

www.pibb.ac.cn



原位冷冻电镜技术和可视蛋白质组学前沿*

亮1)** 孙 李宽莹1) 王闻雪1) 朱 蘅^{1)**} 薛 K 1,2)

(¹⁾ 中国科学院生物物理研究所生物大分子国家重点实验室,北京100101;²⁾ 中国科学院广州生物医药与健康研究院,广州 510530)

摘要 近年来,随着原位冷冻电镜技术和人工智能技术的不断发展,结构生物学的研究模式发生了重大转变。结构解析不 再局限于分离提纯的单一生物大分子,而是在细胞甚至组织内原位直接解析生物大分子的高分辨率结构,并对亚细胞区域 整体分子景观进行结构探索,从而更深刻地理解细胞与组织内生命活动的分子机制。通过展示细胞内不同蛋白质复合物的 精细原位结构,可以进一步生成蛋白质组的可视化定量空间分子结构功能图谱,即可视蛋白质组学。以原位冷冻电镜技术 为代表的新技术能够在空间水平阐明细胞内蛋白质组的三维相互作用网络,促进从整体上系统性地理解细胞内生物大分子 结构功能与互作机制。为推动中国原位冷冻电镜技术和可视蛋白质组学的发展,本文总结了其研究模式和最新前沿进展, 结合具体实例展示了新概念与新技术的先进性,并对发展前景进行了展望。

关键词 结构生物学,细胞生物学,系统生物学,冷冻电镜,冷冻电子断层成像,可视蛋白质组学,子断层结构分析,冷 冻光电关联,人工智能 中图分类号 Q6-3

20世纪90年代初随着X射线晶体学与核磁共 振波谱学的成熟,一批有远见的科学家提出"结构 生物学的时代已经开始"。冷冻电镜技术的发展, 尤其是冷冻电镜单颗粒技术 (cryo-electron microscopy single particle analysis, cryo-EM/SPA) 分辨率革命(resolution revolution)的实现将生物 大分子复合物结构研究推向高峰。在过去的几十年 里,结构生物学在解析大分子结构与理解大分子功 能机制方面取得了巨大的成功。近年来,以 AlphaFold为代表的人工智能结构预测算法的出现, 预示着结构生物学将从传统的解析单一大分子或复 合物结构的时代进入到一个新的时代。冷冻电子断 层成像(cryo-electron tomography, cryo-ET) 等原 位结构生物学(in situ structural biology)技术的快 速发展,使得在细胞甚至组织内原位直接解析生物 大分子的高分辨率结构成为可能。可视蛋白质组学 (visual proteomics)、分子社会学 (molecular sociology)、结构细胞生物学(structural cell biology)等新概念层出不穷。这些概念预示着一 个相同的未来发展方向,即在更接近自然状态下, 更深刻地理解生命基本单元细胞,乃至组织内部复

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0330

杂生命活动的高分辨分子机制。

在众多原位冷冻电镜技术衍生的新概念中,可 视蛋白质组学显得尤为突出。可视化技术在生命科 学研究的各个层面都发挥着重要的作用,通俗来讲 就是"眼见为实"("Seeing is believing")。可视 蛋白质组学的概念最早出现于2006年^[1],旨在通 过展示细胞内蛋白质的原位结构和空间位置, 生成 细胞蛋白质组的定量的、可视化的空间分子结构功 能图谱 (spatial structural and functional landscape)。 可视蛋白质组学连接了分子水平的蛋白质结构与细 胞整体结构之间的鸿沟,能够以前所未有的方式深 入探索细胞内蛋白质相互作用网络,也可以称作 "分子社会学" (molecular sociology)^[2-3]。相比而 言, 传统的蛋白质组学主要借助质谱技术 (mass spectrometry, MS)分析特定细胞或亚细胞的蛋白

^{*}国家杰出青年科学基金(31925026)和国家重点研发计划 (2021YFA1301500)资助项目。

^{**} 通讯联系人。

朱赟 Tel: 010-64888582, E-mail: zhuyun@ibp.ac.cn

薛亮 Tel: 010-64887252, E-mail: liangxue@ibp.ac.cn

收稿日期: 2024-07-17, 接受日期: 2024-08-16

质组成。尽管可以定性或定量地鉴定蛋白质,但却 无法获取蛋白质的空间位置和取向信息,也无法解 析蛋白质精细结构。因此,可视蛋白质组学不仅是 对结构生物学,也是对传统蛋白质组学的拓展,可 以实现对细胞内原位蛋白质组的系统结构研究。以 cryo-ET 为代表的原位冷冻电镜技术能够捕捉细胞 在近自然状态下的"快照",是可视蛋白质组学的 关键研究手段。这种快照包含了细胞三维空间内丰 富且复杂的全部分子结构信息。通过将这些信息与 质谱信息、已解析蛋白质结构信息以及人工智能方 法相结合,就可能实现对细胞内原位蛋白质组的三 维可视化呈现。2009年, Beck 等^[4]结合 cryo-ET 和定量质谱技术,首次对人类病原体钩端螺旋体进 行了可视蛋白质组学研究的尝试。同时期,欧洲分 子生物学实验室结合 cryo-ET 与串联亲和纯化质谱 技术、转录组学、代谢组学等对肺炎支原体进行了 系统生物学研究^[5-7]。尽管受到技术限制,这些研 究仅对若干蛋白质或复合物进行了初步的可视化探 索,但提供了可视蛋白质组学研究的重要范例。

细胞作为生命的基本单元,其中分子以自组织 的方式相互作用,形成多样的大分子复合体以及动 态的亚细胞结构,进而组成一个无比复杂的系统。 截至2024年7月,国际蛋白质数据库PDB中已解 析了222036个蛋白质结构,但仍无法回答细胞如 何从分子产生生命活动这一终极问题。可视蛋白质 组学结合分子社会学以及结构细胞生物学等多种技 术方法,有助于深入全面地理解细胞这个复杂系 统^[8]。当前,原位冷冻电镜技术正处于高速发展 的阶段,众多软件和硬件的创新不断推动该技术走 向成熟,实现可视蛋白质组与分子社会学的愿景。 本文将就原位冷冻电镜技术和可视蛋白质组学的最 新发展趋势以及背后的技术基础等方面做出综述。

原位冷冻电镜与可视蛋白质组学发展的 新研究模式

1.1 复杂多组分复合物的结构解析

传统的结构生物学技术通常需要将目标样品从 生物体天然环境中分离纯化出来,是否能够保持大 分子复合物的天然结构往往存疑。很多生物大分子 复合物中,各组分之间仅通过较弱的相互作用结 合,或者只有在特定的生物体时空环境下才结合在 一起。分离提纯的过程中,物理或化学作用很可能 会破坏这些相互作用,造成复合物组分的缺失或结 构的变化。而 cryo-ET 通常在细胞内原位直接分析 目标复合物的三维结构信息,可以最大程度地保持 复合物整体结构的完整性,获得天然状态下的复合 物结构信息。同时, cryo-ET 避免了分离提纯操作 可能引起的非天然聚集、结构破坏或错误折叠等, 确保观察到的复合物是自然状态下的自然组装形 式。对于膜蛋白来说,原位结构研究具有重要的意 义。膜蛋白的结构和功能高度依赖于其所处的脂质 环境,传统的结构解析方法难以在类似天然膜环境 的条件下研究膜蛋白,而原位冷冻电镜技术可以在 自然的膜环境中直接观察膜蛋白的结构构象变化, 从而对相关生理功能机制有更深刻的了解。

一个突出的例子是核孔复合物 (nuclear pore complex, NPC)的结构研究。NPC是由细胞核的 内外核膜融合形成的孔状复合结构,是负责调控核 质运输的重要通道⁹。NPC的分子质量高达120 Mu, 由约30种不同的核孔蛋白 (nucleoporins, Nups) 组成,这些不同的Nups先组成多个亚复合体(如 Y 复 合 体), 再 相 互 连 接 组 成 胞 质 纤 维 (cytoplasmic filament)、胞质环 (cytoplasmic ring, CR)、内环 (inner ring, IR)、腔内环 (luminal ring, LR)、核质环 (nuclear ring, NR) 和核篮 (nuclear basket, NB) 等结构(图 la)^[10-11]。借助 于传统结构生物学技术,人们对分离提纯的NPC 样品进行了广泛的结构研究。比如,利用 cryo-EM/ SPA技术解析了 3~4 Å分辨率的非洲爪蟾卵母细胞 NPC的CR结构,搭建了CR近完整的分子模 型^[12];此外,还分别以4.2 Å和5.6 Å的平均分辨 率解析了非洲爪蟾NPC的IR^[13]和NR^[14]结构并搭 建结构模型。这些离体的结构信息虽然为理解 NPC 的组装和功能提供了重要的实验数据,但 NPC更完整的结构以及与核膜相互作用的功能状 态信息却只有通过原位结构研究才能揭示。

2016年,Baumeister课题组^[15]利用 cryo-ET技 术首次在 HeLa 细胞核周的原位环境中观察了完整 NPC 结构,发现 NPC 在胞内环境中具有可变化的 直径,这种特殊的结构特征与其所处的复杂细胞环 境相关。在对不同压力状态下裂殖酵母细胞的 NPC 进行原位结构研究后,Beck课题组^[16]发现, 指数生长期的裂殖酵母 NPC 处于直径较大的扩张 状态,而应激状态下的 NPC 处于直径较大的扩张 状态,并且发现核质转运过程在 NPC 处于收缩态时 受到抑制。Schwartz课题组^[17]通过研究 DLD-1细 胞 NPC 原位结构,发现天然状态下 NPC 内环直径 更宽、通道体积增大,核质环和胞质环发生变构, 揭示了NPC固有的结构灵活性。2022年,Beck课题组^[18]结合 cryo-EM 和 cryo-ET 技术捕获了在收缩和原位扩张两种状态下的NPC 构象,绘制了大约70 Mu 的近完整 NPC 支架结构,获得了目前最完整的功能态 NPC结构。Rout 课题组^[19]同时研究了酵母 NPC 分离纯化的结构与原位结构,阐明了NPC 各个骨架结构之间的连接方式,并发现了细胞内同时存在拥有不同结构组分的 NPC 异构体。2024年,Villa 课题组^[20]利用 cryo-ET 和综合结构建模技术,首次解析了 NB 的结构模型,揭示了其发挥生理功能的关键结构基础。同年,Beck 课题组^[21]借助冷冻光电关联(correlative light and electron cryo-microscopy, cryo-CLEM)和 cryo-ET 技术揭示了人类免疫缺陷病毒 HIV-1 进入原发性巨

噬细胞细胞核的过程,阐明HIV核衣壳独特的锥形有利于破解NPC的环状结构,使其顺利通过NPC。

以上结果展示了原位冷冻电镜在复杂多组分复 合物结构解析中的巨大优势。作为结构生物学的圣 杯,NPC巨大的分子质量以及复杂的生理功能使 得传统结构生物学在其相关的结构解析方面显得作 用有限,而原位冷冻电镜则在其复杂功能状态的结 构解析中发挥了重要的互补作用。从对NPC的结 构解析中可以发现,原位冷冻电镜不仅有助于解析 那些难以在体外环境中稳定制备的复杂多组分大分 子复合物结构,而且能够捕获复合物在不同功能状 态下的结构,有利于促进对生物大分子结构和功能 更深刻的理解。



Fig. 1 Examples of cryo-ET studies on the structural composition of complex multi-component assemblies 图1 Cryo-ET研究复杂多组分复合物结构组成的示例

(a)利用原位冷冻电镜技术解析的核孔复合物结构(PDB: 7R5K),样品来源为人类DLD-1细胞系。Tomogram来源于EMPIARC-10700。CR,胞质环;LR,腔内环;NR,核质环。(b)利用原位冷冻电镜技术解析的精子轴丝复合物(PDB: 8I7R)。样品来源为小鼠附睾精子。Tomogram来源于孙飞课题组未发表数据。(c)利用冷冻电镜技术解析的DHPR-RyR1超级复合物(PDB: 5GJW)。样品来源为昆明小鼠骨骼肌纤维。Tomogram来源于孙飞课题组未发表数据。DHPR,二氢吡啶受体;RyR1,1型雷诺丁受体。

1.2 捕捉瞬时动态超分子组装体

除了复杂多组分复合体,原位冷冻电镜技术也 有可能捕捉到瞬时存在的,或者依赖特定细胞环境 才能形成的超分子组装体。传统结构生物学技术通 常研究分离纯化的样品,无法保留细胞内分子间的 瞬时相互作用。而在原位条件下快速冷冻的细胞 内,生物大分子可能被固定在生理过程中任一时刻 的互作状态。例如,在原核细胞中由于没有细胞核 的存在,核糖体可以翻译正在转录中的新生 mRNA,并与RNA聚合酶(RNAP)直接相互作用 形成转录-翻译偶联组装体(expressome)。尽管 "人为"体外组装 RNAP和核糖体后进行 cryo-EM/ SPA可以解析若干组装体结构^[22-24],但体外组装依 赖所加入的特定蛋白质组分和实验条件,无法反应 细胞内的真实情况。利用完整肺炎支原体细胞进行 cryo-ET研究,Rappsilber与Mahamid课题组^[25]首 次在细胞内原位解析了由 RNAP和核糖体形成的超 分子组装体,结合交联质谱技术(crosslinking MS)和综合结构建模发现,转录因子 NusA (N-utilization substance A)处于 RNAP和核糖体之 间的mRNA通路附近,介导了动态的转录-翻译偶 联过程(图2)。用抗生素抑制翻译导致解偶联, 而抑制转录延伸则会挤掉"NusA"并导致RNAP 和核糖体间直接碰撞,表明转录-翻译偶联只有在 天然细胞环境中当转录与翻译正在持续进行时才能 被正确解析。这项工作也是首次将 cryo-ET 和原位 交联质谱这两项最具潜力的原位结构生物学手段结合起来。此外,孙飞课题组^[26]利用 cryo-ET 首次解析了骨骼肌中肌浆网上钙离子释放通道 RyR1 与细胞膜内陷形成的T管上的电压依赖L型钙离子通道 DHPR 间形成的兴奋-收缩偶联三联体原位结构(图1c)。Cryo-ET 还在解析酵母中线粒体与内质网



