



体电子显微学前沿*

张 艳^{1)**,**} 陈 曦^{2)**} 李喜霞^{3)**} 李琳琳^{2)**} 陈联万¹⁾ 韩 华^{2,4)***} 孙 飞^{1,3,5)***}⁽¹⁾ 中国科学院生物物理研究所生物大分子重点实验室, 北京 100101;⁽²⁾ 中国科学院自动化研究所脑认知与类脑智能重点实验室, 微观重建与智能分析团队, 北京 100190;⁽³⁾ 中国科学院生物物理研究所生物成像中心, 北京 100101;⁽⁴⁾ 中国科学院大学未来技术学院, 北京 101408; ⁽⁵⁾ 中国科学院广州生物医药与健康研究院, 广州 510530)

摘要 电子显微成像技术的快速发展使得对完整细胞、组织乃至整个机体进行高分辨三维结构解析研究成为可能, 这些可进行大尺度生物样品三维结构研究的电子显微成像技术统称为体电子显微学技术 (volume electron microscopy, vEM)。近年来, vEM在研究尺度、分辨率、吞吐量和易用性等方面发展迅速, 在整个生命科学领域的应用呈爆炸式增长, 该技术因此被《自然》(Nature) 评为2023年最值得关注的七项前沿技术之一。然而, vEM相关技术的发展和在国内起步较晚, 亟待进一步推广。本综述涵盖了vEM的发展历程、技术分类、样品制备、数据收集、图像处理等全方位的内容, 便于生命科学、医学等领域研究人员去了解、学习、应用和进一步发展该技术。

关键词 体电子显微学成像技术, 扫描电镜, 透射电镜, 样品制备, 图像处理, 跨尺度, 深度学习, 超微结构
中图分类号 Q6 **DOI:** 10.16476/j.pibb.2024.0324

体电子显微学技术 (volume electron microscopy, vEM) 能在纳米分辨率揭示细胞、组织、器官, 甚至整个生物机体的三维 (3D) 结构。随着样品制备自动化程度的提升、成像通量的扩大, 以及分辨率的突破, vEM已经在生命科学、医学等领域的研究中被广泛应用, 是一项正在经历快速发展的前沿成像技术。

vEM成像技术的样品在取材之后, 通过化学固定或冷冻固定等方式制备。通常, 利用电子显微镜, 将固定后的样品进行深度大于1 μm 的连续成像的方法划归为vEM成像技术。根据成像原理的不同, vEM成像技术主要分为两类: 一类是基于透射电子显微镜 (transmission electron microscopy, TEM) 的vEM成像技术, 另一类是基于扫描电子显微镜 (scanning electron microscopy, SEM) 的vEM成像技术。其中, TEM技术使用电子束穿透样品后收集携带结构信息的弹性散射电子成像, 而SEM是电子束在样品表面进行光栅扫描, 利用二

次和/或背散射电子生成图像。不论采取哪种方式, 样品中变化多端的超微结构在电子束照射后, 相机会收集产生携带样品结构信息的不同能量的电子信息。这些不同能量的电子信息产生了不同对比度、不同分辨率生物样品的超微结构图像。这些技术中产生的超微结构图像通过堆叠和后处理形成样品的3D立体结构 (图1)。通常, 根据样品体积大小、预期的分辨率、成像的时间成本等综合确定具体采用的vEM技术类型。

科学问题是技术发展的驱动力。实际上, 基于TEM的vEM技术是较早出现的vEM成像技术。不

* 国家自然科学基金 (32371248), 国家自然科学基金重大研究计划 (92254306) 和国家杰出青年科学基金 (31925026) 资助项目。

** 并列第一作者。

*** 通讯联系人。

张艳 Tel: 010-64888137, E-mail: yanzhang@ibp.ac.cn

韩华 Tel: 010-82544710, E-mail: hua.han@ia.ac.cn

孙飞 Tel: 010-64888582, E-mail: feisun@ibp.ac.cn

收稿日期: 2024-07-16, 接受日期: 2024-09-18

同于光学显微镜几百微米甚至几毫米的成像深度, 作为电镜光源的电子束只能穿透很薄的样品层, 通常在几纳米到几微米的厚度范围, 具体依赖于电子束的能量^[1]。如何利用电镜研究细胞、组织等大尺度生物样本的结构? 这个问题, 直接驱动了连续切片透射电镜成像技术 (serial section transmission electron microscopy, ssTEM)^[2]、连续切片电子断层显微成像技术 (serial section electron tomography, ssET)^[3] 这两种技术的出现。这些技术通常将样品切割成适合电镜成像的尺度, 然后进行连续超薄切片 (ssTEM) 或连续半薄切片 (ssET) 后进行TEM成像。这些技术随着线虫全神经系统的结构解析, 在过去几十年中被广泛应用在连接组学等研究中^[4]。

虽然起步较早, 但基于TEM的上述两种vEM成像技术一直困扰于以下弊端: ssTEM需要进行大量的手动操作, 这导致样品制备过程缓慢且容易出错, 例如, 切片收集、染色及转移过程中容易造成样品的褶皱、损坏或丢失, 最终导致重建结果的形变和不连续性。ssET重构结果中Fourier空间的缺失锥, 给重构的结果带来了假象^[5]。虽然最新发展的自动串行TEM (TEMCA^[6] 和 GridTape, 见<https://luxel.com/gridtape/>) 一定程度上提高了基于TEM的vEM成像的通量和自动化程度, 但上述问题依然不可忽视。

鉴于以TEM为基础的vEM成像技术中的弊端, 也为了响应连接组学所面临的大体积和高分辨成像的双重挑战, 基于SEM的vEM技术近年来快速发展。这些基于SEM的vEM技术可以更快更可靠地获取连续切片的序列图像, 并随之发展了相应的各种软件工具来处理所获得的图像堆栈文件并进行定量分析, 极大地促进了在纳米分辨率水平上进行神经突触等3D超微结构研究。基于SEM的vEM技术主要包括: 序列块表面扫描电镜成像技术 (serial block-face scanning electron microscopy, SBF-SEM)^[7]、聚焦离子束扫描电镜成像技术 (focused ion beam scanning electron microscopy, FIB-SEM)^[8] 和连续切片阵列扫描电镜成像技术。连续切片阵列扫描电镜成像技术主要包括三大主流方法, 即普通的连续切片扫描电镜成像技术 (serial section scanning electron microscopy, ssSEM)^[9]、超薄切片机自动带式收集扫描电镜成

像技术 (automated tape-collecting ultramicrotome scanning electron microscopy, ATUM-SEM)^[10-11], 以及自动切片收集扫描电镜成像技术 (automatic collector of ultra-thin sections scanning electron microscopy, AutoCUTS-SEM)^[12]。SBF-SEM可以边切削样品边成像, 在大尺度的组织或小的生物有机体的结构研究中很受欢迎; FIB-SEM可以实现高分辨率的各向同性重建, 近几年在vEM成像领域备受青睐; ATUM/AutoCUTS-SEM具备可以保存样品、自动切片收集和自动成像的特点, 使其在更大尺度样品 (>1 mm) 的结构研究中大放异彩。为了提高成像通量, ZEISS公司推出了MultiSEM^[13], DELMIC公司推出了Fast-EM (<https://www.delmic.com/en/products/fast-imaging/fast-em>) 等多束SEM成像设备。虽然大大提升了成像通量和数据采集效率, 但是高通量成像设备的普及和设备成本降低还需很长的发展历程。任何一项技术都不是完美的, 需要在发展中不断精进。基于SEM的vEM成像技术也不例外。比如, SBF-SEM、ssSEM、ATUM/AutoCUTS-SEM都存在样品厚度带来的轴向信息缺失问题; SBF-SEM在连续成像过程中存在样品块的荷电问题^[14]; FIB-SEM虽然可以实现各向同性重建, 但是成像体积有限, 难以实现较大尺度生物样品的高分辨率成像, 等等。

随着样品制备和自动化连续切片技术不断提升, TEM和SEM光源、探测器等硬件不断更迭, 基于深度学习的大数据科学计算等软硬件也飞速发展。这些因素共同推动了vEM在生物学中的应用迅速跨越了早期单纯地应用于连接组学的阶段。现已广泛应用于细胞结构和非脑组织成像研究, 涉及感染、免疫、癌症、神经退行性疾病、发育生物学、植物生物学、合成生物学、生物力学、生物材料和临床研究等众多领域。

本文旨在将vEM这一前沿成像技术进行系统而专业的综述, 内容涵盖了vEM技术从样品制备到数据收集, 从数据处理到结构分析, 从技术原理到实际应用等各个方面 (图1)。希望通过本综述, 将vEM这一已经潜入各个学科领域的前沿技术进一步推广, 初学者可以通过本综述掌握基本的vEM操作技术流程, 熟知者可以进一步深入了解该技术的背后原理, 开发者可以针对现有技术的壁

垒进一步展开研发。最终形成国内 vEM 技术应用和开发的新社区, 推动中国 vEM 技术的前瞻发展,

并使 vEM 技术在医学、生命科学、临床诊断等领域发挥更纵深的作用。

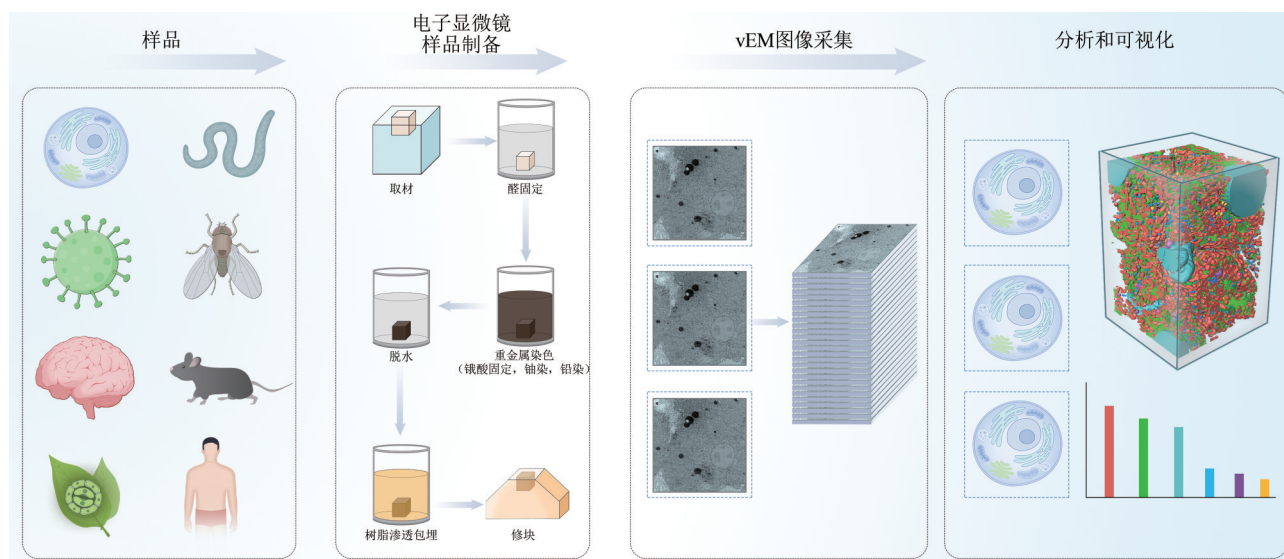


Fig. 1 Overall workflow of vEM imaging technology

图1 vEM技术的整体流程

1 体电子显微学技术分类

vEM技术是一系列大尺度高分辨3D重构技术的统称(图2), 根据电镜成像原理主要可分为两大类: a. 基于透射电镜技术的ssTEM(图2a)和ssET(图2b); b. 基于扫描电镜的SBF-SEM(图2d)、FIB-SEM(图2e), 以及ssSEM(图2f)和ATUM-SEM/AutoCUTS-SEM(或称为Array Tomography、ATUM+Array Tomography, 图2g)等。为了提高成像通量获得更大尺度样品的3D结构, 最近又涌现出诸多新的成像技术。例如: 基于载网条带支撑的连续切片透射电镜成像技术(GridTape transmission electron microscopy, GridTape TEM, 图2c)、等离子聚焦离子束扫描电镜成像技术(plasma FIB-SEM, pFIB-SEM, 图2e), 以及连续切片的多电子束扫描成像(ssSEM+Multibeam, 图2f, g)。下面具体介绍各技术的成像原理、技术实施策略和优缺点。

1.1 基于TEM的vEM技术

1.1.1 连续切片透射电镜成像技术(ssTEM)

ssTEM是最传统的获得细胞3D超微结构的方法。其原理是用狭缝载网手动收集连续超薄切片, 然后进行TEM成像, 从而实现生物样品的3D重构^[5]。1986年, White等^[4]历时近15年, 利用此技术绘制出线虫302个神经元和9 000个神经元连接位点的图谱。基于此项工作, 科学家首次提出连接组学“connectomics”这个概念, 从而开启了一项全新领域。ssTEM的优点是: 图像分辨率高、单张成像速度快、样品可保存并可重复成像, 且无需特殊昂贵的设备, 几乎任何一个电镜实验室都可开展此技术。其缺点是: 它对技术人员的要求很高, 因为用狭缝铜网手动收集连续切片极易出现切片丢失、顺序错乱、切片偏转褶皱等问题, 且速度较慢; 此外, 传统的TEM成像通量很低, 视野较小, 图像后期处理较为复杂, 从而整体实验周期较长, 因此限制了该技术在较大尺度3D重构中的应用。

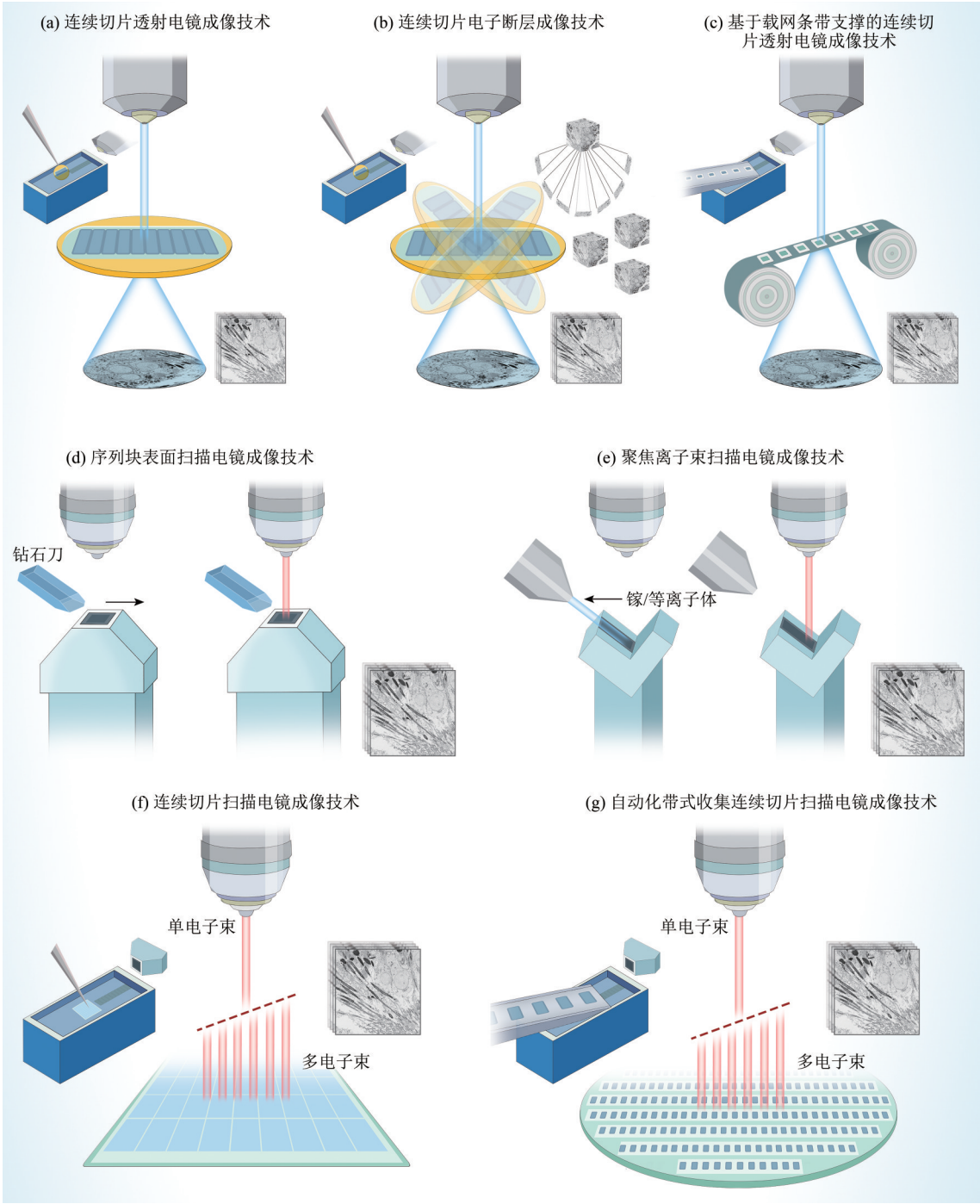


Fig. 2 Different strategies for vEM imaging technology^[9]

