

块染技术在生物样品超微结构三维重构中的应用

姚小敏^{1,2} 李铭洋¹ 李长远¹ 袁笑妍^{1,2} 沈微微^{1,2} 李晓娟^{1,2*}

¹北京林业大学生物科学与技术学院, 林木花卉遗传育种教育部重点实验室, 北京 100083;

²北京林业大学树木发育与基因编辑研究院, 北京 100083)

摘要 该文主要探究生物大分子和各种细胞器的空间位置、相互作用的细节信息, 对解析生命过程至关重要。因此, 通过体电子显微学技术, 实现大尺度生物样品的超微结构的三维重构, 对促进细胞生物学、神经生物学等的研究具有重要意义。然而, 生物样品本身只能提供微弱的电子反差, 电镜成像后样品的细节结构不清晰。染色技术可以有效地增大样品的电子散射差异, 提高样品超微结构的电镜图像质量。近年来, 已有大量研究使用块染技术实现了大尺度样品的超微结构成像, 该文通过概述电镜样品的制备过程、染色方法和染色原理, 比较了在块染过程中不同的桥联剂和块染剂的特点, 以期为促进块染技术的应用和发展提供有效思路。

关键词 块染; 三维重构; 重金属染色; 桥联剂; 电子显微镜

Application of *en bloc* Staining Technique in Three-Dimensional Ultrastructure Reconstruction of Biological Samples

YAO Xiaomin^{1,2}, LI Mingyang¹, LI Changyuan¹, YUAN Xiaoyan^{1,2}, SHEN Weiwei^{1,2}, LI Xiaojuan^{1,2*}

¹Key Laboratory of Genetics and Breeding in Forest Trees and Ornamental Plants, Ministry of Education, College of Bioscience and Bioengineering, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;

²Institute of Tree Development and Genome Editing, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

Abstract Investigating the detailed information of localization and interaction of bio-macromolecules and organelles will provide valuable insights into the understanding of vital life processes. Therefore, three-dimensional reconstructions of the ultrastructure of large-volume biological samples by volume electron microscopy have promoted the research of cell biology and neurobiology. Since the biological sample itself only behaves weak electron contrast, the detailed ultrastructure of the sample under electron microscope usually presented unclear. The staining techniques can effectively increase the electron scattering difference of the sample, therefore greatly improves the image quality. *En bloc* staining has been successfully used in studying the ultrastructure of large-volume samples. This review summarizes the specimen preparation process, staining method and the characteristics of different bridging agents and *en bloc* staining agents, in order to provide some insights for the application and development of *en bloc* staining technology.

Keywords *en bloc* staining; 3D reconstruction; heavy metal staining; bridging agent; electron microscope

随着科技的发展, 人们对微观结构的探索越发迫切, 兴趣越来越浓厚。然而人眼的分辨能力最小约为0.2毫米^[1], 极大限制了人们对微观世界的探索。

16世纪末荷兰科学家安东尼·列文虎克发明了第一台光学显微镜, 分辨率达200纳米, 自此人们可以利用显微镜观察到细菌和细胞^[2]。20世纪30年代德国

收稿日期: 2022-03-31 接受日期: 2022-05-19

国家自然科学基金(批准号: 91954202)和北京林业大学“杰出青年人才”培育计划(批准号: 2019JQ03003)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13501323181, E-mail: lixj@bjfu.edu.cn

Received: March 31, 2022 Accepted: May 19, 2022

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.91954202) and the Beijing Forestry University Outstanding Young Talent Cultivation Project (Grant No.2019JQ03003)

*Corresponding author. Tel: +86-13501323181, E-mail: lixj@bjfu.edu.cn

的研究员RUSKA和KNOLL根据电子光学原理, 创建了第一台电子显微镜^[3]。因其具有较高的分辨率, 很快就被应用于临床病毒学中, 以用于对患者感染的病毒进行鉴别诊断等^[4]。20世纪80年代, 电子显微镜的分辨率提高到0.2~0.3纳米, 且在随后的20年里, 电子显微镜的分辨率逐渐提高到0.1~0.2纳米^[5]。近年来电镜技术飞速发展, 特别是体电子显微学技术(volume electron microscopy, VEM)^[6-7]在生物学中的应用, 不仅能够获取样品的二维信息, 还可以实现生物样品超微结构的三维重构, 使科研人员可以开展由定性到定量, 由平面到空间的立体研究^[8-11]。

体电子显微学技术, 是一类可以实现样品三维重构的电子显微镜技术。例如, 连续超薄切片透射电子显微镜成像技术^[12], 需要将样品用钻石刀连续切片, 然后再成像。手动收集切片的过程难度大耗时较长, WHITE等^[13]利用这种技术花了几十年的时间, 才重建了秀丽隐杆线虫的神经结构。然而, 该方法可以将连续切片收集到镍网上, 有利于后续对其进行胶体金免疫标记, 从而实现对特异蛋白在样品中空间分布的观察和分析。自动化带式收集超薄切片扫描电镜成像技术(automatic tape-collecting ultramicrotome scanning electron microscopy, ATUM-SEM)可以实现自动收集超薄切片, 且通过扫描电镜的并行成像加快成像速度。此外, 收集到硅片上的样品切片可以在不同的分辨率下重复成像^[14-15]。我国研究人员基于自行研制的连续切片自动收集装置和自动成像软件, 开发了另一种用于生物样品三维重构的连续超薄切片扫描电镜成像技术(automatic collector of ultrathin sections scanning electron microscopy, AutoCUTS-SEM)^[10]。AutoCUTS-SEM使用的是更为小巧灵活, 对振动环境耐受性更好的切片连续收集设备, 研究人员应用这一技术, 收集了大约2 140张连续切片, 建立了整条线虫幼虫的连续切片库, 并在此基础上建设了线虫幼虫三维结构数据库, 这有助于挖掘脑科学、神经连接组学、细胞发育、衰老等方面的研究信息。此外, 应用该技术还实现了对裸子植物青杆花粉粒的三维重构, 促进了对植物雄性生殖单位花粉粒的组成细胞及内部超微结构进行深入探索^[16]。系列块表面连续扫描电镜成像技术(serial block face scanning electron microscopy, SBF-SEM)^[17]同样需要利用钻石刀对样品块进行连续切片, 不同的是其成像对象是

