

冷冻电子断层三维重构和子断层平均技术

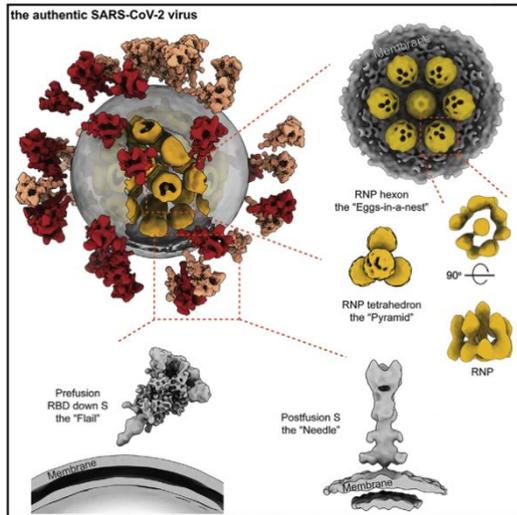
► 李昊 何万中

(分析测试中心生物电镜组 Tel: 010-82698318 Email: lihao9x@iccas.ac.cn)

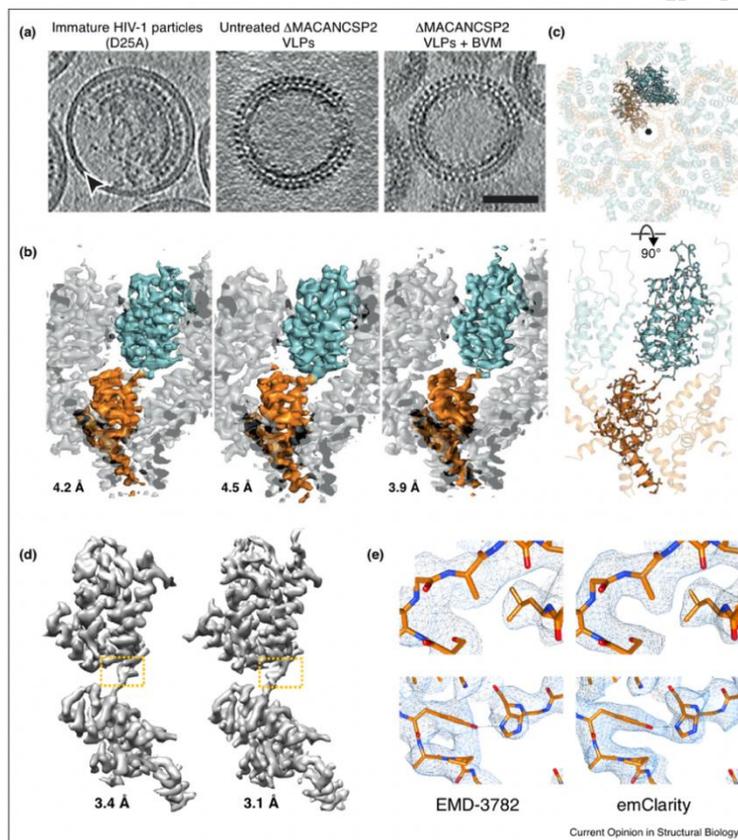
一、引言

2013 年以来, 随着新型直接探测电子相机技术和三维重构新算法在冷冻电镜领域的应用, 冷冻电镜技术现已成为结构生物学的主流研究工具。冷冻电镜单颗粒分析技术 (Cryo-EM) 目前已经成为解析生物大分子原子分辨率结构的常规工具; 而另一个冷冻电镜应用领域, 解析非均一样品三维结构的冷冻电子断层成像技术 (Cryo-ET) 目前也正在加速发展, 尤其是最近兴起的多种子断层平均技术 (sub-tomogram average, STA), 这项技术可以解析出非均一样品中 (病毒, 亚细胞器, 细胞等) 重复结构单元的高分辨率三维结构 (分辨率最高已达 3 \AA ^[1])。现如今, 冷冻电镜单颗粒分析技术已经相当成熟, 对于稳定均一的样品 (如蛋白质及复合物, 病毒颗粒等) 解析出原子级分辨率三位结构已经非常容易^[2]。然而, 对于非均一的样品 (如, 没有固定形状的病毒颗粒、不稳定的大型复合物、细胞原位复合物) 的三维结构, 则需要用冷冻电子断层三维重构技术结合子断层平均技术来解析^[3]。

