

原位冷冻电镜技术和可视蛋白质组学前沿*

李宽莹¹ 王闻雪¹ 朱贇^{1**} 薛亮^{1**} 孙飞^{1,2}

(¹ 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

² 中国科学院广州生物医药与健康研究院, 广州 510530)

摘要: 近年来, 随着原位冷冻电镜技术和人工智能技术的不断发展, 结构生物学的研究模式发生了重大转变。结构解析不再局限于分离提纯的单一生物大分子, 而是在细胞甚至组织内原位直接解析生物大分子的高分辨率结构, 并对亚细胞区域整体分子景观进行结构探索, 从而更深刻地理解细胞与组织内生命活动的分子机制。通过展示细胞内不同蛋白质复合物的精细原位结构, 可以进一步生成蛋白质组的可视化定量空间分子结构功能图谱, 即可视蛋白质组学。以原位冷冻电镜技术为代表的新技术能够在空间水平阐明细胞内蛋白质组的三维相互作用网络, 促进从整体上系统性地理解细胞内生物大分子结构功能与互作机制。为了推动我国原位冷冻电镜技术和可视蛋白质组学的发展, 本文总结了其研究模式和最新前沿进展, 结合具体实例展示了新概念与新技术的先进性, 并对发展前景进行了展望。

关键词: 结构生物学, 细胞生物学, 系统生物学, 冷冻电镜, 冷冻电子断层成像, 可视蛋白质组学, 子断层结构分析, 冷冻光电关联, 人工智能

中图分类号: Q6-3

Frontiers in *in situ* cryo-electron microscopy and visual proteomics

LI Kuanying¹, WANG Wen-Xue¹, ZHU Yun^{1**}, Xue Liang^{1**}, SUN Fei^{1,2}

(¹ National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China; ² Guangzhou Institutes of Biomedicine and Health, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510530, China.)

Abstract In recent years, with the continuous development of *in situ* cryo-electron microscopy (cryo-EM) and artificial intelligence (AI) technologies, the research of structural biology has undergone a paradigm shift. Structural analysis is no longer confined to isolated and purified biomolecules, and determination of high-resolution *in situ* structures directly within cells and tissues becomes feasible. Furthermore, structural analysis of the molecular landscapes of subcellular regions can be performed to gain a deeper understanding of the molecular mechanisms of living activities in the native functional context. Through determining *in situ* structures of various protein complexes within the cell, it is feasible to visualize the proteome with spatial and quantitative information, which is often referred to as visual proteomics. Emerging *in situ* structural methods represented by cryo-electron tomography (cryo-ET) hold the promise to elucidate the three-dimensional interaction networks of the intracellular proteome and understand their activities in a systematic manner. To advance *in situ* cryo-EM/ET and visual proteomics in China, this review summarizes the new research paradigms and technological advances, showcases the superiority of new concepts and technologies with representative examples, and discusses the future prospects in the field.

Key words: structural biology, cell biology, systems biology, cryo-electron microscopy, cryo-electron tomography, visual

* 基金项目: 国家杰出科学基金项目 (31925026), 国家重点研发计划项目 (2021YFA1301500)。

**通讯联系人。朱贇 Tel: 010-64888582, E-mail: zhuyun@ibp.ac.cn; 薛亮 Tel: 010-64887252, E-mail: liangxue@ibp.ac.cn

收稿日期: (以本文投稿日期为准), 接受日期: (此项由编辑部填写)

* This work was supported by grants from National Science Foundation for Distinguished Young Scholars of China (31925026), National Key Research and Development Program (2021YFA1301500).

**Corresponding author. ZHU Yun, Tel: 010-64888582, E-mail: zhuyun@ibp.ac.cn; XUE Liang, Tel: 010-64887252, E-mail: liangxue@ibp.ac.cn

Received: Accepted: Available online:

1 引言

90年代初随着X射线晶体学与核磁共振波谱学的成熟,一批有远见的科学家提出“结构生物学的时代已经开始”。冷冻电镜技术的发展,尤其是冷冻电镜单颗粒技术(cryo-electron microscopy single particle analysis, cryo-EM/SPA)分辨率革命(resolution revolution)的实现将生物大分子复合物结构研究推向高峰。在过去的几十年里,结构生物学在解析大分子结构与理解大分子功能机制方面取得了巨大的成功。近年来,以AlphaFold为代表的人工智能结构预测算法的出现,预示着结构生物学将从传统的解析单一大分子或复合物结构的时代进入到一个新的时代。冷冻电子断层成像(cryo-electron tomography, cryo-ET)等原位结构生物学(in situ structural biology)技术的快速发展,使得在细胞甚至组织内原位直接解析生物大分子的高分辨率结构成为可能。可视蛋白质组学(visual proteomics)、分子社会学(molecular sociology)、结构细胞生物学(structural cell biology)等新概念层出不穷。这些概念预示着一个相同的未来发展方向,即在更接近自然状态下,更深刻地理解生命基本单元细胞,乃至组织内部复杂生命活动的高分辨分子机制。

在众多原位冷冻电镜技术衍生的新概念中,可视蛋白质组学显得尤为突出。可视化技术在生命科学研究的各个层面都发挥着重要的作用,通俗来讲就是“眼见为实”(“Seeing is believing”)。可视蛋白质组学的概念最早出现于2006年^[1],旨在通过展示细胞内蛋白质的原位结构和空间位置,生成细胞蛋白质组的定量的、可视化的空间分子结构功能图谱(spatial structural and functional landscape)。可视蛋白质组学连接了分子水平的蛋白质结构与细胞整体结构之间的鸿沟,能够以前所未有的方式深入探索细胞内蛋白质相互作用网络,也可以称作“分子社会学”(molecular sociology)^[2,3]。相比而言,传统的蛋白质组学主要借助质谱技术(mass spectrometry, MS)分析特定细胞或亚细胞的蛋白质组成。尽管可以定性或定量地鉴定蛋白质,但却无法获取蛋白质的空间位置和取向信息,也无法解析蛋白质精细结构。因此,可视蛋白质组学不仅是对结构生物学,也是对传统蛋白质组学的拓展,可以实现对细胞内原位蛋白质组的系统结构研究。以cryo-ET为代表的原位冷冻电镜技术能够捕捉细胞在近自然状态下的“快照”,是可视蛋白质组学的关键研究手段。这种快照包含了细胞三维空间内丰富且复杂的全分子结构信息。通过将这些信息与质谱信息、已解析蛋白质结构信息以及人工智能方法相结合,就可能实现对细胞内原位蛋白质组的三维可视化呈现。2009年,Beck等结合cryo-ET和定量质谱技术,首次对人类病原体钩端螺旋体进行了可视蛋白质组学研究的尝试^[4]。同时期,欧洲分子生物学实验室结合cryo-ET与串联亲和纯化质谱技术、转录组学、代谢组学等对肺炎支原体进行了系统生物学研究^[5-7]。尽管受到技术限制,这些研究仅对若干蛋白或复合物进行了初步的可视化探索,但提供了可视蛋白质组学研究的重要范例。

细胞作为生命的基本单元,其中分子以自组织的方式相互作用,形成多样的大分子复合体以及动态的亚细胞结构,进而组成一个无比复杂的系统。截止2024年7月,国际蛋白质数据库PDB中已解析了222,036个蛋白质结构,但仍无法回答细胞如何从分子产生生命活动这一终极问题。可视蛋白质组学结合分子社会学以及结构细胞生物学等多种技术方法,有助于深入全面地理解细胞这个复杂系统^[8]。当前,原位冷冻电镜技术正处于高速发展的阶段,众多软件和硬件的创新不断推动该技术走向成熟,实现可视蛋白质组与分子社会学的愿景。本文将就原位冷冻电镜技术和可视蛋白质组学的最新发展趋势以及背后的技术基础等方面做出综述。

2 原位冷冻电镜与可视蛋白质组学发展的新研究模式

2.1 复杂多组分复合物的结构解析

传统的结构生物学技术通常需要将目标样品从生物体天然环境中分离纯化出来,是否能够保持大分子复合物的天然结构往往存疑。很多生物大分子复合物中,各组分之间仅通过较弱的相互作用结合,或者只有在特定的生物体时空环境下才结合在一起。分离提纯的过程中,物理或化学作用很可能会破坏这些相互作用,造成复合物组

分的缺失或结构的变化。而 cryo-ET 通常在细胞内原位直接分析目标复合物的三维结构信息，可以最大程度地保持复合物整体结构的完整性，获得天然状态下的复合物结构信息。同时，cryo-ET 避免了分离提纯操作可能引起的非天然聚集、结构破坏或错误折叠等，确保观察到的复合物是自然状态下的自然组装形式。对于膜蛋白来说，原位结构研究具有重要的意义。膜蛋白的结构和功能高度依赖于其所处的脂质环境，传统的结构解析方法难以在类似天然膜环境的条件下研究膜蛋白，而原位冷冻电镜技术可以在自然的膜环境中直接观察膜蛋白的结构构象变化，从而对相关生理功能机制有更深刻的了解。

一个突出的例子是核孔复合物（nuclear pore complex, NPC）的结构研究。NPC 是由细胞核的内外核膜融合形成的孔状复合结构，是负责调控核质运输的重要通道^[9]。NPC 的分子质量高达 120 MDa，由约 30 种不同的核孔蛋白（nucleoporins, Nups）组成，这些不同的 Nups 先组成多个亚复合体（如 Y 复合体），再相互连接组成胞质纤维（cytoplasmic filament）、胞质环（cytoplasmic ring, CR）、内环（inner ring, IR）、腔内环（luminal ring, LR）、核质环（nuclear ring, NR）和核篮（nuclear basket, NB）等结构（图 1，a）^[10, 11]。借助于传统结构生物学技术，人们对分离提纯的 NPC 样品进行了广泛的结构研究。比如，利用 cryo-EM/SPA 技术解析了 3-4Å 分辨率的非洲爪蟾卵母细胞 NPC 的 CR 结构，搭建了 CR 近完整的分子模型^[12]；此外，还分别以 4.2Å 和 5.6Å 的平均分辨率解析了非洲爪蟾 NPC 的 IR^[13]和 NR^[14]结构并搭建结构模型。这些离体的结构信息虽然为理解 NPC 的组装和功能提供了重要的实验数据，但 NPC 更完整的结构以及与核膜相互作用的功能状态信息却只有通过原位结构研究才能揭示。

2016 年，Baumeister 课题组利用 cryo-ET 技术首次在 HeLa 细胞核周的原位环境中观察了完整 NPC 结构^[15]，发现 NPC 在胞内环境中具有可变化的直径，这种特殊的结构特征与其所处的复杂细胞环境相关。在对不同压力状态下裂殖酵母细胞的 NPC 进行原位结构研究后，Beck 课题组发现指数生长期的裂殖酵母 NPC 处于直径较大的扩张状态，而应激状态下的 NPC 处于直径较小的收缩态，并且发现核质转运过程在 NPC 处于收缩态时受到抑制^[16]。Schwartz 课题组通过研究 DLD-1 细胞 NPC 原位结构，发现天然状态下 NPC 内环直径更宽、通道体积增大，核质环和胞质环发生变构，揭示了 NPC 固有的结构灵活性^[17]。2022 年，Beck 课题组结合 cryo-EM 和 cryo-ET 技术捕获了在收缩和原位扩张两种状态下的 NPC 构象，绘制了大约 70MDa 的近完整 NPC 支架结构，获得了目前最完整的功能态 NPC 结构^[18]。Rout 课题组同时研究了酵母 NPC 分离纯化的结构与原位结构，阐明了 NPC 各个骨架结构之间的连接方式，并发现了细胞内同时存在拥有不同结构组分的 NPC 异构体^[19]。2024 年，Villa 课题组利用 cryo-ET 和整合建模技术，首次解析了 NB 的结构模型，揭示了其发挥生理功能的关键结构基础^[20]。同年，Beck 课题组借助冷冻光电关联（cryo-CLEM）和 cryo-ET 技术揭示了人类免疫缺陷病毒 HIV-1 进入原发性巨噬细胞细胞核的过程，阐明 HIV 核衣壳独特的锥形有利于破解 NPC 的环状结构，使其顺利通过 NPC^[21]。

以上结果展示了原位冷冻电镜在复杂多组分复合物结构解析中的巨大优势。作为结构生物学的圣杯，NPC 巨大的分子量以及复杂的生理功能使得传统结构生物学在其相关的结构解析方面显得作用有限，而原位冷冻电镜则在其复杂功能状态的结构解析中发挥了重要的互补作用。从对 NPC 的结构解析中可以发现，原位冷冻电镜不仅有助于解析那些难以在体外环境中稳定制备的复杂多组分大分子复合物结构，而且能够捕获复合物在不同功能状态下的结构，有利于促进对生物大分子结构和功能更深刻的理解。

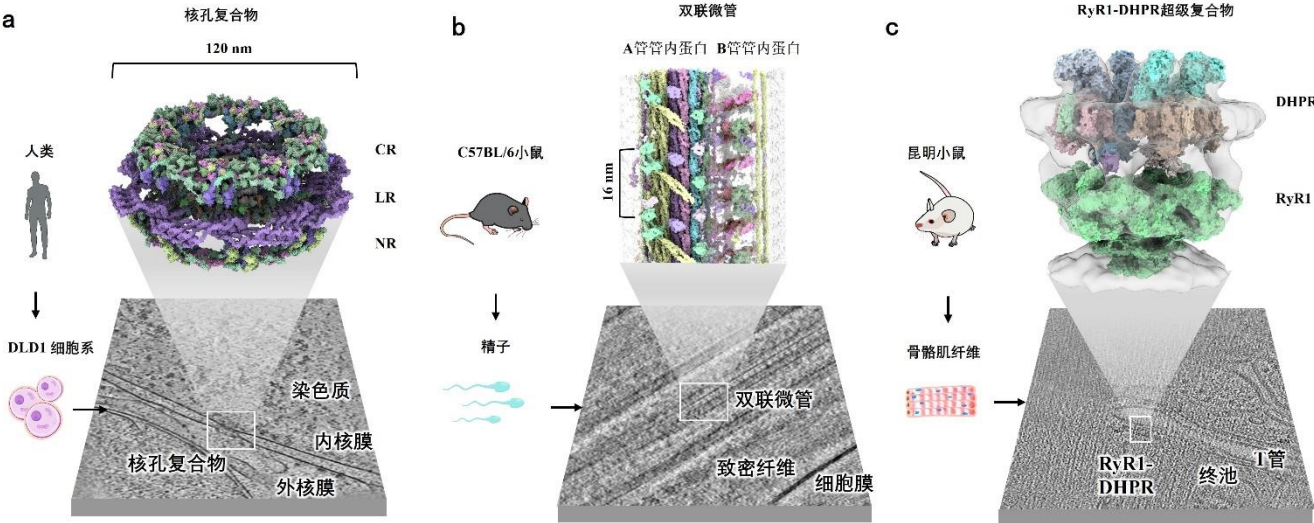


图 1 Cryo-ET 研究复杂多组分复合物结构组成的示例

Fig 1 Examples of cryo-ET studies on the structural composition of complex multi-component assemblies

(a), 利用原位冷冻电镜技术解析的核孔复合物结构 (PDB: 7R5K), 样品来源为人类 DLD-1 细胞系。Tomogram 来源于 EMPIARC-10700。CR, 胞质环; LR, 腔内环; NR, 核质环。(b), 利用原位冷冻电镜技术解析的精子轴丝复合物 (PDB: 8I7R)。样品来源为小鼠附睾精子。Tomogram 来源于孙飞课题组未发表数据。(c), 利用冷冻电镜技术解析的 DHPR-RyR1 超级复合物 (PDB: 5GJW)。样品来源为昆明小鼠骨骼肌纤维。Tomogram 来源于孙飞课题组未发表数据。DHPR, 二氢吡啶受体; RyR1, 1 型雷诺丁受体。