被切割后的样品块表面, 而不是切片本身, 因此避免了切片收集的操作。HUA等^[18]利用该技术对小鼠耳蜗神经回路的关键超微结构进行了三维重构, 研究发现耳蜗听神经受中枢紧密、多样的调控并且能够整合多样的外界声音信号。SBF-SEM还可以对组织中的细胞/细胞器进行量化, PIPITONE等^[19]通过将SBF-SEM提供的形态计量数据与蛋白质组学和脂质组学分析相结合, 发现在拟南芥子叶去黄化过程中, 质体经历了个体体积增加和分裂使数量增加两个不同阶段的变化。与SBF-SEM类似, 聚焦离子束扫描电子显微术(focused ion beam scanning electron microscopy, FIB-SEM)^[20-21]和气团簇离子束扫描电子显微术(gas cluster ion beam scanning electron microscopy, GCIB-SEM)是通过离子束或气团簇离子束对样品表面铣削后, 再用扫描电子束对其表面成像, 如此反复从而得到样品的三维重构图像的^[22]。该类方法可与包埋前胶体金免疫标记相结合, 切片后直接进行电镜成像以提高工作效率。然而受免疫试剂穿透能力的限制, 该方法对样品体积具有较高的要求。FIB-SEM与GCIB-SEM都具有小于10纳米的各向同性分辨率, 然而FIB-SEM的成像区域有限, 适合研究较小体积样品的三维结构。GCIB-SEM具有较广的成像区域, 且能够与多光束电子显微镜兼容, 从而加快了图像采集速度, 因此更适合大体积样本如脑组织等的成像^[22]。低温超分辨(cryogenic super-resolution, cryo-SR)荧光显微镜和聚焦离子束扫描电子显微镜(FIB-SEM)结合使用的新方法cryo-SR/FIB-SEM可以在全局超微结构背景下对蛋白质进行多色二维三维可视化研究^[21]。例如, 在囊泡特性及其形态多样性的研究中, 仅进行电镜成像无法区分囊泡种类的相关研究。然而, 使用该技术可以对特定蛋白进行荧光标记并成像, 有利于对囊泡独特功能的深入研究。

这些技术在电镜分辨率等方面取得了重大进展, 极大促进了细胞生物学、神经学、脑科学等的相关研究。但这些技术的成功应用, 需要通过样品制备过程来增大样品的电子对比度, 从而提高电镜成像后超微结构的清晰度。特别是在三维重构中, 对于SBF-SEM和FIB-SEM这类基于块表面的原位三维重构技术, 样品块染具有重要意义。本文主要讨论了电子显微镜成像样品的染色原理以及块染中几种重要试剂的作用, 希望能为电镜样品块染方法的

改进提供参考。

1 电镜样品染色方法

传统电镜样品的制作流程包括固定、脱水、包埋、聚合等步骤。目前最常用的方法是使用戊二醛和多聚甲醛进行前固定,再用四氧化锇进行后固定,之后经乙醇和丙酮脱水,环氧树脂包埋,高温聚合,最后切片并将切片置于电镜下观察。由于生物样品中的元素原子序数较低,散射电子的能力都较弱,没有明显的电子散射差异^[23]。因此,想看到对比度更加强烈的图像,必须将生物样品进行“电子染色”。电子染色是使铀、铅、锇、钨等重金属盐类中的重金属与组织中某些成分结合或被吸附,以达到染色的目的。样品不同结构和成分可以吸附不同数量的重金属原子,吸附重金属较多的部位,具有较强的电子散射能力,在电镜图像中呈深黑色;吸附重金属较少或没有吸附重金属的部位则呈浅黑色或灰白色。因此,电子染色处理可提高样品的反差,增加图像的清晰度^[24]。

在经典的超薄切片样品制备方法中,将样品切片后用醋酸双氧铀和柠檬酸铅进行“电子染色”,这种染色方法被称为片染^[25]。然而在实际操作过程中片染具有诸多局限性。比如在大批量切片染色过程中,每次染色的切片数量有限而且操作繁复,导致片染的工作效率极低;染色过程中反复用镊子夹取载网,容易使载网弯曲变形,在成像时会影响电镜的聚焦效果;频繁的液体更换,容易使载网上的超薄切片破损或丢失;在铅染液的配制以及使用过程中极易产生污染,影响切片的观察效果^[26]。

块染即将整个样品先染色,然后包埋、聚合、切片,最后直接在电子显微镜下成像。在该操作过程中使用戊二醛和多聚甲醛对样品进行前固定,再用锇酸进行后固定,后固定时通常会加入亚铁氰化钾增强锇染色。有时为了再次加深锇染色以提高膜的对比度,会将固定后的样品用桥联剂浸泡之后再用电镜染色,最后用块染剂如醋酸双氧铀等进行块染。最终样品经过脱水、包埋、聚合和切片后可直接用于电镜观察。块染不仅可以避免片染过程中可能出现的污染、切片褶皱、丢失等现象,而且有利于实现样品连续切片,进而实现三维重构^[27-29]。

