



传染性法氏囊病病毒结构的冷冻电镜初步分析

苗苗^{1,2,3}, 徐彩煌^{1,2,3}, 黄子惠^{1,2,3}, 张小东⁴, 张兴^{1,2,3*}, 吴永平^{4*}

(1. 浙江大学医学院生物物理系, 杭州 310058; 2. 浙江大学医学院附属邵逸夫医院病理科, 杭州 310058;

3. 浙江大学冷冻电镜中心, 杭州 310058; 4. 浙江农林大学动物科技学院, 杭州 311300)

摘要 为研究传染性法氏囊病病毒(infectious bursal disease virus, IBDV)的结构和基因组在其衣壳内部的包装信息,通过IBDV感染DF-1细胞并分离纯化得到完整的IBDV颗粒,利用单颗粒冷冻电镜技术获得了近生理条件下的IBDV在 ≈ 6.6 Å分辨率下的三维结构。结果显示:IBDV病毒衣壳是由260个VP2三聚体蛋白组成的单层衣壳,三角剖分函数 $T=13$;在IBDV衣壳内部观察不到dsRNA基因组和RNA聚合酶的电子密度,这与其他dsRNA病毒如胞质型多角体病毒(cytoplasmic polyhedrosis virus, CPV)、蓝舌病毒(bluetongue virus, BTV)、轮状病毒(rotavirus, RV)明显不同。该结果暗示,IBDV可能采用了与其他dsRNA病毒不同的方式进行基因组组装、转录和复制,这为进一步揭示IBDV基因组的转录、复制和组装的分子机制及IBDV的起源和进化提供了结构学依据。

关键词 冷冻电镜; 传染性法氏囊病病毒; dsRNA基因组结构

中图分类号 S 852.65 文献标志码 A

Preliminary structural analysis of infectious bursal disease virus by cryo-electron microscopy.

Journal of Zhejiang University (Agric. & Life Sci.), 2019,45(4):506-511

MIAO Miao^{1,2,3}, XU Caihuang^{1,2,3}, HUANG Zihui^{1,2,3}, ZHANG Xiaodong⁴, ZHANG Xing^{1,2,3*}, WU Yongping^{4*}

(1. Department of Biophysics, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310058, China; 2. Department of Pathology of Sir Run Run Shaw Hospital, Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310058, China; 3. The Center of Cryo-Electron Microscopy, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China; 4. College of Animal Science and Technology, Zhejiang A & F University, Hangzhou 311300, China)

Abstract In order to investigate the structure of infectious bursal disease virus (IBDV) and how the double-stranded RNA (dsRNA) segments of IBDV are organized inside its capsid and how the genome segments are transcribed and assembled, we first obtained IBDV particles by infecting DF-1 cell with IBDV and purified the virus particles; we then determined the three-dimensional structure of IBDV using a single-particle cryo-electron microscopy (cryo-EM) at ≈ 6.6 Å resolution. The results showed that IBDV possessed a $T=13$ single shell with 260 VP2 trimers. Unexpectedly no characteristic densities of dsRNA and RNA-dependent RNA polymerase were observed inside the IBDV capsid, which was in contrast to the structures of cytoplasmic polyhedrosis virus (CPV), bluetongue virus (BTV) and rotavirus (RV). These facts implicate that IBDV might adopt different mechanisms to organize, transcribe and assemble its genome segments, and that IBDV might originate and evolve

基金项目: 国家重点研发计划(2017YFA0504803, 2018YFA0507700); 中央高校基本科研业务费专项资金(2018XZZX001-13)。

*通信作者 (Corresponding author): 张兴 (<https://orcid.org/0000-0002-6776-326X>), E-mail: xzhang1999@zju.edu.cn; 吴永平 (<https://orcid.org/0000-0002-7213-0205>), E-mail: wypzd2002@163.com

第一作者 (First author): 苗苗 (<https://orcid.org/0000-0001-6634-8032>), E-mail: 21618556@zju.edu.cn

收稿日期 (Received): 2018-08-21; 接受日期 (Accepted): 2018-11-25

differently from other dsRNA viruses.