 Fig. 2
 Systematic structural analysis of the translation machinery in Mycoplasma pneumoniae cells by cryo-ET

 图2
 Cryo-ET系统解析肺炎支原体细胞内翻译机器结构动态

(a) 肺炎支原体细胞经cryo-ET三维重构得到的tomogram横切面图。可见明显核糖体(蓝框)、细胞膜(PM)和特征性附着细胞器 (attachment organelle, AO)等。核糖体对应的三维子断层密度sub-tomogram可被提取平均以解析高分辨率结构。(b)细胞内核糖体颗粒分 类后得到的翻译中间体结构可组成一个完整的翻译延伸循环。其中翻译延伸因子及tRNA状态可被清楚解析。(c)将不同核糖体中间体结构 重新投射回细胞内得到翻译机器的三维空间分布图。其中不同颜色代表不同的翻译功能状态。(d)对核糖体颗粒进行深度分类后得到的 RNA聚合酶与核糖体形成的转录-翻译偶联超分子组装体结构。 接触位点(mitochondria-ER contact site)的连接复 合物结构^[27],酶聚集形成的超分子组装体^[28-29]等 只有在特定时空环境才能存在的超分子组装体上表 现出独特的优势。

1.3 原位结构解析中发现新蛋白质

原位冷冻电镜技术由于避免了结构破坏的风险,有可能发现大分子复合物的新组成蛋白。近年来随着相关技术的不断进步,通过原位结构研究手段直接鉴定目标分子的组成蛋白已经成为可能。一方面,软件和硬件技术的不断进步使得 cryo-ET技术解析的大分子复合体原位结构的分辨率不断提高^[30:34]。另一方面,AlphaFold2^[35]等结构预测软件已经实现了蛋白质三维结构的高准确度预测,并构建了各种物种的蛋白质结构数据库。这样,利用中高等分辨率的原位结构密度图信息,结合质谱与蛋白质结构数据库等信息可以实现目标蛋白质的搜索与确认。

一个例子是哺乳动物精子轴丝的原位结构研 究。成熟精子主要由富含染色质的头部和由轴丝复 合体形成的尾部组成^[36]。精子轴丝复合体由数百 种不同的蛋白质组成,主要包括双联微管 (doublet microtubules, DMT)、中央鞭毛复合体 (central apparatus, CA)、动力蛋白臂 (dynein arms, DA)等成分。这种由9对外周DMTs和中央 CA形成的"9+2"结构是精子轴丝的基本结构单 元(图1b)^[37-39]。动力蛋白通过水解ATP获得能 量,使得DMT相对滑动,从而产生尾部的击打运 动,这种运动对于精子的游动至关重要,精子尾部 的运动缺陷通常会导致严重的男性不育[4041]。轴 丝复合体不仅存在于精子尾部,同时也是真核生物 运动纤毛的核心结构,在细胞运动、信号传递以及 胚胎发育等多个过程中发挥着重要作用,因此对轴 丝复合体的结构解析至关重要。近期,通过分离纯 化精子轴丝的 DMT, 吴建平课题组^[37]利用 cryo-EM/SPA 技术和基于人工智能的建模,建立了 小鼠精子48 nm 周期下 DMT 的原子模型,揭示了 47种DMT相关蛋白,确定了10种精子特异性的微 管内蛋白 (microtubule inner proteins, MIPs)。同 期, Zeev-Ben-Mordehai 课题组^[42]在海胆和牛的精 子提纯的DMT样品中,鉴定了超过60种不同的 DMT相关蛋白。

虽然以上方法可以鉴定精子轴丝复合体的组成 蛋白,然而其提纯方法破坏了轴丝复合体的"9+ 2"整体结构,限制了对轴丝结构组成和功能的更 深入的理解。相比之下,Agard 课题组^[43]利用 cryo-ET 和子断层结构平均法(sub-tomogram averaging,StA)方法,直接在精子细胞的样品中 解析了16 nm周期下6~7Å分辨率的DMT结构。 该原位结构中可以观察到清晰的蛋白质二级和三级 结构。作者利用这些结构信息在AlphaFold2小鼠 蛋白质结构数据库的结构模型中进行了无偏差匹 配,在未知蛋白质密度中鉴定到了Tektin5、 CCDC105以及SPACA9三种新蛋白质,提供了关 于哺乳动物精子尾部轴丝特异性的结构见解。同 期,孙飞课题组^[34]也利用同样的方法在小鼠精子 中解析了DMT的高分辨率原位结构(16 nm周期 下DMT达到4.5Å分辨率),搭建了36种 MIPs 的 结构模型(图1b),说明了直接在原位结构中鉴定 新的蛋白质已成为可能。

以上结果说明, cryo-ET 与基于结构预测的蛋 白质组学数据库的结合分析使得在细胞原位环境中 鉴定新的蛋白质成为可能,这也成为了可视蛋白质 组学的重要方法。这种新的结构研究模式,不仅提 供了发现和鉴定新蛋白质的技术方案,同时允许在 原位细胞环境内直接观察相关蛋白质分子互作网 络,提供全景式的蛋白质结构功能信息。

1.4 重构细胞内全面分子结构景观

原位冷冻电镜样品制备技术使得原位结构解析 不被限制在分离提纯的单一生物大分子或复合物, 更有可能解析相对完整的亚细胞区域内或特定细胞 生命过程中的不同大分子机器结构,进而重构出细 胞内全面的空间分子结构景观。Raunser课题组^[44] 使用 cryo-ET 重构了小鼠肌小节中的粗肌丝与细肌 丝的原位结构,解析了主要蛋白质如肌动蛋白 (actin)、原肌球蛋白 (tropomyosin)、肌钙蛋白 (troponin)、肌球蛋白 (myosin) 等在不同肌小节 区域的组织分布以及在分子水平上的多样性与可塑 性。此外,他们还解析了传统结构生物学手段无法 解析的伴肌动蛋白 (nebulin)、肌联蛋白 (titin)、 肌球蛋白结合蛋白C (myosin-binding protein C) 等肌肉中重要辅助蛋白质的原位结构^[45-46],涵盖 了肌肉收缩中主要的蛋白质分子并提供了高分辨率 的三维空间组织信息。近期另一个代表性研究是蛋 白质翻译这一所有细胞中最基本的生命过程。传统 的核糖体结构解析需要使用破碎细胞后得到的核糖 体组分^[47],无法提供翻译在细胞内如何进行、如 何时空组织等信息。以肺炎支原体细胞为模型, Mahamid 课题组首次用 cryo-ET 将正常细胞和氯霉

素处理细胞中的原位核糖体结构解析到3.5Å^[48]和 3.0 Å^[49] 近原子分辨率。深度结构分类获得的10 多种翻译中间体结构可以捕捉到核糖体翻译延伸以 及行使其他功能时的动态结构变化。处于不同中间 态的核糖体在相同的细胞状态下表现出相对稳定的 分布,显示其可能是细胞内稳态的重要组成部分。 将处于不同翻译状态的核糖体结构重新投射回细胞 内三维空间得到了一个详细而精确的翻译机器的三 维结构功能图谱。基于此,他们回答了多聚核糖体 行进间如何协调的问题,发现了一个由L9蛋白所 介导的避免行进间核糖体直接碰撞以保持翻译保真 度的局部延伸协调机制。利用类似研究框架, Beck 课题组^[50-51] 也在黏菌和人源细胞的 cryo-ET 研究中取得了可达3.2 Å分辨率的一系列原位核糖 体结构。此外, cryo-ET 技术还揭示了抗生素^[49] 或抗癌药物 [52] 如何改变核糖体整体功能状态分 布,引发不受控的核糖体碰撞与细胞应激反应,进 而系统性地重塑翻译机器在细胞内的分子结构功能 景观。

2 原位冷冻电镜与可视蛋白质组学技术的 前沿进展

2.1 更自动化的cryo-ET流程:从样品制备到三 维重构

冷冻制样是将含水样品快速冷却以形成玻璃态 冰的过程,即玻璃化 (vitrification),能够固定并 保留生物大分子水合状态,是已知保存生物样品最 好的方法^[53]。原位样品的多样性(如细胞、类器 官、组织等)与复杂性(如脂类、蛋白质等大分子 浓度与聚集状态差异) 使得需要根据样品类型和研 究目的选择合适的制样方法^[54]。相比于纯化的大 分子, 原位样品在冻样前更应注意保持细胞处于自 然状态,更严格控制温度、培养环境(如二氧化碳 浓度、厌氧微生物所需无氧环境)等,避免细胞应 激反应的影响。常用的投入式冷冻法(plunge freezing)适用于细菌、单细胞生物和培养的细胞。 贴壁细胞可以直接在载网上培养,亦可用微图案化 (micro-patterning) 方法预先处理载网以控制细胞 生长位置或形态[55]。然而由于热传递速度的限制, 投入式 vitrification 穿透深度一般只有约5 µm^[15]; 加入甘油等冷冻保护剂可在更深区域避免冰晶形 成^[56],但要考虑对细胞状态的可能影响。对于更 大的细胞或组织样品需要高压冷冻 (high-pressure freezing)避免内部冰晶形成,一般适用厚度可达 200 μm (图 3a)。近年来开发了一些新冻样技术, 如 Jet freezing^[57]等有可能实现更快的冷冻速率。 但总体而言vitrification原理研究与制样设备开发与 几十年前没有明显差别,是值得重新探索的领域。 将冻样设备与微流控装置^[58],或其他细胞研究中 的设备进行整合也是一个很有潜力的方向。

冷冻电镜成像要求样品厚度在200~300 nm以 下,因此除极少数细菌^[4, 25]和细胞边缘区域^[59-60] 外,对原位样品进行减薄处理是必需的(图3c)。 基于冷冻聚焦离子束 (cryo-FIB) 的减薄方法近年 来快速发展,是原位结构生物学得以兴起的基础。 冷冻切片 CEMOVIS 技术因为钻石刀机械切割固有 的样品形变问题没有被广泛应用^[61]。Cryo-FIB以 高能镓离子轰击样品进行溅射铣削切割,避免了机 械切割的形变问题。对于细胞悬液或贴壁细胞可直 接对含样品的载网进行 cryo-FIB 减薄处理,能够获 得低至80 nm厚度的样品薄片 (lamella)。以等离 子体作为离子源的 plasma FIB 具有更高的切割速 率,也有比较成功的应用^[62-63]。然而,无论是重金 属离子还是等离子体都会在lamella上下表面造成 辐射损伤层丢失部分高分辨率信息。不同方法估算 的受破坏深度一般在 30~60 nm 之间 [63-65]。未来 cryo-FIB 在铣削减薄参数^[64, 66],更理想的离子 源[67],控制冰污染[68-69]等方面仍有优化空间。

自动化 cryo-FIB 样品减薄方法的开发^[68, 70-73] 以及成熟商业化软件 AutoTEM (Thermo Fisher Scientific)的出现进一步改善了 cryo-FIB 样品制备 效率与学习成本。对于需要高压冷冻的样品,由于 高压冷冻载具 (planchet) 和组织样品自身厚度的 限制,无法直接进行 cryo-FIB 减薄制备 lamella,需 要对组织样品进行整修处理以暴露出可制备 lamella 的区块。近年来有 Waffle method^[74]、 VHUT-cryo-FIB^[75]、cryo-lift-out^[72, 76-77]等方法出 现。Plitzko课题组^[78]开发的连续切片提取技术 serial lift-out能够将样品块分割成几微米间隔的数 十张 lamella, 尽可能连续地保留了组织样品结构 信息,是近年来基于 cryo-FIB 进行方法开发的优秀 代表。相比于几至几十微米厚的细胞,单个 lamella仅能覆盖细胞中很小的一部分(1%~20%), 其余均被离子束铣削掉。这不仅意味着信息的损 失,也带来了如何定位的问题。对于特定亚细胞结 构或分子过程,可以使用荧光信号定位 lamella 制 备位置[76,79-83]。基于荧光识别的冷冻光电关联技 术(cryo-CLEM)(图3b)是一种将冷冻电镜与荧

光显微镜 (fluorescence microscopy, FM) 相结合 的技术,其原理是通过FM对荧光标记的样品进行 成像,获得的荧光图像可用于准确指导 lamella 的 定位及后续的数据收集。通常来说,适用于活细胞 的荧光标记技术都可以应用于 cryo-CLEM 流程中, 最常用的方法是表达与荧光蛋白结合的融合蛋白, 以标记感兴趣的蛋白质。也可以将具有自催化功能 的蛋白质标签(如SNAP标签或HALO标签)与感 兴趣的蛋白质融合表达,蛋白质标签扩大了荧光标 记的种类,包括亮度高且可穿透膜的有机染料分 子。除荧光信号帮助定位外,还有一种基于高对比 度的分子标签法,即通过遗传或非遗传手段在靶细 胞表面或靶蛋白上人为增加具有较高对比度的可识 别标签,标签的可识别部分通常包含比样品本身更 能散射电子的重金属元素。如 SPOTs^[84] 以 DNA 序 列折叠形成的高对比度磷酸骨架为分子标签,能够 特异性定位囊泡或细胞膜表面分子。其他相关的分 子标签还包括铁蛋白笼标记[85]、纳米金颗粒[86-87] 等。但是高对比度的分子标签法对哺乳动物细胞的 适用性有限。上述两种方法极大地提高了靶向性的 样品制备和数据收集的成功率^[88]。

