

特约综述



我们实验室主要运用多种分子生物学和结构生物学技术, 包括电子显微镜三维重构、X射线晶体学、小角散射等方法, 研究细胞表面受体的结构以及受体配体之间、细胞之间的相互作用及其分子机制。目前工作主要集中在免疫识别、物质转运、神经黏附、病毒入侵等方面的相关受体及信号和物质传递过程。

<http://www.sibcb.ac.cn/PI.asp?id=139>

电子断层成像技术及其在细胞生物学中的应用

何勇宁^{1*} 何万中²

(¹分子生物学国家重点实验室, 国家蛋白质科学中心(上海)(筹), 中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031; ²北京生命科学研究院, 北京 102206)

摘要 电子断层成像技术(electron tomography)是近年来发展起来一项三维成像技术, 可以在纳米分辨率(2~10 nm)水平上获得生物大分子及其复合物或聚集体、细胞器、细胞以及组织的三维结构, 而且可以用于研究生物大分子在细胞中的定位、排列、分布以及相互作用, 已逐渐成为细胞生物学领域中的一项重要技术手段。该文针对这项技术及其在细胞生物学中的应用作一简要介绍。

关键词 电子断层成像; 三维重构; 电子显微镜; 细胞结构; 结构生物学

Electron Tomography and Its Application in Cell Biology

He Yongning^{1*}, He Wanzhong²

(¹State Key Laboratory of Molecular Biology, National Center for Protein Science (Shanghai), Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institute for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China; ²National Institute of Biological Sciences, Beijing 102206, China)

Abstract Electron tomography is a three-dimensional imaging technique for visualizing macromolecules, organelles, cells and tissues at 2~10 nm resolutions. It can be used to monitor the location, distribution and interactions of macromolecules in cells and tissues and is becoming an important 3D technique for obtaining molecular information at physiological conditions. Here we give a brief introduction of electron tomography and its application in cell biology.

Key words electron tomography; three-dimensional reconstruction; electron microscopy; cell structure; structural biology

国家自然科学基金(批准号: 31270772)、中国科学院“百人计划”(批准号: 2012OHTP03)和上海市“浦江人才”(批准号: 13PJ1409700)资助的课题

*通讯作者。Tel: 021-54921342, E-mail: he@sibcb.ac.cn

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31270772), “One Hundred Talents” Program of Chinese Academy of Sciences (Grant No.2012OHTP03) and “Pujiang Talents” from Shanghai Municipal Government (Grant No.13PJ1409700)

*Corresponding author. Tel: +86-21-54921342, E-mail: he@sibcb.ac.cn

网络出版时间: 2013-10-24 15:52

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20131024.1552.001.html>

在生物学发展历程中, 成像技术的进步与应用对推动学科的进步起着非常重要的作用。电子显微镜作为一种成像手段, 自发明以来, 在物理、材料、生物等很多领域都有着广泛的应用, 提供了大量的图像和结构信息。与物理材料相比, 生物材料在组成和损伤敏感性等方面存在很大不同, 因而电子显微镜在技术上逐渐发展出了基于生物样品自身特点的制样、数据收集以及图像处理系统。随着生物研究的不断深入, 传统电子显微镜技术获得的二维图像已经不能完全满足现代分子和细胞生物学的科研需要。因而, 如何获得生物样品原位的高分辨三维结构信息是生物成像技术的发展方向。近年来, 电子显微镜技术在制样方法、仪器设备、计算条件等方面都有了长足的进步, 使得电子显微镜三维重构技术逐渐成为一种实用的三维成像手段, 可以在纳米或更高分辨率水平上提供生物大分子的结构、定位、排列、分布、相互作用等信息以及细胞和组织的精细三维结构, 在细胞生物学研究中有着很好的应用前景和潜力。

