

# 组织原位结构的冷冻电子断层成像研究方法与应用实例

李昊 何万中

(分析测试中心生物电镜组 Email:lihao9x@iccas.ac.cn)

## 前言

近年来结构生物学领域正在经历一场从“离体”(in vitro)向“原位”(in situ)研究的深刻变革。单颗粒冷冻电镜分析(Single Particle Analysis, SPA)在原子分辨率水平解析纯化生物大分子结构方面取得了巨大成功,为生物医学研究带来了一场深刻的技术革命<sup>[1]</sup>。然而,单颗粒冷冻电镜分析技术要求将生物大分子从其天然的细胞环境中分离纯化,不可避免地破坏了生物大分子在细胞内的自然分布、复杂的相互作用关系及生理性状态信息。此外,传统的组织样品电镜制样方法,需经过化学固定、脱水和树脂包埋、切片、重金属染色等过程,往往会导致样品严重的变形和生理性结构变化,无法满足对组织原位高分辨率研究需求。因此,如何在保持生物样品近生理状态的前提下,获取其原位高分辨率三维结构信息的冷冻电子断层成像技术(Cryo-electron Tomography, Cryo-ET),正成为当前冷冻电镜领域新的研究热点,许多制约Cryo-ET的关键技术瓶颈亟待攻克<sup>[2]</sup>。

Cryo-ET要求利用物理固定方式——即快速的玻璃化冷冻固定(Vitrification),在毫秒至秒级的时间尺度内将生物样品“定格”在非晶态冰中,从而最大程度地保留了生物大分子的原生构象及其所处的细胞微环境<sup>[3,4]</sup>。通过对同一薄片样品进行一系列倾转成像并重构,Cryo-ET能够揭示细胞器、大分子复合物在纳米尺度下的三维原位结构。本文将重点综述Cryo-ET的技术原理,特别是针对从单层细胞向块状动物组织(Tissue)样品拓展所面临的制样技术挑战(如高压冷冻与离子束减薄),并探讨该技术在解析生理状态和病理状态下组织原位三维结构方面的应用前景<sup>[5,6]</sup>。

## 技术原理

针对不同厚度的生物样品,目前已建立了两套不同的冷冻制样策略。对于厚度小于10~20 μm的样品(如细菌、悬浮病毒或单层培养细胞的边缘区域),通常采用投入式冷冻技术(Plunge Freezing),直接将样品冷冻固定再电镜载网上,然

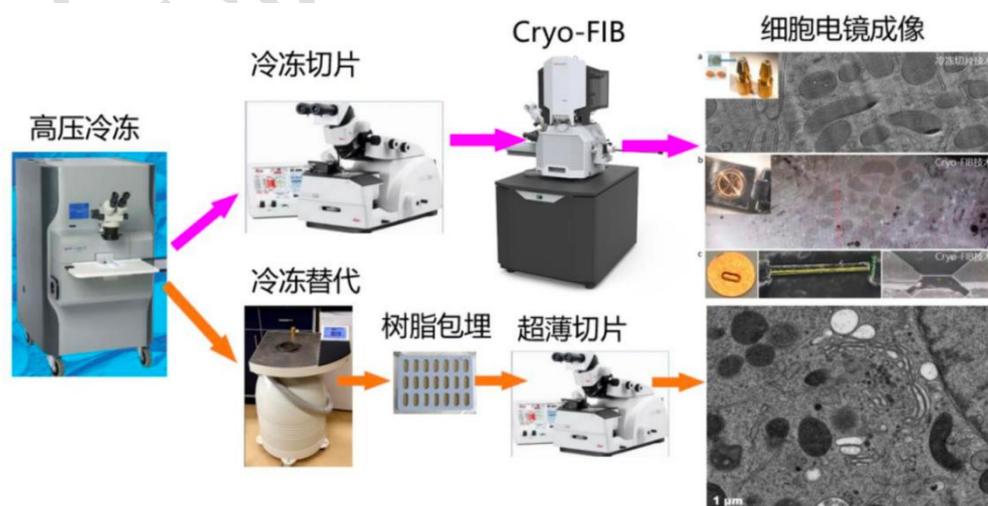
后利用 cryo-FIB 技术减薄制样，目前建立了成熟可靠的制样流程。然而，对于厚度超过 20  $\mu\text{m}$  甚至达到数百微米的块状动物组织，投入式冷冻会产生破坏原位结构的冰晶，必须采用高压冷冻（High-Pressure Freezing, HPF）固定技术，在约 2100 bar 的高压条件下进行瞬时冷冻，从而实现整体组织的快速玻璃化固定<sup>[7,8]</sup>。针对组织样品的 Cryo-ET 制样，需要解决系列技术挑战建立一套新的技术流程（如图 1 所示），主要包含以下四个关键步骤：

