

# 冷冻电镜：在原子尺度上观察生命\*

李雪明<sup>†</sup>

(清华大学生命科学学院 北京 100084)

2017-12-01 收到

<sup>†</sup> email: lixueming@mail.tsinghua.edu.cn

DOI: 10.7693/wl20171204

## Electron cryo-microscopy: observing life at the atomic level

LI Xue-Ming<sup>†</sup>

(School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

**摘要** 2017年的诺贝尔化学奖授予了3位冷冻电子显微学家，以表彰他们在冷冻电子显微镜技术上的奠基性工作，使直接观察溶液中处于生理或者接近生理状态的生物结构成为可能。获奖者都是具有物理学背景的生物学家，他们的获奖不但将冷冻电子显微带入了大众的视野，更体现了生物与物理，甚至与数学和计算机技术的多学科融合所带来的技术突破。文章将从多个方面来介绍冷冻电镜技术，展示科学家们是如何将对生命过程的观察放大到原子水平上的。

**关键词** 冷冻电子显微镜，生物大分子，三维重构，结构

**Abstract** Three electron microscopists were awarded the 2017 Nobel Prize in chemistry for their fundamental works and contributions in developing electron cryo-microscopy (cryoEM) technologies for determining the atomic structures of biological macromolecules in solution. All three laureates have a background in physics but win the prize for chemistry, which shows the importance of interdisciplinary researches involving biology, physics, mathematics and computer sciences. This review gives a brief review of the development of cryoEM, and explains how it can be used to observe life at the atomic level.

**Keywords** Electron cryo-microscopy, biological macromolecule, three-dimensional reconstruction, structure

## 1 引言

观察微观物质世界一直以来都是人们的梦想，除了好奇心的驱使，更多地是因为微观结构往往与物质的某种属性或功能密切相关。比如一辆自行车，其组成材料仅仅是金属和橡胶，但当把金属和橡胶加工成一定的形状并把它们组装起来之后，就具有了交通工具的功能。微观的物质或者各种分子机器，也遵循类似的规律，只不过

组成它们的基本材料是微观的原子。由原子按照一定规则排列形成的结构构成了各种功能的基础。反过来说，一旦了解了物质的结构，人们就有可能了解微观物质实现某种功能的机理，然后通过影响、改造甚至设计新结构来实现人们需要的功能。很多功能材料的发明或发现都是基于此类方法。在这种需求的驱动之下，人们不断发明各种手段来观察物质的结构。在17世纪的时候，虎克发明的光学显微镜，就已经能让人们把物体放大几十上百倍，从而观察到微小的细胞。随着光学技术的发展，光学显微镜技术已经能帮助人

\* 国家重点研发计划(批准号: 2016YFA0501102, 2016YFA0501902)、清华北大生命科学联合中心、北京市结构生物学高精尖创新中心资助项目

们来观察微米尺度上的材料微观纹理或者细胞内的细胞器。然而这样的放大倍数仍然远远达不到原子水平，不足以解释结构与功能的更本质关系，因为更多的本质因素多数隐藏于更精细的原子结构中。

对于生物体来说，其最重要和最核心的功能单位非蛋白质莫属。生物体的功能和各种生命活动，基本都是通过蛋白质来实现的。每一个蛋白质都是一个长串的氨基酸单分子链，由20种氨基酸按照不同的次序排列而成。这个单分子链在三维空间中的进一步折叠形成了不同的蛋白质结构。生物体中的蛋白质就好像是一个个分子机器，多数具有特定的结构，来实现催化、运动或信号传导等功能。这些蛋白质的三维结构通常非常复杂，常常随周围环境的变化而变化，很多时候还要受到其他蛋白质分子机器或者各种小分子的精确调控。例如，霍乱菌表面的分泌系统，通常由十几个蛋白质组成，在细菌的内外膜上形成一个孔道，选择性地将霍乱毒素分泌到细胞外，用来攻击宿主细胞。这样一个大的蛋白质机器由十几种不同的蛋白质分子组成，包含了几十万个原子，其中几个原子的变化或者一个氨基酸的改变(突变)都有可能造成整个蛋白复合物的结构变化，进而造成其功能改变甚至失去活性。由此可见这种分子机器的精密程度之一斑。

