

冷冻电子显微镜技术进展及环境研究应用^{*}

杨宇洁^a 巩宇锈^a 顾天航^{*,a} 张伟贤^{*,a,b}

(^a 同济大学环境科学与工程学院 污染控制与资源化研究国家重点实验室 上海 200092)

(^b 岭南现代农业科学与技术广东省实验室 广州 510642)

摘要 电子显微镜是表征微观粒子结构的必要手段,但预处理过程会对含水样品结构造成破坏,导致结果失真.冷冻电子显微镜(Cryo-EM)技术通过将样品在低温下快速冷冻,使水合样品处于无定形玻璃态冰层内,在保障高真空度要求的同时减少电子辐射对样品的破坏,目前已成为高分辨地观察含水样品原始状态下结构最先进的手段,在生物、材料等领域应用广泛.本综述总结了冷冻电镜在电子元件、成像技术与分辨率等方面的进展,综述了样品制备方法及三维重构技术.鉴于绝大多数环境样品为含水样品,冷冻电镜技术在大气、水体、土壤等环境介质中的应用拓宽和深化了对环境中微纳粒子本身形态结构和粒子间相互作用关系的理解.我们期待冷冻电镜为环境科学研究带来突破性贡献.

关键词 冷冻电镜;快速冷冻;含水样品;玻璃态冰;三维重构;环境化学

Progress and Environmental Research Applications of Cryo-Electron Microscopy^{*}

Yang, Yujie^a Gong, Yuxiu^a Gu, Tianhang^{*,a} Zhang, Wei-xian^{*,a,b}

(^a State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, College of Environmental Science and Engineering, Tongji University, Shanghai 200092)

(^b Guangdong Laboratory for Lingnan Modern Agriculture, Guangzhou 510642)

Abstract Electron microscopy (EM) is one of the most important techniques to characterize the morphology and structure of micro- and nano-particles. However, conventional procedures for sample preparation often alter the structure and morphology of samples with high water contents, causing distortions and misinterpretations for EM characterizations. The invention of Cryo-electron microscopy (Cryo-EM) has largely solved this problem. Via rapidly freezing the hydrated samples at low temperatures, cryogenic techniques instantaneously transform liquid water into amorphous ice to ensure high vacuum and reduce electron radiation damage, allowing researchers to observe hydrated samples in their native state with high resolution. For example, applications of Cryo-EM during the COVID-19 pandemic have demonstrated the amazing ability of Cryo-EM to visualize the detailed structure of SARS-CoV-2 viruses, which provides vital knowledge for rapid and reliable detection and diagnosis of the disease, transmission mitigation, and vaccine development. So far, Cryo-EM technology has been widely used in materials, biology, pharmaceuticals, and other fields of research, successfully broadening and deepening the understanding of the interactions between micro- and nano-particles. This review summarizes the recent development of Cryo-EM from aspects of electronic components, imaging technology, and resolution and introduces the sample preparation methods. Furthermore, the three-dimensional reconstruction method is highlighted to advance the EM method from 2D to 3D. As most environmental samples are highly hydrated, Cryo-EM will likely become an essential tool to investigate microscopic particles in the environmental field. This review gives examples of the applications of Cryo-EM in the formation of aerosol particles in the atmosphere, observing biofilm morphology in the water treatment process, the pore structure of activated sludge flocs, and the potential mechanism of soil microorganisms on heavy metal remediation. Finally, the prospects of Cryo-EM are summarized and discussed. We expect that with software, hardware, and artificial intelligence development, Cryo-EM technology can achieve faster data acquisition and higher resolution and make breakthrough contributions to environmental chemistry research.

Keywords Cryo-electron microscopy (Cryo-EM); rapid freezing; hydrated samples; glassy ice; three-dimensional reconstruction (3D reconstruction); environmental chemistry

^{*} Dedicated to the 90th anniversary of *Acta Chimica Sinica*.

^{*} E-mail: tianhanggu@tongji.edu.cn; zhangwx@tongji.edu.cn

Received April 26, 2023; published June 28, 2023.

Project supported by the Key-Area Research and Development Program of Guangdong Province (No. 2020B0202080001) and the National Natural Science Foundation of China (No. 51978488).

^{*} 庆祝《化学学报》创刊 90 周年.

项目受广东省重点领域研发计划(No. 2020B0202080001)和国家自然科学基金(No. 51978488)资助.

1 引言

水是生命之源,几乎存在于所有环境样品中^[1-2],包括生物膜、气溶胶、活性污泥、土壤等.真实地表征这些含水样品的结构,对于准确认知其功能和相关机理至关重要.例如新型冠状病毒(SARS-CoV-2)的致病性和传播能力与其微观结构息息相关^[3],只有认清 SARS-CoV-2 的病毒结构才能更好地控制疫情.冷冻电子显微镜(冷冻电镜, Cryo-EM)作为一种可视化微观粒子的技术,与常规电子显微镜相比,其在样品制备的过程中用液氮或液氮温度下的快速冷冻代替了干燥、负染色等会破坏样品天然结构的步骤,减少了脱水对样品造成的损害,通过形成无定形的玻璃态冰来降低伪影与电子束辐射的影响^[4],并引入了相位板和衬度传递函数解决了图像分辨率与信噪比难以兼得的问题,实现对常规电镜无法观测的含水生物样品或电子敏感样品成像,使研究者在最接近样品自然形态的条件下真实地观察到含水 SARS-CoV-2 的结构特征^[3].例如, Mendonca 等通过冷冻聚焦离子束扫描电镜发现, SARS-CoV-2 病毒粒子利用突起的 S 糖蛋白与宿主细胞的人血管紧张素转换酶 2 结合,从而改变宿主细胞膜的结构,进入细胞质和囊泡并损伤细胞核,导致细胞感染^[5],这为快速诊断病情、减少病毒传播与疫苗研发提供了明确而有力的指导.

冷冻电镜自发明以来一直不断地进步,依托于电子元件的创新、软件算法的成熟与三维重构技术的完善,实现了样品微观结构从平面到立体的跨越,并使分辨率突破了纳米级的限制,逐步发展为一种优秀的表征技术.与 X 射线衍射法和核磁共振波谱法相比,冷冻电镜在测量生物大分子结构时所需的样品量更少,样品也不是必须为晶体,且突破了核磁共振只能观测较小蛋白质

结构的局限,可对多种类型的样品成像^[6],尤其是可以用来观测含水样品.近年来,冷冻电镜被广泛应用于多个领域.冷冻电镜具有能够在天然状态下捕获蛋白质结构的特点,因此常被用于疾病诊断与药物研发中,例如,可以通过观察冷冻电镜拍摄到的不同的 tau 蛋白丝结构实现对阿尔茨海默症^[7-8]、皮克氏病^[9]、慢性创伤性脑病^[10]和皮质基底节变性^[11]等神经性疾病进行分类诊断;也可以基于观测到的靶蛋白活性以及调控位点的信息定向地开发药物及疫苗^[12-13].在材料科学领域,冷冻电镜可以维持电池稳定的电化学状态,因此可以揭示锂电池固体电解质界面的纳米结构,从而研究电池的性能及寿命^[14-16];冷冻电镜还可以用于在原子水平上探索金属有机框架材料的结构演变和吸附动力学^[17]以及研究软物质聚合物的对称性和组装问题^[18].此外,鉴于低温技术可以保持水合样品天然结构的优良特性,冷冻电镜技术也逐渐开始应用于环境领域研究中,表 1 列举了近年冷冻电镜技术在环境、生物、材料等领域的应用实例,证明了冷冻电镜在微纳米粒子可视化表征方面优异的能力,对研究原始状态下粒子本身的形态结构和粒子间相互作用关系有重要的意义.

本文从冷冻电镜的起源出发,小结了研究者在常规电子显微镜基础上,不断地耦合快速冷冻、计算图像处理、三维重构等技术,逐渐升级电子元器件与图像合成手段,使冷冻电镜成像分辨率达到了原子级.其中,详细介绍了冷冻电镜不同的样品制备方法与三维重构技术的原理,对比分析了电子晶体学、单颗粒分析与电子断层扫描三种重构方法的优缺点与适用条件.综述了冷冻电镜表征水体、大气、土壤及固体废弃物中含水样品以及环境研究中涉及到的蛋白质的应用,并对冷冻电镜未来发展进行了展望.

表 1 冷冻电镜技术应用实例

Table 1 Examples of Cryo-EM application

冷冻电镜种类	原理	代表性研究	参考文献
冷冻透射电子显微镜	将平行电子束投射到样品上,电子与样品中的原子碰撞散射,从而形成投影图像	金、银纳米颗粒	[19-20]
		噬菌体的蛋白质外壳	[21]
		蒙脱石-二氧化硅悬浊液	[22]
		气溶胶颗粒	[23]
		MS2 噬菌体	[24]
冷冻扫描电子显微镜	利用高能电子束扫描样品,在其表面形成二次电子、背散电子等,从而转换产生图像	石油工业中的乳液和悬浮液	[25]
		<i>A. Borkumensis</i> 细菌生物膜	[26]
		乳胶/陶瓷纳米颗粒涂层	[27]
		海藻酸盐水凝胶	[28]
冷冻聚焦离子束扫描电子显微镜	利用聚焦离子束扫描样品得到图像	活性污泥	[29-30]
		枯草芽孢杆菌孢子	[31]
		新型冠状病毒	[5]
冷冻扫描透射电子显微镜	利用聚焦后的电子束逐点扫描样品,在样品下方收集散射或透射电子,从而形成明、暗场像	黏土的孔隙结构	[32]
		铁蛋白	[33]
		锂离子电池中固液界面和枝晶的结构	[34]

2 冷冻电镜技术的起源与发展

近 100 年以来, 无数研究者在常规电子显微镜技术基础上不断探索发现, 逐渐发展并形成了以高分辨地观察含水样品原始状态下结构为目标的冷冻电镜技术. 图 1 以时间为线索, 总结了冷冻电镜技术发展过程中样品制备、电子元器件、3D 重构方法以及分辨率的重大突破.

2.1 历史起源与发展

柏林工业大学的 Max Knoll 和 Ernst Ruska 于 1931 年发明了世界上第一台透射电子显微镜. 经过不断完善, 两年后其放大倍数达到了 12000 倍, 突破了光学显微镜的放大极限^[35], 这使得观察微小颗粒的梦想变为可能.

