^[1-2]。

IgG(分子质量约 150 ku)主要以单体方式分布在血液中, 每个 IgG 分子由 2 个全同的重链和 2 个全同的轻链构成, 各链之间由二硫键相互连结, 形成 3 个相对独立的结构域, 大体形态成 Y 字形。重、轻链按区域又分为可变区和恒定区, 可变区决定抗体特异性结合的抗原对象。可变区有着各异的氨基酸序列和空间结构, 这赋予了抗体对抗原的特异性结合能力, 即一种抗体能且仅能与一种或一类特定的抗原相结合。可变区位于 Y 字形结构的 2 个顶端, 因而该部分被称为抗原结合域(antigen-binding fragment region, 简称 F_{ab} 结构域)。Y 形的柄部称为结晶片段结构域(crystalline fragment region, 简称 F_c 结构域), 完全由恒定区组成, 恒

定区序列的类型决定着抗体的类型, 该区域为糖类物质结合区域, 功能包括激活补体反应等^[3]。

抗体因在人体免疫反应中的特殊地位而受到广泛关注。通过修饰抗体的可变区序列, 研究者可以针对特定的目标蛋白质设计出特定的抗体; 而进一步利用这种特异性识别的能力, 可以将药物附加在抗体结构中, 引导到病患部位进行治疗^[4-6]。

早在 30 年前, 抗体的结构就开始被大量研究。主流的蛋白质结构研究手段包括 X 射线晶体学、核磁共振技术和冷冻电镜单颗粒三维重构等。一般来讲, X 射线晶体学是蛋白质结构研究的核心方法之一。在过去几十年内, 应用 X 射线晶体学方法, 多种抗体的结构域或完整的三维结构被解出, 其中包括三种 IgG 抗体的完整三维结构。这些

* 美国能源部基础科学基金(DE-AC02-05CH11231), 美国国立卫生研究院(NIH)基金(NHLBI, #1R01HL115153)和中国国家自然科学基金(11374237, 11504287)资助项目。

** 通讯联系人。

任 罡. Tel: 1-510-495-2375, E-mail: gren@lbl.gov

张胜利. Tel: 029-82663366, E-mail: zhangsl@mail.xjtu.edu.cn

收稿日期: 2016-06-16, 接受日期: 2016-07-25

结构分别展示出了抗体的不同构象, 而由于晶体样品制备的特殊要求, 这些构象本质上反映的是特定条件下不同抗体结晶条件下的结构^[7-9], 这与抗体在生理环境下的结构可能会有所不同. 核磁共振技术在抗体结构片段的结构研究具有重要贡献^[10-12], 然而由于其技术更适用于分子质量较小的蛋白质结构研究, 用其研究完整的抗体三维构象仍有相当的困难^[13]. 作为近年来发展最为迅速的结构生物学技术, 冷冻电镜单颗粒重构技术, 可以在最大程度上保持蛋白质自然状态的条件下, 能够对结构均一的或者通过实验手段均一化的蛋白质进行高分辨率的三维结构分析. 该方法通过对数千张至数十万张同种大分子的不同角度的照片进行分类、平均, 而后借助初始模型进行空间角度计算、中心修正和反投影运算, 通过数次迭代优化结果, 最终获得精细的三维密度图, 目前该技术已能达到原子级分辨率, 使得从重构结果建立分子模型成为可能^[14-16]. 该方法的缺点是, 一定程度上依赖初始模型, 同时由于涉及分类平均过程, 当应用该方法研究具有动态结构的蛋白质时困难极大, 蛋白质的动态区域通常在三维重构中被模糊化、甚至消失, 因此存在一定的局限性. 例如, Correia 等^[17]使用负染方法和单颗粒三维重构技术对结合抗原的抗体结构研究, 在结果显示抗体结构中 F_c 结构域的区域严重缩小, 无法分辨其形态与方向特征. 除了传统的单颗粒重构技术, 一种通过平均大量独立分子的电子断层成像结

果以获得高分辨三维结构的方法也得到应用. Diebold 等^[18]使用冷冻样品制备方法结合电子断层成像技术研究了细胞表面的 IgG 抗体分子, 结果显示, IgG 抗体分子在细胞表面形成六聚体, 然而由于 F_{ab} 结构域在自然状态下存在自由摆动, 其通过多个蛋白颗粒平均获得的三维密度图, 仍然缺失每个 F_{ab} 结构域的详细信息.

受限传统蛋白质研究方法的平均或结晶策略, 抗体这类具有动态结构的蛋白质构象难以测量. 因而迫切需要一种方法来逐一研究每一个蛋白质分子的结构, 以得到该蛋白质的动态结构特性. 任昱科研小组通过优化的负染样品制备技术和电子断层三维重构技术, 提出了从逐个分子出发进行蛋白质动态结构研究的研究策略. 这套方法包含多个步骤(图 1), 样品制备、仪器调控与数据采集、重构算法与模型匹配等, 其特点如下: a. 优化的负染方法, 使用了新型染色剂和染色流程, 成功地减少了染色剂对蛋白质构象的破坏, 使得电镜图像分辨率有明显提升. b. 电镜调试、图像采集区域选择和优化的数据采集方法, 使实验者能够并保证在电镜成像状态良好的条件下, 选择最佳的成像区域, 进行数据采集, 并通过精确控制欠焦成度, 图像细节信号得到了最大化的保留. c. 独特的三维重构算法, 在迭代过程中, 不断减少噪音区域对对齐误差的影响而提升对齐的精确度. 这里, 本文将首先对优化负染色技术和图像处理方法进行简要综