Key words cryo-electron microscopy; infectious bursal disease virus; organization of dsRNA genome

传染性法氏囊病(infectious bursal disease, IBD)已遍布全球各地的养禽地区^[1]。传染性法氏囊病病毒(infectious bursal disease virus, IBDV)是IBD的病原,导致机体产生免疫抑制^[2-3]。IBDV属于双RNA病毒科,禽双RNA病毒属,其基因组由A、B双链RNA(double-stranded RNA, dsRNA)节段组成,全长约6.0 kbp,其中A节段(约3.2 kbp)含有2个部分折叠的开放阅读框(open reading frame, ORF):大ORF编码一个110 kDa的多聚蛋白前体(pVP2-VP4-VP3),可自行加工成为2个结构蛋白VP2、VP3及一个丝氨酸蛋白酶VP4;小ORF编码一个17 kDa的非结构蛋白VP5。VP2是病毒的主要保护性抗原和主要结构蛋白,与中和抗体的诱导和识别、病毒粒子毒力的变异、细胞凋亡的诱导、抗原漂移和细胞嗜性有很大的关系^[4]。VP3是一个多功能蛋白,其作用主要包括:1)在病毒装配过程中作为支架蛋白和招募病毒蛋白VP1进入病毒粒子;2)与病毒基因组RNA作用;3)调节VP1的活性;4)抗细胞凋亡^[5]。VP5蛋白不是病毒复制的必需蛋白,但在病毒的传播和发病机制中有重要作用^[6-7]。B节段dsRNA(约2.8 kbp)编码一个约90 kDa的VP1蛋白——RNA依赖性RNA聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)^[8],RdRp与病毒dsRNA结合,负责病毒基因组的转录和复制^[9]。

dsRNA病毒的宿主范围广,从细菌到人类,分为7科(呼肠孤病毒科、金色病毒科、囊状噬菌体科、双RNA病毒科、小双RNA病毒科、双分病毒科和全病毒科)。dsRNA病毒基因组包含的RNA片段数目不一,从全病毒科仅包含1个RNA片段到一些轮状病毒中包含12个RNA片段^[10]。目前,关于dsRNA病毒内部基因组的组装方式已有报道^[11-12]。LUQUE等^[13]发现,IBDV颗粒可以包装超过1个完整的基因组,且具有更大基因组拷贝数的IBDV颗粒具有更高的感染率,表明IBDV具有与其他dsRNA病毒完全不同的基因组包装和复制策略。但目前关于IBDV结构的研究主要集中在其蛋白衣壳方面^[14-16],仅获得了IBDV衣壳蛋白的晶体结构^[9],其基因组在其衣壳内部的包装方式和结构还不清楚。

本文通过感染DF-1细胞获取IBDV,利用冷冻电镜三维重构技术获得了中等分辨率的IBDV三维结构。结果表明,IBDV与其他dsRNA病毒如呼肠孤病毒科胞质型多角体病毒(cytoplasmic polyhedrosis virus, CPV)^[12]、蓝舌病毒(bluetongue virus, BTV)^[17]、轮状病毒(rotavirus, RV)^[18]的三维结构明显不同,在IBDV衣壳内部未观察到dsRNA基因组和RNA聚合酶的电子密度,暗示IBDV的dsRNA基因组的包装、转录和复制可能不同于其他dsRNA病毒。该结果可为揭示IBDV的起源进化和致病的分子机制提供结构学信息。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料及仪器

IBDV由山东农业大学崔治中教授提供;负染观察在FEI Tecnai G2 Spirit 120 kV透射电子显微镜下进行,冷冻样品检查在FEI Talos F200C 200 kV冷冻电镜下进行,冷冻样品用FEI Vitrobot装置制备,数据收集使用FEI Titan Krios 300 kV低温场发射透射电子显微镜;普通碳支持膜铜网购自北京中镜科仪技术有限公司;碳微阵列支持膜铜网购自德国Quantifoil公司;氧化石墨烯溶液购自美国Sigma-Aldrich公司。