然而，如何看到这些精密组合在一起的原子，一直以来都是对显微技术的挑战。原子的尺度大小在十分之一纳米的数量级上，度量单位为埃。普通光学显微镜的有效放大倍数或者说分辨率，受可见光波衍射极限的限制，最多只能达到零点几微米。要提高分辨率，就必须缩短波长至与原子尺寸相当的尺度。可见光做不到，就只能寻找波长更短的光波。X射线具有合适的波长，但是很难找到一个透镜能让X射线折射并且成像。因此，人们不得不采用间接的晶体学衍射方法，才能用X射线探测物质的原子结构。但衍射方法仅限于能形成晶体的分子。对于蛋白质或者生物大分子来说，虽然其中少部分可以在特殊的条件下结晶并满足X射线衍射方法的要求，但是

大部分较大的分子(比如分子量大于100 kDa的分子)经常很难或者无法形成晶体。而且结晶的过程会使生物大分子完全脱离生理状态，无法反映其在生物体中的真实状态。对于细胞或者细胞器这种更大的复杂结构体，结晶的方法就更加不可行了。

为了能够找到一种波长更短和容易操控的波，人们想到了电子。20世纪30年代，法国物理学家德布罗意提出了物质的波粒二象性理论，认为基本粒子在被加速到接近光速的情况下，其粒子统计行为呈现出波动性。作为最容易获得和操控的基本粒子，电子在经过电场加速到接近光速之后，可以被当作“光波”用于显微成像。而经过精确设计的具有特定形状的磁场可以被用来当作凸透镜。随着电子光源和电磁透镜技术的发展，在随后的一二十年里，人们已经能用电子显微镜观察到接近原子分辨率的金属或无机晶体的原子结构。然而，当人们第一次用电子显微镜来观察生物样品(棉花纤维)的时候<sup>[1]</sup>，发现生物样品在高能电子束的轰击之下，很快就被破坏掉了，更不用谈观察精细的原子结构了。同时，因为电子与物质的强烈相互作用，电子显微镜的光路只有在高真空中，才能保证电子束能传播足够长距离来成像，而不在传播过程中被空气吸收掉。随之而来的问题是生物样品的含水问题。水在真空中会很快蒸发掉，而生物样品必须始终保持在水环境里，不能脱水。要保证水在真空中不蒸发，就需要把样品冷冻起来。然而水一旦结冰，冰晶就会把生物样品破坏掉。至此，一连串的辐照损伤和样品冷冻的问题便成为生物电子显微镜技术需要克服的最大障碍。这些问题直到20世纪80年代才被初步解决，从而奠定了冷冻电子显微学技术的基础。2017年的3位诺贝尔奖得主正是因为解决了这些技术难题而获奖。3位获奖者(图1)的获奖原因基本体现了冷冻电子显微镜技术的几个主要发展方向，Jacques Dubochet教授实现了冷冻生物样品的制备技术，Joachim Frank教授奠定了三维重构计算技术的基础，Richard Henderson教授证明了原子分辨率的可获得性。此外，最近

几年取得的一系列技术突破，更是让原子分辨率的冷冻电镜技术成为可能，真正的使冷冻电镜成为一个可以服务于大家的工具。本文将结合几位诺贝尔奖得主的贡献和最近几年的技术突破来介绍冷冻电镜技术的发展历程、面临的主要问题和未来发展趋势。

## 2 冷冻生物样品制备技术与玻璃态的非晶冰

冰是一种大家再熟悉不过的物质了。在一个大气压下，当水的温度低于零度时，便会变成固态的冰。水分子在彼此之间的极性相互作用力(范德瓦尔斯力)之下，形成规则的排列形式，变成晶体状态。这是我们生活中常见的冰的存在方式。冰晶的内部通常是极为纯净的，只有水分子存在，任何其他杂质都会在结晶的过程中被挤出晶体之外。当有较多其他杂质存在的情况下，通常会形成多晶。水结冰后体积还会发生膨胀，造成晶体之间相互挤压。生物体内的水如果结冰，冰的膨胀效应和相互挤压会对细胞或组织的结构造成破坏。如果要将生物体冷冻起来，就必须避免冰晶的形成。这也是难以通过冷冻的方法来长期保存生命体的主要原因。

