

# 直接法应用于蛋白质二维晶体的 电子晶体学图像处理\*

阳世新 李方华 刘玉东 古元新 范海福

(中国科学院物理研究所和凝聚态物理中心,北京 100080)

(2000 年 3 月 24 日收到)

试把直接法应用于抗生蛋白链菌素(streptavidin)沿 001 方向投影的模拟像和相应的理论结构因子作图像处理.先用两张高分辨电子显微像作直接法解卷,以互补衬度传递函数的作用而损失的结构信息,求得的欠焦值比用单张像解卷的结果更接近真实值.把从结构模型计算出的 0.30 nm 以内的相位,以及 0.25 nm 以内的振幅作为起始数据,进行直接法相位外推,并借助团簇分析方法得到 0.30 nm 至 0.25 nm 之间的相位.所得分辨率为 0.30 nm 的解卷像和分辨率为 0.25 nm 的晶体结构投影均与理论结构模型的相应投影电势图一致.

关键词:高分辨电子显微学,直接法,图像处理

PACC:6043,6407

## 1 引 言

1968 年建立的电子显微学三维重构技术<sup>[1]</sup>为研究生物大分子的立体结构提供了一种新手段,当时所用的噬菌体尾巴 T4(tail of bacteriophage T4)显微像分辨率只有 3.5 nm.高分辨电子显微学的发展以及电镜生物试样冷冻技术的不断改进,使生物大分子的电子显微像分辨率达 0.30 nm 左右,把电子显微学三维重构技术推上了一个新的台阶.有些生物大分子不能生长成足够大的单晶体以进行 X 射线衍射分析,例如,膜蛋白往往难以形成三维晶体,但却可能形成二维晶体,此时,高分辨电子显微学是测定其晶体结构的唯一手段<sup>[2]</sup>.借助高分辨电子显微像或者结合电子衍射强度研究蛋白质结构的工作又称为蛋白质电子晶体学.

在弱相位体近似<sup>[3]</sup>下,高分辨电子显微像的强度  $I(r)$  与投影电势分布函数  $\varphi(r)$  之间满足如下的关系:

$$I(r) = 1 + 2\sigma\varphi(r) * \mathcal{F}^{-1}[W(H)], \quad (1)$$

式中  $\sigma = \pi/\lambda U$ ,  $\lambda$  和  $U$  分别代表电子波长和加速电压.  $*$  和  $\mathcal{F}^{-1}$  分别代表卷积运算和傅里叶反变换.  $W(H)$  是衬度传递函数,它与球差系数  $C_s$ 、色差所引起的离焦高斯分布的标准差  $D$  和离焦值  $\Delta f$  等成像时的电子光学参数有关,

$$W(H) = \sin\left(\pi\Delta f\lambda H^2 + \frac{1}{2}\pi C_s\lambda^3 H^4\right) \cdot \exp\left(-\frac{1}{2}\pi^2\lambda^2 D^2 H^4\right). \quad (2)$$

通常,一台电镜的  $C_s$  值大体上一定,且可由实验测定, $D$  值可根据像的傅里叶变换作经验估计.于是,为了测定晶体结构的投影电势,首要的是测定离焦值  $\Delta f$ ,然后对(1)式作解卷处理.目前对蛋白质二维晶体的像作解卷处理主要用 Henderson 等提出的方法<sup>[4,5]</sup>.这种解卷方法要求拍摄一系列低剂量电子辐照的像和一幅高剂量电子辐照的像.先借助高剂量像的傅里叶变换中的 Thon 环确定近似的离焦值<sup>[6]</sup>,然后用一系列低剂量像对离焦值进行精修.本文的第一个目的是探讨建立一种新的解卷方法的可能性,以减少使用显微像的数目,避免拍摄两种不同剂量的像.