2.2 捕捉瞬时动态超分子组装体

除了复杂多组分复合体, 原位冷冻电镜技术也有可能捕捉到瞬时存在的, 或者依赖特定细胞环境才能形成的超分子组装体。传统结构生物学技术通常研究分离纯化的样品, 无法保留细胞内分子间的瞬时相互作用。而在原位条件下快速冷冻的细胞内, 生物大分子可能被固定在生理过程中任一时刻的互作状态。例如, 在原核细胞中由于没有细胞核的存在, 核糖体可以翻译正在转录中的新生 mRNA, 并与 RNA 聚合酶 (RNAP) 直接相互作用形成转录-翻译偶联组装体 (expressome)。尽管“人为”体外组装 RNAP 和核糖体后进行 cryo-EM/SPA 可以解析若干组装体结构^[22-24], 但体外组装依赖所加入的特定蛋白组分和实验条件, 无法反应细胞内的真实情况。利用完整肺炎支原体细胞进行 cryo-ET 研究, Rappsilber 与 Mahamid 课题组首次在细胞内原位解析了由 RNAP 和核糖体形成的超分子组装体, 结合全细胞交联质谱技术 (in situ crosslinking MS) 和综合结构建模, 发现转录因子 NusA 处于 RNAP 和核糖体之间的 mRNA 通路附近, 介导了动态的转录-翻译偶联过程 (图 2) ^[25]。用抗生素抑制翻译导致解偶联, 而抑制转录延伸则会挤掉“NusA”并导致 RNAP 和核糖体间直接碰撞, 表明转录-翻译偶联只有在天然细胞环境中当转录与翻译正在持续进行时才能被正确解析。这项工作也是首次将 cryo-ET 和原位交联质谱这两项最具潜力的原位结构生物学手段结合起来。此外, 孙飞课题组利用 cryo-ET 首次解析了骨骼肌中肌浆网上钙离子释放通道 RyR1 与细胞膜内陷形成的 T 管上的电压依赖 L 型钙离子通道 DHPR 间形成的兴奋-收缩偶联三联体原位结构 (图 1, c) ^[26]。Cryo-ET 还在解析酵母中线粒体与内质网接触位点 (mitochondria-ER contact site) 的连接复合物结构^[27], 酶聚集形成的超分子组装体^[28, 29]等只有在特定细胞环境才能存在的超分子组装体上表现出独特的优势。

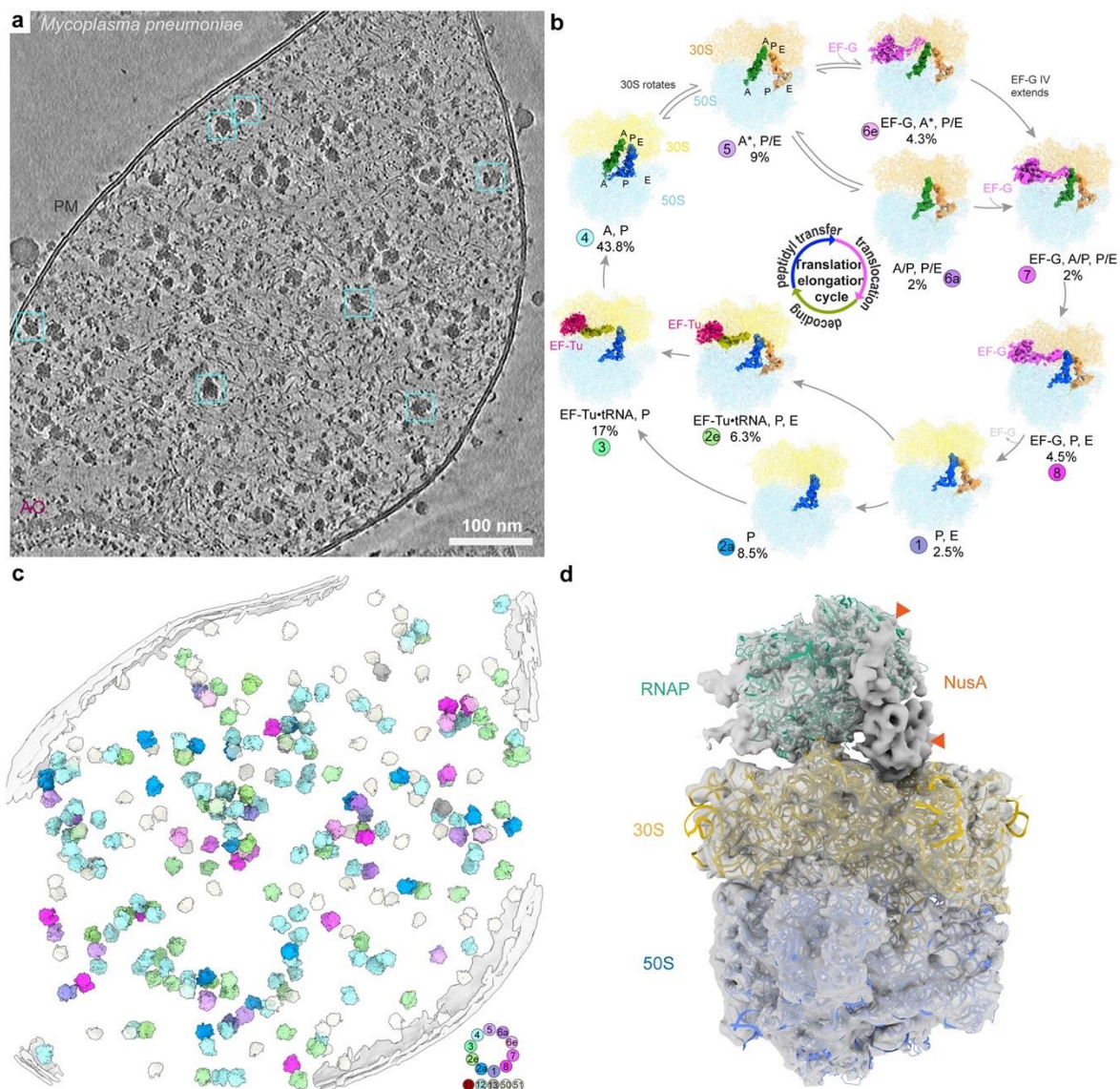


图 2 Cryo-ET 系统解析肺炎支原体细胞内翻译机器结构动态

Fig 2 Systematic structural analysis of the translation machinery in *Mycoplasma pneumoniae* cells by cryo-ET

(a), 肺炎支原体细胞经 cryo-ET 三维重构得到的 tomogram 横切面图。可见明显核糖体（蓝框）、细胞膜 (PM) 和特征性附着细胞器 (attachment organelle, AO) 等。核糖体对应的三维子断层密度 sub-tomogram 可被提取平均以解析高分辨率结构。(b), 细胞内核糖体颗粒分类后得到的翻译中间体结构可组成一个完整的翻译延伸循环。其中翻译延伸因子及 tRNA 状态可被清楚解析。(c), 将不同核糖体中间体结构重新投射回细胞内得到翻译机器的三维空间分布图。其中不同颜色代表不同的翻译功能状态。(d), 对核糖体颗粒进行深度分类后得到的 RNA 聚合酶与核糖体形成的转录-翻译偶联超分子组装体结构。

2.3 原位结构解析中发现新蛋白质

原位冷冻电镜技术由于避免了结构破坏的风险，有可能发现大分子复合物的新组成蛋白。近年来随着相关技术的不断进步，通过原位结构研究手段直接鉴定目标分子的组成蛋白已经成为可能。一方面，软件和硬件技术的不断进步使得 cryo-ET 技术解析的大分子复合体原位结构的分辨率不断提高^[30-34]。另一方面，AlphaFold^[35]等结构预测软件已经实现了蛋白质三维结构的高准确度预测，并构建了各种物种的蛋白质结构数据库。这样，利用中高等分辨率的原位结构密度图信息，结合质谱（或交联质谱）与蛋白质结构数据库等信息可以实现目标蛋白的搜索与确认。

一个例子是哺乳动物精子轴丝的原位结构研究。成熟精子主要由富含染色质的头部和由轴丝复合体形成的尾部组成^[36]。精子轴丝复合体由数百种不同的蛋白质组成，主要包括双联微管（doublet microtubules, DMTs），中央鞭毛复合体（central apparatus, CA），动力蛋白臂（dynein arms, DA）等成分。这种由 9 对外周 DMTs 和中央 CA 形成的“9+2”结构是精子轴丝的基本结构单元（图 1, b）^[37-39]。动力蛋白通过水解 ATP 获得能量，使得 DMT 相对

滑动, 从而产生尾部的击打运动, 这种运动对于精子的游动至关重要, 精子尾部的运动缺陷通常会导致严重的不孕不育^[40, 41]。轴丝复合体不仅存在于精子尾部, 同时也是真核生物运动纤毛的核心结构, 在细胞运动, 信号传递以及胚胎发育等多个过程中发挥着重要作用, 因此对轴丝复合体的结构解析至关重要。近期, 通过分离纯化精子轴丝的 DMT, 吴建平课题组利用 cryo-EM/SPA 技术和基于人工智能的建模, 建立了小鼠精子 48 nm 周期下 DMT 的原子模型, 揭示了 47 种 DMT 相关蛋白, 确定了 10 种精子特异性的微管内蛋白 (microtubule inner proteins, MIPs)^[37]。同期, Zeev-Ben-Mordehai 课题组人在海胆和牛的精子提纯的 DMT 样品中, 鉴定了超过 60 种不同的 DMT 相关蛋白^[42]。

虽然以上方法可以鉴定精子轴丝复合体的组成蛋白, 然而其提纯方法破坏了轴丝复合体的“9+2”整体结构, 限制了对轴丝结构组成和功能的更深入的理解。相比之下, Agard 课题组利用 cryo-ET 和 StA 方法, 直接在精子细胞的样品中解析了 16 nm 周期下 6-7 Å 分辨率的 DMT 结构。该原位结构中可以观察到清晰的蛋白质二级和三级结构。作者利用这些结构信息在 AlphaFold2 小鼠蛋白质结构数据库的结构模型中进行了无偏差匹配, 在未知蛋白密度中鉴定到了 Tektin5、CCDC105 以及 SPACA9 三种新蛋白, 提供了关于哺乳动物精子尾部轴丝特异性的结构见解^[43]。同期, 孙飞课题组也利用同样的方法在小鼠精子中解析了 DMT 的高分辨率原位结构 (16nm 周期下 DMT 达到 4.5 Å 分辨率), 搭建了 36 种 MIPs 的结构模型 (图 1, b), 说明了直接在原位结构中鉴定新的蛋白质已成为可能^[34]。

以上结果说明, cryo-ET 与基于结构预测的蛋白质组学数据库的结合分析使得在细胞原位环境中鉴定新的蛋白成为可能, 这也成为了可视蛋白质组学的重要方法。这种新的结构研究模式, 不仅提供了发现和鉴定新蛋白的技术方案, 同时允许在原位细胞环境内直接观察相关蛋白质分子互作网络, 提供全景式的蛋白质结构功能信息。

2.4 重构细胞内全面分子结构景观

原位冷冻电镜样品制备技术使得原位结构解析不被限制在分离提纯的单一生物大分子或复合物, 更有可能解析相对完整的亚细胞区域内或特定细胞生命过程中的不同大分子机器结构, 进而重构出细胞内全面的空间分子结构景观。Raunser 课题组使用 cryo-ET 重构了小鼠肌小节中的粗肌丝与细肌丝的原位结构, 解析了主要蛋白 actin、tropomyosin、troponin、myosin 等在不同肌小节区域的组织分布以及在分子水平上的多样性与可塑性^[44]。此外, 他们还解析了传统结构生物学手段无法解析的 neublin、titin、myosin-binding protein C 等肌肉中重要辅助蛋白的原位结构^[45, 46], 涵盖了肌肉收缩中主要的蛋白分子并提供了高分辨率的三维空间组织信息。近期另一个代表性研究是蛋白质翻译这一所有细胞中最基本的生命过程。传统的核糖体结构解析需要使用破碎细胞后得到的核糖体组分^[47], 无法提供翻译在细胞内是如何进行、如何时空组织等信息。以肺炎支原体细胞为模型, Mahamid 课题组首次用 cryo-ET 在正常细胞和氯霉素处理细胞中将原位核糖体结构解析到 3.5 Å^[48]和 3.0 Å^[49]近原子分辨率。深度结构分类获得的 15 种翻译中间体结构可以捕捉到核糖体翻译延伸以及行使其它功能时的动态结构变化。处于不同中间态的核糖体在相同的细胞状态下表现出相对稳定的分布, 显示其可能是细胞内稳态的重要组成部分。将处于不同翻译状态的核糖体结构重新投射回细胞内三维空间得到了一个详细而精确的翻译机器的三维结构功能图谱。基于此, 她们回答了多聚核糖体行进间如何协调的问题, 发现了一个由 L9 蛋白所介导的避免行进间核糖体直接碰撞以保持翻译保真度的局部延伸协调机制。利用类似研究框架, Beck 组也在黏菌和人源细胞的 cryo-ET 研究中取得了可达 3.2 Å 分辨率的一系列原位核糖体结构^[50, 51]。此外, cryo-ET 技术还揭示了抗生素^[49]或抗癌药物^[52]如何改变核糖体整体功能状态分布, 引发不受控的核糖体碰撞与细胞应激反应, 进而系统性地重塑翻译机器在细胞内的分子结构功能景观。

3 原位冷冻电镜与可视蛋白质组学技术的前沿进展

3.1 更自动化的 cryo-ET 流程: 从样品制备到三维重构

冷冻制样是将含水样品快速冷却以形成玻璃态冰的过程 (vitrification), 能够固定并保留生物大分子水合状态, 是已知保存生物样品最好的方法^[53]。原位样品的多样性 (如细胞、类器官、组织等) 与复杂性 (如脂类、蛋白质等大分子浓度与聚集状态差异) 使得需要根据样品类型和研究目的选择合适的制样方法^[54]。相比于纯化的大

分子，原位样品在冻样前更应注意保持细胞处于自然状态，更严格控制温度、培养环境（如二氧化碳浓度、厌氧微生物所需无氧环境）等避免细胞应激反应影响。常用的投入式冷冻法(plunge freezing)适用于细菌、单细胞生物和培养的细胞。贴壁细胞可以直接在载网上培养，亦可用 micro-patterning 方法预先处理载网以控制细胞生长位置或形态^[55]。然而由于热传递速度的限制，投入式 vitrification 穿透深度一般只有约 5 μm ^[15]；加入甘油等冷冻保护剂可在更深区域避免冰晶形成^[56]，但要考虑对细胞状态的可能影响。对于更大的细胞或组织样品需要高压冷冻(high-pressure freezing)避免内部冰晶形成，一般适用厚度可达 200 μm （图 3，a）。近年来有一些新冻样技术开发，如 Jet freezing^[57]等有可能实现更快的冷冻速率。但总体而言 vitrification 原理研究与制样设备开发与几十年前没有明显差别，是值得重新探索的领域。将冻样设备与微流控装置^[58]，或其它细胞研究中的设备进行整合也是一个很有潜力的方向。

冷冻电镜成像要求样品厚度在 200 nm – 300 nm 以下，因此除极少数细菌^[4, 25]和细胞边缘区域^[59, 60]外，对原位样品进行减薄处理是必须的（图 3，c）。基于冷冻聚焦离子束(cryo-FIB)的减薄方法近年来快速发展，是原位结构生物学得以兴起的基础。冷冻切片 CEMOVIS 技术因为钻石刀机械切割固有的样品形变问题没有被广泛应用^[61]。Cryo-FIB 以高能镆离子轰击样品进行溅射铣削切割，避免了机械切割的形变问题。对于细胞悬液或贴壁细胞可直接对含样品的载网进行 cryo-FIB 减薄处理，能够获得低至 80 nm 厚度的样品薄片(lamella)。以等离子体作为离子源的 plasma FIB 具有更高的切割速率，也有比较成功的应用^[62, 63]。然而，无论是重金属离子还是等离子体都会在 lamella 上下表面造成辐射损伤层丢失部分高分辨率信息。不同方法估算的受破坏深度一般在 30 nm 至 60 nm 之间^[63-65]。未来 cryo-FIB 在铣削减薄参数^[64, 66]，更理想的离子源^[67]，控制冰污染^[68, 69]等方面仍有优化空间。