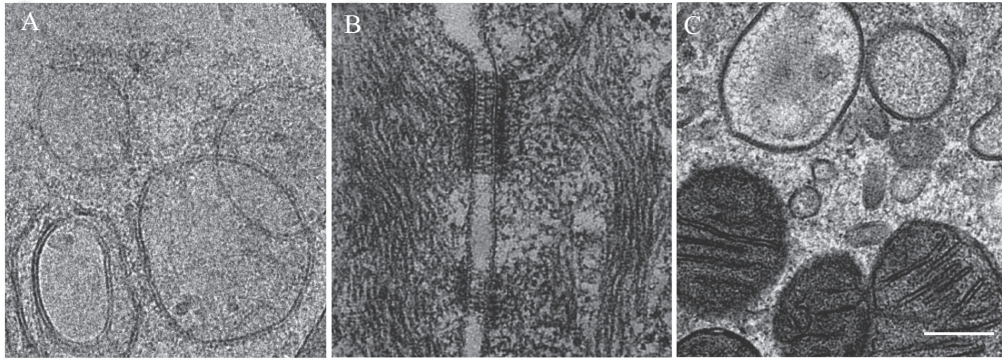
目前, 电子显微镜三维重构技术主要分为两种: 一是单颗粒三维重构(single particle reconstruction)^[1]; 二是断层成像技术(tomography)^[2-7]。电镜单颗粒三维重构主要通过采集目标物大量的具有不同取向的颗粒(或分子)的二维投影图像重构出目标物的三维结构。目前, 部分生物大分子颗粒在冷冻条件下单颗粒三维重构的分辨率已经能够达到大约0.3 nm, 可以直接提供近原子水平的结构信息^[8]。单颗粒重构在制样上通常需要对目标分子进行分离纯化, 虽然其在样品纯度和量的要求上与X射线结晶学相比较低, 但重构过程仍需要进行大量的分子间平均, 因而在获得生物体系中非均质的或原位的动态结构方面困难较大。相比之下, 断层成像技术由于是通过对同一目标物的不同角度的二维投影进行三维重构, 无需颗粒或分子间的平均, 所以能适用于非均质生物体系的结构研究。如果再结合快速冷冻等制样技术, 则可以获得生物体系原位的动态三维结构。事实上, 电镜单颗粒重构和断层成像在结构研究上有很大的互补性, 将二者有机地结合起来, 是目前获得生物体系原位高分辨三维结构很有潜力的途径。由于电镜单颗粒重构技术相对起步较早, 相关文献也较多, 这里就不再赘述。本文主要针对近年来发展较快的电子显微镜断层成像技术作一介绍。

1 基本原理

断层成像的数学原理最早提出于上个世纪初。到了六十年代, 电子断层成像的方法基本建立^[9-11]。简单地讲, 电子断层成像就是利用电子显微镜采集目标物的一系列不同角度的二维投影, 从而重构出该目标物的三维结构。在数学上, 重构过程可以在付立叶空间中实现, 也可以在实空间中实现。付立叶空间重构主要是基于中心切片定理(Central slice theorem), 也就是一个三维物体的二维投影的付立叶变换对应于这个三维物体付立叶变换的一个中心切片。而实空间的三维重构可以通过对物体的二维投影的反向投影进行合成而获得。这两种方法在三维重构软件中均有采用。虽然在理论上断层成像可以完美地重构出目标物的三维结构, 但在实际操作中是很难做到的。因为实际样品具有一定的物理形状, 拿组织样品的超薄切片为例, 其在电镜中处于90度倾角时的厚度要远远大于其在0度倾角(水平)时的厚度, 甚至超出了电子的穿透范围。而且样品架本身也很难达到90度倾角。目前通常数据采集的倾转角在 $\pm 70^\circ$ 之间。由于投影角度的限制, 在三维重构时会产生信息缺失的问题, 进而导致三维重构分辨率的各向异性, 比如在Z方向(电子束入射方向)会产生拉长效应。如果是采用单轴旋转 $\pm 70^\circ$ 的方式采集投影图象, 未采样空间大约是22%。如果采用双轴(相互垂直, 如X和Y)各旋转 $\pm 70^\circ$ 的方式采集投影图象, 未采样空间可降低至7%, 可以很好地改善三维重构的质量和分辨率。