1968 年, De Rosier 和 Klug 提出用中心截面定理对电镜拍摄出的图像进行三维重构, 并以此构建出了噬菌体 T4 尾部的 3D 结构^[36], 这让人们对物体的观察从平面形态进化到了空间形态. 但是, 透射电镜需要在高度真空的条件下才能工作, 且有机样品对于透射电镜的辐射非常敏感, 暴露在电子束之下会造成样品的损伤, 因此这时的电镜只能对不含水的无机样品进行成像, 不能对微生物、生物大分子等含水有机样品进行表征. 为了解决这个问题, Robert Glaeser 和他的学生 Ken Taylor 尝试利用液氮来冷冻处理水合过氧化氢酶晶体, 并对其进行电镜成像, 成功得到了晶体的电子衍射图^[37]. 这证明了冷冻可以有效抵抗电子束对样品的辐射损伤, 并且使含水物质表征符合高度真空的要求, 由此产生了冷冻电镜的雏形. 自此之后, 使用电镜观察冷冻水合样品结构的对比度逐渐增高. 然而, 随意冷冻会使让水分子形成六角形冰晶, 进一步导致不溶性分子的相分离, 并在膜上产生水胁迫和渗透压, 最终可能造成膜撕裂, 导致图像分辨率较低. 因此, 瑞士生物学家 Jacques Dubochet 和他的同事 Alasdair McDowall 在液氮冷冻的基础上引入了快速冷冻技术, 从而防止冰晶形成. 当冷却速率为 $10^6\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{s}^{-1}$ 甚至更快时^[38-40], 水分子无法将自己组织成结晶顺序就瞬间停止, 从而转化为非结晶凝固状态, 也就是所谓的玻璃体状态^[41]. 例如, 在超低温的条件下用比热远大于液氮的液态乙烷将样品快速冷冻固定在不定形的玻璃态冰层内, 既保证了样品高真空的要求, 又

避免样品因脱水而损伤, 使其成像无伪影, 且去除了背景信号的影响与电子束造成的辐射损伤, 从而获得更高的分辨率^[4,42-43].

同一时期, Joachim Frank 和 Marin Vanheul 发明并使用计算图像处理技术, 平均计算了样品成像的多个图像副本, 有效提高了图像的信噪比^[44-46], 这为冷冻电镜分辨率的进步奠定了基础.

2.2 冷冻电镜技术的分辨率发展

自冷冻电镜技术发明以来, 如何提高成像的分辨率一直是研究者所关注的重要问题. 随着探测器和图像合成技术的更新, 冷冻电镜的分辨率逐渐提高, 2017 年 10 月瑞典皇家科学院将诺贝尔化学奖颁发给 Jacques Dubochet、Joachim Frank 和 Richard Henderson 三位科学家, 以表彰他们在解析溶液中生物大分子高分辨结构中的突出贡献. 正是他们的工作拉开了冷冻电镜走向原子级分辨率时代的序幕.

20 世纪 90 年代, 英国分子生物学家 Henderson^[47] 发明了用于分析倾斜标本显微照片的方法, 他从 150 张衍射图谱中获得了细菌视紫红质素的结构图像, 该结构在平行于膜平面的方向上分辨率达到了 0.35 nm 但对于分子量较大的样品, 如核糖体, 其分辨率仅能达到 1.15 nm.

为了获得更高的分辨率, 需要提升样品图像数据采集的能力, 提高图像检测器的质量. 2010 年前, 人们多使用电荷耦合器 (CCD) 记录冷冻电镜图像, 但 CCD 检测效率并不高, 影响了电镜对于成像数据的采集, 从而影响了样品结构的分辨率. 为了获得质量更高的电镜图像, Agade 等发明了利用直接电子探测器 (DDD) 成像的 K2 相机, 将冷冻电镜技术推向更高的分辨率. 2013 年, 程亦凡等^[48]首次使用 DDD 检测出了分辨率为 0.33 nm 的膜蛋白结构, 已接近原子级分辨率. 2016 年, Bartesaghi 等^[49]成功拟合出了分辨率高达 0.28 nm 的乳酸脱氢酶结构和 0.18 nm 的谷氨酸脱氢酶结构, 使冷冻电镜突破了 0.2 nm 分辨率的瓶颈. 2020 年, 德国学者 Ka Man 团队和英国分子生物实验室团队为冷冻电镜配备了新的单色器、Falcon 3 直接电子探测器和电子源, 成功观测到了脱铁铁蛋白中的单个原子, 获得了分辨率高达 0.125 和 0.122 nm 的图像^[50-51], 创造了冷冻电镜分辨率的新记录, 自此冷冻电镜正式进入原子级分辨率时代.

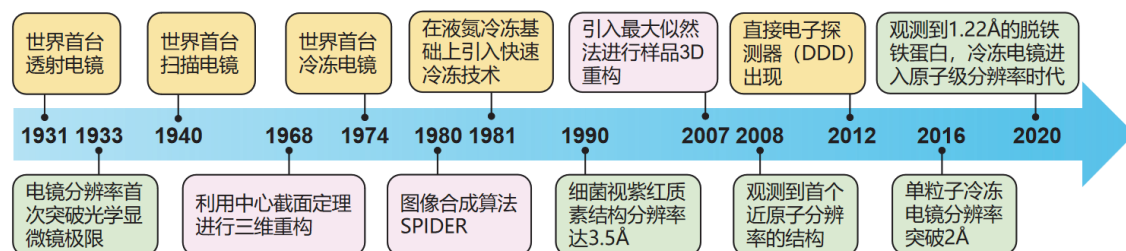


图 1 冷冻电镜发展史

Figure 1 Development history of Cryo-EM

3 冷冻电镜技术基础

3.1 冷冻电镜分类

根据电子信号和成像的区别, 冷冻电镜主要可以分为冷冻透射电子显微镜(冷冻透射电镜, Cryo-TEM)和冷冻扫描电子显微镜(冷冻扫描电镜, Cryo-SEM)两大类。

冷冻透射电镜通过冷冻样品降低电子束辐射的影响, 可以用来观察对温度较敏感的样品和胶体颗粒的内部结构(如多层囊泡的纳米颗粒), 也可以观察近原位状态下复杂流体的高分辨率图像, 且不会出现伪影^[52], 具有能穿透较厚的样品、光学性能好的特点。在此基础上衍生发展出了冷冻扫描透射电子显微镜(冷冻扫描透射电镜, Cryo-STEM), 与常规冷冻透射电镜的单一成像不同, 冷冻扫描透射电镜可通过环形探测器收集不同角度的散射信号, 来获得同一位置的多个图像, 从而丰富样品成像的信息。

冷冻扫描电镜在常规扫描电镜上增加超低温冷冻制样及传输设备, 通过玻璃化防止样品水分流失, 具有能在高真空状态下观察含水样品、分辨率高、制样简单快速等优点。与常规扫描电镜只能观察样品表面结构不同, 冷冻扫描电镜通过对样品冷冻、断裂、升华, 从而暴露其内部结构。如果电镜观察到的图像不理想, 还可以将样品转移回制样台进行重复断裂, 直至目标结构暴露。近些年, 在冷冻扫描电镜的基础上发展出了一项名为冷冻聚焦离子束扫描电子显微镜(Cryo-FIB-SEM)的新兴技术, 它在电镜扫描过程中引入由加速镓离子组成的离子束(FIB), 并将其聚焦到样品表面的特定位置, 通过镓离子的冲击导致样品表层原子的溅射, 达到样品的逐层铣削(图 2)^[53], 从而获得目标区域的切片^[54], 增加了对样品厚度、观测区域的选择性。

3.2 样品制备方法

微生物、生物大分子、有机聚合物等水合样品具有不耐电子辐射的特点。早期研究者采用干燥和负染色的方法处理样品, 即用高密度重金属盐(如乙酸铀酰)在样品颗粒周围形成外壳, 这种经过干燥、染色后的样品可以耐受电子束的辐射损伤和仪器内的真空环境, 但会破坏样品天然的构象^[55]。因此, 同时满足不破坏样品结构和减少辐射损伤成为研究者们对样品制备的要求。自 20 世纪 70 年代 Robert Glaeser 和 Ken Taylor 将样品冷冻处理, 使其在保留水分的情况下观察到衍射图像之后, 冷冻就成了水合样品制备的重要手段。图 3 展示了目前主流的冷冻透射电镜样品制备方法: 将样品液滴(约 2~5 μL)放在透射电镜电磁网格的穿孔碳膜上, 使其悬浮在支撑层孔内的冷冻溶剂层中, 用滤纸将孔内多余的水或溶剂去除后立即将网格放入冷冻剂内, 在低温条件下将样品中的水分迅速冷冻成无定形的玻璃态冰^[56-57], 随后送入电镜进行观察。

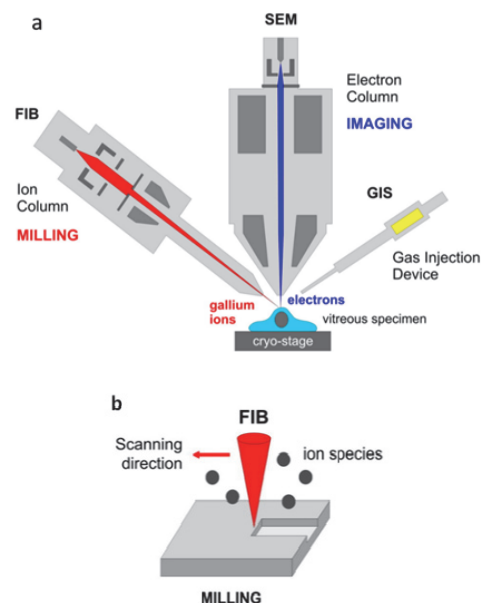


图 2 Cryo-FIB-SEM 工作原理^[53]. (a) 聚焦镓离子束铣削样品. (b) 镓离子与样品碰撞中的动能转移促使原子克服其表面结合能, 作为溅射物质被喷射出来

Figure 2 Operating principle of Cryo-FIB-SEM^[53]. (a) A focused gallium ion beam removes material from the sample. (b) Kinetic energy transfer during gallium ion and sample collisions causes surface atoms to overcome their surface binding energy and to become ejected as a sputtered species

