前沿生物医学电子显微技术的发展态势与战略分析

陶长路¹, 张兴², 韩华³, 梁文锡⁴, 赵经纬², 毕国强^{1*}

1. 中国科学技术大学生命科学学院, 合肥微尺度物质科学国家研究中心集成影像中心, 合肥 230027;

2. 浙江大学医学院基础医学系, 浙江大学医学院附属邵逸夫医院-浙江大学医学电镜研究及诊断中心, 浙江大学冷冻电镜中心, 杭州 310058;

3. 中国科学院大学未来技术学院, 中国科学院自动化研究所模式识别国家重点实验室, 北京 100190;

4. 华中科技大学武汉光电国家研究中心, 武汉 430074

* 联系人, E-mail: gqbi@ustc.edu.cn

收稿日期: 2019-06-04; 接受日期: 2019-09-18; 网络版发表日期: 2020-04-20

安徽省自然科学基金(批准号: 1908085QC95)、中国博士后科学基金(项目号: 2018M640590)、中国科学院战略性先导科技专项(B类)(批准号: XDB32030200)、国家自然科学基金(批准号: 31630030, 31621002, 81571170, 81971144)、科技部重大专项(批准号: 2017YFA0505300, 2017YFA0504803, 2017YFA0104900, 2018YFA0507700)、北京市科技计划专项(批准号: Z181100000118002)、中国科学院国际大科学计划培育专项(批准号: 153D31KYSB20170059)、中央高校基本科研业务费项目专项(批准号: 2018XZZX001-13(ZJU), 2017KFXKJC001(HUST))、国家自然科学基金委员会与中国科学院学科发展战略研究合作项目——“生物医学影像发展战略”资助

摘要 电子显微成像技术(简称电镜)因其超高分辨能力, 成为人类认识微观世界的最主要技术手段之一, 并广泛应用于生物医学研究领域. 随着物理、生物、信息等多学科技术的发展和融合, 电子显微镜在分辨率、成像尺度和自动化等多个方面不断取得突破, 特别是冷冻制样技术和直接电子探测相机的发展使得冷冻电镜技术能够直接解析生物大分子的原子分辨率三维结构. 另一方面, 对生命活动过程的研究往往跨越多个时空尺度, 甚至需要追踪生物事件发生的动态过程, 这就要求研究手段在分辨率、原位成像、动态、多尺度、多模态、高特异性和高通量等特性上不断拓展. 针对这些需求, 生物医学电镜及相关技术的主要发展方向包括: (i) 高分辨冷冻电镜技术, 通过更精确的三维重构理论和电子光学成像技术进一步提高信噪比和分辨率, 实现对更大、更小生物分子的原子分辨率结构解析; (ii) 基于冷冻电子断层三维重建的多模态成像技术, 通过更优化的冷冻制样减薄技术、亚区域三维重建技术等, 实现对组织与细胞中蛋白质等大分子复合物的结构与相互作用的原位解析, 并通过与光学成像的动态性与特异性的有效整合, 实现结构与功能研究的结合; (iii) 大尺度三维重建的体电子显微成像技术, 通过优化样品制备、成像及分析, 实现整个流程的高通量系统集成, 从而进行脑联结组等生物结构的图谱重建; (iv) 具有飞秒量级时间分辨的超快电镜技术, 通过进一步发展脉冲电子源、液相样品室等, 将为蛋白质分子异构、生物组织与纳米材料的物理化学相互作用等动态过程研究提供新的观测工具; (v) 大数据存储和处理技术与基于人工智能的图像处理技术, 将进一步推动海量电镜数据的快速、高效、自动化的处理与分析. 本文重点评述了以上技术方向的发展趋势、所面临的瓶颈问题以及可能的突破点, 并展望了其在未来推动生物医学基础研究和转化应用的前景.

关键词 电子显微成像技术, 冷冻电镜技术, 冷冻电子断层三维重建技术, 光电关联显微成像技术, 体电子显微成像技术, 超快电镜技术, 大数据与人工智能

引用格式: 陶长路, 张兴, 韩华, 等. 前沿生物医学电子显微技术的发展态势与战略分析. 中国科学: 生命科学, 2020, 50: 1176–1191

Tao C L, Zhang X, Han H, et al. Frontiers of electron microscopy for biomedical research (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2020, 50: 1176–1191, doi: 10.1360/SSV-2019-0094

电子显微成像技术(electron microscopy, EM, 简称电镜)是多学科交叉形成的重要工具, 是人类认识微观世界的最主要手段之一. 电镜与更常用的光学显微镜(简称光镜)遵循类似的原理, 但利用加速的电子束作为光源, 并利用电磁透镜对电子束进行聚焦成像. 电子的波长极短(300 kV加速电压下仅为0.019 Å), 这使得电镜的分辨能力远远高于光镜. 电镜技术主要分为透射电子显微镜(transmission electron microscope, TEM, 简称: 透射电镜)和扫描电子显微镜(scanning electron microscope, SEM, 简称: 扫描电镜). 透射电镜通过收集穿透样品的电子束进行成像, 能够探知物质内部细微结构; 扫描电镜通过将聚焦的电子束在样品表面进行扫描, 并采集与样品表面相互作用的信号(如背散射电子、二次电子、X射线等)成像, 主要用于观察样品表面形貌信息.

电镜的发展可追溯到20世纪20年代, 1923年法国物理学家德布罗意(Louis De Broglie)在光的波粒二象性的启发下, 提出电子具有波动性, 即电子也具有波粒二象性, 并因此获得了1929年诺贝尔物理学奖. 1926~1927年, 贝尔实验室的Clinton Davisson和Lester Germer发现电子的衍射现象, 验证了电子的波动性, 并发现电子波长比X射线还要短. 同年, 德国物理学家布施(Hans Busch)发现, 用一个旋转对称、不均匀的磁场可以作为一个“透镜”将电子束聚集起来, 这些发现为电镜的问世奠定了理论基础. 1933年, 德国物理学家Ernst Ruska和电子工程学家Max Knoll等人研制了世界上第一台电子显微镜. 1939年, Ernst Ruska在德国西门子公司制造出商用化的透射电镜, 分辨率达到10 nm, 由于其在电子光学领域及设计第一台透射电镜方面做出开拓性贡献, 他于1986年获得诺贝尔物理学奖. 伴随着透射电镜的发展, 早在1935年, Max Knoll在设计透射电镜的同时, 便提出了扫描电镜的原理和设计思路. 1938年, Manfred Von Ardenne在透射电镜中加入扫描线圈制成了最早的扫描透射电子显微镜(scanning transmission electron microscope, STEM), 并描述了扫描电镜的结构. 1953年, 第一台实用的扫描电镜在剑桥大学诞生, 由Charles Oatley和他的学生Dennis McMullan制作而成. 1965年, 英国剑桥仪器公司研制成世界上第一台商用扫描电镜Mark I, 从此掀开了扫描电镜研发、制造和应用的新开端^[1,2].