2 块染原理

块染在应用中面临一个重要的问题,即如何提

高染色效率,增大图像对比度。为了改善块染效果,研究者们分析了影响染色的关键步骤。研究发现增强重金属锇的沉积,使用桥联剂,以及选择合适的块染剂,有利于提高染液的渗透能力或加深染色,从而使大体积样品的细节结构更加清晰可见。

2.1 锇染色原理

锇酸(O_5O_4)是电镜样品制备中的一个重要试剂,它既是样品的固定剂也是染色剂。作为固定剂它可以与脂类、糖类和蛋白质发生反应^[30-31],从而达到固定样品结构的效果;作为染色剂可以增加膜的反差,使样品的膜结构更加清晰。近年来发展的“整体碳化技术”,利用锇酸蒸汽对生物组织、有机组织的烧灼损伤原理,使样品进入碳化状态。一些无法用常规方法进行临界点干燥的样品,可直接“整体碳化”完成样品制备。而且,整个样品的化学物理收缩率小、形貌结构几乎无改变,细微结构清晰,该方法还可以与免疫胶体金标记技术相结合,达到电镜观察和免疫标记的要求。已有报道在对大鼠脑部突触进行胶体金免疫标记的研究过程中使用该方法,获得了较好的制备效果^[32]。虽然四氧化锇具有以上优点,但它的渗透能力较弱。如果组织块较大,渗透效果的内外差异会使样品从表面到中心形成固定和染色梯度差异。所以研究人员从锇酸染色的基本原理出发,寻找更为优化的染色方法。

目前研究者们认为 O_5O_4 对膜的染色主要通过 O_5O_4 与膜上的不饱和脂质发生的烯炔反应使重金属锇与膜物质结合。除此之外,反应过程中生成 O_5^{VI} 状态的化合物 $[O_5O_2(OH)_4]^{2-}$ 会迅速歧化为 O_5O_4 和 O_5O_2 ,而 O_5O_2 是一种非极性的氧化物可以溶解在膜中,导致膜中锇沉积增加从而达到对膜进行“电子染色”的作用,具体原理如图1所示。第一步, O_5O_4 以离子化亲水形式的 $[O_5O_4(OH)_2]^{2-}$ 和非极性亲脂形式的 O_5O_4 两种状态存在,随着这两种状态之间的相互转换 O_5O_4 进入膜内(图1,步骤①)。第二步,进入膜后 O_5O_4 与不饱和膜脂发生烯炔反应形成环状锇酸酯(图1,步骤②)^[30-31,33]。第三步,膜上的环状锇酸酯发生二羟基化^[30,34],产生 O_5^{VI} 状态的亲水性化合物 $[O_5O_2(OH)_4]^{2-}$,导致 O_5 再次离开膜(图1,步骤③)。第四步, $[O_5O_2(OH)_4]^{2-}$ 发生歧化反应生成 O_5O_4 和 O_5^{IV} 状态的 O_5O_2 , O_5O_2 再次进膜中,加深膜染色^[35](图1,步骤④)。由此可见,该途径需要不饱和膜脂的参与。随着反应的进行,不饱和膜脂的可用性降低,生成的