图2 体电子显微技术的不同策略^[9]

vEM是基于透射电镜和扫描电镜的多种成像方式的统称。对于透射电镜,探测器收集的是穿透样品的携带样品信息的弹性散射电子的信号,如ssTEM(a)、ssET(b)、Grid-Tape TEM(c);对于扫描电镜,收集的是与样品相互作用的背散射电子和/或二次电子的信号。如SBF-SEM(d)、FIB-SEM/pFIB-SEM(e)、ssSEM(f)、ATUM-SEM/AutoCUTS-SEM(g)。其中(f)和(g)既可以使用单电子束成像,也可以用多电子束成像以提高成像通量。

为了满足研究尺度日益增长的需求,2004年美国科学家Potter等^[15]研制出“机械臂”载网加载系统,2007年来自美国的Lefman等^[16]研制了

“加特林弹药筒”载网加载系统,2011年以来,美国霍华德·休斯医学研究所(HHMI)珍妮莉亚研究园区(Janelia Research Campus)的Bock等^[17-19]

陆续开发了定制化的 TEMCA 系列 (TEMCA1、TEMCA2、TEMCA2+ATPS) TEM, 以提高成像通量。其中, TEMCA 电镜一方面可以同时加载 512 个载网, 提高了换样速度, 另一方面将一系列探测器组合到一个大型传感器中, 增加了成像视野, 显著提高了成像速度, 从而获得了完整成年雌性果蝇全脑 3D 电镜数据^[18]。

1.1.2 基于载网条带支撑的连续切片透射电镜成像技术 (Grid-Tape TEM)

虽然 TEMCA 等措施实现了成像自动化, 提升了成像速度, 但是切片收集方式仍然依赖于人工手动收集到传统的狭缝载网。2019 年, 来自美国哈佛医学院波士顿儿童医院 F.M. Kirby 神经生物学中心的 Graham 等^[20] 开发的 Grid-Tape TEM 既实现了自动化切片收集, 也实现了电镜成像的自动化, 显著提高了 vEM 通量。该技术的原理 (图 1c) 是利用改进的超薄切片机和切片自动收集装置, 让连续切片自动落在特制的带孔的 Kapon (美国杜邦公司生产的聚酰亚胺薄膜材料) 收集带上, 其中孔内覆盖有电子束可穿透的支持膜, 比如方华膜 (formvar)。切片带通过在定制的 TEM 上改良的样品传输装置传送, 使得每个切片可以利用快速探测器阵列自动成像, 从而快速获取纳米分辨率的 TEM 图像。利用该技术, 研究者获得了一个成年雌性黑腹果蝇腹侧神经索 (VNC) 的突触分辨率数据集, 重建了 507 个控制四肢的运动神经元来研究控制腿部和翅膀运动的神经元网络^[21]。目前该技术中涉及的电镜改造已被 Voxa Blade 公司商业化, 特制的收集带也可以从 Luxel 公司购买, 国内也有研究机构在开展类似的研究。与此同时, 成像速度更快的 piTEAM 系统也被开发出来, 该系统由一组为 GridTape 成像优化的 TEM 组成, 获得了 1 mm³ 的鼠脑皮层数据集 (>2 PB)^[6]。新技术革命为传统的 ssTEM 注入了自动化、高通量的活力, 同时也为数据处理和分析带来了新的挑战。

1.1.3 连续切片电子断层成像技术 (ssET)

电子断层成像 (ET) 是在电子束照射下对一张厚切片 (200~300 nm) 采集一定倾转角度范围内的一系列 TEM 图像 (比如 -70° 到 +70° 范围), 然后通过背投影等算法计算得到 3D 结构, 其轴向分辨率可达到 2 nm^[22-23], 被众多实验室广泛用于亚细胞 (如细胞器相互作用) 的高分辨 3D 结构研究。但受限于电子束穿透样品的厚度, 即使在 300 kV 加速电压下, 生物样品厚度一般也不能超过

500 nm, 所以单一切片的 ET 技术无法满足更大尺度的成像需求。使用 ssET 可以满足更大尺度的要求。ssET 通过对连续的每张厚切片各自进行 ET 成像来增加样品的成像体积^[5]。该技术的优点是轴向分辨率很高, 缺点是采集每个断层数据时间较长, 视野较小, ssET 切片的重构结果由于缺失楔的存在导致高角度的信息缺失, 且数据处理较为复杂^[23-25]。后来 Veeraraghavan 等^[26] 提出了一种更快的断层图像重构技术, 该技术可以用有限的倾转增加信息的深度。虽然 ssET 因样品收集和成像尚无法实现完全自动化, 限制了其在更大尺度常温样品 3D 重构中的应用, 但是低温电子断层成像技术 (cryo-ET) 却因其可对天然细胞内的大分子复合物进行高分辨率成像, 目前正广泛应用于细胞生物学领域的原位结构研究中。

1.2 基于 SEM 的 vEM 技术

1.2.1 序列块表面扫描电镜成像技术 (SBF-SEM)

SBF-SEM 最初由德国马克斯普朗克医学研究所的 Winfried Denk 和 Heinz Horstmann^[7] 于 2004 年提出, 后来陆续推出了四种商用的产品可供使用, 分别是 3View (Gatan 公司, 目前已停产)、Volume Scope (Thermo Fisher Scientific 公司)、Katana (ConnectomX 公司)、Volutome (ZEISS 公司) 及其自制的一些解决方案。其原理是利用 SEM 腔室内置的原位切片机实现原位的自动连续切片, 然后对暴露出的样品表面进行序列背散射电子成像, 最终获得 3D 结构。对于大多数生物样品, SBF-SEM 的横向分辨率可达到 ~5 nm, 切片厚度最小可达到 25 nm (Volume Scope 的多能反卷积 MED-SEM 可将 z 轴分辨率提高到 <10 nm)。SBF-SEM 应用于诸多神经科学和其他生物学领域的研究, 其优点是成像体积比 FIB-SEM 大, 效率高, 同 FIB-SEM 一样图像配准较为简单, 缺点是工作距离不够理想, 限制了分辨率和电镜探测器的选择。对于导电性差的样品容易因局部负电荷积累影响图像质量, 切片时容易出现颤痕或不完整等缺陷。目前最优的做法是使用局部电荷补偿系统在块面局部注入气流以减轻电荷效应^[27]。对于图层的丢失或污染问题, 一种改进的方法是在图像采集过程中增加碎片检测和清理的步骤^[28]。

1.2.2 聚焦离子束扫描电镜成像技术 (FIB-SEM)

FIB-SEM 最早由瑞士科学家 Holzer 等^[8] 于 2004 年提出, 其原理是原位利用聚焦镱离子束铣削感兴趣的微小区域的表面, 将其暴露后自动获取

背散射电子后进行成像, 从而获得一系列电镜图像, 将其对齐配准之后, 实现生物样品的3D重构。目前该技术已非常成熟, 且镱离子的商业化电镜品牌众多。FIB-SEM的突出优点是: z 轴的分辨率较高(可达5 nm, 接近ET分辨率)^[29-30], 可以获得各向同性的体素, 切片缺陷(破损、褶皱、丢失等)相对较少, 原位切割有利于后期图像的对齐配准。另外, 由于电子束传递给成像表面的负电荷可通过随后离子束带来的正离子而减轻, 因此FIB-SEM可用于成像对比度差的样品。但是, 镱离子切割的能力和有限的速度, 影响了该技术的视野和通量。同时, 长时间操作对仪器的稳定性和样品的形变也都提出了考验, 因而FIB-SEM在小体积生物样品(特别是亚细胞水平)的3D重构研究中应用非常广泛, 例如: 酵母细胞各细胞器的分布^[31]、内质网与其他细胞器的相互作用^[32]等。

为了解决FIB成像速度和持续工作时间方面的普遍缺陷, 2017年, 美国霍华德·休斯医学研究所(HHMI)珍妮莉亚研究园区(Janelia Research Campus)的Xu等^[33]设计定制了一种增强型FIB-SEM系统(eFIB-SEM)。该系统利用样品台位置的正向偏置提高了成像速度, 引入了多层错误和干扰保护措施减少故障, 采用离子束闭环控制以保持仪器稳定性(成像中断后可无缝恢复); 重新定位离子束位置(与电子束夹角由标准的 $52^\circ\sim 55^\circ$ 改为 90°)以缩短工作距离、提高成像质量, 标本还可以通过热刀技术^[34]分切成多个连续的包埋块, 然后在多个eFIB-SEM仪器上并行成像, 从而进一步提高速度和通量。利用此技术他们获得了体素为8 nm的果蝇视叶组织($>10^6\ \mu\text{m}^3$)数据集^[33]和4 nm体素的可成像体积 $>10^5\ \mu\text{m}^3$ 的全细胞和组织数据集(癌细胞、免疫细胞、小鼠胰岛到果蝇神经组织等10种)^[35]。为解决镱离子切割速度慢的问题, 近几年, 等离子体FIB(plasma FIB, pFIB)、气团离子束^[36], 以及多离子束等最新的设备陆续推出。例如使用氧^[37-38]、氩^[39]、氦^[40-41]和氮离子来切割生物标本, 这些离子切削速度更快, 面积更大, 从而提高了FIB-SEM的研究尺度。

值得一提的是, 除了在常温树脂样品方面的应用之外, FIB-SEM在对玻璃化样品的低温应用领域也日益增多。cryo-FIB现已被广泛用于为cryo-ET制备薄的细胞“片层”, 从而促进了cryo-ET的快速发展; cryo FIB-SEM也可以在低温下直接对快速冷冻或高压冷冻后玻璃化的细胞或组织样品进

行连续成像, 避免了化学试剂、脱水、重金属进入导致的形变和假象, 从而获得更加真实的生物3D结构。这种低温体电子显微学技术(cryo-vEM)与高分辨率Cryo-ET结合的潜力令人万分期待。

1.2.3 连续切片扫描电镜成像技术(ssSEM)

ssSEM(也称为Array tomography)主要是指利用超薄切片机和钻石刀将连续切片顺序收集到载体(硅晶片、碳涂层、氧化钢锡涂层或其他导电涂层的玻璃片或塑料薄膜等)^[9]上之后, 置于SEM成像, 再通过后期的图像处理, 最终获得3D结构^[42]。手动收集连续切片技术难度大, 容易造成切片缺陷, 仅适用于少量切片的收集(<500)。为提高切片通量, 先后出现了ASH-100^[43]、硅片提升装置^[44]、改良刀^[45]、“Arraybot”计算机控制收集^[42]、“MagC”磁性收集^[46], 以及商业化的ARTOS 3D超薄切片机(徕卡公司)、ASH2硅片夹持工具(阿姆西公司)等半自动收集的措施。然而, 应用最为广泛、自动化程度最高、切片收集通量最大的方法是基于自动化带式收集的连续超薄切片SEM成像技术, 其典型代表是美国哈佛大学Jeff Lichtman团队开发的ATUM-SEM^[10-11]及中国科学院生物物理研究所生物成像中心孙飞团队开发的AutoCUTS-SEM^[12]。其工作原理是使用常规超薄切片机进行树脂样品的连续切片, 用连续转动的条带进行切片收集。将收集的切片带粘贴到晶片上, 导电处理后转移至SEM中获取序列图像。目前ATUM和AutoCUTS装置均已商业化, 且助力于小鼠脑组织^[47-48]、斑马鱼^[49]、线虫^[12]、青芋花粉粒^[50]、猴视网膜组织^[51]和血管组织^[52]、苜蓿根瘤^[53-54]等多种样品的研究中, 特别是在捕捉机体内的小概率事件^[55-56]中发挥了重要作用。

ssSEM高通量成像的商业解决方案目前也越来越广泛及成熟。研究者通过多束扫描电镜如MutiSEM(ZEISS公司, 61/91束)和Fast-EM(DELMIC公司, 64束)、高速扫描电镜如Navigator SEM-100(聚束科技公司)和HEM6000(国仪量子科技公司), 以及多台电镜并行成像实现纳米分辨率的快速成像。此外, 由于ssSEM切片和成像是分离的, 特别适用于光电关联技术(correlative light and electron microscopy, CLEM)。基于连续切片库(50~200 nm)的构建、重复染色和成像等技术方法, 切片可以在电子显微镜观察之前先在光镜水平下成像, 将从免疫荧光、神经示踪剂或遗传编码探针收集的分子信息反映到细胞超微

结构上, 实现结构和功能的完美结合^[42, 57-59]。

1.3 不同重构技术的特点比较

每种 vEM 技术的成像方法各有其优势和劣势 (表 1)。在图像分辨率方面, TEM 的横向分辨率优于 SEM, 轴向分辨率最高的是 ssET 和 FIB-SEM。由于自动成像的定制化 TEM 设备目前还没有完全商业化, 对于多数实验室来说, 更为成熟的基于 SEM 的高通量自动化图像采集技术更方便使用, 这也使得基于 SEM 的三种策略在大尺度 (>1 μm) 3D 重构中的应用更为普遍。FIB-SEM 和 SBF-SEM 的最大优势在于自动化程度高, 特别是 FIB-SEM 图像质量高, 很少有传统切片造成的缺陷和形变, 从而降低了后期图像处理的难度, 其较高的 z 轴分辨率可以获得各向同性的高分辨率 3D 数据集。二者的显著缺点在于损毁式成像, 即样品不可重复使

用, 且成像速度慢, 尤其是 FIB-SEM。而 ATUM-SEM 和 AutoCUTS-SEM 方法的突出优势在于: 样品可保存, 可重复成像, 从而使珍贵的样品可以像图书馆里的图书一样反复“查阅”, 且科研人员可针对感兴趣的区域分次研究, 从而提高了采集效率和灵活性。同时, 利用商业化的 MultiSEM 和 Fast-EM, 以及多台 SEM 并行成像, 可以进一步提高成像通量, 在研究毫米级尺度的样品上, 其技术优势更为明显。虽然最新的 GridTape TEM 技术, 特别是匹配 piTEAM 系统的成像速度更快, 分辨率更高, 但是其技术门槛也更高。一方面因为 GridTape 收集带价格较为昂贵, 且使得每张切片都能准确无误落入每个孔、同时孔内支持膜又无破损的技术难度较大; 另一方面因为改造 TEM 成本较高, 因而仅有少数的实验室才有能力使用该技术。

Table 1 Technical features of different vEM imaging technologies

表1 体电子显微学技术 (vEM) 不同重构策略的特点比较

		透射电子显微镜 (TEM)			扫描电子显微镜 (SEM)		
		ssTEM	ssET	GridTape TEM	FIB	SBF	ATUM/ AutoCUTS
最高	x, y 方向	1~2	1~2 或更小	1~2	5	5	3
分辨率/nm	z 方向	30	2	30	5	25	30
切片最大尺度		~2 mm	~2 mm	~4 mm	20~100 μm	~1 mm	~4 mm
切片收集方式		手动	手动	自动	自动	自动	自动
切片工具		常规钻石刀	常规钻石刀	常规钻石刀	离子束	特殊钻石刀	常规钻石刀
切片载体		覆有支持膜的 狭缝载网	覆有支持膜的 狭缝载网	覆有支持膜的 带孔收集带	弃之	弃之	收集带
样品块尺度(边长)		<1 mm	>1 mm	>1 mm	<100 μm ²⁾	>100 μm	>1 mm
单张图像获取速度		非常快	非常慢	非常快	很慢	慢	快(非常快 ¹⁾)
成像方式		手动和自动 ³⁾	手动	自动	自动	自动	自动
样品保存		是	是	是	否	否	是
可否重复成像		可	可	可	否	否	可
切片与成像方式		独立	独立	独立	同时	同时	独立
重金属染色方式		块染或片染	块染或片染	块染或片染	块染	块染	块染或片染
数据处理(对齐 和拼接) 难度		大, 平移、旋转、 畸变矫正、衬度 均一化	大, 不同的 算法	大, 平移、旋转、 畸变矫正、衬度均 一化	小, 微小平移通常 足够	小, 微小平移通常 足够	大, 平移、旋 转、畸变矫 正、衬度均 一化
树脂偏好		基本都适用	基本都适用	基本都适用	Durcupan>其他树脂	硬度大的树脂	基本都适用
对切片厚薄的 敏感度		敏感	敏感	敏感	不敏感	不敏感	不敏感
存在问题		切片丢失、偏转、 错位、形变、破 损, 厚薄不均	存在信息 缺失	成本高, 切片丢 失、形变、褶皱、 破损、厚薄不均	盲切, 切片丢失, 碎 片、刀痕; 表面荷 电, 电子剂量敏感	盲切, 样品表面会 沉积离子材料, 可 能会有铣削痕迹	切片形变、褶 皱、破损、厚 薄不均、丢失

