

一种组织样品原位电子断层成像技术的 冷冻含水切片样品制备方法

张建国

(中国科学院 生物物理研究所 蛋白质科学研究平台, 北京, 100101)

摘要: 低温电子断层成像 (cryo-ET) 技术是发展结构生物学和细胞生物学研究的重要技术。该技术可以得到更真实、天然的细胞内部三维结构以及蛋白质大分子的原位结构信息, 是蛋白质组学研究的重要辅助手段, 是结构生物学的重要的研究手段。现有的冷冻切片制备技术, 存在诸多问题 (样品的压缩、断裂等), 严重影响了该研究领域的发展。本项目基于已开发的聚焦离子束法制备单细胞样品冷冻含水切片技术的工作基础上, 拟进一步研发适用范围更广、制备难度更大、更有科学意义的组织样品高质量冷冻含水切片技术。研究内容: (1) 建立一套冷冻含水组织样品制备实验方法以及相关配套硬件装置; (2) 对制备出的样品进行电子断层成像, 并对其进行评价; (3) 利用建立的技术研究皮肤组织细胞桥粒的钙黏着蛋白排列的三维空间结构。该项目的完成可以解决 cryo-ET 技术在结构生物学和细胞生物学在原位结构解析中的瓶颈问题, 进而推动学科的发展。

关键词: 电子断层成像; 三维重建; 聚焦离子束; 冷冻含水切片; 组织样品

1 专业技术成果介绍

冷冻电子断层成像技术 (cryo-electron tomography, cryo-ET) 是一项重要的冷冻电镜技术, 可以获得细胞和组织样品原位三维高分辨率超微结构、生物大分子的原位结构信息以及蛋白质机器原位相互作用信息。该技术被认为是分子生物学和细胞生物学联结的桥梁, 被称为“可视化蛋白质组学”。然而该技术要求样品的厚度必须在 300nm 以下, 获取高分辨率信息则需要更薄的样品 (150nm 以下), 但是大多数生物样品厚度都在数微米以上, 无法直接应用该技术进行研究。此外, 为了研究生物组织样品更接近生理状态的结构, 通常需要利用高压冷冻技术对生物组织样品进行冷冻固定, 但是高压冷冻后的样品厚度一般都在 100 μ m 以上, 如何制备出适合冷冻电子断层成像技术研究的高质量的生物组织样品切片是原位结构生物学领域面临的一个重要技术问题。

本项技术研究基于最新的冷冻聚焦离子束技术 (cryo-FIB), 设计和研制了一套冷冻传输硬件, 有效将颤切片技术、高压冷冻技术、冷冻修块技术和冷冻聚焦离子束减薄技术结

合起来,创新冷冻聚焦离子束切割工艺,形成了一套完整高效的组织样品冷冻含水切片制备技术流程 VHUT-cryo-FIB。利用该技术流程可以高效制备出厚度在 150-300nm 之间的组织样品冷冻含水切片。本研究中应用 VHUT-cryo-FIB 方法分别制备了菠菜叶片、小鼠骨骼肌、肝脏和心肌的冷冻含水切片,并成功解析了菠菜胞质核糖体 (34 Å) (EMD-1780)和小鼠肝脏胞质核糖体 (18 Å) (EMD-10181)的原位三维结构(图 1)。这些结果证明 VHUT-cryo-FIB 方法可以广泛应用于各种生物组织样品的冷冻含水切片制备,为原位结构生物学研究提供有力的样品制备方法。

