

**Center for Biological Imaging**  
中国科学院生物物理研究所生物成像中心



**2008—2012工作总结  
暨2013年度报告**

## 01 一、生物成像中心简介

- 01 1.成立背景、发展定位和目标
- 03 2.装备条件
  - 03 300 kV场发射低温透射电子显微镜 (300 kV FEG cryo-TEM)
  - 03 200 kV透射电子显微镜 (200 kV TEM)
  - 03 120 kV透射电子显微镜 (120 kV TEM)
  - 04 双束场发射扫描电子显微镜 (Dual Beam FEG SEM)
  - 04 扫描探针显微镜 (Scanning Probe Microscope)
  - 04 结构照明超高分辨率荧光显微镜 (Structure Illumination Super Resolution Fluorescence Microscope)
  - 05 高速双转盘荧光共聚焦显微镜SDC (High Speed Spinning Disk Confocal Fluorescence Microscope)
  - 05 高速转盘荧光共聚焦显微镜XD (High Speed Spinning Disk Confocal Fluorescence Microscope)
  - 05 双光子荧光共聚焦显微镜 (Two-photon Confocal Fluorescence Microscope)
  - 06 光谱型激光扫描共聚焦显微镜FV1200 (Multi-color Laser Scanning Confocal Fluorescence Microscope)
  - 06 激光扫描共聚焦显微镜FV1000 (Laser Scanning Confocal Fluorescence Microscope)
  - 06 激光扫描共聚焦显微镜FV500 (Laser Scanning Confocal Fluorescence Microscope)
  - 07 活细胞成像倒置荧光显微镜 (Invert Fluorescence Microscope for Live Cell Imaging)
  - 07 高性能计算机集群
- 08 3.人员队伍
  - 08 学术带头人
  - 09 专业工程师

## 10 二、生物成像中心年度重要工作成果

- 10 1.技术服务 (用户利用本中心的技术和服务所获得的部分重要成果)
  - 10 DNA复制叉相关研究
  - 10 猪动脉内皮细胞胞膜窖的电子断层三维结构分析
  - 11 二型分子伴侣开口状态的结构研究
  - 12 呼肠孤病毒科质型多角体病毒CPV的近原子分辨率结构
  - 12 CPV病毒转录态原子模型
  - 13 小热休克蛋白MjHSP16.5的动态结构研究
  - 13 细胞极化因子Par-3 NTD的组装机理研究
  - 14 柔性交织末端对二型分子伴侣素热稳定性的决定作用
  - 15 兔出血症病毒的准原子模型
  - 15 FeCl<sub>3</sub>/[C<sub>4</sub>mim]Cl离子液体结构
  - 16 心肌细胞中线粒体通讯机制研究
  - 16 EXO70A1基因在拟南芥管状分子发育中的关键作用
  - 17 阴离子双子表面活性剂与阳离子氨基单链表面活性剂混合物的聚集过渡
  - 18 北京宝洁技术有限公司产品的微观结构
  - 18 投射神经元与蘑菇体神经元的突触联系
  - 19 多胺衍生物为基础的DNA线性化核酸酶
  - 19 SbcD对双链DNA的核酸内切酶活性
  - 20 果蝇幼虫光感机制研究新进展
  - 20 iPS细胞重编程机制研究新进展
  - 21 CRAC通道中STIM1分子的自我抑制机理
  - 22 细胞自噬检测探针的新进展

22	多纤毛细胞的中心粒扩增机制研究新进展
22	囊泡运输分子机制研究新进展
23	源自PB1氨基序列的短肽干扰流感病毒多聚酶的组装
24	2. 技术研究 (2013年度生物成像中心所开展的技术和方法学研究)
24	连续超薄切片自动化收集装置
24	透射电镜相位衬度增强技术——相位板系统
25	聚焦离子束法制备冷冻含水切片
<b>26</b>	<b>三、装备运行和技术服务情况</b>
26	1. 电镜样品制备技术服务
27	2. 透射电镜运行服务 (FEI TITAN KRIOS)
28	3. 透射电镜运行服务 (FEI TECNAI 20和FEI TECNAI SPIRIT)
28	4. 扫描电镜运行服务 (FEI HELIOS NANOLAB 600I)
29	5. 扫描探针显微镜运行服务 (NANOSCOPE IIIA MULTIMODE)
29	6. 激光共聚焦显微镜运行服务
32	7. 结构照明超高分辨率荧光显微镜运行服务 (DELTA VISION OMX)
33	8. 数据处理相关设备 (浪潮TS10K计算机集群)
<b>33</b>	<b>四、项目申报情况</b>
<b>34</b>	<b>五、获奖情况</b>
<b>34</b>	<b>六、日常活动和管理</b>
34	1. 周一例会
34	2. 工作汇报及JOURNAL CLUB
36	3. 规章制度
<b>37</b>	<b>七、重要学术活动</b>
37	1. 生物电镜样品制备技术WORKSHOP'08 (2008年)
37	2. 生物电镜样品制备技术WORKSHOP'09 (2009年)
38	3. 中日低温电子显微学双边论坛(CHINA-JAPAN 3D-EM FORUM 2010)
38	4. 第三届郭可信电子显微学学与晶体学暑期学校暨冷冻电镜三维分子成像国际研讨会 (2010年)
39	5. 生物成像中心论坛 (2011年)
39	6. 第一届北京地区三维生物成像论坛 (2012年)
40	7. 国际冷冻电镜图像处理技术培训班 (2013年)
41	8. IMARIS多维图像分析技术交流培训会 (2013年)
41	9. 生物成像中心2013年度常规技术培训
<b>42</b>	<b>八、科普活动</b>
42	少年科学画报供稿
43	北京一零一中学科研兴趣活动——香叶天竺葵的环保作用
<b>44</b>	<b>九、利用生物成像中心设备技术所发表研究论文汇编</b>
44	2013年度
46	2012年度
47	2011年度
48	2010年度
49	2009年度
50	2008年度
<b>51</b>	<b>十、附录</b>
51	生物成像中心成果展示海报汇编
59	生物成像中心各项规章制度和申请表

## 生物成像中心简介

### 1. 成立背景、发展定位和目标

生物医学的研究离不开成像技术，每一次成像技术的革命都会极大推动生命科学研究的进程。光学显微镜的发明使得人们认识到几乎所有的生命都存在一个共同的基本组成单元——“细胞”，电子显微镜的出现极大丰富了人们对细胞内部超微结构的认识，荧光共聚焦显微镜的发明让人们可以观察细胞内部的动态过程，X射线、核磁共振、正电子发射断层扫描成像技术的成功应用使得医生可以在无损伤的条件下对病人体内器官组织的病变情况进行检测，高分辨率电子显微镜技术使得人们对病毒的精细三维结构有了全面认识……可以说，生物成像技术已经渗透到当今生命科学研究的各领域中，成为重要而不可或缺的研究工具。

目前，生物成像面临着新的技术革命，新的原理、新的技术、新的方法层出不穷，这包括了超分辨率荧光显微成像技术(PALM/STORM、SIM、STED、3B)、相干反斯托克拉曼成像技术(CARS)、冷冻电子显微高分辨三维成像技术、基于扫描电镜的大尺度三维成像技术、生物原子力显微技术、自由电子激光相干成像技术……这些新技术的出现和成功应用对生命科学研究的重大作用已经显露，并将进一步推动生命科学的自我革命。

针对当前生物成像技术的发展趋势并结合自身的学科特点，中科院生物物理研究所在过去的六年（2008-2013）重点发展了生物显微三维成像技术，建成了具有国际一流水平的生物显微成像中心（简称生物成像中心，<http://cbi.ibp.ac.cn>）。该中心定位于生命科学研究前沿，致力于实现对生物学对象从纳观尺度（~10 nm）到介观尺度（~10 μm）的高分辨率（0.3 ~ 2 nm）三维成像技术，通过对生物超微高分辨率三维结构的研究来回答生命科学的关键问题。目前，该中心集成了超分辨率光学显微技术、低温电子显微技术、三维重构技术、低温扫描微加工技术、单分子荧光成像技术、原子力显微技术、光电关联显微成像技术以及一系列生物显微成像样品制备技术，并承担了北京及周边地区生物显微成像技术服务工作，极大促进了相关生命科学前沿研究的进展，成为我国生命科学基础研究的重要支撑平台。

生物成像中心占地约1000平方米，拥有透射电子显微镜三台（120kV热发射透射电子显微镜FEI Tecnai Spirit, 200kV热发射透射电子显微镜FEI Tecnai 20和先进的300kV场发射低温透射电子显微镜FEI Titan Krios），双束扫描电子显微镜一台（FEI Helios Nanolab 600i, 配备了Quaroum PT3000低温样品载台），原子力显微镜一台，结构照明超分辨率光学显微镜（Delta Vision OMX）一台，全内反射荧光（TIRF）显微镜一台，激光扫描共聚焦显微镜三台（FV500, FV1000S, FV1200），转盘共聚焦显微镜两台（3I Marianas XL, Andor Revolution XD），双光子显微镜一台（FV1000MPE）。围绕这些显微设备，生物成像中心配备了完整的用于生物超微结构研究的样品制备系统，其中包括高压冷冻固定仪、快速冷冻仪、低温置换/脱水/聚合仪、临界点干燥仪、低温/常温超薄切片机、真空镀膜仪、表面等离子清洗仪、离子溅射仪、低温样品杆以及自主研发的连

续切片自动化收集装置。此外，生物成像中心还建成了完整的显微图像数据采集、存储和处理计算机网络系统，其中包括Leginon-Appion低温透射电镜自动化数据收集和处理系统，Xplor3D低温电子断层数据自动化收集和处理系统，浪潮倚天GPU图形工作站四台，浪潮天梭高性能计算机集群一套（100个计算节点，1200个计算核心）以及具有22台计算机终端的多媒体教室（用于图像处理软件教学）。

在一流的硬件设备基础上，生物成像中心不断完善自己的科研服务队伍建设，目前形成了一支以青年人为主的科学家和工程师队伍。科学家为生物超微显微成像研究领域的学术带头人，这包括了徐涛研究员、徐伟研究员、孙飞研究员、朱平研究员、苗龙研究员和徐平勇研究员，他们作为生物成像中心的兼职首席科学家，负责生物成像中心的发展和建设。目前生物成像中心的主任由孙飞研究员担任，负责生物成像中心的制度建设、学科发展和日常工作。生物成像中心的工程师队伍具有多学科交叉（生物、物理、材料、计算机）的背景，负责生物成像中心的对外技术服务和开展生物超微显微成像的方法学研究，他们分成了样品制备小组（孙磊、孙书锋、王莉、贾艳侠）、电子显微镜小组（季刚、黄小俊、张建国、陈永圣）、荧光显微镜小组（滕岩、李硕果）和网络计算小组（凌伦奖、丁玮）。

在对外技术服务方面，生物成像中心旨在打造一个高水平的开放共享平台，满足生物成像领域日益广泛的科研工作需求，并通过前沿技术的探索和方法学的研究来带领和提升国内本领域发展。截止到2013年12月止，对外技术服务对象涵盖了包括北京大学、南开大学、武汉大学、中山大学、上海生化细胞所、301医院等47所科研单位以及宝洁公司、北京康乐卫士生物技术有限公司、北京凯因生物科技公司等23家高新技术企业，所管理的各仪器平均共享率达到74.6%，平均年使用机时达到5967小时以上。

生物成像中心的发展目标是将多种显微成像技术，特别是高分辨率电子显微技术与超分辨率光学显微技术结合起来，通过对生物学样品实现多尺度（从纳米尺度到微米尺度）的高分辨率（纳米分辨率）三维成像来回答重要的生物学问题，实现细胞生物学研究与结构生物学研究的融合。具体来讲，生物成像中心的研究分为细胞的超微结构研究、生物超分子复合体的高分辨率三维结构研究以及生物组织的大尺度纳米分辨率三维结构成像研究。

生物成像中心在过去的五年建设当中，已经取得了优异的成绩，为北京及其周边地区的科研工作提供了重要的技术支撑，完成了大量的样品制备和观察服务工作，用户在基于生物成像中心工作的基础上取得了诸多重要的研究成果，这些成果发表在Cell, Molecular Cell, Nature Nano-letter, PNAS, PLOS Pathogen, Structure, Journal of Virology等一系列国际一流的期刊上。在下一个五年当中，生物成像中心将进一步加强队伍建设，提升科研实力，提高技术服务水平，开展技术方法学研究，扩大合作研究，成为国内生物成像技术开发推广与培训的基地，并力争成为国际一流的生物成像中心。

## 2. 装备条件



型号：FEI Titan Krios

购入（安装）时间：  
2009年12月

### 300 kV场发射低温透射电子显微镜（300 kV FEG cryo-TEM）

主要性能和指标：

加速电压：80-300 kV连续可调；场发射电子枪；点分辨率0.27 nm；信息分辨极限0.14 nm；三级聚光镜照明系统，可实现平行光照明；低温（液氮温区）样品载物台，可倾转70度，水平可旋转90度；Autoloader自动进样系统，可一次性装载并存储12个冷冻样品；磁透镜系统具有恒功率模式；配置底插4K\*4K CCD相机，型号Gatan US4000 895；配置能量过滤器，型号Gatan GIF Tridium；配置STEM模式和HADDF探测器；安装FEI Xplore3D和Leginon软件。

主要功能和服务范围：

用于生物大分子复合体高分辨率三维结构研究和细胞（细胞器）超微结构三维高分辨率成像。

### 200 kV透射电子显微镜（200 kV TEM）

主要性能和指标：

加速电压：80-200 kV连续可调；热发射电子枪（W或者LaB6灯丝）；点分辨率0.25 nm；配置冷冻样品传输杆Gatan cryo Holder 626和Gatan cryo Holder CT3500；配置底插2K\*2K CCD相机，型号Gatan US1000 894；安装FEI Xplore3D和Leginon软件。

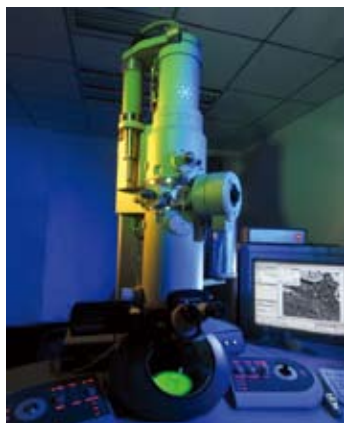
主要功能和服务范围：

用于生物大分子复合体中等分辨率三维结构研究、细胞（细胞器）超微结构成像和三维结构分析。



型号：FEI Tecnai 20

购入（安装）时间：  
2002年5月



型号：FEI Tecnai Spirit

购入（安装）时间：  
2010年12月

### 120 kV透射电子显微镜（120 kV TEM）

主要性能和指标：

加速电压：20-120 kV连续可调；热发射电子枪（W灯丝）；极靴为BioTWIN，球差系数3.7mm；点分辨率0.38 nm；配置冷冻样品传输杆Gatan cryo Holder 626和Gatan cryo Holder CT3500；配置侧插1K\*1K CCD，型号Olympus OSIS MageView；配置底插2K\*2K CCD相机，型号FEI Eagle CCD；安装FEI Xplore3D。

主要功能和服务范围：

用于细胞生物学超微结构研究和生物大分子样品检测。



型号：FEI Helios NanoLab 600i

购入（安装）时间：  
2012年5月

### 双束场发射扫描电子显微镜（Dual Beam FEG SEM）

主要性能和指标：

场发射电子枪，电子束加速电压：350 V - 30 kV；Ga离子枪，离子束加速电压：500 V - 30 kV；分辨率：0.8 nm (@30kV, STEM), 0.9 nm (@15kV, SE), 1.4 nm (@1kV, SE)；配备Pt气体沉积源；配置PP3000T冷冻样品传递系统和冷冻样品台；安装Auto Slice&View软件可以实现自动化离子束切割成像。

主要功能和服务范围：

生物样品大尺度连续切片扫描电子显微成像和三维重构（SBFSEM技术）；生物样品含水冷冻切片加工；生物样品表面超微结构观察；冷冻扫描电子显微成像等。

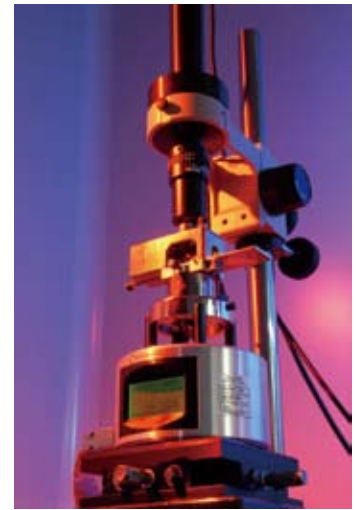
### 扫描探针显微镜（Scanning Probe Microscope）

主要性能和指标：

多种AFM成像模式：Contact Mode和Tapping Mode；AFM成像分辨率，XY方向2 ~ 3 nm，Z方向0.5 nm；可以进行STM（扫描隧道显微术）成像。

主要功能和服务范围：

在亚微米尺度上研究生物样品的形态结构；直接对DNA、RNA、蛋白质等生物大分子样品在生理溶液条件下进行成像，实时观察动态过程。



型号：Nanoscope IIIa Multimode

购入（安装）时间：  
2004年

型号：DeltaVision OMX V3

购入（安装）时间：  
2011年12月

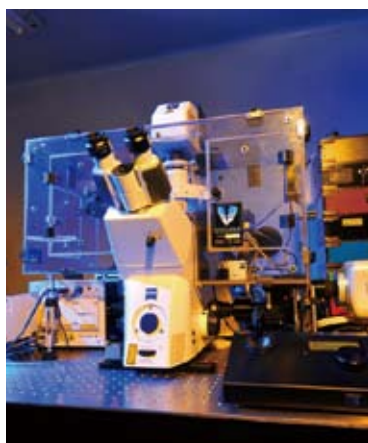
### 结构照明超高分辨率荧光显微镜（Structure Illumination Super Resolution Fluorescence Microscope）

主要性能和指标：

SI Mode结构照明超分辨光学重构技术，可实现三激发光通道（488nm, 405nm, 561nm）超分辨率成像，其中XY方向分辨率可达80 - 120 nm，Z方向分辨率可达300nm；Conventional Mode快速宽场反卷积技术，可用于活细胞动态成像，时间分辨率最高可达33fps。

主要功能和服务范围：

用于观察细胞内特定分子的精确定位和分布，研究生物大分子在细胞内的运动变化规律；由于其超高分辨能力，可以观察到单根的细胞骨架（如微管和微丝）。



型号: Marianas SDC

购入(安装)时间:  
2009年4月

### 高速双转盘荧光共聚焦显微镜SDC (High Speed Spinning Disk Confocal Fluorescence Microscope)

主要性能和指标:

全自动倒置荧光显微镜 (Zeiss Observer Z1); 4个激光器 (405nm、488nm、561nm、640nm); 电动球差校正设备 (SAC); 物镜有40X、100X; 双转盘式共聚焦扫描单元 (CSU-X1); 单光子级EMCCD; 配备共聚焦成像、全内反射成像和紫外光漂白光活化 (FRAP) 三套光路。

主要功能和服务范围:

三套光路可自动切换和组合, 从而实现多种荧光成像功能, 包括多维高速活细胞观察 (如钙火花, 囊泡运输); 共聚焦或是全内反射 (TIRF) 成像模式下同时进行光漂白、光活化。

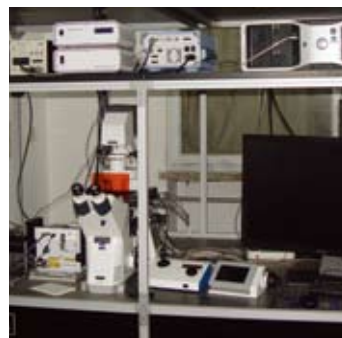
### 高速转盘荧光共聚焦显微镜XD (High Speed Spinning Disk Confocal Fluorescence Microscope)

主要性能和指标:

全内反射全自动倒置荧光显微镜 (Zeiss Observer Z1); 配3个激光器 (405nm, 488nm, 561nm); 物镜10X、100X; 长寿命荧光光源; 闭环控制XY电动平台/压电陶瓷Z轴马达; 双转盘式共聚焦扫描单元 (CSU-X1); 单光子级EMCCD。

主要功能和服务范围:

可实现多维活细胞快速动态荧光成像, 动态荧光强度测量分析, 三维断层扫描成像和重建3D图像等功能。



型号: Andor Revolution XD

购入(安装)时间:  
2012年12月



型号: Olympus FV1000MPE

购入(安装)时间:  
2006年1月

### 双光子荧光共聚焦显微镜 (Two-photon Confocal Fluorescence Microscope)

主要性能和指标:

配备双光子脉冲飞秒激光器 (710-990nm) 及相应的采集光路和探测系统; 正置显微 (Olympus BX61WI); 单光子激光器 (488nm、543nm、633nm); 物镜有4X、10X (W)、40X (W)、60X (W)。

主要功能和服务范围:

双光子显微镜具有光毒性小、信噪比高、穿透深度深等特点, 适合长时间的观察和研究活体细胞和组织以及厚的生物样品。





型号：OLYMPUS FV1200

购入（安装）时间：  
2013年11月

### 光谱型激光扫描共聚焦显微镜FV1200 (Multi-color Laser Scanning Confocal Fluorescence Microscope)

主要性能和指标：

电动倒置荧光显微镜（IX83），带Z轴自动聚焦和防漂移装置；配备4个激光器（405nm、473nm、559nm、635nm），3个荧光通道，及1个透射光通道；具有全内反射荧光（EVA）模块。

主要功能和服务范围：

可实现XY、Z、T、 $\lambda$ 任意组合扫描方式的多色荧光成像；实时动态荧光强度测量分析；采用TIRF物镜与单光子探测器结合，实现膜表面荧光信号探测。

### 激光扫描共聚焦显微镜FV1000 (Laser Scanning Confocal Fluorescence Microscope)

主要性能和指标：

全自动倒置荧光显微镜（IX81）；配4个激光器（405nm、Multi Ar laser 457-488-515nm、543nm、633nm）；物镜有4X、40X、60X、100X；配备3个荧光通道及1个透射光通道，具有同步双扫系统。

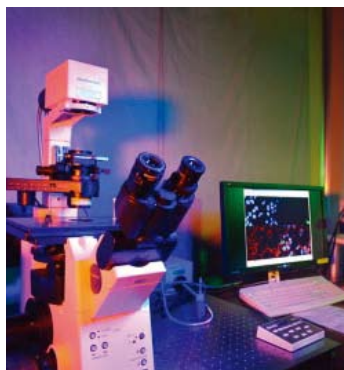
主要功能和服务范围：

多维扫描方式的多色荧光同时成像，实现在激光刺激同时进行共聚焦成像；实现由405 nm激光介导的荧光漂白后恢复（FRAP）、光活化（PA）、光转换等实验。



型号：Olympus FV1000S

购入（安装）时间：  
2009年12月



型号：Olympus FV500

购入（安装）时间：  
2003年2月

### 激光扫描共聚焦显微镜FV500 (Laser Scanning Confocal Fluorescence Microscope)

主要性能和指标：

全自动倒置荧光显微镜（IX81）；配4个激光器（405nm、Multi Ar laser 457-488-515nm、543nm、633nm）；物镜有5X、60X、100X。

主要功能和服务范围：

实现3个荧光和1个透射DIC同时成像；可进行点、线及任意感兴趣区域的扫描；三维重建；可随时间变化扫描图像。



型号: Olympus IX81 MicroPoint

购入(安装)时间:  
2013年11月

## 活细胞成像倒置荧光显微镜 (Invert Fluorescence Microscope for Live Cell Imaging)

主要性能和指标:

全电动倒置荧光显微镜 (IX81), 配ZDC防漂移装置; 物镜10X、40X、60X, 配置相差附件; 具有MicroPoint激光损伤系统(365nm); 高分辨快速CMOS相机; 反馈型CO<sub>2</sub>细胞培养室。

主要功能和服务范围:

可实现长时程活细胞多维动态宽场荧光成像; 可开展细胞损伤和DNA损伤成像, 动态荧光强度测量分析, FURA-2钙离子比率浓度等实验。

## 高性能计算机集群

主要性能和指标:

100个计算节点(1200个CPU核), 80个瘦节点(960个计算核), 20个高速互联瘦节点(240个计算核), 1个厚节点(48个计算核), 4个GPU节点, 总计算能力约为14万亿次每秒; 内存总和3856 GB, 总存储空间60TB; 主干计算网络为10Gb Ethernet, 管理网络为1Gb Ethernet, 高速互联网为40Gb Infiniband; 操作系统为Linux, 作业调度系统为TSJM V1.0。

主要功能和服务范围:

透射电镜的数据收集、数据初步处理、三维重构, 质谱原始数据的处理, 晶体结构解析, 分子动力学, 分子建模, 结构预测, 以及其他生物信息学相关的大规模计算等等。