在20世纪30年代，人们就已经知道水可以形成非晶的状态。也就是说，在低温下水虽然被冻结了，但是水分子并没有形成晶体的规则排列，还是无序的，称之为玻璃态。玻璃态的冰和水的密度相同，没有膨胀效应，也可以和其他的物质共存。因而不会对与其共存的物质造成排斥和挤压并破坏共存物的结构。这种玻璃态冰的形成需要非常快的冷却速度，达到每秒几十万度。可以认为冷却的速度必须足够快，以至于水分子没有时间移动形成规则排列的晶体，在一瞬间被冻在了原地，因此也就不会对原有的结构造成破坏。但是如何获得这么快的冷却速度形成玻璃态冰，在很长时间内一直都没有很好的办法。

在玻璃态冰能够被成功制备出来之前，人们都是采用负染色技术来固定生物结构并对其观察

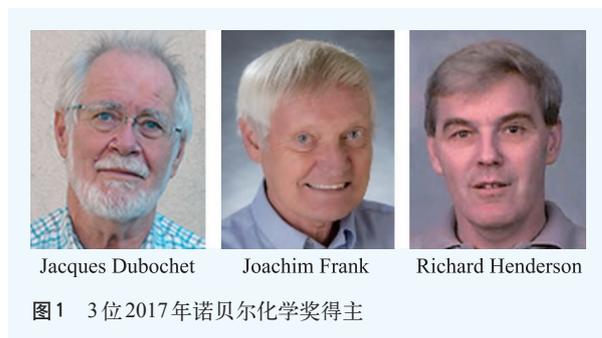


图1 3位2017年诺贝尔化学奖得主

的。负染色技术使用重金属盐作为染色剂，比如甲酸铀或者醋酸双氧铀。首先让重金属盐覆盖并渗透到生物大分子中去，然后把样品晾干脱水，蛋白质在这个干燥的过程中可能已经分解或者破坏掉了，但干燥后的盐保持了生物大分子在干燥前的外部轮廓。这个过程有点像铸造时制作沙模的过程，重金属盐就是沙子。当用电镜观察时，人们看到的生物大分子的图像其实是蛋白降解后留下的空洞，因此衬度是反转的，所以称为负染(图2)。负染的优势是操作简单，图像衬度高。缺点是无法获得高分辨率，因为观察到的仅是重金属盐而已经不是蛋白本身了。相应地，负染分辨率的上限只能达到十几埃左右。最早的生物样品的高分辨率结构都是通过负染色技术来观察的，比如20世纪50年代人们就借助负染色技术看到了与老年痴呆相关的脑神经细胞中出现的淀粉样沉淀，以及多种植物病毒的影像。虽然负染的分辨率远达不到原子水平，但是其相对于光学显微镜来说分辨率已经很高了。所以，这一技术目前依然有着很广泛的应用，用于对样品质量的快速检测和样品结构的初步分析，是最主要的日常电镜生物结构分析手段之一。随着高压冷冻和冷冻替代技术的发展，负染色技术也是目前观察细胞或者组织样品的重要手段。

负染色电镜技术算是一种对生物结构的间接观察手段，要想观察到更高分辨率的结构细节，就需要对生物样品的直接观察。在20世纪70年代中期，科学家们取得了一系列的重要进展。Robert Glaeser和他的学生 Kenneth Talyor 尝试直接用液氮冷冻 catalase 晶体，并观察到了高分辨率的衍射信号，证明了可以用电子显微镜来观察冷冻的生