自动化 cryo-FIB 样品减薄方法的开发^[68, 70-73]以及成熟商业化软件 AutoTEM (Thermo Fisher Scientific) 的出现进一步改善了 cryo-FIB 样品制备效率与学习成本。对于需要高压冷冻的样品，由于高压冷冻载具(planchet)和组织样品自身厚度的限制，无法直接进行 cryo-FIB 减薄制备 lamella，需要对组织样品进行整修处理以暴露出可制备 lamella 的区块。近年来有 Waffle method^[74]，VHUT-cryo-FIB^[75]，cryo-lift-out^[72, 76, 77]等方法出现。Plitzko 课题组开发的连续切片提取技术 serial lift-out^[78]能够将样品块分割成几微米间隔的数十张 lamella，尽可能连续地保留了组织样品结构信息，是近年来基于 cryo-FIB 进行方法开发的优秀代表。相比于几至几十微米厚的细胞，单个 lamella 仅能覆盖细胞中很小的一部分(1%-20%)，其余均被离子束铣削掉。这不仅意味着信息的损失，也带来了如何定位的问题。对于特定亚细胞结构或分子过程，可以使用荧光信号定位 lamella 制备位置^[76, 79-83]。基于荧光识别的冷冻光电关联技术(correlative light and electron cryo-microscopy, cryo-CLEM)（图 3，b）是一种将冷冻电镜与荧光显微镜(fluorescence microscopy, FM)相结合的技术，其原理是通过 FM 对荧光标记的样品进行成像，获得的荧光图像可用于准确指导 lamella 的定位及后续的数据收集。通常来说，适用于活细胞的荧光标记技术都可以应用于 cryo-CLEM 流程中，最常用的方法是表达与荧光蛋白结合的融合蛋白，以标记感兴趣的蛋白质。也可以将具有自催化功能的蛋白标签（如 SNAP 标签或 HALO 标签）与感兴趣的蛋白融合表达，蛋白标签扩大了荧光标记的种类，包括亮度高且可穿透膜的有机染料分子。除荧光信号帮助定位外，还有一种基于高对比度的分子标签法，即通过遗传或非遗传手段在靶细胞表面或靶蛋白上人为增加具有较高对比度的可识别标签，标签的可识别部分通常包含比样品本身更能散射电子的重金属元素。如 SPOTs^[84]以 DNA 序列折叠形成的高对比度磷酸骨架为分子标签，能够特异性定位囊泡或细胞膜表面分子。其它相关的分子标签还包括铁蛋白笼标记^[85]，纳米金颗粒^[86, 87]等。但是高对比度的分子标签法对哺乳动物细胞的适用性有限。上述两种方法极大地提高了靶向性的样品制备和数据收集的成功率^[88]。

Cryo-ET 需要收集样品在不同倾转角下的图像组成一个倾转系列(tilt-series)来实现三维重构（图 3，d）。自动倾转数据收集可以在诸如 SerialEM^[89]或 Tomography (Thermo Fischer Scientific) 软件上实现，但倾转会引入一系列成像通量和质量问题。Dose-symmetric 的数据收集方法因为能够最大程度地保留低倾转角低电子辐射累积部分的高分辨率信息，已经成为 cryo-ET 数据收集的主流方案^[90, 91]。基于光束-图像偏移 (beam-image shift, BIS) 的数据收集首先在冷冻电镜单颗粒中被广泛应用，近年拓展到 cryo-ET 后将数据收集速度提升到约 5 分钟一套^[92-96]。虽然数据收集速度仍有提升空间，但已不再是 cryo-ET 的主要限制因素。如何改进因倾转、样品厚度、BIS 等带来的成像质量问题（波束倾斜 beam tilt, 像散 astigmatism, 电荷累积 charging, 欠焦不均匀等）以及如何建立针对特定样品的优化策略将是未来方法开发的重点。Volta 相位板可以提高衬度，但是相位偏移不稳定、电荷积累以及

需要长时间准备等限制了其在 cryo-ET 中的应用^[97, 98]。正在开发中的激光相位板^[99]可以避免以上问题，有望实现理想的近正焦 cryo-ET 数据收集。此外，更快更好的相机，更稳定的能量过滤器，更优化的样品台，更经济可靠的球差矫正器等电镜硬件开发所带来的成像质量提升对原位电镜都是重要的。Montage tomography 和方形光阑等可以通过点阵收集获取大样品区域的连续三维重构图^[100-102]，也为 cryo-ET 方法开发打开了新思路。

三维重构是用对齐的倾转系列二维图像重构出三维密度图（tomogram）的过程（图 3，e）。在可能的情况下引入胶体金这样的高衬度颗粒进行对齐仍是最优方案，可以手动或自动挑选金颗粒用于倾转序列对齐^[103-105]。基于样品内部特征进行全自动对齐的方法也被开发出来^[106] ^[107]。Etomo^[104]和 AreTomo^[107]分别是现阶段最常用的手动和自动对齐软件。用对齐的倾转系列重构 tomogram 最常用的是加权背投影算法(weighted back projection)^[108]。迭代算法 SIRT 或代数重构算法等可以增加低频衬度但无法保留高频信息，在 cryo-ET 中并不常用。开发新的既能提高衬度又最大程度保留高频信息的重构算法仍有意义。最近有诸如 MBIR^[109]，NUDM^[110]、compressed sensing^[111]等新算法出现，但尚缺乏比较成功的应用案例。为了更利于直接观察，对低信噪比的 tomogram 进行降噪是必要的（图 3，f）。除传统的低通滤波外，最常见的是去卷积滤波^[112]，以及基于 noise2noise 深度学习的降噪方法^[113-115]。为了避免深度学习降噪可能引入的假象，有必要交叉比较不同的降噪方法。由于样品台和倾转厚度限制，cryo-ET 倾转角一般在 $\pm 60^\circ$ 之间，因此在电子束方向因傅里叶空间信息缺失而有“缺失楔效应”^[108]。ICON^[116]、IsoNet^[117]等可对缺失楔效应进行矫正，弥补部分缺失信息增加 tomogram 的可解析度^[109, 118]。对于细胞膜、细胞骨架等连续且衬度较高的区域可以进行密度图分割（segmentation）以更直观展现三维重构信息^[15, 119]。密度图分割在某种意义上也是一种降噪过程。手动分割非常消耗时间经验，基于人工智能的密度图分割^[120-122]是 tomogram 深度数据挖掘方法开发的发展方向。

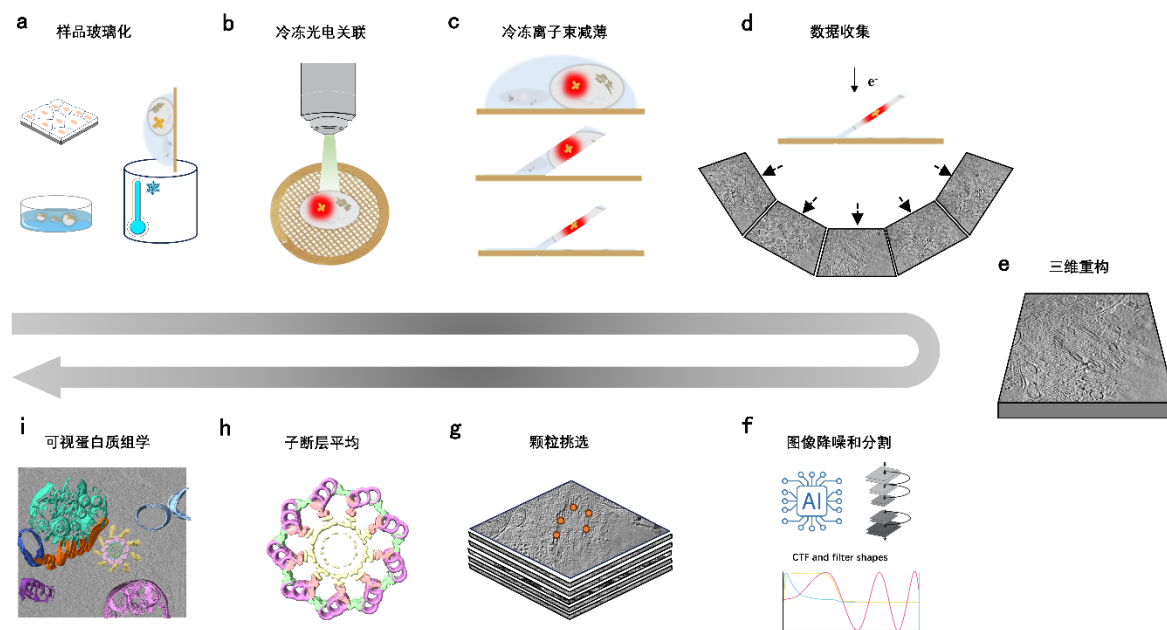


图 3 原位冷冻电镜技术在细胞或组织原位解析生物大分子结构的流程

Fig.3 The workflow of cryo-ET for in situ analysis of biomolecular structures within cells or tissues

(a), 组织样品和细胞样品的玻璃化。组织样品通常通过高压冷冻的方式进行冷冻制样，细胞样品通常通过投入式冷冻进行制样。(b), 玻璃化后的样品进行冷冻光电关联。样品的荧光信号有利于帮助确定目标区域的位置，这里以发红色荧光的中心体为例。(c), 在荧光信号的指导下进行冷冻聚焦离子束减薄。随着减薄程度的加深，荧光信号会逐渐湮灭，表明离子束减薄到荧光所在区域。(d), 冷冻电子显微镜数据收集，减薄后的 lamella 在不同角度下进行旋转成像，生成倾转系列。中心体的原始倾转系列详见 EMPIARC-200003 (e), 倾转系列对齐后进行三维重构，生成 tomogram。(f), 利用 AI 或调制函数对 tomogram 进行降噪。(g), 在 tomogram 中定位目标颗粒。针对所要挑选的目标区域选择不同的颗粒挑选方法。(h), 对挑选的颗粒进行子断层平均计算。这里展示的是中心体的原位结构（EMD-33417, EMD-33418, EMD-33419, EMD-33420, EMD-33421）。(i), 可视蛋白质组学示例。这里仅对 tomogram 中以中心体为代表的部分细胞器结构进行了可视化。

3.2 子断层结构分析：计算虚拟层面的拆解与复现

因为低信噪比、缺失楔和对齐精度限制，单个三维重构图 tomogram 所能达到的分辨率只有数个纳米。对于 tomogram 中相同的大分子复合物，可以将其对应局部三维密度 sub-tomogram 提取出来进行平均以提高分辨率，即为子断层结构平均法（sub-tomogram averaging）^[123-125]。除三维结构平均外，还可进行三维结构分类、空间分布分析、基于平均的畸变分析等，这里将其统称为子断层结构分析法（sub-tomogram analysis, StA）。

在 tomogram 中定位目标颗粒是子断层结构分析的第一步，也是最重要一步（图 3, g）。对于无过往结构研究的目标复合物，手动挑取仍然是优先选择。若干软件如 Dynamo^[126]、PySeg^[127]、Blik^[128]等也提供基于几何分布的挑选与取样策略，对于纤维状或膜表面结构等的挑选有帮助。但是手动挑选非常消耗时间，也易受主观因素影响，不适合大规模数据处理。对于已有类似或初步结构的情况，可将其作为模版在 tomogram 中进行模板匹配（template matching）^[4, 129, 130]，常用 cryo-ET 数据处理软件如 PyTom^[131]等均有模板匹配功能且基本原理类似，即通过计算三维模版与每个像素点对应局部三维密度间相关系数来提取目标位置。低频信息在三维模版匹配中起主导作用，因此容易在细胞膜或其它高衬区域出现假阳性问题。在模版匹配时适当增加高频信息可能有助于减少假阳性影响^[132, 133]。近年来，一些基于机器学习尤其是卷积神经网络的颗粒挑选与分割方法被开发出来，如后文中详细介绍的 DeepFinder^[134]、DeePicT^[121]、DeepETPicker^[135]、crYOLO^[136]、PickYOLO^[137]等，在颗粒挑选应用上展现出很大潜力。然而现有机机器学习方法一般依赖训练数据，在全面性、三维定位精确度等方面也没有显著优于模版匹配方法。未来趋势在于开发不依赖训练数据的无监督深度学习算法，以及将模板识别与人工智能方法结合起来^[122]。原位数据共享和诸如 SHREC^[138]的公开竞赛也将有助于促进数据发掘新算法的开发。

传统 cryo-ET 子断层平均法，如 TOM/AV3^[125, 139]、PyTom^[131]、Dynamo^[126]、RELION 3^[140]等软件中，主要将 tomogram 中框取的三维颗粒 sub-tomogram 进行平均以提高分辨率（图 3, h）。相比于 cryo-EM/SPA 直接由处于不同取向的颗粒的二维图像重构出最终结构，cryo-ET/StA 多了收集倾转系列重构 tomogram 这一中间步骤。但两种方法原理上是一致的^[141]，在技术上也并没有严格的分界。近年来的研究表明未来趋势是将两种方法结合起来以获得高分辨 cryo-ET 原位结构^[48, 142-146]。Cryo-ET/StA 一般要经过从原始帧图像到二维图像、二维倾转系列间以及三维颗粒密度间对齐三个步骤。更大的电子剂量累积也使得 cryo-ET 中有更高的 BIM（beam induced motion）以及更大尺度的样品形变。从二维倾转图像到三维 tomogram 重构过程中湮灭了大部分高分辨结构信息，是限制传统子断层结构分辨率的主要因素^[147]。此外，不同区域的颗粒因为样品厚度和倾转而有不同的欠焦值^[148]，也需要引入三维 CTF 校正^[148, 149]。在 cryo-EM/SPA 中首先被开发的帧对齐^[150]，dose-filtering^[151, 152]，以及基于平均结构的对齐^[153, 154]等概念的引入是早期获得部分病毒高分辨原位结构的关键^[152, 155]。为了解决 tomogram 中间步骤高频信号湮灭问题，最近一批成功的 cryo-ET/StA 新方法如 emClarity^[142]、EMAN2^[106]、Warp/M^[33]、RELION 4^[145]等一般先进行传统 sub-tomogram 对齐平均以获得初始三维平均结构与对齐参数，然后利用这些信息与对应的二维倾转图像区域进行关联对比，优化整体和局部倾转系列对齐参数和 CTF 拟合参数。其中 Warp/M 将 cryo-EM 与 cryo-ET 数据处理整合在一个统一框架内，可同时实现多颗粒的，基于平均结构的倾转对齐、样品畸变、CTF 模型、颗粒取向等参数优化，在多种样品中实现了 4Å 以内分辨率的原位结构解析^[45, 48, 50, 51]。为了解决不同 cryo-ET/StA 程序间兼容整合难题，最近也有 ScipionTomo^[156]、nextPYP^[144]、TomoBEAR^[157]、TOMOMAN^[158]、TomoNet^[159]等一批整合了不同软件的平台化方案出现，为初学者提供了更友好的数据处理平台。

既然 cryo-ET/StA 原位高分辨结构解析需要回到二维图像层面，进行比 cryo-EM/SPA 更耗费时间和计算资源的 cryo-ET/StA 是否还有必要？将电子剂量分配在倾转系列尤其是高倾转角上是否还是最优策略？有研究组尝试了先收集高剂量非倾转 cryo-EM/SPA 图像再收集 cryo-ET/StA 倾转数据为 SPA 提供初始对齐参数的策略^[160, 161]。但由于数据收集与处理的复杂性，这种交叉方案并没有表现出明显优势。对于原位样品中的超大型复合物如呼吸链复合物或捕光复合物，用传统 cryo-EM 数据收集与优化的 SPA 算法可直接找到对齐参数解析出 3Å 左右的高分辨原位结构^[162, 163]。高分辨二维模板匹配方法也可在颗粒重叠或分子拥挤的非倾转 cryo-EM 图像中定位像核糖体这样的大复合物^[133, 164, 165]。若目的仅为解析若干大分子复合物的原位结构，是否还有必要进行 cryo-ET/StA 需要未来更多不同样品上的研究去探索。在挑取更小复合物，电子束方向的空间定位，以及解析全面的细胞内分子景观方面，cryo-ET/StA 仍然有更大的潜在优势。未来的 cryo-ET/StA 研究也应该根据不同样品与研究目的选择最优化的数据收集与处理策略。值得指出是，cryo-ET/StA 与 cryo-EM/SPA，亦或是原位和传统结构生物学从来不是对立的，