2 样品制备

生物样品如生物大分子、细胞、组织等, 通常比较脆弱, 对环境及电子损伤较其他材料更为敏感, 无法直接用于电镜观察和数据收集, 需经过一定的处理和制备过程。针对不同的生物样品, 电镜样品的制备条件也有所不同。由于电镜制样的质量会直接影响以后的重构结果, 因此样品制备是获得高质量的电镜三维重构的关键之一。对电子断层成像来说, 目前主要有三种制样方式。一是传统的化学固定制样。这种方式虽然可以获得一定量的生物信息, 但在固定过程中也引入了相当程度的缺陷, 很难保留样品原位的高分辨信息, 因此不能完全满足当前生物研究的需要; 二是高压冷冻和冷冻替代制样^[12-14]。这种方式是先将样品在高压下用液氮快速冷冻, 然



A: 冷冻制样蛋白脂质体; B: 高压冷冻替代制样细胞连接; C: 高压冷冻替代制样小鼠肠道细胞。标尺=100 nm。

A: cryo-specimen of proteoliposome; B: cell junction prepared by high pressure freezing and substitution; C: mouse intestine cells prepared by high pressure freezing and substitution. Bar=100 nm.

图1 电子断层成像样品

Fig.1 Specimens for electron tomography

后在低温下去水并固定。该方法的优点是避免了常温化学固定带来的缺陷,能够较好地保留样品原位信息,捕捉动态的生物学过程。但制样时间相对较长,同时需要高压冷冻机等特殊制样仪器;三是直接将样品在液氮温度下冷冻,并且在冷冻条件下收集电镜数据(即冷冻电子断层成像)^[15-16]。该方法能够很好地保留样品的原位信息和动态过程。对于厚度较小的样品(小于1 μm),如细胞器、小细胞等,可以直接进行断层成像数据收集。但由于电子穿透能力的限制,对于较厚的样品,则需要在冷冻条件下进行超薄切片^[17-19],这在实际操作中有一定的难度。同时,未经染色的冷冻样品衬度较低,对电子损伤较化学固定样品更为敏感,这些因素也会增加三维重构和结构分析的难度(图1)。除了以上三种主要制样方法外,近年来也有研究组采用离子束减薄的方法(FIB)处理较厚的细胞及组织样品^[20-21],从而避免冷冻切片带来的结构缺陷和操作上的困难,这一技术目前仍然处在探索阶段。

除了要尽可能多地保留生物样品原位的结构信息并适合电镜数据采集外,断层成像制样的另一个重要方向就是如何标记目标分子,从而能够在细胞或组织的三维重构中识别、定位、跟踪目标分子。这对于细胞生物学研究有着重要的意义。传统上,免疫金颗粒标记是最为常用的分子标记方式,但免疫金标记的效率依赖于抗体的结合能力以及制样过程中目标分子的保存程度,在实验中可能引入一定的误差和不确定性。相比而言,在基因水平上对目标分子进行标记是比较理想的标记方式,譬如类似光学显微镜中的GFP标记技术。目前,有不少研究组

正在进行这方面的研究,希望能找到比较普适的电镜基因标记方法,也取得了一定的进展,但要获得真正实用的标记技术还需要进一步的探索和尝试^[22-23]。

3 数据采集

虽然电镜断层成像理论很早就已经提出,但由于种种技术上的困难,直到上世纪九十年代才逐步实现比较实用的生物电镜断层成像的数据采集和重构系统。尤其在过去的十年里,由于电镜仪器、图像探测器和计算技术的快速进步,电子断层成像在细胞生物学领域有了实质性的发展。无论是数据采集、图像处理还是三维重构都逐步成熟,相当程度上实现了自动化数据采集,使得对细胞甚至更大尺度的生物体系的三维重构成为可能。