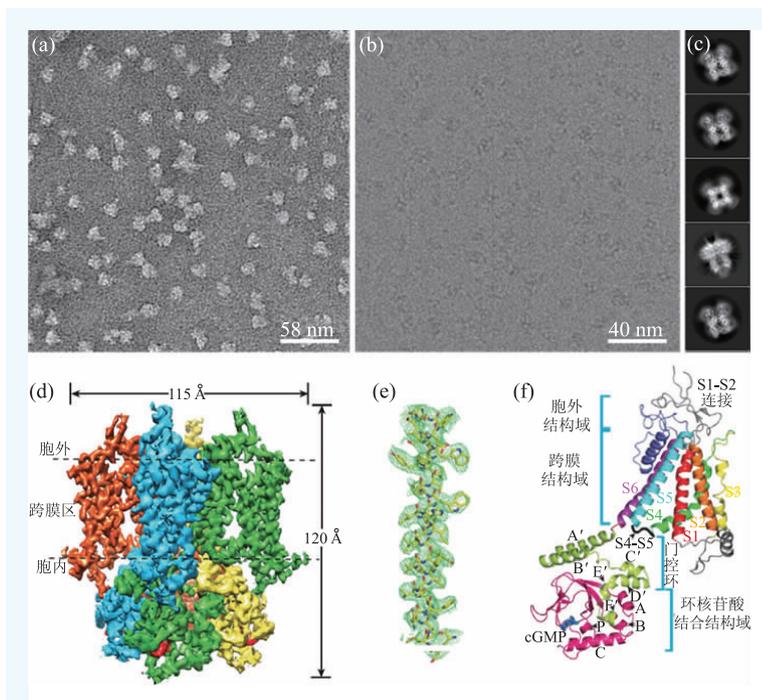


图2 真核生物环核苷酸门控(CNG)离子通道蛋白(分子量约300 kDa)复合物的电镜照片和3.5 Å分辨率的重构的三维结构<sup>[4]</sup> (a)负染照片,其中白色的颗粒是蛋白;(b)冷冻样品照片,其中黑色的颗粒是蛋白,极低的衬度说明了图像的信噪比很低;(c)多张冷冻蛋白颗粒照片平均叠加信号增强后的照片;(d)重构后的三维结构;(e)从三维重构的电子密度图中切出来的一小段氨基酸链,其中清晰可见每个氨基酸的侧链;(f)蛋白的一个非对称组成单元的结构卡通图,整个结构由一个长氨基酸分子链折叠而成

物大分子,并且能够达到至少3 Å的分辨率,而且冷冻有助于减低样品的辐照损伤和获得更好的衬度<sup>[2]</sup>。随后, Richard Henderson 和 P. N. T. Unwin 通过把水置换成糖的方法使样品脱水但是保持生物结构,最终获得了第一个接近高分辨率的膜蛋白结构<sup>[3]</sup>。这些工作第一次证明了电镜可以直接观察生物大分子结构,并且在高能电子辐照下也能够获得生物样品的原子分辨率结构信息。

随后在1980年左右, Jacques Dubochet 和同事们们在玻璃态冰的制备技术上取得了突破性的进展<sup>[5]</sup>。首先,他们发现可以使用接近液氮温度的液态乙烷把支撑膜上的小水滴冷冻为非晶的玻璃态冰,确立了冷冻的基本方法。之后又发现可以利用水的表面张力,在微孔上形成一层跨孔的很薄的水膜,然后用液态乙烷可以将水膜快速冷冻。如果水膜中包含生物大分子的颗粒,那么这些大分子颗粒就被固定在这层薄冰里了。这层水

膜的厚度可以很容易被做到几十纳米厚,从而有利于电子束的穿过和成像。这里之所以用液态乙烷来冷冻,主要是因为液态乙烷的比热很大,远高于液氮。大比热意味着降低同样多的温度,可以吸收更多的热量,从而加快样品的冷却速度。形成玻璃态的冰,需要达到每秒几十万摄氏度的降温速度,液态乙烷的高比热让这样的降温速度成为了可能。在此基础上,冷冻制样的基本技术被确立了起来。首先需要有一个有很多微孔的支持膜(载网),孔的直径通常在2 μm左右。然后,把含有生物大分子的溶液滴到膜上,用滤纸吸走多余的溶液之后,微孔上就能形成一层薄膜。这个过程类似于吹肥皂泡的过程,把一个圆圈放到肥皂水里再捞出来,圆圈里就能形成一层薄膜。最后,把样品快速投入到液态乙烷中进行冷冻,就制备好了冷冻电镜样品。乙烷在常温下是气态的,在液氮温度下是固态的。通常

的做法是在制样之前把乙烷气体吹入在液氮中冷却的金属杯里,气态的乙烷接触杯壁后降温到略高于液氮的温度,大概-180 °C左右,变成液态。目前这一制样方法从三十几年前被设计出来到现在,一直是冷冻电镜样品制备的主要方法,几乎没有变过。是否还有更好的制样方式?还有待科学家和工程师们进一步的努力和创新。

### 3 低剂量图像处理 and 三维重构技术

电子显微镜,更严格地说,透射电子显微镜是利用穿透样品的光束来成像的。只有当光束穿透样品,才有可能把样品内部的结构信息携带出来,称之为透射。只利用样品表面反射光的扫描电子显微镜是不能用来测定样品内部的三维结构的。当透射光打到荧光屏或者相机上后,操作者看到的或者相机记录到的是二维的图像。而我们

