

CONTENTS

目录 | 2015 报告

01	一、生物成像中心2015年度工作概述
01	1.概述
02	2.生物成像中心仪器设备介绍
11	3.2015年度新增设备介绍
14	4.人员队伍
14	学术带头人
15	生物成像中心专家委员
15	专业工程师
16	博士后及其他岗位
16	5.2015年度新增人员介绍
17	二、生物成像中心2015年度重要工作成果
17	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）
17	新方法解析病毒内部核酸和RNA聚合酶的结构
18	Calyx of Held突触囊泡循环的定量研究
18	基于冷冻含水切片技术的光电关联成像观察线粒体内部结构
19	电子断层成像方法对Hela细胞内染色质纤维的分析
20	接合素43介导了由PFOS诱导的星形胶质细胞凋亡
20	PEG-PE胶束纳米笼介导胰岛素重新折叠
21	表观遗传因子CENP-A周期性招募CENP-N蛋白介导着丝粒功能的机制
22	CENP-A Ser68可逆磷酸化调控着丝粒装配的分子机制研究进展
22	Sox2做为DNA识别受体参与对外源DNA的固有免疫反应
23	C8orf4调控肝癌干细胞自我更新的分子机制研究进展
24	一种“智能”克服肿瘤多药耐药的新方法
25	人类干细胞衰老机理
26	2.技术研究（2015年度生物成像中心所开展的技术和方法学研究）
26	聚焦离子束法制备冷冻含水切片
26	连续超薄切片扫描电镜成像方法研究
27	低温透射电镜高分辨率成像用支持膜的研发
28	基于高真空光学冷台的光电关联成像方法研究
29	三、装备运行和技术服务情况
29	1.电镜样品制备技术服务
30	2.透射电镜运行服务（FEI Titan Krios）
31	3.透射电镜运行服务（FEI Talos）
32	4.透射电镜运行服务（FEI Tecnai 20和FEI Tecnai Spirit）
33	5.扫描电镜运行服务（FEI Helios NanoLab 600i）
33	6.扫描探针显微镜运行服务（Nanoscope IIIa Multimode）
34	7.激光共聚焦显微镜运行服务
37	8.结构光照明超高分辨率荧光显微镜运行服务（Delta Vision OMX）

38	9.数据处理相关服务（高性能计算服务站）
39	四、学术交流活动
39	1.生物成像中心主办（承办）活动
39	1) 中国结构生物学冷冻电镜培训班
40	2) 国际冷冻电子显微镜高级图像处理研讨会
41	3) 2015年细胞电镜冷冻制样及成像高级研讨班
43	4) 2015年度生物成像中心常规技术培训
44	2.学术讲座
44	1) 西班牙国家生物技术中心终身教授Jose Maria Salvador Carazo Garcia博士学术报告
45	2) 徕卡STED超高分辨成像多重荧光标记方法技术讲座
46	五、项目申请情况
46	六、日常活动和管理
48	七、生物成像中心精彩图片展
53	八、利用生物成像中心设备技术所发表研究论文汇编
53	署名文章
53	致谢文章
55	九、附录
55	附录一 2015年度生物成像中心对外服务用户申请情况统计
60	附录二 如何收集Falcon3数据
64	附录三 利用SerialEM进行单颗粒数据收集的流程

生物成像中心2015年度工作概述

1. 概 述

中国科学院生物物理研究所科学研究平台生物成像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到介观尺度的高分辨率三维成像技术的研究，通过对生物超高分辨率三维结构的解析来回答生命科学的关键问题。中心由孙飞研究员担任主任，正高级工程师季刚博士担任副主任，负责生物成像中心的制度建设、学科发展和日常工作；生物超微显微成像研究领域学术带头人徐涛研究员、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担任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；张宏研究员、邓红雨研究员、李国红研究员、朱岩研究员与几位兼职首席科学家们共同组成专家委员会，中心实施以专家委员会为指导、以专业技术实验室为基本组织单元的运行管理机制。

生物成像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。2015年度生物成像中心对外技术服务对象涵盖了北京大学、北京化工大学、北京师范大学、首都师范大学、中医药大学、南京大学、厦门大学、华中农业大学、大连理工大学等高校，中国医学科学院、中国疾控中心环境所、昆明动物所、福州总医院、中日友好医院、北京国家技术转移中心、高能物理所、军事医学科学院、协和药物所、卫生环境研究所等数十所科研单位，以及宝洁公司、北京康乐卫士生物技术有限公司、中关村京蒙高科等几十家高新技术企业，对外服务总机时达32917.15小时。用户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Science、Nature Immunology、Nature Communications、Molecular Cell、Developmental Cell、Biomaterials、Macromolecular Bioscience、Fungal Genetics and Biology、Chemosphere、Proceedings of the National Academy of Sciences、PLOS Genetics、Journal of Virology、Journal of Structural Biology、Biophysics Reports、Autophagy、Genes & Development、eLife等一系列国际一流的期刊上。

依托先进的生物显微成像硬件设备，生物成像中心致力于探究解析生物超微结构多尺度高分辨率三维结构的电镜成像新技术、新方法。其中，样品制备技术、电子显微成像技术以及大尺度成像技术三个重要研究方向的发展与创新，是探究解析生物超微结构多尺度高分辨率三维结构的关键组成单元。生物成像中心目前开展的显微成像相关技术方法学研究主要包括：一，基于连续超薄切片自动化收集和扫描电镜数据自动收集的大尺度高分辨率三维重构技术；二，基于石墨烯技术的微阵列支持膜研发；三，光电关联显微成像技术；四，聚焦离子束法制备冷冻含水切片技术。截止2015年底，生物成像中心方法学研究已经获批国家重大科研设备研制专项子项目一项、国家自然科学基金青年基金三项、中国科学院仪器功能开发项目研发基金四项；相关技术成果已经申请国家发明专利五项，授权国家实用新型专利两项，完成技术成果转化一项。

此外，生物成像中心近年来积极开展与国内外专家的学术和技术交流活动，2015年度中心主办（承办）了“中国结构生物学冷冻电镜培训班”、“国际冷冻电子显微镜高级图像处理研讨会”和“2015年细胞电镜冷冻制样及成像高级研讨班”三次培训课程，并先后邀请班牙国家生物技术中心终身教授Jose Maria Salvador Carazo Garcia博士、徕卡公司超分辨荧光显微技术工程师来生物物理所做学术报告，有效促进了国内外生物显微成像

领域新技术新方法的交流与发展。

在生物物理研究所科学研究平台的支持下，生物成像中心2015年度新增样品制备设备六台，并实现了高端低温电镜Titan和Talos直接电子探测相机的升级与采购。同时，生物成像中心也顺利完成了十三五修购计划的论证，为2016年高端低温电镜Titan Krios等大型仪器设备的购置做足了准备。

2. 生物成像中心仪器设备介绍



型号：FEI Titan Krios

购入（安装）时间：
2009年12月

设备升级

2014年6月加装直接电子探测相机Falcon II，2015年7月升级为Falcon III



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0.25nm nm；信息分辨极限0.14 nm；球差系数2.7mm；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HAADF探测器；安装FEI Xplore3D和Serial EM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。

Falcon III主要性能和指标：

像素：4096×4096；像素实际尺寸：14μm；电子转换效率：79 counts/e；

主要功能和服务范围：

直接电子探测相机Falcon 3是Falcon 2升级版，芯片厚度更薄，低频反差更强，可实行Counting 模式拍摄，每秒输出帧数为32帧。至此，在Titan Krios上共安装三台相机，按从上至下的安装顺序，分别为4K×4K FEI Falcon 3直接电子探测相机，与Falcon 3同一高度（相对安装）的2K×2K Gatan Orius CCD相机，以及4K×4K Gatan Ultrascan 895 CCD 相机。



型号：FEI Talos F200C

购入（安装）时间：
2014年10月

200 kV场发射低温透射电子显微镜（Talos F200C）

主要性能和指标：

加速电压：20-200kV连续可调，加速电压稳定度 $\leq 10\text{ppm}/10\text{min}$ ；场发射电子枪；点分辨率0.3nm；信息分辨极限0.15nm；球差系数2.7mm；低温（液氮温区）样品载物台，可倾转70度；物镜具有恒功率；配置有自动光阑系统和自动低温Box；配置Ceta 4K*4K 200kV相机；配置STEM模式（包括HAADF、BF/DF探测器）；安装EPU、FEI Xplore3D和Serial EM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，可以满足冷冻单颗粒技术、冷冻电子断层扫描技术、STEM电子断层扫描技术的数据收集需求，如：1. 进行液氮温度的冷冻样品数据收集；2. 可进行单颗粒样品数据收集；3. 可进行电子断层扫描自动化数据收集。



型号：FEI Tecnai 20

购入（安装）时间：
2002年5月

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；球差系数2mm；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Serial EM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。

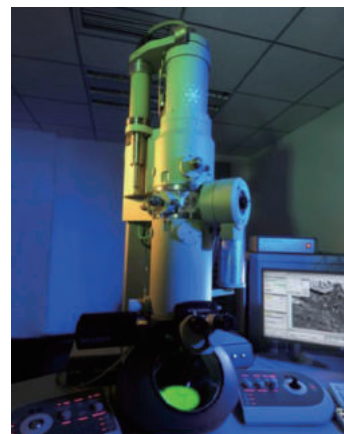
120 kV透射电子显微镜（120 kV TEM）

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 SIS MageView G2；配置底插2K*2K CCD相机，型号FEI Eagle CCD；安装FEI Xplore3D和Serial EM软件。

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 Tecnai Spirit

购入（安装）时间：
2010年12月

设备升级

2014年1月加装一体式光电关联成像系统用光学插件iCorr



iCorr主要性能和指标:

荧光光学系统:

物镜: 15x/0.5NA; 激发光: 460-500nm, 峰值470nm; 发射光: 510-560nm; 采集模式: 荧光成像, 反射光成像;

CCD相机:

2448像素x 2050线, 12 bit; 帧率: 每秒高于10帧 (在高分辨率时); 视野: 0.6mm x 0.5mm

主要功能和服务范围:

FEI iCorr光学插件搭载于Tecnai Spirit透射电镜上, 允许反射和落射荧光成像, 可以在电镜样品腔室内交替进行光学成像和透射电镜成像, 并能完成两种成像模式之间的自动关联定位, 关联精度可达2 μ m。

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。



型号: FEI Helios NanoLab 600i

购入 (安装) 时间:
2012年5月

高压冷冻仪

主要性能和指标:

高压冷冻仪是利用高压的方式对样品进行冷冻固定的装置。它可将生物体快速冷冻成玻璃态样品, 其压力达到2000bar, 冷冻速率约为20000 $^{\circ}$ C/s, 冷冻深度可达200 μ m, 大大增加了快速冷冻的深度 (普通快速冷冻深度约为几十 μ m), 实现了对细胞、组织等生物大样品的良好的物理固定。

主要功能和服务范围:

- 1) 高含水样品;
- 2) 较难固定渗透的样品, 如植物细胞、线虫等;
- 3) 细胞内特殊结构, 如植物细胞内的液泡。



型号: Leica EM HPM100

购入 (安装) 时间:
2014年1月16日

高压冷冻可最大限度的保持样品的自然状态和真实结构，避免化学固定对样品带来的损伤和假象。它可以方便的结合冷冻替代、冷冻断裂、冷冻干燥等技术，进行细胞的超微结构观察；也可以进行免疫化学的工作，还可连接冷冻切片技术，进行细胞的冷冻电镜三维重构工作。

主要性能和指标：

高压冷冻仪是利用高压的方式对样品进行冷冻固定的装置。它可将生物体快速冷冻成玻璃态样品，其压力达到2000bar，冷冻速率约为20000℃/s，冷冻深度可达200μm，大大增加了快速冷冻的深度（普通快速冷冻深度约为几十μm），实现了对细胞、组织等生物大样品的良好的物理固定。

主要功能和服务范围：

- 1) 高含水样品；
- 2) 较难固定渗透的样品，如植物细胞、线虫等；
- 3) 细胞内特殊结构，如植物细胞内的液泡。

高压冷冻可最大限度的保持样品的自然状态和真实结构，避免化学固定对样品带来的损伤和假象。它可以方便的结合冷冻替代、冷冻断裂、冷冻干燥等技术，进行细胞的超微结构观察；也可以进行免疫化学的工作，还可连接冷冻切片技术，进行细胞的冷冻电镜三维重构工作。



型号：Leica EM PACT2

购入（安装）时间：
2008年9月

冷冻替代仪（Leica AFS）

主要性能和指标：

- 1.温度范围：-140℃~+70℃可控
- 2.液氮容积35L，一次充满可维持5天运行，设有独立液氮注入口
- 3.“Deep Freeze”功能允许在低于-140℃进行样品转移，“TF”功能可有效排除湿气和氧气的影响
4. LED照明，LED紫外灯
5. 灵活，各种包埋系统可供选择，兼容不同应用范围
6. 彩色屏幕，图形化显示，鼠标控制，简单易学，可存储10组用户，每个用户可存储99组程序
7. 安全，内置排风系统，有毒有害气体可排出室外

主要功能和服务范围：

主要用于冷冻替代和梯度变温技术，同时也可用于树脂的低温包埋和聚合过程。Leica EM AFS2 配有Leica EM FSP（冷冻替代驱动器），是为Leica EM ASF2 特别设计的自动化数据处理系统，可为冷冻替代和梯度变温过程自动稀释和更换试剂，并内置LED紫外灯，自动完成紫外聚合过程。样品室内部和体视显微镜下都装有LED照明灯，方便观察和定位样品。



型号：Leica EM AFS2

购入（安装）时间：
2010年12月



型号：Leica EM UC6

购入（安装）时间：
2010年12月



型号：Leica EM FC6

购入（安装）时间：
2007年5月

超薄切片机

主要性能和指标：

Leica EM UC6 超薄切片机由以下几部分组成：1) 机身主体；2) 中心式移动显微镜；3) 彩色触屏控制器。其切片窗口可调范围为0-50mm，样品进刀范围为200 μ m，切削速度范围在0.1-50mm/s之间。切片厚度在纳米级到微米级之间。用户可以方便的对仪器进行控制，调节各项参数，得到自己需要的切片。

Leica EM UC6 超薄切片机配件包括刀台和样品夹等。其刀台可进行90度角旋转移动，可用于放置玻璃刀或钻石刀，进行切片。其配有通用样品夹和平扁样品夹两种样品夹，可以将不同形状的包埋块牢固的固定在夹头上，进行修块和切片。

主要功能和服务范围：

Leica EM UC6 超薄切片机是用于电镜样品制备的仪器，可进行超薄和半薄切片。主要应用于生物样品制备，包括细胞、组织等样品，以及聚合物的切片制备。

主要性能和指标：

Leica EM FC6 低温超薄切片机是在Leica EM UC6 超薄切片机的基础上加载低温系统，安装冷冻箱和低温发生系统。前者通过连接机身，可实时精确进行冷冻控温；后者为45L的液氮容器，通过连接装置与冷冻箱相连，其可调节温度范围低至-185 $^{\circ}$ C，可以满足生物样品冷冻保护下的冷冻超薄切片（Tokuyasu方法）和冷冻含水切片等不同的需要。Leica EM FC6 低温超薄切片机配件还包括静电发生器和样品夹。工作时，冷冻箱内可同时放置两把刀，用于修块和切片的不同需要；可利用预编程序进行修块和切片的设置。低温箱内设LED照明，方便用户在低温下进行切片的观察和收集。

主要功能和服务范围：

Leica EM FC6 低温超薄切片机是制备冷冻切片必不可少的工具，通过该仪器制备的冷冻切片可连接免疫标记技术，用于蛋白、病毒的细胞内标记等免疫学与细胞化学的电镜工作；可连接低温电镜技术进行三维重构的工作。

主要性能和指标：

Leica EM FC7 低温超薄切片机是在Leica EM FC6 低温超薄切片机的版型上改进发展，用于生物样品的冷冻超薄切片、冷冻半薄切片，尤其适用于冷冻含水切片。



型号：Leica FC7

购入（安装）时间：
2013年10月

具体的说，Leica EM FC7 低温超薄切片机和Leica EM FC6 低温超薄切片机的主要区别，是特别针对冷冻含水切片的切片收集配置了超微操作系统和静电发生/减灭系统。其可调节温度范围低至-185℃，可以满足生物样品冷冻保护下的冷冻超薄切片和冷冻含水切片等不同的需要。

主要功能和服务范围：

Leica EM FC7 低温超薄切片机是制备冷冻切片尤其是含水切片必不可少的工具，通过该仪器制备的冷冻含水切片可连接冷冻电镜（CEMOVIS技术），用于直接生理状态下的细胞超微形态成像以及三维重构。亦可连接免疫标记技术，用于蛋白、病毒的细胞内标记等免疫学与细胞化学的电镜工作。

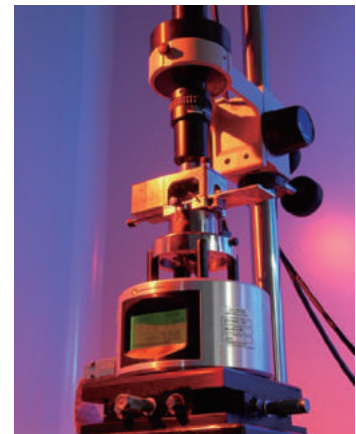
扫描探针显微镜（Scanning Probe Microscope）

主要性能和指标：

多种AFM成像模式：Contact Mode和Taping 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

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：DeltaVision OMX V3

购入（安装）时间：
2011年12月



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

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）、25X（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 FV1000MPE

购入（安装）时间：
2006年1月



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；新增一个150倍光学物镜。

主要功能和服务范围：

可实现XY、Z、T、 λ 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。

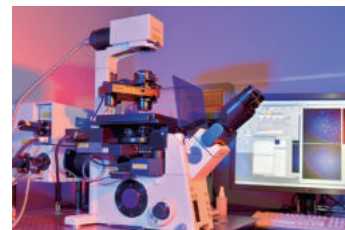
激光扫描共聚焦显微镜FV1000 (Laser Scanning Confocal Fluorescence Microscope)

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

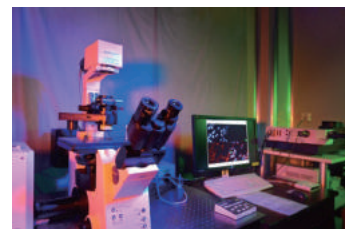
激光扫描共聚焦显微镜FV500 (Laser Scanning Confocal Fluorescence Microscope)

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。

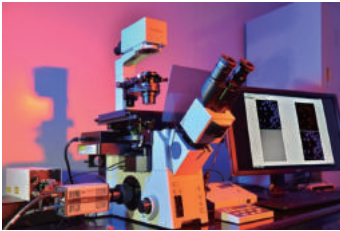
主要功能和服务范围：

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 FV500

购入（安装）时间：
2003年2月



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：

全自动倒置荧光显微镜（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CO2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。



型号：浪潮TS10K

购入（安装）时间：
2010年10月

高性能计算机集群

主要性能和指标：

该集群共有1300个CPU核，400TB 的存储容量，总计算能力约为 14万亿次每秒，具体包括：管理节点2个，用户登录节点和数据处理各1个，它们都有8 个CPU核，16G内存；80个常规瘦节点和20个内部高速互联瘦节点，这些瘦节点都有12 个CPU核，36G内存；1个厚节点（48个CPU核，256G内存）；4个GPU节点，每个节点都有8个CPU核，896个CUDA核，96GB内存；有并行和NFS两种文件系统，前者为曙光 Parastor-200，存储容量为360TB，后者包括几个小规模磁盘阵列，总容量为60TB；主干 计算网络为万兆Ethernet，管理网络为千兆Ethernet；操作系统为Linux (64位的RHEL6.4)，作业调度系统为TSJM V1.0。

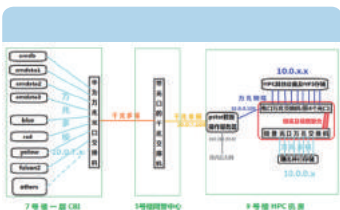
主要功能和服务范围：

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。

CBI现在每天能产生T数量级的数据，要及时有效地处理（包括分析，储存，拷贝转移等）这大量的数据，7号楼原有的千兆以太网网络已无法胜任。为此，我们今年新添置了一套万兆（光纤）网络系统。有了这套系统，CBI数据系统的主要设备（即：3个存储服务器emdata1, emdata2, emdata3; 1个数据库服务器; 3个图像工作站blue, red, yellow等）之间的数据传递带宽可达9Gb/s以上，网速不再成为数据传输的瓶颈。我们还将它和研究所原有的光纤网络联通，使CBI数据系统和9号楼HPC的数据传输速度比原来（所内以太网）提高了8倍。

新增了存储（并行文件系统）一套，型号为“曙光ParaStot-200”，可用容量为340T，用作为高性能计算机集群TS10K的主文件系统。

系统的主要特点有：



7号楼新增万兆网

非对称多集群架构设计，能够确保整个系统在任何组件失效时，都能够保持业务的连续性和用户的正常数据访问。

高效数据容错重构算法以及基于真实数据的分布式恢复机制，使得系统数据恢复速度能够超过传统Raid机制5倍，可靠性成倍上升。

条带化技术将I/O操作均匀分布到多个数据控制器，为数据提供了多个并行传输通道，并行化的I/O有效地提高了存储系统的读写带宽和IOPS,从而实现最高达数百GB/s的吞吐量。

系统聚合IO带宽随系统容量的增加呈线性增长，可满足由于用户应用规模的不断增长而带来的容量和性能的需求。

提供了基于WEB的图形化监控管理界面，提供系统配置管理、监控告警等功能，直观易懂的图形化界面方便用户实时监控系统的状态，简化了安装和维护过程，提高了管理效率。



曙光ParaStor-200

3. 2015年度新增设备介绍



型号：Leica EM UC7

购入（安装）时间：
2015年11月

Leica UC7 超薄切片机

主要性能和指标：

Leica EM UC7 超薄切片机由以下几部分组成：1）机身主体；2）中心式移动显微镜；3）彩色触屏控制器。其切片窗口可调范围为0.2-14mm，样品臂总行程最大为200 μ m，切片速度控制范围在0.05-100mm/s之间。切片厚度在纳米级到微米级之间。用户可以方便的对仪器进行控制，调节各项参数，得到自己需要的切片。

Leica EM UC7 超薄切片机配件包括刀座和样品夹等。刀座可用于放置玻璃刀或钻石刀，刀的角度-2°至15°范围可调，可支持刀宽度6—12mm。还配有通用式和平扁式两种样品夹，可以将不同形状的包埋块牢固的固定在夹头上，做360度旋转，进行修块和切片。

主要功能和服务范围：

Leica EM UC7 超薄切片机是用于电镜样品制备的仪器，可进行超薄和半薄切片。主要应用于生物样品制备，包括细胞、组织等样品，以及聚合物的切片制备。

修块机 Leica EM TRIM2

主要性能和指标:

Leica EM TRIM2是一套高速研磨修块系统, 包括一体化体式镜和LED 环形照明。其铣刀研磨最小步进 $\leq 1\mu\text{m}$, 铣刀转速 $\geq 20000\text{rpm}$, 样品研磨角度在 $0 - 60^\circ$ 可调, 样品观察角度在 $0 - 90^\circ$ 可调, 可满足正面/侧面观察, 方便精细修块时的定位。其样品夹可做 360° 旋转, 每 90° 卡口, 可调对中。可修整最小样品面为 $200\mu\text{m}$ 边长。机器还带有洗尘装置, 防止粉尘污染。

主要功能和服务范围:

用于传统细胞/组织等包埋块的研磨修块。用自动程序代替传统人工修块, 不仅提高修块速度, 还可提高修块质量, 便于接下来更好的制备超薄切片。



型号: Leica EM TRIM2

购入(安装)时间:
2015年11月



型号: Leica EM AMW

购入(安装)时间:
2015年11月

微波组织处理机 Leica EM AMW

主要性能和指标:

Leica EM AMW微波组织处理机, 其样品容量为: 组织处理 ≥ 20 个/次; 聚合 ≥ 20 个/次。最大可存储99组程序, 每程序最大容纳 ≥ 20 个步骤, 每步时间范围为 $0 - 99$ 小时。混匀振幅 $\geq 4\text{mm}$, 试剂管更换时间 ≤ 30 秒。温度控制范围为室温 $- 100^\circ\text{C}$, 误差范围 $\leq 1^\circ\text{C}$ 。微波加热功率 $\geq 30\text{W}$, 连续可调, 1W 步进

主要功能和服务范围:

