

文章编号: 1004-0374(2011)11-1130-10

· 技术与应用 ·

低温电子显微技术在膜蛋白结构研究中的应用和展望

孙 飞*, 王 雪

(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)

摘 要: 介绍了蛋白质电子晶体学和单颗粒分析技术这两种低温电子显微技术在膜蛋白和膜蛋白复合体结构研究中的具体方法和近 10~20 年来的实际应用, 并分别分析了这两种方法的优势和瓶颈。此外, 还介绍了 Amphipol 替代、Streptavidin 二维晶体锚定脂质体和纳米球包被脂质体等近两年来出现的新的用于低温电镜成像的膜蛋白样品制备方法。最后对膜蛋白的低温电子显微研究的未来发展做了展望。

关键词: 膜蛋白; 低温电子显微技术; 电子晶体学; 单颗粒分析; 电镜样品制备

中图分类号: Q-33; Q503 **文献标志码:** A

Application and aspect of cryo-electron microscopy for the structural study of membrane proteins

SUN Fei*, WANG Xue

(National Laboratory of Biomacromolecule, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: Two three-dimensional cryo-electron microscopic techniques, electron crystallography and single particle analysis, and their application for the structural study of membrane proteins and membrane complexes in the recent ten to twenty years were introduced and reviewed. The benefits and drawbacks of those two methods on the membrane protein structural study were discussed accordingly. Besides, the recent appeared new sample preparation techniques for cryo-electron microscopic study of membrane proteins, e.g. the amphipol usage, liposome tethered by 2D crystal of streptavidin and solid-based liposome, were also introduced and discussed. Finally, I gave my personal aspect of the future development of cryo-electron microscopy on its potential of solving the 3D structure of membrane proteins.

Key words: membrane proteins; cryo-electron microscopy; electron crystallography; single particle analysis; sample preparation for electron microscopy

蛋白质的三维结构信息对于解释其生物学功能的分子机制非常重要, 对于理解蛋白质之间的特异相互作用也十分关键, 特别是那些重要药物靶点蛋白的精细三维结构信息对于开发特异靶向药性化合物是必需的。在细胞的整个蛋白质组中, 膜蛋白虽然只占 30%~40%, 却由于其在细胞膜的特殊地位, 在细胞新陈代谢活动中起到了至关重要的作用。各种受体、离子通道、离子泵、分子转运体和膜酶等膜蛋白在信号转导、免疫识别、物质转运和能量转换等过程中扮演着主要角色。由于膜蛋白功能的重要性, 在药物靶蛋白数据库中有 70% 是膜蛋白。因

此, 对膜蛋白的结构和功能研究不但将极大丰富我们对细胞生理分子机制的理解, 也将对人类的卫生健康事业做出巨大贡献。

结构生物学在近 20 多年里得到了长足的发展, 特别是蛋白质 X 射线晶体学已经日趋成熟并得到了

收稿日期: 2011-08-12

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(“973”项目)(2011CB910901, 2011CB910301); 国家自然科学基金项目(31021062)

*通信作者: E-mail: feisun@ibp.ac.cn

广泛的应用, 在蛋白质结构数据银行 (Protein Data Bank, PDB) 中存储了大量的蛋白质三维结构数据, 截至 2011 年 7 月 31 日, 已经有约 74 800 个结构在存, 其中蛋白质结构约 7 万个。这些数据极大丰富了我们对生物大分子三维结构的认识, 然而在这 7 万多的结构数据当中, 膜蛋白的三维结构信息却相当缺乏, 根据跨膜蛋白数据银行 (Protein Data Bank of Transmembrane Proteins, PDBTM, <http://pdbtm.enzim.hu>)^[1] 的统计, 截至 2011 年 8 月 4 日, 只有 1 458 个跨膜蛋白的三维结构得到解析, 在剔除掉突变体、不同底物结合、不同构象状态变化等因素后, 按照加州大学 Irvine 分校 Stephen White 教授的统计, 其中完全独立的结构只有约 300 个 (<http://blanco.biomol.uci.edu/mpstruc/listAll/list>)。膜蛋白的结构研究已经成为了当前结构生物学的前沿和热点, 并且毋庸置疑将在相当一段时间内成为结构生物学研究的一个难点。

蛋白质结构研究的手段主要有三种——X 射线晶体学、磁共振和电子显微术, 在目前获得的近 1 500 个膜蛋白结构当中, 90% 以上的都是由 X 射线晶体学得到的。然而, 随着低温电子显微三维重构技术在近 5~10 年来的飞速发展, 用低温电镜来观察和研究膜蛋白 (特别是膜蛋白复合物) 的结构和动态变化开始受到青睐, 可以预见, 在未来的 5~10 年内, 将会在越来越多的膜蛋白结构研究报道中出现低温电子显微技术的应用。本文回顾了過去 10~20 年来低温电子显微技术在膜蛋白结构研究中应用的发展, 并对其中的技术优势和瓶颈进行了分析, 最后就未来的发展方向和趋势做了讨论。

1 低温电子显微技术简介

低温电子显微三维重构技术的出现源于生物大分子电子显微学和低温电子显微镜技术的建立。关于生物大分子电子显微学的起源和发展, 可以参见北京大学尹长城教授在《生物物理学报》上的综述^[2], 其奠基人是 MRC 分子生物学实验室的 Aaron Klug 教授和他的学生 David DeRosier 教授, 他们于 1966 年在 *Nature* 上发表了一篇关于利用电子显微镜照片重构烟草花叶病毒的三维结构的著名论文, 提出并建立电子显微三维重构 (3D reconstruction) 的一般概念和方法^[3]。此后, 为了解决生物大分子的脱水 and 辐射损伤问题, 人们提出了低温电子显微技术和低剂量辐照技术。低温电子显微技术是将含水生物样品快速冷冻固定, 在液氮 / 氮条件下对其进行电

镜成像, 低温固定解决了生物样品脱水的问题, 并且提高了生物样品的辐射损伤耐受能力。低剂量辐照技术可以精确控制成像区域的电子辐射剂量, 从而避免样品产生不必要的辐射损伤。1984 年, Dubochet 等^[4] 发表了第一张病毒的低温电子显微照片, 开创了低温电子显微的研究时代。在低温电子显微技术、低剂量辐照技术和电子显微三维重构理论的基础上, 一门新的研究领域形成了, 即以低温电子显微三维重构技术为主要手段的结构生物学研究。

针对样品不同特点, 应用低温电子显微三维重构技术研究生物大分子三维结构时又有所不同, 大致可以分为螺旋重构 (helical reconstruction)、二维电子晶体学 (two dimensional electron crystallography)、单颗粒三维重构 (single particle analysis) 和电子断层三维重构 (electron tomography) 等四种不同的方法。关于这些技术方法以及电子显微三维重构的具体原理、应用和发展, 本课题组在《生物物理学报》上做了详细的论述^[5]。本文将关注这些技术在膜蛋白结构研究中的应用。