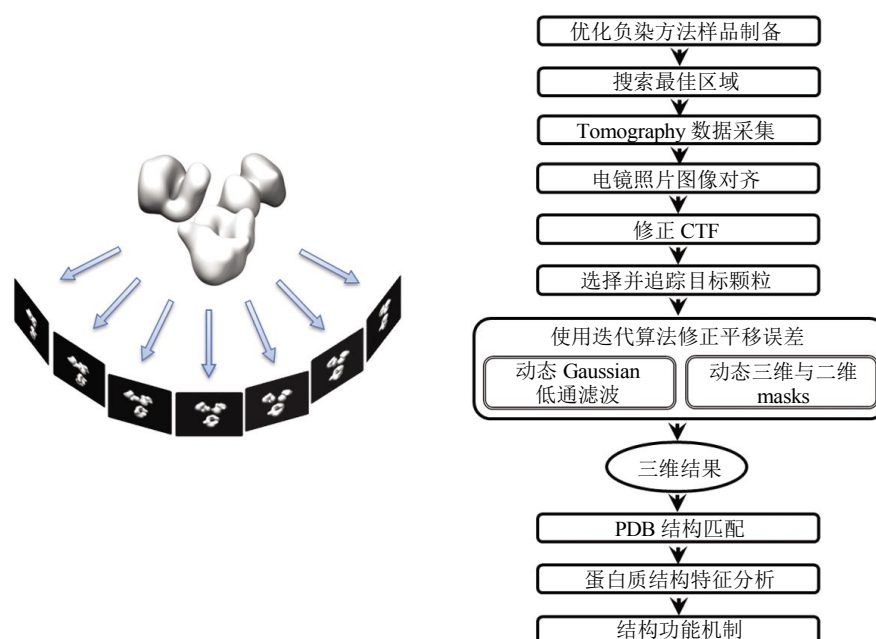


Fig. 1 Procedure of IPET on antibody structural study

图 1 抗体分子的电子断层三维重构研究的方法步骤

述, 而后对电子断层三维重构技术(individual-particle electron tomography, IPET)在抗体动态结构研究中的应用进行讨论.

1 抗体三维结构的电子显微镜分析

1.1 电镜样品制备的优化负染色方法

高分辨率的电子显微成像技术作为一种重要的分子观察手段, 可用于单个蛋白质分子的构象研究. 目前主流的生物大分子电镜样品制备方法包括快速冷冻固定法和化学负染色方法. 冷冻方法主要是将蛋白质样品悬浊溶液通过瞬间冷冻形成几十至几百纳米厚度的非晶态冰, 从而能够保持蛋白质在溶液中的原貌. 这种方法得到的图像往往衬度较低^[19], 特别是对小于 200 ku 的分子. 对于分子质量为 160 ku 的抗体分子的冷冻样品使用电子显微镜直接观察难度极大, 要获得单个抗体分子的空间结构目前尚无法实现. 2004 年曾经出现过对抗体分子空间结构的冷冻电镜的报道^[20-21]. 这些研究是使用一种基于最大熵理论的迭代算法(COMET 重构法)进行三维重构的. 然而文献中只给出极少部分的结果, 没有原始数据和重构中间过程, 引起了同行的质疑. 特别是, 利用相同方法处理数据的一

篇 2008 年的 PNAS 论文^[22], 验证发现, 远超过 90% 的结果不可靠, 被合作人于 2012 年撤回^[23]. 表明了该方法的不成熟, 也同时说明了对单个抗体分子颗粒空间结构测定的难度.

经过大量的实验和测试, 张磊等^[24-26]通过对负染技术进行优化, 使用甲酸铀酰作为染色剂, 并通过控制染色步骤、条件和时间等参数, 成功地减少了染色剂造成的假象, 并提高了负染方法的空间分辨率. 应用该技术, 已成功观察了多种不同蛋白质样品, 包括胆固醇酯转移蛋白、高密度脂蛋白、抗体等^[25].

1.2 优化负染法制备的抗体样品的电镜观察

使用电子显微镜对负染法制备的 IgG1 抗体样品进行观察, 在高斯低通滤波后, 其负染电镜图像(图 2 左)和放大的单抗分子的图像(图 2 右)显示未绑定肽的抗体样品形状呈“Y”字型, 并包含 3 个球状结构域, 对应 2 个 F_{ab} 结构域和 1 个 F_c 结构域. 从图像上来看, 每个抗体颗粒大小约为 150~200Å, 每个结构域的大小约为 50~80Å. 更重要的是, 原始图像中有超过一半的蛋白颗粒显示了重要的结构细节, 包括每个结构域的空间朝向和位于每个结构域中心的低密度孔洞.

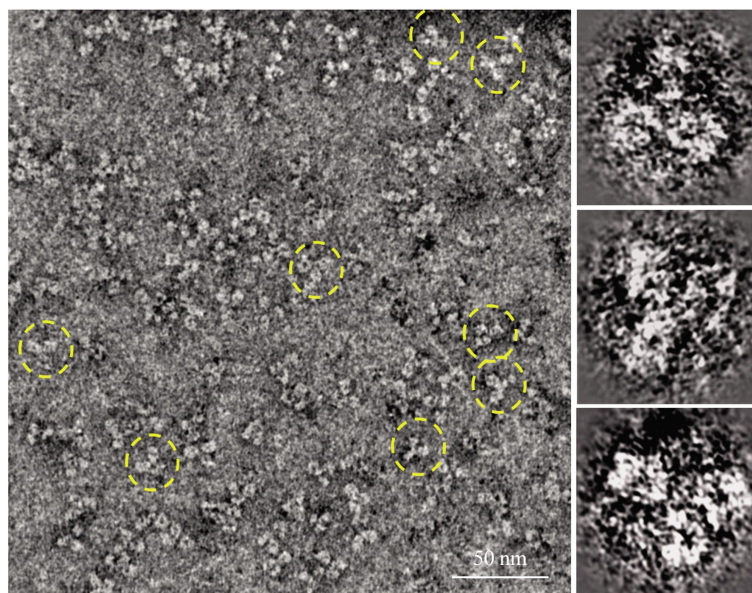


Fig. 2 TEM image of antibody sample^[27]

图 2 单个抗体结构的电镜观察^[27]

1.3 单个 IgG1 抗体的电子显微学电子断层三维重构

自从电子显微镜被应用于生物样品观察, 很快研究者们便意识到, 二维图像并不足以提供足够的

结构信息来进行有效的功能分析. 因此研发电子断层成像技术(electron tomography)用来研究生物样品的三维结构. 该方法首先要采集不同倾转角下的投

影照片,而后使用全套的完整照片进行图像对齐和三维反投影计算,获得目标大分子结构的电子密度图^[28].近年来,电镜三维重构技术已经广泛应用在较大尺度的生物样品如细胞切片^[29]、细胞核孔^[30]、微管结构^[31]、分子马达^[32]、病毒^[33-34]等.然而,直接使用电镜三维重构对小尺度分子的结构研究极少涉及.以前领域内的普遍观点认为单个蛋白质尺度极小,在电子束的密集照射下,极易出现辐照损伤,这会导致化学键断裂甚至结构改变,而在有限的辐照剂量下图像信号极低,难以获得有实用价值的三维结构^[28].近来,任罡和张磊等^[35]重新检验了电子断层三维重构方法应用于单个分子颗粒研究的可行性,优化了图像采集策略和三维重构算法.与传统的电子断层成像技术使用整张的电子显微镜照片进行对齐与三维重构不同,他们针对每个蛋白质颗粒的局域图像进行精细处理,通过追踪特定蛋白质颗粒在每张图像上的位置,将其相关图像区域取出,经行局部图像的迭代对齐重构,以此消除照片畸变带来的不利影响.不仅如此,在反投影、投影、对齐的迭代过程中,通过加入尺寸逐渐缩小的边缘光滑的动态图像掩模和截止频率逐渐升高的动态低通滤波,来逐渐削弱噪音造成的平移搜索误差,提高单个蛋白质颗粒图像的对齐精度,使三维重构的分辨率满足结构分析需求,这种图像处理策略被称为聚焦电子断层重构(focused electron tomography reconstruction, FETR).这种 IPET 方法已成功应用于多种小分子质量蛋白质的三维结构获取,其电子密度图分辨率能够达到或优于 20Å,重构获得的密度图能如实地反映单个蛋白质分子所展现的空间结构.