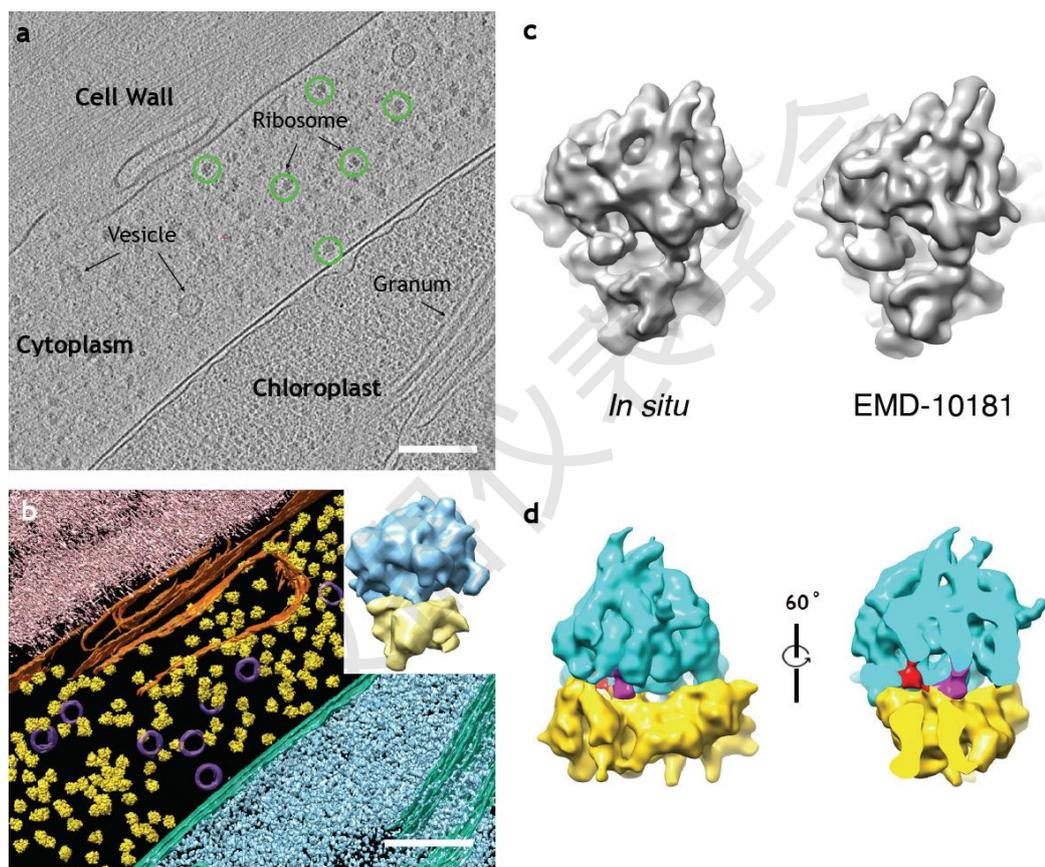


图 1 Cryo-FIB 方法制备的冷冻含水切片样品, Cryo-ET 方法解析菠菜叶片和小鼠肝样品中核糖体三维结构。

a: 菠菜叶片重构后的细胞内部结构, 其超微结构包括细胞壁、细胞质、叶绿体、囊泡、核糖体和基粒; b: 三维渲染后的图 a, 黄色,核糖体;淡粉色, 细胞壁;橙色,细胞膜;紫色,囊泡;绿色,叶绿体膜;青色, 叶绿体基质。菠菜核糖体的原位结构, 大亚基蓝色的, 小亚基黄色; c: Subtomogram average 得到小鼠肝脏核糖体的原位结构(左), 与通过单粒子重构得到小鼠胞质核糖体密度图(右); d: 小鼠肝脏核糖体原位结构密度图, 大亚基和小亚基分别为蓝色和黄色。红色(P/E 位点)和紫色(A/P 位点)显示了两个 tRNAs。Scale bar:150nm。