（1）组织取样与高压冷冻固定：将实验动物在麻醉状态下进行活体原位快速取样，迅速将组织切至 50  $\mu\text{m}$  以下厚度并装入特制的 D 型铜盘（厚度约 80  $\mu\text{m}$ ，凹槽深度约 50  $\mu\text{m}$ ）。加入适量冷冻保护剂后覆盖蓝宝石片，整个过程需在 1 min 内完成，随后立即进行高压冷冻，以最大程度保留组织的生理状态。

（2）冷冻修块：参考 VHUT-cryo-FIB 方法<sup>[9]</sup>，使用冷冻超薄切片机对玻璃化样品进行第一次修块减薄，将样品厚度修至 20~30  $\mu\text{m}$ ，并将样品盘装入 Autogrid 中，为后续 FIB 减薄做准备。这一步骤可显著缩短后续 FIB 减薄时间，提高制样通量。

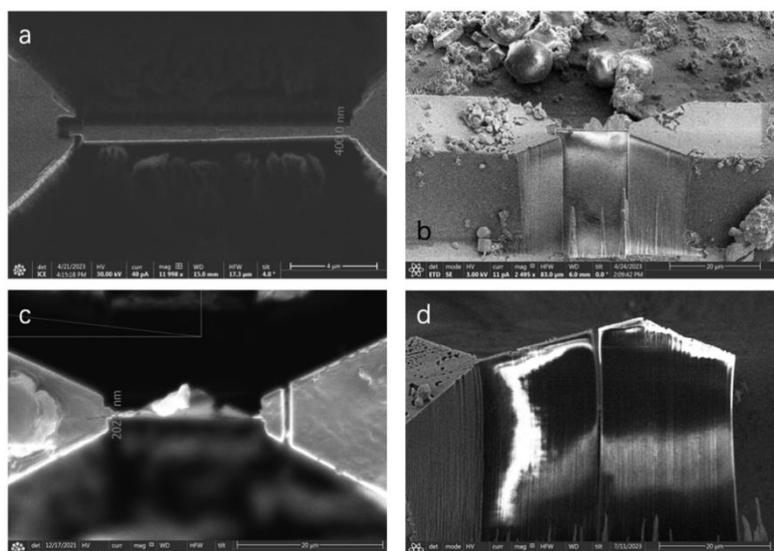
（3）Cryo-FIB 减薄：利用冷冻聚焦离子束（Cryo-FIB）技术对冷冻组织块进行“纳米雕刻”：通过高能镓离子束或等离子束轰击样品，逐步移除目标区域上下的多余物质，最终留下一片厚度小于 300 nm 的薄片（Lamella）供冷冻电镜成像使用<sup>[10,11]</sup>。

（4）数据采集与三维重构：将制备好的薄片转移至冷冻透射电镜中，在 -170  $^{\circ}\text{C}$  以下进行倾转系列数据采集，随后通过加权反投影或迭代重构算法进行三维重构，最终获得断层图像。