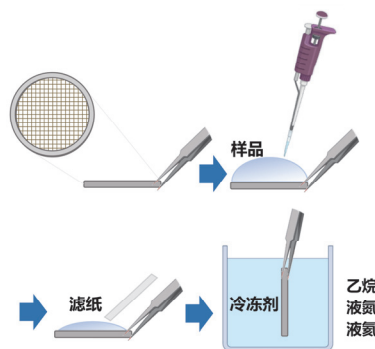


图 3 冷冻透射电镜样品制备方法示意图

Figure 3 Schematic illustration for Cryo-TEM sample preparation method

冷冻扫描电镜的样品制备方法如下: 将携带样品溶液的铆钉在液氮雪中冷冻 30 s, 然后将其放入冷冻制备腔室中进行样品的断裂、升华和金属镀膜, 一般镀层由厚度 5~10 nm 的 Pt、Pt/Pd 或 Au/Pb 超薄导电金属组成^[58]。在制样过程中, 使用双压裂操作器可以使冷冻后的样品断裂地更快速自然, 升华可以去除细胞间和细胞内的水, 使样品呈现微纳米结构和内部细节^[58-59], 而金属涂层可以提高样品导电性, 减少样品表面的静电放电现象, 还能减少样品所受的辐射损伤。值得注意的是, 如果在压裂过程中引入聚焦离子束, 则还可以额外获得一个垂直于裂缝表面的光滑横截面, 为冷冻扫描增加了第三个维度的图像, 从而为样品成像提供更详细的信息^[58]。当然, 如图 4 所示, 冷冻聚焦离子束扫描电镜也

可以不经冷冻压裂过程, 直接对样品进行铣削, 去除外层的样品, 获得目标区域的玻璃态薄片^[53].

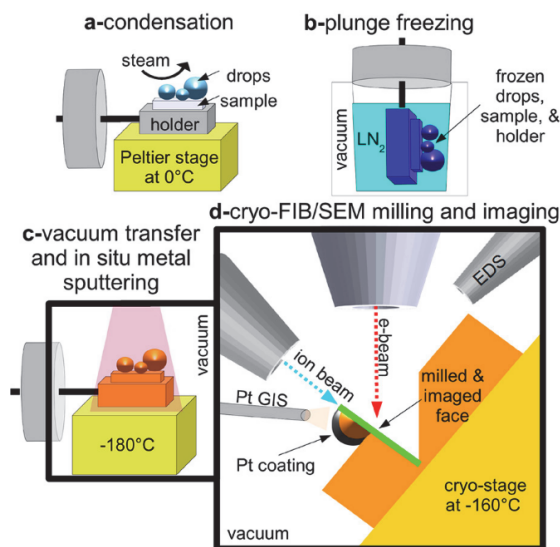


图4 冷冻聚焦离子束扫描电镜样品制作方法的分步示意图^[56]. (a)预冷样品上的水冷凝. (b)在液氮雪泥中快速冷冻. (c)真空转移和金属镀膜. (d)冷冻聚焦离子束扫描电镜铣削和成像

Figure 4 Step-by-step schematic of the Cryo-FIB-SEM method^[56]. (a) Water condensation on precooled sample. (b) Rapid plunge freezing in liquid nitrogen slush. (c) Vacuum transfer and metal coating. (d) Cryo-FIB-SEM milling and imaging

在制样的过程中, 电磁网格和冷冻剂的选择对于获得更加接近原始状态和更高分辨率的图像有重要影响. 一般电磁网格是由铜、金、镍等金属材料制成, 其中最常用的是铜网格, 但如果用来观测细胞结构, 则多选用金做载体, 可避免网格对细胞的毒性^[60]. 目前常用的冷冻剂包括液氮、液氦、乙烷等^[61]. 当然, 样品所处溶液环境对冷冻剂的选择也很重要. 当样品处在水溶液中时, 通常使用液态乙烷作为制冷剂. 而当样品处在有机溶剂中时(如在有机溶剂中合成或自组装的聚合物纳米颗粒)^[62-63], 为防止这些非极性溶剂溶于乙烷, 多选择液氮做制冷剂^[64]. 考虑到冷冻透射电镜的工作温度通常在 -170°C 左右, 而液氮的冰点和沸点温度接近, 在冷冻过程中会减缓样品中水分玻璃化速度, 因此常使用由液氮冷却的液态乙烷作为冷冻透射电镜的冷冻剂, 可实现样品的快速冷冻^[52]. 冷冻扫描电镜使用的则是过冷的液氮, 可以有效防止样品产生莱顿弗罗斯特效应, 即在温暖的液滴表面和冰冷的冷冻剂间形成气膜^[58]. 与环境温度相比, 在冷冻条件下使用电镜可使样品受到的辐射损伤降低6倍以上^[4].

4 三维重构技术

三维重构技术的发展和打碎了从平面到空间的壁垒, 实现了维度的跨越. 在结合三维重构技术后, 冷冻电镜实现了生物大分子、有机聚合物等含水样品的

空间结构表征. 三维重构技术以傅里叶变换和中心截面定理为基础, 通过对样品从不同方向所拍摄到的多个电镜图像做傅里叶变换, 得到一组二维图像集合, 以此构成傅里叶空间, 再对该空间做逆傅里叶变换即可得到样品的三维结构. 基于此原理, 三维重构技术细分为3类方法, 分别为电子晶体学(electron crystallography)方法、单颗粒分析(single particle analysis, SPA)方法以及电子断层扫描(electron tomography, ET)方法.

4.1 电子晶体学方法

电子晶体学方法通过电镜对样品在不同维度形成的有序排列结构成像, 或收集衍射图像, 结合从图像的傅里叶变换计算获得的相位和从衍射获得的振幅^[65], 进而分析这些样品的结构, 但是该方法只适用于结构有序的晶体样品, 因此难以广泛推行.

4.2 单颗粒分析方法

单颗粒分析不是通过晶体的衍射来确定结构, 而是利用计算机识别, 把数千个静态2D粒子投影收集起来, 确定其空间方向和位置, 将具有相同或相似构象的大分子图像组合, 进而拟合成更加清晰的二维图像, 在此基础上进行三维成像. 为了减少电子束辐射的影响, 提高结构分辨率, 单颗粒冷冻电镜对每个分子进行成像的电子剂量都很低, 这种低剂量成像导致单个投影图像信噪比非常差, 因此必须收集多个相同或相似的图像进行平均, 从而改善信噪比^[66-67]. 但是, 这种方法需要同时估计分子的典型结构、由于运动或解离等原因导致的结构变化以及每个粒子图像中分子的状态, 2D投影方向参数容易与异构图像集合混杂在一起无法区分, 因此单颗粒分析需要解决构象或者成分异质性的问题^[68].

面对这个问题, Sigworth^[69]引入了最大似然法进行分类和细化. 在此方法中, 电镜拍摄到的图像不是根据相似性标准分配给单个方向, 而是有概率被分配给处于任何方向的组^[70], 也就是说一个粒子图像可能会被分为不同的类, 每一类都可以进行细化. 在这种分类细化的过程中, 可以分离所研究分子的不同构象, 也可以将完整的颗粒或复合物与不完整或在玻璃化过程中受损的颗粒或复合物分离^[71-72].

4.3 电子断层扫描法

冷冻电子断层扫描则是对同一样品在不同倾斜角度下进行拍摄(理想情况下在 $\pm 60^{\circ}$ 之间), 从而获得样品在多个方向上的2D投影, 对于厚度较大样品(如组织或者是细胞沉淀)的成像, 通常需要借助成像滤光片来收集投影图像^[61], 然后通过反向投影对其进行3D重构^[73]. 这种方法不仅可以确定细胞中单个生物分子的位置和相互作用, 还可以获得原位高分辨率结构^[74]. 但是, 冷冻电子断层扫描会使样品多次暴露于电子束, 极易受到辐射损伤^[75-76], 因此需要每次暴露的电子剂量都保持在最小值从而降低损伤的风险^[77]. 直接电子探

测器的出现克服了这一缺点,它通过提高电子探测器的调制传递函数和分辨率相关探测量子效率,从而降低样品所受的总电子剂量^[78-79],有效地保护了样品的原始结构。

冷冻电子断层扫描不仅可以在分子水平上分析蛋白质及其复合物的 3D 结构,还能可视化亚细胞细节。近年来,冷冻电子断层扫描技术填补了细胞生物学的空白,使人们能够观察到线粒体、核糖体、内质网等超微结构以及不对称的病毒结构^[80]。与单颗粒分析技术相比,尽管电子断层扫描成像分辨率不如 SPA,但非常适合在纳米尺度上研究结构异质体的三维结构。

5 冷冻电镜在环境领域的研究应用

水作为环境中重要组成部分,在大气、水体、土壤等介质中广泛存在,因此这些环境介质中的微观粒子例如生物膜、气溶胶、活性污泥等大多都是含水的。冷冻电镜具有保留水合样品天然微观特征的优良特性,近年来逐渐被应用于环境样品的研究中。

5.1 冷冻电镜在大气科学研究中的应用

作为阳光穿透大气层时遇到的第一个固体物质,卷云的微观结构影响着光粒子的散射^[81]。由于小冰晶组成的卷云颗粒难以接近,从远处捕获的图像分辨率一直较低。冷冻气球封装与冷冻扫描电镜的结合有效解决了这一问题。研究者们根据拍摄到的电镜图像发现,在空气质量较好时,大多数冰粒表面没有气溶胶粒子,而在空气质量较差情况下拍摄到的冰粒表面基本都粘附着许多矿物或者是污染物气溶胶,如矿物粉尘、烟灰和粉煤灰等,有时也会附着生物气溶胶颗粒^[82]。