电镜利用其自身的分辨率优势, 并结合能谱、波

谱、阴极荧光等多种分析手段, 自发明之日起, 便在生物医学、材料研究、工业失效性分析、高端制造业检测、刑事侦破、考古鉴定等各个领域作出重要贡献. 在生物医学研究领域, 一方面, 电镜常用于临床研究和诊断, 为正确的临床诊断和治疗提供了保障. 人们通过从细胞、亚细胞的形态结构上阐明疾病的发生、发展及转变规律, 丰富健全了传统病理学的知识; 并对亚细胞结构和病原体的观察, 为多种疾病的诊断和鉴别提供了依据, 如肿瘤细胞来源的鉴别诊断, 血液病和肾脏疾病的分型诊断, 病毒性疾病的诊断, 支原体与衣原体的鉴别, 神经系统、肝脏、代谢性疾病等的诊断和鉴别^[3]. 另一方面, 电镜广泛应用于基础医学和生物学研究, 包括组织与细胞超微结构及其病理变化解析、分子定位与分布探究、生物大分子结构测定等, 为理解生命活动的规律奠定了基础. 值得一提的是, 《自然》杂志评选出了2019年值得关注的7项技术, 其中绘制大脑连接图谱技术和解析分子结构技术均是以前沿电子显微成像作为核心技术手段^[4].

1 现代前沿生物医学电子显微成像技术的发展现状

对生命活动过程的研究往往需要跨越多个时空尺度, 甚至需要追踪生物事件发生的动态过程, 这就要求研究手段具备高时空分辨率、原位、动态、多尺度、多模态、高特异性和高通量等多种特性. 随着物理、生物、信息等多学科技术的发展和融合, 工艺和技术上的不断革新, 电子显微成像技术在上述的多个特性方面不断拓展, 主要表现为以下4个方面(图1): 高分辨单颗粒冷冻电镜技术(single particle cryo-electron microscopy, CryoEM), 能够实现对生物大分子(包括蛋白质复合物、核酸、病毒等)的原子水平三维结构的测定与解析, 为理解生物大分子的分子机理以及新型药物设计与改进提供结构信息^[5]; 冷冻电子断层三维重构成像技术(cryo-electron tomography, CryoET), 能够在细胞原位解析其分子组织架构, 并能与光学显微成像进行有效整合, 在解析神经突触超微结构、病毒感染细胞机理等方面不断取得突破^[6-8]; 大尺度三维重构的体电子显微成像技术(large-scale volume electron microscopy, VEM), 能够观察空间成像范围为立方毫米体积的生物组织在纳米分辨率水平上的精细结构,

图1 前沿生物医学电子显微成像技术的主要发展方向

Figure 1 Main directions in the development of biomedical electron microscopy

广泛应用于精细的细胞三维形态、局部的脑神经连接图谱的绘制^[9-11]；四维超快电镜技术(four-dimensional electron microscopy, 4D-EM, 简称: 超快电镜, 又称时间分辨透射电镜技术), 一种将超快激光与高分辨电镜技术结合的新型电镜成像技术, 可以在高时间(皮秒至飞秒)与空间分辨率(纳米至埃)下观察样品的瞬态动态过程, 有望实现对液相环境中特定动态生物学事件的直接观察^[12,13]。

这些前沿生物医学电子显微成像技术作为一个整体, 相比于其他研究手段, 主要具备以下优势: (i) 极高的空间分辨率: 可以实现原子水平成像, 如最新利用CryoEM对生物大分子复合物三维结构的解析分辨率高达1.62 Å (EMDB: 9599, <https://www.ebi.ac.uk/pdbe/emdb/>未正式发表数据)。 (ii) 成像尺度范围大、适用样品范围广: 由于电镜的放大倍率能够连续变化, 放大倍率跨度接近100万倍, 成像尺度可从亚纳米到厘米量级, 样品适用范围可从单个蛋白分子到细胞与组织, 乃至到整个生物体。 (iii) 全貌信息、图像高保真: 相比荧光显微成像只能探测有荧光标记的样品信息, 电镜采用衬度成像, 包含了样品的全貌信息。 (iv) 分析手段多样, 可进行多模态关联成像: 一方面, 电子与样品作用会发射俄歇电子、二次电子、背散射电子、透射电子、特征X射线、阴极荧光等多种信号, 收集这些功能表征不同的信号, 可以多方面分析样品的不同特性;

另一方面, 电镜成像可以与光学成像等多种手段结合, 实现结构分析与功能研究的结合。

另一方面, 电子显微成像除设备昂贵、运行和维护条件苛刻等限制了电镜的广泛应用外, 其技术本身仍存在相当的局限性。 (i) 样品制备效率低: 由于电镜成像需要高真空环境且电子穿透能力有限, 导致含水的生物样品需要固定和减薄处理。传统基于脱水、包埋、切片、重金属染色的制样方式对样品结构损伤严重。而冷冻固定的样品则对电子辐射损伤十分敏感, 且缺乏高效的样品减薄处理方法。 (ii) 缺乏特异性、动态性: 电镜成像主要是衬度成像, 目前缺乏有效的特异标记手段。同时由于电镜通常只能观察固定后的样品, 因此无法动态追踪生物事件的发生过程。 (iii) 成像通量低: 当前为了解析一个大分子复合物的原子分辨率结构, 通常需要数天到数周的电镜连续成像, 而为了大尺度三维重建组织样品的超微结构, 则更是需要数月数年的连续成像; 并且针对海量的电镜数据, 尚缺乏有效快捷的自动化数据处理方法。

在以下几节, 本文针对生物医学前沿电子显微成像技术的几个重要方向, 分别阐述了其发展历程、技术特征与当前所面临的瓶颈问题, 并分析了其发展与应用态势。

2 高分辨冷冻电镜技术

在现代前沿生物医学电子显微成像技术中, 最引人瞩目的当属能够解析蛋白质等生物大分子的原子分辨率三维结构的冷冻电镜技术。蛋白质机器是生命过程的最直接执行者, 为揭示蛋白机器功能的分子机理, 需要精确解析其在原子水平的结构信息, 冷冻电镜是当前生物大分子结构解析的最主要技术手段之一。

冷冻电镜技术的发展, 一方面起源于三维重构理论的提出, 1968年, 英国剑桥大学MRC分子生物学实验室Aaron Klug领导的团队^[14]提出了中心截面定律, 即利用物体二维投影图像可重建其三维空间结构, 并获得了1982年的诺贝尔化学奖。另一方面, 美国加州大学伯克利分校Robert Glaeser团队^[15]于1974年证明, 低温下的蛋白质分子在电子显微镜的高真空中可以保持含水状态。1982年, 欧洲分子生物学实验室的Jacques Dubochet团队^[16]改进速冻的方法, 成功将生物大分子冷冻到玻璃态冰中, 奠定了冷冻电镜制样技术的

基础. 这些技术一起奠定了今天的冷冻电镜三维重建技术的基础, 包括CryoEM和CryoET. 单颗粒冷冻电镜三维重建技术方法最早由Joachim Frank^[17]在70年代提出, 其核心是通过收集大量具有同一性样品的二维投影, 进而重构出其三维结构. Richard Henderson^[18,19]在1990年首次利用冷冻电镜解析了冷冻条件下原子分辨率的细菌视紫红质二维晶体结构, 随后对冷冻电镜的理论、技术和方法, 作出了一系列理论和实验的预测. 2008~2010年期间, 张兴、周正洪和Nikolaus Grigorieff等团队^[20~22]率先利用单颗粒冷冻电镜技术解析了二十面体病毒近原子分辨率的结构, 标志着冷冻电镜技术用于解析生物大分子正式进入了原子分辨率时代. 近几年来, 直接电子探测相机(direct detect device, DDD)^[23,24]、Volta相位板(volta phase plate, VPP)^[25]和电子能量过滤器(electron energy filter, EEF)等技术的发展和运用, 以及数据三维重构处理软件的创新^[26], 推动了冷冻电镜技术突飞猛进的发展, 并使得冷冻电镜成为生物大分子原子水平结构测定的最核心技术手段之一. 并因此, Joachim Frank, Jacques Dubochet和Richard Henderson三位推动高分辨冷冻电镜技术发展与运用的先驱者荣获了2017年诺贝尔化学奖. 我国在高分辨冷冻电镜应用领域已经走到了世界的前列, 不断解析多种重要蛋白或病毒的结构与功能^[27~30].