Cryo-ET 需要收集样品在不同倾转角下的图像 组成一个倾转系列(tilt-series)来实现三维重构 (图 3d)。自动倾转数据收集可以在诸如 SerialEM^[89] 或 Tomography (Thermo Fischer Scientific) 软件上实现, 但倾转会引入一系列成像 通量和质量问题。Dose-symmetric 的数据收集方法 因为能够最大程度地保留低倾转角低电子辐射累积 部分的高分辨率信息,已经成为 cryo-ET 数据收集 的主流方案^[90-91]。基于光束-图像偏移(beamimage shift, BIS)的数据收集首先在冷冻电镜单 颗粒中被广泛应用,近年拓展到 cryo-ET 后将数据 收集速度提升到约5 min/套^[92-96]。虽然数据收集速 度仍有提升空间,但已不再是 cryo-ET 的主要限制 因素。如何改进因倾转、样品厚度、BIS等带来的 成像质量问题(波束倾斜(beam tilt)、像散 (astigmatism)、电荷累积 (charging)、欠焦不均匀 等) 以及如何建立针对特定样品的优化策略将是未 来方法开发的重点。Volta相位板可以提高衬度, 但是相位偏移不稳定、电荷积累以及需要长时间准 备等限制了其在 cryo-ET 中的应用^[97-98]。正在开发 中的激光相位板 [99] 可以避免以上问题,有望实现 理想的近正焦 cryo-ET 数据收集。此外,更快更好 的相机、更稳定的能量过滤器、更优化的样品台、 更经济可靠的球差矫正器等电镜硬件开发所带来的 成像质量提升对原位电镜都是重要的。Montage tomography和方形光阑等可以通过点阵收集获取大 样品区域的连续三维重构图^[100-102],也为 cryo-ET 方法开发打开了新思路。

三维重构是用对齐的倾转系列二维图像重构出 三维密度图(tomogram)的过程(图3e)。在可能 的情况下引入胶体金这样的高衬度颗粒进行对齐仍 是最优方案,可以手动或自动挑选金颗粒用于倾转 序列对齐^[103-105]。基于样品内部特征进行全自动对 齐的方法也被开发出来^[106-107]。Etomo^[104]和 AreTomo^[107]分别是现阶段最常用的手动和自动对 齐软件。用对齐的倾转系列重构 tomogram 最常用 的是加权背投影算法(weighted back projection)^[108]。 迭代算法 SIRT 或代数重构算法等可以增加低频衬 度但无法保留高频信息,在cryo-ET中并不常用。 开发新的既能提高衬度又最大程度保留高频信息的 重构算法仍有意义。最近有诸如 MBIR^[109]、 NUDM^[110]、compressed sensing^[111]等新算法出现, 但尚缺乏比较成功的应用案例。为了更利于直接观 察,对低信噪比的 tomogram 进行降噪是必要的 (图3f)。除传统的低通滤波外,最常见的是去卷积 滤波^[112],以及基于 noise2noise 深度学习的降噪方 法[113-115]。为了避免深度学习降噪可能引入的假 象,有必要交叉比较不同的降噪方法。由于样品台 和倾转厚度限制, cryo-ET倾转角一般在±60°之间, 因此在电子束方向因傅里叶空间信息缺失而有"缺 失楔效应"^[108]。ICON^[116]、IsoNet^[117]等可对缺失 楔效应进行矫正,弥补部分缺失信息增加 tomogram的可解析度^[109, 118]。对于细胞膜、细胞 骨架等连续且衬度较高的区域可以进行密度图分割 (segmentation) 以更直观展现三维重构信息^[15, 119]。 密度图分割在某种意义上也是一种降噪过程。手动 分割非常消耗时间经验,基于人工智能的密度图分 割^[120-122]是tomogram深度数据发掘方法开发的主 要发展方向。

2.2 子断层结构分析:计算虚拟层面的拆解与 复现

因为低信噪比、缺失楔和对齐精度限制,单个 三维重构图 tomogram 所能达到的分辨率只有数纳 米。对于 tomogram 中相同的大分子复合物,可以 将其对应局部三维密度 sub-tomogram 提取出来进 行平均以提高分辨率,即为 StA^[123-125]。除三维结 构平均外,还可进行三维结构分类、空间分布分



 Fig. 3
 The workflow of cryo-ET for *in situ* analysis of biomolecular structures within cells or tissues

 图3
 原位冷冻电镜技术在细胞或组织原位解析生物大分子结构的流程

(a)组织样品和细胞样品的玻璃化。组织样品通常通过高压冷冻的方式进行冷冻制样,细胞样品通常通过投入式冷冻进行制样。(b)玻璃 化后的样品进行冷冻光电关联。样品的荧光信号有利于帮助确定目标区域的位置,这里以发红色荧光的中心体为例。(c)在荧光信号的指 导下进行冷冻聚焦离子束减薄。随着减薄程度的加深,荧光信号会逐渐湮灭,表明离子束减薄到荧光所在区域。(d)冷冻电子显微镜数据 收集,减薄后的lamella在不同角度下进行旋转成像,生成倾转系列。中心体的原始倾转系列详见EMPIAR-200003。(e)倾转系列对齐后进 行三维重构,生成tomogram。(f)利用AI或调制函数对tomogram进行降噪。(g)在tomogram中定位目标颗粒。针对所要挑选的目标区域选 择不同的颗粒挑选方法。(h)对挑选的颗粒进行子断层平均计算。这里展示的是中心体的原位结构(EMD-33417、EMD-33418、EMD-33419、EMD-33420、EMD-33421)。(i)可视蛋白质组学示例。这里仅对tomogram中以中心体为代表的部分细胞器结构进行了可视化。

析、基于平均的畸变分析等,这里将其统称为 StA。

在 tomogram 中定位目标颗粒是子断层结构分 析的第一步,也是最重要一步(图 3g)。对于无过 往结构研究的目标复合物,手动挑取仍然是优先选 择。若干软件如 Dynamo^[126]、PySeg^[127]、Blik^[128] 等也提供基于几何分布的挑选与取样策略,对于纤 维状或膜表面结构等的挑选有帮助。但是手动挑选 非常消耗时间,也易受主观因素影响,不适合大规 模数据处理。对于已有类似或初步结构的情况,可 将其作为模板在 tomogram 中进行模板匹配 (template matching)^[4, 129-130]。常用 cryo-ET 数据处 理软件如 PyTom^[131]等均有模板匹配功能且基本原 理类似,即通过计算三维模板与每个像素点对应局 部三维密度间相关系数来提取目标位置。低频信息 在三维模板匹配中起主导作用,因此容易在细胞膜 或其他高衬区域出现假阳性问题。在模板匹配时适 当增加高频信息可能有助于减少假阳性影响^[132-13]。近年来,一些基于机器学习尤其是卷积神经网络的颗粒挑选与分割方法被开发出来,如后文中详细介绍的DeepFinder^[134]、DeePicT^[121]、DeepETPicker^[135]、crYOLO^[136]、PickYOLO^[137]等,在颗粒挑选应用上展现出很大潜力。然而现有机器学习方法一般依赖训练数据,在全面性、三维定位精确度等方面也没有显著优于模板匹配方法。未来趋势在于开发不依赖训练数据的无监督或自监督深度学习算法,以及将模板识别与人工智能方法结合起来^[122]。原位数据共享和诸如SHREC^[138]的公开竞赛也将有助于促进数据发掘新算法的开发。

传统 cryo-ET 子断层平均法,如 TOM/ AV3^[125, 139]、PyTom^[131]、Dynamo^[126]、RELION 3^[140] 等软件中,主要将 tomogram 中框取的三维颗粒 sub-tomogram 进行平均以提高分辨率(图 3h)。相 比于 cryo-EM/SPA 直接由处于不同取向的颗粒的二 维图像重构出最终结构, cryo-ET/StA多了收集倾 转系列重构 tomogram 这一中间步骤。但两种方法 原理上是一致的[141],在技术上也并没有严格的分 界。近年来的研究表明,未来趋势是将两种方法结 合起来以获得高分辨 cryo-ET 原位结构^[48, 142-146]。 Cryo-ET/StA 一般要经过从原始帧图像到二维图 像、二维倾转系列间以及三维颗粒密度间对齐三个 步骤。更大的电子剂量累积也使得 cryo-ET 中有更 高的BIM (beam induced motion) 以及更大尺度的 样品形变。从二维倾转图像到三维tomogram重构 过程中湮灭了大部分高分辨结构信息,是限制传统 子断层结构分辨率的主要因素^[147]。此外,不同区 域的颗粒因为样品厚度和倾转而有不同的欠焦 值^[148],也需要引入三维CTF校正^[148-149]。在 cryo-EM/SPA 中首先被开发的帧对齐^[150]、dosefiltering^[151-152],以及基于平均结构的对齐^[153-154]等 概念的引入是早期获得部分病毒高分辨原位结构的 关键^[152, 155]。为了解决 cryo-ET 中间步骤高频信号 湮灭问题,最近一批成功的cryo-ET/StA新方法如 emClarity^[142] EMAN2^[106] Warp/M^[33] RELION 4^[145] 等一般先进行传统 sub-tomogram 对 齐平均以获得初始三维平均结构与对齐参数,然后 利用这些信息与对应的二维倾转图像区域进行关联 对比,优化整体和局部倾转系列对齐参数和CTF 拟合参数。其中Warp/M将cryo-EM与cryo-ET数据 处理整合在一个统一框架内,可同时实现多颗粒 的,基于平均结构的倾转对齐、样品畸变、CTF模 型、颗粒取向等参数优化,在多种样品中实现了 4 Å以内分辨率的原位结构解析^[45, 48, 50-51]。为了解 决不同 cryo-ET/StA 程序间兼容整合难题, 最近也有 ScipionTomo^[156]、 nextPYP^[144]、 TomoBEAR^[157], TOMOMAN^[158], TomoNet^[159] 等一批整合了不同软件的流程化方案出现,为初学 者提供了更友好的数据处理平台。

既然 cryo-ET/StA 原位高分辨结构解析需要回 到二维图像层面,进行比 cryo-EM/SPA 更耗费时间 和资源的 cryo-ET/StA 是否还有必要?将电子剂量 分配在倾转系列尤其是高倾转角上是否还是最优策 略?有研究组尝试了先收集高剂量非倾转 cryo-EM/SPA 图像再收集 cryo-ET/StA 倾转数据为 SPA 提供初始对齐参数的策略^[160-161]。但由于数据收集 与处理的复杂性,这种交叉方案并没有表现出明显 优势。对于原位样品中的超大型复合物如呼吸链复 合物或捕光复合物,用传统 cryo-EM数据收集与优 化的SPA算法可直接找到对齐参数解析出3Å左右 的高分辨原位结构^[162-163]。高分辨二维模板匹配方 法也可在颗粒重叠或分子拥挤的非倾转 cryo-EM图 像中定位像核糖体这样的大复合物^[133,164-165]。若目 的仅为解析若干大分子复合物的原位结构,是否还 有必要进行 cryo-ET/StA需要未来更多不同样品上 的研究去探索。在挑取更小复合物、确定电子束方 向的空间定位,以及解析全面的细胞内分子景观方 面, cryo-ET/StA仍然有更大的潜在优势。未来的 cryo-ET/StA研究也应该根据不同样品与研究目的 选择最优化的数据收集与处理策略。值得指出是, cryo-ET/StA与 cryo-EM/SPA,亦或是原位和传统 结构生物学从来不是对立的,原位结构生物学的核 心即是多方法的融合。

在平均的基础上,解析复合物颗粒中的结构多 样性(structural heterogeneity)可以探究大分子机 器行使功能的动态结构机制。在细胞内原位能更好 地保留结构多样性与更接近自然状态的不同结构分 布频率,因此三维结构分类是原位结构研究重要的 组成部分。常见的三维结构分类方法如最大似然法 与主成分分析等在不同的 cryo-ET 数据处理软件中 均有成功应用。但三维结构分类方法仅能解析若干 不连续的亚结构类别,不能重构出连续的结构变 化。基于机器学习的cryoDRGN等方法最近成功拓 展到子断层分析上,可以重构出大分子机器在原位 相对连续的结构变化[166-169]。除了解析不同状态的 结构, cryo-ET/StA还可以根据不同结构种类中颗 粒数量计算出不同结构状态出现的频率,建立大分 子机器的功能图谱(functional landscape)。比如在 核糖体的原位结构研究中发现,同一种细胞在特定 状态下倾向于表现出类似的功能状态分布,但不同 的细胞种类以及不同的环境或药物处理能导致完全 不同的分布^[48, 51-52]。保持关键大分子机器相对稳 定的功能图谱可能是细胞内稳态的重要部分。原位 结构研究为深入理解细胞的生命活动提供了全新 视角。

