

## 荧光导航冷冻聚焦离子束减薄技术的研究进展

李尉兴<sup>1</sup>, 卢婧<sup>1</sup>, 肖珂<sup>1</sup>, 纪伟<sup>1,2,3\*</sup><sup>1</sup>中国科学院生物物理研究所交叉科学所重点实验室, 北京 100101;<sup>2</sup>生物岛实验室光学成像和检测技术研发创新中心, 广东广州 510320;<sup>3</sup>中国科学院大学生命科学学院, 北京 100049

**摘要** 细胞超微结构的原位解析是当前的一个研究热点。冷冻电子断层扫描成像技术(cryo-ET)是目前细胞原位结构解析的核心技术。cryo-ET 只能对厚度小于 300 nm 的样品进行成像,因此利用 cryo-ET 研究细胞超微结构时首先需要对细胞进行减薄。聚焦离子束(FIB)切割是目前冷冻生物样品减薄的主流技术。传统 FIB 切割只能在细胞的任意位置上进行“盲切”,无法对细胞内部特定研究目标进行定点切割。光电融合成像技术(CLEM)恰可解决这一问题。CLEM 利用荧光成像技术识别并定位研究目标,通过光电图像的关联匹配,可在 FIB 图像中确定荧光目标的位置,进而指导 FIB 的定点减薄。针对荧光导航 cryo-FIB 减薄的相关技术方法、仪器设备和工作流程进行了梳理,分析对比了主流方案的优缺点,旨在帮助研究者选择出合适的荧光导航 FIB 减薄方案,并对该技术的未来发展方向进行了展望。

**关键词** 生物学; 冷冻电子断层扫描成像技术; 扫描电镜; 荧光成像技术; 快速冷冻; 聚焦离子束减薄; 光电融合成像技术

中图分类号 Q-31

文献标志码 A

DOI: 10.3788/CJL230469

## 1 引言

真核细胞内部有着十分丰富的超微结构,包括各种细胞器(内质网、高尔基体、溶酶体、线粒体、中心体等)以及各类生物大分子复合体(蛋白酶体、核糖体、核小体等)。这些超微结构具有精细的分工和特定的功能,但又不是孤立工作的,而是通过交互作用紧密协作以实现某项特定的生理功能。将超微结构单独提纯出来的传统研究方法已经无法满足最新的科研需要。只有在细胞原位获取的形态、丰度、分布和相互作用等信息,才能客观完整地反映出真实的生理过程,因此细胞原位结构解析是目前的一大研究热点。

冷冻电子断层扫描成像技术(cryo-ET)是目前原位结构解析最前沿的技术<sup>[1-2]</sup>。该技术的理论基础是 1968 年由 De Rosier 和 Klug<sup>[3]</sup>提出的三维重构原理,即通过对同一区域进行多角度的透射电子成像后,再反向计算便可重构出成像对象的三维信息。这个理论将透射电镜成像从二维时代带入了三维时代。20 世纪 80 年代, Dubochet 等<sup>[4]</sup>发展了快速冷冻技术,将含水生物样品在近乎天然的生理状态下冷冻固定于非晶冰中<sup>[5-6]</sup>,解决了传统电镜样品制备方法脱水失活的问题。高保真的样品制备和高分辨的三维解析开启了利

用 cryo-ET 解析细胞原位结构的时代<sup>[7-9]</sup>,极大地加深了人们在细胞层面对生命的认知。

cryo-ET 的一个局限是其只能观察厚度在几百纳米以下的样品<sup>[10]</sup>,因为主流 300 kV 透射电镜的电子束只能穿透 300 nm 左右的冷冻样品<sup>[11]</sup>。有限的成像深度在很大程度上限制了 cryo-ET 的应用范围,因为真核细胞的厚度有几个微米,组织样品的厚度达到百微米甚至毫米级别,这些样品都无法直接利用 cryo-ET 进行观察。要用 cryo-ET 对生物样品进行成像,首先要将样品减薄成 200 nm 左右的薄片。

冷冻聚焦离子束(cryo-FIB)切割是近年来发展出的一项冷冻生物样品减薄技术<sup>[12]</sup>。该技术使用高能粒子(镓、氦、氙、氧、氩离子等)轰击样品表面,移除部分物质以实现减薄<sup>[13]</sup>。相较于传统的超薄切片技术,cryo-FIB 可以有效避免机械切割过程中的样品扭曲、崩裂、变形等问题<sup>[14-15]</sup>,适用于微小细胞切片的制备,逐渐成为 cryo-ET 样品减薄的主流方法<sup>[16-17]</sup>。

cryo-FIB 切割的一个先天缺陷是无法对细胞内部的特定目标进行定点减薄。聚焦离子束(FIB)或扫描电镜(SEM)成像只能勾勒出细胞浅表的形貌信息,无法看到细胞内部的情况,因此难以对特定细胞结构进行识别和定位。利用 FIB 在细胞任意位置上进行盲切

收稿日期: 2023-01-31; 修回日期: 2023-03-02; 录用日期: 2023-03-02; 网络首发日期: 2023-03-13

基金项目: 国家自然科学基金(62105356)、国家杰出青年科学基金(T2225020)

通信作者: \*jiwei@ibp.ac.cn

的传统方法只能大概率命中丰度较高的细胞器(如高尔基体、线粒体等),而对于稀疏的细胞结构(如线粒体等),FIB盲切几乎不可能准确命中<sup>[18]</sup>。因此,精准制备含有特定目标的冷冻生物样品切片成为 cryo-FIB 技术的一个难题,也成为影响 cryo-ET 应用范围的一个重要因素。

光电融合成像技术(CLEM)<sup>[19-22]</sup>可以弥补电镜成像无法特异性识别研究目标的缺陷。CLEM 利用荧光成像技术(FIM)来表征特定的研究对象,再通过光电图像的配准,确定研究对象在电镜图像上的位置,进而辅助电镜数据的筛选和分析,已被广泛应用到透射电镜<sup>[23-27]</sup>和扫描电镜<sup>[28-29]</sup>的原位结构解析研究中。此外,CLEM 也被用来引导 FIB 的定点切割<sup>[30]</sup>,通过光镜和 FIB 图像的关联配准,可在 FIB 图像上定位研究目标,从而实现“有的放矢”的定点减薄,解决了传统 FIB “盲切”的问题,拓展了 cryo-ET 的应用范围。本文围绕冷冻细胞的荧光导航 FIB 减薄,对相关的技术方法、仪器设备和工作流程进行了梳理,旨在帮助研究者选择出合适的样品减薄方案,精准高效地制备含有研究目标的冷冻细胞切片,提高 cryo-ET 的效率和成功率。

## 2 荧光导航 FIB 减薄相关核心技术

### 2.1 细胞快速冷冻技术

#### 2.1.1 概述

电镜(EM)的成像环境为高真空,为了对含水生物样品进行电镜观察,首先将样品固定在真空兼容的状态中。传统的电镜样品制备方法包括染色、化学固定、脱水、树脂包埋、切片等一系列操作<sup>[31]</sup>,这种基于化学固定的方法会引入不同程度的假象,影响细胞超微

结构解析的真实性。为了解决化学固定造成的样品失真问题,人们尝试利用冷冻的方法固定生物样品。含水样品的冷冻固定必须避免晶体冰的形成,因为晶体冰不仅会刺破样品的微观结构,还会形成絮状衬度,影响透射电镜(TEM)的观察。为此人们发明了高压冷冻<sup>[32]</sup>和快速冷冻两种方法,分别对较厚的组织样品(厚度在 500  $\mu\text{m}$  以内)和较薄的细胞、生物大分子样品(厚度在 20  $\mu\text{m}$  以内)进行冷冻固定<sup>[33]</sup>,可将生物样品在近乎天然的生理状态下固定在非晶态冰中<sup>[34]</sup>(图 1)。高压冷冻是在冷冻样品的过程中向样品施加高达 210 MPa 左右的压力,将水的成核温度降低至 181 K<sup>[35]</sup>以抑制晶态冰的形成。快速冷冻则将薄样品迅速投入到制冷剂(通常是液态乙烷或丙烷)中,制冷剂的高热容和高导热率快速带走热量,可在晶体冰形成前完成样品的非晶态固定。

#### 2.1.2 载网和支撑膜

快速冷冻细胞样品的第一步是选择合适的载网和支撑膜。载网的材质通常为铜、钼、金等金属。固定细胞悬浮液一般会选择铜、钼等硬度较高的载网,避免冻样和转移过程中载网变形导致的样品破损。如果在载网上直接培养细胞,则选择毒性较小的金网。

载网上需覆盖一层有机支撑膜。支撑膜可以填补金属梁间的空隙,起到承托细胞的作用,通常选择带有孔洞的膜,方便冻样时从载网反面吸走多余的液体。孔洞可以为规则排列的形状,如商业化的 Quantifoil [图 2(a)];也可以为不规则形状,如微栅[图 2(b)]。支撑膜表面通常还会喷镀一层碳膜以增强样品导电性,提高电镜成像质量。带有坐标的载网也是很好的选择[图 2(c)],坐标可以辅助定位,方便找到研究目标。

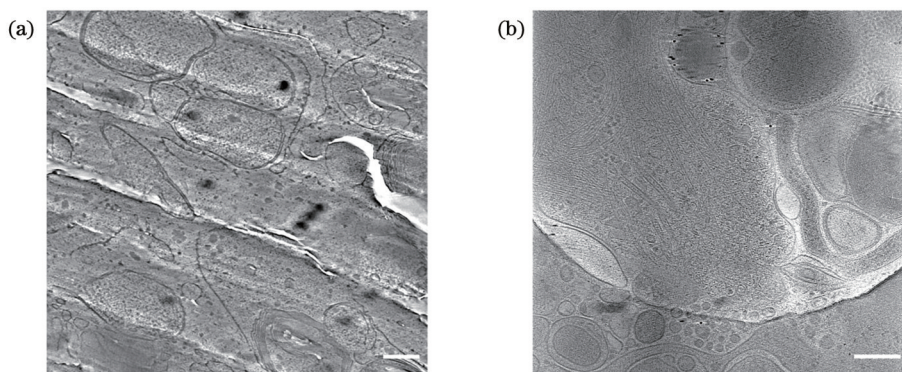


图 1 冷冻固定非晶冰中的生物样品(标尺:200 nm)。(a)利用高压冷冻固定的 U2OS 细胞超薄切片的透射电镜图像;(b)利用快速冷冻固定的 PC12 细胞的透射电镜图像

