

전자현미경을 이용한 단백질 3차원 구조

정 강 원*

경상대학교 자연과학대학 생명과학부 생화학과

Three-dimensional Structure of Protein Using Electron Microscopy

Gang-Won Cheong*

Department of Biochemistry, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea

(Received July 24, 2000)

ABSTRACT

Electron microscopy has used for analysing the structure of protein over 30 years. Bacteriorhodopsin and porins are used as examples to illustrate the progress that has recently been made in attaining resolutions which hitherto were regarded as exclusive to the realm of x-ray crystallography. To determine a protein structure used by electron microscopy, one must pass through a number of basic steps including preparation of specimen, data acquisition and data processing.

Key words : Electron Microscopy, Image processing, Three-dimensional structure

서 론

단백질의 3차원(3D) 구조분석은 x-선 회절(x-ray diffraction)에 의해 1960년도 초 처음으로 규명되어 졌다. 3D 구조의 규명으로, 생명체에서 중요한 역할을 수행하고 있는 수많은 단백질의 기능에 대해 보다 많이 이해할 수 있게되었다. 오늘날, 단백질의 3D 구조분석은 x-선 회절, 핵자기 공명(nuclear magnetic resonance, NMR)과 전자현미경(electron microscopy) 등의 이용으로 분자, 원자수준의 분해능까지 분석이 가능하다. 또한, STM(scanning tunneling microscopy)와 AFM(atomic force microscopy)이 단백질 구조분

석에 이용되고 있다(Walz et al., 1997).

먼저 x-선 회절에 의한 방법은 Perutz(1963)와 Kendrew(1963)에 의해 처음으로 단백질의 3차원 구조를 밝혔으며, 또한 현재까지 단백질 구조분석에 뛰어난 방법이다. 하지만, 아래와 같은 단점을 가지고 있다. 첫 번째로, 회절분석을 위해 요구되는 3차원 단백질결정 생성에 많은 양의 고 순도(highly pure) 단백질이 필요하며, 또한 결정생성이 종종 어려울 때가 있다. 두 번째로, electron density map을 구하기 위해서 amplitude와 phase가 요구되나, amplitude만 직접 구할 수 없는 단점을 가지고 있다. 다 차원(multi-dimensional) NMR은 고체가 아닌 용액 속에서 단백질의 3차원 구조분석과 분자의 flexible part에 대해 구

이 논문은 1999년 추담연구 장학재단의 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

* Correspondence should be addressed to Dr. Gang-Won Cheong, Department of Biochemistry, Gyeongsang National University, Chinju 660-701, Korea. Ph.: (055) 751-5962, FAX: (055) 752-7062, E-mail: gwcheong@nongae.gsnu.ac.kr

Copyright © 2000 Korean Society of Electron Microscopy

조직 정보를 얻을 수 있는 뛰어난 장점을 가지고 있으나, 분자량의 한계 즉, 30 kDa 이상의 분자량을 가지는 단백질에 대한 구조분석의 어려움(Kay & Gardner, 1997)과 x-선 회절과 마찬가지로 많은 양의 고 순도 단백질이 필요하다.

전자현미경은 원자 또는 near-atomic 분해능의 단백질 구조분석이 가능하며, 3D 구조를 빠르게 분석할 수 있는 방법이다(Bremer et al., 1992). 전자현미경을 이용한 구조분석은 x-선 회절이나 NMR에 비해 아래와 같은 장점을 가지고 있다. i) 적은 양의 단백질로 분석이 가능하며, ii) 고 순도가 요구되지 않으며, iii) 전자현미경으로 시료의 phase와 amplitude에 대한 정보를 직접 구할 수 있으며, 또한 전자현미경 사진으로 기록 할 수 있다. iv) 가장 큰 장점중 하나인, 시료를 생리활성과 유사한 상태에서 관찰할 수 있다. 예로, membrane protein을 lipid bilayer속에서 재결정화 한 후 관찰할 수 있다. v) 거대분자 단백질이나 단백질 집합체(assembly), 즉 분자량의 한계가 없이 정확한 분자구조 분석을 할 수 있다. crystalline이 배열된 결정에 대해 electron crystallography적 방법(AMOS et al., 1982)으로, 각각이 구조를 가지는 거대분자 집합체 즉, proteasome (Baumeister & Lupas, 1997), ribosome (Frank et al., 1990), virus (Yeager et al., 1994) 등과 같은 소위 single unit cell 대해 electron tomography적 방법으로 3D를 구할 수 있다. 이와 같이 전자현미경을 이용한 단백질 3차원 구조 분석에 많은 장점을 가진 반면 아래와 같은 단점들을 가지고 있다. 즉, i) 시료를 고 진공인 전자현미경 속에서 관찰하여야 하며, ii) contrast가 낮으며, iii) 강한 radiation-sensitive를 가지므로 electron beam에 의해 쉽게 변형된다.

