

知識天地

中研院低溫電顯研究簡介

章為皓(化學研究所助研究員)

電子顯微鏡早在二戰前由德國魯斯卡 (Ruska, Nobel Physics 1990) 所發明，接近一世紀時間，由於工藝不斷進步，早已達到原子解析度，成為材料學家的利器。而赫胥黎 (J. Huxley) 在 1950 引進的負染色法，使生物學家可以有效固定生物樣品並提供極佳的對比，然而經過脫水和固定的生物結構與在細胞內的生物結構 (native structure) 是否相同？什麼方法可以讓我們清楚觀察到生物原始結構呢？在 1975 年現任英國醫學中心 (Medical Research Council) 韓德森博士 (Hederson) 發現在液氮溫度下紫菌膜蛋白的二維晶體可以繞射至原子解析度，歷過 15 年 (簡稱低溫電顯, cryo-EM) 韓德森博士結合傅利葉影像分析法和電子繞射解出紫菌膜蛋白的原子結構，同時法國的杜伯謝 (Dubochet) 發明了速凍法，直接把蛋白質單粒子存在無序冰裡面，得到非常好的對比，而紐約華德伍茲 (Wadworth Research Center) 的法蘭克博士 (Frank) 發展單粒子重建法於 1995 臻於成熟，能有效解決核醣體的次奈米動態結構，從此低溫電顯 (cryo-EM) 迅速竄起，成為與 X 光結晶學和核磁共振三柱鼎立的高解析度結構生物學利器。在前任美國總統克林頓 (Clinton) 執政末期，倍增國家衛生院 (National Institute of Health) 研究經費，使得在 1998 之後，美國許多研究型大學積極設立低溫電顯設施，延聘具低溫電顯專長的學者任助理教授。頓時在美國，低溫電顯從冷門科學魚躍龍門變成顯學，凌駕於其發源地之歐洲。目前台灣從事巨分子研究的科學家越來越清楚低溫電顯能夠提供 X 光結晶學和核磁共振所不能得到的資訊，是發表高衝擊性科學文章所必需的，筆者特在此撰一短文介紹中研院化學所低溫電顯的新創研究 (start-up research program) 經過三年從無變有的過程，以揭開低溫電顯這個高技術門檻高領域的神祕面紗。

低溫電顯的成像原理與一般明場穿透式電顯 (Bright field transmission electron microscopy) 的模式並無不同。近乎平行的電子束穿過極薄樣品，由於量子效應，被樣品中的原子分布所擾動的電子波與未被擾動的電子波，由電磁透鏡所聚焦發生干涉，成像於底片或電荷耦合相機 (CCD) 上。影像上的強度變化可由弱相位弱振幅近似做泰勒展式忽略高次項。以簡單之數學模型表達：

$$I(R) = N (1 - T(R) \times n \times f \times \lambda * PSF) + \text{噪訊}$$

I(R): 在座標 R 之強度

N: 電子劑量

T(R): 在座標 R 之樣品厚度

n: 原子密度

f: 原子散射函數

λ : 電子波長

PSF: 透鏡光學模糊函數

*: 捲積運算

從公式中我們清楚看見對比項與厚度、材料密度、原子種別、電子波長，都有正相關，而對比若是不夠，訊號將埋在噪訊中。對於蛋白質樣品，對比主要來自蛋白質密度 (1.3g/ml) 與無序冰密度 (0.94g/ml) 的差異，為了避免高劑量電子破壞蛋白質結構，造影低溫樣品時仍須使用不高於 2000/nm² 的電子通量，因此所得之影像含有高量的噪訊，無法像材料科學中因使用十倍至百倍的電子通量，由單一影像獲得到原子分辨率資訊。我們在文獻中看到的非常高分辨率的生物分子結構並非由單一影像而得，都是經由影像處理平均數萬個至數十萬個分子，去除了噪訊而獲得的。如何藉影像處理從充滿噪訊的影像中榨出近原子解析度的資訊是低溫電顯結構生物學的核心問題。談到電顯的透鏡效應，它一直是低溫電顯結構生物學中最頭痛的問題，傳統電子顯微術中透鏡光學模糊函數是一個正弦函數，只能傳輸微弱的低頻訊號，造成有效對比下降，使得原本對比已經十分微弱的蛋白質，核酸，脂質在無序冰中更加看不清楚，因此用低溫電顯造影生物樣品時，往往需要用數個微米的欠焦技巧，去補償失去的對比，大的欠焦，會造成透鏡光學模糊函數在高頻域相角快速振動，使高解析度結構失真，需藉取得一系列不同欠焦距的資料 (defocus series)，疊加起來才能還原失真之結構，為低溫電顯資料擷取 (data collection) 與影像處理 (image processing) 之速率瓶頸 (bottleneck of throughput)。

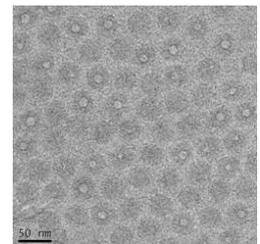
五年前在美國巧遇陳長謙前副院長，陳院士是一位對提升台灣、香港、新加坡的科研充滿熱情的長者，當他詢問我是否願意回台北建立低溫電顯研究時，我不能不接受了這個挑戰。當時中研院化學所為因應奈米熱潮，選擇了日本電子 2011 型之二十萬伏（200KV）加速電壓，解析度可達 0.14 奈米的超高解析度電顯，在我到任之前已經安裝完畢，正待揚帆出港。經過數度測試，發現 2011 電顯上之試片影像總有嚴重漂移現象，無法從事低溫電顯造