大量研究表明,生物气溶胶是病毒传播的重要途径^[83-86],吸入这些气溶胶颗粒会对人体健康造成不良的影响^[87-88],严重的甚至会导致死亡。大气作为环境中移动最快的流体,气溶胶颗粒一进入空气,就会迅速传播并长时间停留^[89]。为了保障公共卫生安全,保护人体生命健康,研究在空气中传播的病毒结构以及其感染宿主的方式,对抑制病毒大流行至关重要。以 2019 年爆发的新型冠状病毒(SARS-CoV-2)为例,研究表明,冠状病毒进入宿主细胞是由跨膜糖基化刺突(S)糖蛋白介导的^[90],该糖蛋白形成从病毒表面突出的同源三聚体,在病毒感染期间,三聚体 S 蛋白被裂解成 S1 和 S2 亚基。其中 S1 包含的受体结合域(RBD)直接与宿主的 ACE2 肽酶结构域(PD)结合^[91],而 S2 负责膜融合^[92],这一过程对病毒感染至关重要。考虑到蛋白质脱水会产生变性的问题,因此常规电镜不适合对冠状病毒与宿主细胞间的作用关系进行表征。Xu 等^[93]通过冷冻电镜技术重建了 ACE2 诱导 SARS-CoV-2 S 三聚体构象转变过程,如图 5 所示,未配体的 SARS-CoV-2 三聚体处于紧密闭合状态,所有 RBD 结构域都被掩埋,而当受体出现时,ACE2 结合 S1 亚基而引起实质性的构象变化,导致病毒进入宿主细

胞,这加深了人们对于 SARS-CoV-2 感染的理解。除了可以观察大气中的噬菌体颗粒,冷冻电镜技术还能清晰地拍摄花粉颗粒的成熟与释放机制^[94-95]以及昆虫对其的粘附与传递^[96]。这无疑再次证明了冷冻电镜在观测大气中气溶胶的传递与相互作用时的强大能力,为可视化空气中其他的污染物颗粒提供了可靠的方法。

近年来,工业化进程加速与化石燃料过度使用导致温室气体排放不断增加,造成全球气候变暖,据联合国最新报告数据显示,目前地球平均气温已经比工业化前高出 1.1 °C,其中有 0.3 °C 来自于甲烷。尽管大气中甲烷浓度远低于二氧化碳,但其温室效应是二氧化碳的数十倍,因此减少大气中的甲烷含量迫在眉睫。研究发现,将甲烷转化为甲醇可能是一种有效的方法。在自然界中,甲烷营养细菌中的颗粒甲烷单加氧酶(pMMO)可以在室温下有效地将甲烷转化为甲醇^[97-99]。Chang 等^[100]所拍摄的 pMMO 冷冻电镜图像展示了其三个亚基(PmoA, PmoB 和 PmoC)以及不同位点的位置分布(图 6a)。其中螯合了一个铜簇的 D 点(图 6b)位于跨膜结构域内 PmoA 和 PmoC 两个亚基之间,这是酶活性位点所在的地方。该铜簇在被 O₂ 激活时生成高反应性单线态氧杂质双自由基,通过与甲烷的 C—H 键结合产生甲醇(图 6c),该发现为削减大气中温室气体浓度提供了新思路。

5.2 冷冻电镜在水化学研究中的应用

工程纳米材料在其整个生命周期中会在土壤、水和生物组织等环境介质中不断地迁移、转化、积累^[101],从而影响到水体中微生物的生命活动^[102]。以环境修复中广泛应用的纳米零价铁(nZVI)与水体中常见的蓝藻细胞间的相互作用为例,将含有蓝藻的污泥与 nZVI 混合反应 30 min,通过对比常规扫描电镜与冷冻扫描电镜的成像图片可以发现,常规 SEM 的干燥过程会导致蓝藻细胞结构脱水崩溃,呈现出干瘪的形态(图 7a),而经过液氮快速冷冻的细胞表面则饱满光滑(图 7b~7c),表明了冷冻电镜对含水颗粒优秀的表征能力。并且通过观察图 7c 可以发现,nZVI 附着的蓝藻细胞表面出现明显的皱缩(蓝框),而没有附着 nZVI 的细胞表面平整光滑(红框),且可以清晰地观察到蓝藻细胞间存在丝状连接,表明加入 nZVI 虽然破坏了部分蓝藻的细胞结构,但并未影响到胞间连丝作用,这加深了我们对于工程微纳米颗粒与环境微生物间相互作用的理解。

此外,纳米粒子与液体环境中的细菌之间也会产生相互作用。Loza 等通过冷冻电镜拍摄到了革兰氏阳性表皮链球菌和革兰氏阴性大肠杆菌与周围金纳米棒(NRs)间作用的明显差异,如图 8 所示,NRs 紧密包裹在表皮链球菌的周围(图 8a~8c),而在大肠杆菌膜表面并未显示出特异性的粘附(图 8d~8f)。这种包裹是由于 NRs 表面正电荷与细菌膜上的负电荷相互作用,与大肠杆菌相比,表皮链球菌所带的负电荷更多、表面积更小,因此与 NRs 所产生的静电作用更强烈,从而能够更好地

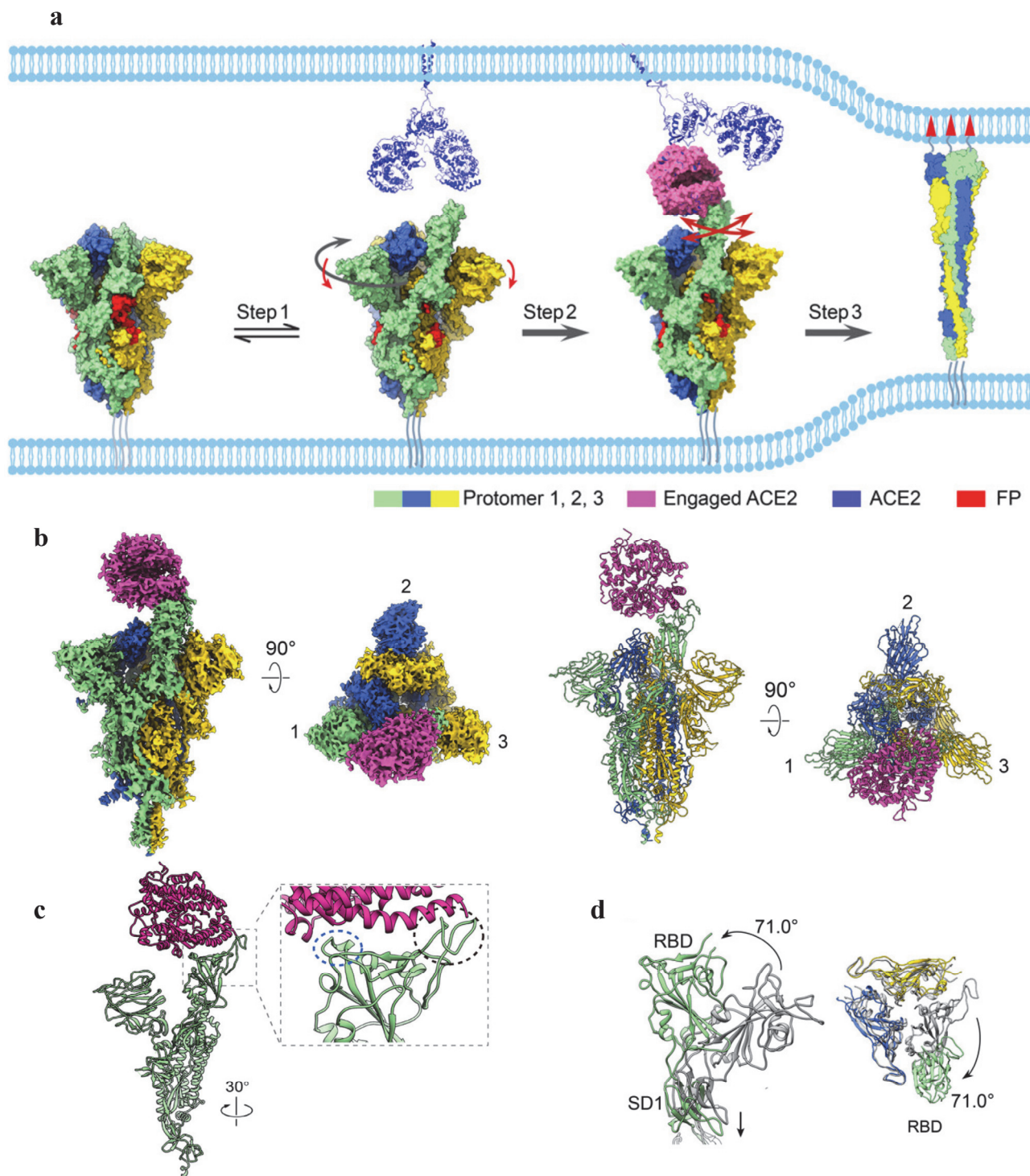


图5 新冠病毒S糖蛋白的冷冻电镜图^[93]. (a) ACE2诱导SARS-CoV-2 S三聚体构象转变的机制. 从闭合的预融合状态到瞬时打开状态(步骤1)的构象过渡, 具有与S1向下运动(红色箭头)相关的解扭曲运动(深灰色箭头突出显示), 从打开状态到动态ACE2接合状态(步骤2), 然后一直到重新折叠的融合后状态(步骤3). ACE2-RBD在S三聚体内的连续摆动运动用红色箭头表示. (b) SARS-CoV-2 S-ACE2复合体的冷冻电镜图. (c)来自S-ACE2结构的ACE2(紫红色)结合S1(浅绿色)的整体视图, 以及ACE2和RBD之间相互作用界面的放大视图. (d) RBD向上/向外旋转71.0°, 与原S1中SD1的向下移动有关

Figure 5 Cryo-EM map of SARS-CoV-2 S^[93]. (a) The proposed mechanism of ACE2-induced conformational transitions of SARS-CoV-2 S trimer. Conformational transitions from the closed ground prefusion state (with packed FP, in red) to the transiently open state (step 1) with an untwisting motion (highlighted in dark gray arrow) associated with a downward movement of S1 (red arrow), from the open state to the dynamic ACE2 engaged state (step 2), and then all the way to the refolded postfusion state (step 3). The continuous swing motions of ACE2-RBD within S trimer are indicated by red arrows. (b) Cryo-EM map of SARS-CoV-2 S-ACE2 complex. (c) The overall view of ACE2 (violet red) bound S1 (light green) from S-ACE2 structure, and zoom-in view of the interaction interface between ACE2 and RBD. (d) There is a 71.0° upward/outward rotation of RBD associated with a downward shift of SD1 in S1