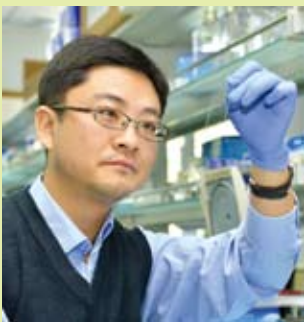


型号: 浪潮TS10K

购入(安装)时间:  
2010年10月

## 3. 人员队伍

## 学术带头人



孙飞 研究员

(中组部万人计划)  
生物成像中心主任。  
技术研究方向：  
高分辨率冷冻电镜显微三维重构技术，多尺度关联成像技术。



徐涛 研究员

(中组部万人计划)  
杰青，中国科学院生物物理研究所所长。  
技术研究方向：  
生物超分辨率光学显微成像技术，超高分辨率冷冻光电关联成像技术。



徐伟 研究员

生物成像中心资深专家顾问。  
技术研究方向：  
高分辨率冷冻电镜显微技术，生物电镜样品制备技术。



朱平 研究员

(百人计划)，生物成像中心专家。  
技术研究方向：  
高分辨率冷冻电镜显微三维重构技术。



苗龙 研究员

(百人计划)，生物成像中心专家。  
技术研究方向：  
细胞超微结构显微成像技术。



徐平勇 研究员

生物成像中心专家。  
技术研究方向：  
生物样品荧光显微超分辨技术，特殊荧光探针技术。

## 专业工程师



季刚 博士，高级工程师

擅长单颗粒三维重构、电子断层扫描三维重构等低温电镜成像技术。



黄小俊 博士，工程师

擅长低温透射电镜和单颗粒分析技术。



张建国 博士，工程师

擅长双束扫描电镜成像技术，利用离子减薄技术进行生物样品大尺度三维成像。



滕岩 硕士，高级工程师

擅长荧光显微镜成像技术，包括宽场、共聚焦、多光子等显微成像技术。



李硕果 硕士，助理工程师

擅长结构照明超分辨荧光显微成像技术。



贾艳侠 博士，工程师

擅长生物大分子原子力显微镜成像技术。



凌伦奖，研究员级高工

擅长数据采集与存储系统管理、高性能计算机集群系统管理。



丁玮 博士，高级工程师

擅长电子显微镜图像数据的处理和相关程序的开发。



陈永圣 硕士，工程师

擅长电气设备运行维护，并同时负责实验室日常事务管理。



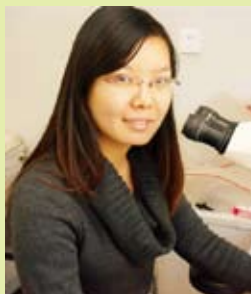
孙磊 硕士，高级工程师

擅长生物电镜的样品制备，包括超薄切片技术，高压冷冻、冷冻切片等低温制样技术以及免疫标记技术。



孙书锋 硕士，高级工程师

擅长电镜样品制备，包括冷冻蚀刻技术、常规超薄切片技术、高压冷冻-冷冻替代技术和低温切片-免疫标记技术。



王莉 硕士，工程师

擅长生物组织和细胞的透射电镜样品制备技术。

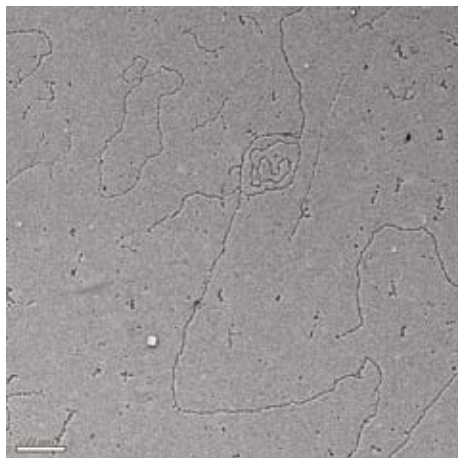
## 生物成像中心年度重要工作成果

### 1. 技术服务（用户利用本中心的技术和服务所获得的部分重要成果）

——透射电镜成像技术（分子展层、高分辨金属投影技术，2012年）

#### DNA复制叉相关研究

在DNA复制过程中，如果DNA复制叉出问题，将会导致基因组稳定性的极大改变。北京大学孔道春课题组研究发现核酸酶Dna2在维持DNA复制叉稳定中起重要作用，证明了Cds1-Chk2途径中的效应激酶是通过靶向Dna2上S220位点，来调控Dna2与染色质中停顿复制叉的相互作用。这是该领域的重要突破之一。



裂殖酵母的基因组DNA倒转复制叉结构

生物成像中心利用核酸展层技术与高分辨金属投影技术制备DNA复制叉样品并对其进行电镜成像，通过对大量透射电镜照片中倒转复制叉和复制叉的鉴定和统计为该课题的最终结论提供了有力而直观的证据。

相关论文信息：

Hu J, Sun L, Shen F, Chen Y, Hua Y, Liu Y, Zhang M, Hu Y, Wang Q, Xu W, Sun F, Ji J, Murray JM, Carr AM, Kong D. (2012) The Intra-S Phase Checkpoint Targets Dna2 to Prevent Stalled Replication Forks from Reversing. *Cell*.149 (6):1221-32

技术支持：孙磊

——透射电镜成像技术（电子断层三维成像技术，2009年）

#### 猪动脉内皮细胞胞膜窖的电子断层三维结构分析

中国科学院生物物理研究所孙飞课题组利用电子断层三维重构技术对猪动脉内皮细胞 (porcine aorta endothelial cell, PAE cell) 胞膜窖的三维结构进行了初步研究，发现胞膜窖在细胞膜表面呈不均匀分布并在局部形成聚集；胞膜窖膜内外表面都由宽度约14-16nm的条纹状结构所环绕，推测该条纹状结构主要由窖蛋白和胆固醇构成；狭窄的胞膜窖颈部区域存在高密度的丝状结构；三维结构显示胞膜窖与纤维丝体网络（推测为微管网络）相互作用，暗示了细胞内吞可能的运输途径。

该课题研究在生物成像中心完成，对猪动脉内皮细胞进行固定和树脂包埋，应用透射电镜对70 nm厚度切片中的胞膜窖进行观察，并对200 nm厚度切片进行系列倾转图像采集，最后进行三维重构计算获得胞膜窖的电子断层三维结构。

相关论文信息:

孙书锋, 张凯, 徐伟, 王刚, 陈建军, 孙飞, 猪动脉内皮细胞胞膜小窝的电子断层三维结构分析. (2009) 生物化学与生物物理进展. 36 (6) : 729~735.

技术支持: 孙书锋

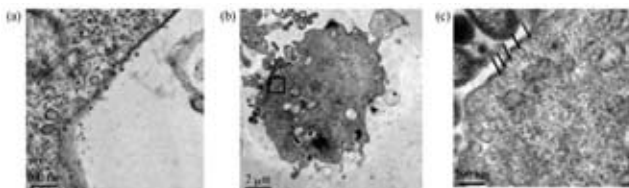


图1. 树脂包埋切片猪动脉内皮细胞胞膜小窝的电镜超微结构

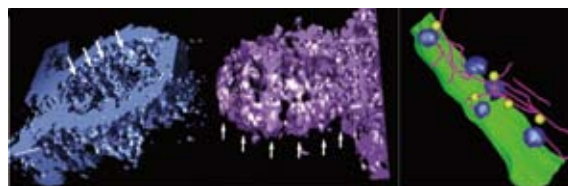
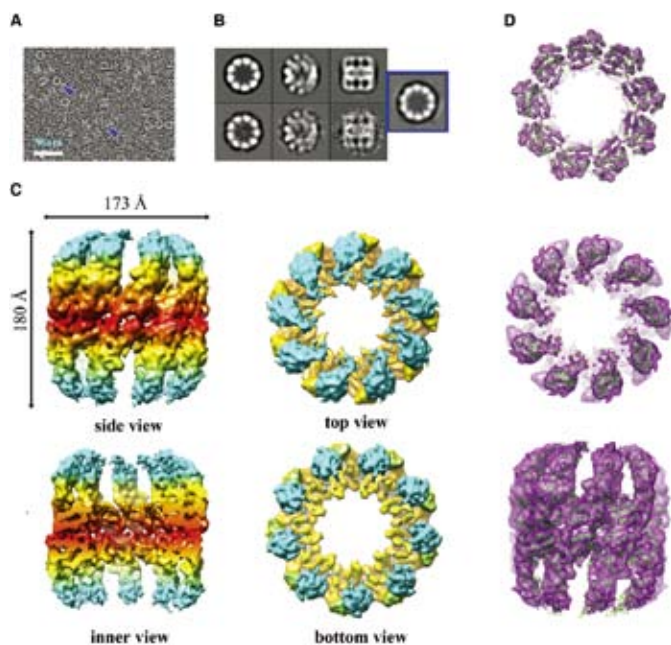


图2. 胞膜小窝细胞膜两侧结构及其与细胞骨架的结构关系

——透射电镜成像技术 (低温电镜单颗粒三维重构技术, 2010年)

## 二型分子伴侣开口状态的结构研究

分子伴侣素 (Chaperonins) 是一种ATP依赖的协助蛋白折叠的多亚基双环复合物, 关于二型分子伴侣素核酸结合功能态的结构以及功能循环各个环节中的构象变化的研究不是很透彻, 其中最为关键的因素就是没有此类分子开口状态的高分辨率结构。中国科学院生物物理研究所孙飞研究组和微生物研究所董志扬研究组通过合作研究, 将冷冻电镜三维重构和X射线晶体学有效地结合在一起, 获得了第一个开口状



二型分子伴侣开口状态的冷冻电镜单颗粒三维重构

态的二型分子伴侣3.7Å分辨率的结构, 对人们认识此类分子的功能循环过程提供了关键的结构信息。

该课题研究的部分电镜成像数据在生物成像中心完成, 负染色透射电镜数据和部分冷冻电镜数据利用生物成像中心的200 kV透射电镜FEI Tecnai 20完成。

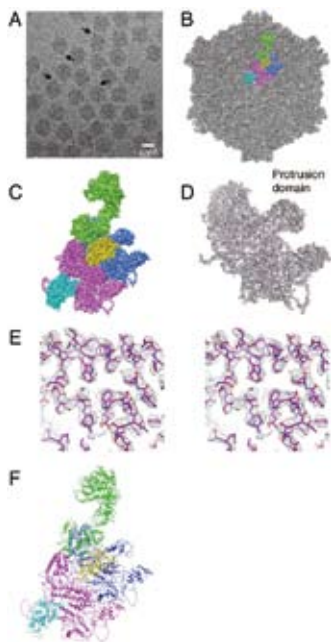
相关论文信息:

Yanwu Huo, Zhongjun Hu, Kai Zhang, Li Wang, Yujia Zhai, Qiangjun Zhou, Gabe Lander, Jiang Zhu, Yongzhi He, Xiaoyun Pang, Wei Xu, Mark Bartlam, Zhiyang Dong, and Fei Sun. (2010) Crystal Structure of Group II Chaperonin in the Open State, Structure, 18:1270-1279.

技术支持: 孙书锋

——透射电镜成像技术（低温电镜单颗粒三维重构技术，2011年）

### 呼肠孤病毒科质型多角体病毒CPV的近原子分辨率结构



质多角体病毒CPV的冷冻电镜图像  
和质型多角体病毒衣壳三维结构  
模型

朱平研究组与孙飞研究组合作利用冷冻电镜单颗粒图像处理技术获得了呼肠孤病毒科的质型多角体病毒近原子分辨率的三维结构（3.9埃），并独立构建了全原子模型。这是我国首次利用冷冻电镜技术解析的生物大分子原子结构模型，也是世界上首次利用冷冻电镜的CCD图像获得的生物大分子复合体的全原子模型。该研究确认了呼肠孤病毒mRNA的流出通道，定位了呼肠孤病毒科质型多角体病毒的两个甲基转移酶（7-N-methyltransferase 和 2'-O-methyltransferase）并揭示了该流出通道如何引导mRNA依次经过这两个甲基转移酶以完成“加帽”（Capping）的过程。该发现对研究dsRNA病毒的mRNA加帽（Capping）机制有重要意义。

论文发表相关信息：

Cheng L., Sun J., Zhang K., Mou Z., Huang X., Ji G., Sun F., Zhang J., Zhu P. (2011), Atomic model of a cypovirus built from cryo-EM structure provides insight into the mechanism of mRNA capping. PNAS, 108(4):1373-1378.

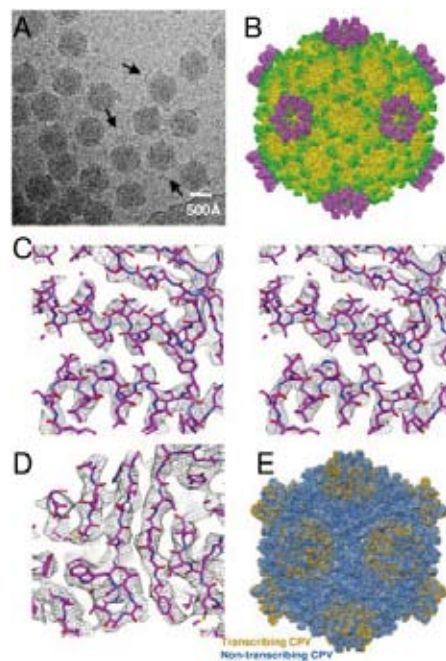
技术支持：季刚

——透射电镜成像技术（低温电镜单颗粒三维重构技术，2012年）

### CPV病毒转录态原子模型

病毒的转录状态是亚稳定状态，难以形成规则排列的晶体。冷冻电镜三维重构技术非常适于解析此类生物大分子复合物的结构。朱平研究组与孙飞研究组合作首次将转录态双链RNA病毒结构精度解析到近原子分辨水平。该研究揭示了双链RNA病毒在转录环节中所发生的与其转录功能相适应的构象变化，不仅为长期以来关于双链RNA病毒mRNA的释放通道假说提供了有力证据，而且还观察到此类病毒在mRNA加帽过程中GTPase酶活位点及其和反应底物相互作用的状态，从而揭示了RNA转录和加帽过程中结构蛋白之间如何相互协调使得新生RNA得以顺利流出。

该课题研究的电镜三维重构工作在生物成像中心完成，冷冻电镜数据通过300kV透射电镜Titan Krios进行采集。



CPV病毒转录态的低温电镜照片和三维结构模型

论文发表相关信息:

Yang C., Ji G., Liu H., Zhang K., Liu G., Sun F., Zhu P., Cheng L. (2012), Cryo-EM structure of a transcribing cypovirus. PNAS, 109(16): 6118-6123.

技术支持: 季刚

——透射电镜成像技术 (低温电镜单颗粒三维重构技术, 2013年)

### 小热休克蛋白MjHSP16.5的动态结构研究

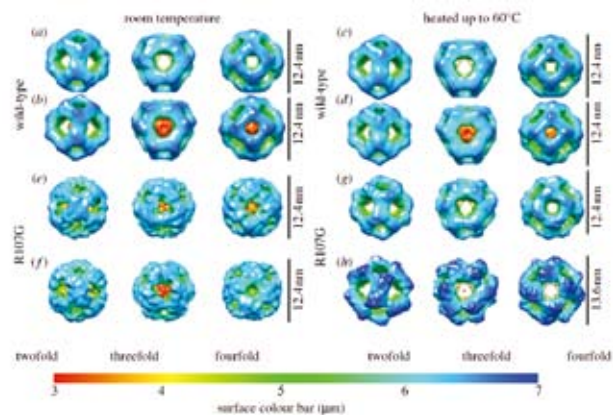
小热休克蛋白 (sHSP) 是分子量介于15-30kD普遍存在的一类蛋白。当一些错误折叠的蛋白或受损蛋白可能发生聚集时, 小热休克蛋白能起到一定的抑制作用。同时, 它还可以组装成分子伴侣, 调节肌动蛋白, 微管等高聚物在细胞中的装配。其关键残基位点的突变, 会导致人体白内障, 心肌病等疾病发生。孙飞课题组利用冷冻电镜单颗粒三维重构技术解析了野生型小分子热休克蛋白MjHSP16.5及其突变体R107G在不同温度下的动态三维结构。突变体R107G加热到60度以后的结构与常温下的结构相比, 体积发生了明显的膨大, 直径相差1.2nm。而野生型的MjHSP16.5在加热到60度后, 并没有发生这些体积的变化。体外实验也证明R107G突变体加热到60度后, 其分子伴侣活性明显增强。

该课题研究在生物成像中心完成, 冷冻电镜数据通过300kV透射电镜Titan Krios进行采集。

论文发表相关信息:

Roy A. Quinlan, Yan Zhang, Andrew Lansbury, Ian Williamson, Ehmke Pohl and Fei Sun. (2013) Changes in the quaternary structure and function of MjHSP16.5 attributable to deletion of the IXI motif and introduction of the substitution, R107G, in the  $\alpha$ -crystallin domain, Phil. Trans. R. Soc. B, 368: 1-11.

技术支持: 季刚



MjHSP16.5及其突变体R107G在室温以及60度下的结构比较

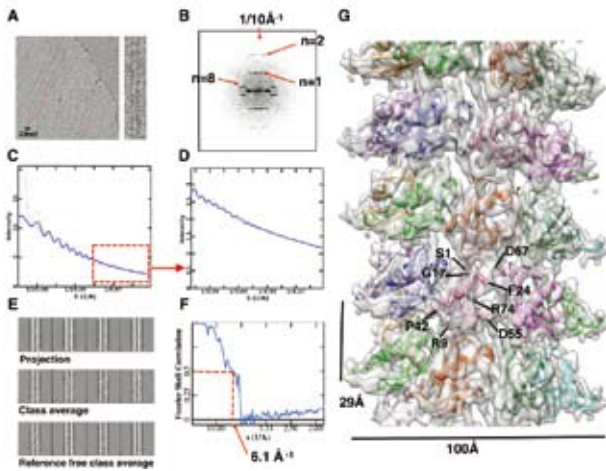
——透射电镜成像技术 (低温电镜单颗粒三维重构技术, 2013年)

### 细胞极化因子Par-3 NTD的组装机理研究

Par-3在细胞极性调控方面起到基础性的作用。研究表明Par-3在体内可以多聚化。已知Par-3包含NTD, PDZ和aPKC结合域等结构域, 其中NTD结构域的高聚化对于介导Par-3的聚集起到重要作用。冯巍课题组与孙飞课题组合作研究了Par-3 NTD结构域的自组装分子机理。发现NTD通过静电相互作用形成首尾相接螺旋上升的组装结构。对相互作用面上的静电相互作用破坏, 使得Par-3失去了调控极性的功能。

该课题研究的电镜三维重构工作在生物成像中心完成, 冷冻电镜数据通过300kV透射电镜Titan Krios





Par-3 NTD的冷冻电镜螺旋三维重构

进行采集。

论文发表相关信息：

Yan Zhang, Wenjuan Wang, Jia Chen, Kai Zhang, Feng Gao, Shuai Zhang, Mingdong Dong, Flemming Besenbacher, Weimin Gong, Mingjie Zhang, Fei Sun, and Wei Feng. (2013) Structural insights into the intrinsic self-assembly of Par-3 N-terminal domain, *Structure*, 21:1-10.

技术支持：季刚

——透射电镜成像技术（低温电镜单颗粒三维重构技术，2013年）

### 柔性交织末端对二型分子伴侣素热稳定性的决定作用

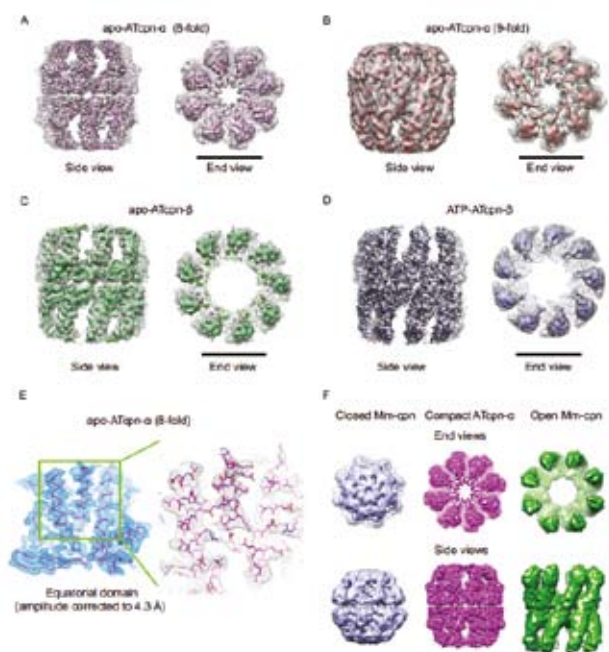
腾冲嗜酸嗜热两面菌（*Acidianus tengchongensis*）菌株S5表达两种二型伴侣素ATcpn- $\alpha$ 和ATcpn- $\beta$ 。ATcpn- $\alpha$ 和ATcpn- $\beta$ 的序列高度同源性（identity 51%，similarity 70%）。但重组的ATcpn- $\alpha$ 以8次对称性为主，重组的ATcpn- $\beta$ 以9次对称性为主。中科院生物物理研究所孙飞研究组从结构和生化两方面阐释了ATcpn- $\alpha$ 和ATcpn- $\beta$ 的组装和热稳定性机理。发现N端和C端柔性密度相互聚集在一起，共同形成相互交织状的结构特征，该特征是二型伴侣素组装并维持聚合态的关键因素，同时也是导致不同类型二型伴侣素热稳定性差异的决定因素。

该课题研究的电镜三维重构工作在生物成像中心完成，冷冻电镜数据通过300kV透射电镜Titan Krios进行采集。

论文发表相关信息：

Kai Zhang, Li Wang, Yanxin Liu, Kwok-Yan Chan, Xiaoyun Pang, Klaus Schulten, Zhiyang Dong, Fei Sun. (2013) Flexible interwoven termini determine the thermal stability of thermosomes, *Protein & Cell*, 4(6):432-444.

技术支持：季刚



ATcpn的冷冻电镜三维重构

——透射电镜成像技术（低温电镜单颗粒三维重构技术，2013年）

### 兔出血症病毒的准原子模型

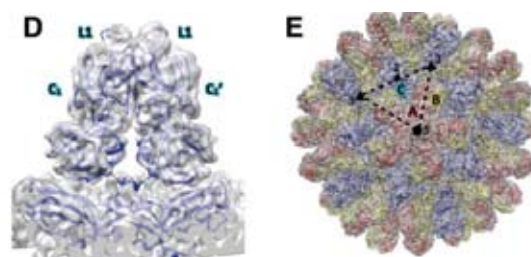
兔出血症（Rabbit Hemorrhagic Disease, RHD）是一种急性、致死传染病，家兔在感染后48~72小时死亡。该病的病原体兔出血症病毒（Rabbit Hemorrhagic Disease Virus, RHDV）隶属杯状病毒科兔病毒属。中科院生物物理研究所孙飞研究组与合作者利用冷冻电镜方法得到了RHDV高分辨率（6.5Å）的电镜结构，以及其衣壳蛋白S结构域和P结构域的晶体结构，并通过动力学模拟方法得到了RHDV衣壳蛋白的准原子模型。该成果填补了杯状病毒研究的一个空白。

该课题研究的电镜三维重构工作在生物成像中心完成，冷冻电镜数据通过300kV透射电镜Titan Krios进行采集。

论文发表相关信息：

Xue Wang, Fengting Xu, Jiasen Liu, Bingquan Gao, Yanxin Liu, Yujia Zhai, Jun Ma, Kai Zhang, Timothy S. Baker, Klaus Schulten, Dong Zheng, Hai Pang, Fei Sun. (2013) Atomic model of rabbit hemorrhagic disease virus by cryo-electron microscopy and crystallography. PLOS Pathogens, 9(1): e1003132.

技术支持：季刚



RHDV衣壳准原子模型（右）与RHDV衣壳蛋白P结构域关键抗原表位

——透射电镜成像技术（冷冻断裂蚀刻复型技术，2012年）

### FeCl<sub>3</sub>/[C4mim]Cl离子液体结构

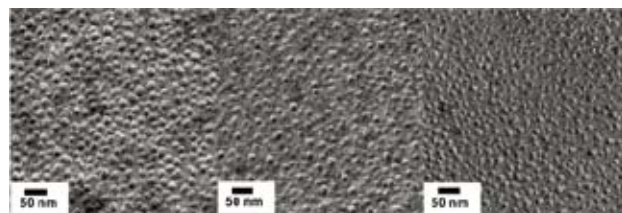
中国石油大学胡玉峰课题组合成了一系列基于FeCl<sub>3</sub>/[C4mim]Cl的离子液体，对其拉曼光谱、红外光谱、热力动态学特性进行了分析测定，研究了其相关化学性质，并首次对不同温度下的FeCl<sub>3</sub>/[C4mim]Cl离子液体结构应用冷冻断裂蚀刻复型—电镜技术进行了分析。

离子液体粘度较高，而且实验需要固定在不同温度点的结构信息，应用常规样品制备方法难以实现对其纳米聚集状态和超微结构的观察分析。生物成像中心首先采用控温法快速冷冻固定样品，再应用冷冻断裂蚀刻复型技术完成样品制备，最后通过透射电镜观察获得样品在不同温度下纳米结构的直观图像。

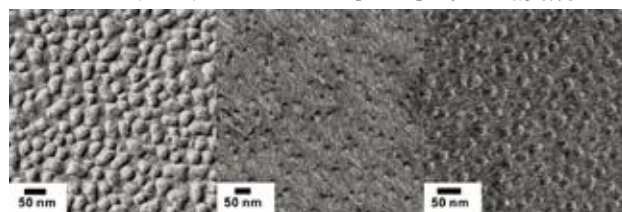
论文发表相关信息：

Li JG, Hu YF, Sun SF, Ling S, Zhang JZ, Ionic Structure of Nano-based FeCl<sub>3</sub>/[C4mim]Cl Ionic Liquid. J Phys Chem A, 2012: 116 (22): 6461-6464.