根据前面提到的制样方法,断层成像数据采集可以在常温或低温下进行。对于常温切片样品,可使用常温电镜旋转样品杆。对于冷冻样品,则需要使用冷冻样品杆。目前,部分高端生物透射电镜(如FEI Polara、FEI Titan Krios等),附带有自身的进样及控制系统,可以一次性放置多个样品,大大提高了样品筛选和数据采集的效率。电子断层成像的数据收集通常由专门的数据收集软件控制,目前常用的数据收集软件有SerialEM、UCSFTomo、Leginon等。数据收集时,首先要确定电镜处于正常的运行状态,并进行合轴和光阑调整,然后根据数据收集软件的要求设定参数(具体可参考软件使用说明)。一般来讲,主要设定的参数包括:(1)样品倾转角的范围。通常在 $\pm(60\sim 70)$ 度之间,但实际收集过程中需要根据样品厚度、位置、样品杆等因素进行调整;(2)旋转

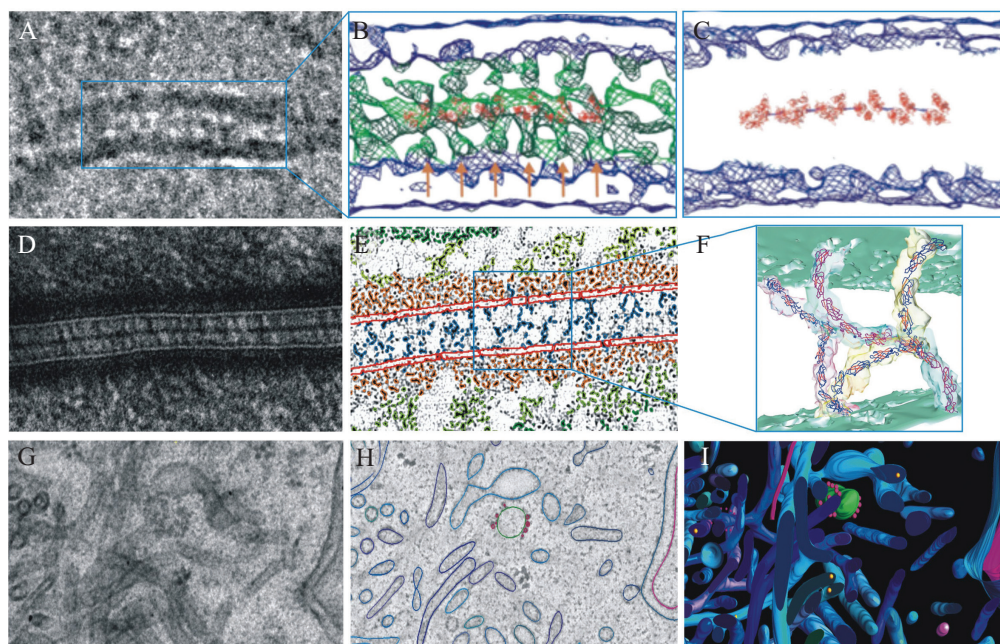
时倾转角的间距。常用的间距为0.5~2.0度。间距的大小决定了投影采样的密度, 可根据最终分辨率的要求来确定; (3)电子剂量及曝光时间。对于重金属染色的切片样品, 电子剂量的影响相对较小。但对于冷冻样品来说, 电子剂量的选择非常重要。剂量过小会降低图像信噪比, 过大则会导致样品的损伤和漂移, 甚至会产生局部发泡。通常冷冻样品电子总剂量在40~100 e^-/A^2 范围内; (4)欠焦的选择。对于染色样品, 由于本身衬度较高, 数据收集时可采用较低的欠焦(如0.5~1.0 μm)。对于冷冻样品, 需要用较高的欠焦弥补衬度的不足, 通常在2~6 μm 之间。在选择欠焦时也需要考虑重构目标的尺度和分辨率; (5)放大倍数及像素。放大倍数需要根据重构目标的大小而定, 同时还需要参考相应探测器的物理像素大小, 因为图像像素大小决定了分辨率的极限。

由于电子断层成像是通过将一系列的二维投影重构出三维结构, 所以准确获得二维投影间的相互位置和角度对三维重构至关重要。目前常用的做法是在样品制备过程中, 将胶体金颗粒(5 nm或10 nm)加在切片样品的表面, 或在冷冻样品制样时将金颗粒