¹⁾ 使用 MultiSEM 或者 Fast-EM, 速度可以媲美 TEM; ²⁾ 使用 pFIB 切割尺度可以 >100 μm ; ³⁾ 使用类似 TEMCA 系列的定制化 TEM, 可以实现自动成像。

选择哪种3D重构方法主要取决于课题所追求的横向(x , y)和轴向(z)分辨率, 以及感兴趣结构的尺度。一般来讲, 体素大小至少要达到感兴趣结构的一半尺度, 此外还需考虑时间和经济成本。如果研究所需的横向分辨率较高(<2 nm), SEM的分辨率无法满足, 则优先选择基于TEM的3D重构方式; 如果SEM的分辨率足以满足需求, 那么基于SEM的3D重构方式因其较为成熟和自动化程度高, 更适合大多数实验室开展。对于研究尺度 <50 μm , 且目标结构表达丰度高的课题, FIB-SEM是最佳选择; 对于研究尺度较大, z 轴分辨率适中的课题, SBF-SEM因其自动化程度高、数据处理难度低, 常被列为不错的选择; 对于研究尺度 >100 μm , 所需 z 轴分辨率 >30 nm, 且希望获得不同分辨率的图像, 样品还很珍贵希望保存的课题, ssSEM无疑是最适合的方法。另外, 对于捕捉生物体内的小概率事件, ssSEM也优于FIB-SEM和SBF-SEM这两种方法。因为后两者目前还只是盲切, 除非借助X射线(X-ray)电子断层扫描等其他技术手段, 能够提前预判目标结构的位置。然而X-ray显微成像的分辨率(≥ 500 nm)较低, 仅适合分析反差大的结构特征, 对于在相似结构中寻找特定细胞的需求是无法满足的。

2 vEM的样品制备

体电镜的样品制备方法与普通对切片样品仅进行电镜成像二维(2D)观察的制样方法基本相同, 但体电镜对制样的要求更高, 比如体电镜要求样品具有较好的完整性, 树脂块要有很好的可切割性能等。而且体电镜由于不可以切片后再染色, 因此必须在包埋前进行重金属染色。而普通的切片样品成像一般仅进行2D观察, 所以既可以选择对样品块进行重金属染色, 也可以切片后再染色, 还可以在块染后再次进行切片染色。下面详细介绍体电镜的样品制备过程。

2.1 样品块的制备

良好的电镜样品制备是体电镜3D重建的基础, 同时也是后续精细结构进行量化分析的关键。基于连续超薄切片的体电镜技术, 需要超薄切片厚度达到50 nm甚至30 nm以下, 以保证生物组织3D结构的连续性。基于生物样品固定方法的不同, 体电镜样品制备主要分为基于化学固定的样品制备和基于高压冷冻与冷冻替代两种样品制备方法。

2.1.1 基于化学固定的样品制备(OTO)

化学固定是最常用的生物组织固定方法。生物组织体电镜样品化学固定制样方法通过固定、脱水、浸透、包埋和切片等一系列步骤, 最终获取组织块染色均匀、超微结构保存良好、细胞膜性结构清晰和切片导电性良好的电镜样品。在化学固定样品制备过程中, 生物样品取材后, 利用醛类和四氧化锇等化学物质, 通过化学反应与蛋白质和脂类之间形成交联, 从而保存生物样品超微结构。其中, 在低温条件下延长固定时间, 能够保证较好的组织固定效果的同时, 减少固定液对组织的抽提作用。随后, 通过有机试剂将生物组织或细胞内部水分替换出来。进一步, 利用环氧树脂逐步取代样品中的脱水剂, 最终形成一个非常耐溶剂和耐化学腐蚀的交联稳定的含有生物样品的树脂块。

为了增强高通量SEM成像过程中图像的衬度以及后期图像分割的效率, 需要利用重金属染色提高体电镜样品细胞膜性结构的对比度。四氧化锇是一种非电解质强氧化剂, 具有很好的电子染色作用。目前, 通过硫代甲酰二肼(thiocarbohydrazide, TCH)和两次四氧化锇处理的OTO(osmium tetroxide-TCH-osmium tetroxide)电镜样品制备方法, 利用TCH的桥连作用, 增加重金属锇在细胞膜上的含量, 从而提高细胞膜性结构的对比度^[60-61]。另外, 在体电镜样品化学固定制样过程中, 利用硝酸铅和醋酸双氧铀对样品在50°C条件下进行块染, 也可以显著提升样品的衬度以及导电性^[60-61]。需要注意的是, 在OTO电镜样品制备方法中, TCH反应过程中释放 N_2 形成气泡, 易破坏样品内部结构的完整性^[62]。

和传统电镜样品制备方法不同的是, 体电镜样品制备中树脂的配方至关重要。树脂的环氧基和硬化剂反应基之间的比率决定了聚合链的长度, 也决定了树脂块的切割性能。在钻石刀进行超薄切片的过程中, 钻石刀的切割面与样品表面有一定角度, 因此, 在切片过程中, 样品垂直面会受到钻石刀的挤压。样品垂直面挤压过大导致样品在垂直方向上挤压深度过多, 从而导致切片机在纳米级步进过程中无法实现样品连续切片及收集。因此, 偏硬的树脂利于后期连续切片的收集。但是, 偏硬的树脂会导致展片困难, 切片易出现褶皱等问题。偏软树脂的切片易于展片, 但是不利于收集厚度更薄的切片。此外, 样品不同区域的硬度差, 如树脂和样品交界处、样品内部之间, 也是导致切片出现褶皱的

原因之一。因此,需要根据不同的样品,调节树脂配方,获取软硬适中的生物组织电镜样品块,从而实现厚度在30~50 nm左右的序列切片的稳定收集。

基于化学固定的样品制备方法,还需要对生物组织的电镜样品进行切片镜检,包括检查切片质量和样品质量,监测超微结构保存完好度、染色衬度、切片有无污染、褶皱等问题,以确定是否需要重新制样。

2.1.2 基于高压冷冻与冷冻替代的样本制备

化学固定方法经常会给样品带来假象,而高压冷冻固定方法可以最大限度地保持样品的真实结构^[63-65]。高压冷冻固定方法(high pressure freezing, HPF)是利用高压(2 100 bar以上)液氮在毫秒级别对生物组织或细胞样本进行快速冷冻。高压可以抑制并减缓冰晶的形成,使得样品中的水分以玻璃化状态存在,从而较好保存了细胞和组织的真实状态。目前高压冷冻技术对样品的最佳冷冻深度可以达到200 μm 。对于含水量较大或难渗透的样品,如水熊虫、线虫和部分植物等样品,化学固定易导致样品皱缩并带来假象,这种情况的样品则推荐采用高压冷冻/冷冻替代的样品制备方法。

高压冷冻方法制样时,样品的取材过程至关重要,动植物可手动或用取材工具快速切取长度宽度均小于2 mm、厚度约200 μm 的样品。需要注意的是,植物组织需要在填充剂中抽气。在高压冷冻固定过程中,先加少量冷冻保护液浸润样品盘凹槽,凹槽内装入样品,然后用冷冻保护液加满样品盘凹槽,最后装上平底样品盘盖,送入高压冷冻仪。针对细胞样品,先在样品盘凹槽加入细胞与冷冻保护液的混合液,将蓝宝石片用磷酸缓冲溶液冲洗一下,然后用该蓝宝石片盖住样品盘凹槽,之后再送入高压冷冻仪。最后,在液氮里用预冷的镊子等工具,将样品盘拨入冻存管中,置于液氮下备冷冻替代用。

高压冷冻后的样品需要通过冷冻替代方法进行组织或细胞内脱水。冷冻替代是在低温条件下,利用有机溶剂将生物组织或细胞内部水分替换出来^[64-65]。常用冷冻替代剂为1%四氧化锇-丙酮溶液。冷冻替代完成后,样品会逐渐升温。另外,体电镜样品制备过程中,通常会利用重金属对样品进行多次染色,从而增加后期SEM成像时图像的衬度和信噪比。因此,在基于高压冷冻/冷冻替代的体电镜样品制备过程中,在样品恢复到室温后,可

以进一步通过0.5%醋酸铀-丙酮溶液对样品进行块染,从而增加细胞膜性结构对比度。随后与常规制备的样品一样进行后续的浸透、包埋、切片等实验步骤。

需要注意的是,由于冰晶损伤,高压冷冻与冷冻替代电镜样品制备方法也会不可避免地带来假象。虽然高压冷冻技术冷冻深度可以达到200 μm ,但是理想情况下只有接近样品盘表面50 μm 左右的深度可以避免冰晶的形成。冰晶可能来自高压冷冻的过程,也可能来自冷冻替代的过程。可以根据细胞膜性结构的光滑连续性以及细胞内部精细结构排布状态判断样品冰晶的情况。对体电镜样品制备而言,整个组织块超微结构保存良好是进行体电镜样品制备的前提,因此,选择适合高压冷冻/冷冻替代方法的生物样品以及后期评估样品的整体冷冻质量至关重要。

2.2 连续切片的制备和收集

纳米尺度超薄切片自动带式收集技术是由哈佛大学J.W.Lichtman实验室开发的一套基于高精度电动轮式传输带收集和输送系统的序列超薄切片扫描电镜成像技术ATUM-SEM^[48]。此外,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团队也开发了更加高效便捷的超薄切片自动收集及扫描电镜成像装置AutoCUTS-SEM^[12]。两种纳米尺度超薄切片自动带式收集系统均包括超薄切片机、电动轮式传输带、控制计算机、防震台、除静电装置以及自动补水装置等。

连续切片的制备和收集过程主要包含生物组织电镜样品修块、收集带的预处理和安装、序列切片收集、序列切片的装订和导电性处理等环节,下面逐一介绍这些步骤。

修块包括粗修和精修。由于树脂与样品之间的硬度差容易导致样品出现褶皱,因此在修块的过程中,尽可能修掉兴趣区域以外多余的树脂。针对单层细胞电镜样品,修块时避免对样品顶面修整,只需将样品上、下、左和右四个侧面进行修边。在特殊情况下,需要利用微米CT(micro-CT)对样品的感兴趣区域进行定位,避免修块时造成感兴趣区域的损失。

目前常用的收集带有两种:一种是Kapton-PET收集带,表面平整,不导电;另一种是Carbon-PE收集带,表面不平整,导电。此外,中国科学院自动化研究所开发了基于高真空镀膜仪的连续薄膜条带镀碳技术。该技术可以在Kapton-

PET收集带上镀一层可以导电的碳膜,从而获取表面平整且导电良好的收集带。利用卷轴式的等离子清洗仪对收集带进行亲水化处理。针对不同的条带,需要调整合适的条带转动速度以及等离子处理功率和时间。

连续切片自动收集器主要有两种:一是基于RMC超薄切片机的ATUMtome自动切片收集器,二是基于Leica的超薄切片机的AutoCUTS。切片收集器主要包括切片收集器主体、控制面板和注水泵3部分。其中,切片收集器主体包括收集带导轨支架、供带盘轴、收带盘轴、驱动电机、支架四维调节控制部件等。在收集带安装过程中,将收集带导轨支架置于钻石刀槽上方外侧,启动收集器,然后将供带盘轴传送来的收集带自下而上绕过收集带导轨支架并连接在收带盘轴上,并同时调节收集带的松紧程度,随后停止收集器运行。

序列切片的装订,是指将载有切片的收集带,通过双面碳导电胶带粘贴在硅晶圆片上的过程。需要注意的是,如果使用的收集带是Kapton-PET收集带,收集带上的样品导电性极差,需要进行导电性处理。利用Leica的高真空镀膜仪对装订好的切片样品进行镀碳,镀碳厚度约为6 nm。处理后的

切片样品放于干燥柜中备用。

3 vEM的数据收集

SEM对切片样品成像既可采集背散射电子信号,也可采集二次电子信号。二次电子图像的分辨率和采集速度一般优于背散射电子图像,但是对切片的平整性、重金属染色强度,及导电性要求更高。图像的衬度与信噪比与探测器的收集效率,样品的工作距离有直接关系。而图像分辨率与样品结构的保存,电子束束斑尺寸,在样品中的入射深度有关。样品良好、充分的重金属染色、选择合适的工作距离、高收集效率的探测器配合合适的束流和成像时间是提高图像衬度和信噪比的关键。

不同vEM技术的图像采集流程略有不同。比如,连续切片自动化成像采集策略可简单概括为导航、定位、采集。以AutoCUTS-SEM为例,具体数据采集的基本过程(图3)包括:a.导航,获取整张硅晶圆片的地图,能够清晰识别每一张切片;b.切片定位,对每张切片进行编号及定位;c.精确标定感兴趣区域; d.采集高分辨率图像,利用最佳成像条件对感兴趣区域进行自动移位、模板匹配、聚焦、采集图像并保存。

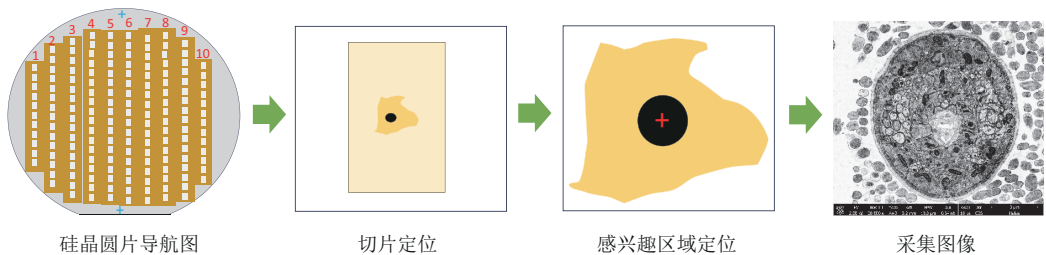


Fig. 3 Strategy for automatic imaging of serial sections
图3 连续切片自动化图像采集策略

目前vEM的成像软件已经非常成熟且自动化,不仅有研究者自己开发的开源软件,如“WaferMapper”(哈弗大学J. W. Lichtman实验室)、“MiRA_Capture”(中国科学院自动化研究所微观重建与智能分析团队)、“AutoSEE”(中国科学院生物物理研究所生物成像中心),也有商业化的成像软件,例如“Atlas”(ZEISS公司)、“Maps”(Thermo Fisher Scientific公司)。

电镜成像方面,vEM在图像采集速度、图像分辨率和成像体积之间需要权衡。加速图像采集势

必会牺牲一定的图像质量,仅追求目标结构的高分辨成像又可能模糊重要的组织背景,错失偶然发现的机会。而且目前的高通量成像设备和解决方案,不仅价格昂贵且尚缺乏成熟的商业化验证,仅在全球少数专用大设施中实施,无法普及。

4 vEM的图像处理

4.1 图像拼接

由于电镜其成像的分辨率越高,成像视场越小,因而很难在高分辨率下获得大视场图像。现有

的vEM成像大多通过移动电镜载物台^[66-67],对样品的切片或切面进行分块拍摄,得到具有重叠区域的高分辨率图像。但是,由于电镜载物台移动的精度有限,无法反映图像真实的位置信息。所以,需要引入图像拼接算法,将这些图像合成为一幅完整的大视场高分辨率图像。