$[\text{OsO}_2(\text{OH})_4]^{2-}$ 和 OsO_2 会趋于饱和。如果能突破这一局限,膜染色仍然有加深的可能性。

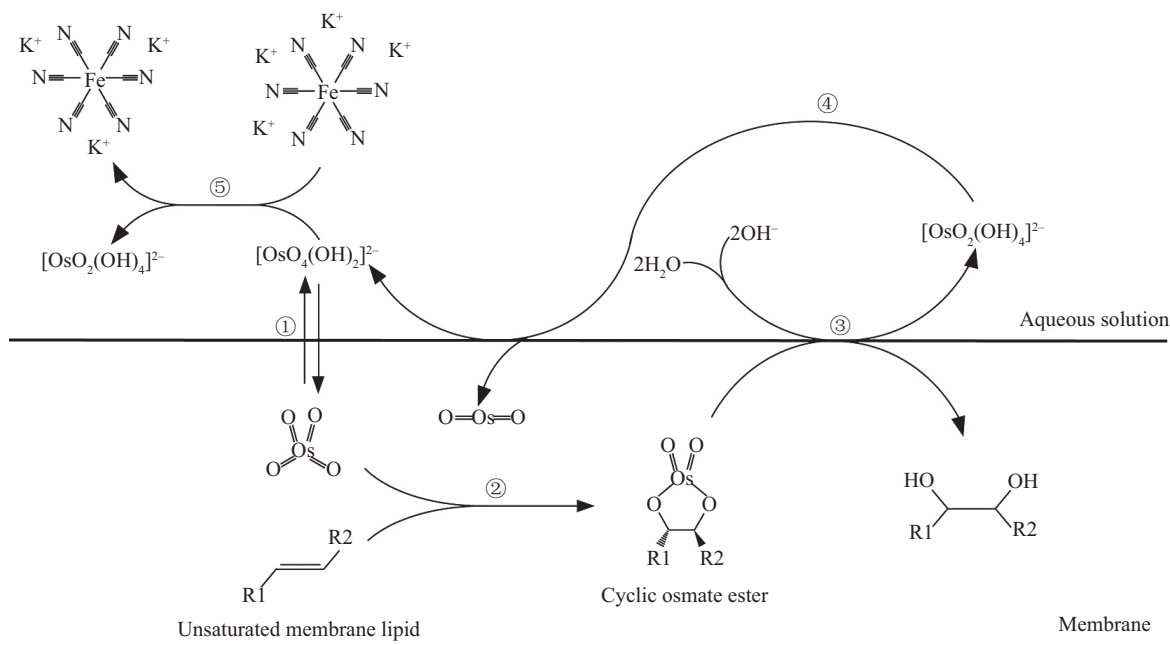
2.2 桥联剂

为了加深钨对膜的染色,研究人员发现在钨浸渍的过程中使用硫代碳酰肼($\text{H}_2\text{NNHCNSNH}_2$, TCH)作为桥联剂,可以在原始钨位置继续沉积钨^[36-37],将该方法称为OTO(osmium-thiocarbohydrazide-osmium, OTO)法。SELIGMAN等^[37]利用小鼠的肾脏、心脏、大脑和小肠进行了传统钨固定染色和OTO方法的对比实验,结果发现使用OTO法使富含脂类的膜结构密度显著增加。因此他们推测TCH可能会与初始钨浸渍过程中结合到脂质上的钨化合物发生反应,并生成反应产物,如图2所示。而TCH的反应基团在这次的反应中没有被完全消耗掉,反应产物可以在第二次钨浸渍过程中与钨酸发生反应,从而起到桥接作用,增加膜上的钨含量^[37]。研究显示,使用OTO法对动物样品进行染色,线粒体的嵴和线粒体外膜、质膜、核膜、内质网等膜结构染色明显加深^[37]。本实验室以青杆花粉管为材料进行实验,也发现经过OTO染色后细胞质膜、线粒体外膜等结构更加清晰,对比度增强(图3)。早期研究表明,钨酸对脂质的固定和染色程度远大于蛋白质、核蛋白或多糖等物质^[38],而且研究人员对浸渍过不饱和脂、蛋白质、核酸和碳水

化合物的滤纸进行OTO法染色,结果发现OTO法会使所有亲钨成分的对比度增强,但由于结合到脂质上的钨含量高于蛋白质,所以脂质成分对比度增强最大,因此推测 OsO_4 与脂质的反应与后者不同^[39]。使用TCH的另一个优点是样品可以富集更多的金属染色剂使其对电子更具导电性,防止样品在SEM观察过程中过量充电^[40]。

此外,早在1984年,科研工作者已经将还原性亚铁氰化钾辅助钨染色法与OTO法相结合,实验结果显示样品的对比度增大,该方法简称为ROTO法^[41]。亚铁氰化钾可以将 Os^{VIII} 状态的 $[\text{OsO}_4(\text{OH})_2]^{2-}$ 转化为 Os^{VI} 状态的 $[\text{OsO}_2(\text{OH})_4]^{2-}$,该途径绕过了钨酸酯形成的步骤^[42](图1,步骤⑤),使得更多的 Os^{VI} 可用于歧化反应,从而产生更多的 OsO_2 沉积在膜中,加深膜染色^[35]。目前,ROTO法仍然被广泛应用于各种较大组织的块染。例如在对小鼠视网膜神经结构的研究中,科研人员通过该染色方法与体电子显微镜技术的结合,实现了对神经回路的3D超微结构成像^[43]。

虽然使用ROTO法可以增大图像对比度,但它还存在一定的缺陷,即TCH可能与组织结合生成 N_2 而形成气泡,损伤样品块从而影响后续观察。所以研究人员寻找了TCH的替代物,发现邻苯三酚(1,2,3-三羟基苯)既可以与钨酸反应,又可溶于水且

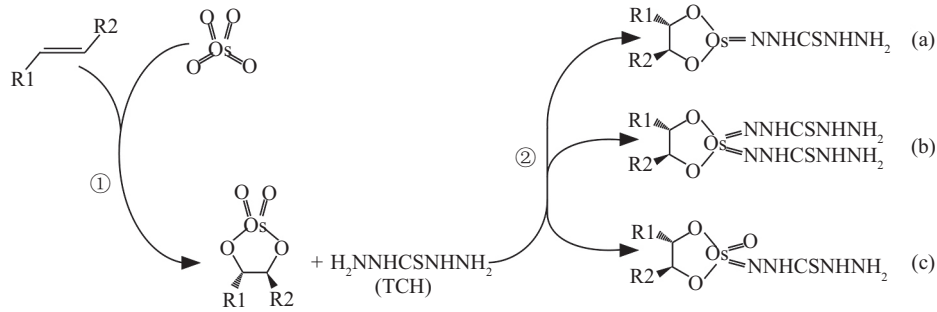


①~⑤分别表示5个反应步骤。

①~⑤ represent five reactions, respectively.

图1 钨对生物细胞膜染色中可能存在的化学反应(根据参考文献[35]修改)

Fig.1 Chemical reactions in osmium staining of biological cell membrane (modified from the reference [35])

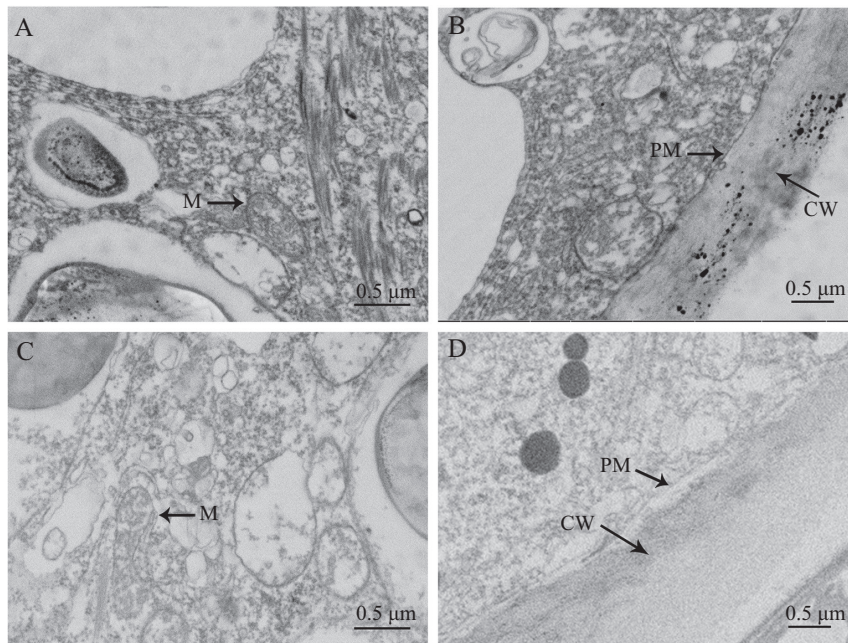


①、②分别表示2个反应步骤。(a)~(c)分别表示反应产物。

①、② represent two reactions, respectively. (a)-(c) represent reaction products, respectively.