用于细胞、组织等生物样品的透射电镜制样。可完成从固定、脱水到包埋、聚合全套的样品处理过程; 同时配备微波对植物、线虫等难于渗透的样品提高渗透效率。



型号: Leica EM AFS2

购入(安装)时间:
2015年11月

冷冻替代仪 Leica EM AFS2 (新增两台)

主要性能和指标:

1. 温度范围: $-140^\circ\text{C} \sim +70^\circ\text{C}$ 可控;
2. 液氮容积 35L , 一次充满可维持5天运行, 设有独立液氮注入口;
3. “Deep Freeze”功能允许在低于 -140°C 进行样品转移, “TF”功能可有效排除湿气和氧气的影响;
4. LED照明, LED紫外灯;
5. 灵活, 各种包埋系统可供选择, 兼容不同应用范围;
6. 彩色屏幕, 图形化显示, 鼠标控制, 简单易学, 可存储10组用户,

每个用户可存储99组程序；

7. 安全，内置排风系统，有毒有害气体可排出室外。

主要功能和服务范围：

主要用于冷冻替代和梯度变温技术，同时也可用于树脂的低温包埋和聚合过程。



型号：Leica VT 1200S

购入（安装）时间：
2015年7月

振动切片机 Leica VT 1200S

主要性能和指标：

1. 具有缓冲液盘可以连接循环制冷装置,刀架和缓冲液盘可拆卸，防止固定剂的残留污染；

2. 水平向和纵向刀架振幅和振动频率均可调节，可调节的振幅在0-3mm之间，振动频率约0.85 +/- 5 Hz；

3. 手动进样厚度可调节，并具有切片厚度总计功；

4. 刀片前进和回退速度在1-5mm/s之间可调；

5. 刀片切速在0.01-1.5mm/s之间；

6. 可切体积尺寸在 33x50x20mm以内的样品；

7. 可以用Vibrocheck进行振动测量，调节旋钮可将刀片的纵向振动（偏离）最小化至1 μ m 以下，确保高质量的切片。

主要功能和服务范围：

主要用于组织样品的制样前处理。可以在短时间内获得微米级厚度的切片，同时最大程度的保护组织、酶和抗原，便于衔接之后的冷冻制样工作。



型号：SOLARUS 950

购入（安装）时间：
2014年12月

Gatan等离子清洗仪

主要性能和指标：

Gatan等离子清洗仪是透射电镜及扫描电镜样品进行前制备的仪器。它连接三种气体，分别是高纯氢气、氧气和氩气，可实现氢氧、氧氩的混合气体清洗实验，可用作透射电镜载网表面亲水性处理。它的样品腔室尺寸为直径8cm，高度5cm。每次处理时真空度被精确控制且具备自动的微量气流阀门，可记忆多组处理方案（包括使用气体、流量、处理功率、处理时间等），具有较高的可重复性。

主要功能和服务范围：

用于透射电镜及扫描电镜样品制备用载网亲水性处理等。



型号：Leica EM GP

购入（安装）时间：
2016年1月

Leica投入式快速冷冻仪（EM GP）

主要性能和指标：

- 1.环境仓温度控制范围：+4°C - +60°C
 - 2.环境仓湿度控制范围：室内湿度 - 99%
 - 3.液氮杜瓦瓶容量≥1 L
 - 4.杜瓦瓶温度：≤- 196°C
 - 5.烘烤温度≥+ 110°C
 - 6.烘烤时间≤1小时
 - 7.乙烷容器温度：-100°C ~ -196°C 可自由设定
 - 8.乙烷容器容量≥2.5 ml
 - 9.液氮消耗量(TF值设定为50%，液氮100%装满)可维持≥1小时运行而无需加液氮
 - 10.控制器：独立液晶触屏控制器及脚控装置；可存储≥10组程序
- 主要功能和服务范围：

适用于冲入式冷冻透射电镜样品制备，如单颗粒三维重构样品（纯化的蛋白、大分子复合体、纳米颗粒）、培养在载网上的细胞样品、分离纯化的细胞器冷冻样品制备等。

4. 人员队伍

学术带头人

学术带头人		
孙 飞	研究员	（国家万人计划）生物成像中心主任 技术研究方向：高分辨率冷冻电镜三维重构技术，多尺度关联成像技术。
徐 涛	研究员	（国家万人计划）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	（国家万人计划）杰青，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）杰青，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。

生物成像中心专家委员

徐 伟	研究员	生物成像中心资深专家顾问 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	（国家万人计划）杰青，生物成像中心专家 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）杰青，生物成像中心专家 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，核酸生物学重点实验室，创新课题组组长 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。
张 宏	研究员	（国家万人计划）杰青，生物大分子国家重点实验室副主任，创新课题组组长 研究方向：多细胞生物中自噬作用的机理和调控机制。
邓红雨	研究员	（百人计划）杰青，感染与免疫重点实验室，创新课题组组长 研究方向：病毒复制的分子机理及病毒与宿主的相互作用。
李国红	研究员	（百人计划）杰青，生物大分子国家重点实验室创新课题组组长 研究方向：染色质结构和表观遗传调控的研究。
朱 岩	研究员	（百人计划），脑与认知科学国家重点实验室创新课题组组长 研究方向：神经系统的结构、发育和功能。

专业工程师

季 刚	博士，正高级工程师	技术方向：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，高级工程师	技术方向：低温透射电镜和单颗粒分析技术。
张建国	博士，高级工程师	技术方向：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。
郭振玺	博士，工程师	技术方向：低温透射电镜和单颗粒分析技术。
陈永圣	硕士，工程师	技术方向：电气设备运行维护，并同时负责实验室日常事务管理。
滕 岩	硕士，高级工程师	技术方向：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，工程师	技术方向：结构照明超分辨荧光显微成像技术，光电关联显微成像技术。
孙磊	硕士，高级工程师	技术方向：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。
王莉	硕士，工程师	技术方向：生物组织和细胞的透射电镜样品制备技术。
贾艳侠	博士，高级工程师	技术方向：生物大分子原子力显微镜成像技术，生物电镜的样品制备技术。
凌伦奖	正高级工程师	技术方向：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	技术方向：电子显微镜图像数据的处理和相关程序的开发。

博士后及其他岗位

李喜霞	生物成像中心-徕卡联合培养博士后	研究方向：以线虫为研究对象，通过连续超薄切片扫描电镜成像方法，实现大尺度三维重构。
蒋春丽	技术员	技术方向：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。
范得印	实习生	实习方向：低温电镜样品制备技术及支持膜制备技术。
彭灿	实习生	实习方向：电镜常规样品制备技术及超薄切片技术。

5. 2015年度新增人员介绍

郭振玺 工程师



研究方向：
冷冻透射电子显微学的技术和方法研究

彭 灿 实习生



学习方向：
电镜常规样品制备技术及超薄切片技术

生物成像中心2015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

新方法解析病毒内部核酸和RNA聚合酶的结构

课题背景:

近年来，利用电镜技术和X射线晶体学技术，结构生物学家已经解析了大量病毒衣壳的原子分辨率三维结构，对衣壳蛋白结构已有较为系统的认识。然而，由于病毒衣壳内部核酸及相关蛋白与其衣壳具有不同的对称性（又被称为“对称失配”），导致收集的病毒图像中不同对称性的结构信息的叠加。现有的三维重构方法尽管能够很好地解析病毒衣壳的结构，但却无法解析衣壳内部没有对称性的核酸和蛋白的结构。此前，生物学家对病毒的核酸及相关蛋白在衣壳内的结构及其装配方式几乎一无所知。

清华大学生命学院程凌鹏和湖南师范大学物理系刘红荣两人在病毒三维重构领域开展了十多年的合作研究，他们提出了一种从电镜图像中解析对称失配的生物大分子复合物结构的新方法。他们用该方法首次解析了一种昆虫的双链RNA病毒在转录和非转录两种状态下病毒内部RNA及其聚合酶复合物的三维结构，揭示了不同状态下病毒内部RNA及其聚合酶相互作用的构象变化，进一步完善了双链RNA病毒在复制和转录这两个病毒生命周期的重要过程中RNA与聚合酶的协同工作模型。该研究成果也改变了长期以来占据双链RNA病毒研究领域十多年的“病毒衣壳内的RNA和聚合酶呈线轴状排列”的主流观点，为阐明双链RNA病毒的复制和转录的分子机制提供了结构基础。该研究不仅首次报道了二十面体病毒衣壳内部的基因组核酸及其相关蛋白复合物的结构，而且提出了一种解析具有不同对称性大分子复合物三维结构的新方法。该研究中使用的透射电镜原始数据取自生物成像中心300kV高端低温透射电镜Titan Krios，该研究成果最终发表在Science上。

论文发表相关信息:

Hongrong Liu^{#,*} and Lingpeng Cheng^{#,*}, Cryo-EM shows the polymerase structures and a nonspooled genome within a dsRNA virus, *Science*, Vol. 349, (2015), pp: 1347-1350 (*corresponding author, #equal contribution)

生物成像中心在该研究中的主要贡献:

该研究的图像数据在中国科学院生物物理所科学研究平台生物成像中心用配备CCD相机的Titan Krios电镜收集完成。

技术支持: 季刚、黄小俊

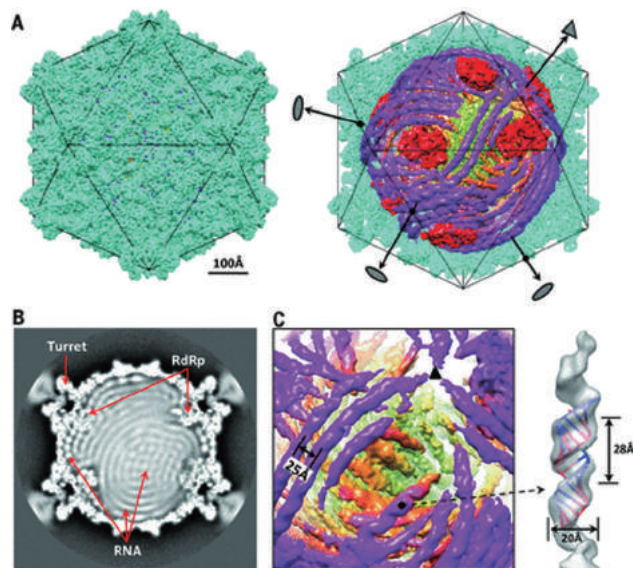


Fig1. Structures of the RNA fragments and RdRps within the NCPV capsid.

——透射电镜成像技术，扫描电镜三维重构技术

Calyx of Held突触囊泡循环的定量研究

课题背景：

突触囊泡的循环对于维持神经信息的可靠传递至关重要。囊泡循环主要包括了囊泡与突触前膜融合释放神经递质，前膜内吞形成新的囊泡，而后通过酸化、神经递质重填充，最后锚定以及动员作用再次成为具有释放能力的囊泡等一系列过程。到目前为止，由于研究手段和检测技术的局限性，有关囊泡循环的一些基本特性仍存在巨大的争议，例如循环囊泡池的大小是多少，以及囊泡的循环机制如何有效地维持突触传递等问题仍无定论。

中国科学院生物物理研究所孙坚原课题组通过在小鼠脑片上采用局部灌流囊泡 ATP 酶的阻断剂 folimycin 抑制内吞后囊泡酸化的手段，将电生理记录的突触后兴奋性电流转换成突触中的预留囊泡数和再利用的囊泡数，发现突触囊泡再利用的时间与循环囊泡池的使用比例相关。他们还提出了一个囊泡循环顺序释放的动力学模型，将循环池进一步分为预备释放池、预备动员池和成熟前池，并分别计算出了各个囊泡池的容量。为了进一步验证这一定量分析方法，通过双束扫描电镜三维重构Calyx of Held突触，计算出囊泡总量，并且通过观察到被FM1-43标记的囊泡所占比例计算出Calyx of Held突触中循环池的大小，此结果与电生理结果相吻合。此项研究提出了一种具有高效的时间和信号分辨率的定量分析方法，用来研究 Calyx of Held 以及其他谷氨酸能突触中囊泡循环的动力学特征。

论文发表相关信息：

Qiu X*, Zhu Q*, Sun J. (2015) Quantitative analysis of vesicle recycling at the calyx of Held synapse. PNAS. 112(15):4779-84

生物成像中心在该研究中的主要贡献：

电镜样品制备，双束扫描电镜三维重构和透射电镜观察均在生物成像中心完成，孙飞老师，孙磊老师和张建国老师给予了技术指导和技术服务。

技术支持：孙飞、孙磊、张建国

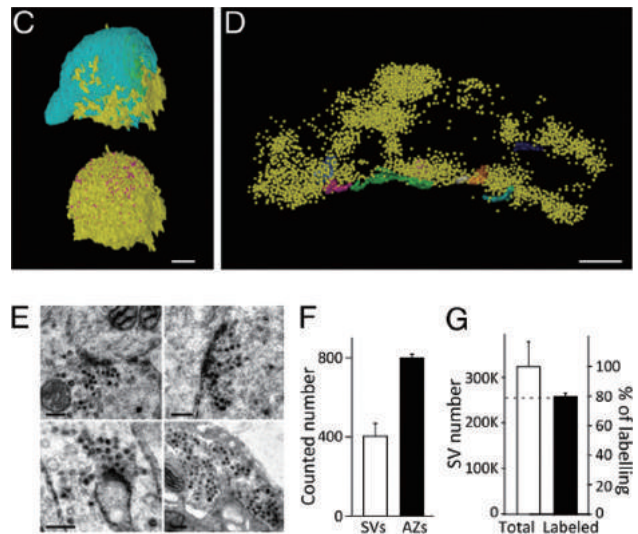


图1.上图：用电镜技术观察统计Calyx of Held突触中囊泡总量和循环池大小。图C.用双束扫描电镜图像重构的一个完整的Calyx of Held突触，黄色为突触后principle cell，青色为突触终末，红色为活性带。图D.重构的一部分Calyx突触终末内囊泡（黄色）和活性带（其他颜色）分布。图E.在透射电镜下被FM1-43标记的囊泡中心呈现高电子致密度。图F.一个Calyx of Held突触钟包含的活性带数量和每个活性带包含的囊泡数。图G. Calyx of Held突触中囊泡总量约为320,000，循环池占囊泡总池的80%。

——冷冻含水切片技术，冷冻电子断层扫描技术，三维重构技术

基于冷冻含水切片技术的光电关联成像观察线粒体内部结构

课题背景：

细胞内各种生物分子机器（包括蛋白复合物）的功能与其内部结构以及它们所处的细胞内的环境（定位分布）密切相关。它们在细胞内相互作用协同执行细胞的各种生理功能。分子机器的内部结构可用电子显微技术解析；而其定位和分布等特征则需要超高分辨的光学显微成像技术。由于两种成像技术长期隔阂，人们没有较

为完美的直接观察兴趣蛋白与细胞内亚结构的共定位的方法，而随着生命科学的发展，越来越多的问题需要我们综合蛋白结构信息与其亚细胞器位置信息来解决。目前国际上已经实现了常温下的超高分辨荧光和电镜结合，但是存在对样品破坏性较大，荧光保存不佳等问题。中国科学院生物物理研究所徐涛课题组实现了深冷条件下的三维超高分辨荧光成像，并将之与电镜冷冻含水切片技术结合，达到了光学8 nm的定位精度，并且能在电镜下观察到线粒体等亚细胞器的清晰膜结构。其目标是将定位信息和结构信息进行整合和处理，从而获得大量关于分子机器在细胞原位的三维结构信息，并由此统计归纳出目标分子机器原位动态变化规律。

论文发表相关信息：

Bei Liu*, Yanhong Xue*, Wei Zhao*, Yan Chen, Chunyan Fan, Lusheng Gu, Yongdeng Zhang, Xiang Zhang, Lei Sun, Xiaojun Huang, Wei Ding, Fei Sun, Wei Ji and Tao Xu. (2015) Three-dimensional super-resolution protein localization correlated with vitrified cellular context. *Scientific Reports*. 5: 13017

生物成像中心在该研究中的主要贡献：

冷冻含水切片、冷冻电子断层扫描和三维重构在生物成像中心完成。季刚、丁玮、黄小俊、孙磊、孙飞等老师给予了技术指导和技术服务。

技术支持：季刚、丁玮、黄小俊、孙磊、孙飞

——双束扫描电镜成像技术

电子断层成像方法对Hela细胞内染色质纤维的分析

课题背景：

真核细胞中的遗传物质DNA以染色质的形式经过多级折叠，储存在细胞核中。染色质的折叠机制与基因的转录、复制和修复密切相关。高等生物通过表观遗传机制实现对染色质高级结构变化的调控，影响基因转录沉默或激活状态，从而决定细胞的组织特异性和细胞命运。所以，解析染色质的高级结构（30-nm纤维）对于探究表观遗传事件和理解表观遗传调控机制具有重要意义。近年关于体外组装染色质纤维的高分辨结构已有报道，然而在真核细胞（尤其是哺乳动物细胞）中是否存在30-nm染色质纤维一直存在争议。

中国科学院生物物理研究所朱平课题组利用冷冻切片和电子断层成像技术对Hela S3细胞内染色质的折叠状态进行了原位研究。在Hela S3细胞和细胞核的化学固定包埋切片中，观察到类似染色质纤维的密

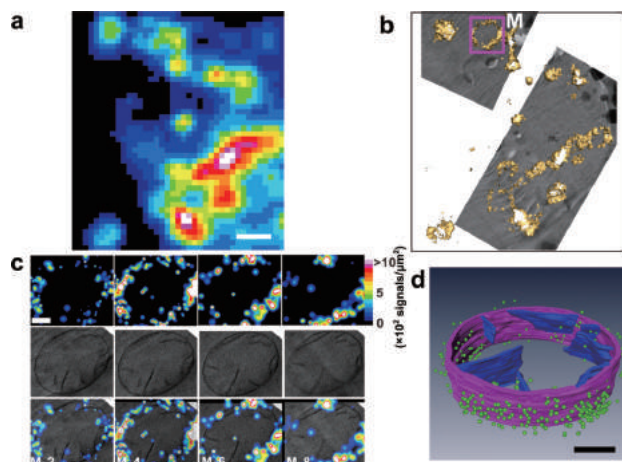


图1.上图是表达TOM20-Dronpa的HEK293细胞的冷冻切片三维图像。(a)单分子数据图，标尺：1 μm 。(b)PALM图像和低倍透射电镜图像关联图；(c)每列图像抽取自一个线粒体三维关联成像的一个层面：上:Cryo-PALM，中:Cryo-ET，下:融合图像。标尺：200 nm。(d)光电融合图像的三维展示。图中紫色和蓝色分别表示线粒体外膜和嵴，绿点表示Dronpa分子，标尺：200 nm。

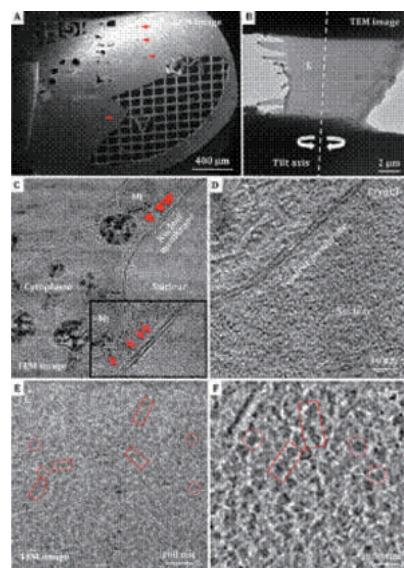


图1.FIB方法制备冷冻含水切片技术分析Hela细胞和细胞核结构

度存在；而Hela S3细胞核经过高压冷冻和冷冻替代处理后，进一步接近天然状态，功率谱分析看到了较为明显的11-nm和30-nm的峰，免疫电镜分析和电子断层成像分析得出染色质的分布区域和大致的结构形态，进一步为体内30-nm染色质高级结构的存在提供了证据。最后，利用双束扫描电镜（FIB-SEM）离子减薄技术对Hela S3细胞核进行了冷冻切片和电子断层扫描成像三维重构，观察到细胞原位中类似30-nm染色质纤维的密度。

论文发表相关信息：

Li XM, Feng HL, Zhang JG, Sun L, Zhu P. (2015) Analysis of chromatin fibers in Hela cells with electron tomography. *Biophysics Reports*. 1(1):51-60

生物成像中心在该研究中的主要贡献：

FIB方法制备冷冻含水切片及双束扫描电镜成像以及高压冷冻等样品制备步骤在生物成像中心完成。

技术支持：张建国、孙磊、季刚、黄小俊、李硕果

——超薄切片样品制备技术

接合素43介导了由PFOS诱导的星形胶质细胞凋亡

课题背景：

PFOS是一种人造的环境污染物，对哺乳动物具有毒性。目前PFOS的神经毒理效应还未被广泛研究。中国疾控中心环境健康和相关产品安全研究所白雪涛组研究了星形胶质细胞特异性的间隙连接蛋白connexin 43在

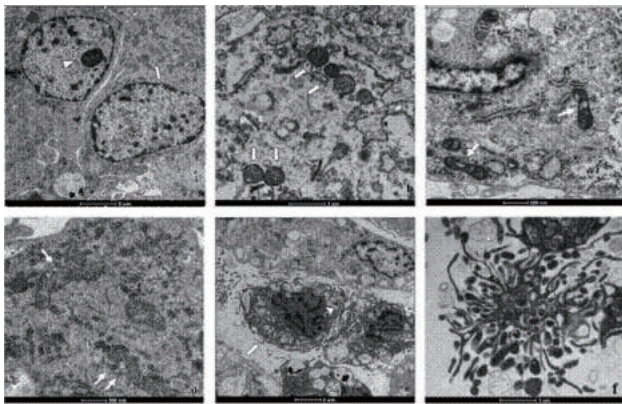


图2.50 $0.5 \mu\text{M}$ PFOS处理24小时后的星形胶质细胞的超微结构图像。(a-b)是未被处理的正常细胞；(c)中箭头指示肿胀的线粒体；(d)线粒体膜的完整性遭到破坏（箭头所指）；(e)核的形态发生变化，染色质凝缩（三角所示），伪足形成（箭头所指）；(f)原始的细胞形态消失，细胞碎裂。

PFOS诱导的细胞凋亡中的作用。细胞超薄切片的透射电镜观察为展示PFOS诱导的细胞凋亡现象提供了大量清晰的照片。

论文发表相关信息：

Li Dong, Xiaoyan Yang, Wen Gu, Kangfeng Zhao, Huizheng Ge, Jianjun Zhou, Xuetao Bai. Connexin 43 mediates PFOS-induced apoptosis in astrocytes. *Chemosphere*. 2015, 132: 8-16

生物成像中心在该研究中的主要贡献：

负责细胞样品的超薄切片样品制备、切片、染色和透射电镜观察，为展示PFOS诱导的细胞凋亡现象提供了重要的影像佐证。

技术支持：贾艳侠、孙磊

——原子力显微成像技术

PEG-PE胶束纳米笼介导胰岛素重新折叠

课题背景：

纳米材料聚乙二醇磷脂酰乙醇胺（PEG-PE）是一种两亲性材料，具有生物可降解性，是通过FDA认证的药物输送载体。中国科学院生物物理研究所梁伟组致力于研究PEG-PE的载药效果。他们发现PEG-PE能够使

由DTT介导的胰岛素聚集物重新解聚成单体，并被包装进PEG-PE的纳米笼里。原子力显微镜成像结果为揭示PEG-PE诱导胰岛素重新折叠提供了直观有力的证据。

论文发表相关信息：

Xiaocui Fang, Tao Yang, Luoyang Wang, Jibing Yu, Xiuli Wei, Yinjian Zhou, Chen Wang, Wei Liang. Nano-cage-mediated refolding of insulin by PEG-PE micelle (2016) .Biomaterials, 77: 139-148

生物成像中心在该研究中的主要贡献：

承担原子力显微镜成像工作，原子力显微镜成像实验为揭示PEG-PE诱导胰岛素重新折叠提供了直观有力的证据。

技术支持: 贾艳侠

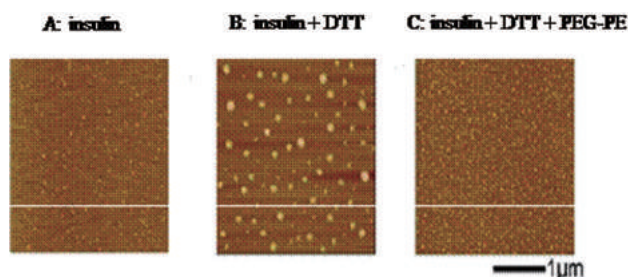


图1.PEG-PE、胰岛素和 DTT 在 37 °C 下孵育4小时后的代表性原子力显微镜图像

——荧光显微成像技术

表观遗传因子CENP-A周期性招募CENP-N蛋白介导着丝粒功能的机制

课题背景：

中国科学院生物物理研究所李国红课题组研究发现: CENP-A的RG loop (CENP-A特有的Arg80/Gly81两个氨基酸)是CENP-A招募CENP-N的关键性位点并且CENP-N只能与结构松散的CENP-A染色质结合而不能与结构紧密的CENP-A染色质结合。进一步研究发现着丝粒区染色质结构在G1期紧密在S期松散，而CENP-N在S期装配至着丝粒区。我们提出着丝粒区染色质结构周期性的变化可以调节RG loop在CENP-A染色质上的“暴露”或“隐藏”，从而调节CENP-N周期性的装配至着丝粒进而介导着丝粒的功能。利用生物成像中心的激光扫描显微镜OlympusFV1000S能够清晰的观察CENP-A与CENP-N共定位的情况从而分析二者相互作用，同时能够清晰的观察CENP-N在不同细胞周期时在着丝粒上富集的程度，从而为分子机制的研究提供了重要的影像依据。

