

· 特邀综述 ·

冷冻聚焦离子束-扫描电镜成像技术研究进展

贾星, 孙飞, 季刚*

中国科学院生物物理研究所, 北京 100101

摘要 冷冻聚焦离子束-扫描电镜成像(Cryo-FIB-SEM)是一种新兴的成像检测技术, 在原位进行冷冻聚焦离子束切割和冷冻扫描电镜成像, 为研究天然含水状态下生物样品内部未被破坏的原始结构打开了一扇窗口。近年来, 该技术在生命科学领域的应用研究取得了一系列重要进展。该文对其在冷冻体积连续成像、冷冻光电关联成像、冷冻透射扫描成像、冷冻含水切片制备监控及冷冻扫描图像处理等方面的研究进展进行综述, 并展望了该技术在大批量生物样品三维原位成像研究领域的前沿性发展趋势, 以期推动Cryo-FIB-SEM技术在生物样品三维结构研究中的应用。

关键词 冷冻聚焦离子束-扫描电镜成像, 冷冻光电关联, 冷冻体积连续成像, 冷冻透射扫描成像

贾星, 孙飞, 季刚 (2022). 冷冻聚焦离子束-扫描电镜成像技术研究进展. 植物学报 57, 24–29.

生物体的结构复杂、有层次且多级有序, 最重要的是生物体含水。300多年来, 人们使用各种各样的仪器和方法来进行观察实验, 包括光学成像、电子显微成像和X射线成像技术。20世纪90年代兴起的聚焦离子束切割-扫描电镜成像(focused ion beam-scanning electron microscopy, FIB-SEM)是一种高效、快速且自动化的大批量三维成像方法, 主要应用于半导体行业, 进入21世纪后才被应用于生命科学中观察细胞或组织内部结构(Vidavsky et al., 2016)。FIB-SEM的原理是在原位利用聚焦离子束(FIB)轰击样品某个微小感兴趣区域表面, 将其暴露后, 用扫描电镜(SEM)自动获取背散射电子图像, 不断重复这个过程, 就可以获得包含大量图像序列的数据集(Hayles and De Winter, 2021)。目前, FIB-SEM可提供的图像最高分辨率约为3 nm, 样品体积可达 $10^6 \mu\text{m}^3$, 像素尺寸可达 $4 \text{ nm} \times 4 \text{ nm} \times 4 \text{ nm}$ (Xu et al., 2017)。利用FIB-SEM技术, 研究人员已得到神经组织连接体、小鼠(*Mus musculus*)肝组织、果蝇(*Drosophila melanogaster*)视叶组织、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)花粉、莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)、苜蓿(*Medicago truncatula*)根瘤维管组织、细菌、寄生虫、细胞或细胞器-细胞膜的相互作用等生物样品三维结构的重构

成果(Titze and Genoud, 2016; Xu et al., 2017; Kizilyaprak et al., 2019; Wang et al., 2020)。

利用FIB-SEM技术可以得到生物样品的三维结构。然而该技术的一大不足是前期需使用传统的树脂包埋方法, 在常温条件下将生物细胞或组织样品进行脱水和树脂包埋处理, 或使用高压冷冻及冷冻替代方法制备样品的常温树脂包埋块。FIB-SEM实验也在常温下进行, 样品经过固定(化学或冷冻固定)、染色和干燥等操作会产生假象, 从而无法观察天然含水状态下样品内部未被破坏的原始结构(Bhawana et al., 2014; Hoffman et al., 2020)。随着技术的进步, 冷冻技术已应用于各类电子显微观察实验, 其中包括利用双束扫描电镜在冷冻条件下对样品进行切割, 生产冷冻含水超薄切片, 冷冻含水超薄切片可以被进一步转移到冷冻透射电镜(cryo-transmission electron microscopy, Cryo-TEM)下进行高分辨率的冷冻电子断层成像(cryo-electron tomography, Cryo-ET)数据收集(Lučić et al., 2013; Wagner et al., 2017)。然而, 受透射电镜样品成像厚度的限制, 采用Cryo-ET得到的样品体积厚度最大为200–300 nm, 从而无法获得细胞乃至组织层面的大尺度三维结构信息。