一般来说,显微图像的拼接方法可以分为基于频域的、基于像素灰度值的和基于特征点的图像拼接方法。其中,基于频域的图像拼接方法^[68-70]通常将图像空间转换到频域,然后利用傅里叶变换和相位相关等方法来计算相邻图像之间的平移。在进行图像拼接时,首先使用快速傅立叶变换计算每对图像之间的相关性,然后利用最短路径算法判断图像之间的邻近关系,边的权重由图像间的相关性得到,最后对每幅图像的位置进行全局优化和对图像进行微调和插值得到最终的拼接结果。

基于图像像素灰度的方法^[71-72]利用图像像素灰度分布来比较两幅图像之间的相似性,并使用均方误差(MSE)或归一化互相关(NCC)作为相似性度量。但是,这两种方法基本只考虑了理想条件下的情况,即待拼接的两幅相邻图像之间只存在平移变换。然而,在实际的成像过程中,图像的失真不可避免。基于频域和基于像素灰度的拼接方法由于变换模型选取的局限性,很难处理这些失真。

电镜图像由于其成像分辨率较高,局部细节比较清晰,纹理也更加丰富,多采用基于特征点的方法^[73-76]进行拼接。这种方法可以拟合更加灵活的图像变换模型,如刚性变换、仿射变换或投影变换等。这些电镜图像拼接方法通常采用SIFT特征或Harris角点来提取特征点,然后通过仿射变换来拟合线性形变。但在这些方法中,仿射变换的剪切形变可能会改变样品的原始结构信息。此外,电镜图像的非线性失真可能会干扰拼接结果。为了得到无缝拼接的效果,需要在拼接过程中对图像畸变进行矫正。Kaynig等^[73]针对TEM图像,提出了一种基于多项式拟合非线性形变的拼接方法。该方法被应用在大体量鼠脑组织重建任务中^[6],其平均拼接误差在2.56个像素左右,有效提升了图像拼接精度。

4.2 图像对齐

基于序列块面的vEM成像方式比如SBF-SEM由于是对样品的表面进行成像,因此图像不存在褶皱和丢失问题,图像对齐的难度较低,使用简单的

仿射变换即可完成序列图像的对齐任务。

如1.3节所述,从成像范围、成像效率与成本角度等考虑,基于序列切片的vEM成像方法是目前最适合大体量生物样品的数据获取方式。但切片过程可能会出现切片扭曲、褶皱、破损、丢失等情况,需要对切片图像进行精细的图像对齐。

早期的图像对齐主要是通过简单的将切片局部按照偏移向量移动到对应位置来实现配准,没有采用复杂的数学模型。德国马普所的Briggman等^[77]利用互相关计算切片的局部偏移向量,然后通过全局最小二乘法进行拟合,并使用傅里叶位移插值法实现切片间的对齐。Scheffer等^[78]提出了一种适用于不完美切片的对齐方法,使用归一化互相关法寻找切片间的局部空间对应关系,并根据这些对应关系计算图像间的仿射变换矩阵。Takemura等^[79]使用TrackEM2^[80]进行刚性粗对齐,然后再进行精对齐。这种粗到细(coarse-to-fine)的对齐策略也被广泛应用于后续多种对齐算法中。

对于复杂的非线性对齐模型,代表性的方法是Saalfeld等^[81]提出的基于胡克弹簧模型的Elastic对齐算法。该算法首先在切片上按照一定规律构建网格点,并利用这些格点对切片进行三角剖分。随后,将每个三角形的边视为没有初始长度的弹簧,利用模板匹配获取格点的偏移向量,将偏移向量视作施加在弹簧网格上的力。这样,就可以利用弹簧模型建模位移向量之间的关系,在不断迭代中使系统达到稳态,并利用每个三角形的格点计算三角形内部的仿射形变关系,从而完成图像对齐。但是,受制于形变模型与算法性能,该算法仍然需要大量的参数调节与人工介入以改善对齐的结果^[82]。Wetzel等^[83]提出的SWIFT-IR算法,通过频域方法实现切片图像的对齐。该算法主要利用可调的信号白化技术在频率域上最大化信噪比来对齐切片图像,能稳健地处理生物组织中结构的快速变化等问题。

近年来,神经网络算法也逐步应用到图像对齐中。Yoo等^[84]提出ssEMnet,通过引入卷积自编码器对图像进行编码,计算光流场实现对齐。Mitchell等^[85]提出了用于电镜图像对齐的光流网络SEAMLeSS。该网络通过修改训练损失使得网络能够以自监督方式进行训练。网络的损失函数由相似性约束与平滑性约束构成,其中相似性约束期望相邻层切片越相似越容易实现图像对齐,而平滑性约束则用于防止匹配错误导致切片拓扑结构错

位。此外,该方法还对破损切片如褶皱或者撕裂进行了适应性调整,使得网络能够修复破损切片。但是,SEAMLeSS网络结构本身的性能限制了其对长程相关性的计算,也无法有效处理较为严重的褶皱或撕裂问题。

中国科学院自动化研究所微观重建与智能分析团队通过理论分析,确定影响图像对齐精度的关键因素^[86]。针对长序列图像对齐过程中的形态偏移问题,提出基于光流网络的结构回归方法^[87],并开发相应的软件工具,解决切片过程中不可避免的褶皱或撕裂情况^[88]。

4.3 轴向信息恢复

如1.3节所述,vEM制样过程中,连续切片或者切面厚度(z 方向)通常在几十个纳米左右,而电镜成像时图像水平方向(横向或 x, y 方向)的点像素可达10 nm以下。因此,vEM重构的结果在横向和纵向(即厚度方向)的分辨率存在严重的各向异性,较厚切片成像时甚至导致大于10倍(比如:切片厚度80 nm,切片成像的点像素8 nm,此时纵向和横向产生的各向异性因子为10)的各向异性。这种各向异性阻碍了vEM在生物样品的3D超微结构和生理过程瞬态捕捉等方面研究的分辨率和准确性。

实际上,ssTEM、ssSEM、ATUM-SEM和SBF-SEM等vEM技术的分辨率都存在各向异性。虽然ssET和FIB-SEM是为数不多的可以实现各向同性重建的vEM技术,但它们通常以降低成像体积等为代价^[33]。

在实践中,为了节省成像时间,提高成像体积,研究者通常设置较大的切片厚度,然后再通过图像处理进一步解决各向异性分辨率问题。通常采用的弥补各向异性分辨率的方法是简单易实现的插值方法。然而,插值虽然简单易于实现,但插值会引起误差和明显的伪影,特别是当各向异性因子较高比如8或10倍时,插值带来的假信号更明显。基于光流的插值方法是传统插值方法的改进。然而,当各向异性因子大于4时,插值结果会很不稳定^[89]。

随着深度学习技术的快速发展,其在vEM的各向同性重建中也被逐步应用。比如基于卷积神经网络(CNN)的3D-FRCCNN和3D-SRUNET算法,在全监督配置下通过事先准备好的各向同性数据作为目标来训练。这种全监督的深度学习方法明显优于插值方法^[90]。然而,由于各向同性训练数据集在实际的实验中往往很难获得,所以全监督的方法

在vEM中的应用非常有限。相反,无需各向同性训练集的自监督方法更适合vEM的各向同性重建。

自监督式的各向同性重建方法目前有两种。一种是使用对抗性神经网络训练(GAN),指导输出的轴向信息接近高分辨率的水平方向信息的模式。例如,2D SRGAN模型^[91]和CycleGAN^[92]等都是基于GAN的各向同性vEM重建方法。然而,基于GAN的模型有几个缺点。首先,它们的训练很容易变得不稳定,需要对超参数进行微调。其次,它们的重建输出可能包含诸如纹理混叠或结构变形之类的伪影。此外,基于GAN的重建输出在相同数据的不同运行批次中可能存在很大差异。另一种自监督式的各向同性重建方法是基于扩散式生成模型的方法。扩散模型以其优于GAN模型的细节生成能力和训练稳定性而获得了广泛的应用。目前,基于扩散模型的vEM各向同性重建方法包括EMDiffuse、DiffuseIR和DiffusionEM。这些方法均使用高分辨率横向切片进行训练,以自监督的方式实现各向同性vEM重建。其中,EMDiffuse^[93]基于扩散模型设计了各种vEM图像恢复任务,包括切片的超分辨率成像、去噪和vEM的各向同性重建。DiffuseIR^[94]和DiffusionEM^[95]实现了零样本学习时的各向同性重建。相比前述的插值、基于GAN的深度学习方法等,这些方法可以重建出更多更准确的超微结构。但这些模型均属于2D的生成式模型,它们没有直接在模型中利用结构连续性,因此在捕捉3D样品切片信息的连续性方面有一定限制。此外,在处理大规模vEM数据时,它们的训练和推理也比较耗时。为了开发高效的、高保真的,且鲁棒的vEM各向同性重建方法,He等^[96]基于注意力机制和Transformer网络,开发了可以进行任意各向异性倍率恢复且适应不同电镜模态数据的各向同性vEM重建方法IsoVEM,该方法在各向同性重建的同时,还可以进行切片的瑕疵恢复。IsoVEM有望成为各向异性重建领域的通用模型。

4.4 三维重建(特征识别、分割、渲染、可视化)

受限于计算机的存储和分析能力,vEM图像自动3D重建技术直到近十年才逐渐发展起来。最初,vEM中神经元或细胞器的识别一般是应用传统的图像处理与机器学习技术实现。具体来说,首先应用各种特征提取算法从图像中提取目标的特征,随后应用随机森林或Adaboost等机器学习算法进行分类识别^[97-105]。例如,Kreshuk等^[100]提出了一种FIB-SEM图像中突触检测的算法,该算法

将包含高斯梯度的幅值、拉普拉斯高斯算子、结构张量、海森矩阵在内的35个特征作为突触的特征,随后使用随机森林分类器对突触进行分类。Vazquez-Reina等^[98]介绍了一种基于水平集的方法用于神经元边界检测,通过多个层集函数之间的弹性耦合建立了无监督的分割模型。

随着深度学习的迅猛发展,CNN在vEM数据分析中得到了广泛应用,实现了分割和重建精度上质的飞跃。Jain等^[106]首次提出使用CNN对神经切片电镜图像进行识别并对神经元膜结构进行分割。该方法先在神经显微图像上对膜结构进行标记,随后通过CNN对输入图像逐个像素进行识别,以此来区分不同的细胞结构。上述方法将CNN作为像素的分类器来对神经元膜结构进行识别,然而这种方法效率较低且难以保留输入图像中的空间信息,并不适用于大规模神经元图像分割。Ronneberger等^[107]提出使用U形结构的全卷积神经网络,对整幅输入图像进行分割并输出与输入大小相同的识别结果,大大提升了神经元分割的效率。以该工作为起点,后续涌现出了一批优秀的重建算法。Beier等^[108]通过ICv1网络获取神经元膜概率图,随后使用分水岭算法与距离变换获得过分割图像,最后通过Multicut算法^[109]得到最终分割结果。该算法极大提升了神经元自动分割的效果。Lee等^[110]提出使用一个3D U-Net的变体网络来预测最近邻亲和图,并将长程亲和图的预测作为一个辅助任务,随后使用平均亲和聚合算法得到重建结果。该方法在SNEMI3D挑战赛中首次超过人类的精度,标志着神经元自动重建算法在精度上又迈出了一大步。Januszewski等^[111]提出了洪水填充网络来处理神经元分割与重建问题。Hong等^[112]结合线粒体和突触的分割结果,提出了一套具有生物拓扑先验的神经元3D聚合框架。Li等^[113]聚焦于神经元分割的超像素聚合阶段,提出了一种端到端的Multicut聚合框架,以缓解模型估计和求解的两阶段误差累积问题。在亚细胞结构分割方面,Xiao等^[114]提出了一种深度监督的3D全卷积神经网络用于线粒体分割,取得了最先进的分割精度。Liu等^[115]将Mask R-CNN与3D连接算法应用于小鼠听觉皮层突触的识别,并基于此实现了多位点突触的快速定位算法。Dorkenwald等^[116]借助深度CNN和随机森林分类器开发了SyConn框架,该框架可以自动识别线粒体、突触等细胞结构。

基于数据驱动的无监督对比学习也逐步应用到

vEM图像分析中。Wilson等^[117]提出了SynapseCLR算法,该方法通过无监督对比学习,实现了突触结构在高维流形中的标注。哈佛大学的Lichtman团队^[118]直接从3D电镜图像和分割结果中生成细胞表征,并应用于人类和小鼠大脑皮层vEM数据重建。与完全监督学习方法相比,该方法使细胞亚区(轴突、树突、体细胞、星形胶质细胞)的分类标签数据减少了4 000倍。

在自然语言处理等领域取得巨大成功的大模型技术也被应用到vEM数据的重建中。视觉分割基础模型SAM^[119]因其强大的学习和泛化能力受到广泛关注。通过专家生成的点或框提示,SAM可实现2D图像数据中的目标提取。Constantin Pape团队^[120]在光镜和电镜数据上微调SAM,获得MicroSAM模型,并将该模型应用于神经元、细胞器等目标的半自动追踪和识别中。部分标注软件也开始集成这些基础模型,以实现更高效的交互式分割(如Webknossos^[121])。

为了追求高质量的可视化渲染,常用的商业可视化软件包括Dragonfly(Comet Group)、Amira(Thermo Fisher Scientific)、Imaris(Oxford Instruments)等。而对于大规模vEM数据的密集重建与分析来说,可视化与分析工具需要对数据分块存储,并优化存取过程中的异步性;对需要快速访问的数据,预先计算多尺度金字塔格式,同时还可以预先计算所重建结构的表面模型、骨架等,方便后续可视化快速调用^[9]。Fiji(BigDataViewer^[122]/MoBIE^[123])、CATMAID^[124]等通过优化底层数据存储规则,在原有体系架构的基础上实现了大规模数据的支撑。马普所的Helmstaedter等^[125]发布了KNOSSOS用于大体量vEM数据的3D可视化和标注,并在后续发布了基于网页的工具webKnossos^[121]。这两款工具主要用于校验神经元的骨架,能够极大地提升神经元标注速度。谷歌研究院连接组团队的Maitin-Shepard^[126]发布了软件Neuroglancer,迅速成为最受欢迎的大规模vEM数据的开源可视化工具。哈佛大学的Berger等^[127]发布了VAST,能够以手动或者半自动的方式标注或校验大体量的体素分割数据。

5 vEM的应用

5.1 vEM在脑图谱和连接组学中的应用

随着电镜成像技术和计算技术的发展,研究人员已经通过vEM技术对包括线虫、果蝇、斑马鱼、

小鼠在内的多种模式生物的神经组织进行了不同体量的重建工作, 并逐渐将vEM技术应用到人脑组织的连接组重建工作中。

线虫的神经系统仅包含302个神经元和700多个突触连接。White等^[4]绘制了线虫神经系统的详细结构, 记录了302个神经元和大量的突触与交汇点。该项工作为后续的线虫连接组研究^[128-130]奠定了基础。哈佛大学对8个不同发育时期的线虫进行了3D电镜成像, 揭示了线虫神经系统在发育过程中的变化^[131]。

果蝇神经系统含有数万个神经元。Janelia研究所先后完成了果蝇的中央脑区域^[132]和全脑的vEM成像^[18]。剑桥大学在2023年发表了果蝇幼虫全脑连接组的重建分析^[133]。

斑马鱼也是神经科学领域的重要研究对象。2017年, 哈佛大学在《自然》(*Nature*)发布了斑马鱼幼鱼全脑的多分辨率电镜成像数据^[49]。2020年, 普林斯顿大学完成了包含控制眼球运动神经元的斑马鱼幼鱼脑干重建工作^[134]。2022年, 马普研究所发表了对斑马鱼幼鱼全脑的密集自动重建工作, 并进行了全面的细胞和亚细胞结构统计分析^[135]。

小鼠作为研究哺乳动物神经系统的关键模式动物, 被广泛用于研究神经发育、功能和疾病。2013年, 马普研究所在《自然》(*Nature*)发表了小鼠视网膜中主要的计算神经鞘区域的神经密集重建工作^[28]。哈佛大学于2015年完成了体积约40×40×

50 μm³的小鼠大脑新皮质的成像工作, 并半自动密集重建了这一柱状区域内的神经元结构^[48]。2019年, 马普研究所在《科学》(*Science*)上发表了小鼠躯体感觉皮层的脑连接组重建工作, 重建了约2.7 m的神经元环路和40万个突触连接^[136]。2021年, MICrONS发布的跨越小鼠皮层脑连接图谱^[137], 包括75 000个神经元和5.24亿个突触的重建结果, 其重建体量达到立方毫米级。2022年, 普林斯顿大学在《细胞》(*Cell*)上发表了小鼠初级视觉皮层的密集自动重建工作^[138]。同年, 哈佛医学院在《自然》(*Nature*)上发表了小鼠小脑皮层的密集重建工作, 探究了小脑皮层的连接机制^[139]。2024年, 柏林神经科学研究所对小鼠海马CA3区域进行了3D电镜成像^[140]。