图2 假设TCH与结合到脂质上的钨复合物可生成反应产物(根据参考文献[37]修改)

Fig.2 Hypothetical reaction product of TCH with osmium complex bound to lipid (modified from the reference [37])



A、B: 应用OTO法制备样品, 细胞中膜结构染色较深; C、D: 应用传统钨酸染色, 细胞结构染色较浅。M: 线粒体; PM: 质膜; CW: 细胞壁。

A,B: the membrane structure in the cells of the sample prepared by OTO method is darker; C,D: the membrane structure of the sample prepared by the traditional staining method is lightly stained. M: mitochondria; PM: plasma membrane; CW: cell wall.

图3 青杆花粉管细胞超微结构

Fig.3 Ultrastructure of *Picea wilsonii* Mast. pollen tube

分子量不高, 是一个较为理想的TCH替代物。研究人员以小鼠大脑为材料, 分别用邻苯三酚和TCH作为桥联剂进行块染, 结果发现使用前者制备的样品, 无论是膜对比度, 还是染色的渗透度和均一度都具有较好的制备效果^[44]。

3 块染剂的选择

在电子显微成像中使用重金属染色剂以增强细胞精细结构的对比度, 不同重金属盐的性质不同, 其染色效果也不同。块染除了使用钨酸外, 经常会在后续操作中加入其他重金属染色剂, 例如钨化合物

或铅化合物等。这些试剂的不同组合会使样品产生不同的染色效果^[45]。下文着重选择了几种应用比较广泛的块染剂进行介绍, 对这些染色剂性质的了解, 有助于研究人员在块染过程中选择合适的块染剂。

醋酸双氧铀(uranyl acetate, UA)是一种相对特异性的染色剂, 主要染色核酸、蛋白质等, 目前已经被广泛地应用于电镜样品的片染和块染中^[45-47]。当作为切片后染色剂时, 一般使用浓度为2%的醋酸双氧铀水溶液, 室温下对切片染色0.5~1小时。为了提高染色效果, 可以将醋酸双氧铀和铅染色剂结合使用。醋酸双氧铀作为媒染剂, 与铅染色剂结合达到

染色剂附加的效果^[26], 从而加深染色。醋酸双氧铀也可以用于块染, 染色时可向染液中加入乙醇或甲醇以提高其对组织的渗透力^[45]。虽然醋酸双氧铀的染色效果较好, 但其具有高毒性和放射性, 管控严格, 所以即使是用于科学研究也会受到严格的限制^[48]。

铅化合物可染多种细胞成分, 包括膜、核酸和糖原^[49]。常用的铅染色剂有柠檬酸铅和天门冬氨酸铅。天门冬氨酸铅由天门冬氨酸与硝酸铅溶液配制而成, 天门冬氨酸具有两个羧基, 当溶液pH超过一定值时, 羧基的基团会发生离子化, 与溶液中游离的铅离子结合形成天门冬氨酸铅复合物。至于其染色效果则取决于天门冬氨酸与硝酸铅溶液的配比。因为游离的铅离子会与样品结合导致溶液中的铅离子减少, 从而促使天门冬氨酸铅复合物分解释放出更多的铅离子, 铅离子少量而稳定的释放有利于控制染色过程中产生污染^[50]。据前人研究显示使用ROTO与天门冬氨酸铅的组合对组织进行块染, 可以产生无污染、反差较好的染色效果^[45]。柠檬酸铅的染色效果与天门冬氨酸铅类似, 而其渗透效果要优于天门冬氨酸铅^[45], 块染中如果样品块体积较大, 为了更好地观察其内部超微结构, 可优先选择柠檬酸铅进行染色。铅化合物还有一个重要的特点是可以用于酶活性的研究。酶是细胞中生命活动的重要参与者, 负责调节生物功能和提供生命必需的物质, 其活性可根据酶促反应形成的产物来衡量^[51], 铅化合物对酶反应产物具有较好的保存和染色效果^[50]。WACHSTEIN等^[52]曾利用硝酸铅对磷酸酶活性进行检测, 直到现在铅化合物仍是酶活性研究中常用的金属染色剂^[51]。然而铅染色剂的主要缺点是容易产生污染, 尤其在片染过程中柠檬酸铅易与空气中的二氧化碳结合, 形成不溶性的碳酸铅沉淀^[53]。块染可以有效地减少片染期间沉淀物在样品中的沉积, 同时提高了样品的电子密度^[54]。

单宁酸又称鞣酸, 是分子量在500~3000 Da的一类复杂的水溶性多酚化合物, 具有很强的生物活性, 与蛋白质有强烈的结合能力, 经常被用于电镜样品的染色^[55-56]。前人研究发现, 醛类固定后的样品使用单宁酸进行块染, 所得到的样品图像对比度增强, 结构清晰, 染色效果优于醋酸双氧铀^[57]。研究人员以成熟小鼠的胰腺、空肠等为实验材料使用单宁酸进行块染, 结果显示单宁酸染色可以减少脱水和后续实验过程中对胞质、线粒体基质造成的抽提, 从而对细胞成