原位结构生物学的核心即是多方法的融合。

在平均的基础上，解析复合物颗粒中的结构多样性（structural heterogeneity）可以探究大分子机器行使功能的动态结构机制。在细胞内原位能更好地保留结构多样性与更接近自然状态的不同结构分布频率，因此三维结构分类是原位结构研究重要的组成部分。常见的三维结构分类方法如最大似然法与主成分分析等在不同的 cryo-ET 数据处理软件中均有成功应用。但三维结构分类方法仅能解析若干不连续的亚结构类别，不能重构出连续的结构变化。基于机器学习的 cryoDRGN 等方法最近成功拓展到子断层分析上，可以重构出大分子机器在原位相对连续的结构变化^[166-169]。除了解析不同状态的结构，cryo-ET/StA 还可以根据不同结构种类中颗粒数量计算出不同结构状态出现的频率，建立大分子机器的功能图谱（functional landscape）。比如在核糖体的原位结构研究中发现，同一种细胞在特定状态下倾向于表现出类似的功能状态分布，但不同的细胞种类以及不同的环境或药物处理能导致完全不同的分布^[48, 51, 52]。保持关键大分子机器相对稳定的功能图谱可能是细胞内稳态的重要部分。原位结构研究为深入理解细胞的生命活动提供了全新视角。

原位结构生物学不是仅仅解析若干大分子复合物的原位结构。Cryo-ET/StA 原位技术的最大意义还在于，可以将获得的不同结构重新投射回细胞内三维空间进而获得细胞的空间分子结构功能图谱（图 3，i）。其中大分子复合物的空间定位精度可达亚纳米或埃级别，并且有旋转取向、结构功能状态、辅助蛋白甚至药物小分子结合等综合信息^[48]。Cryo-ET/StA 的定位精度与结构细节是现有细胞生物学技术如超分辨荧光显微镜^[170]无法比拟的。基于 cryo-ET/StA 的三维空间分析（spatial analysis）在研究神经细胞中变性蛋白聚集与蛋白酶体互作^[171]，内质网蛋白降解微区域^[172]，多聚核糖体^[48]，细胞骨架 actin wave^[60, 119]等方面取得了一系列新发现，为深入理解细胞和分子层面的生命活动提供了结构基础。基于 ChimeraX 的 ArtiaX^[173]和基于 napari 的 Blik^[128]的开发也使得三维可视化变得更加简单。除了三维可视化，更系统和定量地分析不同结构分布、邻近、聚集等三维组织信息是未来方法开发的方向之一^[48, 174, 175]。

Cryo-ET/StA 可以类比于在计算机虚拟层面拆解一个由电镜图像三维重构的细胞，但相比于传统结构生物学破坏后提纯的结构解析，cryo-ET/StA 保留了“复原”细胞内完整三维分子景观的可能性，是现阶段构建“细胞的原子模型”（atomic model of the cell）这一结构生物学家终极目标最有潜力的方法。在 cryo-ET/StA 解析与构建的基础上，结合多组学数据与机器模拟有可能建立可以模拟正常细胞功能的虚拟细胞模型^[176]。

3.3 整合生物成像解析生命系统复杂性

生命系统的复杂性和单个研究方法的局限性使得整合多种技术方法成为必然。光镜和电镜在各自的领域一直在突破新的界限，而两者的结合同样在不断发展。如前文中提到的 cryo-CLEM，实验过程中可将样品玻璃化后在集成了冷冻荧光显微镜（fluorescence cryo-microscopy, cryo-FM）模块的冷冻聚焦离子束扫描电子显微镜（cryo-FIB-SEM）中进行成像以减少样品的转移过程，最大程度的减少冰污染，同时可以在实时荧光信号指导的情况下对感兴趣区域进行特定减薄（图 3，c），将 lamella 的荧光图像与扫描电子图像相结合，能够指导 cryo-ET 的数据收集过程。孙飞课题组研制的 ELI-TriScope 系统能够将电子束、光束和离子束精确地聚焦到同一点上，有效提高了冷冻聚焦离子束减薄的成功率和样品制备通量^[82]。通过荧光标记，他们利用该系统成功制备了一批精准靶向中心体的 lamella，并发现了此前未被报道的 RD3 结构。徐涛和纪伟课题组等将激光共聚焦显微镜集成到 cryo-FIB-SEM 中开发了 CLIEM 系统，通过高质量的全细胞多色三维荧光成像，可精准定位研究目标的三维空间位置，并通过投影变换将光镜图像与聚焦离子束图像进行快速精准关联，实现了 110 nm 精度的聚焦离子束定点减薄^[83]。此外，还有一些类似的商业化解决方案，比如 iFLM（Thermo Fischer）和 METEOR（Delmic）等。Cryo-CLEM 技术已广泛应用于细胞生物学、结构生物学等领域，利用该技术研究人员成功解析了病毒入侵细胞的过程^[177]，揭示了病毒与宿主细胞膜的相互作用机制，同时还研究了细胞骨架^[178]、细胞器动态变化^[179, 180]等生物学过程。

由于油浸物镜及其它浸入式光学物镜目前仍无法在冷冻条件下进行成像，因此典型的 cryo-FM 通常使用以空气为介质的物镜，导致其光学分辨率被限制在 400-500 nm 的范围内。为了实现对亚细胞或小分子蛋白更加准确和精细的定位，超分辨冷冻光电关联技术（correlative cryo-super resolution light and cryo-electron microscopy, SR-cryoCLEM）得到了越来越多的应用^[180-182]。SR-cryoCLEM 技术的发展得益于超分辨率显微镜技术（Super-resolution Fluorescence Microscopy, SR-FM）的发展。SR-FM 能够突破传统光学显微镜的衍射极限，实现纳米级

别的分辨率, 如 PALM^[183]和 STORM^[184]能够精确地定位单个分子, 有助于研究荧光分子在细胞中的精确分布和动态变化。徐涛和纪伟课题组开发的 ROSE^[185]和 ROSE-Z^[186]方法利用激光干涉来定位单个荧光分子, 分别提高了单分子定位显微镜 (SMLM) 的横向分辨率和轴向分辨率。SR-FM 的应用广泛^[187, 188], 在用于冷冻样品的同时也被用于传统常温电镜。徐涛和徐平勇课题组开发的新型荧光蛋白 mEosEM^[189, 190]具有出色的热力学稳定性和对 OsO₄ 的抵抗力, 可以在保持生物样品超微结构的同时实现超分辨率成像, 推动了高精度三维光电关联成像在大尺度厚样品中的应用。与常规 cryo-CLEM 技术类似, SR-cryoCLEM 首先将带有荧光标记的样品快速冷冻并在 cryo-FM 下进行超分辨率的荧光成像, 然后将样品转移到冷冻电子显微镜下进行成像。最后, 通过图像处理软件, 将超分辨率光学显微镜图像和冷冻电子显微镜图像进行对齐和整合。2015 年徐涛课题组结合高压冷冻、冷冻切片和单分子定位技术实现了在冷冻条件下对线粒体外膜及相关膜蛋白的纳米水平的观察, 将 SR-cryoCLEM 扩展到对哺乳动物细胞玻璃化切片的研究上^[191]。最近, 孙飞课题组通过引入结构光照明成像技术研制了冷冻结构光照明成像系统 HOPE-SIM, 实现了优于 150 nm 的光镜-聚焦离子束三维关联对齐精度, 对宿主细胞内鼠疱疹病毒和 HeLa 细胞内中心体样品进行了原位结构研究^[192]。利用 SR-cryoCLEM, Moerner 课题组能够在 30nm 精度下对 tomogram 中的三种不同目标蛋白进行荧光定位, 实现了利用荧光信号在 tomogram 中对小蛋白分子的直接注释^[193]。Hess 课题组利用 cryo-SR 技术和 cryo-FIB-SEM 技术对多种细胞进行了全细胞成像, 以三维方式可视化了整个细胞在纳米尺度下的超微结构, 发现了此前未观察到的蛋白质-细胞器空间关系, 包括含有内质网相关蛋白的细胞核内囊泡、小脑神经元之间的网状粘附网络以及根据转录活性进行细分的染色质结构域^[194]。这些研究工作体现了 cryo-SR/FIB-SEM 技术在揭示细胞原生超微结构方面的潜力, 这种意想不到的蛋白质定位模式能够帮助我们理解细胞内部的复杂性。

cryo-CLEM 可以在同一样品上进行多尺度的关联分析, 包括宏观的细胞形态以及微观的分子细节, 这对于理解细胞内部的复杂网络和分子间的相互作用非常有帮助, 有望在细胞生物学研究中发挥更大的作用。目前 cryo-CLEM 面临的最大的技术挑战之一是 z 轴分辨率和 z 轴相关精度。即使是最新的 SR-FM 也只能在 z 轴方向上达到 tomogram 一半厚度左右的分辨率。因此利用 cryo-FM 在 tomogram 中直接定位某些蛋白质仍然具有挑战性。为了提高 lamella 包含感兴趣事件的概率, cryo-FM 和 cryo-FIB-SEM 的 3D 相关精度必须优于典型的 lamella 厚度 (即 <150 nm)。但是目前达到如此高的 3D 相关精度仍是十分困难的事情。另外, 在使用 cryo-SR 时往往需要定制 cryo-FM 设备以完成冷冻状态下的超分辨荧光成像, 并且需要探索不同荧光分子在超分辨冷冻荧光显微镜中的适用性^[195, 196]。基于高对比度的分子标签法和 cryo-CLEM 都极大扩展了 cryo-ET 的应用范围。未来, 基于两种方法的联用能够一次标记和区分多个目标分子, 为解决日益复杂的生物学问题提供了多种选择^[197]。

此外, 原位核磁共振 (in-cell NMR) 技术能够在细胞内研究较小且富集的蛋白的结构动态, 有研究成功地将其与 cryo-ET 结合起来研究膜蛋白的跨膜转运过程^[198]。上述研究方法更关注对细胞内小部分区域进行高清成像, 而 cryo-soft X-ray tomography (cryo-SXT)^[199]有提供细胞器精度的细胞三维成像能力, 能够在全细胞尺度下进行成像, 也有跟 cryo-ET 进行联合成像的应用潜力。对于更高尺度的生物成像, 体电子显微学 (volume electron microscopy, vEM)^[200]无疑是更好的选择。vEM 能够在纳米分辨率下对多细胞进行连续切片成像, 其在脑图谱^[201-203]、早期胚胎发育^[204]等生物学研究中发挥着重要的作用。

除了联合多种成像方法实现更深、更广的可视化, 也可整合不同数据进行结构解释与模型搭建。整合结构生物学技术 (integrative structural biology) 可以将获得的密度图, 过往解析的结构, AlphaFold 预测模型等多种信息整合起来进行综合结构建模。质谱技术与 cryo-ET 都是无标记的、能提供系统组学信息的方法, 两者相得益彰。新兴的质谱技术方法^[205], 如定量质谱 (quantitative MS)^[4], 天然质谱 (native MS)^[206], 单细胞质谱 (single-cell MS)^[207]等能提供大分子丰度、比例、动态变化等重要定量信息。交联质谱技术能够提供氨基酸级别的蛋白-蛋白相互作用信息, 以及大分子复合物的组分与拓扑结构信息^[208]。在 cryo-ET/StA 原位结构研究中, 通常结构分辨率较低 (8 Å - 30 Å) 且细胞内各种蛋白成分无法确定, 因此需要依赖其它辅助信息才能完成模型搭建。Rappsilber 与 Mahamid 课题组首次将 cryo-ET 和原位交联质谱结合起来用于解析细胞内转录-翻译复合物结构, 显示了整合原位结构生物学的可行性^[25]。Cryo-ET 和原位交联质谱也被成功应用到小鼠精子尾部的原位结构研究中^[209]。

3.4 基于人工智能的算法突破

在过去的几年, 人工智能 (artificial intelligence, AI) 技术飞速发展, 正逐步渗透到各行各业, 给传统技术带来了深刻的转型和变革, 也极大的促进了结构生物学的发展。诸如 AlphaFold^[35], RoseTTAFold^[210], OpenFold^[211]

等相关蛋白质结构预测软件的诞生，标志结构生物学发展到了全新的阶段。同样的，人工智能正在改变和加速冷冻电镜相关的数据处理过程，特别是在原位冷冻电镜技术中，AI 无论是在样品制备，数据收集还是数据处理过程中都发挥了极大的作用。尤其在数据处理方面，AI 技术体现了非常出色的性能。cryo-ET 原始图像的信噪比很低、存在缺失楔效应、挑选颗粒困难，需要借助 AI 技术进行图像增强和颗粒挑选；原位结构解析的密度图分辨率一般不高，需要 AI 辅助预测进行蛋白指认或复合体蛋白结构模型搭建；生物样品的原位结构信息非常丰富，需要 AI 技术进行深度数据挖掘；原位解析的结构一般是静态结构，需要借助 AI 技术进行动态模拟和预测，以便更全面地理解分子机制。下面针对这些不同的应用场景进行举例介绍。

良好的样品是数据收集的前提，不同的样品其制备方式通常需要经过多种条件的摸索，这个过程耗时耗力，严重限制了样品制备的效率，而 AI 在自动化样品制备过程中展现出巨大潜力。Chameleon 是第一个在样品制备过程中实时提供载网质量信息的仪器，该仪器一方面通过控制和监控样品冷冻过程中的必要参数（如控制样品浓度，加样体积以及 blot 时间等）来提高制备良好样品的效率，另一方面产生大量的相关数据，深度学习算法使得这些数据可以根据样品的性质推算出相应的制备方案^[212]。这种将样品制备过程从调整样品的生化性质以匹配标准样品制备方案，转向使用样品的生化性质以驱动有效的样品制备策略在理论上可以极大提高样品制备的效率。然而，Chameleon 目前在实际使用过程中仍面临着如无法控制环境温度以及样品存在取向优势等问题，而且还无法直接用于细胞和组织的原位样品制备。在原位样品制备中，尤其是 cryo-FIB 或 lift-out 中往往有大量消耗人力时间的重复操作；并且参数选择复杂，对实验经验有很高要求。一个有巨大潜力的未来方向是将人工智能与硬件开发整合起来，实现全自动化的原位样品制备。除了质量与效率，全自动化的原位样品制备设备对于处理有生物安全要求的临床样品也将有很大益处。

进行数据收集前需要在载网上选择合适的目标区域进行电子成像，相关目标区域的选择通常依靠人为决策来确定，近年来，一些软件开始应用深度学习来自动化选择目标区域。如 Danev R. 课题组开发的 SPACETomo 软件，就是利用深度学习算法自动化完成 lamella 的定位以及目标区域的识别和收集，极大缩短了人工操作的时间，提高了样品收集的效率^[213]。SPACETomo 的效果目前在酵母样品中得到了验证，未来针对其它类型生物样品的深度学习训练会进一步拓宽应用范围。需要注意的是，深度学习算法十分依赖训练数据的数量和质量，相关的自动化软件需要进行大量的训练才能较好的完成目标区域的识别任务。目前来说，即使是最佳的算法其表现也无法超越人为决策。

在图像降噪和数据增强方面，目前基于 AI 技术的方法非常多，如前文提及的基于 noise2noise 的降噪软件 Topaz^[113]和 Cryo-CARE^[115]，两者都是通过从噪声中学习噪声的方法来训练神经网络，从而习得噪声模式，改善图像质量。最近，Xu 课题组开发了一种基于无监督深度学习框架的 DUAL 模型^[214]，DUAL 通过使用循环生成对抗网络和噪声解耦处理原始图像中的噪声和实际结构信息，能够显著提高原始图像的信噪比，增强颗粒挑选的准确性。对于数据增强，除前文提到的 ICON^[116]和 IsoNet^[117]，最近开发的 DeepDeWedge 也可用于 tomogram 降噪和缺失楔重建^[215]。该模型将真实数据集分成两部分作为训练集，并独立地对它们进行 tomogram 生成和 CTF 校正，然后使用 UNet 架构的神经网络在训练集中学习从噪声数据中恢复缺失信息，最后将原始 tomogram 通过训练好的网络进行处理，并将结果重新组合以获得最终的去噪和缺失楔形校正的 tomogram。该软件使用相对复杂的神经网络，可能需要较长的训练时间，并且其对原始数据的依赖可能存在过拟合风险。不同的数据集可能需要尝试不同的方法来进行信息补偿，并且无论是利用何种深度学习架构开发的软件，对缺失楔信息的补偿都存在着不准确的风险，因此处理后的 tomogram 都只能辅助颗粒挑选而不能用于 StA 计算。