1.2 病毒培养及纯化

首先将IBDV株接种至DF-1细胞上,待出现明显的细胞病变时收获病毒。将收获的2 L IBDV上清液离心(5 000 g, 4 °C, 30 min),弃细胞碎片,然后加入500 mL 40%的聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)8000到病毒上清液中,于4 °C条件下缓慢搅拌过夜,再经过 1.6×10^4 g, 4 °C离心1 h,去除上清液,收集IBDV沉淀。将沉淀用20 mmol/L Tris-HCl(pH 7.4)悬浮后吹打混匀,用24%的蔗糖垫在 1.05×10^5 g、4 °C条件下离心2 h后弃上清液,然后加入400 μ L Tris-HCl(pH 7.4),于4 °C条件下过夜,接着将病毒沉淀吹打混匀后加至碘克沙醇梯度溶液(10%、20%、30%、40%、55%)中,以 2.1×10^5 g、4 °C离心4 h,最后使用注射器小心抽取出各梯度溶液中的病毒条带,

并进行缓冲液置换,于4℃条件下保存。

1.3 间接免疫荧光试验

为检测分离纯化的IBDV颗粒是否完整、是否有感染性,通过间接免疫荧光试验(immunofluorescent assay, IFA)进行观察^[6]。试验步骤大致如下:IBDV感染DF-1细胞后48 h,弃细胞培养基;用磷酸盐缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)洗2次;加入100 μL等体积丙酮和甲醇的混合液,然后在-20℃条件下放置30 min;PBS清洗3次;用5%脱脂奶在37℃条件下封闭2 h;在抗VP5单抗中于37℃条件下孵育1 h;PBS清洗3次;在用异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)标记的羊抗鼠IgG(1:200)中于37℃条件下孵育1 h;PBS清洗3次;用10 μg/mL 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)于室温条件下染核5 min,然后用PBS清洗3次,在倒置显微镜下观察。

1.4 透射电镜负染色观察

吸取3 μL IBDV样品于普通碳支持膜铜网上,吸附1 min后,用滤纸将表面样品液滴吸干,随即用2%醋酸铀溶液染色3次(染色时间分别为10 s、10 s、1 min),然后用FEI Tecnai G2 Spirit透射电子显微镜观察IBDV的形态结构。

1.5 冷冻样品制备及数据收集

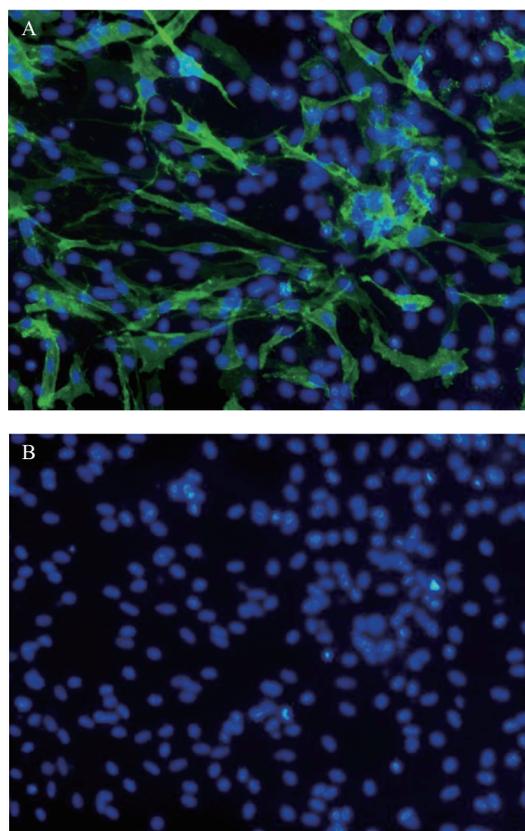
使用FEI Vitrobot快速冷冻IBDV样品的方法如下:将Vitrobot样品室的湿度调至100%,吸取2.5 μL IBDV样品,滴加于铺有氧化石墨烯的Quantifoil(2/2)铜网上,使用Vitrobot滤纸吸7.5 s,除去多余的液体后快速落至液氮冷却的液态乙烷中;之后利用Titan Krios 300 kV电子显微镜和Gatan K2 Summit相机收集数据,放大倍数为 1.8×10^4 倍,对应的像素大小为1.634 Å;图像曝光时间6~8 s,总电子剂量 $\approx 50 e^-$ /像素。用Motion Corr2矫正图像漂移。原始4K×4K图像经过2×2像素平均后产生2K×2K图像,对应的像素大小为3.268 Å,之后使用RELION^[19]、cryoSPARC^[20]等进行图像处理和三维重构,其中图像欠焦和像散用Gctf确定^[21],二维及三维分类后,最终选取5 493个病毒颗粒进行取向优化和三维重构。