技术支持：孙书锋



(1/1.5, 1/1, 1.5/1) FeCl<sub>3</sub>/[C4mim]Cl在298K的结构



(1/1.5, 1/1, 1.5/1) FeCl<sub>3</sub>/[C4mim]Cl在343K的结构

——透射电镜成像技术（电镜样品制备、超薄切片技术，2013年）

### 心肌细胞中线粒体通讯机制研究

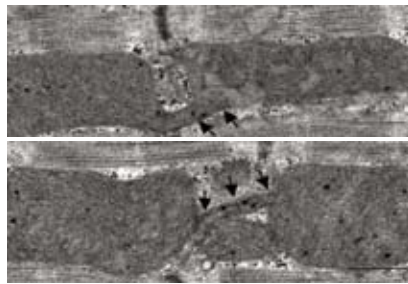
动物心肌细胞大约含有6000个线粒体。可是线粒体运动为肌丝所限制，彼此之间怎样实现物质交换？北京大学分子医学研究所郑铭研究组、程和平研究组与宾夕法尼亚大学Franzini-Armstrong教授合作研究揭示，静止的心肌线粒体表面会生出直径约100nm的双层膜管状结构，可瞬态接通相邻的或较远处的线粒体，实现线粒体间的物质交换，称之为“纳米通道”（Nanotunneling）；另一种方式则是相邻两静止的线粒体间短暂的接通，称之为“吻合”（Kissing）。心肌细胞线粒体通过纳米通道与吻合机制构成一个动态的连续的物质交换和通讯网络。

生物成像中心利用电镜样品制备和超薄切片技术获得了心肌细胞的固定切片，并利用生物成像中心的透射电镜进行成像，直观地显示了心肌线粒体间“纳米通道”的存在，为该研究的结论提供了直接的证据。

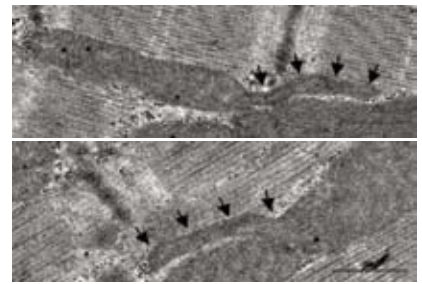
论文发表相关信息：

Huang X, Sun L, Ji S, Zhao T, Zhang W, Xu J, Zhang J, Wang Y, Wang X, Franzini-Armstrong C, Zheng M, Cheng H. (2013) Kissing and nanotunneling mediate intermitochondrial communication in the heart. PNAS. 110(8):2846-51

技术支持：孙磊

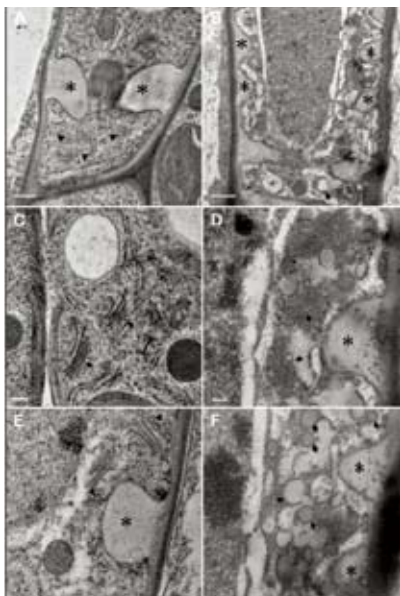


左图：连接两个相邻线粒体的“纳米管”结构；



右图：一端连接于线粒体上的“纳米管”结构。（bar=500nm）

——透射电镜成像技术（高压冷冻-冷冻替代技术，2013年）



高压冷冻-冷冻替代处理透射电镜观察的拟南芥管状分子相关结构。

(A)、(C)、(E)，野生型；(B)、(D)、(F)，EXO70A1突变型。(A)、(B)生长的管状分子（星号）和囊泡（箭头）结构。突变体管状分子小，囊泡大。(C)、(D)高尔基体结构不同，突变体膜囊结构增多。(E)、(F)膜状囊泡大小对比。

### EXO70A1基因在拟南芥管状分子发育中的关键作用

中国科学院植物研究所刘春明课题组的研究表明EXO70A1基因在拟南芥管状分子发育过程中调节囊泡的运输，对植物根部的导管形成有重要作用。EXO70A1突变导致植株木质部结构异常，抑制细胞增长，降低水分运输，表现为植株矮小和不育。电镜超微结构分析显示，突变体植株内次生细胞壁加厚被抑制，有大的囊泡结构在生长的管状分子附近聚集，提示EXO70A1作用于管状分子形成中的囊泡运输过程，从而调节次生细胞壁加厚模式。

生物成像中心应用高压冷冻—冷冻替代技术对野生型和突变体拟南芥根部组织样品进行固定，很好地保存了拟南芥根部组织的超微结构，对该超微结构进行透射电子显微成像，为本项研究的结论提供了直观而有力的证据。

论文发表相关信息：

Shipeng Li, Min Chen, Dali Yu, Shichao Ren, Shufeng Sun, Linde Liu, TijsKetelaar, Anne-MieC.Emons, and Chun-Ming Liu, EXO70A1-Mediated Vesicle Trafficking Is Critical for Tracheary Element Development in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 2013, 25: 1774–1786.

技术支持：孙书锋

——透射电镜成像技术（低温透射电镜技术，2013年）

### 阴离子双子表面活性剂与阳离子氨盐基单链表面活性剂混合物的聚集过渡

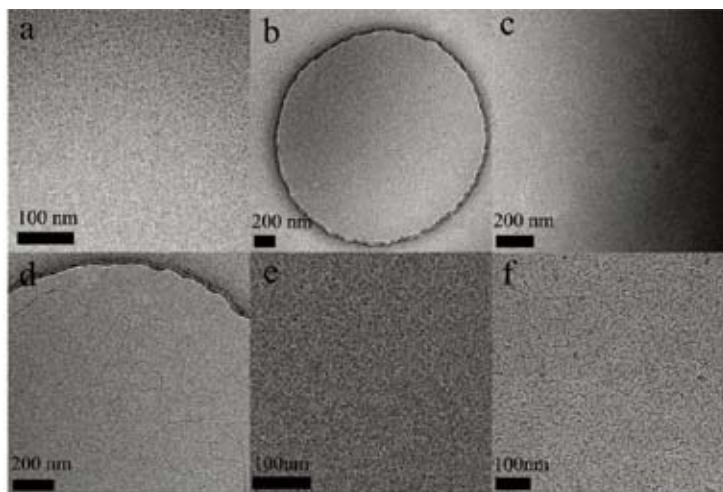
中国科学院化学研究所王毅林课题组研究了阴离子双子表面活性剂和阳离子氨盐基单链表面活性剂不同配比混合物的形态和性质。阴离子表面活性剂(C12C3C12(SO3)2)与阳离子表面活性剂(CTAB)以一系列比例混合，其混合物结构发生变化，从球状胶束过渡为蠕虫状胶束、囊泡，再依次变为蠕虫状胶束、球状胶束。该实验主要研究其比例和结构关系。

生物成像中心应用FEI Vitribot快速冷冻装置固定样品，并利用低温电镜成像技术观察和记录了微乳液、胶束等液体化学样品的自然原始状态，为该实验结论的提出提供了直接的影像学证据。

论文发表相关信息：

Maozhang Tian, Linyi Zhu, Defeng Yu, Yingxiong Wang, Shufeng Sun, and Yilin Wang. (2013) Aggregate Transitions in Mixtures of Anionic Sulfonate Gemini Surfactant with Cationic Ammonium Single-Chain Surfactant. *Physical Chemistry B*, 117:433-440.

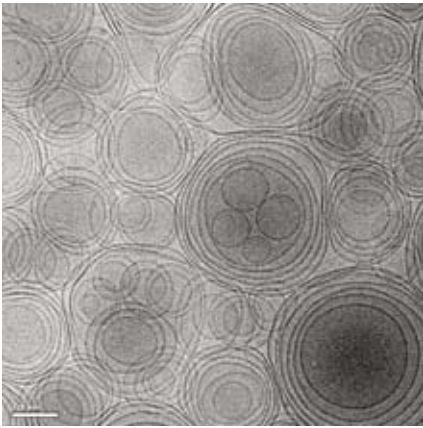
技术支持：孙书锋



C<sub>12</sub>C<sub>3</sub>C<sub>12</sub>(SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>/CTAB聚集体的低温电镜照片: for CT=2.0 mM, X<sub>g</sub> = 0.10 (a), 0.20 (b), 0.30 (c), 0.47(d), and 0.80 (e); for CT=10.0 mM, X<sub>g</sub>= 0.20 (f).

——透射电镜成像技术（低温透射电镜技术，2013年）

### 北京宝洁技术有限公司产品的微观结构



Structured surfactant solution的低温电镜照片

北京宝洁技术有限公司与生物成像中心签订了合作协议，由生物成像中心为该公司的研发试剂提供成像服务，通过对其研发试剂的微观结构观察，为其最终产品（洗衣液，柔顺剂，洗手液，牙膏等）的配方提供影像依据。

此次生物成像中心提供的是基于FEI Tecnai 20透射电镜的低温电镜成像技术服务，样品为structured surfactant solution，性质粘稠。低温电镜观察表明其典型微观结构为vesicle。（具体细节为宝洁商业机密）

技术支持：黄小俊

——双束扫描电子显微成像技术（2013年）

### 投射神经元与蘑菇体神经元的突触联系

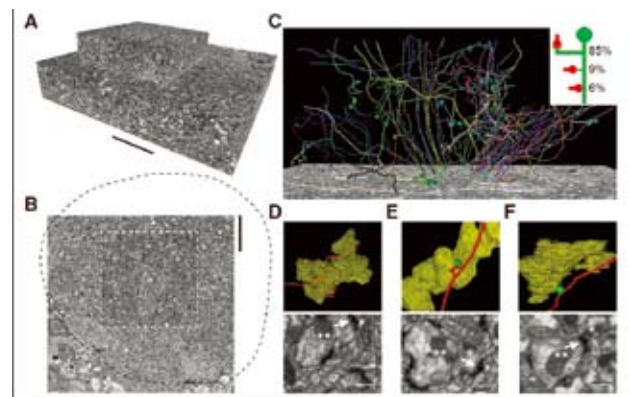
中国科学院神经科学研究所郭爱克课题组研究发现果蝇蘑菇体神经元对果蝇嗅觉学习和记忆有关键作用。单个蘑菇体神经元（KS）从许多突触前投射神经元（PN）接收输入，并将这些输入信号整合为单一的输出信号。单个KS对外界刺激反应特性在很大程度上决定于它所接收的突触前PN的反应特性。郭爱克课题组基于双束扫描电子显微成像技术对蘑菇体进行大尺度三维重构，得到了包含59条单独Kenyon细胞的蘑菇体结构信息，通过基于结构的追踪分辨出单个KC接收输入的PN轴突末梢，在此基础上用双色钙功能成像技术（用绿色G-CaMP标出单个KC，用红色R-GECO标出前级PN）将这个KC和它所接收的PN轴突末梢对气味的反应进行测量。这项研究在一定程度上揭示了蘑菇体神经元气味编码特性的来源。

该项研究的电镜三维重构工作在生物成像中心完成，蘑菇体连续切片和电镜成像在场发射双束扫描电子显微镜FEI Helios NanoLab 600i上完成。目前仅有生物成像中心可以提供生物样品的大尺度三维重构技术。

论文发表相关信息：

Li H, Li Y, Lei Z, Wang K, Guo A. (2013) Transformation of odor selectivity from projection neurons to single mushroom body neurons mapped with dual-color calcium imaging. Proc Natl Acad Sci.110(29):12084-9

技术支持：季刚、张建国



果蝇蘑菇体花萼的双束扫描电镜连续切片三维重构

——原子力显微成像技术（2012年）

### 多胺衍生物为基础的DNA线性化核酸酶

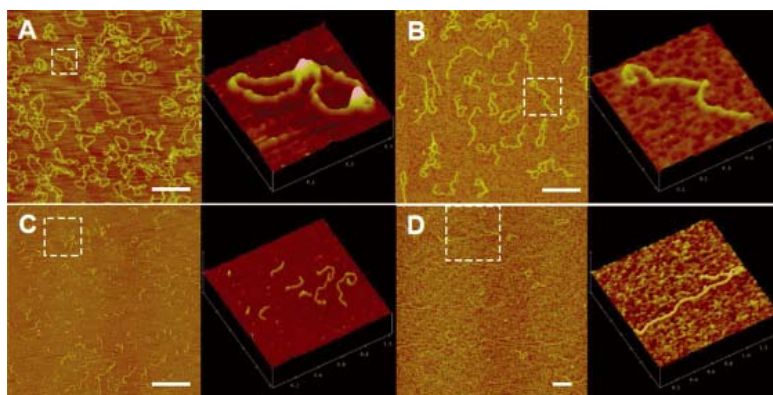
北京化工大学乔仁忠组合成出了一系列多胺衍生物，并通过琼脂糖凝胶电泳实验发现其中一种多胺衍生物具有DNA内切酶的活性。

生物成像中心为乔仁忠研究组提供了原子力显微成像技术服务，通过原子力显微成像可以清楚地看到这种多胺衍生物能将环状质粒切开使其变成线状，并且随着多胺衍生物浓度的增加，DNA能够被切碎，该结果为这种多胺衍生物的内切酶活性研究提供了有力的证据。

论文发表相关信息：

Chao Li, Fangfang Zhao, Yunan Huang, Xueyuan Liu, Yan Liu, Renzhong Qiao, and Yufen Zhao. (2012) Metal-free DNA linearized nuclease based on PASP-polyamine conjugates. *Bioconjugate Chem*, 23: 1832–1837

技术支持：贾艳侠



pUC18质粒的AFM图像。(A) 未做任何处理的超螺旋pUC18质粒。(B) 和(C) 分别是用 $38.2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  和  $79.6 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  PASP-cyclen在 $37^\circ\text{C}$ 下处理3小时后的质粒。(D)是(C)图中的DNA经T4 DNA连接酶在 $4^\circ\text{C}$ 下连接12小时后形成的长片段。图中比例尺代表500 nm。

——原子力显微成像技术（2013年）

### SbcD对双链DNA的核酸内切酶活性

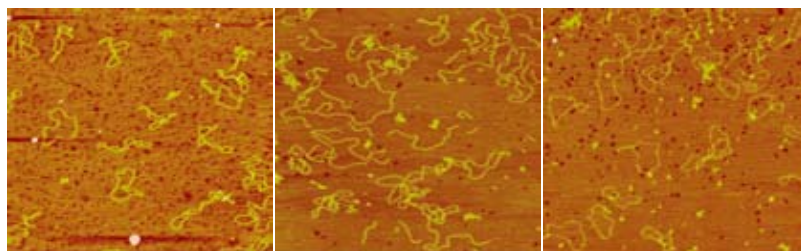
SbcD是原核生物双链断裂修复系统中的一个关键蛋白。中国科学院生物物理研究所梁栋材研究组通过琼脂糖凝胶电泳实验发现SbcD具有双链DNA内切酶活性，原子力显微成像技术为这一推论提供了直观的证据。

生物成像中心为梁栋材研究组提供了原子力显微镜成像技术服务，通过原子力显微成像证实了SbcD具有双链DNA核酸内切酶活性，能将环状质粒切开变成线状，且研究结果显示SbcD的活性是 $\text{Mn}^{2+}$ 依赖的。

论文发表相关信息：

Liu, S., Tian, L., Liu, Y., An, X., Tang, Q., Yan, X., Liang, D. (2014) Structural Basis for DNA Recognition and Nuclease Processing by Mre11 Homolog SbcD in Double-Strand Break Repair. *Acta Crystallographica Section D, Biological Crystallography*, D70.

技术支持：贾艳侠



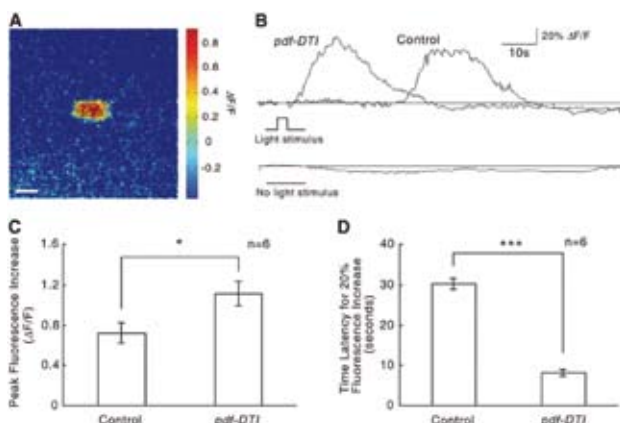
SbcD的双链DNA内切酶活性。（左）为环状质粒对照；（中）为环状质粒与SbcD在 $37^\circ\text{C}$ 下孵育15分钟以后，环状质粒被切开成为线状；（右）为反应缓冲液中不加 $\text{Mn}^{2+}$ 时SbcD无法将环状质粒切开。扫描尺寸为 $2 \mu\text{m}$ ，色标代表5 nm。

——荧光显微成像技术（双光子荧光共聚焦显微技术，2010年）

### 果蝇幼虫光感机制研究新进展

中国科学院生物物理研究所刘力课题组龚哲峰副研究员等人研究发现果蝇幼虫中央脑的两对神经元（NP394神经元）足以调节果蝇幼虫对于不同光强条件的偏好行为，增加这两对神经元的活性会促进幼虫的避光行为，而抑制这两对神经元的活性则能够逆转幼虫的避光行为为趋光行为。这项工作为揭示果蝇幼虫光偏好行为乃至其他偏好行为的神经元机制奠定了重要基础。

本研究需要在可见光刺激的同时采集神经细胞钙信号变化的图像，但常规的荧光显微镜无法分离刺激光和图像采集光（后者为可见光，会对光刺激形成干扰）。生物成像中心的双光子显微镜Olympus



敲除腹侧神经元以后NP394神经元对于视觉刺激的反应分析

FV1000MPE图像采集光源为红外光，可有效分析NP394神经元对于视觉刺激的反应，为该研究成果提供了可靠的影像依据。

论文发表相关信息：

Zhefeng Gong, Jiangqu Liu, Chao Guo, Yanqiong Zhou, Yan Teng, Li Liu. (2010) Two Pairs of Neurons in the Central Brain Control Drosophila Innate Light Preference. *Science* 330 (6003): 499-502.

技术支持：滕岩

——荧光显微成像技术（激光扫描共聚焦显微技术，2013年）

### iPS细胞重编程机制研究新进展

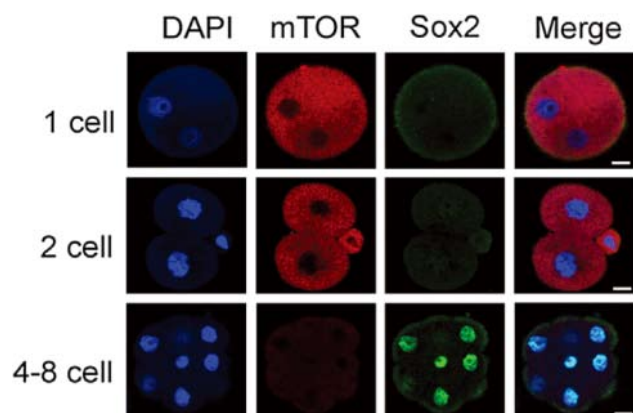
中国科学院生物物理研究所范祖森课题组研究发现Sox2通过招募NuRD复合物参与自噬调节，在细胞重编程过程中发挥着至关重要的作用，从而揭示了转录因子Sox2调控细胞自噬参与细胞重编程的分子机制。

本研究中需要分析自噬相关蛋白（如mTOR）与Sox2蛋白在胚胎发育各时期的表达情况。生物成像中心的激光扫描共聚焦显微镜Olympus FV1000S可以实现多色荧光同时高分辨率成像，从而可以对不同蛋白的表达和定位同时进行分析，为该研究成果提供了可靠的影像依据。

论文发表相关信息：

Wang S, Xia P, Ye B, Huang G, Liu J, Fan Z. (2013) Sox2-initiated transient autophagy is required for early stage reprogramming of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell*. 13. 617-625.

技术支持：滕岩

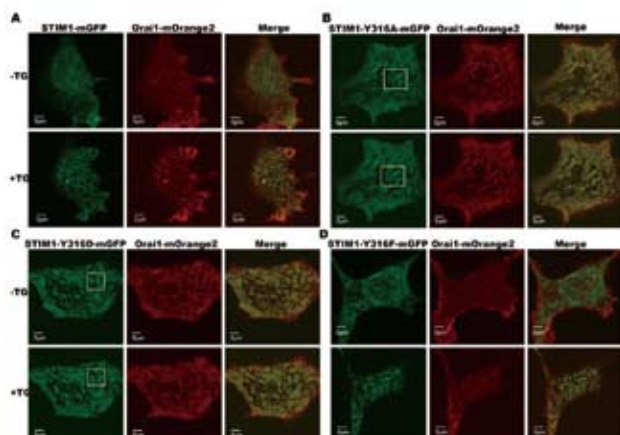


mTOR蛋白与Sox2蛋白在胚胎发育各时期表达情况

——荧光显微成像技术（激光扫描共聚焦显微技术，2013年）

### CRAC通道中STIM1分子自我抑制机理

中国科学院生物物理研究所徐涛与徐平勇课题组研究发现，在静息状态下，STIM1分子内部的关键结构域能相互作用，从而把STIM1抑制在失活状态；当用氨基酸突变打破这种相互作用时，STIM1分子将不依赖钙库的盈亏状态而持续激活。



激光扫描共聚焦荧光显微成像显示，在静息的HEK293细胞中，当把第316位的酪氨酸突变为丙氨酸（图B）、天冬氨酸（图C），这些突变的STIM1将不依赖钙库的盈亏而与Orai1共定位。

利用生物成像中心的激光扫描共聚焦显微镜Olympus FV1000S，能够清晰观察到STIM1聚集所形成的簇斑与Orai1聚集所形成的簇斑共定位，成为关键氨基酸筛选的依据，为该项研究提供了重要的影像依据。

论文发表相关信息：

Junwei YU, Haining ZHANG, Mingshu ZHANG, Yongqiang DENG, Huiyu WANG, Jingze LU, Tao XU & Pingyong XU. (2013) An aromatic amino acid in the CC1 domain plays a crucial role in the auto-inhibitory mechanism of STIM1. *Biochem J*, 454, 401-9.

技术支持：滕岩

——荧光显微成像技术（双光子荧光共聚焦显微技术，2013年）

### 细胞自噬检测探针的新进展

中国科学院生物物理所徐平勇课题组与北京大学化学与分子工程学院张俊龙课题组合作研究发展一种可对细胞自噬进行实时检测的荧光探针Zn-G4，研究结果表明该荧光探针检测自噬的发生不仅具有高的特异性，高信噪比，并可实现定量检测，双光子成像检测以及高通量筛选。研究发现Zn-G4具有很高的双光子吸收横截面积，可利用其良好的双光子激发荧光性质来实现自噬的检测并提高成像分辨率和深度。在诱导自噬发生后，可以观察到明显增强的Zn-G4双光子激发荧光，充分证明Zn-G4在检测细胞自噬方面的优势。

该课题研究的荧光成像工作在生物成像中心完成，双光子荧光成像数据通过Olympus FV1000MPE采集。

论文发表相关信息：

Juan-Juan Chen, Jing Jing, Hao Chang, Yueguang Rong, Yang Hai, Juan Tang, Jun-Long Zhang\*, Pingyong Xu\*. (2013) A sensitive and quantitative autolysosome probe for detecting autophagic activity in live and prestained fixed cells. *Autophagy*, 9, 894-904.

技术支持：滕岩



Zn-G4在L6成肌细胞中的双光子激发荧光图像（比例尺：2 μm）

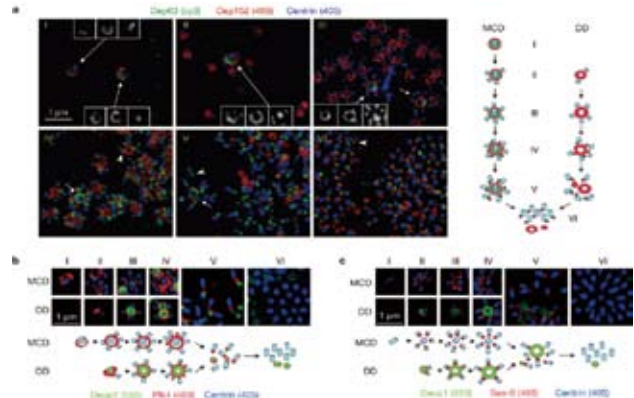


——荧光显微成像技术（结构照明超分辨荧光成像技术，2013年）

### 多纤毛细胞的中心粒扩增机制研究新进展

中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所朱学良课题组研究发现在高等动物中一对同源蛋白质Deup1和Cep63分别调控了多纤毛发生过程中“从无到有”和“母中心粒依赖”的两种中心粒扩增方式，以及它们与脊椎动物从海洋到陆地的适应和进化联系。

中心粒结合蛋白Cep152是一个内径约200nm，外径约300nm的环状结构，而中心粒蛋白Centrin以及Deup1和Cep63的尺度均在100-150nm左右，依靠普通的荧光显微镜（受限于衍射极限）无法分辨这几种蛋白的相互定位关系。生物成像中心的结构照明超分辨荧光显微成像系统OMX V3可以实现XY



结构照明超分辨荧光显微图像显示Cep63调控多纤毛发生过程中母中心粒依赖（MCD）的中心粒扩增方式



方向80-100 nm和Z方向300nm的超分辨成像，清晰显示了两种不同的中心粒扩增方式，为该研究成果提供了重要的影像依据。

论文发表相关信息：

Huijie Zhao, Lei Zhu, Yunlu Zhu, Jingli Cao, Shanshan Li, Qiongping Huang, Tao Xu, Xiao Huang, Xiumin Yan1, Xueliang Zhu. (2013) The Cep63 paralogue Deup1 enables massive de novo centriole biogenesis for vertebrate multiciliogenesis. *Nature Cell Biology*, 15(12): 1434-44.