2 电子晶体学在膜蛋白结构研究中的应用

蛋白质在空间中有序排列, 可以形成三维晶体, 也可以形成二维晶体。蛋白质二维晶体在 XY 平面内具有平移对称性, 而在 Z 方向上只有一个或者几个蛋白分子的厚度。电子波照射到二维晶体上时能够发生衍射, 衍射点的振幅可以通过衍射图直接测定, 相位可以根据二维晶体的电子显微图像来确定。在确定了衍射振幅和相位后就可以通过逆傅里叶变换获得该二维晶体中蛋白质分子的密度投影图。通过倾斜二维晶体来获得其在不用角度下的投影图, 这些投影图在经过三维重构之后就获得二维晶体内蛋白质分子的三维密度图, 从而解析出该蛋白的三维结构^[6], 这种方法称为蛋白质电子晶体学 (protein electron crystallography)。关于蛋白质电子晶体学的具体原理和分析方法, 早期文献可以参见英国剑桥 MRC 分子生物学实验室 Amos 等^[6] 的文章和我国生物电镜专家徐伟研究员在 20 世纪 90 年代的综述文章^[7]。关于膜蛋白的二维晶体生长方法和二维晶体数据收集处理技术可以参见 Henning Stahlberg 研究组在 *Methods in Enzymology* 上的文章^[8]。

应当说, 电子显微学在一开始受到结构生物学的青睐就是源于电子晶体学在膜蛋白结构研究中的应用和潜在的优势。因为电子晶体学处理的是二维

晶体样品, 相对于生长出适合于 X 射线晶体学研究的三维单晶 (尺寸在 10~100 μm), 人们认为膜蛋白由于其天然处在生物膜的二维环境下更容易形成二维的晶体 (尺寸在 100 nm~1 μm), 因此 1990 年 Henderson 等^[9]首次利用电子晶体学技术解出细菌视紫红质膜蛋白 (bacteriorhodopsin) 的三维结构之后, 人们曾对利用电子晶体学研究膜蛋白的三维结构研究充满了信心。在 Henderson 之后, 有很多研究组开展膜蛋白的二维晶体生长和蛋白质的二维电子晶体学研究, 获得了一系列的研究成果, 包括比较容易获得的蛋白质分子投影结构图, 如紫细菌 *Rhodospirillum rubrum* 的捕光蛋白复合体 I (1995 年, 8.5 \AA)^[10]、无脊椎动物视紫红质 (1996 年, 8 \AA)^[11]、植物叶绿素光反应系统 II (1996 年, 8 \AA)^[12]、植物液泡膜水通道蛋白 (1999 年, 7.7 \AA)^[13] 和牛心线粒体呼吸链复合体 I 的亚复合体 (2000 年, 20~25 \AA)^[14] 等。除了二维晶体投影结构图外, 经过努力人们也获得了一系列膜蛋白的三维结构图, 包括盐细菌视紫红质 Halorhodopsin (1995 年, 7 \AA)^[15]、紫细菌 *Rhodo-spirillum rubrum* 捕光蛋白 (1996 年, 7 \AA)^[16]、植物叶绿素光反应系统 II (1998 年, 8 \AA)^[17]、质膜 H^+ -ATPase 的开放构象 (1998 年, 8 \AA)^[18]、细胞膜联结蛋白 Gap Junction (1999 年, 7.5 \AA)^[19]、离子偶联的转运蛋白 NhaA (2000 年, XY 方向 7 \AA , Z 方向 14 \AA)^[20]、甘油通道 GlpF (2000 年, 6.9 \AA)^[21]、肾脏 Na^+ - K^+ ATPase (2001 年, 9.5 \AA)^[22]、膀胱上皮细胞主要膜蛋白复合体 uroplakins (2001 年, 12 \AA)^[23]、大肠杆菌药物转运膜蛋白 EmrE (2003 年, 7 \AA)^[24]、胃 H^+ / K^+ ATPase (2009 年, 6.5 \AA)^[25] 和人红细胞阴离子 ($\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$) 交换通道 (即反向转运体, antiporter) (2010 年, 7.5 \AA)^[26] 等。

应用蛋白质电子晶体学方法研究膜蛋白的三维结构最成功的例子就是水通道蛋白 (aquaporin, AQP) 的结构研究。2000 年, 京都大学的 Fujiyoshi 教授领导的研究组解析了人红细胞水通道蛋白 AQP1 的 3.8 \AA 的二维晶体结构^[27]。5 年后, Fujiyoshi 教授又与哈佛大学的 Walz 和 Harrison 教授合作完成了水通道蛋白 AQP0 的 1.9 \AA 分辨率的二维晶体结构。该结构揭示了膜蛋白是如何与膜脂分子相互作用的^[28], 这是蛋白质电子晶体领域里程碑式的工作, 证明电子晶体学可以解析膜蛋白的原子分辨率结构, 并且表明电子晶体学方法可以观察到在 X 射线晶体学获得的去污剂包裹的膜蛋白结构中所无法看到的膜蛋白与磷脂分子的相互作用。之后, 他们

继续开展水通道蛋白二维晶体学研究, 于 2009 年报道了水通道蛋白 AQP4 的 2.8 \AA 二维晶体结构, 揭示了其选择性的水通透性的分子机理^[29]; 2010 年, 通过解析水通道蛋白 AQP0 在大肠杆菌极性磷脂结合下的 2.5 \AA 结构, 揭示了膜蛋白与环形磷脂的相关作用^[30]。

从膜蛋白的二维电子晶体学研究历史来看, 利用二维晶体学的方法获得高分辨率的膜蛋白三维结构并非易事, 其原因有如下几个方面。

2.1 膜蛋白的二维晶体生长比较困难, 获得高质量的二维晶体更加困难

膜蛋白二维晶体的生长一般包括四个步骤^[8]: 首先是获得去污剂包裹的纯化的膜蛋白样品, 然后将合适的磷脂分子溶解在相应的去污剂当中, 再将膜蛋白溶液与磷脂分子溶液按照一定比例混合, 最后利用各种办法 (包括稀释、透析、环糊精吸附、Bio-Beads 吸附等) 将该混合溶液中的去污剂去除。在最后一步去污剂缓慢的去除过程中, 控制好温度和组分浓度, 就有可能形成二维晶体。目前关于膜蛋白二维结晶的机理研究还比较少, 这使得膜蛋白二维结晶工作需要筛选大量的结晶条件, 从而消耗很多人力和时间。当然, 像细菌紫膜蛋白 bacteriorhodopsin、细胞膜联结蛋白 Gap Junction、膀胱上皮细胞主要膜蛋白复合体 uroplakins 和水通道蛋白 AQP 等膜蛋白, 它们在天然情况下就在细胞膜上紧密堆积甚至形成了有序的结构, 这类膜蛋白就比较容易获得二维晶体。但并不是所有的膜蛋白都具有这样的性质, 要找到合适的磷脂成分让其形成二维晶体是比较困难的, 处理磷脂分子的复杂性也进一步增加了膜蛋白二维结晶的难度。要解析膜蛋白的高分辨率二维晶体结构, 必须要获得面积比较大而且具有整齐排列晶格的二维晶体, 比如水通道蛋白 AQP0 的二维晶体尺寸可以达到 2~8 μm ^[28], 这对于一般的膜蛋白来说是个挑战。