与样品混合。这样金颗粒可以在三维重构时用做精确确定投影间相互关系的标记。也有部分软件可以在不加金颗粒的情况下利用投影自身的特征确定相互关系, 但一般来说, 有金颗粒辅助下的定位更为准确。

数据收集时可以采用只沿一根轴倾转的单轴倾转方式收集, 也可以采用分别沿两根相互垂直的轴倾转的双轴倾转方式收集^[24-25]。由于双轴倾转方式的未采样空间较小, 得到的三维重构质量和各向同性要好于单轴倾转数据。但对于冷冻样品来说, 由于有总电子剂量的限制, 采用双轴倾转时每张投影的信噪比要低于单轴倾转投影, 这也会对最终的重构结果产生影响。

如果需要获得较大区域的三维重构(如整个细胞), 可以将其分为若干个小区域, 依次收集断层成像数据, 然后将这些三维重构拼接成一个大的三维结构。这也是目前细胞或组织大尺度三维结构研究的一个很有用的方法^[26]。但如果重构区域很大的话, 对数据采集、计算机和三维图象处理的硬件要求相对较高。随着制样、计算机等技术能力的迅速发展,



A、B和C分别为冷冻制样获得的脂膜界面二维投影、相应的断层三维重构密度图和由此得到的界面黏附分子分布模型; D、E和F分别为由高压冷冻替代制样获得的细胞连接的二维投影、相应的断层三维重构截面和构建的细胞界面模型; G、H和I分别为小鼠肠道细胞的高压冷冻替代制样切片二维投影、相应的断层三位重构截面和囊泡结构分布模型。

A, B and C are the 2D projection, tomogram and the lipid adhesion model by cryo-electron tomography, respectively; D, E and F are the 2D projection, tomogram section and the segmentation model of cell junction by high pressure freezing and substitution, respectively; G, H and I are the 2D projection, tomogram section and the segmentation model of mouse intestine cells by high pressure freezing and substitution, respectively.

图2 电子断层三维重构

Fig.2 Electron tomograms

获得整个细胞、多细胞甚至组织的纳米或更高分辨率的三维结构是完全可以实现的, 这将对细胞生物学产生不可估量的影响。

4 结构分析

相对于电镜单颗粒重构, 电子断层成像三维重构过程比较直接。目前有多个软件包可用于断层重构, 其中最常用的重构软件是IMOD^[27], 具体使用方法可参考该软件的说明。在获得电子断层成像的三维重构之后, 要获得目标物的结构信息, 通常有以下几种结构分析方法:

最为直接的方法就是通过三维可视化软件观察三维重构, 在合理的分辨率范围内判断目标物的三维结构是否含有有价值的信息。并可利用软件工具对目标物进行量化表征, 如大小、构像、定位、排布等。目前常用的三维可视化软件有IMOD、Chimera、Amira等, 均可用于断层重构的观察和量化分析。

如果需要对三维重构作进一步的结构分析, 同时去除背景干扰, 通常的做法是利用可视化软件工具, 将三维重构中的目标物(如细胞膜、微管、囊泡、病毒颗粒、细胞器、生物大分子等)以手动或半自动的方式分割出来(segmentation), 这样可以更清晰地获得目标物在整个重构区域中的三维分布, 更加直观地表征目标物的空间定位和分布^[28](图2)。

在得到较大区域(如部分或整个细胞)的断层三维重构后, 如果需要对某些特定目标物(如蛋白复合物)进行定位, 可以采用模板匹配(template matching)的办法, 用已知的目标物结构为模板, 在三维重构区域内进行搜索, 最终获得目标物的位置、取向、排布等信息^[29-30]。如果目标物在制样时已经带有特定的标记(如金颗粒)等, 则更有利于定位等信息的确定。

如果所研究的目标物(如病毒颗粒、生物大分子等)在重构区域内存在一定数量的分布, 则可以将这些目标物单独分离出来, 并作进一步的数学平均(subtomogram averaging), 这样往往可以提高目标物的分辨率, 进而获得其在原位状态下的精细结构或动态构象^[31]。