在目标颗粒的定位方面（图 3g），基于互相关算法的模板匹配^[129]最早被应用于自动化颗粒挑选，但是模板匹配的精度较低，需要多轮迭代以及后续分类来区分真假阳性。前文提及的 DeepFinder 和 DeepETPicker 利用卷积神经网络来学习和识别 tomogram 中生物大分子的特征和模式，能够自动化识别多种类型的生物大分子，显示出比模板匹配更高的精度和召回率。但这类软件都需要手动标注真实数据集进行模型训练，当训练数据集不够大或者不够多样化时，模型的泛化能力会受到限制。Eltsov 课题组最近提出了模板学习技术（template learning），结合了深度学习在颗粒识别上的准确性以及邻域随机化方法训练模型的便利性，旨在通过综合模拟数据集和真实数据集的训练来提高深度学习挑选颗粒的精度和召回率，但其实际表现依然受限于训练数据集的质量和数量^[216]。基于深度学习的一系列算法和软件的开发在理论上提高了颗粒挑选的效率，但是对于大多数蛋白质来说，通常无法从

真实数据集中手动标注足够的训练集来训练网络，因此模板匹配仍然是最常使用的方法。但是无论是模板匹配还是基于深度学习的种种软件，自动化颗粒挑选的准确度依然不如手动颗粒挑选。

原位结构解析获得的电子密度图通常无法达到很高分辨率，难以准确的结构建模。AI 技术可以从多个角度提高密度图质量。例如，黄胜友课题组通过采用多尺度 UNet 架构，开发了 EMReady 软件，用于改善原始密度图的各向异性，提升原始密度图的质量，有利于后续精确建模^[217]。针对 StA 颗粒中存在的组成和构象上的异质性，前文提到的 cryoDRGN (tomoDRGN) 程序不仅可以重构出生物大分子机器连续的结构变化，同时可以利用训练好的模型捕捉和重建原始密度图的结构特征。

针对原位结构解析的中等分辨率密度图的建模难题，将其它方法解析或者预测的蛋白原子模型拟合到密度图中是最常用的一种做法。EMBuild 集成了 AlphaFold 结构预测和基于快速傅里叶变换的全局拟合等方法共同作用于深度卷积网络预测的主链信息概率图上，能够针对 4-10Å 内的 cryo-ET 密度图进行相对可靠的自动化蛋白质建模^[218]。DomainFit 能够将 AlphaFold 预测的蛋白质结构域半自动拟合到密度图中，从而实现了对蛋白的鉴定，对 3-8Å 分辨率的密度图表现最佳^[219]。如果 cryo-ET 获得的密度图分辨率能够近原子水平，则可以在不依赖其它确定结构的方法下进行从头建模，如 DeepTracer^[219, 220]、CR-I-TASSER^[221]、RosettaES^[222]、MAINMAST^[223]。通过以上方法能够获得在自然状态下原子水平的蛋白质构象，对生物大分子进行原子水平的原位可视化，能够将不同构象下的生物大分子与周围复杂环境相关联，在多尺度理解细胞内不同分子互作网络导致的细胞不同生理状态。这也是可视蛋白质组学中重要的计算方式。

在真实的细胞里，生物大分子通常处于高度动态的变化中。针对原位结构研究中缺乏动态结构信息的问题，人们开发了很多蛋白结构构象变化分析程序。除前文提到的 cryoDRGN 外，还包括基于分子动力学模拟的 MDTOMO，可以分析 sub-tomogram 的连续构象变化^[224]。使用 MDTOMO 分析的 SARS-CoV-2 刺突蛋白数据，揭示了分子的多种构象状态，并发现了与单个 RBD (受体结合域) 开启相关的渐进构象变化。基于三维光流算法 (3D dense optical flow) 的 TomoFlow^[225]和基于正则模态分析 (normal mode analysis, NMA) 的 HEMNMA-3D^[166]软件也同样可以用于分析生物大分子在连续空间中的构象变化。通过将这些构象变化可视化在 cryo-ET 的原位数据上，研究人员更好地理解生物大分子的动态行为和功能。

Cryo-ET 得到的 tomogram 包含丰富的信息，但是目前的颗粒挑选仅关注已知的蛋白或者感兴趣的蛋白，对于 tomogram 中剩下的大量信息挖掘较少，Xu M.课题组提出了一个应用于大规模数据集的无监督深度学习方法 DISCA，能够在无模板无手动标注的情况下无差别的对 tomogram 中的多种质量大小的蛋白分子进行识别和注释^[122]。基于深度度量学习开发的 TomoTwin 程序，能够在拥挤的细胞环境中对多种蛋白进行无需手动标注的颗粒挑选^[226]。这些软件充分地利用了 tomogram 中的信息，能够帮助挖掘有趣的生物问题，有利于推动细胞生物学和可视蛋白质组学的发展。然而，目前开发的大部分软件都不太适合膜蛋白或丝状蛋白的识别，并且不适合拷贝数较少或者分子质量较小的生物大分子。对于这些难以自动注释的蛋白，人工注释仍是必要的。

虽然 cryo-ET 技术本身的复杂性以及数据处理的固有挑战使相关软件的开发十分困难，但是相关的数据处理已逐渐更加智能和高效。随着 AI 和 cryo-ET 相关技术的进一步发展，对整个细胞或亚细胞区域内蛋白质组实现纳米或亚纳米水平的可视化将不再遥不可及 (图 3, i)。

4 总结与展望

原位冷冻电镜技术在解析复杂多组分复合物结构、捕捉细胞内瞬时超分子组装体、发现新的复合物组分蛋白、重构细胞内整体分子结构景观等方面表现出独特的优势与潜力。结构生物学已经跳出分子结构生物学的桎梏，发展为细胞乃至组织的结构生物学。在未来，更好的原位样品制备方法仍将是原位冷冻电镜技术发展的重点，如何最大程度保持细胞与组织样品的原始状态将是其中的关键。除了实验室培养的细胞，对自然环境或临床样本进行更快速高效的原位样品制备将极大促进原位冷冻电镜技术在临床医学等研究中的应用。同时，随着 cryo-CLEM、SR-cryoCLEM、多组学方法、新图像处理算法、AI 结构预测等的不断发展，如何通过软硬件开发有效地整合跨尺度、多模态的数据也将是未来重点发展方向。另外，目前原位结构研究仅能够获得空间信息，如何开发新技术获得时间维度上的信息将是值得探索的方向。最后，为结合 AI 实现“数字细胞”及类似模拟复杂维度生命活动的大

模型, 优质数据共享和新算法开发同样重要。AlphaFold2 的巨大成功是建立在过去几十年积累的大量蛋白质结构数据基础上的。数据尤其是原始数据的共享是原位结构生物学未来发展的基础。仅仅在 EMDB 或 PDB 数据库上分享密度图或原子模型的传统方式已经不足以支持原位数据的多样性与复杂性。尽管已有 EMPIAR 数据库等较成熟的原始数据共享平台, 最近成立的 Cryo-ET Data Portal 也提供了一种共享 tomogram 注释数据的方案, 但鉴于原位数据的复杂性与敏感性, 如何鼓励原位数据分享与建立标准化的数据共享规范等仍然亟需领域内共识。大量高质量注释 tomogram 数据共享将利于催生新的 AI 算法实现原位数据的深入挖掘与整合。

结构生物学的时代方兴未艾!

参考文献

- [1] Nickell S, Kofler C, Leis A P, *et al.* A visual approach to proteomics. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, **7**(3): 225-230. <https://dx.doi.org/10.1038/nrm1861>
- [2] Forster F, Han B G, Beck M. Visual proteomics. *Methods Enzymol*, 2010, **483**(215-243). [https://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879\(10\)83011-3](https://dx.doi.org/10.1016/S0076-6879(10)83011-3)
- [3] Robinson C V, Sali A, Baumeister W. The molecular sociology of the cell. *Nature*, 2007, **450**(7172): 973-982. <https://dx.doi.org/10.1038/nature06523>
- [4] Beck M, Malmstrom J A, Lange V, *et al.* Visual proteomics of the human pathogen *Leptospira interrogans*. *Nat Methods*, 2009, **6**(11): 817-823. <https://dx.doi.org/10.1038/nmeth.1390>
- [5] Guell M, Van Noort V, Yus E, *et al.* Transcriptome complexity in a genome-reduced bacterium. *Science*, 2009, **326**(5957): 1268-1271. <https://dx.doi.org/10.1126/science.1176951>
- [6] Yus E, Maier T, Michalodimitrakis K, *et al.* Impact of genome reduction on bacterial metabolism and its regulation. *Science*, 2009, **326**(5957): 1263-1268. <https://dx.doi.org/10.1126/science.1177263>
- [7] Kuhner S, Van Noort V, Betts M J, *et al.* Proteome organization in a genome-reduced bacterium. *Science*, 2009, **326**(5957): 1235-1240. <https://dx.doi.org/10.1126/science.1176343>
- [8] Beck M, Covino R, Hanelt I, *et al.* Understanding the cell: Future views of structural biology. *Cell*, 2024, **187**(3): 545-562. <https://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2023.12.017>
- [9] Lin D H, Hoelz A. The Structure of the Nuclear Pore Complex (An Update). *Annu Rev Biochem*, 2019, **88**(725-783). <https://dx.doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-011901>
- [10] Tai L, Yin G, Sun F, *et al.* Cryo-electron Microscopy Reveals the Structure of the Nuclear Pore Complex. *J Mol Biol*, 2023, **435**(9): 168051. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2023.168051>
- [11] Beck M, Hurt E. The nuclear pore complex: understanding its function through structural insight. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2017, **18**(2): 73-89. <https://dx.doi.org/10.1038/nrm.2016.147>
- [12] Zhu X, Huang G, Zeng C, *et al.* Structure of the cytoplasmic ring of the *Xenopus laevis* nuclear pore complex. *Science*, 2022, **376**(6598): eabl8280. <https://dx.doi.org/10.1126/science.abl8280>
- [13] Huang G, Zhan X, Zeng C, *et al.* Cryo-EM structure of the inner ring from the *Xenopus laevis* nuclear pore complex. *Cell Res*, 2022, **32**(5): 451-460. <https://dx.doi.org/10.1038/s41422-022-00633-x>
- [14] Huang G, Zhan X, Zeng C, *et al.* Cryo-EM structure of the nuclear ring from *Xenopus laevis* nuclear pore complex. *Cell Res*, 2022, **32**(4): 349-358. <https://dx.doi.org/10.1038/s41422-021-00610-w>
- [15] Mahamid J, Pfeiffer S, Schaffer M, *et al.* Visualizing the molecular sociology at the HeLa cell nuclear periphery. *Science*, 2016, **351**(6276): 969-972. <https://dx.doi.org/10.1126/science.aad8857>
- [16] Zimmerli C E, Allegretti M, Rantos V, *et al.* Nuclear pores dilate and constrict in cellulo. *Science*, 2021, **374**(6573): eabd9776. <https://dx.doi.org/10.1126/science.abd9776>
- [17] Schuller A P, Wojtynek M, Mankus D, *et al.* The cellular environment shapes the nuclear pore complex architecture. *Nature*, 2021, **598**(7882): 667-671. <https://dx.doi.org/10.1038/s41586-021-03985-3>
- [18] Mosalaganti S, Obarska-Kosinska A, Siggel M, *et al.* AI-based structure prediction empowers integrative structural analysis of human nuclear pores. *Science*, 2022, **376**(6598): eabm9506. <https://dx.doi.org/10.1126/science.abm9506>
- [19] Akey C W, Singh D, Ouch C, *et al.* Comprehensive structure and functional adaptations of the yeast nuclear pore complex. *Cell*, 2022, **185**(2): 361-378.e325. <https://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2021.12.015>
- [20] Singh D, Soni N, Hutchings J, *et al.* The Molecular Architecture of the Nuclear Basket. *bioRxiv*, 2024, 2024.2003.2027.587068. <https://dx.doi.org/10.1101/2024.03.27.587068>
- [21] Kreysing J P, Heidari M, Zila V, *et al.* Passage of the HIV capsid cracks the nuclear pore. *bioRxiv*, 2024, 2024.2004.2023.590733. <https://dx.doi.org/10.1101/2024.04.23.590733>

- [22] Kohler R, Mooney R A, Mills D J, *et al.* Architecture of a transcribing-translating expressome. *Science*, 2017, **356**(6334): 194-197. <https://dx.doi.org/10.1126/science.aal3059>
- [23] Wang C, Molodtsov V, Firlar E, *et al.* Structural basis of transcription-translation coupling. *Science*, 2020, eabb5317. <https://dx.doi.org/10.1126/science.abb5317>
- [24] Webster M W, Takacs M, Zhu C, *et al.* Structural basis of transcription-translation coupling and collision in bacteria. *Science*, 2020, eabb5036. <https://dx.doi.org/10.1126/science.abb5036>
- [25] O'reilly F J, Xue L, Graziadei A, *et al.* In-cell architecture of an actively transcribing-translating expressome. *Science*, 2020, **369**(6503): 554-557. <https://dx.doi.org/10.1126/science.abb3758>
- [26] Xu J, Liao C, Yin C C, *et al.* In situ structural insights into the excitation-contraction coupling mechanism of skeletal muscle. *Sci Adv*, 2024, **10**(12): eadl1126. <https://dx.doi.org/10.1126/sciadv.adl1126>
- [27] Wozny M R, Di Luca A, Morado D R, *et al.* In situ architecture of the ER-mitochondria encounter structure. *Nature*, 2023, **618**(7963): 188-192. <https://dx.doi.org/10.1038/s41586-023-06050-3>
- [28] Dietrich H M, Righetto R D, Kumar A, *et al.* Membrane-anchored HDCR nanowires drive hydrogen-powered CO(2) fixation. *Nature*, 2022, **607**(7920): 823-830. <https://dx.doi.org/10.1038/s41586-022-04971-z>
- [29] Hugener J, Xu J, Wettstein R, *et al.* FilamentID reveals the composition and function of metabolic enzyme polymers during gametogenesis. *Cell*, 2024, **187**(13): 3303-3318 e3318. <https://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2024.04.026>
- [30] Ke Z, Oton J, Qu K, *et al.* Structures and distributions of SARS-CoV-2 spike proteins on intact virions. *Nature*, 2020, **588**(7838): 498-502. <https://dx.doi.org/10.1038/s41586-020-2665-2>
- [31] Turonova B, Sikora M, Schurmann C, *et al.* In situ structural analysis of SARS-CoV-2 spike reveals flexibility mediated by three hinges. *Science*, 2020, **370**(6513): 203-208. <https://dx.doi.org/10.1126/science.abd5223>
- [32] Yao H, Song Y, Chen Y, *et al.* Molecular Architecture of the SARS-CoV-2 Virus. *Cell*, 2020, **183**(3): 730-738 e713. <https://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.018>
- [33] Tegunov D, Xue L, Dienemann C, *et al.* Multi-particle cryo-EM refinement with M visualizes ribosome-antibiotic complex at 3.5 Å in cells. *Nat Methods*, 2021, **18**(2): 186-193. <https://dx.doi.org/10.1038/s41592-020-01054-7>
- [34] Tai L, Yin G, Huang X, *et al.* In-cell structural insight into the stability of sperm microtubule doublet. *Cell Discov*, 2023, **9**(1): 116. <https://dx.doi.org/10.1038/s41421-023-00606-3>
- [35] Jumper J, Evans R, Pritzel A, *et al.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*, 2021, **596**(7873): 583-589. <https://dx.doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>
- [36] Abou-Haila A, Tulsiani D R. Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function. *Arch Biochem Biophys*, 2000, **379**(2): 173-182. <https://dx.doi.org/10.1006/abbi.2000.1880>
- [37] Zhou L, Liu H, Liu S, *et al.* Structures of sperm flagellar doublet microtubules expand the genetic spectrum of male infertility. *Cell*, 2023, **186**(13): 2897-2910 e2819. <https://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2023.05.009>
- [38] Linck R W, Chemes H, Albertini D F. The axoneme: the propulsive engine of spermatozoa and cilia and associated ciliopathies leading to infertility. *J Assist Reprod Genet*, 2016, **33**(2): 141-156. <https://dx.doi.org/10.1007/s10815-016-0652-1>
- [39] Lehti M S, Sironen A. Formation and function of sperm tail structures in association with sperm motility defects. *Biol Reprod*, 2017, **97**(4): 522-536. <https://dx.doi.org/10.1093/biolre/iox096>
- [40] Pereira R, Sá R, Barros A, *et al.* Major regulatory mechanisms involved in sperm motility. *Asian J Androl*, 2017, **19**(1): 5-14. <https://dx.doi.org/10.4103/1008-682x.167716>
- [41] Williamson R A, Koehler J K, Smith W D, *et al.* Ultrastructural sperm tail defects associated with sperm immotility. *Fertil Steril*, 1984, **41**(1): 103-107. [https://dx.doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)47549-7](https://dx.doi.org/10.1016/s0015-0282(16)47549-7)
- [42] Leung M R, Zeng J, Wang X, *et al.* Structural specializations of the sperm tail. *Cell*, 2023, **186**(13): 2880-2896.e2817. <https://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2023.05.026>
- [43] Chen Z, Shiozaki M, Haas K M, *et al.* De novo protein identification in mammalian sperm using in situ cryoelectron tomography and AlphaFold2 docking. *Cell*, 2023, **186**(23): 5041-5053.e5019. <https://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2023.09.017>
- [44] Wang Z, Grange M, Wagner T, *et al.* The molecular basis for sarcomere organization in vertebrate skeletal muscle. *Cell*, 2021, **184**(8): 2135-2150 e2113. <https://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2021.02.047>
- [45] Wang Z, Grange M, Pospich S, *et al.* Structures from intact myofibrils reveal mechanism of thin filament regulation through nebulin. *Science*, 2022, **375**(6582): eabn1934. <https://dx.doi.org/10.1126/science.abn1934>
- [46] Tamborini D, Wang Z, Wagner T, *et al.* Structure of the native myosin filament in the relaxed cardiac sarcomere. *Nature*, 2023, **623**(7988): 863-871. <https://dx.doi.org/10.1038/s41586-023-06690-5>
- [47] Brown A, Shao S. Ribosomes and cryo-EM: a duet. *Curr Opin Struct Biol*, 2018, **52**(1-7). <https://dx.doi.org/10.1016/j.sbi.2018.07.001>