分具有较好的保存作用^[58]。在使用单宁酸进行块染时需要注意几点, 一是使用单宁酸时宜现配现用, 不宜久置以免影响实验效果; 二是单宁酸为酸性物质, 一般使用二甲砷酸钠缓冲液配制, 必要时可以适当调节溶液的pH; 三是单宁酸在块染中的渗透能力较弱, 制备样品时需要尽量将样品切为小块^[57]。

4 结语

近年来, 三维重构技术的发展让我们对生物样品内部超微结构有了更加深入的了解, 不断刷新了我们对细胞内部的基本结构和细胞之间的结构变化与功能关系的理解。通过对细胞内的内质网、线粒体、脂滴、溶酶体等细胞器进行三维重构, 发现这些细胞器之间存在膜接触位点, 并在脂质稳态维持、代谢物交换、钙水平调节和细胞器分裂等生理活动中发挥着重要作用^[59-61]。对体积较大的样品进行三维重构在科学研究中同样具有重要的意义, 例如, 对小鼠的大脑进行三维重构, 有利于探究大脑活动与神经结构之间的联系。然而对更超微的结构和更大体积样品进行超高分辨率成像, 对样品制备尤其是染色方面提出了更高的要求。

在块染方法的改进中, 研究者们通过更换块染剂、使用桥联剂和增强钨沉积等方式, 提高图像的对比度, 以及解决染液对大尺寸样品渗透不均一等问题。与动物样品相比, 植物样品具有较厚的细胞壁, 且一般细胞内部液泡体积占比较大, 样品的含水量相对较高, 因此块染难度较大。在对拟南芥根尖大液泡形成过程的研究中, 使用钨酸与醋酸双氧铀的混合液对拟南芥根尖进行染色, 通过重金属染色剂的叠加使用提高了图像的对比度, 从而能够对液泡进行高质量的三维重构^[62], 促进了研究人员对液泡起源的理解。然而该染色方法是否适用于体积较大的植物样品仍有待探究。此外, 桥联剂除TCH外, 邻苯三酚也有较好的桥接效果, 但其在植物中的应用尚未见报道。因此, 改进植物样品的块染方法, 将有助于对其结构进行多尺度的研究, 从而更好地将生物样品的内部结构与生理功能相结合, 进一步加深对复杂生命体系的探索。

参考文献 (References)

- [1] DONNELLY W J, ROORDA A. Optimal pupil size in the human eye for axial resolution [J]. *J Opt Soc Am A Opt Image Sci Vis*,

