

冷冻结构光照明荧光显微成像系统 HOPE-SIM 的自主研发

李硕果¹, 贾星¹, 牛彤欣¹, 张小云¹, 孙飞¹, 季刚¹

(1. 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, 北京 100101)

摘要: 聚焦离子束减薄制备冷冻含水切片样品, 可用于生物原位结构解析研究, 其中靶向定位切割精度是限制该技术应用的主要瓶颈之一。为了攻克这一难题, 自主研发了基于结构光照明的冷冻光电关联成像系统 HOPE-SIM, 结合三维结构光照明成像技术和研制物镜内置式高真空腔室, 实现了优于 200nm 的冷冻光学成像横向分辨率, 旨在通过提高冷冻荧光定位精度来实现高效的冷冻聚焦离子束减薄流程。利用自主编写的光电关联成像软件 3D-View, 基于 HOPE-SIM 的冷冻光电关联成像定位精度可以达到 110 nm。实验成功地利用 HOPE-SIM 系统高效制备了包含线粒体、中心体和疱疹病毒的冷冻细胞切片。

关键词: 冷冻结构光照明; 聚焦离子束; 电子断层扫描成像; 光电关联成像; 高真空光学冷台

Research and development of HOPE-SIM, a cryo-structured illumination fluorescence microscopy system

Shuoguo Li¹, Xing Jia¹, Tongxin Niu¹, Xiaoyun Zhang¹, Fei Sun¹, Gang Ji¹

(1. Center for Biological Imaging, Core Facilities for Protein Science, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101)

Abstract: Cryo-focused ion beam (cryo-FIB) milling technology has been developed for the fabrication of cryo-lamella of frozen native specimens for study by in situ cryo-electron tomography (cryo-ET). However, the precision of the target of interest is still one of the major bottlenecks limiting application. Here, we have developed a cryo-correlative light and electron microscopy (cryo-CLEM) system named HOPE-SIM by incorporating a 3D structured illumination fluorescence microscopy (SIM) system and an upgraded high-vacuum stage to achieve efficiently targeted cryo-FIB. With the 3D super resolution of cryo-SIM as well as our cryo-CLEM software, 3D-View, the correlation precision of targeting region of interest can reach to 110 nm enough for the subsequent cryo-lamella fabrication. We have successfully utilized the HOPE-SIM system to prepare cryo-lamellae targeting mitochondria, centrosomes of HeLa cells

and herpesvirus assembly compartment of infected BHK-21 cells, which suggests the high potency of the HOPE-SIM system for future in situ cryo-ET workflows.

Keywords : Cryo-structured illumination microscopy; Cryo-focused ion beam; Cryo-electron tomography; Correlative light and electron microscopy; High-vacuum optical platform

1 研究背景

揭示三维细胞超微结构是理解生命的重要步骤，冷冻电子断层成像技术（cryo-Electron Tomography, cryo-ET），通过对冷冻固定在近生理状态下的生物样品进行冷冻透射电镜低剂量模式系列倾转成像，解析细胞内亚细胞结构乃至生物大分子复合体的高分辨率三维结构¹⁻³，有助于我们理解生命活动背后的分子机制。得益于冷冻电镜的技术突破，Cryo-ET技术近几年在原位结构学的应用研究中也取得了大量重要进展，德国马普所的W.BAUMEISTER研究组利用该技术研究了海拉细胞核周物质的分子组成⁴。随后，衣藻26S蛋白酶体⁵，三蛋白介导的ER折叠曲率调控⁶，胞内多膜复合结构⁷，细胞骨架的分子结构及其与细胞内微管曲率的关系⁸，藻类核孔复合体的原位结构⁹等细胞原位结构解析领域的相关研究成果也陆续发表。2021年，Peng Xu等人解析了染色质纤维冷冻电子断层原位超微结构¹⁰，Victoria A. Trinkaus等人解析了神经元 α -核蛋白及其周围复合物的冷冻电镜原位三维结构¹¹。可以说，基于冷冻电子断层成像技术的原位结构生物学研究已经逐步建立起了近生理状态下，亚细胞功能研究与生物大分子复合体的分子机制阐明之间的连接桥梁。