2 以 IPET 技术研究肽分子绑定抗体的结构变化

肽分子具有特异亲和性和低生物毒性,是极有应用价值的药物设计材料^[36].绑定肽的单克隆抗体既具有肽分子的生物活性,又具备抗体的药物动力学特性.然而,绑定肽的抗体分子通常表现出抗原亲和力和差的问题,并且可能存在目前未知的结构变化.由于抗体本身的结构活性,研究其构象改变极为困难.美国辉瑞制药公司的下属 Pfizer CovX LLC 研发公司开发了一种肽绑定抗体,有可能成为治疗肿瘤有效的选择性药物载体.但是在随后进行的病理实验中,该类肽绑定抗体并没有显示出对细胞表面目标具有有效的效用功能,并且绑定后的

肽和抗体支架的药物动力学预期不相符,因此人们怀疑肽的绑定,可能导致载体抗体的结构发生了改变.任罡研究小组的童慧敏等^[27]使用优化的负染色技术和电子断层三维重构技术,通过对绑定肽后抗体的二维图像和三维结构分析发现,结合肽后抗体的结构域变得更为细长.这表明该技术可用于研究大分子在药物作用下的结构构象变化.

2.1 从电镜图像观察肽绑定对抗体结构的影响

实验中用作载体的抗体是人体单克隆抗体 IgG 亚型 1,称为 h38C2(即 m38C2 抗体的人源化版本).未绑定肽的抗体样品(20.0 g/L)是用 HEK-239 细胞表达并用 A/G 蛋白色层分析法提纯.肽绑定抗体样品中,特异性设计的肽通过赖氨酸反应绑定在抗体的 F_{ab} 结构域.绑定后的抗体被辉瑞制药公司命名为 CovX-body,是一种新的化学类别,它具有肽的生物学特性和抗体持久的半衰期.该公司通过增强肽和药物端小分子的药物代谢动力学和药效学性质,成功地证明了该技术在数个疾病医药领域的实用性^[37].

绑定和未绑定肽的抗体电镜样品都是用优化负染方法制备^[27].样品的透射电子显微图像是在室温下用带有 20eV 能量过滤器的 Zeiss Libra 120 Plus 透射电子显微镜(Carl Zeiss NTS)和 Gatan UltraScan 4 kx4 k CCD 在 Scherzer 焦距下采集的;电镜操作电压为 120 kV,放大倍数为 80 k.未绑定肽和绑定肽的单克隆 IgG1 抗体的电镜图像如图 3 所示.

以实验图像为基础,研究者从以下 3 个方面对绑定和未绑定肽的抗体之间二维结构的不同点统计分析:a. 3 个结构域尺寸;b. 3 个结构域的形状;c. F_{ab} 结构域和 F_c 结构域之间的角度.

未绑定肽的抗体(总数 250)的几何平均尺寸分布显示,超过 90%的结构域分布在 50Å~80Å 之间,峰值(约 11.6%的抗体)在(66.8 ± 1.0)Å(图 4a).与此相对应的是,绑定肽的抗体(总数 332)的几何平均尺寸分布显示,超过 90%的结构域分布在 48Å~78Å 之间,峰值(约 10.8%的抗体)在(64.2 ± 1.0)Å(图 3a).抗体结构域尺寸大小在肽绑定前后没有本质变化.

用结构域的最大直径与其垂直直径的比值来分析结构域的形状.未绑定肽 h38C2 抗体的直径比分布显示,超过 90%的结构域分布在 1.0~1.8 之间,峰值(约 21.6%的抗体)在(1.28 ± 0.05)Å(图 3b).绑定肽抗体的直径比分布显示,超过 90%的结构域分布在 1.0~2.2 之间,峰值(约 12.5%的抗体)约

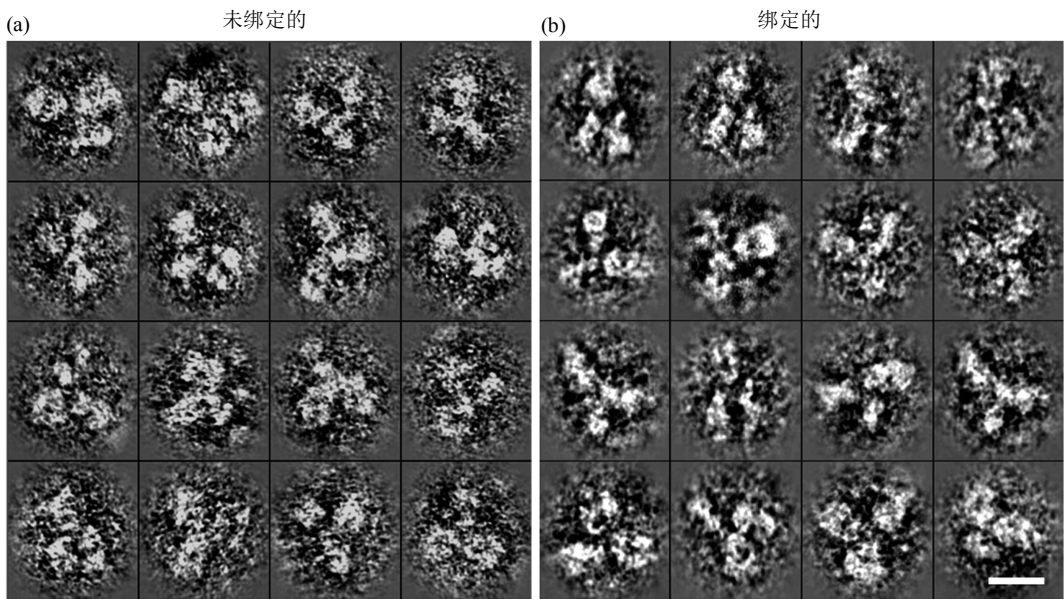


Fig. 3 peptide-conjugated and unconjugated antibodies^[27]