**图 1、**两种组织样品的冷冻样品制备和成像方式：一种是通过冷冻替代技术，在常温下拍摄样品的图像；另一种是利用冷冻聚焦离子束（FIB）技术，在完全冷冻状态下进行冷冻电镜成像

上述流程中，Cryo-FIB 减薄是最具挑战性的环节。大块组织样品在减薄过程中会释放巨大的内应力（通常比单层细胞高出一个数量级），极易导致薄片弯曲、破裂，制备成功率极低<sup>[12]</sup>。传统的应力释放方案，如单边应力释放槽、梳子状（Furrow-Ridge）结构等，在实际操作中均存在明显局限：单边切口无法有效释放应力，薄片中部仍易破裂；而梳子状结构虽能提供一定的机械支撑，但其“山脊”在电镜倾转时会严重遮挡成像视野，导致有效倾转角度受限（图 2）。



**图 2、**不同应力槽方案尝试：(a) 单边小应力槽 (b) 单边大应力槽 (c) 单边切出一条缝 (d) 切断一边但薄片较大

目前，针对上述难题已发展出两种有效的解决策略：

其一为“对称切口应力释放方案”<sup>[11]</sup>（图 3）。该方案的核心思路是：当薄片减薄至约 2 μm 厚度时，先在中部切出一条 0.5~1 μm 宽的缝隙，随后继续将两侧分别减薄至 300 nm 以下，最终形成两个宽度约 5 μm 的独立薄区。

该设计的优势在于：

(1) 每侧薄片因悬臂长度短 (<5 μm) 而具备良好的机械稳定性，不易弯曲破裂；

(2) 对称结构使两侧应力分布均匀，避免了单边切断导致的翘曲问题；

(3) 两薄区在 TEM 倾转采集时可提供连续的有效视野，不存在遮挡问题。

采用该方案后，厚度小于 300 nm 薄片的制备成功率可稳定达到 90 % 以上。

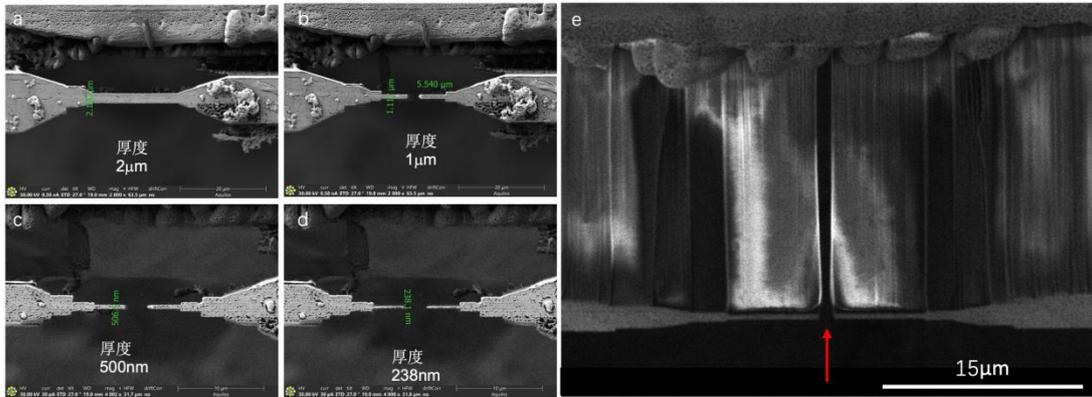


图 3、对称切口应力释放方案实例：(a-d) 为薄片减薄过程，在减薄至 2 μm 的时候先将中间切一个 0.5~1 μm 宽度的缝隙，再逐步将两边减薄至 300 nm 以下 (e) 为 sem 下的效果，红色箭头为中间缝隙，两边薄片宽度在 5 μm 左右

其二为 Cryo-Lift-Out 技术<sup>[13]</sup> (图 4)。该方法借鉴材料科学领域的 lift-out 技术，使用冷冻机械臂通过再沉积 (redeposition) 方式将样品与机械臂牢固连接，随后切割三条缝隙将目标区域从大块样品中完整取出。取出的样品块被转移至预先修出约 20 μm 宽槽的 TEM 载网上，再进行后续减薄。