目前研究人员利用 Cryo-ET 及子断层平均技术解析了越来越多的非均一样品三维结构。例如 Yao 等人成功解析出 SARS-CoV-2 病毒结构 (平均分辨率达到 $8.7 - 11 \text{ \AA}$), 揭示了病毒的结构细节及 RNA 装入腔体的分子机制^[4]; Liu 等人成功解析出 HIV 病毒的 GP120 与中和抗体形成的复合物高分辨率三维结构及并揭示其构象变化^[5]; Zhang 等人甚至将未成熟的 HIV-1 Gag 颗粒结构的分辨率提高到 3.1 \AA ^[6]。本文将简要介绍 Cryo-ET 及子断层平均技术的基本原理与实现方法, 展示一些应用实例, 并讨论 Cryo-ET 的可能的发展方向。



● 图 1、 SARS-CoV-2 病毒分子结构^[4]



● 图 2、子断层图平均获得的 HIV-1 外壳蛋白高分辨率结构^[7]

二、Cryo-ET 技术原理

Cryo-ET 技术是在低剂量成像条件下采集样品同一区域的单轴倾斜系列电镜照片（一般在 $-60^{\circ}\sim 60^{\circ}$ 按 $2\text{-}3^{\circ}$ 间隔拍摄；总曝光电子剂量在 100 电子/ Å^2 以下），进行三维重构获得电子断层图。但是，倾斜角度限制及低剂量条件约

束的采样间隔限制导致电子断层图信噪比非常差，而且还存在“缺失锥”造成的Z轴拉长变形问题，通常无法从其中直接提取高分辨率结构信息。后期子断层三维平均技术可以通过平均多个重复单元提高信噪比且能依靠不同重复单元取向弥补“缺失锥”信息，获得高分辨率的重复单元结构。

子断层平均法类似于单颗粒重构中二维投影分类平均，也就是将形态类似的颗粒进行对齐和平均，只不过是针对重复的三维颗粒进行分类平均。像单颗粒重建一样，子断层平均法的工作原理是对大量的三维颗粒进行迭代调整和平均，从而逐渐提高信噪比（SNR）和分辨率（图3）^[3]，直到最终得到高分辨率平均结构。

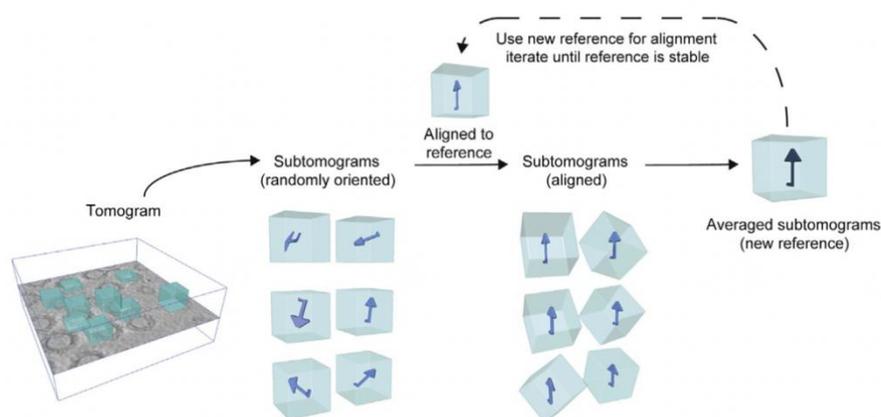


图 3、子断层平均工作流程^[8]