要测定的样品结构是三维的。这个二维图像和三维样品结构的关系是什么呢？如何通过二维图像来重构出三维样品的结构呢？冷冻电镜三维重构技术的第一步就是解决这个问题。

1968年，Aaron Klug提出了从二维图像重构三维物体的基本数学原理<sup>[6]</sup>，称为中心截面定理(图3)，奠定了三维重构技术的基础。Klug也因此获得了1982年的诺贝尔奖。这一原理也是医院里常用的CT设备的基本成像原理。通过冷冻电镜获得的图像是样品沿着光束入射方向的二维投影图像，中心截面定理利用傅里叶变换的关系，建立了二维投影的傅里叶变换和三维物体傅里叶变换之间的截面关系。也就是说，只要获得足够多方向的样品投影，通过傅里叶变换，就能换算出三维物体傅里叶变换后沿不同方向的截面。当截面多到足够填充整个三维傅里叶空间的时候，就重构出了三维物体在傅里叶空间中的结构，然后通过简单的傅里叶逆变换计算，就能得到物体的三维结构了。因此，要重构一个三维结构，关键在于获得物体沿多个方向投影的图像，并且知道每个投影的方向。

目前常用的获得投影的方式有两种：一种是把样品连续地旋转，在每一个旋转角度上都拍一张照片，称为电子三维断层扫描技术；第二种是制备很多具有同样结构的大分子，然后对大分子随机地投影拍照，再利用计算方法测定角度，称为单颗粒技术。第一种方法是最简单直接的方法，尤其是对样品的要求相对低，常用于对细胞或者生物组织结构的三维重构。但是当对同一个样品位置拍照很多次的时候，电子束对样品的辐照损伤就成为了最大的问题，导致这种方法的分辨率普遍很低。第二种方法相对于第一种，每个样品位置只需要拍一张照片，因此，辐照损伤的问题有所改善。但是这种方法对样品的重复性有非常苛刻的要求，因此只能用于对提纯出来的结构稳定的生物大分子的三维重构。这两种技术的应用都与辐照损伤密切相关，如何处理辐照损伤带来的问题实际上是这两个技术要解决的主要问题。

纵观冷冻电镜技术的发展史，辐照损伤自始

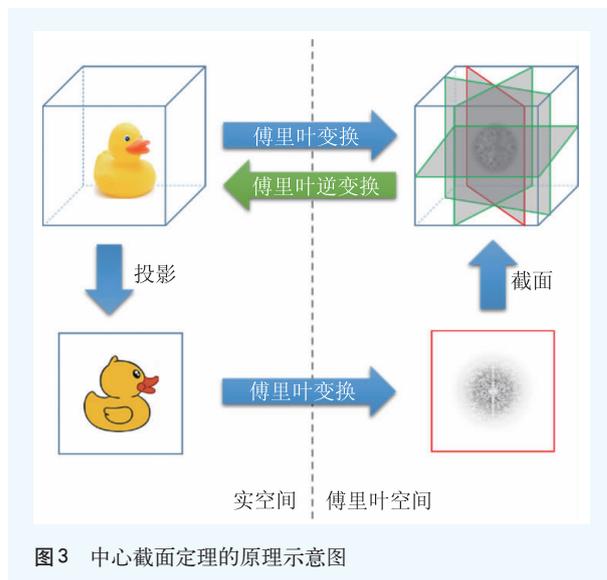


图3 中心截面定理的原理示意图

至终都是最主要的问题。3位诺贝尔奖得主的奠基性工作本质上也是为了解决辐照损伤造成的问题。在电子显微镜的发明之初，人们就发现生物样品在高能(几百千伏的加速电压)电子束的辐照之下，很快就会被破坏掉。与其他的辐照损伤类似，这种损伤是和累积的辐照总剂量相关的，而和辐射光束的强度关系不大。因此，为了降低辐照损伤，就必须要用很低的剂量来对样品进行拍照，称之为低剂量成像技术。低剂量成像的直接结果就是图像信噪比很差，所有物体都被掩盖在很强的噪音之中。这类似于在黑夜里拍摄物体的照片，看到的任何东西都是模模糊糊的(图2(b))。在看不清的情况下，还需要完成几个埃精度的样品识别、定位和三维重构所需的各种分析，其难度可想而知。通过经验的和理论的研究发现，在低于 $\sim 20 \text{ e}/\text{\AA}^2$ 的累积剂量之下，生物样品受到的辐照损伤还不是很显著。随着剂量的增加，辐照损伤的影响主要体现在对高分辨率细节的破坏上，而对低分辨率结构细节的影响相对低一些。因此，当分辨率要求不高的时候，人们通常采用稍高的剂量，以增强图像的信噪比，改善计算的精度。