2.2 膜蛋白二维晶体的观察比较复杂

对于蛋白质的三维晶体, 利用一个普通的光学显微镜 (最好使用偏振光) 就可以对其进行观察, 从而对结晶条件进行筛选和优化。然而, 二维晶体是无法利用普通光学显微镜进行观察的, 目前使用的方法是利用负染色的办法在电子显微镜下进行观察, 这个过程是比较耗时和费力的, 而且需要消耗样品, 这使得二维结晶条件的筛选过程变得比较缓慢。美国加州圣迭哥 Scripps 研究所的 AMI (Automated Molecular Imaging Group, <http://ami>.)

scripps.edu) 研究组曾开发了一个机器手臂和自动化的数据收集系统 Legimon 来加快筛选过程^[31-32], 这个系统对于二维电子晶体学的实效性还有待进一步的研究。

膜蛋白二维晶体的晶格容易发生畸变, 这增加了采集高分辨率数据的困难。二维晶体实际是一层非常软的膜, 在放置到用于电镜观察的支持载网(膜)上后容易发生褶皱和变形, 从而使其内部有序的晶格排列发生畸变, 这使得其电子衍射能力大大降低, 无法收集到高分辨率的衍射数据。畸变是经常发生的事情, 因此发展了一些晶格矫正的计算方法, 从而获取较高分辨率的信息^[7]。无论如何, 寻找没有畸变的二维晶体是最佳的办法。

膜蛋白二维晶体的低温电子显微数据收集工作比较复杂。要获得二维晶体的三维结构信息, 必须要旋转二维晶体, 在不同角度下收集其衍射数据和显微图像。此外, 膜蛋白二维晶体比较容易发生辐射损伤。因此, 要收集高质量的膜蛋白二维晶体的电子显微数据, 需要进一步提高其耐辐射的能力, 提高在倾斜状态下样品的稳定程度。日本京都大学的 Fujiyoshi 教授设计的电子显微镜采用液氮冷台和顶插样品杆技术解决了这两个问题, 因此很多二维晶体的高分辨率数据都是在他的实验室收集完成的(注: 目前日本电子生产的 JEM-3200FSC 型号的电子显微镜融合了 Fujiyoshi 教授的设计思想)。

由于以上原因, 国际上利用电子晶体学开展膜蛋白三维结构研究的研究组不是很多, 目前除了京都大学的 Fujiyoshi 教授研究组 (<http://em.biophys.kyoto-u.ac.jp/Eng/index.htm>) 外, 比较有名的还有哈佛大学的 Tom Walz 研究组 (<http://walz.med.harvard.edu/>)。此外, 瑞士 Basel 大学的 Henning Stahlberg 研究组 (<http://www.c-cina.unibas.ch/>) 一直在从事膜蛋白电子晶体学的方法学研究(包括结晶方法和数据处理), 其研究组开发的 2dx (<http://www.2dx.unibas.ch/>) 是目前比较成熟地用于处理膜蛋白二维晶体衍射数据的软件^[33]。当然, 如果将来在膜蛋白二维晶体生长和观察方面能够取得大的突破, 利用电子晶体学方面研究膜蛋白的三维结构还是具有很大的空间和优势, 这主要是因为相对于 X 射线晶体学, 二维电子晶体学可以研究膜蛋白在磷脂双分子层中的结构, 更加接近其天然状态。

电子晶体学除了可以处理二维晶体样品, 也可以处理螺旋结构样品。膜蛋白除了能够形成二维晶体外, 在一些特殊条件下也能够有序排列形成纤维

状的具有螺旋对称性的微观结构。这些具有螺旋对称性的样品可以对平行入射的电子波产生衍射(helical diffraction), 这种衍射斑点的振幅可以直接测定, 对螺旋结构样品的图像进行傅里叶变换可以获得对应衍射点的相位。因此, 对于螺旋结构样品, 也可以通过类似晶体学的方法解出其三维结构^[34]。利用电子晶体学方法解析膜蛋白螺旋结构样品最成功的例子就是关于乙酰胆碱受体膜蛋白的三维结构解析, Nigel Unwin 和 Yoshinori Fujiyoshi 教授合作于 2003 年获得了乙酰胆碱受体膜蛋白的螺旋管样品, 通过电子显微镜测定了其螺旋衍射数据并解析了该受体膜蛋白的 4 Å 分辨率的三维结构^[35]。

3 单颗粒三维重构技术在膜蛋白结构研究中的应用

在低温电子显微三维重构技术中目前应用最为广泛的是单颗粒三维重构技术, 也叫做单颗粒分析(single particle analysis, SPA)。该技术主要适用于具有全同性的生物大分子的结构解析——蛋白质等生物大分子的溶液样品被加载到含有微孔的碳膜上, 通过快速冷冻的方法, 这些大分子颗粒被包埋在玻璃态的冰层中, 它们具有全同的三维结构, 只是方位取向不同, 利用透射电镜采集这些颗粒分子的投影图像, 通过图像处理计算出这些投影颗粒的空间取向, 然后通过中央截面定理进行三维重构计算获得该颗粒分子的三维结构, 这个计算过程是反复迭代进行的, 最终收敛到一个正确的结果。在单颗粒分析中, 投影颗粒空间取向的精确求解是获得高分辨率三维重构结构的关键所在, 为此人们发展了不同的算法来克服电镜原始图像的低信噪比并准确计算每个颗粒的取向, 这包括了等价线方法(根据中央截面定理, 每一对投影图的傅里叶变换具有一条公共的交线, 这条线叫做等价线)和投影匹配方法等。由于需要分析的大分子样品有不同的特点, 例如具有二十面体对称性的病毒颗粒样品、具有旋转对称性的分子伴侣样品、不具有对称性的核糖体颗粒样品等, 针对不同特点的单颗粒样品, 在投影取向和三维重构方面有不同的算法。关于单颗粒分析的详细原理和技术细节可以参考本课题组在《生物物理学报》上的论述文章^[5,36]。这里讨论的重点是该技术在膜蛋白结构研究中的应用。