一系列论文说明,把高分辨电子显微学和衍射分析结合起来,所建立的电子晶体学解卷和相位外推处理技术,称之为第二步图像处理技术<sup>[7,8]</sup>,已成功地应用于测定微小无机晶体的结构<sup>[9-14]</sup>,所测得晶体结构的分辨率,远高于像的分辨率,而接近衍射分辨极限.电子晶体学第二步图像处理技术中的第一个步骤是解卷处理技术.其中的直接法解卷技术只借助一幅像或结合一幅像和一幅电子衍射花样,便能够测定离焦值<sup>[15]</sup>.本文内容之一是改进这一方法,

使之能应用到蛋白质二维晶体高分辨电子显微像的解卷处理。

蛋白和电子晶体学中的另一个问题是像的噪声大,使像的分辨率往往低于显微镜的分辨本领,而电子衍射花样相对地有较高的分辨率,达到或高于显微镜的分辨本领。像的分辨率低除与电子显微镜有关外<sup>[16]</sup>,还因样品漂移和辐射损伤而降低<sup>[17]</sup>。为此,近年来,人们提出了各种方法,例如,用计算机控制技术把电子束聚成约 300—600 nm 的束斑对样品进行扫描曝光 (spot-scan),可有效地减小电子束引起的样品漂移<sup>[18]</sup>。降低样品温度能有效地减小样品损伤<sup>[17]</sup>。采用这些措施之后,细菌视紫红质二维晶体的像分辨率由 0.60 nm 提高到 0.35 nm<sup>[5,17]</sup>,抗生蛋白链菌素二维晶体的像分辨率达到 0.30 nm。另一方面,用同样样品拍摄的电子衍射花样的分辨率却分别为 0.26 nm<sup>[19]</sup>和 0.25 nm<sup>[20]</sup>。可见,像与电子衍射花样之间在分辨率上仍然存在差距。本文的第二个目的是在蛋白质电子晶体学领域中,建立一种提高所测晶体结构分辨率的方法。借鉴针对无机材料小分子晶体所建立和发展的上述电子晶体学二步图像处理技术<sup>[12,13,21—23]</sup>中的第二个步骤,结合像和电子衍射强度,借助直接法作相位外推,得到分辨率介于像和衍射花样之间的相位,使所测定的晶体结构分辨率接近衍射花样的分辨极限。因而,本文内容之二是改进直接法相位外推技术,使之适用于蛋白质二维晶体。

## 2 直接法解卷和相位外推处理原理和方法改进

### 2.1 直接法解卷

为数学处理方便,对(1)式做傅里叶变换,得到像强度的傅里叶变换  $T(H)$ ,它与结构因子  $F(H)$  有如下关系:

$$T(H) = \alpha(H) + 2\sigma F(H)W(H), \quad (3)$$

式中  $\alpha(H)$  代表傅里叶空间原点的透射电子,可忽略不计,于是(3)式改写为

$$F(H) = \frac{T(H)}{2\sigma W(H)}. \quad (4)$$

与无机晶体相比,考虑到蛋白质晶体的晶胞大,衍射数目多,而且摄像时的离焦量大,衬度传递函数等于零的点较多使像上丢失的结构信息多,故建议改从两幅不同离焦量的像出发,进行解卷处理。取两幅离焦差值  $\Delta d$  已知的像,这在实验中要求记录两

次拍摄的像的离焦值之差。在应用直接法作解卷处理时,先设置第一幅像的尝试离焦值  $\Delta f_1$ ,它从某一初值开始按一定的步长在一定的范围内递增,对应第二幅像的尝试离焦值  $\Delta f_2$  则为  $\Delta f_1 + \Delta d$ 。其次,对于每一对尝试离焦值,可从(4)式计算出两套尝试结构因子  $F_1(H)$  和  $F_2(H)$ 。显然,由于两套  $F(H)$  对应于不同的离焦值,它们所包含的衍射斑亦有所不同。第三,把两套结构因子的衍射作互补处理,如用  $F_2(H)$  中的衍射点弥补另一套  $F_1(H)$  中所丢失的衍射点。显然,为此需对  $F_1(H)$  和  $F_2(H)$  作归一化处理,并定义归一化因子

$$k = \frac{\sum_H |F_1(H)|^2}{\sum_H |F_2(H)|^2}, \quad (5)$$

式中的求和是对两套结构因子中同时存在的衍射点进行的,即不包括只存在其中一套中的那些衍射点。对结构因子  $F_1(H)$  中缺少的衍射点,可用公式

$$F_1(H) = kF_2(H) \quad (6)$$

从  $F_2(H)$  中补回来。最后,对所获得的一套比较完整的结构因子  $F_i(H)$ ,用直接法计算得到相应的品质因子值<sup>[15]</sup>。这样,对每一个尝试离焦值都可以计算出一个品质因子值。品质因子值越大,则尝试的结构因子满足 Sayre 等式<sup>[24]</sup>的程度越高,尝试的离焦值也越接近真实值<sup>[15]</sup>。为直观起见,以尝试离焦值为横轴,对应的品质因子为纵轴,画出质因子-离焦曲线。把曲线上最高峰所对应的离焦值  $\Delta f$  代入(2)式计算出  $W(H)$ 。再把  $W(H)$  代入(4)式,求得结构因子  $F_i(H)$ 。下标  $i$  表示该结构因子是从像所获得的。