通过前面的介绍，我们可以看到冷冻电镜的主要技术难度在于处理低信噪比的图像。信噪比指的是图像中信号强度和噪音强度的比值，单颗粒冷冻电镜图像的典型信噪比通常在0.1量级。

提高信噪比的主要办法是叠加平均。图像中的信号是我们要重构的结构，是一种稳定的信息，可以通过叠加多幅图像中的相同信号来增强。而噪音是一种随机的信息，没有重复性，因此不会通过叠加而获得增强。所以，当平均多幅相同的图像时，其中的信号获得稳步增强，而噪音维持不变，最终信噪比获得了提升(图2(c))。在20世纪70年代的时候，包括Joachim Frank在内的生物电子显微学家已经开始采用这种图像处理技术来增强冷冻电镜的图像信噪比，从而提高三维重构的分辨率<sup>[7]</sup>。基于这种图像平均的思想，要重构一个三维结构所需的图像是高度冗余的，其数量经常远远大于满足投影角度分布所需的照片数。换句话说，要重构一个结构，理论上只需要几百张不同角度的投影照片就足够了，但为了提高信噪比，照片数量经常会达到几万张到百万张级别。Richard Henderson在20世纪90年代的一项工作，从理论上说明了要重构一个100 kDa左右分子量的蛋白质只需要大约一万张照片就能获得足够角度测量精度，获得原子分辨率的三维重构<sup>[8]</sup>。然而这个理论预期到现在都还很难做到。但随着冷冻电镜数据采集技术和计算技术的发展，人们正越来越接近于这个预测。图2(d—f)展示了一个使用大约8万张照片重构的一个3.5 Å左右分辨率的CNG离子通道结构。

对于低剂量的低信噪比冷冻电镜照片，最大的挑战还在于如何精确测定每张照片的三维投影方向。对于单颗粒三维重构技术，取向测定的精度直接决定了三维重构的分辨率。对于每一张照片，描述其空间取向需要至少5个参数，包括描述图像面内平移的2个参数和3个空间取向角(称为欧拉角)。如果有十万张照片，那就意味着至少有50万个参数要测定，由此可见测定的难度和计算量的巨大。目前主要的测定方法是采用迭代精修的数值算法。首先给定一个初始模型，可以是一个任意的模型或者一个根据先验知识做出来的模型，然后把所有照片跟这个模型所有的投影去比较，找到最像的投影方向作为测定的投影方向。然后，根据测定投影方向计算一个新的模型

出来，作为下一轮的模型。重复这个过程，直到最终收敛到一个稳定的结构。Joachim Frank的贡献就在于最早发展了一系列图像分析、聚类 and 三维重构技术，并开发了一个称为SPIDER的软件系统来辅助科学家们完成相应的计算<sup>[9]</sup>。随着技术的发展，各种不同的算法和软件系统不断地被开发出来，大大增强了冷冻电镜技术的可用性和解决问题的能力。

目前来说，如何普遍地提高取向测定精度以推高分辨率到2 Å甚至更高的原子水平，仍然是人们最感兴趣的研究方向。尤其是对于那些具有一定柔性的动态变化的分子结构，如何通过计算技术来重构和展示与功能相关的动态过程，正在成为最热门的研究方向。

#### 4 原子分辨率与直接电子图像探测器技术

原子分辨率是发展冷冻电镜技术的初衷和目标，然而这一目标直到最近几年才算真正地得以实现。这其中最大的问题还是来源于图像的低信噪比问题。低信噪比造成了图像的低衬度，也就是说图像看上去很不清晰。从而影响到图像识别和三维重构的取向测量精度，最终导致低分辨率。所以，最早出现的几个原子分辨率结构还都是利用蛋白形成的二维晶体，借助天然的晶格周期重复性来提高信噪比，才最终得以解析的。直到十几年前，人们首次获得了悬浮于溶液中的病毒颗粒的3~4 Å的原子分辨率结构<sup>[10]</sup>。这些病毒颗粒具有几十兆道尔顿(MDa)的分子量和正二十面体的高对称性。大分子量意味着在低剂量成像条件下也有足够的信噪比来完成三维重构的过程。当噪音强度固定的时候，越小的物体，信噪比就会越低。类比于我们在黑夜里很容易就能看清楚一座大楼，但很难看清楚一只小蚂蚁。同时，高对称性为取向测量提供了很强的对称性约束，有助于补偿信噪比不足造成的误差。然而，对于那些只有几百千道尔顿(kDa)分子量且对称性很低甚至没有对称性的大分子复合物，精度就难

