

# 光电融合超分辨生物显微成像系统

中国科学院生物物理研究所

## 仪器研发背景

超分辨率光学显微成像技术能够在纳米尺度确定生物分子的精确定位。近年来，该技术得到快速的发展，为光镜-电镜融合成像（以下简称“光电融合成像”）带来了新的发展契机。光电融合成像可以在成像尺度和分辨率上将结构生物学和细胞生物学两大研究领域结合起来，利用超分辨率光学显微技术对目标生物分子进行纳米分辨率定位，通过电镜三维重构技术获取荧光指示部位的微观结构信息，将定位信息和周边亚细胞结构信息进行整合和处理，从而获得大量关于生物分子相对于细胞器的三维空间位置信息，并由此绘制出细胞和生物个体内生物分子的三维纳米精度分布地图，甚至最终可以通过多个生物分子的配准和平均获取其原位原子分辨结构信息。

当前，光电融合成像被认为是结构细胞生物学（structural cell biology）这一新兴学科的核心关键技术，已成为国际竞争的焦点。2012年，在国家自然科学基金委员会的支持下，中国科学院生物物理研究所组织优势研究队伍，开始了国家重大科研仪器设备研制专项“光电融合超分辨生物显微成像系统”的研制工作。光电融合超分辨生物显微成像系统的研制，在该研究领域达到领先水平，推动结构细胞生物学研究进入从体外到原位研究的新层次，促进超分辨光学显微成像和电子显微成像在国内的普及和应用，同时也将有助于原创性重大成果的产出。

## 取得的进展

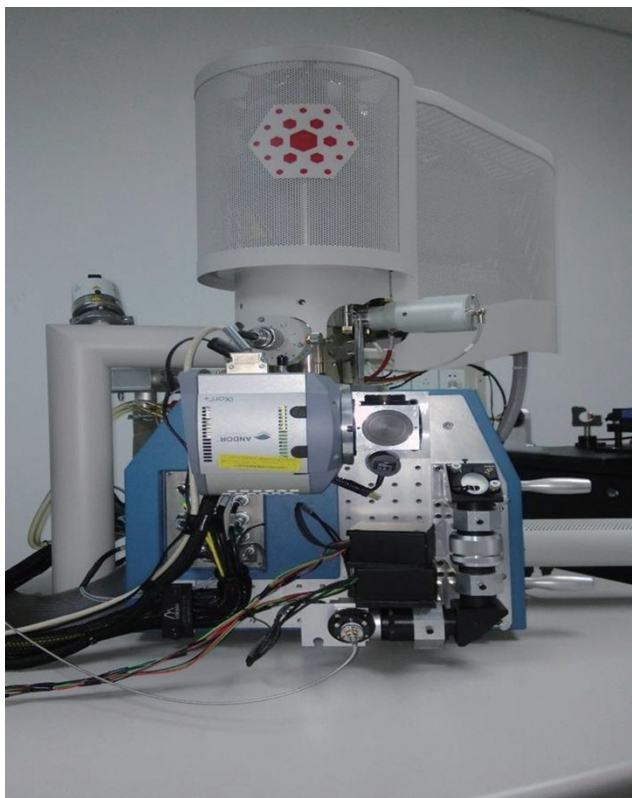
该项目是首批立项的国家重大科研仪器设备研制专项，也是当年生命科学领域唯一立项的项目。项目负责人徐涛院士带领项目组历经4年攻关，研制出了处于国际领先水平的设备级系统，并在超分辨光电融合成像领域取得了一系列相关的研究成果。

项目组所研制的光电融合超分辨生物显微成像系统首次实现了冷冻三维超分辨成像与冷冻透射电镜融合成像、片层光超分辨成像与扫描电镜融合成像，达到并优于项目任务书原定的技术指标，发展的超分辨光电融合成像技术对生命科学前沿领域的发展有着重要意义。该仪器利用超分辨光学显微成像技术获得目标蛋白在生物样品内部的定位和分布等特异性信息，同时利用电镜成像技术获得同一样品的超微结构信息。通过图像处理将光学定位信息与电子显微镜的高分辨率精细结构信息匹配关联，并对两种技术进行有机融合，构成一种新的能够同时提供高分辨率和高特异性的成像方法。该方法可用于系统地研究生物分子机器在细胞内的分布、原位结构以及动态变化等。