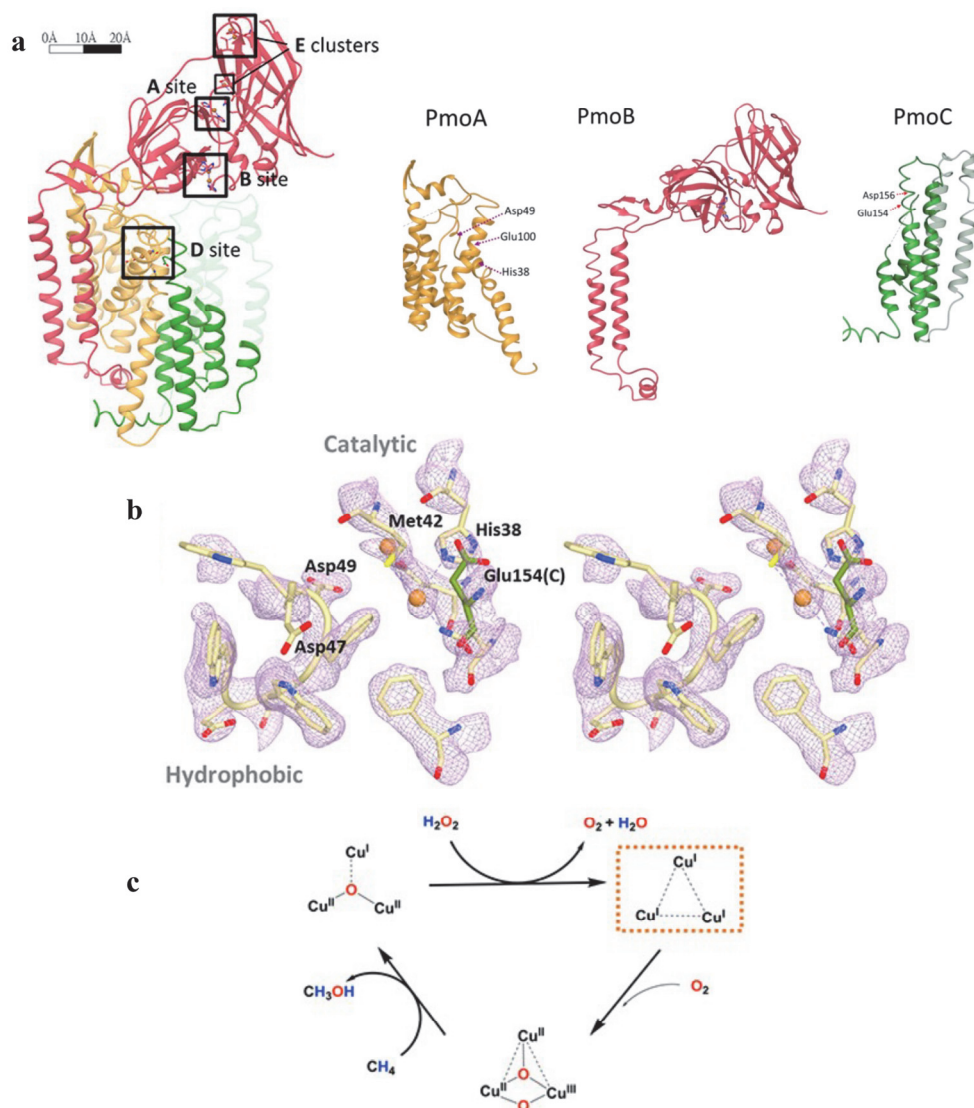


图6 颗粒甲烷单加氧酶的冷冻电镜图^[100]. (a) pMMO原型的原子模型, 其中PmoA, PmoB和PmoC分别用金色, 红色和绿色表示. 突出显示了A、B和D点以及E群集的位置. (b) D点的冷冻电镜图谱特写视图: 该位点由PmoA His38, Met42, Asp47, Asp49, Glu100(在此视图中未显示)和PmoC Glu154组成, 表示为Glu154(C). 这些残基主要是亲水的, 形成了催化中心. (c)为D点提出的甲烷氧化化学方案

Figure 6 Cryo-EM map of pMMO^[100]. (a) Atomic model of the pMMO protomer, where PmoA, PmoB, and PmoC are depicted by ribbons in gold, red, and green, respectively. The A, B, and D sites and the location of the E clusters are highlighted. (b) Close-up view of the Cryo-EM map at the D site in stereopair: This site is composed of PmoA His38, Met42, Asp47, Asp49, Glu100 (not shown in this view), and of PmoC Glu154, denoted as Glu154(C). These residues, largely hydrophilic, form the proposed catalytic center. (c) Chemistry scheme of methane oxidation proposed for the D site

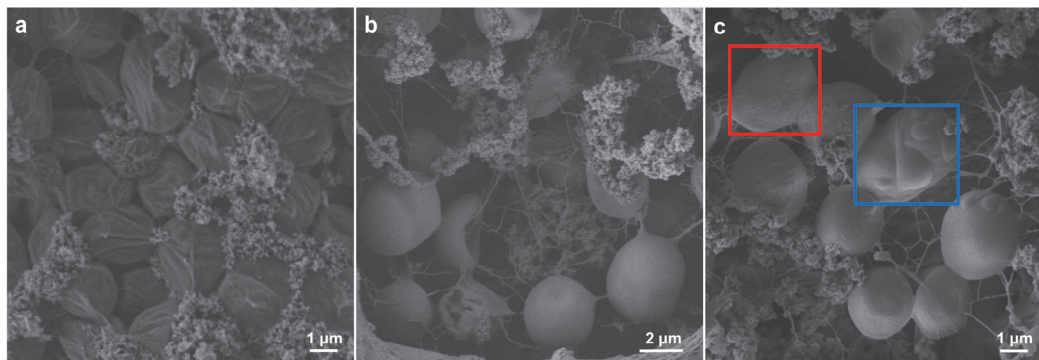


图7 纳米零价铁与含蓝藻的污泥相互作用的扫描电镜图片. (a)常规扫描电镜照片. (b~c)冷冻扫描电镜照片(Gong和Zhang未发表的图片)

Figure 7 The SEM of nZVI-treated cyanobacteria-containing sludge. (a) Traditional SEM micrograph. (b~c) Cryo-SEM micrograph (Gong and Zhang, unpublished results)

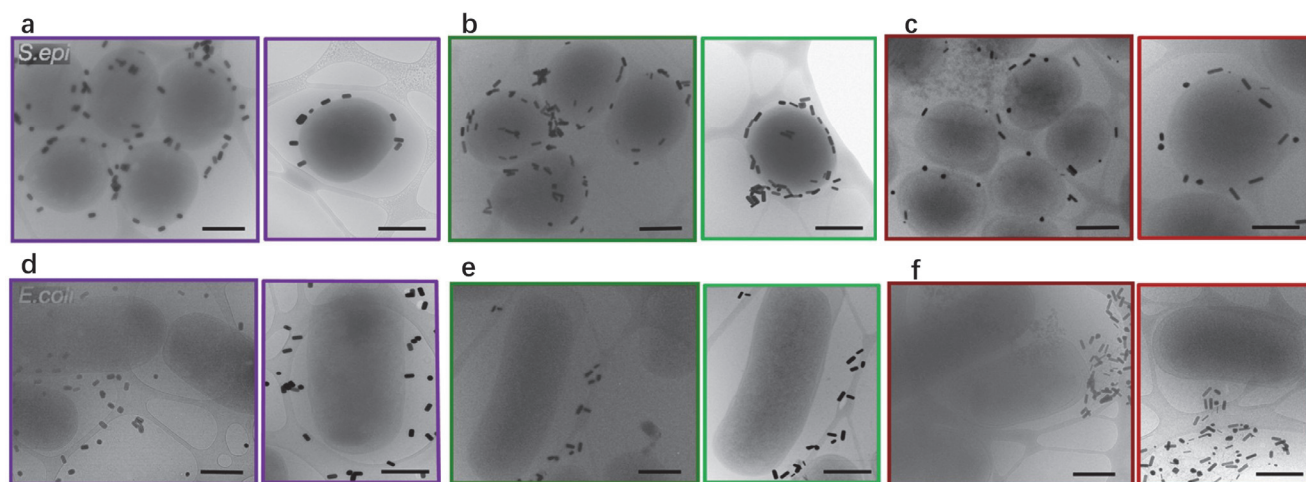


图 8 细菌细胞与金纳米棒之间的相互作用^[103]. (a~c)表皮链球菌与金纳米棒混合的冷冻电镜图: (a) 670 nm, 紫色. (b) 717 nm, 绿色. (c) 860 nm, 红色. (d~f)大肠杆菌与金纳米棒混合的冷冻电镜图: (d) 670 nm, 紫色. (e) 717 nm, 绿色. (f) 860 nm, 红色. 与大肠杆菌细胞表面相比, 纳米颗粒与表皮链球菌细胞表面紧密结合, 因为前者具有更高的负表面电荷. 比例尺表示 500 nm

Figure 8 Interaction between bacterial cells and gold nanorods^[103]. (a~c) Cryo-EM images of *S. epidermidis* mixed with NRs: (a) 670 nm, purple. (b) 717 nm, green. (c) 860 nm, red. (d~f) Cryo-EM images of *E. coli* mixed with NRs: (d) 670 nm, purple. (e) 717 nm, green. (f) 860 nm, red, respectively. The nanoparticles show tight binding to *S. epidermidis* cell surface compared to *E. coli* cell surfaces, as the former has a higher negative surface charge. Scale bar indicates 500 nm

吸引金纳米棒, 表现出更高的表面增强拉曼光谱信号^[103], 这为液体环境中的细菌鉴定与药物测试提供了新方法.

除了能够观察到工程纳米颗粒与环境微生物间的相互作用, 冷冻电镜技术还能观测海洋溢油的降解^[104]. 相比于会对海洋生物造成毒性的化学分散剂, 直接利用海洋微生物降解油层是一种更绿色高效的方法^[105-107]. 研究者们利用冷冻扫描电镜实现了海洋微生物膜以及油水界面膜形态可视化. 将海洋中可降解脂肪烃的 *A. borkumensis* 细菌培养后植入用阿纳达科原油改性过的 ONR7a 培养基(一种模拟海水组成的培养基), 3~4 d 后油水界面出现生物膜. 冷冻扫描电镜可以清晰地观察到 *A. borkumensis* 细菌细胞被外聚物纤维包裹并形成的生物膜. 在油水界面上, 细菌细胞附着在暴露的油层表面, 并使原油破裂成小液滴, 形成稳定的皮克林乳液^[108]. 这些结果表明生物膜可以将浮在海面上的油层分散到直径只有几十微米的稳定液滴中^[26], 有效地解决海洋溢油问题.