2 结果

2.1 纯化的IBDV对DF-1细胞的感染

为检测纯化的IBDV是否为完整的病毒颗粒并

具有感染性,应用间接IFA方法检测经纯化的IBDV感染的DF-1细胞与抗IBDV VP5单抗的反应性。如图1所示,在感染纯化的IBDV的DF-1细胞上瞬间表达的VP5蛋白与抗VP5单抗发生了特异性反应。该结果表明,纯化的IBDV能够感染DF-1细胞并复制和繁殖。



A. 用抗VP5的单抗检测经纯化的IBDV感染的DF-1细胞; B. 阴性对照。

A. IBDV-infected DF-1 cells detected using monoclonal antibodies specific for VP5; B. Negative control.

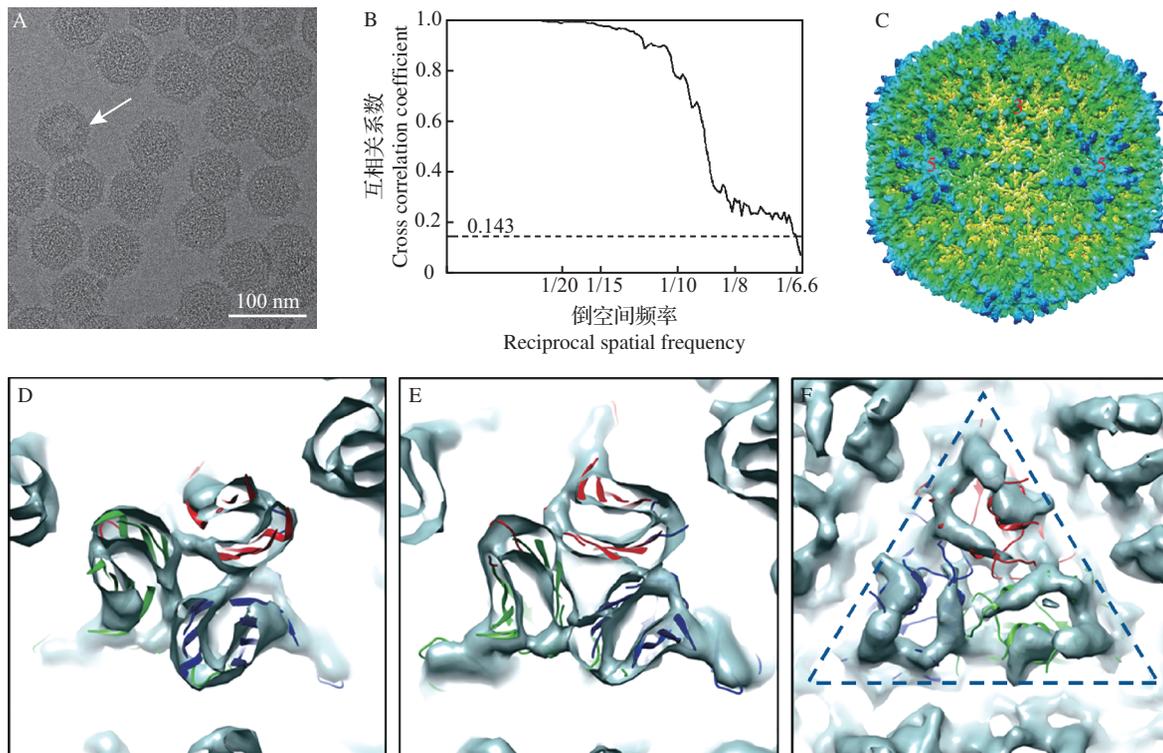
图1 间接免疫荧光试验检测纯化的IBDV病毒的感染性
Fig. 1 Infectivity assay of purified IBDV on DF-1 cells detected with indirect immunofluorescent assay