论文发表相关信息：

Fang, J., Liu, Y., Wei, Y., Deng, W., Yu, Z., Huang, L., Teng, Y., Yao, T., You, Q., Ruan, H., Chen, P., Xu, RM., Li, G. Structural Transitions of Centromeric Chromatin Regulate the Cell Cycle-dependent Recruitment of CENP-N. Genes & Development. 29 (10):1058-73

生物成像中心在该研究中的主要贡献：

利用生物成像中心的激光扫描显微镜OlympusFV1000S能够清晰的观察CENP-A与CENP-N共定位的情况从而分析二者相互作用，同时能够清晰的观察CENP-N在不同细胞周期时在着丝粒上富集的程度，从而为分子机制的研究提供了重要的影像依据。

技术支持: 滕岩

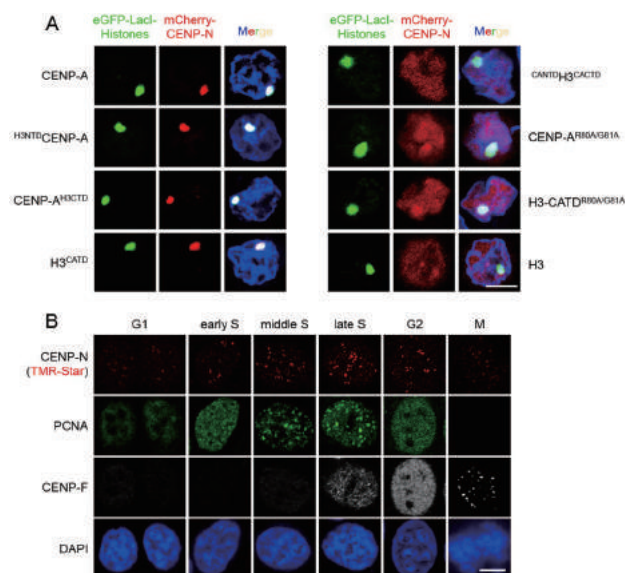


图1.激光扫描共聚焦荧光显微成像显示：(A) CENP-A能招募CENP-N，并且这一过程由CENP-A的CATD结构域中的R80G81位介导完成 (B) CENP-N在有丝分裂的中后S期富集在着丝粒区域。

CENP-A Ser68可逆磷酸化调控着丝粒装配的分子机制研究进展

课题背景:

中国科学院生物物理研究所李国红组研究发现: 着丝粒特异的组蛋白H3变体CENP-A的68位丝氨酸可以发生细胞周期依赖式的可逆磷酸化, 这一翻译后修饰调控对着丝粒功能的建立与维持起着重要的调控作用。在细胞周期进行到G2/M期时, CDK1-cyclin B激酶复合物催化CENP-A的68位丝氨酸发生磷酸化, 从而避免了CENP-A专属的染色质装配因子HJURP过早的与CENP-A结合形成复合物。在M期末期该位点的磷酸化修饰会被PP1 α 磷酸酶去除, 从而使HJURP可以在这一时期将CENP-A装配到着丝粒区域。

论文发表相关信息:

Zhouliang Yu, Xiang Zhou, Wenjing Wang, Wenqiang Deng, Junnan Fang, Hao Hu, Zichen Wang, Shangze Li, Lei Cui, Jing Shen, Linhui Zhai, Shengyi Peng, Jiemin Wong, Shuo Dong, Zengqiang Yuan, Guangshuo Ou, Xiaodong Zhang, Ping Xu, Jizhong Lou, Na Yang, Ping Chen, Rui-Ming Xu, Guohong Li. Dynamic Phosphorylation of CENP-A at Ser68 Orchestrates Its Cell-Cycle-Dependent Deposition at Centromeres. *Developmental Cell* (2015), 32(1), 68-81

生物成像中心在该研究中的主要贡献:

利用生物成像中心的激光扫描显微镜OlympusFV1200S能够清晰的观察到HeLa细胞中着丝粒区域一些着丝粒及动粒相关蛋白比如CENP-A、CENP-B、CENP-C、NDC80等多个重要因子的定位情况, 为了解细胞周期不同时期中着丝粒区域染色质组成的研究提供了重要的成像依据。

技术支持: 滕岩

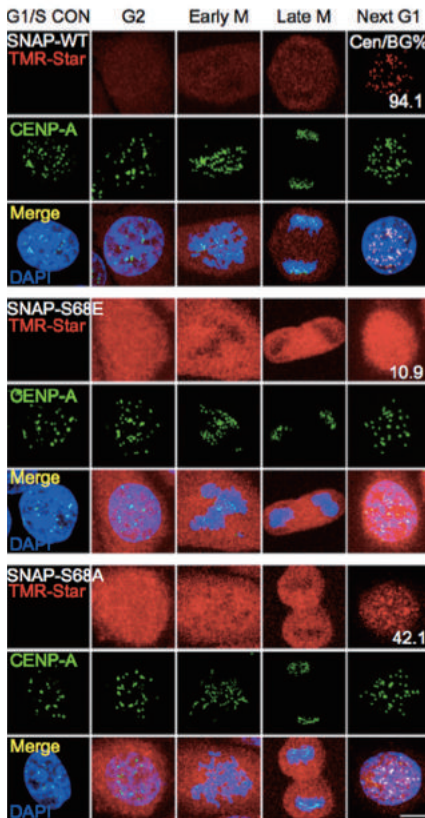


图1. 激光扫描共聚焦荧光显微成像显示: 野生型的CENP-A蛋白在有丝分裂结束后的下一个细胞周期的G1期可以装配到着丝粒区域(呈现点状分布), 而模拟Ser68发生磷酸化的CENP-A S68E突变体则不能在正常的G1期装配到着丝粒区域。对于CENP-A S68A这种不能被磷酸化的突变体而言, CENP-A虽有部分可以装配到着丝粒区域, 但仍有大部分CENP-A信号位于非着丝粒区域, 提示CENP-A可能在该时期还存在一个Ser68依赖的稳定性调控机制。

Sox2做为DNA识别受体参与对外源DNA的固有免疫反应

课题背景:

中国科学院生物物理研究所范祖森组研究发现: 嗜中性粒细胞能够表达Sox2蛋白。一般认为, Sox2只在特定的肿瘤细胞和干细胞中有表达, 为了进一步确认此发现, 范祖森研究组分别检测了Sox2在嗜中性粒细胞中的mRNA水平和蛋白水平, 发现嗜中性粒细胞中确实存在Sox2蛋白表达。通过免疫荧光的实验发现, Sox2定位于嗜中性粒细胞的细胞浆中, 而且在细菌感染的情况下Sox2呈现明显的斑点状分布。

论文发表相关信息:

Xia P, Wang S, Ye B, Du Y, Huang G, Zhu P, Fan Z. Sox2 functions as a sequence-specific DNA sensor in neutrophils to initiate innate immunity against microbial infection. *Nat. Immunol.* 2015; 16: 366-375.

生物成像中心在该研究中的主要贡献:

利用生物成像中心的激光扫描显微镜 OlympusFV1000S能够清晰的观察到Sox2蛋白与MPO蛋白在嗜中性粒细胞中的定位情况,为分子机制的研究提供了重要的成像依据。

技术支持: 滕岩

——荧光显微成像技术

C8orf4调控肝癌干细胞自我更新的分子机制研究进展**课题背景:**

中国科学院生物物理研究所范祖森组研究发现:C8orf4在肝癌和肝癌干细胞中低表达,C8orf4能够与Notch2的N段相互作用,抑制N2ICD的入核,进而抑制肝癌干细胞的自我更新。Notch2信号的活化与肝癌的发生发展密切相关,并与肝癌干细胞的自我更新正相关。C8orf4通过抑制Notch2信号负向调控肝癌干细胞的自我更新。

论文发表相关信息:

Zhu P, et al. C8orf4 negatively regulates selfrenewal of liver cancer stem cells via suppression of NOTCH2 signalling. *Nat Commun.* 2015;6:7122.

生物成像中心在该研究中的主要贡献:

利用生物成像中心的激光扫描显微镜 OlympusFV1000S能够清晰的观察到C8orf4在肝癌组织样本中的表达情况,以及N2ICD在C8orf4KO小球中的核质分布,为分子机制的研究提供了重要的成像依据。

技术支持: 滕岩

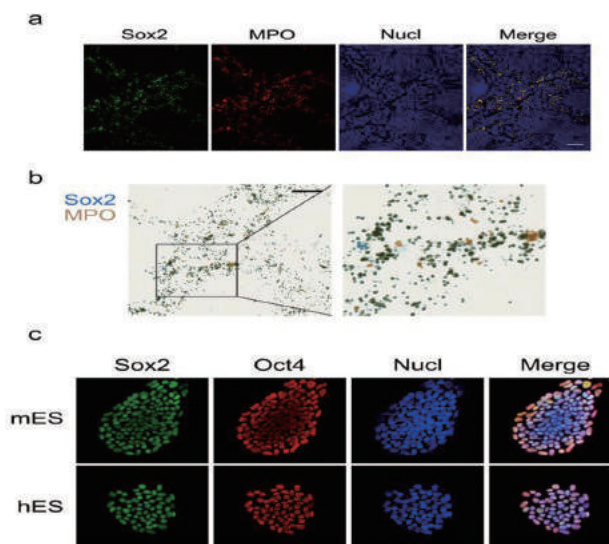


图1.激光扫描共聚焦荧光显微成像显示:(a)嗜中性粒细胞中Sox2蛋白与MPO蛋白有共定位。在小鼠的脾脏中,Sox2蛋白有较高的表达,而且与嗜中性粒细胞的标识物MPO有较强的共定位。(b)通过免疫组化的方法显示Sox2蛋白与MPO蛋白在小鼠脾脏中的共定位。(c)Sox2蛋白与Oct4蛋白在小鼠和人的胚胎干细胞中有共定位。

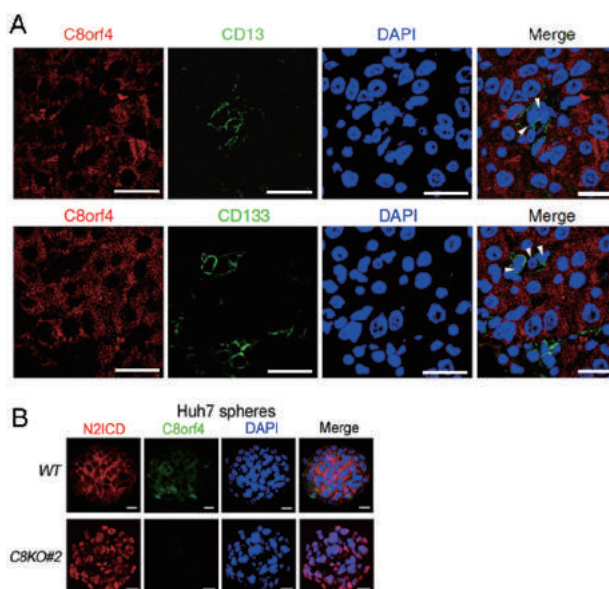


图1.激光扫描共聚焦荧光显微成像显示:(A)C8orf4在肝癌干细胞中低表达。肝癌干细胞marker阳性的细胞(肝癌干细胞)中,C8orf4表达量较低。(B)C8orf4抑制Notch2胞内段的入核。C8orf4KO的细胞和WT细胞形成的小球中,检测N2ICD和的分布,发现C8orf4KO之后N2ICD主要分布在细胞核。

——结构光照明超分辨荧光显微成像技术
一种“智能”克服肿瘤多药耐药的新方法

课题背景:

肿瘤的多药耐药 (MDR) 性是导致癌症化疗失败的重要原因之一, 也是临床癌症治疗的最大挑战。MDR 现象源于具有能量依赖性“药泵”功能的细胞膜蛋白的表达增多, 导致药物在到达胞内靶点前即被拦截或泵出。因此, 开发出更多更好的抗多药耐药性策略非常重要。

与常见的通过抑制MDR外排泵作用或利用纳米载体负载大量药物的方法不同, 中国科学技术大学化学与材料科学学院梁高林教授课题组设计了一种可在癌细胞内“智能”自组装成纳米药物的策略, 其同时兼具靶向富集和药物缓释的策略为抗MDR的发展提供了新思路。他们设计的“智能”小分子药物为Ac-Arg-Val-Arg-Arg-Cys(StBu)-Lys(taxol)-CBT (CBT-Taxol)。当CBT-Taxol进入Furin酶高表达的癌细胞后, Cys上双硫键被细胞内大量的GSH还原, Ac-Arg-Val-Arg-Arg被Furin剪切脱离, 裸露的Cys与CBT缩合形成环状二聚体, 再通过自组装生成紫杉醇 (taxol) 的纳米粒子 (Taxol-NPs) 并富集在癌细胞中。纳米药物在癌细胞内酯酶作用下缓慢解组装释放出游离的紫杉醇从而杀死癌细胞。

利用中科院生物物理研究所生物成像中心结构光照明超分辨荧光显微镜OMX, 在成像中顺利采集到了尺度在百纳米级的、具备荧光特性的纳米药物在细胞内的富集以及释放等现象, 验证了实验结果。

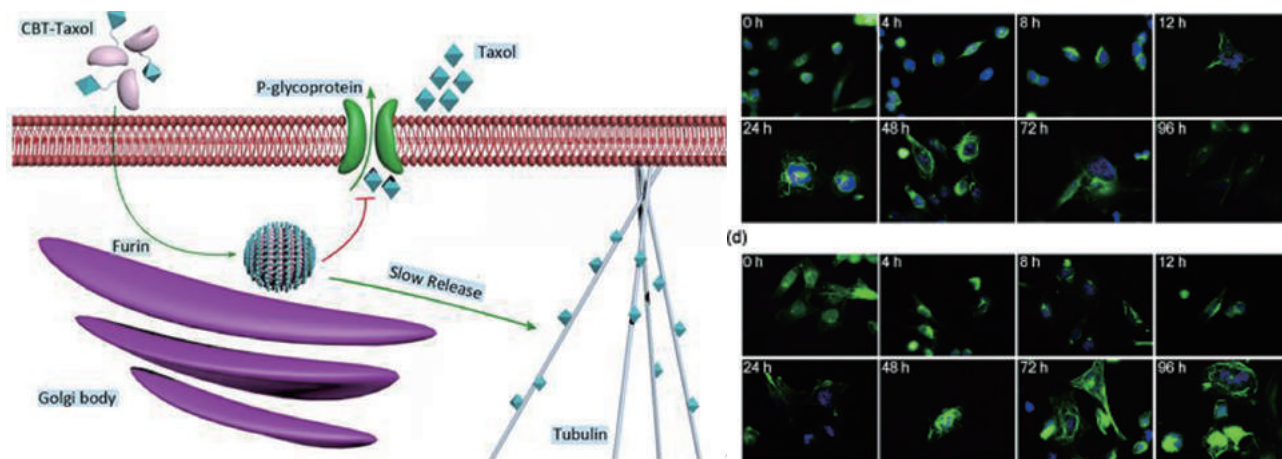


图1. 纳米药物在癌细胞内酯酶作用下缓慢解组装释放出游离的紫杉醇机制原理图及不同时间段纳米药物在细胞内富集的过程

论文发表相关信息:

Yue Yuan, Lin Wang, Wei Du, Zhanling Ding, Jia Zhang, Tao Han, Linna An, Huafeng Zhang, Gaolin Lian(2015). Intracellular Self-Assembly of Taxol Nanoparticles for Overcoming Multidrug Resistance. *Angewandte Chemie International Edition*;54(33):9700-4. doi: 10.1002/anie.201504329. Epub 2015 Jun 26

生物成像中心在该研究中的主要贡献:

生物成像中心的结构光照明超分辨荧光显微镜OMX横向分辨率可达100nm, 可以顺利采集到尺度在百纳米级的、具备荧光特性的纳米药物在细胞内的富集情况, 为验证本实验结果提供了影像佐证。

技术支持: 李硕果

——透射电镜技术、图像处理技术

人类干细胞衰老机理

课题背景:

衰老是人类疾病最大的危险因素，针对衰老的基础和转化医学研究正成为全人类共同关注且亟需解决的重大科学问题。成年早衰症是一种罕见的常染色体隐性遗传病，由WRN基因（编码一种DNA修复/解旋酶）的突变所致。成年早衰症患者自青春期开始提前启动衰老程序，加速呈现出自然衰老的表征并伴发多种老年性疾病。因此，研究成年早衰症对于揭示人类自然衰老的奥秘以及实现防治衰老相关疾病具有重要的科学意义。

来自中科院生物物理所刘光慧课题组以及北京大学、Salk研究所等实验室的研究人员首先提出“组织干细胞的加速衰老（耗竭）可能是人类早衰症的病因”这一科学假设，并通过基因组靶向编辑技术使得人间充质干细胞（MSC）中的WRN基因发生纯合缺失突变，在实验室“制造”出人类早衰症特异的MSC。这些早衰症MSC不仅表现出生长速度减慢、DNA损伤反应加剧和分泌大量炎症因子等衰老指征，而且表现出内层核膜蛋白以及核周异染色质的加速缺失。通过对组蛋白共价修饰、DNA甲基化、以及RNA转录本进行全基因组扫描，研究人员发现早衰症干细胞的异染色质发生了显著的结构退行性变化，主要表现为着丝粒和端粒附近的H3K9me3“山脉”（mountains）的缺失。进一步研究发现，WRN蛋白同异染色质蛋白SUV39H1和HP1共存于一个蛋白复合物中，该复合物具有维持异染色质和核纤层的稳定性以及阻止MSC衰老的作用。WRN的缺失导致异染色质结合蛋白的减少以及着丝粒卫星DNA的转录，进而诱发细胞衰老。通过比较健康老年人和年轻人体内分离的MSC，也可见WRN水平的下调以及核膜蛋白和异染色质结构的异常，提示异染色质的重塑可能是正常细胞衰老的驱动力之一。最后，研究发现过量表达HP1能抑制早衰症细胞的加速衰老，因而为未来干预人类干细胞的衰老提供了可能的分子靶标。

论文发表相关信息:

Zhang, W., Li, J., Suzuki, K., Qu, J., Wang, P., & Zhou, J., et al. (2015). A werner syndrome stem cell model unveils heterochromatin alterations as a driver of human aging. *Science*, 348.

生物成像中心在该研究中的主要贡献:

电镜制样和数据采集以及荧光图像数据分析在生物成像中心完成，丁玮老师、孙磊老师给予了技术支持和技术服务。

技术支持: 丁玮、孙磊

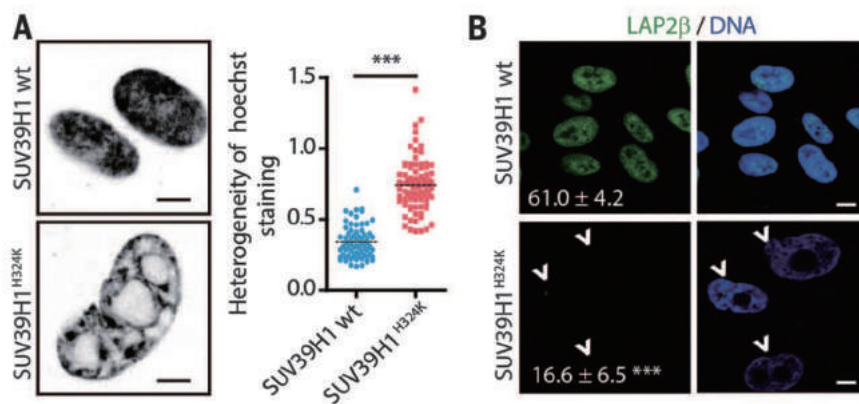


图1. 人间充质干细胞（MSC）中WRN 基因发生纯合缺失突变前后细胞核的形态变化

2. 技术研究（2015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：

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）技术是发展结构生物学和细胞生物学重要的研究手段。该技术可以得到更真实的接近天然状态的细胞内部高分辨率的三维结构以及蛋白质大分子定位及相互作用的信息，是蛋白质组学研究的重要辅助手段被成为“可视化蛋白质组学”（Visual Approach to Proteomic）。常用的样品制备方法—含水冷冻超薄切片技术，存在严重的压缩、振颤、皱缩、断裂以及载网附着能力差等，以及技术难度大，成功率低等问题。人们期望寻找到更理想的样品制备方法。2006年M.Marko等人发现聚焦离子束方法加工的冷冻至玻璃态的生物样品并未出现重结晶现象，由此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方法的探索。

该技术首先需要将细胞样品滴到载网上，经过快速投掷液氮冷却的乙烷中制得玻璃态的冷冻含水样品，然后将样品转移到液氮温度的自制的样品座上，并一起转移进双束扫描电镜样品室低温样品台中，进行FIB减薄操作。制备出的200nm厚的样品转移到低温透射电镜中进行数据成像和收集。图1显示了我們利用聚焦离子束法制备的冷冻含水切片的过程和冷冻含水切片样品的透射电镜照片，可见细胞内部的亚细胞结构，和一些大分子复合物的结构。

实验结果表明，聚焦离子束是可以用以制备生物样品的含水冷冻超薄切片的。然而，要作为一种成熟的技术应用于低温电镜生物样品制备，还有很长的路要走，许多困难与技术难题需要深入探索与克服。

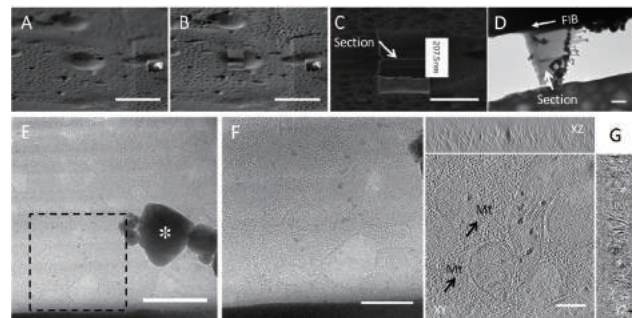


图1.聚焦离子束法制备冷冻含水切片，(A)为载网支持膜上冷冻的细胞，(B)为粗切细胞剩余较厚的切片，(C)精细切割后较薄的切片。(D)低倍下投射电镜观察整个切片的结构(E)中等倍数小观察切片中细胞结构的信息，(F)高倍观察(E)中方框区域的结构(F) IMOD处理电子断层成像数据后SF9细胞线粒体，微管(箭头)和内部大分子复合物。

连续超薄切片扫描电镜成像方法研究

（李喜霞、季刚、陈曦*、马宏图*、张建国、丁玮、孙飞、徐伟）

要想获得细胞、乃至组织层面的大尺度三维结构信息，特别是脑计划的相关研究，需依赖体电子显微学技术的发展。该技术主要是对树脂包埋样品进行连续超薄切片后，再对获得的系列电子显微图像进行高分辨率的大尺度三维重构。目前基于连续超薄切片扫描电镜成像方法（SUSSEM）作为新兴的体电子显微学技术具有其独特的优势：研究尺度最大（毫米级），样品可保存，可重复成像，从而使珍贵的样品可以像图书馆里的图书一样反复“查阅”，且科研人员可针对感兴趣的区域分次研究，从而提高了采集效率和灵活性。同时它还能多台

SEM并行成像，真正实现高通量。

线虫作为一种重要的模式生物，有一些针对其局部组织（如神经元、中段、头部等）的三维结构信息，但目前尚未有整条线虫三维重构的相关报道。我们通过发展SUSSEM这种新技术，可以建立一套完整的线虫三维结构数据库，从而更有利于人们揭示细胞凋亡、细胞分化及发育、衰老等方面的分子机制。

目前我们利用自主研发不断升级优化的连续切片自动收集装置AUTOCUTS（图1）已成功收集多套完整线虫的连续切片，并建立了针对线虫的切片库（图2）。其中每套切片均达2000张以上，切片大小约为 $1.5 \times 1\text{mm}^2$ ，切片厚度约100nm。