Fig. 1 Biological samples cryo-fixed in vitreous ice (scalebar: 200 nm). (a) TEM image of lamella of U2OS cell vitrified using high pressure freezing; (b) TEM image of PC12 cell vitrified using plunge freezing

载网的目数以每孔容纳若干细胞为宜[图 2(d)]。过高的目数会导致孔隙过密,使大多数细胞落在金属梁上,无法进行切割;过低的目数会导致孔隙过疏,载网支撑力变弱,冻样过程中容易造成支撑膜破裂。

#### 2.1.3 快速冷冻设备

快速冷冻设备在 20 世纪 80 年代由实验室开发<sup>[36-39]</sup>,经过几十年的发展,已形成众多成熟的商业化产品(图 3)。这些商业化设备可实现自动或半自动的



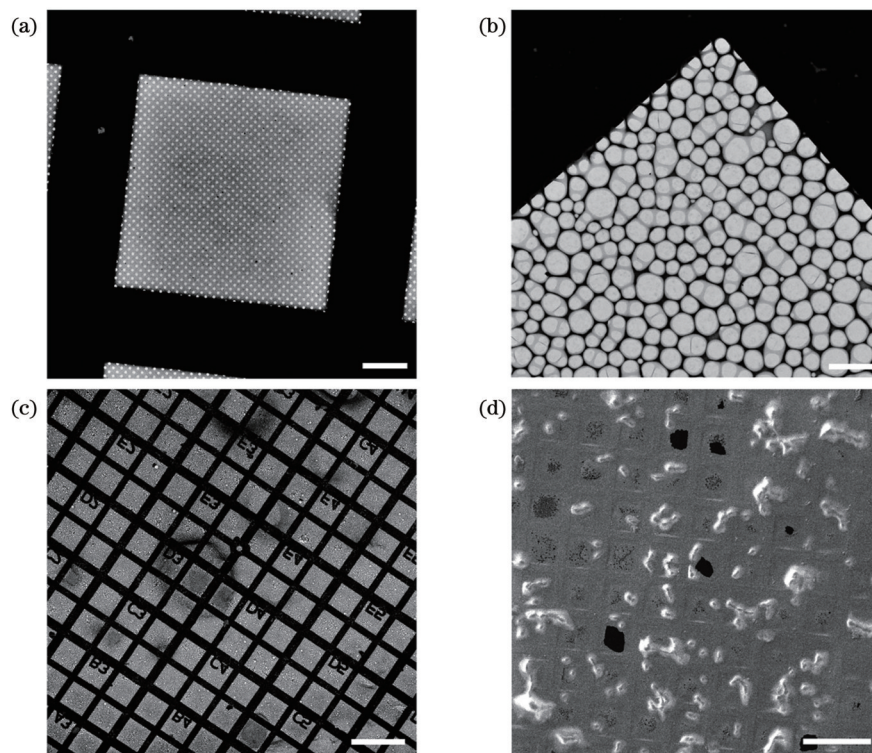


图 2 用于细胞快速冷冻的电镜载网。(a)具有规则圆孔的Quantifoil载网(标尺:20  $\mu\text{m}$ );(b)具有不规则孔洞的微栅载网(标尺:10  $\mu\text{m}$ );(c)带有坐标的微栅载网(标尺:200  $\mu\text{m}$ );(d)承载HeLa细胞的微栅载网(标尺:200  $\mu\text{m}$ )

Fig. 2 EM grids for plunge freezing of cells. (a) Quantifoil grid with regular circular holes (scalebar: 200  $\mu\text{m}$ ); (b) lattice grid with irregular holes (scalebar: 200  $\mu\text{m}$ ); (c) lattice grid with coordinate markers (scalebar: 200  $\mu\text{m}$ ); (d) lattice grid containing HeLa cells (scalebar: 200  $\mu\text{m}$ )



图 3 商业化快速冷冻设备。(a)赛默飞公司的Vitrobot;(b)Leica公司的EM GP;(c)Gatan公司的Cp3

Fig. 3 Commercial instruments for plunge freezing. (a) Vitrobot from ThermoFisher; (b) EM GP from Leica; (c) Cp3 from Gatan

快速冷冻,具有很高的冻样效率和成功率,已作为冷冻电镜的核心配套设备被广泛应用在 cryo-ET 实验中。这些设备提供从制冷剂制备、环境温湿度控制、滤纸吸干时间和力度设定、样品自动投入制冷剂到样品回收的完整解决方案。此外,这些设备还具有友好的人机设计和多种预定的工作程序,经过简单培训即可上手,为科研工作者制备高质量的冷冻样品提供了有力支撑。

#### 2.1.4 快速冷冻工作流程

快速冷冻的工作流程主要包括制冷剂制备、快速

冷冻、样品回收等几个核心步骤<sup>[40-41]</sup>。即便商业化设备已经提供了十分完善的自动或半自动程序,在制样过程中仍有许多参数和条件需要用户根据具体的样品进行优化。对于细胞样品,快速冷冻的工作流程和注意要点如下。

1) 将快速冷冻设备的部件(如泡沫盒、液态乙烷杯、镊子等)充分吹干,避免上一个用户使用之后的水蒸气残留。

2) 更换滤纸,设置冻样设备的湿度及温度,对于细胞样品,温度一般设置在 37  $^{\circ}\text{C}$  左右,湿度在 85%

左右。

3) 将设备空载运行一次, 以免正式冻样时设备故障损坏镊子, 浪费样品。

4) 将冻样部件和样品盒完全浸入液氮中进行预冷。

5) 对载网进行辉光放电(对于生长在载网上的细胞样品, 跳过此步骤)。

6) 制备液态乙烷。制备过程中观察乙烷形态, 若能看到稳定的乙烷冰霜或者液态乙烷已部分变成固态, 此时液态乙烷达到最低凝固点温度。

7) 用镊子夹取载网, 并将镊子卡入冻样设备。

8) 使用移液枪吸取 3~5  $\mu\text{L}$  细胞悬浮液, 加在载网有碳膜一侧。(对于生长在载网上的细胞样品, 加磷酸缓冲盐溶液(PBS)以冲洗掉细胞培养液, 避免“冻不透”。)

9) 使用滤纸进行自动吸干, 吸液时长一般为 3~5 s。

10) 将镊子及载网投入到液态乙烷中, 完成快速冷冻。

11) 将载网转移至样品盒。转移过程中保持载网不暴露在空气中。

12) 将样品盒快速放进盛有液氮的 50 mL 离心管中, 并将离心管转移至液氮罐中保存。

## 2.2 cryo-FIB 减薄技术

### 2.2.1 概述

FIB 切割使用的离子源主要包括液态金属离子源<sup>[42]</sup>(例如镓等)和等离子体源<sup>[43]</sup>(例如氩、氙等)。目前冷冻细胞样品减薄中使用的主要是液态金属镓离子源。镓具有低熔点、易挥发、低蒸气压的特点<sup>[44]</sup>, 在室温下以液态形式存在, 在外加电压的作用下可电离出镓离子, 再经过加速和一系列静电透镜的聚焦形成聚焦离子束。离子束的加速电压通常为 5~50 keV, 束流一般为几十 pA 到几 nA, 可产生 5~500 nm 直径的离子束, 因此 FIB 十分适合在纳米尺度上进行细胞的加工。当 FIB 轰击样品表面时会移

除焦点处的原子, 再通过三维空间的扫描即可移除特定的体积, 达到切割的效果。和 SEM 原理类似, FIB 在扫描样品的过程中也会激发二次电子, 同样可以形成二次电子图像。

FIB 切割技术最早被应用在材料科学中, 用于制备透射电镜薄片样品<sup>[45]</sup>或者加工固体材料<sup>[46]</sup>。不同于传统的固体材料, 冷冻生物样品的加工必须在 -135  $^{\circ}\text{C}$  以下进行, 否则非晶冰就会发生去玻璃化形成晶态冰<sup>[47]</sup>。2006 年, Marko 等<sup>[48]</sup>率先将 FIB 应用在非晶冰的切割中, 证实了 FIB 不会引起非晶冰的去玻璃化。2007 年, Marko 等<sup>[12]</sup>进一步将这项技术应用在冷冻细菌的减薄中, 获得了适用于透射电镜观察的细菌薄片样品, 并验证了 FIB 切割不会引入影响透射电镜观察的缺陷。后来, Rigort 等<sup>[49]</sup>完善了这项技术, 针对 cryo-ET 建立了冷冻细胞 FIB 减薄的工作流程, 并提出了利用 CLEM 引导 FIB 减薄的方案<sup>[50]</sup>, 使 FIB 成为 cryo-ET 样品减薄的主流方法。

### 2.2.2 cryo-FIB 减薄设备

FIB 通常被安装在 SEM 中使用, 再配以气体注入系统(GIS)、冷台系统及多种二次电子、背散射电子探测器, 形成功能强大的 cryo-FIB 减薄系统。目前主流 SEM 厂商均针对冷冻生物样品减薄提供了成熟的双束电镜(图 4)。冷台系统是冷冻双束电镜的核心部件, 用于对电镜内部的样品进行制冷和保冷。蔡司和泰斯肯公司使用的是 Quorum 公司提供的第三方冷台[图 5(a)], 赛默飞公司使用的是自研发的冷台。这些冷台的工作原理类似, 都是利用循环的液氮带走热量实现降温, 冷台温度可控制在 -180  $^{\circ}\text{C}$  以下, 远低于非晶冰去玻璃化的相变温度(约 -160  $^{\circ}\text{C}$ ), 可保证冷台上的生物样品始终处在非晶冰状态下。电子枪附近还会安装一个冷阱[图 5(b)], 其温度通常控制在低于冷台温度 10  $^{\circ}\text{C}$  左右, 用于吸附 FIB 切割过程中产生的碎屑, 避免碎屑掉落在样品上造成污染。此外, 这些双束电镜还配有相应的冷冻样品真空传输系统, 可在低温条件下将冷冻样品传输至电镜真空腔

