
生物物理所开发冷冻结构光照明与电镜关联成像新技术

作者：writer 来源：中国科学院

本文原地址：<https://www.iikx.com/news/progress/23042.html>

本文仅供学习交流之用，版权归原作者所有，请勿用于商业用途！

生物物理所开发冷冻结构光照明与电镜关联成像新技术

面向原位结构解析的冷冻电子断层成像(cryo-ET)是研究生物大分子复合物的原位高分辨率结构及其相互作用关系的关键技术。但受限于电子束穿透能力，需要先利用聚焦离子束(cryo-FIB)将细胞和组织样品减薄成200纳米左右的薄片后才能进行cryo-ET数据采集。冷冻光电关联成像技术可以为cryo-FIB精准制备包含特定目标结构的冷冻含水切片提供荧光定位指导，但是冷冻荧光显微镜的光学分辨能力以及光镜、电镜图像的对齐精度是制约冷冻光电关联实验成功率的关键因素。

为了解决上述技术瓶颈，中国科学院生物物理研究所蛋白质科学研究平台生物成像中心一直致力于开发新型冷冻光电关联成像技术，在前期自主研发的冷冻光电关联成像高真空光学冷台HOPE(*Journal of Structural Biology*, 2017)基础上，通过引入结构光照明成像技术，成功研制了冷冻结构光照明成像系统HOPE-SIM，实现了横向优于200纳米的光学分辨率，以及优于150纳米的光镜-聚焦离子束三维关联对齐精度，相关研究成果于4月29日在线发表在《通讯-生物》(*Communications Biology*)上。

光镜-电镜关联成像技术(Correlative Light and Electron Microscopy, CLEM)，是利用荧光特异标记对特定生物大分子或亚细胞结构进行荧光示踪，实现对整个细胞的三维荧光定位成像，之后通过荧光图像和电镜图像的配准，获得荧光标记信号和电镜超微结构的关联信息。冷冻光电关联成像技术的应用方向之一，是通过关联图像，指示出荧光标记的结构在电镜图像中的具体位置，实现对荧光示踪目标物的电镜高分辨率结构解析。而得益于光镜成像对生物样品的无损特性，可以在不损伤样品的前提下获得样品内部的三维荧光定位信息，再通过光电关联成像流程和关联对齐软件，将三维荧光图像与扫描电镜图像关联匹配，实现在荧光信号的指导下进行cryo-FIB对目标区域的减薄加工。如此，便可以避免“盲切”，实现对荧光指示目标物的指导切割，以期提高冷冻聚焦离子束技术用于电子断层成像切片样品制备的效率。

目前，光电关联成像指导cryo-FIB减薄技术流程的实现方式有多种类型，根据系统构成可以分为光镜电镜分体式光电关联成像系统和集成型光电关联成像系统。生物成像中心技术团队自2013年开始专注于冷冻光电关联成像技术方法学研究，在光镜电镜分体式光电关联成像系统研制方面，于2017年自主研制了一款可搭载在倒置荧光显微镜上的高真空光学冷台HOPE(High-vacuum Optical Platform for cryo-CLEM)，HOPE可与透射电镜冷冻样品杆适配连接，完成荧光定位后样品将随冷冻样品杆被转移进电镜当中进行高分辨率数据采集，同时结合光电关联定位软件，可以实现大视野光学定位成像与电镜成像的匹配。HOPE采用冷冻样品杆来实现冷冻光镜成像、冷冻传

输以及冷冻透射电镜成像，有效避免了光电关联成像过程中对冷冻载网的反复夹取，保证了冷冻样品的完整性和同一性，有效提高了关联成功率和实验效率。

然而，基于宽场成像技术的HOPE系统受限于光学衍射极限和冷冻光学成像装置的空间限制等，仅能使用长工作距离、低数值孔径的冷冻荧光成像系统，所能达到的横向分辨率约为400-500纳米，纵向分辨率则达微米级，这对于精准捕获数微米厚度细胞内百纳米尺度的目标结构而言，是非常不利的。

结构光照明超分辨荧光成像技术在能提高宽场荧光显微镜一倍分辨率的前提下，还具备不需要特殊的荧光探针、成像速度快、辐照密度低等技术优势，是所有超分辨成像技术中最适合应用到冷冻环境中对冷冻样品进行高分辨率成像的技术。因此，研究团队选择了结构光照明成像技术作为提高冷冻荧光成像分辨率的手段，基于倒置荧光显微镜自主研制了大腔室高真空冷台，腔室内置0.9NA长工作距离光学物镜和防污染器系统(ACS和cryo-box)、外接真空传输系统(TPS)以及冷冻电镜样品杆(cryo-holder)适配器。同时，借助三维结构光照明(SIM)光路，实现了真空环境下对冷冻样品的三维结构光照明成像，在提高冷冻光镜分辨率的同时，有效增强了光电关联成像样品传输过程中对冷冻样品的保护。