该技术的优势在于：

(1) 样品在转移过程中应力得到充分释放，后续减薄时不易破裂；

(2) 对高压冷冻样品的初始质量要求较低，即使存在局部冰晶损伤也可通过精准提取避开；

(3) 可在同一载网上制备多个薄片，显著提高制样通量。该方法尤其适用于厚度较大或结构异质性较强的组织样品。

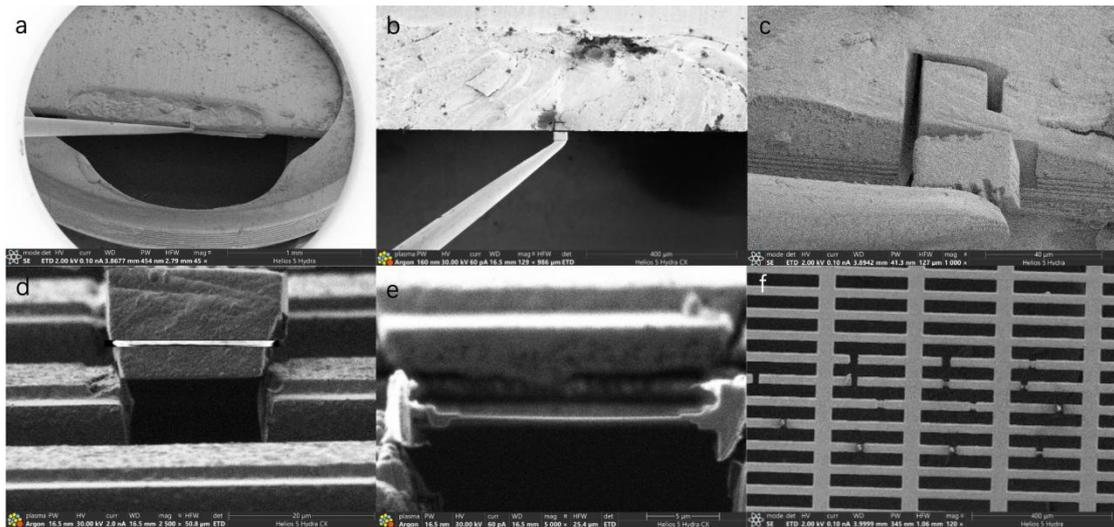


图 4、改进的 Lift-out 流程：(a) 将机械臂用反沉积的方式粘住样品 (b-c) 切 3 条缝并将样品取出 (d) 放入预先修出 20  $\mu\text{m}$  宽度槽的载网将样品搭上去并修下一块厚 5 $\mu\text{m}$  左右的样品 (e) 将样品在载网上减薄 (f) 最终在载网上呈现的效果

冷冻电子断层技术原理要求采集系列倾转样品的投影像然后进行三维重构 (图 5)。在低温 (约  $-170\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) 条件下, 样品台携带玻璃化冷冻样品在电子束下进行一定角度范围 (通常为  $-60^{\circ}$  至  $+60^{\circ}$ ) 的连续倾转, 每旋转一个微小角度采集一张二维投影图像, 形成一套倾转系列 (Tilt Series)。随后, 利用加权反投影 (Weighted Back-projection) 或迭代重构算法将这些二维投影反演为三维密度图 (Tomogram) [14]。然而, 电子束在穿透样品时会发生非弹性散射, 导致图像信噪比随样品厚度增加而急剧下降。对于常规 300 keV 透射电子显微镜而言, 能够实现高质量成像的样品厚度物理极限通常在 500 nm 以内。这一物理限制意味着, 除了边缘较薄的贴壁细胞或微小的病毒颗粒外, 绝大多数真核细胞及生物组织样品都无法直接进行透射成像, 必须经过精细的减薄处理。