本文将介绍一种最新的生物结构分析方法——

收稿日期: 2021-09-14; 接受日期: 2021-11-17

基金项目: 国家自然科学基金(No.31801201)

* 通讯作者。E-mail: jiggang@ibp.ac.cn

冷冻聚焦离子束-扫描电镜成像(cryo-focused ion beam-scanning electron microscopy, Cryo-FIB-SEM), 它集成了冷冻成像和对大体积样品进行三维分析两大优势。Cryo-FIB-SEM作为一种工具, 可在没有任何重金属染色的情况下, 在当前的扫描电镜分辨率范围内进行冷冻体积成像, 通过连续FIB切割和SEM成像来获取整个冷冻固定的生物样品图像集, 进而直接获得天然玻璃化样品新鲜暴露的块面上的细胞超微结构。值得一提的是, 使用Cryo-FIB-SEM时生物样品从制备到拍摄全程处于冷冻状态, 允许在不经任何化学处理的条件下对整个冷冻生物样品进行三维成像。近年来, 很多学者对Cryo-FIB-SEM进行了探索(图1), 在冷冻体积连续成像、冷冻光电关联成像、冷冻透射扫描成像、冷冻含水切片制备监控和冷冻扫描图像处理等方面取得了诸多进展。本文将对Cryo-FIB-SEM近期取得的较为瞩目的研究成果进行综述。

1 利用Cryo-FIB-SEM获得大尺度冷冻生物样品的三维结构信息

Cryo-FIB-SEM冷冻体积连续成像集成了冷冻成像和大体积数据三维成像的巨大优势, 可获得几千立方微米体积的近天然、充分含水冷冻细胞和组织样品的三维图像集。近年来, 研究人员获得了小鼠视神经、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)孢子、海胆(*Echinoid-
ea*)胚胎、斑马鱼(*Danio rerio*)尾巴和利氏综合征(Leigh syndrome, Ls)患者细胞等样品三维结构的分析结果。

早在2013年, Wiebke Möbius实验室研究人员就将Cryo-FIB-SEM作为对细胞或组织等大尺寸冷冻样

品进行快速三维冷冻成像的直接工具, 观察了通过高压冷冻获得的小鼠视神经和枯草芽孢杆菌孢子冷冻含水样品。生物体内膜结构本身的对比度足以区分高尔基体、囊泡、内质网和线粒体内的嵴等结构, 并可对少突胶质细胞和星形细胞中不同类型的线粒体进行三维重构(Schertel et al., 2013)。通过测量核膜平均宽度, 研究人员发现由高压冷冻或者冷冻替代所引起的样品收缩远远小于传统的样品处理方法。这里的收缩是指在化学固定树脂包埋制样方法中由脱水引起的假象。当时, 尚未实现在不激活萌发的情况下对休眠的枯草芽孢杆菌孢子(以下简称孢子)进行成像, 其原因是传统的醛类固定可能引起孢子萌发或结构变化, 而且孢子芯的膜对树脂不渗透, 因此高压冷冻、冷冻替代和树脂包埋休眠孢子的实验均以失败告终。后来, 该实验室利用Cryo-FIB-SEM获得了包含大量休眠孢子的样品体积结构数据, 并在孢子核中发现由局部明亮的信号形成的相互连接, 重构的三维模型像一个丝状网络, 这是以前使用任何其它技术都无法获得的。

2016年, Andreas Schertel实验室使用Cryo-FIB-SEM方法通过镜筒内(in lens)二次电子探测器进行大体积样品成像, 观察海胆胚胎和斑马鱼幼虫尾鳍细胞的超微结构, 通过同时获取二次电子和背散射电子图像可以逐片获取组织超微结构和重元素材料对比/矿物定位的互补信息, 有助于理解不同生物组织的结构和功能(Vidavsky et al., 2016)。该实验的目的是了解细胞如何产生矿化组织以及形成矿化元素与周围膜之间的空间关系。海胆的胚胎骨骼和斑马鱼的幼虫骨骼均由高度不稳定的前体矿物组成, 然而在常规样品制备过程中, 这种前体矿物容易溶解或改变,