1968년 DeRosier와 Klug에 의해 bacteriophage T4의 tail에 대해 전자현미경을 이용하여 처음으로 3D electron density map을 얻었다(DeRosier & Klug, 1968). 이 구조는 저 분해능(low resolution)의 3차원 구조였으나, 그후 고 분해능의 구조분석을 위해 많은 연구가 세계 곳곳에서 수행되어져 오고 있다. 본 연구에서 전자현미경을 이용한 단백질의 3D 구조 규명에 대해 간략히 토론하고자 한다.

단백질 (3차원)구조 결정방법

전자현미경을 이용한 거대분자 단백질의(고 분해능) 구조규명은 2차원 결정(또는 중첩 2차원 결정)에 대한 electron crystallography적 방법이나, 거대분자 집합체(single particle)에 대한 electron tomography적 방법으로 결정할 수 있다. 이 두가지 방법으로 구조를 규명하기 위해서는 다음과 같은 기본과정 즉, 시료준비, 자료수집과 자료처리를 거쳐야 한다.

1. 시료준비

생리활성과 유사한 상태에서 단백질의 전자현미경 image를 얻기 위해서는 고진공 전자현미경 속에서 건조됨과 높은 에너지인 electron으로부터 보호되어야 한다. 또한 단백질은 원자번호가 적은 원소로 구성되어 있으므로 electron과 시료의 산란에 의해 형성되는 contrast는 충분하지 못하다. 이러한 이유로 contrast를 증가시키며, electron beam에 대한 시료의 안정성증가와 탈수(dehydration)로부터 보호하기 위해서 다음과 같은 방법들이 이용되고 있다. i) frozen hydrated된 시료에 금속 막을 입히는 방법, ii) amorphous ice에 고정시키는 방법, iii) 중금속 염의 얇은 막을 입히는 소위 음착색(negative stain)을 한다.

1) 음착색법

Hall(1955)과 Huxley(1957) 등에 의해 생체조직이 electron이 풍부한 물질에 고정되었을 때 contrast가 반대로 관찰되어짐(reverse contrast)을 보고하였다. 그 후 Brenner와 Horne(1959)이 이와 같은 결과(negative staining)를 전자현미경 시료제작에 이용하므로써 널리 이용되기 시작하였다. 이와 같은 음착색 물질은 다음과 같은 조건을 만족하여야 한다. i) 시료와 stain 물질간의 상호작용이 최소이어야(결코 일어나지 않아야)하며, ii) 물에 잘 녹아야 하고, iii) 높은 밀도와 높은 원자번호를 가져야 하고, iv) electron beam에 안정하여야 하며, v) supporting film에 균일하게 분포되어야 하며, vi) pH 변화에도 안정하여야 한다. 이와 같은 stain의 종류로 uranyl acetate, methyl phosphotungstate, ammonium molybdate, aurothioglucose 등(최

근 review : Kiselev et al., 1990)이 있고, 이를 이용한 다. 최근 중금속염에 적은 양의 non-volatile hydrophilic molecules(예 sugar 등)를 첨가하여 착색하므로 분해능을 증가시킨다(최근 review : Brenner et al., 1992).

생물시료를 전자현미경으로 관찰하기 위해서 supporting film을 입힌 grid를 사용한다. supporting film은 electron beam과 온도(극저온과 실온)에 안정해야 하므로 주로 carbon film을 사용한다. 또한 고 분해능의 image를 얻기 위하여 표면이 편평하여야 하므로, carbon을 여러번 사출하여 이를 이용한다(Butt et al., 1991). 탄소막을 입힌 구리 grid에 약 5 μ l의 시료혼합 용액을 흡착시킨 후, 흡착되지 않은 시료와 염 등을 제거하기 위해서 증류수로 씻은 후 음착색 물질로 착색시킨다. 음착색 과정 중 각 단계에서 여과지로 조심스럽게 상등액을 제거하며, 이때 grid의 표면이 건조되지 않아야 한다. 시료가 용액표면(용액과 공기의 경계면)에 놓이게 되어 표면장력 등에 의한 구조적 변화(Glaeser et al., 1991)와 supporting film과 직접적인 상호작용(흡착) (Baumeister & Engelhardt, 1987) 또는 착색물질이 균일하게 충분히 착색되지 않은 소위 stain effect로(Fuller, 1981) 변화된 구조를 관찰할 수 있다.