圖一 a 2011 移機前後

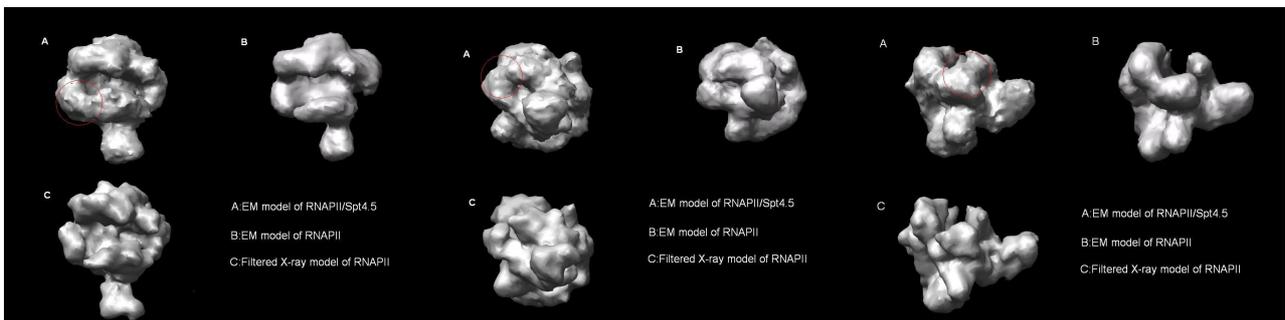
影，經過兩年折衝，精細籌劃，終於在 2005 耶誕節前一天將 2011 電顯遷到化學所一絕磁、絕音、避震、控溫最為穩定的電顯環境，一舉解決漂移問題，隔週立刻攝得該機型應提供的 0.14 奈米的金箔條紋（圖一 a）。2011 為日本電子 2100 場發射電顯的前身機型，雖然亮

度、同調度暨控制界面友善度較為遜色，若使用得當，仍為一利器。我們在化學所 2011 電顯上加裝了一具伸縮電視，和電子束開關，使我們可以利用電視所提供遠比螢光板好的對比在低倍率來搜尋獵物，並在必要時可關掉電子束，為台灣唯一能有效從事低劑量攝影模式的電子顯微鏡。具備這兩個條件後，我們立刻與中山大學林全信教授合作，成功攝得魚病毒存於無序冰的清楚影像（圖一 b），我們選擇病毒作為目標物，是利用它有足夠的厚度（35 奈米），能夠在約 50 奈米的無序冰層中有好的對比。製作低溫樣品的關鍵是控制無序冰的型成，有三年的時間我們在台灣買不到乙烷（ethane）而用丙烷（propane）替代，得不到好的效果，日前我們終於找到供應乙烷的來源，排除了之前使用丙烷的問題。



圖一 b 魚病毒鞘蛋白於無序冰中

在這個設立低溫電顯的過程中，對目標蛋白結構和功能的熱情是對抗壓力與挫折的最佳武器，目前院內友人提供的蛋白因為較小而不能提供足夠對比，所以我們實驗室選定了幾個具重要生物意義並且在二十萬伏（200KV）下良好對比的真核蛋白複合物（分子量大於 400Kd）自行純化，其中有真核核糖核酸聚合酶複合物（圖二），真核降解酶複合物，真核剪接子複合物，這些目標蛋白屬於高度競爭的題目，在我們的人力、



圖二 酵母核糖核酸聚合酶三維重建（解析度 2 奈米）

物力、電顯和計算機設備都不如國外最頂尖的實驗室的情況下，如何做出大部分低溫電顯結構生物學家做不出的研究而出奇制勝呢？翁院長曾經說過台灣生技發展要靠創意，因此我們在 2005 年規劃了兩個全新的方向，藉著中研院所支助的基因體計畫與生醫所張久媛合作完成了開發用奈米金標記複合物之單元體的前置工作，將用來解決真核細胞中，核糖核酸聚合酶複合物，降解酶複合物（與分生所林淑端合作），剪接子複合物（與基因體中心張典顯合作）的單元體在空間中排列的問題，另外藉著奈米計劃的支助，我們同時與物理所陳福榮、張嘉升和胡宇光合作用 Zernike 相位片把電子顯微術中透鏡光學模糊函數轉成餘弦函數，可大幅改善低溫電顯的對比，與世界上與日本永山

國昭 (Nagayama, Okazaki)，德國施洛德 (Schroeder, Frankfurt) 的實驗組同步競爭。我們已用電腦模擬證明 Zernike 相位片帶來的對比改良對影像處理的效益有革命性的突破，使得藉由平均數萬個單粒子影像就可得到原子解析度的結構。筆者之後將會陸續撰文報告這些令人興奮的結果，謹在此誌謝李遠哲前院長、翁啓惠院長、陳長謙前副院長、賴明詔前副院長、王惠鈞副院長、陸天堯前所長、陶雨臺所長、儀服中心姚永德前主任，也要謝謝化學所的同事徐新光教授、同仁蕭志忠、莊曜瑛、捷東公司團隊，以及我們實驗室成員：陳青諭博士、林彥成博士、吳逸民、邱宗凱、顏畿府、翁依蘋、張智超和 T. Setiawan。

最後附表，是關於目標蛋白的大小與電子顯微鏡規格和最合適樣品製備方法的關係，以供有興趣的同仁規劃合作。

加速電壓	目標物與尺度	範例	建議方法	狀態
十萬伏 (100KV)	50 Kd to 300 Kd	膜蛋白	二維結晶	採購中
二十萬伏 (200KV)	400 Kd (十五奈米) 至 三十奈米	蛋白複合體	單粒子	使用中
三十萬伏 (300KV)	五十奈米以上	病毒、細胞	斷層重建	計議中