原位结构生物学不是仅仅解析若干大分子复合物的原位结构。Cryo-ET/StA原位技术的最大意义还在于,可以将获得的不同结构重新投射回细胞内三维空间进而获得细胞的空间分子结构功能图谱(图2c,图3i)。其中大分子复合物的空间定位精度可达亚纳米或埃级别,并且有旋转取向、结构功能状态、辅助蛋白质甚至药物小分子结合等综合信息^[48]。Cryo-ET/StA的定位精度与结构细节是现有

细胞生物学技术如超分辨荧光显微镜^[170]无法比拟的。基于 cryo-ET/StA 的三维空间分析(spatial analysis)在研究神经细胞中变性蛋白聚集与蛋白酶体相互作用^[171]、内质网蛋白降解微区域^[172]、多聚核糖体^[48]、细胞骨架肌动蛋白波(actin wave)^[60, 19]等方面取得了一系列新发现,为深入理解细胞和分子层面的生命活动提供了结构基础。基于 ChimeraX 的 ArtiaX^[173]和基于 napari 的 Blik^[128]的开发也使得三维可视化变得更为简单。除了三维可视化,更系统和定量地分析不同结构分布、邻近、聚集等三维组织信息是未来方法开发的方向之一^[48, 174-175]。

Cryo-ET/StA可以类比于在计算机虚拟层面拆 解一个由电镜图像三维重构的细胞,但相比于传统 结构生物学破坏后提纯的结构解析,cryo-ET/StA 保留了"复原"细胞内完整三维分子景观的可能 性,是现阶段构建"细胞的原子模型"(atomic model of the cell)这一结构生物学家终极目标最有 潜力的方法。在cryo-ET/StA解析与构建的基础上, 结合多组学数据与机器模拟有可能建立可以模拟正 常细胞功能的虚拟细胞模型^[176]。

2.3 整合生物成像解析生命系统复杂性

生命系统的复杂性和单个研究方法的局限性使 得整合多种技术方法成为必然。光镜和电镜在各自 的领域一直在突破新的分辨率界限,而两者的结合 同样在不断发展。如前文中提到的 cryo-CLEM, 实 验过程中可将样品玻璃化后在集成了冷冻荧光显微 镜 (fluorescence cryo-microscopy, cryo-FM) 模块 的冷冻聚焦离子束扫描电子显微镜 (cryo-FIB-SEM)中进行成像以减少样品的转移过程,最大 程度地减少冰污染,同时可以在实时荧光信号指导 的情况下对感兴趣区域进行特定减薄(图3c),将 lamella 的荧光图像与扫描电子图像相结合,能够 指导 cryo-ET 的数据收集过程。孙飞课题组^[82] 研 制的 ELI-TriScope 系统能够将电子束、光束和离子 束精确地聚焦到同一点上,有效提高冷冻聚焦离子 束减薄的成功率和样品制备通量。通过荧光标记, 他们利用该系统成功制备了一批精准靶向中心体的 lamella,并发现了此前未被报道的RD3结构。徐 涛和纪伟课题组^[83]将激光共聚焦显微镜集成到 cryo-FIB-SEM 中开发了 CLIEM 系统,通过高质量 的全细胞多色三维荧光成像,可精准定位研究目标 的三维空间位置,并通过投影变换将光镜图像与聚 焦离子束图像进行快速精准关联,实现了110 nm 精度的聚焦离子束定点减薄。此外,还有一些类似的商业化解决方案,比如iFLM(Thermo Fischer)和METEOR(Delmic)等。Cryo-CLEM技术已广泛应用于细胞生物学、结构生物学等领域,利用该技术研究人员成功解析了病毒入侵细胞的过程^[177],揭示了病毒与宿主细胞膜的相互作用机制,同时还研究了细胞骨架^[178]、细胞器动态变化^[179-180]等生物学过程。

由于油浸物镜及其他浸入式光学物镜目前仍无 法在冷冻条件下进行成像,因此典型的 cryo-FM 通 常使用以空气为介质的物镜,导致其光学分辨率被 限制在400~500 nm的范围内。为了实现对亚细胞 或小分子蛋白质更加准确和精细的定位,超分辨冷 冻光电关联技术 (correlative cryo-super resolution light and cryo-electron microscopy, SR-cryoCLEM) 得到了越来越多的应用^[180-182]。SR-cryoCLEM技术 的发展得益于超分辨率显微镜技术 (superresolution fluorescence microscopy, SR-FM) 的发 展。SR-FM能够突破传统光学显微镜的衍射极限, 实现纳米级别的分辨率,如PALM^[183]和 STORM^[184]能够精确地定位单个分子,有助于研 究荧光分子在细胞中的精确分布和动态变化。徐涛 和纪伟课题组开发的ROSE^[185]和ROSE-Z^[186]方法 利用激光干涉来定位单个荧光分子,分别提高了单 分子定位显微镜(SMLM)的横向分辨率和轴向分 辨率。SR-FM的应用广泛^[187-188],在用于冷冻样品 的同时也被用于传统常温电镜。徐涛和徐平勇课题 组^[189-190]开发的新型荧光蛋白mEosEM具有出色的 热力学稳定性和对OsO4的抵抗力,可以在保持生 物样品超微结构的同时实现超分辨率成像,推动了 高精度三维光电关联成像在大尺度厚样品中的应 用。与常规 cryo-CLEM 技术类似, SR-cryoCLEM 首先将带有荧光标记的样品快速冷冻并在 cryo-FM 下进行超分辨率的荧光成像,然后将样品转移到冷 冻电子显微镜下进行成像。最后,通过图像处理软 件,将超分辨率光学显微镜图像和冷冻电子显微镜 图像进行对齐和整合。2015年徐涛课题组^[191]结合 高压冷冻、冷冻切片和单分子定位技术实现了在冷 冻条件下对线粒体外膜及相关膜蛋白的纳米水平的 观察,将SR-cryoCLEM扩展到对哺乳动物细胞玻 璃化切片的研究上。最近,孙飞课题组^[192]通过引 入结构光照明成像技术研制了冷冻结构光照明成像 系统HOPE-SIM,实现了优于150 nm的光镜-聚焦 离子束三维关联对齐精度,对宿主细胞内鼠疱疹病

毒和HeLa细胞内中心体样品进行了原位结构研究。 利用 SR-cryoCLEM, Moerner 课题组^[193] 能够在 30 nm 精度下对 tomogram 中的三种不同目标蛋白 质进行荧光定位,实现了利用荧光信号在 tomogram 中对小蛋白分子的注释。Hess 课题组^[194] 利用 cryo-SR 技术和 cryo-FIB-SEM 技术对多种细胞 进行了全细胞成像,以三维方式可视化了整个细胞 在纳米尺度下的超微结构,发现了此前未观察到的 蛋白质-细胞器空间关系,包括含有内质网相关蛋 白的细胞核内囊泡、小脑神经元之间的网状黏附网 络以及根据转录活性进行细分的染色质结构域。这 些研究工作体现了 cryo-SR/FIB-SEM 技术在揭示细 胞原生超微结构方面的潜力,这种多模态的蛋白质 定位模式能够帮助我们理解细胞内部的复杂性。

cryo-CLEM 可以在同一样品上进行多尺度的 关联分析,包括宏观的细胞形态以及微观的分子细 节,这对于理解细胞内部的复杂网络和分子间的相 互作用非常有帮助,有望在细胞生物学研究中发挥 更大的作用。目前 cryo-CLEM 面临的最大技术挑 战之一是z轴分辨率和z轴相关精度。即使是最新 的SR-FM也只能在z轴方向上达到150 nm 左右的 分辨率。因此利用 cryo-FM 在 tomogram 中直接定 位某些蛋白质仍然具有挑战性。为了提高lamella 包含感兴趣事件的概率, cryo-FM和 cryo-FIB-SEM 的 3D 相关精度必须优于典型的 lamella 厚度 (即<150 nm)。但是目前达到如此高的 3D 相关精 度仍是十分困难的事情。另外,在使用 cryo-SR 时 往往需要定制 cryo-FM 设备以完成冷冻状态下的超 分辨荧光成像,并且需要探索不同荧光分子在超分 辨冷冻荧光显微镜中的适用性[195-196]。基于高对比 度的分子标签法和 cryo-CLEM 都极大扩展了 cryo-ET 的应用范围。未来,基于两种方法的联用能够 一次标记和区分多个目标分子,为解决日益复杂的 生物学问题提供了多种选择^[197]。

此外,原位核磁共振(in-cell NMR)技术能 够在细胞内研究较小且富集的蛋白质的结构动态, 有研究成功地将其与 cryo-ET 结合起来研究膜蛋白 的跨膜转运过程^[198]。上述研究方法更关注对细胞 内小部分区域进行高清成像,而 cryo-soft X-ray tomography (cryo-SXT)^[199]有提供细胞器精度的 细胞三维成像能力,能够在全细胞尺度下进行成 像,也有跟 cryo-ET 进行联合成像的应用潜力。对 于更高尺度的生物成像,体电子显微学(volume electron microscopy, vEM)^[200]无疑是更好的选择。 vEM能够在纳米分辨率下对多细胞进行连续切片 成像,其在脑图谱^[201-203]、早期胚胎发育^[204]等生 物学研究中发挥着重要的作用。

除了联合多种成像方法实现更深、更广的可视 化,也可整合不同数据进行结构解释与模型搭建。 整合结构生物学技术 (integrative structural biology)可以将获得的密度图、过往解析的结构、 AlphaFold 预测模型等多种信息整合起来进行综合 结构建模。质谱技术与 cryo-ET 都是无标记的、能 提供系统组学信息的方法,两者相得益彰。新兴的 质谱技术方法^[205],如定量质谱(quantitative MS)^[4]、天然质谱(native MS)^[206]、单细胞质谱 (single-cell MS)^[207]等能提供大分子丰度、比例、 动态变化等重要定量信息。交联质谱技术能够提供 氨基酸级别的蛋白质-蛋白质相互作用信息,以及 大分子复合物的组分与拓扑结构信息^[208]。在 cryo-ET/StA 原位结构研究中,通常结构分辨率较 低(8~30Å)且细胞内各种蛋白质成分难以确定, 因此需要依赖其他辅助信息才能完成模型搭建。 Rappsilber与Mahamid课题组^[25]首次将 cryo-ET 和 原位交联质谱结合起来用于解析细胞内转录-翻译 复合物结构,显示了整合原位结构生物学的可行 性。Crvo-ET 和原位交联质谱也被成功应用到小鼠 精子尾部的原位结构研究中^[209]。

2.4 基于人工智能的算法突破

在过去的几年中,人工智能 (artificial intelligence, AI) 技术飞速发展, 正逐步渗透到各 行各业,给传统技术带来了深刻的转型和变革,也 极大地促进了结构生物学的发展。诸如 AlphaFold^[35]、RoseTTAFold^[210]、OpenFold^[211]等 相关蛋白质结构预测软件的诞生,标志着结构生物 学发展到了全新的阶段。同样地,人工智能正在改 变和加速冷冻电镜相关的数据处理过程,特别是在 原位冷冻电镜技术中, AI 无论是在样品制备, 数 据收集还是数据处理过程中都发挥了极大的作用。 尤其在数据处理方面,AI技术体现了非常出色的 性能。cryo-ET 原始图像的信噪比很低、存在缺失 楔效应、挑选颗粒困难,需要借助AI技术进行图 像增强和颗粒挑选;原位结构解析的密度图分辨率 一般不高,需要AI辅助预测进行蛋白质指认或复 合体蛋白结构模型搭建; 生物样品的原位结构信息 非常丰富,需要AI技术进行深度数据挖掘;原位 解析的结构一般是静态结构,需要借助AI技术进 行动态模拟和预测,以便更全面地理解分子机制。

下面针对这些不同的应用场景进行举例介绍。

良好的样品是数据收集的前提,不同的样品其 制备方式通常需要经过多种条件的摸索,这个过程 耗时耗力,严重限制了样品制备的效率,而AI在 自动化样品制备过程中展现出巨大潜力。 Chameleon 是第一个在样品制备过程中实时提供载 网质量信息的仪器,该仪器一方面通过控制和监控 样品冷冻过程中的必要参数(如控制样品浓度、加 样体积等)来提高制备良好样品的效率,另一方面 产生大量的相关数据,深度学习算法使得这些数据 可以根据样品的性质推算出相应的制备方案^[212]。 这种将样品制备过程从调整样品的生化性质以匹配 标准样品制备方案,转向使用样品的生化性质以驱 动有效的样品制备策略在理论上可以极大提高样品 制备的效率。然而, Chameleon 目前在实际使用过 程中仍面临着如无法控制环境温度以及样品存在取 向优势等问题,而且还无法直接用于细胞和组织的 原位样品制备。在原位样品制备中,尤其是 cryo-FIB或 lift-out 中往往有大量消耗人力时间的重 复操作,并且参数选择复杂,对实验经验有很高要 求。一个有巨大潜力的未来方向是将人工智能与硬 件开发整合起来,实现全自动化的原位样品制备。 除了质量与效率,全自动化的原位样品制备设备对 于处理有生物安全要求的临床样品也将有很大 益处。

进行数据收集前需要在载网上选择合适的目标 区域进行电子成像,相关目标区域的选择通常依靠 人为决策来确定,近年来,一些软件开始应用深度 学习来自动化选择目标区域。如Danev课题组^[213] 开发的 SPACEtomo 软件,就是利用深度学习算法 自动化完成 lamella 的定位以及目标区域的识别和 收集,极大缩短了人工操作的时间,提高了样品收 集的效率。SPACEtomo 的效果目前在酵母样品中 得到了验证,未来针对其他类型生物样品的深度学 习训练会进一步拓宽应用范围。需要注意的是,深 度学习算法十分依赖训练数据的数量和质量,相关 的自动化软件需要进行大量的训练才能较好地完成 目标区域的识别任务。目前来说,即使是最佳算法 的表现也无法超越人为决策。