随着脑连接组重建技术的发展, 哈佛大学和马普研究所等机构已经开始着手进行人类大脑连接组的重建分析。2021年, 哈佛大学与Google公司合作, 发布了人类大脑颞叶区域1 mm³组织块的重建成果, 总计获取了约1.4 PB的图像数据, 重建结果揭示了5万个细胞的3D结构和1.3亿个突触连接^[141]。2022年, 马普研究所为了研究脑连接组跨生物之间的变化情况, 在《科学》(*Science*)上发表了对小鼠、猕猴、人类的脑组织L2/3区域进行了成像和重建分析的工作, 该工作比较了三者脑组织L2/3局部区域中神经元和突触连接情况(图4)^[142]。

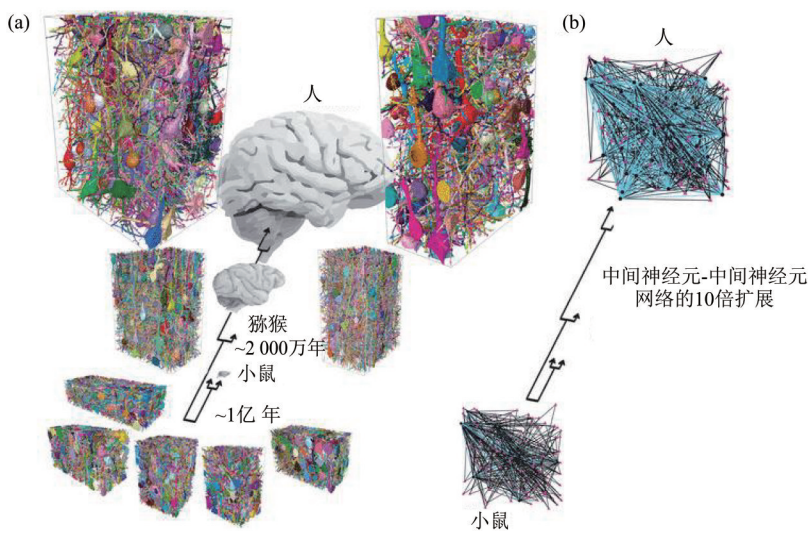


Fig. 4 Connectomic screening across mammalian species: comparison of five mouse, two macaque, and two human connectomic datasets from the cerebral cortex^[142]

图4 小鼠、猕猴和人类大脑皮层连接组数据集的三维重建和比较^[142]

(a) 使用随机颜色自动分割的所有神经元及其细胞体。这里分析的连接组总共包括~160万个突触。箭头表示进化分枝: 人类和小鼠之间的最后一个共同祖先大约在1亿年前, 人类和猕猴之间的最后一个共同祖先大约在2 000万年前。(b) 人类比小鼠的中间神经元到中间神经元的网络连接扩展了约10倍。

与之相比,国内在脑连接组重建方面相关的工作起步较晚。中国科学院上海神经所对于果蝇的蘑菇体神经元^[143],采用完全手动标记的办法,将所关心的神经元走向及与特定其他神经元之间的突触标示出来。中国科学院生物物理研究所利用自研的连续切片自动化收集装置Auto-CUTS,建立了一套完整的秀丽隐杆线虫幼虫3D电镜图像数据库^[12]。上海交通大学医学院在突触水平重构了小鼠耳蜗神经回路,并对其中一系列关键超微结构进行了解析和量化^[144]。本文作者韩华教授带领中国科学院自动化研究所的团队与上海交通大学医学院合作,对小鼠耳蜗内毛细胞进行3D电镜重构,完成了内毛细胞、带状突触及全细胞范围线粒体的自动化重建和定量化分析^[145],还与上海科技大学合作,重建小鼠听觉皮层,应用深度学习技术重构了小鼠听觉皮层135 000个线粒体和160 000个突触(图5)^[115]。

从线虫、果蝇、斑马鱼、鼠脑到人脑的脑连接组重建工程可以看到,国内外对突触水平神经环路

重建的关注日益增多。2022年美国国立卫生研究院(NIH)正式启动Brain 2.0计划,将“构建小鼠全脑微观联接图谱”确立为三个变革性项目之一,计划在突触水平下绘制完整的哺乳动物大脑联接图谱^[146],重建体积大约500 mm³,接近于立方厘米体量,电镜图像数据达到1 000 PB。该计划的实施意味着微观尺度脑连接组研究进入了超大规模脑连接组图谱绘制的时代。

5.2 vEM在细胞的三维图谱和超微结构研究中的应用

vEM技术以其广泛的成像体积和较高的分辨率,很适合在细胞水平进行3D图谱和超微结构研究,为在细胞层面揭示细胞的功能、细胞间的相互作用机理以及更多有趣的微观生命活动的发现等起到了至关重要的作用。

在海洋生物研究方面,NIH的Mayorova等^[147]通过SBF-SEM技术,首次发现来自海洋的盘虫Placozoa的纤毛细胞是多功能的巨噬细胞,不仅可以吞噬细胞碎片和细菌,还参与伤口愈合。

在早期胚胎发育方面,Zenker等^[148]利用SBF-SEM技术结合活细胞成像,发现早期小鼠胚胎的细胞通过稳定的微管桥连接在一起,从而指导细胞内微管的生长,且聚集在微管附近的早期核内体也来自于微管桥。该研究还发现,从桥上发出的微管有助于引导关键蛋白质(包括E钙黏蛋白)运输到细胞膜,从而在早期发育过程中控制细胞极化。虽然中心体在大多数动物细胞中起到了组织微管等细胞骨架的关键作用,但这种细胞器在早期发育中是缺失的。该研究通过vEM技术,对于早期胚胎发育过程中细胞骨架的生长锚点中心提出了新的认识。

vEM技术在病原体如何入侵宿主细胞并在宿主细胞内感染繁殖等方面也有广泛应用。病原体通过一系列复杂的相互作用在宿主细胞内存活和繁殖。通过体电子显微镜可以重建3D超微结构的优势,细胞内的病原体在其细胞环境中的侵染和繁殖过程以前所未有的详细程度得以可视化,且通过体电子显微镜与多维荧光显微镜的关联成像,可以将分子机制和功能信息与感染后细胞的整体超微结构结合起来^[149]。比如,分枝杆菌今天对世界卫生构成威胁,致病性和机会性细菌在大部分人口中引起结核病和非结核性疾病。在感染和疾病期间,细菌和宿主之间的相互作用仍有许多未知之处,需要更多的研究来应对耐药性和低效疫苗的挑战。比如,

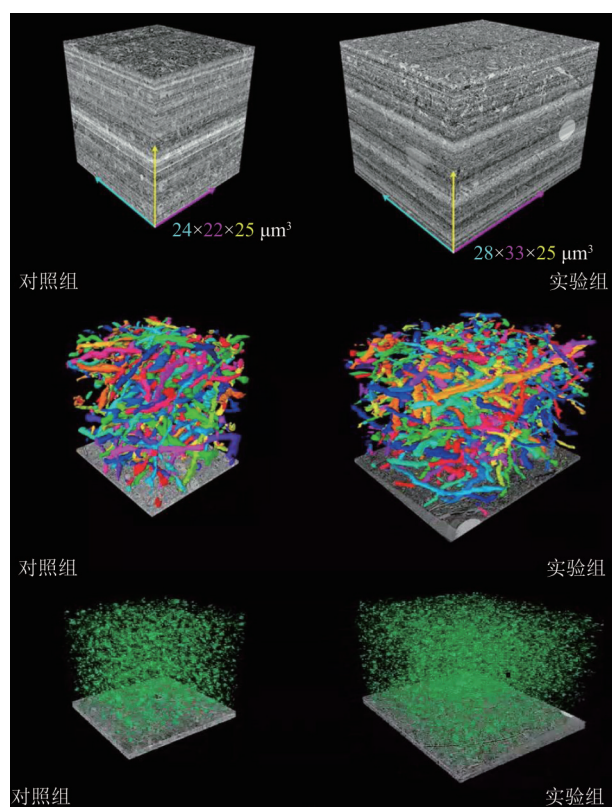


Fig. 5 The 3D reconstruction and segmentation results of neurites and synapses of the control and conditioned mice under the fear learning experiment^[115]

图5 恐惧学习实验范式下不同组别小鼠听觉皮层的vEM三维成像结果及其神经突、突触分割结果^[115]

早在2015年, 挪威科技大学儿童与妇女健康实验室的Beckwith等^[150]用FIB-SEM结合共聚焦荧光显微镜定位, 在超高分辨率下对感染分枝杆菌的人巨噬细胞进行关联成像, 可以保证成像质量的同时以较高的通量对整个分枝杆菌感染的巨噬细胞3D细胞内环境进行数据采集和超微结构分析。几年后, 英国关于结核的宿主-病原体相互作用实验室的科学家, 利用人诱导多能干细胞衍生的巨噬细胞(iPSDMs)研究了人巨噬细胞对结核分枝杆菌感染的应答机制。通过FIB-SEM技术结合活细胞成像, 为研究人类巨噬细胞与结核分支杆菌时空动态相互作用, 感染后的不同炎症反应, 以及结核分支杆菌如何逃逸捕获等, 都提供了一个有价值的模型^[151]。类似的技术方法也应用到了被病毒感染的

细胞的研究中。比如, NIH的Sriram Subramaniam课题组^[152]利用FIB-SEM结合电子断层3D重建技术, 建立了定义病毒学突触的细胞-细胞相互作用场景, 分析了细胞-细胞接触的空间结构和HIV病毒粒子在成熟树突状细胞和T细胞之间形成的病毒学突触上的分布。

还有很多工作, 利用vEM技术直接进行细胞器层面的结构和功能研究。这包括Terasaki等^[153]利用ssET研究了啮齿类动物神经元中内质网的连接问题。Marsh等^[154]通过ssET技术, 早在2005年就报道了高尔基复合体的精细3D构造。最近, Müller等^[155]通过FIB-SEM提供了小鼠 β 细胞中的细胞器和微管的3D空间分布和相互作用界面, 且获得了更高分辨率的高尔基体的结构(图6)。Xu

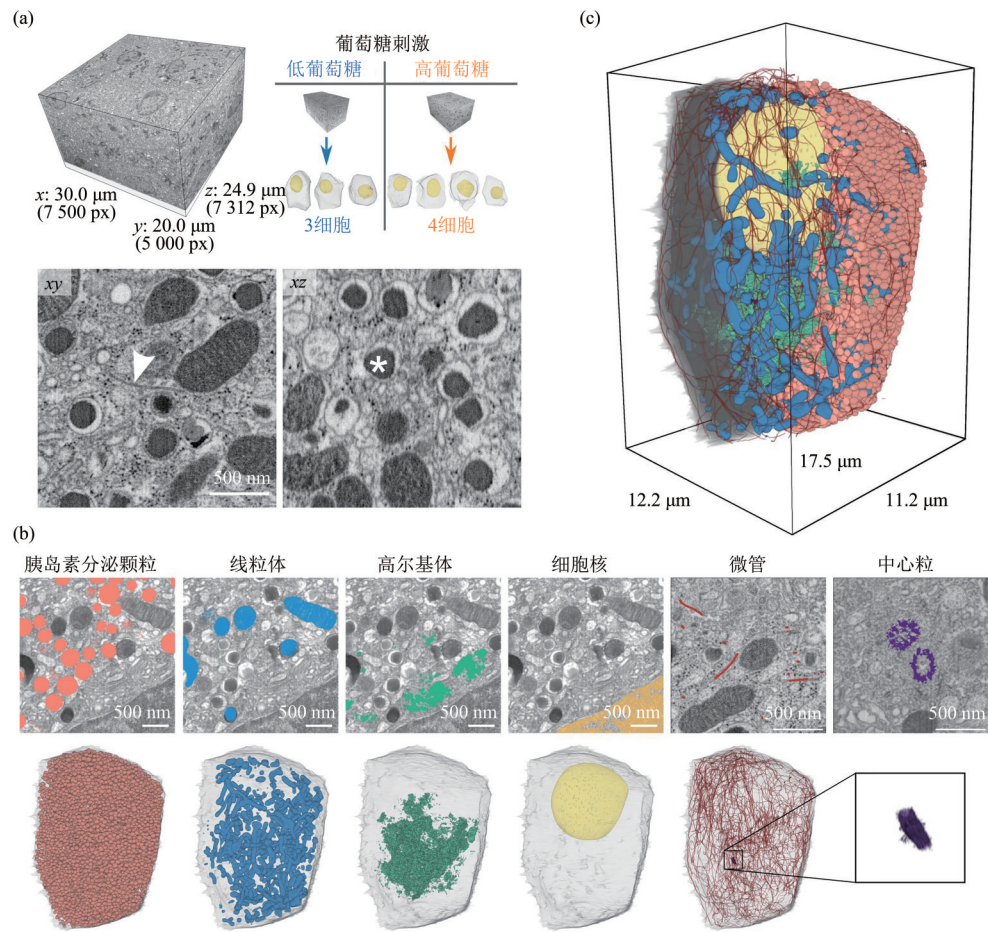


Fig. 6 FIB-SEM volumes of pancreatic β cells and 3D segmentation of microtubules and organelles^[155]

图6 小鼠胰腺 β 细胞中的细胞器和微管的三维分割和空间分布^[155]

(a) 胰岛的完整FIB-SEM重构体(左); 其中一个是低葡萄糖条件下获取的且含有三个完整 β 细胞, 另一个是在高葡萄糖条件下获取且含有4个完整 β 细胞。局部的横向(xy面)和轴向(xz面)突出展示了FIB-SEM重构体的各向同性分辨率性能。图中箭头表示微管, 星号表示胰岛素分泌颗粒。(b) 同一区域中的胰岛素分泌颗粒、线粒体、高尔基体、细胞核的2D分割标注图, 以及不同区域上的微管和中心粒的2D分割标注图。同时在各细胞器的2D分割标注图下方展示了高葡萄糖条件下一个完整细胞中的相应细胞器的3D渲染图, 并对质膜进行了透明渲染。在最后一个面板中, 中心粒被放大。(c) 包含在一个细胞内的所有细胞器的3D渲染图。其中, 细胞右半部分的质膜和左半部分的胰岛素分泌颗粒被去除, 以帮助观察其内部结构分布情况。

等^[35]总结了FIB-SEM的技术的的进展,随着铣削的精度和稳定性的进步,其能够在4 nm各向同性的高分辨率体素下使得成像体积增加两个数量级,并在这种高分辨率下展示了HeLa细胞内细胞器的分布和相互作用。

中国利用vEM技术进行细胞器的超微结构和相互作用等方面的研究也日益增多。本文作者韩华^[156]带领团队利用ATUM-SEM技术,高效高精

度地重建肝脏细胞中的内质网、线粒体、脂滴、溶酶体、过氧化物酶体和细胞核的精细3D超微结构,系统性分析了内质网与其他细胞器的相互作用关系;基于ssET成像技术,重建了野生型大鼠大脑前额叶皮层中完整的突触结构(图7),定量分析了突触前膜与突触囊泡之间的距离关系,为其他亚细胞结构的重建分析提供了有效手段^[157]。

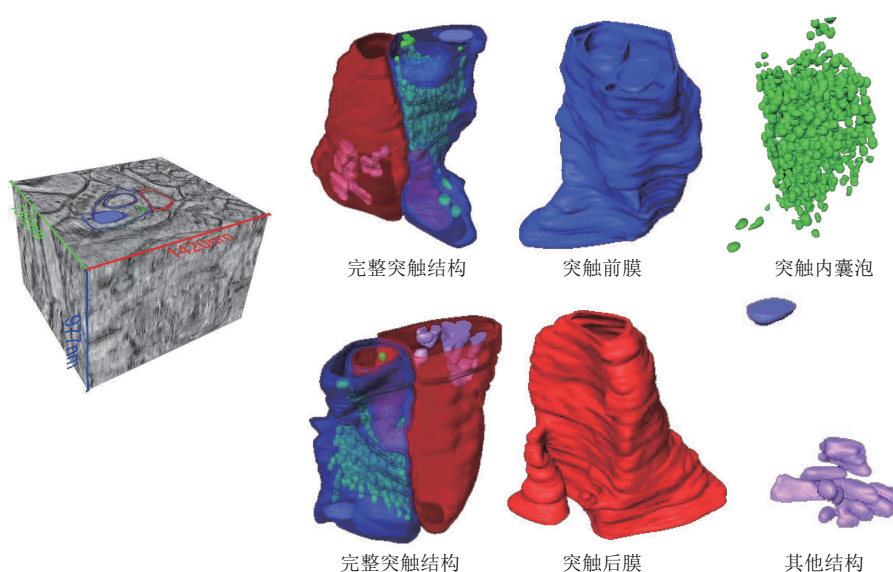


Fig. 7 Three-dimensional reconstruction and segmentation of intact synapses in rat brain using ssET imaging technique^[157]