2.2 IBDV冷冻电镜结果

将IBDV样品经冷冻制样后,利用FEI Titan Krios 300 kV低温场发射电子显微镜收集数据。从IBDV的冷冻图像(图2A)中,可以清晰地观察到病毒的外部形态,样品有2种不同状态的病毒颗粒:大多数病毒颗粒为包装dsRNA基因组的完整病毒颗粒,少数为不含dsRNA的空病毒颗粒(图2A箭头所示)。利用cryoSPARC和RELION软件对采集的IBDV冷冻电镜数据处理分析后获得了 ≈ 6.6 Å分辨率的

IBDV 三维结构(图2B~C)。三维结构显示,病毒颗粒直径 ≈ 70 nm,病毒衣壳由VP2三聚体构成,同时,VP2形成了五聚体及六聚体2种多聚体形式。IBDV衣壳形成三角形剖分函数 $T=13$ 的二十面体结构,与以前报道的IBDV结构^[14]一致,也与BÖTTCHER等^[16]用冷冻电镜做过的分辨率 ≈ 20 Å的IBDV的衣壳结构一致。IBDV衣壳由260个VP2三聚体组成,其中20

个VP2三聚体位于3次轴上,称为“I3三聚体”,4个VP2三聚体组成一个大的三角形,称为“G4三角形”。“G4三角形”与“I3三聚体”组成了一个非对称单元,其中“I3三聚体”连接3个“G4三角形”组成二十面体的一个平面。将获得的电镜结构与IBDV晶体结构^[14]比较,发现两者的大部分蛋白二级结构吻合很好(图2D~F)。



A. IBDV冷冻电镜图像(白色箭头指示IBDV空颗粒);B. IBDV三维重构分辨率曲线;C. IBDV三维结构及3次轴与5次轴位置;(D~E).从外部观测的VP2三聚体的 β -折叠结构;F.从颗粒内部观测的VP2三聚体的 α -螺旋结构。

A. Cryo-electron microscopy (cryo-EM) image of IBDV particles (the white arrow indicates incomplete IBDV particles); B. Resolution curve of the IBDV three-dimensional reconstruction; C. Cryo-EM density map of IBDV and its 3-fold and 5-fold axes marked; (D-E). β -sheet structure of the VP2 trimer observed from outside; F. α -helix structure of the VP2 trimer observed from inside.