高分辨冷冻电镜成像技术的发展, 使得其可以适用于解析大部分蛋白质复合物的原子分辨率结构, 然而对于一些超大蛋白复合物或小分子蛋白或多肽, 仍旧无法有效解析其高分辨结构. 如何进一步提高冷冻电镜的成像分辨率($\sim 1 \text{ \AA}$)和信噪比以适用超大和超小蛋白分子的结构解析是当前急需解决的问题. 具体主要可以通过以下3个方面来进一步提高冷冻电镜的适用范围和分辨率.

(1) 发展更精确的电子光学成像和三维重构理论. 限制冷冻电镜技术的一个重要因素是当前采用的电子光学成像和三维重构理论为强相位近似理论, 虽然电子波长极短、埃瓦尔德球曲率很大, 但当前使用的平面近似处理方法, 已不适用于更高分辨率的重构要求, 特别是对半径较大的样品^[31]. 为了进一步提高分辨率, 需要发展更精确的电子光学成像理论和计算方法以进行更准确的图像重构, 消除电子波在样品颗粒内的焦距梯度的影响, 更真实地还原生物样品的结构信息, 实现单颗粒冷冻电镜分辨率的进一步突破, 例如, 中

国科学技术大学刘云涛等人^[32]发展的基于连续局部分类和对称性释放的高分辨冷冻电镜三维重构方法, 实现了对人类单纯疱疹病毒(herpes simplex virus, HSV)这一超大蛋白/核酸复合体的冷冻电镜高分辨结构的解析(图2).

(2) 改善和提高电镜硬件技术, 主要包括相位板、高性能相机和样品台等. 生物样品是相位物体, 必须利用相位衬度成像. 但目前相位板技术还不成熟, 只能利用物镜欠焦来实现相位衬度成像, 在一定程度上限制了分辨率. 发展完善的相位板技术, 能够进一步发挥冷冻电镜技术的潜力^[25,34,35]. 同时, 大量数据的采集需要多次移动样品对多个视野成像, 发展高像素、高速的电子成像相机和更稳定的电镜样品台将极大缩短数据收集时间, 提高效率.

(3) 发展微小晶体电子衍射技术(micro electron diffraction, MicroED). 冷冻电镜成像的低信噪比, 使得对小蛋白分子的三维重构极其困难. 通常分子量100 kD以下的蛋白分子, 利用单颗粒冷冻电镜解析其高分辨结构非常具有挑战性. MicroED技术: 将蛋白分子生长成微小晶体, 放置于电镜载网上进行快速冷冻固定, 进一步通过冷冻聚焦离子束减薄后(或直接放入冷冻电镜中), 进行电子晶体衍射成像, 可以解析相应蛋白的原子分辨率三维结构^[36~38]. MicroED技术的发展与运用, 为小分子蛋白的结构解析提供了新的途径^[39,40].

3 基于冷冻电子断层三维重构成像的多模态成像技术

对蛋白质等生物大分子结构的解析, 目标是希望通过对其结构的测定来揭示其在生物机体中的功能与作用机理, 从而推动对大自然中生命体奥妙的理解, 并为相关疾病的发生机制与诊断, 以及治疗药物的研发提供线索和依据. 生物大分子的真实结构与功能在特定的细胞内环境中才能真实呈现, 而生物体是由成千上万种蛋白质、核酸、细胞器等多种组分组成的结构复杂多样的有机体, 生命过程是高度动态变化的, 同时存在高度的个体差异性. 这就要求相应的研究技术手段能够在高时空尺度下, 在细胞原位对分子组织、分布及动态变化进行研究, 以实现结构与功能研究的统一.

图 2 冷冻电镜解析I型人类疱疹病毒(HSV-1)的高分辨三维结构, 揭示病毒DNA组装机制。A: 一种新型基于连续局部分类和对称性释放的高分辨冷冻电镜三维重构方法; B: 完整人类单纯疱疹病毒的衣壳蛋白、DNA基因组和DNA通道蛋白的高分辨三维结构(引自文献[32,33])

Figure 2 Structures of the portal vertex and dsDNA genome in herpes simplex virus type 1 revealed by cryoEM. A: Flow chart illustrating the sequential localized classification and sub-particle reconstruction cryoEM methods; B: structures of the portal vertex and dsDNA genome in HSV type 1 (adapted from Ref. [32,33])

CryoET是目前已知分辨率最高的细胞水平成像技术, 其核心是通过收集同一样品不同角度的二维投影, 再通过计算重构出样品的三维结构。结合快速冷

冻制样技术, CryoET能够在近生理条件下解析细胞等样本在分子水平的超微结构^[41]。CryoET不仅能够将生物大分子的空间分布和相互作用关系映射在其完整的

细胞环境中, 还可以以更高的分辨率揭示其原位三维结构, 从而展现细胞或组织在近生理状态下的高分辨三维视野. CryoET的适用范围可涵盖从分子水平的蛋白质, 到亚细胞水平的细胞器, 以至细胞水平的组织样本, 有效填补了X射线晶体衍射、核磁共振(nuclear magnetic resonance, NMR)以及单颗粒冷冻电镜等手段所解析的蛋白与复合物的高分辨结构与光学显微成像等手段所观察的细胞或组织整体水平的分子定位与细胞形态等低分辨信息之间的空白.

CryoET技术的快速发展和广泛应用, 始于2000年左右, 以Wolfgang Baumeister等人为代表的先驱性工作^[42-44], 主要得益于能够实现不同角度倾转的稳定电镜样品台和能够进行实时成像的CCD(charge coupled device)相机的发展. 近些年来, 同样由于直接电子探测相机、相位板和电子能量过滤器等技术的发展与应用, CryoET在成像分辨率和信噪比上均有了质的提升. 当前, CryoET正向两个方面不断拓展: 一方面, 通过发展后期数据处理技术, 包括模板匹配(template-matching), 用已知蛋白的晶体结构或单颗粒冷冻电镜结构作为模板将该蛋白从CryoET三维断层重构图像(cryo-tomogram)中一一自动识别出来, 从而获取该蛋白在细胞内的空间分布信息^[45-48], 进一步通过亚区域平均技术(sub-tomogram averaging)在细胞等原位解析该蛋白的高分辨三维结构^[49-54]; 另一方面, 通过将CryoET与光学显微成像结合的冷冻光电关联显微成像(cryo-correlative light and electron microscopy, CryoCLEM), 即对样品进行光学显微成像, 随后对同一样品的同一区域进行冷冻电镜成像, 有效整合了光学显微与冷冻电镜的优势, 从而实现对生物样品的动态、多尺度、高特异性、高灵敏性和高分辨地综合成像研究^[6,55-60].

深入发展与应用CryoET和CryoCLEM技术, 将是冷冻电镜技术未来的研究重点和热点, 也将是蛋白质机器与细胞超微结构解析的最核心手段之一^[8,61,62]. 相比于单颗粒冷冻电镜, CryoET与CryoCLEM技术仍处于发展阶段, 我国在这一领域整体来说还十分落后. 值得一提的是中国科学技术大学毕国强团队和中国科学院生物物理研究所徐涛团队等已分别在发展与应用CryoCLEM解析神经突触超微结构与原位结构(图3)、冷冻超分辨荧光与冷冻电镜融合成像技术等方面达到国际领先水平^[6,59,64].