以保证了。所以，如果要解析比较小的生物大分子结构，就要想办法尽可能提高图像的信噪比。

随着电镜的电子光学系统性能和稳定性的不断改善，电镜本身的分辨率很早之前就已经不是限制生物大分子三维重构的瓶颈因素了。人们发现电镜相机记录图像信号的能力成为了分辨率的决定性因素。如果相机在记录原子分辨率结构信息的时候，衰减了本来就很微弱的信号，还附加了很多的噪音，那无论如何也很难算到原子分辨率了。最开始人们使用底片来记录图像。底片是一个比较优秀且廉价的图像记录介质，但是需要定影、显影和扫描等一系列过程，才能看到和获得计算机能够处理的图像。这很难满足三维重构对照片数量的需求。因此，人们从90年代就逐渐开始使用数码相机来记录图像了。然而，数码相机的探测器芯片难以经受高能电子束的持续轰击，很快就会损坏。为了解决这个问题，人们不得不在相机芯片前面放一个光电闪烁体，把入射电子信号转化为光信号，然后光信号再经由与之耦合的透镜或者光纤系统传递到数码相机的探测芯片上。这一系列复杂的信号转化过程，造成了信号的弥散，也就是说任何一个小光点在记录时都变成了一个斑，称为点扩展效应。这就好像我们透过一个毛玻璃去看一个物体，图像变模糊了。这一问题在大概2000年左右的时候就被人们意识到了，Richard Henderson是最早意识到并着手推动解决这个问题的科学家之一。思路很简单，就是用探测器芯片直接去探测电子，减少点扩展效应，称为直接电子探测器。随着探测器技术的发展，这一技术在十年前开始逐渐取得成功。并且探测器芯片被设计得很薄，以防止穿透的电子再反射回来产生错误的信号。

然而直接电子探测还是不够完美，点扩展效应只是被减弱了，但并没有被消除掉。另外，电子元器件的热噪音等问题，也给记录到的图像增添了额外的噪音。因此，UCSF的David Agard和程亦凡等科学家意识到这个问题之后，提出了单电子计数的概念。如果相机拍照的速度足够快，比如每秒钟拍摄几百帧图像。那么记录在每一帧

上的电子就会很少，从而就有可能识别出每一个电子轰击到相机上之后产生的信号。从这些信号中就能分析出每一个电子的入射位置，然后将每个电子强度记为1，作为在这个位置的图像信号记录下来，其他的信号都被忽略掉。通过这种方式，点扩展效应和比电子入射信号弱的相机噪音就被去除了。从而，实现了以近乎理想的状态来记录图像<sup>[11]</sup>。

在2013年左右，直接电子探测技术和在此基础上发展出来的电子计数技术的出现突破性地将相机记录到的可用信号的分辨率大幅提高到了原子尺度。同时，新型相机记录的图像衬度也获得了大幅提高，最终使得在几百千道尔顿分子量的中小生物分子上也能获得原子分辨率的三维重构。这些新型相机还提供了多帧的图像采集能力。也就是说，以前拍照只是拍一张照片，现在改成拍电影了，记录下了拍照过程中样品不稳定造成的图像抖动和漂移的全过程。通过同期发展起来到漂移纠正技术，人们实现了电镜的图像防抖，进一步提高了图像的分辨率。

与此同时，新的三维重构算法也在不断地被发展出来。基于最大似然和贝叶斯统计推断算法在三维重构中的应用，三维重构的精度获得大幅提高，整个计算过程也变得更加智能和自动化。最终，通过整合相机技术和计算技术的突破性进展，2013年成为了冷冻电镜技术发展的分水岭。在此之后，随着TrpV1<sup>[12]</sup>等一系列具有重要生物学意义的大分子复合物的原子分辨率结构的解析，冷冻电镜成为了一个炙手可热的新工具，正在重塑着结构生物学的格局<sup>[13]</sup>。