利用自动化成像数据采集策略，已成功收集一套完整的线虫扫描电镜背散射图像数据。与自动化所合作，通过相应的算法，以及Amira、IMOD等软件基本已完成整条线虫的三维重构（图3）。

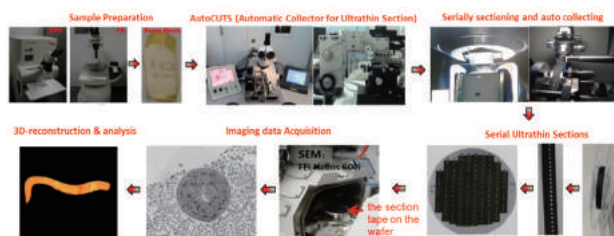


图1.连续超薄切片扫描电镜成像方法解决方案

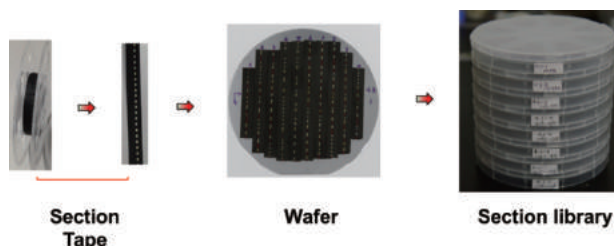


图2. 线虫连续切片数据库

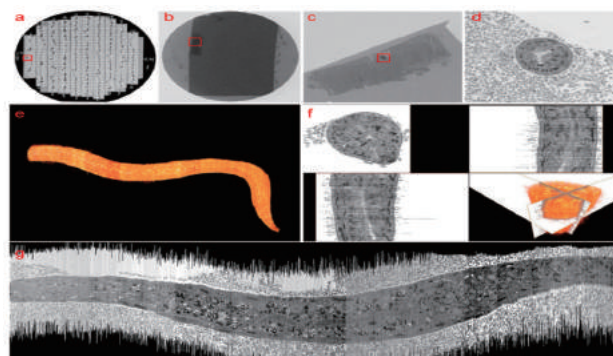


图3. 线虫的三维重构

低温透射电镜高分辨率成像用支持膜的研发

（黄小俊、季刚、范得印、丁玮、孙飞、徐伟）

低温透射电镜单颗粒三维重构技术随着相差矫正电镜的实现、直接电子探测相机的普及，其分辨率提升的限制因素集中在样品制备方面。要制作一个适合获得高分辨三维重构数据的低温电镜样品，除了样品颗粒自身的性质（如全同性、分散性、大小尺寸等）以外，最重要的是承载样品的载网以及铺设在载网上的支持膜。做为承载样品的载网支持膜要求机械强度高、亲水性好、导电性能优良、表面平整、厚度适中、带有微阵列孔洞。现市售的常用微阵列支持膜（Quantifoil和C-flat）在亲水性能、支持膜厚度及导电性能方面都已固定，无法根据样品的具体需要而调整。

生物成像中心自2008年起开始自行制备微阵列支持膜。2012年制备技术已摸索成熟并命名为GIG载网。今年，GIG载网为增强导电性能以及电子束照射时的膜稳定性，开发了纯金膜微孔阵列GiG，如图1所示。同时，其他材质的微孔阵列薄膜也在合作开发中，如非晶态的金属薄膜。除此以外，石墨烯也被尝试替代超薄碳膜作为负载在微孔阵列支持膜的连续薄膜，如图2所示。这种应用石墨烯的载网被命名为GrG载网。

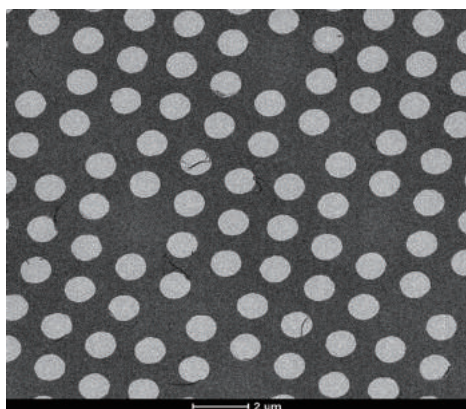


图1. 纯金膜微孔阵列GiG载网。该微孔阵列为内外两圈六角形排布，中间留有聚焦位点。这种局部无序、整体有序的微孔阵列设计大大降低了自动数据收集时低倍定位的错误率，更适合自动tilt pair的数据收集。

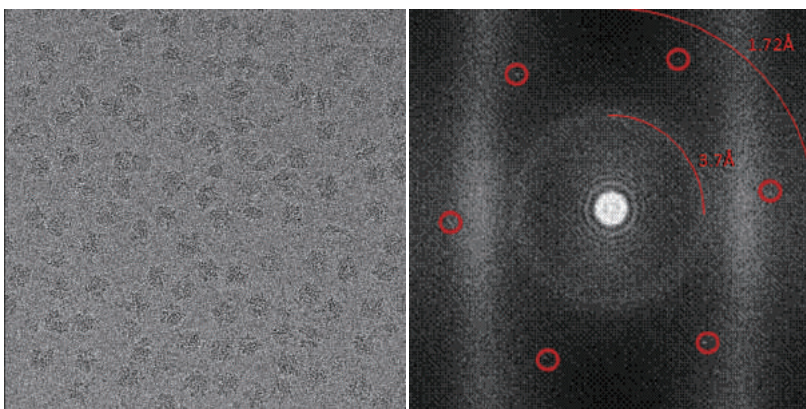


图2 纯化的核糖体样品应用GrG制备的冷冻样品。左图的拍摄条件为FEI Titan Krios (300kV, FEG), 相机FEI Falcon3EC prototype (counting mode, 1e/pix/sec, 30 sec), pixel size 0.86Å。Scale bar=50nm。右图为左图的快速傅立叶变换，其中红圈处为石墨烯的特征性衍射点。

基于高真空光学冷台的光电关联成像方法研究

(李硕果、季刚、黄小俊、孙磊、张建国、丁玮、孙飞、徐伟)

基于高真空光学冷台 (High-vacuum Optical Platform for CLEM (HOPE)) 的光电关联显微成像技术可以有效避免液氮冷台在光学成像或者样品传输过程中对低温样品以及光学物镜的污染、或成像过程中因液氮沸腾对样品造成损伤，引起载物台震动漂移等不利影响。本项目自2014年立项至今，截止目前已经完成了高真空光学冷台的搭建，该系统主体为一个管状高真空光学冷台，样品在高真空环境中温度可长期保持在液氮温度。同时，针对这套系统还设计了一款光电关联定位软件，可以实现快速的光电关联成像匹配，提高了光电关联实验的工作效率。

2015年度本项目主要的攻关方向为进一步提高冷台内高真空度以及减少光学成像过程中真空环境内污染物对低温样品的污染。通过进一步优化冷台设计以及改进真空密封装置，目前该真空腔室内的高真空环境最高已经达到 6×10^{-5} Pa，十分接近电镜内高真空环境。此外，还为这套系统加装了防污染装置，多次重复实验结果显示，目前该高真空冷台的防污染性能已经日趋完善。

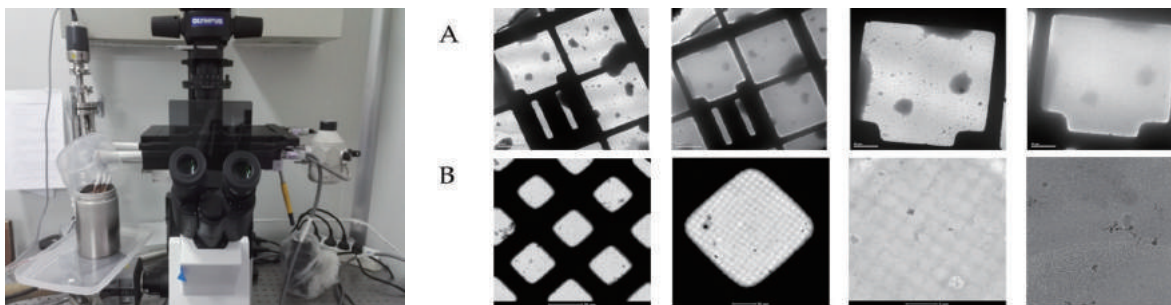


图1.左图：加装防污染器后的 HOPE实物图，右图：HOPE防污染测试结果.图A为未加装防污染器前，低温样品在HOPE内放置15分钟后电镜成像对比结果，左起依次为：放入HOPE前56X电镜成像，放入HOPE后56X电镜成像，放入HOPE前420X电镜成像，放入HOPE后420X成像，对比可以看出未安装防污染器的情况下，低温样品在HOPE内会受到较严重的污染，导致冰层变厚；图B为进一步提升腔室内高真空度以及加装防污染器后，低温样品在HOPE内放置15分钟后从低倍到高倍的电镜图像，结果显示防污染效果良好。

装备运行和技术服务情况

1. 电镜样品制备技术服务

生物成像中心样品制备各仪器运行状况良好，2015年度全年共为用户制备电镜样品354个，对外服务情况统计如下：

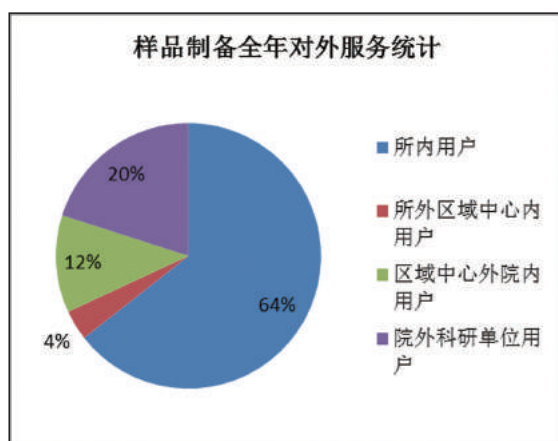


图1. 2015年度样品制备对外服务情况统计

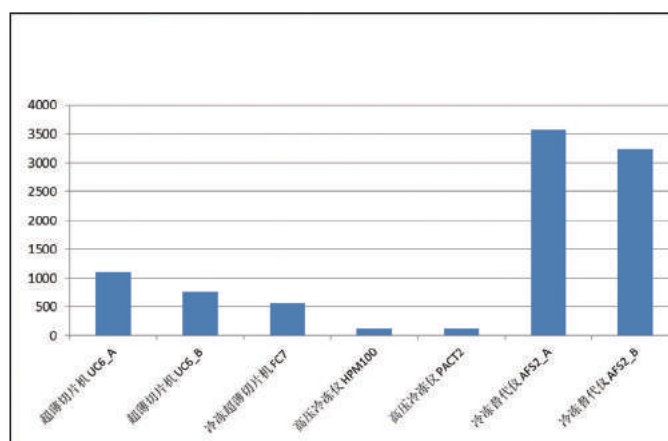


图2. 2015年度样品制备仪器使用情况统计

2015年度样品制备对外技术服务所产生的代表性文章：

1) Zhang WQ, Li JY, Suzuki K, Qu J, Wang P, Zhou JZ, Liu XM, Ren RT, Xu XL, Ocampo A, Yuan TT, Yang JP, Li Y, Shi L, Guan D, Pan HZ, Duan SL, Ding ZC, Li M, Yi F, Bai RJ, Wang YY, Chen C, Yang FQ, Li XY, Wang ZM, Aizawa E, Goebel A, Soligalla RD, Reddy P, Esteban CR, Tang FC, Liu GH, Izpisua Belmonte JCI. (2015) A Werner syndrome stem cell model unveils heterochromatin alterations as a driver of human aging. *Science*. 348(6239): 1160-3

2) Qiu XF, Zhu QW, Sun JY. (2015) Quantitative analysis of vesicle recycling at the calyx of Held synapse. *PNAS*. 112(15):4779-84

3) Liu B, Xue Y, Zhao W, Chen Y, Fan C, Gu L, Zhang Y, Zhang X, Sun L, Huang X, Ding W, Sun F, Ji W, Xu T. (2015) Three-dimensional super-resolution protein localization correlated with vitrified cellular context. *Sci Rep*. 14;5:13017. doi: 10.1038/srep13017.

4) Zhou X, Fu X, Lin C, Liu J, Wang L, Zhang X, Zuo M, Fan X, Li D, Sun Y. (2015) Deafening-driven dendritic spine remodeling in the avian vocal motor cortex is dependent on the basal ganglia circuit. *ELIFE*. no: 22-07-2015-ralife-10295

5) Jing Wang, Wen Zhu, Lixin Liu, Yongming Chen, Chun Wang. (2015) Synthesis and Cellular Internalization of Spindle Hematite/Polymer Hybrid Nanoparticles. *ACS Applied Materials & Interfaces*. 7: 5454-61

6) Li Dong, Xiaoyan Yang, Wen Gu, Kangfeng Zhao, Huizheng Ge, et al. (2015) Connexin 43 mediates PFOS-induced apoptosis in astrocytes. *Chemosphere*. 132: 8-16

7) Zhou L, Yu H, Ai G, Zhang B, Hu S, Dong X. (2015) Transcriptomic and physiological insights into the robustness of UASB granule-prevalent long filamentous cells of *Methanosaeta harundinacea*. *Appl Environ Microbiol*. 81: 831-839

8) Jingyang Wang, Hui Zhou, Hua Lu, Ting Du, Yuanming Luo, Iain B.H. Wilson, Cheng Jin. (2015) Kexin-like endoprotease KexB is required for N-glycan processing morphogenesis and virulence in *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet Biol*. 76:57-69

9) Li XM, Feng HL, Zhang JG, Sun L, Zhu P. (2015) Analysis of chromatin fibers in HeLa cells with electron tomography. *Biophysics Reports*. 1(1):51-60

2. 透射电镜运行服务 (FEI Titan Krios)

FEI Titan Krios自2014年11月16日至2015年10月15日的总服务机时为5741小时，使用效率为358.81%（按年平均使用机时1600小时计算）。

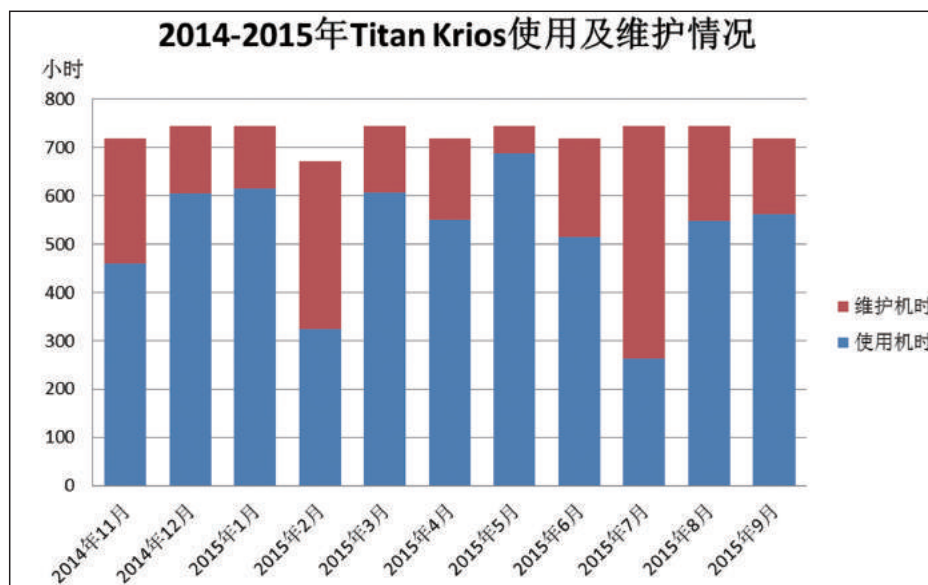


图1.2015年度Titan Krios使用及维护情况

2015年度重要的升级维护事件总结如下：

时间	升级/维护内容
4月8日-4月10日	Autoloader dewar加热装置维修
7月13日-7月17日	直接电子探测相机Falcon3EC安装、软件系统升级、硬件调试
7月18日-7月31日	Falcon3EC数据传输及处理的系列软件调试，及数据收集测试
全年uptime比例为97%	

2015年度在该仪器上产生的代表性文章:

- 1) Hongrong Liu, Lingpeng Cheng (2015).Cryo-EM shows the polymerase structures and a nonspooled genome within a dsRNA virus. Science 349(6254):1347-1350
- 2) Liu B, Xue Y, Zhao W, Chen Y, Fan C, Gu L, Zhang Y, Zhang X, Sun L, Huang X, Ding W, Sun F, Ji W, Xu T(2015).Three-dimensional super-resolution protein localization correlated with vitrified cellular context. Sci Rep 5:13017
- 3) Han R, Wang L, Liu Z, Sun F, Zhang F.(2015).A novel fully automatic scheme for fiducial marker-based alignment in electron tomography.Journal of Structural Biology, in press
- 4) Xiaomin Li , Hongli Feng , Jianguo Zhang, Lei Sun, Ping Zhu(2015).Analysis of chromatin fibers in Hela cells with electron tomography. Biophysics Reports1 (1) : 51-60
- 5) Wang CY, Zhang QF, Gao YZ, Zhou XP, Ji G, Huang XJ, Hong J, Zhang CX (2015) . Insight into the three-dimensional structure of maize chlorotic mottle virus revealed by Cryo-EM single particle analysis. Virology(2015); Nov;485:171-8

3. 透射电镜运行服务 (FEI Talos)

FEI Talos自2014年11月16日至2015年10月15日的总服务机时为3532小时。

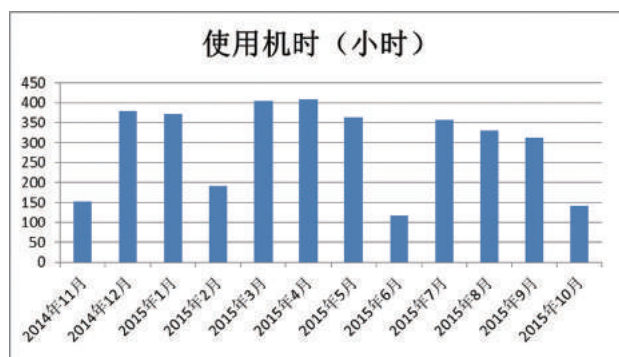


图1.2015年度Talos使用及维护情况

2015年度重要的升级维护事件总结如下:

日期	故障内容
2015.3.6	与荷兰建立远程通讯
2015.3.17	数据自动收集过程中物镜光阑出现极大偏移
2015.3.27	触摸屏死机, 断电重启
2015.4.26	新626样品杆真空密封出现问题, 样品杆无法保持长时间低温, 报修
2015.4.27	屋顶空调漏水, 房间湿度较大
2015.4.11	新626出现升温现象
2015.5.1	Talos房间安装除湿系统
2015.5.15	触摸屏Reset Stage无响应, 重启后保险丝烧断, 更换保险丝
2015.5.17	检查样品过程中Stage无法移动, 重启软件后恢复
2015.6.16	水循环故障
2015.6.17	通讯故障, 无法控制聚光镜和物镜光阑, 找不到光 (Optics: Boards Degraded)
2015.7.6	更换控制板, 光阑无法自动控制, 电镜恢复使用
2015.7.10	找不到光 (Optics: Boards Degraded), 插拔电源线, 重启后恢复
2015.11.10	安装新相机DE20

2015年度在该仪器上产生的代表性文章:

1) Peng S, Gao J, Liu Y, Guo DS. Facile fabrication of cross-linked vesicle via "surface clicking" of calixarene-based supra-amphiphiles. Chem Commun (Camb). 51(92):16557-60

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

FEI Tecnai 20和FEI Tecnai Spirit自2014年11月16日至2015年10月15日的总服务机时分别为1012.56小时和2281.47小时, 对外服务情况统计见下图:

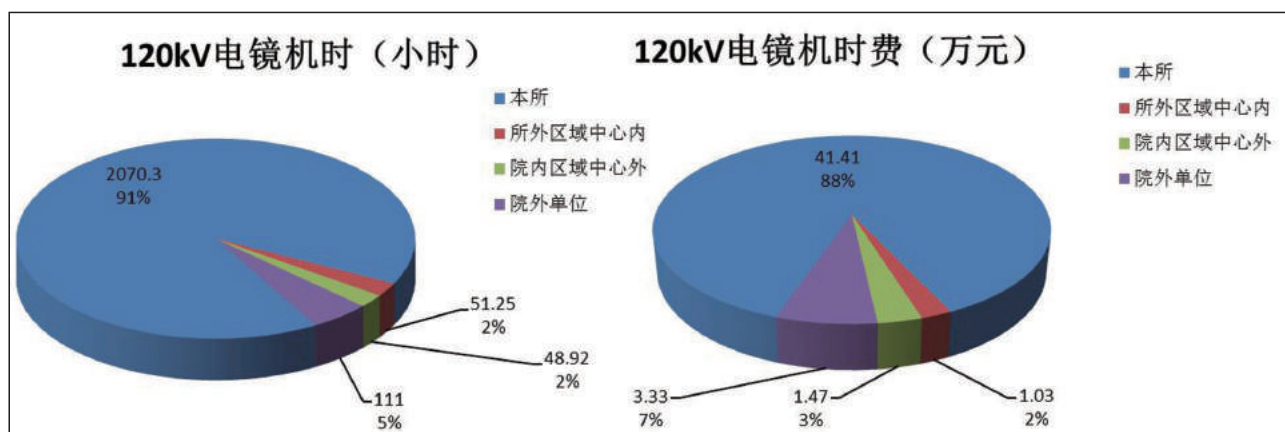


图1.2015年FEI Tecnai Spirit对外服务情况统计

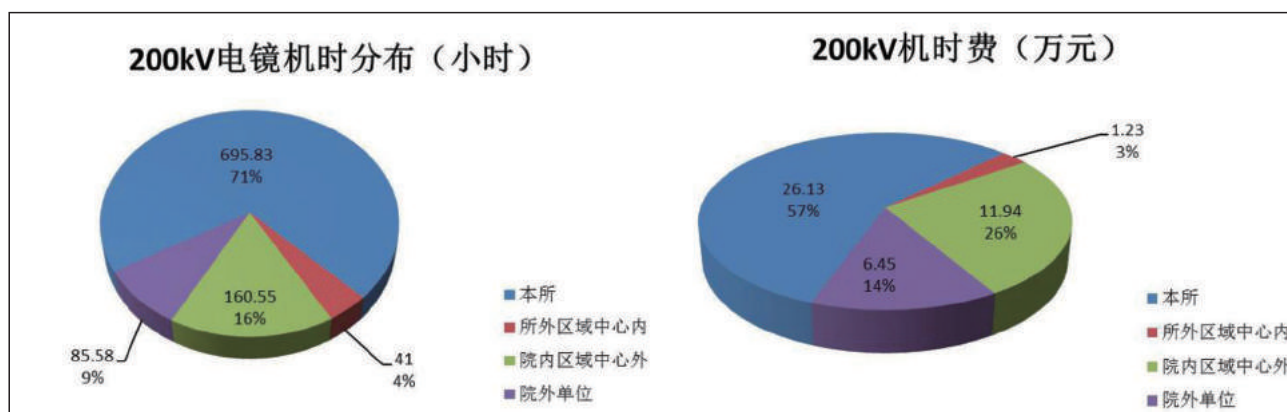


图2.2015年FEI Tecnai 20对外服务情况统计

5. 扫描电镜运行服务 (FEI Helios NanoLab 600i)

双束扫描电镜于2012年10月安装调试完成开始对外服务，截止目前仪器运行状态良好。

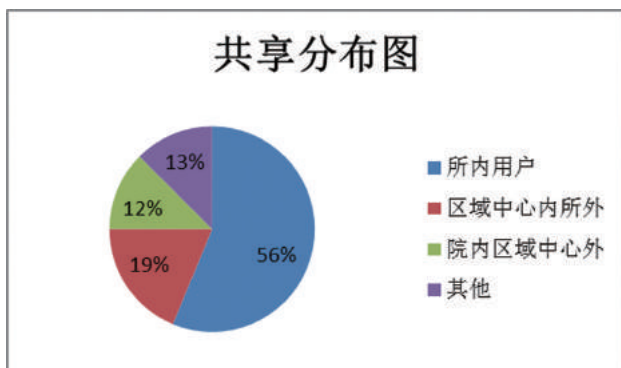


图1. 双束扫描电镜2014年11至2015.10月所内外共享情况统计图

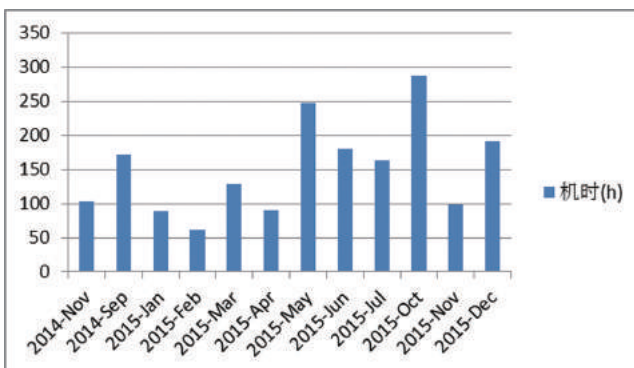


图2. 双束扫描电镜2014.11至2015.10机时情况统计图

升级更换设备:

试剂耗材方面: 在运行了一年多时间分别在2015年3月更换了两次离子源、离子枪吸取极和光阑条。

2015年度在该仪器上产生的代表性文章:

- 1) Xufeng Qiu, Qianwen Zhu, Jianyuan Sun, Quantitative analysis of vesicle recycling at the calyx of Held synapse, Proc Natl Acad Sci, 2015. 112(15):4779-84
- 2) Xiaomin Li, Hongli Feng, Jianguo Zhang, Lei Sun, Ping Zhu (2015). Analysis of chromatin fibers in HeLa cells with electron tomography. Biophysics Reports 1 (1): 51-60

6. 扫描探针显微镜运行服务 (Nanoscope IIIa Multimode)

Nanoscope IIIa Multimode扫描探针显微镜是2004年引进的，截至目前已经运行十一年。虽然仪器型号已经

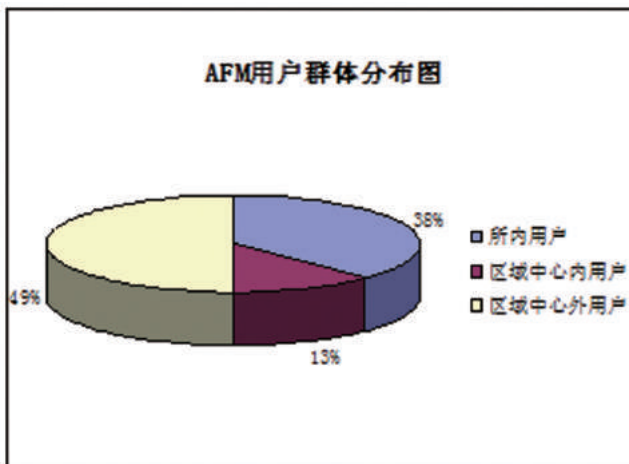
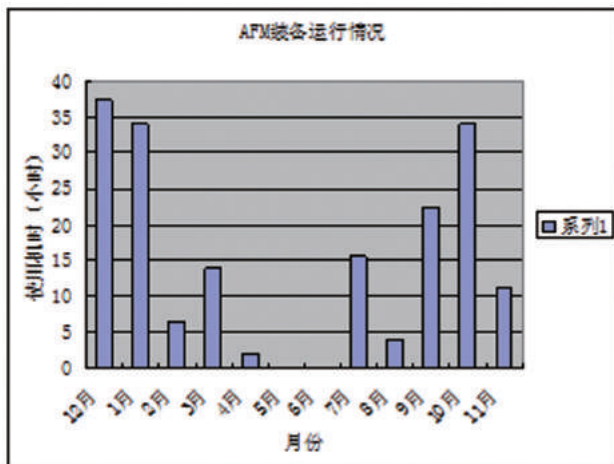


图1. 2015年AFM对外服务情况统计及用户群体分布图

明显落后，但是由于我们掌握了溶液中成像技术，能够比空气中成像在更大程度上保持生物样品的天然状态，因此吸引了许多外单位甚至是外地用户慕名而来，比如南京大学、沈阳药科大学、华中农业大学、福州总医院、中国农业大学、军科院四所、大连理工大学、昆明动物所等。2015-2016年度该仪器对外服务统计情况如下：

2015年度在该仪器上产生的代表性文章：

1) Ling Li, Fangfang Zhao, Baojing Zhao, Jin Zhang, Chao Li, Renzhong Qiao. Chitosan Grafted with Phosphorylcholine and Macrocyclic Polyamine as an Effective Gene Delivery Vector: Preparation, Characterization and In Vitro Transfection (2015) .Macromolecular Bioscience, 15: 912-926

2) Fuguo Liu, Cuixia Sun, Di Wang, Fang Yuan and Yanxiang Gao. RSC Advances 2015, 5: 78215-78228

3) Xiaocui Fang, Tao Yang, Luoyang Wang, Jibing Yu, Xiuli Wei, Yinjian Zhou, Chen Wang, Wei Liang. Nano-cage-mediated refolding of insulin by PEG-PE micelle (2016) .Biomaterials, 77: 139-148

7. 激光共聚焦显微镜运行服务

生物成像中心现配备激光扫描共聚焦显微镜、转盘共聚焦显微镜、双光子、活细胞工作站多种荧光显微镜设备，可以满足多领域科研需求。2015-2016年度运行总机时近7500小时，承检3505个有效预约单。对所内47个课题组，所外13个单位25个课题组提供服务，具体对外服务情况统计如下：

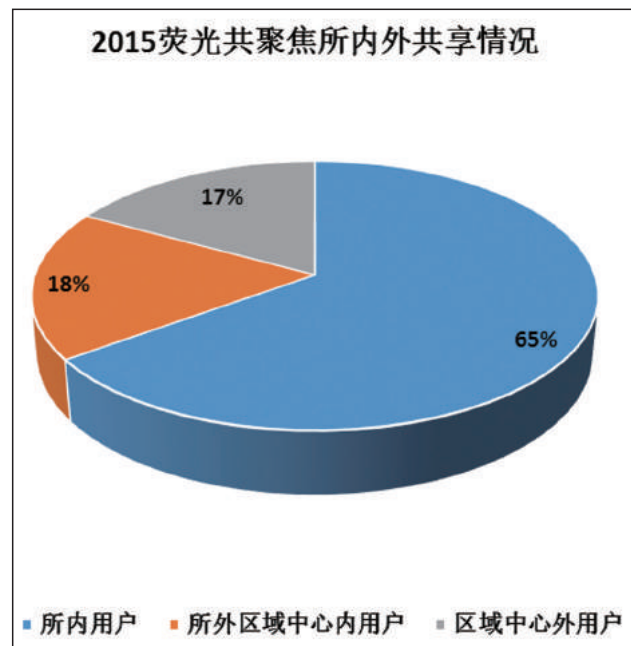
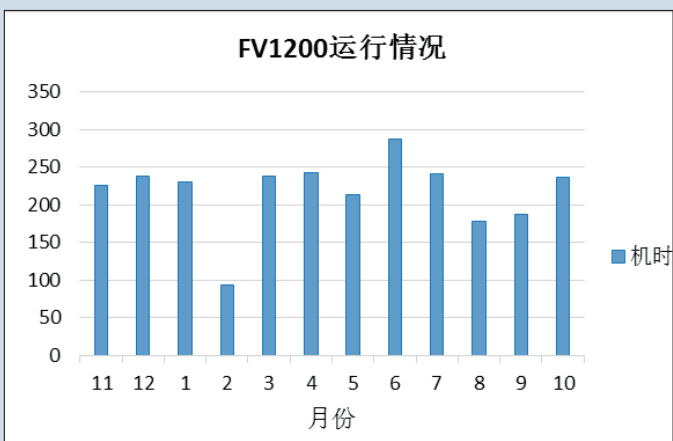
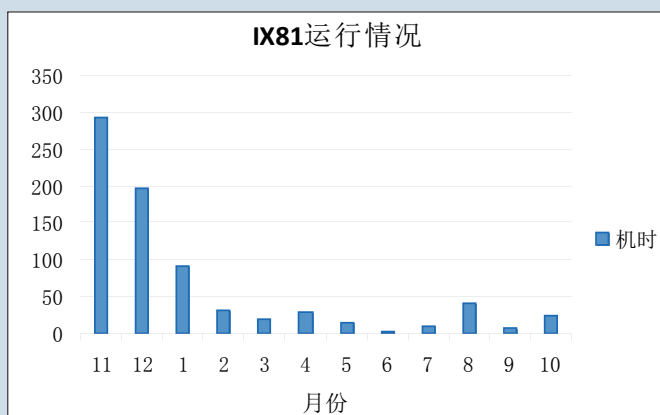


图1.2015年激光共聚焦显微镜所内外共享情况统计

2015年度各仪器对外服务机时统计及重要升级维护事件总结如下：

仪器名称	设备维护维修情况		使用机时统计（2014. 11-2015. 10）																										
	具体时间	内 容																											
激光共聚焦显微镜Olympus FV1000	2015.01.20	安装新购置635nm激光器	<p>FV1000运行情况</p> <table border="1"> <caption>FV1000 Usage Hours (Estimated)</caption> <thead> <tr><th>月份</th><th>机时</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>11</td><td>150</td></tr> <tr><td>12</td><td>210</td></tr> <tr><td>1</td><td>240</td></tr> <tr><td>2</td><td>70</td></tr> <tr><td>3</td><td>220</td></tr> <tr><td>4</td><td>250</td></tr> <tr><td>5</td><td>170</td></tr> <tr><td>6</td><td>240</td></tr> <tr><td>7</td><td>280</td></tr> <tr><td>8</td><td>240</td></tr> <tr><td>9</td><td>160</td></tr> <tr><td>10</td><td>130</td></tr> </tbody> </table>	月份	机时	11	150	12	210	1	240	2	70	3	220	4	250	5	170	6	240	7	280	8	240	9	160	10	130
	月份	机时																											
	11	150																											
	12	210																											
	1	240																											
2	70																												
3	220																												
4	250																												
5	170																												
6	240																												
7	280																												
8	240																												
9	160																												
10	130																												
2015.03.24	汞灯更换																												
2015.10.20	更换UPS风扇																												
2015.10.27	光路调试																												
2015.11.07	新刷卡系统按装调试																												
双光子显微镜Olympus FV1000 MPE	2015.02.04	更换汞灯	<p>双光子运行情况</p> <table border="1"> <caption>双光子 Usage Hours (Estimated)</caption> <thead> <tr><th>月份</th><th>机时</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>11</td><td>45</td></tr> <tr><td>12</td><td>145</td></tr> <tr><td>1</td><td>120</td></tr> <tr><td>2</td><td>60</td></tr> <tr><td>3</td><td>40</td></tr> <tr><td>4</td><td>115</td></tr> <tr><td>5</td><td>20</td></tr> <tr><td>6</td><td>15</td></tr> <tr><td>7</td><td>60</td></tr> <tr><td>8</td><td>65</td></tr> <tr><td>9</td><td>70</td></tr> <tr><td>10</td><td>35</td></tr> </tbody> </table>	月份	机时	11	45	12	145	1	120	2	60	3	40	4	115	5	20	6	15	7	60	8	65	9	70	10	35
	月份	机时																											
	11	45																											
	12	145																											
	1	120																											
	2	60																											
3	40																												
4	115																												
5	20																												
6	15																												
7	60																												
8	65																												
9	70																												
10	35																												
2015.03.04	制冷系统维修																												
2015.05.04	更换干燥剂优化功率																												
2015.05.08	光斑偏离中心调光路																												
2015.06.23	更换新的制冷系统																												
2015.11.07	新刷卡系统按装调试																												
2015.11.09	25x 镜头到货安装																												
高速转盘荧光成像系统Andor Revolution	2015.06.18	操作软件重新设置安装	<p>转盘共聚焦运行情况</p> <table border="1"> <caption>转盘共聚焦 Usage Hours (Estimated)</caption> <thead> <tr><th>月份</th><th>机时</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>11</td><td>115</td></tr> <tr><td>12</td><td>25</td></tr> <tr><td>1</td><td>60</td></tr> <tr><td>2</td><td>30</td></tr> <tr><td>3</td><td>70</td></tr> <tr><td>4</td><td>110</td></tr> <tr><td>5</td><td>90</td></tr> <tr><td>6</td><td>45</td></tr> <tr><td>7</td><td>105</td></tr> <tr><td>8</td><td>70</td></tr> <tr><td>9</td><td>60</td></tr> <tr><td>10</td><td>60</td></tr> </tbody> </table>	月份	机时	11	115	12	25	1	60	2	30	3	70	4	110	5	90	6	45	7	105	8	70	9	60	10	60
	月份	机时																											
	11	115																											
	12	25																											
1	60																												
2	30																												
3	70																												
4	110																												
5	90																												
6	45																												
7	105																												
8	70																												
9	60																												
10	60																												
2015.08.13	激光器移出防震台																												
2015.10.30	拷贝出配置文件，系统重装																												
2015.11.07	新刷卡系统按装调试																												

多功能活细胞 工作站IX81 MicroPoint	2014.12.16	435染料及染料池 到货，并安装调试
	2015.01.30	光纤出光后照明 不均匀，更换光 纤
	2015.03.24- 04.21	培养室的盖子不 能加热，重新更 换
	2015.08.12	DG4光路偏移调 节
	2015.11.07	新刷卡系统按装 调试
	2014.12.16	435染料及染料池 到货，并安装调试
激光共聚焦显 微镜Olympus FV1200	2015.03.24	更换汞灯
	2015.05.04	软件升级至4.2
	2015.05.13	触摸屏控制器 (TPC) 操作系统 升级
	2015.08.26	更换 汞灯
	2015.10.27	接收光谱误差 10nm，调试光栅 的位置
	2015.11.07	新刷卡系统按装 调试
	2015.11.09	150x物镜到货安 装



2015年度在荧光显微成像设备上所产生的代表性文章:

1) Zhouliang Yu, Xiang Zhou, Wenjing Wang, Wenqiang Deng, Junnan Fang, Hao Hu, Zichen Wang, Shangze Li, Lei Cui, Jing Shen, Linhui Zhai, Shengyi Peng, Jiemin Wong, Shuo Dong, Zengqiang Yuan, Guangshuo Ou, Xiaodong Zhang, Ping Xu, Jizhong Lou, Na Yang, Ping Chen, Rui-Ming Xu, and Guohong Li. Dynamic Phosphorylation of CENP-A at Ser68 Orchestrates Its Cell-Cycle-Dependent Deposition at CentromeresStem (2015). *Developmental Cell*. Jan 12;32(1):68-81

2) Junnan Fang, Yuting Liu, Yun Wei, Wenqiang Deng, Zhouliang Yu, Li Huang, Yan Teng, Ting Yao, Qinglong You, Haihe Ruan, Ping Chen, Rui-Ming Xu, and Guohong Li. Structural transitions of centromeric chromatin regulate the cell cycle-dependent recruitment of CENP-N (2015). *Genes & Development*. May 15;29(10):1058-73

3) Pingping Zhu, Yanying Wang, Ying Du, Lei He, Guanling Huang, Geng Zhang, Xinlong Yan & Zusen Fan. C8orf4 negatively regulates self-renewal of liver cancer stem cells via suppression of NOTCH2 signalling (2015). *Nature Communications*. May 19;6:7122

4) Pengyan Xia, Shuo Wang, Buqing Ye, Ying Du, Guanling Huang, Pingping Zhu & Zusen Fan. Sox2 functions as a sequence-specific DNA sensor in neutrophils to initiate innate immunity against microbial infection (2015). *Nature immunology*. Apr;16(4):366-75

5) Sheng Shen, Xing Jia, Haitao Guo and Hongyu Deng. Tegument protein ORF33 of a gammaherpesvirus is associated with intranuclear capsids at an early stage of tegumentation process (2015). *J Virol*. May;89(10):5288-97

6) Congping Shang, Zhihui Liu, Zijun Chen, Yingchao Shi, Qian Wang, Su Liu, Dapeng Li, Peng Cao. parvalbumin-positive excitatory visual pathway to trigger fear responses in mice (2015). *Science*. Jun 26;348(6242):1472-7

8. 结构光照明超高分辨率荧光显微镜运行服务 (Delta Vision OMX)

生物成像中心结构光照明超分辨荧光显微镜OMX 2014年11月至2015年10月运行总机时885小时，服务所内15个课题组，所外11个科研单位，对外服务情况统计如下：

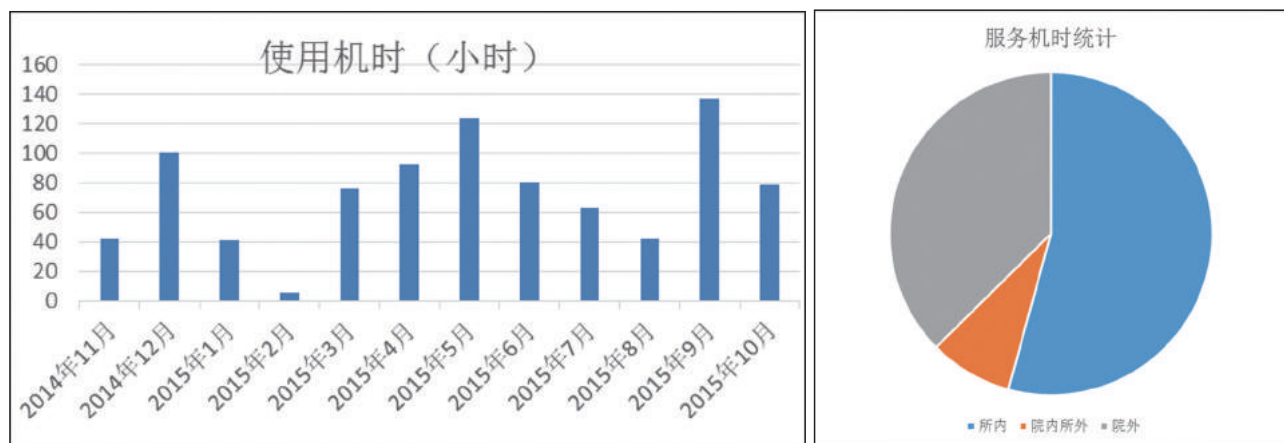


图1.2015年结构光照明超分辨荧光显微镜OMX对外服务机时统计及用户群体分布

2015-2016年度在该仪器上所产生的代表性文章:

1) Yue Yuan, Lin Wang, Wei Du, Zhanling Ding, Jia Zhang, Tao Han, Linna An, Huafeng Zhang, Gaolin Liang(2015).Intracellular Self-Assembly of Taxol Nanoparticles for Overcoming Multidrug Resistance (2015) . Angewandte Chemie International Edition; 54(33):9700-4

9. 数据处理相关服务（高性能计算服务站）

2015年度（从2014年11月13日至2015年10月15日），生物成像中心高性能计算服务站的有效服务机时为687万CPU小时，按可用机时为950万CPU小时算（330*24*1200），使用效率为72%；服务对象包括本研究所多个领域，其中最主要的是生物大分子（及其复合物）结构的电镜三维重构领域，比如孙飞、朱平等研究组。2015-2016年度对外服务及用户群体分布情况见下图：

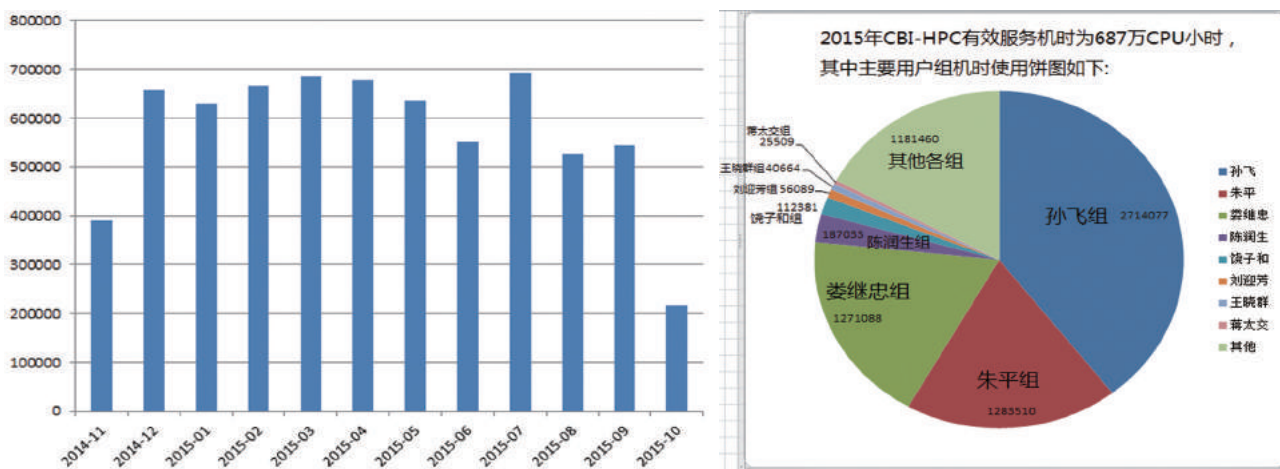


图1.2015年高性能计算服务站对外服务机时统计及用户群体分布

仪器更新升级情况:

新购置了存储容量为340T的并行存储系统“曙光Parastor-200”，由1个万兆交换机，2个索引服务器，以及6个数据存储服务器组成，系统实物图见下图：

在该仪器上所产生的代表性文章:

1) Shenghai Chang, Dapeng Sun, Huanhuan Liang, Jia Wang, Jun Li, Lu Guo, Xiangli Wang, Chengcheng Guan, Bhargavi M. Boruah, Lingmin Yuan, Feng Feng, Mingrui Yang, Lulan Wang, Yao Wang, Justyna Wojdyla, Lanjuan Li, Jiawei Wang, Meitian Wang, Genhong Cheng, Ho(2015).Cryo-EM Structure of Influenza Virus



图2.新购置的存储容量为340T的并行存储系统“曙光Parastor-200”

RNA Polymerase Complex at 4.3 Å Resolution. *Molecular Cell*57(5):925-35

2) Li X, Feng H, Zhang J, Sun L, Zhu P*. (2015) Analysis of Chromatin Fiber in HeLa Cell with Electron Tomography. *Biophys. Report*, 2015, 1(1):51–60 (*corresponding author)

3) Li Z, Qi X, Ren X, Cui L, Wang X*, Zhu P*. (2015) Molecular characteristics and evolutionary analysis of a very virulent infectious bursal disease virus. *Sci China Life Sci*, Vol.58 No.8: 731–738 (*corresponding author)

学术交流活动

中国科学院生物物理研究所生物成像中心近年来积极开展与国内外专家的学术和技术交流活动，2015年度本中心主办（承办）了“中国结构生物学冷冻电镜培训班”、“国际冷冻电子显微镜高级图像处理研讨会”和“2015年细胞电镜冷冻制样及成像高级研讨班”三次培训课程，并先后邀请西班牙国家生物技术中心终身教授Jose Maria Salvador Carazo Garcia博士、徕卡公司超分辨荧光显微技术工程师来生物物理所做学术报告。同时，生物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. 生物成像中心主办（承办）活动

（1）中国结构生物学冷冻电镜培训班

由中国生物物理学会、中科院生物物理研究所、清华大学和FEI公司联合主办的第一次中国结构生物学冷冻电镜培训班（Get acquainted with Cryo-Electron Microscopy: First Chinese Workshop for Structural Biologists）

Get acquainted with Cryo-Electron Microscopy: First Chinese Workshop for Structural Biologists
2015/May/29-June/3



于2015年5月29日-6月3日在北京顺利举行。本次培训班主任由中科院生物物理所孙飞研究员、清华大学王宏伟教授和美国FEI公司Marc Storms博士担任，讲授队伍来自中科院生物物理所、清华大学、北京大学、中科院上海生化细胞所、中国科技大学、英国剑桥大学LMB实验室和FEI公司等工作在冷冻电镜一线的教授和工程师们，并精心地为学员们准备了包括讲义、课件、学习资料、实习材料和数据在内的教学材料。本次培训班得到了FEI公司的独家赞助和大力支持。

作为生物大分子结构研究的手段之一，冷冻电子显微镜三维重构技术，尤其是单颗粒三维重构技术（SPA），近期取得了非常瞩目的成果。近两年来，利用SPA技术解析的重要生物大分子复合体层出不穷，分辨率也日益提高。在此契机下，中国生物物理学会生物超微结构显微成像专业委员会与FEI公司进行合作，利用中科院生物物理研究所和清华大学生命科学学院在国际上领先的冷冻电子显微平台，联合发起了此次培训班，旨在为零基础学员提供全面了解和学习电镜三维重构理论和技术的机会，系统地将冷冻电镜前沿技术带给国内的相关研究人员，特别是X射线晶体学、NMR等非电镜领域的专家学者和学生们。这无疑将极大地推动我国冷冻电镜和结构生物学领域的发展。