CryoET与CryoCLEM在样品制备、成像、关联方

式与关联精度, 以及后期数据处理等方面均有巨大的提升空间, 未来的技术发展可主要包括以下5个方面.

(1) 基于冷冻切片(cryo-sectioning)与冷冻聚焦离子束切割(cryo-focused ion beam milling, CryoFIB)的冷冻样品减薄技术. CryoET的一个核心限制因素是样品的厚度, 由于电子的穿透能力有限, 对于300 kV电镜来说, 一般样品厚度超过500 nm则无法获得清晰的电镜成像. 发展基于冷冻切片与冷冻聚焦离子束减薄的冷冻电镜样本制备技术能够对冷冻玻璃化样品进行无损减薄^[65-67], 这将是推动利用CryoET对细胞与组织样品在分子水平超微结构进行解析的主要途径^[61].

(2) 优化CryoET成像硬件、方法与数据处理技术等. 与单颗粒冷冻电镜相比, CryoET在成像速度、成像数据质量以及后期数据处理上均存在明显不足, 这些因素直接限制了CryoET技术对细胞原位中生物大分子的解析. 为此, 在硬件方面, 需要进一步发展更稳定更快速的样品台^[68]以提高数据收集速度; 优化现有Volta相位板与发展新型相位板技术(如激光相位板, laser-based phase plate)^[69,70]等来提高数据采集质量和速度. 软件方面, 则可以发展与优化包括: 对称性倾转的数据采集方式^[71], 基于不同样品高度的衬度传递函数的梯度校正方法^[49], 基于蛋白颗粒本身的迭代对齐方法^[54], 成像缺失锥校正^[72], 基于深度学习的自动化蛋白查找, 更精准的三维分类等方法, 以实现生物大分子在细胞内的空间分布以及定量分析^[73-75].

(3) (时间相关)关联显微成像技术. 将CryoET与其他研究手段结合, 实现多模态的成像解析是细胞与组织水平结构与功能研究的重要手段. 一方面, 可以将基于单分子定位的超分辨荧光显微成像与高保真高分辨的CryoET成像进行关联, 有望实现将超分辨成像下单个荧光分子定位与CryoET成像下单个电子密度颗粒的纳米精度对齐, 从而实现荧光导向的细胞原位分子结构的直接鉴别. 另一方面, 可以将活细胞超分辨荧光显微成像、定点调控与瞬时冷冻制样等技术进行结合, 实现时间相关-光电关联显微成像, 从而精确解析特定功能状态下分子水平超微组织架构和大分子三维结构.

(4) 新型原位标记技术. 发展可用于冷冻条件下特异性标记物质并能在电镜成像下识别的技术, 将能弥补冷冻电镜缺乏特异性的问题, 如利用量子点、免疫金颗粒、纳米颗粒对活细胞膜蛋白的胞外区域进行标

图 3 冷冻电镜断层三维重构与光电关联成像解析神经突触超微结构。A: 冷冻电镜与关联显微成像解析原代培养海马神经元突触的技术流程; B: 冷冻光电关联显微成像鉴别兴奋性突触; C: 高分辨冷冻电镜断层成像实现对神经递质受体蛋白的识别(引自文献[6,63])

Figure 3 Ultrastructure of neuronal synapses resolved by cryo-electron tomography and correlative microscopy. A: A pipeline for imaging neuronal synapses in cultured neurons with cryoET and cryoCLEM; B: identification of an excitatory synapse with cryoCLEM; C: visualization of individual neurotransmitter receptors with high resolution cryoET (adapted from Ref. [6,63])

记^[76,77], 以及基于基因改造的纳米金来标记细胞内单个蛋白分子^[78]。

(5) 冷冻扫描透射电子断层三维重构技术(cryo-scanning transmission electron microscopy tomography, cryo-STEMT)。STEM通过将电子束会聚成原子尺度的束斑, 在样品上进行扫描并同步采集相应信号。这种成像方法, 一方面能够对更厚的样本进行成像; 另

一方面, 由于其可以同步采集常规透射电镜中无法进行空间关联的其他信号, 包括二次电子、散射的电子束电子、表征X射线和电子能量损失, 所以STEM能够对样品进行元素分析; 并且由于其可以保持在正焦成像, 能有效提高厚样本的成像分辨率^[79,80]。将STEM与CryoET结合, 将在生物厚样本的超微结构与功能研究中有很好的应用前景。

4 基于高通量体电子显微成像的大尺度超微结构解析

脑计划的提出对绘制精细的细胞全貌、局部乃至全脑水平神经连接图谱提出了要求^[81]。光学成像手段能够快速重建大尺度脑组织中的连接图谱,然而分辨率局限在亚微米或微米水平^[82]。在纳米分辨率水平对生物样品进行三维重构,需要依赖高分辨的电镜成像手段。随着电子显微成像技术的发展以及在生命科学中的深入应用,利用电子显微镜对较大尺度的生物样品精细微观结构在纳米分辨率水平进行三维重构已经成为可能,尤其在脑科学微观连接网络解析中,很多最新的重要研究成果都是基于连续超薄切片或切面的电镜三维成像技术(图4)^[83~86]。

然而,突触水平的大范围脑网络结构重建在大体量数据获取、三维重建和自动分析,以及与神经生理研究如何结合等方面,对神经科学和信息科学来说都是一个巨大的挑战。如何高效率、低成本地获取生物三维电镜数据并进行有效解析,已成为迫切需要解决的问题,这就需要开展系列关键技术攻关,譬如电镜样品制备技术、超薄切片收集技术、高速电镜成像技术、海量数据三维重建技术等。将成像系统与上游的样品制备系统和下游的数据分析系统集成,建立高通量、自动化的脑微观结构规模化重建流程,将是大量生物电镜成像的主要研究方向^[85]。

(1) 基于生物切片的高通量扫描电镜三维成像技术。快速稳定获取高质量电镜图像是建立大范围生物样品三维重建的限制瓶颈之一,突破这一瓶颈依赖于基于连续超薄切片的高通量电镜的三维解决方案,同时满足高分辨率、高成像速度和高稳定性3个方面的严格要求。

高通量扫描电镜可以分为单束流型(single-beam)、多镜筒型(multi-column)和多束流型(multi-beam)^[86]。作为美国脑计划的一部分,美国高级情报研究计划署(Intelligence Advanced Research Projects Activity, IARPA)的MICrONS计划斥资1亿美元用于解剖1 mm³鼠脑皮质柱,哈佛大学Jeff Litchman实验室购置德国Zeiss研制的多束电镜(multiple-beam SEM)作为PB级数据获取的解决方案^[87]。多束成像复杂度,多束电镜成本高且价格昂贵,购置和使用门槛非常高,难于普及。单束流高通量电镜技术具有分

辨率高、稳定性好、操作方便、采购和维护成本低等优势,符合目前脑科学项目对于高速度、高分辨率、高稳定性、可并行等多方面的综合要求,也是实现生物型高通量三维电镜成像能力快速普及化的重要技术突破口之一。

高通量生物结构扫描电镜三维成像系统主要包括:基于连续超薄切片的自动收集装置、基于高通量扫描技术的高分辨率电镜、基于切片阵列的自动化采集控制系统、基于切片电镜图像的三维实时配准系统。该系统通过连续超薄切片自动收集装置实现万张连续切片的自动收集,利用高速背散射电子成像实现高分辨的大范围图像采集,同步进行电镜数据的实时拼接和三维配准,最终形成高效集成、无缝衔接、连续稳定的一体化成像设施,具备高分辨率高速成像、大范围连续稳定采集和三维实时可视化的生物精细结构高通量数据获取能力。