图7 基于ssET的大鼠脑完整突触的三维成像、分割结果^[157]

5.3 vEM在组织的三维构造研究中的应用

随着vEM技术的不断发展,所研究的尺度也不断增大,由于其可以获取2D切片无法展示的3D立体空间结构,因此vEM在组织和器官层面的应用也日益增多。利用ssTEM, Anderson等^[158]揭示了视网膜组织的新特征:包括至少17种不同信号模式的无轴突神经细胞通路;大多数锥体双极细胞的轴突形成了明显的信号整合区,并存在针对不同细胞类型的ON锥体双极细胞轴突突触;分子标记及其激发定位清楚地将超微结构定义的双极细胞群划分为不同的反应簇等。Wilson等^[159]通过SBF-SEM技术,研究了味蕾的3D构造。该研究发现味蕾包含多种细胞类型,非常有趣的结果是他们发现其中两种细胞介导特定味觉的转导,即III型细胞转导酸味,II型细胞转导甜味、苦味或鲜味。但是,超微结构研究显示II型和III型细胞之间的接触点很少,并且缺乏形态学上可识别的突触,表明

这些细胞类型之间的相互作用不是通过突触发生的。在采样体积内127个与味觉细胞发生突触接触的纤维中,70%($n=91$)只与一个味觉细胞发生突触接触;而32个纤维只与多个II型细胞或多个III型细胞发生突触接触^[159]。还有很多vEM技术在组织和器官层面的应用结果,读者可以根据自己的兴趣进行相应调研,在此不再一一列举。

5.4 vEM在临床和医学中的应用

不论TEM,还是SEM,都在医院临床诊断和病理检测中一直发挥着重要作用。只是早期的临床应用,主要是利用电子显微镜进行病理组织的2D图像检查,最常见的包括纤毛病和肾脏病的诊断^[160]。随着成像分辨率的提升和成像体积的不断增大,vEM技术也广泛应用在临床病理样品的3D构造研究和诊断中。

炎性肾小球疾病,包括免疫球蛋白A肾病(IgAN)、过敏性肾炎(IgA血管炎)、膜增生性肾

小球肾炎和月牙状肾小球肾炎,是终末期肾病的重要病因。肾小球炎症伴白细胞内流和随后肾小球基底膜(GBM)破坏可导致血尿和蛋白尿,最终导致肾小球硬化性瘢痕病变。Nagai等^[161]利用SBF-SEM技术,对IgAN患者的人体活检样本进行3D重建,通过重建评估了患者GBM的破坏程度,并研究了破坏区域内的肾小球的大量组成成分之间的关系。这是临床中在人体活检样本中,利用vEM技术研究肾小球组成细胞之间的相互作用和病理变化的非常重要的案例。

Riesterer等^[162]发布了从2D成像到3D重建的工作流程,使病理学家和癌症研究人员能够从人类癌症活检中观察和研究感兴趣的区域。活体组织的vEM分析揭示了肿瘤细胞的形态和超微结构,并可以直接呈现肿瘤细胞和周围环境的关系,这是传统的临床上的2D成像无法揭示的。正因为如此,vEM在临床上的应用越来越广泛。比如研究者利用vEM技术观察阿尔茨海默病患者死后大脑的神经突触组织的结构^[163]和帕金森病患者的细胞器的变化^[164]等。

尽管2D的电子显微学研究在临床诊断和病理学领域仍然是一个重要的工具,但vEM技术的3D成像由于可以直接显示正常细胞和癌细胞之间超微结构的异同,以及它们的细胞外基质环境,可以使癌症研究人员和病理学家能够更好地了解疾病的进展并确定潜在的治疗靶点。因此,vEM的3D重建将在临床诊断中发挥不可或缺的作用。

5.5 vEM的应用优势和局限性

相较于光学成像,vEM的最大优势就是其在更高分辨率水平上,将细胞或者更小的生物体(微生物、病毒等)内的超微结构3D可视化。此外,还可以获得周围细胞环境的结构信息。相较于传统的2D切片电镜成像,vEM的最大优势在于3D体成像数据更能准确描述生物个体的结构特征,数据更为丰富,从而体现生物个体和生命活动的复杂性,避免造成错误结论。例如:2D切片中看到的多个细胞核/线粒体,经3D重构发现是一个细胞核/线粒体。其二,在细胞和亚细胞尺度上,vEM可以更为准确地揭示整个细胞中膜和细胞器的结构,从而可以研究细胞分裂,病毒在细胞中的复制过程,细胞内寄生虫与宿主细胞的相互作用,细胞器接触位点,对细胞器超微结构进行定量的全细胞空间的研究,包括膜室形态的细节,复杂的管状膜网络,微管-细胞器相互作用的全细胞图谱等。其三,

vEM通过不同的成像策略既可以获得包含数千个细胞的大视野,提供丰富的细胞背景,也可以得到较为精细的超微结构和细节。因此,vEM更有利于研究细胞群落形态和组织的生物学问题,例如:肿瘤细胞在转移过程中的迁移,炎症中的免疫反应,以及病原体如何在组织中移动,特别是在神经元连接组学领域具有革命性意义。如5.1所述,vEM对神经连接图谱的绘制已经从线虫、果蝇、斑马鱼推广到更大、更复杂的脑连接体诸如小鼠、人类的部分脑组织。其四,更容易捕捉细胞或机体内的小概率事件。例如:利用连续切片SEM成像技术可以较容易地捕捉到线虫PVD神经元分支处的内质网结构^[56],但是传统的单张切片电镜成像却很难实现(切过或切不到分支结构)。

尽管vEM的持续发展,使其在生命科学中的应用越来越广泛。但是不得不承认,它还存在很多局限性。首先,它不能像荧光显微镜那样可以检测来自特定标签或染料的信号,从而缺乏解析生命活动所需的关键功能信息,同时也无法定位感兴趣的罕见结构。因为,如果目标结构没有被特异性标记,很难在整个细胞或组织的大体积中进行vEM成像的定位。第二,由于vEM的样品都是固定后的细胞,无法进行活细胞成像,所以捕获的都是离散时刻的细胞图像,无法像荧光显微成像那样进行活细胞实时成像,从而直接解释生命活动的动态过程。第三,由于电镜图像是通过不同的对比度来区分不同的结构,原始图像都是灰度信息,不会有太多的区别。因此,要明确地识别vEM观察到的许多结构极具挑战。对于后期的图像分割比较依赖于专家的人工识别,特别是对于结构相似或异常的结构,不同的人在进行识别时可能存在很大分歧,从而影响最终的统计分析结果。第四,vEM可以提供细胞内不同大分子的位置甚至结构特征,但在大多数情况下,它并不能告诉我们观察到的结构或大分子的元素组成。这就需要蛋白质组学或者能谱等其他技术来补充和解释vEM数据。第五,vEM虽然可以实现毫米级尺度的3D重构,但是对于分析组织以上尺度的生物样本还远远不够。因此,通过vEM成像进行目标观察之前,通常需要使用更高通量的技术(比如光学成像)来精确定义生物过程的条件、位置和时间。最后,vEM(特别是对于毫米级以上的大尺度样本)的研究周期、经济成本,技术难度等门槛很高,不适合普通的实验室开展。

综上,许多重要的生物信息无法用电子显微镜

直接观察到。随着荧光显微镜、蛋白质组学和人工智能预测等方法的迅速发展,只有将vEM成像与其他多模态数据相结合,才有利于研究人员更全面的理解生物学过程。

6 vEM的挑战和展望

vEM技术和相关图像处理算法的快速发展,使得我们可以更加清晰地在不同尺度上直接观察和分析细胞和组织的空间3D结构、形态和分布,为功能和机理的阐释、生命活动的机制和规律的揭示、病理研究和临床诊断等发挥了至关重要的作用。正如 Christopher J. Peddie 等^[9]的论述:基因组学、蛋白质组学和代谢组学面临的挑战是从系统水平分析转向单细胞,而电子显微镜面临的挑战是从单细胞水平转向系统水平。正是vEM技术的发展,为我们提供了研究尺度从单细胞,到组织,再到整个肌体系统跨越的机会。

新的技术方法的发展,来源于生命科学、医学等各领域亟待解决的科学问题的驱动;反过来,技术的发展也推动了人类对生命机理的认知和医疗水平的提升,使科学问题的研究更加深入和系统。两者相辅相成,互相推进的过程中必然出现各种困难。目前,vEM技术面临解决的困难和挑战包括:在样品制备方面,需要解决厚度在1 mm以上的大尺度样品的化学固定和高效渗透问题,这样才能满足研究尺度的日益增大;在成像通量方面,目前ZEISS公司、DELMIC公司等多家公司可以实现多束或快速扫描,但价格昂贵,只有少数实验室购置安装。如何保证大尺度高通量成像的同时降低设备成本,使高通量成像普及,将是未来技术发展的趋势和面临的挑战;在数据处理方面,在连续切片非线性形变的对齐方面,尚待开发高效的算法以进一步提高对齐精度;而且组学数据与各尺度vEM形态结构数据的准确映射图谱关系也是未来图像处理的前瞻性问题;此外,vEM还需解决和优化:高分辨率高通量成像条件下的大数据存储和管理策略、细胞和组织等各尺度的3D形态划分的通用人工智能大模型、建立统一的vEM基础设施和科研社区、建立vEM各技术从样品制备到数据分析的统一的流程化培训和推广方案等等。克服以上这些障碍需要结构生物学、体电子显微学、光学成像、临床科学、医学成像、生物学、人工智能、计算机等各学科各领域的研究人员之间广泛的跨学科合作。

深度学习等人工智能算法在vEM的图像拼接、对齐、轴向信息恢复中发挥了重要作用。未来,深度学习将扩展到蛋白质、细胞、组织、器官甚至到整个肌体系统的跨尺度的vEM图谱绘制和跨层图谱映射中。进而,该图谱映射关系与蛋白质组、转录组、代谢组研究相结合,形成组学数据在不同尺度空间的多层次3D分布网络,从而将vEM的结构和形态研究与功能机制研究之间建立起联系。这种基于组学和vEM的大数据挖掘和人工智能方法研究将推动跨尺度生物样品形态研究与生命机理和病理研究的密切结合。跨越学科界限,与空间蛋白质组学、转录组学及代谢组学的结合,将为vEM的空间结构研究增添空间功能的色彩,最终迈向功能形态计量学的新时代^[9]。

参 考 文 献

- [1] Kanaya K, Okayama S. Penetration and energy-loss theory of electrons in solid targets. *J Phys D Appl Phys*, 1972, **5**(1): 43-58
- [2] Bang B H, Bang F B. Graphic reconstruction of the third dimension from serial electron microphotographs. *J Ultrastruct Res*, 1957, **1**(2): 138-139
- [3] 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
- [4] White J G, Southgate E, Thomson J N, *et al*. The structure of the nervous system of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1986, **314**(1165): 1-340
- [5] Briggman K L, Denk W. Towards neural circuit reconstruction with volume electron microscopy techniques. *Curr Opin Neurobiol*, 2006, **16**(5): 562-570
- [6] Yin W, Brittain D, Borseth J, *et al*. A petascale automated imaging pipeline for mapping neuronal circuits with high-throughput transmission electron microscopy. *Nat Commun*, 2020, **11**(1): 4949
- [7] Denk W, Horstmann H. Serial block-face scanning electron microscopy to reconstruct three-dimensional tissue nanostructure. *PLoS Biol*, 2004, **2**(11): e329
- [8] Holzer L, Indutnyi F, Gasser P H, *et al*. Three-dimensional analysis of porous BaTiO₃ ceramics using FIB nanotomography. *J Microsc*, 2004, **216**(Pt 1): 84-95
- [9] Peddie C J, Genoud C, Kreshuk A, *et al*. Volume electron microscopy. *Nat Rev Methods Primers*, 2022, **2**: 51
- [10] Schalek R, Kasthuri N, Hayworth K, *et al*. Development of high-throughput, high-resolution 3D reconstruction of large-volume biological tissue using automated tape collection ultramicrotomy and scanning electron microscopy. *Microanal*, 2011, **17**(S2): 966-967
- [11] Hayworth K J, Morgan J L, Schalek R, *et al*. Imaging ATUM ultrathin section libraries with WaferMapper: a multi-scale