5.3 冷冻电镜在土壤和固废研究方面的应用

土壤重金属污染一直是人们亟待解决的环境问题之一^[109], 冷冻电镜被证明可以用于在原始状态下观察土壤中微生物对重金属污染的修复. Ahmad 等^[110]从银矿区收集土壤样品, 分离出的抗银细菌 SMP1 对银有明显吸附作用, 并通过该细菌自身的代谢能力, 将土壤中的银离子转化为球形的银纳米颗粒(AgNPs)(图 9), 从而修复和回收土壤中的贵金属银.

除了微生物外, 土壤中还含有许多可以用来提升土壤肥力的大分子有机物, 如腐殖酸. 与用常规扫描电镜观察相比, 冷冻电镜可以更好地在含水状态下观察腐殖

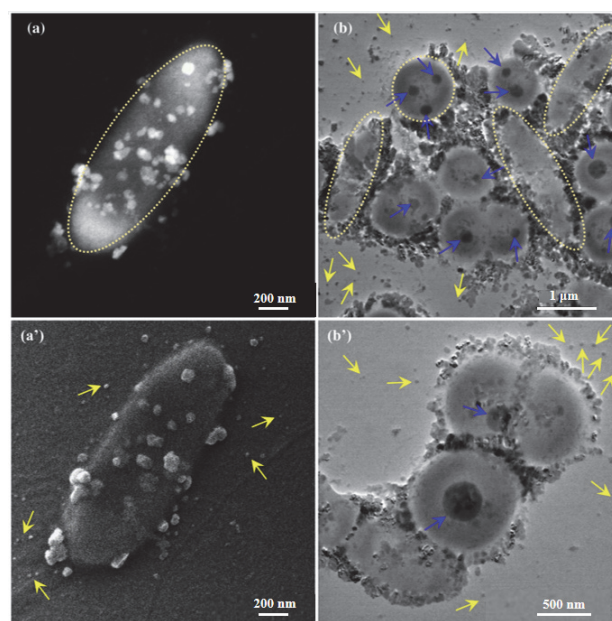


图 9 银纳米颗粒吸附和合成的冷冻扫描透射电子显微照片^[110]. (a, a') 表面吸附银的成熟细菌细胞的暗场和明场扫描图像. (b, b') 银纳米颗粒的吸附和合成. 蓝色箭头表示细胞内的银纳米颗粒, 黄色箭头表示细胞外的银纳米颗粒

Figure 9 Cryo-scanning transmission electron micrographs showing the adsorption and synthesis of AgNPs^[110]. (a, a') dark field and bright field scanning images of mature bacterial cells with silver adsorbed on the surface. (b, b') Adsorption and synthesis of AgNPs. Intracellular AgNPs and extracellular AgNPs are highlighted with blue arrows and yellow arrows

酸海绵状的颗粒网结构, 而常规电镜因对样品脱水干燥导致其结构断裂, 会形成各种形状和尺寸的颗粒, 改变样品的同质性^[111].

对于污水处理过程产生的污泥来说, 利用冷冻扫描

电镜可以从表面形态和内部结构中发现颗粒污泥和絮状污泥存在明显差异。污泥絮凝体由一系列不同大小的簇组成,大小一般在 10~50 μm ,表面和内部都分布着许多孔隙,具有开放的多孔网络结构(图 10a~10b),而颗粒状污泥内部则是由许多丝状结构紧密排列,没有明显的孔隙结构(图 10c~10d)^[30]。

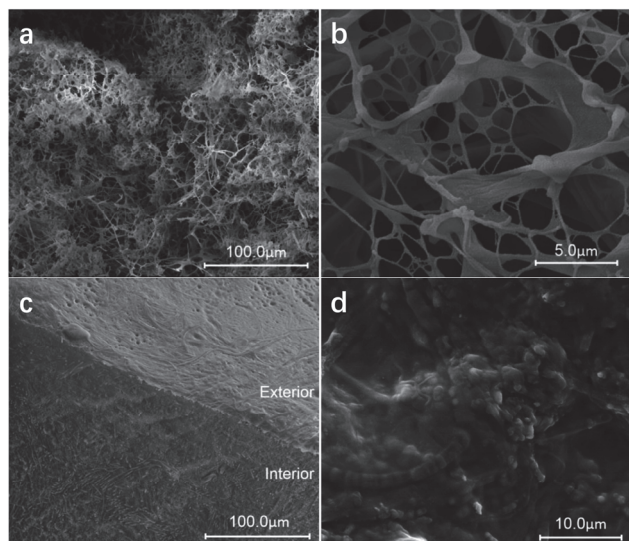


图 10 污泥样品内部的冷冻扫描电镜图像^[30]。(a, b)絮状污泥样品内部。(c, d)颗粒状污泥样品内部

Figure 10 Cryo-SEM images of sludge^[30]. (a, b) The interior of a flocular sludge sample. (c, d) The interior of a granular sludge sample

6 总结与展望

冷冻电镜技术自 1974 年首次应用以来,经过近 50 年的发展,已经成为表征样品结构的重要手段。它克服了常规电镜不能观察含水样品的缺点,通过将待测样品在低温下快速冷冻,使液态水转化为无定形玻璃态冰,既满足了样品高真空度的要求,又减少电子束对样品造成的辐射损伤,从而可以高分辨地展现样品最原始状态下的三维结构,为探索含水离子大分子的微观结构提供了机会。基于这种完美保存水合样品天然结构的特点,我们重点介绍冷冻电镜在环境领域观测含水粒子的实例,例如使用冷冻电镜探索大气中生物气溶胶颗粒的结构、水体中工程微纳米颗粒与微生物间的相互作用以及污泥絮体中的孔隙结构,这为人们研究环境微纳米颗粒间的相互作用提供了最直观的证据。

但冷冻电镜技术仍存在一些不足。首先,冷冻电镜的分辨率还有待提高,尽管目前已知结构的分辨率最高已经达到 0.122 nm,但其他大多数结构仍保持在 0.3~1.0 nm 的水平。其次,冷冻电镜数据收集和处理较慢,在 X 射线衍射法中,收集数据只需要花费几分钟时间,而冷冻电镜的数据收集则需要耗费数小时,效率较低,因此需要对样品制备工具、成像检测器等硬件进行进一步的优化,同时加强计算机对于有效数据的采集与处理

能力,开发新的算法。现今,人工智能的出现有望促进数据收集与处理的进步,并最大限度地提高数据质量,使更多样品结构可以达到原子级分辨率。最后,目前鲜有环境研究实验室配备冷冻电镜,其在环境领域的应用十分有限。我们期待将其在环境研究中大范围推广,拓宽并加深对环境微观粒子间相互作用的认知,例如:(1)应用冷冻电镜对水处理过程中混凝剂、消毒剂等化学试剂与天然有机物、生物大分子等污染物之间的作用关系进行可视化,(2)研究活性污泥作用过程中组分及生物群落的变化,建立微塑料、阻燃剂等新型污染物的降解、迁移和转化机制,改进水处理手段,促进新技术的发展,(3)探索在添加调理剂前后污泥中结合水向游离水转化的过程,从而达到更好的污泥脱水性,为环境化学和环境微生物学带来新突破。

作者简介



杨宇洁, 同济大学环境科学与工程学院 2021 级硕士生, 研究方向为纳米零价铁环境应用。



巩宇锈, 同济大学环境科学与工程学院 2017 级博士, 研究方向为纳米零价铁修复重金属污染土壤。



顾天航, 同济大学环境科学与工程学院 2018 级博士生, 研究方向为纳米零价铁富集水中稀有元素, 已发表 SCI 论文 10 余篇。



张伟贤, 教授、博士生导师, 国家特聘专家, 2011年起任污染控制与资源化研究国家重点实验室主任。1984年毕业于同济大学, 1996年获美国约翰·霍普金斯大学(The Johns Hopkins University)环境工程博士学位, 曾任美国里海大学(Lehigh University)教授。主持过国家自然科学基金海外及港澳学者合作研究基金及多项国家自然科学基金项目。长期致力于环境中重金属及持久性有机污染物的基础与应用研究, 是环境纳米技术的先驱之一, 纳米零价铁技术的创始研究者。在纳米零价铁合成、表征、污染物反应机理、应用于地下水修复及废水处理方面发表了系列经典论文。