在图像降噪和数据增强方面,目前基于AI技术的方法非常多,如前文提及的基于noise2noise的降噪软件Topaz^[113]和Cryo-CARE^[115],两者都是通过从噪声中学习噪声的方法来训练神经网络,从而习得噪声模式,改善图像质量。最近,Xu课题

组^[214]开发了一种基于无监督深度学习框架的 DUAL模型, DUAL 通过使用循环生成对抗网络和 噪声解耦处理原始图像中的噪声和实际结构信息, 能够显著提高原始图像的信噪比,增强颗粒挑选的 准确性。对于数据增强,除前文提到的ICON^[116] 和 IsoNet^[117],最近开发的 DeepDeWedge 也可用于 tomogram 降噪和缺失楔重建^[215]。该模型将真实数 据集分成两部分作为训练集,并独立地对它们进行 tomogram 生成和 CTF 校正, 然后使用 UNet 架构的 神经网络在训练集中学习从噪声数据中恢复缺失信 息,最后将原始tomogram通过训练好的网络进行 处理,并将结果重新组合以获得最终的去噪和缺失 楔形校正的 tomogram。该软件使用相对复杂的神 经网络,可能需要较长的训练时间,并且其对原始 数据的依赖可能存在过拟合风险。不同的数据集可 能需要尝试不同的方法来进行信息补偿,并且无论 是利用何种深度学习架构开发的软件,对缺失楔信 息的补偿都存在着不准确的风险,因此处理后的 tomogram 都只能辅助颗粒挑选而不能用于 StA 计算。

·2467·

在目标颗粒的定位方面(图3g),基于互相关 算法的模板匹配^[129]最早被应用于自动化颗粒挑 选,但是模板匹配的精度较低,需要多轮迭代以及 后续分类来区分真假阳性。前文提及的 DeepFinder 和DeepETPicker利用卷积神经网络来学习和识别 tomogram 中生物大分子的特征和模式,能够自动 化识别多种类型的生物大分子,显示出比模板匹配 更高的精度和召回率。但这类软件都需要手动标注 真实数据集进行模型训练,当训练数据集不够大或 者不够多样化时,模型的泛化能力会受到限制。 Eltsov 课题组^[216] 最近提出了模板学习技术 (template learning),结合了深度学习在颗粒识别上 的准确性以及邻域随机化方法训练模型的便利性, 旨在通过综合模拟数据集和真实数据集的训练来提 高深度学习挑选颗粒的精度和召回率,但其实际表 现依然受限于训练数据集的质量和数量。基于深度 学习的一系列算法和软件的开发在理论上提高了颗 粒挑选的效率,但是对于大多数蛋白质来说,通常 无法从真实数据集中手动标注足够的训练集来训练 网络,因此模板匹配仍然是最常使用的方法。但是 无论是模板匹配还是基于深度学习的各种软件,自 动化颗粒挑选的准确度依然不如手动颗粒挑选。

原位结构解析获得的电子密度图通常无法达到 很高分辨率,难以进行准确的结构建模。AI技术 可以从多个角度提高密度图质量。例如,黄胜友课题组^[217]通过采用多尺度 UNet 架构,开发了 EMReady 软件,用于改善原始密度图的各向异性,提升原始密度图的质量,有利于后续精确建模。针对 StA 颗粒中存在的组成和构象上的异质性,前文提到的 cryoDRGN (类似 tomoDRGN)程序不仅可以重构出生物大分子机器连续的结构变化,同时可以利用训练好的模型捕捉和重建原始密度图的结构 特征。

针对原位结构解析的中等分辨率密度图的建模 难题,将其他方法解析或者预测的蛋白质原子模型 拟合到密度图中是最常用的一种做法。EMBuild集 成了 AlphaFold 结构预测和基于快速傅里叶变换的 全局拟合等方法共同作用于深度卷积网络预测的主 链信息概率图上,能够针对4~10 Å内的 cryo-ET 密 度图进行相对可靠的自动化蛋白质建模[218]。 DomainFit 能够将 AlphaFold 预测的蛋白质结构域半 自动拟合到密度图中,从而实现对蛋白质的鉴定, 对 3~8 Å分辨率的密度图表现最佳^[219]。如果 cryo-ET 获得的密度图分辨率能够近原子水平,则可以 在不依赖其他确定结构的方法下进行从头 建模,如 DeepTracer^[219-220]、CR-I-TASSER^[221]、 RosettaES^[222]、MAINMAST^[223]。通过以上方法能 够获得在自然状态下原子水平的蛋白质构象,对生 物大分子进行原子水平的原位可视化,能够将不同 构象下的生物大分子与周围复杂环境相关联,在多 尺度理解细胞内不同分子相互作用网络导致的细胞 不同生理状态。这也是可视蛋白质组学中重要的计 算方式。

在真实的细胞里,生物大分子通常处于高度动态的变化中。针对原位结构研究中缺乏动态结构信息的问题,人们开发了很多蛋白结构构象变化分析程序。除前文提到的 cryoDRGN外,还包括基于分子 动力学模拟的 MDTOMO,可以分析 sub-tomogram 的连续构象变化^[224]。使用 MDTOMO分析的严重急性呼吸系统综合征冠状病毒2(SARS-CoV-2)刺突蛋白数据,揭示了分子的多种构象状态,并发现了与单个受体结合域(RBD)开启相关的渐进构象变化。基于三维光流算法(3D dense optical flow)的 TomoFlow^[225]和基于正则模态分析 (normal mode analysis, NMA)的 HEMNMA-3D^[166]软件也同样可以用于分析生物大分子在连续空间中的构象变化。通过将这些构象变化可视化在 cryo-ET 的原位数据上,研究人员更好地理解生

物大分子的动态行为和功能。

Cryo-ET 得到的 tomogram 包含丰富的信息, 但是目前的颗粒挑选仅关注已知的蛋白质或者感兴 趣的蛋白质,对于 tomogram 中剩下的大量信息挖 掘较少,Xu课题组^[122]提出了一个应用于大规模 数据集的无监督深度学习方法 DISCA, 能够在无 模板无手动标注的情况下无差别地对tomogram中 的多种质量大小的蛋白质分子进行识别和注释。基 于深度度量学习开发的 Tomo Twin 程序, 能够在拥 挤的细胞环境中对多种蛋白质进行无需手动标注的 颗粒挑选^[226]。这些软件充分地利用了 tomogram 中 的信息,能够帮助挖掘有趣的生物问题,有利于推 动细胞生物学和可视蛋白质组学的发展。然而,目 前开发的大部分软件都不太适合膜蛋白或丝状蛋白 的识别,并且不适合拷贝数较少或者分子质量较小 的生物大分子。对于这些难以自动注释的复合物, 人工注释仍是必要的。

虽然 cryo-ET 技术本身的复杂性以及数据处理 的固有挑战使相关软件的开发十分困难,但是相关 的数据处理已逐渐更加智能和高效。随着 AI 和 cryo-ET 相关技术的进一步发展,对整个细胞或亚 细胞区域内蛋白质组实现纳米或亚纳米水平的可视 化将不再遥不可及(图 3i)。

3 总结与展望

原位冷冻电镜技术在解析复杂多组分复合物结 构、捕捉细胞内瞬时超分子组装体、发现新的复合 物组分蛋白、重构细胞内整体分子结构景观等方面 表现出独特的优势与潜力。结构生物学已经跳出分 子结构生物学的桎梏,发展为细胞乃至组织的结构 生物学。在未来,更好的原位样品制备方法仍将是 原位冷冻电镜技术发展的重点,如何最大程度保持 细胞与组织样品的原始状态将是其中的关键。除了 实验室培养的细胞,对自然环境或临床样本进行更 快速高效的原位样品制备将极大促进原位冷冻电镜 技术在临床医学等研究中的应用。同时,随着 cryo-CLEM、SR-cryoCLEM、多组学方法、新图像 处理算法、AI结构预测等的不断发展,如何通过 软硬件开发有效地整合跨尺度、多模态的数据也将 是未来重点发展方向。另外,目前原位结构研究仅 能够获得空间信息,如何开发新技术获得时间维度 上的信息将是值得探索的方向。最后,为结合AI 实现"数字细胞"及类似模拟复杂维度生命活动的 大模型,优质数据共享和新算法开发同样重要。 AlphaFold2的巨大成功是建立在过去几十年积累的 大量蛋白质结构数据基础上的。数据尤其是原始数 据的共享是原位结构生物学未来发展的基础。仅仅 在 EMDB或 PDB数据库上分享密度图或原子模型 的传统方式已经不足以支持原位数据的多样性与复 杂性。尽管已有 EMPIAR数据库等较成熟的原始数 据共享平台,最近成立的 Cryo-ET Data Portal 也提 供了一种共享 tomogram 注释数据的方案,但鉴于 原位数据的复杂性与敏感性,如何鼓励原位数据分 享与建立标准化的数据共享规范等仍然亟需领域内 共识。大量高质量注释 tomogram 数据共享将利于 催生新的 AI 算法实现原位数据的深入挖掘与整合。

结构生物学的时代方兴未艾!

参考文献

- Nickell S, Kofler C, Leis A P, et al. A visual approach to proteomics. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006, 7(3): 225-230
- [2] Forster F, Han B G, Beck M. Visual proteomics. Methods Enzymol, 2010, 483: 215-243
- [3] Robinson C V, Sali A, Baumeister W. The molecular sociology of the cell. Nature, 2007, 450(7172): 973-982
- [4] Beck M, Malmström J A, Lange V, et al. Visual proteomics of the human pathogen *Leptospira interrogans*. Nat Methods, 2009, 6(11): 817-823
- [5] Güell M, van Noort V, Yus E, *et al.* Transcriptome complexity in a genome-reduced bacterium. Science, 2009, **326**(5957): 1268-1271
- [6] Yus E, Maier T, Michalodimitrakis K, *et al.* Impact of genome reduction on bacterial metabolism and its regulation. Science, 2009, **326**(5957): 1263-1268
- [7] Kühner S, van Noort V, Betts M J, et al. Proteome organization in a genome-reduced bacterium. Science, 2009, 326(5957): 1235-1240
- [8] Beck M, Covino R, Hänelt I, et al. Understanding the cell: future views of structural biology. Cell, 2024, 187(3): 545-562
- [9] Lin D H, Hoelz A. The structure of the nuclear pore complex (an update). Annu Rev Biochem, 2019, 88: 725-783
- [10] Tai L, Yin G, Sun F, et al. Cryo-electron microscopy reveals the structure of the nuclear pore complex. J Mol Biol, 2023, 435(9): 168051
- [11] Beck M, Hurt E. The nuclear pore complex: understanding its function through structural insight. Nat Rev Mol Cell Biol, 2017, 18(2): 73-89
- Zhu X, Huang G, Zeng C, *et al.* Structure of the cytoplasmic ring of the *Xenopus laevis* nuclear pore complex. Science, 2022, 376(6598): eabl8280
- [13] Huang G, Zhan X, Zeng C, et al. Cryo-EM structure of the inner ring from the *Xenopus laevis* nuclear pore complex. Cell Res, 2022, **32**(5):451-460
- [14] Huang G, Zhan X, Zeng C, et al. Cryo-EM structure of the nuclear ring from *Xenopus laevis* nuclear pore complex. Cell Res, 2022,

32(4): 349-358

- [15] Mahamid J, Pfeffer S, Schaffer M, et al. Visualizing the molecular sociology at the HeLa cell nuclear periphery. Science, 2016, 351(6276):969-972
- [16] Zimmerli C E, Allegretti M, Rantos V, et al. Nuclear pores dilate and constrict in cellulo. Science, 2021, 374(6573): eabd9776
- [17] Schuller A P, Wojtynek M, Mankus D, et al. The cellular environment shapes the nuclear pore complex architecture. Nature, 2021, 598(7882): 667-671
- [18] Mosalaganti S, Obarska-Kosinska A, Siggel M, et al. AI-based structure prediction empowers integrative structural analysis of human nuclear pores. Science, 2022, 376(6598): eabm9506
- [19] Akey C W, Singh D, Ouch C, *et al.* Comprehensive structure and functional adaptations of the yeast nuclear pore complex. Cell, 2022, 185(2): 361-378.e25
- [20] Singh D, Soni N, Hutchings J, et al. The molecular architecture of the nuclear basket. Cell, 2024, 187(19): 5267-5281.e13
- [21] Kreysing J P, Heidari M, Zila V, et al. Passage of the HIV capsid cracks the nuclear pore. bioRxiv, 2024. https://doi.org/10.1101/2024.04.23.590733
- [22] Kohler R, Mooney R A, Mills D J, et al. Architecture of a transcribing-translating expressome. Science, 2017, 356(6334): 194-197
- [23] Wang C, Molodtsov V, Firlar E, et al. Structural basis of transcription-translation coupling. Science, 2020, 369(6509): 1359-1365
- [24] Webster M W, Takacs M, Zhu C, et al. Structural basis of transcription-translation coupling and collision in bacteria. Science, 2020, 369(6509): 1355-1359
- [25] O'Reilly F J, Xue L, Graziadei A, *et al.* In-cell architecture of an actively transcribing-translating expressome. Science, 2020, 369(6503):554-557
- [26] Xu J, Liao C, Yin C C, et al. In situ structural insights into the excitation-contraction coupling mechanism of skeletal muscle. Sci Adv, 2024, 10(12): eadl1126
- [27] Wozny M R, Di Luca A, Morado D R, et al. In situ architecture of the ER-mitochondria encounter structure. Nature, 2023, 618(7963):188-192
- [28] Dietrich H M, Righetto R D, Kumar A, et al. Membrane-anchored HDCR nanowires drive hydrogen-powered CO₂ fixation. Nature, 2022, 607(7920): 823-830
- [29] Hugener J, Xu J, Wettstein R, et al. FilamentID reveals the composition and function of metabolic enzyme polymers during gametogenesis. Cell, 2024, 187(13): 3303-3318.e18
- [30] Ke Z, Oton J, Qu K, *et al.* Structures and distributions of SARS-CoV-2 spike proteins on intact virions. Nature, 2020, 588(7838): 498-502
- [31] Turoňová B, Sikora M, Schürmann C, et al. In situ structural analysis of SARS-CoV-2 spike reveals flexibility mediated by three hinges. Science, 2020, 370(6513): 203-208
- [32] Yao H, Song Y, Chen Y, *et al.* Molecular architecture of the SARS-CoV-2 virus. Cell, 2020, **183**(3): 730-738. e713