2) Freeze-drying/metal-shadowing

금속 냉동한 시료를 저온(-100°C 이하)에서 건조 후, 시료에 금속 막을 입혀 전자현미경으로 관찰하는 방법이다. 이 방법의 큰 장점은 electron beam에 매우 안정하고, metal shadowing 각도를 변화시킴으로써 contrast를 증가시킬 수 있다. 특히 금속 냉동시킴으로써 시료에 포함된 물분자를 보존할 수 있으므로 변형화 되지 않은 구조를 관찰할 수 있다.

1982년 Gross 박사팀(Wildhaber et al., 1982)는 물분자를 중수소(D₂O)로 치환시킨 후 온도변화에 따른 D₂O의 배출량을 mass spectrometer로 측정, 보고하였다. 이 보고서에 의하면, 대부분의 물분자(D₂O)는 -93~-83°C사이에서 관찰되어지고, 일부 적은 양은 -50~-40°C에서 관찰됨을 보고하였다. 또한 Gross 팀은 이 온도에서 배출되는 물이 생체분자에 결합된 물분자 일 것이라 추정하였다. 즉 -50°C보다 낮은

온도에서 건조시킨다면, 생체물질에 포함된 물분자의 탈수화 즉, dehydration이 일어나지 않게 될 것이다. 그러므로 물분자의 배출로 인한 구조의 변형을 막게 되므로, 그들의 미세구조를 관찰할 수 있게 될 것이다. 이 방법의 또 다른 장점은 시료표면의 3차원 정보를 얻을 수 있다. 즉, 금속이 사출되는 방향으로 일정한 두께를 가지게 되므로, 전자현미경 image상에서 시료의 요철부분을 알 수 있고, 이를 image processing 등의 방법으로 표면의 3차원 구조를 구할 수 있다(Guckenberger, 1985). 최근 이와 같은 방법으로 2차원 결정의 양쪽면 각각에서 구한 표면의 구조를 결합하여 3차원 구조를 결정하는 새로운 방법이 소개되고 있다(Cheong et al., 1993).

Freeze-drying/metal-shadowing의 방법은 이와 같은 큰 장점을 가지는 반면, 다음과 같은 단점을 가지고 있다. 사출된 금속이 공기 중에서 산화가 일어나게 되므로, 이를 방지하기 위해서 얇은 탄소막(C-backing)을 입히게 된다. 이로 인한 분해능의 손실이다. 이와 같은 문제점을 극복하기 위해서 금속막을 입힌 후, 공기와의 접촉 없이(C-backing 불필요) 전자현미경으로 이동하여 관찰하는 방법(Gross et al., 1990)이 개발된 후, 10~20Å의 고 분해능 구조분석이 가능해졌다(Cheong et al., 1993).

3) Amorphous (vitreous) ice 고정

극저온 전자현미경(cryoelectron microscopy)은 생체물질을 가장 자연적인 상태(hydration 상태) 즉, 미세 구조의 변형됨 없이 관찰할 수 있는 방법이다. 최근 이 방법을 이용하여 얻은 시료의 3차원 구조에서 β -sheet 구조의 관찰을 보고하였다(Jap et al., 1991). 이와 같은 큰 장점으로 가지고 있는 반면, 음착색법 또는 freeze-drying/metal-shadowing법에 비해 electron beam에 대해 매우 불안정함과 매우 낮은 contrast를 가지는 단점을 가지고 있다. 극저온 현미경으로 고 분해능의 구조를 관찰하기 위해서 시료준비 및 전자현미경관찰에서 다음과 같은 점들을 주의하여야 한다. i) 얇은 두께의 vitreous ice의 형성, ii) 시료가 devitrification되지 않게 낮은 온도를 유지하면서 전자현미경으로 이동 및 관찰, iii) 시료의 변형이 일어나지 않을 정도로 충분히 적은 electron dose로 관

