

冷冻超分辨光电融合成像技术 ——新挑战，新机遇*

李尉兴³⁾ 谷陆生³⁾ 徐晓君⁴⁾ 薛艳红¹⁾ 纪伟^{2,3)} 徐涛^{1,2,3,4)**}

¹⁾ 中国科学院生物物理研究所科教融合生物大分子卓越创新中心, 生物大分子国家重点实验室, 北京 100101;

²⁾ 中国科学院大学, 北京 100049; ³⁾ 中国科学院生物物理研究所蛋白质科学研究平台, 生命科学仪器研制与技术服务中心, 北京 100101;

⁴⁾ 华中科技大学生命科学与技术学院, 武汉 430074)

摘要 冷冻超分辨光电融合成像技术近年来发展迅速, 该技术结合了荧光显微镜特异性标记与冷冻电镜超高分辨率的优势, 成为细胞原位结构研究的新手段, 有望发展成为下一代成像技术. 本文从发展背景、应用领域等几个方面, 介绍了冷冻超分辨光电融合成像技术的概况及未来发展前景.

关键词 超分辨成像, 冷冻电镜, 光电融合, 原位

学科分类号 Q-3

DOI: 10.16476/j.pibb.2018.0197

常言道: “眼见为实”, 视觉观察是人类感知自然最早也是最基本的方式. 为了拓展人眼观察的局限性, 几个世纪以来人们发明了一代又一代的显微镜, 从 16 世纪在荷兰出现的只有几个镜片组成的光学显微镜原型, 到今天由数万个零件组成的电子显微镜, 人类已经将可以“眼见”的范围拓展到了细胞内部的纳米结构, 开始从微观尺度窥探生命的过程.

1 显微技术近年取得的突破进展

显微成像技术从原理上可分为光学显微成像和电子显微成像两大类, 这两类显微技术在近年都得到了突破性的发展. 近 10 年来, 超分辨荧光成像是生物物理领域最热门的研究方向之一, 其中基于单分子定位的超分辨荧光成像技术^[1-3]突破了传统光学显微镜的衍射极限^[4], 将传统光学显微镜的分辨率提升了一个数量级, 侧向分辨率达到 20 nm 左右, 还实现了三维^[5]和多色通道^[6]的同时检测, 该技术为细胞生物学的研究提供了新的技术手段, 成为探索细胞微结构新的科研利器, 帮助研究者观察到许多以前看不到的精细结构, 例如神经细胞轴突中周期性膜骨架^[7]、核孔支撑骨架^[8]等. 因此问世

不到 10 年, 便获得了 2014 年的诺贝尔奖^[9]. 由于直接电子探测相机的应用, 冷冻电镜近几年来发展得更如火如荼, 它是目前对于生物样品成像分辨率最高的方法^[10], 是结构生物学的革命性技术^[11], 极大地推动了结构生物学及相关领域的发展, 从而获得了 2017 年的诺贝尔奖.

2 光电融合成像技术

2.1 光电融合成像技术诞生背景

任何一种显微成像技术在具有独特优势的同时也都存在一定的局限性. 例如基于单分子定位的超分辨荧光成像具有特异性标记、精确分子定位的优势, 然而分辨率还是无法达到电子显微镜的亚纳米级别. 而电子显微镜具有超高分辨率、解析细胞内部细节结构优势, 但不具有识别特异性目标分子的能力. 近年来, 研究者们尝试将这两种技术结合起来, 衍生出光电融合成像技术(correlative light and

* 国家自然科学基金重大仪器研制项目(31127901)资助.

** 通讯联系人.

Tel: 010-64888524, E-mail: xutao@ibp.ac.cn

收稿日期: 2018-07-16, 接受日期: 2018-08-03

electron microscopy, CLEM)实现了两种技术的优势互补, 给生物显微成像技术带来了新的发展契机. 该技术利用荧光特异性标记目标分子, 通过超分辨单分子定位确定目标位置, 然后引导电镜对感兴趣目标进行高分辨率成像, 通过将定位信息和高分辨结构信息进行整合, 处理可以表征出目标分子机器在细胞原位的分布和所处微环境结构, 进一步揭示生命过程的奥秘.

2.2 常温超分辨光电融合成像技术

超分辨光电融合成像技术可分为常温超分辨光镜-常温电镜融合与冷冻超分辨光镜-冷冻电镜融合两种模式. 2006年 Betzig 等^[1]在《科学》(Science)发表的首篇基于单分子定位的超分辨成像(photo-activated localization microscopy, PALM)技术的文章中就把常温单分子定位荧光成像与常温透射电镜的成像进行了结合, 以验证 PALM 技术的可靠性. 2010年 Watanabe 等^[12]在普通常温切片上实现了 PALM 与扫描电镜的结合. 这些工作代表着超分辨光电融合成像技术发展的起始, 也预示了光电融合技术的两个发展方向: 一个方向是向超微观方向发展, 旨在原位观察分子机器结构, 并阐述其功能; 另外一个方向是向宏观方向发展, 探索厚样本的光电融合观察方法, 在整个细胞或生物个体水平上观察分子机器在细胞原位的定位和分布, 绘制生物分子分布的地图.