- [33] Tegunov D, Xue L, Dienemann C, et al. Multi-particle cryo-EM refinement with M visualizes ribosome-antibiotic complex at 3.5 Å in cells. Nat Methods, 2021, 18(2): 186-193
- [34] Tai L, Yin G, Huang X, *et al.* In-cell structural insight into the stability of sperm microtubule doublet. Cell Discov, 2023, 9(1):116
- [35] Jumper J, Evans R, Pritzel A, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. Nature, 2021, 596(7873): 583-589
- [36] Abou-Haila A, Tulsiani D R P. Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function. Arch Biochem Biophys, 2000, 379(2): 173-182
- [37] Zhou L, Liu H, Liu S, *et al*. Structures of sperm flagellar doublet microtubules expand the genetic spectrum of male infertility. Cell, 2023, 186(13): 2897-2910.e19
- [38] Linck R W, Chemes H, Albertini D F. The axoneme: the propulsive engine of spermatozoa and cilia and associated ciliopathies leading to infertility. J Assist Reprod Genet, 2016, 33(2): 141-156
- [39] Lehti M S, Sironen A. Formation and function of sperm tail structures in association with sperm motility defects. Biol Reprod, 2017, 97(4): 522-536
- [40] Pereira R, Sá R, Barros A, et al. Major regulatory mechanisms involved in sperm motility. Asian J Androl, 2017, 19(1): 5-14
- [41] Williamson R A, Koehler J K, Dianne Smith W, et al. Ultrastructural sperm tail defects associated with sperm immotility. Fertil Steril, 1984, 41(1): 103-107
- [42] Leung M R, Zeng J, Wang X, et al. Structural specializations of the sperm tail. Cell, 2023, 186(13): 2880-2896.e17
- [43] Chen Z, Shiozaki M, Haas K M, et al. De novo protein identification in mammalian sperm using in situ cryoelectron tomography and AlphaFold2 docking. Cell, 2023, 186(23): 5041-5053.e19
- [44] Wang Z, Grange M, Wagner T, *et al.* The molecular basis for sarcomere organization in vertebrate skeletal muscle. Cell, 2021, 184(8):2135-2150.e13
- [45] Wang Z, Grange M, Pospich S, *et al.* Structures from intact myofibrils reveal mechanism of thin filament regulation through nebulin. Science, 2022, 375(6582): eabn1934
- [46] Tamborrini D, Wang Z, Wagner T, *et al.* Structure of the native myosin filament in the relaxed cardiac sarcomere. Nature, 2023, 623(7988): 863-871
- [47] Brown A, Shao S. Ribosomes and cryo-EM: a duet. Curr Opin Struct Biol, 2018, 52: 1-7
- [48] Xue L, Lenz S, Zimmermann-Kogadeeva M, et al. Visualizing translation dynamics at atomic detail inside a bacterial cell. Nature, 2022, 610(7930): 205-211
- [49] Xue L, Spahn C M T, Schacherl M, et al. Structural insights into context-dependent inhibitory mechanisms of chloramphenicol in cells. BioRxiv, 2023. https://doi.org/10.1101/2023.06.07.544107
- [50] Hoffmann P C, Kreysing J P, Khusainov I, et al. Structures of the eukaryotic ribosome and its translational states in situ. Nat Commun, 2022, 13(1): 7435

- [51] Xing H, Taniguchi R, Khusainov I, *et al.* Translation dynamics in human cells visualized at high resolution reveal cancer drug action. Science, 2023, **381**(6653): 70-75
- [52] Fedry J, Silva J, Vanevic M, et al. Visualization of translation reorganization upon persistent ribosome collision stress in mammalian cells. Mol Cell, 2024, 84(6): 1078-1089.e4
- [53] Dubochet J, Adrian M, Chang J J, et al. Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. Q Rev Biophys, 1988, 21(2): 129-228
- [54] Dubochet J. The physics of rapid cooling and its implications for cryoimmobilization of cells. Methods Cell Biol, 2007, 79: 7-21
- [55] Toro-Nahuelpan M, Zagoriy I, Senger F, et al. Tailoring cryoelectron microscopy grids by photo-micropatterning for in-cell structural studies. Nat Methods, 2020, 17(1): 50-54
- [56] Bäuerlein F J B, Saha I, Mishra A, et al. In situ architecture and cellular interactions of PolyQ inclusions. Cell, 2017, 171(1): 179-187.e10
- [57] Ravelli R B G, Nijpels F J T, Henderikx R J M, et al. Cryo-EM structures from sub-nl volumes using pin-printing and jet vitrification. Nat Commun, 2020, 11(1): 2563
- [58] Fuest M, Schaffer M, Nocera G M, et al. In situ microfluidic cryofixation for cryo focused ion beam milling and cryo electron tomography. Sci Rep, 2019, 9(1): 19133
- [59] Medalia O, Weber I, Frangakis A S, *et al.* Macromolecular architecture in eukaryotic cells visualized by cryoelectron tomography. Science, 2002, **298**(5596): 1209-1213
- [60] Fäßler F, Dimchev G, Hodirnau V V, et al. Cryo-electron tomography structure of Arp2/3 complex in cells reveals new insights into the branch junction. Nat Commun, 2020, 11(1): 6437
- [61] Al-Amoudi A, Studer D, Dubochet J. Cutting artefacts and cutting process in vitreous sections for cryo-electron microscopy. J Struct Biol, 2005, 150(1): 109-121
- [62] Dumoux M, Glen T, Smith J L R, et al. Cryo-plasma FIB/SEM volume imaging of biological specimens. Elife, 2023, 12: e83623
- [63] Berger C, Dumoux M, Glen T, et al. Plasma FIB milling for the determination of structures in situ. Nat Commun, 2023, 14(1): 629
- [64] Tuijtel M W, Cruz-León S, Kreysing J P, et al. Thinner is not always better: optimizing cryo-lamellae for subtomogram averaging. SciAdv, 2024, 10(17): eadk6285
- [65] Lucas B A, Grigorieff N. Quantification of gallium cryo-FIB milling damage in biological lamellae. Proc Natl Acad Sci USA, 2023, 120(23): e2301852120
- [66] Yang Q, Wu C, Zhu D, *et al.* The reduction of FIB damage on cryolamella by lowering energy of ion beam revealed by a quantitative analysis. Structure, 2023, **31**(10): 1275-1281.e4
- [67] Steele A V, Schwarzkopf A, McClelland J J, et al. High-brightness Cs focused ion beam from a cold-atomic-beam ion source. Nano Futures, 2017, 1(1):015005
- [68] Tacke S, Erdmann P, Wang Z, et al. A streamlined workflow for automated cryo focused ion beam milling. J Struct Biol, 2021, 213(3): 107743
- [69] Lau K, Jonker C, Liu J, *et al.* The undesirable effects and impacts of ice contamination experienced in the cryo-electron tomography

workflow and available solutions. Micros Today, 2022, 30(3): 30-35

- [70] Zachs T, Schertel A, Medeiros J, et al. Fully automated, sequential focused ion beam milling for cryo-electron tomography. Elife, 2020, 9: e52286
- [71] Buckley G, Gervinskas G, Taveneau C, et al. Automated cryolamella preparation for high-throughput in situ structural biology. J Struct Biol, 2020, 210(2): 107488
- [72] Kuba J, Mitchels J, Hovorka M, et al. Advanced cryo-tomography workflow developments-correlative microscopy, milling automation and cryo-lift-out. J Microsc, 2021, 281(2): 112-124
- [73] Klumpe S, Fung H K, Goetz S K, et al. A modular platform for automated cryo-FIB workflows. Elife, 2021, 10: e70506
- [74] Kelley K, Raczkowski A M, Klykov O, *et al.* Waffle Method: a general and flexible approach for improving throughput in FIBmilling. Nat Commun, 2022, **13**(1): 1857
- [75] Zhang J, Zhang D, Sun L, et al. VHUT-cryo-FIB, a method to fabricate frozen hydrated lamellae from tissue specimens for in situ cryo-electron tomography. J Struct Biol, 2021, 213(3): 107763
- [76] Mahamid J, Schampers R, Persoon H, et al. A focused ion beam milling and lift-out approach for site-specific preparation of frozen-hydrated lamellas from multicellular organisms. J Struct Biol, 2015, 192(2): 262-269
- [77] Schaffer M, Pfeffer S, Mahamid J, et al. A cryo-FIB lift-out technique enables molecular-resolution cryo-ET within native *Caenorhabditis elegans* tissue. Nat Methods, 2019, 16(8): 757-762
- [78] Schiøtz O H, Kaiser C J O, Klumpe S, et al. Serial Lift-Out: sampling the molecular anatomy of whole organisms. Nat Methods, 2023, 21(9): 1684-1692
- [79] Arnold J, Mahamid J, Lucic V, *et al.* Site-specific cryo-focused ion beam sample preparation guided by 3D correlative microscopy. Biophys J, 2016, 110(4): 860-869
- [80] 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 Struct Biol, 2018, 201(1): 63-75
- [81] Fu X, Ning J, Zhong Z, et al. AutoCLEM: an automated workflow for correlative live-cell fluorescence microscopy and cryoelectron tomography. Sci Rep, 2019, 9(1): 19207
- [82] Li S, Wang Z, Jia X, et al. ELI trifocal microscope: a precise system to prepare target cryo-lamellae for in situ cryo-ET study. Nat Methods, 2023, 20(2): 276-283
- [83] Li W, Lu J, Xiao K, et al. Integrated multimodality microscope for accurate and efficient target-guided cryo-lamellae preparation. Nat Methods, 2023, 20(2): 268-275
- [84] Silvester E, Vollmer B, Pražák V, et al. DNA origami signposts for identifying proteins on cell membranes by electron cryotomography. Cell, 2021, 184(4): 1110-1121.e16
- [85] Wang Q, Mercogliano C P, Löwe J. A ferritin-based label for cellular electron cryotomography. Structure, 2011, 19(2): 147-154
- [86] Melia C E, Bolla J R, Katharios-Lanwermeyer S, et al. Architecture of cell-cell junctions in situ reveals a mechanism for

bacterial biofilm inhibition. Proc Natl Acad Sci USA, 2021, 118(31): e2109940118

- [87] Yi H, Strauss J D, Ke Z, et al. Native immunogold labeling of cell surface proteins and viral glycoproteins for cryo-electron microscopy and cryo-electron tomography applications. J Histochem Cytochem, 2015, 63(10): 780-792
- [88] Tian B, Zhou M, Feng F, *et al.* Cryogenic superresolution correlative light and electron microscopy of vitreous sections. Biophys Rep, 2022, 8(4): 193-204
- [89] Schorb M, Haberbosch I, Hagen W J H, et al. Software tools for automated transmission electron microscopy. Nat Methods, 2019, 16(6):471-477
- [90] Hagen W J H, Wan W, Briggs J A G. Implementation of a cryoelectron tomography tilt-scheme optimized for high resolution subtomogram averaging. J Struct Biol, 2017, 197(2): 191-198
- [91] Turoňová B, Hagen W J H, Obr M, et al. Benchmarking tomographic acquisition schemes for high-resolution structural biology. Nat Commun, 2020, 11(1): 876
- [92] Wu C, Huang X, Cheng J, et al. High-quality, high-throughput cryo-electron microscopy data collection via beam tilt and astigmatism-free beam-image shift. J Struct Biol, 2019, 208(3): 107396
- [93] Bouvette J, Liu H F, Du X, et al. Beam image-shift accelerated data acquisition for near-atomic resolution single-particle cryoelectron tomography. Nat Commun, 2021, 12(1): 1957
- [94] Khavnekar S, Wan W, Majumder P, et al. Multishot tomography for high-resolution in situ subtomogram averaging. J Struct Biol, 2023, 215(1): 107911
- [95] Chreifi G, Chen S, Metskas L A, et al. Rapid tilt-series acquisition for electron cryotomography. J Struct Biol, 2019, 205(2): 163-169
- [96] Eisenstein F, Yanagisawa H, Kashihara H, et al. Parallel cryo electron tomography on *in situ* lamellae. Nat Methods, 2023, 20(1):131-138
- [97] 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
- [98] Khoshouei M, Pfeffer S, Baumeister W, et al. Subtomogram analysis using the Volta phase plate. J Struct Biol, 2017, 197(2): 94-101
- [99] Schwartz O, Axelrod J J, Campbell S L, et al. Laser phase plate for transmission electron microscopy. Nat Methods, 2019, 16(10): 1016-1020
- [100] Chua E Y D, Alink L M, Kopylov M, et al. Square beams for optimal tiling in transmission electron microscopy. Nat Methods, 2024, 21(4): 562-565
- [101] Peck A, Carter S D, Mai H, et al. Montage electron tomography of vitrified specimens. J Struct Biol, 2022, 214(2): 107860
- [102] Yang J E, Larson M R, Sibert B S, *et al.* Correlative montage parallel array cryo-tomography for *in situ* structural cell biology. Nat Methods, 2023, 20(10): 1537-1543
- [103] Burt A, Gaifas L, Dendooven T, et al. A flexible framework for multi-particle refinement in cryo-electron tomography. PLoS Biol,