然而，受限于电子平均自由程，透射电镜对生物样品的穿透深度一般只能达到300-500nm^{12,13}，而为了获得较好成像衬度和完成高角度倾转成像，cryo-ET成像技术一般要求样品的厚度必须在200nm以下，这远远小于实验生物样品的原本厚度。冷冻聚焦离子束加工(cryo-Focused ion beam, cryo-FIB)技术¹⁴⁻¹⁶，借助高速离子束对生物样品的切削，可以精准加工出厚度约200nm的冷冻含水切片样品，用于后续冷冻电子断层成像的数据收集。当前，限制冷冻电子断层扫描成像技术应用的主要瓶颈是如何在冷冻环境下定位和识别感兴趣的目标区域，并指导聚焦离子束精准靶向减薄包含目标区域的薄切片。为此，冷冻光电关联成像(cryo-CLEM)技术被提出¹⁷，利用荧光标记导航冷冻聚焦离子束减薄制备冷冻含水切片的冷冻电子断层扫描成像。冷冻光电关联成像技术流程通常需要先实现冷冻荧光显微镜成像(cryo-FM)，然后在冷冻荧光显微镜和冷冻扫描电子显微镜(cryo-SEM)图像之间通过关联软件实现图像配准，用于导航冷冻聚焦离子束减薄¹⁸⁻²⁰。虽然已经有不少研发成果通过

开发冷冻宽场荧光显微镜或高分辨率共聚焦显微镜来实现这一技术流程,但是光电关联成像精度和成功率依然严重受制于冷冻荧光显微镜的分辨率的冷冻传输系统的限制,特别是冷冻样品传输过程中容易引入样品变形、升温以及冰污染等不利因素,这些都会大大降低实验的成功率。生物成像中心早期自主研发的高真空光学冷台(HOPE)²¹,借助冷冻透射电镜样品杆实现了冷冻光镜成像以及冷冻传输,可以有效减少样品变形和冰污染情况,然而基于宽场成像模式的HOPE系统光学分辨率仅能达到约400nm,难以满足高精度关联定位的需求。

结构光照明超分辨成像技术(SIM)^{22,23}通过引入条纹照明光,可以获得超出衍射极限的高分辨率信息,从而使得荧光成像的分辨率提高了近一倍。与其他超分辨显微成像技术相比,如光激活定位显微镜(PALM)^{20,24}等,SIM使用相对低照明功率(10–100 mW/cm²),并且不需要特殊的荧光团,同时低光照功率最小限度地降低了对样品的加热效应。因此,基于HOPE系统,通过引入结构光成像技术,将冷冻宽场荧光显微成像系统HOPE升级到3D-SIM系统,通过提高XYZ三维的荧光成像分辨率,进一步提高了光电关联对齐精度,用以指导冷冻聚焦离子束精准靶向减薄目标区域。同时,还升级了高真空腔室系统,以改善腔室内的真空度,进一步降低冷冻光镜成像过程中的冷冻样品表面冰的生长速度,有效保护了样品的质量。同步开发了一个三维光电关联对齐软件3D-View,以实现三维冷冻结构光照明图像和冷冻聚焦离子束图像之间基于对齐标记物的精准匹配,用于精准导航冷冻聚焦离子束减薄。

2 技术原理及系统设计

2.1 结构光照明成像技术原理

结构光照明成像技术通过在实空间对物体加载(照射)满足余弦函数分布的结构光,实现倒空间对衍射极限外高频信息的搬运,使得光学显微成像系统可以收集到超过衍射极限的高频信息。随后,通过移频复原高频信息,即可获得突破衍射极限的超分辨结构图像。

Gustafsson MG率先提出了结构光照明成像技术的概念,并发表了其在细胞生物学中的应用以及三维结构光照明超分辨成像技术²⁵,通过线性结构光照明成像技术将基于1.49NA的油镜的宽场荧光显微镜横向空间分辨率提升至100nm左右,纵向分辨率提升到了280nm。

2.2 冷冻结构光照明成像系统HOPE-SIM的设计

在前期研发的基于高真空冷台的光电关联成像系统HOPE的基础上,重新设计了开发了大腔室高真空冷台,并将其安装在商用落射荧光显微镜(型号IX73,日本奥林巴斯公司)上。大腔室冷台一方面保证了腔室内真空度的稳定,另一方面也提供了足够的空间可以容纳一个光学物镜。本项目选择了0.9NA、工作距离2mm的物镜(尼康CFI TU Plan Apo EPI 100×,

NA / WD: 0.9 / 2 mm)。此外，大腔室高真空冷台还带有预泵装置的真空传输系统（TPS），并且适配多种不同类型的冷冻样品杆（cryo-holder）。最重要的是，大腔室还可以容纳一个内置的防污染器系统（ACS 和 cryo-box），这对于冷冻荧光成像过程中对冷冻样品的保护是非常有帮助的。大腔室高真空冷台的设计图见图 1 所示，实物图见图 2 所示。

最后，为倒置荧光显微成像系统引入了三维结构光照明光路。结构光照明条纹由空间光调制器（SLM, QXGA-3DM, Forth Dimension Displays）产生（见图 1），系统配备了三个激光通道（561 nm / 488 nm / 405 nm）的激光器，所得荧光信号由物镜收集并记录在高灵敏度 sCMOS 相机（Prime 95B, Photometrics）上。