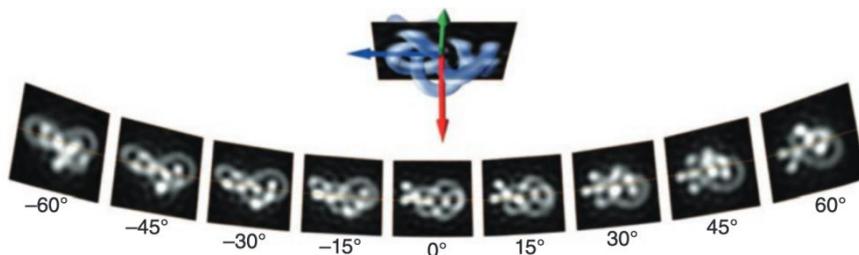


图 5、断层成像的数据采集与三维重构。目标样品 (蓝色结构) 在坐标系中绕倾斜轴 (红色箭头) 旋转, 同时接受来自正交方向 (绿色箭头) 的穿透式照明。在不同的旋转角度 ( $-60^{\circ}$

至 60°) 下, 采集得到一系列二维投影图像 (下图)。这些二维投影数据将用于后续的反投影计算, 以重构目标的三维体积。

重构得到三维断层图后, 如何从极低信噪比 (SNR) 的电子断层图中提取高分辨率结构信息是另一大挑战。子断层平均技术 (Subtomogram Averaging, STA) 可以用来提取重复结构的高分辨率信息。该技术基于一个假设: 即生物样品中存在大量结构相同的重复单元 (如核糖体、病毒衣壳蛋白等)。通过从三维重构体中提取成千上万个这样的子体积 (Subtomograms), 并在三维空间中对它们进行平移和旋转对齐, 最后叠加平均, 可以显著消除随机噪声, 将分辨率提升至近原子水平<sup>[15]</sup>。这一技术使得 Cryo-ET 不仅能看清细胞的“轮廓”, 更能解析分子的“细节”<sup>[16]</sup>。

### 典型应用与研究进展

Cryo-ET 技术最早在较薄的单细胞及微生物样品中取得了突破性应用。在细菌、古菌以及真核细胞的边缘区域, 研究人员利用该技术成功解析了细菌鞭毛马达的原位组装机制、核糖体在细胞质中的多聚体状态以及病毒侵染宿主细胞的动态过程。这些研究不仅验证了 Cryo-ET 在近生理状态下解析超微结构的能力, 也为后续的技术拓展积累了宝贵经验。然而, 基于单层细胞培养 (2D Cell Culture) 的研究体系存在天然局限性: 它们往往缺乏细胞外基质 (ECM) 的三维支撑, 且细胞极性、基因表达谱系及信号转导通路与体内真实环境存在显著偏差<sup>[17][18]</sup>。例如, 许多细胞间原位结构需要在组织样品中才能观察到, 如细胞间连接、肌肉神经连接、多种细胞互作等, 因此迫切需要实现组织原位结构的 Cryo-ET 成像技术。

有效整合高压冷冻术与 Cryo-FIB 制样技术制作出冷冻薄片组织样品后, 可利用 Cryo-ET 解析一些关键原位结构。以神经肌肉接头 (Neuromuscular Junction, NMJ) 为例 (图 6), 其生理功能的实现高度依赖于运动神经元末梢、突触后肌纤维膜以及末端施旺细胞 (Terminal Schwann Cells) 三者构成的“三方突触”精密结构<sup>[19]</sup>。这种跨细胞类型的复杂连接涉及突触前膜活性区与突触后膜乙酰胆碱受体簇的精确对齐, 在解离的单细胞体系中根本无法重现。通过对小鼠骨骼肌组织

进行原位 Cryo-ET 分析,研究者不仅能观察到突触间隙中神经递质受体的原位分布,还能解析施旺细胞如何通过复杂的膜突起包裹神经末梢,从而揭示组织特异性微环境对神经信号传递的调控机制<sup>[20]</sup>。这种在组织层面保留细胞间相互作用网络的能力,是 Cryo-ET 区别于其他结构生物学方法的独特优势。