2021, 19(8): e3001319

- [104] Mastronarde D N, Held S R. Automated tilt series alignment and tomographic reconstruction in IMOD. J Struct Biol, 2017, 197(2): 102-113
- [105] Ni T, Frosio T, Mendonça L, *et al.* High-resolution *in situ* structure determination by cryo-electron tomography and subtomogram averaging using emClarity. Nat Protoc, 2022, 17(2): 421-444
- [106] Chen M, Bell J M, Shi X, et al. A complete data processing workflow for cryo-ET and subtomogram averaging. Nat Methods, 2019, 16(11): 1161-1168
- [107] Zheng S, Wolff G, Greenan G, et al. AreTomo: an integrated software package for automated marker-free, motion-corrected cryo-electron tomographic alignment and reconstruction. J Struct Biol X, 2022, 6: 100068
- [108] Orlova E V, Saibil H R. Structural analysis of macromolecular assemblies by electron microscopy. Chem Rev, 2011, 111(12): 7710-7748
- [109] Yan R, Venkatakrishnan S V, Liu J, et al. MBIR: a cryo-ET 3D reconstruction method that effectively minimizes missing wedge artifacts and restores missing information. J Struct Biol, 2019, 206(2): 183-192
- [110] Geng Z, She Z, Zhou Q, et al. NUDIM: a non-uniform fast Fourier transform based dual-space constraint iterative reconstruction method in biological electron tomography. J Struct Biol, 2021, 213(3): 107770
- [111] Böhning J, Bharat T A M, Collins S M. Compressed sensing for electron cryotomography and high-resolution subtomogram averaging of biological specimens. Structure, 2022, 30(3): 408-417.e4
- [112] Tegunov D, Cramer P. Real-time cryo-electron microscopy data preprocessing with Warp. Nat Methods, 2019, 16(11): 1146-1152
- [113] Bepler T, Kelley K, Noble A J, et al. Topaz-Denoise: general deep denoising models for cryoEM and cryoET. Nat Commun, 2020, 11(1): 5208
- [114] Lehtinen J, Munkberg J, Hasselgren J, et al. Noise2Noise: learning image restoration without clean data. arXiv, 2018. https://doi.org/10.48550/arXiv.1803.04189
- [115] Buchholz T O, Jordan M, Pigino G, et al. Cryo-CARE: contentaware image restoration for cryo-transmission electron microscopy data//IEEE. 2019 IEEE 16th International Symposium on Biomedical Imaging (ISBI 2019). Venice, Italy: IEEE, 2019: 502-506
- [116] Deng Y, Chen Y, Zhang Y, et al. ICON: 3D reconstruction with 'missing-information' restoration in biological electron tomography. J Struct Biol, 2016, 195(1): 100-112
- [117] Liu Y T, Zhang H, Wang H, et al. Isotropic reconstruction for electron tomography with deep learning. Nat Commun, 2022, 13(1):6482
- [118] Zhai X, Lei D, Zhang M, et al. LoTToR: an algorithm for missingwedge correction of the low-tilt tomographic 3D reconstruction of a single-molecule structure. Sci Rep, 2020, 10(1): 10489
- [119] Jasnin M, Beck F, Ecke M, et al. The architecture of traveling actin

waves revealed by cryo-electron tomography. Structure, 2019, **27**(8): 1211-1223.e5

- [120] Chen M, Dai W, Sun S Y, et al. Convolutional neural networks for automated annotation of cellular cryo-electron tomograms. Nat Methods, 2017, 14(10): 983-985
- [121] de Teresa-Trueba I, Goetz S K, Mattausch A, *et al.* Convolutional networks for supervised mining of molecular patterns within cellular context. Nat Methods, 2023, 20(2): 284-294
- [122] Zeng X, Kahng A, Xue L, *et al.* High-throughput cryo-ET structural pattern mining by unsupervised deep iterative subtomogram clustering. Proc Natl Acad Sci USA, 2023, **120**(15): e2213149120
- [123] Beck M, Förster F, Ecke M, et al. Nuclear pore complex structure and dynamics revealed by cryoelectron tomography. Science, 2004, 306(5700): 1387-1390
- [124] Förster F, Medalia O, Zauberman N, *et al*. Retrovirus envelope protein complex structure *in situ* studied by cryo-electron tomography. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, **102**(13): 4729-4734
- [125] Wan W, Briggs J A. Cryo-electron tomography and subtomogram averaging. Methods Enzymol, 2016, 579: 329-367
- [126] Castaño-Díez D, Kudryashev M, Arheit M, et al. Dynamo: a flexible, user-friendly development tool for subtomogram averaging of cryo-EM data in high-performance computing environments. J Struct Biol, 2012, 178(2): 139-151
- [127] Martinez-Sanchez A, Kochovski Z, Laugks U, et al. Template-free detection and classification of membrane-bound complexes in cryo-electron tomograms. Nat Methods, 2020, 17(2): 209-216
- [128] Gaifas L, Kirchner M A, Timmins J, et al. Blik is an extensible 3D visualisation tool for the annotation and analysis of cryo-electron tomography data. PLoS Biol, 2024, 22(4): e3002447
- [129] Bohm J, Frangakis A S, Hegerl R, et al. Toward detecting and identifying macromolecules in a cellular context: template matching applied to electron tomograms. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(26): 14245-14250
- [130] Ortiz J O, Förster F, Kürner J, et al. Mapping 70S ribosomes in intact cells by cryoelectron tomography and pattern recognition. J Struct Biol, 2006, 156(2): 334-341
- [131] Hrabe T, Chen Y, Pfeffer S, et al. PyTom: a python-based toolbox for localization of macromolecules in cryo-electron tomograms and subtomogram analysis. J Struct Biol, 2012, 178(2): 177-188
- [132] Cruz-León S, Majtner T, Hoffmann PC, et al. High-confidence 3D template matching for cryo-electron tomography. Nat Commun, 2024, 15(1): 3992
- [133] Lucas B A, Himes B A, Xue L, et al. Locating macromolecular assemblies in cells by 2D template matching with cisTEM. eLife, 2021, 10: e68946
- [134] Moebel E, Martinez-Sanchez A, Lamm L, et al. Deep learning improves macromolecule identification in 3D cellular cryoelectron tomograms. Nat Methods, 2021, 18(11): 1386-1394
- [135] Liu G, Niu T, Qiu M, et al. DeepETPicker: Fast and accurate 3D particle picking for cryo-electron tomography using weakly supervised deep learning. Nat Commun, 2024, 15(1): 2090

- [136] Wagner T, Merino F, Stabrin M, et al. SPHIRE-crYOLO is a fast and accurate fully automated particle picker for cryo-EM. Commun Biol, 2019, 2: 218
- [137] Genthe E, Miletic S, Tekkali I, *et al.* PickYOLO: fast deep learning particle detector for annotation of cryo electron tomograms. J Struct Biol, 2023, 215(3): 107990
- [138] Gubins I, Schot G V D, Veltkamp R C, et al. SHREC'19 Track: Classification in Cryo-Electron Tomograms//Proceedings of the Eurographics Workshop on 3D Object Retrieval, F, 2019. DOI: 10.2312/3dor.20191061
- [139] Nickell S, Förster F, Linaroudis A, et al. TOM software toolbox: acquisition and analysis for electron tomography. J Struct Biol, 2005, 149(3): 227-234
- [140] Bharat T A M, Scheres S H W. Resolving macromolecular structures from electron cryo-tomography data using subtomogram averaging in RELION. Nat Protoc, 2016, 11(11): 2054-2065
- [141] De Rosier D J, Klug A. Reconstruction of three dimensional structures from electron micrographs. Nature, 1968, 217(5124): 130-134
- [142] Himes BA, Zhang P. emClarity: software for high-resolution cryoelectron tomography and subtomogram averaging. Nat Methods, 2018, 15(11): 955-961
- [143] Chen M, Shi X, Yu Z, et al. In situ structure of the AcrAB-TolC efflux pump at subnanometer resolution. Structure, 2022, 30(1): 107-113.e3
- [144] Liu H F, Zhou Y, Huang Q, *et al.* nextPYP: a comprehensive and scalable platform for characterizing protein variability *in situ* using single-particle cryo-electron tomography. Nat Methods, 2023, 20(12): 1909-1919
- [145] Zivanov J, Otón J, Ke Z, *et al.* A Bayesian approach to singleparticle electron cryo-tomography in RELION-4.0. eLife, 2022, 11: e83724
- [146] Ni T, Sun Y, Burn W, et al. Structure and assembly of cargo Rubisco in two native α-carboxysomes. Nat Commun, 2022, 13(1): 4299
- [147] Bharat TAM, Russo C J, Löwe J, et al. Advances in single-particle electron cryomicroscopy structure determination applied to subtomogram averaging. Structure, 2015, 23(9): 1743-1753
- [148] Turoňová B, Schur F K M, Wan W, et al. Efficient 3D-CTF correction for cryo-electron tomography using NovaCTF improves subtomogram averaging resolution to 3.4Å. J Struct Biol, 2017, 199(3): 187-195
- [149] Kunz M, Frangakis A S. Three-dimensional CTF correction improves the resolution of electron tomograms. J Struct Biol, 2017, 197(2): 114-122
- [150] Li X, Mooney P, Zheng S, *et al.* Electron counting and beaminduced motion correction enable near-atomic-resolution singleparticle cryo-EM. Nat Methods, 2013, **10**(6): 584-590
- [151] Grant T, Grigorieff N. Measuring the optimal exposure for single particle cryo-EM using a 2.6 Å reconstruction of rotavirus VP6. eLife, 2015, 4: e06980
- [152] Schur F K M, Obr M, Hagen W J H, et al. An atomic model of

HIV-1 capsid-SP1 reveals structures regulating assembly and maturation. Science, 2016, **353**(6298): 506-508

- [153] Bartesaghi A, Lecumberry F, Sapiro G, et al. Protein secondary structure determination by constrained single-particle cryoelectron tomography. Structure, 2012, 20(12): 2003-2013
- [154] Scheres S H. Beam-induced motion correction for sub-megadalton cryo-EM particles. Elife, 2014, 3: e03665
- [155] Mattei S, Glass B, Hagen W J H, et al. The structure and flexibility of conical HIV-1 capsids determined within intact virions. Science, 2016, 354(6318): 1434-1437
- [156] de la Morena J J, Conesa P, Fonseca Y C, *et al.* ScipionTomo: towards cryo-electron tomography software integration, reproducibility, and validation. J Struct Biol, 2022, **214**(3): 107872
- [157] Balyschew N, Yushkevich A, Mikirtumov V, et al. Streamlined structure determination by cryo-electron tomography and subtomogram averaging using TomoBEAR. Nat Commun, 2023, 14:6543
- [158] Khavnekar S, Erdmann P S, Wan W. TOMOMAN: a software package for large scale cryo-electron tomography data preprocessing, community data sharing, and collaborative computing. bioRxiv, 2024. https://doi.org/10.1101/2024.05.02.589639
- [159] Wang H, Liao S, Yu X, *et al.* TomoNet: a streamlined cryoET software pipeline with automatic particle picking on flexible lattices. bioRxiv, 2024. DOI: 10.1101/2024.02.17.580557
- [160] Sanchez R M, Zhang Y, Chen W, et al. Subnanometer-resolution structure determination *in situ* by hybrid subtomogram averaging single particle cryo-EM. Nat Commun, 2020, 11(1): 3709
- [161] Song K, Shang Z, Fu X, et al. In situ structure determination at nanometer resolution using TYGRESS. Nat Methods, 2020, 17(2): 201-208
- [162] You X, Zhang X, Cheng J, et al. In situ structure of the red algal phycobilisome-PSII-PSI-LHC mega complex. Nature, 2023, 616(7955):199-206
- [163] Zheng W, Chai P, Zhu J, et al. High-resolution in situ structures of mammalian respiratory super complexes. Nature, 2024, 631(8019):232-239
- [164] Cheng J, Li B, Si L, et al. Determining structures in a native environment using single-particle cryoelectron microscopy images. Innovation (Camb), 2021, 2(4): 100166
- [165] Lucas B A, Zhang K, Loerch S, et al. In situ single particle classification reveals distinct 60S maturation intermediates in cells. eLife, 2022, 11: e79272
- [166] Harastani M, Eltsov M, Leforestier A, et al. HEMNMA-3D: cryo electron tomography method based on normal mode analysis to study continuous conformational variability of macromolecular complexes. Front Mol Biosci, 2021, 8: 663121
- [167] Zhang H, Li Y, Liu Y, et al. A method for restoring signals and revealing individual macromolecule states in cryo-ET, REST. Nat Commun, 2023, 14(1): 2937
- [168] Rangan R, Feathers R, Khavnekar S, et al. CryoDRGN-ET: deep reconstructing generative networks for visualizing dynamic biomolecules inside cells. Nat Methods, 2024, 21(8): 1537-1545