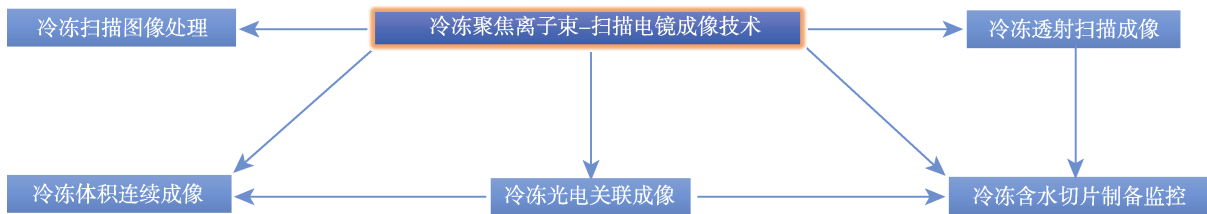


图1 Cryo-FIB-SEM应用领域

Cryo-FIB-SEM应用领域包括冷冻体积连续成像、冷冻光电关联成像、冷冻透射扫描成像、冷冻含水切片制备监控以及冷冻扫描图像处理。

Figure 1 Cryo-FIB-SEM application fields

Cryo-FIB-SEM application fields contain cryo-volume serial imaging, cryo-correlative light and electron microscopy imaging, cryo-transmission scanning electron microscopy imaging, cryo-lamella preparation monitoring, and cryo-SEM image processing.

而冷冻为玻璃化样品后则保存完好。使用Cryo-FIB-SEM方法, 研究人员观察到海胆胚胎样品中的线粒体、多膜体、内质网、高尔基体及丝状伪足等结构, 通过三维视图能更好地了解囊泡在骨针周围的空间方向分布。研究人员还对斑马鱼尾巴样品进行连续成像三维重构, 展示了骨、细胞、血管和细胞外其它区域之间的相互作用, 并发现在一处深度长达20 μm 线粒体的网络中存在电子密度高的矿物颗粒。

由于Cryo-ET对厚样品成像的限制, 后续又开发了FIB-SEM技术以获取大样品的三维结构, 并逐步将其应用于冷冻生物样品, 即Cryo-FIB-SEM冷冻体积连续成像。基于冷冻生物样品的特性, 在使用该方法时还面临低衬度(样品无染色)和低剂量(样品不耐辐照)成像等挑战。随着技术的不断发展, 2021年, Peijun Zhang实验室开发并优化了Cryo-FIB-SEM冷冻体积连续成像用于整个玻璃化细胞的三维可视化工作流程, 并揭示了Ls患者整个细胞和亚细胞的三维结构, 发现Ls患者原代成纤维细胞的结构被破坏(Zhu et al., 2021)。对比FIB-SEM结果, Cryo-FIB-SEM提供了更快捷且真实的全细胞或组织的表型特征, 证明Cryo-FIB-SEM冷冻体积连续成像技术在临床和病理学中具有应用潜力。为了最大限度地优化Cryo-SEM图像的对比度、分辨率与样品总体积、实验时间之间的平衡, 研究人员测试了一些FIB和SEM成像参数, 包括像素尺寸、FIB切片厚度、FIB和SEM探针电流、加速电压、SEM成像驻留时间和平均线数(表1)。实验过程中, 对患者整个成纤维细胞进行切片, SEM成像采用10.5 nm横向像素间距, FIB层厚度为21.0 nm, 成像像素为4 096 $\times$ 3 072, 共切2 018片, 耗时约17.5小时, 产生的样品总体积为58 789 μm^3 。对照组的成像像素是3 072 $\times$ 1 150, 共切575片, 耗时约5.5小时, 产生样品总体积为4 062 μm^3 (具体参数见表1)。实验结果表明, Ls患者的成纤维细胞呈现明显的结构紊乱, 细胞内部被大量来源不明的空泡占据, 线粒体体积明显变小, 高尔基体形态异常。通过三维重构及渲染, 在

对照组细胞中可见扁圆形管状线粒体网络, 而患者细胞的线粒体是分散的, 大多为圆形或椭圆形个体, 线粒体的嵴结构严重紊乱, 数量稀少且较短。患者细胞内的囊泡也明显大于对照, 而且更丰富和密实。