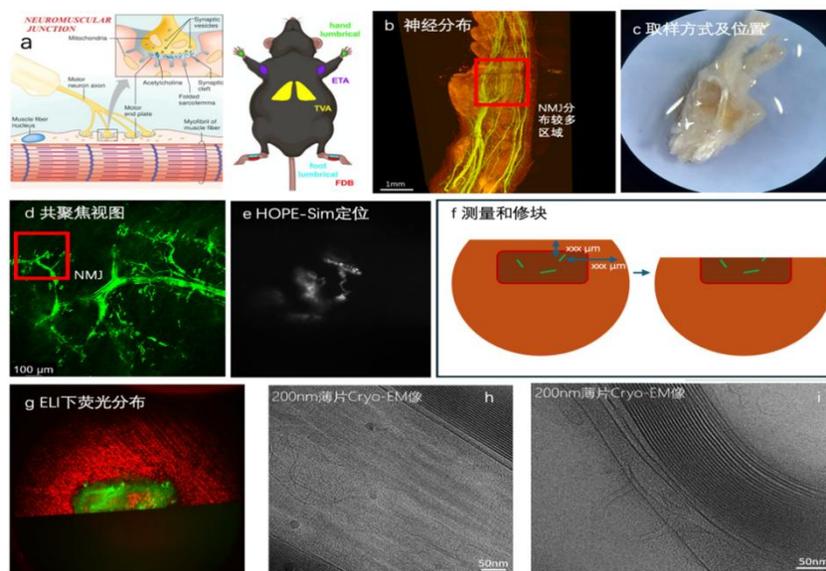


图 6、Thy1-GFP 小鼠（北京脑科学与类脑研究所赵瑚组提供小鼠）(a) NMJ 示意图和位置；(b) 在老鼠前爪的神经分布,红框内为 NMJ 分布较多的区域,根据分布区域决定取样方案(c); (c) 直接从中间剪断,从前爪手心贴近指骨处提取样品,可以保证精准取样；(d) 在共聚焦中拍到 NMJ 形态；(e) 将样品进行高压冷冻以后在 HOPE-Sim 当中成像进行粗定位；(f) 找到大概位置之后记录距离铜盘边缘的位置,然后修块至目标区域；(g) 将切到位置的铜盘放在 ELI 下面找到目标位置并切割标记；(h,i) 最终在 Cryo-EM 下拍到的神经髓鞘。

在临床转化与病理学研究领域, Cryo-ET 正成为连接分子病理与组织形态学的桥梁。例如,在阿尔茨海默病 (AD) 和帕金森病 (PD) 的研究中,传统病理切片仅能提供淀粉样斑块或路易小体的宏观分布信息,而缺乏分子层面的细节。最新的研究利用 Cryo-ET 技术,直接在死后人脑组织或疾病模型小鼠的脑组织切片中,解析了淀粉样蛋白和 Tau 蛋白聚集体在原位环境下的纤维结构及其与周围细胞器 (如线粒体、内质网) 的病理互作<sup>[21]</sup>。这些高分辨率的原位结构数据,揭示了病理蛋白聚集体如何物理性地破坏细胞膜系统或干扰细胞运输,为理解疾病

的致病机理及开发针对性的阻断药物提供了前所未有的结构基础。

## 总结与展望

综上所述，冷冻电子断层成像技术（Cryo-ET）通过整合高压冷冻、聚焦离子束减薄及先进的图像重构算法，目前已经成功实现了从单细胞到复杂组织样品的原位结构解析，为理解生物大分子在组织原位状态下的功能机制提供了革命性的工具。然而，我们必须清醒地认识到，该技术在组织样品应用中仍面临严峻挑战：特别是针对厚度大于 20  $\mu\text{m}$  的哺乳动物组织，Cryo-FIB 减薄过程耗时极长且极易因应力释放导致样品破裂，制样成功率和通量依然较低<sup>[12]</sup>。此外，在海量断层数据中精准定位目标分子的难度也随着样品复杂度的增加而指数级上升。展望未来，随着自动化制样技术（如自动 Lift-out）的成熟、光电联用技术（CLEM）定位精度的提升以及人工智能辅助的数据处理流程的引入<sup>[13]</sup>，Cryo-ET 有望突破现有的通量瓶颈，成为解析复杂组织及临床病理机制的利器。