图 3 绑定与未绑定肽的抗体照片对比^[27]

(a)未绑定肽的抗体. (b)绑定肽的抗体(标尺长度为 10 nm)

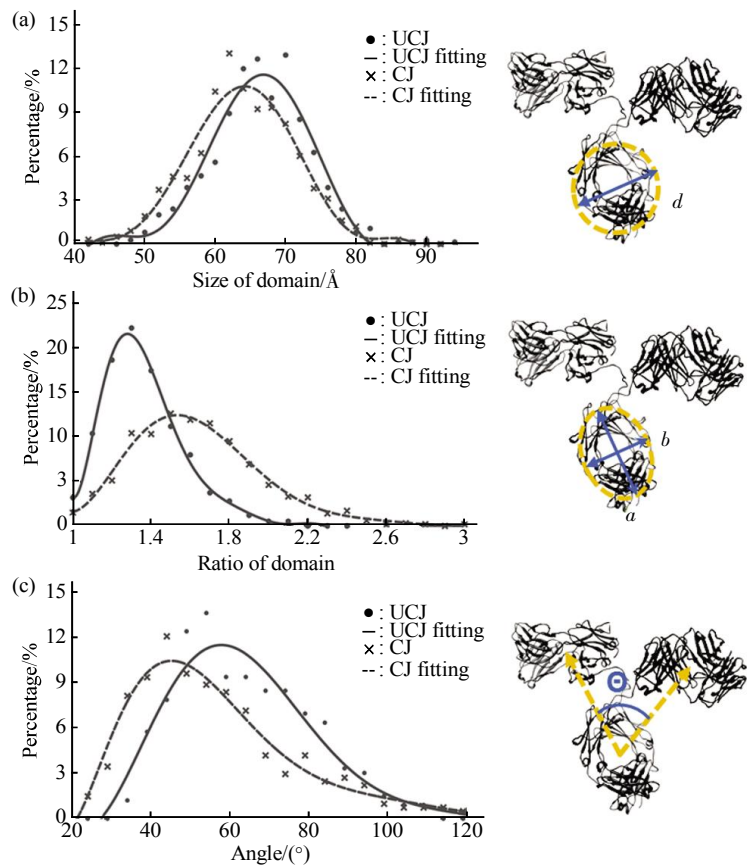


Fig. 4 Histogram of size, shape and F_{ab} - F_c - F_{ab} angle of antibody before and after peptide conjugation^[27]

图 4 IgG1 抗体在绑定肽前后结构域尺寸、形态、 F_{ab} - F_c - F_{ab} 的角度数据统计及多项式拟合^[27]

(a)几何平均直径(d). (b)长短轴比例(a/b). (c)中心夹角(θ)(UCJ: 未绑定肽的抗体; CJ: 绑定肽的抗体).

在 (1.53 ± 0.05) (图 4b), 肽绑定后抗体结构域的形状被拉长了约 20%. 考虑到结构域峰值尺寸在 $64\text{\AA} \sim 67\text{\AA}$ 左右, 肽绑定后的拉长对应约 $13\text{\AA}$ 的形态改变, 结构域形状发生了根本的改变.

未绑定肽的 h38C2 抗体的角度分布直方图显示, 超过 90% 的结构域角度在 $39\text{\AA} \sim 99\text{\AA}$ 之间, 峰值(约 11.6% 的抗体)在角度 $(57.8 \pm 2.5)\text{\AA}$ 左右(图 4c). 绑定抗体的角度分布直方图显示, 超过 90% 的结构域角度在 $29\text{\AA} \sim 94\text{\AA}$ 左右, 峰值(约 10.5% 的抗体)在角度 $(45.2 \pm 2.5)\text{\AA}$ 左右(图 4c). 因此, 肽绑定后抗体 F_{ab} - F_c - F_{ab} 角度峰值与未绑定肽的抗体相比大大减小. 肽绑定可能限制了抗体结构域

的自由运动的空间自由度.

以上统计分析表明, 肽绑定使抗体的结构域形态发生了变化, 同时结构域相对活动范围减小.

2.2 绑定肽前后的抗体三维结构比较

为了揭示肽绑定后抗体的结构改变, 研究者们应用 IPET 方法重构了肽绑定前后抗体的三维结构(图 5). 抗体样品被置于 Gatan 高倾转角度样品杆上, 在 $-60^\circ \sim 60^\circ$ 范围内进行倾转并收集图像, 图像采集间隔为 1.5° . 每个样品区域在图像采集过程受到的电子辐照剂量约为 $200\text{ e}^-/\text{\AA}^2$. 电镜样品杆的倾转和图像采集是通过 Gatan 断层成像控制软件来实现的^[38].

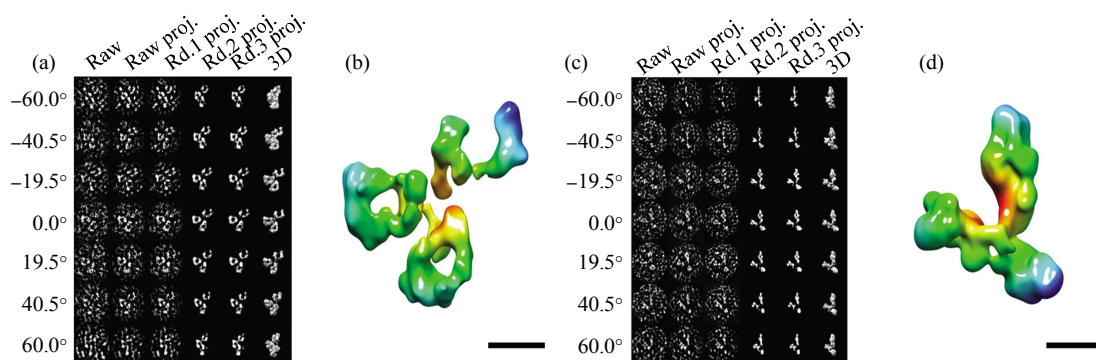


Fig. 5 3D reconstruction of antibody molecular by IPET^[27]

图 5 抗体分子应用 IPET 方法后的三维重构结果^[27]

(a, b)未绑定肽的抗体. (c, d)绑定肽的抗体(标尺长度为 5 nm, 体积显示为 1.3 倍的抗体分子质量所对应的体积).

重构结果的傅里叶壳层关联性分析表明, 其分辨率在 $17\text{\AA}$ 左右. 两个抗体的尺寸和形状有较大差异. 三维形态的变化可概括为各结构域的形状向长轴延伸, 模拟图如图 6 所示. 通过以上观察可以得出, 肽绑定到 F_{ab} 结构域导致了 F_{ab} 和 F_c 结构域形态都发生了改变. 实验证实辉瑞制药公司所使用的肽绑定 h38C2 抗体上后, 导致从 F_{ab} 结构域到 F_c 结构域一系列形变, 最终改变了抗体的整体结构, 也就改变了抗体的功能.