为了定量地比较用一幅像和用两幅像作解卷处理的差别,定义可靠性因子

$$R = \frac{\sum_i ||F_i| - |F_c||}{\sum |F_c|}, \quad (7)$$

式中  $F_i$  是用一幅像解卷或用两幅像解卷所获得的结构因子,  $F_c$  是从原子模型计算出的结构因子。

### 2.2 直接法相位外推

电子晶体学中相位外推的原理与 X 射线晶体学中的基本相同。借助 SAPI 程序<sup>[25]</sup>外推分辨率介于像和电子衍射花样之间的结构因子相位。输入数据中的结构因子振幅来源于电子衍射花样,从像得到的结构因子相位作为外推的初始相位。用随机方法给定外推位相的起始套<sup>[26]</sup>。正切公式中的权重借

助于 Hull 和 Irwin 提出的统计权<sup>[27]</sup>. 借助 SAPI 程序可以外推出许多套解, 最后按经验令所取解的套数等于不对称单元内的原子数.

研究小分子晶体结构时, 传统的直接法相位外推工作借助品质因子来挑选正确的相位套, 即计算每一相位套的品质因子, 然后把品质因子值最大的一套相位作为正确的解<sup>[21]</sup>. 近年来, 针对蛋白质大分子发展了团簇分析法来代替品质因子的分析<sup>[27]</sup>. 其原理如下. 先定义一对相位套间的平均相位差为

$$\text{di}(\varphi) = \sum_H F(\mathbf{H}) \{ \varphi(\mathbf{H})_1 - \varphi(\mathbf{H})_2 \} \sum_H F(\mathbf{H}). \quad (8)$$

然后, 任取某一个相位套, 搜寻与该套间的平均相位差  $\text{di}(\varphi)$  小于某一值的其他相位套, 这些相位套和该相位套一起构成一个团簇. 团簇内相位套的个数反映团簇的大小. 按照统计的观点, 最大团簇的平均相位应接近正确解. 采用矢量平均方法对最大团簇内所有相位套中的相位作平均

$$\begin{aligned} & [m_H \exp(i\varphi(\mathbf{H}))]_{\text{average}} \\ &= \sum_{j=0}^N [m_H \exp(i\varphi(\mathbf{H}))]_j / N, \quad (9) \end{aligned}$$

式中  $N$  为最大团簇内的相位套数  $[m_H]_j$  为第  $j$  个相位套中相位  $\varphi(\mathbf{H})$  的权重.

## 3 结果与讨论

### 3.1 抗生蛋白链菌素晶体的测试数据

抗生蛋白链菌素是一种蛋白质二维晶体, 其晶体结构已用 X 射线衍射方法测定<sup>[28, 29]</sup>. 在磷脂单层上生长的此蛋白质二维晶体适合用高分辨电子显微学方法进行结构分析<sup>[20]</sup>. 抗生蛋白链菌素沿  $[001]$  方向有  $Cmm$  对称性. 图 1(a) 和 (b) 为晶体的  $[001]$  投影电势图, 分辨率分别为 0.30 nm 和 0.25 nm. 晶体的晶胞参数为  $a = 8.23$  nm,  $b = 8.23$  nm,  $c = 5.00$  nm. 图 1(c) 和 (d) 是用多层法<sup>[30]</sup> 所计算的模拟像, 欠焦值分别为 410 nm 和 460 nm, 其余电子光学参数  $U$ ,  $C_s$  和  $D$  分别为 400 kV, 4.1 mm 和 3.8 nm, 像分辨率为 0.30 nm.