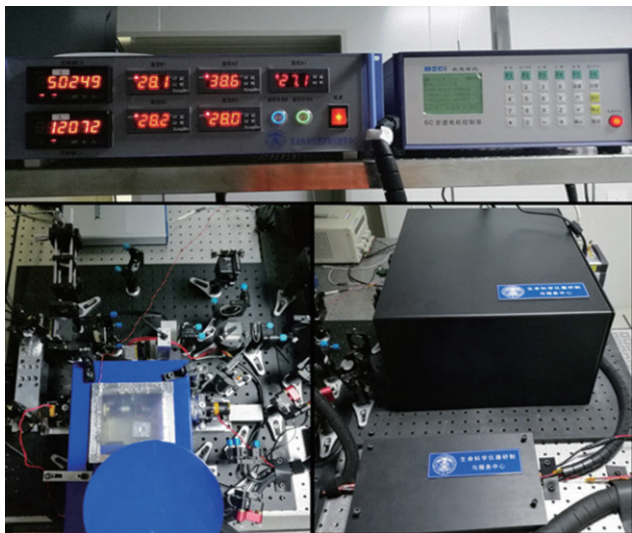
仪器研制过程中，项目组在发展新的超分辨荧光探针和超分辨成像算法、超分辨仪器设备研制和新技术方法等领域取得了显著成果，先后在 *Nature Methods*、*PNAS*、*Cell Research*、*Scientific Reports* 等国际知名专业期刊上发表高水平论文7篇，并申请发

执笔人：徐涛，贾策

明专利 5 项，其中 3 项已获得授权。项目负责人徐涛院士曾受邀在 2015 年三维电子显微镜戈登会议（2015 Gordon Research Conference on Three-Dimensional Electron Microscopy）上做了题为“冷冻含水样品的超分辨光电融合成像”的学术报告，获得了同行的广泛认可和一致好评。



厚样品片层荧光和扫描电镜融合成像系统



冷冻超分辨光电融合成像系统

与此同时，项目在工程技术人才培养方面也探索出了新的机制，形成了一支有特色的生命科学仪器研制团队。该项目进展顺利、成果突出，是第一个提前一年结题的国家自然科学基金委员会重大仪器研制专项。

## 独创性

项目研制的光电融合超分辨生物显微成像系统有效结合了超分辨光学显微成像技术和电子显微镜的成像特点，在生物样品成像中实现了高分辨率和高特异性的结合。在研究尺度和分辨率上，该仪器通过冷冻超分辨率光学显微技术对目标分子进行纳米分辨率定位，借助冷冻电子三维重构技术获取相应部位的高分辨率三维结构，实现了结构生物学和细胞生物学两大研究领域的结合。该仪器的主要创新点体现在以下 5 个方面。

（1）原位切片、光片层成像和扫描电镜成像一体化设计是项目中突出的原始创新，其实现上非常具有挑战性，其一体化设计和搭建也是项目的关键技术突破。

（2）为了能够在冷冻透射电镜提供高分辨率结构信息的同时得到目标生物分子分布的特异性信息，项目开发了低温（液氮温区）光学超分辨显微成像系统。

（3）首次实现了冷冻样品的三维超分辨光电融合成像，侧向分辨率比之前报道的提高了一个数量级。

（4）发展了新型的基于人工神经网络的单分子定位算法，能够达到更高的定位精度以及更快的计算速度，定位误差受单分子运动状态以及离焦等情况的影响显著小于传统的单分子定位算法。

（5）发展了新型支撑膜系统，解决了激光照射引发冷冻生物样品去玻璃态的技术难题。

## 应用仪器产生的代表性科研成果

目前，应用研制的光电融合超分辨生物显微成像系统，已首次在哺乳动物细胞上实现了荧光标记的线粒体外膜蛋白的冷冻超分辨三维荧光成像和线粒体膜结构的电镜图像的纳米精度融合成像。

同时，该仪器的研制过程也推动了超分辨荧光探针（mEos3 和 mGeos 系列）的发展。新探针被 *Nature Methods* 和国际知名蛋白质资源网站（PSI/SBKB）作为新的工具专门介绍；其中 mEos3.2 已在国内外超过 200 家实验室得到广泛使用，应用该探针的研究成果发表在 *Cell*、*Nature Methods* 等国际一流杂志。该仪器已用于

回答重要生物学问题。例如，用于研究 HID-1 蛋白的定位和功能；与中国科学院上海药物研究所高召兵研究员合作，诠释了“一个电压门控钾离子通道需要几个电压感受单元”这一问题；与中国科学院生物物理研究所刘光慧研究员合作，验证了一种新型基因组 DNA 三维成像探针。

### 专家点评

该仪器首次实现了冷冻单分子荧光超分辨成像与低温透射电镜成像融合、片层光超分辨成像与扫描电镜成像融合，处于国际领先水平。光电融合新模式成像已应用于线粒体、核膜和染色质等研究中，对生命科学的发展有着重要意义，有助于解决生命科学领域中难点问题，拓展新的前沿领域。

——程和平，中国科学院院士，北京大学教授