培训班为期四天，包括上午讲座报告、下午实际操作和上机实习、以及晚上的答疑讨论会。来自全国百余学员参加了此次培训活动。5月30日上午，北京大学的尹长城教授对冷冻电镜的发展历史、现状进行总结并对未来的发展进行展望，提出电镜技术已经进入“黄金时代”。随后，清华大学的王宏伟教授和中国科技大学的蔡刚教授分别对负染色和冷冻两种电镜制样方法进行了非常详尽的介绍。5月31日上午，清华大学的雷建林教授详细讲解了透射电子显微镜（TEM）的光学系统、成像原理等关键理论，FEI公司的应用工程师王庆博士则介绍了如何操作电镜，如何进行拍照成像等具体的工作流程。6月1日上午，清华大学的高宁教授介绍了如何评估电镜数据质量，李雪明教授介绍了目前最前沿的直接电子探测相机技术及其相关的motion校准技术，英国MRC的白晓晨博士分享了解析高分辨率电镜结构涉及到从前期制样到后期图像处理的大量技术细节。利用前三天下午的实习操作时间，学员们不仅零距离看到工程师们现场演示制作电镜样品和电镜操作，而且还亲自练习制样方法并实际操作电镜。6月2日，中科院生物物理所的孙飞研究员、中科院上海生化细胞所的丛尧教授介绍了单颗粒三维重构的基础知识和原理，中科院生物物理所的朱平研究员系统讲解了如何对重构结果进行分析和展示。2日下午学员们在老师们的指导下上机练习了两个冷冻电镜三维重构软件EMAN2和Relion，对三维重构的流程有了更加直观的认识。除此之外，每天晚上的讨论会，学员们都带着问题来的，互动交流的主动性很高，积极发言，深入讨论，将白天所学知识消化掌握，反响很好。

经过四天的学习和实践，绝大多数学员反映自己在此次培训中收获很大，基本了解并部分掌握了冷冻电镜三维重构技术的研究流程，很多知识都可以应用到自己的实际研究工作中。

本次培训班圆满地完成了教学任务，很好地实现了培养目标。

（2）国际冷冻电子显微镜高级图像处理研讨会

由中国生物物理学会、清华大学、中科院生物物理研究所联合主办的国际冷冻电子显微镜高级图像处理研讨会（International Workshop of Advanced Image Processing of Cryo-Electron Microscopy 2015）于2015年6月3日-6月7日在北京顺利举行。

本次研讨会由清华大学隋森芳教授担任组委会主席，由清华大学王宏伟教授、中科院生物物理所孙飞研究员共同担任执行主席。教师队伍来自MRC分子生物学实验室（英国）、Brandeis University（美国）、University of Colorado Boulder（美国）、脑科学MPI研究所（德国）、University of Basel（瑞士）等多所国外

大学与研究机构。研讨会为期五天，包括上午讲座报告、下午软件操作与上机实习、及晚上的答疑讨论会，围绕近原子分辨率单颗粒重构技术、三维模型建立与精修、电子断层扫描与sub-tomo平均计算等主要议题，分别就DED图像的信息分析与处理方法、单颗粒锐化及电子密度图校正、低分辨率冷冻电镜图像的模型建立与验证、冷冻电镜图谱原子模型的搭建、近原子分辨率冷冻电镜图谱的结构细化与验证、电子断层扫描技术的理论与原理、电子断层扫描数据



采集与处理中重要影响因素、sub-tomo平均计算的流程与应用、及其理论、方法与前景等多项话题展开深入的交流与细节探讨。来自日本、印度、美国等多个国家一百四十余名学员参加了本次研讨会，反响热烈。

作为生物大分子结构研究的重要手段之一，冷冻电子显微镜技术近年来取得了非常瞩目的成果，分辨率获得极大提高。在此契机下，中国生物物理学会生物超微结构显微成像专业委员会与FEI等公司进行合作，利用中科院生物物理研究所与清华大学生命科学学院在国际上领先的冷冻电子显微镜平台，联合发起中国结构生物学冷冻电镜培训班与国际冷冻电子显微镜高级图像处理研讨会，不仅为零基础学员提供全面了解和学习电镜三维重构理论与技术的机会，同时为电镜结构生物学领域青年科学家们系统地介绍冷冻电镜前沿技术与图像处理最新研究方法与进展，积极促进国际交流与合作，极大的推动我国冷冻电子显微镜和结构生物学领域的进步与发展。

（3）2015年细胞电镜冷冻制样及成像高级研讨班

由中国生物物理学会、中国科学院生物物理研究所生物成像中心、徕卡仪器有限公司、FEI公司共同主办的细胞电镜冷冻制样及成像高级研讨班（Advanced Workshop of Cryo Cellular Electron Microscopy）于2015年9月23日至25日在生物物理所成功举办。此次研讨班特别邀请到了来自徕卡仪器有限公司、FEI公司、Diatome公



司、Nexperion e.U.公司，以及中国科学院生物物理研究所生物成像中心的技术专家提供大会报告和培训指导。

在9月23日的会议报告上，中国科学院生物物理研究所和徕卡仪器有限公司的相关领导做开场发言，生物物理所科学研究平台韩玉刚主任发言表示：徕卡公司与科学研究平台共同组织学术活动，为平台发展和建设起到了积极作用。徕卡仪器有限公司生命科学部许英杰经理也指出：科技创新，离不开高精尖的科研仪器和实验技术。之后，投入式快速冷冻仪Leica EM GP的设计者、来自Nexperion e.U.公司的Guenter Resch博士；被誉为“超薄切片第一人”、来自Diatome公司的技术专家Helmut Gnaegi；FEI公司的技术专家Ben Lich博士、王庆博士；徕卡公司的技术专家Cveta Tomova博士、童艳丽、张艾敬作为主讲人，为大家介绍了细胞电镜冷冻制样前沿相关的高压冷冻技术、冷冻替代技术、投入式快速冷冻技术、冷冻超薄切片技术以及低温电镜数据收集和图像处理技术。生物物理所生物成像中心孙飞主任也受邀做了题为《连续切片扫描电镜成像方法在线虫大尺度三维重构中的应用研究》的报告，为大家介绍了生物成像中心在大尺度高通量连续切片扫描电镜数据收集方面的最新技术和研究成果。会议报告内容精彩纷呈，报告之后的提问环节也十分热烈。

9月24日和25日的学员上机实训，包括了高压冷冻、冷冻替代、冷冻超薄切片以及投入式快速冷冻技术等细胞电镜冷冻制样方法中最重要的几大技术。Guenter Resch博士对学员进行了徕卡最新一代投入式快速冷冻仪Leica EM GP的使用操作培训；徕卡公司Cveta Tomova博士和生物成像中心孙磊高级工程师对学员进行了徕卡最新一代高压冷冻仪Leica EM ICE的使用培训；Diatome公司技术专家Helmut Gnaegi及生物物理所薛艳红高级工程师负责冷冻超薄切片技术培训；徕卡公司应用工程师张艾敬以及生物成像中心李喜霞博士负责冷冻替代技术培训。

此外，本次培训还包括了冷冻透射电镜断层扫描数据收集与图像处理技术，生物成像中心提供了一台200kV场发射透射电镜FEI Talos和一台120kV透射电镜FEI Tecnai Spirit用于学员上机实习，来自FEI的透射电镜应用工程师王庆博士与生物成像中心低温电镜高级工程师黄小俊博士、季刚博士、图像处理高级工程师丁玮博士共同完成了本次透射电镜数据收集与图像处理培训。

本次高级研讨班旨在为学习和使用冷冻电镜进行细胞生物学的老师和同学们提供一次高水准的专业培训，内容涵盖从样品制备到电镜数据收集与处理整个过程，通过讲解报告和上机实践相结合的方式，系统又详细的介绍细胞电镜冷冻制样和成像的方法，使大家真正做到知其然又知其所以然，充分理解并掌握相关技术。通过三天的学习，学员们纷纷表示受益匪浅。研讨班圆满的完成了技术研讨和培训任务，为进一步推动我国细胞电镜领域的发展做出贡献。



Diatome公司VP Helmut Gnaegi介绍玻璃化冷冻切片电镜技术冷冻切片应用技巧



生物成像中心孙飞研究员介绍连续切片扫描电镜成像方法在线虫大尺度三维重构中的应用研究



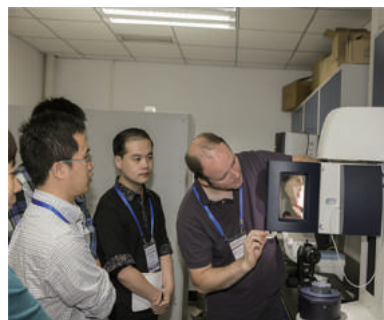
Nexperion公司Dr. Guenter Resch介绍冷冻电镜技术以及投入冷冻制样技术



会场讨论



徕卡最新一代高压冷冻仪EM ICE培训现场

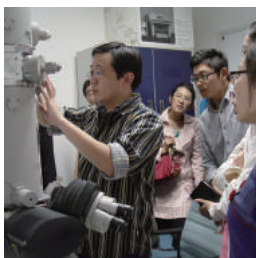


徕卡最新一代投入式快速冷冻仪EM GP培训现场

(4) 2015年度生物成像中心常规技术培训

2015年9月至12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五项，包括：电子显微成像技术，原子力显微成像技术，激光共聚焦显微成像技术，结构照明超分辨荧光显微成像技术以及高性能计算机集群应用培训。

本次常规培训的主要内容有：一，电子显微成像技术（常规样品制备技术、常规透射电镜成像技术、低温透射电镜成像技术、扫描电镜成像技术）；二，原子力显微成像技术；三，激光共聚焦显微成像技术；四，结构照明超分辨荧光显微成像技术；五，高性能计算机集群培训等，主要是为了满足本研究所科研活动中日益增长的技术需求，培训内容涵盖技术基本原理、操作要点等方面。本次常规培训由生物成像中心相关技术工程师分别负责，培训方式分为技术讲座和上机实习两部分。



季刚老师培训低温电镜成像技术



黄小俊老师低温电镜成像技术讲座现场



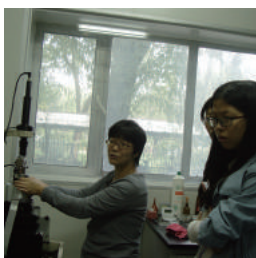
张建国老师培训扫描电镜操作技术



陈永圣老师培训负染色技术



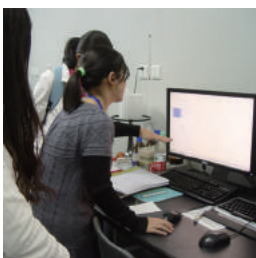
孙磊老师培训超薄切片技术



贾艳侠老师培训原子力显微技术



滕岩老师激光共聚焦显微技术讲座现场



李硕果老师培训结构光照明超分辨荧光显微成像技术



凌伦奖老师高性能计算机集群基础知识讲座现场



丁玮老师图像数据处理讲座现场

2. 学术讲座

(1) 西班牙国家生物技术中心终身教授Jose Maria Salvador Carazo Garcia博士学术报告

2015年8月26日至31日，西班牙国家生物技术中心教授Carazo Garcia博士受孙飞研究员邀请，访问生物物理所生物成像中心，并在我所开展了一系列的学术活动。27日上午，Carazo Garcia博士在生物物理所图书馆报告厅做题为“CryoElectron Microscopy: towards higher resolution in cell biology”的生物大分子国家重点实验室学术报告。27日下午，Carazo Garcia博士在冷冻电镜图像处理小型研讨会（A mini-symposium on cryoEM image processing）上，分别做了题为“Initial Volume Problem in cryo EM: Problem Statement and I2PC new results”和“Structural Bioinformatics Domain-Domain Interaction Predictions: How can they help in medium resolution model building”的精彩学术报告。该小型研讨会由孙飞研究员主持，湖南师范大学刘红荣教授，中国科学院生物物理研究所张艳博士、博士研究生邓雨辰同学，中国科学院计算技术研究所张法博士、万晓华博士也做了简短的报告，并参加了学术交流讨论。28日，Carazo Garcia博士作为主讲教授，出席了在生物物理所多媒体教室召开的冷冻电镜图像处理的专题workshop（Mini-workshop of cryoEM image processing）。

Carazo Garcia博士在冷冻电镜领域做出了巨大贡献，是该领域的领军人物。他所领导的实验室于2007-2011年期间开发了极大似然算法，应用于冷冻电镜三维重构，该方法已成为目前冷冻电镜三维重构的主流方法之一；从1996年开始，该研究团队开发目前普遍使用的电镜数据库EMDataBank；并在神经网络的SOM领域开发新的数学方法。其开发的所有软件集成在XMIPP软件包中，下载量在业内已经超过2000人次，在电镜三维重构领域广泛应用。同时，Carazo Garcia博士还在西班牙的ALBA线站基础上建立了新的软X-ray线站和其领导的生物计算部门被选为欧洲战略研究设施的一部分。

此次来访，Carazo Garcia博士为我们总结和展望了冷冻生物电镜在近几年的快速发展和美好前景。他指出，电子显微镜的发展主要靠硬件和软件的双重提高，我们所处的时代，直接电子探测相机的广泛应用使得硬件不再是成像质量的瓶颈。这就让软件的配合发展变得极其重要。在28日的workshop中，Carazo Garcia博士着重介绍了其所在的团队最新开发的Scipion软件包。Scipion融合了生物电镜领域的最新软件发展，整合了包括EMAN, Relion, Spider, XMIPP在内的诸多现有的软件包。Scipion的出现，极大的简化了电子显微镜工作者数据处理的流程，使得在不同的软件包间“各取所长”变得非常简单。Carazo Garcia博士在Scipion之后又介绍了其团队开发的EMX数据格式，这种数据格式使得原先复杂繁琐的数据文件转换工作变得简单清晰，现已经成



图1. 西班牙国家生物技术中心教授Carazo Garcia博士讲座现场

为EM领域公认的新学科标准。最后，CarazoGarcia博士远程连线了其在西班牙生物技术中心的同事，为我们解答了关于XMIPP软件底层命令行控制的一些问题。大家在这几天的学术活动中踊跃积极，会场气氛热烈，与会人员收获颇丰。

（2）徕卡STED超高分辨成像多重荧光标记方法技术讲座

2015年5月20日，应生物成像中心孙飞研究员的邀请，徕卡显微系统高级应用专家刘继红博士在生物物理研究所5211会议室做了题为“STED超高分辨成像多重荧光标记方法”的技术讲座。讲座由孙飞研究员主持，徕卡公司市场部胡向东经理，销售部刘丽环等共同出席，所内外荧光显微相关领域的科研人员等数十人聆听了本次讲座。

STED超高分辨成像技术可以实现纳米级的分解率（侧向分辨率可达50nm,轴向分辨率可达130nm），以及视频级的成像速度(7帧每秒)，是生命科学研究中显微成像领域的尖端技术。徕卡公司新推出的第三代STED显微成像系统3X集成了白激光及HyD门控技术，可以实现快速活细胞超分辨显微成像，而升级后的受激发射衰减校准系统也使得该技术更加稳定。讲座中，刘继红博士向大家介绍了一些适用于STED成像的荧光标记方法：对于固定样品，Alexa系列，Atto系列，Dylight系列以及实验室常用的一些发射光谱在450-700nm之间的荧光染料均可用于STED样品制备，封片剂建议选用Prolong-Gold系列等带有抗荧光淬灭效果的产品；对于活细胞染色，可以选用SiR系列，荧光蛋白以及NEB公司的SNAP-tag染料。此外，由于DAPI发射光谱较长，不建议在样品中使用，可以选用PICOGREEN作为替代染料。本次讲座内容紧跟超分辨显微成像技术前沿，徕卡公司近十年来积累的数据与成像经验的分享也让参会者们纷纷表示受益匪浅。



图1. 徕卡显微系统高级应用专家刘继红STED超分辨显微成像技术讲座交流现场

项目申请情况

生物成像中心2015年度项目在研/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
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	100万	2013年-2016年
用于冷冻电镜高分辨结构解析的新型相位板的研制及其应用	国家自然科学基金委面上项目	季 刚	90万	2015年-2018年
基于高真空光学冷台的光电关联成像方法研究	科学院仪器功能开发项目	李硕果	40万	2014年-2016年
聚焦离子束法制备冷冻含水切片	国家自然科学基金青年基金	张建国	23万	2014年-2016年
低温透射电镜高分辨率成像用支持膜的研发	科学院仪器功能开发项目	黄小俊	40万	2015年-2017年
新型快速冷冻替代装置的研制和快速冷冻替代及评价方法的建立	科学院仪器功能开发项目	王 莉	40万	2015年-2017年
一种高通量大尺度生物样品电镜三维重构方法的研究	国家自然科学基金青年基金	李喜霞	23万	2016年-2018年
单颗粒低温透射电镜高分辨率数据收集用支持膜的研究	国家自然科学基金青年基金	黄小俊	23.8万	2016年-2018年
提高扫描电子显微镜背散射电子成像Z轴分辨率的新方法	科学院仪器功能开发项目	丁 玮	30万	2016年-2018年

日常活动和管理

生物成像中心日常活动主要包括每周例会与方法学讨论会，例会定于每周一下午1:30召开，主要内容包括：讨论生物中心运行管理相关事务，生物成像中心各成员进行工作总结以及学术交流活动。此外，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。方法学讨论会定于每月最后一周例会时间召开，讨论会由中心主任孙飞研究员主持，参与方法学研究的各位成员分别就近期项目进展情况进行总结汇报，并与大家展开深入讨论。


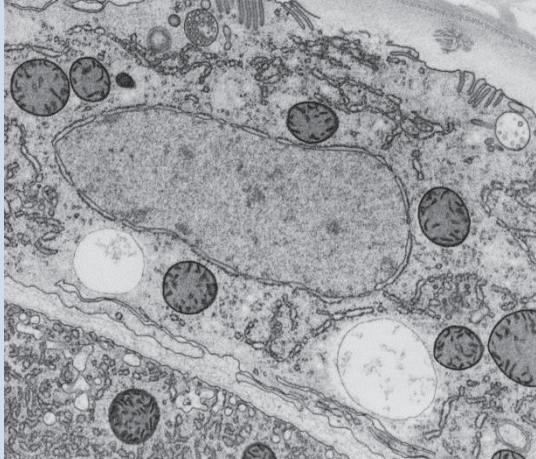
生物成像中心2015年度Journal Club内容及时间表

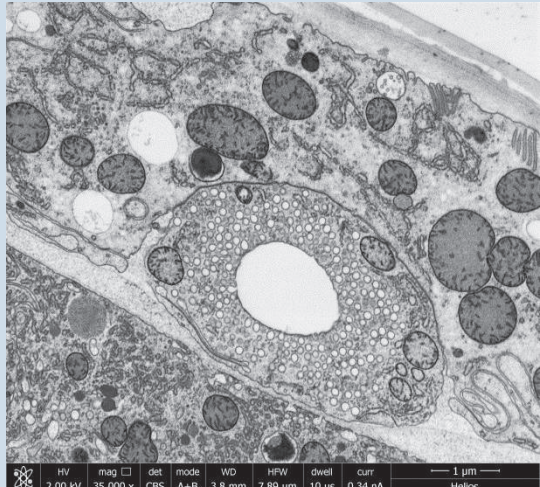
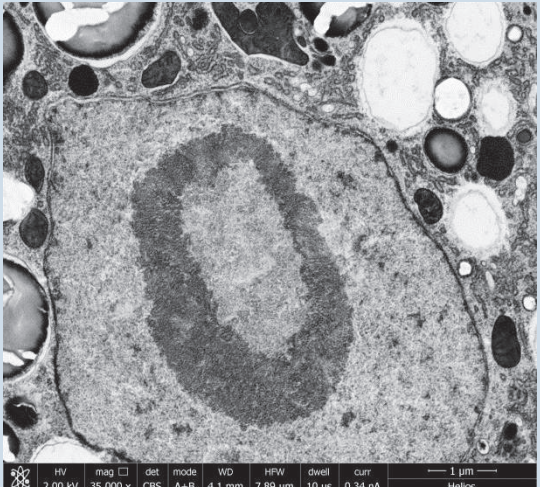
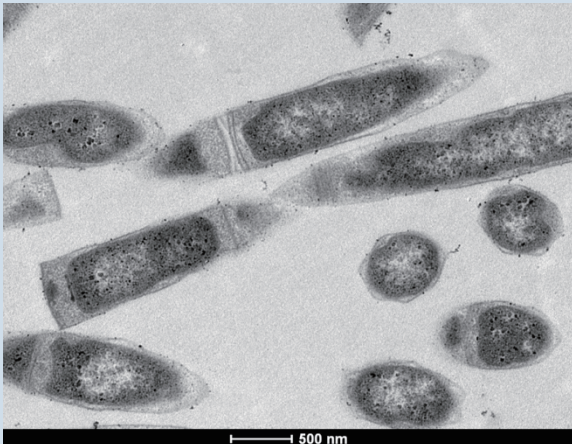
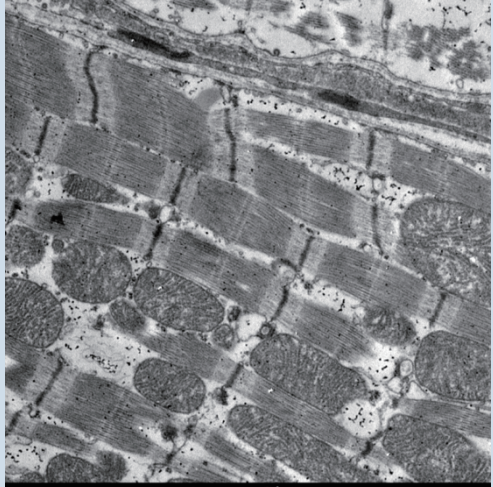
日期	报告人	报告题目
2015-01-12	孙 磊	Six Common Errors Cause Dangerous Mistakes in Interpretation of Electron Micrographs
2015-03-09	陈永圣	Controlling protein adsorption on graphene for cryo-EM using lowenergy hydrogen plasmas
2015-03-16	季 刚	Imaging ATUM ultrathin section libraries with wafer mapper: a multi-scale approach to EM reconstruction of neural circuits
2015-04-02	王 莉	An improved procedure for low-temperature embedding of high-pressure frozen and freeze-substituted plant tissues resulting in excellent structural preservation and contrast.
2015-04-10	李喜霞	Fixation-resistant photoactivatable fluorescent proteins for CLEM.
2015-05-15	李硕果	Correlative microscopy: Bridging the gap between fluorescence light microscopy and cryo-electron tomography
2015-05-22	孙 磊	A High-Speed Fixation Method for Immuno-Electron Microscopy
2015-06-19	张建国	Structural analysis of multicellular organisms with cryo-electron tomography
2015-07-03	丁 玮	Deformable elastic network refinement for low-resolution macromolecular crystallography
2015-08-31	黄小俊	Thon rings from amorphous ice and implications of beam-induced Brownian motion in single particle electron cryo-microscopy
2015-09-07	张建国	A focused ion beam milling and lift-out approach for site-specific preparation of frozen-hydrated lamellas from multicellular organisms
2015-09-28	滕 岩	Mapping molecules in scanning far-field fluorescence nanoscopy.
2015-11-09	孙 磊	A novel method for high-pressure freezing of adherent cells for frozen hydrated sectioning and CEMOVIS
2015-11-23	李喜霞	High-resolution whole-brain staining for electron microscopic circuit reconstruction
2015-12-07	李硕果	Extended-resolution structured illumination imaging of endocytic and cytoskeletal dynamics

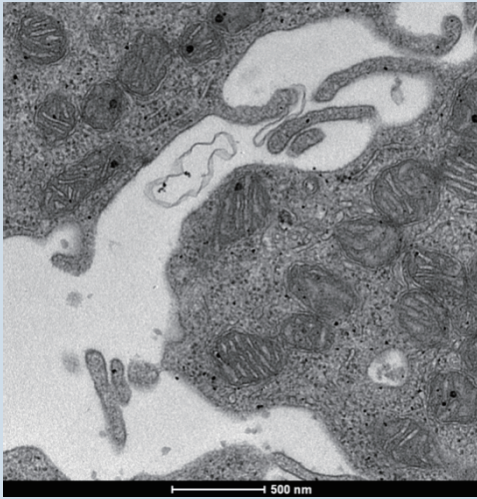
徐伟研究员2015年度学术讲座内容及时间表

日期	报告题目
2015-01-22	高能电子与物质的相互作用
2015-02-03	磁电子透镜与电子显微镜(1)
2015-02-10	磁电子透镜与电子显微镜(2)
2015-04-15	透射电子显微镜的分辨力(1)
2015-04-22	透射电子显微镜的分辨力(2)
2015-05-14	衬度与成像
2015-06-29	Electron Diffraction Crystallography of Protein Nanocrystals by Cryo Electron Diffraction, Part I
2015-07-06	Electron Diffraction Crystallography of Protein Nanocrystals by Cryo Electron Diffraction, Part II
2015-10-19	The main challenge in Cryo-EM, Part I
2015-10-26	The main challenge in Cryo-EM, Part II