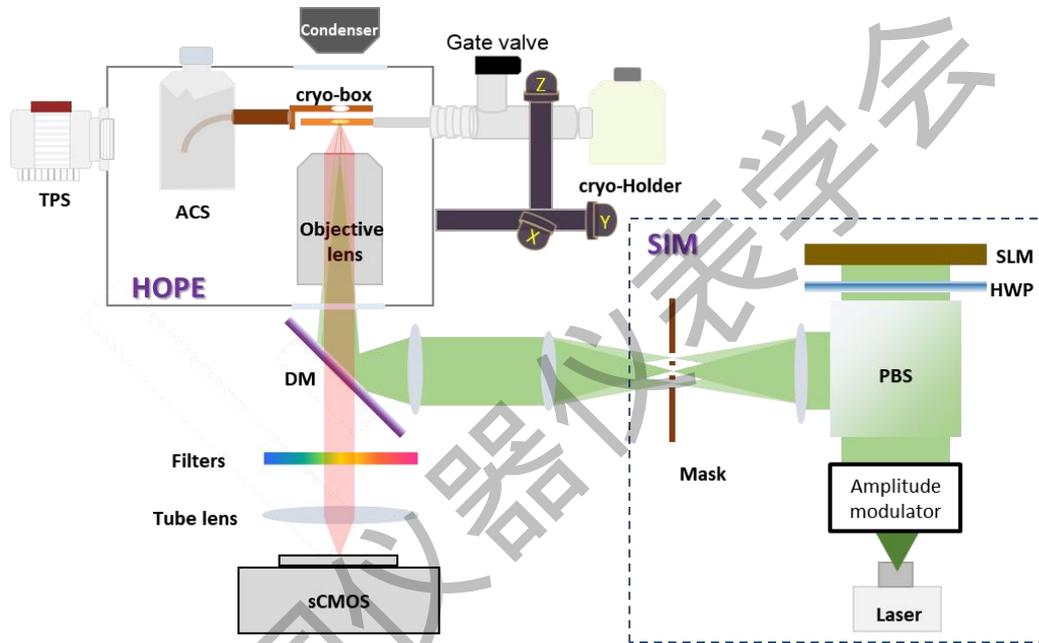


图 1 冷冻结构光照明成像系统 HOPE-SIM 设计原理图

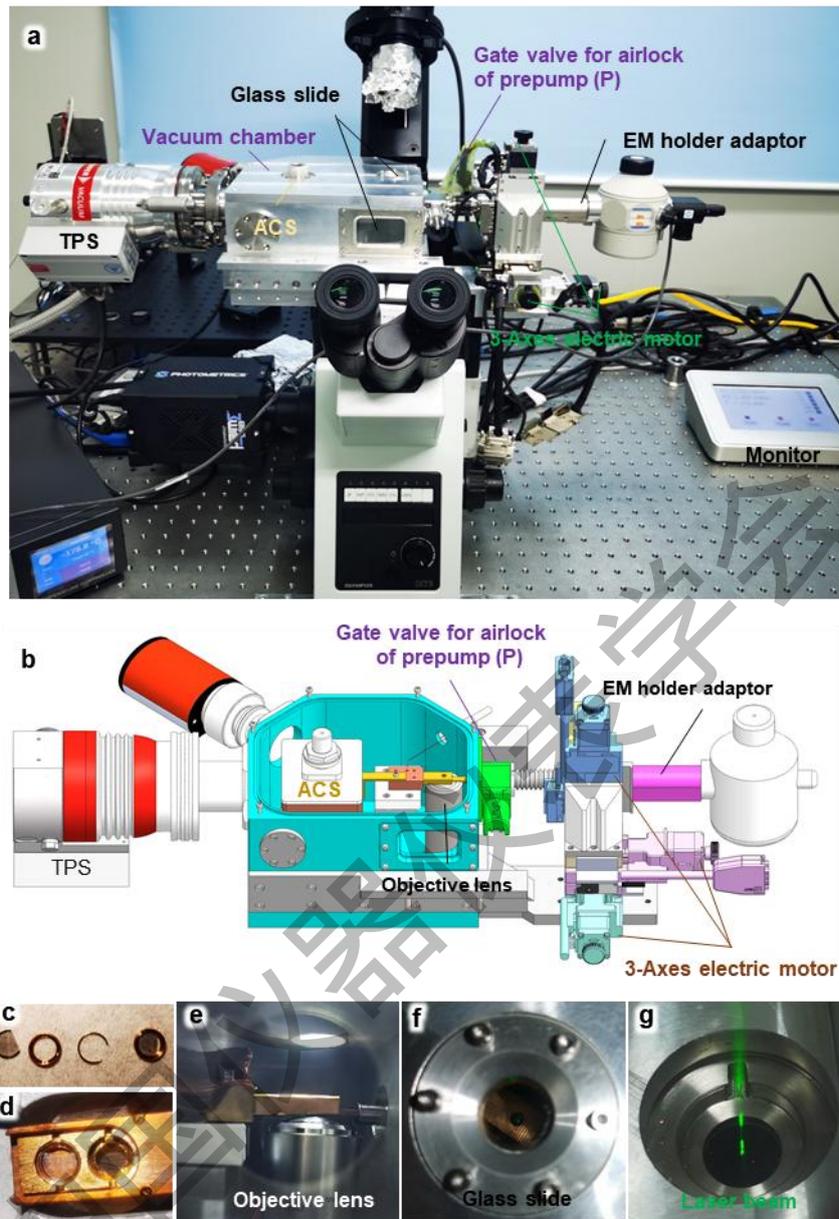


图2 冷冻结构光照明成像系统 HOPE-SIM

- (a) 装有 HOPE-SIM 的奥林巴斯 IX73 倒置显微镜的真实照片。TPS，真空泵系统;ACS，防污染系统。
- (b) HOPE-SIM 真空腔室的剖面图。(c) HOPE-SIM 系统中使用的 D 形载网和 AutoGrid。(d) 固定有载网的 AutoGrid 照片。(e) 通过观察窗口在工作条件下实时观察物镜和 ACS 的窗口。(f) HOPE-SIM 系统的顶视图。(g) HOPE-SIM 系统的底视图。

2.3 三维光电关联定位软件 3D-View

基于 HOPE-SIM 系统²⁶的高精度荧光导航指导聚焦离子束减薄技术流程包括如下步骤：
 一、细胞在电镜载网上培养，并进行荧光标记；二、在细胞表面加入对齐标记物（荧光珠），通过投入式快速冷冻技术将电镜载网上的细胞玻璃态化；三、多通道三维冷冻结构光照明荧

光成像，获得荧光标记在细胞内的高精度三维定位信息，并记录下对应细胞的位置坐标；四、转移进冷冻双束扫描电镜中，获得目标细胞的 cryo-FIB 二维图像；五、进行光镜电镜图像的关联配准；六、利用 cryo-FIB 减薄目标区域至 200nm，获得包含目标结构的冷冻含水切片；七：对包含目标结构的冷冻含水切片进行 cryo-ET 数据采集及重构。

为了实现三维结构光照明图像与聚焦离子束二维图像的精准配准，项目组基于 LabView 编写了光-电关联对齐软件 3D-View（图 3），借助对齐标记物（荧光珠），利用最小二乘法求解空间欧拉角变换的算法，将三维冷冻结构光照明数据与二维冷冻 FIB 图像进行配准，使相关关联偏差值最小化。首先，从 cryo-SIM 和 cryo-FIB 图像中手动选择目标细胞周围清晰可见的荧光微球作为对齐标记物，所选荧光微球的分布应位于细胞的周围，以获得更好的相关精度。首先，我们需要手动确定光镜和 FIB 图像中，对应微球的中心。为了进一步优化两个相关图像之间的相关性，可以根据荧光微球的形状手动调整荧光微球的 Z 高度。