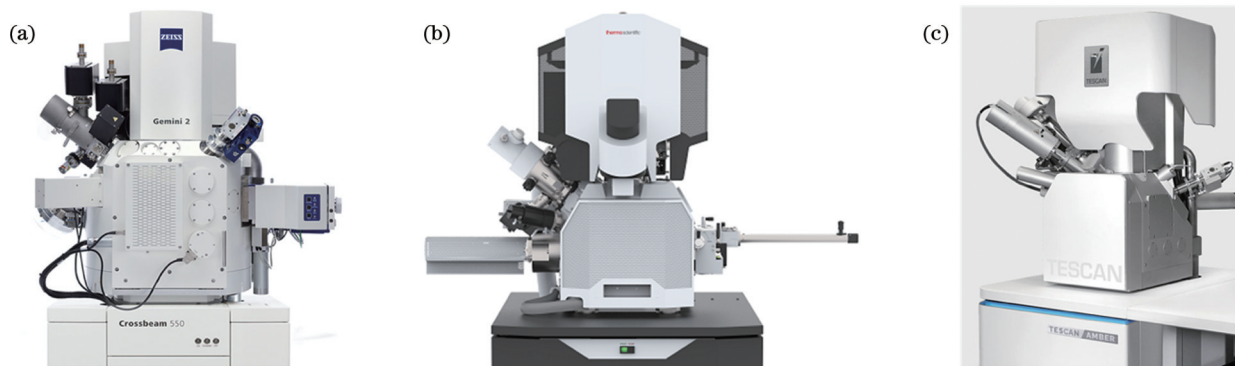


图 4 商业化双束电镜。(a)蔡司公司的 Crossbeam 双束电镜;(b)赛默飞公司的 Aquilos 双束电镜;(c)泰斯肯公司的 Amber 双束电镜

Fig. 4 Commercial dual-beam FIB/SEMs. (a) Crossbeam dual-beam FIB/SEM from Zeiss; (b) Aquilos dual-beam FIB/SEM from ThermoFischer; (c) Amber dual-beam FIB/SEM from Tescan



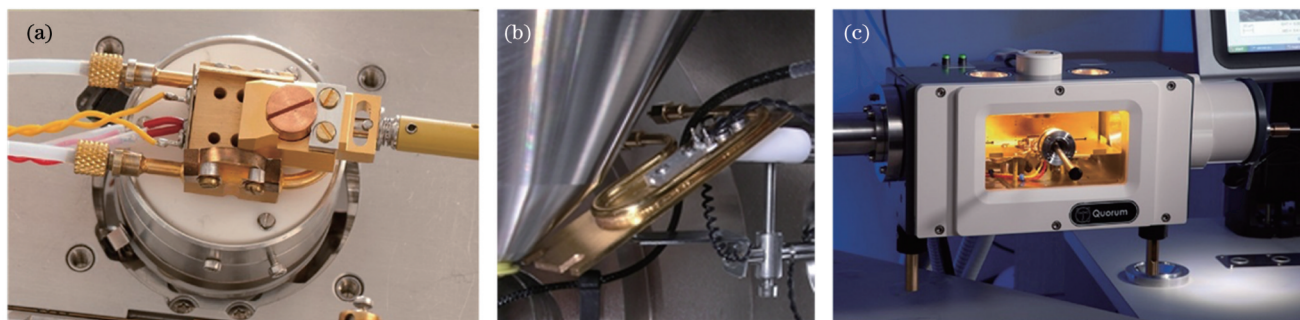


图 5 Quorum 公司的冷台系统。(a)冷台模块;(b)冷阱模块;(c)带有磁控溅射镀膜功能的冷冻样品传输模块

Fig. 5 Cryostage system from Quorum. (a) Cryostage module; (b) cryotrap module; (c) cryogenic sample transfer module equipped with magnetron sputter coating function

内。Quorum 公司的传输系统还带有磁控溅射镀膜和冷冻断裂功能[图 5(c)],可在传输过程中方便地进行样品预处理。

### 2.2.3 cryo-FIB 减薄流程

cryo-FIB 减薄生物样品的工作流程已经发展得较为完善和成熟<sup>[51-52]</sup>。通常先将承载冷冻细胞的电镜载网(特别是柔软的金网)固定在 Autogrid 卡环中[图 6(a)]以加固载网,减小载网在传输过程中的破损概率。然

后将 Autogrid 安装到特定的样品托上[图 6(b)],再利用冷冻传输系统将其装载到双束电镜的冷台上。切割前一般会用 GIS 在样品表面喷镀几微米厚的铂(Pt)层,保护切片前端在切割过程中不被散射的离子束击破,并减少切割中产生的“窗帘效应”<sup>[53]</sup>。切割角度(样品与 FIB 夹角)可根据不同需要设定为十几度甚至更小,小角度的切割可以产生更大面积的切片,方便透射电镜的观察。

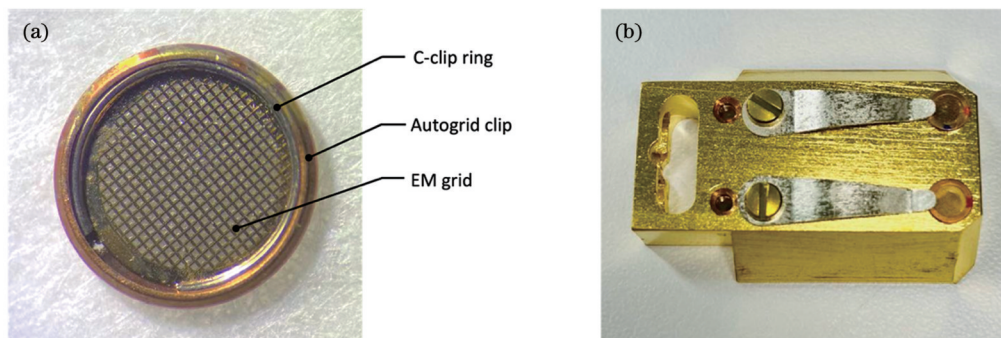


图 6 Autogrid 及样品托。(a)装载在 Autogrid 中的电镜载网;(b)承载 Autogrid 样品的冷台样品托

Fig. 6 Autogrid and sample holder. (a) EM grid mounted in Autogrid; (b) cryostage sample holder containing Autogrid samples

目前最常用的减薄策略是在预设切片位置的上下方切割掉两个长方体以获得切片[图 7(a)]。离子束

在设定的长方体范围内进行三维扫描,受到轰击的部分会脱离样品,掉落的碎屑会被冷阱吸附或被真空泵

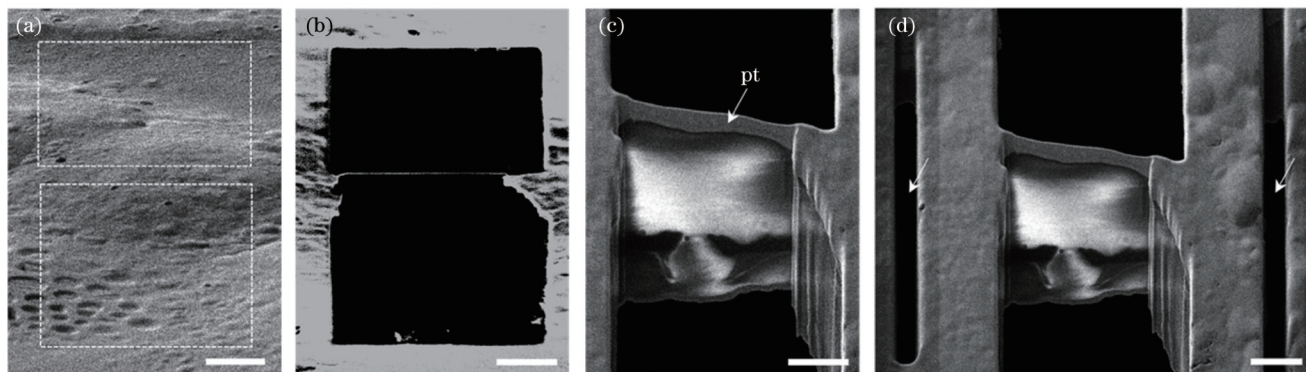


图 7 冷冻细胞的 FIB 减薄(标尺:5 μm)。(a)冷冻在载网上的 HeLa 细胞的 FIB 图像,虚线框所示为准备切掉的部分;(b)减薄后细胞切片的 FIB 图像;(c)减薄后细胞切片的 SEM 图像;(d)细胞切片两侧微伸缩缝(箭头)的 SEM 图像

Fig. 7 FIB milling of vitrified cells (scalebar: 5 μm). (a) FIB image of HeLa cells vitrified on grid with part to be cut off shown in dashed box; (b) FIB image of cell lamella after milling; (c) SEM image of cell lamella after milling; (d) SEM image of cell lamella with micro-expansion joints (arrows)



抽走。切割过程通常从大束流(300~500 pA)开始,快速移除切片两侧的大部分物质,然后逐步减小束流,切割不断向切片中心逼近,最后使用微小束流(10~50 pA)进行抛光,形成一个只有两侧边缘连接在细胞上的超薄切片[图 7(b)、(c)]。

对于 cryo-ET,切片的厚度通常控制在 300 nm 以内,样品越薄,电子通透性越好,得到的图像衬度和分辨率越高<sup>[51]</sup>。切片的宽度通常为 10~20  $\mu\text{m}$ ,由于样品内部应力的存在,越宽的切片面临的弯曲、褶皱和破损的几率也就越大。为了释放应力,在减薄前在切片两侧加工两条微伸缩缝(micro-expansion joints)[图 7(d)],可以缓冲应力产生的微小样品形变,有效降低切片的破损率<sup>[54]</sup>。切割完成后,利用冷冻传输系统将样品从双

束电镜中撤出,然后装入冷冻样品盒里,浸没在液氮中保存。保存时间越短,样品的冰污染和破损几率越小,因此通常在切片加工完成后,尽快进行 cryo-ET 实验。

### 2.3 荧光导航 cryo-FIB 减薄技术

#### 2.3.1 概述

作为 CLEM 的一种应用形式,荧光导航 cryo-FIB 减薄的原理与 CLEM 类似:首先对荧光标记的细胞分别进行冷冻光镜<sup>[55]</sup>和 cryo-FIB 成像,再将光电图像进行关联匹配,根据荧光信号在 FIB 图像中的位置识别和定位研究目标,由此确定 FIB 的切割位点(图 8)。荧光导航 FIB 减薄主要应用的成像模式是宽场成像<sup>[50,56-58]</sup>、共聚焦成像<sup>[59-60]</sup>以及基于共聚焦成像的 Airyscan 成像<sup>[61-62]</sup>。