- [48] Xue L, Lenz S, Zimmermann-Kogadeeva M, *et al.* Visualizing translation dynamics at atomic detail inside a bacterial cell. *Nature*, 2022, **610**(7930): 205-211. <https://dx.doi.org/10.1038/s41586-022-05255-2>
- [49] Xue L, Spahn C M T, Schacherl M, *et al.* Structural insights into context-dependent inhibitory mechanisms of chloramphenicol in cells. *BioRxiv*, 2023, 544107. <https://dx.doi.org/https://doi.org/10.1101/2023.06.07.544107>
- [50] Hoffmann P C, Kreysing J P, Khusainov I, *et al.* Structures of the eukaryotic ribosome and its translational states in situ. *Nat Commun*, 2022, **13**(1): 7435. <https://dx.doi.org/10.1038/s41467-022-34997-w>
- [51] Xing H, Taniguchi R, Khusainov I, *et al.* Translation dynamics in human cells visualized at high resolution reveal cancer drug action. *Science*, 2023, **381**(6653): 70-75. <https://dx.doi.org/10.1126/science.adh1411>
- [52] Fedry J, Silva J, Vanevic M, *et al.* Visualization of translation reorganization upon persistent ribosome collision stress in mammalian cells. *Mol Cell*, 2024, **84**(6): 1078-1089 e1074. <https://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2024.01.015>
- [53] Dubochet J, Adrian M, Chang J J, *et al.* Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Q Rev Biophys*, 1988, **21**(2): 129-228. <https://dx.doi.org/10.1017/s0033583500004297>
- [54] Dubochet J. The Physics of Rapid Cooling and Its Implications for Cryoimmobilization of Cells. 2007, **79**(7-21). [https://dx.doi.org/10.1016/s0091-679x\(06\)79001-x](https://dx.doi.org/10.1016/s0091-679x(06)79001-x)
- [55] Toro-Nahuelpan M, Zagoriy I, Senger F, *et al.* Tailoring cryo-electron microscopy grids by photo-micropatterning for in-cell structural studies. *Nat Methods*, 2020, **17**(1): 50-54. <https://dx.doi.org/10.1038/s41592-019-0630-5>
- [56] Bauerlein F J B, Saha I, Mishra A, *et al.* In Situ Architecture and Cellular Interactions of PolyQ Inclusions. *Cell*, 2017, **171**(1): 179-187 e110. <https://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2017.08.009>
- [57] Ravelli R B G, Nijpels F J T, Henderikx R J M, *et al.* Cryo-EM structures from sub-nl volumes using pin-printing and jet vitrification. *Nat Commun*, 2020, **11**(1): 2563. <https://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-16392-5>
- [58] Fuest M, Schaffer M, Nocera G M, *et al.* In situ Microfluidic Cryofixation for Cryo Focused Ion Beam Milling and Cryo Electron Tomography. *Sci Rep*, 2019, **9**(1): 19133. <https://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-55413-2>
- [59] Medalia O, Weber I, Frangakis A S, *et al.* Macromolecular architecture in eukaryotic cells visualized by cryoelectron tomography. *Science*, 2002, **298**(5596): 1209-1213. <https://dx.doi.org/10.1126/science.1076184>
- [60] Fassler F, Dimchev G, Hodirna V V, *et al.* Cryo-electron tomography structure of Arp2/3 complex in cells reveals new insights into the branch junction. *Nat Commun*, 2020, **11**(1): 6437. <https://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-20286-x>
- [61] Al-Amoudi A, Studer D, Dubochet J. Cutting artefacts and cutting process in vitreous sections for cryo-electron microscopy. *J Struct Biol*, 2005, **150**(1): 109-121. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2005.01.003>
- [62] Dumoux M, Glen T, Smith J L R, *et al.* Cryo-plasma FIB/SEM volume imaging of biological specimens. *eLife*, 2023, **12**(e83623). <https://dx.doi.org/https://doi.org/10.7554/eLife.83623>
- [63] Berger C, Dumoux M, Glen T, *et al.* Plasma FIB milling for the determination of structures in situ. *Nat Commun*, 2023, **14**(1): 629. <https://dx.doi.org/10.1038/s41467-023-36372-9>
- [64] Tuijtel M W, Cruz-Leon S, Kreysing J P, *et al.* Thinner is not always better: Optimizing cryo-lamellae for subtomogram averaging. *Sci Adv*, 2024, **10**(17): eadk6285. <https://dx.doi.org/10.1126/sciadv.adk6285>
- [65] Lucas B A, Grigorieff N. Quantification of gallium cryo-FIB milling damage in biological lamellae. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2023, **120**(23): e2301852120. <https://dx.doi.org/10.1073/pnas.2301852120>
- [66] Yang Q, Wu C, Zhu D, *et al.* The reduction of FIB damage on cryo-lamella by lowering energy of ion beam revealed by a quantitative analysis. *Structure*, 2023, **31**(10): 1275-1281 e1274. <https://dx.doi.org/10.1016/j.str.2023.07.002>
- [67] Steele A V, Schwarzkopf A, McClelland J J, *et al.* High-brightness Cs focused ion beam from a cold-atomic-beam ion source. *Nano Futures*, 2017, **1**(1): 015005. <https://dx.doi.org/10.1088/2399-1984/aa6a48>
- [68] Tacke S, Erdmann P, Wang Z, *et al.* A streamlined workflow for automated cryo focused ion beam milling. *J Struct Biol*, 2021, **213**(3): 107743. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2021.107743>
- [69] Lau K, Jonker C, Liu J, *et al.* The Undesirable Effects and Impacts of Ice Contamination Experienced in the Cryo-Electron Tomography Workflow and Available Solutions. *Microscopy Today*, 2022, **30**(3): 30-35. <https://dx.doi.org/10.1017/s1551929522000621>
- [70] Zachs T, Schertel A, Medeiros J, *et al.* Fully automated, sequential focused ion beam milling for cryo-electron tomography. *Elife*, 2020, **9**(e52286). <https://dx.doi.org/10.7554/eLife.52286>
- [71] Buckley G, Gervinskis G, Tavenau C, *et al.* Automated cryo-lamella preparation for high-throughput in-situ structural biology. *J Struct Biol*, 2020, **210**(2): 107488. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2020.107488>
- [72] Kuba J, Mitchels J, Hovorka M, *et al.* Advanced cryo-tomography workflow developments - correlative microscopy, milling automation and cryo-lift-out. *J Microsc*, 2021, **281**(2): 112-124. <https://dx.doi.org/10.1111/jmi.12939>

- [73] Klumpe S, Fung H K H, Goetz S K, *et al.* A modular platform for automated cryo-FIB workflows. *Elife*, 2021, **10**(e70506). <https://dx.doi.org/10.7554/eLife.70506>
- [74] Kelley K, Raczkowski A M, Klykov O, *et al.* Waffle Method: A general and flexible approach for improving throughput in FIB-milling. *Nat Commun*, 2022, **13**(1): 1857. <https://dx.doi.org/10.1038/s41467-022-29501-3>
- [75] Zhang J, Zhang D, Sun L, *et al.* VHUT-cryo-FIB, a method to fabricate frozen hydrated lamellae from tissue specimens for in situ cryo-electron tomography. *J Struct Biol*, 2021, **213**(3): 107763. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2021.107763>
- [76] Mahamid J, Schampers R, Persoon H, *et al.* A focused ion beam milling and lift-out approach for site-specific preparation of frozen-hydrated lamellas from multicellular organisms. *J Struct Biol*, 2015, **192**(2): 262-269. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2015.07.012>
- [77] Schaffer M, Pfeffer S, Mahamid J, *et al.* A cryo-FIB lift-out technique enables molecular-resolution cryo-ET within native *Caenorhabditis elegans* tissue. *Nat Methods*, 2019, **16**(8): 757-762. <https://dx.doi.org/10.1038/s41592-019-0497-5>
- [78] Schiotz O H, Kaiser C J O, Klumpe S, *et al.* Serial Lift-Out: sampling the molecular anatomy of whole organisms. *Nat Methods*, 2023, <https://dx.doi.org/10.1038/s41592-023-02113-5>
- [79] Arnold J, Mahamid J, Lucic V, *et al.* Site-Specific Cryo-focused Ion Beam Sample Preparation Guided by 3D Correlative Microscopy. *Biophys J*, 2016, **110**(4): 860-869. <https://dx.doi.org/10.1016/j.bpj.2015.10.053>
- [80] Li S, Ji G, Shi Y, *et al.* High-vacuum optical platform for cryo-CLEM (HOPE): A new solution for non-integrated multiscale correlative light and electron microscopy. *J Struct Biol*, 2018, **201**(1): 63-75. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2017.11.002>
- [81] Fu X, Ning J, Zhong Z, *et al.* AutoCLEM: An Automated Workflow for Correlative Live-Cell Fluorescence Microscopy and Cryo-Electron Tomography. *Sci Rep*, 2019, **9**(1): 19207. <https://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-55766-8>
- [82] Li S, Wang Z, Jia X, *et al.* ELI trifocal microscope: a precise system to prepare target cryo-lamellae for in situ cryo-ET study. *Nat Methods*, 2023, **20**(2): 276-283. <https://dx.doi.org/10.1038/s41592-022-01748-0>
- [83] Li W, Lu J, Xiao K, *et al.* Integrated multimodality microscope for accurate and efficient target-guided cryo-lamellae preparation. *Nat Methods*, 2023, **20**(2): 268-275. <https://dx.doi.org/10.1038/s41592-022-01749-z>
- [84] Silvester E, Vollmer B, Prazak V, *et al.* DNA origami signposts for identifying proteins on cell membranes by electron cryotomography. *Cell*, 2021, **184**(4): 1110-1121 e1116. <https://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2021.01.033>
- [85] Wang Q, Mercogliano C P, Lowe J. A ferritin-based label for cellular electron cryotomography. *Structure*, 2011, **19**(2): 147-154. <https://dx.doi.org/10.1016/j.str.2010.12.002>
- [86] Melia C E, Bolla J R, Katharios-Lanwermyer S, *et al.* Architecture of cell-cell junctions in situ reveals a mechanism for bacterial biofilm inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2021, **118**(31): e2109940118. <https://dx.doi.org/10.1073/pnas.2109940118>
- [87] Yi H, Strauss J D, Ke Z, *et al.* Native immunogold labeling of cell surface proteins and viral glycoproteins for cryo-electron microscopy and cryo-electron tomography applications. *J Histochem Cytochem*, 2015, **63**(10): 780-792. <https://dx.doi.org/10.1369/0022155415593323>
- [88] Tian B, Zhou M, Feng F, *et al.* Cryogenic superresolution correlative light and electron microscopy of vitreous sections. *Biophys Rep*, 2022, **8**(4): 193-204. <https://dx.doi.org/10.52601/bpr.2022.220005>
- [89] Schorb M, Haberbosch I, Hagen W J H, *et al.* Software tools for automated transmission electron microscopy. *Nat Methods*, 2019, **16**(6): 471-477. <https://dx.doi.org/10.1038/s41592-019-0396-9>
- [90] Hagen W J H, Wan W, Briggs J A G. Implementation of a cryo-electron tomography tilt-scheme optimized for high resolution subtomogram averaging. *J Struct Biol*, 2017, **197**(2): 191-198. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2016.06.007>
- [91] Turonova B, Hagen W J H, Obr M, *et al.* Benchmarking tomographic acquisition schemes for high-resolution structural biology. *Nat Commun*, 2020, **11**(1): 876. <https://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-14535-2>
- [92] Wu C, Huang X, Cheng J, *et al.* High-quality, high-throughput cryo-electron microscopy data collection via beam tilt and astigmatism-free beam-image shift. *J Struct Biol*, 2019, **208**(3): 107396. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2019.09.013>
- [93] Bouvette J, Liu H F, Du X, *et al.* Beam image-shift accelerated data acquisition for near-atomic resolution single-particle cryo-electron tomography. *Nat Commun*, 2021, **12**(1): 1957. <https://dx.doi.org/10.1038/s41467-021-22251-8>
- [94] Khavnekar S, Wan W, Majumder P, *et al.* Multishot tomography for high-resolution in situ subtomogram averaging. *J Struct Biol*, 2023, **215**(1): 107911. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2022.107911>
- [95] Chreifi G, Chen S, Metskas L A, *et al.* Rapid tilt-series acquisition for electron cryotomography. *J Struct Biol*,

2019, **205**(2): 163-169. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2018.12.008>

[96] Eisenstein F, Yanagisawa H, Kashihara H, *et al.* Parallel cryo electron tomography on in situ lamellae. *Nat Methods*, 2023, **20**(1): 131-138. <https://dx.doi.org/10.1038/s41592-022-01690-1>

[97] Fukuda Y, Laugks U, Lucic V, *et al.* Electron cryotomography of vitrified cells with a Volta phase plate. *J Struct Biol*, 2015, **190**(2): 143-154. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2015.03.004>

[98] Khoshouei M, Pfeffer S, Baumeister W, *et al.* Subtomogram analysis using the Volta phase plate. *J Struct Biol*, 2017, **197**(2): 94-101. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2016.05.009>

[99] Schwartz O, Axelrod J J, Campbell S L, *et al.* Laser phase plate for transmission electron microscopy. *Nat Methods*, 2019, **16**(10): 1016-1020. <https://dx.doi.org/10.1038/s41592-019-0552-2>

[100] Chua E Y D, Alink L M, Kopylov M, *et al.* Square beams for optimal tiling in transmission electron microscopy. *Nat Methods*, 2024, **21**(4): 562-565. <https://dx.doi.org/10.1038/s41592-023-02161-x>