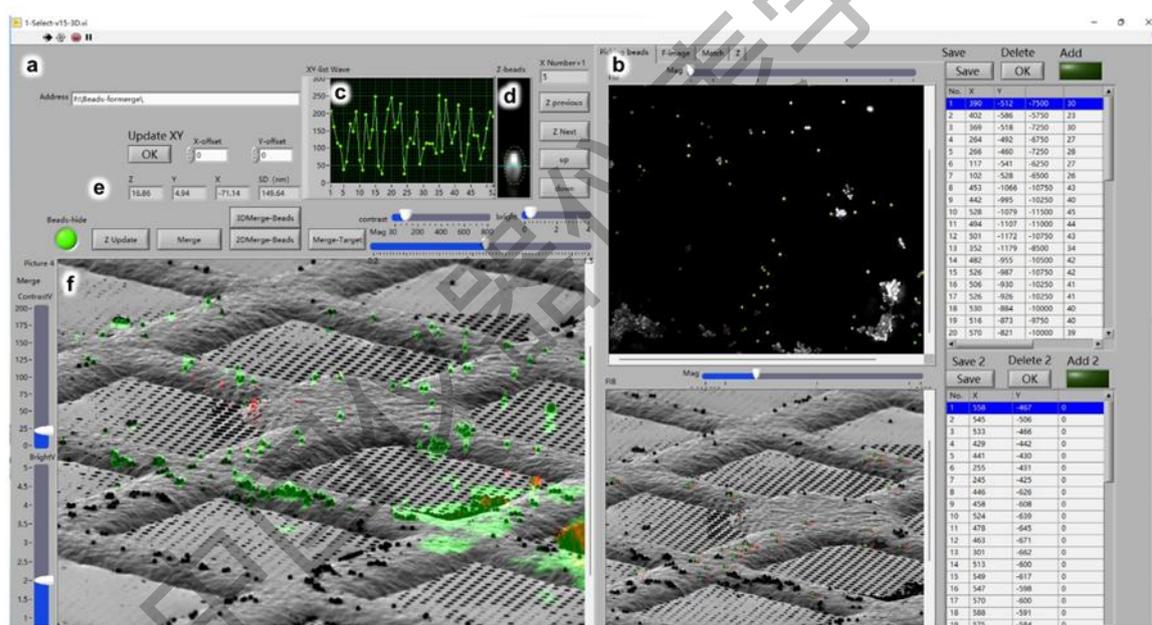


图 3 三维光电关联软件 3D-View 界面

3D View 软件的主页包含：(a) 用于加载 cryo-FM 和 cryo-FIB 图像的地址栏，(b) 对齐标记物选区；(c) 配准偏差显示栏；(d) 对齐标记物 Z 高度调整区；(e) 配准偏差结果显示栏；(f) 最终光电关联配准结果显示区。

最终，先通过荧光微珠实现三维冷冻结构光照明荧光图像与二维 cryo-FIB 图像精准匹配，然后再将目标物，例如线粒体红色荧光信号，关联到 FIB 图像中，从而获得荧光标记的目标结构在细胞内的精准定位信息（图 3f）。

3 技术流程

3.1 运用 HOPE-SIM 技术解析疱疹病毒原位结构

疱疹病毒科是一个大家族，由 α 、 β 和 γ 疱疹病毒组成。鼠丙种疱疹病毒 68 (MHV-68) 与人丙种疱疹病毒一样，可以对源自哺乳动物物种的成纤维细胞或上皮细胞系产生感染，因此是研究与人类丙种疱疹病毒感染相关的致病机制的模型系统。疱疹病毒成熟包括四个阶段：衣壳在细胞核中形成，穿过核膜完成初级囊膜化，在细胞质中进行二次囊膜化，以及从宿主细胞中向外释放²⁷。使用常规树脂包埋的方式研究疱疹病毒包装释放机制，往往会应为电镜样品制备过程中的固定、脱水等过程，造成结构的破坏，因此原位捕获疱疹病毒并解析三维结构，对于我们正确理解病毒包装释放机制至关重要。

基于结构光照明和真空冷台的光-电关联成像技术 HOPE-SIM 精准定位了感染疱疹病毒 MHV-68 的 BHK-21 细胞的病毒包装工厂 (0.2-2 微米)，并借助 cryo-FIB 高效制备了包含目标物的冷冻含水切片，用于后续 cryo-ET 数据采集与重构(图 4)。首先，荧光蛋白 mCherry (红色) 标记 MHV-68 的衣壳蛋白 ORF65，去感染 BHK-21 细胞。细胞被培养在冷冻电镜坐标载网上并进行快速冷冻，获得冷冻样品 (图 4a)。其次，使用 1 μm 蓝色微球作为基准标记 (图 4 中绿色球状结构)，在 3D-View 软件实现三维冷冻光电关联成像，用于指导聚焦离子束对目标区域进行精准减薄 (图 4d-f)，获得包含目标结构的冷冻含水切片，用于后续冷冻电子断层数据采集。