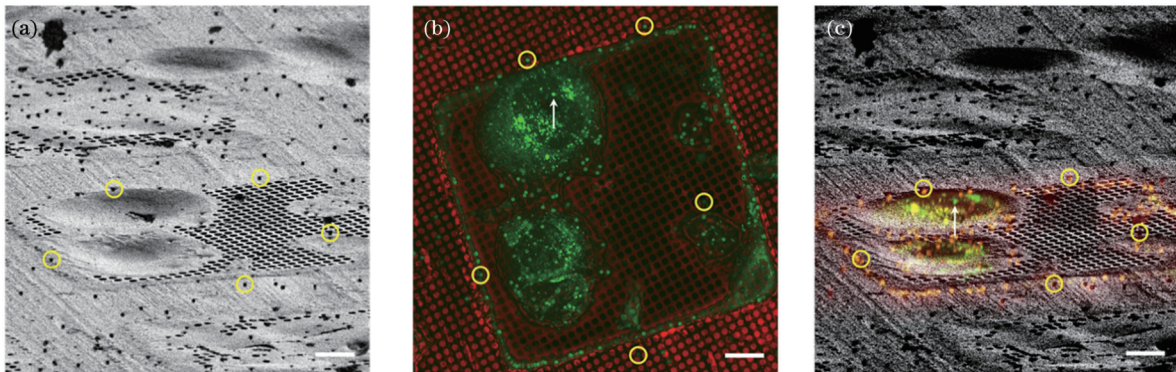


图 8 荧光导航 cryo-FIB 减薄原理(标尺:10  $\mu\text{m}$ )。(a) HepG2 细胞的 FIB 图像,圆圈标注出 5 个用来配准的荧光珠;(b) 图 8(a) 的光镜图像,圆圈标注出图 8(a) 中对应的 5 个荧光珠,箭头标注选取的研究目标;(c) FIB 和光镜的配准图像,箭头指示图 8(b) 中选取的研究目标

Fig. 8 Principle of fluorescence-guided cryo-FIB milling (scalebar: 10  $\mu\text{m}$ ). (a) FIB image of HepG2 cells with five fluorescent beads selected for image registration shown by circles; (b) light microscopy image of Fig. 8(a) with five fluorescent beads in Fig. 8(a) shown by circles and selected interest target shown by arrow; (c) superimposition of FIB and light microscopy images after image registration with target chosen in Fig. 8(b) shown by arrow

荧光导航 cryo-FIB 减薄目前有两种方案:分体式方案<sup>[50,59,61-62]</sup>和集成式方案<sup>[56-58,60]</sup>。在分体式方案[图 9(a)]中,冷冻光学显微镜和 cryo-FIB/SEM 是两套独立的设备,样品需要先利用 cryo-FLM 进行荧光成像,然后更换样品托后传输至 cryo-FIB/SEM 中进行 FIB 成像,再将光电图像进行配准,实现 FIB 定点的减薄;如需再次检查荧光信号,则重新利用 cryo-FLM 对减薄后的切片进行荧光成像。分体式方案的工作流程步骤复杂,样品传输次数多,切片的荧光检查十分不便。在集成式方案[图 9(b)]中,冷冻光学显微镜被整合到 cryo-FIB/SEM 中形成一套设备(cryo-FLM-FIB/SEM),因此只需进行一次样品传输,便可在双束电镜内完成光镜和 FIB 成像,并实时进行光电图像配准和 FIB 减薄,还可随时检查切片的荧光。对比分体式方案,集成式方案具有高效率、高精度、操作便捷等优势,是目前最新的技术方法。各类荧光导航 cryo-FIB 减薄策略的比较如表 1 所示。

#### 2.3.2 分体式荧光导航 cryo-FIB 减薄设备与工作流程

分体式荧光导航 FIB 减薄设备主要由独立的冷冻光学显微镜和 cryo-FIB/SEM 系统构成。cryo-FIB/SEM 在前文已介绍过,此处介绍冷冻光学显微镜。冷冻光学显微镜系统主要由光学低温恒温器和荧光显微镜两部分组成。光学低温恒温器通常是一个带有光学窗口的隔热腔室,利用绝热材料或者真空进行隔热,利用循环或者静态的液氮对隔热腔室内的样品进行制冷。利用显微物镜的光学窗口观察低温下的样品,实现低温光学成像。光学低温恒温器既有实验室开发的原型机<sup>[19,23,26,50,63-67]</sup>,也有丰富的商业化产品[图 10(a)~(d)],可根据具体应用进行选择。光学低温恒温器可装载到商业化或者自搭建的显微镜中使用。在商业化成像系统方面,蔡司公司将 Linkam 低温恒温器整合到自家显微镜[图 10(e)]中,并利用独有的 Airyscan 技术<sup>[68]</sup>实现了冷冻高分辨三维共聚焦成像。Leica 公司将自行研发的光学低温恒温器、低温物镜和



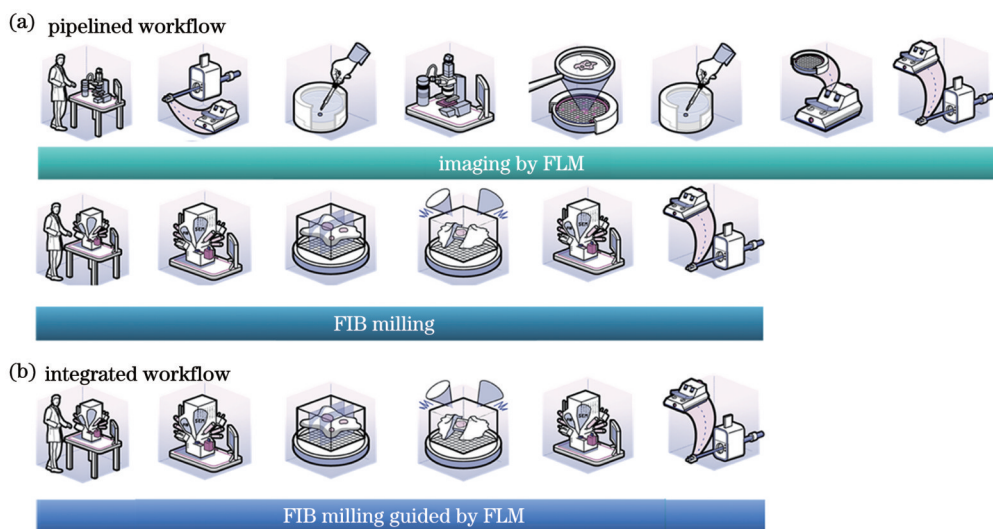


图9 荧光导航 cryo-FIB 减薄方案(图片来自 www.nanoscience.com)。(a)分体式方案;(b)集成式方案

Fig. 9 Schemes of fluorescence-guided cryo-FIB milling (image source: www.nanoscience.com). (a) Pipelined scheme; (b) integrated scheme

表 1 不同荧光导航 FIB 减薄策略的比较

Table 1 Comparison of different fluorescence-guided FIB milling strategies

Strategy	FLM mode	Needed fiducial marker	Applicable target size	Time of targeted milling	Success rate of targeted milling
Pipelined workflow	Widefield, confocal microscopy, Airyscan, etc.	Yes	$\geq 1 \mu\text{m}$	$\sim 1.5 \text{ h}$ for each lamella	Not reported
Integrated METEOR/iFLM	Widefield (LED illuminated)	Yes	$\geq 1 \mu\text{m}$	$\sim 2 \text{ h}$ for each lamella	Not reported
Integrated ELI-TriScope	Widefield (LED illuminated)	No	200–500 nm	$\sim 0.8 \text{ h}$ for each lamella	91%
Integrated CLIEM	Confocal	No	$\geq 10 \text{ nm}$	$\sim 1 \text{ h}$ for each lamella	95%

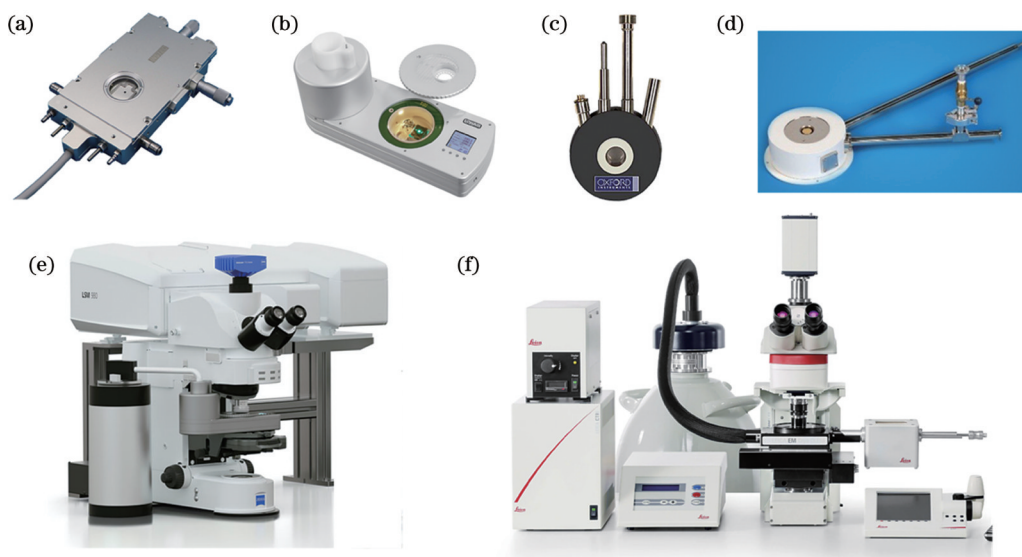


图 10 商业化光学低温恒温器和 cryo-FLM 成像系统。(a)Instec 公司的 HCS621GXY 低温恒温器;(b)Linkam 公司的 CMS196 低温恒温器;(c)Oxford Instruments 公司的 MicrostatN 低温恒温器;(d)Janis 公司的 ST500 低温恒温器;(e)搭载 Linkam 低温恒温器的蔡司冷冻共聚焦成像系统;(f)搭载自主研发低温恒温器的 Leica 冷冻成像系统

Fig. 10 Commercial optical cryostat and imaging systems by cryo-FLM. (a) HCS621GXY Cryostat from Instec; (b) CMS196 cryostat from Linkam; (c) MicrostatN cryostat from Oxford Instruments; (d) ST500 cryostat from Janis; (e) Zeiss confocal cryo-imaging system equipped with Linkam cryostat; (f) Leica cryo-imaging system equipped with self-developed cryostat