References

- [1] Ball, P. *Chem. Rev.* **2008**, *108*, 74.
- [2] Ball, P. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2017**, *114*, 13327.
- [3] Yao, H. P.; Song, Y. T.; Chen, Y.; Wu, N. P.; Xu, J. L.; Sun, C. J.; Zhang, J. X.; Weng, T. H.; Zhang, Z. Y.; Wu, Z. G.; Cheng, L. F.; Shi, D. R.; Lu, X. Y.; Lei, J. L.; Crispin, M.; Shi, Y. G.; Li, L. J.; Li, S. *Cell* **2020**, *183*, 730.
- [4] Adrian, M.; Dubochet, J.; Lepault, J.; McDowell, A. W. *Nature* **1984**, *308*, 32.
- [5] Mendonca, L.; Howe, A.; Gilchrist, J. B.; Sheng, Y. W.; Sun, D. P.; Knight, M. L.; Zanetti-Domingues, L. C.; Bateman, B.; Krebs, A. S.; Chen, L.; Radecke, J.; Li, V. V. D.; Ni, T.; Kounatidis, I.; Koronfel, M. A.; Szykiewicz, M.; Harkiolaki, M.; Martin-Fernandez, M. L.; James, W.; Zhang, P. *J. Nat. Commun.* **2021**, *12*, 4629.
- [6] Fernandez-Leiro, R.; Scheres, S. H. *Nature* **2016**, *537*, 339.
- [7] Fitzpatrick, A. W. P.; Falcon, B.; He, S.; Murzin, A. G.; Murshudov, G.; Garringer, H. J.; Crowther, R. A.; Ghetti, B.; Goedert, M.; Scheres, S. H. W. *Nature* **2017**, *547*, 185.
- [8] Shi, Y.; Murzin, A. G.; Falcon, B.; Epstein, A.; Machin, J.; Tempest, P.; Newell, K. L.; Vidal, R.; Garringer, H. J.; Sahara, N.; Higuchi, M.; Ghetti, B.; Jang, M. K.; Scheres, S. H. W.; Goedert, M. *Acta Neuropathol.* **2021**, *141*, 697.
- [9] Falcon, B.; Zhang, W. J.; Murzin, A. G.; Murshudov, G.; Garringer, H. J.; Vidal, R.; Crowther, R. A.; Ghetti, B.; Scheres, S. H. W.; Goedert, M. *Nature* **2018**, *561*, 137.
- [10] Falcon, B.; Zivanov, J.; Zhang, W. J.; Murzin, A. G.; Garringer, H. J.; Vidal, R.; Crowther, R. A.; Newell, K. L.; Ghetti, B.; Goedert, M.; Scheres, S. H. W. *Nature* **2019**, *568*, 420.
- [11] Zhang, W. J.; Tarutani, A.; Newell, K. L.; Murzin, A. G.; Matsubara, T.; Falcon, B.; Vidal, R.; Noack, J.; Farhat, N.; Czudnochowski, N.; Havenar-Daughton, C.; Sprouse, K. R.; Dillen, J. R.; Powell, A. E.; Chen, A.; Maher, C.; Yin, L.; Sun, D.; Soriaga, L.; Bassi, J.; Silacci-Fregni, C.; Gustafsson, C.; Franko, N. M.; Logue, J.; Iqbal, N. T.; Mazzitelli, L.; Geffner, J.; Grifantini, R.; Chu, H.; Gori, A.; Riva, A.; Giannini, O.; Ceschi, A.; Ferrari, P.; Cippa, P. E.; Franzetti-Pellanda, A.; Garzoni, C.; Halfmann, P. J.; Kawaoka, Y.; Hebner, C.; Purcell, L. A.; Piccoli, L.; Pizzuto, M. S.; Walls, A. C.; Diamond, M. S.; Telenti, A.; Virgin, H. W.; Lanzavecchia, A.; Snell, G.; Vesler, D.; Corti, D. *Nature* **2022**, *602*, 664.
- [14] Li, Y. Z.; Huang, W.; Li, Y. B.; Pei, A.; Boyle, D. T.; Cui, Y. *Joule* **2018**, *2*, 2167.
- [15] Cheng, D. Y.; Wynn, T. A.; Wang, X. F.; Wang, S.; Zhang, M. H.; Shimizu, R.; Bai, S.; Nguyen, H.; Fang, C. C.; Kim, M. C.; Li, W. K.; Lu, B. Y.; Kim, S. J.; Meng, Y. S. *Joule* **2020**, *4*, 2484.
- [16] Liu, Y. J.; Ju, Z. J.; Zhang, B. L.; Wang, Y.; Nai, J. W.; Liu, T. F.; Tao, X. Y. *Acc. Chem. Res.* **2021**, *54*, 2088.
- [17] Li, Y. Z.; Wang, K. C.; Zhou, W. J.; Li, Y. B.; Vila, R.; Huang, W.; Wang, H. X.; Chen, G. X.; Wu, G. H.; Tsao, Y. C.; Wang, H. S.; Sinclair, R.; Chiu, W.; Cui, Y. *Matter* **2019**, *1*, 428.
- [18] Wang, F. B.; Gnewou, O.; Solemanifar, A.; Conticello, V. P.; Egelman, E. H. *Chem. Rev.* **2022**, *122*, 14055.
- [19] Schrinner, M.; Polzer, F.; Mei, Y.; Lu, Y.; Haupt, B.; Ballauff, M.; Goldel, A.; Drechsler, M.; Preussner, J.; Glatzel, U. *Macromol. Chem. Phys.* **2007**, *208*, 1542.
- [20] Lu, Y.; Mei, Y.; Schrinner, M.; Ballauff, M.; Moller, M. W. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 7676.
- [21] Bayfield, O. W.; Klimuk, E.; Winkler, D. C.; Hesketh, E. L.; Chechik, M.; Cheng, N. Q.; Dykeman, E. C.; Minakhin, L.; Ranson, N. A.; Severinov, K.; Steven, A. C.; Antson, A. A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2019**, *116*, 3556.
- [22] Hilhorst, J.; Meester, V.; Groeneveld, E.; Dhont, J. K. G.; Lekkerkerker, H. N. W. *J. Phys. Chem. B* **2014**, *118*, 11816.
- [23] Li, W. J.; Teng, X. M.; Chen, X. Y.; Liu, L.; Xu, L.; Zhang, J.; Wang, Y. Y.; Zhang, Y.; Shi, Z. B. *Environ. Sci. Technol.* **2021**, *55*, 16639.
- [24] Dai, X. H.; Li, Z. H.; Lai, M.; Shu, S.; Du, Y. S.; Zhou, Z. H.; Sun, R. *Nature* **2017**, *541*, 112.
- [25] Mikula, R. J.; Munoz, V. A. *Colloids Surf. A* **2000**, *174*, 23.
- [26] Omarova, M.; Swientoniewski, L. T.; Tseng, I. K. M.; Blake, D. A.; John, V.; McCormick, A.; Bothun, G. D.; Raghavan, S. R.; Bose, A. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2019**, *7*, 14490.
- [27] Luo, H.; Scriven, L. E.; Francis, L. F. *J. Colloid Interface Sci.* **2007**, *316*, 500.
- [28] Aston, R.; Sewell, K.; Klein, T.; Lawrie, G.; Grondahl, L. *Eur. Polym. J.* **2016**, *82*, 1.
- [29] Liu, N.; Gong, Y. X.; Peng, X. X.; Li, S. L.; Zhang, W. X. *J. Hazard. Mater.* **2022**, *432*, 128683.
- [30] Krysiak-Baltyn, K.; Cavalida, R.; Thwaites, B.; Reeve, P. J.; Scales, P. J.; Van den Akker, B.; Ong, L.; Martin, G. J. O.; Stickland, A. D.; Gras, S. L. *J. Water Process Eng.* **2019**, *29*, 100785.
- [31] Schertel, A.; Snaidero, N.; Han, H. M.; Ruhwedel, T.; Laue, M.; Grabenbauer, M.; Mobius, W. *J. Struct. Biol.* **2013**, *184*, 355.
- [32] Lubelli, B.; de Winter, D. A. M.; Post, J. A.; van Hees, R. P. J.; Drury, M. R. *Appl. Clay Sci.* **2013**, *80*, 358.
- [33] Houben, L.; Weissman, H.; Wolf, S. G.; Rybitchinski, B. *Nature* **2020**, *579*, 540.
- [34] Zachman, M. J.; Tu, Z. Y.; Choudhury, S.; Archer, L. A.; Kourkoutis, L. F. *Nature* **2018**, *560*, 345.
- [35] Xu, B. J.; Liu, L. *Protein Sci.* **2020**, *29*, 872.
- [36] De Rosier, D. J.; Klug, A. *Nature* **1968**, *217*, 130.
- [37] Taylor, K. A.; Glaeser, R. M. *Science* **1974**, *186*, 1036.
- [38] Dubochet, J.; Adrian, M.; Chang, J. J.; Homo, J. C.; Lepault, J.; McDowell, A. W.; Schultz, P. Q. *Rev. Biophys.* **1988**, *21*, 129.
- [39] Dubochet, J. *Methods Cell Biol.* **2007**, *79*, 7.
- [40] Taylor, K. A.; Glaeser, R. M. *J. Ultrastruct. Res.* **1976**, *55*, 448.
- [41] Limmer, D. T.; Chandler, D. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111*, 9413.
- [42] Dubochet, J.; McDowell, A. W. *J. Microsc.* **1981**, *124*, 3.
- [43] Dubochet, J.; McDowell, A. W.; Lepault, J. *Biol. Cell* **1982**, *45*, 456.
- [44] Frank, J.; Shimkin, B.; Dowse, H. *Ultramicroscopy* **1981**, *6*, 343.
- [45] Vanheel, M.; Frank, J. *Ultramicroscopy* **1981**, *6*, 187.
- [46] Vanheel, M.; Keegstra, W. *Ultramicroscopy* **1981**, *7*, 113.
- [47] Henderson, R.; Baldwin, J. M.; Ceska, T. A.; Zemlin, F.; Beckmann, E.; Downing, K. H. *J. Mol. Biol.* **1990**, *213*, 899.
- [48] Liao, M. F.; Cao, E. H.; Julius, D.; Cheng, Y. F. *Nature* **2013**, *504*, 107.
- [49] Merk, A.; Bartesaghi, A.; Banerjee, S.; Falconieri, V.; Rao, P.; Davis, M. I.; Prangani, R.; Boxer, M. B.; Earl, L. A.; Milne, J. L. S.; Subramaniam, S. *Cell* **2016**, *165*, 1698.
- [50] Yip, K. M.; Fischer, N.; Paknia, E.; Chari, A.; Stark, H. *Nature* **2020**, *587*, 157.
- [51] Sente, A.; Nakane, T.; Kotecha, A.; Aricescu, A. R.; Scheres, S. H. W. *Acta Crystallogr. A* **2020**, *76*, 220.
- [52] Cui, H.; Hodgdon, T. K.; Kaler, E. W.; Abezgauz, L.; Danino, D.; Lubovsky, M.; Talmon, Y.; Pochan, D. J. *Soft Matter* **2007**, *3*, 945.