[101] Peck A, Carter S D, Mai H, *et al.* Montage electron tomography of vitrified specimens. *J Struct Biol*, 2022, 107860. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2022.107860>

[102] Yang J E, Larson M R, Sibert B S, *et al.* Correlative montage parallel array cryo-tomography for in situ structural cell biology. *Nat Methods*, 2023, **20**(10): 1537-1543. <https://dx.doi.org/10.1038/s41592-023-01999-5>

[103] Burt A, Gaifas L, Dendooven T, *et al.* A flexible framework for multi-particle refinement in cryo-electron tomography. *PLoS Biol*, 2021, **19**(8): e3001319. <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.3001319>

[104] Mastronarde D N, Held S R. Automated tilt series alignment and tomographic reconstruction in IMOD. *J Struct Biol*, 2017, **197**(2): 102-113. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2016.07.011>

[105] Ni T, Frosio T, Mendonca L, *et al.* High-resolution in situ structure determination by cryo-electron tomography and subtomogram averaging using emClarity. *Nat Protoc*, 2022, **17**(2): 421-444. <https://dx.doi.org/10.1038/s41596-021-00648-5>

[106] Chen M, Bell J M, Shi X, *et al.* A complete data processing workflow for cryo-ET and subtomogram averaging. *Nat Methods*, 2019, **16**(11): 1161-1168. <https://dx.doi.org/10.1038/s41592-019-0591-8>

[107] Zheng S, Wolff G, Greenan G, *et al.* AreTomo: An integrated software package for automated marker-free, motion-corrected cryo-electron tomographic alignment and reconstruction. *J Struct Biol X*, 2022, **6**(100068). <https://dx.doi.org/10.1016/j.yjsbx.2022.100068>

[108] Orlova E V, Saibil H R. Structural analysis of macromolecular assemblies by electron microscopy. *Chem Rev*, 2011, **111**(12): 7710-7748. <https://dx.doi.org/10.1021/cr100353t>

[109] Yan R, Venkatakrishnan S V, Liu J, *et al.* MBIR: A cryo-ET 3D reconstruction method that effectively minimizes missing wedge artifacts and restores missing information. *J Struct Biol*, 2019, **206**(2): 183-192. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2019.03.002>

[110] Geng Z, She Z, Zhou Q, *et al.* NUDIM: A non-uniform fast Fourier transform based dual-space constraint iterative reconstruction method in biological electron tomography. *J Struct Biol*, 2021, **213**(3): 107770. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2021.107770>

[111] Bohning J, Bharat T a M, Collins S M. Compressed sensing for electron cryotomography and high-resolution subtomogram averaging of biological specimens. *Structure*, 2022, **30**(3): 408-417 e404. <https://dx.doi.org/10.1016/j.str.2021.12.010>

[112] Tegunov D, Cramer P. Real-time cryo-electron microscopy data preprocessing with Warp. *Nat Methods*, 2019, **16**(11): 1146-1152. <https://dx.doi.org/10.1038/s41592-019-0580-y>

[113] Bepko T, Kelley K, Noble A J, *et al.* Topaz-Denoise: general deep denoising models for cryoEM and cryoET. *Nat Commun*, 2020, **11**(1): 5208. <https://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-18952-1>

[114] Lehtinen J, Munkberg J, Hasselgren J, *et al.* Noise2Noise: Learning Image Restoration without Clean Data. *Pr Mach Learn Res*, 2018, **80**

[115] Buchholz T O, Jordan M, Pigino G, *et al.* Cryo-CARE: Content-Aware Image Restoration for Cryo-Transmission Electron Microscopy Data. *I S Biomed Imaging*, 2019, 502-506. <https://dx.doi.org/10.1109/isbi.2019.8759519>

[116] Deng Y, Chen Y, Zhang Y, *et al.* ICON: 3D reconstruction with 'missing-information' restoration in biological electron tomography. *J Struct Biol*, 2016, **195**(1): 100-112. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2016.04.004>

[117] Liu Y T, Zhang H, Wang H, *et al.* Isotropic reconstruction for electron tomography with deep learning. *Nat Commun*, 2022, **13**(1): 6482. <https://dx.doi.org/10.1038/s41467-022-33957-8>

[118] Zhai X, Lei D, Zhang M, *et al.* LoTToR: An Algorithm for Missing-Wedge Correction of the Low-Tilt Tomographic 3D Reconstruction of a Single-Molecule Structure. *Sci Rep*, 2020, **10**(1): 10489. <https://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-66793-1>

[119] Jasnin M, Beck F, Ecke M, *et al.* The Architecture of Traveling Actin Waves Revealed by Cryo-Electron Tomography. *Structure*, 2019, **27**(8): 1211-1223 e1215. <https://dx.doi.org/10.1016/j.str.2019.05.009>

- [120] Chen M, Dai W, Sun S Y, *et al.* Convolutional neural networks for automated annotation of cellular cryo-electron tomograms. *Nat Methods*, 2017, **14**(10): 983-985. <https://dx.doi.org/10.1038/nmeth.4405>
- [121] De Teresa-Trueba I, Goetz S K, Mattausch A, *et al.* Convolutional networks for supervised mining of molecular patterns within cellular context. *Nature Methods*, 2023, **20**(2): 284-294. <https://dx.doi.org/10.1038/s41592-022-01746-2>
- [122] Zeng X, Kahng A, Xue L, *et al.* High-throughput cryo-ET structural pattern mining by unsupervised deep iterative subtomogram clustering. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2023, **120**(15): e2213149120. <https://dx.doi.org/10.1073/pnas.2213149120>
- [123] Beck M, Forster F, Ecke M, *et al.* Nuclear pore complex structure and dynamics revealed by cryoelectron tomography. *Science*, 2004, **306**(5700): 1387-1390. <https://dx.doi.org/10.1126/science.1104808>
- [124] Forster F, Medalia O, Zauberman N, *et al.* Retrovirus envelope protein complex structure in situ studied by cryo-electron tomography. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, **102**(13): 4729-4734. <https://dx.doi.org/10.1073/pnas.0409178102>
- [125] Wan W, Briggs J A. Cryo-Electron Tomography and Subtomogram Averaging. *Methods Enzymol*, 2016, **579**(329-367). <https://dx.doi.org/10.1016/bs.mie.2016.04.014>
- [126] Castano-Diez D, Kudryashev M, Arheit M, *et al.* Dynamo: a flexible, user-friendly development tool for subtomogram averaging of cryo-EM data in high-performance computing environments. *J Struct Biol*, 2012, **178**(2): 139-151. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2011.12.017>
- [127] Martinez-Sanchez A, Kochovski Z, Laugks U, *et al.* Template-free detection and classification of membrane-bound complexes in cryo-electron tomograms. *Nat Methods*, 2020, **17**(2): 209-216. <https://dx.doi.org/10.1038/s41592-019-0675-5>
- [128] Gaifas L, Kirchner M A, Timmins J, *et al.* Blik is an extensible 3D visualisation tool for the annotation and analysis of cryo-electron tomography data. *PLoS Biol*, 2024, **22**(4): e3002447. <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.3002447>
- [129] Bohm J, Frangakis A S, Hegerl R, *et al.* Toward detecting and identifying macromolecules in a cellular context: template matching applied to electron tomograms. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, **97**(26): 14245-14250. <https://dx.doi.org/10.1073/pnas.230282097>
- [130] Ortiz J O, Forster F, Kurner J, *et al.* Mapping 70S ribosomes in intact cells by cryoelectron tomography and pattern recognition. *J Struct Biol*, 2006, **156**(2): 334-341. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2006.04.014>
- [131] Hrabe T, Chen Y, Pfeiffer S, *et al.* PyTom: a python-based toolbox for localization of macromolecules in cryo-electron tomograms and subtomogram analysis. *J Struct Biol*, 2012, **178**(2): 177-188. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2011.12.003>
- [132] Cruz-Leon S, Majtner T, Hoffmann P C, *et al.* High-confidence 3D template matching for cryo-electron tomography. *Nat Commun*, 2024, **15**(1): 3992. <https://dx.doi.org/10.1038/s41467-024-47839-8>
- [133] Lucas B A, Himes B A, Xue L, *et al.* Locating Macromolecular Assemblies in Cells by 2D Template Matching with cisTEM. *eLife*, 2021, **10**(e68946). <https://dx.doi.org/10.7554/eLife.68946>
- [134] Moebel E, Martinez-Sanchez A, Lamm L, *et al.* Deep learning improves macromolecule identification in 3D cellular cryo-electron tomograms (vol 18, pg 1386, 2021). *Nature Methods*, 2022, **19**(1): 129-129. <https://dx.doi.org/10.1038/s41592-021-01349-3>
- [135] Liu G, Niu T, Qiu M, *et al.* DeepETPicker: Fast and accurate 3D particle picking for cryo-electron tomography using weakly supervised deep learning. *Nat Commun*, 2024, **15**(1): 2090. <https://dx.doi.org/10.1038/s41467-024-46041-0>
- [136] Wagner T, Merino F, Stabrin M, *et al.* SPHIRE-crYOLO is a fast and accurate fully automated particle picker for cryo-EM. *Commun Biol*, 2019, **2**(218). <https://dx.doi.org/10.1038/s42003-019-0437-z>
- [137] Genthe E, Miletic S, Tekkali I, *et al.* PickYOLO: Fast deep learning particle detector for annotation of cryo electron tomograms. *J Struct Biol*, 2023, **215**(3): 107990. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2023.107990>
- [138] Gubins I, Schot G V D, Veltkamp R C, *et al.* SHREC'19 Track: Classification in Cryo-Electron Tomograms; proceedings of the Eurographics Workshop on 3D Object Retrieval, F, 2019 [C].
- [139] Nickell S, Forster F, Linaroudis A, *et al.* TOM software toolbox: acquisition and analysis for electron tomography. *J Struct Biol*, 2005, **149**(3): 227-234. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2004.10.006>
- [140] Bharat T A, Scheres S H. Resolving macromolecular structures from electron cryo-tomography data using subtomogram averaging in RELION. *Nat Protoc*, 2016, **11**(11): 2054-2065. <https://dx.doi.org/10.1038/nprot.2016.124>
- [141] De Rosier D J, Klug A. Reconstruction of three dimensional structures from electron micrographs. *Nature*, 1968, **217**(5124): 130-134. <https://dx.doi.org/10.1038/217130a0>
- [142] Himes B A, Zhang P. emClarity: software for high-resolution cryo-electron tomography and subtomogram

averaging. *Nat Methods*, 2018, **15**(11): 955-961. <https://dx.doi.org/10.1038/s41592-018-0167-z>

[143] Chen M, Shi X, Yu Z, *et al.* In situ structure of the AcrAB-TolC efflux pump at subnanometer resolution. *Structure*, 2021, 107–113.e103. <https://dx.doi.org/10.1016/j.str.2021.08.008>

[144] Liu H F, Zhou Y, Huang Q, *et al.* nextPYP: a comprehensive and scalable platform for characterizing protein variability in situ using single-particle cryo-electron tomography. *Nat Methods*, 2023, **20**(12): 1909-1919. <https://dx.doi.org/10.1038/s41592-023-02045-0>

[145] Zivanov J, Otón J, Ke Z L, *et al.* A Bayesian approach to single-particle electron cryo-tomography in RELION-4.0. *Elife*, 2022, **11**(e83724). <https://dx.doi.org/10.7554/eLife.83724>

[146] Ni T, Sun Y, Burn W, *et al.* Structure and assembly of cargo Rubisco in two native alpha-carboxysomes. *Nat Commun*, 2022, **13**(1): 4299. <https://dx.doi.org/10.1038/s41467-022-32004-w>

[147] Bharat T a M, Russo C J, Lowe J, *et al.* Advances in Single-Particle Electron Cryomicroscopy Structure Determination applied to Sub-tomogram Averaging. *Structure*, 2015, **23**(9): 1743-1753. <https://dx.doi.org/10.1016/j.str.2015.06.026>

[148] Turonova B, Schur F K M, Wan W, *et al.* Efficient 3D-CTF correction for cryo-electron tomography using NovaCTF improves subtomogram averaging resolution to 3.4Å. *J Struct Biol*, 2017, **199**(3): 187-195. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2017.07.007>

[149] Kunz M, Frangakis A S. Three-dimensional CTF correction improves the resolution of electron tomograms. *J Struct Biol*, 2017, **197**(2): 114-122. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2016.06.016>

[150] Li X, Mooney P, Zheng S, *et al.* Electron counting and beam-induced motion correction enable near-atomic-resolution single-particle cryo-EM. *Nat Methods*, 2013, **10**(6): 584-590. <https://dx.doi.org/10.1038/nmeth.2472>

[151] Grant T, Grigorieff N. Measuring the optimal exposure for single particle cryo-EM using a 2.6 Å reconstruction of rotavirus VP6. *Elife*, 2015, **4**(e06980). <https://dx.doi.org/10.7554/eLife.06980>

[152] Schur F K, Obr M, Hagen W J, *et al.* An atomic model of HIV-1 capsid-SP1 reveals structures regulating assembly and maturation. *Science*, 2016, **353**(6298): 506-508. <https://dx.doi.org/10.1126/science.aaf9620>

[153] Bartesaghi A, Lecumberry F, Sapiro G, *et al.* Protein secondary structure determination by constrained single-particle cryo-electron tomography. *Structure*, 2012, **20**(12): 2003-2013. <https://dx.doi.org/10.1016/j.str.2012.10.016>

[154] Scheres S H. Beam-induced motion correction for sub-megadalton cryo-EM particles. *Elife*, 2014, **3**(e03665). <https://dx.doi.org/10.7554/eLife.03665>

[155] Mattei S, Glass B, Hagen W J, *et al.* The structure and flexibility of conical HIV-1 capsids determined within intact virions. *Science*, 2016, **354**(6318): 1434-1437. <https://dx.doi.org/10.1126/science.aah4972>

[156] Jiménez De La Morena J, Conesa P, Fonseca Y C, *et al.* ScipionTomo: Towards cryo-electron tomography software integration, reproducibility, and validation. *J Struct Biol*, 2022, **214**(3): 107872. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2022.107872>

[157] Balyschew N, Yushkevich A, Mikirtumov V, *et al.* Streamlined structure determination by cryo-electron tomography and subtomogram averaging using TomoBEAR. *Nat Commun*, 2023, **14**(1): 6543. <https://dx.doi.org/10.1038/s41467-023-42085-w>

[158] Khavnekar S, Erdmann P S, Wan W. TOMOMAN: a software package for large scale cryo-electron tomography data preprocessing, community data sharing, and collaborative computing. *bioRxiv*, 2024, 589639. <https://dx.doi.org/10.1101/2024.05.02.589639>

[159] Wang H, Liao S, Yu X, *et al.* TomoNet: A streamlined cryoET software pipeline with automatic particle picking on flexible lattices. *bioRxiv*, 2024, 580557. <https://dx.doi.org/10.1101/2024.02.17.580557>

[160] Sanchez R M, Zhang Y, Chen W, *et al.* Subnanometer-resolution structure determination in situ by hybrid subtomogram averaging - single particle cryo-EM. *Nat Commun*, 2020, **11**(1): 3709. <https://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-17466-0>

[161] Song K, Shang Z, Fu X, *et al.* In situ structure determination at nanometer resolution using TYGRESS. *Nat Methods*, 2020, **17**(2): 201-208. <https://dx.doi.org/10.1038/s41592-019-0651-0>

[162] You X, Zhang X, Cheng J, *et al.* In situ structure of the red algal phycobilisome-PSII-PSI-LHC megacomplex. *Nature*, 2023, **616**(7955)(199–206). <https://dx.doi.org/10.1038/s41586-023-05831-0>

[163] Zheng W, Chai P, Zhu J, *et al.* High-resolution in situ structures of mammalian respiratory supercomplexes. *Nature*, 2024, **631**(8019)(232-239). <https://dx.doi.org/10.1038/s41586-024-07488-9>

[164] Cheng J, Li B, Si L, *et al.* Determining structures in a native environment using single-particle cryoelectron microscopy images. *Innovation (Camb)*, 2021, **2**(4): 100166. <https://dx.doi.org/10.1016/j.xinn.2021.100166>