(2) 大体量电镜图像数据的三维重建与分析技术。以构建突触水平的脑神经结构图谱为例,需要将多个视场下的显微镜图像拼接成包含完整神经元的三维图像,然后将图像中神经元的形态及其突触提取出来,转化为易于分析的数字模型。建立突触水平连接组,大体量数据导致神经结构自动标注和分析需求呈爆炸式增长,相应的自动分析方法和能力的滞后、高度依赖于人工工作、处理效率低、识别可靠性和可重复性差,导致重构工程量巨大^[88]。

开展突触水平大范围脑网络结构重建技术研究,建立符合神经重建工程行为特征的自动化分析方法学框架,突破精细神经结构的自动识别、大范围神经元连接网络的精确分析、海量数据管理及显示等的技术瓶颈,设计适合神经重建特点的深度学习网络并建立高通量的自动重建系统,将为开展大体量神经结构重建工程提供算法理论基础和工程解决方案^[89]。

进一步,建立面向全脑规模的微观尺度图谱,则必须在仪器装备和数据处理效率有数量级提升的条件下建立规模化作业的工程平台。在宏观、介观尺度脑图谱的指导下,策略性地选取脑块进行微观重建,提供微观尺度的神经元、神经网络物理结构及理论模型,结合功能和计算手段,由局部拓展至整体,搭建统计学意义的全脑图谱。

图 4 大尺度体电子显微成像技术解析大脑精细连接图谱。A: 大尺度体电子显微成像解析生物样品超微结构的技术流程(引自文献[85,86])。CC BY 4.0 license^[85], Copyright©2011 Elsevier Ltd^[86]; B: 基于连续切片的高通量自动化体电子显微成像分别实现对果蝇、斑马鱼幼鱼的全脑神经元链接的精细解析(引自文献[83,84])。CC BY 4.0 license^[83], Copyright©2017, Springer Nature^[84]。授权再版

Figure 4 Large-scale volume electron microscopy for brain connectome reconstruction. A: A pipeline of volume electron microscopy (adapted from [85,86]). CC BY 4.0 license^[85], Copyright©2011 Elsevier Ltd^[86]; B: brain connectomes of adult *Drosophila melanogaster* and larval zebrafish brain revealed by volume electron microscopy (adapted from Ref. [83,84]).^[81] CC BY 4.0 license^[83], Copyright©2017, Springer Nature^[84]. Reproduced with permission

5 基于超快电镜成像的生物分子超快动态过程研究

对生命过程的研究, 时常需要在纳米范围内观测生命功能与活动过程相关的基础动态过程, 这些基础动态过程发生在原子分子层面且具有原子运动的时间尺度, 这就要求研究工具不仅具有原子水平的空间分辨率, 同时需要有纳秒到飞秒的时间分辨率。

四维超快电子显微镜(four dimensional ultrafast electron microscopy, 4D-UTEM), 又称时间分辨透射电子显微镜, 是近些年来刚发展起来的一种新型电子显微技术, 最早由美国加州理工学院Ahmed Zewail团队在2005年首次设计实现, 其核心是将常规电镜的直流发射电子束改为时间宽度为百飞秒/纳秒的电子脉冲, 并在样品处导入用于激发样品的泵浦激光脉冲, 结合超快光学中的泵浦-探测方法以及频闪法实现对原子、分子超快过程的启动和记录(图5A)。超快电镜, 具有与常规电镜相当的空间分辨能力及电子能谱分辨能力, 同时具有超快的时间分辨能力(纳秒到飞秒), 可以

实现从时域、三维实空间、衍射空间和能量域对物质内部以及原子分子的动态过程同时进行多维度、原子尺度分辨的观测。

发展以超快电镜为基础的超快生物分子成像装置, 从原子分子运动的角度研究生命活动过程及生物功能实现过程中有关的物理学、化学和生物学的动态过程, 能够对这些生命活动和生物功能的机制进行根本性的理解^[13]。一方面, 运用超快电镜研究蛋白质分子、蛋白纤维的微观结构及动力学特性, 将帮助人们对神经科学中相关蛋白结构-功能关系的理解, 为诸如理解重大疾病的机理、研制靶向药物等问题提供认识的基础(图5B)^[90-93]; 另一方面, 从纳米颗粒乃至材料内部原子分子运动的层次进行成像观察, 有望为纳米材料的生物学效应研究、纳米材料新药物的开发带来重大突破。

超快电镜当前仍以无机材料为主要观测对象^[12,94,95], 面对复杂程度更高、对辐射损伤耐受程度更低的生物样品, 则要求超快电镜技术进一步发展。

(1) 相干度更高的脉冲电子源。从直流发射的电子

图 5 超快电镜结合飞秒激光诱导近场效应对细胞膜成像, 鉴别人类A431癌细胞。A: 利用电子能量过滤对细胞膜囊泡的激光诱导近场成像的方法; B: 表皮生长因子对光致近场的抑制导致电子能量增益/损失峰的消失(引自文献^[93])。版权: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 授权再版

Figure 5 Ultrafast electron microscopy of A431 human cancer cell membrane through femtosecond laser-induced near-field effects. A: Schematic of laser-induced near-field image of membrane vesicles employing electron energy filter; B: the suppress of laser-induced near-field by epidermal growth factor leads to the diminishment of the gain and loss peaks in the spectrum (adapted from Ref. ^[93]). Copyright: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission

束改为由飞秒激光照射产生的光电子脉冲, 电子源的相干度受到激光光强涨落及阴极温度涨落的影响而降低, 需要发展相干性更好的超快脉冲电子源。

(2) 超快时间分辨的冷冻电镜. 将超快电镜技术与现今最前沿的解析生物结构的冷冻电镜技术相结合, 可利用超短时间宽度的电子脉冲在生物样品辐射损伤次级过程发生之前获取结构信息。

(3) 开发液相或气相样品池. 电子显微成像需要在高真空状态下进行, 这使得电镜技术一直局限于固化样品体系. 发展能够承载溶液或气体样品的样品池装置^[12], 则是充分利用超快电镜成像技术解决生命科学问题的关键突破口之一。

6 基于大数据、云计算和深度学习的电镜数据处理技术

随着电镜成像向更高分辨率和更大尺度的推进, 电镜成像数据呈现爆炸式增长, 在当前的成像条件下, 电镜每天产生的数据量在TB量级, 而一套完整样品的数据更是可高达PB量级, 如此海量的数据量对数据的存储和计算均产生了巨大的挑战。同时由于上述所提到的电镜图像缺乏特异性与低信噪比等因素, 电镜三维重构图像的后期处理, 包括切割渲染以及量化分析, 当前尚没有高效快捷的处理方式^[96]。就冷冻电镜成像而言, 从二维投影图像到原子分辨率三维结构解析通常要花费数周到数月的时间; 而对于细胞的断层三维重构数据尚没有有效的自动化切割渲染方法。在大尺度扫描电镜成像方面, 如1 mm³的大脑组织能够产生PB量级的图像数据, 如此大体量数据导致图像三维重建与拼接、神经结构标注和神经连接网络分析面临严重挑战。生物医学电镜数据的自动、快速与高效分析已成为电镜技术发展与应用的主要瓶颈。

近年来, 计算机科学与信息技术的突飞猛进的发展, 为解决这些挑战提供了可行的路线。例如, 运用大数据与云计算方法, 能更加灵活有效地进行海量电镜数据的存储与处理, 如美国MIT Sebastian Seung实验室^[97]将大尺度电镜三维图像的切割与渲染做成电脑网络游戏“Eyewire”, 可有效号召全世界的普通民众来参与数据处理分析。将人工智能深度学习的方法应用到电镜三维重构以及后期切割渲染等可以大大提高数据的处理速度, 实现海量电镜数据分析处理的高通