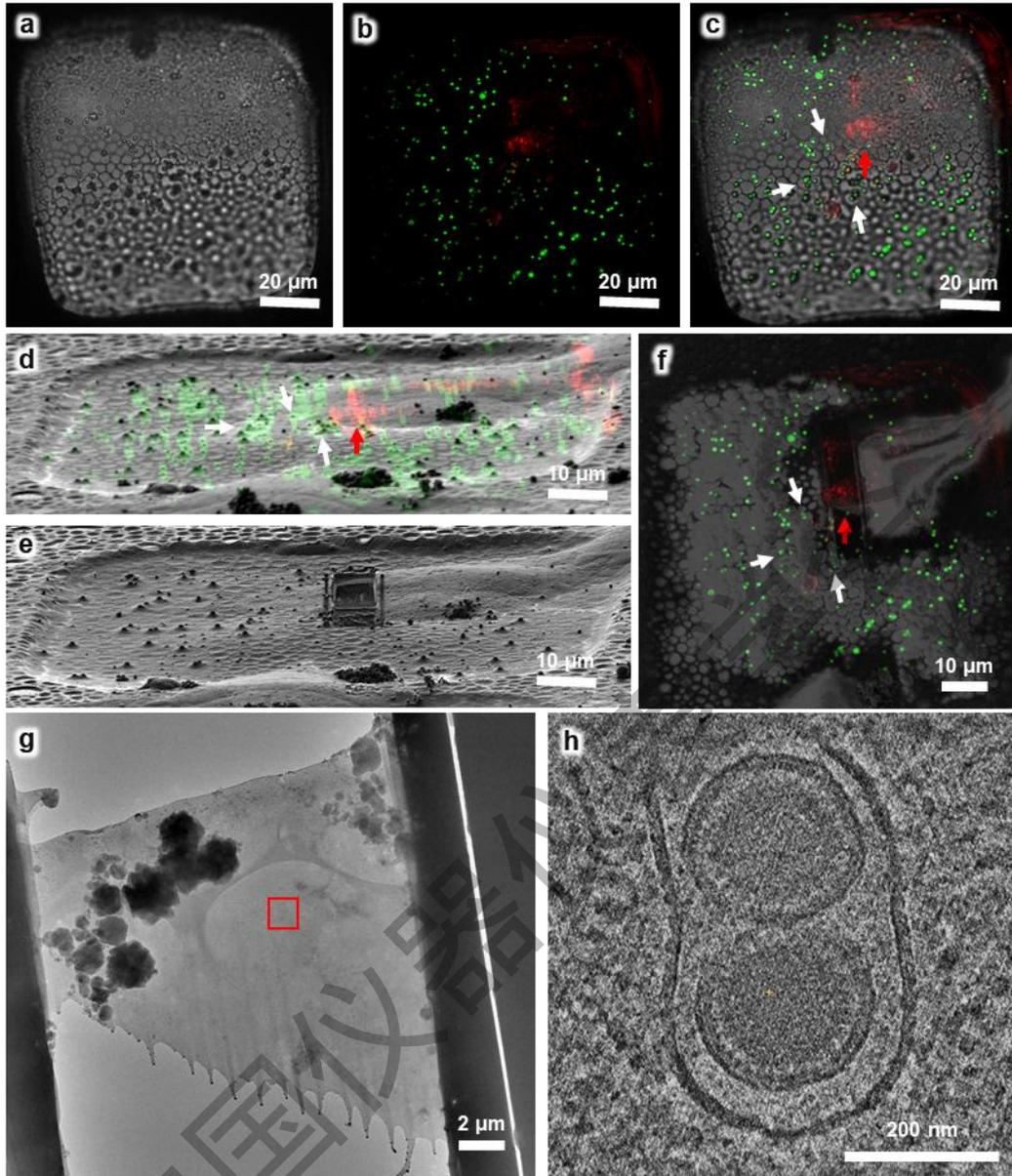


图 4 基于 HOPE-SIM 冷冻光电联技术捕获宿主细胞中的 MHV-68 病毒颗粒

(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) (f) 制备的冷冻含水切片的冷冻透射电镜显微照片 (3600X)；(h)

冷冻断层扫描成像，放大倍率为 64000X，显示了被捕获的病毒颗粒

3.2 运用 HOPE-SIM 技术解析疱疹病毒原位结构

制备表达 mCherry 标记的 pericentrin 蛋白的 HeLa 细胞，这是位于 PCM 区的中心体的一个组成部分²⁸。基于 HOPE-SIM 技术的高精度冷冻光电方法，对荧光标记中心的海拉细胞进行了冷冻光电关联成像，并成功捕获了目标中心体 (图 5)。