[165] Lucas B A, Zhang K, Loerch S, *et al.* In situ single particle classification reveals distinct 60S maturation intermediates in cells. *Elife*, 2022, **11**(e79272). <https://dx.doi.org/10.7554/eLife.79272>

[166] Harastani M, Eltsov M, Leforestier A, *et al.* HEMNMA-3D: Cryo Electron Tomography Method Based on

- Normal Mode Analysis to Study Continuous Conformational Variability of Macromolecular Complexes. *Front Mol Biosci*, 2021, **8**(663121). <https://dx.doi.org/10.3389/fmolb.2021.663121>
- [167] Zhang H, Li Y, Liu Y, *et al.* A method for restoring signals and revealing individual macromolecule states in cryo-ET, REST. *Nat Commun*, 2023, **14**(1): 2937. <https://dx.doi.org/10.1038/s41467-023-38539-w>
- [168] Rangan R, Feathers R, Khavnekar S, *et al.* CryoDRGN-ET: deep reconstructing generative networks for visualizing dynamic biomolecules inside cells. *Nat Methods*, 2024, **21**(8): 1537-1545. <https://dx.doi.org/10.1038/s41592-024-02340-4>
- [169] Powell B M, Davis J H. Learning structural heterogeneity from cryo-electron sub-tomograms with tomoDRGN. *Nat Methods*, 2024, **21**(8): 1525-1536. <https://dx.doi.org/10.1038/s41592-024-02210-z>
- [170] Liu S, Hoess P, Ries J. Super-Resolution Microscopy for Structural Cell Biology. *Annu Rev Biophys*, 2022, **51**(301-326). <https://dx.doi.org/10.1146/annurev-biophys-102521-112912>
- [171] Guo Q, Lehmer C, Martinez-Sanchez A, *et al.* In Situ Structure of Neuronal C9orf72 Poly-GA Aggregates Reveals Proteasome Recruitment. *Cell*, 2018, **172**(4): 696-705 e612. <https://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2017.12.030>
- [172] Albert S, Wietrzynski W, Lee C W, *et al.* Direct visualization of degradation microcompartments at the ER membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2020, **117**(2): 1069-1080. <https://dx.doi.org/10.1073/pnas.1905641117>
- [173] Ermel U H, Arghittu S M, Frangakis A S. ArtiaX: An electron tomography toolbox for the interactive handling of sub-tomograms in UCSF ChimeraX. *Protein Sci*, 2022, **31**(12): e4472. <https://dx.doi.org/10.1002/pro.4472>
- [174] Dimchev G, Amiri B, Fassler F, *et al.* Computational toolbox for ultrastructural quantitative analysis of filament networks in cryo-ET data. *J Struct Biol*, 2021, 107808. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2021.107808>
- [175] Jiang W, Wagner J, Du W, *et al.* A transformation clustering algorithm and its application in polyribosomes structural profiling. *Nucleic Acids Res*, 2022, **50**(16): 9001-9011. <https://dx.doi.org/10.1093/nar/gkac547>
- [176] Thornburg Z R, Bianchi D M, Brier T A, *et al.* Fundamental behaviors emerge from simulations of a living minimal cell. *Cell*, 2022, **185**(2): 345-360 e328. <https://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2021.12.025>
- [177] Vijayakrishnan S. In Situ Imaging of Virus-Infected Cells by Cryo-Electron Tomography: An Overview. *Subcell Biochem*, 2023, **106**(3-36). https://dx.doi.org/10.1007/978-3-031-40086-5_1
- [178] Sexton D L, Burgold S, Schertel A, *et al.* Super-resolution confocal cryo-CLEM with cryo-FIB milling for in situ imaging of *Deinococcus radiodurans*. *Curr Res Struct Biol*, 2022, **4**(1-9). <https://dx.doi.org/10.1016/j.crstbi.2021.12.001>
- [179] Loginov S V, Fermie J, Fokkema J, *et al.* Correlative Organelle Microscopy: Fluorescence Guided Volume Electron Microscopy of Intracellular Processes. *Front Cell Dev Biol*, 2022, **10**(829545). <https://dx.doi.org/10.3389/fcell.2022.829545>
- [180] Klein S, Wimmer B H, Winter S L, *et al.* Post-correlation on-lamella cryo-CLEM reveals the membrane architecture of lamellar bodies. *Commun Biol*, 2021, **4**(1): 137. <https://dx.doi.org/10.1038/s42003-020-01567-z>
- [181] Kirchweyer P, Mullick D, Swain P P, *et al.* Correlating cryo-super resolution radial fluctuations and dual-axis cryo-scanning transmission electron tomography to bridge the light-electron resolution gap. *J Struct Biol*, 2023, **215**(3): 107982. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2023.107982>
- [182] 李尉兴, 谷陆生, 徐晓君, *et al.* 综述: 冷冻超分辨光电融合成像技术 ——新挑战, 新机遇. *生物化学与生物物理进展*, 2018, **45**(9): 957-960.
- [183] Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, *et al.* Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science*, 2006, **313**(5793): 1642-1645. <https://dx.doi.org/10.1126/science.1127344>
- [184] Rust M J, Bates M, Zhuang X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat Methods*, 2006, **3**(10): 793-795. <https://dx.doi.org/10.1038/nmeth929>
- [185] Gu L, Li Y, Zhang S, *et al.* Molecular resolution imaging by repetitive optical selective exposure. *Nat Methods*, 2019, **16**(11): 1114-1118. <https://dx.doi.org/10.1038/s41592-019-0544-2>
- [186] Gu L, Li Y, Zhang S, *et al.* Molecular-scale axial localization by repetitive optical selective exposure. *Nat Methods*, 2021, **18**(4): 369-373. <https://dx.doi.org/10.1038/s41592-021-01099-2>
- [187] Li Y, Xue Y, Xu X, *et al.* A mitochondrial FUNDC1/HSC70 interaction organizes the proteostatic stress response at the risk of cell morbidity. *EMBO J*, 2019, **38**(3): e98786. <https://dx.doi.org/10.15252/emboj.201798786>
- [188] Ren R, Deng L, Xue Y, *et al.* Visualization of aging-associated chromatin alterations with an engineered TALE system. *Cell Res*, 2017, **27**(4): 483-504. <https://dx.doi.org/10.1038/cr.2017.18>
- [189] Fu Z, Peng D, Zhang M, *et al.* mEosEM withstands osmium staining and Epon embedding for super-resolution CLEM. *Nat Methods*, 2020, **17**(1): 55-58. <https://dx.doi.org/10.1038/s41592-019-0613-6>
- [190] Peng D, Li N, He W, *et al.* Improved Fluorescent Proteins for Dual-Colour Post-Embedding CLEM. *Cells*, 2022, **11**(7): 1077. <https://dx.doi.org/10.3390/cells11071077>
- [191] Liu B, Xue Y, Zhao W, *et al.* Three-dimensional super-resolution protein localization correlated with vitrified

cellular context. Sci Rep, 2015, 5(13017). <https://dx.doi.org/10.1038/srep13017>

- [192] Li S, Jia X, Niu T, *et al.* HOPE-SIM, a cryo-structured illumination fluorescence microscopy system for accurately targeted cryo-electron tomography. Commun Biol, 2023, 6(1): 474. <https://dx.doi.org/10.1038/s42003-023-04850-x>
- [193] Dahlberg P D, Saurabh S, Sartor A M, *et al.* Cryogenic single-molecule fluorescence annotations for electron tomography reveal in situ organization of key proteins in *Caulobacter*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2020, 117(25): 13937-13944. <https://dx.doi.org/10.1073/pnas.2001849117>
- [194] Hoffman D P, Shtengel G, Xu C S, *et al.* Correlative three-dimensional super-resolution and block-face electron microscopy of whole vitreously frozen cells. Science, 2020, 367(6475): eaaz5357. <https://dx.doi.org/10.1126/science.aaz5357>
- [195] Last M G F, Voortman L M, Sharp T H. scNodes: a correlation and processing toolkit for super-resolution fluorescence and electron microscopy. Nat Methods, 2023, 20(10): 1445-1446. <https://dx.doi.org/10.1038/s41592-023-01991-z>
- [196] Last M G F, Noteborn W E M, Voortman L M, *et al.* Super-resolution fluorescence imaging of cryosamples does not limit achievable resolution in cryoEM. J Struct Biol, 2023, 215(4): 108040. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jsb.2023.108040>
- [197] Fung H K H, Hayashi Y, Salo V T, *et al.* Genetically encoded multimeric tags for subcellular protein localization in cryo-EM. Nat Methods, 2023, 20(12): 1900-1908. <https://dx.doi.org/10.1038/s41592-023-02053-0>
- [198] Baker L A, Sinnige T, Schellenberger P, *et al.* Combined (1)H-Detected Solid-State NMR Spectroscopy and Electron Cryotomography to Study Membrane Proteins across Resolutions in Native Environments. Structure, 2018, 26(1): 161-170 e163. <https://dx.doi.org/10.1016/j.str.2017.11.011>
- [199] Harkiolaki M, Darrow M C, Spink M C, *et al.* Cryo-soft X-ray tomography: using soft X-rays to explore the ultrastructure of whole cells. Emerg Top Life Sci, 2018, 2(1): 81-92. <https://dx.doi.org/10.1042/ETLS20170086>
- [200] Peddie C J, Genoud C, Kreshuk A, *et al.* Volume electron microscopy. Nat Rev Methods Primers, 2022, 2(51). <https://dx.doi.org/10.1038/s43586-022-00131-9>
- [201] Winding M, Pedigo B D, Barnes C L, *et al.* The connectome of an insect brain. Science, 2023, 379(6636): eadd9330. <https://dx.doi.org/10.1126/science.add9330>
- [202] Scheffer L K, Xu C S, Januszewski M, *et al.* A connectome and analysis of the adult *Drosophila* central brain. Elife, 2020, 9(e57443). <https://dx.doi.org/10.7554/eLife.57443>
- [203] Loomba S, Straehle J, Gangadharan V, *et al.* Connectomic comparison of mouse and human cortex. Science, 2022, 377(6602): eabo0924. <https://dx.doi.org/10.1126/science.abo0924>
- [204] Hawdon A, Geoghegan N D, Mohenska M, *et al.* Apicobasal RNA asymmetries regulate cell fate in the early mouse embryo. Nat Commun, 2023, 14(1): 2909. <https://dx.doi.org/10.1038/s41467-023-38436-2>
- [205] Lossl P, Van De Waterbeemd M, Heck A J. The diverse and expanding role of mass spectrometry in structural and molecular biology. EMBO J, 2016, 35(24): 2634-2657. <https://dx.doi.org/10.15252/emboj.201694818>
- [206] Von Kugelgen A, Tang H, Hardy G G, *et al.* In Situ Structure of an Intact Lipopolysaccharide-Bound Bacterial Surface Layer. Cell, 2020, 180(2): 348-358 e315. <https://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2019.12.006>
- [207] Slavov N. Unpicking the proteome in single cells. Science, 2020, 367(6477): 512-513. <https://dx.doi.org/10.1126/science.aaz6695>
- [208] Graziadei A, Rappsilber J. Leveraging crosslinking mass spectrometry in structural and cell biology. Structure, 2022, 30(1): 37-54. <https://dx.doi.org/10.1016/j.str.2021.11.007>
- [209] Leung M R, Zenezini Chiozzi R, Roelofs M C, *et al.* In-cell structures of conserved supramolecular protein arrays at the mitochondria-cytoskeleton interface in mammalian sperm. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2021, 118(45): e2110996118. <https://dx.doi.org/10.1073/pnas.2110996118>
- [210] Baek M, Dimaio F, Anishchenko I, *et al.* Accurate prediction of protein structures and interactions using a three-track neural network. Science, 2021, 373(6557): 871-876. <https://dx.doi.org/10.1126/science.abj8754>
- [211] Ahdriz G, Bouatta N, Floristean C, *et al.* OpenFold: retraining AlphaFold2 yields new insights into its learning mechanisms and capacity for generalization. Nat Methods, 2024, 21(8): 1514-1524. <https://dx.doi.org/10.1038/s41592-024-02272-z>
- [212] Levitz T S, Weckener M, Fong I, *et al.* Approaches to Using the Chameleon: Robust, Automated, Fast-Plunge cryoEM Specimen Preparation. Front Mol Biosci, 2022, 9(903148). <https://dx.doi.org/10.3389/fmolb.2022.903148>
- [213] Eisenstein F, Fukuda Y, Danev R. Smart Parallel Automated Cryo Electron tomography. bioRxiv, 2023, 2023.2012.2014.571776. <https://dx.doi.org/10.1101/2023.12.14.571776>
- [214] Zeng X, Ding Y, Zhang Y, *et al.* DUAL: deep unsupervised simultaneous simulation and denoising for cryo-electron tomography. bioRxiv, 2024, 583135. <https://dx.doi.org/10.1101/2024.03.02.583135>
- [215] Wiedemann S, Heckel R. A Deep Learning Method for Simultaneous Denoising and Missing Wedge

- Reconstruction in Cryogenic Electron Tomography. arXiv preprint arXiv:231105539, 2023, <https://dx.doi.org/https://doi.org/10.48550/arXiv.2311.05539>
- [216] Harastani M, Patra G, Kervrann C, *et al.* Template Learning: Deep Learning with Domain Randomization for Particle Picking in Cryo-Electron Tomography. bioRxiv, 2024, 2024.2003. 2020.585905. <https://dx.doi.org/10.1101/2024.03.20.585905>
- [217] He J, Li T, Huang S Y. Improvement of cryo-EM maps by simultaneous local and non-local deep learning. Nat Commun, 2023, **14**(1): 3217. <https://dx.doi.org/10.1038/s41467-023-39031-1>
- [218] He J, Lin P, Chen J, *et al.* Model building of protein complexes from intermediate-resolution cryo-EM maps with deep learning-guided automatic assembly. Nat Commun, 2022, **13**(1): 4066. <https://dx.doi.org/10.1038/s41467-022-31748-9>
- [219] Gao J, Tong M, Lee C, *et al.* DomainFit: Identification of protein domains in cryo-EM maps at intermediate resolution using AlphaFold2-predicted models. Structure, 2024, **32**(8): 1248-1259 e1245. <https://dx.doi.org/10.1016/j.str.2024.04.017>
- [220] Nakamura A, Meng H, Zhao M, *et al.* Fast and automated protein-DNA/RNA macromolecular complex modeling from cryo-EM maps. Brief Bioinform, 2023, **24**(2): bbac632. <https://dx.doi.org/10.1093/bib/bbac632>
- [221] Zhang X, Zhang B, Freddolino P L, *et al.* CR-I-TASSER: assemble protein structures from cryo-EM density maps using deep convolutional neural networks. Nat Methods, 2022, **19**(2): 195-204. <https://dx.doi.org/10.1038/s41592-021-01389-9>
- [222] Frenz B, Walls A C, Egelman E H, *et al.* RosettaES: a sampling strategy enabling automated interpretation of difficult cryo-EM maps. Nat Methods, 2017, **14**(8): 797-800. <https://dx.doi.org/10.1038/nmeth.4340>
- [223] Terashi G, Kihara D. De novo main-chain modeling for EM maps using MAINMAST. Nat Commun, 2018, **9**(1): 1618. <https://dx.doi.org/10.1038/s41467-018-04053-7>
- [224] Vuillemot R, Rouiller I, Jonić S. MDTOMO method for continuous conformational variability analysis in cryo electron subtomograms based on molecular dynamics simulations. Sci Rep, 2023, **13**(1): 10596. <https://dx.doi.org/10.1038/s41598-023-37037-9>
- [225] Harastani M, Eltsov M, Leforestier A, *et al.* TomoFlow: Analysis of Continuous Conformational Variability of Macromolecules in Cryogenic Subtomograms based on 3D Dense Optical Flow. J Mol Biol, 2022, **434**(2): 167381. <https://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167381>
- [226] Rice G, Wagner T, Stabrin M, *et al.* TomoTwin: generalized 3D localization of macromolecules in cryo-electron tomograms with structural data mining. Nat Methods, 2023, **20**(6): 871-880. <https://dx.doi.org/10.1038/s41592-023-01878-z>