图1 冷冻结构光照明成像系统HOPE-SIM。a.HOPE-SIM硬件组成， b. HOPE-SIM设计原理图， c. HOPE-SIM光路原理图

借助HOPE-SIM高分辨率冷冻光电关联成像系统以及自主编写的三维关联对齐软件3D-View，团队成功制备了包含宿主细胞内鼠疱疹病毒(图2)和海拉细胞内荧光标记的中心体(图3)的细胞切片样品，通过冷冻电子断层原位结构分析图像处理流程和软件分析其在原位结构。实验结果表明，

基于HOPE-SIM技术的高精度冷冻光电方法可以实现优于150nm的三维对齐精度，为尺寸较大、胞内丰度高的目标物的原位捕获提供了一种高效、精确的靶向冷冻聚焦离子束减薄技术方案。

图2 基于 HOPE-SIM冷冻光电联技术捕获宿主细胞中的MHV-68病毒颗粒。a.冷冻明场透射光图像;b.HOPE-SIM荧光图像的z投影。绿色，荧光微球。红色，MHV-68病毒;c将b中的荧光图像与a中的明场图像合并，以显示目标信号的位置;d.冷冻SIM和冷冻FIB图像之间的三维关联匹配;e.对目标区域减薄后的冷冻FIB图像;f.减薄后冷冻扫描电镜图像，与b中冷冻SIM图像的融合;g.制备的冷冻含水切片的冷冻透射电镜显微照片(3600倍);h.冷冻断层扫描成像，放大倍率为64000倍，显示了被捕获的病毒颗粒。

图3 基于HOPE-SIM技术流程精准捕获海拉细胞内红色荧光标记的中心体。a.3D-View光-电关联软件获得的冷冻结构光-cryo-FIB关联配准图;b.cryo-FIB对红色荧光标记所在区域进行减薄;c.cryo-FIB减薄获得的200nm冷冻含水切片;d.冷冻含水切片在透射电镜下8700倍成像，黄色框线内为目标中心体;e.目标中心体的cryo-ET数据采集(53000倍)激光指向位置主动稳定系统示意图。

相关研究工作得到国家重点研发计划、国家自然科学基金、中科院战略性先导科技专项(B类)等项目的资助。

值得一提的是，在集成型光电关联成像系统研制方面，2023年1月，《自然-方法》(Nature Methods)报道了中科院院士、生物物理所研究员徐涛和研究员纪伟团队研发的cryo-CLIEM系统和生物成像中心技术团队自主研发的三束共焦成像系统ELI-TriScope系统，在双束扫描电镜真空腔室内集成了光学成像系统，避免了样品传输过程，有效提高了冷冻光电关联成像的精度和成功率。其中生物成像中心技术团队自主研发ELI-TriScope系统集成了一个基于冷冻样品杆的传输系统(cryo-transfer system)，并在冷冻样品下方嵌入了一个倒置荧光成像系统(cryo-STAR system)，从而实现电子束(E)、光束(L)和离子束(I)被精确地聚焦到同一点上，可以在cryo-FIB减薄的同时实时监控目标分子的荧光信号，显著提高了cryo-FIB减薄技术对特定目标物的捕获精度，将制备冷冻含水切片的时间成本从每片2-2.5小时降低到约0.8小时。

生物成像中心技术团队研发的基于结构光照明技术的HOPE-SIM系统可以实现三维高分辨率冷冻荧光成像，同时还可以通过冷冻样品杆直接衔接三束共焦光电关联成像系统ELI-TriScope，实现高分辨三维冷冻荧光成像的同时，完成后续原位荧光实时监控聚焦离子束减薄全技术流程，有效提高了冷冻聚焦离子束减薄的效率、准确性、成功率和样品制备通量，为原位结构解析研究提供了成功的解决方案，在未来的原位结构生物学中有巨大应用潜力。

论文链接

研究团队单位：生物物理研究所

更多 科学进展 请访问 <https://www.iikx.com/news/progress/>

本文版权归原作者所有，请勿用于商业用途，[爱科学iikx.com](https://www.iikx.com)转发