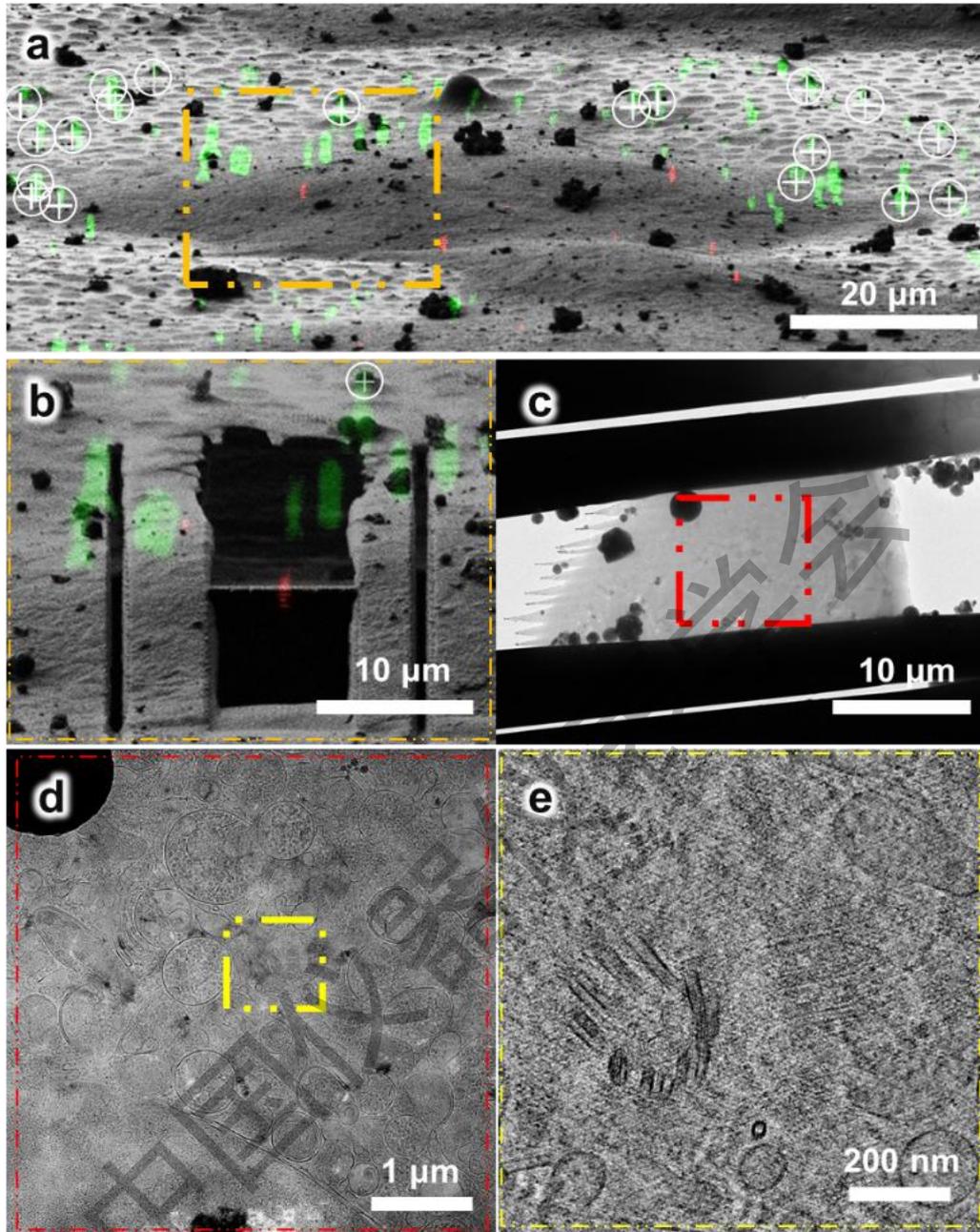


图5 基于 HOPE-SIM 技术流程精准捕获海拉细胞内红色荧光标记的中心体

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。

4 讨论

本研究针对限制冷冻电子断层技术在样品制备方面面临的实验效率低、定位精度低等技术瓶颈，自主研发了基于结构光照明和真空冷台的冷冻光电关联成像系统 HOPE-SIM，在此

基础上成功制备了包含感染鼠疱疹病毒和包含中心体的含水切片样品,通过冷冻电子断层原位结构分析图像处理流程和软件解析了疱疹病毒和人源中心体的原位结构特征。

HOPE-SIM 系统通过引入结构光照明技术, 获得了横向优于 200 纳米的冷冻光学分辨率, 配套开发的 3D-View 软件实现冷冻结构光照明荧光图像与冷冻聚焦离子束图像的关联, 实现了优于 110 纳米的光镜-聚焦离子束关联对齐精度。借助 HOPE-SIM 高分辨率冷冻光电关联成像系统, 项目组以感染鼠疱疹病毒的细胞作为测试样品, 制备了包含疱疹病毒颗粒的冷冻含水切片, 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囊膜组装位点的原位结构, 为原位结构解析研究提供了一种非常成功的解决方案, 在未来的原位结构生物学中有巨大应用潜力。

参考文献:

- [1] Beck, M. & Baumeister, W. Cryo-Electron Tomography: Can it Reveal the Molecular Sociology of Cells in Atomic Detail[J]. *Trends Cell Biol*, 2016, 26(11):825-837.
- [2] Lučić, V., Rigort, A. & Baumeister, W. Cryo-electron tomography: the challenge of doing structural biology in situ[J]. *J Cell Biol*, 2013, 202(3):407-419.
- [3] Steven, A. C. & Aebi, U. The next ice age: cryo-electron tomography of intact cells[J]. *Trends Cell Biol*, 2003, 13(3):107-110.
- [4] Mahamid J, Pfeffer S, Schaffer M, et al. Visualizing the molecular sociology at the HeLa cell nuclear periphery[J]. *Science*, 2016, 351(6276):969-972.
- [5] Sakata, E., Eisele, M. R. & Baumeister, W. Molecular and cellular dynamics of the 26S proteasome[J]. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*, 2021, 1869(3):140583.
- [6] Collado J, Kalemánov M, Campelo F, et al. Tricalbin-Mediated Contact Sites Control ER Curvature to Maintain Plasma Membrane Integrity[J]. *Dev Cell*, 2019, 51(4):476-487.e7.
- [7] Martínez-Sánchez A, Kochovski Z, Laugks U, et al. Template-free detection and classification of membrane-bound complexes in cryo-electron tomograms[J]. *Nat Methods*, 2020, 17(2):209-216.
- [8] Chakraborty, S., Mahamid, J. & Baumeister, W. Cryoelectron Tomography Reveals Nanoscale Organization of the Cytoskeleton and Its Relation to Microtubule Curvature Inside Cells[J]. *Structure*, 2020, 28(9):991-1003.e4.
- [9] Mosalaganti S, Kosinski J, Albert S, et al. In situ architecture of the algal nuclear pore