5 应用

作为一种三维成像手段, 电子断层成像近年来

已经在生物学领域内得到广泛应用, 在病毒与感染、细胞骨架、细胞器、细胞黏附等研究方向获得了不少重要的发现^[32-43]。在细胞生物学研究中, 如何确定生物大分子的原位动态构象是普遍关心的问题, 也是目前成像方法学上的挑战和难点。就电子断层成像而言, 虽然其2~10 nm的分辨率对于很多大分子复合物和聚集体来说无法提供高分辨结构, 但仍然能够获得相当的结构信息, 比如用于监测这些复合物大的构象变化等。正如前面所提到的, 电子断层成像的一个优势就是能够用于研究细胞内生物大分子的定位和分布。如果目标生物分子本身具有易于识别的结构特征(如核糖体、病毒颗粒等), 则可以在断层三维重构中直接获得其定位与分布。如果目标分子没有明显的识别特征, 则可通过标记的方法(如金颗粒标记等)在三维重构中获得其定位和分布。这对于深入了解细胞的各种生物路径及动态过程尤为重要。除了生物大分子的结构与定位, 对于较大尺度的结构(如细胞器、细胞等)而言, 电子断层成像可以给出非常精细的三维信息, 为研究这些细胞结构在不同生理状态下的形态、变化、运动等提供重要信息。另外, 电子断层成像还可以用于研究多细胞和组织的三维结构, 并提供细胞之间的相互作用结构信息, 从而在分子或准分子水平上了解细胞相互作用的细节和机制。

6 发展方向

电子断层成像作为近年来迅速发展的一项三维结构解析技术, 与其它广泛使用的结构技术如X-射线蛋白质晶体学、核磁共振等相比, 最主要的优势是可以对非均质的蛋白复合物、细胞器、细胞以及组织进行三维结构解析, 这也是该技术在结构解析方面的独特之处。但作为一项较新的技术手段, 其在仪器、制样以及数据处理方面还存在着诸多不足之处和亟待解决的问题。在方法学上, 电子断层成像还需要在以下几个方面进行改进, 以应对生物学深入发展的需求:

电子断层成像针对不同的生物样品, 其样品制备在固定、替代以及切片等方式上各有不同。不同的制样方式在样品保存的真实性、成功率、操作的难易程度以及数据质量上分别存在一定的局限, 限制了该技术的应用以及所获得的三维结构信息。因此, 技术上如何发展出更好的制样方式, 一方面能更

好地保留样品的高分辨原位信息, 另一方面又能在制样成功率、制样周期以及操作简易度上有所突破, 对电镜断层成像技术今后的发展与推广有着重要的作用。

基于自身的技术特点, 电子断层成像在研究生物大分子在细胞或组织中的定位与分布方面有着很好的应用前景。其中一个重要的技术瓶颈, 就是如何在复杂的细胞环境中定位并跟踪目标分子。虽然到目前为止有过不少电镜生物大分子标记的相关报导, 但仍然没有发展出相对普适的标记技术, 既能准确清晰地在细胞中定位目标分子, 又能基本不对其生理功能产生大的扰动。简单地说, 如何找到类似光学显微镜中GFP的电镜标记, 是目前电子断层成像技术的一个重要课题。

电子断层成像三维重构目前所能达到的空间分辨率大约在2~10 nm, 远远低于电子显微镜本身所能达到的分辨率极限。因而在分辨率提高方面还有很大的潜力。在仪器硬件方面, 如何改进现有电镜设备及附件, 如高分辨电子探测器、相位板、能量过滤器等, 都会为该技术的进一步拓展提供保证。

除了需要有硬件上的技术进步, 与之相配套的软件研发也会直接影响到该技术的应用前景。这其中包括数据采集、处理、分析、三维模型构建与解析等方面的软件技术。如何实现大规模、高通量的数据采集并能够快速、高质量地进行大尺度的高分辨三维重构, 对今后电子断层成像的发展与应用有着重要意义。

参考文献 (References)