自新型冠状病毒(SARS-CoV-2)爆发流行以来, 人们对体外纯化的病毒成分和灭活病毒结构进行了深入研究。然而, 对原生细胞环境中SARS-CoV-2感染进程的结构和超微结构却无从知晓, 对SARS-CoV-2在细胞中的复制周期也缺乏全面了解。利用Cryo-FIB-SEM系统, Peijun Zhang实验室揭示了接近天然状态下SARS-CoV-2在细胞内的组装和释放路径(Mendonça et al., 2021)。研究结果表明, SARS-CoV-2感染的细胞病变效应在整个细胞水平上是深远的。例如, 在细胞质中有大量各种各样的囊泡用于RNA合成和病毒组装, 其形成的膜通道有利于病毒释放或者从细胞质侵入细胞核。此外, 他们还揭示了病毒RNA如何从双层膜泡运输到病毒组装位点, 病毒刺突和RNPs如何协助病毒组装和出芽, 以及完全组装好的病毒粒子如何脱离细胞。Cryo-FIB-SEM实验结果还显示, 与未感染的细胞相比, 感染细胞中的线粒体经常被破坏。此外, 在感染细胞中常见电子致密的复合膜泡结构, 最显著的特征是细胞核的病变性损伤, 其中可见近一半的细胞核被内陷的细胞质所占据。这项研究首次揭示了SARS-CoV-2复制周期在接近天然条件下的变化。同时, 研究开发的方法和工作流程可广泛应用于其它多种病毒或细菌的感染过程研究。

2 Cryo-FIB-SEM在样品制备领域的应用

近年来, 光电关联(correlative light and electron microscopy, CLEM)技术飞速发展, 该技术通过将来自荧光显微镜(fluorescence microscope, FM)的信息映射到同一样本的电镜数据, 研究罕见、动态或单一成像方法无法描述的细胞活动。然而, 将冷冻光镜(Cryo-FM)成像和Cryo-FIB-SEM结合起来的技术

表1 Cryo-FIB-SEM实验参数总结
Table 1 Summary of serial Cryo-FIB-SEM parameters

	FIB束流 (pA)	SEM束流 (pA)	SEM电压 (kV)	剂量 $\text{pA}\times\text{ns}/\text{\AA}^2$	驻留时间 (ns)	平均 线数	像素尺寸x-y-z (nm)	图像尺寸x-y (像素)	切片数	总体积 (μm^3)	耗时 (h)
对照	700	59	1.9	22.4	200	19	10 $\times$ 10 $\times$ 20	3072 $\times$ 1150	575	4062	5.5
患者	700	35	2.3	21.3	100	61	10.5 $\times$ 10.5 $\times$ 21	4096 $\times$ 3072	2018	58789	17.5

尚未普及。使用光电关联成像,可见特征标志物必须在两种成像模式下被识别,这可以通过观察样品的固有特征来实现,如细胞形状、特定细胞器,或者通过添加基准标志物。添加的标志物不仅可以发荧光,而且在电镜下也不透光,但是添加基准标志物在低温条件下操作通常具有挑战性,尤其是用在冷冻切片上。为攻克这些挑战,并开发三维冷冻光电关联方法, Ori Avinoam实验室提出是否有这样的细胞器,在细胞中含量相对丰富且在Cryo-FIB-SEM成像时易于识别。2021年,该研究组发现荧光标记的脂滴可作为关联Cryo-FM和Cryo-FIB-SEM数据集的原位基准标记物,并且这种方法可在低温条件下用于标定几十微米厚的样本(Scher et al., 2021)。他们的研究表明,Cryo-FIB-SEM成像对研究细胞内的细胞器结构和细胞器间接触、细胞核组织构成和无机物沉积等方面很有帮助。该研究组利用Cryo-FIB-SEM观察到相邻线粒体之间的相互作用、线粒体的嵴和线粒体基质中的小颗粒结构,以及细胞核内的异染色质、核仁、核内斑点和核膜内陷形成的管状结构。这些结果均表明,Cryo-FIB-SEM是研究完整含水细胞中有膜或无膜细胞器三维结构的一种特别有效的方法,尤其是那些常温制样中细胞结构不能完好保存的样品。