2 专业技术人才介绍

2.1 个人简介

张建国 中国科学院生物物理研究所，蛋白质科学研究平台，高级工程师。

2012年9月在日本高知工科大学获得博士学位，在博士期间就主要研究离子束与材料的相互作用。

2012年10月-2015年12月生物物理研究所工程师，2016年10月-今生物物理研究所高级工程师，2019年短期在瑞典 Umea 大学学习研究。

主要负责双束扫描电镜的使用工作，和基于双束扫描电镜相关的体电子显微学相关应用工作，积累了丰富的仪器使用和管理经验。长期从事低温电镜电子断层成像技术（cryo-electron tomography）样品制备方面的研究---聚焦离子束法制备生物样品冷冻含水切片的方法学研究工作。2016年国内首次建立了细胞样品冷冻含水切片样品制备方法和相关的载网和转移工具的设计，2021年建立了 VHUT-cryo-FIB 方法制备组织样品冷冻含水切片制备方法和相关的 carrier 的硬件设计。在生物物理研究所建立了细胞、晶体和组织样品等不同尺度和种类样品的冷冻含水切片样品制备技术，并指导了多位研究人员和学生应用该技术展开相关研究工作。工作期间，作为第一作者在 Journal of Structural Biology 发表 2 篇方法学文章，（Journal of Structural Biology 194 (2016) 218–223），（Journal of Structural Biology 213 (2021) 107763），第一发明人申请发明专利 2 项（ZL201510010319.7, ZL201621139538.1），主持了国家自然科学基金面上基金 1 项《利用聚焦离子束技术制备低温电镜组织样品冷冻含水切片的方法研究及应用》、主持青年基金项目 1 项《利用聚焦离子束技术制备低温电镜冷冻含水切片方法的研究》和主持中科院仪器功能开发项目 1 项《基于荧光辅助定位的冷冻电镜离子减薄样品制备系统研制》。

2.2 专业技术研究方向

常温双束扫描电镜、低温双束扫描电镜、低温透射电镜。

3 承担科技项目及代表论著

负责承担项目：

(1)《利用聚焦离子束技术制备低温电镜组织样品冷冻含水切片的方法研究及应用》国家自然科学基金面上基金项目 2018.01-2021.12

(2)《基于荧光辅助定位的冷冻电镜离子减薄样品制备系统研制》中科院仪器功能开发项目 2017.09-2021.09

(3)《利用聚焦离子束技术制备低温电镜冷冻含水切片方法的研究》国家自然科学基金青年基金项目 2015.01-2017.12

代表论著:

- [1] **Jianguo Zhang***, Danyang Zhang,* Lei Sun*, Gang Ji, Xiaojun Huang, Tongxin Niu, Fei Sun*; VHUT-cryo-FIB, a method to fabricate frozen hydrated lamellae from tissue specimens for in situ cryo-electron tomography, *Journal of Structural Biology* 213(2021)107763
- [2] **Jianguo Zhang**, Gang Ji, Xiaojun Huang, Wei Xu, Fei Sun, An improved cryo-FIB method for fabrication of frozen hydrated lamella, *Journal of Structural Biology*,194(2016)218–223
- [3] Xiaomin Li, Hongli Feng, **Jianguo Zhang**, Lei Sun, Ping Zhu, The Analysis of Chromatin Fiber in Hela Cell with Electron Tomography, *Biophysics Reports*, 1(2015) 51-60
- [4] Yang Shi, Li Wang, **Jianguo Zhang**, Yujia Zhai, Fei Sun, Determining the target protein localization in 3D using the combination of FIB-SEM and APEX2, *Biophysics Reports*, 2017
- [5] Wenbo Li, Wei Ding, Gang Ji, Li Wang, Jianguo Zhang, Fei Sun, Three-dimensional visualization of arsenic stimulated mouse liver sinusoidal by FIB-SEM approach, *Protein & Cell*,7 (2016) 227-232

4 获奖及荣誉

第四届全国冷冻电子显微学与结构生物学专题研讨会最佳墙报奖 (The Fourth National Symposium of CryoEM and Structural Biology (NSCEM2015)) <fabrication of cryo-hydrated section by FIB method>, 2015.06.08-11.