生物成像中心精彩图片展

	
高压冷冻制备的C.elegans, Ventral nerve cord	高压冷冻制备的C.elegans, Nucleus
Courtesy of Xixia Li, CBI, IBP, CAS, China Image Details: Instrument used: FEI Helios Nanolab 600i Accelerating voltage: 2.00kV; Magnification: 50000x ; Scale bars: 1 μ m	Courtesy of Xixia Li, CBI, IBP, CAS, China Image Details: Instrument used: FEI Helios Nanolab 600i Accelerating voltage: 2.00kV; Magnification: 50000x ; Scale bars: 1 μ m
图片供稿: 李喜霞	图片供稿: 李喜霞

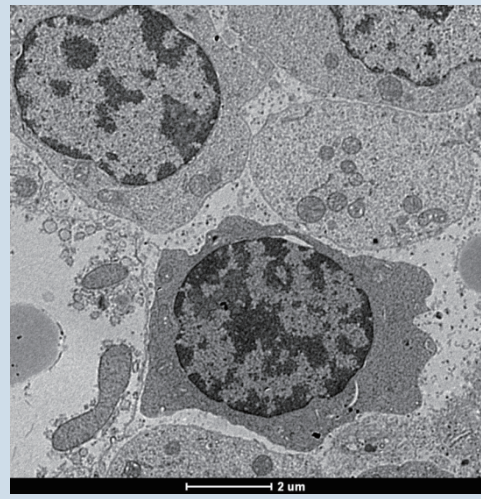
	
<p>高压冷冻制备的C.elegans, Excretory Cannal</p>	<p>高压冷冻制备的C.elegans, Intestin-Nucleus</p>
<p>Courtesy of Xixia Li, CBI, IBP, CAS, China Image Details: Instrument used: FEI Helios Nanolab 600i Accelerating voltage: 2.00kV; Magnification:35000x ; Scale bars: 1 μm</p>	<p>Courtesy of Xixia Li, CBI, IBP, CAS, China Image Details: Instrument used: FEI Helios Nanolab 600i Accelerating voltage: 2.00kV; Magnification:35000x ; Scale bars: 1 μm</p>
<p>图片供稿：李喜霞</p>	<p>图片供稿：李喜霞</p>
	
<p>Methanoseta harundinacea</p>	<p>The cardiac tissue of diabetic mice</p>
<p>Courtesy of Liguang Zhou, Xiuzhu Dong's Group, IM, CAS, China Image Details: Instrument used: FEI Tecnai Spirit Biotwin TEM Accelerating voltage: 100 kV</p>	<p>Courtesy of Qunfang Zhou, Guibin Jiang's Group, Research Center for Eco-Environmental Sciences, CAS, China Image Details: Instrument used: FEI Tecnai Spirit Biotwin TEM Accelerating voltage: 100 kV</p>
<p>图片供稿：贾艳侠</p>	<p>图片供稿：贾艳侠</p>



Duodenum epithelial tissue of *Xenopus laevis*

Courtesy of Qinqin Lou, Zhanfen Qin's Group, Research Center for Eco-Environmental Sciences, CAS, China
Image Details:
Instrument used: FEI Tecnai Spirit Biotwin TEM
Accelerating voltage: 100 kV

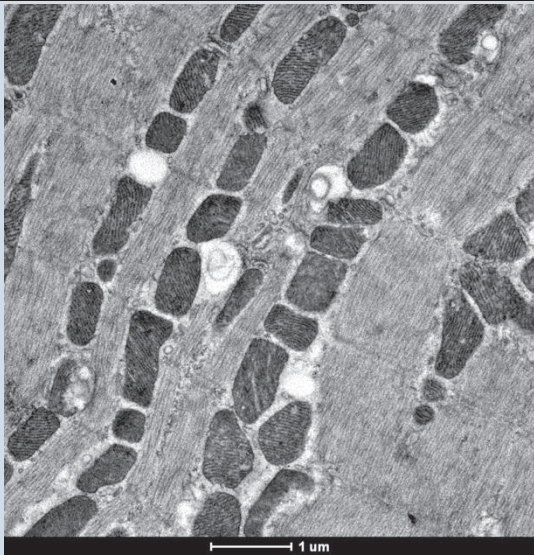
图片供稿: 贾艳侠



Liver of nascent mutant mice

Courtesy of Fang Li, Jiansheng Kang's Group, Institute for Nutritional Sciences, SIBS, CAS, China
Image Details:
Instrument used: FEI Tecnai Spirit Biotwin TEM
Accelerating voltage: 100 kV

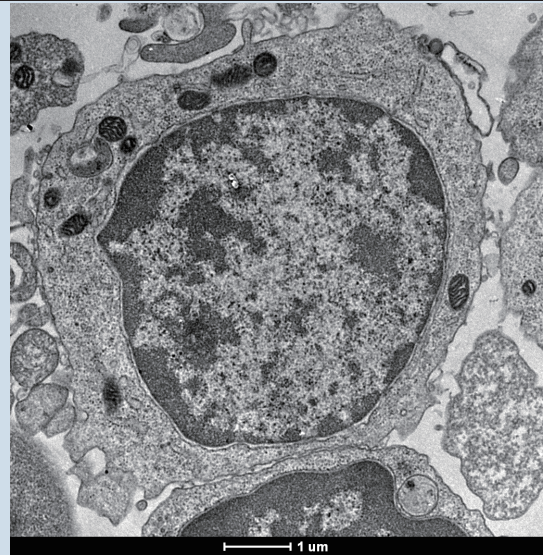
图片供稿: 贾艳侠



高压冷冻制备的小鼠心肌组织

Courtesy of Yanyan Gao, Yan Qin's Group, IBP, CAS.
Image Details:
Instrument used: FEI Tecnai Spirit TEM Accelerating voltage: 100kV.

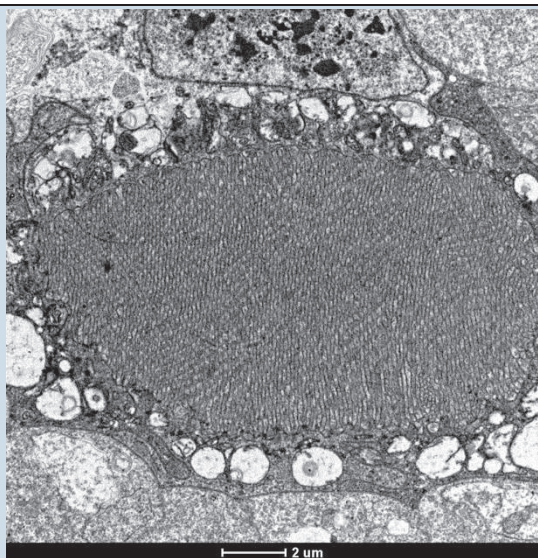
图片供稿: 孙磊



小鼠骨髓NK细胞的超薄切片电镜图像

Courtesy of Yanyan Gao, Yan Qin's Group, IBP, CAS.
Image Details:
Instrument used: FEI Tecnai Spirit TEM Accelerating voltage: 100kV.

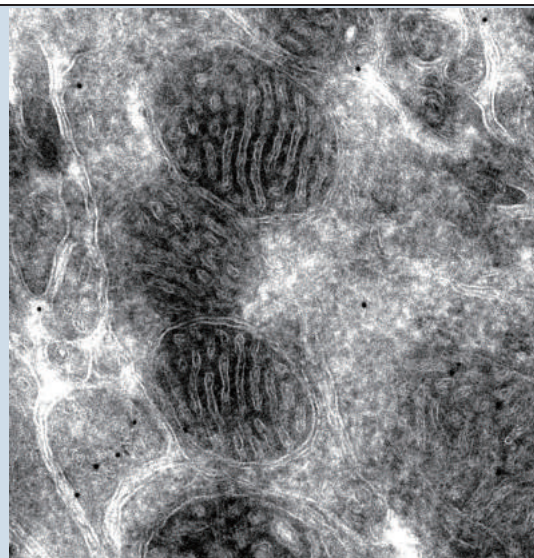
图片供稿: 孙磊



水龟复眼的超薄切片电镜图像

Courtesy of Leipo Jia, Aiping Liang's Group, IZ, CAS.
Image Details:
Instrument used: FEI Tecnai Spirit TEM Accelerating
voltage: 100kV.

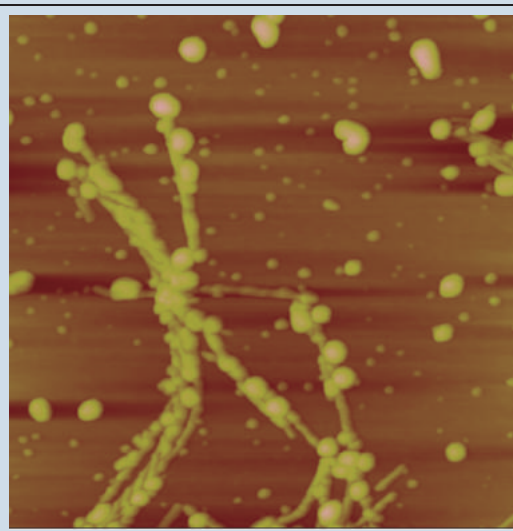
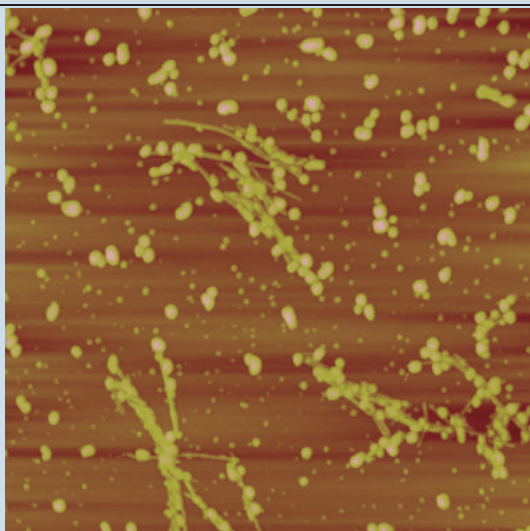
图片供稿：孙磊



冷冻超薄切片的小鼠大脑海马部位线粒体

Courtesy of Yanrui Yang, Jijia Liu's Group, IGDB, CAS.
Image Details:
Instrument used: FEI Tecnai T20 TEM Accelerating
voltage: 100kV.

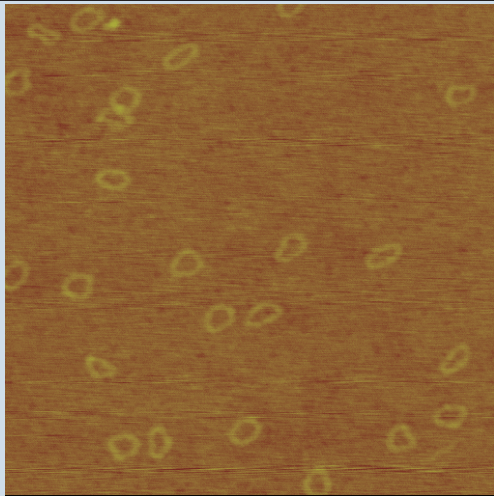
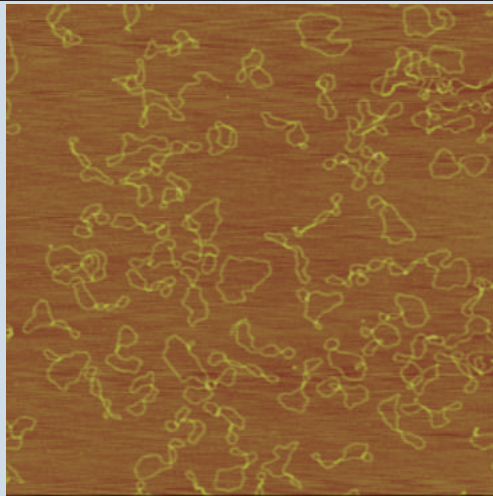
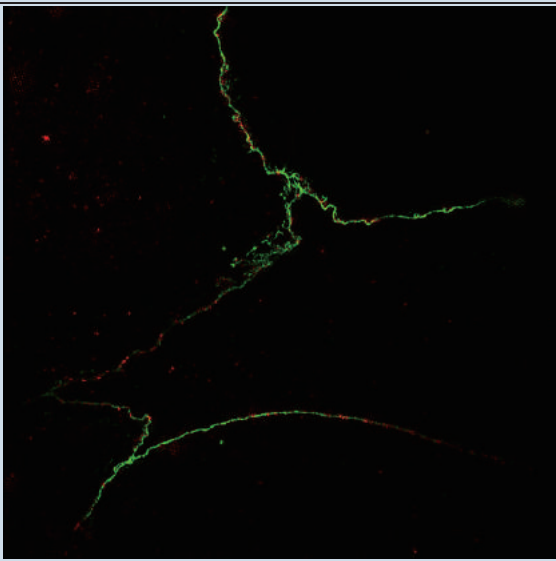
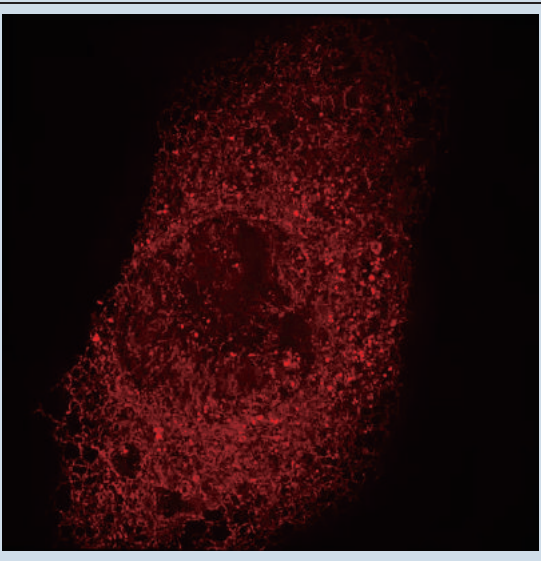
图片供稿：孙磊



Protein fibril

Courtesy of Xiaocui Fang, Wei Liang's Group, IBP, CAS, China
Image Details:
Instrument used: Bruker Nanoscope IIIA Multimode SPM
Scan size: (Left) 2 μm, (right) 1 μm;
Color scale: 30 nm.

图片供稿：贾艳侠

	
<p>Extrachromosomal single strand circular DNA</p>	<p>Double strand circular plasmid</p>
<p>Courtesy of Kun Wang, Peifeng Li's Group, IM, CAS, China Image Details: Instrument used: Bruker Nanoscope IIIA Multimode SPM Scan size: 800 nm; Color scale: 3 nm.</p>	<p>Courtesy of Chao Li, Renzhong Qiao's Group, Beijing Chemistry and Industry University, China Image Details: Instrument used: Bruker Nanoscope IIIA Multimode SPM Scan size: 2.5 um; Color scale: 3 nm.</p>
<p>图片供稿: 贾艳侠</p>	<p>图片供稿: 贾艳侠</p>
	
<p>Caco-2 cells immunostained with antibodies against ZO-1(green) and Claudin-2(red) were analysed by 3DSIM</p>	<p>Hela cells transfected with ER-mCherry analyzed by 3DSIM</p>
<p>Courtesy of Jibing Yu, Wei liang's Group, Key Laboratory of Protein and Peptide Drugs, Institute of Biophysics, CAS Image Details: Imaged by Delta Vision OMX Super-resolution Microscope Mode: Structured Illumination Microscopy (SIM) Image Size: 40 *40μm</p>	<p>Courtesy of Xi Zhang, Pingyong Xu's Group, IBP, CAS Image Details: Imaged by Delta Vision OMX Super-resolution Microscope Mode: Structured Illumination Microscopy (SIM) Image Size: 40 *40μm</p>
<p>图片供稿: 李硕果</p>	<p>图片供稿: 李硕果</p>

利用生物成像中心设备技术所发表研究论文汇编

署名文章

- 1.Wang XY, Wang DB, Zhang ZP, Bi LJ, Zhang JB, Ding W, Zhang XE.(2015).A S-Layer Protein of Bacillus anthracis as a Building Block for Functional Protein Arrays by In Vitro Self-Assembly. Small doi: 10.1002/smll.201501413
- 2.Wang CY, Zhang QF, Gao YZ, Zhou XP, Ji G, Huang XJ, Hong J, Zhang CX(2015). Insight into the three-dimensional structure of maize chlorotic mottle virus revealed by Cryo-EM single particle analysis.Virology485:171-8
- 3.Han R, Wang L, Liu Z, Sun F, Zhang F.(2015).A novel fully automatic scheme for fiducial marker-based alignment in electron tomography. Journal of Structural Biology doi: 10.1016
- 4.Liu B, Xue Y, Zhao W, Chen Y, Fan C, Gu L, Zhang Y, Zhang X, Sun L, Huang X, Ding W, Sun F, Ji W, Xu T(2015). Three-dimensional super-resolution protein localization correlated with vitrified cellular context. Sci Rep 5:13017
- 5.Xiaomin Li , Hongli Feng , Jianguo Zhang, Lei Sun, Ping Zhu(2015).Analysis of chromatin fibers in Hela cells with electron tomography. Biophysics Reports1 (1) : 51-60
- 6.Fang J, Liu Y, Wei Y, Deng W, Yu Z, Huang L, Teng Y, Yao T, You Q, Ruan H, Chen P, Xu RM, Li G(2015). Structural transitions of centromeric chromatin regulate the cell cycle-dependent recruitment of CENP-N. Genes Dev. 29(10):1058-73

致谢文章

- 1.Peng S, Gao J, Liu Y, Guo DS(2015).Facile fabrication of cross-linked vesicle via "surface clicking" of calixarene-based supra-amphiphiles. Chem Commun (Camb) 51(92):16557-60
- 2.Ru H, Chambers MG, Fu TM, Tong AB, Liao M, Wu H(2015).Molecular Mechanism of V(D)J Recombination from Synaptic RAG1-RAG2 Complex Structures.Cell163(5):1138-52
- 3.Cao X, Jin X, Zhang X, Li Y, Wang C, Wang X, Hong J, Wang X, Li D, Zhang Y(2015).Morphogenesis of Endoplasmic Reticulum Membrane-Invaginated Vesicles during Beet Black Scorch Virus Infection: Role of Auxiliary Replication Protein and New Implications of Three-Dimensional Architecture.J Virol89(12):6184-95
- 4.Li Z, Qi X, Ren X, Cui L, Wang X*, Zhu P*(2015).Molecular characteristics and evolutionary analysis of a very virulent infectious bursal disease virus.Sci China Life Sci58(8) : 731-738
- 5.Congping Shang ,Zhihui Liu,Zijun Chen, Yingchao Shi, Qian Wang, Su Liu, Dapeng Li, Peng Cao(2015). parvalbumin-positive excitatory visual pathway to trigger fear responses in mice.Science26;348(6242):1472-7,2015
- 6.Pengyan Xia, Shuo Wang, Buqing Ye, Ying Du, Guanling Huang, Pingping Zhu & Zusen Fan(2015).Sox2 functions as a sequence-specific DNA sensor in neutrophils to initiate innate immunity against microbial infection.Nature immunology16(4):366-75,2015

7. Zhouliang Yu, Xiang Zhou, Wenjing Wang, Wenqiang Deng, Junnan Fang, Hao Hu, Zichen Wang, Shangze Li, Lei Cui, Jing Shen, Linhui Zhai, Shengyi Peng, Jiemin Wong, Shuo Dong, Zengqiang Yuan, Guangshuo Ou, Xiaodong Zhang, Ping Xu, Jizhong Lou, Na Yang, Ping (2015). Dynamic Phosphorylation of CENP-A at Ser68 Orchestrates Its Cell-Cycle-Dependent Deposition at Centromeres. *Developmental Cell* 32(1):68-81, 2015
8. Xiaocui Fang, Tao Yang, Luoyang Wang, Jibing Yu, Xiuli Wei, Yinjian Zhou, Chen Wang, Wei Liang (2015). Nano-cage-mediated refolding of insulin by PEG-PE micelle. *Biomaterials* 77: 139-148
9. Ling Li, Fangfang Zhao, Baojing Zhao, Jin Zhang, Chao Li, Renzhong Qiao (2016). Chitosan Grafted with Phosphorylcholine and Macrocyclic Polyamine as an Effective Gene Delivery Vector: Preparation, Characterization and In Vitro Transfection. *Macromolecular Bioscience* 15: 912-926
10. Jingyang Wang, Hui Zhou, Hua Lu, Ting Du, Yuanming Luo, Iain B.H. Wilson, Cheng Jin (2015). Kexin-like endoprotease KexB is required for N-glycan processing morphogenesis and virulence in *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet Biol* 76:57-69
11. Zhou L, Yu H, Ai G, Zhang B, Hu S, Dong X (2015). Transcriptomic and physiological insights into the robustness of UASB granule-prevalent long filamentous cells of *Methanosaeta harundinacea*. *Appl Environ Microbiol* 81: 831-839
12. Li Dong, Xiaoyan Yang, Wen Gu, Kangfeng Zhao, Huizheng Ge, et al. (2015). Connexin 43 mediates PFOS-induced apoptosis in astrocytes. *Chemosphere* 132: 8-16
13. Jing Wang, Wen Zhu, Lixin Liu, Yongming Chen, Chun Wang (2015). Synthesis and Cellular Internalization of Spindle Hematite/Polymer Hybrid Nanoparticles. *ACS Applied Materials & Interfaces* 7: 5454-61
14. Qiu XF, Zhu QW, Sun JY (2015). Quantitative analysis of vesicle recycling at the calyx of Held synapse. *PNAS* 112(15):4779-84
15. Jianwen Deng, Mengxue Yang, Yanbo Chen, Xiaoping Chen, Jianghong Liu, Shufeng Sun, Haipeng Cheng, Yang Li, Eileen H. Bigio, Marsel Mesulam, Qi Xu, Sidan Du, Kazuo Fushimi, Li Zhu, Jane Y. Wu (2015). FUS Interacts with HSP60 to Promote Mitochondrial Damage. *PLoS Genet* 11(9):e1005357
16. Hongrong Liu, Lingpeng Cheng (2015). Cryo-EM shows the polymerase structures and a nonspooled genome within a dsRNA virus. *Science* 349(6254):1347-1350
17. Yue Yuan, Lin Wang, Wei Du, Zhanling Ding, Jia Zhang, Tao Han, Linna An, Huafeng Zhang, Gaolin Liang (2015). Intracellular Self-Assembly of Taxol Nanoparticles for Overcoming Multidrug Resistance. *Angewandte Chemie International Edition* 54(27) DOI: 10.1002/anie.201504329
18. Zhao YG, Sun L, Miao G, Ji C, Zhao H, Sun H, Miao L, Yoshii SR, Mizushima N, Wang X, Zhang H. (2015). The autophagy gene *Wdr45/Wipi4* regulates learning and memory function and axonal homeostasis. *Autophagy*. 11(6):881-90
19. Sheng Shen, Xing Jia, Haitao Guo and Hongyu Deng (2015). Gamma herpesvirus Tegument Protein ORF33 Is Associated with Intranuclear Capsids at an Early Stage of the Tegumentation Process. *Journal of Virology* 89(10):5288-5297
20. Pingping Zhu, Yanying Wang, Ying Du, Lei He, Guanling Huang, Geng Zhang, Xinlong Yan, & Zusen Fan (2015).