利用Cryo-FIB制备适合Cryo-ET的冷冻含水切片技术已在生物学领域广泛应用(Wagenknecht et al., 2015; Guo et al., 2018; Weiss et al., 2019; Li et al., 2021; Zhang et al., 2021),然而在实验流程上仍然具有挑战性且非常耗时,在样品感兴趣区域的保存、冷冻切片的完整性方面尚存在许多问题。为了精准地切到细胞内感兴趣的区域,很多学者对不同尺度冷冻成像方式的工作流程进行了探索(图2)。2020年, Wah Chiu实验室使用高分辨率Cryo-Airyscan扫描共聚焦显微镜确定载网上玻璃化的细胞内荧光目标Z轴方向的位置,然后使用Cryo-FIB-SEM“切割和观察”(mill and view, MAV)成像技术边切边定位,当细胞被切割到包含感兴趣目标的片层时即停止上层减薄,再将细

胞下层减薄,成为一片200 nm厚的冷冻含水切片,最后用冷冻透射电镜Cryo-ET解析感兴趣区域的分子结构细节,从而揭示整个热休克酵母(heat-shock yeast)细胞的细胞器和亚细胞结构的三维分布,包括招募荧光标记的分子伴侣Hsp104蛋白质包体的超微结构(Wu et al., 2020)。

冷冻样品在制备和转移过程中有被污染的风险,导致样品上的切片升温或完全丢失,那么如何保证Cryo-FIB冷冻切片的完整性? Jan A. Post实验室提出了一种原位检测的方法(de Winter et al., 2013),即通过冷冻透射扫描模式(cryo-transmission SEM, Cryo-TSEM)检测冷冻含水切片的完整性以及冷冻样品的玻璃化状态。使用Cryo-TSEM对未染色的样品成像,可直接观察到样品内细胞或细胞内结构,以此来判断是否切到目标物,还可以通过获得晶体的取向衬度图像来区分切片中的晶态冰和非晶态冰区域,以此监控在使用Cryo-FIB制备冷冻含水切片过程中样品是否产生冰晶,从而决定是继续进行下一步冷冻透射电镜Cryo-ET数据收集还是重新开始新一轮Cryo-FIB实验。

上述各项研究虽然建立了Cryo-FIB-SEM作为未染色样本全细胞成像的标准方法,所获得的数据像素大小/体素分辨率已经可以与通过SEM观察到的树脂包埋样品相媲美,但还需要进一步探索能否在不损伤对离子束敏感的玻璃化冷冻生物样品的情况下更好地提高成像衬度,从而提高图像分辨率。2020年, Patrick Schultz实验室将没有经过任何重金属染色的冷冻HeLa细胞,在低温下通过Cryo-FIB-SEM技术使用镜筒内二次电子探测器成像。后期通过对数据集进行对齐、去噪、去除离子束窗帘效应和局部电荷不平衡补偿等一系列处理得到三维重构结果,并获得接近生理状态的整个HeLa细胞内部各细胞器结构的详细视图(Spehner et al., 2020)。研究发现,线粒体、脂质体和溶酶体在细胞内的分布和数量各不相同,线粒体在细胞的一侧极化程度较高,而核孔则均匀分布于

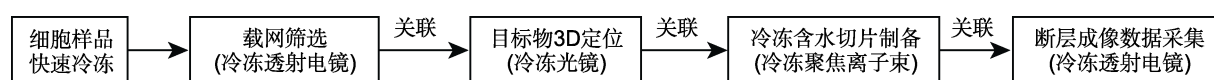


图2 低温条件下通过不同成像平台进行关联成像的实验流程

Figure 2 Experimental workflow including multiple correlative imaging steps under cryogenic conditions via different imaging platforms

整个核膜。该实验室还研究了Cryo-FIB-SEM成像与活细胞蛋白检测相结合的可行性,证明可以通过低电压的背散射电子来检测内化的金颗粒,同时用二次电子探测器获取信号对细胞成像。