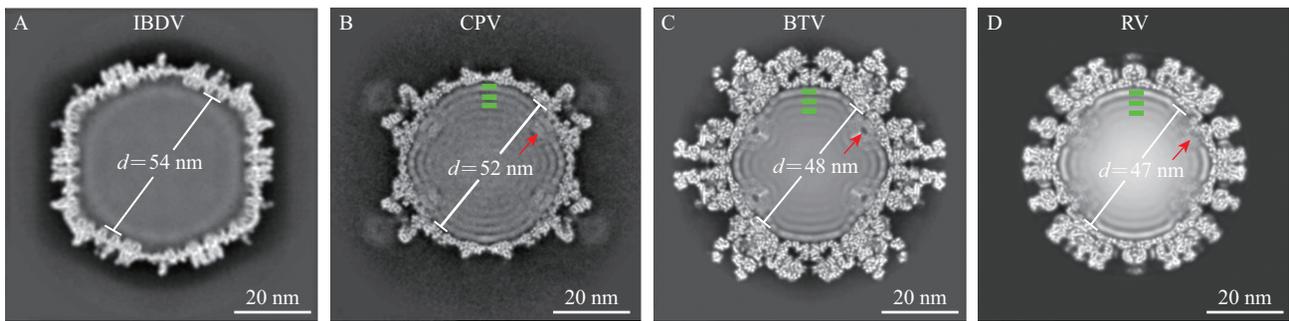
图2 IBDV 三维重构

Fig. 2 Three-dimensional reconstruction of IBDV by cryo-EM

2.3 IBDV 与其他 dsRNA 病毒结构的比较

dsRNA 病毒的三维结构已被广泛研究,包括衣壳和内部基因组结构。我们通过三维重构获得了生理状态下 IBDV 的三维结构,与其他已知 dsRNA 病毒结构如呼肠孤病毒科的胞质型多角体病毒(CPV)^[12]、蓝舌病毒(BTV)^[17]和轮状病毒(RV)^[18]相比,在 IBDV 内部未观察到典型的 ≈ 20 Å的 dsRNA 特征密度,同时,在衣壳内表面的5次轴附近也没有观察到病毒RNA聚合酶的电子密度(图3A)。而作为对比,在其他3种 dsRNA 病毒结构内部都可以观察

到明显的 dsRNA 及其聚合酶电子密度(图3B~D)。此外,IBDV 的基因组密度也明显不同于其他 dsRNA 病毒。从表1可以看出:IBDV 的衣壳内直径最大,约为 54 nm,其他3种病毒为 47~52 nm;IBDV 基因组总长约为 6.0 kbp,其他3种病毒分别为 24.7、19.0 和 18.0 kbp;IBDV 基因组密度约为 0.072 bp/nm³,其他均约为 0.3 bp/nm³,说明 IBDV 衣壳内基因组密度明显低于其他3个 dsRNA 病毒。这些差别暗示 IBDV 病毒在基因组包装、转录复制方面与其他 dsRNA 病毒不同。



A. 传染性法氏囊病毒中心切面图; B. 胞质型多角体病毒中心切面图; C. 蓝舌病毒中心切面图; D. 轮状病毒中心切面图。短绿线表示病毒衣壳内不同位置 dsRNA 的电子密度; 红色箭头表示病毒衣壳内 RNA 聚合酶的电子密度。

A. Central section of infectious bursal disease virus (IBDV); B. Central section of cytoplasmic polyhedrosis virus (CPV); C. Central section of bluetongue virus (BTV); D. Central section of rotavirus (RV). The short green lines represent the dsRNA densities, and the red arrow indicates the density of RNA polymerase in Figures B, C and D.

图3 IBDV 与其他 dsRNA 病毒内部结构对比

Fig. 3 Difference between IBDV and three other dsRNA viruses at their central sections

表1 IBDV 与其他 dsRNA 病毒的比较

Table 1 Comparison between IBDV and three other dsRNA viruses

病毒 Virus	衣壳内直径 Inner diameter/nm	衣壳内部体积 Internal volume/nm ³	基因组总长(片段数) Genome length/kbp (number of segments)	基因组密度 Genome packing density/(bp/nm ³)
传染性法氏囊病毒 IBDV	≈54	≈82 400	6.0(2)	≈0.072
胞质型多角体病毒 CPV	≈52	≈73 600	24.7(10)	≈0.336
蓝舌病毒 BTV	≈48	≈57 900	19.0(10)	≈0.328
轮状病毒 RV	≈47	≈54 300	18.0(11)	≈0.331