- complex[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1):2361.
- [10] Xu P, Mahamid J, Dombrowski M. et al. Interphase epichromatin: last refuge for the 30-nm chromatin fiber[J]. *Chromosoma*, 2021, 130(2-3):91-102.
- [11] Trinkaus VA, Riera-Tur I, Martínez-Sánchez A, et al. In situ architecture of neuronal α -Synuclein inclusions[J]. *Nat Commun*, 2021, 12(1):2110.
- [12] Sun, F. Orienting the future of bio-macromolecular electron microscopy[J]. *Chinese Physics B*, 2018, 27: 063601.
- [13] Briggs, J. A. G. Structural biology in situ—the potential of subtomogram averaging[J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2013, 23(2):261-267.
- [14] Marko, M., Hsieh, C., Schalek, R. et al. Focused-ion-beam thinning of frozen-hydrated biological specimens for cryo-electron microscopy[J]. *Nat Methods*, 2007, 4(3):215-217.
- [15] Zhang J, Zhang D, Sun L, et al. VHUT-cryo-FIB, a method to fabricate frozen hydrated lamellae from tissue specimens for in situ cryo-electron tomography[J]. *J Struct Biol*, 2021, 213(3):107763
- [16] Hsieh, C., Schmelzer, T., Kishchenko, G. et al. Practical workflow for cryo focused-ion-beam milling of tissues and cells for cryo-TEM tomography[J]. *Journal of Structural Biology*, 2014, 185(1):32-41.
- [17] Arnold J, Mahamid J, Lucic V, et al. Site-Specific Cryo-focused Ion Beam Sample Preparation Guided by 3D Correlative Microscopy[J]. *Biophys J*, 2016, 110(4):860-869.
- [18] De Boer, P., Hoogenboom, J. P. & Giepmans, B. N. G. Correlated light and electron microscopy: ultrastructure lights up[J]. *Nat Methods*, 2015, 12(6):503-513.
- [19] Sartori A, Gatz R, Beck F. et al. Correlative microscopy: Bridging the gap between fluorescence light microscopy and cryo-electron tomography[J]. *J Struct Biol*, 2007, 160(2):135-145.
- [20] Hoffman DP, Shtengel G, Xu CS, et al. Correlative three-dimensional super-resolution and block-face electron microscopy of whole vitreously frozen cells[J]. *Science*, 2020, 367(6475): eaaz5357.
- [21] Li S, Ji G, Shi Y, et al. High-vacuum optical platform for cryo-CLEM (HOPE): A new solution for non-integrated multiscale correlative light and electron microscopy[J]. *J. Struct. Biol*, 2018, 201(1):63-75.

- [22] Kounatidis I, Stanifer ML, Phillips MA, et al. 3D Correlative Cryo-Structured Illumination Fluorescence and Soft X-ray Microscopy Elucidates Reovirus Intracellular Release Pathway[J]. *Cell*, 2020, 182(2):515-530.e17.
- [23] Phillips MA, Harkiolaki M, Susano Pinto DM, et al. CryoSIM: super resolution 3D structured illumination cryogenic fluorescence microscopy for correlated ultra-structural imaging[J]. *Optica.*, 2020, 7(7):802-812.
- [24] Shtengel G, Wang Y, Zhang Z. et al. Imaging cellular ultrastructure by PALM, iPALM, and correlative iPALM-EM[J]. *Methods Cell Biol*, 2014, 123: 273-294.
- [25] Gustafsson MG, Shao L, Carlton PM, et al. Three-dimensional resolution doubling in wide-field fluorescence microscopy by structured illumination [J]. *Biophys J*, 2008, 94(12):4957-4970.
- [26] Li S, Jia X, Niu T, et al. HOPE-SIM, a cryo-structured illumination fluorescence microscopy system for accurately targeted cryo-electron tomography[J]. *Commun Biol*, 2023, 6(1):474.
- [27] Mettenleiter, T. C. Herpesvirus assembly and egress[J]. *J Virol*, 2002, 76(4):1537-1547.
- [28] Gillingham, A. K. & Munro, S. The PACT domain, a conserved centrosomal targeting motif in the coiled-coil proteins AKAP450 and pericentrin[J]. *EMBO Rep*, 2000, 1(6):524-529.