3 以 IPET 方法研究抗体的结构动态范围

了解蛋白如何发挥功能, 需要从分子层面上研究蛋白质的结构以及结构动态特性. 抗体是一种典型的具有高结构柔性的蛋白质, 揭示其结构动态特征, 对于理解抗体搜索结合抗原的结构机制非常重要. 任罡研究小组的张星等利用单个蛋白分子的电

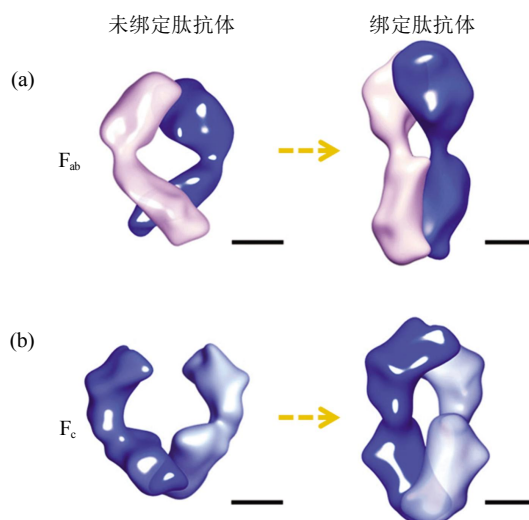


Fig. 6 Shape transfer of antibody after peptide conjugation^[27]

图 6 抗体在绑定肽后的形态转变示意图^[27]
(a) F_{ab} 结构域. (b) F_c 结构域. (标尺长度为 2 nm)

子显微三维重构方法进一步研究了 IgG1 抗体的结构动态特征.

3.1 IgG1 抗体不同三维构象的采集

使用同种抗体 IgG1(h38C2)进行实验, 按照同样的样品制备和数据采集方法, 进行了大量的电镜图像采集和三维重构. 以抗体分子三维重构单子密度图作为限制条件, 使用靶向的动力学模拟技术, 将 X 射线晶体结构对实验电子密度图进行了柔性匹配, 从而获得更加细致的结构信息和结构表示, 便于进行结构分析^[39]. 通过重复以上方法, 研究者获得了 IgG1 抗体大量的电子密度图. 并从中筛选出 120 个形态各异的 IgG1 三维构象, 如图 7 所示.

通过将这 120 个结构中的 F_c 结构域进行对齐, 重合的三维结构展现出一个树形的分布, 其中 F_{ab} 结构域由于空间位置和角度的不确定性, 分布在一个半椭球的区域中(图 8).

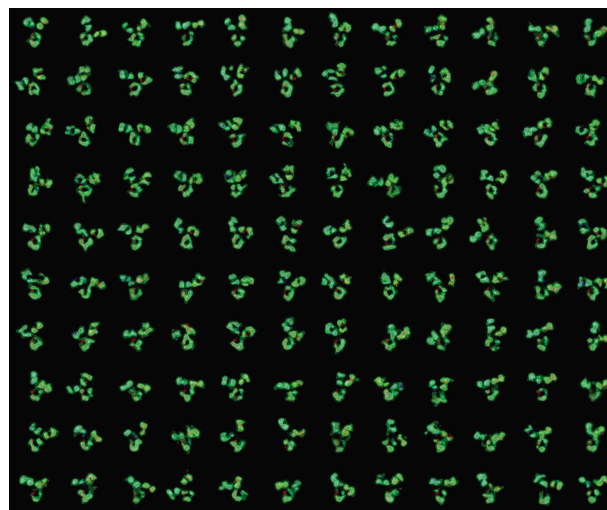


Fig. 7 Gallery of IgG1 antibody conformations^[39]

图 7 IgG1 抗体大量不同构象的收集^[39]

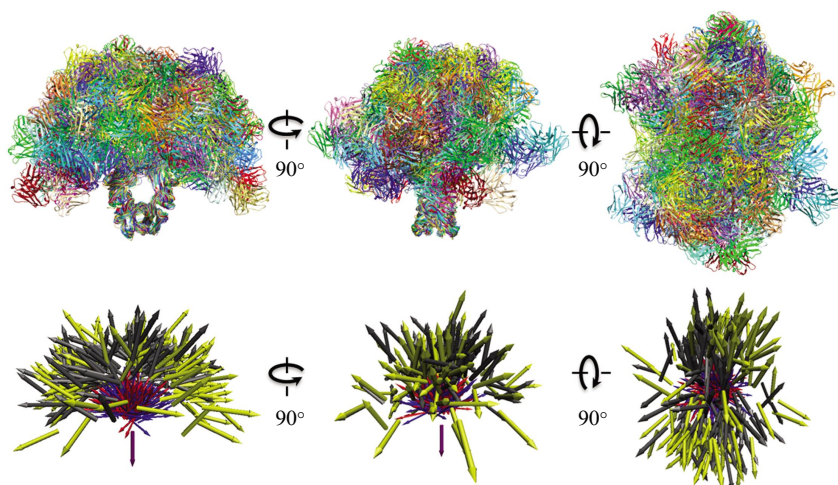


Fig. 8 3D distribution of IgG1 antibody conformations^[39]

图 8 IgG1 抗体构象的三维空间分布^[39]

3.2 抗体结构动态特征的统计分析

研究者们从以下四个方面对该抗体的结构分布进行量化的统计分析:

a. 结构域之间的质心距离分布(图 9a). 结果表明所有的距离都在 $60\text{\AA} \sim 120\text{\AA}$ 的范围内. 这与原子力显微镜多测量的溶液条件下 IgG1 抗体的迁移步长相一致^[40]. 两个 F_{ab} 结构域之间距离的数量峰值出现在约 $(82.0 \pm 2.5)\text{\AA}$ (约占总数的 17.6%). F_{ab} 和 F_c 结构域之间距离的数量峰值出现在约 $(85.0 \pm 2.5)\text{\AA}$ (约占总数的 16.1%). IgG1 抗体的结构中 3 个结构域平均空间距离近似相等.

b. F_{ab} - F_c - F_{ab} 结构域构成的角度分布(图 9b). 直方图表明超过 90% 的抗体其夹角约在 $40^\circ \sim 72^\circ$ 之间. 其中角的数量峰值($\sim 28.8\%$)出现在 $(56.6 \pm 4.0)^\circ$, 表明拥有等边三角形形状的抗体具有最大的出现概率. 这个数量峰值与通过 X 射线和中子散射得到的 IgA1 角度相符^[41], 但是此结果与 X 射线散射实验得到的 IgD^[42]、X 射线和中子散射实验得到的 IgA2 角度 $\sim 180^\circ$ ^[43] 不一致.