- Frank J. Single-particle reconstruction of biological macromolecules in electron microscopy—30 years. *Q Rev Biophys* 2009; 42(3): 139-58.
- Baumeister W, Grimm R, Walz J. Electron tomography of molecules and cells. *Trends Cell Biol* 1999; 9(2): 81-5.
- Hoenger A, McIntosh JR. Probing the macromolecular organization of cells by electron tomography. *Curr Opin Cell Biol* 2009; 21(1): 89-96.
- Koster AJ, Grimm R, Typke D, Hegerl R, Stoschek A, Walz J, Baumeister W. Perspectives of molecular and cellular electron tomography. *J Struct Biol* 1997; 120(3): 276-308.
- Lucic V, Forster F, Baumeister W. Structural studies by electron tomography: From cells to molecules. *Annu Rev Biochem* 2005; 74: 833-65.
- McIntosh JR. Electron microscopy of cells: A new beginning for a new century. *J Cell Biol* 2001; 153(6): F25-32.
- McIntosh R, Nicastro D, Mastronarde D. New views of cells in 3D: An introduction to electron tomography. *Trends Cell Biol* 2005; 15(1): 43-51.
- Zhang X, Jin L, Fang Q, Hui WH, Zhou ZH. 3.3 A cryo-EM structure of a nonenveloped virus reveals a priming mechanism for cell entry. *Cell* 2010; 141(3): 472-82.
- Frank J. Introduction: Principles of electron tomography. In: Frank J. (ed) *electron tomography: Methods for three-dimensional visualization of structures in the cell*, 2nd Ed. New York: Springer, 2006, 1-8.
- de Rosier DJ, Klug A. Reconstruction of three dimensional structures from electron micrograph. *Nature* 1968; 217(5124): 130-4.
- Fernandez JJ. Computational methods for electron tomography. *Micron* 2012; 43(10): 1010-30.
- Moor H. Theory and practice of high-pressure freezing. In: Steinbrecht RA, Zierold K. (eds) *Cryotechniques in Biological Electron Microscopy*. Berlin: Springer-Verlag, 1987, 175-91.
- Steinbrecht RA, Mueller M. Freeze substitution and freeze drying. In: Steinbrecht RA, Zierold K. (eds) *Cryotechniques in Biological Electron Microscopy*. Berlin: Springer-Verlag, 1987, 149-72.
- Dahl R, Staehelin LA. High-pressure freezing for the preservation of biological structure: Theory and practice. *J Electron Microscop Tech* 1989; 13(3): 165-74.
- Iancu CV, Tivol WF, Schooler JB, Dias DP, Henderson GP, Murphy GE, *et al.* Electron cryotomography sample preparation using the vitrobot. *Nat Protoc* 2006; 1(6): 2813-9.
- Dubochet J, Adrian M, Chang JJ, Homo JC, Lepault J, McDowell AW, *et al.* Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Q Rev Biophys* 1988; 21(2): 129-228.
- Al-Amoudi A, Norlen LP, Dubochet J. Cryo-electron microscopy of vitreous sections of native biological cells and tissues. *J Struct Biol* 2004; 148(1): 131-5.
- Al-Amoudi A, Chang JJ, Leforestier A, McDowell A, Salamin LM, Norlén LP, *et al.* Cryo-electron microscopy of vitreous sections. *EMBO J* 2004; 23(18): 3583-8.
- 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): 109-21.
- Rigort A, Bauerlein FJ, Villa E, Eibauer M, Laugks T, Baumeister W, *et al.* Focused ion beam micromachining of eukaryotic cells for cryoelectron tomography. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(12): 4449-54.
- Villa E, Schaffer M, Plitzko JM, Baumeister W. Opening windows into the cell: Focused-ion-beam milling for cryo-electron tomography. *Curr Opin Struct Biol* 2013; 23(5): 771-7.
- Diestra E, Fontana J, Guichard P, Marco S, Risco C. Visualization of proteins in intact cells with a clonable tag for electron microscopy. *J Struct Biol* 2009; 165(3): 157-68.
- Mercogliano CP, DeRosier DJ. Gold nanocluster formation using metallothionein: Mass spectrometry and electron microscopy. *J Mol Biol* 2006; 355(2): 211-23.
- Penczek P, Marko M, Buttle K, Frank J. Double-tilt electron tomography. *Ultramicroscopy* 1995; 60(3): 393-410.
- Mastronarde DN. Dual-axis tomography: An approach with alignment methods that preserve resolution. *J Struct Biol* 1997; 120(3): 343-52.