三、Cryo-ET 实现及软件介绍

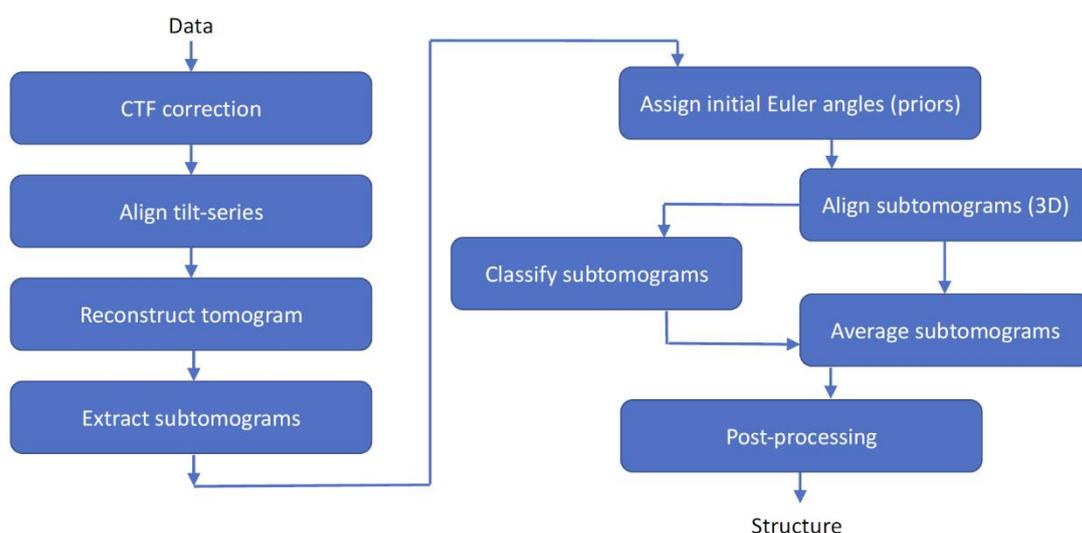
1) 计算平台

子断层平均需要用到 GPU 进行大量的计算。我们的平台配置为 2 块 10 核心 Xeon CPU，256 G 内存和 2 块拥有 24 G 显存的 3090 GPU，系统采用了 Ubuntu20.04，软件方面则使用了：MotionCor2, CTFFIND, Imod, Relion, Dynamo 和 ChimeraX。

2) 处理流程

多套倾斜系列电镜照片经过图 4 所示的流程，处理后得到多套电子断层图。整个流程包含预处理和子断层平均两个部分。预处理包括图像的抖动校正、CTF 校正、对齐和断层图重构。拍摄照片时因电子束引起的样品抖动，会导致照片模

糊不清，使用 MotionCor2 可以实现抖动校正。原理是将电子相机高速拍摄的一系列低剂量多帧照片通过叠加不同帧照片的相同特征来纠正，进而合成一张抖动校正的清晰图像^[9]。抖动校正后的照片可以用 CTFFIND^[10]程序来进行衬度传递函数（CTF）校正^[11]。接下来，用 IMOD 完成倾斜系列对齐。它是以样品表面的胶体金颗粒作为基准标记进行最小二乘拟合对齐。最后，用 IMOD 的加权背投影算法将对齐的倾斜系列照片计算得到三维重构图（断层图）^[12]，如图 5 所示。