## 参考文献：

1. Sali, A., et al., From words to literature in structural proteomics., *Nature*, **2003**, 422, 6928, 216.
2. Asano, S., et al., In Situ Cryo-Electron Tomography: A Post-Reductionist Approach to Structural Biology. *J. Mol. Biol.*, **2016**, 428, 332.
3. Berger, C., et al., Cryo-electron tomography on focused ion beam lamellae transforms structural cell biology. *Nat. Methods*, **2023**, 20, 499.
4. Turk, M. and W. Baumeister, The promise and the challenges of cryo-electron tomography. *FEBS Lett.*, **2020**, 594, 3243.
5. F. Förster and A. Briegel, Cryo-Electron Tomography: *Structural Biology in situ*, **2024**, Springer International Publishing.
6. Kixmoeller, K., et al., Bridging structural biology and clinical research through in-tissue cryo-electron tomography. *EMBO J.*, **2024**, 43, 4810.
7. Studer, D., et al., Vitrification of articular cartilage by high-pressure freezing. *J. Microsc.*, **1995**, 179, 321.

8. Studer, D., et al., Electron microscopy of high pressure frozen samples: bridging the gap between cellular ultrastructure and atomic resolution. *Histochem. Cell Biol.*, **2008**, *130*, 877.
9. Zhang, J., et al., VHUT-cryo-FIB, a method to fabricate frozen hydrated lamellae from tissue specimens for in situ cryo-electron tomography. *J. Struct. Biol.*, **2021**, *213*, 107763.
10. Marko, M., et al., Focused-ion-beam thinning of frozen-hydrated biological specimens for cryo-electron microscopy. *Nat. Methods*, **2007**, *4*, 215.
11. Wang, S., et al., CryoFIB milling large tissue samples for cryo-electron tomography. *Sci. Rep.*, **2023**, *13*, 5879.
12. Wolff, G., et al., Mind the gap: Micro-expansion joints drastically decrease the bending of FIB-milled cryo-lamellae. *J. Struct. Biol.*, **2019**, *208*, 107389.
13. Schaffer, M., et al., A cryo-FIB lift-out technique enables molecular-resolution cryo-ET within native *Caenorhabditis elegans* tissue. *Nat. Methods*, **2019**, *16*, 757.
14. Dubochet, J., et al., Cryo-electron microscopy of vitrified specimens. *Q. Rev. Biophys.*, **1988**, *21*, 129.
15. Zhang, P., Advances in cryo-electron tomography and subtomogram averaging and classification. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2019**, *58*, 249.
16. Hylton, R.K. and M.T. Swulius, Challenges and triumphs in cryo-electron tomography. *iScience*, **2021**, *24*, 102959.
17. Pampaloni, F., et al., The third dimension bridges the gap between cell culture and live tissue. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2007**, *8*, 839.
18. Kapałczyńska, M., et al., 2D and 3D cell cultures - a comparison of different types of cancer cell cultures. *Arch. Med. Sci.*, **2018**, *14*, 910.
19. Barik, A., et al., Schwann Cells in Neuromuscular Junction Formation and Maintenance. *J. Neurosci.*, **2016**, *36*, 9770.
20. Nishimune, H. and K. Shigemoto, Practical Anatomy of the Neuromuscular Junction in Health and Disease. *Neurol. Clin.*, **2018**, *36*, 231.
21. Gilbert, M.A.G., et al., CryoET of amyloid and tau within postmortem Alzheimer's disease brain. *Nature*, **2024**, *631*, 913.

分析测试中心编制