量、自动化和标准化^[73~75,98,99]。最终通过对软硬件的整合, 实现生物医学电镜技术的数据采集、存储、处理与分析的一体化和实时化。

7 结论与展望

电子显微镜属于大型科学装置, 其购买、安装以及运行维护成本极其高昂, 非个人或单个课题组所能承担。同时电子显微成像技术涉及到生物医学、物理电子光学、机械工程学、信息与计算科学等多学科交叉, 也是任何个人或单个课题组无法胜任的。因此, 依托科研院校、医院等研究机构, 搭建电子显微镜交叉型大科学装置平台, 深度发展交叉学科的融合, 培养和组建多学科交叉人才团队, 是电子显微成像技术发展的前提。

在此基础上, 深入优化成像装置和方法, 重点发展多模态成像方法, 积极探索原位动态电镜成像技术, 以及针对不同成像方法的制样技术, 力争在高分辨冷冻电镜三维重构技术与方法、光电关联显微成像装置、大尺度扫描电镜成像装置、超快电镜技术等研究领域达到国际领先水平, 实现具有自主知识产权的原创性技术, 并为我国生物医学研究提供先进的、多方位的观测手段。促进我国生物医学影像技术的创新发展, 将推动蛋白质结构与功能研究、药物设计与研发、细胞超微结构与功能机制、精细脑功能图谱绘制等重大科学前沿研究和国家战略计划的实施。

当前, 前沿生物医学电子显微成像技术还比较局限在基础科学研究中的应用, 在临床研究和病理诊断中的应用还非常缺乏, 尤其是冷冻电镜技术尚未见应用于临床诊断和研究, 因此有广阔的开发空间, 比如将超微结构与功能变化研究结合起来将会在原子水平精准地揭示生理或病理变化, 特别是透射扫描电镜结合X射线能量色散谱分析技术可在细胞器内直接定量、精准定位分析元素与生理或病理状态的关系。这种技术可应用于外源物质引起病变的精准定位诊断(如矽肺), 也可对细胞超微结构中离子浓度(如钙离子)精准测量。诚然, 前沿电子显微成像技术在临床研究和诊断中的使用还需要较多的技术流程研发和优化, 但由于其独一无二的结构解析能力, 可以预测该技术在医学研究、病理诊断和药物研发等方面具有巨大的价值和广阔的应用前景。

致谢 感谢中国科学技术大学研究生夏轶男在图表制作方面提供的帮助。

参考文献

- Oatley C W. The early history of the scanning electron microscope. In: Breton B C, McMullan D, Smith K C A, eds. *Advances in Imaging and Electron Physics*. California: Elsevier Academic Press, 2004. 7–34
- Haguenau F, Hawkes P W, Hutchison J L, et al. Key events in the history of electron microscopy. *Microsc Microanal*, 2003, 9: 96–138
- Gordon R E. Electron microscopy: A brief history and review of current clinical application. In: Day C, ed. *Histopathology. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)*. New York: Humana Press, 2014. 119–135
- Fessenden M. Technologies to watch in 2019. *Nature*, 2019, 565: 521–523
- Cheng Y. Single-particle cryo-EM—How did it get here and where will it go. *Science*, 2018, 361: 876–880
- Tao C L, Liu Y T, Sun R, et al. Differentiation and characterization of excitatory and inhibitory synapses by cryo-electron tomography and correlative microscopy. *J Neurosci*, 2018, 38: 1493–1510
- Zhang P. Correlative cryo-electron tomography and optical microscopy of cells. *Curr Opin Struct Biol*, 2013, 23: 763–770
- Oikonomou C M, Jensen G J. Cellular electron cryotomography: Toward structural biology *in situ*. *Annu Rev Biochem*, 2017, 86: 873–896
- Peddie C J, Collinson L M. Exploring the third dimension: Volume electron microscopy comes of age. *Micron*, 2014, 61: 9–19
- Titze B, Genoud C. Volume scanning electron microscopy for imaging biological ultrastructure. *Biol Cell*, 2016, 108: 307–323
- Dance A. Connectomes make the map. *Nature*, 2015, 526: 147–149
- Fu X, Chen B, Tang J, et al. Imaging rotational dynamics of nanoparticles in liquid by 4D electron microscopy. *Science*, 2017, 355: 494–498
- Flannigan D J, Barwick B, Zewail A H. Biological imaging with 4D ultrafast electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 9933–9937
- De Rosier D J, Klug A. Reconstruction of three dimensional structures from electron micrographs. *Nature*, 1968, 217: 130–134
- Taylor K A, Glaeser R M. Electron diffraction of frozen, hydrated protein crystals. *Science*, 1974, 186: 1036–1037
- Dubochet J, Lepault J, Freeman R, et al. Electron microscopy of frozen water and aqueous solutions. *J Microsc*, 1982, 128: 219–237
- Frank J. Averaging of low exposure electron micrographs of non-periodic objects. *Ultramicroscopy*, 1975, 1: 159–162
- Henderson R, Baldwin J M, Ceska T A, et al. An atomic model for the structure of bacteriorhodopsin. *Biochem Soc Trans*, 1990, 18: 844
- Henderson R. The potential and limitations of neutrons, electrons and X-rays for atomic resolution microscopy of unstained biological molecules. *Quart Rev Biophys*, 1995, 28: 171–193
- Zhang X, Jin L, Fang Q, et al. 3.3 Å cryo-EM structure of a nonenveloped virus reveals a priming mechanism for cell entry. *Cell*, 2010, 141: 472–482
- Yu X, Jin L, Zhou Z H. 3.88 Å structure of cytoplasmic polyhedrosis virus by cryo-electron microscopy. *Nature*, 2008, 453: 415–419
- Zhang X, Settembre E, Xu C, et al. Near-atomic resolution using electron cryomicroscopy and single-particle reconstruction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 1867–1872
- Liao M, Cao E, Julius D, et al. Structure of the TRPV1 ion channel determined by electron cryo-microscopy. *Nature*, 2013, 504: 107–112
- Li X, Mooney P, Zheng S, et al. Electron counting and beam-induced motion correction enable near-atomic-resolution single-particle cryo-EM. *Nat Methods*, 2013, 10: 584–590
- Danev R, Buijsse B, Khoshouei M, et al. Volta potential phase plate for in-focus phase contrast transmission electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111: 15635–15640
- Scheres S H W. Relion: Implementation of a bayesian approach to cryo-EM structure determination. *J Struct Biol*, 2012, 180: 519–530
- Yang G, Zhou R, Shi Y. Cryo-EM structures of human γ -secretase. *Curr Opin Struct Biol*, 2017, 46: 55–64
- Yan C, Wan R, Shi Y. Molecular mechanisms of pre-mRNA splicing through structural biology of the spliceosome. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2019, 11: a032409
- Zhang J, Ma J, Liu D, et al. Structure of phycobilisome from the red alga *griffithsia pacifica*. *Nature*, 2017, 551: 57–63
- Wang H W, Lei J, Shi Y. Biological cryo-electron microscopy in China. *Protein Sci*, 2017, 26: 16–31