在 20 世纪 90 年代, 由于大家对蛋白质二维电子晶体学的信心以及当时单颗粒分析技术手段还不是很成熟, 利用低温单颗粒分析技术来研究膜蛋白

的三维结构的工作比较少,包括骨骼肌钙离子释放通道(Ryanodine受体)(1994年,32 Å)^[37]和流感病毒凝血素(haemagglutinin)的结构(1999年,10~14 Å)^[38]。后来人们逐渐认识到,对于很多暂时还无法获得结晶的膜蛋白复合体,虽然单颗粒分析方法还不能获得很高的分辨率,但是仍然能够提供很多有用的信息用于研究该复合体的构造和构象变化。因此,到了21世纪的这10多年间,出现了诸多利用低温单颗粒技术来研究膜蛋白复合体结构的工作,比如Ryanodine受体异形体3(RyR3)的两种构象状态(2000年,开放状态,34 Å;关闭状态,40 Å)^[39]、ABC转运蛋白YvcC与磷脂一去污剂形成的高聚体结构(2002年,25 Å)^[40]、质膜H⁺ATPase的两种构象(2002年,ligand-free,17 Å;Mg²⁺/ADP-bound,17.5 Å)^[41]、古菌膜蛋白p97(“烦清”类药物结合ATPase的同源蛋白;2002年,23 Å)^[42]、鼠肝内源ATPase(p97)的AMP-PNP结合构象(2003年,24 Å)^[43]、鼠源质膜丝氨酸二肽蛋白酶DPPIV/CD26(2003年,14 Å)^[44]、大肠杆菌鞭毛分泌系统外膜孔道pIV(2003年,22 Å)^[45]、牛心线粒体ATP合酶(2003年,32 Å)^[46]、Ryanodine受体RyR1(2005年,10.3 Å)^[47]、细菌毒素分泌孔道VacA(低温负染电镜;2005年,19 Å)^[48]、牛脑V-ATPase(2007年,34 Å)^[49]、人源重组钾离子通道Kv2.1(2008年,25 Å)^[50]、酵母线粒体ATP合酶(2008年,24 Å)^[51]、酵母线粒体外膜蛋白质转运孔道TOM复合体(2008年,18 Å)^[52]、大肠杆菌外膜蛋白Wza的构象变化(2009年,25~33 Å)^[53]和植物液泡膜H⁺-ATPase(2009年,16.5 Å)^[54]等。

利用单颗粒分析方法研究膜蛋白的结构,其样品制备过程与二维结晶不同,相对比较容易,只需要将纯化好的膜蛋白溶液加到带微孔的碳膜上进行短时间的吸附,之后用滤纸将多余的液体吸去,然后迅速将样品冷冻在液态的乙烷中,最后转移至液氮中。相对于可溶性蛋白而言,膜蛋白样品制备的困难之处在于以下几方面。(1)膜蛋白溶液中的去污剂会增加低温电镜成像时的图像背景,从而降低膜蛋白图像的对比度。通常低温电镜成像的对比度是来自蛋白质密度(1.36 g/cm³)与玻璃态冰的密度(~0.93 g/cm³)的差别,而去污剂的存在使得背景密度发生变化,如去污剂DDM(N-dodecyl-beta-maltoside)溶液的密度为1.19 g/cm³^[55],因此,DDM这种去污剂并不适于膜蛋白的低温电镜成像。此外,去污剂溶液在临界浓度(critical micelle concentration, CMC)之上会形成微团(micelle),这些微团在低温电镜下

会产生假象,不利于对膜蛋白颗粒的识别。(2)膜蛋白溶液中的去污剂会降低水溶液的表面张力,从而不利于在微孔中形成厚度合适的冰层。(3)由于膜蛋白的疏水性质和支持碳膜的疏水性质,大量膜蛋白分子容易被碳膜吸附,相反在微孔中的膜蛋白颗粒会很少。(4)在相同的相对分子质量情况下,制备合适的用于电镜观察的样品,膜蛋白样品所需要的浓度要明显高于可溶性蛋白——这个现象的具体原因还不是很清楚。针对这些问题,人们选择将带微孔的碳膜替换成连续的碳膜,利用碳膜对膜蛋白的吸附作用,在膜蛋白溶液与碳膜短时间吸附后,用不含去污剂的溶液进行润洗,然后再进行冷冻——这种做法解决了去污剂干扰和蛋白颗粒分散的问题,但是带来的新问题是膜蛋白颗粒在碳膜上的取向优势和碳膜产生的图像背景。当然,使用超薄碳膜(该碳膜依附在带微孔的碳膜上以增强其支撑性能)可以降低碳膜产生的背景。关于用于单颗粒分析的膜蛋白样品制备技术,其具体细节、注意事项和技巧可以参阅Rubinstein的文章^[56]。

利用单颗粒分析方法研究膜蛋白的结构,其优点是样品制备过程简单,所需样品量比较少,很快能够得到关于样品的初步结构信息。因此,近年来这方面的应用越来越多。但是,从目前所获得的膜蛋白结构来看,解析分辨率还没有能够突破10 Å。这里的主要原因有以下几点。(1)膜蛋白在离开磷脂双分子环境后其构象稳定性下降,导致在利用单颗粒方法分析膜蛋白结构时样品的均一性比较差,从而阻碍了分辨率的提高。(2)与病毒颗粒和分子伴侣颗粒不同,膜蛋白复合体一般都没有什么对称性,这给在单颗粒分析中颗粒空间取向的精确求解带来了困难。事实上,即使是可溶性蛋白复合体,除核糖体外,如果没有对称性,目前要想获得其亚纳米分辨率的结构也是比较困难的。(3)由于单颗粒分析技术本身的特点,其只能适合分析相对分子质量(M_r)较大的蛋白复合体($M_r > 200\ 000$),而适合于单颗粒分析的膜蛋白质复合体其本身的提取和纯化就有一定的难度,要想获得高质量的样品需要花费更多的精力。将来,在膜蛋白电镜样品制备技术、电子显微成像技术和图像处理技术方面有新的发展和突破之后,利用单颗粒分析技术来解析膜蛋白复合体亚纳米分辨率的三维结构是完全有可能的。

4 特殊的样品制备技术

针对单颗粒分析方法中膜蛋白样品制备的去污

剂问题, 人们提出一些特殊的样品制备方法, 如 Amphipol 替换方法和脂质体方法等。

Amphipol 是一类两亲聚合物的统称, 起初被设计出来是用来克服去污剂分子动态解离的特性。不同于去污剂的一头亲水一头亲脂的线性分子特性, Amphipol 是一种长链的聚合物, 拥有很多侧链, 较短的亲水侧链与数个较长的亲脂侧链互相交错着排列在一起——没有完全疏水或者亲水的区域^[57]。由于是聚合物, Amphipol 的相对分子质量一般比较大, 如 A8-35 是一种 Amphipol, 其 M_r 为 9 000~10 000^[57]。在去污剂溶解的膜蛋白溶液中, 必须要含有游离去污剂分子, 否则与膜蛋白结合的去污剂分子就会与膜蛋白解离, 从而导致膜蛋白的聚集和沉淀, 这些溶液中的游离去污剂分子给膜蛋白低温电镜实验带来了麻烦。而 Amphipol 与去污剂不同, 其与膜蛋白结合很紧密, 溶液中游离 Amphipol 的浓度非常低, 因此当膜蛋白与 Amphipol 结合后, 其后期纯化和样品处理就同可溶性蛋白一样。因此, 如果用 Amphipol 替代去污剂, 就可以解决在低温电镜中去污剂所带来的背景和假象等问题。2000 年, Wilkens^[58] 利用 Amphipol 替代去污剂 LDAO, 对大肠杆菌的 FOF1-ATPase 进行低温电镜成像, 获得了背景比较干净清楚的该膜蛋白复合体的低温电镜照片, 并在获得三维结构的基础上进一步修正了关于该 ATPase 的组装模型。2007 年, 在关于线粒体呼吸链复合体 I 的低温单颗粒分析中, 通过比较发现, Amphipol 替代之后膜蛋白颗粒在冰层中的分布更加均匀, 而且 Amphipol 的结合并不改变该复合体的三维结构^[57]。关于 Amphipol 在膜蛋白复合体低温电镜单颗粒分析研究中的优势还需要更多的研究来深入探讨和分析。