从抗生蛋白链菌素的晶体结构模型计算出 0.25 nm 以内的结构因子  $F(hk0)$ . 0.30 nm 以内的结构因子的傅里叶变换对应于弱相位体近似<sup>[3]</sup> 下高分辨电子显微像. 把相应的相位作为初始相位, 结

合 0.25 nm 的振幅信息利用直接法进行相位外推处理, 得到 0.30 nm 到 0.25 nm 之间的相位, 并同理论数据比较.

### 3.2 抗生蛋白链菌素晶体的解卷结果

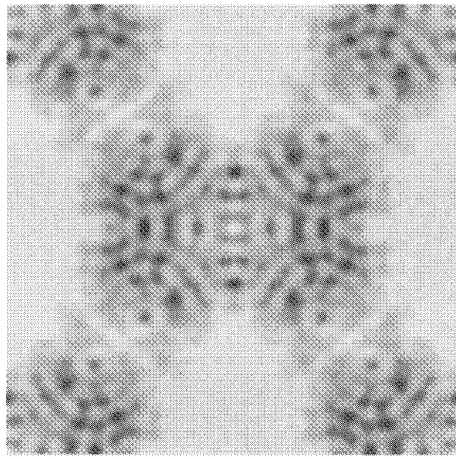
图 2(a) 给出用欠焦值为 460 nm 的单张像解卷得到的品质因子-离焦曲线, 共有三个主峰, 虽然最右边的峰位置靠近 460 nm, 但偏差较大. 图 2(b) 给出把欠焦值为 410 nm 的像的数据补充到 460 nm 的像上, 用两张像解卷得到的一条品质因子-离焦曲线. 图中只有一个主峰, 且峰位置所对应的欠焦值为 460 nm. 这说明不能把针对小分子所发展的直接法解卷技术简单地应用到生物大分子上. 由于衬度传递函数阈值的限制, 一些衍射点不能从单张像中恢复出来, 但用双像互补解卷的方法能够把这些衍射点恢复出来, 使最终的解卷像更接近真实的投影电势. 表 1 中  $\Delta f_{\text{one}}$  和  $\Delta f_{\text{two}}$  是用单张像和双像互补解卷方法分别对 10 张模拟像进行图像解卷所测定的离焦值, 10 张模拟像的真实欠焦值分别为 410 nm, 420 nm, 430 nm, 440 nm, 450 nm, 460 nm, 470 nm, 480 nm, 490 nm, 500 nm. 结果表明, 用双像互补解卷测定的离焦值  $\Delta f_{\text{two}}$  比用单张像解卷测定的离焦值更接近真实值  $\Delta f_{\text{true}}$ . 例如, 对 -430 nm 模拟像用单张像解卷测定的离焦值误差较大, 为 2.5 nm, 而用双像互补解卷测定相应离焦值的误差只有 0.5 nm.  $R_{\text{one}}$  和  $R_{\text{two}}$  分别对应于用单张像解卷和用双像互补解卷时从 (7) 式中计算出的  $R$  因子.  $R_{\text{two}}$  比  $R_{\text{one}}$  小很多的事实证实用这种方法解卷能够有效地改善投影电势. 图 1(e) 是用这种方法结合欠焦值 410 nm 和 460 nm 的模拟像进行解卷所得的解卷像, 很接近晶体的投影电势.

表 1 搜索的离焦值和  $R$  因子

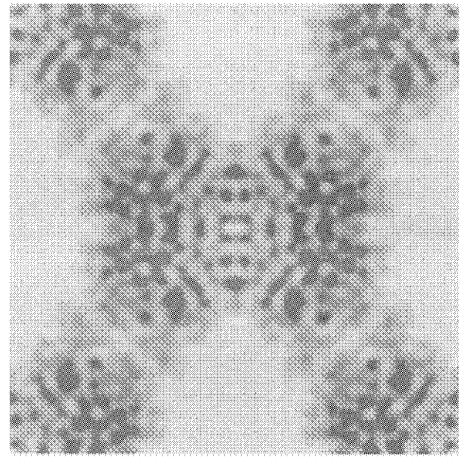
| Image number | $\Delta f_{\text{true}}$ | $\Delta f_{\text{one}}$ | $\Delta f_{\text{two}}$ | $R_{\text{one}}$ | $R_{\text{two}}$ |
|--------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------|------------------|
| 1            | 410.0                    | 411.0                   | 409.5                   | 0.388            | 0.279            |
| 2            | 420.0                    | 420.5                   | 420.0                   | 0.409            | 0.275            |
| 3            | 430.0                    | 432.5                   | 429.5                   | 0.418            | 0.276            |
| 4            | 440.0                    | 444.0                   | 440.0                   | 0.437            | 0.269            |
| 5            | 450.0                    | 443.5                   | 450.0                   | 0.405            | 0.273            |
| 6            | 460.0                    | 457.0                   | 459.5                   | 0.393            | 0.287            |
| 7            | 470.0                    | 471.0                   | 470.0                   | 0.398            | 0.278            |
| 8            | 480.0                    | 482.0                   | 479.5                   | 0.423            | 0.278            |
| 9            | 490.0                    | 491.5                   | 490.0                   | 0.415            | 0.275            |
| 10           | 500.0                    | 503.0                   | 500.0                   | 0.416            | 0.279            |