3 讨论

为了避免病毒 dsRNA 在细胞质中引起宿主细胞产生抗病毒反应, dsRNA 病毒必须把其 dsRNA 基因组片段保护在其衣壳内部, 同时, 每个 dsRNA 片段均包装一个核酸转录酶, 并且这个核酸转录酶固定结合在衣壳内表面的 5 次轴附近。在感染宿主细胞期间, 每条 dsRNA 片段均在病毒衣壳内部高效地独立进行转录复制, 互不干扰。如在 CPV、BTV 和 RV 病毒衣壳内部分别包装了 10、10 和 11 条 dsRNA 片段和对应的核酸转录酶。但 dsRNA 病毒基因组片段是如何包装在衣壳内部以保证不同的病毒 dsRNA 基因组片段的有序转录的, 一直是未解之谜。

IBDV 病毒基因组比较简单, 只有 2 条不同的 dsRNA 片段, 因此很适合用于解析 dsRNA 病毒基因

组是如何包装的秘密。尽管目前对于 IBDV 结构的研究已有很多, 例如 BÖTTCHER 等^[6]也用冷冻电镜做过 IBDV 的结构研究, 但分辨率仅约为 20 Å, 同时该研究也没有报道衣壳内部基因组的结构信息, 因此, 关于 IBDV 衣壳内部 dsRNA 的结构信息知之甚少。本研究利用冷冻电镜单颗粒技术, 获得了在生理状态下 IBDV 约 6.6 Å 分辨率的三维结构。但与其他已知结构的 dsRNA 病毒相比, 在 IBDV 内部并未观察到特征性的 dsRNA 电子密度和 RNA 聚合酶电子密度。该结果可能存在 2 种原因: 一是 IBDV 衣壳破裂, 导致病毒 dsRNA 和 RNA 聚合酶从衣壳内部释放出来; 二是 IBDV 基因组 dsRNA 可能存在与其他 dsRNA 病毒基因组完全不同的组装方式。由于在数据处理过程中, 我们选择的是完整的、内部含有 dsRNA 基因组的病毒颗粒进行三维重构, 同时, 我们用纯化的 IBDV 病毒对 DF-1 细胞进行感染实验的结果表明, 纯化的 IBDV 能够感染 DF-1 细胞

并复制繁殖,说明纯化的IBDV病毒基因组具有完整性。因此,在IBDV衣壳内部观测不到dsRNA的最可能原因为后者,即IBDV的dsRNA基因组采取了与其他dsRNA病毒基因组完全不同的包装方式。根据LUQUE等^[13]的发现,在IBDV内部可包装多于1个基因组拷贝,且基因组拷贝数与病毒的毒力相关。通过与3个dsRNA病毒衣壳内部体积、包装基因组数目及基因组包装密度对比,发现IBDV衣壳内基因组密度明显低于其他3个dsRNA病毒,衣壳内部可包装多个基因组。总之,本结果表明,IBDV基因组采用了与其他dsRNA病毒基因组不同的组装方式,暗示IBDV的起源和进化与其他已知基因结构的dsRNA病毒不同。该结果也说明,使用单颗粒冷冻电镜方法不能解析出IBDV病毒内部的三维结构,需要使用冷冻电子断层三维重构的方法来进行IBDV基因组的结构研究。

致谢 文中的实验数据收集自浙江大学冷冻电镜中心,谨致谢意!