如上所述, 去污剂包裹的膜蛋白, 由于其离开了磷脂双分子层的生物膜环境, 构象变得不稳定, 均一性比较差, 而且去污剂也不利于样品的成像。因此, 人们想到是否可以将膜蛋白直接重建到脂质体上, 然后直接利用低温电镜进行观察和成像。2005 年, 英国伦敦 Birkbeck 大学的 Saibil 研究组在这个方面做了成功的尝试。他们将细菌的溶血毒素穿孔蛋白整合到脂质体上, 然后进行低温电镜成像, 通过三维重构获取了该穿孔蛋白在细胞膜上形成孔道的结构, 在结构分析的基础上给出了该蛋白在形成孔道过程中的构象变化^[59]。

脂质体的方法能够获得膜蛋白在细胞膜的自然结构, 但技术上存在新的问题。(1) 膜蛋白在脂质

体上的密度不能太高, 否则在电镜图像中就会出现蛋白图像的重叠; 而脂质体本身在支持网上的分布密度就不高, 并且倾向于分布在碳膜上, 在微孔中的数量比较少, 这就造成了目的膜蛋白颗粒在观察区域内的分布密度非常低, 不利于数据的收集(通常需要收集上万个蛋白颗粒的图像)。(2) 脂质体磷脂双分子层的密度接近蛋白质, 如何有效去除磷脂双分子层的图像背景是一个棘手的问题。2008 年, 美国耶鲁大学的 Wang 和 Sigworth^[60] 利用他们发明的链霉亲和素蛋白 (Streptavidin) 二维晶体锚定法解决了第一个问题。他们将生长好的 Streptavidin 二维晶体附在带有微孔的碳膜上, 然后将含有生物素 (biotin) 标记磷脂分子的脂质体 (膜蛋白已经整合在上面) 溶液加到 Streptavidin 二维晶体上。由于 biotin 与 Streptavidin 的高特异亲和力, 脂质体被均匀地挂在了支持网上, 从而有效提高了脂质体和蛋白的分布密度。2009 年, 他们用这种方法研究了人源钙离子/电压门控的钾离子通道 (BK potassium channel) 的三维结构 (17~20 Å)^[61]。在该项研究中, 他们利用 Streptavidin 二维晶体的电子衍射现象来清除 Streptavidin 二维晶体的背景图像, 然后在其关于脂质体的低温电镜成像的定量模拟研究基础^[62]上, 通过模拟不含膜蛋白的脂质体的电镜图像来有效去除磷脂双分子层的图像背景, 从而解决了第二个问题。此外, 由于膜蛋白定位在球形的脂质体上, 其空间取向有一定的约束, 因此 Wang 和 Sigworth 利用这个约束关系发展了 RSC (random spherically constrained) 算法, 有效提高了膜蛋白单颗粒分析中颗粒空间取向求解的精确性。Wang 和 Sigworth 的方法给膜蛋白复合体的低温单颗粒分析研究打开了新的思路, 有望得到进一步发展和推广。关于这个方法详细原理和实验方法, 可以参见他们的方法学文章^[63]。

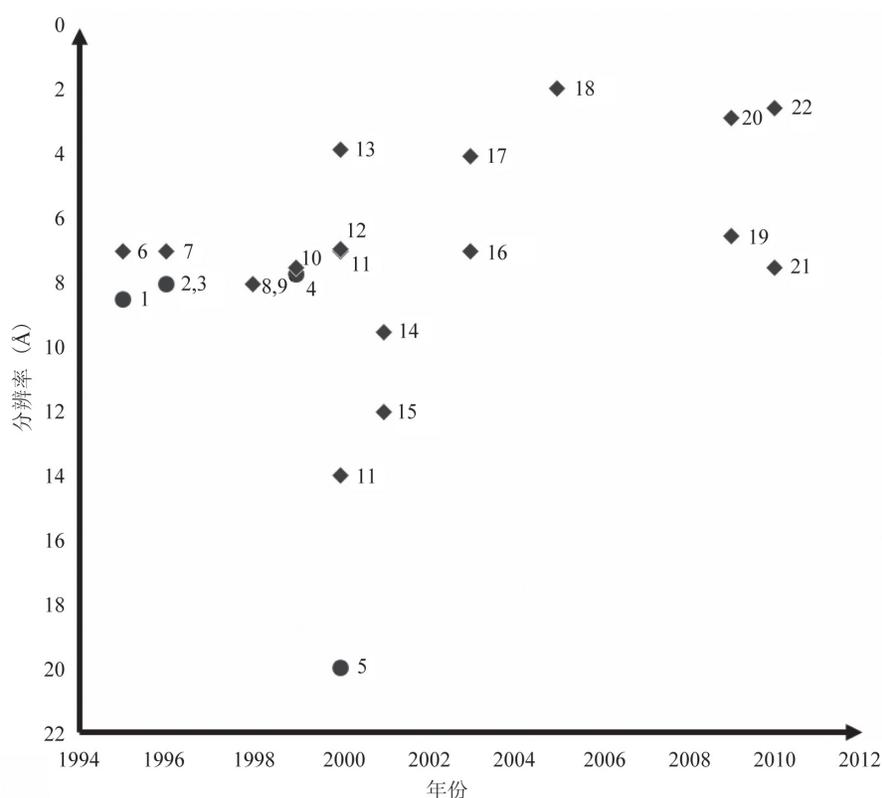
关于脂质体方法, 2007 年化学家们做了一件有意思的事情——Olivier Lambert 研究组利用包被磷脂膜的纳米球作为膜蛋白的载体——相当于在脂质体内部镶嵌了硅基纳米球, 膜蛋白被镶嵌在纳米球表面的磷脂双分子层内。在低温电镜下, 由于高电子密度的纳米球的存在, 图像的对比特明显增强, 并且从原始照片上看, 膜蛋白的电子密度能够显著与磷脂双分子层进行区分^[64]。如果能够将 Wang 和 Sigworth 的方法与 Lambert 的方法结合起来, 或许能够进一步促进利用低温电镜单颗粒方法研究膜蛋白三维结构的发展。

5 展望

获取高分辨率(原子分辨率)三维结构是电子显微镜三维重构技术发展的重要目标,目前针对病毒样品或者高对称样品,这个目标已经接近或达到;对于膜蛋白或者膜蛋白复合体而言,这个目标还没有实现,但理论上没有什么障碍。本课题组将近20年来利用电子晶体学或者单颗粒分析技术所解析的膜蛋白或者膜蛋白复合体的结构按照年份做一个统计,可以看出,20世纪90年代是膜蛋白电子晶体学的时代(图1),那时针对膜蛋白的单颗粒分析工作比较少;而到了21世纪,涌现出了一大批膜蛋