注  $\Delta f_{\text{true}}$  是真实的离焦值,  $\Delta f_{\text{one}}$  和  $R_{\text{one}}$  是用单张像解卷得到的离焦值和  $R$  因子,  $\Delta f_{\text{two}}$  和  $R_{\text{two}}$  是用双像互补解卷得到的离焦值和  $R$  因子 (离焦值的单位为 nm).

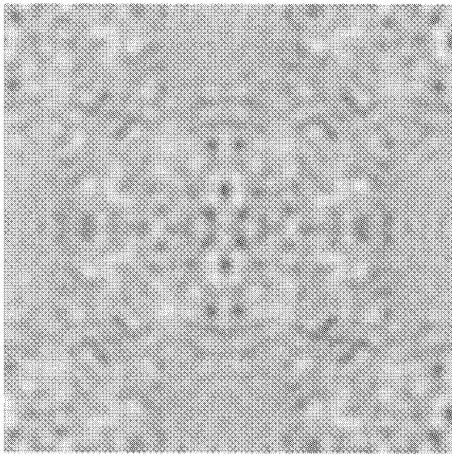
表 1 中两张像间的离焦差  $\Delta d$  均为 50 nm. 表 2



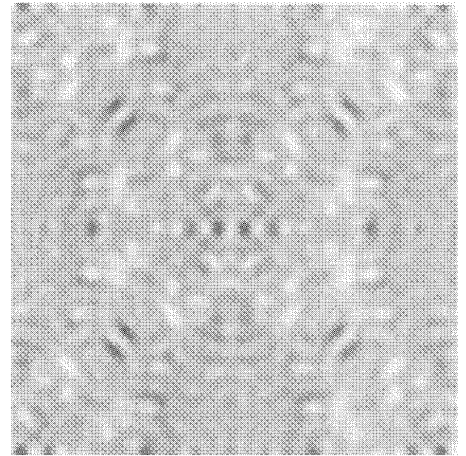
(a)



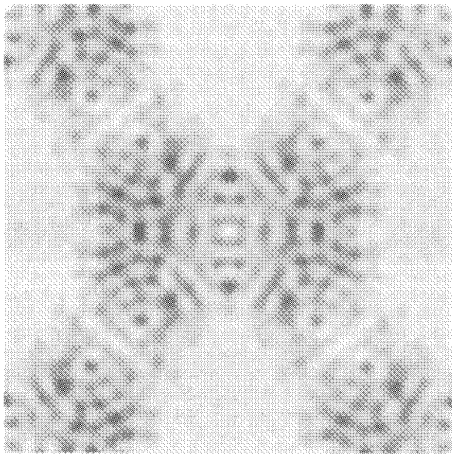
(b)



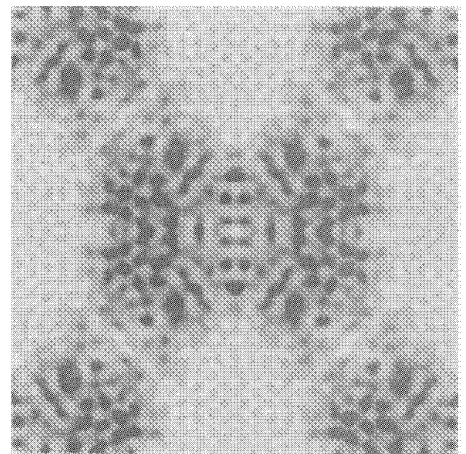
(c)



(d)



(e)



(f)