2.3 冷冻光电融合成像技术

2.3.1 冷冻光电融合成像技术的优势

相比常温样品的光电融合成像, 冷冻样品的光电融合成像更具优势: a. 低温下荧光分子发光性能提高, 成像定位精度也大幅度提高; b. 冷冻样品制备方法能保持样品的近天然状态.

2.3.2 冷冻光电融合成像技术的应用

冷冻超分辨光电融合成像的应用主要有两个方面: a. 利用单分子定位成像的精确定位信息, 引导冷冻电镜数据的收集. 以加州理工 Grant Jensen 实验室在 2014 年发表的工作为例^[13], 他们在 *Myxococcus xanthus* (革兰氏阴性杆状细菌) 里利用 cryo-PALM 定位 PA-GFP 标记的第六分泌系统, 并在 cryo-PALM 得到的定位信息的指引下用冷冻电子断层成像(cryo-ET)观察其结构. b. 研究特定的生物分子在亚细胞结构里的精确定位和分布. 以中国科学院生物物理研究所徐涛研究员等^[14]发展的 csCLEM (cryogenic super-resolution correlative light and electron microscopy)技术为例, 该技术建立了完整高效的冷冻光电融合实验流程, 验证了 TOM20 蛋白分子在线粒体膜上的精确定位分布, 这也是第一篇把冷冻超分辨光电融合成像技术应用于哺乳动物细胞, 并首次实现了三维的冷冻超分辨光电融合成像(图 1). 在这个工作里还发现了更多的能用于低温荧光成像的光敏荧光蛋白质, 它们在

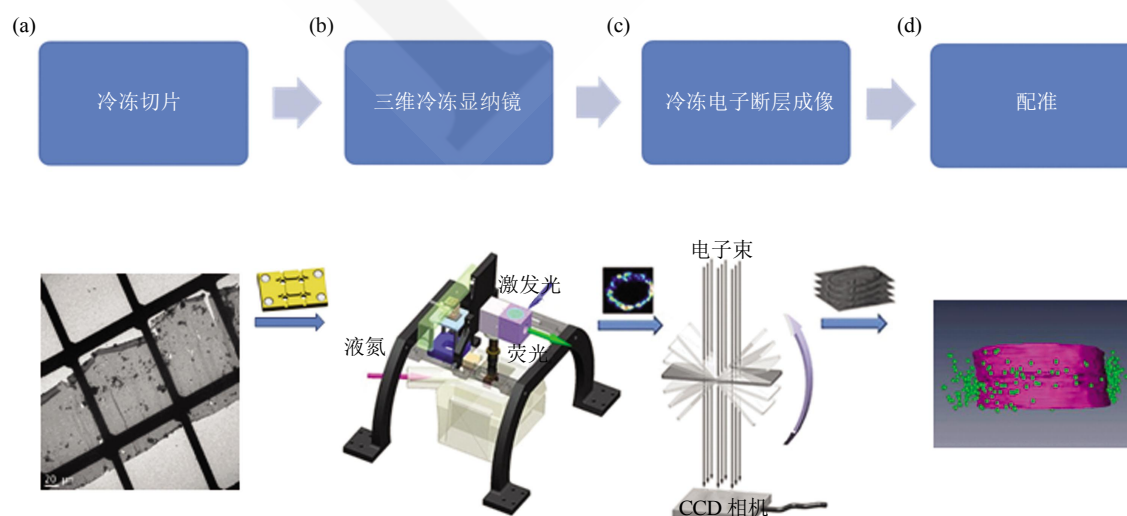


Fig. 1 Workflow of csCLEM

图 1 冷冻超分辨光电融合成像技术流程图

(a) 生物样品经高压冷冻后进行冷冻切片, 并固定在铺有支撑膜的载网上. (b) 样品在低温下传输至冷冻荧光显微系统中进行三维单分子定位超分辨成像. (c) 样品传输至冷冻电镜中进行电子断层三维成像. (d) 将光镜和电镜三维图像进行匹配与重叠, 获得光电融合图像.