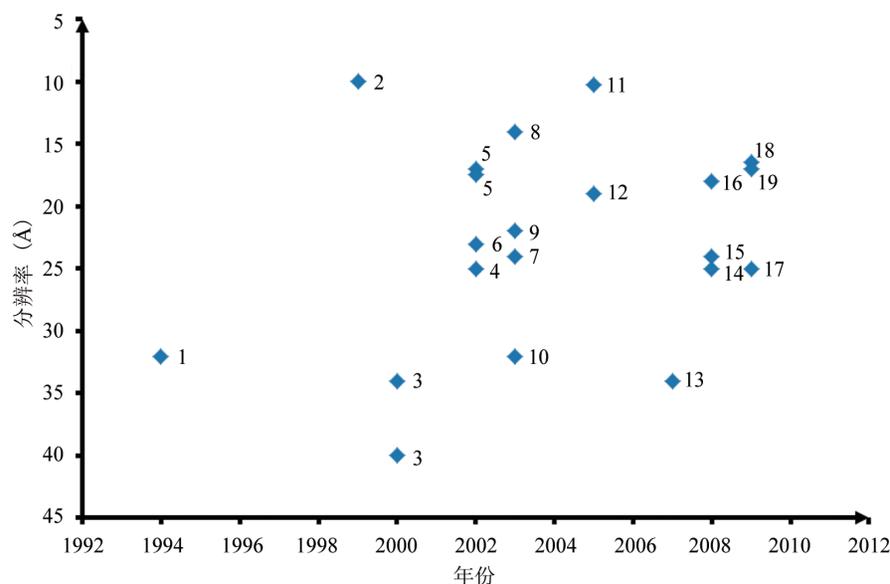
白复合体的单颗粒三维重构研究(图2),相反膜蛋白电子晶体学的研究步伐却慢了下来(图1),其主要原因是电子晶体学的技术难度较单颗粒分析要大很多。从图1和图2中还可以看出,膜蛋白电子晶体学研究结果的分辨率一般在6~8 Å,而膜蛋白单颗粒分析的分辨率一般保持在10~20 Å。但是随着技术的进步,这两种技术的分辨率整体在不断提高。

将来在样品制备(提高样品的均一性)、支持膜技术(降低背景噪音)、仪器性能(相位板技术和球差校正技术)和图像处理算法(更加有效的分类、取向求解和三维重构算法)等方面的新突破将会进一步提高膜蛋白的三维重构分辨率,推动低温电镜



横坐标,年份;纵坐标,所解结构的分辨率(Å);实心圈,投影结构;实心菱形,三维结构。每个数据点旁的数字表示:1,紫细菌*Rhodospirillum rubrum*的捕光蛋白复合体I,投影结构(1995年,8.5 Å)^[10];2,无脊椎动物视紫红质,投影结构(1996年,8 Å)^[11];3,植物叶绿素光反应系统II,投影结构(1996年,8 Å)^[12];4,植物液泡膜水通道蛋白,投影结构(1999年,7.7 Å)^[13];5,牛心线粒体呼吸链复合体I的亚复合体,投影结构(2000年,20~25 Å)^[14];6,盐细菌视紫红质 Halorhodopsin(1995年,7 Å)^[15];7,紫细菌*Rhodospirillum rubrum*捕光蛋白(1996年,7 Å)^[16];8,植物叶绿素光反应系统II(1998年,8 Å)^[17];9,质膜H⁺-ATPase的开放构象(1998年,8 Å)^[18];10,细胞膜联结蛋白Gap Junction(1999年,7.5 Å)^[19];11,离子偶联的转运蛋白NhaA(2000年,XY方向7 Å,Z方向14 Å)^[20];12,甘油通道GlpF(2000年,6.9 Å)^[21];13,人红细胞水通道蛋白AQP1(2000年,3.8 Å)^[27];14,肾脏Na⁺-K⁺ ATPase(2001年,9.5 Å)^[22];15,膀胱上皮细胞主要膜蛋白复合体uroplakins(2001年,12 Å)^[23];16,大肠杆菌药物转运膜蛋白EmrE(2003年,7 Å)^[24];17,乙酰胆碱受体膜蛋白(2003年,4 Å)^[35];18,水通道蛋白AQP0(2005年,1.9 Å)^[28];19,胃H⁺/K⁺ ATPase(2009年,6.5 Å)^[25];20,水通道蛋白AQP4(2009年,2.8 Å)^[29];21,人红细胞阴离子(Cl⁻/HCO₃⁻)交换通道(即反向转运体, antiporter)(2010年,7.5 Å)^[26];22,水通道蛋白AQP0在大肠杆菌极性磷脂结合下(2010年,2.5 Å)^[30]。

图1 近20年利用电子晶体学方法解析出结构的重要膜蛋白结构



横坐标, 年份; 纵坐标, 所解结构的分辨率(Å)。每个数据点旁的数字表示: 1, 骨骼肌钙离子释放通道(Ryanodine受体)(1994年, 32 Å)^[37]; 2, 流感病毒凝血素(haemagglutinin)(1999年, 10~14 Å)^[38]; 3, Ryanodine受体异形体3(RyR3)的两种构象状态(2000年, 开放状态, 34 Å; 关闭状态, 40 Å)^[39]; 4, ABC转运蛋白YvcC与磷脂一去污剂形成的高聚体结构(2002年, 25 Å)^[40]; 5, 质膜H⁺-ATPase的两种构象(2002年, ligand-free, 17 Å; Mg²⁺/ADP-bound, 17.5 Å)^[41]; 6, 古菌膜蛋白p97(“烦清”类药物结合ATPase的同源蛋白; 2002年, 23 Å)^[42]; 7, 鼠肝内源ATPase(p97)的AMP-PNP结合构象(2003年, 24 Å)^[43]; 8, 鼠源质膜丝氨酸二肽蛋白酶DPPIV/CD26(2003年, 14 Å)^[44]; 9, 大肠杆菌鞭毛分泌系统外膜孔道pIV(2003年, 22 Å)^[45]; 10, 牛心线粒体ATP合酶(2003年, 32 Å)^[46]; 11, Ryanodine受体RyR1(2005年, 10.3 Å)^[47]; 12, 细菌毒素分泌孔道VacA(低温负染电镜; 2005年, 19 Å)^[48]; 13, 牛脑V-ATPase(2007年, 34 Å)^[49]; 14, 人源重组钾离子通道Kv2.1(2008年, 25 Å)^[50]; 15, 酵母线粒体ATP合酶(2008年, 24 Å)^[51]; 16, 酵母线粒体外膜蛋白质转运孔道TOM复合体(2008年, 18 Å)^[52]; 17, 大肠杆菌外膜蛋白Wza的构象变化(2009年, 25~33 Å)^[53]; 18, 植物液泡膜H⁺-ATPase(2009年, 16.5 Å)^[54]; 19, 人源钙离子/电压门控的钾离子通道(BK potassium channel)(2009年, 17~20 Å)^[61]。

图2 近20年利用单颗粒三维重构方法解析出的重要膜蛋白结构

技术在膜蛋白结构研究中的应用。最近的确出现了一些令人兴奋的发现, 如新型支持膜 CryoMesh 技术^[65]和石墨烯支持膜技术。人们发现利用石墨烯作为支持膜, 其图像背景几乎为零, 一个没有喷涂金属的DNA分子可以在石墨烯上被清晰成像^[66]。因此, 如果将膜蛋白附在该支持膜上, 其电镜图像的对比度将显著增强, 这对于精确取向非常有利。

利用低温电子显微技术研究膜蛋白和膜蛋白复合体的高分辨率三维结构是值得期待和为之努力的!