技术支持：李硕果

——荧光显微成像技术（结构照明超分辨荧光成像技术，2013年）

### 囊泡运输分子机制研究新进展

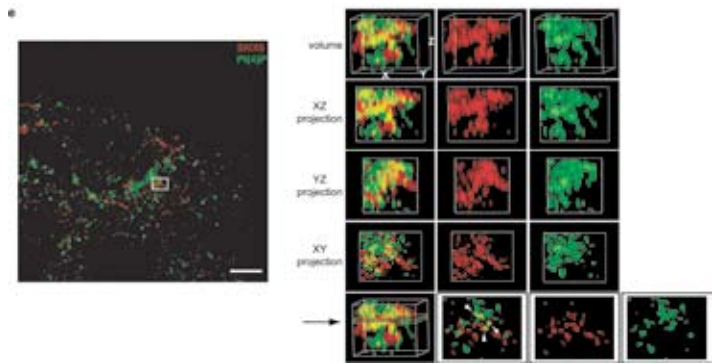
中国科学院遗传与发育生物学研究所分子发育生物学国家重点实验室刘佳佳课题组与中国科技大学田长麟、中国科学院生物物理研究所龚为民课题组合作研究，在由SNX6介导的囊泡货物卸载机制中，证实了高尔基体膜中的磷脂能够通过抑制动力蛋白-货物相互作用而促进动力蛋白在靶细胞器膜上精确释放囊泡货物。

本研究中发现SNX6的PX结构域不仅能与p150Glued结合，而且与高尔基体膜上富含的磷脂PI4P有弱亲和力。依靠普通的荧光显微镜（受限于衍射极限）无法精确判定这些目标物之间的定位效率，而生物成像中心的结构照明超分辨荧光显微成像系统OMX V3则清楚直观地展示了SNX6与PI4P的空间结合及定位情况，为该研究成果提供了重要的影像依据。

论文发表相关信息:

Yang Niu, Cheng Zhang, Zhe Sun, Zhi Hong, Ke Li, Demeng Sun, Yanrui Yang, Changlin Tian, Weimin Gong & Jia-Jia Liu. (2013) PtdIns(4)P regulates retromer-motor interaction to facilitate dynein-cargo dissociation at the trans-Golgi network. *Nature Cell Biology*, 15(4):417-29.

技术支持: 李硕果



结构照明超分辨荧光显微图片显示Hela细胞内免疫标记磷脂酰肌醇四磷酸 (PI4P) 与SNX6定位关系

——高性能计算技术 (2013年)

### 源自PB1氨基酸序列的短肽干扰流感病毒多聚酶的组装

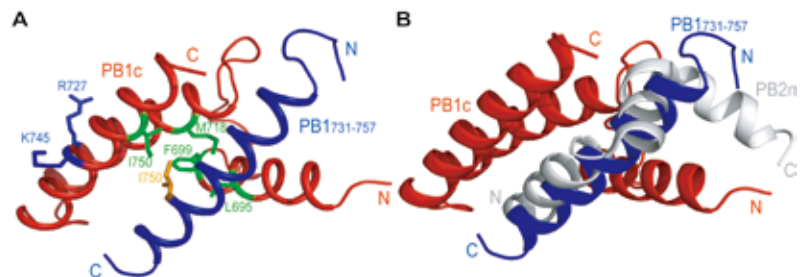
流感病毒聚合酶PB1是重要的药物设计靶点。中国科学院生物物理研究所蒋太交课题组的研究显示,一段源自PB1氨基酸序列731-757的短肽(记为PB1731-757)能破坏PB1 C端和PB2 N端的相互作用,还能抑制流感病毒聚合酶活动和病毒复制,它和PB1 C端(而不是PB2 N端)相互作用。该研究结果为抗流感病毒药物的设计提供了重要线索。

该研究中的大规模计算在生物成像中心的高性能计算机上完成,使用了高性能并行计算技术。

论文发表相关信息:

Chunfeng Li, Qi Ba, Aiping Wu, Hong Zhang, Tao Deng, Taijiao Jiang. (2013) A peptide derived from the C-terminus of PB1 inhibits influenza virus replication by interfering with viral polymerase assembly. *FEBS J.* 280(4): 1139-49.

技术支持: 凌伦奖



模拟的PB1c和PB1731-757短肽的复合物结构示意图。(A)用计算对接的方法模拟的PB1c-PB1731-757短肽复合物结构示意图,红色的为PB1c,蓝色为短肽;(B)实验检测的突变位点。短肽上的I750位点为黄色, PB1c上的疏水氨基酸L695, F699, M718及I750为绿色, PB1c上的亲水氨基酸R727, K745为蓝色。当疏水的氨基酸突变后,相互作用被破坏,而亲水的氨基酸突变后相互作用不受影响。

## 2. 技术研究（2013年度生物成像中心所开展的技术和方法学研究）

生物成像中心除了承担北京及周边地区生物显微成像技术服务工作外，还开展了先进的显微成像相关技术方法学研究，目前正在开展的有以下项目：

### 连续超薄切片自动化收集装置

（季刚、赵旭东、陈永圣、孙磊、刘苏、邱蓉、孙飞、徐伟）

基于连续超薄切片自动化收集技术的大尺寸生物样品三维重构技术是目前神经生物学、细胞生物学研究的重要技术之一。

神经生物学领域的连接组学（Connectomics），主要以测绘和构建从模式动物到人的神经系统回路为主要目的，利用超分辨率的组织化学、神经网络tracing、成像以及行为相关的功能性神经网络测绘等技术来高通量获得神经网络连接的“线路图”。大尺度高分辨电子显微三维重构技术是探究神经回路的重要技术方法。

我们根据学科发展的需求，研制了一套连续超薄切片自动化收集装置。该装置具有如下特点：（1）实现大尺寸生物样品连续超薄切片的自动化收集；（2）磁带式切片收集方式，可实现海量切片收集；（3）水位自动监控加注系统，保证连续切片装置长时间稳定工作；（4）收集到的样品可直接在扫描电镜下观察，无需后染色和导电化处理；（5）收集的样品可以长期保持，重复观察。

目前可实现收集连续切片900片以上，切片厚度70nm，切片面积约1\*1mm<sup>2</sup>。



图1 连续超薄切片自动化收集装置

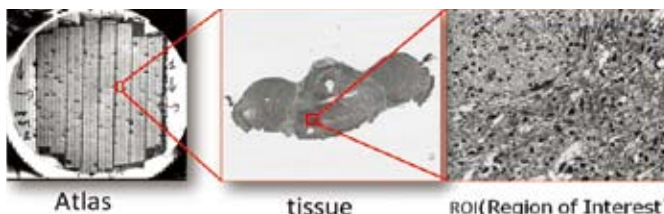


图2 连续切片在不同放大倍数下的扫描电镜成像

### 透射电镜相位衬度增强技术——相位板系统

（季刚、张建国、黄小俊、刘苏、陈永圣、孙飞、徐伟）

低温电镜技术在解析生物大分子、细胞超微结构等方面的应用日益广泛，并起着越来越重要的作用。目前低温电镜图像衬度主要是基于球差和欠焦产生的相位衬度。大欠焦会在一定程度上降低图像分辨率。随着人们对结构解析分辨率的不断提高，成像的欠焦量需要进一步减小，除使用灵敏度更高的图像探测器外，利用相位板技术提高正焦成像衬度是非常重要的手段。

生物成像中心从2009年开始对该技术进行研究，目前已成功研制出纳米精度相位板三维定位系统（图1），得到薄膜型相位衬度成像的初步结果（图2），结果显示相位板成像可以在正焦条件下获得很高的图像衬度。

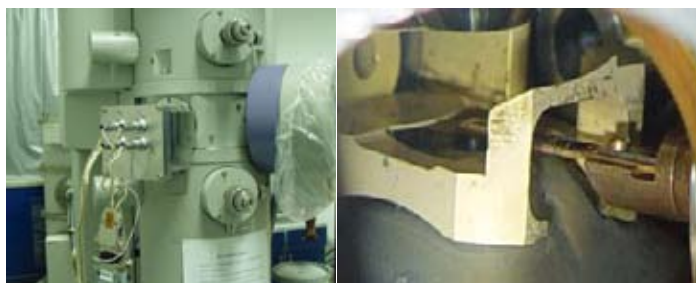


图1. 相位板系统（左）和相位板在物镜的位置（右）

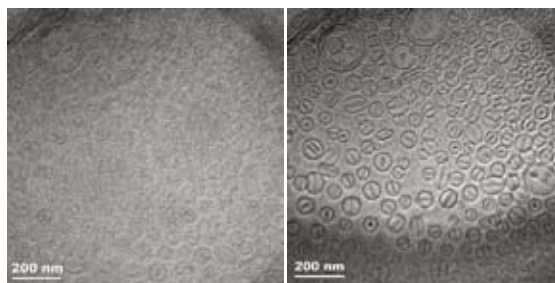


图2. 低衬度材料的无相位板（左）和有相位板（右）在正焦条件下的低温电镜成像

### 聚焦离子束法制备冷冻含水切片

（张建国、季刚、黄小俊、李硕果、孙飞、徐伟）

低温电子断层成像三维重构（cryo-ET）技术是结构生物学和细胞生物学研究的重要手段。该技术可以得到接近天然状态的细胞内部高分辨率三维结构、蛋白质等大分子在细胞原位的定位和相互作用信息。细胞cryo-ET的传统样品制备方法为含水冷冻超薄切片，该技术存在严重的压缩、振颤、皱缩、断裂以及载网附着能力差等缺点，并且技术难度大、成功率低。人们期望寻找到更理想的适合于细胞cryo-ET的样品制备方法。2006年M.Marko等发现利用聚焦离子束可以加工冷冻至玻璃态的生物样品，并且没有重结晶现象出现，从而开启了利用聚焦离子束技术制备生物样品含水冷冻超薄切片的方法探索。

生物成像中心从2012年开始发展基于聚焦离子束（FIB）加工的含水冷冻超薄切片技术，设计和制作了冷冻样品转移和支持装置，并建立了从样品快速冷冻、冷冻样品转移至双束SEM腔室、FIB 减薄加工、冷冻含水超薄切片转移至低温电镜到低温电子断层三维成像的一整套技术流程，成功完成了基于聚焦离子束技术的生物样品含水冷冻超薄切片的制备和成像。图中显示了我们利用聚焦离子束制备的冷冻含水切片样品的低温透射电镜照片，可观察到细胞内部的亚细胞结构。

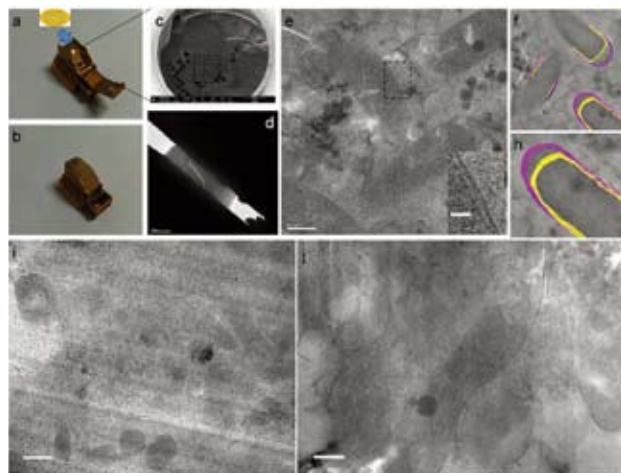
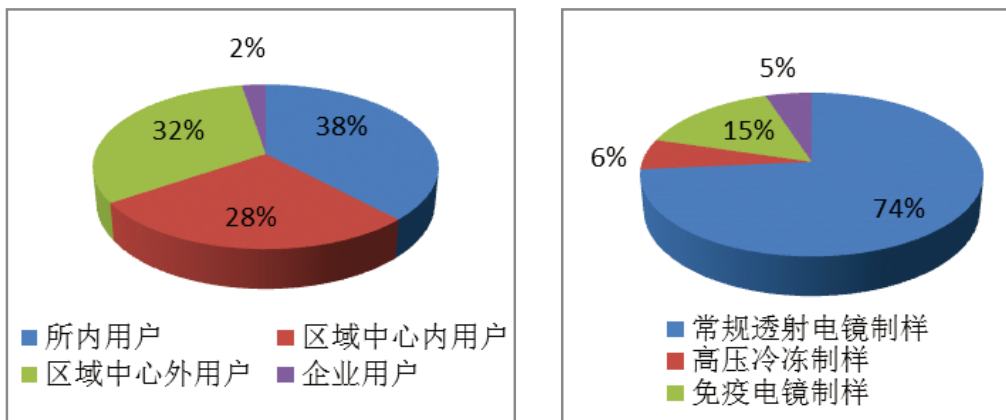


图. 聚焦离子束法制备冷冻含水切片。(a)和(b)为冷冻样品转移和支持装置。(c) 聚焦离子束切割的铜网正面。(d) 冷冻含水切片。(e) 低温透射电镜观察减薄后的大肠杆菌样品。(f)和(h) 大肠杆菌样品切片的三维重构。

## 装备运行和技术服务情况

### 1. 电镜样品制备技术服务

生物成像中心全年共为用户制备电镜样品926个，涉及研究课题83项。各类用户和技术服务类别统计如下：



样品制备对外服务统计

年度运行维护情况总结如下

仪器名称	年度运行情况统计（总使用率按年平均使用机时1600小时计算）
超薄切片机Leica EM UC6	该仪器分别于2007、2010年投入使用。目前仪器运行情况良好，其中一台用于超薄切片对外服务，2013年总使用机时为941小时，总使用率为59.04%；另一台用于连续切片收集。
冷冻超薄切片Leica EM FC6	该仪器于2007年投入使用。目前仪器运行情况良好，2013年总使用机时为1537小时，总使用率为96.44%。
高压冷冻仪 Leica EM PACT2	该仪器于2007年投入使用。2013年9月仪器更换温度传感器、高压密封圈、冷冻密封圈；11月维修冷冻液感应器。经维修后仪器运行情况良好，2013年总使用机时为88小时，总使用率为5.55%。
冷冻替代仪 EM AFS2	该仪器分别于2007、2010年投入使用。目前仪器运行情况良好，2013年两台总使用机时为3930小时，总使用率为123.33%。

在该仪器上所产生的代表性文章

- 1) Li JG et al. (2012) Ionic Structure of Nano-based FeCl<sub>3</sub>/[C4mim]Cl Ionic Liquid. J Phys Chem A, 116 (22): 6461-6464.
- 2) Hu J et al. (2012) The Intra-S Phase Checkpoint Targets Dna2 to Prevent Stalled Replication Forks from Reversing. Cell.149 (6):1221-32

## 2. 透射电镜运行服务 (FEI Titan Krios)

FEI Titan Krios自2010年9月装机运行以来总服务机时为13252小时，使用率达到252%（按年平均使用机时1600小时计算）。



FEI Titan Krios 服务机时统计

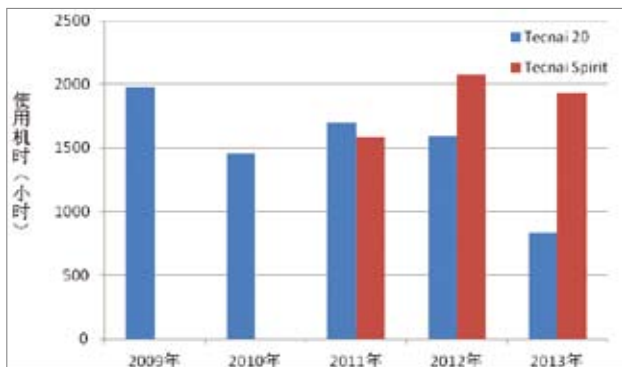
2013年度重要的升级维护事件总结如下：

时间	升级/维护内容
1月16日—2月8日	解决镜筒真空漏气问题
5月14日—7月23日	进行直接电子探测相机DE12 (Direct Electron) 的测试工作
6月20日—10月7日	维修高压罐故障、autoloader电源板故障、显卡故障、循环水故障、895CCD故障、镜筒真空漏气故障、HAADF电路板故障、液氮加注阀电源故障；更换场发射灯丝

### 在该仪器上所产生的代表性文章

- 1) Yang C et al. (2012) Cryo-EM structure of a transcribing cypovirus. PNAS 109 (16): 6118-6123.
- 2) Xue Y et al. (2012) Ultra-structural study of insulin granules in pancreatic  $\beta$ -cells of db/db mouse by scanning transmission electron microscopy tomography. Protein Cell 3 (7): 521-525.
- 3) Roy A et al. (2013) Changes in the quaternary structure and function of MjHSP16.5 attributable to deletion of the IXI motif and introduction of the substitution, R107G, in the  $\alpha$ -crystallin domain. Phil. Trans. R. Soc. B. 368(1617): 20120327.
- 4) Sun D et al. (2013) In vitro Assembly and Electron Microscopic Analysis of 30 nm Chromatin Fibers. Progress in Biochemistry and Biophysics 40(8): 739-747.
- 5) Wang X et al. (2013) Atomic Model of Rabbit Hemorrhagic Disease Virus by Cryo-Electron Microscopy and Crystallography. PLOS Pathogens 9(1): e1003132.
- 6) Zhang K et al. (2013) Flexible interwoven termini determine the thermal stability of thermosomes. Protein Cell 4(6): 432-444.
- 7) Zhang Y et al. (2013) Structural Insights into the Intrinsic Self-Assembly of Par-3 N-Terminal Domain. Structure 21(6): 997-1006.

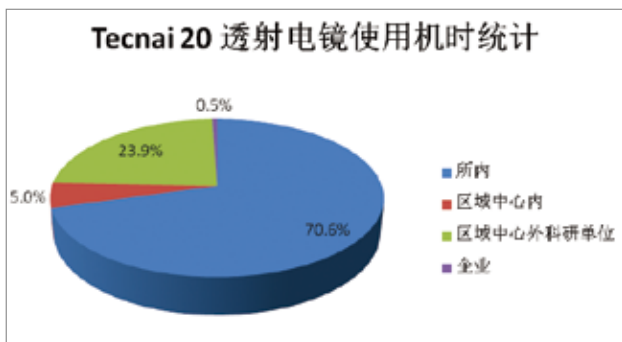
### 3. 透射电镜运行服务 (FEI Tecnai 20和FEI Tecnai Spirit)



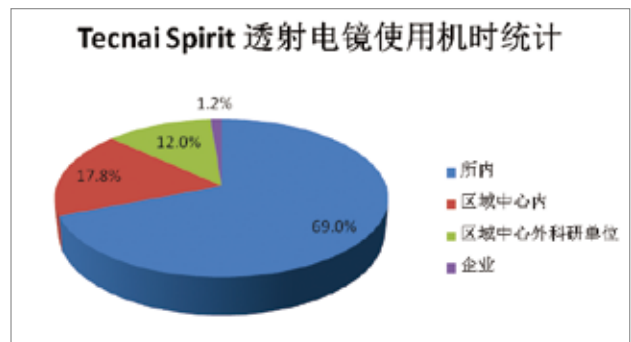
FEI Tecnai 20 和 FEI Tecnai Spirit 服务机时统计

近五年来, FEI Tecnai 20 200 kV透射电镜总服务机时为7565小时, 使用率达到95% (按年平均使用机时1600小时计算)。FEI Tecnai Spirit 120 kV透射电镜自2010年安装以来, 近三年总服务机时为5596小时, 使用率达到117% (按年平均使用机时1600小时计算)。

FEI Tecnai 20于2000年安装投入运行, 迄今已13年, 设备状态基本稳定, 部分部件老化。FEI Tecnai Spirit 运行状态良好, 利用率很高。



FEI Tecnai 20 透射电镜近五年来所内外共享情况统计图



FEI Tecnai Spirit 透射电镜近三年来所内外共享情况统计图

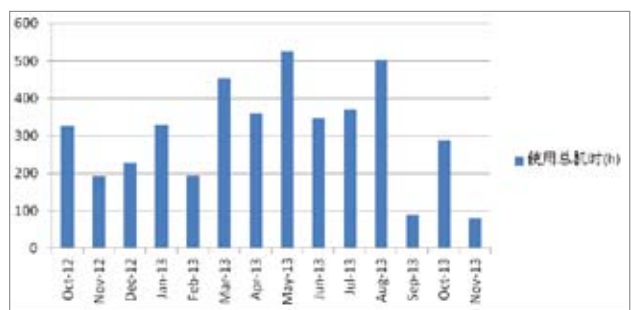
### 4. 扫描电镜运行服务 (FEI Helios NanoLab 600i)

FEI Helios NanoLab 600i 自2012年10月装机运行以来总服务机时为4292小时, 使用率达到240.4% (按年平均使用机时1600小时计算)。

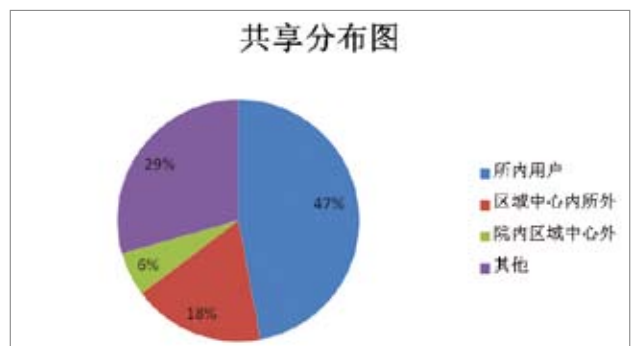
该设备自运行以来, 基本运行正常, 状态良好。分别在2013年2月和9月更换了两次离子源、离子枪吸取极和光阑条。

#### 在该仪器上所产生的代表性文章

1) Li H et al. (2013) Transformation of odor selectivity from projection neurons to single mushroom body neurons mapped with dual-color calcium imaging. Proc Natl Acad Sci.110(29):12084-9



FEI Helios NanoLab 600i 服务机时统计



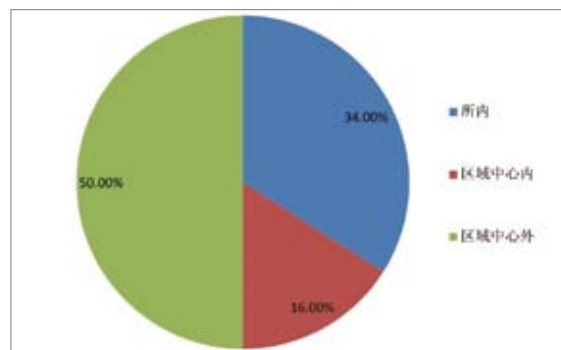
双束扫描电镜FEI Helios NanoLab 600i所内外共享情况统计

## 5. 扫描探针显微镜运行服务 (Nanoscope III a Multimode)

该设备于2004年引进，截至目前已经运行九年，状态稳定，但仪器功能已经明显落后于目前市面上的主流机型，机时也远不饱和，亟待更新和升级。

近五年来对外服务情况统计如下：

**重要的升级维护事件总结如下：**



扫描探针显微镜Nanoscope III a Multimode近五年来所内外共享情况统计

年份	机时数 (小时)	利用率	性能状态
2009	383	22.21%	至2009年已运行五年，Picoforce Quardex坏过两次，维修一次，更换一次
2010	137	8.57%	性能稳定
2011	87	5.46%	至2011年已运行七年，随着新的仪器型号的推出，该机型性能已经落后
2012	295	18.49%	性能稳定
2013	344	19.33%	至2013年已经运行九年，在机器性能落后的前提下，最大程度的发挥它的功能

**在该仪器上所产生的代表性文章**

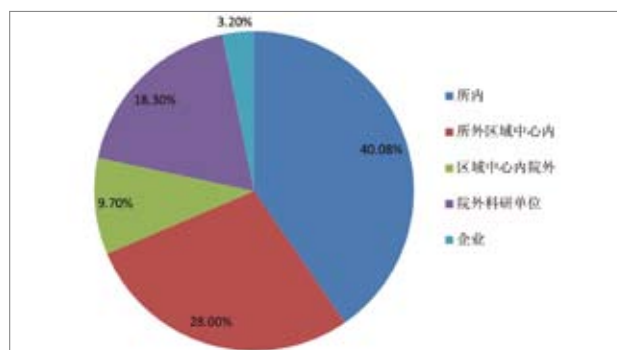
- 1) Chao Li et al. (2012) Metal-free DNA linearized nuclease based on PASP-polyamine conjugates. *Bioconjugate Chem*, 23: 1832-1837
- 2) Liu, S. et al. (2014) Structural Basis for DNA Recognition and Nuclease Processing by Mre11 Homolog SbcD in Double-Strand Break Repair. *Acta Crystallographica Section D, Biological Crystallography*, D70.