图1 抗生素蛋白链菌素的模拟像、解卷像和相位外推所得的投影电势 (a)分辨率为 0.30 nm 沿[001]方向的投影电势 (b)分辨率为 0.25 nm 沿[001]方向的投影电势 (c)次焦值为 410 nm 沿[001]方向的模拟像 (d)次焦值为 460 nm 沿[001]方向的模拟像 (e)用直接法解卷方法结合图 1(c)和 1(d)两张像进行解卷所得的解卷像 (f)用直接法相位外推方法外推出 0.30 nm 到 0.25 nm 之间的相位所得的投影电势



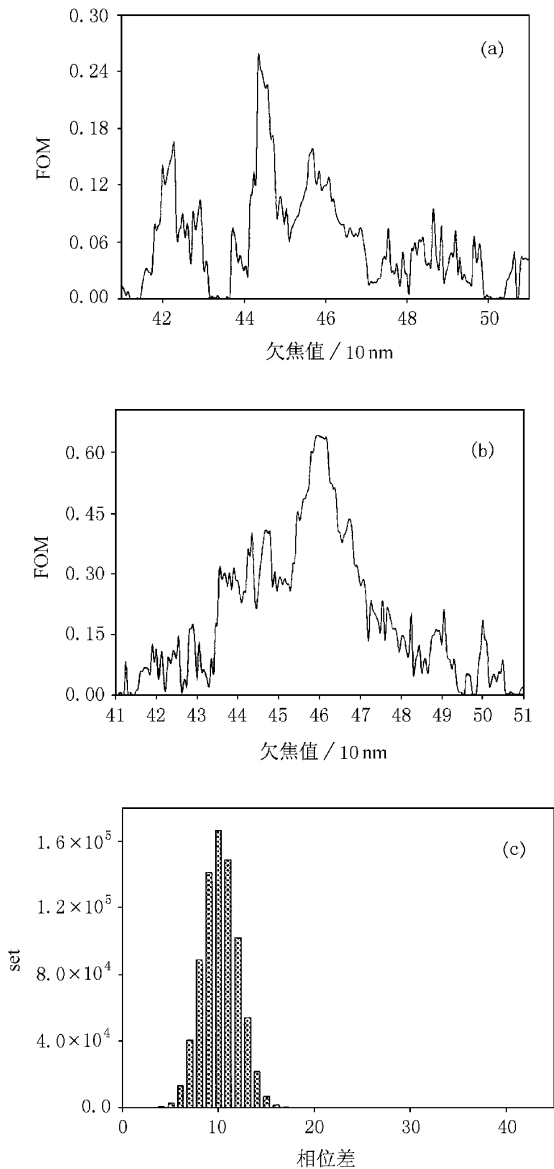


图 2 (a)用欠焦值为 460 nm 的单张像解卷得到的品质因子-离焦曲线 (b)结合图 1(c)和图 1(d)两张像解卷得到的品质因子-离焦曲线 (c)对相位外推所得到的 888 套解,由(7)式计算得到的平均相角误差分布图

则是在不同的离焦差值下用双像互补解卷方法搜索到的离焦值.目的是验证在任意一个离焦差值的情况下本文中所提出的方法的有效性.从表 2 可见,所测定的离焦值误差不超过 0.5 nm.因此,此方法的有效性两张像之间的离焦差  $\Delta d$  无关.

### 3.3 直接法相位外推得到抗生素蛋白链菌素晶体 0.25 nm 的投影势

归一化结构因子的下限取为 0.35.可以选出 313 个强衍射点参加相位外推,其中 85 个点的分

表 2 在不同的离焦差值  $\Delta d$  的条件下搜索的离焦值

| Two images      |                 | $\Delta d$ | Found defocus value |                 |
|-----------------|-----------------|------------|---------------------|-----------------|
| $\Delta f_{1t}$ | $\Delta f_{2t}$ |            | $\Delta f_{1d}$     | $\Delta f_{2d}$ |
| 450.0           | 460.0           | 100        | 450.0               | 460.0           |
| 450.0           | 470.0           | 200        | 450.0               | 470.0           |
| 450.0           | 480.0           | 300        | 449.5               | 479.5           |
| 450.0           | 490.0           | 400        | 450.0               | 490.0           |
| 450.0           | 500.0           | 500        | 450.0               | 500.0           |

注:  $\Delta f_{1t}$  和  $\Delta f_{2t}$  是双像互补解卷所用两张像的真实离焦值,  $\Delta f_{1d}$  和  $\Delta f_{2d}$  是搜索得到的离焦值.