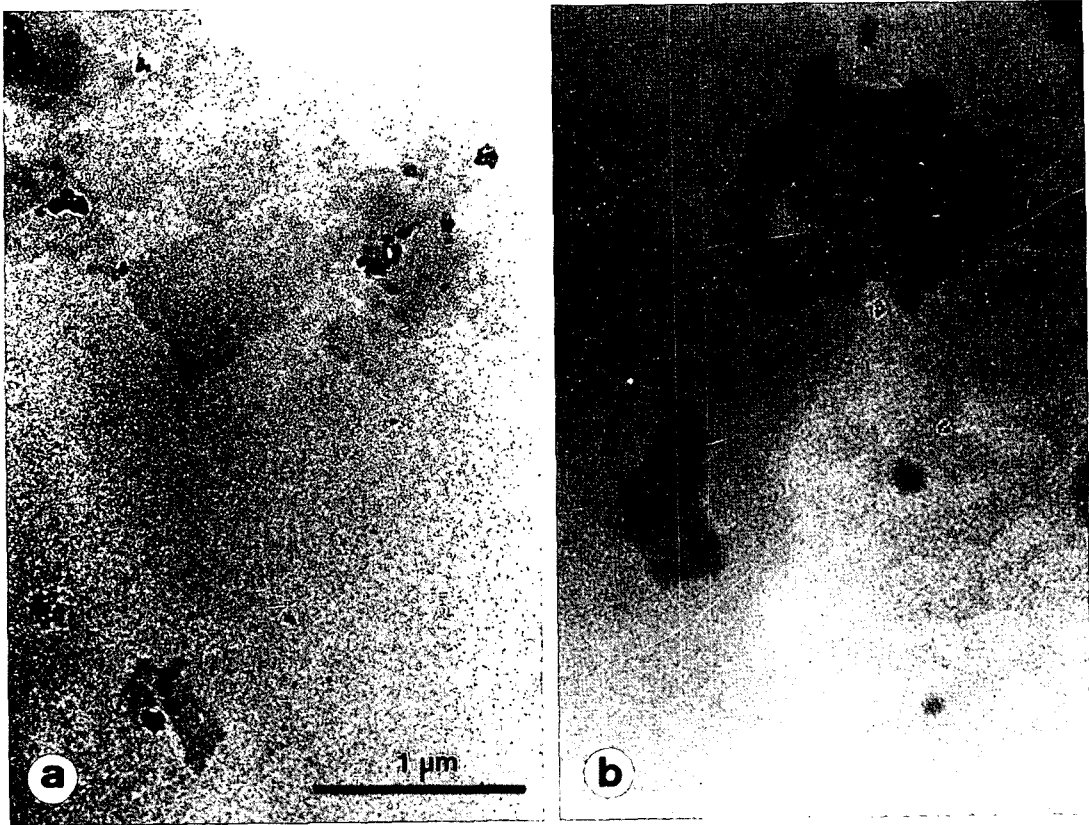


Fig. 1. Compilation of micrographs using two different preparation methods with (a) and without (b) detergent. The detergent promotes the homogenous thin films of specimen and stained on the supporting film.

찰 및 촬영.

먼저, amorphous ice에 시료를 고정시키기 위해서, 얇은 두께의 용액을 얻어야 한다. 물은 표면장력으로 인해 용액의 얇은층(두께)을 얻기가 어렵다. 이와 같은 문제점을 극복하기 위해서 용액에 매우 적은 양의 detergent를 혼합하여 사용하므로(Cheong et al., 1996a), 얇고 균일한 두께의 용액을 얻을 수 있다(Fig. 1). 더욱이 이 방법은 detergent의 얇은 film이 용액의 표면에 놓이게 됨으로써 장력에 의한 단백질 구조 변화로부터 보호해주는 역할을 한다. 또 다른 방법으로 hole grid를 이용하여 grid 뒷면에서 여과지로 용액을 흡착하여 얇은막의 용액을 얻는 방법이다. 두 번째로, 얇은막의 용액을 vitreous ice로 만들기 위해서 급속 냉동법이 가장 널리 이용된다(Cheong et al., 1996b). 이때 사용되는 냉매로서는 액체 ethane,

액체 propane 또는 액체 질소가 이용된다. 세 번째로 액체 질소에 보관된 급속 냉동된 시료를 공기와의 접촉 없이, 온도의 변화 없이 전자현미경으로 옮기기 위해 cryotransfer holder를 이용한다. 초저온(액체 질소온도)에서의 시료는 electron beam에 매우 불안정하므로 low dose기법(Data 수집 참조)으로 시료를 관찰 및 촬영을 한다.

2. Data 수집

low-dose, spot-scanning기법, energy filtering 등을 이용하여 고 분해능의 전자현미경 image를 얻는다.

1) Low-Dose 기법

1970년대 초 Glaeser 박사(Glaeser, 1971)는 단백질 2차원결정에 대해 electron dose를 증가시켜 가면서

electron diffraction pattern을 기록하였다. 그 결과는 electron dose가 증가될수록 분해능이 감소하는 즉, 분해능의 한계는 radiation damage에 기인됨을 보고하였다. 이와 같은 한계를 극복하기 위해서 최소의 electron dose로 시료의 관찰과 기록을 하여야 한다. 즉, focus와 astigmatism을 수정하기 위해서 기록하고자 하는 시료가 아닌 곳으로 beam을 이동시켜야 한다. 즉, low-dose기법은 아래와 같은 세 가지의 방법(순서)에 따라 전자현미경 image를 기록한다.