参考文献(References):

- [1] SHEHATA A A, SULTAN H, HALAMI M Y, et al. Molecular characterization of very virulent infectious bursal disease virus strains circulating in Egypt from 2003 to 2014. *Archives of Virology*, 2017,162(4):1-13.
- [2] QIN Y, XU Z C, WANG Y Q, et al. VP2 of infectious bursal disease virus induces apoptosis via triggering oral cancer overexpressed 1 (ORAOV1) protein degradation. *Frontiers in Microbiology*, 2017(8):1351-1370.
- [3] QIN Y, ZHENG S J. Infectious bursal disease virus–host interactions: multifunctional viral proteins that perform multiple and differing jobs. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017,18(1):161-174.
- [4] QI X L, GAO X, LU Z, et al. A single mutation in the P_{BC} loop of VP2 is involved in the *in vitro* replication of infectious bursal disease virus. *Science China Life Sciences*, 2016,59(7):717-723.
- [5] FERRERO D, GARRIGA D, NAVARRO A, et al. Infectious bursal disease virus VP3 upregulates VP1-mediated RNA-dependent RNA replication. *Journal of Virology*, 2015,89(21):11165-11168.
- [6] WU Y P, HONG L L, YE J X, et al. The VP5 protein of infectious bursal disease virus promotes virion release from infected cells and is not involved in cell death. *Archives of Virology*, 2009,154(12):1873-1882.
- [7] MÉNDEZ F, ROMERO N, CUBAS L L, et al. Non-lytic egression of infectious bursal disease virus (IBDV) particles from infected cells. *PLoS One*, 2017,12(1):1-22.
- [8] CHETTLE N, STUART J, WYETH P. Outbreak of virulent infectious bursal disease in East Anglia. *Veterinary Record*, 1989,125(10):271-272.
- [9] PAN J, VAKHARIA V N, TAO Y J. The structure of a birnavirus polymerase reveals a distinct active site topology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2007,104(18):7385-7390.
- [10] PAN J, DONG L, LIN L, et al. Atomic structure reveals the unique capsid organization of a dsRNA virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2009,106(11):4225-4230.
- [11] WANG X R, ZHANG F X, SU R, et al. Structure of RNA polymerase complex and genome within a dsRNA virus provides insights into the mechanisms of transcription and assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2018,115(28):7344-7349.
- [12] ZHANG X, DING K, YU X K, et al. *In situ* structures of the segmented genome and RNA polymerase complex inside a dsRNA virus. *Nature*, 2015,527(7579):531-534.
- [13] LUQUE D, RIVAS G, ALFONSO C, et al. Infectious bursal disease virus is an icosahedral polyploid dsRNA virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2009,106(7):2148-2152.
- [14] COULIBALY F, CHEVALIER C, GUTSCHE I, et al. The birnavirus crystal structure reveals structural relationships among icosahedral viruses. *Cell*, 2005,120(6):761-772.
- [15] GARRIGA D, QUEROLAUD J, ABAITUA F, et al. The 2.6-angstrom structure of infectious bursal disease virus-derived T=1 particles reveals new stabilizing elements of the virus capsid. *Journal of Virology*, 2006,80(14):6895-6905.
- [16] BÖTTCHER B, KISELEV N A, STELMASHCHUK V Y, et al. Three-dimensional structure of infectious bursal disease virus determined by electron cryomicroscopy. *Journal of Virology*, 1997,71(1):325-330.
- [17] ZHANG X, PATEL A, CELMA C C, et al. Atomic model of a nonenveloped virus reveals pH sensors for a coordinated process of cell entry. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2016,23(1):74-80.
- [18] ZHANG X, SETTEMBRE E, XU C, et al. Near-atomic resolution using electron cryomicroscopy and single-particle reconstruction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 2008,105(6):1867-1872.
- [19] SCHERES S H W. RELION: implementation of a Bayesian approach to cryo-EM structure determination. *Journal of Structural Biology*, 2012,180(3):519-530.
- [20] PUNJANI A, RUBINSTEIN J L, FLEET D J, et al. cryoSPARC: algorithms for rapid unsupervised cryo-EM structure determination. *Nature Methods*, 2017,14(3):290-296.
- [21] ZHANG K. Gctf: real-time CTF determination and correction. *Journal of Structural Biology*, 2015,193(1):1-12.