## 6. 激光共聚焦显微镜运行服务

生物成像中心现配备有全内反射荧光 (TIRF) 显微镜一台，激光扫描共聚焦显微镜两台 (FV500, FV1000)，转盘共聚焦显微镜一台 (3I Marianas XL)，双光子显微镜一台 (FV1000MPE)，可以满足多领域科研需求。

近五年来对外服务情况统计如下：

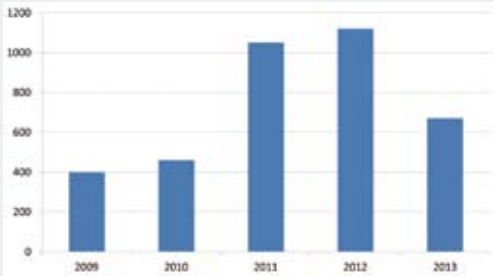
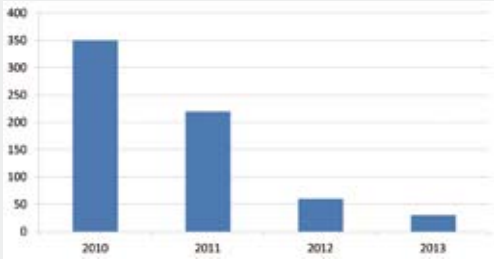
**重要的升级维护事件总结如下：**



荧光共聚焦显微镜系统近五年来所内外共享情况统计



仪器名称	设备维护维修情况 (2009-2013)		使用机时统计 (2009-2013)
	具体时间	内容	
激光共聚焦显微镜 Olympus FV500	2009.05.12	更换老化激光器488nm	 <p>运行状态说明： 该系统已经高效率地使用十年，部分硬件出现老化，系统运行较慢功能单一，随着更高性能相关仪器的出现，使用率在2011年后开始有所下降，但目前仪器基本功能运行正常。</p>
	2009.08.10	三通道扫描单元电路板老化更换	
	2009.09.11	Z轴电路板老化更换	
	2009.09.24	更换老化543nm激光器	
	2011.06.01	更换主机箱	
	2012.10.10	电脑显卡坏，更新	
	2013.11.05	从3606室移机至7106室	
	2013.11.26	调节激光光路	
光谱型激光共聚焦显微镜 Olympus FV1000	2010.04.08	安装培训，网上预约使用	 <p>该系的使用效率逐年升高，自2012年开始使用机时已超负荷，硬件消耗较快，尤其是激光器在2013年几乎全部更新，目前该仪器正常高效运行。</p>
	2011.06.14	559nm激光器不出光返厂维修	
	2011.07.20	新配置TOKAI HIT细胞培养室	
	2012.12.25	从8818室移机到3606室	
	2013.01.05	更换老化激光器Multi-488nm laser	
	2013.04.16	更换激光器635nm laser	
	2013.09.26	更换激光器405nm laser	
	2013.11.26	调节405 nm激光光路	

双光子显微镜 Olympus FV1000 MPE	2009.09.24	更换安装488nm激光器	 <p>该系统是正置双光子显微镜，更适合在体或是离体组织荧光成像，使用范围有限，每年常用用户不超10个，目前该系统运行正常。</p>
	2009.10.16	载物台滑动失灵维修	
	2010.07.19	更换干燥过滤器	
	2010.07.28	光路系统清洁调试	
	2011.12.23	更换干燥剂过滤器	
	2012.02.23	维修防震台泵	
	2012.07.24	防震台升级维修	
	2012.12.28	更换气泵阀门	
	2013.09.04	更换干燥过滤器	
转盘共聚焦显微镜 3I Marianas XL	2009.07.01	安装调试	 <p>该系统的优势是快速成像，分辨率低于常规点扫描共聚焦显微镜，共享率不高，使用机时受主要用户使用率影响很大；2012年开始系统出现故障进行了长时间的返厂维修，目前成像光路系统还需要进一步优化，正在设计调试中，其他成像单元运行正常。</p>
	2009.10.20	控温系统加热器更换	
	2009.10.21	CCD 不能制冷至-80度，更换	
	2010.06.15	调试整个光路系统	
	2010.08.11	防漂移装置失灵，检修控制器中电路	
	2011.09.13	激光器不稳定，维修调试	
	2011.11.24	激光器和电动载物台返美国厂家维修	
	2012.06.19	CSU往返日本维修	
	2012.10.11	防漂移装置失灵，检修控制器中电路	
2013.12.06	防漂移装置光路校准		

## 2013年新增仪器列表:

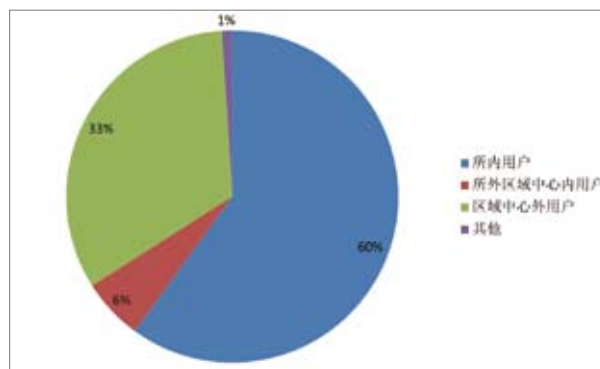
时间	仪器名称
2013年12月	光谱型激光共聚焦显微镜 (OLYMPUS FV1200)
2013年12月	多功能活细胞工作站 (IX81/MicroPoint)
2013年12月	高速转盘荧光成像系统 (Andor Revolution XD)

## 在该仪器上所产生的代表性文章

- 1) Xia P, et al. (2013) WASH inhibits autophagy through suppression of Beclin 1 ubiquitination. EMBO J. 32, 2685-2696.
- 2) Wang S, et al. (2013) Sox2-initiated transient autophagy is required for early stage reprogramming of induced pluripotent stem cells. Cell Stem Cell. 13. 617-625.

7. 结构照明超高分辨率荧光显微镜  
运行服务 (Delta Vision OMX)

结构照明超分辨荧光显微成像系统Delta Vision OMX于2011年底引进, 2012年8月20日正式开始对外服务, 自运行以来服务总机时879小时, 总使用效率45.1%。



结构照明超分辨荧光显微成像系统OMX所内外共享情况统计

## 该设备截止目前运行状态良好, 典型维修记录如下:

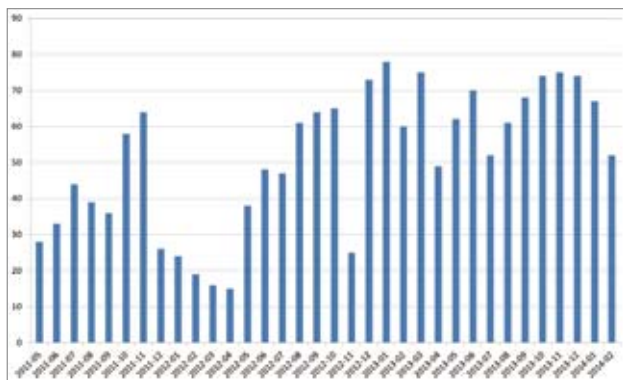
时间	升级/维护内容
2013年1月	更换光纤, 升级SoftWorx系统
2013年3月	清理循环管道, 更换制冷器内循环泵; 调整气浮装置, 更换密封阀
2013年5月	清洗制冷机冷液循环管道
2013年7月	OTF及多通道校准; 硬件全面检测
2013年10月	制冷机加装气泡过滤装置

## 在该仪器上所产生的代表性文章

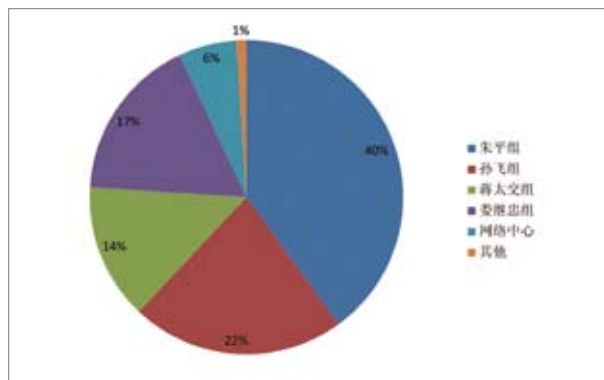
- 1) Huijie Zhao. et al. (2013). The Cep63 paralogue Deup1 enables massive de novo centriole biogenesis for vertebrate multiciliogenesis. Nature Cell Biology 15(12):1434-44
- 2) Yang Niu. et al. (2013). PtdIns(4)P regulates retromer-motor interaction to facilitate dynein-cargo dissociation at the trans-Golgi network. Nature Cell Biology 15(4):417-29

## 8. 数据处理相关设备（浪潮TS10K计算机集群）

集群2011年5月份开始正式提供服务，2013年总服务机时674万CPU小时。以1200个CPU核每天24小时每年365天总处于计算状态为基准，集群自开始服务以来的利用率统计如下：



浪潮TS10K计算机集群自运用以来的利用率



浪潮TS10K计算机集群2013年所内外共享情况统计

### 在该仪器上所产生的代表性文章

1) Chunfeng Li. et al. (2013) A peptide derived from the C-terminus of PB1 inhibits influenza virus replication by interfering with viral polymerase assembly. FEBS J. 280(4): 1139-49.

## ← 项目申请情况

生物成像中心项目申请情况统计表

项目名称	课题来源	项目负责人	经费(万)	起止时间
光电融合超分辨生物显微成像系统	基金委国家重大科研装备研制专项	徐涛	3000万	2011年-2015年
场发射扫描电镜在生物样品大尺度三维重构研究中的应用	科技部国家重大科研装备研制专项	孙飞	200万	2013年-2016年
低温透射电镜成像衬度增强技术-相位板系统的研制	科学院科研装备研制项目	孙飞	160万	2012年-2013年
相位板技术及其在生物电子显微学中应用的研究	国家自然科学基金青年基金	季刚	20万	2010年-2012年
DNA错配修复机理研究	国家自然科学基金青年基金	贾艳侠	20万	2011年-2013年
新型生物电镜染色剂的研究	科学院仪器功能开发项目	孙磊	40万	2012年-2013年
连续超薄切片自动化收集系统研制	科学院仪器功能开发项目	季刚	40万	2011年-2012年

## 获奖情况

2012年度生物成像中心获奖统计表

序号	奖项名称	颁发单位	获奖人/获奖单位名称	颁奖日期
1	2011—2012年度中央国家机关青年文明号	中央国家机关团工委	科学研究平台生物成像中心	2012. 11
2	北京生命科学大型仪器区域中心优秀仪器管理员	北京生命科学大型仪器区域中心	季刚	2012. 03

## 日常活动和管理

### 1. 周一例会

每周一下午1:30—2:30召开例会，讨论生物中心运行管理相关事务，会议通过会议电子纪要形式进行记录，方便生物成像中心成员查阅相关事项。



部分会议纪要展示



周一例会

### 2. 工作汇报及journal club

每周一下午2:30—5:00，生物成像中心各成员进行工作总结和学术交流活动。每周由两位工程师进行工作总结，另外一位工程师进行最新文献讲解（journal club）。每月生物成像中心资深专家徐伟研究员还会就生物显微成像领域的最新学术动态和前沿进行学术讲座。

生物成像中心年度Journal club内容及时间表

日期	报告人	报告题目
2012年10月12日	孙书锋	Pathway tracing using biotinylated dextran amines
2012年11月2日	黄小俊	Characterization of the calmodulin-ryanodine receptor interaction by cryo-electron microscopy
2012年11月16日	孙磊	Examination of electron stains as a substitute for UA
2012年11月30日	季刚	连续超薄切片自动化收集系统的研制
2012年12月14日	王莉	Correlated fluorescence and 3D electron microscopy with high sensitivity and spatial precision
2013年1月11日	李硕果	Correlated fluorescence and 3D electron microscopy with high sensitivity and spatial precision
2013年1月25日	贾艳侠	AFM, section and 3-D reconstruction
2013年3月8日	陈永圣	Visualizing Proteins and Macromolecular Complexes by Negative Stain EM: from Grid Preparation to Image Acquisition
2013年3月15日	张建国	Fabrication of vitreous sections for cryo-EM by focused ion beam(FIB)
2013年3月25日	黄小俊	direct electron detectors
2013年4月1日	孙书锋	Freeze-substitution of biological tissue for the localization of water-soluble compounds
2013年4月15日	滕岩	Reversibly Switchable fluorescent proteins for RESOLFT live cell nanoscopy(rsEGP2)
2013年4月22日	孙磊	A new protocol for preparation of biological specimens
2013年5月6日	季刚	The making of frozen-hydrated, vitreous lamellas from cells for cryo-electron microscopy
2013年5月13日	王莉	Pre-Embedding Immunolabeling for Electron Microscopy: An Evaluation of Permeabilization Methods and Markers
2013年5月27日	李硕果	Simultaneous Correlative Scanning Electron and High-NA Fluorescence Microscopy
2013年6月3日	贾艳侠	Correlated atomic force microscopy and fluorescence lifetime imaging of live bacterial cells
2013年6月17日	陈永圣	Single Particle Electron Microscopy Reconstruction of the Exosome Complex Using the Random Conical Tilt Method
2013年6月24日	张建国	In-situ integrity control of frozen-hydrated, vitreous lamellas prepared by the cryo-focused ion beam-scanning electron microscope
2013年9月2日	滕岩	Fluorescence Lifetime Imaging of Molecular Rotors in Living Cells
2013年9月9日	孙书锋	Cryosectioning and Immunolabeling
2013年9月16日	李硕果	结构照明超分辨荧光显微成像技术
2013年10月14日	黄小俊	image formation modeling in cryo-electron microscopy
2013年11月4日	孙磊	Staining and embedding the whole mouse brain for electron microscopy
2013年11月11日	季刚	Diffraction-unlimited optical imaging of unstained living cells in liquid by electron beam scanning of luminescent environmental cells
2013年12月2日	王莉	Silver enhancement of nanogold particles during freeze substitution for electron microscopy
2013年12月9日	贾艳侠	Advanced AFM Techniques

## 徐伟研究员学术讲座内容及时间表

日期	报告题目
2012年12月22日	The Potential of Electron Cryo-microscopy and New Concepts of Phase Plate
2012年12月28日	Site-Specific Biomolecule Labeling with Gold Clusters
2013年2月22日	Several Thoughts on Improvement of Thin-foil Phase Plate
2013年4月8日	The Clonable Gold Labels (1) – A Ferritin-Based Label
2013年5月20日	The Clonable Gold Labels (2) part1
2013年7月8日	The Clonable Gold Labels (2) part2
2013年9月23日	Volume electron microscopy (1)
2013年11月25日	Volume electron microscopy (2)
2013年12月30日	Compressed Sensing of Microscopy

## 3. 规章制度

生物成像中心在过去的管理和运行过程中制定了一系列的规章制度，这些制度保证了生物成像中心的安全和有序运转，同时为了提高技术服务的效率和质量，我们针对一些关键技术和大型仪器设备，制定了各类申请表格，在方便用户提交申请的同时，也方便相关技术工程师掌握用户的基本课题信息。这些规章制度、申请表格、技术流程都可以通过生物成像中心的网站<http://cbi.ibp.ac.cn>下载。

\*各项规章和申请表详见附录



为了提高国内同行在电子显微镜成像方面的学术水平和实验技能，中国科学院生物物理研究所生物成像中心积极开展与国内外专家的学术和技术交流活动，至中心成立以来共主办了8次学术研讨会和技术培训班。另外，成像中心每年都会组织工作人员参与北京生命科学大型仪器区域中心年度常规仪器技术培训计划，为使用仪器的客户提供专业技能的培训。

## 1. 生物电镜样品制备技术workshop'08（2008年）

2008年1月15日至21日，生物电镜样品制备技术Workshop'08在中国科学院生物物理研究所生物成像中心成功举办。北大丁明孝教授、苏都莫日根教授、生物物理所徐伟研究员、孙飞研究员，苗龙研究员和Leica公司的Steven Liang分别就生物电镜样品制备技术的应用作了报告。所内11名学员在专家的细心指导下，进行了各项技术实习。通过6天的workshop，学员们了解了电子显微镜在生命科学中的适用范围并学习了生物样品制备技术。

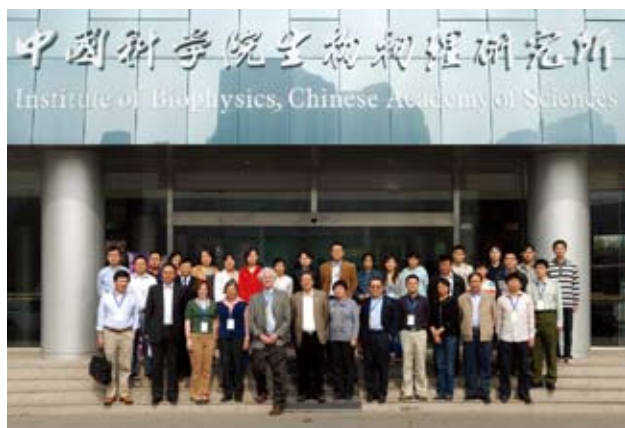


生物电镜样品制备技术workshop'08证书

## 2. 生物电镜样品制备技术workshop'09（2009年）

2009年4月13日至25日，生物电镜样品制备技术Workshop'09在中国科学院生物物理研究所成功举办。

本次workshop首度邀请了生物电镜领域的国际著名学者David Howard Hall、Fengli Guo，技术专家



生物电镜样品制备技术workshop'09合影

Erika Anna Hartweg、Leslie Gunther Cummins，针对化学固定、超薄切片、连续切片、冷冻切片、免疫标记、高压冷冻、冷冻替代等生物电镜样品制备技术，进行了包括讲座、演示、实习和讨论在内的全面培训，并举办了冷冻电子断层成像技术、电镜图像三维重构等一系列相关学术报告。

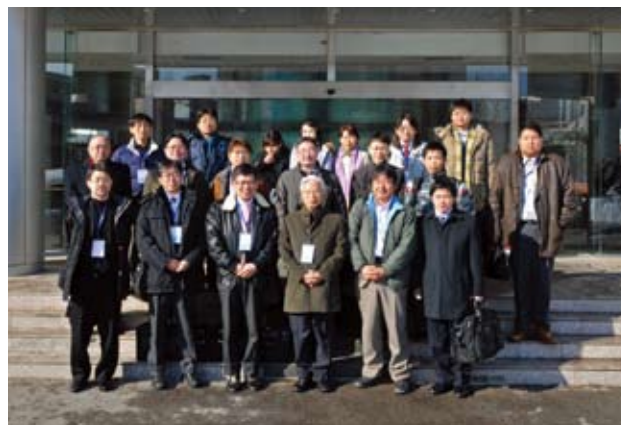
来自生物物理研究所、遗传与发育研究所、植物研究所以及北京生命科学研究所的13名学员在专家的细心指导下，进行了各项技术实习。通过两周的workshop，学员们掌握了多项国际先进的生物电



镜样品制备技术，这一方面有助于学员们更好地完成自身课题的研究，另一方面则有利于生物电镜技术在相关领域的推广。

### 3. 中日低温电子显微学双边论坛(China-Japan 3D-EM Forum 2010)

2010年1月4日至6日，在中国科学院生物物理研究所召开中日三维电镜(3D-EM)双边论坛。日本国际纯粹应用生物物理学学会(IUPAB)主席Kuniaki Nagayama教授等人参加这次双边交流，并就单颗粒技术和低温X射线断层技术相关的相位衬度最新研究进展做了大会报告。三维电子显微学及电镜三维重构的中日双边交流尚属首次。本次交流会使低温电镜领域的科研工作者了解到了电子显微学技术的最新进展情况，加强了中日双方在三维电子显微学领域的交流和合作，促进了电子显微学技术在结构生物学等领域的应用。



中日低温电子显微学交流会的部分专家学者合影

### 4. 第三届郭可信电子显微学与晶体学暑期学校暨冷冻电镜三维分子成像国际研讨会(2010年)

2010年8月8日—12日，由中国科学院生物物理研究所生物成像中心主办、中国生物物理学会、电子显微学学会和晶体学会协办的第三届“郭可信电子显微学与晶体学暑期学校，暨冷冻电镜三维分子成像国际研讨会”在北京中国科学院生物物理研究所顺利召开。本次国际研讨会由中国科学院生物物理所孙飞研究员和美国纽约大学王大能教授共同组织，共有来自美国的Scripps研究所、Baylor医学院、英国MRC分子



冷冻电镜三维分子成像国际研讨会的全体参加者合影

生物学实验室、德国Max Plank分子生理学研究所、日本京都大学等49所不同高校和研究所的专家、学者和学生参加，总参加人数达到了200人，其中165人来自国内，35人来自国外。从另一角度看，专家学者共70人，学生占130人。学生大部分来自国内高校或研究所，另有12名学生来自日本大阪大学，荷兰莱顿大学等不同国家和科研院校。无论从参加人数上，还是在全球各相关单位的覆盖面上，其规模都比前两届的郭可信暑期学校要大很多。

本次暑期班的专题报告涉及低温电镜领域的前沿及交叉科学问题，所有受邀人都是低温电镜领域的资深专家，其中一些专家还在实习部分亲自授课和演示，会后大家普遍反映这是一次成功的培训。实习结束后主办方对学员进行了实习感想调查，大家一致反映实习效果良好，收获颇丰，并寄语今后再多举办类似的暑期培训班。本届郭可信电子显微学与晶体学暑期学校为年轻的学者和学生们提供了一个和海内外资深专家零距离交流和讨论的机会。

## 5. 生物成像中心论坛（2011年）

2011年12月23日，来自徐涛、孙飞、朱平、苗龙、冯巍等研究组和科学研究平台生物成像技术实验室的研究人员在中国科学院生物物理研究所9501会议室召开了第三次生物成像论坛。本次论坛由孙飞组和生物成像中心共同主办，为期1天。共有约70人参加了此次论坛。

论坛由学术报告和生物成像实验室成员的工作汇报两部分组成。学术报告共分为：“超高分辨光学成像”、“新成果交流”、“仪器设备



生物成像中心论坛现场图片

研制”、“三维重构”四个主题。每个主题的报告人是徐平勇研究员、孙飞研究员、季刚高级工程师和薛艳红博士。论坛的第二部分是生物成像技术实验室成员的工作汇报。生物成像中心的工作人员：孙书锋、孙磊、贾艳侠、陈永圣和王莉分别总结了其在工作中积累的经验和发现的问题。

本次论坛涵盖病毒、细胞骨架与细胞极性、染色体与表观遗传、囊泡运输与蛋白质分选等多个关键生物学问题，同时还涉及透射电镜相位板研制、切片自动收集装置研发等仪器自主创新问题。

报告人和参会人员论坛上深入系统地讨论了不同的实验课题在实验中的具体操作细节，分享了一些成功和失败的经验。此次论坛为大家在繁忙的科研工作之余提供了一次难得的交流和学习的机会。

## 6. 第一届北京地区三维生物成像论坛（2012年）

2012年12月22日由蛋白质科学研究平台生物成像中心主办的第一届北京地区三维生物成像论坛（3DEM BAR）在中国科学院生物物理研究所9501会议室拉开了帷幕。本次论坛除了生物物理研究所



第一届北京地区三维生物成像论坛（3DEM BAR）开幕式

徐涛组、孙飞组、朱平组、苗龙组、徐平勇组和生物成像中心参加外，还邀请了北京地区知名的低温电镜同行参加，他们分别是清华大学的隋森芳组、王宏伟组、高宁组和雷建林组，北京大学的尹长城组，北京生命科学研究所的何万中组和中国科学院计算所的张法组。本次论坛共有13个研究组共计120人参加，会期1天。

论坛上，大家踊跃发言，讨论气氛非常热烈。此次论坛的举办得到参会者一致好评，大家认为充分的思想碰撞有利于思维的启发和日后工作技能的提升。

## 7. 国际冷冻电镜图像处理技术培训班（2013年）

2013年7月10日至7月13日，国际冷冻电镜图像处理技术培训班在中国科学院生物物理研究所成功举办。培训班的重点在于让学员了解冷冻电镜图像处理技术，并训练学员运用冷冻电镜单颗粒技术领域的三个重要软件（EMAN2、Xmipp、RELION）从电镜照片中提取样品结构信息，重构样品三维结构。EMAN2的主要编写者美国Baylor医学院Steven Ludtke教授以及EMAN的熟练使用者中国科学院上海生化与细胞生物研究所丛尧研究员担任EMAN2培训的主讲。Xmipp的主讲是其编写团队西班牙国家生物技术中心Jose Maria Carazo教授以及他的组员Roberto Marabini博士和Carlos-Oscar Sanchez Sorzano博士。RELION由其作者英国MRC实验室Sjors Scheres教授和他的组员白晓辰博士主讲。来自全国各地以及多个国家和地区的学员参加了这次的培训活动。培训班分讲座（上午）、上机实习（下午）和讨论会（晚上）三种形式，这使得学员有充足的时间和空间与各位主讲者交流。7月10日晚的第一堂课由Steven Ludtke教授概述冷冻电镜技术的要点和最新进展。随后的三天由各位主讲们分别详细讲述EMAN2、Xmipp、RELION的各自特点和使用流程。

此次培训班组织委员会主席是清华大学隋森芳院士，执行主席是生物物理所孙飞研究员以及北京大学尹长城教授。



参加2013年北京国际冷冻电镜图像处理技术培训班的各位主讲及学员合影

## 8. Imaris多维图像分析技术 交流培训会（2013年）



Imaris多维图像分析技术交流培训会现场

2013年9月26日，蛋白质科学研究平台生物成像中心主办了“Imaris多维图像分析的技术交流培训会”。会上邀请厂家技术工程师温寅鑫和南希详细阐述了Imaris软件各项数据分析和多维图像处理功能；同时还邀请清华大学医学院祁海实验室的徐和平博士和北京大学生科院张晨实验室的王威博士，就他们自己研究的领域分别介绍了“Imaris在免疫反应过程中的动态数据分析”和“Imaris在神经元迁移研究中的应用”，在交流会最后，大家针对Imaris软件的功能应用进行了深入交流和讨论。会后于2013年10月15日—18日组织了为期四天的上机实习培训，参加实习培训的学员有生物物理所的丁玮，李硕果，王圣柳，张萌娜，动物所的周晨曦，曹忠红，基因组所的王海，杨琼，生态环境研究中心的杨敏等。通过此次培训，学员们初步掌握了Imaris软件的应用，提升了图像处理分析能力，同时也促进生物成像中心图像分析技术服务的进一步完善。

## 9. 生物成像中心2013年度 常规技术培训

2013年9月，北京生命科学大型仪器区域中心年度常规仪器技术培训如期举办。该培训为北京生命科学大型仪器区域中心面向用户，主要就区域中心仪器设备的基本原理、常规实验方法、基本操作流程和操作安全规范展开培训。其中科学研究平台生物成像中心承担培训课程六项：电镜样品制备技术（负责人：孙磊），电子显微成像技术（负责人：黄小俊和季刚），原子力显微成像技术（负责人：贾艳侠），激光共聚焦显微成像技术（负责人：滕岩），结构照明显微成像技术（负责人：李硕果）以及高性能计算机集群培训（负责人：凌伦奖和丁玮）。

此次培训与往年一样得到了仪器用户的广泛关注和积极参与。经过培训，仪器用户对所使用仪器的工作原理有了进一步的了解并且对相应的操作技巧和注意事项更为熟悉，该培训对本中心各种仪器设备的应用推广和相关工作者技术水平的提高也有着积极的推动作用。