(i) 적당한 시료 찾기

낮은 배율(약 $\times 6300$)에서 높은 defocus ($\Delta z = 10 - 30 \mu\text{m}$)한 image 또는 강하게 underfocus된 diffraction image에서 원하는 시료를 찾는다.

(ii) focusing

원하는 시료에서 직접 focus하지 않고, 시료에 대한 전자현미경의 tilt axis의 다른 두 곳에서 focus하는 방법이다(Fig. 2). underfocus (Δz)의 값은 'Wobbler'의 원리와 방법으로 식(1)을 이용하여 구할 수 있다(Cheong et al., 1996a).

$$\gamma(\theta) = \pi\lambda^{-1}(C_s\theta^4/4 - \Delta z\theta^2/2) \quad (1)$$

여기서, C_s 는 spherical aberration constant이며, λ 는 전자의 파장, θ 는 beam tilt angle이다. $d\gamma(\theta)/d\theta = 0$ 의 값을 한 각도(θ)에서 위 식은 $C_s\theta^2 - \Delta z = 0$ 이 된다. 즉, 각도 $\theta = (\Delta z/C_s)^{1/2}$ 일 때 image의 이동(shift)을 관찰할 수 없게되며, 이때의 underfocus (Δz)를 계산할 수 있다. 예로, θ 가 10^{-2} rad이고 image의 이동을 관찰

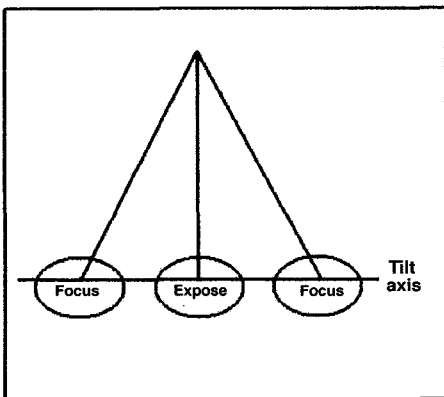


Fig. 2. Diagram of low-dose illumination technique.

할 수 없을 때 underfocus (Δz)는 200 nm이다.

(iii) image 기록

focus상태에서 원하는 underfocus로 image를 기록하고자 할 때 'beam-blank'을 이용하여 beam을 focus 위치에서 exposure위치로 옮긴 후(magnification도 변화), 원하는 시간동안 촬영한다. 이때 electron dose는 $100 \sim 200 \text{ e}^-/\text{nm}^2$ 로 underfocus는 $400 \sim 1000 \text{ nm}$ 범위에서 image를 기록한다.

2) Spot-Scan방법

최근 전자현미경 image를 기록할 때 beam에 의한 시료의 움직임 소위 beam-induced specimen movement가 contrast의 감소원인으로 알려졌다(Henderson & Glaeser, 1985). 이와 같은 원인을 줄이기 위해 beam의 크기(보통 $3 \mu\text{m}$)를 50nm에서 200nm 크기로 줄여 시료 위에서 beam을 scan하는 것과 같이 이동(여러 번 expose)하면서 전자현미경 image를 기록하는 방법이다(Fig. 3). 시료가 beam에 의해 움직임 없이, 안정함이 유지되므로 고 분해능의 image를 얻을 수 있다(Downing & Glaser, 1986). 이와 같은 방법 소위 spot scanning의 기법은 electron crystallography에 널리 이용되며(Cheong et al., 1996a; Bullough & Henderson, 1990; Bullough & Tolloch, 1990), 특히 tilted

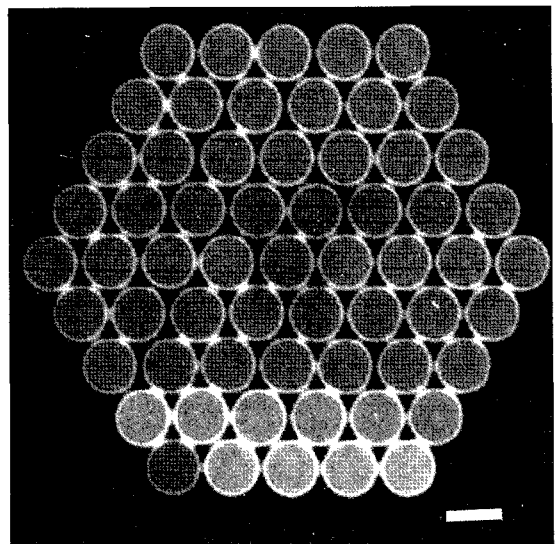


Fig. 3. Micrograph of using spot-scan illumination techniques. Bar is 200 nm.

specimen에 대한 focus 즉 dynamic focus로 focus gradient를 줄일 수 있다(Zemlin, 1989; Baumeister & Typke, 1993).