冷冻换样系统集成到自家显微镜<sup>[67]</sup>[图 10(f)]中,并提供宽场和共聚焦两种成像方案;在宽场成像中,利用独有的 Thunder imaging 技术可以剔除背景<sup>[69-70]</sup>,实现高信噪比的三维成像。这些商业化冷冻光学显微镜系统均为荧光导航 cryo-FIB 减薄提供了完整的光镜解决方案。

分体式荧光导航 cryo-FIB 减薄工作流程如图 9(a)所示,其核心是将冷冻光学显微镜图像与 FIB 图像进行配准。利用冷冻光学显微镜和 FIB 观察样品的角度通常不同,因此无法将两个模式下拍摄的图像直接进行关联,且样品在更换样品托和跨设备传输后,其位置和取向都会发生变化,更增加了图像关联的难度。为了将不同角度、不同取向的冷冻光学显微镜图像和 FIB 图像进行关联,通常需要向样品中添加配准标记物(fiducial marker)<sup>[71-72]</sup>以进行图像配准。配准标记物(一般是荧光微球或者微磁珠)在冷冻光学显微镜图像和 FIB 图像中均具有较高的衬度,可通过对若干标记物进行质心定位,计算出两种成像模式间的图像变换矩阵,再将一幅图像用变换矩阵转换后即可实现与另一幅图像的配准<sup>[73]</sup>。这一基于配准标记物和坐标变换的配准流程不仅操作繁琐,计算复杂,精度也无法保证。因为手动选取标记物具有随机性,选取不同的点或不同数量的点都会影响转换矩阵的计算结果,从而配准偏差较大,可重复性较低。

分体式工作流程的另一缺点是样品需要多次转移。一般来讲,冷冻光学显微镜和 cryo-FIB/SEM 使用的样品托和传输系统均不相同,冷冻样品在跨系统传输中需要更换样品托,再分别用不同的传输机构进行换样操作。多次的样品转移不仅增加了操作难度和工作量,还容易造成样品的冰污染、升温、变形甚至破裂<sup>[13]</sup>。此外,减薄完成后,如果想对切片再次进行荧光检查,就需要将样品从 cryo-FIB/SEM 中传出,更换样品托后再传入冷冻光学显微镜中拍摄。重复的样品转移意味着切片受损的风险也会加倍,为了保护来之不

易的脆弱切片,人们通常不愿意再次检查荧光,而是将切片直接传入到透射电镜中进行检查,这就进一步降低了透射电镜的成像效率。

针对分体式工作流程的这些问题,人们也在不断开发新的配件和方法以提高其效率和成功率。为了提升光电图像配准算法的易用性,Arnold 等<sup>[59]</sup>将他们的配准软件设置为开源,方便科研人员使用。为了减少样品的转移次数,Kuba 等<sup>[18]</sup>开发了可兼容冷冻光学显微镜和 cryo-FIB/SEM 的样品托,样品在进行冷冻光学显微镜成像后可直接送入到 cryo-FIB/SEM 中进行关联减薄,在一定程度上降低了样品的损坏几率。

### 2.3.3 集成式荧光导航 cryo-FIB 减薄设备与工作流程

近年来,人们尝试将冷冻光学显微镜与 cryo-FIB/SEM 系统进行集成。2019 年,Gorelick 等<sup>[56]</sup>将宽场荧光显微镜整合到商业化双束电镜中,获得了第一套集成式光电联用双束电镜。这套系统使用发光二极管(LED)作为照明和激发光源,将物镜安装在电镜腔室内部,将光学部件挂在电镜外壁上,实现了同一真空腔室内的荧光导航 FIB 减薄。与这套光学系统的结构类似,Delmic 公司在 2021 年推出了商业化宽场荧光成像模块 METEOR<sup>[57]</sup>[图 11(a)],适配蔡司、赛默飞等主流双束电镜[图 11(b)],为双束电镜升级荧光成像功能提供了商业化解决方案。同年,赛默飞公司也推出了集成式荧光导航 FIB 减薄系统,将自主研发的宽场荧光成像模块 iFLM 集成到 Aquilos 2 双束电镜[图 11(c)]中。这些集成系统的工作原理类似:样品通过在光镜成像位置和 FIB/SEM 成像位置间自动切换,可实现同一区域的冷冻光学显微镜和 FIB 成像,再利用配准标记物进行光电图像配准,实现荧光导航的 FIB 定点减薄。减薄完成后还可将样品移回光镜位,实时检查切片中的荧光信号,判断定点减薄是否成功,在源头上为透射电镜筛选出含有研究目标的切片。

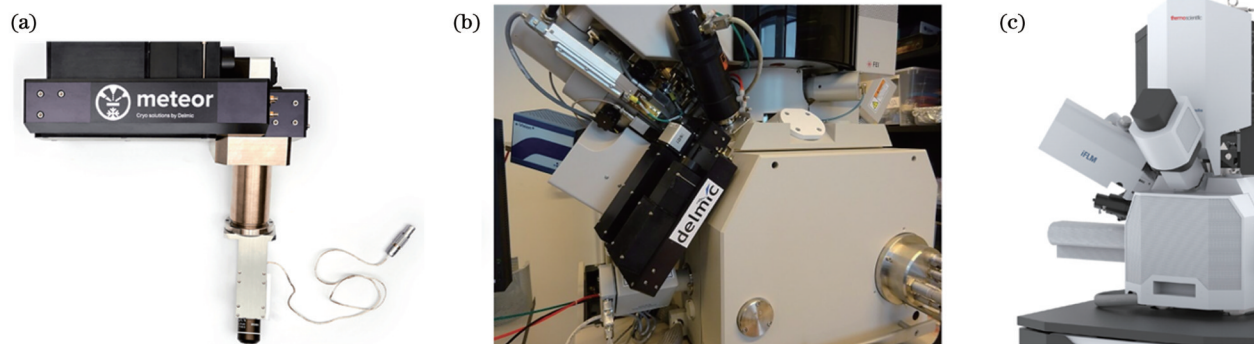


图 11 商业化集成式 cryo-FLM-FIB/SEM 系统。(a) Delmic 公司可适配双束电镜的宽场荧光成像模块 METEOR;(b)搭载 METEOR 的双束电镜;(c)搭载自主研发宽场荧光成像模块 iFLM 的赛默飞 Aquilos 2 双束电镜

Fig. 11 Commercial integrated cryo-FLM-FIB/SEM systems. (a) Widefield FLM module METEOR from Delmic for FIB/SEM; (b) FIB/SEM equipped with METEOR; (c) ThermoFisher Aquilos 2 FIB/SEM with self-developed widefield fluorescence imaging module iFLM



中国科学院生物物理研究所孙飞团队提出了一种新的宽场荧光成像与双束电镜集成方案 ELI-TriScope<sup>[58]</sup> (图 12), 对双束电镜腔室门进行了改造, 把冷冻样品杆前端直接插入到 FIB/SEM 位置, 再将物镜置于样品杆另一侧, 从样品背面进行宽场成像, 这样光镜位置与减薄位置重叠, 形成光镜、FIB、SEM 三束共焦的系统。这种共焦设计的优势是无须切换样品位置即可在 FIB 减薄过程中进行光学成像, 因此不再需

要通过光电图像配准来定位研究目标, 而是通过在减薄过程中实时观察荧光信号来控制切割过程。当切割到研究目标时, 荧光信号会衰减, 以此作为停止减薄的依据。利用这一技术, 课题组将荧光导航 FIB 的减薄时间减少至每片约 0.8 h, 与分体式流程相比, 效率提高了近一倍, 并在 5 d 内制备了 61 片含有中心体的切片样品, 并利用 cryo-ET 实现了中心体原位结构的高精度解析。

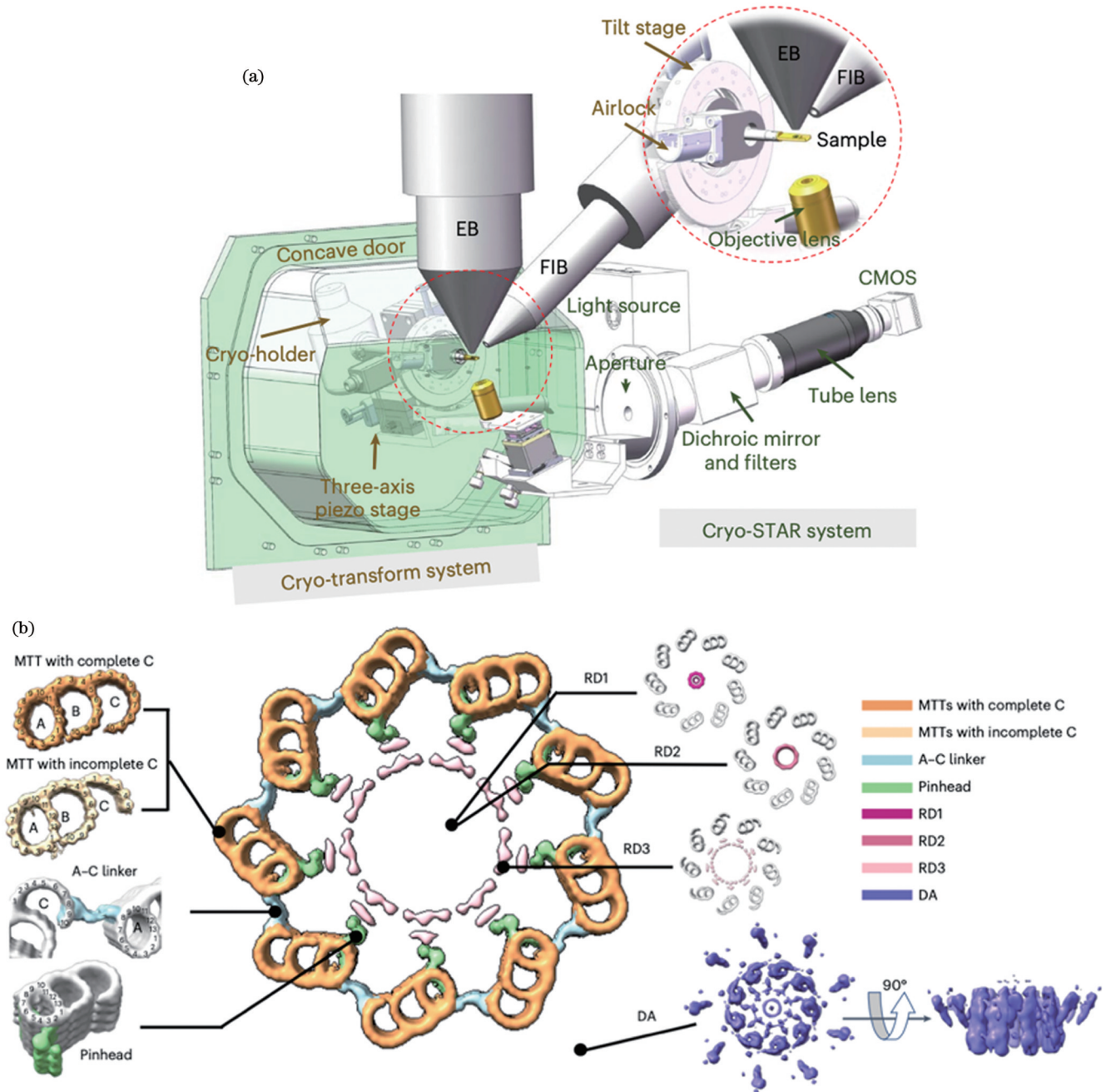


图 12 ELI-TriScope 系统及应用<sup>[58]</sup>。(a) ELI-TriScope 系统的三维结构示意图; (b) HeLa 细胞中心粒原位结构  
Fig. 12 ELI-TriScope system and application<sup>[58]</sup>. (a) 3D schematic illustration of ELI-TriScope system; (b) *in situ* structure of centriole in HeLa cells