生命科学大型仪器区域中心年度常规仪器技术培训现场

## 科普活动

### 少年科学画报供稿



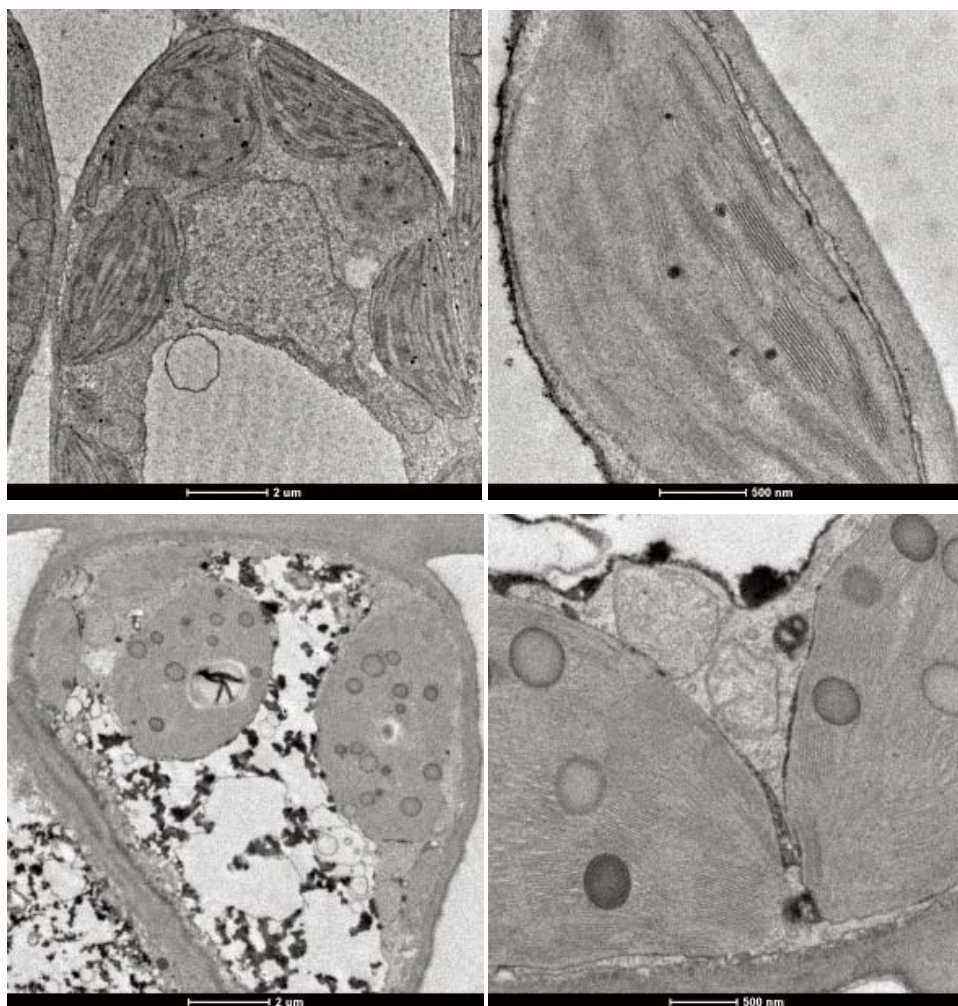
2013年生物成像中心为《少年科学画报》“大不一样”栏目供稿图选

《少年科学画报》是中国第一本面向少年儿童的科普漫画杂志，以图文并茂的形式向少年儿童传播科学知识。生物成像中心将平时工作中拍摄到的精美图片，配以简要的文字说明，提供给《少年科学画报》。这些照片中有荧光显微镜照片、原子力显微镜照片、扫描电镜照片和透射电镜照片，它们不仅生动形象的向少年儿童普及科学知识，还激发了他们探求知识的兴趣和热情。我们的工作也得到了杂志社的认可与好评。

### 北京一零一中学科研兴趣活动——香叶天竺葵的环保作用

香叶天竺葵(又名驱蚊草)，属多年生草本植物，具有净化空气的能力，是一种环保植株。这种植株是否能对北京日益严重的空气污染、尤其是PM2.5、起到吸收治理的作用呢？北京一零一中学科研兴趣小组的同学们对香叶天竺葵进行了实验，向其叶子表面不断喷洒污染物，一段时间累积后观察其变化。我们生物成像中心提供了电镜部分的实验数据，即将不同阶段的样品固定后进行超薄切片，通过电镜观察其超微结构的变化，从结构学的角度验证其吸收污染物的能力。实验证明，香叶天竺葵确实有吸收污染颗粒的作用。

技术完成人：孙磊



香叶天竺葵叶片的超微结构。上：对照组，可见细胞形态正常、叶绿体形态正常、叶绿体内基粒排列整齐；下：喷洒污染物72小时后取样，可见细胞形态开始异常、细胞内出现污染颗粒、叶绿体内膜紊乱。

## 利用生物成像中心设备技术所发表研究论文汇编

2013年度

### 署名文章

- Yang S, Liu X, Li X, Sun S, Sun F, Fan B, Zhao S(2013). MicroRNA-124 reduces caveolar density by targeting caveolin-1 in porcine kidney epithelial PK15 cells. *Mol Cell Biochem* 384(1-2):213-9
- Li S, Chen M, Yu D, Ren S, Sun S, Liu L, Ketelaar T, Emons AM, Liu CM(2013). EXO70A1-mediated vesicle trafficking is critical for tracheary element development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 25(5):1774-86
- SUNDa-Peng, SONGFeng, HUANGLi, ZHANGKuo, JI Gang, CHENPing, ZHUPing(2013). In vitro Assembly and Electron Microscopic Analysis of 30 nm Chromatin Fibers. *Progress in Biochemistry and Biophysics* 40(8): 739-747
- Xia P, Wang S, Du Y, Zhao Z, Shi L, Sun L, Huang G, Ye B, Li C, Dai Z, Hou N, Cheng X, Sun Q, Li L, Yang X, Fan Z(2013). WASH inhibits autophagy through suppression of Beclin 1 ubiquitination. *EMBO J* 32(20):2685-96
- Shang Y, Chen L, Liu Z, Wang X, Ma X, Miao L(2013). Cytosolic Ca(2+) as a multifunctional modulator is required for spermiogenesis in *Ascaris suum*. *Protein Cell* 4(6):456-66
- Tian M, Zhu L, Yu D, Wang Y, Sun S, Wang Y(2013). Aggregate transitions in mixtures of anionic sulfonate gemini surfactant with cationic ammonium single-chain surfactant. *J Phys Chem B* 117(1):433-40
- Zhang Y, Wang W, Chen J, Zhang K, Gao F, Gao B, Zhang S, Dong M, Besenbacher F, Gong W, Zhang M, Sun F, Feng W(2013). Structural Insights into the Intrinsic Self-Assembly of Par-3 N-Terminal Domain. *Structure* 21(6):997-1006
- Zhang K, Wang L, Liu Y, Chan KY, Pang X, Schulten K, Dong Z, Sun F(2013). Flexible interwoven termini determine the thermal stability of thermosomes. *Protein Cell* 4(6):432-44
- Liu Z, Chen L, Shang Y, Huang P, Miao L.(2013).The micronutrient element zinc modulates sperm activation through the SPE-8 pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Development* 140(10):2103-7
- Fengfeng Niu, Neil Shaw, Yao E. Wang, Lianying Jiao, Wei Ding, Xiaomin Li, Ping Zhu, Halmurat Upur, Songying Ouyang, Genhong Cheng, and Zhi-Jie Liu(2013). Structure of the Leanyer orthobunyavirus nucleoprotein-RNA complex reveals unique architecture for RNA encapsidation. *PNAS* 110(22):9054-9
- Roy A. Quinlan, Yan Zhang, Andrew Lansbury, Ian Williamson, Ehmke Pohl, and Fei Sun(2013). Changes in the quaternary structure and function of MjHSP16.5 attributable to deletion of the IXI motif and introduction of the substitution, R107G, in the  $\alpha$ -crystallin domain. *Phil. Trans. R. Soc. B.* 368(1617):20120327
- Xiaohu Huang, Lei Sun, Shuangxi Ji, Ting Zhao, Wanrui Zhang, Jiejia Xu, Jue Zhangc, Yanru Wang, Xianhua Wang, Clara Franzini-Armstrong, Ming Zheng,and Heping Cheng(2013). Kissing and nanotunneling

mediate intermitochondrial communication in the heart. PNAS 110(8):2846-51

- Xue Wang, Fengting Xu, Jiasen Liu, Bingquan Gao, Yanxin Liu, Yujia Zhai, Jun Ma, Kai Zhang, Timothy S. Baker, Klaus Schulten, Dong Zheng, Hai Pang, Fei Sun (2013). Atomic Model of Rabbit Hemorrhagic Disease Virus by Cryo-Electron Microscopy and Crystallography. PLOS Pathogens 9(1):e1003132

### 致谢文章

- Huijie Zhao, Lei Zhu, Yunlu Zhu, Jingli Cao, Shanshan Li, Qiongping Huang, Tao Xu, Xiao Huang, Xiumin Yan, Xueliang Zhu (2013). The Cep63 paralogue Deup1 enables massive de novo centriole biogenesis for vertebrate multiciliogenesis. Nature Cell Biology 15(12):1434-44

- Li H, Li Y, Lei Z, Wang K, Guo A. (2013). Transformation of odor selectivity from projection neurons to single mushroom body neurons mapped with dual-color calcium imaging. Proc Natl Acad Sci U S A 110(29):12084-9

- Li C, Ma C, Xu P, Gao Y, Zhang J, Qiao R, Zhao Y (2013). Effective and Reversible DNA Condensation Induced by a Simple Cyclic/Rigid Polyamine Containing Carbonyl Moiety. J Phys Chem B 117(26):7857-67

- Baobin Li, Quan Wang, Xijiang Pan, Isabel Fernández de Castro, Yuna Sun, Yu Guo, Xinwei Tao, Cristina Risco, Sen-Fang Sui, and Zhiyong Lou (2013). Bunyamwera virus possesses a distinct nucleocapsid protein to facilitate genome encapsidation. PNAS 110(22):9048-53

- Yang Niu, Cheng Zhang, Zhe Sun, Zhi Hong, Ke Li, Demeng Sun, Yanrui Yang, Changlin Tian, Weimin Gong & Jia-Jia Liu (2013). PtdIns(4)P regulates retromer-motor interaction to facilitate dynein-cargo dissociation at the trans-Golgi network. Nature Cell Biology 15(4):417-29

- Li-Qiong Xu, Si Wu, Alexander K. Buell, Samuel I. A. Cohen, Li-Jun Chen, Wan-Hui Hu, Sarah A. Cusack, Laura S. Itzhaki, Hong Zhang, Tuomas P. J. Knowles, Christopher M. Dobson, Mark E. Welland, Gary W. Jones and Sarah Perrett (2013). Influence of specific HSP70 domains on fibril formation of the yeast prion protein Ure2. Phil. Trans. R. Soc. B 368(1617):20110410

- Haolong C, Du N, Hongchao T, Yang Y, Wei Z, Hua Z, Wenliang Z, Lei S, Po T (2013). Enterovirus 71 VP1 activates calmodulin-dependent protein kinase II and results in the rearrangement of vimentin in human astrocyte cells. PLoS One. 8(9):e73900

- Wang S, Xia P, Ye B, Huang G, Liu J, Fan Z. (2013) Transient Activation of Autophagy via Sox2-Mediated Suppression of mTOR Is an Important Early Step in Reprogramming to Pluripotency. Cell Stem Cell. 13(5):617-25.

- Zhao C, Yin S, Dong Y, Guo X, Fan L, Ye M, Hu H. (2013) Autophagy-dependent EIF2AK3 activation compromises ursolic acid-induced apoptosis through upregulation of MCL1 in MCF-7 human breast cancer cells. Autophagy. 9(2):196-207.

- Zhao W, Lü Y, Ouyang H, Zhou H, Yan J, Du T, Jin C. (2013) N-glycosylation of Gel1 or Gel2 is vital for cell wall  $\beta$ -glucan synthesis in *Aspergillus Fumigatus*. Glycobiology. 23(8):955-68.

- Wan B, Wang ZX, Lv QY, Dong PX, Zhao LX, Yang Y, Guo LH. (2013) Single-walled carbon nanotubes



and graphene oxides induce autophagosome accumulation and lysosome impairment in primarily cultured murine peritoneal macrophages. *Toxicology Lett.* 221(2):118-27.

2012年度

署名文章

- LI Xia, RONG Ye, LI Yefei, XUE Yanhong, ZHANG Yunfeng, JI Gang (2012). STEM Tomography for Thick Synaptic Specimen. *ACTA BIOPHYSICA SINICA* 28(11):886-895
- Yang Song, Teng Yan, Xu Ping-Yong(2012). A novel fluorescent protein pair for dual-color two-photon laser scanning microscopy. *Progress in Biochemistry and Biophysics* 39(10):1012-1016
- Zhao Y, He W, Liu WF, Liu CC, Feng LK, Sun L, et al(2012). Two distinct states of Escherichia coli cells that overexpress the recombinant heterogeneous  $\beta$ -galactosidase. *JBC* 287(12):9259-68
- Fu-Gen Wu, Ji-Sheng Yu, Shu-Feng Sun, Hai-Yuan Sun, Jun-Jie Luo, and Zhi-Wu Yu(2012). Stepwise Ordering of Imidazolium-Based Cationic Surfactants during Cooling-Induced Crystallization. *Langmuir* 28 (19): 7350–7359
- Fu-Gen Wu, Nan-Nan Wang, Qing-Guo Zhang, Shu-Feng Sun, Zhi-Wu Yu(2012). Crystallization from the micellar phase of imidazolium-based cationic surfactants. *Journal of Colloid and Interface Science* 374 (1): 197–205
- Li JG, Hu YF, Sun SF, Ling S, Zhang JZ(2012). Ionic structures of nanobased FeCl<sub>3</sub>/[C4mim]Cl ionic liquids. *J Phys Chem A* 116(22):6461-4
- Yu D, Tian M, Fan Y, Ji G and Wang Y(2012). Aggregate Transitions in Aqueous Solutions of Sodium Dodecylsulfate with a “Gemini-Type” Organic Salt. *J. Phys. Chem. B* 116(22):6425-30
- Yan G. Zhao, Hongyu Zhao, Lin Miao, Li Wang, Fei Sun and Hong Zhang(2012). The p53-induced gene Ei24 is an essential component of the basal autophagy pathway. *JBC* 287(50):42053-63
- Hu JZ, Sun L, Shen FF, Chen YF, Hua Y, Liu Y, Zhang M, Hu YR, Wang QS, Xu W, Sun F, Ji JG, Murray, J.M., Carr, A.M., Kong DC(2012). The Intra-S Phase Checkpoint Targets Dna2 to Prevent Stalled Replication Forks from Reversing. *Cell* 149(6):1221-1232
- Yang C, Ji G, Liu H, Zhang K, Liu G, Sun F, Zhu P and Cheng L (2012). Cryo-EM structure of a transcribing cypovirus. *PNAS* 109 (16):6118-6123
- Xue Y, Zhao W, Du W, Zhang X, Ji G, Ying W and Xu T, (2012). Ultra-structural study of insulin granules in pancreatic  $\beta$ -cells of db/db mouse by scanning transmission electron microscopy tomography. *Protein Cell* 3 (7): 521-525
- C Cao, X Dong, X Wu, B Wen, G Ji, L Cheng, H Liu(2012). Conserved fiber-penton base interaction revealed by a near-atomic resolution cryo-EM structure of adenovirus provides insight into receptor interaction. *J Virol* 86(12):12322-12329

### 致谢文章

- Zhe Chen, Xiang-Jun Chen, Mengdie Xia, Hua-Wei He, Sha Wang, Huihui Liu, Haipeng Gong, Yong-Bin Yan(2012). Chaperone-Like Effect of the Linker on the Isolated C-Terminal Domain of Rabbit Muscle Creatine Kinase. *Biophysical Journal* 103:558–566
- Jing Wang, Yiguang Wang, Wei Liang(2012). Delivery of drugs to cell membranes by encapsulation in PEG–PE micelles. *Journal of Controlled Release* 160(3):637-51
- S Wang, P Xia, L Shi and Z Fan(2011). FADD cleavage by NK cell granzyme M enhances its self-association to facilitate procaspase-8 recruitment for auto-processing leading to caspase cascade. *Cell Death and Differentiation* 19(4):605-15
- Dong PX, Wan B, Wang ZX, Yang Y, Zhao L(2012). Exposure of single-walled carbon nanotubes impairs the functions of primarily cultured murine peritoneal macrophages. *Nanotoxicology* 7(5):1028-42
- J Wang, XC Fang, W Liang(2012). Pegylated Phospholipid Micelles Induce Endoplasmic Reticulum-Dependent Apoptosis of Cancer Cells but not Normal Cells. *ACS Nano* 6(6):5018-30
- Wang L, Guo H, Reyes N, Lee S, Bortz E, Guo F, Sun R, Tong L, Deng H(2012). Distinct Domains in ORF52 Tegument Protein Mediate Essential Functions in Murine Gammaherpesvirus 68 Virion Tegumentation and Secondary Envelopment. *J. Virol* 86(3):1348-57
- Zhu S, Gao B, Harvey PJ, Craik DJ(2012). Dermatophytic defensin with antiinfective potential. *PNAS* 109(22): 8495-8500
- Jun-Jie Luo, Fu-Gen Wu, Shan-Shan Qin, and Zhi-Wu Yu(2012). In Situ Unfolded Lysozyme Induces the Lipid Lateral Redistribution of a Mixed Lipid Model Membrane. *Journal of Physical Chemistry B* 116(41):12381-8
- Xianzhi Lin, Xiaofan Li, Deguang Liang and Ke Lan(2012). MicroRNAs and Unusual Small RNAs Discovered in Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Virions. *J. Virol* 86 (23): 12717-12730
- Chao Li, Fangfang Zhao, Yunan Huang, Xueyuan Liu, Yan Liu, Renzhong Qiao, and Yufen Zhao(2012). Metal-free DNA linearized nuclease based on PASP–polyamine conjugates. *Bioconjugate Chem* 23: 1832–1837
- Yang C, Ji G, Liu H, Zhang K, Liu G, Sun F, Zhu P, Cheng L(2012). Cryo-EM structure of a transcribing cypovirus. *PNAS* 109(16):6118-23

### 2011年度

### 署名文章

- Lin G, Wang Y, Zhang Q, Zhang X, Ji G, Ba L.(2011). Controllable formation and TEM spatial visualization of cross-linked gold nanoparticle spherical aggregates. *Nanoscale* 3(11):4567-70
- Wu FG, Yu ZW, Ji G(2011). Formation and Transformation of the Subgel Phase in Dioctadecyldimethyla

mmonium Bromide Aqueous Dispersions. *Langmuir* 27(6):2349–2356

- Fu-Gen Wu, Ji-Sheng Yu, Shu-Feng Sun, and Zhi-Wu Yu(2011). Comparative Studies on the Crystalline to Fluid Phase Transitions of Two Equimolar Cationic/Anionic Surfactant Mixtures Containing Dodecylsulfonate and Dodecylsulfate. *Langmuir* 27 (24): 14740–14747
- Cheng L , Sun J, Zhang K, Mou Z, Huang X, Ji G, Sun F, Zhang J and Zhu P(2011). Atomic model of a cypovirus built from cryo-EM structure provides insight into the mechanism of mRNA capping. *PNAS* 108(4) :1373-1378

#### 致谢文章

- Q.Q. Qin, B.S. Xia, Y. Xiong, S.X. Zhang, Y.B. Luo, Y.L. Hao(2011). Structural Characterization of the Exopolysaccharide Produced by *Streptococcus thermophilus* 05-34 and Its In Situ Application in Yogurt. *Journal of Food Science* 76(9):C1226-30
- Liu Y, Qiang M, Wei Y, He R(2011). A novel molecular mechanism for nitrated  $\alpha$ -synuclein-induced cell death. *J Mol Cell Biol.* 3(4):239-49
- Da Q, Yang X, Xu Y, Gao G, Cheng G, Tang H(2011). TANK-Binding Kinase 1 Attenuates PTAP-Dependent Retroviral Budding through Targeting Endosomal Sorting Complex Required for Transport-I. *J Immunol* 186(5):3023-30
- Lingxiang Jiang, Yu Peng, Yun Yan and Jianbin Huang(2011). Aqueous self-assembly of SDS@2 $\beta$ -CD complexes: lamellae and vesicles. *Soft Matter* 7: 1726-1731
- Yunfeng Ding, Li Yang, Shuyan Zhang, Yang Wang, Yalan Du, Jing Pu, Gong Peng, Yong Chen, Huina Zhang, Jinhai Yu, Haiying Hang, Peng Wu, Fuquan Yang, Hongyuan Yang, Alexander Steinbüchel, Pingsheng Liu(2011). Identification of the Major Functional Proteins of Prokaryotic Lipid Droplets. *Journal of Lipid Research* 53 (3): 399-411
- Li Zhang, Dao-an Zha, Tingting Du, Shilin Mei, Zujin Shi, and Zhaoxia Jin(2011). Formation of superhydrophobic microspheres of poly(vinylidene fluoride- hexafluoropropylene)/graphene composite via gelation. *Langmuir* 27(14):8943-9

#### 2010年度

#### 署名文章

- Ji-Guang Li, Yu-Feng Hu, Shu-Feng Sun, Yan-Sheng Liu, Zhi-Chang Liu (2010) Densities and dynamic viscosities of the binary system (water + 1-hexyl-3-methylimidazolium bromide) at different temperatures. *J. Chem. Thermodynamics* 42(7): 904–908

#### 致谢文章

- Zhang YJ, Liu DQ, Chen X, Li J, Li LM, Bian Z, Sun F, Lu JW, Yin Y, Cai X, Sun Q, Wang KH, Ba Y, Wang Q, Wang DJ, Yang JW, Liu PS, Xu T, Yan Q, Zhang JF, Zen K, and Zhang CY.(2010). Secreted Monocytic miR-150 Enhances Targeted Endothelial Cell Migration. *Molecular Cell* 39(1):133-144
- Huafeng Zhou, Yang Yue, Guanlan Liu, Yan Li, Jing Zhang, Qiu Gong, Zemin Yan, Mingxing Duan. (2010) Preparation and Characterization of a Lecithin Nanoemulsion as a topical delivery system. *Nanoscale Res Lett* 5: 224-230
- Guiping Du, Xiang Liu, Xinping Chen, Mei Song, Yan Yan, Renjie Jiao, and Chih-chen Wang (2010) Drosophila Histone Deacetylase 6 Protects Dopaminergic Neurons against-Synuclein Toxicity by Promoting Inclusion Formation. *Molecular Biology of the Cell* 21(13): 2128-2137
- Binglei Song, Yufang Hu, Yongming Song, Jianxi Zhao (2010) Alkyl chain length-dependent viscoelastic properties in aqueous wormlike micellar solutions of anionic gemini surfactants with an azobenzene spacer. *Journal of Colloid and Interface Science* 34(1): 94-100

## 2009年度

### 署名文章

- SUN Shu-feng, ZHANG Kai, XU Wei, WANG Gang, CHEN Jian-Jun, SUN Fei (2009) 3D Structural Investigation of Caveolae of PAE Cell by Electron Tomography. *Progress in Biochemistry and Biophysics* 36 (6): 729-735

### 致谢文章

- Yi Li, Ai-Hua Zou, Ru-Qiang Ye, and Bo-Zhong Mu (2009) Counterion-Induced Changes to the Micellization of Surfactin-C16 Aqueous Solution. *J. Phys. Chem. B* 113(46): 15272–15277
- Jiang L, Deng M, Wang Y, Liang D, Yan Y, Huang J (2009) Special Effect of beta-Cyclodextrin on the Aggregation Behavior of Mixed Cationic/Anionic Surfactant Systems. *J. Phys. Chem. B* 113 (21): 7498-7504
- Binglei Song, Yufang Hu, Jianxi Zhao (2009) A single-component photo-responsive fluid based on a gemini surfactant with an azobenzene spacer. *Journal of Colloid and Interface Science* 333 (2): 820-822
- Lingxiang Jiang, Ke Wang, Fuyou Ke, Dehai Liang and Jianbin Huang (2009) Endowing cationic surfactant vesicles with dual responsive abilities via a noncovalent strategy: introduction of a responder, sodium cholate. *Soft Matter* 5: 599 – 606


2008年度

署名文章


- Sun SF, Pan QZ, Hui X, Zhang BL, Wu HM, Li H, Xu W, Zhang Q, Li JY, Deng XM, Chen JW, Lian ZX, Li N (2008) Stronger in vitro phagocytosis by monocytes-macrophages is indicative of greater pathogen clearance and antibody levels in vivo. *Poult Sci* 87(9):1725-1733
- Yuping Wei, Fa Cheng, Guili Hou, Shufeng Sun (2008) Amphiphilic cellulose: Surface activity and aqueous self-assembly into nano-sized polymeric micelles. *Reactive & Functional Polymers* 68: 981-989

致谢文章

- Lingxiang Jiang, Ke Wang, Manli Deng, Yilin Wang, and Jianbin Huang (2008) Bile Salt-Induced Vesicle-to-Micelle Transition in Catanionic Surfactant Systems: Steric and Electrostatic Interactions. *Langmuir* 24: 4600-4606
- Na Li, Shaohua Zhang, Liqiang Zheng, Bin Dong, Xinwei Li and Li Yu (2008) Aggregation behavior of long-chain ionic liquids in an ionic liquid. *Physical Chemistry Chemical Physics* 10: 4375– 4377
- Shaohua Zhang, Na Li, Liqiang Zheng, Xinwei Li, Yanan Gao, and Li Yu (2008) Aggregation Behavior of Pluronic Triblock Copolymer in 1-Butyl-3-methylimidazolium Type Ionic Liquids. *J. Phys. Chem. B* 112: 10228–10233



中国科学院蛋白质科学研究平台  
Core Facilities for Protein Sciences, CAS



### Structural insights into the intrinsic self-assembly of Par-3 N-terminal domain

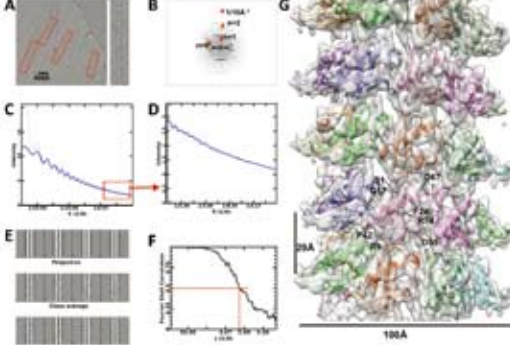
Yan Zhang<sup>1,d</sup>, Wenjuan Wang<sup>1,d</sup>, Kai Zhang<sup>1</sup>, Feng Gao<sup>1</sup>, Mingjie Zhang<sup>1</sup>, Weimin Gong<sup>1</sup>, Fei Sun<sup>1\*</sup> and Wei Feng<sup>1,2\*</sup>

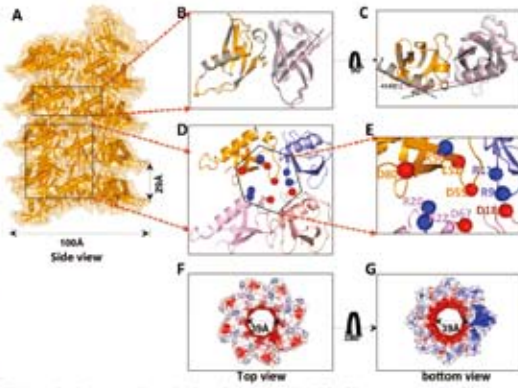
<sup>1</sup>National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics (IBP), Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China.  
<sup>2</sup>Laboratory of Non-coding RNA, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, 15 Datun Road, Beijing 100101, China;  
<sup>3</sup>Division of Life Sciences, State Key Laboratory of Molecular Neuroscience, Hong Kong University of Science and Technology, Clear Water Bay, Kowloon, Hong Kong, China.  
<sup>4</sup>These authors gave equal contributions to this work.  
 \*Correspondence should be addressed to: Fei Sun (fesusun@ibp.ac.cn) and Wei Feng (wffeng@ibp.ac.cn)

#### Introduction

The Par3/Par6/aPKC complex plays a critical role in the control of a variety of cell polarity in distinct biological contexts, and the scaffold protein Par3 is an essential component to mediate the complex assembly. The N-terminal domain (NTD) of Par-3 tends to form homo-oligomers, indicating that it can further assemble the Par3/Par6/aPKC complex to form the (Par3/Par6/aPKC) supra-complex. So it's very important and significant to solve the structure of Par3 to determine that if NTD may serve as a platform for organizing other polarity-regulating proteins. From the diffraction pattern of particles in the raw EM data, we know that Par3 has the helical structure. Even the outer diameter of Par3 is about 100 Å, inner diameter is about 39 Å, but it's a very thin filament with the thickness of just 30 Å (measured from two dimension averaged particles of Par3). It's difficult to get a clear diffraction pattern for this so thin filament. We first reconstructed the Par3NTD structure using IHRSR method (Egelman E. H.), then refine the structure by EMAN suite (Ludtke et al., 1999). The resolution of the final reconstruction was estimated by FSC to be about 5.3 Å using the 0.5 criterion.