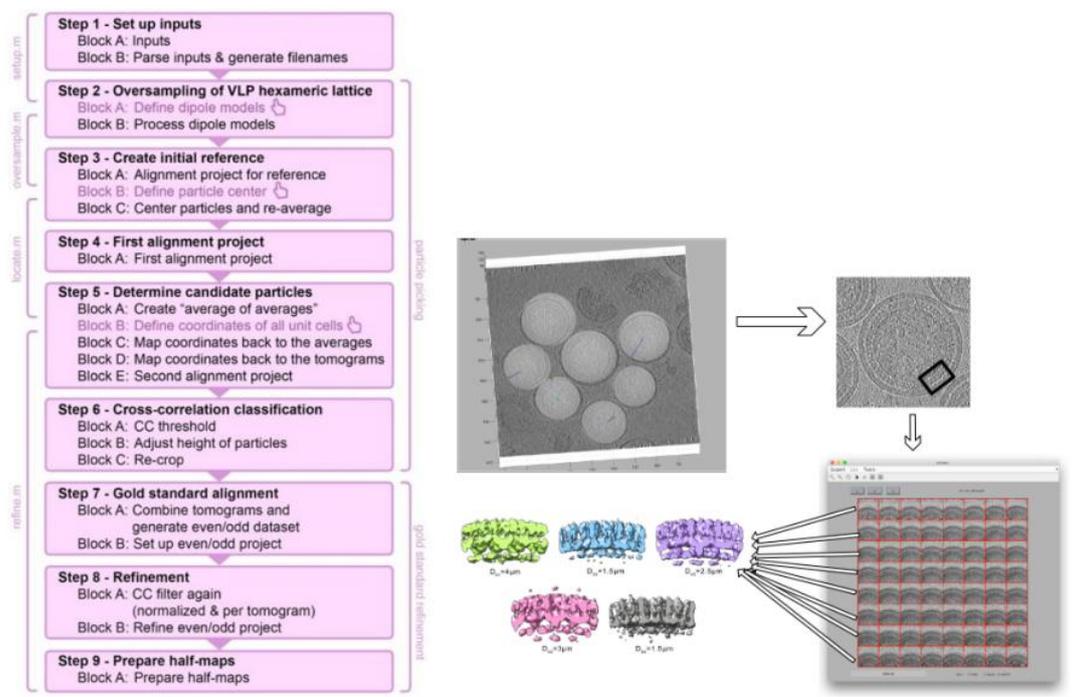
● 图 4、电子断层三维重构与子断层平均流程图

2D projections -> 3D reconstruction



● 图 5、背投影实现二维倾斜序列计算得到断层图——图片来源于 Baumeist

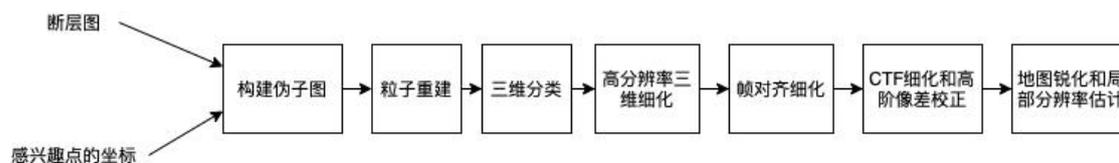
获得多套电子断层图后，接下来进行子断层平均。子断层平均常用软件有 Relion^[13]和 Dynamo^[14]等，下面以 Dynamo 为例简要介绍子断层平均的一般流程，如图 6 所示。



● 图 6、Dynamo 子断层平均流程^[15]

使用 Dynamo 的 dtmslice 工具对断层图中感兴趣的区域进行子断层标注和剪裁提取（类似单颗粒方法），随后创建参考模板，对多个子断层进行多次对齐平均迭代，最终生成平均的三维结构。

Relion 的子断层平均与 Dynamo 类似，也是需要多次分类、对齐和平均。但 Relion 不能直接标记子断层，需要借助第三方工具标记获取子断层坐标，将子断层坐标和原始断层图提交到 Relion 进行处理，详细流程如图 7 所示。



● 图 7、Dynamo 的详细流程

3) 子断层平均软件对比

Zhang 等人^[7]于 2019 年对多个子断层平均软件进行了系统的比较，如表 1 所示。从表 1 可见，Relion 缺失 Dynamo 的模板匹配功能，而 Dynamo 则缺失了 3D CTF 校正功能，二者的缺失边缘修正方案也不同。需要指出的是，两款软件缺失的功能，都可联用整合其他工具进行弥补。

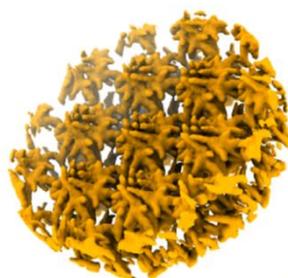
●表 1、RELION 和 Dynamo 关于子断层平均的功能比较^[7]

Comparison of features of major subtomogram averaging software packages		
Major Software	RELION	Dynamo
Template Matching ^a	No	Manual
3D CTF correction ^b	Per-particle	No
Missing-wedge compensation ^c	3D-Sampling	WMD
Tilt-series refinement	No	No
GPU support	No <small>(Yes, Relion4.0 Already support)</small>	Yes
GUI	Yes	Yes

^a Method used for extracting subtomograms.
^b 3D CTF correction algorithm such as implemented in NovaCTF
^c Handling of missing-wedge in subtomogram alignment and classification.
^d WMD: wedge masked differences.

四、应用实例与讨论

实例 1: 我们用 Dynamo 对 HIV-1 病毒样颗粒外壳重复单元进行了子断层平均，经过 19 天的计算，成功得到了 HIV-1 病毒样颗粒外壳上 4.5 Å 的六次对称的结构（如图 8 所示）。