[参 考 文 献]

- [1] Tusnady GE, Dosztanyi Z, Simon I. PDB_TM: selection and membrane localization of transmembrane proteins in the protein data bank. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(Database issue): D275-8
- [2] 尹长城. 生物大分子电子显微学的起源和发展. *生物物理学报*, 2010, 26(7): 527-32
- [3] Klug A, De Rosier DJ. Optical filtering of electron micrographs: reconstruction of one-sided images. *Nature*, 1966, 212(5057): 29-32
- [4] Adrian M, Dubochet J, Lepault J, et al. Cryo-electron microscopy of viruses. *Nature*, 1984, 308(5954): 32-6
- [5] Zhang K, Zhang Y, Hu ZJ, et al. Development and frontier of electron microscopy 3D reconstruction. *Acta Biophys Sin*, 2010, 26(7): 533-59
- [6] Amos LA, Henderson R, Unwin PN. Three-dimensional structure determination by electron microscopy of two-dimensional crystals. *Prog Biophys Mol Biol*, 1982, 39(3): 183-231
- [7] 徐伟, 黄达详. 生物大分子电子晶体学中的像分析与像处理. *电子显微学报*, 1994, 13(4): 305-12
- [8] Abeyrathne PD, Chami M, Pantelic RS, et al. Preparation of 2D crystals of membrane proteins for high-resolution electron crystallography data collection[M]//Grant JJ. *Methods in enzymology*. NY: Academic Press, 2010: 25-43
- [9] Henderson R, Baldwin JM, Ceska TA, et al. Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy. *J Mol Biol*, 1990, 213(4): 899-929
- [10] Karrasch S, Bullough PA, Ghosh R. The 8.5 Å projection

- map of the light-harvesting complex I from *Rhodospirillum rubrum* reveals a ring composed of 16 subunits. *EMBO J*, 1995, 14(4): 631-8
- [11] Davies A, Schertler GF, Gowen BE, et al. Projection structure of an invertebrate rhodopsin. *J Struct Biol*, 1996, 117(1): 36-44
- [12] Nakazato K, Toyoshima C, Enami I, et al. Two-dimensional crystallization and cryo-electron microscopy of photosystem II. *J Mol Biol*, 1996, 257(2): 225-32
- [13] Daniels MJ, Chrispeels MJ, Yeager M. Projection structure of a plant vacuole membrane aquaporin by electron cryo-crystallography. *J Mol Biol*, 1999, 294(5): 1337-49
- [14] Sazanov LA, Walker JE. Cryo-electron crystallography of two sub-complexes of bovine complex I reveals the relationship between the membrane and peripheral arms. *J Mol Biol*, 2000, 302(2): 455-64
- [15] Havelka WA, Henderson R, Oesterhelt D. Three-dimensional structure of halorhodopsin at 7 Å resolution. *J Mol Biol*, 1995, 247(4): 726-38
- [16] Savage H, Cyrklaff M, Montoya G, et al. Two-dimensional structure of light harvesting complex II (LHII) from the purple bacterium *Rhodovulum sulfidophilum* and comparison with LHII from *Rhodospseudomonas acidophila*. *Structure*, 1996, 4(3): 243-52
- [17] Rhee KH, Morris EP, Barber J, et al. Three-dimensional structure of the plant photosystem II reaction centre at 8 Å resolution. *Nature*, 1998, 396(6708): 283-6
- [18] Auer M, Scarborough GA, Kuhlbrandt W. Three-dimensional map of the plasma membrane H⁺-ATPase in the open conformation. *Nature*, 1998, 392(6678): 840-3
- [19] Unger VM, Kumar NM, Gilula NB, et al. Expression, two-dimensional crystallization, and electron cryo-crystallography of recombinant gap junction membrane channels. *J Struct Biol*, 1999, 128(1): 98-105
- [20] Williams KA. Three-dimensional structure of the ion-coupled transport protein NhaA. *Nature*, 2000, 403(6765): 112-5
- [21] Stahlberg H, Braun T, de Groot B, et al. The 6.9-Å structure of GlpF: a basis for homology modeling of the glycerol channel from *Escherichia coli*. *J Struct Biol*, 2000, 132(2): 133-41
- [22] Hebert H, Purhonen P, Vorum H, et al. Three-dimensional structure of renal Na,K-ATPase from cryo-electron microscopy of two-dimensional crystals. *J Mol Biol*, 2001, 314(3): 479-94
- [23] Oostergetel GT, Keegstra W, Brisson A. Structure of the major membrane protein complex from urinary bladder epithelial cells by cryo-electron crystallography. *J Mol Biol*, 2001, 314(2): 245-52
- [24] Ubarretxena-Belandia I, Baldwin JM, Schuldiner S, et al. Three-dimensional structure of the bacterial multidrug transporter EmrE shows it is an asymmetric homodimer. *EMBO J*, 2003, 22(23): 6175-81
- [25] Abe K, Tani K, Nishizawa T, et al. Inter-subunit interaction of gastric H⁺,K⁺-ATPase prevents reverse reaction of the transport cycle. *EMBO J*, 2009, 28(11): 1637-43
- [26] Yamaguchi T, Ikeda Y, Abe Y, et al. Structure of the membrane domain of human erythrocyte anion exchanger 1 revealed by electron crystallography. *J Mol Biol*, 2010, 397(1): 179-89
- [27] Murata K, Mitsuoka K, Hirai T, et al. Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature*, 2000, 407(6804): 599-605
- [28] Gonen T, Cheng Y, Sliz P, et al. Lipid-protein interactions in double-layered two-dimensional AQP0 crystals. *Nature*, 2005, 438(7068): 633-8
- [29] Tani K, Mitsuma T, Hiroaki Y, et al. Mechanism of aquaporin-4's fast and highly selective water conduction and proton exclusion. *J Mol Biol*, 2009, 389(4): 694-706
- [30] Hite RK, Li Z, Walz T. Principles of membrane protein interactions with annular lipids deduced from aquaporin-0 2D crystals. *EMBO J*, 2010, 29(10): 1652-8
- [31] Suloway C, Pulokas J, Fellmann D, et al. Automated molecular microscopy: the new Legimon system. *J Struct Biol*, 2005, 151(1): 41-60
- [32] Lyumkis D, Moeller A, Cheng A, et al. Automation in single-particle electron microscopy: Connecting the pieces[M]//Grant JJ. *Methods in enzymology*. Academic Press, 2010: 291-338
- [33] Schenk AD, Castaño-Díez D, Gipson B, et al. 3D reconstruction from 2D crystal image and diffraction data[M]//Grant JJ. *Methods in Enzymology*. NY: Academic Press, 2010: 101-29
- [34] DeRosier DJ, Moore PB. Reconstruction of three-dimensional images from electron micrographs of structures with helical symmetry. *J Mol Biol*, 1970, 52(2): 355-69
- [35] Miyazawa A, Fujiyoshi Y, Unwin N. Structure and gating mechanism of the acetylcholine receptor pore. *Nature*, 2003, 423(6943): 949-55
- [36] Cai G. State-of-the-art of single particle EM. *Acta Biophys Sin*, 2010, 26(7): 560-9
- [37] Radermacher M, Rao V, Grassucci R, et al. Cryo-electron microscopy and three-dimensional reconstruction of the calcium release channel/ryanodine receptor from skeletal muscle. *J Cell Biol*, 1994, 127(2): 411-23
- [38] Böttcher C, Ludwig K, Herrmann A, et al. Structure of influenza haemagglutinin at neutral and at fusogenic pH by electron cryo-microscopy. *FEBS Lett*, 1999, 463(3): 255-9
- [39] Sharma MR, Jeyakumar LH, Fleischer S, et al. Three-dimensional structure of ryanodine receptor isoform three in two conformational states as visualized by cryo-electron microscopy. *J Biol Chem*, 2000, 275(13): 9485-91
- [40] Chami M, Steinfels E, Orelle C, et al. Three-dimensional structure by cryo-electron microscopy of YvcC, an homodimeric ATP-binding cassette transporter from *Bacillus subtilis*. *J Mol Biol*, 2002, 315(5): 1075-85
- [41] Rhee KH, Scarborough GA, Henderson R. Domain movements of plasma membrane H⁺-ATPase: 3D structures of two states by electron cryo-microscopy. *EMBO J*, 2002, 21(14): 3582-9
- [42] Rockel B, Jakana J, Chiu W, et al. Electron cryo-