- 26 Phan S, Lawrence A, Molina T, Lanman J, Berlanga M, Terada M, *et al.* TxBR montage reconstruction for large field electron tomography. *J Struct Biol* 2012; 180(1): 154-64.
- 27 Kremer JR, Mastronarde DN, McIntosh JR. Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD. *J Struct Biol* 1996; 116(1): 71-6.
- 28 Volkman N. Methods for segmentation and interpretation of electron tomographic reconstruction. *Methods Enzymol* 2010; 483: 31-46.
- 29 Bohm J, Frangakis A, Hegerl R, Nickell S, Typke D, Baumeister W. Toward detecting and identifying macromolecules in a cellular context: Template matching applied to electron tomograms. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(26): 14245-50.
- 30 Lebbink MN, Geerts WJ, van der Krift TP, Bouwhuis M, Hertzberger LO, Verkleij AJ, *et al.* Template matching as a tool for annotation of tomograms of stained biological structures. *J Struct Biol* 2007; 158(3): 327-35.
- 31 Briggs JA. Structural biology *in situ*—the potential of subtomogram averaging. *Curr Opin Struct Biol* 2013; 23(2): 261-7.
- 32 Liu J, Bartesaghi A, Borgnia MJ, Sapiro G, Subramaniam S. Molecular architecture of native HIV-1 gp120 trimers. *Nature* 2008; 455(7209): 109-13.
- 33 Grunewald K, Desai P, Winkler DC, Heymann JB, Belnap DM, Baumeister W, *et al.* Three-dimensional structure of herpes simplex virus from cryo-electron tomography. *Science* 2003; 302(5649): 1396-8.
- 34 Urban E, Jacob S, Nemethova M, Resch GP, Small JV. Electron tomography reveals unbranched networks of actin filaments in lamellipodia. *Nat Cell Biol* 2010; 12(5): 429-35.
- 35 Medalia O, Weber I, Frangakis AS, Nicastro D, Gerisch G, Baumeister W. Macromolecular architecture in eukaryotic cells visualized by cryoelectron tomography. *Science* 2002; 298(5596): 1209-13.
- 36 Liu J, Taylor DW, Kremntsova EB, Trybus KM, Taylor KA. Three-dimensional structure of the myosin V inhibited state by cryoelectron tomography. *Nature* 2006; 442(7099): 208-11.
- 37 Beck M, Lucić V, Förster F, Baumeister W, Medalia O. Snapshots of nuclear pore complexes in action captured by cryo-electron tomography. *Nature* 2007; 449(7162): 611-5.
- 38 Ladinsky MS, Mastronarde DN, McIntosh JR, Howell KE, Staehelin LA. Golgi structure in three dimensions: Functional insights from the normal rat kidney cell. *J Cell Biol* 1999; 144(6): 1135-49.
- 39 Nicastro D, Schwartz C, Pierson J, Gaudette R, Porter ME, McIntosh JR. The molecular architecture of axonemes revealed by cryoelectron tomography. *Science* 2006; 313(5789): 944-8.
- 40 Li S, Fernandez JJ, Marshall WF, Agard DA. Three-dimensional structure of basal body triplet revealed by electron cryotomography. *EMBO J* 2012; 31(3): 552-62.
- 41 He W, Cowin P, Stokes DL. Untangling desmosomal knots with electron tomography. *Science* 2003; 302(5642): 109-13.
- 42 He W, Ladinsky MS, Huey-Tubman KE, Jensen GJ, McIntosh JR, Björkman PJ. FcRn-mediated antibody transport across epithelial cells revealed by electron tomography. *Nature* 2008; 455(7212): 542-6.
- 43 Basler M, Pilhofer M, Henderson GP, Jensen GJ, Mekalanos JJ. Type VI secretion requires a dynamic contractile phage tail-like structure. *Nature* 2012; 483(7388): 182-6.