●图 8 、 HIV-1 病毒样颗粒表面的六次对称三维结构

实例 2: 我们用 Relion 4.0 对未成熟 HIV-1 病毒样颗粒的断层图进行了子

断层平均处理，经过 9 天时间计算，获得了如图 9 所示的~3.4 Å 平均结构。



● 图 9、HIV-1 病毒样颗粒中的某个结构

从现有研究来看，AI 技术在冷冻电镜图像处理方面发挥越来越重要的作用。例如 Topaz^[16]的 AI 降噪、颗粒筛选；Isonet^[17]通过神经网络对断层图缺失数据部分进行补全获得了高质量的断层图；以及 CryoDRGN^[18]可直接使用神经网络对子断层进行三维重构。此外，AlphaFold^[19]已经在预测蛋白折叠的三维结构的精准度方面取得惊人进展，将来可以跟冷冻电子断层技术相结合来分析更多数据。我们期待整合这些新技术，在细胞组织原位电子断层结构分析方面，开展一系列方法和应用研究。

(部分数据来自网络，如有侵权请联系删除。)

参考文献：

- 1、Henderson, R. Von der Elektronenkristallographie zur Einzelpartikel-KryoEM (Nobel-Aufsatz). *Angew. Chem.* **2018**, *130*, 10966.
- 2、Zhang, P. Advances in cryo-electron tomography and subtomogram averaging and classification. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2019**, *58*, 249.
- 3、Wan, W. & Briggs, J. A. G. Cryo-Electron Tomography and Subtomogram Averaging. *Meth. Enzymol.* **2016**, *579*, 329.
- 4、Yao, H. *et al.* Molecular Architecture of the SARS-CoV-2 Virus. *Cell.* **2020**, *183*, 730. e13.
- 5、Liu, J., Bartesaghi, A., Borgnia, M. J., Sapiro, G. & Subramaniam, S. Molecular architecture of native HIV-1 gp120 trimers. *Nat.* **2008**, *455*, 109.

- 6、 Himes, B. A. & Zhang, P. emClarity: software for high-resolution cryo-electron tomography and subtomogram averaging. *Nat. Methods*. **2018**, *15*, 955.
- 7、 Zhang, P. Advances in cryo-electron tomography and subtomogram averaging and classification. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2019**, *58*, 249.
- 8、 Briggs, J. A. G. Structural biology in situ-the potential of subtomogram averaging. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2013**, *23*, 261.
- 9、 Zheng, S. Q. *et al.* MotionCor2: Anisotropic correction of beam-induced motion for improved cryo-electron microscopy. *Nat. Methods*. **2017**, *14*, 331.
- 10、 Rohou, A. & Grigorieff, N. CTFFIND4: Fast and accurate defocus estimation from electron micrographs. *J. Struct Biol.* **2015**, *192*, 216.
- 11、 Cheng, Y., Grigorieff, N., Penczek, P. A. & Walz, T. A primer to single-particle cryo-electron microscopy. *Cell*. **2015**, *161*, 438.
- 12、 James R. Kremer, David N. Mastronarde & J. Richard McIntosh. Computer Visualization of Three-Dimensional Image Data Using IMOD. *J. Struct Biol.* **1996**, *116*, 71.
- 13、 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*, 2054.
- 14、 Castaño-Díez, D., Kudryashev, M., Arheit, M. & Stahlberg, H. Dynamo: A flexible, user-friendly development tool for subtomogram averaging of cryo-EM data in high-performance computing environments. *J. Struct Biol.* **2012**, *178*, 139.
- 15、 Scaramuzza, S. & Castaño-Díez, D. Step-by-step guide to efficient subtomogram averaging of virus-like particles with Dynamo. *Plos Biol.* **2021**, *19*.
- 16、 Scaramuzza, S. & Castaño-Díez, D. Step-by-step guide to efficient subtomogram averaging of virus-like particles with Dynamo. *PLos Biol* . **2021**, *19*.
- 17、 Bepler, T., Morin, A., Rapp, M., Brasch, J., Shapiro, L., Noble, A. & Berger B. Positive-unlabeled convolutional neural networks for particle picking in cryo-electron micrographs. *Nat. Methods*. **2019**, *16*, 1153.
- 18、 Liu, Y., Zhang, H., Wang, H., Tao, C., Bi, G. & Hong Zhou, Z. Isotropic Reconstruction of Electron Tomograms with Deep Learning. *bioRxiv. Preprint*.

<https://doi.org/10.1101/2021.07.17.45212>.

19、Zhong, E. D., Bepler, T., Berger, B. & Davis, J. H. CryoDRGN: reconstruction of heterogeneous cryo-EM structures using neural networks. *Nat. Methods*. **2021**, *18*, 176.

版权为中国科学院化学研究所分析测试中心所有