宽场荧光成像具有结构简单、成本低、成像速度快等优势, 但由于缺少三维信息, 无法对研究目标进行准确的三维定位。此外, 细胞样品具有一定的厚度, 在宽

场成像中背景信号较高, 会导致弱荧光信号淹没在背景中, 从而无法识别。为了获得目标的三维定位信息和更高的光学成像质量, 中国科学院生物物理研究所

徐涛课题组、纪伟课题组和北京大学郭强课题组合作,研发出光电关联激光共聚焦双束电镜系统 CLIEM<sup>[60]</sup>(图 13),并开发了基于三维光学成像的全新荧光导航 FIB 减薄流程。该流程不再使用基于配准标记物的复杂的坐标变换来配准光电图像,而是利用 FIB 刻蚀标记作为配准基准,再将三维光镜图像投影到 FIB 的切割角度上,得到与 FIB 图像一致的光镜投影像,然后在该投影像中根据刻蚀的基准定位荧光目标,实现了

几十纳米精度的定点 FIB 减薄。此外,由于三维共聚焦成像可以去除背景,提高图像信噪比,课题组还开发了“虚拟切片”功能:利用三维图像生成细胞不同位置虚拟切片的荧光图像,直观反映出切片内容,可在拥挤的细胞中确定最优的切割位点。利用这项技术,课题组成功制备了含有脂滴-线粒体互作位点以及中心体的冷冻超薄切片,并利用 cryo-ET 解析了其原位结构。

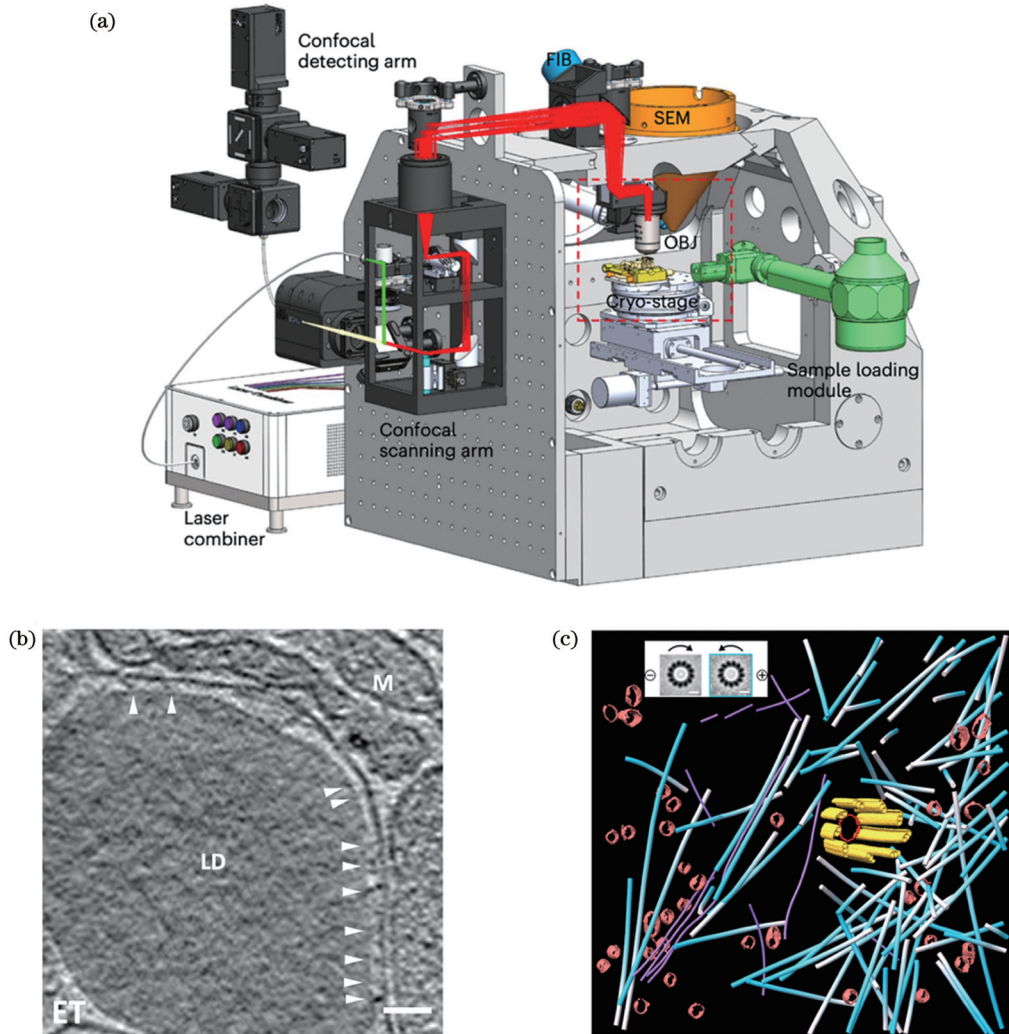


图 13 CLIEM 系统及应用<sup>[60]</sup>。(a) CLIEM 系统三维结构示意图;(b) 线粒体(M)-脂滴(LD)互作位点的原位结构,箭头所指是在互作面上发现的丝状结构,标尺为 50 nm;(c) HeLa 细胞中心粒及周边结构的渲染图

Fig. 13 CLIEM system and application<sup>[60]</sup>. (a) 3D schematic illustration of CLIEM system; (b) *in situ* structure of contact site between mitochondria (M) and lipid droplet (LD) with tethering structures discovered on interaction surface shown by arrows and scalebar is 50 nm; (c) rendering of HeLa cell centriole and surrounding structure

### 3 总结和展望

随着近年来细胞原位结构解析领域的快速发展, cryo-ET 已经成为人们在细胞原位探索生命奥秘的一项前沿技术。由于具有高保真的冷冻制样方法以及高分辨的三维解析能力, cryo-ET 可以在近乎天然的生理状态下观察细胞内部的超微结构,在纳米尺度揭示细胞原位的生理过程,具有非常广阔的应用前景。然

而,作为一项新兴技术, cryo-ET 仍面临诸多技术挑战,样品制备便是其中之一。

冷冻生物样品减薄是 cryo-ET 的一个关键步骤,减薄的效率和成功率直接决定 cryo-ET 实验的成败。作为目前主流的冷冻生物样品减薄技术, FIB 切割具有操作简便、精度高、切片质量好等特点,在透射电镜样品制备中发挥了至关重要的作用。但传统的 FIB 盲切方法无法对特定的细胞结构进行定点减薄,盲切的



低效率和低成功率已经成为阻碍 cryo-ET 发展的瓶颈。

最新发展出的光电关联荧光导航 FIB 减薄技术赋予了 FIB“视觉”的能力,通过荧光成像可以精确定位研究目标,再利用光电关联锁定目标在 FIB 图像中的位置,解决了 FIB 定点切割的难题。这项技术目前主要有两种实现方案:分体式方案和集成式方案。分体式方案比较灵活,可以通过在显微镜上加装商业化冷台实现冷冻光学显微镜成像,成本较低。但分体式方案的工作流程较为复杂,样品传递次数多,容易造成样品的冰污染、升温或损坏,还需使用配准标记物和配准软件才能实现光电联用,配准精度和工作效率都较低。集成式方案是将冷冻光镜与冷冻双束电镜整合成一套设备,操作简便,工作效率高,样品转移次数少,具有替代分体式方案的潜力。但集成式方案成本较高,双束电镜升级光镜模块需要根据具体电镜型号进行定制,升级周期较长。另外,受限于电镜外挂模块的体积和质量,目前只有宽场和共聚焦两种成像模式可供选择。

降低成本、提供更加丰富的光学成像模式并实现工作流程自动化是未来集成式荧光导航 FIB 减薄的发展方向。在成本控制方面,相信通过普及此技术和增加光镜模块装机量,前期的研发成本将减小,光镜有望逐渐成为双束电镜的标配模块之一。在成像模式升级方面,可将共聚焦成像升级为 Airyscan 或受激辐射损耗(STED)<sup>[74]</sup>成像,将宽场成像升级为单分子定位成像(SMLM)<sup>[75]</sup>,从而提高光学成像的分辨率。还可将共聚焦成像与宽场成像结合并拓展为多模态成像,可适应更加广泛的应用场景。此外,还可利用高空间带宽成像<sup>[76]</sup>或超分辨结构光照明成像<sup>[77]</sup>等成像模式,扩大成像的视野。在自动化方面,FIB 自动减薄已经实现<sup>[78]</sup>,未来可在此基础上将光学成像融合进来,通过人工智能等软件算法自动识别研究目标并完成光电配准,有望实现批量自动化的荧光导航 FIB 定点减薄。

总之,荧光导航 FIB 减薄技术将特异性荧光成像与高质量 FIB 切割结合起来,为定点制备透射电镜生物样品切片提供了新的解决方案,可用来精准研究细胞内部特定的超微结构,拓展了 cryo-ET 的应用范围,必将推动原位结构生物学的发展。