- 2003, 20(11): 2010-5.
- [2] WOLLMAN A J M, NUDD R, HEDLUND E G, et al. From Animaculum to single molecules: 300 years of the light microscope [J]. *Open Biol*, 2015, 5(4): 150019.
- [3] ROINGEARD P. Viral detection by electron microscopy: past, present and future [J]. *Biol Cell*, 2008, 100(8): 491-501.
- [4] REY J S, LI W, BRYER A J, et al. Deep-learning in situ classification of HIV-1 virion morphology [J]. *Comput Struct Biotechnol*, 2021, 19, 5688-700.
- [5] NAKAMURA H, KIKKAWA M, MURATA T. Technical development and sharing of high-resolution cryo-electron microscopes [J]. *Biophys Physicobiol*, 2021, 18: 265-6.
- [6] LI X X, JI G, CHEN X, et al. Large scale three-dimensional reconstruction of an entire *Caenorhabditis elegans* larva using AutoCUTS-SEM [J]. *J Struct Biol*, 2017, 200(2): 87-96.
- [7] TITZE B, GENOUD C. Volume scanning electron microscopy for imaging biological ultrastructure [J]. *Biol Cell*, 2016, 108(11): 307-23.
- [8] 李晓敏. 聚焦离子束技术在常温生物样品三维重构方面的方法探讨[J]. 电子显微学报(LI X M. Discussion on three-dimensional reconstruction of biological samples at room temperature by focused ion beam technology [J]. *Journal of Electron Microscopy*), 2020, 39(2): 196-205.
- [9] ZHANG X, MAN Y, ZHUANG X H, et al. Plant multiscale networks: charting plant connectivity by multi-level analysis and imaging techniques [J]. *Sci China Life Sci*, 2021, 64(9): 1392-422.
- [10] ZHANG X, HU Z J, GUO Y Y, et al. High-efficiency procedure to characterize, segment, and quantify complex multicellularity in raw micrographs in plants [J]. *Plant Methods*, 2020, 16(1): 100.
- [11] MIROSLAV O, DANIEL V W, PAVEL T, et al. Multiscale imaging of plant development by light-sheet fluorescence microscopy [J]. *Nat Plants*, 2018, 4(9): 639-50.
- [12] ROUQUETTE J, GENOUD C, VAZQUEZ-NIN G H, et al. Revealing the high-resolution three-dimensional network of chromatin and interchromatin space: a novel electron-microscopic approach to reconstructing nuclear architecture [J]. *Chromosome Res*, 2009, 17(6): 801-10.
- [13] CUENTAS-CONDORI A, MILLER RD D M. Synaptic remodeling, lessons from *C. elegans* [J]. *J Neurogenet*, 2020, 34(3/4): 307-22.
- [14] HILDEBRAND D G C, CICCONET M, TORRES R M, et al. Whole-brain serial-section electron microscopy in larval zebrafish [J]. *Nature*, 2017, 545(7654): 345-9.
- [15] KASTHURI N, HAYWORTH K J, BERGER D R, et al. Saturated reconstruction of a volume of neocortex [J]. *Cell*, 2015, 162(3): 648-61.
- [16] SHEN W W, MA L Y, ZHANG X, et al. Three-dimensional reconstruction of *Picea wilsonii* Mast. pollen grains using automated electron microscopy [J]. *Sci China Life Sci*, 2020, 63(2): 171-9.
- [17] 曹流, 张东. 连续切片扫描电子显微镜在石墨烯相变复合材料导热骨架表征中的初步应用[J]. 化工新型材料(CAO L, ZHANG D. Preliminary application of continuous slice scanning electron microscope in characterization of thermal conductive skeleton of graphene phase change composites [J]. *New Chemical Materials*), 2020, 48(9): 260-3.
- [18] HUA Y, DING X, WANG H, et al. Electron microscopic reconstruction of neural circuitry in the cochlea [J]. *Cell Reports*, 2021, 34(1): 108551.
- [19] PIPITONE R, EICKE S, PFISTER B, et al. A multifaceted analysis reveals two distinct phases of chloroplast biogenesis during de-etiolation in *Arabidopsis* [J]. *eLife*, 2021, 10: e62709.
- [20] WEINER A, ENNINGA J. The pathogen-host interface in three dimensions: correlative FIB/SEM applications [J]. *Trends Microbiol*, 2019, 27(5): 426-39.
- [21] HOFFMAN D P, SHTENGEL G, XU C S, et al. Correlative three-dimensional super-resolution and block-face electron microscopy of whole vitreously frozen cells [J]. *Science*, 2020, 367(6475): eaaz5357.
- [22] HAYWORTH K J, PEALE D, JANUSZEWSKI M, et al. Gas cluster ion beam SEM for imaging of large tissue samples with 10 nm isotropic resolution [J]. *Nat Methods*, 2020, 17(1): 68-71.
- [23] 黄远洁, 莫肖敏, 孟春梅, 等. 3种常规透射电子显微镜超薄切片染色方法的对比分析[J]. 广西医科大学学报(HUANG Y J, MO X M, MENG C M, et al. Comparative analysis of three conventional transmission electron microscopy ultra-thin section staining methods [J]. *Journal of Guangxi Medical University*), 2015, 32(6): 912-3.
- [24] 付洪兰. 实用电子显微镜技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 2004, 62-5.
- [25] 林方兴, 范晓燕, 沈亚峰, 等. 电镜超薄切片批量染色的载网固定装置改进与应用[J]. 电子显微学报(LIN F X, FAN X Y, SHEN Y F, et al. Improvement and application of carrier net fixation device for batch dyeing of electron microscopic ultra-thin sections [J]. *Journal of Electron Microscopy*), 2017, 36(1): 3.
- [26] MASCORRO J A, BOZZOLA J J. Processing biological tissues for ultrastructural study [J]. *Methods Mol Biol*, 2007, 369: 19-34.
- [27] MOTTA A, BERNING M, BOERGENS K M, et al. Dense connectomic reconstruction in layer 4 of the somatosensory cortex [J]. *Science*, 2019, 366(6469): 1093.
- [28] DENK W, HORSTMANN H. Serial block-face scanning electron microscopy to reconstruct three-dimensional tissue nanostructure [J]. *PLoS Biol*, 2004, 2(11): e329.
- [29] HAYWORTH K J, XU C S, LU Z Y, et al. Ultrastructurally smooth thick partitioning and volume stitching for large-scale connectomics [J]. *Nat Methods*, 2015, 12(4): 319-22.
- [30] KHAN A A, RIEMERSMA J C, BOOIJ H L. The reactions of osmium tetroxide with lipids and other compounds [J]. *J Histochem Cytochem*, 1961, 9(5): 560-3.
- [31] MALATESTA M. Transmission electron microscopy as a powerful tool to investigate the interaction of nanoparticles with subcellular structures [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(23): 12789.
- [32] GAO B Y, XU D S, LIU P L, et al. Modified constraint-induced movement therapy alters synaptic plasticity of rat contralateral hippocampus following middle cerebral artery occlusion [J]. *Neural Regen Res*, 2020, 15(6): 1045-57.
- [33] WHITE D L, ANDREWS S B, FALLER J W, et al. The chemical nature of osmium tetroxide fixation and staining of membranes by x-ray photoelectron spectroscopy [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1976, 436(3): 577-92.
- [34] SUBBARAMAN L R, SUBBARAMAN J, BEHRMAN E J. Formation and hydrolysis of osmate(VI) esters [J]. *Inorg Chem*,