- 31 Zhu D, Wang X, Fang Q, et al. Pushing the resolution limit by correcting the ewald sphere effect in single-particle cryo-EM reconstructions. *Nat Commun*, 2018, 1552
- 32 Liu Y T, Jih J, Dai X, et al. Cryo-EM structures of herpes simplex virus type 1 portal vertex and packaged genome. *Nature*, 2019, 570: 257–261
- 33 Dai X, Zhou Z H. Structure of the herpes simplex virus 1 capsid with associated tegument protein complexes. *Science*, 2018, 360: eaao7298
- 34 Danev R, Baumeister W. Expanding the boundaries of cryo-EM with phase plates. *Curr Opin Struct Biol*, 2017, 46: 87–94
- 35 Fan X, Zhao L, Liu C, et al. Near-atomic resolution structure determination in over-focus with volta phase plate by cs-corrected cryo-EM. *Structure*, 2017, 25: 1623–1630.e3
- 36 Shi D, Nannenga B L, Iadanza M G, et al. Three-dimensional electron crystallography of protein microcrystals. *eLife*, 2013, 2: e01345
- 37 Martynowycz M W, Zhao W, Hattne J, et al. Collection of continuous rotation microED data from ion beam-milled crystals of any size. *Structure*, 2019, 27: 545–548.e2
- 38 Luo F, Gui X, Zhou H, et al. Atomic structures of FUS LC domain segments reveal bases for reversible amyloid fibril formation. *Nat Struct Mol Biol*, 2018, 25: 341–346
- 39 Jones C G, Martynowycz M W, Hattne J, et al. The cryoEM method microed as a powerful tool for small molecule structure determination. *ACS Cent Sci*, 2018, 4: 1587–1592
- 40 Zhou H, Luo F, Luo Z, et al. Programming conventional electron microscopes for solving ultrahigh-resolution structures of small and macromolecules. *Anal Chem*, 2019, 91: 10996–11003
- 41 Baumeister W. Electron tomography: Towards visualizing the molecular organization of the cytoplasm. *Curr Opin Struct Biol*, 2002, 12: 679–684
- 42 Hoppe W, Gassmann J, Hunsmann N, et al. Three-dimensional reconstruction of individual negatively stained yeast fatty-acid synthetase molecules from tilt series in the electron microscope. Hoppe-Seyler's Zeitschrift fur Physiol Chem, 1974, 355: 1483–1487
- 43 Nicastro D, Frangakis A S, Typke D, et al. Cryo-electron tomography of neurospora mitochondria. *J Struct Biol*, 2000, 129: 48–56
- 44 Bohm J, Frangakis A S, Hegerl R, et al. Toward detecting and identifying macromolecules in a cellular context: Template matching applied to electron tomograms. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 14245–14250
- 45 Zhao Q, Ofverstedt L G, Skoglund U, et al. Morphological variation of individual escherichia coli 50s ribosomal subunits *in situ*, as revealed by cryo-electron tomography. *Exp Cell Res*, 2004, 300: 190–201
- 46 Medalia O, Weber I, Frangakis A S, et al. Macromolecular architecture in eukaryotic cells visualized by cryoelectron tomography. *Science*, 2002, 298: 1209–1213
- 47 Frangakis A S, Böhm J, Förster F, et al. Identification of macromolecular complexes in cryoelectron tomograms of phantom cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 14153–14158
- 48 Hrabe T, Chen Y, Pfeffer S, et al. Pytom: A python-based toolbox for localization of macromolecules in cryo-electron tomograms and subtomogram analysis. *J Struct Biol*, 2012, 178: 177–188
- 49 Turoňová B, Schur F K M, Wan W, et al. Efficient 3D-CTF correction for cryo-electron tomography using NovaCTF improves subtomogram averaging resolution to 3.4 Å. *J Struct Biol*, 2017, 199: 187–195
- 50 Wan W, Briggs J A. Cryo-electron tomography and subtomogram averaging. In: Crowther R A, ed. The Resolution Revolution: Recent Advances in cryoEM. Methods in Enzymology. Salt Lake City: Academic Press, 2016. 329–367
- 51 Schur F K M, Hagen W J H, Rumlová M, et al. Structure of the immature HIV-1 capsid in intact virus particles at 8.8 Å resolution. *Nature*, 2015, 517: 505–508
- 52 Mahamid J, Pfeffer S, Schaffer M, et al. Visualizing the molecular sociology at the HeLa cell nuclear periphery. *Science*, 2016, 351: 969–972
- 53 Asano S, Fukuda Y, Beck F, et al. A molecular census of 26s proteasomes in intact neurons. *Science*, 2015, 347: 439–442
- 54 Himes B A, Zhang P. emClarity: Software for high-resolution cryo-electron tomography and subtomogram averaging. *Nat Methods*, 2018, 15: 955–961
- 55 Guo Q, Lehmer C, Martínez-Sánchez A, et al. *In situ* structure of neuronal C9orf72 poly-GA aggregates reveals proteasome recruitment. *Cell*, 2018, 172: 696–705.e12
- 56 Sartori A, Gatz R, Beck F, et al. Correlative microscopy: Bridging the gap between fluorescence light microscopy and cryo-electron tomography. *J Struct Biol*, 2007, 160: 135–145
- 57 Lucić V, Kossel A H, Yang T, et al. Multiscale imaging of neurons grown in culture: From light microscopy to cryo-electron tomography. *J Struct Biol*, 2007, 160: 146–156