#### Helical structure of the Par-3 NTD filament by cryo-EM

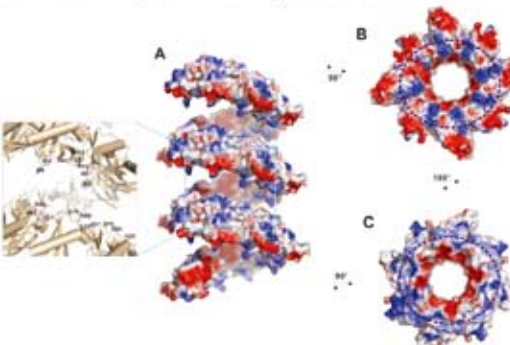


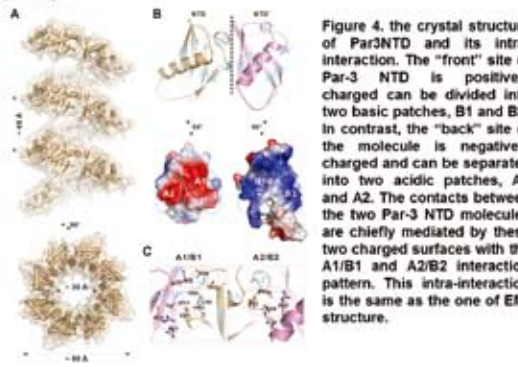


**Figure 1.** Cryo-EM reconstruction of the Par-3 NTD filament. The 3D structure of the Par-3 NTD filament was successfully determined by using the iterative helical real space reconstruction (IHRSR) method. This model was further refined by symmetry-restrained molecule dynamics flexible fitting (MDFF) approach and finally fits nicely with the cryo-EM map.

**Figure 2.** Structural analysis of the Par-3 NTD filament and evaluation of key residues for Par-3 NTD self-assembly. Comparison with the helical packing observed in the crystal structure, we found that the significant difference of the cryo-EM model is its extensive longitudinal inter-layer packing.

#### Structure comparison with crystal structure of Par3 NTD






**Figure 3.** Layer-to-layer interaction and electrostatic surfaces of crystal structure of Par3 NTD.

**Figure 4.** The crystal structure of Par3NTD and its intra-interaction. The "front" site of Par-3 NTD is positively charged and can be divided into two basic patches, B1 and B2. In contrast, the "back" site of the molecule is negatively charged and can be separated into two acidic patches, A1 and A2. The contacts between the two Par-3 NTD molecules are chiefly mediated by these two charged surfaces with the A1/B1 and A2/B2 interaction pattern. This intra-interaction is the same as the one of EM-structure.

**ACKNOWLEDGMENTS**  
 We thank the beam-line BL17U of SSRF (Shanghai Synchrotron Radiation Facility) for the beam time. This work was supported by grants from the National Major Basic Research Program of China (2011CB910503 and 2011CB910301), the National Natural Science Foundation of China (31021062, 31070657 and 31190062), and the Knowledge Innovation Program of the Chinese Academy of Sciences (KSCX2-YW-R-154 and KSCX2-EW-J-3). K.Z. (F.S. group) was supported by a Gatan China Scholarship (2011-2012). All the EM data were collected and processed at Center for Biological Imaging, Core Facility for Protein Sciences, Chinese Academy of Sciences.



蛋白质研究平台生物成像中心  
Center for Biological Imaging, core facilities for Protein Sciences

北京市朝阳區天竺西路15号, 100101, Tel.&Fax: +86-10-64888419, http://cbl.ibp.ac.cn  
 Datun Road 15, Chaoyang District, Beijing, China, 100101, Tel.&Fax: +86-10-64888419, http://cbl.ibp.ac.cn

## 生物成像中心成果展示海报汇编

中国科学院蛋白质科学研究平台  
Core Facilities for Protein Sciences, CAS

## Atomic model of rabbit hemorrhagic disease virus by cryo-electron microscopy and crystallography

Xue Wang<sup>1,2\*</sup>, Fengting Xu<sup>3\*</sup>, Jiasen Liu<sup>3\*</sup>, Bingquan Gao<sup>1,2</sup>, Yanxin Liu<sup>4</sup>, Yujia Zhai<sup>1</sup>, Jun Ma<sup>1,2</sup>, Kai Zhang<sup>1,2</sup>, Timothy S. Baker<sup>5</sup>, Klaus Schulten<sup>6</sup>, Dong Zheng<sup>1</sup>, Hai Pang<sup>6,7</sup>, Fei Sun<sup>1,8\*</sup>

1 National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics (IBP), Chinese Academy of Sciences (CAS), Beijing 100101, China.  
2 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China.  
3 Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Life Sciences.  
4 Analytical and Testing Center, Beijing Normal University, Beijing 100875, China  
5 State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Science, Harbin 150001, China.  
6 School of Medicine, Tsinghua University, Beijing, 100084, China.  
7 Beckman Institute and Department of Physics, University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, Illinois, United States of America.  
8 Department of Chemistry and Biochemistry and Division of Biological Sciences, University of California-San Diego, La Jolla, California, United States of America.

### Introduction

Rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV), the etiological agent of rabbit hemorrhagic disease, belongs to the Lagovirus genus in the Calciviridae family. The molecular structure of member of Lagovirus is still unknown in detail. We reported a cryo-electron microscopic reconstruction of wild RHDV at 6.5Å, the crystal structures of the S and P domain of its major capsid protein VP60 at 2.0Å, and the building of a complete atomic model of the RHDV capsid. Furthermore, sequence alignments of VP60 from six groups of RHDV strains reveal seven varied regions and suggest three putative binding pockets that might be responsible for histo-blood group antigen binding. A flexible loop (aa.300-318) selected from these regions is found to interact with rabbit tissue cells and to contain an important epitope for anti-RHDV antibody production.

### CryoEM reconstruction of the RHDV virion

Highly purified RHDV virions (Figure 1A) obtained from the livers of infected domestic rabbits were used for cryoEM studies (Figure 1B). The structure of RHDV (Figure 1C) reported here has a resolution of 6.5/4.8Å based on Fourier shell correlation (FSC) cutoff thresholds of 0.5 and 0.143, respectively. The resolution of the RHDV inner shell is higher than that of its outer shell (Figure 1D).

### Crystal structures of VP60 S and P domains

RHDV VP60 contains three domains (NTA; S domain; P domain) and a short hinge (Figure 2A). The crystal structure of S domain (2.0Å) folds into an eight-stranded β-barrel (Figure 2B); and P domain (2.0Å) consists of two sub-domains, called P1 and P2 (Figure 2C and 2D).

### Atomic model of the complete RHDV capsid

A pseudo-atomic model of the complete RHDV capsid was constructed based on crystal structures of VP60 (Figure 3E). Three A/B and C/C dimers pack alternatively via S domains around three-fold axis and NTA domain folds onto its cognate S domain (Figure 3A). The NTA domains of B and C monomers form a network of interactions with a plug-like density surrounding the three-fold axis (Figure 3B). The cryo-EM density maps of A/B and C/C capsomers showed the interactions between the P2 sub-domains (Figure 3C and D).

### Sequence alignment of RHDV VP60s and location of the sequence-varied regions on capsomer surface.

The results of multi-sequence alignments of VP60 among all current RHDV strains reveals seven varied regions (V1 to V7) across different strains. These seven variation regions are located at the corresponding loop L1 to L7 of the P2 sub-domain and three cavities (C1, C2 and C3) on the outer surface of the RHDV capsomer were found, which might contribute to HBGAs binding.

### Variation region V1 of RHDV VP60

Binding assay of the rabbit tissue cells by the peptides derived from the loop L1 suggests the hepatocyte and splenocyte cells express receptors capable of binding both peptides, but RK13 cells do not (Figure 5B). Western blotting assay of the sera containing anti-NJ85-KLH and anti-NJ85Δ-KLH antibodies against RHDV viruses showed antibody titer induced by KLH-NJ85 higher than that induced by KLH-NJ85Δ (Figure 5C). The virus challenge experiments of HYD strain displayed 100% immune protection in two groups of rabbits vaccinated separately with KLH-NJ85 and KLH-NJ85Δ demonstrates loop L1 (Figure 5A) in P2 sub-domain of VP60 forms an epitope in RHDV (Figure 5D).

### ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants to F.S. from Chinese Ministry of Science and Technology (2011CB910303), Chinese Academy of Sciences (KGCX1-YW-13) and National Natural Science Foundation of China (31021062), grants to H.P. from National Natural Science Foundation of China (30770439) and from State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology (SKLVB2011), Harbin Veterinary Research Institute, a grant to J.L. from National Natural Science Foundation of China (30800830) and a grant to K.S. from the National Institutes of Health (P41-RR005969). K.Z. (F.S. group) was supported by a Gatan China Scholarship (2011-2012).

蛋白质研究平台生物成像中心  
Center for Biological Imaging, core facilities for Protein Sciences

北京市朝阳地区五环路15号, 100101, Tel.&Fax: +86-10-64888419, http://cbl.ibp.ac.cn  
Datun Road 15, Cheoyang District, Beijing, China, 100101, Tel.&Fax: +86-10-64888419, http://cbl.ibp.ac.cn

生物成像中心成果展示海报汇编

中国科学院蛋白质科学研究平台  
Core Facilities for Protein Sciences, CAS

**Ultra-structural study of insulin granules in pancreatic  $\beta$ -cells of db/db mouse by scanning transmission electron microscopy tomography**

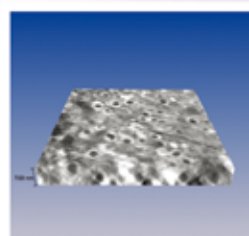
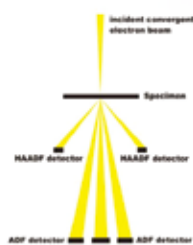
Yanhong Xue, Wei Zhao, Wen Du, Xiang Zhang, Gang Ji, Wang Ying, Tao Xu\* □□

National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

Insulin granule trafficking is a key step in the secretion of glucose-stimulated insulin from pancreatic  $\beta$ -cells. The main feature of type 2 diabetes (T2D) is the failure of pancreatic  $\beta$ -cells to secrete sufficient amounts of insulin to maintain normal blood glucose levels.

In this work, we developed and applied tomography based on scanning transmission electron microscopy (STEM) to image intact insulin granules in the  $\beta$ -cells of mouse pancreatic islets.

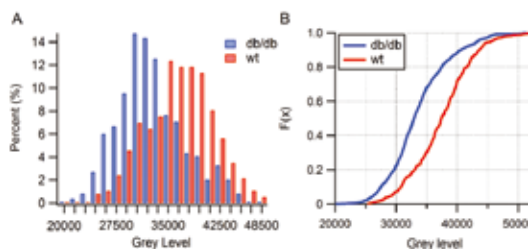
Using three-dimensional reconstruction, we found decreases in both the number and the grey level of insulin granules in db/db mouse pancreatic  $\beta$ -cells. Moreover, insulin granules were closer to the plasma membrane in diabetic  $\beta$ -cells than in control cells. Thus, 3D ultra-structural tomography may provide new insights into the pathology of insulin secretion in T2D.



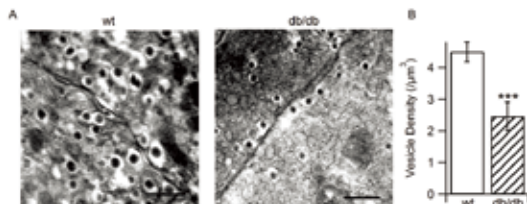
**Figure 1.** Ortho-slice of reconstructed volume ( $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m} \times 700\text{nm}$ ) of  $\beta$  cells from a 16-week-old male wt mouse contains many intact secretory granules (SGs). Pixel size = 2.5 nm.

**STEM Advantages**

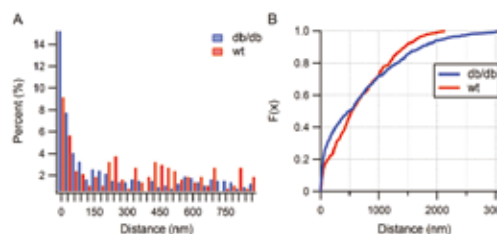
- ◆ Thick sections
- ◆ Dynamic focus
- ◆ BF, ADF and HAADF
- ◆ linear contrast



**Figure 3.** (A) Histogram of the dense core grey level. The dense core grey levels from db/db mouse  $\beta$  cells displays a distinguished left shift ( $p < 0.001$  by Student's *t*-test) towards light grey direction, suggesting defective packaging. (B) The Kolmogorov-Smirnov test of the dense core grey level ( $p < 0.001$ )



**Figure 2.** (A) Slices from each reconstruction (supplementary movie 1,2) show morphological difference of SGs between 16-week-old male wt and db/db mouse  $\beta$  cells. Bar =  $1\mu\text{m}$ . (B) Density of SGs ( $n=372$ ) in db/db mouse  $\beta$  cells ( $n=10$ ) is remarkably lower than that ( $n=731$ ) of wt cells ( $n=10$ ) ( $p < 0.001$  by Student's *t*-test). 10  $\beta$  cells were analyzed in both db/db and wt mouse islets.



**Figure 4.** (A) Histogram of the nearest distance from granules to plasma membrane. More insulin granules in  $\beta$ -cell of db/db mice are in the proximity of the plasma membrane (0-100nm) as compared with those in normal  $\beta$ -cells, which is confirmed by the Kolmogorov-Smirnov test ( $p < 0.001$ ) (B).

*Protein & Cell*. 2012.3(7): 481-559



蛋白质研究平台生物成像中心  
Center for Biological Imaging, core facilities for Protein Science

北京市朝阳门内大街15号, 100101, Tel.&Fax: +86-10-64888419, http://cbl.ibp.ac.cn  
Datun Road 15, Chaoyang District, Beijing, China, 100101, Tel.&Fax: +86-10-64888419, http://cbl.ibp.ac.cn



## 生物成像中心成果展示海报汇编

中国科学院蛋白质科学研究平台  
Core Facilities for Protein Sciences, CAS

结构照明超分辨率荧光显微镜  
Delta Vision | OMX

Shaoguo Li, Wei Ji  
Center for Biological Imaging, core facilities for protein science, National Laboratory of Biomacromolecules, Institute of Biophysics, CAS, Beijing 100101, China.

Delta Vision OMX是基于3D-SIM ( Three-Dimensional Structured Illumination Microscopy )的超分辨率荧光显微镜, 突破了传统光学显微镜已无法逾越的空间和时间上的技术极限, 大大提高空间的分辨率, 保持高分辨率的同时还能实现极快速的图像更新, 进行实时动态观察。

## ◆ 3D-SIM(结构照明)技术优势

荧光样品通过不同方向和相位的光源照射, 并且在成像后利用特定的运算方法重构, 产生突破布儒斯特角衍射极限的超高分辨率图像。

3D-SIM具备以下技术优势:

- 1) 完全兼容现有荧光分子和荧光染料;
- 2) 侧向分辨率提高到80-120nm, 空间分辨率提高到激光共聚焦显微镜观察极限的8倍。



Fig-1. Delta Vision | OMX

## ◆ 超高速成像

Delta Vision OMX利用超亮度光源以及改进的新型照相机, 大大提高了成像速度:

- 1) 可同时观察四个荧光通道: 488nm, 405nm, 561nm, 642nm;
- 2) 快速多通道成像 (33fps, 512×512像素)。
- 3) 可用紫外、绿色、红色三个通道成超高分辨图像, 远红外通道成普通分辨率成像。

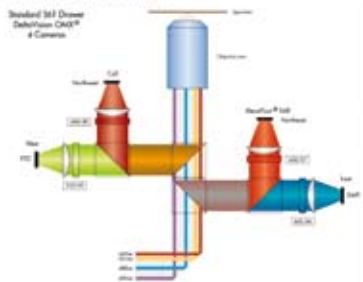


Fig-4. Delta Vision OMX 4 Cameras



蛋白质研究平台生物成像中心  
Center for Biological Imaging, core facilities for Protein Sciences

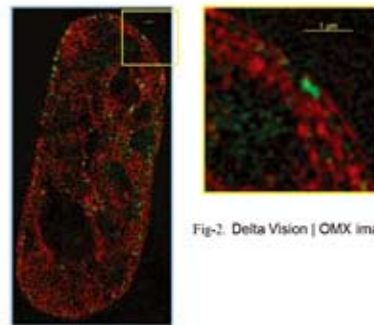


Fig-2. Delta Vision | OMX image

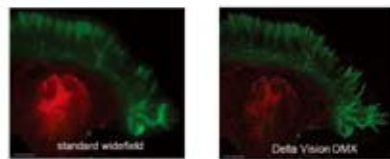


Fig-3. Hippocampal neurons - Image courtesy of Eric Dent, University of Wisconsin Madison

## ◆ 应用实例

搭载3D-SIM技术的Delta Vision OMX超分辨率显微镜已经成功运用到了很多样品, 比如微生物、脊椎动物细胞、组织切片甚至整个胚胎等, 该技术可用于观察细胞内器官等细微结构的精确定位和分布, 阐明蛋白等生物大分子如何组成细胞的基本结构, 重要的活性因子如何调节细胞的主要生命活动等。大大提高的分辨率在鉴定和研究亚细胞结构中成效显著, 比如对微管和肌动蛋白的观察中可以解析到单根微管纤维。

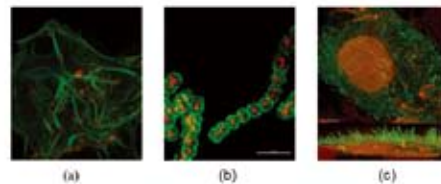




Fig-5. (a) *R. parkeri* infected Cos7 cells - Image courtesy of Matt Welch, University of California at Berkeley  
(b) *Streptococcus* cells - Image courtesy of Cynthia Whitchurch, University of Technology  
(c) Image courtesy of Renato Mortara, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), Sao Paulo, Brazil

生物成像中心成果展示海报汇编

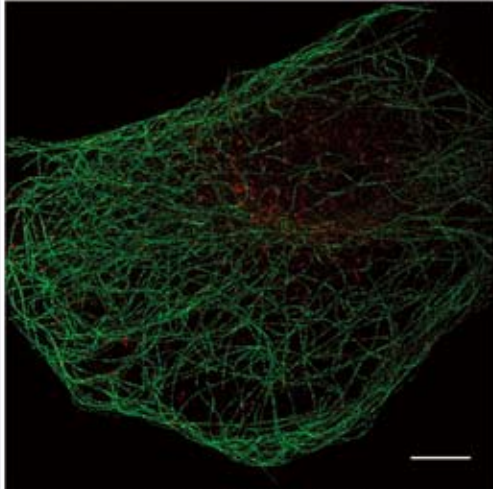


中国科学院蛋白质科学研究平台  
Core Facilities for Protein Sciences, CAS

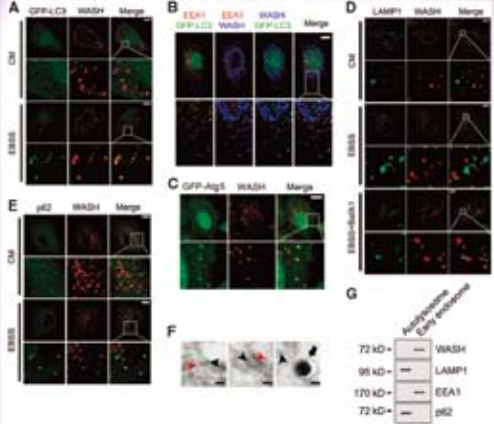


### SIM & LSCM images of cells

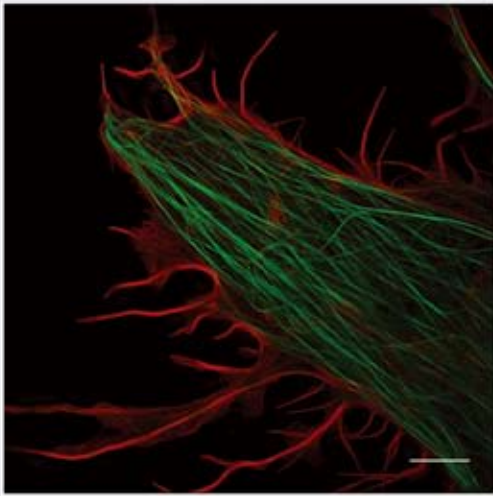
Center for Biological Imaging, Core Facilities for Protein Science, Institute of Biophysics, CAS, Beijing 100101, China.



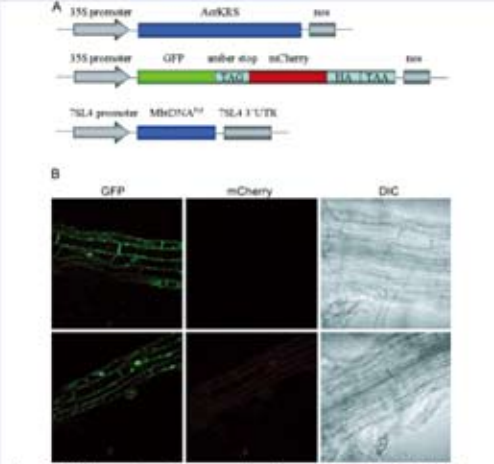
**Fig-1.** NRK cells immunostained with antibodies against microtubule and MIP were analysed by 3D-SIM. Courtesy of Yang Niu, Jiajia Liu's Group, State Key Laboratory of Molecular Developmental Biology, Institute of Genetics and Developmental Biology, CAS, China  
**Image Details:** Imaged by Delta Vision OMX Super-resolution Microscope  
Scale bar: 5  $\mu$ m.



**Fig-2.** WASH is localized in autophagosomes. (A) WASH colocalizes with GFP-LC3 upon starvation. (B) Autophagy-related WASH does not colocalize with EEA1. (C) WASH localizes to unclosed autophagosomes. (D) WASH does not localize in autolysosomes. (E) Colocalization of WASH and autophagy substrate p62 during autophagy. For (A–E), scale bar, 10  $\mu$ m. (F) Immuno-electron microscopy analysis of HeLa cells treated with EBSS for 1 h. Scale bar, 100 nm. Courtesy of Zusen Fan's Group, IBP, CAS. Publication in *EMBO J.* 2013 Aug 23.  
**Image Details:** Imaged by Laser Scanning Confocal Microscopy (Olympus FV500).



**Fig-3.** Live COS-7 cells co-transfected with LifeAct-mCherry and MAP4-EmGFP were analysed by 3D-SIM. Courtesy of Hao Chang, Tao Xu's group, Institute of Biophysics Chinese Academy of Sciences, China.  
**Image Details:** Imaged by Delta Vision OMX Super-resolution Microscope  
Scale bar: 5  $\mu$ m.



**Fig-4.** A) DNA constructs for expanding the genetic code of *A. thaliana*. B) Fluorescence images of *A. thaliana* expressing MbtRNA<sup>CUA</sup><sup>Trp</sup>, AcrKR3, and GFP-TAG-mCherry-HA in the absence (top) or presence (bottom) of 5 mM AcrK. DIC=differential interference contrast microscopy. Courtesy of Jiangyun Wang Group, IBP, CAS. Publication in *Angew Chem Int Ed Engl.* 2013 Sep 9;52(37):9700-4  
**Image Details:** Imaged by Laser Scanning Confocal Microscopy (Olympus FV500).