率介于 0.30 nm 与 0.25 nm 之间.用程序 SAPI 共推出 888 套解.应用团簇分析法对这些解之间的平均相位差进行统计分析,相位差分布图(见图 2(c))显示只有一个单峰,即能够找到一个最大团簇用(8)式求最佳平均解.比较所求得的最佳平均解与真实的结构因子中的相位,用结构因子振幅作权重求相位错误百分比,结果为 31%.图 1(f)是用直接法相位外推得到的投影电势图,分辨率为 0.25 nm,与从原子模型计算的相应的投影电势(图 1(b))一致.

## 4 结 论

本文把直接法应用于二维蛋白质晶体高分辨电子显微像的解卷和分辨率的提高,利用抗生素蛋白链菌素晶体的已知结构模型从方法上验证了直接法应用于蛋白质晶体学的有效性.由于衬度传递函数的影响,应用直接法对抗生素蛋白链菌素的单张模拟像解卷时,大约有 100 个衍射点不能恢复,给寻找正确的离焦值带来困难.本文提出的结合两张高分辨电子显微像互补的解卷方法,此法克服了上述困难,能得到误差较小的离焦值,使解卷像更接近结构模型的投影电势.在直接法相位外推方面,结果表明,传统的联合品质因子分析不甚适用于挑选正确的相位套,借鉴蛋白质晶体学中的团簇分析法,通过对最大团簇内的相位套做加权平均,得到的相位信息与直接法外推得到 888 套中的最佳相位套非常接近.

本工作说明,针对生物大分子晶体的特点,把电子晶体学第二步图像处理技术中的解卷和相位外推两个步骤分别作些改动之后,可以应用于蛋白质晶体结构的测定,且测得结构的分辨率高于显微像的分辨率,而接近衍射分辨率.这种第二步图像处理技术发展成为蛋白质电子晶体学结构分析的新工具.下一步的工作将研究此技术在实验显微像和实验衍射强度上的应用.