- 58 Jun S, Ke D, Debiec K, et al. Direct visualization of HIV-1 with correlative live-cell microscopy and cryo-electron tomography. *Structure*, 2011, 19: 1573–1581
- 59 Liu B, Xue Y, Zhao W, et al. Three-dimensional super-resolution protein localization correlated with vitrified cellular context. *Sci Rep*, 2015, 5: 13017
- 60 Chang Y W, Chen S, Tocheva E I, et al. Correlated cryogenic photoactivated localization microscopy and cryo-electron tomography. *Nat Methods*, 2014, 11: 737–739
- 61 Lučić V, Rigort A, Baumeister W. Cryo-electron tomography: The challenge of doing structural biology *in situ*. *J Cell Biol*, 2013, 202: 407–419
- 62 Vanhecke D, Asano S, Kochovski Z, et al. Cryo-electron tomography: Methodology, developments and biological applications. *J Microsc*, 2011, 242: 221–227
- 63 Liu Y T, Tao C L, Lau P M, et al. Postsynaptic protein organization revealed by electron microscopy. *Curr Opin Struct Biol*, 2019, 54: 152–160
- 64 Si Z, Zhang J, Shivakoti S, et al. Different functional states of fusion protein gB revealed on human cytomegalovirus by cryo electron tomography with Volta phase plate. *PLoS Pathog*, 2018, 14: e1007452
- 65 Wang K, Strunk K, Zhao G, et al. 3D structure determination of native mammalian cells using cryo-FIB and cryo-electron tomography. *J Struct Biol*, 2012, 180: 318–326
- 66 Rigort A, Bäuerlein F J B, Villa E, et al. Focused ion beam micromachining of eukaryotic cells for cryoelectron tomography. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109: 4449–4454
- 67 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 Struct Biol*, 2014, 185: 32–41
- 68 Chreifi G, Chen S, Metskas L A, et al. Rapid tilt-series acquisition for electron cryotomography. *J Struct Biol*, 2019, 205: 163–169
- 69 Müller H, Jin J, Danev R, et al. Design of an electron microscope phase plate using a focused continuous-wave laser. *New J Phys*, 2010, 12: 073011
- 70 Campbell S L, Schwartz O, Axelrod J J, et al. A laser-based phase plate for phase contrast transmission electron microscopy. In: *Frontiers in Optics/Laser Science*, OSA Technical Digest. Washington, 2018
- 71 Hagen W J H, Wan W, Briggs J A G. Implementation of a cryo-electron tomography tilt-scheme optimized for high resolution subtomogram averaging. *J Struct Biol*, 2017, 197: 191–198
- 72 Yan R, Venkatakrishnan S V, Liu J, et al. MBIR: A cryo-ET 3D reconstruction method that effectively minimizes missing wedge artifacts and restores missing information. *J Struct Biol*, 2019, 206: 183–192
- 73 Chen M, Dai W, Sun S Y, et al. Convolutional neural networks for automated annotation of cellular cryo-electron tomograms. *Nat Methods*, 2017, 14: 983–985
- 74 Frazier Z, Xu M, Alber F. Tomominer and tomominercloud: A software platform for large-scale subtomogram structural analysis. *Structure*, 2017, 25: 951–961.e2
- 75 Pei L, Xu M, Frazier Z, et al. Simulating cryo electron tomograms of crowded cell cytoplasm for assessment of automated particle picking. *BMC Bioinf*, 2016, 17: 405
- 76 Zhao Y, Chen S, Swensen A C, et al. Architecture and subunit arrangement of native ampa receptors elucidated by cryo-EM. *Science*, 2019, 364: 355–362
- 77 Liu S, Xu L, Guan F, et al. Cryo-EM structure of the human $\alpha 5\beta 3$ GABAA receptor. *Cell Res*, 2018, 28: 958–961
- 78 Jiang Z, Jin X, Li Y, et al. Direct synthesis of EM-visible gold nanoparticles on genetically encoded tags for single-molecule visualization in cells. *BioRxiv*, 2019
- 79 Wolf S G, Mutsafi Y, Dadosh T, et al. 3D visualization of mitochondrial solid-phase calcium stores in whole cells. *eLife*, 2017, 6: e29929
- 80 Rez P, Larsen T, Elbaum M. Exploring the theoretical basis and limitations of cryo-STEM tomography for thick biological specimens. *J Struct Biol*, 2016, 196: 466–478
- 81 Poo M M, Du J L, Ip N Y, et al. China brain project: Basic neuroscience, brain diseases, and brain-inspired computing. *Neuron*, 2016, 92: 591–596
- 82 Wang H, Zhu Q, Ding L, et al. Scalable volumetric imaging for ultrahigh-speed brain mapping at synaptic resolution. *Natl Sci Rev*, 2019, 6: 982–992
- 83 Zheng Z, Lauritzen J S, Perlman E, et al. A complete electron microscopy volume of the brain of adult drosophila melanogaster. *Cell*, 2018, 174:

730–743.e22

- 84 Hildebrand D G C, Cicconet M, Torres R M, et al. Whole-brain serial-section electron microscopy in larval zebrafish. *Nature*, 2017, 545: 345–349
- 85 Kornfeld J, Denk W. Progress and remaining challenges in high-throughput volume electron microscopy. *Curr Opin Neurobiol*, 2018, 50: 261–267
- 86 Briggman K L, Bock D D. Volume electron microscopy for neuronal circuit reconstruction. *Curr Opin Neurobiol*, 2012, 22: 154–161
- 87 Marx V. Brain mapping in high resolution. *Nature*, 2013, 503: 147–152
- 88 Helmstaedter M. Cellular-resolution connectomics: Challenges of dense neural circuit reconstruction. *Nat Methods*, 2013, 10: 501–507
- 89 Lee K, Turner N, Macrina T, et al. Convolutional nets for reconstructing neural circuits from brain images acquired by serial section electron microscopy. *Curr Opin Neurobiol*, 2019, 55: 188–198
- 90 Lorenz U J, Zewail A H. Biomechanics of DNA structures visualized by 4D electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110: 2822–2827
- 91 Fitzpatrick A W P, Lorenz U J, Vanacore G M, et al. 4D cryo-electron microscopy of proteins. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 19123–19126
- 92 Fitzpatrick A W P, Vanacore G M, Zewail A H. Nanomechanics and intermolecular forces of amyloid revealed by four-dimensional electron microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112: 3380–3385
- 93 Kaplan M, Yoo B K, Tang J, et al. Photon-induced near-field electron microscopy of eukaryotic cells. *Angew Chem Int Ed*, 2017, 56: 11498–11501
- 94 Zewail A H. Four-dimensional electron microscopy. *Science*, 2010, 328: 187–193
- 95 Yurtsever A, van der Veen R M, Zewail A H. Subparticle ultrafast spectrum imaging in 4D electron microscopy. *Science*, 2012, 335: 59–64
- 96 Lichtman J W, Pfister H, Shavit N. The big data challenges of connectomics. *Nat Neurosci*, 2014, 17: 1448–1454
- 97 Tinati R, Luczak-Roesch M, Simperl E, et al. An investigation of player motivations in eyewire, a gamified citizen science project. *Comput Human Behav*, 2017, 73: 527–540
- 98 Wang F, Gong H, Liu G, et al. DeepPicker: A deep learning approach for fully automated particle picking in cryo-EM. *J Struct Biol*, 2016, 195: 325–336
- 99 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

Frontiers of electron microscopy for biomedical research

TAO Chang-Lu¹, ZHANG Xing², HAN Hua³, LIANG WenXi⁴, ZHAO Jing-Wei² & BI Guo-Qiang¹

¹ Center for Integrative Imaging, Hefei National Laboratory for Physical Sciences at Microscale, School of Life Sciences, University of Science and Technology of China, Hefei 230027, China;

² Center of Diagnostic Electron Microscopy, Sir Run Run Shaw Hospital, Zhejiang University School of Medicine and Center of Cryo-Electron Microscopy, School of Basic Medical Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China;

³ National Laboratory of Pattern Recognition, Institute of Automation of Chinese Academy of Sciences, School of Future Technology, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100190, China;

⁴ Huazhong University of Science and Technology, Wuhan National Laboratory for Optoelectronics, Wuhan 430074, China

Electron microscopy (EM) has been an important tool widely used in biomedical research. Recent progress in physics, informatics, biology and other disciplines has enabled major breakthroughs for EM to achieve higher resolution and throughput. For example, cryogenic sample preparation and direct electron detection helped cryoEM to solve atomic structures of biological macromolecules. In the meantime, biological systems and life processes often span multiple spatial and temporal scales, and demand not only resolution, specificity and throughput, but also in their applicability *in situ*. To this end, the techniques and applications of biomedical EM is advancing in several fronts: (i) For high resolution cryoEM, new electron-optical imaging techniques will achieve higher signal-to-noise ratio, whereas new computational techniques will allow for more precise three-dimensional reconstruction. (ii) For cryo electron tomography (cryoET), optimized cryo-sectioning/milling techniques for tissue/cell samples and new computational methods such as sub-tomogram averaging will enable study of molecular organization *in situ*. Its multimodal integration with light microscopy will enable structure-function studies of subcellular machinery. (iii) For large-scale volume electron microscopy, faster imaging and data processing will allow for high throughput mapping of brain connectomes and other biological structures. (iv) Ultrafast electron microscopy with femtosecond temporal resolution will provide new tools to resolve the dynamic process of protein isomerization as well as the physical and chemical interactions in live cells and tissues. (v) New techniques of data handling and AI-based analysis methods will further facilitate the processing and analysis of the rapidly growing volume of EM data. In this paper, we reviewed the trends, challenges, and possible breakthroughs in EM and related technologies, and discussed perspectives of their applications in biomedical research.

electron microscopy, cryo-electron microscopy, cryo-electron tomography, correlative light and electron microscopy, volume electron microscopy, ultrafast electron microscopy, big data and artificial intelligence

doi: 10.1360/SSV-2019-0094