- [169] Powell B M, Davis J H. Learning structural heterogeneity from cryo-electron sub-tomograms with tomoDRGN. Nat Methods, 2024, 21(8): 1525-1536
- [170] Liu S, Hoess P, Ries J. Super-resolution microscopy for structural cell biology. Annu Rev Biophys, 2022, 51: 301-326
- [171] Guo Q, Lehmer C, Martínez-Sánchez A, et al. In situ structure of neuronal C9orf72 poly-GA aggregates reveals proteasome recruitment. Cell, 2018, 172(4): 696-705.e12
- [172] Albert S, Wietrzynski W, Lee C W, et al. Direct visualization of degradation microcompartments at the ER membrane. Proc Natl Acad Sci USA, 2020, 117(2): 1069-1080
- [173] Ermel U H, Arghittu S M, Frangakis A S. ArtiaX: an electron tomography toolbox for the interactive handling of subtomograms in UCSF ChimeraX. Protein Sci, 2022, 31(12): e4472
- [174] Dimchev G, Amiri B, Fäßler F, et al. Computational toolbox for ultrastructural quantitative analysis of filament networks in cryo-ET data. J Struct Biol, 2021, 213(4): 107808
- [175] Jiang W, Wagner J, Du W, et al. A transformation clustering algorithm and its application in polyribosomes structural profiling. Nucleic Acids Res, 2022, 50(16): 9001-9011
- [176] Thornburg Z R, Bianchi D M, Brier T A, et al. Fundamental behaviors emerge from simulations of a living minimal cell. Cell, 2022, 185(2): 345-360.e28
- [177] Vijayakrishnan S. In situ imaging of virus-infected cells by cryoelectron tomography: an overview. Subcell Biochem, 2023, 106: 3-36
- [178] Sexton DL, Burgold S, Schertel A, et al. Super-resolution confocal cryo-CLEM with cryo-FIB milling for in situ imaging of Deinococcus radiodurans. Curr Res Struct Biol, 2021, 4: 1-9
- [179] Loginov S V, Fermie J, Fokkema J, et al. Correlative organelle microscopy: fluorescence guided volume electron microscopy of intracellular processes. Front Cell Dev Biol, 2022, 10: 829545
- [180] Klein S, Wimmer B H, Winter S L, et al. Post-correlation onlamella cryo-CLEM reveals the membrane architecture of lamellar bodies. Commun Biol, 2021, 4(1): 137
- [181] Kirchweger P, Mullick D, Swain P P, et al. Correlating cryo-super resolution radial fluctuations and dual-axis cryo-scanning transmission electron tomography to bridge the light-electron resolution gap. J Struct Biol, 2023, 215(3): 107982
- [182] 李尉兴,谷陆生,徐晓君,等.冷冻超分辨光电融合成像技术
 新挑战,新机遇.生物化学与生物物理进展,2018,45(9): 957-960
 LiWX,GuLS,XuXJ, et al. Prog Biochem Biophys, 2018,45(9): 957-960
- [183] Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. Science, 2006, 313(5793): 1642-1645
- [184] Rust M J, Bates M, Zhuang X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). Nat Methods, 2006, 3(10): 793-796
- [185] Gu L, Li Y, Zhang S, et al. Molecular resolution imaging by repetitive optical selective exposure. Nat Methods, 2019, 16(11):

1114-1118

- [186] Gu L, Li Y, Zhang S, *et al.* Molecular-scale axial localization by repetitive optical selective exposure. Nat Methods, 2021, 18(4): 369-373
- [187] Li Y, Xue Y, Xu X, et al. A mitochondrial FUNDC1/HSC70 interaction organizes the proteostatic stress response at the risk of cell morbidity. EMBO J, 2019, 38(3): e98786
- [188] Ren R, Deng L, Xue Y, *et al.* Visualization of aging-associated chromatin alterations with an engineered TALE system. Cell Res, 2017, 27(4): 483-504
- [189] Fu Z, Peng D, Zhang M, et al. mEosEM withstands osmium staining and Epon embedding for super-resolution CLEM. Nat Methods, 2020, 17(1): 55-58
- [190] Peng D, Li N, He W, et al. Improved fluorescent proteins for dualcolour post-embedding CLEM. Cells, 2022, 11(7): 1077
- [191] Liu B, Xue Y, Zhao W, et al. Three-dimensional super-resolution protein localization correlated with vitrified cellular context. Sci Rep, 2015, 5: 13017
- [192] Li S, Jia X, Niu T, et al. HOPE-SIM, a cryo-structured illumination fluorescence microscopy system for accurately targeted cryoelectron tomography. Commun Biol, 2023, 6(1): 474
- [193] Dahlberg P D, Saurabh S, Sartor A M, et al. Cryogenic singlemolecule fluorescence annotations for electron tomography reveal *in situ* organization of key proteins in *Caulobacter*. Proc Natl Acad Sci USA, 2020, **117**(25): 13937-13944
- [194] Hoffman D P, Shtengel G, Xu C S, et al. Correlative threedimensional super-resolution and block-face electron microscopy of whole vitreously frozen cells. Science, 2020, 367(6475): eaaz5357
- [195] Last M G F, Voortman L M, Sharp T H. scNodes: a correlation and processing toolkit for super-resolution fluorescence and electron microscopy. Nat Methods, 2023, 20(10): 1445-1446
- [196] Last M G F, Noteborn W E M, Voortman L M, et al. Superresolution fluorescence imaging of cryosamples does not limit achievable resolution in cryoEM. J Struct Biol, 2023, 215(4): 108040
- [197] Fung H K H, Hayashi Y, Salo V T, et al. Genetically encoded multimeric tags for subcellular protein localization in cryo-EM. Nat Methods, 2023, 20(12): 1900-1908
- [198] Baker L A, Sinnige T, Schellenberger P, et al. Combined ¹Hdetected solid-state NMR spectroscopy and electron cryotomography to study membrane proteins across resolutions in native environments. Structure, 2018, 26(1): 161-170.e3
- [199] Harkiolaki M, Darrow M C, Spink M C, et al. Cryo-soft X-ray tomography: using soft X-rays to explore the ultrastructure of whole cells. Emerg Top Life Sci, 2018, 2(1): 81-92
- [200] Peddie C J, Genoud C, Kreshuk A, et al. Volume electron microscopy. Nat Rev Methods Primers, 2022, 2:51
- [201] Winding M, Pedigo B D, Barnes C L, et al. The connectome of an insect brain. Science, 2023, 379(6636): eadd9330
- [202] Scheffer L K, Xu C S, Januszewski M, et al. A connectome and analysis of the adult *Drosophila* central brain. eLife, 2020,

9:e57443

- [203] Loomba S, Straehle J, Gangadharan V, et al. Connectomic comparison of mouse and human cortex. Science, 2022, 377(6602): eabo0924
- [204] Hawdon A, Geoghegan N D, Mohenska M, et al. Apicobasal RNA asymmetries regulate cell fate in the early mouse embryo. Nat Commun, 2023, 14(1): 2909
- [205] Lössl P, van de Waterbeemd M, Heck A J. The diverse and expanding role of mass spectrometry in structural and molecular biology. EMBO J, 2016, 35(24): 2634-2657
- [206] von Kügelgen A, Tang H, Hardy G G, et al. In situ structure of an intact lipopolysaccharide-bound bacterial surface layer. Cell, 2020, 180(2): 348-358.e15
- [207] Slavov N. Unpicking the proteome in single cells. Science, 2020, 367(6477): 512-513
- [208] Graziadei A, Rappsilber J. Leveraging crosslinking mass spectrometry in structural and cell biology. Structure, 2022, 30(1): 37-54
- [209] Leung M R, Zenezini Chiozzi R, Roelofs M C, et al. In-cell structures of conserved supramolecular protein arrays at the mitochondria-cytoskeleton interface in mammalian sperm. Proc NatlAcad Sci USA, 2021, 118(45): e2110996118
- [210] Baek M, DiMaio F, Anishchenko I, *et al.* Accurate prediction of protein structures and interactions using a three-track neural network. Science, 2021, **373**(6557): 871-876
- [211] Ahdritz G, Bouatta N, Floristean C, et al. OpenFold: retraining AlphaFold2 yields new insights into its learning mechanisms and capacity for generalization. Nat Methods, 2024, 21(8): 1514-1524
- [212] Levitz T S, Weckener M, Fong I, et al. Approaches to using the chameleon: robust, automated, fast-plunge cryoEM specimen preparation. Front Mol Biosci, 2022, 9: 903148
- [213] Eisenstein F, Fukuda Y, Danev R. Smart parallel automated cryo electron tomography. Nat Methods, 2024, 21: 1612-1615
- [214] Zeng X, Ding Y, Zhang Y, et al. DUAL: deep unsupervised simultaneous simulation and denoising for cryo-electron tomography. bioRxiv, 2024. https://doi.org/10.1101/2024.03.02.583135
- [215] Wiedemann S, Heckel R. A deep learning method for simultaneous denoising and missing wedge reconstruction in cryogenic electron

tomography. Nat Commun, 2024, 15(1): 8255

- [216] Harastani M, Patra G, Kervrann C, et al. Template learning: deep learning with domain randomization for particle picking in cryo-electron tomography. bioRxiv, 2024. https://doi.org/10.1101/2024.03.20.585905
- [217] He J, Li T, Huang S Y. Improvement of cryo-EM maps by simultaneous local and non-local deep learning. Nat Commun, 2023, 14(1): 3217
- [218] He J, Lin P, Chen J, et al. Model building of protein complexes from intermediate-resolution cryo-EM maps with deep learningguided automatic assembly. Nat Commun, 2022, 13(1): 4066
- [219] Gao J, Tong M, Lee C, et al. DomainFit: identification of protein domains in cryo-EM maps at intermediate resolution using AlphaFold2-predicted models. Structure, 2024, 32(8): 1248-1259.e5
- [220] Nakamura A, Meng H, Zhao M, et al. Fast and automated protein-DNA/RNA macromolecular complex modeling from cryo-EM maps. Brief Bioinform, 2023, 24(2): bbac632
- [221] Zhang X, Zhang B, Freddolino P L, et al. CR-I-TASSER: assemble protein structures from cryo-EM density maps using deep convolutional neural networks. Nat Methods, 2022, 19(2): 195-204
- [222] Frenz B, Walls A C, Egelman E H, et al. RosettaES: a sampling strategy enabling automated interpretation of difficult cryo-EM maps. Nat Methods, 2017, 14(8): 797-800
- [223] Terashi G, Kihara D. *De novo* main-chain modeling for EM maps using MAINMAST. Nat Commun, 2018, 9(1): 1618
- [224] Vuillemot R, Rouiller I, Jonić S. MDTOMO method for continuous conformational variability analysis in cryo electron subtomograms based on molecular dynamics simulations. Sci Rep, 2023, 13(1): 10596
- [225] Harastani M, Eltsov M, Leforestier A, et al. TomoFlow: analysis of continuous conformational variability of macromolecules in cryogenic subtomograms based on 3D dense optical flow. J Mol Biol, 2022, 434(2): 167381
- [226] Rice G, Wagner T, Stabrin M, et al. TomoTwin: generalized 3D localization of macromolecules in cryo-electron tomograms with structural data mining. Nat Methods, 2023, 20(6): 871-880

Frontiers in *in situ* Cryo-electron Microscopy and Visual Proteomics*

LI Kuan-Ying¹, WANG Wen-Xue¹, ZHU Yun^{1)**}, XUE Liang^{1)**}, SUN Fei^{1,2})

(¹⁾National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;
²⁾Guangzhou Institutes of Biomedicine and Health, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510530, China)

Graphical abstract



Tilt-series of cellular lamella

Abstract In recent years, with the continuous development of *in situ* cryo-electron microscopy (cryo-EM) and artificial intelligence (AI) technologies, the research of structural biology has undergone a paradigm shift. Structural analysis is no longer confined to isolated and purified biomolecules, and determination of high-resolution *in situ* structures directly within cells and tissues becomes feasible. Furthermore, structural analysis of the molecular landscapes of subcellular regions can be performed to gain a deeper understanding of the molecular

ZHU Yun. Tel: 86-10-64888582, E-mail: zhuyun@ibp.ac.cn

XUE Liang. Tel: 86-10-64887252, E-mail: liangxue@ibp.ac.cn

^{*} This work was supported by grants from National Science Foundation for Distinguished Young Scholars of China (31925026) and National Key Research and Development Program (2021YFA1301500).

^{**} Corresponding author.

Received: July 17, 2024 Accepted: August 16, 2024

mechanisms of living activities in the native functional context. Through determining *in situ* structures of various protein complexes within the cell, it is feasible to visualize the proteome with spatial and quantitative information, which is often referred to as visual proteomics. Emerging *in situ* structural methods represented by cryo-electron tomography (cryo-ET) hold the promise to elucidate the three-dimensional interaction networks of the intracellular proteome and understand their activities in a systematic manner. To advance *in situ* cryo-EM/ET and visual proteomics in China, this review summarizes the new research paradigms and technological advances, showcases the superiority of new concepts and technologies with representative examples, and discusses the future prospects in the field.

Key words structural biology, cell biology, systems biology, cryo-electron microscopy, cryo-electron tomography, visual proteomics, sub-tomogram averaging, cryo-correlative light and electron microscopy, artificial intelligence

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0330