3 研究展望

当前技术发展日新月异,总结目前的研究结果发现一个非常有趣的趋势,即不仅要在整个实验过程中控制切片的完整性,而且感兴趣的部位必须精确定位在几百纳米厚度以内,即发展一体化系统(Cryo-CLEM-FIB-TSEM),使原位确定感兴趣的区域、原位制备冷冻含水切片、原位冷冻切片完整性检查和使用具有透射成像能力的冷冻扫描电镜进行原位观察,都在一台仪器中完成。这种一体化解决方案的主要优点是减少在转移过程中样品被污染或丢失的风险,而且低电压和低剂量成像可使更多的信息被记录在断层扫描图中,这使冷冻透射扫描断层成像成为一种极具应用前景的技术,可为未来大体积生物样品三维原位成像研究提供极其强大的工具。

致谢 由衷感谢中国科学院微生物研究所孔照胜团队和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冯韵工程师提供封面图片和相关数据。

参考文献

- Bhawana, Miller JL, Cahoon AB** (2014). 3D Plant cell architecture of *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) using focused ion beam-scanning electron microscopy. *Appl Plant Sci* **2**, apps.1300090.
- de Winter DAM, Mesman RJ, Hayles MF, Schneijdenberg CTWM, Mathisen C, Post JA** (2013). *In-situ* integrity control of frozen-hydrated, vitreous lamellas prepared by the cryo-focused ion beam-scanning electron microscope. *J Struct Biol* **183**, 11–18.
- Guo Q, Lehmer C, Martínez-Sánchez A, Rudack T, Beck F, Hartmann H, Pérez-Berlanga M, Frottin F, Hipp MS, Hartl FU, Edbauer D, Baumeister W, Fernández-Busnadiego R** (2018). *In situ* structure of neuronal C9orf72 Poly-GA aggregates reveals proteasome recruitment. *Cell* **172**, 696–705.
- Hayles MF, De Winter DAM** (2021). An introduction to cryo-FIB-SEM cross-sectioning of frozen, hydrated life science samples. *J Microsc* **281**, 138–156.
- Hoffman DP, Shtengel G, Xu CS, Campbell KR, Freeman M, Wang L, Milkie DE, Pasolli HA, Iyer N, Bogovic JA, Stabley DR, Shirinifard A, Pang S, Peale D, Schaefer K, Pomp W, Chang CL, Lippincott-Schwartz J, Kirchhausen T, Solecki DJ, Betzig E, Hess HF** (2020). Correlative three-dimensional super-resolution and block-face electron microscopy of whole vitreously frozen cells. *Science* **367**, eaaz5357.
- Kizilyaprak C, Stierhof YD, Humbel BM** (2019). Volume microscopy in biology: FIB-SEM tomography. *Tissue Cell* **57**, 123–128.
- Li MJ, Ma JF, Li XM, Sui SF** (2021). *In situ* cryo-ET structure of phycobilisome-photosystem II supercomplex from red alga. *eLife* **10**, e69635.
- Lučić V, Rigort A, Baumeister W** (2013). Cryo-electron tomography: the challenge of doing structural biology *in situ*. *J Cell Biol* **202**, 407–419.
- Mendonça L, Howe A, Gilchrist JB, Sheng YW, Sun DP, Knight ML, Zanetti-Domingues LC, Bateman B, Krebs AS, Chen L, Radecke J, Li VD, Ni T, Kounatidis I, Koronfel MA, Szynkiewicz M, Harkiolaki M, Martin-Fernandez ML, James W, Zhang PJ** (2021). Correlative multi-scale cryo-imaging unveils SARS-CoV-2 assembly and egress. *Nat Commun* **12**, 4629.
- Scher N, Rechav K, Paul-Gilloteaux P, Avinoam O** (2021). *In situ* fiducial markers for 3D correlative cryo-fluorescence and FIB-SEM imaging. *iScience* **24**, 102714.
- Schertel A, Snaidero N, Han HM, Ruhwedel T, Laue M, Grabenbauer M, Möbius W** (2013). Cryo FIB-SEM: volume imaging of cellular ultrastructure in native frozen specimens. *J Struct Biol* **184**, 355–360.
- Spehner D, Steyer AM, Bertinetti L, Orlov I, Benoit L, Pernet-Gallay K, Schertel A, Schultz P** (2020). Cryo-FIB-SEM as a promising tool for localizing proteins in 3D. *J Struct Biol* **211**, 107528.
- Titze B, Genoud C** (2016). Volume scanning electron microscopy for imaging biological ultrastructure. *Biol Cell* **108**, 307–323.
- Vidavsky N, Akiva A, Kaplan-Ashiri I, Rechav K, Addadi L, Weiner S, Schertel A** (2016). Cryo-FIB-SEM serial milling and block face imaging: large volume structural analysis of biological tissues preserved close to their native state. *J Struct Biol* **196**, 487–495.
- Wagenknecht T, Hsieh C, Marko M** (2015). Skeletal muscle triad junction ultrastructure by focused-ion-beam milling of muscle and cryo-electron tomography. *Eur J Transl Myol* **25**, 4823.
- Wagner J, Schaffer M, Fernández-Busnadiego R** (2017).