- [53] Rigort, A.; Plitzko, J. M. *Arch. Biochem. Biophys.* **2015**, *581*, 122.
- [54] Volkert, C. A.; Minor, A. M. *MRS Bull.* **2007**, *32*, 389.
- [55] Shen, P. S. *Anal. Bioanal. Chem.* **2018**, *410*, 2053.
- [56] Rykaczewski, K.; Landin, T.; Walker, M. L.; Scott, J. H. J.; Varanasi, K. K. *ACS Nano* **2012**, *6*, 9326.
- [57] Stewart, P. L. *Wiley Interdiscip. Rev.: Nanomed. Nanobiotechnol.* **2017**, *9*, 1417.
- [58] Hayles, M. F.; De Winter, D. A. M. *J. Microsc.* **2021**, *281*, 138.
- [59] Gong, Y. X.; Gu, T. H.; Ling, L.; Qiu, R. L.; Zhang, W. X. *J. Hazard. Mater.* **2022**, *436*, 129192.
- [60] Thompson, R. F.; Walker, M.; Siebert, C. A.; Muench, S. P.; Ranson, N. A. *Methods* **2016**, *100*, 3.
- [61] Milne, J. L. S.; Borgnia, M. J.; Bartesaghi, A.; Tran, E. E. H.; Earl, L. A.; Schauder, D. M.; Lengyel, J.; Pierson, J.; Patwardhan, A.; Subramaniam, S. *FEBS J.* **2013**, *280*, 28.
- [62] Zhong, S.; Pochan, D. J. *Polym. Rev.* **2010**, *50*, 287.
- [63] Newcomb, C. J.; Moyer, T. J.; Lee, S. S.; Stupp, S. I. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **2012**, *17*, 350.
- [64] Danino, D.; Gupta, R.; Satyavolu, J.; Talmon, Y. *J. Colloid Interface Sci.* **2002**, *249*, 180.
- [65] Unwin, P. N. T.; Henderson, R. *J. Mol. Biol.* **1975**, *94*, 425.
- [66] Sander, B.; Golas, M. M.; Stark, H. J. *Struct. Biol.* **2003**, *143*, 219.
- [67] Joyeux, L.; Penczek, P. A. *Ultramicroscopy* **2002**, *92*, 33.
- [68] Nogales, E. *Nat. Methods* **2016**, *13*, 24.
- [69] Sigworth, F. J. *J. Struct. Biol.* **1998**, *122*, 328.
- [70] Scheres, S. H. W.; Gao, H. X.; Valle, M.; Herman, G. T.; Eggermont, P. P. B.; Frank, J.; Carazo, J. M. *Nat. Methods* **2007**, *4*, 27.
- [71] Liao, M.; Cao, E.; Julius, D.; Cheng, Y. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2014**, *27*, 1.
- [72] Cheng, Y. F. *Cell* **2015**, *161*, 450.
- [73] Pyle, E.; Zanetti, G. *Biochem. J.* **2021**, *478*, 1827.
- [74] Wagner, J.; Schaffer, M.; Fernandez-Busnadiego, R. *FEBS Lett.* **2017**, *591*, 2520.
- [75] Comolli, L. R.; Downing, K. H. *J. Struct. Biol.* **2005**, *152*, 149.
- [76] Bammes, B. E.; Jakana, J.; Schmid, M. F.; Chiu, W. J. *Struct. Biol.* **2010**, *169*, 331.
- [77] McEwen, B. F.; Downing, K. H.; Glaeser, R. M. *Ultramicroscopy* **1995**, *60*, 357.
- [78] McMullan, G.; Faruqi, A. R.; Henderson, R. *Methods Enzymol.* **2016**, *579*, 1.
- [79] McMullan, G.; Chen, S.; Henderson, R.; Faruqi, A. R. *Ultramicroscopy* **2009**, *109*, 1126.
- [80] Lucic, V.; Forster, F.; Baumeister, W. *Annu. Rev. Biochem.* **2005**, *74*, 833.
- [81] Kramer, M.; Rolf, C.; Lueke, A.; Afchine, A.; Spelten, N.; Costa, A.; Meyer, J.; Zoger, M.; Smith, J.; Herman, R. L.; Buchholz, B.; Ebert, V.; Baumgardner, D.; Borrmann, S.; Klingebiel, M.; Avallone, L. *Atmos. Chem. Phys.* **2016**, *16*, 3463.
- [82] Magee, N.; Boaggio, K.; Staskiewicz, S.; Lynn, A.; Zhao, X. Y.; Tusay, N.; Schuh, T.; Bandamede, M.; Bancroft, L.; Connelly, D.; Hurler, K.; Miner, B.; Khoudary, E. *Atmos. Chem. Phys.* **2021**, *21*, 7171.
- [83] Fiegel, J.; Clarke, R.; Edwards, D. A. *Drug Discov. Today* **2006**, *11*, 51.
- [84] Yao, M. S. *J. Aerosol Sci.* **2018**, *119*, 91.
- [85] Tellier, R.; Li, Y. G.; Cowling, B. J.; Tang, J. W. *BMC Infect. Dis.* **2019**, *19*, 101.
- [86] Moschovis, P. P.; Yonker, L. M.; Shah, J.; Singh, D.; Demokritou, P.; Kinane, T. B. *Pediatr. Pulmonol.* **2021**, *56*, 6.
- [87] Tellier, R. J. R. *Soc., Interface* **2009**, *6*, 783.
- [88] Cowling, B. J.; Ip, D. K. M.; Fang, V. J.; Suntarattiwong, P.; Olsen, S. J.; Levy, J.; Uyeki, T. M.; Leung, G. M.; Peiris, J. S. M.; Chot-pitayasunondh, T.; Nishiura, H.; Simmerman, J. M. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 1935.
- [89] Brankston, G.; Gitterman, L.; Hirji, Z.; Lemieux, C.; Gardam, M. *Lancet Infect. Dis.* **2007**, *7*, 758.
- [90] Walls, A. C.; Park, Y. J.; Tortorici, M. A.; Wall, A.; McGuire, A. T.; Veesler, D. *Cell* **2020**, *183*, 1735.
- [91] Zhu, Z. Y.; Liang, A. X.; Haotian, R. L.; Tang, S. S.; Liu, M.; Xie, B. T.; Luo, A. Q. *Acta Chim. Sinica* **2023**, *81*, 253 (in Chinese). (朱子煜, 梁阿新, 浩天瑞霖, 唐珊珊, 刘淼, 解炳腾, 罗爱芹, 化学学报, **2023**, *81*, 253.)
- [92] Wrapp, D.; Wang, N. S.; Corbett, K. S.; Goldsmith, J. A.; Hsieh, C. L.; Abiona, O.; Graham, B. S.; McLellan, J. S. *Science* **2020**, *367*, 1260.
- [93] Xu, C.; Wang, Y. X.; Liu, C. X.; Zhang, C.; Han, W. Y.; Hong, X. Y.; Wang, Y. F.; Hong, Q.; Wang, S. T.; Zhao, Q. Y.; Wang, Y. L.; Yang, Y.; Chen, K. J.; Zheng, W.; Kong, L. L.; Wang, F. F.; Zuo, Q. Y.; Huang, Z.; Cong, Y. *Sci. Adv.* **2021**, *7*, 5575.
- [94] Ito, S.; Gorb, S. N. *J. R. Soc., Interface* **2019**, *16*, 0269.
- [95] Tsou, C. H.; Cheng, P. C.; Tseng, C. M.; Yen, H. J.; Fu, Y. L.; You, T. R.; Walden, D. B. *Plant Reprod.* **2015**, *28*, 47.
- [96] Karolyi, F.; Gorb, S. N.; Krenn, H. W. *Arthropod-Plant Interact.* **2009**, *3*, 1.
- [97] Trotsenko, Y. A.; Murrell, J. C. *Adv. Appl. Microbiol.* **2008**, *63*, 183.
- [98] Semrau, J. D.; DiSpirito, A. A.; Yoon, S. *FEMS Microbiol. Rev.* **2010**, *34*, 496.
- [99] Wang, V. C. C.; Maji, S.; Chen, P. R. Y.; Lee, H. K.; Yu, S. S. F.; Chan, S. I. *Chem. Rev.* **2017**, *117*, 8574.
- [100] Chang, W. H.; Lin, H. H.; Tsai, I. K.; Huang, S. H.; Chung, S. C.; Tu, I. P.; Yu, S. S. F.; Chan, S. I. *J. Am. Chem. Soc.* **2021**, *143*, 9922.
- [101] Yang, S. M.; Liu, A. R.; Liu, J.; Liu, Z. L.; Zhang, W. X. *Acta Chim. Sinica* **2022**, *80*, 1536 (in Chinese). (杨思明, 刘爱荣, 刘静, 刘钊丽, 张伟贤, 化学学报, **2022**, *80*, 1536.)
- [102] Hochella, M. F.; Mogk, D. W.; Ranville, J.; Allen, I. C.; Luther, G. W.; Marr, L. C.; McGrail, B. P.; Murayama, M.; Qafoku, N. P.; Rosso, K. M.; Sahai, N.; Schroeder, P. A.; Vikesland, P.; Westerhoff, P.; Yang, Y. *Science* **2019**, *363*, 1414.
- [103] Tadesse, L. F.; Ho, C. S.; Chen, D. H.; Arami, H.; Banaei, N.; Gambhir, S. S.; Jeffrey, S. S.; Saleh, A. A. E.; Dionne, J. *Nano Lett.* **2020**, *20*, 7655.
- [104] Yin, L. P.; Zhang, M.; Zhang, Y. L.; Qiao, F. L. *Acta Oceanol. Sin.* **2018**, *37*, 69.
- [105] Wise, C. F.; Wise, J. T. F.; Wise, S. S.; Thompson, W. D.; Wise, J. P.; Wise, J. P. *Aquat. Toxicol.* **2014**, *152*, 335.
- [106] DeLeo, D. M.; Ruiz-Ramos, D. V.; Baums, I. B.; Cordes, E. E. *Deep-Sea Res.* **2016**, *129*, 137.
- [107] Alexander, F. J.; King, C. K.; Reichelt-Brushett, A. J.; Harrison, P. L. *Environ. Toxicol. Chem.* **2017**, *36*, 1563.
- [108] Gong, H. Y.; Bao, M. T.; Pi, G. L.; Li, Y. M.; Wang, A. Q.; Wang, Z. N. *ACS Sustainable Chem. Eng.* **2016**, *4*, 169.
- [109] Tchounwou, P. B.; Yedjou, C. G.; Patlolla, A. K.; Sutton, D. J. *Exp. Suppl.* **2012**, *101*, 133.
- [110] Ahmad, F.; Ashraf, N.; Zhou, R. B.; Chen, J. J.; Liu, Y. L.; Zeng, X. B.; Zhao, F. Z.; Yin, D. C. *J. Hazard. Mater.* **2019**, *380*, 120906.
- [111] Negre, M.; Leone, P.; Trichet, J.; Defarge, C.; Boero, V.; Gennari, M. *Geoderma* **2004**, *121*, 1.

(Cheng, F.)