- 1972, 11(11): 2621-7.
- [35] HUA Y F, LASERSTEIN P, HELMSTAEDTER M. Large-volume en-bloc staining for electron microscopy-based connectomics [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 7923.
- [36] WEINER E, PINSKEY J M, NICASTRO D, et al. Electron microscopy for imaging organelles in plants and algae [J]. *Plant Physiol*, 2022, 188(2): 713-25.
- [37] SELIGMAN A M, WASSERKRUG H L, HANKER J S. A new staining method (OTO) for enhancing contrast of lipid: containing membranes and droplets in osmium tetroxide-fixed tissue with osmiophilic thiocarbohydrazide (TCH) [J]. *J Cell Biol*, 1966, 30(2): 424-32.
- [38] STORCKENIUS W, MAHR S C. Studies on the reaction of osmium tetroxide with lipids and related compounds [J]. *Lab Invest*, 1965, 14: 1196-207.
- [39] HANKER J S, DEB C, WASSERKRUG H L, et al. Staining tissue for light and electron microscopy by bridging metals with multidentate ligands [J]. *Science*, 1966, 152(3729): 1631-4.
- [40] GLANCY B, HSU L Y, DAO L, et al. *In vivo* microscopy reveals extensive embedding of capillaries within the sarcolemma of skeletal muscle fibers [J]. *Microcirculation*, 2014, 21(2): 131-47.
- [41] WILLINGHAM M C, RUTHERFORD A V. The use of osmium-thiocarbohydrazide-osmium (OTO) and ferrocyanide-reduced osmium methods to enhance membrane contrast and preservation in cultured cells [J]. *J Histochem Cytochem*, 1984, 32(4): 455-60.
- [42] WHITE D L, MAZURKIEWICZ J E, BARNETT R J. A chemical mechanism for tissue staining by osmium tetroxide-ferrocyanide mixtures [J]. *J Histochem Cytochem*, 1979, 27(7): 1084-91.
- [43] BRIGGMAN K L, HELMSTAEDTER M, DENK W. Wiring specificity in the direction-selectivity circuit of the retina [J]. *Nature*, 2011, 471(7337): 183-8.
- [44] MIKULA S, DENK W. High-resolution whole-brain staining for electron microscopic circuit reconstruction [J]. *Nat Methods*, 2015, 12(6): 541-6.
- [45] TAPIA J C, KASTHURI N, HAYWORTH K J, et al. High-contrast en bloc staining of neuronal tissue for field emission scanning electron microscopy [J]. *Nat Protoc*, 2012, 7(2): 193-206.
- [46] CARPENTIER A, ABREU S, TRICHET M, et al. Microwaves and tea: new tools to process plant tissue for transmission electron microscopy [J]. *J Microsc*, 2012, 247(1): 94-105.
- [47] MURSALIMOV S, OHNO N, MATSUMOTO M, et al. Serial block-face scanning electron microscopy reveals that intercellular nuclear migration occurs in most normal tobacco male meiocytes [J]. *Front Plant Sci*, 2021, 12: 672642.
- [48] MILLAR A A, SIMAKOVA A V. Use of the OTE-staining method for ultrathin sections on the example of microsporidia (Protozoa: Microsporidia) [J]. *Tsitologiya*, 2009, 51(9): 741-7.
- [49] SILVA R C, BAO S N, JIVAGO J L, et al. Ultrastructural characterization of porcine oocytes and adjacent follicular cells during follicle development: lipid component evolution [J]. *Theriogenology*, 2011, 76(9): 1647-57.
- [50] MIKULA S, BINDING J, DENK W. Staining and embedding the whole mouse brain for electron microscopy [J]. *Nat Methods*, 2012, 9(12): 1198-201.
- [51] KUCHENBROD M T, SCHUBERT U S, HEINTZMANN R, et al. Revisiting staining of biological samples for electron microscopy: perspectives for recent research [J]. *Mater Horiz*, 2021, 8(3): 685-99.
- [52] WACHSTEIN M, MEISEL E. Histochemistry of hepatic phosphatases of a physiologic pH; with special reference to the demonstration of bile canaliculi [J]. *Am J Clin Pathol*, 1957, 27(1): 13-23.
- [53] 张丽芳, 姚梅宏, 曲利娟, 等. 透射电镜超薄切片染色铅污染的补救方法[J]. *临床与实验病理学杂志(ZHANG L F, YAO M H, QU L J, et al. A remedy for TEM ultra-thin section staining lead contamination [J]. Journal of Clinical and Experimental Pathology)*, 2014, 30(7): 816.
- [54] RUMNEY B M, MALIK F T, MORGAN S R, et al. The ultrastructural development and 3D reconstruction of the transparent carapace of the ostracod *Skogsbergia lernerii* [J]. *Mar Biol*, 2022, 169(3): 35.
- [55] 石闪闪, 何国庆. 单宁酸及其应用研究进展[J]. *食品工业科技 (SHI S S, HE G Q. Research progress on tannic acid and its application [J]. Technology for The Food Industry)*, 2012, 33(4): 4.
- [56] RELUCENTI M, FAMILIARI G, DONFRANCESCO O, et al. Microscopy methods for biofilm imaging: focus on SEM and VP-SEM pros and cons [J]. *Biology*, 2021, 10(1): 51.
- [57] SIMIONESCU N, SIMIONESCU M. Galloylglucoses of low molecular weight as mordant in electron microscopy. II. The moiety and functional groups possibly involved in the mordanting effect [J]. *J Cell Biol*, 1976, 70(3): 622-33.
- [58] LEWIS P N, YOUNG R D, SOUZA R B, et al. Contrast-enhanced tissue processing of fibrillin-rich elastic fibres for 3D visualization by volume scanning electron microscopy [J]. *Methods Protoc*, 2021, 4(3): 56.
- [59] LIM C Y, DAVIS O B, SHIN H R, et al. ER-lysosome contacts enable cholesterol sensing by mTORC1 and drive aberrant growth signalling in Niemann-Pick type C [J]. *Nat Cell Biol*, 2019, 21(10): 1206-18.
- [60] HERNANDEZ-ALVAREZ M I, SEBASTIAN D, VIVES S, et al. Deficient endoplasmic reticulum-mitochondrial phosphatidylserine transfer causes liver disease [J]. *Cell*, 2019, 177(4): 881-95.
- [61] JIANG Y, LI L L, CHEN X, et al. Three-dimensional ATUM-SEM reconstruction and analysis of hepatic endoplasmic reticulum-organelle interactions [J]. *J Mol Cell Biol*, 2021, 13(9): 636-45.
- [62] CUI Y, CAO W H, HE Y L, et al. A whole-cell electron tomography model of vacuole biogenesis in *Arabidopsis* root cells [J]. *Nat Plants*, 2019, 5(1): 95-105.