- microscopy of VAT, the archaeal p97/CDC48 homologue from *Thermoplasma acidophilum*. *J Mol Biol*, 2002, 317(5): 673-81
- [43] Beuron F, Flynn TC, Ma J, et al. Motions and negative cooperativity between p97 domains revealed by cryo-electron microscopy and quantised elastic deformational model. *J Mol Biol*, 2003, 327(3): 619-29
- [44] Ludwig K, Yan S, Fan H, et al. The 3D structure of rat DPPIV/CD26 as obtained by cryo-TEM and single particle analysis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 304(1): 73-7
- [45] Opalka N, Beckmann R, Boisset N, et al. Structure of the filamentous phage pIV multimer by cryo-electron microscopy. *J Mol Biol*, 2003, 325(3): 461-70
- [46] Rubinstein JL, Walker JE, Henderson R. Structure of the mitochondrial ATP synthase by electron cryomicroscopy. *EMBO J*, 2003, 22(23): 6182-92
- [47] Samsó M, Wagenknecht T, Allen PD. Internal structure and visualization of transmembrane domains of the RyR1 calcium release channel by cryo-EM. *Nat Struct Mol Biol*, 2005, 12(6): 539-44
- [48] 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): 215-28
- [49] Gregorini M, Wang J, Xie XS, et al. Three-dimensional reconstruction of bovine brain V-ATPase by cryo-electron microscopy and single particle analysis. *J Struct Biol*, 2007, 158(3): 445-54
- [50] Adair B, Nunn R, Lewis S, et al. Single particle image reconstruction of the human recombinant Kv2.1 channel. *Biophys J*, 2008, 94(6): 2106-14
- [51] Lau WC, Baker LA, Rubinstein JL. Cryo-EM structure of the yeast ATP synthase. *J Mol Biol*, 2008, 382(5): 1256-64
- [52] Model K, Meisinger C, Kuhlbrandt W. Cryo-electron microscopy structure of a yeast mitochondrial preprotein translocase. *J Mol Biol*, 2008, 383(5): 1049-57
- [53] Ford RC, Brunkan-LaMontagne AL, Collins RF, et al. Structure-function relationships of the outer membrane translocon Wza investigated by cryo-electron microscopy and mutagenesis. *J Struct Biol*, 2009, 166(2): 172-82
- [54] Muench SP, Huss M, Song CF, et al. Cryo-electron microscopy of the vacuolar ATPase motor reveals its mechanical and regulatory complexity. *J Mol Biol*, 2009, 386(4): 989-99
- [55] Timmins PA, Leonhard M, Weltzien HU, et al. A physical characterization of some detergents of potential use for membrane protein crystallization. *FEBS Lett*, 1988, 238(2): 361-8
- [56] Rubinstein JL. Structural analysis of membrane protein complexes by single particle electron microscopy. *Methods*, 2007, 41(4): 409-16
- [57] Flotenmeyer M, Weiss H, Tribet C, et al. The use of amphipathic polymers for cryo electron microscopy of NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J Microsc*, 2007, 227(Pt 3): 229-35
- [58] Wilkens S. F1F0-ATP synthase-stalking mind and imagination. *J Bioenerg Biomembr*, 2000, 32(4): 333-9
- [59] Tilley SJ, Orlova EV, Gilbert RJ, et al. Structural basis of pore formation by the bacterial toxin pneumolysin. *Cell*, 2005, 121(2): 247-56
- [60] Wang L, Ounjai P, Sigworth FJ. Streptavidin crystals as nanostructured supports and image-calibration references for cryo-EM data collection. *J Struct Biol*, 2008, 164(2): 190-8
- [61] Wang L, Sigworth FJ. Structure of the BK potassium channel in a lipid membrane from electron cryomicroscopy. *Nature*, 2009, 461(7261): 292-5
- [62] Wang L, Bose PS, Sigworth FJ. Using cryo-EM to measure the dipole potential of a lipid membrane. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(49): 18528-33
- [63] Wang L, Sigworth FJ. Liposomes on streptavidin crystal: A system to study membrane proteins by Cryo-EM[M]// Grant JJ. *Methods in enzymology*. NY: Academic Press, 2010: 147-64
- [64] Trepout S, Mornet S, Benabdelhak H, et al. Membrane protein selectively oriented on solid support and reconstituted into a lipid membrane. *Langmuir*, 2007, 23(5): 2647-54
- [65] Yoshioka C, Carragher B, Potter CS. Cryomesh: a new substrate for cryo-electron microscopy. *Microsc Microanal*, 2010, 16(1): 43-53
- [66] Pantelic RS, Suk JW, Magnuson CW, et al. Graphene: Substrate preparation and introduction. *J Struct Biol*, 2011, 174(1): 234-8