- approach to EM reconstruction of neural circuits. *Front Neural Circuits*, 2014, **8**: 68
- [12] Li X, Ji G, Chen X, *et al.* Large scale three-dimensional reconstruction of an entire *Caenorhabditis elegans* larva using AutoCUTS-SEM. *J Struct Biol*, 2017, **200**(2): 87-96
- [13] Courson J A, Landry P T, Do T, *et al.* Serial block-face scanning electron microscopy (SBF-SEM) of biological tissue samples. *J Vis Exp*, **2021**(169): e62045
- [14] Crosby K, Eberle A L, Zeidler D. Multi-beam SEM technology for high throughput imaging. *MRS Adv*, 2016, **1**(26): 1915-1920
- [15] Potter C S, Pulokas J, Smith P, *et al.* Robotic grid loading system for a transmission electron microscope. *J Struct Biol*, 2004, **146**(3): 431-440
- [16] Lefman J, Morrison R, Subramaniam S. Automated 100-position specimen loader and image acquisition system for transmission electron microscopy. *J Struct Biol*, 2007, **158**(3): 318-326
- [17] Bock D D, Lee W C A, Kerlin A M, *et al.* Network anatomy and *in vivo* physiology of visual cortical neurons. *Nature*, 2011, **471**(7337): 177-182
- [18] Zheng Z, Lauritzen J S, Perlman E, *et al.* A complete electron microscopy volume of the brain of adult *Drosophila melanogaster*. *Cell*, 2018, **174**(3): 730-743.e22
- [19] Robinson C, Price J, Milkie D, *et al.* Automated infrastructure for high-throughput acquisition of serial section TEM image volumes. *Microanal*, 2016, **22**(S3): 1150-1151
- [20] Graham B J, Hildebrand D G C, Kuan A T, *et al.* High-throughput transmission electron microscopy with automated serial sectioning. *bioRxiv*, 2019. <https://doi.org/10.1101/657346>
- [21] Phelps J S, Hildebrand D G C, Graham B J, *et al.* Reconstruction of motor control circuits in adult *Drosophila* using automated transmission electron microscopy. *Cell*, 2021, **184**(3): 759-774.e18
- [22] Hohmann-Marriott M F, Sousa A A, Azari A A, *et al.* Nanoscale 3D cellular imaging by axial scanning transmission electron tomography. *Nat Methods*, 2009, **6**(10): 729-731
- [23] Bárcena M, Koster A J. Electron tomography in life science. *Semin Cell Dev Biol*, 2009, **20**(8): 920-930
- [24] Soto G E, Young S J, Martone M E, *et al.* Serial section electron tomography: a method for three-dimensional reconstruction of large structures. *Neuroimage*, 1994, **1**(3): 230-243
- [25] Starborg T, Lu Y, Kadler K E, *et al.* Electron microscopy of collagen fibril structure *in vitro* and *in vivo* including three-dimensional reconstruction. *Methods Cell Biol*, 2008, **88**: 319-345
- [26] Veeraraghavan A, Genkin A V, Vitaladevuni S, *et al.* Increasing depth resolution of electron microscopy of neural circuits using sparse tomographic reconstruction//IEEE. 2010 IEEE Computer Society Conference on Computer Vision and Pattern Recognition. San Francisco, CA, USA: IEEE, 2010: 1767-1774
- [27] Deerinck T J, Shone T M, Bushong E A, *et al.* High-performance serial block-face SEM of nonconductive biological samples enabled by focal gas injection-based charge compensation. *J Microsc*, 2018, **270**(2): 142-149
- [28] Helmstaedter M, Briggman K L, Turaga S C, *et al.* Connectomic reconstruction of the inner plexiform layer in the mouse retina. *Nature*, 2013, **500**: 168-174
- [29] Villinger C, Gregorius H, Kranz C, *et al.* FIB/SEM tomography with TEM-like resolution for 3D imaging of high-pressure frozen cells. *Histochem Cell Biol*, 2012, **138**(4): 549-556
- [30] Heymann J A W, Hayles M, Gestmann I, *et al.* Site-specific 3D imaging of cells and tissues with a dual beam microscope. *J Struct Biol*, 2006, **155**(1): 63-73
- [31] Wei D, Jacobs S, Modla S, *et al.* High-resolution three-dimensional reconstruction of a whole yeast cell using focused-ion beam scanning electron microscopy. *Biotechniques*, 2012, **53**(1): 41-48
- [32] Zhao Y G, Chen Y, Miao G, *et al.* The ER-localized transmembrane protein EPG-3/VMP1 regulates SERCA activity to control ER-isolation membrane contacts for autophagosome formation. *Mol Cell*, 2017, **67**(6): 974-989.e6
- [33] Xu C S, Hayworth K J, Lu Z, *et al.* Enhanced FIB-SEM systems for large-volume 3D imaging. *Elife*, 2017, **6**: e25916
- [34] Hayworth K J, Xu C S, Lu Z, *et al.* Ultrastructurally smooth thick partitioning and volume stitching for large-scale connectomics. *Nat Methods*, 2015, **12**(4): 319-322
- [35] Xu C S, Pang S, Shtengel G, *et al.* An open-access volume electron microscopy atlas of whole cells and tissues. *Nature*, 2021, **599**(7883): 147-151
- [36] Hayworth K J, Peale D, Januszewski M, *et al.* Gas cluster ion beam SEM for imaging of large tissue samples with 10 nm isotropic resolution. *Nat Methods*, 2020, **17**(1): 68-71
- [37] Wang J, Randolph S, Wu Q, *et al.* Reactive oxygen FIB spin milling enables correlative workflow for 3D super-resolution light microscopy and serial FIB/SEM of cultured cells. *Sci Rep*, 2021, **11**(1): 13162
- [38] Sergey G, Denis K, Ava H, *et al.* Oxygen plasma focused ion beam scanning electron microscopy for biological samples. *bioRxiv*, 2018. <https://doi.org/10.1101/457820>
- [39] Burnett T L, Kelley R, Winiarski B, *et al.* Large volume serial section tomography by Xe Plasma FIB dual beam microscopy. *Ultramicroscopy*, 2016, **161**: 119-129
- [40] Gholinia A, Curd M E, Bousser E, *et al.* Coupled Broad Ion Beam-Scanning Electron Microscopy (BIB-SEM) for polishing and three dimensional (3D) serial section tomography (SST). *Ultramicroscopy*, 2020, **214**: 112989
- [41] Winiarski B, Gholinia A, Mingard K, *et al.* Broad ion beam serial section tomography. *Ultramicroscopy*, 2017, **172**: 52-64
- [42] Smith S J. Q&A: Array tomography. *BMC Biol*, 2018, **16**(1): 98
- [43] Wacker I, Spomer W, Hofmann A, *et al.* Hierarchical imaging: a new concept for targeted imaging of large volumes from cells to tissues. *BMC Cell Biol*, 2016, **17**(1): 38
- [44] Koike T, Kataoka Y, Maeda M, *et al.* A device for ribbon collection for array tomography with scanning electron microscopy. *Acta Histochem Cytochem*, 2017, **50**(5): 135-140
- [45] Burel A, Lavault M T, Chevalier C, *et al.* A targeted 3D EM and

- correlative microscopy method using SEM array tomography. Development, 2018, **145**(12): dev160879
- [46] Templier T, MagC, magnetic collection of ultrathin sections for volumetric correlative light and electron microscopy. Elife, 2019, **8**: e45696
- [47] Morgan J L, Berger D R, Wetzel A W, *et al.* The fuzzy logic of network connectivity in mouse visual thalamus. Cell, 2016, **165**(1): 192-206
- [48] Kasthuri N, Hayworth K J, Berger D R, *et al.* Saturated reconstruction of a volume of neocortex. Cell, 2015, **162**(3): 648-661
- [49] Hildebrand D G C, Cicconet M, Torres R M, *et al.* Whole-brain serial-section electron microscopy in larval zebrafish. Nature, 2017, **545**(7654): 345-349
- [50] Shen W, Ma L, Zhang X, *et al.* Three-dimensional reconstruction of *Picea wilsonii* Mast. pollen grains using automated electron microscopy. Sci China Life Sci, 2020, **63**(2): 171-179
- [51] Wang S, Zheng Y, Li Q, *et al.* Deciphering primate retinal aging at single-cell resolution. Protein Cell, 2021, **12**(11): 889-898
- [52] Zhang W, Zhang S, Yan P, *et al.* A single-cell transcriptomic landscape of primate arterial aging. Nat Commun, 2020, **11**(1): 2202
- [53] Zhang X, Wang Q, Wu J, *et al.* A legume kinesin controls vacuole morphogenesis for rhizobia endosymbiosis. Nat Plants, 2022, **8**(11): 1275-1288
- [54] Yang J, Zhai N, Chen Y, *et al.* A signal peptide peptidase is required for ER-symbiosome proximal association and protein secretion. Nat Commun, 2023, **14**(1): 4355
- [55] He J, Cao Y, Zhu Q, *et al.* Renal macrophages monitor and remove particles from urine to prevent tubule obstruction. Immunity, 2024, **57**(1): 106-123.e7
- [56] Liu X, Guo X, Niu L, *et al.* Atlastin-1 regulates morphology and function of endoplasmic reticulum in dendrites. Nat Commun, 2019, **10**(1): 568
- [57] Lane R, Wolters A H G, Giepmans B N G, *et al.* Integrated array tomography for 3D correlative light and electron microscopy. Front Mol Biosci, 2021, **8**: 822232
- [58] Micheva K D, Smith S J. Array tomography: a new tool for imaging the molecular architecture and ultrastructure of neural circuits. Neuron, 2007, **55**(1): 25-36
- [59] Peddie C J, Domart M C, Snetkov X, *et al.* Correlative super-resolution fluorescence and electron microscopy using conventional fluorescent proteins *in vacuo*. J Struct Biol, 2017, **199**(2): 120-131
- [60] Hua Y, Laserstein P, Helmstaedter M. Large-volume en-bloc staining for electron microscopy-based connectomics. Nat Commun, 2015, **6**: 7923
- [61] Tapia J C, Kasthuri N, Hayworth K J, *et al.* High-contrast en bloc staining of neuronal tissue for field emission scanning electron microscopy. Nat Protoc, 2012, **7**(2): 193-206
- [62] Mikula S, Denk W. High-resolution whole-brain staining for electron microscopic circuit reconstruction. Nat Methods, 2015, **12**(6): 541-546
- [63] Dahl R, Staehelin L A. High-pressure freezing for the preservation of biological structure: theory and practice. J Electron Microscop Tech, 1989, **13**(3): 165-174
- [64] Karahara I, Kang B H. High-pressure freezing and low-temperature processing of plant tissue samples for electron microscopy. Methods Mol Biol, 2014, **1080**: 147-157
- [65] Doyle N, Hawes P C. Preparation of cultured cells using high-pressure freezing and freeze substitution for subsequent 2D or 3D visualization in the transmission electron microscope. Methods Mol Biol, 2020, **2203**: 263-275
- [66] Capek M, Brůza P, Janáček J, *et al.* Volume reconstruction of large tissue specimens from serial physical sections using confocal microscopy and correction of cutting deformations by elastic registration. Microsc Res Tech, 2009, **72**(2): 110-119
- [67] Pichat J, Iglesias J E, Yousry T, *et al.* A survey of methods for 3D histology reconstruction. Med Image Anal, 2018, **46**: 73-105
- [68] Tasdizen T, Koshevoy P, Grimm B C, *et al.* Automatic mosaicking and volume assembly for high-throughput serial-section transmission electron microscopy. J Neurosci Methods, 2010, **193**(1): 132-144
- [69] Preibisch S, Saalfeld S, Tomancak P. Fast stitching of large 3d biological datasets. Proceedings of the ImageJ User and Developer Conference, 2008. <https://www.janelia.org/publication/fast-stitching-large-3d-biological-datasets>
- [70] Preibisch S, Saalfeld S, Tomancak P. Globally optimal stitching of tiled 3D microscopic image acquisitions. Bioinformatics, 2009, **25**(11): 1463-1465
- [71] Chalfoun J, Majurski M, Blattner T, *et al.* MIST: accurate and scalable microscopy image stitching tool with stage modeling and error minimization. Sci Rep, 2017, **7**(1): 4988
- [72] Seo J H, Yang S, Kang M S, *et al.* Automated stitching of microscope images of fluorescence in cells with minimal overlap. Micron, 2019, **126**: 102718
- [73] Kaynig V, Fischer B, Müller E, *et al.* Fully automatic stitching and distortion correction of transmission electron microscope images. J Struct Biol, 2010, **171**(2): 163-173
- [74] Hörl D, Rojas Rusak F, Preusser F, *et al.* BigStitcher: reconstructing high-resolution image datasets of cleared and expanded samples. Nat Methods, 2019, **16**(9): 870-874
- [75] Saalfeld S, Cardona A, Hartenstein V, *et al.* As-rigid-as-possible mosaicking and serial section registration of large ssTEM datasets. Bioinformatics, 2010, **26**(12): i57-i63
- [76] Khairy K, Denisov G, Saalfeld S. Joint deformable registration of large EM image volumes: a matrix solver approach. arXiv, 2018. <https://doi.org/10.48550/arXiv.1804.10019>
- [77] Briggman K L, Helmstaedter M, Denk W. Wiring specificity in the direction-selectivity circuit of the retina. Nature, 2011, **471**(7337): 183-188
- [78] Scheffer L K, Karsh B, Vitaladevuni S. Automated alignment of imperfect EM images for neural reconstruction. arXiv, 2013. <http://doi.org/10.48550/arXiv.1304.6034>

- [79] Takemura S Y, Bharioke A, Lu Z, *et al.* A visual motion detection circuit suggested by *Drosophila* connectomics. *Nature*, 2013, **500**(7461): 175-181
- [80] Cardona A, Saalfeld S, Schindelin J, *et al.* TrakEM2 software for neural circuit reconstruction. *PLoS One*, 2012, **7**(6): e38011
- [81] Saalfeld S, Fetter R, Cardona A, *et al.* Elastic volume reconstruction from series of ultra-thin microscopy sections. *Nat Methods*, 2012, **9**(7): 717-720
- [82] Saalfeld S. Computational methods for stitching, alignment, and artifact correction of serial section data. *Methods Cell Biol*, 2019, **152**: 261-276
- [83] Wetzel A W, Bakal J, Dittrich M, *et al.* Registering large volume serial-section electron microscopy image sets for neural circuit reconstruction using FFT signal whitening//IEEE. 2016 IEEE Applied Imagery Pattern Recognition Workshop (AIPR). Washington, DC, USA: IEEE, 2016: 1-10
- [84] Yoo I, Hildebrand D G C, Tobin W F, *et al.* ssEMnet: serial-section electron microscopy image registration using a spatial transformer network with learned features//Lecture Notes in Computer Science. Cham: Springer International Publishing, 2017: 249-257
- [85] Mitchell E, Keselj S, Popovych S, *et al.* Siamese encoding and alignment by multiscale learning with self-supervision. *arXiv*, 2019. <https://doi.org/10.48550/arXiv.1904.02643>
- [86] Zhou F, Chen B, Chen X, *et al.* Neuronal morphological model-driven image registration for serial electron microscopy sections. *Front Hum Neurosci*, 2022, **16**: 846599
- [87] Xin T, Lv Y, Chen H, *et al.* A novel registration method for long-serial section images of EM with a serial split technique based on unsupervised optical flow network. *Bioinformatics*, 2023, **39**(8): btad436
- [88] Xin T, Shen L, Li L, *et al.* Expected affine: a registration method for damaged section in serial sections electron microscopy. *Front Neuroinform*, 2022, **16**: 944050
- [89] González-Ruiz V, García-Ortiz J P, Fernández-Fernández M R, *et al.* Optical flow driven interpolation for isotropic FIB-SEM reconstructions. *Comput Methods Programs Biomed*, 2022, **221**: 106856
- [90] Heinrich L, Bogovic J A, Saalfeld S. Deep learning for isotropic super-resolution from non-isotropic 3D electron microscopy//Lecture Notes in Computer Science. Cham: Springer International Publishing, 2017: 135-143
- [91] Ledig C, Theis L, Huszar F, *et al.* Photo-realistic single image super-resolution using a generative adversarial network//IEEE. 2017 IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR). Honolulu, HI: IEEE, 2017: 105-114
- [92] Zhu J Y, Park T, Isola P, *et al.* Unpaired image-to-image translation using cycle-consistent adversarial networks//IEEE. 2017 IEEE International Conference on Computer Vision (ICCV). Venice: IEEE, 2017: 2242-2251
- [93] Lu C, Chen K, Qiu H, *et al.* Diffusion-based deep learning method for augmenting ultrastructural imaging and volume electron microscopy. *Nat Commun*, 2024, **15**(1): 4677
- [94] Pan M, Gan Y, Zhou F, *et al.* DiffuseIR: diffusion models for isotropic reconstruction of 3D microscopic images//Lecture Notes in Computer Science. Cham: Springer Nature Switzerland, 2023: 323-332
- [95] Lee K, Jeong W K. Reference-free isotropic 3D EM reconstruction using diffusion models//Lecture Notes in Computer Science. Cham: Springer Nature Switzerland, 2024: 235-245
- [96] He J, Zang Y, Sun W, *et al.* IsoVEM: isotropic reconstruction for volume electron microscopy based on transformer. *bioRxiv*, 2023. <https://doi.org/10.1101/2023.11.22.567807>
- [97] Matas J, Chum O, Urban M, *et al.* Robust wide-baseline stereo from maximally stable extremal regions. *Image Vis Comput*, 2004, **22**(10): 761-767
- [98] Vazquez-Reina A, Miller E, Pfister H. Multiphase geometric couplings for the segmentation of neural processes//IEEE. 2009 IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition. Miami, FL, USA: IEEE, 2009: 2020-2027
- [99] Mishchenko Y, Hu T, Spacek J, *et al.* Ultrastructural analysis of hippocampal neuropil from the connectomics perspective. *Neuron*, 2010, **67**(6): 1009-1020
- [100] Kreshuk A, Straehle C N, Sommer C, *et al.* Automated segmentation of synapses in 3D EM data//IEEE. 2011 IEEE International Symposium on Biomedical Imaging: From Nano to Macro. Chicago, IL, USA: IEEE, 2011: 220-223
- [101] Roberts M, Jeong W K, Vázquez-Reina A, *et al.* Neural process reconstruction from sparse user scribbles//Proceedings of the 14th International Conference on Medical Image Computing and Computer-Assisted Intervention-Volume Part I. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2011: 621-628
- [102] Becker C, Ali K, Knott G, *et al.* Learning context cues for synapse segmentation. *IEEE Trans Med Imaging*, 2013, **32**(10): 1864-1877
- [103] Sun M, Zhang D, Guo H, *et al.* 3D-reconstruction of synapses based on EM images//IEEE. 2016 IEEE International Conference on Mechatronics and Automation. Harbin, Heilongjiang, China: IEEE, 2016: 1959-1964
- [104] Jagadeesh V, Anderson J, Jones B, *et al.* Synapse classification and localization in electron micrographs. *Pattern Recognit Lett*, 2014, **43**: 17-24
- [105] Kreshuk A, Koethe U, Pax E, *et al.* Automated detection of synapses in serial section transmission electron microscopy image stacks. *PLoS One*, 2014, **9**(2): e87351
- [106] Jain V, Murray J F, Roth F, *et al.* Supervised Learning of Image Restoration with Convolutional Networks//IEEE. 2007 IEEE 11th International Conference on Computer Vision. Rio de Janeiro, Brazil: IEEE, 2007: 1-8
- [107] Ronneberger O, Fischer P, Brox T. U-net: convolutional networks for biomedical image segmentation. *arXiv*, 2015. <https://doi.org/10.48550/arXiv.1505.04597>
- [108] Beier T, Pape C, Rahaman N, *et al.* Multicut brings automated neurite segmentation closer to human performance. *Nat Methods*, 2017, **14**(2): 101-102
- [109] Keuper M, Levinkov E, Bonneel N, *et al.* Efficient decomposition