低温下所发的光子数比常温下多出数 10 倍, 把成像定位精度提高到 10 nm 以内。

2.3.3 冷冻光电融合成像技术的发展

冷冻超分辨光电融合成像技术是一项新兴的技术, 目前还具有很大的提升与发展空间, 主要体现在以下三个方面。a. 冷冻条件下荧光分子发光的特性尚无系统性研究, 为达到冷冻条件下更高的定位精度, 荧光分子的选择、结构设计、针对冷冻环境的优化都还有大量工作需要开展。b. 低温超分辨荧光成像需要一套为其量身订造的低温光学成像系统来保证定位精度, 成像冷台要满足防止冰晶污染、防止激光照射下样品升温、保持超高机械与温度稳定性、便捷的低温样品转移等苛刻条件, 而目前市场上还没有专用于超分辨成像的商业化冷台, 因此相关科研仪器的开发同样大有可为。c. 冷冻样品从光镜到电镜中的转移目前仍通过手动操作, 转移通量不高, 操作步骤复杂, 转移过程易造成样品的破坏和污染, 这也是制约冷冻光电融合成像技术广泛推广的一个重要瓶颈。因此开发一套同时兼容冷冻光镜与电镜的自动化样品转移系统可大大降低光电联合成像的实现难度和技术门槛, 为该技术进入更多的实验室服务生命科学研究铺平道路。

3 结论与展望

冷冻超分辨光电融合成像技术通过将两种诺奖成像技术有机地结合在一起, 成为一种新的研究细胞生物学和原位结构生物学的成像技术, 为相关领域的发展带来了新的机遇。由于技术流程中存在冷冻超分辨成像的条件苛刻, 冷冻样品转移的便捷性较差、原位样品制备的通量较低等问题尚未完全解决, 目前该技术还存在一些挑战。这个新兴技术的发展正逢其时, 将给生命科学带来越来越多的惊喜。

参 考 文 献

- [1] Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, *et al.* Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science*, 2006, **313**(5793): 1642–1645
- [2] Rust M J, Bates M, Zhuang X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nature Methods*, 2006, **3**(10): 793–796
- [3] Hess S T, Girirajan T P, Mason M D. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy. *Biophys Journal*, 2006, **91**(11): 4258–4272
- [4] Abbe E. Beitrage zur theori des mikroskops und der mikroskopischen wahrnehmung. *Archiv Fuer Mikroskopische Anatomy*, 1873, **9**: 413–418
- [5] Huang B, Wang W, Bates M, *et al.* Three-dimensional super-resolution imaging by stochastic optical reconstruction microscopy. *Science*, 2008, **319**(5864): 810–813
- [6] Bates M, Huang B, Dempsey G T, *et al.* Multicolor super-resolution imaging with photo-switchable fluorescent Probes. *Science*, 2007, **317**(5845): 1749–1753
- [7] Xu K, Zhong G, Zhuang X. Actin, spectrin, and associated proteins form a periodic cytoskeletal structure in axons. *Science*, 2013, **339**(6118): 452–456
- [8] Szymborska A, De Marco A, Daigle N, *et al.* Nuclear pore scaffold structure analyzed by super-resolution microscopy and particle averaging. *Science*, 2013, **341**(6146): 655–658
- [9] Betzig E. Nobel lecture: single molecules, cells, and super-resolution optics. *Rev Mod Phys*, 2015, **87**: 1153–1168
- [10] Dubochet J. Cryo-EM—the first thirty years. *J Microsc*, 2012, **245**(3): 221–224
- [11] Bai X C, McMullan G, Scheres S H W. How cryo-EM is revolutionizing structural biology. *Trends Biochem Sci*, 2015, **40**(1): 49–57
- [12] Watanabe S, Punge A, Hollopeter G, *et al.* Protein localization in electron micrographs using fluorescence nanoscopy. *Nature Methods*, 2011, **8**(1): 80–84
- [13] Chang Y-W, Chen S, Tocheva E I, *et al.* Correlated cryogenic photoactivated localization microscopy and cryo-electron tomography. *Nat Methods*, 2014, **11**(7): 737–739
- [14] Liu B, Xue Y, Zhao W, *et al.* Three-dimensional super-resolution protein localization correlated with vitrified cellular context. *Sci Rep*, 2015, **5**: 13017

Cryogenic Super-resolution Correlative Light and Electron Microscopy (csCLEM): New Challenges and New Opportunities*

LI Wei-Xing³⁾, GU Lu-Sheng³⁾, XU Xiao-Jun⁴⁾, XUE Yan-Hong¹⁾, JI Wei^{2,3)}, XU Tao^{1,2,3,4)**}

⁽¹⁾ National Laboratory of Biomacromolecules, CAS Center for Excellence in Biomacromolecules, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

²⁾ University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;

³⁾ Center for Biological Instrument Development, Core Facility for Protein Research, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

⁴⁾ College of Life Science and Technology, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430074, China)

Abstract Cryogenic super-resolution correlative light and electron microscopy (csCLEM) has been rapidly developed in recent years. This imaging methodology combines the specific labeling of fluorescence microscopy and the ultra-high resolution of electron microscopy, providing a new tool for resolving cellular structures *in situ*. It has the potential to become the next generation of imaging method. In this article, csCLEM was reviewed based on its historical background, application fields, development prospects, etc.

Key words super-resolution imaging, cryo electron microscopy, correlative light and electron microscopy, *in situ*

DOI: 10.16476/j.pibb.2018.0197

* This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (31127901).

**Corresponding author.

Tel: 86-10-64888524, E-mail: xutao@ibp.ac.cn

Received: July 16, 2018 Accepted: August 3, 2018