Cryo-electron tomography—the cell biology that came in from the cold. *FEBS Lett* **591**, 2520–2533.

Wang Q, Huang Y, Ren Z, Zhang X, Ren J, Su J, Zhang C, Tian J, Yu Y, Gao GF, Li L, Kong Z (2020). Transfer cells mediate nitrate uptake to control root nodule symbiosis. *Nat Plants* **7**, 800–808.

Weiss GL, Kieninger AK, Maldener I, Forchhammer K, Pilhofer M (2019). Structure and function of a bacterial gap junction analog. *Cell* **178**, 374–384.

Wu GH, Mitchell PG, Galaz-Montoya JG, Hecksel CW, Sontag EM, Gangadharan V, Marshman J, Mankus D, Bisher ME, Lytton-Jean AKR, Frydman J, Czymmek K, Chiu W (2020). Multi-scale 3D cryo-correlative microscopy for vitrified cells. *Structure* **28**, 1231–1237.

Xu CS, Hayworth KJ, Lu ZY, Grob P, Hassan AM, García-Cerdán JG, Niyogi KK, Nogales E, Weinberg RJ, Hess HF (2017). Enhanced FIB-SEM systems for large-volume 3D imaging. *eLife* **6**, e25916.

Zhang JG, Zhang DY, Sun L, Ji G, Huang XJ, Niu TX, Xu JS, Ma CY, Zhu Y, Gao N, Xu W, Sun F (2021). VHUT-cryo-FIB, a method to fabricate frozen hydrated lamellae from tissue specimens for *in situ* cryo-electron tomography. *J Struct Biol* **213**, 107763.

Zhu Y, Sun DP, Schertel A, Ning JY, Fu XF, Gwo PP, Watson AM, Zanetti-Domingues LC, Martin-Fernandez ML, Freyberg Z, Zhang PJ (2021). Serial cryoFIB/SEM reveals cytoarchitectural disruptions in leigh syndrome patient cells. *Structure* **29**, 82–87.

Advances in Cryo-focused Ion Beam-Scanning Electron Microscopy Imaging Technology

Xing Jia, Fei Sun, Gang Ji*

Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Abstract Cryo-focused ion beam-scanning electron microscopy (Cryo-FIB-SEM) is an emerging technology designed for advanced imaging detection, which performs *in situ* by combining Cryo-FIB milling and Cryo-SEM imaging, and has facilitated the visualization of the native structures of biological sample in the context of the cellular environment in the frozen hydrated state. In recent years, a series of important advances have been achieved in the application of this technology in the research field of life science. In this review, we summarize its application in cryo-volume serial imaging, and in combination with cryo-correlative light and electron microscopy (CLEM), cryo-transmission SEM (TSEM), cryo-lamella preparation monitoring, and Cryo-SEM image processing. We also provide future prospective on future development and application of Cryo-FIB-SEM in three-dimensional *in situ* imaging of large volume biological samples.

Key words cryo-focused ion beam-scanning electron microscopy (Cryo-FIB-SEM), cryo-correlative light and electron microscopy (Cryo-CLEM), cryo-volume serial imaging, cryo-transmission scanning electron microscopy imaging

Jia X, Sun F, Ji G (2022). Advances in cryo-focused ion beam-scanning electron microscopy imaging technology. *Chin Bull Bot* **57**, 24–29.

* Author for correspondence. E-mail: jigang@ibp.ac.cn