c. 各结构域朝向之间夹角的分析(图 9c). 结构域的朝向定义成由结构域的链接端(Y 字形的交叉处), 指向结构域顶端, 2 个 F_{ab} 结构域朝向之间

夹角的数量峰值约(135.4 ± 5.0)°, 而 70% 以上的夹角分布在 $90^\circ \sim 160^\circ$ 之间. 这个范围和由抗体三维结构的 AFM 测量法得到的结果一致. F_{ab} - F_c 结构域朝向之间角度的数量峰值约是(124.7 ± 5.0)°. 这些数据表明, 3 个结构域通常处于舒展状态且方向相对自由. 良好的活动性和向外的朝向, 保证了抗体的抗原结合部位有着充分的自由度来搜索抗原表面结合位点并调整适应结合方向.

d. 2 个结构域平面的法线间夹角(图 9d). 由 VMD 软件^[44]计算得到的结构域最大惯量主轴来确

定(因为 F_{ab} 结构域中的重链和轻链在当前分辨率下不能被分辨, 定义二面角范围为 $0^\circ \sim 90^\circ$). 这个角度分布表明了 2 个结构域平面间的夹角几乎均匀地分布在 $10^\circ \sim 90^\circ$ 之间. 在 10° 以下分布出现了下降, 这表明结构域所在平面之间, 相对角度几乎自由, 然而通常不会平行, 这有可能是长程分子间作用力形成的势能位阻造成^[40].

这些结构统计分析, 揭示了 IgG1 抗体的三维结构柔性特征和结构涨落空间. 为人们进一步研究抗体的结构机制和功能优化提供了基础.

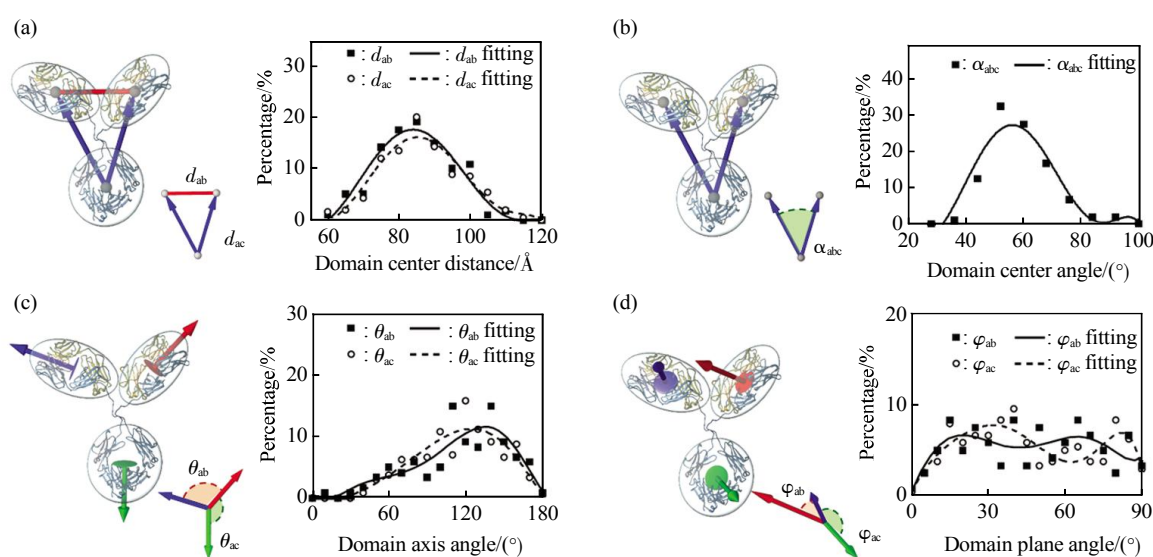


Fig. 9 Histogram of antibody structural characteristics^[39]

图 9 IgG1 抗体构象的结构统计特征^[39]

4 总结与展望

以往蛋白质三维结构的检测手段常常仅提供单一、静态的三维结构. 在这些技术中, 对于像抗体这样的具有极强结构柔性和多样性的生物大分子, 其结构柔性、结构动态特征通常被忽略. 本文所用的 IPET 方法, 不仅可以用于检测单个小尺寸蛋白质结构的构象, 而且能够通过对大量不同构象分子的收集与统计分析, 来研究蛋白质的结构柔性及结构动态的构象空间. IPET 方法的核心是图像的精确对齐和三维反投影, 并不受限于样品制备方法的选择, 实际应用中证明 IPET 方法对于冷冻方法制备的样品同样适用, 例如 CETP 结合脂质体的复合体形态研究^[45]、17 nm 高密度脂蛋白的形态研

究^[35], 由于冷冻样品照片的高噪音, 其结果的空间分辨率限制在 $\sim 35 \text{ \AA}$ 附近.

冷冻电镜单颗粒三维重构技术, 从大量同种分子不同三维投影角度的照片出发, 通过平均策略来提高信噪比, 能最高获得 $\sim 2 \text{ \AA}$ 的空间分辨率, 达到重建氨基酸侧链的等级, 然而却由于初始模型的依赖性和算法中包含的平均过程而难以用于研究具有结构柔性的蛋白质. IPET 方法从每个单个分子出发, 收集不同角度下的断层图像, 该方法尤其适合于研究结构柔性高的蛋白质, 而其缺点是空间分辨率较低, 仅能够达到分辨结构域的等级. 这正好与单颗粒三维重构技术形成互补.