- of image and mesh graphs by lifted multicuts. arXiv, 2015. <https://doi.org/10.48550/arXiv.1505.06973>
- [110] Lee K, Zung J, Li P, *et al.* Superhuman accuracy on the SNEMI3D connectomics challenge. arXiv, 2017. <https://doi.org/10.48550/arXiv.1706.00120>
- [111] Januszewski M, Kornfeld J, Li P H, *et al.* High-precision automated reconstruction of neurons with flood-filling networks. Nat Methods, 2018, **15**(8): 605-610
- [112] Hong B, Liu J, Shen L, *et al.* Graph partitioning algorithms with biological connectivity decisions for neuron reconstruction in electron microscope volumes. Expert Syst Appl, 2023, **222**: 119776
- [113] Li Z, Yang X, Liu J, *et al.* DeepMulticut: deep learning of multicut problem for neuron segmentation from electron microscopy volume. IEEE Trans Pattern Anal Mach Intell, 2024. DOI: 10.1109/TPAMI.2024.3409634
- [114] Xiao C, Chen X, Li W, *et al.* Automatic mitochondria segmentation for EM data using a 3D supervised convolutional network. Front Neuroanat, 2018, **12**: 92
- [115] Liu J, Qi J, Chen X, *et al.* Fear memory-associated synaptic and mitochondrial changes revealed by deep learning-based processing of electron microscopy data. Cell Rep, 2022, **40**(5): 111151
- [116] Dorkenwald S, Schubert P J, Killinger M F, *et al.* Automated synaptic connectivity inference for volume electron microscopy. Nat Methods, 2017, **14**(4): 435-442
- [117] Wilson A, Babadi M. SynapseCLR: Uncovering features of synapses in primary visual cortex through contrastive representation learning. Patterns, 2023, **4**(4): 100693
- [118] Dorkenwald S, Li P H, Januszewski M, *et al.* Multi-layered maps of neuropil with segmentation-guided contrastive learning. Nat Methods, 2023, **20**(12): 2011-2020
- [119] Kirillov A, Mintun E, Ravi N, *et al.* Segment anything//IEEE. 2023 IEEE/CVF International Conference on Computer Vision (ICCV). Paris, France: IEEE, 2023: 3992-4003
- [120] Archit A, Nair S, Khalid N, *et al.* Segment anything for microscopy. bioRxiv, 2023. <https://doi.org/10.1101/2023.08.21.554208>
- [121] Boergens K M, Berning M, Bocklisch T, *et al.* webKnossos: efficient online 3D data annotation for connectomics. Nat Methods, 2017, **14**(7): 691-694
- [122] Pietzsch T, Saalfeld S, Preibisch S, *et al.* BigDataViewer: visualization and processing for large image data sets. Nat Methods, 2015, **12**(6): 481-483
- [123] Pape C, Meechan K, Moreva E, *et al.* MoBIE: a Fiji plugin for sharing and exploration of multi-modal cloud-hosted big image data. Nat Methods, 2023, **20**(4): 475-476
- [124] Saalfeld S, Cardona A, Hartenstein V, *et al.* CATMAID: collaborative annotation toolkit for massive amounts of image data. Bioinformatics, 2009, **25**(15): 1984-1986
- [125] Helmstaedter M, Briggman K L, Denk W. High-accuracy neurite reconstruction for high-throughput neuroanatomy. Nat Neurosci, 2011, **14**(8): 1081-1088
- [126] Maitin-Shepard J. Neuroglancer[S/OL] [2021-04-30]. <https://github.com/google/neuroglancer>
- [127] Berger D R, Seung H S, Lichtman J W. VAST (volume annotation and segmentation tool): efficient manual and semi-automatic labeling of large 3D image stacks. Front Neural Circuits, 2018, **12**: 88
- [128] Jarrell T A, Wang Y, Bloniarz A E, *et al.* The connectome of a decision-making neural network. Science, 2012, **337**(6093): 437-444
- [129] Bumbarger D J, Riebesell M, Rödelsperger C, *et al.* System-wide rewiring underlies behavioral differences in predatory and bacterial-feeding nematodes. Cell, 2013, **152**(1/2): 109-119
- [130] Cook S J, Jarrell T A, Brittin C A, *et al.* Whole-animal connectomes of both *Caenorhabditis elegans* sexes. Nature, 2019, **571**(7763): 63-71
- [131] Witvliet D, Mulcahy B, Mitchell J K, *et al.* Connectomes across development reveal principles of brain maturation. Nature, 2021, **596**(7871): 257-261
- [132] Scheffer L K, Xu C S, Januszewski M, *et al.* A connectome and analysis of the adult *Drosophila* central brain. eLife, 2020, **9**: e57443
- [133] Winding M, Pedigo B D, Barnes C L, *et al.* The connectome of an insect brain. Science, 2023, **379**(6636): eadd9330
- [134] Vishwanathan A, Ramirez A D, Wu J, *et al.* Modularity and neural coding from a brainstem synaptic wiring diagram. bioRxiv, 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.10.28.359620>
- [135] Svava F, Förster D, Kubo F, *et al.* Automated synapse-level reconstruction of neural circuits in the larval zebrafish brain. Nat Methods, 2022, **19**(11): 1357-1366
- [136] Motta A, Berning M, Boergens K M, *et al.* Dense connectomic reconstruction in layer 4 of the somatosensory cortex. Science, 2019, **366**(6469): eaay3134
- [137] The Microns Consortium, Bae J A, Baptiste M, *et al.* Functional connectomics spanning multiple areas of mouse visual cortex. bioRxiv, 2023. <https://doi.org/10.1101/2021.07.28.454025>
- [138] Turner N L, Macrina T, Bae J A, *et al.* Reconstruction of neocortex: organelles, compartments, cells, circuits, and activity. Cell, 2022, **185**(6): 1082-1100.e24
- [139] Nguyen T M, Thomas L A, Rhoades J L, *et al.* Structured cerebellar connectivity supports resilient pattern separation. Nature, 2023, **613**(7944): 543-549
- [140] Sammons R P, Vezir M, Moreno-Velasquez L, *et al.* Structure and function of the hippocampal CA3 module. Proc Natl Acad Sci USA, 2024, **121**(6): e2312281120
- [141] Shapson-Coe A, Januszewski M, Berger D R, *et al.* A connectomic study of a petascale fragment of human cerebral cortex. bioRxiv, 2021. <https://doi.org/10.1101/2021.05.29.446289>
- [142] Loomba S, Straehle J, Gangadharan V, *et al.* Connectomic comparison of mouse and human cortex. Science, 2022, **377**(6602): eabo0924
- [143] Li H, Li Y, Lei Z, *et al.* Transformation of odor selectivity from projection neurons to single mushroom body neurons mapped with

- dual-color calcium imaging. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, **110**(29): 12084-12089
- [144] Hua Y, Ding X, Wang H, *et al.* Electron microscopic reconstruction of neural circuitry in the cochlea. *Cell Rep*, 2021, **34**(1): 108551
- [145] Liu J, Wang S, Lu Y, *et al.* Aligned organization of synapses and mitochondria in auditory hair cells. *Neurosci Bull*, 2022, **38**(3): 235-248
- [146] Ngai J. BRAIN 2.0: transforming neuroscience. *Cell*, 2022, **185**(1): 4-8
- [147] Mayorova T D, Hammar K, Jung J H, *et al.* Placozoan fiber cells: mediators of innate immunity and participants in wound healing. *Sci Rep*, 2021, **11**(1): 23343
- [148] Zenker J, White M D, Templin R M, *et al.* A microtubule-organizing center directing intracellular transport in the early mouse embryo. *Science*, 2017, **357**(6354): 925-928
- [149] Weiner A, Enninga J. The pathogen-host interface in three dimensions: correlative FIB/SEM applications. *Trends Microbiol*, 2019, **27**(5): 426-439
- [150] Beckwith M S, Beckwith K S, Sikorski P, *et al.* Seeing a mycobacterium-infected cell in nanoscale 3D: correlative imaging by light microscopy and FIB/SEM tomography. *PLoS One*, 2015, **10**(9): e0134644
- [151] Bernard E M, Fearn A, Bussi C, *et al.* *M. tuberculosis* infection of human iPSC-derived macrophages reveals complex membrane dynamics during xenophagy evasion. *J Cell Sci*, 2020, **134**(5): jcs252973
- [152] Felts R L, Narayan K, Estes J D, *et al.* 3D visualization of HIV transfer at the virological synapse between dendritic cells and T cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, **107**(30): 13336-13341
- [153] Terasaki M, Shemesh T, Kasthuri N, *et al.* Stacked endoplasmic reticulum sheets are connected by helicoidal membrane motifs. *Cell*, 2013, **154**(2): 285-296
- [154] Marsh B J. Lessons from tomographic studies of the mammalian Golgi. *Biochim Biophys Acta*, 2005, **1744**(3): 273-292
- [155] Müller A, Schmidt D, Xu C S, *et al.* 3D FIB-SEM reconstruction of microtubule-organelle interaction in whole primary mouse β cells. *J Cell Biol*, 2021, **220**(2): e202010039
- [156] Jiang Y, Li L, Chen X, *et al.* Three-dimensional ATUM-SEM reconstruction and analysis of hepatic endoplasmic reticulum-organelle interactions. *J Mol Cell Biol*, 2021, **13**(9): 636-645
- [157] Chang S, Li L, Hong B, *et al.* An intelligent workflow for sub-nanoscale 3D reconstruction of intact synapses from serial section electron tomography. *BMC Biol*, 2023, **21**(1): 198
- [158] Anderson J R, Jones B W, Watt C B, *et al.* Exploring the retinal connectome. *Mol Vis*, 2011, **17**: 355-379
- [159] Wilson C E, Lasher R S, Yang R, *et al.* Taste bud connectome: implications for taste information processing. *J Neurosci*, 2022, **42**(5): 804-816
- [160] Erlandson R A. Role of electron microscopy in modern diagnostic surgical pathology. *Modern Surgical Pathology*, 2009: 71-84
- [161] Nagai M, Saitoh S, Takaki T, *et al.* Glomerular cellular interactions following disruption of the glomerular basement membrane in IgA nephropathy: ultrastructural analyses by 3-dimensional serial block-face scanning electron microscopy. *Kidney Med*, 2020, **2**(2): 222-225
- [162] Riesterer J L, Lopez C S, Stempinski E S, *et al.* A workflow for visualizing human cancer biopsies using large-format electron microscopy. *Methods Cell Biol*, 2020, **158**: 163-181
- [163] Domínguez-Álvaro M, Montero-Crespo M, Blazquez-Llorca L, *et al.* 3D electron microscopy study of synaptic organization of the normal human transentorhinal cortex and its possible alterations in Alzheimer's disease. *eNeuro*, 2019, **6**(4): ENEURO.0140-19.2019
- [164] Shahmoradian S H, Lewis A J, Genoud C, *et al.* Lewy pathology in Parkinson's disease consists of crowded organelles and lipid membranes. *Nat Neurosci*, 2019, **22**(7): 1099-1109

Advances of Volume Electron Microscopy*

ZHANG Yan^{1)**,**}, CHEN Xi^{2)**}, LI Xi-Xia^{3)**}, LI Lin-Lin^{2)**}, CHEN Lian-Wan¹⁾,
HAN Hua^{2,4)**}, SUN Fei^{1,3,5)**}

⁽¹⁾Key Laboratory of Biological Macromolecules, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

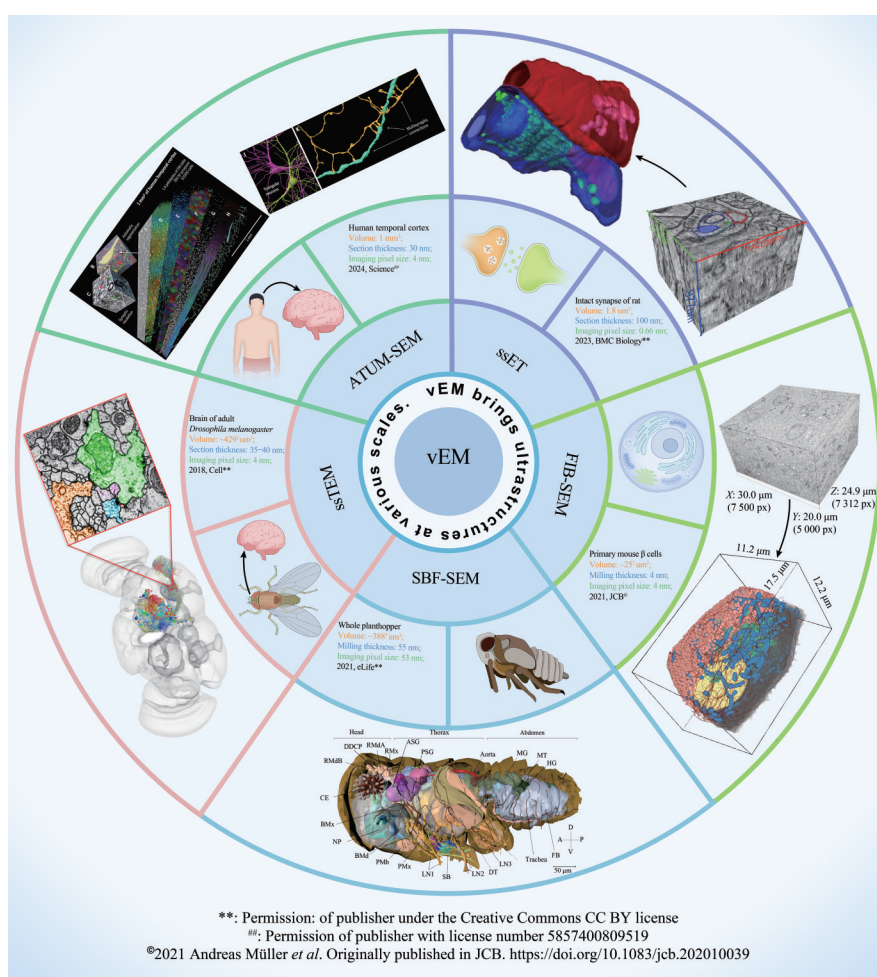
⁽²⁾Key Laboratory of Brain Cognition and Brain-inspired Intelligence Technology, Micro Reconstruction & Intelligent Analysis Team, Institute of Automation, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China;

⁽³⁾Center for Biological Imaging, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

⁽⁴⁾School of Future Technology, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 101408, China;

⁽⁵⁾Guangzhou Institutes of Biomedicine and Health, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510530, China)

Graphical abstract



* This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (32371248), Major Research Program Integration Project of National Natural Science Foundation of China (92254306), and National Science Foundation for Distinguished Young Scholars of China (31925026).

** These authors contributed equally to this work.

*** Corresponding author.

ZHANG Yan. Tel: 86-10-64888137, E-mail: yanzhang@ibp.ac.cn

HAN Hua. Tel: 86-10-82544710, E-mail: hua.han@ia.ac.cn

SUN Fei. Tel: 86-10-64888582, E-mail: feisun@ibp.ac.cn

Received: July 16, 2024 Accepted: September 18, 2024

Abstract Volume electron microscopy (vEM) imaging technology was rapidly developed in recent years. It has been the advanced technology to solve high-resolution three-dimensional structures of biological samples. Much wonderful work has revealed the fine structure and interactions of intracellular organelles, the ultrastructure of tissues, and even the three-dimensional structure of entire small biological organisms. With the continuous improvement of resolution, scale and throughput, vEM is becoming more and more widely used in medicine, life sciences, clinical diagnostics and other fields. As a result, this technology has been rated by *Nature* as one of the seven most noteworthy frontier technologies to watch in 2023. However, the development and application of vEM-related technologies started late in China and need to be further promoted. We write this review to introduce all related vEM technologies, covering the development history of vEM, technology classification, sample preparation, data collection, image processing, *etc.*, which is convenient for people in various fields to understand, learn, apply and further develop this technology.

Key words volume electron microscopy, scanning electron microscopy, transmission electron microscopy, sample preparation, image processing, cross-scale, deep learning, ultrastructure

DOI: 10.16476/j.pibb.2024.0324