3) Energy filtering

전자현미경 image는 시료와 electron의 산란 즉 탄성(elastic)과 비탄성(inelastic)산란에 의해 형성된다. 탄성산란은 에너지의 변화가 없으나, 비탄성 산란은 에너지를 잃게된다. 또 탄성산란은 전자현미경 image의 contrast의 원인이 되고, 비탄성 산란은 탄성산란에 의해 형성된 image위에 중첩되므로 image의 질을 감소시킨다(Reimer, 1989). 비탄성 산란의 다른 문제는 image의 signal-to-noise의 비율을 감소시키는 원인이 된다(Langmore & Smith, 1992). Energy filtering으로 비탄성 산란된 electron을 image에서 제거하므로, image의 intensity는 감소시키고, contrast는 증가시킬 수 있다.

3. 자료처리

1) 2차원 결정 (electron crystallography)

crystalline으로 배열된 단백질결정에 대한 구조연구는 모든 unit cell의 평균 image를 얻는 correlation average법(Saxton & Baumeister, 1982)이 가장 많이 이용된다. 이 방법은 2차원 단백질결정의 임의의 위치에서 unit cell의 2~3배 크기의 reference를 정하고, 이 reference와 결정체간의 cross-correlation function이 최대값을 가지는 위치를 unit cell의 중심위치로 정한다. 전체 image의 Fourier transform된 image(power spectrum)에서 얻은 vector(lattice space)을 이용하여, 이 위치에서 unit cell의 크기로 자른 후 모두 alignment 시킨 후 average를 구한다(Saxton & Baumeister, 1982). 최근 signal-noise-ratio(s.n.r.)의 낮은 값과 분해능을 높이기 위해서, 첫 번째 경로로 얻은 average를 reference로 이용하여 한번 더 correlation average를 구한다(Cheong et al., 1996a).

2차원 결정으로부터 3차원 구조결정은 Real/Fourier Space방법(Saxton et al., 1984)으로 구한다. Tilt series에서 얻은 각각의 unit cell을 vector에 평행되게 re-sampling한 후, 3차원 Fourier space로 옮긴다. 이 Data set으로부터 unit cell의 structure factor 등을 구하며,

또 이 Data를 3차원 real space로 옮겨, 수직과 수평방향으로 자른 자료로 시료의 두께 등을 구할 수 있다(Cheong et al., 1991). 또한, 이 3차원 Data set으로부터 unit cell의 부피를 알 수 있고 또한 단백질의 밀도 값으로부터 분자량을 계산할 수 있으며, 또한 3차원 모델을 재구성한다.

2) 비결정형입자 (single particles: electron tomography)

single macromolecule particle 구조연구에 널리 이용되고 있는 single-exposure random conical tilt series(Radermacher et al., 1987; Radermacher, 1988)의 방법을 이용하여 각각의 입자(비결정형 입자)로부터 3차원 구조를 재구성한다.

입자들(single particles)은 support film 위에서(in plane)무질서하게 orientation(azimuthal angle)되어 소위 random azimuthal angle을 가진다. 그러므로 3차원 입자는 여러 가지 형태의 2차원 image를 나타낼 것이다. 이와 같은 image를 rotational 또는 translational alignment한 data set를 multivariate statistical analysis(van Heel & Frank, 1981; van Heel, 1984) 즉, alignment된 모든 입자들을 각각 서로 비교하여 같은 형태별로 그룹화(classification) 시킨다. 이와 같은 방법으로 얻은 2차원 구조 분석은 complex의 symmetry 등을 예측할 수 있다(Kim et al., 1999; Cheong et al., 2000). random azimuthal angle을 가지는 particle이 일정각도(θ)로 tilt되면, 각각의 입자들은 tilt-angle θ 와 random azimuthal angle을 가지게 되며, 3차원 구조의 재구성을 위해 위의 두 각도를 정확히 알아야 한다. 먼저 tilt angle은 전자현미경의 goniometer의 표시된 값으로부터 또는 동일 입자의 tilt와 tilt되지 않은 전자현미경 사진의 비교로 구할 수 있다. azimuthal angle은 rotation cross-correlation을 이용하여 tilt되지 않은 입자의 전자현미경 사진으로 구할 수 있다. 즉 여러 방향으로 orientation된 입자들을 multivariate statistical분석(van Heel & Frank, 1981; van Heel, 1984)법으로 위 두 각도를 구할 수 있다. 비대칭 입자들을 alignment 시킨 후, 3차원 구조를 재구성한다.