在目前电子断层重构技术条件下, 使用冷冻样品制备方法, 难以观察分子质量较小的抗体样品,

因而本文所涉及的结果使用负染方法来完成。负染技术能够提供高衬度的图像, 但由于染色剂的结晶化和在大分子周围的非均匀分布, 造成衬度的起伏和蛋白质局部形变, 因而三维重构分辨率被限制在 20Å 左右, 同时受限于干燥过程和染色剂层的厚度, 垂直于样品网平面的方向上大分子的空间自由度受到一定程度的压缩。如何保持蛋白质自然状态的同时提高分辨率, 仍是负染技术发展的重点^[25, 46]。一些将负染方法与冷冻方法相结合的策略逐渐得到应用, 主要有冷冻正染色^[47]和冷冻负染方法^[48-49], 通过在冷冻样品制备流程中加入染色剂, 能够获得更高的图像衬度, 同时由于去除了干燥过程, 染色剂所造成的假象或蛋白畸变也得到了有效的抑制。另一方面, 对于理论上能够提供原子级高分辨信息的冷冻样品制备方法, 提高实验图像的衬度和低信噪比图像对齐算法精度, 是发展的主要方向。随着针对生物冷冻样品的相位衬度成像^[50-52]和直接电子探测成像技术的日趋成熟^[53], 获取更加自然的、功能状态下的单个蛋白质分子的高分辨三维结构将成为可能。

蛋白质在自然状态下具有动态结构, 动态结构是蛋白质功能发挥的结构基础^[54]。IPET 技术有望广泛应用于柔性蛋白质的结构研究, 成为一种深入理解蛋白质动力学特性的普适方法。

参 考 文 献

- [1] 周爱儒. 生物化学 第六版 北京: 人民卫生出版社, 2005
- [2] Litman G W, Rast J P, Shambloot M J, *et al.* Phylogenetic diversification of immunoglobulin genes and the antibody repertoire. *Mol Biol Evol*, 1993, **10**(1): 60-72
- [3] Market E, Papavasilou F N. V(D)J recombination and the evolution of the adaptive immune system. *Plos Biol*, 2003, **1**(1): 24-27
- [4] Friden P M, Walus L R, Musso G F, *et al.* Anti-transferrin receptor antibody and antibody-drug conjugates cross the blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**(11): 4771-4775
- [5] Allen T M. Long-circulating (sterically stabilized) liposomes for targeted drug delivery. *Trends in Pharmacological Sciences*, 1994, **15**(7): 215-220
- [6] Sellers W R, Fisher D E. Apoptosis and cancer drug targeting. *The Journal of Clinical Investigation*, 1999, **104**(12): 1655-1661
- [7] Harris L J, Larson S B, Hasel K W, *et al.* Refined structure of an intact IgG2a monoclonal antibody. *Biochemistry*, 1997, **36** (7): 1581-1597
- [8] Harris L J, Skaletsky E, McPherson A. Crystallographic structure of an intact IgG1 monoclonal antibody. *J Mol Biol*, 1998, **275** (5): 861-872
- [9] Saphire E O, Parren P W, Pantophlet R, *et al.* Crystal structure of a neutralizing human IGG against HIV-1: a template for vaccine design. *Science*, 2001, **293**(5532): 1155-1159
- [10] Bundle D R, Baumann H, Brisson J-R, *et al.* The solution structure of a trisaccharide-antibody complex: comparison of NMR measurements with a crystal structure. *Biochemistry*, 1994, **33**(17): 5183-5192
- [11] Kleinjung J, Petit M C, Orlewski P, *et al.* The third-dimensional structure of the complex between an Fv antibody fragment and an analogue of the main immunogenic region of the acetylcholine receptor: A combined two-dimensional NMR, homology, and molecular modeling approach. *Biopolymers*, 2000, **53**(2): 113-128
- [12] Constantine K L, Friedrichs M S, Metzler W J, *et al.* Solution structure of an isolated antibody V L domain. *J Mol Biol*, 1994, **236**(1): 310-327
- [13] Wilson I A, Stanfield R L. Antibody-antigen interactions: new structures and new conformational changes. *Curr Opin Struct Biol*, 1994, **4**(6): 857-867
- [14] Nogales E, Scheres S H. Cryo-EM: a unique tool for the visualization of macromolecular complexity. *Molecular Cell*, 2015, **58**(4): 677-689
- [15] Li X, Mooney P, Zheng S, *et al.* Electron counting and beam-induced motion correction enable near-atomic-resolution single-particle cryo-EM. *Nat Methods*, 2013, **10**(6): 584-590
- [16] Cheng Y, Grigorieff N, Penczek P A, *et al.* A primer to single-particle cryo-electron microscopy. *Cell*, 2015, **161**(3): 438-449
- [17] Correia I, Sung J, Burton R, *et al.* The structure of dual-variable-domain immunoglobulin molecules alone and bound to antigen. *mAbs*, 2013, **5**(3): 364-372
- [18] Diebold C A, Beurskens F J, De Jong R N, *et al.* Complement is activated by IgG hexamers assembled at the cell surface. *Science*, 2014, **343**(6176): 1260-1263
- [19] Vulovic M, Voortman L M, Van Vliet L J, *et al.* When to use the projection assumption and the weak-phase object approximation in phase contrast cryo-EM. *Ultramicroscopy*, 2014, **136**(1): 61-66
- [20] Bongini L, Fanelli D, Piazza F, *et al.* Freezing immunoglobulins to see them move. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**(17): 6466-6471
- [21] Sandin S, fverstedt L G, Wikström A C, *et al.* Structure and flexibility of individual immunoglobulin G molecules in solution. *Structure*, 2004, **12**(3): 409-415
- [22] Van Bueren J J L, Bleeker W K, Brännström A, *et al.* The antibody zalutumumab inhibits epidermal growth factor receptor signaling by limiting intra-and intermolecular flexibility. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(16): 6109-6114
- [23] Lammerts Van Bueren J, Bleeker W, Brännström A, *et al.* Retraction for Lammerts van Bueren *et al.* The antibody zalutumumab inhibits epidermal growth factor receptor signaling by limiting intra-and intermolecular flexibility. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, **109**(14): 5548-5548
- [24] Zhang L, Tong H, Garewal M, *et al.* Optimized negative-staining electron microscopy for lipoprotein studies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2013, **1830** (1): 2150-2159