- [ 1 ] D. J. DeRosier , A. Klug , *Nature* **217** ( 1968 ) , 130.
- [ 2 ] F. H. Li *et al.* , *Physics* **26** ( 1997 ) , 515 ( in Chinese [ 李方华等 *物理* **26** ( 1997 ) , 515 ] ).
- [ 3 ] J. M. Cowley , *Diffraction Physics* , 2nd Ed. ( Amsterdam , North-Holland , 1981 ) , p. 287.
- [ 4 ] R. Henderson , J. M. Baldwin , K. H. Downing , J. Lepault , F. Zemlin , *Ultramicroscopy* **19** ( 1986 ) , 147.
- [ 5 ] R. Henderson , J. M. Baldwin , J. A. Ceska , F. Zemlin , E. Beckmann , K. H. Downing , *J. Mol. Biol.* **213** ( 1990 ) , 899.
- [ 6 ] F. Thon , *Z. Naturforsch* **21a** ( 1966 ) , 476.
- [ 7 ] F. H. Li , *Proc. XIIIth Int. Cong. Electron Microsc.* ( 1994 ) , 481.
- [ 8 ] F. H. Li , *Microscopy Research and Technique* **40** ( 1998 ) , 86.
- [ 9 ] F. H. Li , H. F. Fan , *Acta Physica Sinica* **28** ( 1979 ) , 276 ( in Chinese [ 李方华、范海福 *物理学报* **28** ( 1979 ) , 276 ] ).
- [ 10 ] Z. Q. Fu , D. X. Huang , F. H. Li , J. Q. Li , Z. X. Zhao , T. Z. Cheng , H. F. Fan , *Ultramicroscopy* **54** ( 1994 ) , 229.
- [ 11 ] B. Lu , F. H. Li , Z. H. Wan , H. F. Fan , Z. Q. Mao , *Ultramicroscopy* **70** ( 1997 ) , 13.
- [ 12 ] H. Jiang , F. H. Li , Z. Q. Mao , *Micron* **46** ( 1999 ) , 375.
- [ 13 ] J. Liu , F. H. Li , Z. H. Wan , H. F. Fan , X. J. Wu , T. Tamura , K. Tanabe , *Materials Transactions JIM* **39** ( 1998 ) , 920.
- [ 14 ] F. H. Li , *J. of Microscopy* **190** ( 1997 ) , 249.
- [ 15 ] F. S. Han , H. F. Fan , F. H. Li , *Acta Cryst.* **A42** ( 1986 ) , 353.
- [ 16 ] H. P. Erickson , A. Klug , *Phil. Trans. Roy. Soc. London* **B261** ( 1970 ) , 105.
- [ 17 ] P. N. T. Unwin , R. Henderson , *J. Mol. Biol.* **94** ( 1975 ) , 425.
- [ 18 ] P. Bullough , R. Henderson , *Ultramicroscopy* **21** ( 1987 ) , 223.
- [ 19 ] S. B. Hayward , R. M. Glaeser , *Electron Microscopy at Molecular Dimensions* , edited by W. Baumeister , W. Vogel ( Springer-Verlag , Berlin , 1980 ) .
- [ 20 ] A. J. Avila-Saker , W. Chiu , *Biophys J.* **70** ( 1996 ) , 57.
- [ 21 ] H. F. Fan , Z. Y. Zhong , C. D. Zheng , F. H. Li , *Acta Cryst.* **A41** ( 1985 ) , 163.
- [ 22 ] H. F. Fan , S. B. Xiang , F. H. Li , Q. Pan , N. Uyeda , Y. Fujiyoshi , *Ultramicroscopy* **36** ( 1991 ) , 361.
- [ 23 ] J. J. Hu , F. H. Li , H. F. Fan , *Ultramicroscopy* **41** ( 1992 ) , 387.
- [ 24 ] D. Sayre , *Acta Cryst.* **5** ( 1952 ) , 60.
- [ 25 ] H. F. Fan , J. X. Yao , C. D. Zheng , Y. X. Gu , J. Z. Qian , *SAPI-91* , A Computer Program for Automatic Solution of Crystal Structures from X-ray Diffraction DATA ( Institute of Physics , Chinese Academy of Sciences , Beijing , China , 1991 ) .
- [ 26 ] J. X. Yao , *Acta Cryst.* **A37** ( 1981 ) , 642.
- [ 27 ] Y. D. Liu , Y. X. Gu , C. D. Zheng , Q. Hao , H. F. Fan , *Acta Cryst.* **D55** ( 1999 ) , 846.
- [ 28 ] P. C. Weber , D. H. Ohlendorf , J. J. Wendoloski , F. R. Salemme , *Science* **243** ( 1989 ) , 85.
- [ 29 ] W. A. Hendrickson , A. Pähler , J. L. Smith , Y. Satow , E. A. Merritt , R. P. Phizackerley , *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86** ( 1989 ) , 2190.
- [ 30 ] J. M. Cowley , A. F. Moodie , *Acta Cryst.* **10** ( 1957 ) , 609.

## APPLICATION OF DIRECT METHOD TO ELECTRON CRYSTALLOGRAPHIC IMAGE PROCESSING FOR TWO-DIMENSIONAL PROTEIN CRYSTALS<sup>\*</sup>

YANG SHI-XIN LI FANG-HUA LIU YU-DONG GU YUAN-XIN FAN HAI-FU

( Institute of Physics & Center for Condensed Matter Physics , Chinese Academy of Sciences , Beijing 100080 , China )

( Received 24 March 2000 )

### ABSTRACT

The direct method was applied to the image processing for [ 001 ] simulated high-resolution electron microscope images of protein streptavidin. The image deconvolution was carried out for two images of different defocus values such that the structural information loss due to the zero crosses of contrast transfer function could be compensated. It is shown that the determined defocus values based on two images combined are closer to the true ones than those based on a single image. The phase extension was also carried out for this protein. The initial structure factors were calculated from the theoretical structure model with the phases of 0.30 nm resolution and amplitudes of 0.25 nm resolution. Both the deconvoluted image of 0.30 nm resolution and projected crystal structure of 0.25 nm resolution obtained are in agreement with the projected potential distribution maps of theoretical structure model.

**Keywords :** high-resolution electron microscopy , direct method , image processing

**PACC :** 6043 , 6407

<sup>\*</sup> Project supported by the National Natural Science Foundation of China.