### 参 考 文 献

- [1] Turk M, Baumeister W. The promise and the challenges of cryo-electron tomography[J]. FEBS Letters, 2020, 594(20): 3243-3261.
- [2] Hylton R K, Swilius M T. Challenges and triumphs in cryo-electron tomography[J]. iScience, 2021, 24(9): 102959.
- [3] De Rosier D J, Klug A. Reconstruction of three dimensional structures from electron micrographs[J]. Nature, 1968, 217(5124): 130-134.
- [4] Dubochet J, Lepault J, Freeman R, et al. Electron microscopy of frozen water and aqueous solutions[J]. Journal of Microscopy, 1982, 128(3): 219-237.
- [5] Adrian M, Dubochet J, Lepault J, et al. Cryo-electron microscopy of viruses[J]. Nature, 1984, 308(5954): 32-36.
- [6] Dubochet J, Adrian M, Lepault J, et al. Emerging techniques: Cryo-electron microscopy of vitrified biological specimens[J]. Trends in Biochemical Sciences, 1985, 10(4): 143-146.
- [7] Mahamid J, Baumeister W. Cryo-electron tomography: the realization of a vision[J]. Microscopy and Analysis, 2012, 26: 45-48.
- [8] Beck M, Baumeister W. Cryo-electron tomography: can it reveal the molecular sociology of cells in atomic detail?[J]. Trends in Cell Biology, 2016, 26(11): 825-837.
- [9] Oikonomou C M, Jensen G J. Cellular electron cryotomography: toward structural biology *in situ*[J]. Annual Review of Biochemistry, 2017, 86: 873-896.
- [10] Lučić V, Rigort A, Baumeister W. Cryo-electron tomography: the challenge of doing structural biology *in situ*[J]. The Journal of Cell Biology, 2013, 202(3): 407-419.
- [11] Shi S, Sun S, Andrews S B, et al. Thickness measurement of hydrated and dehydrated cryosections by EELS[J]. Microscopy Research and Technique, 1996, 33(3): 241-250.
- [12] Marko M, Hsieh C, Schalek R, et al. Focused-ion-beam thinning of frozen-hydrated biological specimens for cryo-electron microscopy[J]. Nature Methods, 2007, 4(3): 215-217.
- [13] 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.
- [14] Al-Amoudi A, Studer D, Dubochet J. Cutting artefacts and cutting process in vitreous sections for cryo-electron microscopy[J]. Journal of Structural Biology, 2005, 150(1): 109-121.
- [15] Han H M, Zuber B, Dubochet J. Compression and crevasses in vitreous sections under different cutting conditions[J]. Journal of Microscopy, 2008, 230(2): 167-171.
- [16] Villa E, Schaffer M, Plitzko J M, et al. Opening windows into the cell: focused-ion-beam milling for cryo-electron tomography[J]. Current Opinion in Structural Biology, 2013, 23(5): 771-777.
- [17] Rigort A, Plitzko J M. Cryo-focused-ion-beam applications in structural biology[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2015, 581: 122-130.
- [18] Kuba J, Mitchels J, Hovorka M, et al. Advanced cryo-tomography workflow developments-correlative microscopy, milling automation and cryo-lift-out[J]. Journal of Microscopy, 2021, 281(2): 112-124.
- [19] Sartori A, Gatz R, Beck F, et al. Correlative microscopy: bridging the gap between fluorescence light microscopy and cryo-electron tomography[J]. Journal of Structural Biology, 2007, 160(2): 135-145.
- [20] Briegel A, Chen S Y, Koster A J, et al. Correlated light and electron cryo-microscopy[J]. Methods in Enzymology, 2010, 481: 317-341.
- [21] de Boer P, Hoogenboom J P, Giepmans B N G. Correlated light and electron microscopy: ultrastructure lights up![J]. Nature Methods, 2015, 12(6): 503-513.
- [22] Karreman M A, Hyenne V, Schwab Y, et al. Intravital correlative microscopy: imaging life at the nanoscale[J]. Trends in Cell Biology, 2016, 26(11): 848-863.
- [23] van Driel L F, Valentijn J A, Valentijn K M, et al. Tools for correlative cryo-fluorescence microscopy and cryo-electron tomography applied to whole mitochondria in human endothelial cells[J]. European Journal of Cell Biology, 2009, 88(11): 669-684.
- [24] Jun S M, Ke D X, Debiec K, et al. Direct visualization of HIV-1 with correlative live-cell microscopy and cryo-electron tomography [J]. Structure, 2011, 19(11): 1573-1581.
- [25] Liu B, Xue Y H, Zhao W, et al. Three-dimensional super-resolution protein localization correlated with vitrified cellular context[J]. Scientific Reports, 2015, 5(1): 1-11.
- [26] Li S G, 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]. *Journal of Structural Biology*, 2018, 201(1): 63-75.
- [27] Moser F, Prazák V, Mordhorst V, et al. Cryo-SOFI enabling low-dose super-resolution correlative light and electron cryo-microscopy [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2019, 116(11): 4804-4809.
- [28] Rigort A, Kirmse R, Doring V, et al. Imaging of vitrified biological specimens by confocal cryo-fluorescence microscopy and cryo-FIB/SEM tomography[J]. *Microscopy and Microanalysis*, 2015, 21(S3): 1121-1122.
- [29] Hoffman David P, Gleb S, Shan X C, et al. Correlative three-dimensional super-resolution and block-face electron microscopy of whole vitreously frozen cells[J]. *Science*, 2020, 367(6475): eaaz5357.
- [30] Rigort A, Villa E, Bäuerlein F J B, et al. Integrative approaches for cellular cryo-electron tomography: correlative imaging and focused ion beam micromachining[J]. *Methods in Cell Biology*, 2012, 111: 259-281.
- [31] Huang B Q, Yeung E C. Chemical and physical fixation of cells and tissues: an overview[M]//Yeung E C T, Stasolla C, Sumner M J, et al. *Plant microtechniques and protocols*. Cham: Springer, 2015: 23-43.
- [32] Moor H. Theory and practice of high pressure freezing[M] //Steinbrecht R A, Zierold K. *Cryotechniques in biological electron microscopy*. Heidelberg: Springer, 1987: 175-191.
- [33] Galway M E, Heckman J W, Jr, Hyde G J, et al. Advances in high-pressure and plunge-freeze fixation[M] //Methods in cell biology. Amsterdam: Elsevier, 1995: 3-19.
- [34] Mielanczyk L, Matysiak N, Michalski M, et al. Closer to the native state. Critical evaluation of cryo-techniques for Transmission Electron Microscopy: preparation of biological samples[J]. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 2014, 52(1): 1-17.
- [35] Kanno H, Speedy R J, Angell C A. Supercooling of water to  $-92^{\circ}\text{C}$  under pressure[J]. *Science*, 1975, 189(4206): 880-881.
- [36] Handley D A, Alexander J T, Chien S. The design and use of a simple device for rapid quench-freezing of biological samples[J]. *Journal of Microscopy*, 1981, 121(3): 273-282.
- [37] Dubochet J, McDowell A W, Menge B, et al. Electron microscopy of frozen-hydrated bacteria[J]. *Journal of Bacteriology*, 1983, 155(1): 381-390.
- [38] McDowell A W, Chang J J, Freeman R, et al. Electron microscopy of frozen hydrated sections of vitreous ice and vitrified biological samples[J]. *Journal of Microscopy*, 1983, 131(1): 1-9.
- [39] McDowell A W, Hofmann W, Lepault J, et al. Cryo-electron microscopy of vitrified insect flight muscle[J]. *Journal of Molecular Biology*, 1984, 178(1): 105-111.
- [40] Iancu C V, Tivol W F, Schooler J B, et al. Electron cryotomography sample preparation using the Vitrobot[J]. *Nature Protocols*, 2006, 1(6): 2813-2819.
- [41] Dobro M J, Melanson L A, Jensen G J, et al. Plunge freezing for electron cryomicroscopy[J]. *Methods in Enzymology*, 2010, 481: 63-82.
- [42] Swanson L W. Liquid metal ion sources: mechanism and applications[J]. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, 1983, 218(1/2/3): 347-353.
- [43] Smith N S, Skoczylas W P, Kellogg S M, et al. High brightness inductively coupled plasma source for high current focused ion beam applications[J]. *Journal of Vacuum Science & Technology B: Microelectronics and Nanometer Structures*, 2006, 24(6): 2902-2906.
- [44] Orloff J. High - resolution focused ion beams[J]. *Review of Scientific Instruments*, 1993, 64(5): 1105-1130.
- [45] Giannuzzi L A, Stevie F A. Introduction to focused ion beams instrumentation, theory, techniques and practice[M]. Boston: Springer, 2004.
- [46] Jin C Y, Wu W, Cao L, et al. Fabrication of lithium niobate metasurfaces via a combination of FIB and ICP-RIE[J]. *Chinese Optics Letters*, 2022, 20(11): 113602.
- [47] Dubochet J, Booy F P, Freeman R, et al. Low temperature electron microscopy[J]. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*, 1981, 10: 133-149.
- [48] Marko M, Hsieh C, Moberlychan W, et al. Focused ion beam milling of vitreous water: prospects for an alternative to cryo-ultramicrotomy of frozen-hydrated biological samples[J]. *Journal of Microscopy*, 2006, 222(1): 42-47.
- [49] Rigort A, Bäuerlein F J B, Villa E, et al. Focused ion beam micromachining of eukaryotic cells for cryoelectron tomography[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(12): 4449-4454.
- [50] Rigort A, Bäuerlein F J B, Leis A, et al. Micromachining tools and correlative approaches for cellular cryo-electron tomography[J]. *Journal of Structural Biology*, 2010, 172(2): 169-179.
- [51] Schaffer M, Engel B D, Laugks T, et al. Cryo-focused ion beam sample preparation for imaging vitreous cells by cryo-electron tomography[J]. *Bio-protocol*, 2015, 5(17): e1575.
- [52] Medeiros J M, Böck D, Weiss G L, et al. Robust workflow and instrumentation for cryo-focused ion beam milling of samples for electron cryotomography[J]. *Ultramicroscopy*, 2018, 190: 1-11.
- [53] Hayles M F, Stokes D J, Phifer D, et al. A technique for improved focused ion beam milling of cryo-prepared life science specimens[J]. *Journal of Microscopy*, 2007, 226(3): 263-269.
- [54] Wolff G, Limpens R W A L, Zheng S, et al. Mind the gap: micro-expansion joints drastically decrease the bending of FIB-milled cryo-lamellae[J]. *Journal of Structural Biology*, 2019, 208(3): 107389.
- [55] Kaufmann R, Hagen C, Grünwald K. Fluorescence cryo-microscopy: current challenges and prospects[J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2014, 20: 86-91.
- [56] Gorelick S, Buckley G, Gervinskis G, et al. PIE-scope, integrated cryo-correlative light and FIB/SEM microscopy[J]. *eLife*, 2019, 8: e45919.
- [57] Smeets M, Bieber A, Capitanio C, et al. Integrated cryo-correlative microscopy for targeted structural investigation *in situ* [J]. *Microscopy Today*, 2021, 29(6): 20-25.
- [58] Li S G, Wang Z Y, Jia X, et al. ELI trifocal microscope: a precise system to prepare target cryo-lamellae for *in situ* cryo-ET study[J]. *Nature Methods*, 2023, 20(2): 276-283.
- [59] Arnold J, Mahamid J, Lucic V, et al. Site-specific cryo-focused ion beam sample preparation guided by 3D correlative microscopy [J]. *Biophysical Journal*, 2016, 110(4): 860-869.
- [60] Li W X, Lu J, Xiao K, et al. Integrated multimodality microscope for accurate and efficient target-guided cryo-lamellae preparation[J]. *Nature Methods*, 2023, 20(2): 268-275.
- [61] Sexton D L, Burgold S, Schertel A, et al. Super-resolution confocal cryo-CLEM with cryo-FIB milling for *in situ* imaging of *Deinococcus radiodurans*[J]. *Current Research in Structural Biology*, 2022, 4: 1-9.
- [62] Wu G H, Mitchell P G, Galaz-Montoya J G, et al. Multi-scale 3D cryo-correlative microscopy for vitrified cells[J]. *Structure*, 2020, 28(11): 1231-1237.
- [63] Schwartz C L, Sarbash V I, Ataulkhanov F I, et al. Cryo-fluorescence microscopy facilitates correlations between light and cryo-electron microscopy and reduces the rate of photobleaching[J]. *Journal of Microscopy*, 2007, 227(2): 98-109.
- [64] Le Gros M A, McDermott G, Uchida M, et al. High-aperture cryogenic light microscopy[J]. *Journal of Microscopy*, 2009, 235(1): 1-8.
- [65] Xu X J, Xue Y H, Tian B Y, et al. Ultra-stable super-resolution fluorescence cryo-microscopy for correlative light and electron cryo-microscopy[J]. *Science China Life Sciences*, 2018, 61(11): 1312-1319.
- [66] Li W X, Stein S C, Gregor I, et al. Ultra-stable and versatile widefield cryo-fluorescence microscope for single-molecule