- [25] Rames M, Yu Y, Ren G. Optimized negative staining: a high-throughput protocol for examining small and asymmetric protein structure by electron microscopy. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, 2014(90): e51087–e51087
- [26] Garewal M, Zhang L, Ren G. Optimized negative-staining protocol for examining lipid-protein interactions by electron microscopy. *Lipid-Protein Interactions: Methods and Protocols*, 2013: 111–118
- [27] Tong H, Zhang L, Kaspar A, *et al.* Peptide-conjugation induced conformational changes in human IgG1 observed by optimized negative-staining and individual-particle electron tomography. *Scientific Reports*, 2013, **3**: 1089
- [28] Ercius P, Alaidi O, Rames M J, *et al.* Electron tomography: a three-dimensional analytic tool for hard and soft materials research. *Advanced Materials*, 2015, **27**(38): 5638–5663
- [29] Gan L, Jensen G J. Electron tomography of cells. *Q Rev Biophys*, 2012, **45**(01): 27–56
- [30] Beck M, Lucic V, Förster F, *et al.* Snapshots of nuclear pore complexes in action captured by cryo-electron tomography. *Nature*, 2007, **449**(7162): 611–615
- [31] Sui H, Downing K H. Molecular architecture of axonemal microtubule doublets revealed by cryo-electron tomography. *Nature*, 2006, **442**(7101): 475–478
- [32] Cope J, Gilbert S, Rayment I, *et al.* Cryo-electron tomography of microtubule-kinesin motor complexes. *J Struct Biol*, 2010, **170**(2): 257–265
- [33] Hu B, Margolin W, Molineux I J, *et al.* The bacteriophage t7 virion undergoes extensive structural remodeling during infection. *Science*, 2013, **339**(6119): 576–579
- [34] Cardone G, Winkler D C, Trus B L, *et al.* Visualization of the herpes simplex virus portal *in situ* by cryo-electron tomography. *Virology*, 2007, **361**(2): 426–434
- [35] Zhang L, Ren G. IPET and FETR: experimental approach for studying molecular structure dynamics by cryo-electron tomography of a single-molecule structure. *PloS One*, 2012, **7**(1): e30249
- [36] Otvos Jr L. Peptide-based drug design: here and now. *Peptide-Based Drug Design*. Springer, 2008: 1–8
- [37] Doppalapudi V R, Tryder N, Li L, *et al.* Chemically programmed antibodies: endothelin receptor targeting CovX-Bodies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2007, **17**(2): 501–506
- [38] Zheng S Q, Keszthelyi B, Branlund E, *et al.* UCSF tomography: an integrated software suite for real-time electron microscopic tomographic data collection, alignment, and reconstruction. *J Struct Biol*, 2007, **157**(1): 138–147
- [39] Zhang X, Zhang L, Tong H, *et al.* 3D structural fluctuation of IgG1 antibody revealed by individual particle electron tomography. *Scientific Reports*, 2015, **5**: 11
- [40] Preiner J, Kodera N, Tang J, *et al.* IgGs are made for walking on bacterial and viral surfaces. *Nature Communications*, 2014, **5**(3): 4394
- [41] Bonner A, Almogren A, Furtado P B, *et al.* Location of secretory component on the Fc edge of dimeric IgA1 reveals insight into the role of secretory IgA1 in mucosal immunity. *Mucosal Immunology*, 2009, **2**(1): 74–84
- [42] Sun Z, Almogren A, Furtado P B, *et al.* Semi-extended solution structure of human myeloma immunoglobulin D determined by constrained X-ray scattering. *J Mol Biol*, 2005, **353**(1): 155–173
- [43] Furtado P B, Whitty P W, Robertson A, *et al.* Solution structure determination of monomeric human IgA2 by X-ray and neutron scattering, analytical ultracentrifugation and constrained modelling: a comparison with monomeric human IgA1. *J Mol Biol*, 2004, **338**(5): 921–941
- [44] Humphrey W, Dalke A, Schulten K. VMD: visual molecular dynamics. *Journal of Molecular Graphics*, 1996, **14**(1): 33–38
- [45] Zhang M, Charles R, Tong H, *et al.* HDL surface lipids mediate CETP binding as revealed by electron microscopy and molecular dynamics simulation. *Scientific Reports*, 2015, **5**: 8741
- [46] De Carlo S, Harris J R. Negative staining and cryo-negative staining of macromolecules and viruses for TEM. *Micron*, 2011, **42**(2): 117–131
- [47] Zhang L, Yan F, Zhang S, *et al.* Structural basis of transfer between lipoproteins by cholesteryl ester transfer protein. *Nature Chemical Biology*, 2012, **8**(4): 342–349
- [48] Adrian M, Dubochet J, Fuller S D, *et al.* Cryo-negative staining. *Micron*, 1998, **29**(2): 145–160
- [49] El-Bez C, Adrian M, Dubochet J, *et al.* High resolution structural analysis of *Helicobacter pylori* VacA toxin oligomers by cryo-negative staining electron microscopy. *J Struct Biol*, 2005, **151**(3): 215–228
- [50] Fukuda Y, Laugks U, Lučić V, *et al.* Electron cryotomography of vitrified cells with a Volta phase plate. *J Struct Biol*, 2015, **190**(2): 143–154
- [51] Danev R, Nagayama K. Single particle analysis based on Zernike phase contrast transmission electron microscopy. *J Struct Biol*, 2008, **161**(2): 211–218
- [52] Glaeser R M. Invited review article: methods for imaging weak-phase objects in electron microscopy. *Review of Scientific Instruments*, 2013, **84**(11): 111101
- [53] Faruqi A, Henderson R, McMullan G. Chapter two-progress and development of direct detectors for electron cryomicroscopy. *Advances in Imaging and Electron Physics*, 2015, **190**: 103–141
- [54] Boehr D D, Nussinov R, Wright P E. The role of dynamic conformational ensembles in biomolecular recognition. *Nature Chemical Biology*, 2009, **5**(11): 789–796

3D Reconstruction and Structural Study of IgG1 Antibody by Individual-particle Electron Tomography*

ZHANG Xing^{1,2)}, LIAO Yu-Heng^{1,2)}, TONG Hui-Min²⁾, ZHANG Lei^{1,2)}, ZHANG Sheng-Li^{1)**}, REN Gang^{2)**}

⁽¹⁾ Department of Applied Physics, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049, China;

⁽²⁾ The Molecular Foundry, Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, CA 94720, USA)

Abstract Antibody (also named as an immunoglobulin, Ig), a most important macromolecule for immune response in human body, has been developed as macromolecular drug to treat the cancer and immune diseases. Understanding of antibody three-dimensional (3D) structure and fluctuation could be an important step for further understanding and controlling the antibody pharmacological function. However, the study is limited by antibody flexible structure. In this paper, we reviewed the current research progresses on structural study of human IgG1 antibody conducted by our recently developed individual-particle electron tomography (IPET) method. The review includes the sample preparation method, basic logic of image processing strategy, 3D analysis and its application in antibody-drug conjugation and antibody structural fluctuation. We also discussed the strengths and weakness of the technique.

Key words antibody, immunoglobulin, transmission electron microscopy technique, individual-particle electron tomography

DOI: 10.16476/j.pibb.2015.0389

* This work was supported by grants from U.S. Department of Energy (DE-AC02-05CH11231), U.S. NIH (NHLBI, #1R01HL115153) and The National Natural Science Foundation of China (11374237, 11504287).

**Corresponding author.

ZHANG Sheng-Li. Tel: 86-29-82663366, E-mail: zhangsl@mail.xjtu.edu.cn

REN Gang. Tel: 1-510-495-2375, E-mail: gren@lbl.gov

Received: June 16, 2016 Accepted: July 25, 2016