## 5 结论

从电子显微镜的发明，到冷冻电镜技术在80年代的基本确立，经历了将近50年的时间，再到原子分辨率三维重构的普遍实现，又经历了将近40年的时间。这将近90年的发展过程从一个侧面体现了科学家们在发展冷冻电镜技术的过程中所面临的巨大挑战。正是由于包括3位诺贝尔奖得

主在内的一大批科学家和技术人员的不懈努力，才成就了冷冻电镜这一个划时代的技术。从三维重构原理的提出，到样品快速冷冻技术确立，再到图像分析技术的逐步成熟完善，生物样品的辐照损伤问题被逐渐地解决，最终使冷冻电镜技术逐渐成为一个具有巨大潜力的革命性技术。这一过程与包括生物学、物理学、数学、电子工程和

计算机技术等在内的多学科交叉是密不可分的。随着新方法新技术的不断融入，或许在不远的将来，科学家们将可以利用冷冻电镜在细胞中直接测定生物大分子的原子结构，揭示隐藏在结构之中的生命奥秘。

## 参考文献

- [1] Marton L. *Nature*, 1934, 133: 911  
 [2] Taylor K A, Glaeser R M. *Science*, 1974, 186: 1036  
 [3] Henderson R, Unwin P N. *Nature*, 1975, 257: 28  
 [4] Li M, Zhou X, Wang S *et al.* *Nature*, 2017, 542: 60  
 [5] Dubochet J. *J. Microscopy*, 2011, 245: 221  
 [6] De Rosier D J, Klug A. *Nature*, 1968, 217: 130  
 [7] Frank J, Goldfarb W, Eisenberg D *et al.* *Ultramicroscopy*, 1978, 3: 283  
 [8] Henderson R. *Q. Rev. Biophys.*, 1995, 28: 171  
 [9] Shaikh T R, Gao H, Baxter W T *et al.* *Nat. Protoc.*, 2008, 3: 1941  
 [10] Zhang X, Jin L, Fang Q *et al.* *Cell*, 2010, 41: 472  
 [11] Li X, Mooney P, Zheng S *et al.* *Nat. Methods*, 2013, 10: 584  
 [12] Liao M, Cao E, Julius D *et al.* *Nature*, 2013, 504: 107  
 [13] Cheng Y. *Cell*, 2015, 161: 450

## 新书资讯

剑桥大学卡文迪许实验室，在1904年至1989年的85年间一共产生了29位诺贝尔奖得主，这个数字真的令人惊叹！卡文迪许实验室的前主任马尔科姆·朗盖尔教授，这位国际公认的大才子，这位仅靠一次讲座就可以吸粉无数的大科学家，在剑桥大学传授物理学课程几十年，针对大学物理教学中一些被忽略的重要方面，综合与多位学者以及课堂上聪明且能言善辩的学生的讨论，以全力以赴的工作态度加上热情洋溢的写作风格，为全世界的读者奉献了这本《物理学中的理论概念》，一直被剑桥大学卡文迪许实验室用作教材。它不仅限于解决实际的物理问题，更注重物理概念的历史渊源、物理图像和物理本质。

一般的大学物理教材，总是把知识分割成力学、热学、电磁学、光学、原子物理学来阐述。而本书打通了这些本不该被分立的知识体系，模

糊了彼此的界限，体现职业物理学家处理问题时用到的整体观，以严谨的理论逻辑为主线，7大专题，脉络清晰，连续而深刻地对物理学整体进行了总结和提升。

本书以一种独创、新颖且全面综合的方法对物理学中的理论研究进行了探讨，并以真实的物理学是科学家不断探索和实践的结果的视角阐述主题。作者试图将本书作为大学本科高年级物理课程的补充读物，并假定读者对普通物理的知识已有所了解。利用对7个专题的系列研究，作者着重描述了理论物理学中某些最难的观念、科学家们充满智慧的艰难探索，以及研究和发现所带来的激动和欣喜。这些专题研究包括牛顿运动定律和万有引力定律起源、麦克斯韦方程组、线性/非线性力学与动力学、热力学与统计物理、量子概念起源、狭义相对论、广义相对论与宇宙学。

读者和编者



码上有书