- localization with sub-nanometer accuracy[J]. *Optics Express*, 2015, 23(3): 3770-3783.
- [67] Schorb M, Gaechter L, Avinoam O, et al. New hardware and workflows for semi-automated correlative cryo-fluorescence and cryo-electron microscopy/tomography[J]. *Journal of Structural Biology*, 2017, 197(2): 83-93.
- [68] Huff J, Bergter A, Birkenbeil J, et al. The new 2D Superresolution mode for ZEISS Airyscan[J]. *Nature Methods*, 2017, 14(12): 1223.
- [69] Reymann J. Lightning: image information extraction by adaptive deconvolution[EB/OL]. [2022-10-09]. [https://medschool.ucsd.edu/som/neurosciences/research/microscopy-core/resources/Documents/LIGHTNING\\_WhitePaper.pdf](https://medschool.ucsd.edu/som/neurosciences/research/microscopy-core/resources/Documents/LIGHTNING_WhitePaper.pdf).
- [70] Schumacher J, Bertrand L. Thunder imagers: how do they really work? [EB/OL]. [2022-11-08]. <https://7157e75ac0509b6a8f5c-5b19c577d01b9ccfe75d2f9e4b17ab55.ssl.cf1.rackcdn.com/EQZKYFC-PDF-1-450123-4426040265.pdf>.
- [71] Kukulski W, Schorb M, Welsch S, et al. Correlated fluorescence and 3D electron microscopy with high sensitivity and spatial precision[J]. *Journal of Cell Biology*, 2011, 192(1): 111-119.
- [72] Kukulski W, Schorb M, Welsch S, et al. Precise, correlated fluorescence microscopy and electron tomography of lowcryl sections using fluorescent fiducial markers[J]. *Methods in Cell Biology*, 2012, 111: 235-257.
- [73] Fukuda Y, Schrod N, Schaffer M, et al. Coordinate transformation based cryo-correlative methods for electron tomography and focused ion beam milling[J]. *Ultramicroscopy*, 2014, 143: 15-23.
- [74] Hell S W, Wichmann J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy[J]. *Optics Letters*, 1994, 19(11): 780-782.
- [75] Lelek M, Gyparaki M T, Beliu G, et al. Single molecule localization microscopy[J]. *Nature Reviews Methods Primers*, 2021, 1(1): 39.
- [76] Park J, Brady D J, Zheng G A, et al. Review of bio-optical imaging systems with a high space-bandwidth product[J]. *Advanced Photonics*, 2021, 3(4): 044001.
- [77] Wang Z J, Zhao T Y, Hao H W, et al. High-speed image reconstruction for optically sectioned, super-resolution structured illumination microscopy[J]. *Advanced Photonics*, 2022, 4(2): 026003.
- [78] Zachs T, Schertel A, Medeiros J, et al. Fully automated, sequential focused ion beam milling for cryo-electron tomography [J]. *eLife*, 2020, 9: e52286.

## Recent Developments in Fluorescence-Guided Cryogenic Focused-Ion-Beam Milling

Li Weixing<sup>1</sup>, Lu Jing<sup>1</sup>, Xiao Ke<sup>1</sup>, Ji Wei<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory of Interdisciplinary Research, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

<sup>2</sup>Innovative Development Center of Light Microscopy and Detection Technology, Bioland Laboratory, Guangzhou 510320, Guangdong, China;

<sup>3</sup>College of Life Science, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

### Abstract

**Significance** Eukaryotic cells have numerous cellular structures, including a variety of organelles and macromolecular complexes. These structures have specific physiological functions and work interactively to perform certain cellular activities. Therefore, studying these structures in their native state is essential to understand the real physiological processes in the cells. *In situ* investigation of cellular structures does not only provide morphology, distribution, and abundance information, but also reveals their interaction mechanisms, thereby providing new insights into the understanding of life.

Cryo-electron tomography (cryo-ET) is currently the principal technique to resolve the *in situ* structures of biological specimens. By collecting tilted series of transmission electron images and performing image reconstruction, cryo-ET determines the 3D structures of bio-specimens with a nanometer-level resolution. A prerequisite for applying cryo-ET is to fix the sample under cryogenic conditions. High-pressure freezing and plunge freezing are well-established cryo-fixation methods that preserve biological specimens in their near-native state in vitreous ice. Benefiting from these techniques, cryo-ET has been widely applied to cells and tissues.

One limitation to cryo-ET is its restricted imaging depth, which is typically a few hundred nanometers owing to the confined penetration capabilities of electrons. Therefore, reducing the thickness of the samples to that of lamellae of approximately 200 nm is necessary before applying cryo-ET. Focused ion beam (FIB) milling has been recently employed to prepare lamellae of bio-specimens for cryo-ET. Compared to traditional ultramicrotomy, FIB milling avoids artifacts such as distortions, crevasses, and compression when fabricating the lamella. However, conventional FIB milling does not allow site-specific milling, because in a dual-beam FIB/SEM system, FIB or SEM image only illustrates the surface morphology of the sample and cannot provide more information to recognize and localize the underlying interest targets. When milling cells with FIB, cutting at an arbitrary position can only hit abundant cellular structures such as Golgi apparatus or mitochondria but cannot be used to prepare lamellae containing specific targets. This drawback hinders the application of FIB in cryo-ET.

The “blind” milling can be improved by correlative light and electron microscopy (CLEM). In CLEM, the targets of interest are fluorescently labelled and can be identified by fluorescence imaging. After registering the light and FIB images, fluorescence signal can be used to guide the FIB to mill at specific sites. Currently, various light imaging modalities have been adopted to navigate FIB fabrication, including widefield microscopy, confocal microscopy, and Airyscan. Moreover, two major working routines, that is,

pipelined and integrated workflows, have been established to perform fluorescence-guided FIB milling. Therefore, it is important and necessary to summarize the existing techniques and discuss the advantages and limitations of different working routines to provide guidelines for researchers to choose the appropriate protocols.

**Progress** This study reviews the essential techniques involved in fluorescence-guided cryo-FIB milling. First, plunge freezing is introduced. Plunge freezing is the most commonly used technique to vitrify cells. The key aspects to obtain good plunge-frozen specimens are discussed, including the choice of electron microscope grids and supporting films (Fig. 2), available commercial instruments (Fig. 3), and standard protocols.

Second, as a popular method to prepare lamellae of vitrified cells, FIB milling is discussed in several aspects: the working principle is introduced; the relevant instrumentations are summarized, including dual-beam FIB/SEM system (Fig. 4), cryostage and cryotransfer systems (Fig. 5), and Autogrid and sample holder (Fig. 6); and the milling of frozen cells is outlined (Fig. 7).

Third, the principle (Fig. 8) and workflow (Fig. 9) of fluorescence-guided FIB milling is introduced. Pipelined and integrated workflows are described, and relevant commercial instruments are overviewed (Figs. 10 and 11). The different workflows and various systems are compared (Table. 1). The most recent developments of integrated solutions are discussed in detail. Sun Fei's research group and Ji Wei's research group from the Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences have developed novel integrated light, ion, and electron microscopies (Figs. 12 and 13), thereby providing new avenues for performing accurate and efficient FIB milling at specific sites under fluorescence guidance.

**Conclusions and Prospects** *In situ* investigation of cellular structures using cryo-ET has recently become an interesting research topic. Fluorescence-guided FIB milling has been applied to mill vitrified biological samples at specific sites. The recent developments in integrated cryo-FLM-FIB/SEM systems and workflows provide efficient and accurate methods to fabricate cell lamellae containing desired targets. These innovations have the potential to serve as all-in-one solutions for site-specific cryo-lamella preparation for cryo-ET in the future.

**Key words** bio-optics; cryo-electron tomography; scanning electron microscope; fluorescence light microscopy; plunge freezing; focus ion beam milling; correlative light and electron microscopy