결 론

단백질 구조분석에 methodology 뿐만 아니라 technology적 관점에서 매우 중요한 장점을 가지고 있는 전자현미경은 이 분야에 중요한 기술로써 인식되어 오고 있다. 극저온 전자현미경의 electron crystallography와 electron tomography, CCD camera와 energy filtering 등의 신기술 발전으로 고 분해능의 image를 얻을 수 있을 수 있으며, 이는 구조생물학 분야의 발전에 큰 기여를 할 것이다. 현재와 같이 계속 발전된다면, 다가올 10년 내에 전자현미경을 이용하여 거대 분자 단백질 complex의 atomic resolution을 얻을 수 있을 것으로 확신한다.

감사의 글

이 논문은 1999년 추담연구 장학재단의 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

참 고 문 헌

- Amos LA, Henderson R, Unwin PNT: Three-dimensional structure determination by electron microscopy of two dimensional crystals. *Prog Biophys Mole Biol* 39 : 183-231, 1982.
- Baumeister W, Engelhardt H: Three-dimensional structure of bacterial surface layer. In: Harris, J.R. and Home, R.W. ed. *Electron microscopy of proteins: membrane structures*, pp. 109-154, Academic Press, Inc, New York, 1987.
- Baumeister W, Typke D: Electron crystallography of proteins: state of the art and strategies for the future. *MSA Bulletin* 23(1) : 11-19, 1993.
- Bremer A, Henn C, Engel A, Baumeister W, Aebi U: Has negative staining still a place in biomolecular electron microscopy? *Ultramicroscopy* 46 : 85-111, 1992.
- Brenner S, Horne RW: A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochim Biophys Acta* 34 : 103-110, 1959.
- Bullough PA, Henderson R: Phase accuracy in high-resolution electron microscopy of trigonal and orthorhombic purple membrane. *Biophys J* 58 : 705-711, 1990.
- Bullough PA, Tulloch PA: High-resolution spot-scan electron microscopy of microcrystals of an α -helical coiled-coil protein. *J Mol Biol* 215 : 161-173, 1990.
- Butt H-J, Wang DN, Hansma PK, Kuehlbrant W: Effect of surface roughness of carbon support films on high-resolution electron diffraction of two-dimensional protein crystals. *Ultramicroscopy* 36 : 307-318, 1991.
- Cheong G-W, Cejka Z, Peters J, Stetter KO, Baumeister W: The surface protein layer of *Methanoplanus limicola*: three-dimensional structure and chemical characterization. *System Appl Microbiol* 44 : 209-217, 1991.
- Cheong G-W, Reinhard G, Fuchs K-H, Gross H, Baumeister W: The structure of the surface layer of *Methanoplanus limicola* obtained by a combined electron microscopy and scanning tunneling microscopy approach. *J Struc Biol* 111 : 125-134, 1993.
- Cheong G-W, Typke D, Baumeister W: Projection structure of the surface layer of *Methanoplanus limicola* at 10Å resolution obtained by electron cryomicroscopy. *J Struc Biol* 117 : 138-144, 1996a.
- Cheong G-W, Howard SY, Ogawa H, Toyoshima C, Stokes DL: Lamellar stacking in three-dimensional crystals of Ca^{2+} -ATPase from Sarcoplasmic Reticulum. *Biophysical J* 70 : 1689-1699, 1996b.
- Cheong G-W, Kim KI, Park S-C, Ha JS, Woo KM, Choi SJ, Chung CH: Heptameric ring structure of the heat shock protein ClpB, a protein-activated ATPase in *E. coli*. *J Mol Biol* 303 : 655-666, 2000.
- DeRosier D, Klug A: Reconstruction of three-dimensional structures from electron micrographs. *Nature* 217 : 130-134, 1968.
- Downing KH, Glaeser RM: Improvement in high resolution image quality of radiation-sensitive specimens achieved with reduced spot size of the electron beam. *Ultramicroscopy* 20 : 269-278, 1986.
- Frank J: Classification of macromolecular assemblies studies as 'single particles'. *Qua Rev Biophys* 23(3) : 281-329, 1990.
- Fuller SD: Three-dimensional reconstruction of membrane protein crystals. *Meth Cell Biol* 22 : 251-296, 1981.
- Glaeser RM: Limitations to significant information in biological electron microscopy as a result of radiation damage.