## 生物成像中心成果展示海报汇编

中国科学院蛋白质科学研究平台  
Core Facilities for Protein Sciences, CAS

**EM & AFM images of macromolecules**

Center for Biological Imaging, Core Facilities for Protein Science, Institute of Biophysics, CAS, Beijing 100101, China.

**Fig-1. The reversal of replication forks in fission yeast genomic DNA**  
Courtesy of Jiazhi Hu, Daochun Kong's Group, Peking Univ. Publication in *Cell*, 2012, 149(6): 1221-32  
**Image Details:**  
Imaged by FEI Tecnai20 TEM with accelerating voltage of 120kV, after platinum shadowing. Bar 200nm.


**Fig-2. AFM image of MutS protein and DNA complex**  
Courtesy of Yanxia Jia, CBI, IBP, CAS.  
**Image Details:**  
Imaged by Picoforce Multimode Scanning Probe Microscopy. Bar: 250 nm; Color bar (height): 0-3 nm.

**Fig-3. RHDV particles**  
Courtesy of Bingquan Gao, Fei Sun's Group, IBP, CAS.  
**Image Details:**  
Imaged by FEI Tecnai Spirit TEM with accelerating voltage of 120kV, after negative staining. Bar 100nm.


**Fig-4. Pluronic L64 in bmimBF4 solution**  
Courtesy of Shaohua Zhang, Liqiang Zheng's Group, Shandong Univ. Publication in *J. Phys. Chem. B*, 2008, 112: 10228-33  
**Image Details:**  
Imaged by FEI Tecnai20 TEM with accelerating voltage of 120kV, after freeze fracture replication. Bar 200nm.



生物成像中心成果展示海报汇编

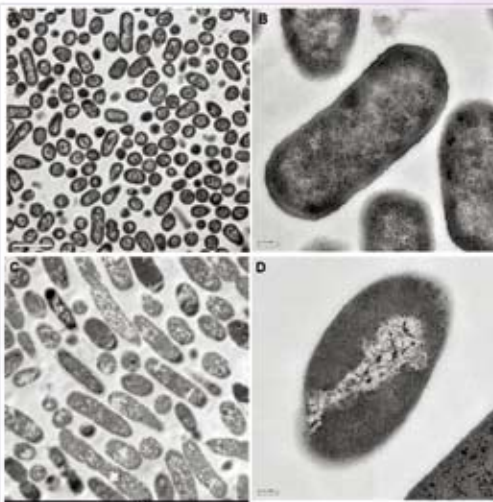


中国科学院蛋白质科学研究平台  
Core Facilities for Protein Sciences, CAS

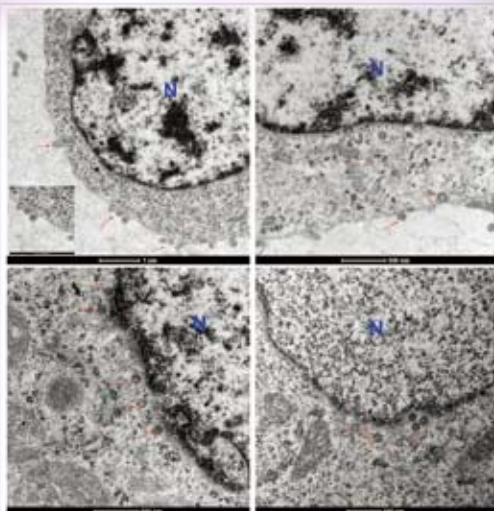


### EM images of ultrastructure of cells

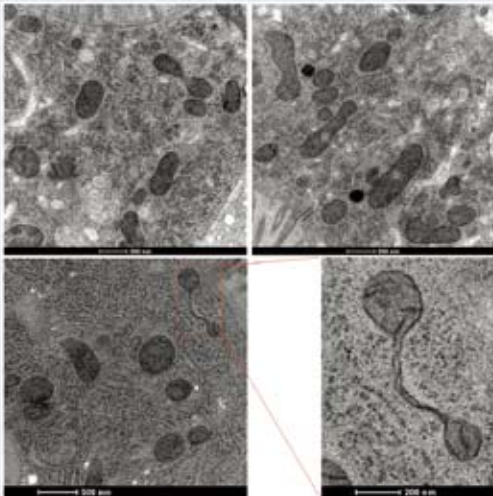
Center for Biological Imaging, Core Facilities for Protein Science, Institute of Biophysics, CAS, Beijing 100101, China.



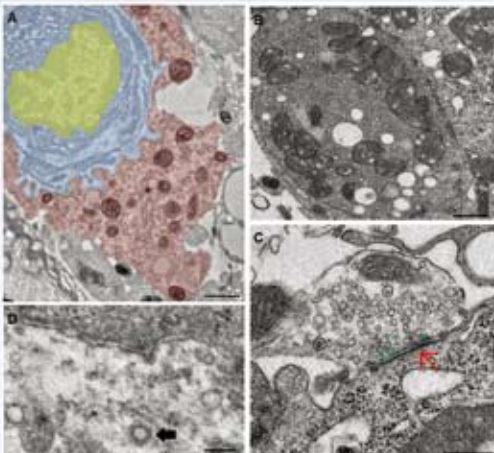
**Fig-1. non-inclusion-body & inclusion-body of *E. coli***  
Courtesy of Yun Zhao, Haiying Heng's Group, IBP, CAS.  
**Image Details:**  
Imaged by FEI Tecnai20 TEM and FEI Tecnai Spirit TEM. Sample prepared by chemical fixation, embedded in epon812. Ultrathin sections about 60nm. Images showed the effects of IPTG on recombinant protein production of *E. coli*. A&B are before induced. C&D are after induced. Cell size was larger obviously and inclusion-body was formed after induced. Bars 2  $\mu\text{m}$  (A&C); 200nm (B&D).




**Fig-2. 293T cells infected by HIV-1**  
Courtesy of Ru Bai, Limin Liu's Group, UCAS.  
**Image Details:**  
Imaged by FEI Tecnai Spirit TEM with accelerating voltage of 100kV. Sample prepared by chemical fixation, embedded in epon812. Ultrathin sections about 60nm. Images showed the HIV-1 particles (arrows) attach to the cell membrane or infect cell inside at different experiment conditions. Bars 1  $\mu\text{m}$ , 500nm, 200nm.



**Fig-3. Intestinal mitochondria in worms**  
Courtesy of Fang Yang, Yan Qin's Group, IBP, CAS.  
**Image Details:**  
Imaged by FEI Tecnai Spirit TEM with accelerating voltage of 100kV. Sample prepared by high pressure freezing and freeze substitution, embedded in epon812. Ultrathin sections about 60nm. Images showed most mitochondria of a mutant worm are normal, while some mitochondria don't fission correctly (red frames). Bars 500nm. The two small mitochondria were connected with a thin membrane linker (the enlarged image, Bar 200nm).



**Fig4. the Calyx of Held synapses of P13 mice**  
Courtesy of Qianwen Zhu, Jianyuan Sun's Group, IBPCAS  
**Image Details:**  
Imaged by FEI Tecnai Spirit TEM with accelerating voltage of 100kV. Sample prepared by chemical fixation, embedded in epon812. Ultrathin sections about 60nm.  
A. Single calyx of Held synapse [red as presynaptic Calyx terminal; blue as MNTB principal neuron soma; yellow as its nucleus]. Bar 1  $\mu\text{m}$ . B. The Calyx terminal contained several active zones and a large number of synaptic vesicles. Bar 500 nm. C. Single active zone (arrows) with docked (green) and undocked vesicles. Bar 250 nm. D. Clathrin-dependent endocytosis. Clathrin assembly triggered coated pit invagination of presynaptic membrane with  $\square$  shape (red dash line) and then coated vesicle budding (arrows). Bar 100nm.



蛋白质研究平台生物成像中心  
Center for Biological Imaging, core facilities for Protein Science

北京市朝阳区长安路15号, 100101, Tel.&Fax: +86-10-64888419, <http://cbl.ibp.ac.cn>  
Datun Road 15, Chaoyang District, Beijing, China, 100101, Tel.&Fax: +86-10-64888419, <http://cbl.ibp.ac.cn>

## 生物成像中心成果展示海报汇

中国科学院蛋白质科学研究平台  
Core Facilities for Protein Sciences, CAS

**CryoEM images and 3D reconstructions**

Center for Biological Imaging, Core Facilities for Protein Science, Institute of Biophysics, CAS, Beijing 100101, China.

Fig-1. Cytoplasmic Polyhedrosis Virus (CPV) Courtesy of Lingpeng Cheng, Ping Zhu's Group, IBP, CAS, China  
Image Details:  
Instrument used: FEI Titan Krios FEG TEM  
Accelerating voltage: 300kV; Magnification: 75000x; Dose: 20e<sup>-4</sup>Å

Fig-2. hetero-oligomer ATcpnAB at 10 Å resolution Courtesy of Kai Zhang, Fei Sun's Group, IBP, CAS, China  
Image Details:  
Instrument used: FEI Titan Krios FEG TEM  
Accelerating voltage: 300kV; Magnification: 96000x; Dose: 20e<sup>-4</sup>Å

Fig-3. Par3 N-terminal domain (Par3NTD) Courtesy of Yan Zhang, Fei Sun's Group, IBP, CAS, China  
Image Details:  
Instrument used: FEI Titan Krios FEG TEM  
Accelerating voltage: 300kV; Magnification: 96000x; Dose: 20e<sup>-4</sup>Å

Fig-4. Tip49a/Tip49b Courtesy of Feng Song, Ping Zhu's Group, IBP, CAS, China  
Image Details:  
Instrument used: FEI Titan Krios FEG TEM  
Accelerating voltage: 300kV; Magnification: 96000x; Dose: 20e<sup>-4</sup>Å

蛋白质研究平台生物成像中心  
Center for Biological Imaging, core facilities for Protein Science

北京市朝阳区天竺路15号, 100101, Tel.&Fax: +86-10-64888419, http://cbi.ibp.ac.cn  
Datun Road 15, Chaoyang District, Beijing, China, 100101, Tel.&Fax: +86-10-64888419, http://cbi.ibp.ac.cn

## 生物成像中心各项规章和申请表

### 实验室管理规章

#### 切片工作室管理制度

1. 来本工作室工作的人员需经过培训，通过考核，取得由生物电镜中心颁发的使用资格后，方可使用仪器。未取得资格的人员请不要自行使用仪器。
2. 使用超薄切片机必须先进行网上预约，经审核批准后按时使用，请不要在预约外时间擅自使用。
3. 使用后必须进行工作登记，登记要清晰详细，请不要不登记或少登记乱登记。
4. 工作过程中必须保持安静，请不要聊天和随意走动。
5. 工作室各仪器、小工具以及耗材，请不要随意变动摆放位置，更不要将其拿出工作室。
6. 工作后要及时清理机器和台面，保证室内清洁。尤其注意打扫修块碎屑。玻璃刀和刀片等危险废品要放入指定垃圾盒，请不要乱扔乱放。水槽等重复使用物品请放入指定回收盒，请不要随意丢弃。
7. 工作后请带走所有个人物品，包括样品。本室不负责保管。
8. 有问题要及时咨询相关工作人员，请不要自行尝试解决，以免损坏仪器或样品。
9. 本工作室属于洁净区，请不要带入有毒试剂，不要戴实验手套操作，不要带入任何污染物。
10. 请不要在工作室内吃喝，喝水吃东西请去接待室。
11. 如有违反上列情况的现象发生，本中心有权停止该人员使用资格，并追究相关责任。

蛋白质科学研究平台生物成像中心

监督负责人：孙磊

### 实验室管理规章

#### 实验室常用仪器使用注意事项

1. 爱护实验室公用仪器，实验完毕后及时关闭仪器电源，并将自己的实验物品带走，保持台面整洁。
2. 使用仪器时将个人物品做好标记，包括使用人、使用时间等信息。  
离心机使用前需配平。
3. 漩转混合仪、盘旋混合仪、脱色摇床使用时需将离心管口用封口膜封好，避免液体流出污染仪器；如有漏液需及时将仪器清洗干净。
4. 废液需按类别放入相关废液瓶，不可直接倾入下水道。  
请大家自觉遵守实验室规定，如有违反将视情节轻重予以警告、禁用惩罚。

#### 实验室台面整理注意事项

1. 请保持台面整洁，实验完毕后及时带走个人物品，并清理台面。
2. 取用试剂物品请及时放回原处，不可乱放。
3. 请及时撤换实验污染的报纸，避免溅湿台面，尤其避免放射性液体溅出。
4. 各类废品应严格按分类放入相应废液瓶或垃圾箱，不可乱丢乱掷。

#### 通风橱使用注意事项

1. 离心管架/盒仅于实验过程中放置通风橱内，实验完毕后请及时收好，不要堆放。
2. 实验完成后请及时清理剩余样品及试剂，不要堆放。
3. 请保持通风橱内清洁，及时撤换实验污染的报纸，避免溅湿台面或玻璃，尤其避免放射性液体溅出。
4. 各类废液应严格按标签放入废液瓶，不要乱丢乱掷；树脂类废品请包好后放入烘箱下层，聚合后方可丢弃。

#### 实验室管理规章

#### 烘箱使用注意事项

1. 本烘箱用于样品包埋聚合，请尽量不放无关物品。
2. 包埋板/架务必标注实验人姓名，聚合完成后请及时取走。
3. 下层的废品务必严密包扎，避免外流，聚合后请一并取走。
4. 烘箱定期清理，无标注者、完成不取者丢失概不负责。

#### 实验室废液废品处理

一、实验过程中产生的废液，一律不得直接倾入下水道，必须专门回收，或处理后方可丢弃。

1. 钷酸废液以及含有钷酸的各类缓冲液废液，请投入通风橱中标有“钷”的废液瓶中，并拧紧瓶塞；
2. 醋酸双氧铀染液以及冲洗过染液的含铀废液，请用滤纸吸收或容器装好后投入样品制备室的铅皮垃圾桶中，由实验室专门人员负责处理；

铅染液以及冲洗过染液的含铅废液，请投入通风橱中标有“铅”的废液瓶中，由实验室专门人员负责处理；

3. 环氧树脂类废液，请用离心管等容器收集，加入聚合催化剂后，旋紧管口，放入塑料袋中并扎紧，与包埋块一放入烘箱（下层）聚合，固化后方可丢入实验室垃圾箱；

4. 其他废液，包括醛类、丙酮、甲醇、弱酸/碱、氯仿，以及实验中用过的废乙醇、废缓冲液等各类有机/无机试剂，请投入通风橱内普通废液缸，并盖好缸盖；

强酸强碱类物质，请先将废酸/废碱加碱/酸中和，调PH至中性后方可投入通风橱内普通废液缸。

二、实验中产生的固体废物，请丢入实验室专用垃圾箱，不可丢入生活区垃圾箱。注射器针头必须套好硬塑料外套后方可丢入，以免扎伤人。

三、请勿将未灭活动物病毒、实验动物活体等带入实验室，相关前处理步骤请在具有相关资质的实验室进行。实验后的多余样品请带走，或进行专门处理后方可丢入实验专用垃圾箱。

## 实验登记表

### 样品制备登记表

接样时间： 年 月 日

一. 送样人信息							
用户姓名		联系电话		课题组		课题组电话	
单位				Email			
二. 样品信息							
样品名称				经费来源			
样品数量(对照组加实验组)/样品状态(是否经过前固定及其它处理)							
三. 实验信息							
实验目的/ 课题名称					参考文献	有 <input type="checkbox"/> 无 <input type="checkbox"/>	
实验说明(研究背景/实验组预期变化/已有的参考数据比如光镜水平生化指标等等/及其它需要说明的)							
用户独立 操作步骤		用户在指导 下操作步骤		工作人员独 立操作步骤		工作 人员	

### 用户意见反馈表

课题名称							
姓名及导师		单位		电话			
评价							
服务态度	○ 非常好		○ 良好 ○ 很差		○ 还可以		
实验结果	○ 非常好		○ 达到预期 ○ 未达到预期		○ 基本达到预期		
问题原因	○ 样品本身问题 ○ 非常规实验性方案难免		○ 用户操作问题		○ 平台人员操作问题 ○ 说不清问题		
其它意见	用户签字:						



实验登记表

## Helios Nanolab 600i场发射双束扫描电镜用户使用申请书

填写说明

一、各项内容均请认真填写，表达要明确、严谨，字迹要清晰易辨。各栏中空间不够时，请自行加页。

二、机时预约

1. 每个用户使用Helios电镜前，必须填写本申请书。每年以每个季度初为时间节点开始预约（即每次开放预约可以同时约本季度3个月的机时），每个组网上完成预约并填好申请表发给管理人员，由专家委员会评审后批准机时。

2. Helios 的固定用户（固定用户名单另行发布），可以提前一周预约机时，每组最多预约5个工作日/月（如可以独立操作机器的用户可以增加相邻的周末的时间），其他时间为其他用户预约，每组最多预约4个工作日/月。管理员每月保留4-5天作为机器调试和维修时间。

3. 其他用户每半年根据样品的制备情况、预约时间和工作质量等可以申请成为固定用户，最终由专家委员会评审。

4. 正式上机前用户应按照需求完成前期修块（粗修和精修）和TEM检查，然后提前1-3天对样品喷碳，以便节省正式使用的时间。

5. 初次实验者，实验前应与管理人研究制定实验方案。

三、本申请书一式二份

四、申请书请寄：张建国 Email: [jianguozhang@moon.ibp.ac.cn](mailto:jianguozhang@moon.ibp.ac.cn)

五、更多的信息，Helios操作方法和样品制备信息等，请登录生物成像中心网站：<http://cbi.ibp.ac.cn/cbiweb/>

蛋白质科学研究平台生物成像中心

二〇一三年制

## 实验登记表

### 一、实验信息：

研究领域					
申请人姓名			单位/实验室		
联系电话			Email		
样品个数			实验内容	<input type="checkbox"/> 常温连续切片三维重构 <input type="checkbox"/> 冷冻样品制备/成像 <input type="checkbox"/> 常温高分辨率成像	
实验参数	扫描电镜 (SEM)		聚焦离子束 (FIB)		
	成像区域 (HFW) ( $\mu\text{m}$ )	成像分辨率 ( $\text{nk} \times \text{nk}$ )	电流 (nA)	切片厚度 (nm)	切割区域 ( $\mu\text{m}$ )
机时需求	起始时间 (年/月/日)		结束时间 (年/月/日)		
是否具有使用 Helios Nanolab 600i 经验			使用何种样品制备设备或辅助设备		
本次实验的实验目的和研究计划：					

### 二、审查意见：

运行管理小组评审意见：
管理小组组长 (签章) <span style="float: right;">年 月 日</span>

## 实验登记表

### Titan Krios 300kV FEG TEM用户使用申请书

#### 填写说明

一、各项内容均请认真填写，表达要明确、严谨，字迹要清晰易辨。各栏中空格不够时，请自行加页。

二、“机时需求”一栏填写要以“时间段”为单位，即将一天二十四小时分为两个时间段，各十一个小时。早九时至晚八时为一个时间段，晚九时至次日早八时为另一个时间段。

三、申请书请一式二份寄回，复印时一律用A4复印纸。

四、申请书请寄：

北京市朝阳区大屯路15号，99信箱

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技术实验室

邮政编码：100101

黄小俊 收

同时可通过网上传送，Email: xiaojunhuang@moon.ibp.ac.cn。

#### 用户申请须知

每份用户实验申请提交后将在一星期内转发给两位专家进行评审，评审时间约为一个月。此后将评审意见及机时安排的起始及终止日期通知用户。

符合以下情况的用户实验申请将为所申请的实验在一年中分批安排所申请的机时：

1. 两位评审专家均同意该实验申请

2. 一位专家同意实验申请，另一位不同意实验申请，而用户提交申请的同时附上曾依托本所实验平台的Titan Krios发表的论文（论文中清楚地注明依托本所实验平台的设备）

符合以下情况的用户实验申请将根据机时需求的紧张程度，在一年中为所申请的实验安排部分申请机时：

1. 一位专家同意实验申请，另一位不同意实验申请

2. 两位专家均不同意实验申请，但用户提交申请的同时附上曾依托本所实验平台的Titan Krios发表的论文（论文中清楚地注明依托本所实验平台的设备）

#### 实验登记表

以下情况的用户实验申请将不安排机时：

1. 两位专家均不同意实验申请

专家评审要点有以下四点：

第一，对用户实验的生物学或医学或方法学上的重要性做出评定。

第二，用户使用Titan Krios 的必要性。使用其它电镜或实验方法能否达到实验目的，使用本中心其他设备能否同样达到实验目的。

本中心尚有：透射电镜Tecnai Spirit（120kV，钨灯丝，2K×2K 底插式eagle CCD，1K\*1K 侧插式

OSIS冷CCD，电子断层扫描自动化数据收集软件，配有室温单倾样品杆、Gatan 927 室温双轴高倾样品杆、Gatan 626 低温样品杆，Gatan CT3500低温样品杆，样品台最大倾转角70度，物镜球差系数3.7mm,色差系数3.7mm，点分辨率0.34nm）；透射电镜FEI Tecnai 20（200kV，LaB6灯丝，2K×2K Gatan Ultrascan 894 CCD，电子断层扫描自动化数据收集软件，配有室温单倾样品杆、Gatan 927 室温双轴高倾样品杆、Gatan 626 低温样品杆，Gatan CT3500低温样品杆，样品台最大倾转角70度，物镜球差系数2.5mm,色差系数2.5mm，点分辨率0.25nm）。

第三，使用Titan Krios能否达到用户的实验目的。

本中心的Titan Krios配置为1. 配有场发射电子枪，最高加速电压300kV，三级聚光镜系统，实现一定范围内的平行光照明； 2. 自动进样系统可同时存储12个冷冻样品，样品台可倾转最大角度70度，水平旋转90度； 3. 恒功率模式的电磁透镜系统保证成像的高稳定性； 4. 物镜球差系数2.7mm,色差系数2.7mm； 5. 点分辨率0.25nm,信息分辨极限0.14nm； 6. 底插式Gatan Ultrascan 985 4K×4K CCD相机； 7. Gatan GIF Tridium 能量过滤器； 8. STEM 暗场模式成像； 9. 用户界面友好，远程操作； 10. 配有DM和TIA图像采集和分析软件； 11. 配有Xplore3D电子断层扫描自动化数据收集软件。

第四，用户的实验设计是否合理，前期实验工作是否充分，所申请的机时是否合理。

本中心的机时以11小时为单位，每天分为两个时间段，中间间隔1小时。早九点至晚八点为一个时间段，晚九点到次日早八点为另一个时间段。

## 实验登记表

## 1 申请者信息:

姓名		专业技术职务				
单位	名称					
	地址					
通讯地址						
邮政编码		电话		传真		
Email						
项目 组	姓名	专业技术职务	所在单位	分工		
课题来源	国家自然科学基金 (面上、重点、重大)		973	863	创新	A. 基础研究
	部门重大课题	军工	百人计划	其它		B. 应用研究
经费保障						
研究领域						
是否具有使用 Titan Krios TEM经验						

## 2 申请材料:

课题的研究内容、研究目标、研究意义、研究意义, 使用Titan Krios TEM的必要性, 实验内容及预期成果。(可自行加页)
--

管理说明文件

## 关于用户在发表研究成果时进行致谢的说明

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（以下简称生物成像中心）定位于生命科学研究前沿，致力于实现生物学对象从纳观尺度到介观尺度的高分辨率三维成像技术（包括超分辨率光学显微技术、低温电子显微技术、三维重构技术、低温扫描微加工技术、单分子荧光成像技术、原子力显微技术、光电关联显微成像技术以及一系列生物显微成像样品技术），并承担着北京及周边地区生物显微成像技术服务工作，我们追求高质量的技术服务，我们坚持技术服务仅仅收取仪器设备运行成本费用。

用户在生物成像中心完成科研工作、获取研究数据并据此发表相关成果（论文、著作等），应在发表的文章对生物成像中心予以致谢，建议这部分文字格式规范如下：

一、用户使用生物成像中心仪器设备，在中心相关技术人员协助下完成相应研究工作，在生物成像中心获取了研究数据、图片或是技术方法等，并据此发表成果（如论文，著作等）时，致谢格式为：

致谢：……（冷冻电镜成像、超分辨率荧光成像等）相关工作在生物物理研究所蛋白质科学研究平台生物成像中心完成，感谢XX在（样品制备、数据采集与分析等）工作中的帮助……

Acknowledgement: ...we would like to thank the Center for Biological Imaging (CBI), Institute of Biophysics, Chinese Academy of Science for our XXX (Electron Microscopy/ Cryo-EM/ Atomic Force Microscopy/ Structured Illumination Microscopy work) and we would be grateful to XX for his /her help of [making EM sample, taking/analyzing EM images]...

二、用户使用生物成像中心仪器设备，在生物成像中心自行从事相关科研工作，在生物成像中心获取的研究数据、图片或是技术方法等，并据此发表相应成果，致谢格式为：

致谢：……（冷冻电镜成像、超分辨率荧光成像等）相关工作在生物物理研究所蛋白质科学研究平台生物成像中心完成……

Acknowledgement: ...Our XXX (Electron Microscopy/ Cryo-EM/ Atomic Force Microscopy/ Structured Illumination Microscopy work was performed at the Center for Biological Imaging (CBI), Institute of Biophysics, Chinese Academy of Science.

三、生物成像中心浪潮集群于2013年12月起正式更名为中国科学院生物物理研究所生物成像中心高性能计算服务站（HPC-Service Station in Center for Biological Imaging, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences），致谢格式请一并参照上文格式说明。

为鼓励和支持科研创新与发展，利用生物成像中心相关仪器设备或技术手段获取高质量研究成果的用户，将在以后的仪器预约使用中获得一定的优先权。

最后，感谢用户对生物成像中心的信任，您的认可与支持是生物成像中心前进的动力！

蛋白质科学院研究平台生物成像中心  
2013年12月



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  
<http://cbi.ibp.ac.cn>  
地址：北京市朝阳区大屯路 15 号  
邮编：100101  
电话：8610-64888419  
传真：8610-64888419