- J Ultrastruct Res 36: 466-482, 1971.
- Glaeser RM, Zilker A, Radermacher M, Gaub HE, Hartmann T, Baumeister W: Interfacial energies and surface-tension forces involved in the preparation of thin, flat crystals of biological macromolecules for high-resolution electron microscopy. *J Microscopy* 161: 21-45, 1991.
- Gross H, Krusche K, Tittmann P: Recent progress in high-resolution shadowing for biological transmission electron microscopy. *Proceedings of the XII International Congress for Electron Microscopy*, p. 510-511, San Francisco, 1990.
- Guckenberger R: Surface reliefs derived from heavy-metal-shadowed specimens-fourier space techniques applied to periodic objects. *Ultramicroscopy* 16: 357-370, 1985.
- Hall CE: Electron densitometry of stained virus particles. *J Biophys Biochem Cytol* 1: 1-12, 1955.
- Henderson R, Glaeser RM: Quantitative analysis of image contrast in electron micrographs of beam-sensitive crystals. *Ultramicroscopy* 16: 139-150, 1985.
- Huxley HE: Some observation on the structure of TMV. In: *Proceedings of the stockholm Congress on Electron Microscopy*, 260-261, 1957.
- Kim KI, Park S-C, Kang SH, Cheong G-W, Chung CH: Selective degradation of unfolded proteins by the self-compartmentalized HtrA protease, a periplasmic heat shock protein in *E. coli*. *J Mol Biol* 294: 1363-1374, 1999.
- Jap BK, Walian PJ, and Gehring K: Structural architecture of an outer membrane channel as determined by electron crystallography. *Nature* 350: 167-170, 1991.
- Kay KE, Gardner KH: Solution NMR spectroscopy beyond 25 kDa. *Curr Opin Stru Biol* 7: 722-731, 1997.
- Kendrew JC: *Science* 139: 1259, 1963.
- Kiselev NA, Sherman MB, Tuspran VL: Negative staining of proteins. *Electron Microsc Rev* 3: 43-72, 1990.
- Langmore JP, Smith MF: Quantitative energy-filtered electron microscopy of biological molecules in ice. *Ultramicroscopy* 46: 349-373, 1992.
- Perutz MF: *Science* 140: 863, 1963.
- Radermacher M: Three-dimensional reconstruction of single particles from random and nonrandom tilt series. *J Elect Micro Tech* 9: 359-394, 1988.
- Radermacher M, Wagenknecht T, Verschoor A, Frank J: Three-dimensional reconstruction from a single-exposure random conical tilt series applied to the 50S ribosomal subunit of *Escherichia coli*. *J Microsc* 146: 113-136, 1987.
- Reimer L: in *Transmission Electron Microscopy*, Hawkes PW (Ed.) 2nd ed., Vol. 36, Springer Verlag, Heidelberg, 1989.
- Saxton WO, Baumeister W: The correlation average of a regularly arranged bacterial cell envelope protein. *J Microsc* 127: 127-138, 1982.
- Saxton WO, Baumeister W, Hahn M: Three-dimensional reconstruction of imperfect two-dimensional crystals. *Ultramicroscopy* 13: 57-70, 1984.
- van Heel M: Multivariate statistical classification of noisy images: randomly oriented biological macromolecules. *Ultramicroscopy* 13: 165-184, 1984.
- van Heel M, Frank J: Use of multivariate statistics in analyzing the images of biological macromolecules. *Ultramicroscopy* 6: 187-194, 1981.
- Walz T, Tittmann P, Fuchs KH, Müller DJ, Smith DL, Agre P, Gross H, Engel A: Surface topographies at subnanometer resolution reveal asymmetry and sidedness of aquaporin-1. *J Mol Biol* 264: 907-918, 1997.
- Wildhaber I, Gross H, Moor H: The control of freeze-drying with Deuterium Oxide (D₂O). *J Ultrastru Res* 80: 367-373, 1982.
- Yeager M, Berriman JA, Baker TS, Bellamy AR: Three-dimensional structure of the rotavirus haemagglutinin VP4 by cryo-electron microscopy and difference map analysis. *EMBO J* 13(5): 1011-1018, 1994.
- Zemlin F: Dynamic focusing for recording images from tilted samples in small-spot scanning with a transmission electron microscope. *J Electron Microsc Tech* 11: 251-257, 1989.

< 국문 초록 >

전자현미경을 이용한 단백질 구조분석은 약 30여년간 발전되어 왔다. Bacteriorhodopsin과 porin 등의 near atomic resolution의 구조분석은 전자현미경의 발전과 진행을 보여주는 하나의 예로 설명될 수 있다. 전자현미경을 이용한 거대분자의 3차원 구조를 규명하기 위해 필요한 기본과정 즉, 시료준비, 자료수집과 자료처리 등에 대하여 토론하였다.