C8orf4 negatively regulates self-renewal of liver cancer stem cells via suppression of NOTCH2 signalling. Nature Communications 6:7122

21.Zhang W, Li J, Suzuki K, Qu J, Wang P, Zhou J, Liu X, Ren R, Xu X, Ocampo A, Yuan T, Yang J, Li Y, Shi L, Guan D, Pan H, Duan S, Ding Z, Li M, Yi F6, Bai R, Wang Y, Chen C, Yang F, Li X, Wang Z, Aizawa E, Goebel A, Soligalla RD, Reddy P, Esteban CR, Tang F(2015).A Werner syndrome stem cell model unveils heterochromatin alterations as a driver of human aging.Science. 348(6239):1160-3

22.Shen S, Jia X, Guo H, Deng H.(2015).Tegument protein ORF33 of a gammaherpesvirus is associated with intranuclear capsids at an early stage of tegumentation process. Journal of Virology. 89(10):5288-97

23.Shenghai Chang, Dapeng Sun, Huanhuan Liang, Jia Wang, Jun Li, Lu Guo, Xiangli Wang, Chengcheng Guan, Bhargavi M. Boruah, Lingmin Yuan, Feng Feng, Mingrui Yang, Lulan Wang, Yao Wang, Justyna Wojdyla, Lanjuan Li, Jiawei Wang, Meitian Wang, Genhong Cheng, Ho(2015).Cryo-EM Structure of Influenza Virus RNA Polymerase Complex at 4.3 Å Resolution.Molecular Cell . 57(5):925-35

附 录

附录一 2015年度生物成像中心对外服务用户申请情况统计

中国科学院生物物理研究所生物成像中心是一个开放型的创新性高端科学研究基础平台，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。为了更好地为广大用户提供优质服务，从2015年开始，针对不同的用户，不同的技术方法需求，生物成像中心已提供不同层次的技术服务，包括：合作研究服务；技术咨询服务；日常技术服务，以及仪器使用服务。对于工作人员参与较多的实验，采用用户事先提申请，我们每月组织专家进行评审，通过申请或给予建议。截止2015年12月，我们共收到162份申请，详见下表：

服务类型	申请单位	课题组	申请份数	批复情况
电镜样品制备	中科院生物物理研究所	邓红雨组	3	通过
		高光侠组	1	通过
		阎锡蕴组	2	通过
		徐平勇组	2	通过
		孙飞组	1	通过
		吴瑛组	3	通过
		胡俊杰组	2	通过
		秦燕组	2	通过1未通过1
		刘光慧组	1	通过
	中科院系统	动物所伍一军组	1	通过
		动物所梁爱萍组	1	通过
		动物所刘以训组	1	通过
		动物所唐铁山组	1	未通过
		遗传所马润林组	1	通过
		遗传所朱保葛组	1	通过
		微生物所田波组	1	未通过
		生态中心朱本占组	1	通过
		营养所康健胜组	1	通过
	其他科研单位	中国医学科学院甄永苏组	1	通过
		中国医学科学院彭小忠组	1	通过
		中国医学科学院赵振东组	1	通过
		北京师范大学孙颖郁组	2	通过
		北京大学刘彦君组	1	通过
		北京大学陈英玉组	1	通过
		北京大学赵进东组	1	通过
		南昌大学刘双梅组	1	通过
		南昌大学范广琴组	1	未通过
		天津大学乔建军组	1	通过
		江南大学胥传来组	1	通过
		武汉大学药学院陈实组	1	通过
香港科技大学王文雄组		1	通过	
北大口腔医院董艳梅组		1	通过	
北京大学药学院张强组		1	通过	
解放军301医院姚元庆组		1	未通过	
军事医学科学院贾晓东组		1	通过	
其他企业单位	宝洁公司	1	通过	

服务类型	申请单位	课题组	申请份数	批复情况
低温透射电镜 Titan & Talos (300kV)	中科院生物物理研究所	朱平课题组	4	通过
		张荣光课题组	1	通过
		叶克穷课题组	3	通过
		阎锡蕴课题组	1	通过
		孙飞课题组	7	通过
		常文瑞/柳振峰课题组	2	通过
		徐涛课题组	1	通过
		章新政课题组	4	通过
		刘迎芳课题组	1	通过
		王大成课题组	3	通过
		饶子和课题组	2	通过
	邓红雨课题组	1	通过	
	北京大学医学院	尹长城课题组	1	通过
中国科学技术大学	蔡刚课题组	1	通过	
低温电镜 (Tecnai20, 200kV)	中科院生物物理研究所	胡俊杰组	2	通过
		阎锡蕴组	1	通过
	中科院系统	过程所刘会洲组	2	通过
		过程所张欣组	1	通过
		化学所曹安民组	1	未通过
		化学所黄勇组	1	通过
		化学所王春儒组	1	通过
		化学所王金本组	1	通过
		化学所王毅琳组	3	通过
		化学所吴德成组	1	通过
		化学所许淑娟组	1	未通过
		化学所张建玲组	1	通过
		理化技术所刘惠玉组	1	通过
		理化技术所吴骊珠组	1	通过
		生态环境中心朱本占组	2	通过
遗传与发育所马润林组	1	通过		

服务类型	申请单位	课题组	申请份数	批复情况
低温电镜 (Tecnai20, 200kV)	其它科研单位	北京大学梁子才组	1	通过
		北京大学张强组	1	通过
		北京化工大学刘云组	1	通过
		北京理工大学钟海政组	1	通过
		北京林业大学许凤组	1	未通过
		常州大学杨建红组	1	通过
		哈尔滨工业大学霍曜组	1	未通过
		哈尔滨工业大学刘绍琴组	1	未通过
		吉林大学姜春来组	1	通过
		暨南大学何留民组	1	未通过
		江南大学刘雪峰组	2	通过
		江南大学胥传来组	2	通过
		辽宁医学院高慎阳	1	通过
		聊城大学魏西莲组	1	通过
		南京大学吴旭东组	1	未通过
		南开大学郭东升组	1	通过
		山东大学郑利强组	1	通过
		沈阳药科大学王思玲组	1	通过
		首都师范大学李伟	1	通过
		四川大学梁朋	1	通过
		天津大学乔建军组	1	通过
		武汉大学董金凤	2	通过
		西安交通大学李涤尘组	1	通过
		厦门大学颜晓梅	1	通过
		湘潭大学杨立新	1	未通过
		扬州大学 葛玲玲	1	通过
		中国农业大学赵广华组	1	未通过
		中国石油大学(北京)宋昭峥	1	未通过
	中国医学科学院病原生物学研究所金奇	1	通过	
	中国医学科学院基础医学研究所彭小忠	1	通过	
中国医学科学院药物研究所刘玉玲组	1	通过		
中石油勘探开发研究院廊坊分院杨江	1	通过		
企业	北京宝洁技术有限公司孙丽丽	2	通过	
	中生北控生物科技股份有限公司蒋琳	2	通过	

服务类型	申请单位	课题组	申请份数	批复情况
双束扫描电镜	北京工商大学	孙宝国组	1	通过
		郦金龙组	1	通过
	北大口腔医院	谭建国组	1	通过
	北京化工大学	李媛组	1	通过
	北京师范大学	孙甜甜组	1	通过
	过程工程研究所	马光辉组	1	通过
	中科院生物物理研究所	邓红雨组	1	通过
		侯俊杰组	1	通过
		苗龙组	1	通过
		孙飞组	1	通过
		孙坚原组	1	通过
		徐涛组	1	通过
		朱平组	2	通过
	朱岩组	1	通过	
	中科院微生物研究所	董志阳组	1	通过
	浙江大学	洪健组	1	通过
	中国地质大学(北京)	于炳松组	1	通过
	中国矿业大学	张明青组	1	通过
	中国农业大学	任发政组	2	通过
中国制浆造纸研究院	杜艳芬组	1	通过	
超分辨荧光显微成像OMX	军事医学科学院四所	李君文课题组	2	通过
	合计		162份	

附录二 如何收集Falcon3数据

一、将移动硬盘挂载到电脑falcon2的/media/目录。

二、Falcon3 普通多帧模式进行数据收集（每秒输出32帧）

在TEM控制电脑中，将相机状态切换至normal mode。

A Falcon3扣背底（gain correction）

1) 在电脑falcon3启动扣背底第一部分：

gain_correction1_f3.bash（该程序由IBP 丁玮编写）

2) 在无样品位置，光斑覆盖整个相机范围，且在数据收集的Record模式（放大倍数和电子剂量都已设定好）下，拍摄10张曝光时间为2秒的照片。

可在serialEM中运行macro 5（macro内容见下），自动完成拍摄。

Loop 10

Delay 30

R

Endloop

3) 启动扣背底第二部分：

gain_correction2_f3.pl（该程序由IBP 丁玮、孙飞编写）

即可完成扣背底操作。

B 启动后台数据收集程序

在电脑falcon3 输入以下命令启动后台数据收集程序

start_capture（该程序由MRC编写，FEI提供）

并按要求输入用户名（不需要包括日期，因为程序会自动在用户名前加上日期）

C 启动后台数据转移和数据处理程序

在电脑falcon2中启动后台数据收集和转移程序

后台数据收集程序包括：输出帧数压缩（IBP丁玮merge_slice）并降数据传输至用户移动硬盘，图像漂移矫正（清华李雪明程序dosefgpu_driftcorr），CTF测算（MRC张凯程序Gctf），可使用以下命令可查看完整的参数列表：

auto_f3_all.pl（该程序由IBP 黄小俊、丁玮编写）

根据参数列表，选择并设置所需参数

如：用户dingwei，希望将照片命名为apoC_数字.mrcs，其在电脑falcon3中启动数据收集程序时程序为他新建的文件夹名为01-08-2015-dingwei，照片名称的数字起始值为1，照片的实际pixel size 是1.42Å，同时他希望将输出数据中的每两帧加合成一帧输出（即每秒输出16帧），则他可以这样启动后台数据转移和数据处理程序：

```
auto_f3_all.pl -mode 2 -user dingwei -job apoC -rmi 2 -raw_f 01-08-2015-dingwei -raw_n 1 -psize 1.42
-merge_num 2
```

所有文件最终会输出在电脑falcon2挂载的移动硬盘中，路径为：

/media/01-08-2015-dingwei /

用户dingwei所得到的第一张照片名为apoC_0001.mrcs

用李雪明程序做图像漂移矫正的加合单张照片名为apoC_0001_SumCorr.mrc；可用李雪明程序查看矫正结

果的log文件名为apoC_0001_Log.txt; 更多图像漂移矫正结果在文件夹dosef_quick中

用张凯Gctf的输出结果为apoC_0001_SumCorr_ctffind3.log, apoC_0001_ctf.mrc

D 停止数据采集

1) 在电脑falcon3中

stop_capture (该程序由MRC编写)

2) 在Falcon2中停止后台数据转移和数据处理程序

stop_autoall.bash (该程序由IBP 丁玮、黄小俊编写)

三、Falcon3 counting模式进行数据收集 (每秒输出1帧)

Falcon3 gain是稳定的, 无需扣。

A Falcon3 counting拍照条件设置

1) 曝光剂量统一为1e/pix/sec

准确测量曝光剂量的方法为, 用bin1曝光一秒, 然后看TIA界面中照片的mean值, 1e/pix/sec对应的mean值为79

2) 建议使用的放大倍数和曝光时长为

75kX, pixel size为1.1Å, 1e/pix/sec将对应0.83e/Å²/sec, 曝光50sec, 总剂量41e Å²

96kX, pixel size为0.86Å, 1e/pix/sec将对应1.35e/Å²/sec, 曝光40sec, 总剂量54e Å²

3) 移动样品台后, 推荐静止至少25sec后, 再开始曝光, 曝光结束后, 停留至少5秒再开始下一个操作。

4) 使用SerialEM自动数据收集时, 拍摄地图可用normal mode, 但正式的数据收集全程都需要使用counting mode。

B启动后台数据收集程序

在TEM控制电脑中, 将相机状态切换至counting mode

在电脑falcon3输入以下命令启动后台数据收集程序

start_counting (该程序由FEI编写提供)

此时, 有以下提问出现:

<<< Folder will be named as 01-11-2015-customerservice, if you want to change "customerservice", please enter now:

输入用户名即可 (用户名不需要包括日期, 因为程序会自动在用户名前加上日期)

随后, 第二个提问出现如下:

<<< # of frames in one dose fraction(options are 32[Default],16,8,4):

问的是多少帧合并成1帧输出, 默认为32帧合并成一帧。即每秒输出1帧, 通常用默认值即可, 按回车键结束提问。

C 启动后台数据转移和数据处理程序

后台数据收集程序包括: defect & post-counting gain矫正 (IBP丁玮程序defect_gain_correct), 输出帧数压缩 (IBP丁玮程序merge_slice), 图像漂移矫正 (清华李雪明程序dosefgpu_driftcorr), CTF测算 (MRC张凯程序Gctf), 可使用以下命令可查看完整的参数列表:

auto_f3_all.pl (该程序由IBP 黄小俊、丁玮编写)

根据参数列表, 选择并设置所需参数

如: 用户dingwei, 希望将照片命名为apoC_数字_DF_GC.mrcs, 其在电脑falcon3中启动数据收集程序时程序为他新建的文件夹名为01-08-2015-dingwei, 照片名称的数字起始值为1, 照片的实际pixel size是0.86Å, 同时他希望将输出数据中的每两帧加合成一帧输出 (即每2秒输出1帧) 并保留未合并前的mrcs, 则他可以这样启动后台数据转移和数据处理程序:

```
auto_f3_all.pl -mode 1 -user dingwei -job apoC -rmi 2 -raw_f 01-08-2015-dingwei -raw_n 1 -psize 1.1
-merge_num 2
```

所有文件最终会输出在电脑falcon2挂载的移动硬盘中，路径为：

/media/01-08-2015-dingwei/

用户dingwei所得到的第一张照片名为apoC_0001_DF_GC.mrcs

用李雪明程序做图像漂移矫正的加合单张照片名为apoC_0001_DF_GC_SumCorr.mrc；可用李雪明程序查看矫正结果的log文件名为apoC_0001_DF_GC_Log.txt；更多图像漂移矫正结果在文件夹dosef_quick中

用张凯程序Gctf的输出结果为apoC_0001_DF_GC_SumCorr_ctffind3.log， apoC_0001_ctf.mrc

D 停止数据采集

1) 在电脑falcon3中

stop_counting （该程序由FEI编写提供）

2) 在Falcon2中停止后台数据转移和数据处理程序

stop_autoall.bash （该程序由IBP 丁玮、黄小俊编写）

四、监控数据收集情况

当开始有数据导出后，在电脑falcon2中，可通过查看以启动数据转移和处理程序时设置的-job（即设置的图片名）为名字的文本文件，来密切监测数据收集状况，如之前的例子中用户dingwei为照片命名为apoC_数字_DF_GC.mrcs，则监测数据的文件名为“apoC”

用户将会看到一个实时更新的文本列表，如下图所示：

```
#1 total dose (e/Å2);
#2 mrcs stack size
#3 time when collect data
#4 file_name;
#5 defocus1;
#6 defocus2;
#7 difference between #2 and #3;
#8 azimuth of astigmatism;
#9 cross_correlation;
#10 spacing (in Angstroms) up to which CTF rings were detected;
#11 the percentage of hard drive in used
#12 time in sec for moving mrcs to hard drive
#13 time when collect data
48.197 4160750592 1444118095 apoC_0002 13189.71 12994.84 194.87 8.988 0.032 22.720 28% 36.16 2015-10-06 15:54
48.009 4160750592 1444118055 apoC_0001 16067.13 15900.65 166.48 46.749 0.148 4.460 28% 36.41 2015-10-06 15:54
46.999 4160750592 1444118166 apoC_0003 24287.67 23749.07 538.60 82.812 0.022 8.454 28% 36.36 2015-10-06 15:56
47.081 4160750592 1444118207 apoC_0004 21050.71 20484.59 566.12 21.784 0.031 8.553 28% 36.42 2015-10-06 15:56
47.982 4160750592 1444118302 apoC_0005 31240.89 31091.59 149.30 -32.417 0.032 5.426 28% 36.33 2015-10-06 15:58
48.250 4160750592 1444118342 apoC_0006 28777.39 28515.38 262.01 59.437 0.009 12.535 28% 41.83 2015-10-06 15:59
48.232 4160750592 1444118417 apoC_0007 30597.71 30500.00 97.71 9.817 0.009 6.161 28% 36.31 2015-10-06 16:00
48.390 4160750592 1444118457 apoC_0008 28204.70 27991.06 213.64 -7.783 0.011 14.541 29% 36.34 2015-10-06 16:00
48.184 4160750592 1444118528 apoC_0009 37866.19 37435.22 430.97 -1.005 0.014 7.653 29% 37.84 2015-10-06 16:02
48.289 4160750592 1444118567 apoC_0010 34995.93 34359.28 636.65 -25.067 0.012 12.117 29% 36.32 2015-10-06 16:02
48.296 4160750592 1444118642 apoC_0011 37456.86 37223.29 233.57 9.515 0.016 7.573 29% 36.35 2015-10-06 16:04
48.422 4160750592 1444118681 apoC_0012 35780.33 35229.51 550.82 23.149 0.013 11.185 29% 36.36 2015-10-06 16:04
48.467 4160750592 1444118792 apoC_0014 34322.29 33999.89 322.40 -46.096 0.003 13.718 29% 36.49 2015-10-06 16:06
48.364 4160750592 1444118753 apoC_0013 36344.05 35994.93 349.12 -13.510 0.011 11.185 29% 37.38 2015-10-06 16:05
48.361 4160750592 1444118867 apoC_0015 30106.37 29666.88 439.49 74.450 0.010 12.323 29% 36.35 2015-10-06 16:07
48.316 4160750592 1444118906 apoC_0016 27727.79 27592.14 135.65 -0.775 -0.007 7.495 29% 36.30 2015-10-06 16:08
48.237 4160750592 1444119037 apoC_0018 8479.640 8234.414 245.23 -6.453 0.042 10.386 30% 36.33 2015-10-06 16:10
48.220 4160750592 1444118997 apoC_0017 8384.905 8256.773 128.13 37.874 0.041 10.386 30% 38.16 2015-10-06 16:09
48.335 4160750592 1444119612 apoC_0019 17924.74 17613.39 311.35 -7.835 0.047 7.903 30% 36.35 2015-10-06 16:20
```

列表第一列纪录照片的总剂量（e/Å²）

列表第二列纪录movie格式的文件大小（B）

列表第三列纪录照片的拍照时间（表现格式为该时间距离1970-01-01 00:00:00 UTC的总秒数）

列表第四列纪录照片的名称，忽略后缀

列表第五列纪录照片经过CTFFIND4计算出来的defocus1

列表第六列纪录照片经过CTFFIND4计算出来的defocus2

列表第七列纪录照片经过CTFFIND4计算出来的defocus1和defocus2的差值

列表第八列纪录照片经过CTFFIND4计算出来的像散角度

列表第九列纪录照片经过CTFFIND4计算出来的CC值

列表第十列纪录照片经过CTFFIND4计算出来的可辨认的CTF环所对应的实空间尺寸 (Å)

列表第十一列纪录到该照片为止，移动硬盘已使用空间的百分比

列表第十二列纪录该照片从本地硬盘转移到移动硬盘所消耗的时间 (秒)

列表第十三列纪录该照片拍摄的日期和时间

此外，每10张照片还将输出一组主要监控像散的数据，以及每50张输出一组欠焦值和像散分布情况、数据拍摄速度、移动硬盘更换时间预测等信息的统计结果。该文本文件文件名为”命名的照片名_stigma”，如用户dingwei为照片命名为apoC_数字_DF_GC.mrcs，则统计监测数据的文件名为“apoC_stigma”

```
#1 first image number to summarize
#2 last image number to summarize
#3 the mean of the difference between defocus1 and defocus2
#4 the mean of azimuth of astigmatism
#5 the standard deviation of azimuth of astigmatism
#6 the confidence of astigmatism
#7 the mean of defocus
#8 the mean of total dose (e/A2)
1      10      299.6    6.2      8.4      90.6%    15934.46    37.90
11     20      271.7    17.0     23.5     73.9%    15741.08    38.09
21     30      269.8    13.9     8.0      91.1%    20116.13    37.83
31     40      315.4    17.1     8.9      90.1%    19453.49    38.18
41     50      286.0    26.7     6.5      92.8%    25131.97    38.81
```

每十张统计一次

```
6G5_0030 may contain defect!
6G5_0035 may contain defect!
#defocus summary:
below 1.0um:1
1.0um-1.5um:7
1.5um-2.0um:24
2.0um-2.5um:11
2.5um-3.0um:7
3.0um-3.5um:
3.5um-4.0um:
4.0um-4.5um:
above 4.5um:
##diference between defocus 1 and defocus 2:
below 10nm:
10nm-15nm:
15nm-20nm:6
20nm-30nm:24
30nm-40nm:16
40nm-50nm:4
above 50nm:
###average data collection speed: 66.84 sec per image
#### 50 images from 1 to 50 were summarized
4.0% of 50 images might contain defects, which have been listed above!!
Please change hard drive at 2015-10-16 22:44
```

每五十张统计一次

附注一：通过实时Gctf计算辅助调整物镜像散

先将thon ring在目测情况下调圆，再执行以下操作进行微调

- 1) 按照步骤B所描述的步骤启动Falcon3后台数据收集程序
- 2) 启动Falcon3后台数据转移和数据处理程序

```
adjust_stigma.pl -mode 2 -user dingwei -job test -rmi 2 -raw_f 01-08-2015-test -raw_n 1 -psize 1.42
-merge_num 2
```

其中01-08-2015-test为启动Falcon3后台数据收集程序创建的文件夹

-psize为调整物镜像散所处的放大倍数对应的pixel size

- 3) 开启并跟踪监控数据

```
cd /data/storage/ctf_value/
```

```
tail -f test
```

- 4) 在调整物镜像散所处的放大倍数下在远离裂痕的碳膜处拍照，建议拍1秒以减少图像漂移

- 5) 根据监控数据的输出结果（特别是defocus1和defocus2的差值），调整物镜像散，建议将像散调节界面的step设为3，每次调1格

- 5) 调整完后，在Falcon2中停止后台数据转移和数据处理程序

```
stop_autoall.bash
```

- 6) 调整完后，按步骤E所示在Falcon3中停止后台数据收集程序

附注二：

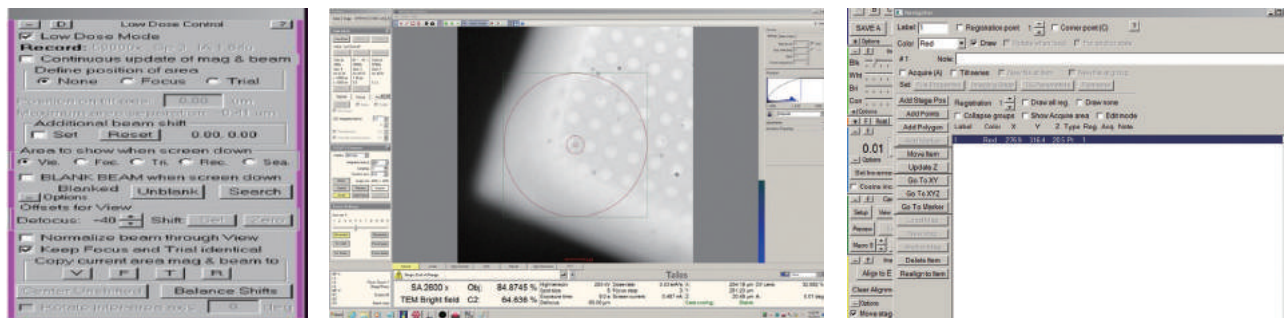
用户的数据随收集进程，同时使用Gctf做了defocus值的求解，在用户数据输出硬盘中每张照片都将有一个对应的*_SumCorr_ctffind3.log 文件（如果是counting模式，该文件名为*_DF_GC_SumCorr_ctffind3.log）。当使用relicon进行数据处理时，可该文件随同做了漂移矫正的照片一起，拷到relicon目录下，届时可直接用于relicon的star文件生成，无需在relicon中重做ctf计算。

附录三 利用SerialEM进行单颗粒数据收集的流程

- 1 设置SerialEM各模式的放大倍数和dose rate（详情参见CBI网站）
- 2 设置SerialEM各模式的相机参数及曝光时间（详情参见CBI网站）
- 3 设置自动拍地图（Corner地图）

- a) 在SerialEM菜单栏navigator-> open打开navigator

b) 在Low Dose Control界面 -> Area to show when screen down -> 选择Vie.放下电镜荧光屏，等待20 sec将自动进入View模式。在这个模式下，移动样品到载网的网格的一角（square的某个角），点击Navigator中“Add Stage Pos”添加一个Type为Pt的条目（见下图所示），重复上述步骤添加需要拍摄地图的网格其余三个角：



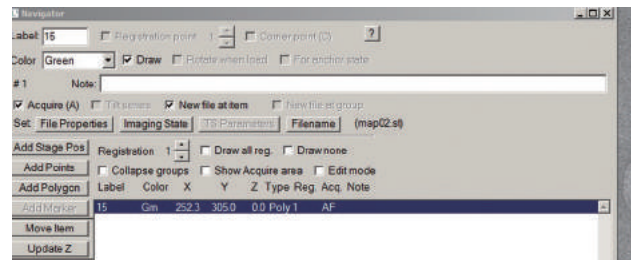
- c) 添加完成后，依次选中这些条目，勾选Navigator中“Corner Point (C)”使该条目后面出现“C”字样

- d) 上述操作完成后，点击Serial EM主菜单中的Navigator -> Montaging & Grids -> Polygon from Corners.

该操作将生成一个Type为Poly的新条目，同时会弹出一个对话框，提示是否要删除已经选定的四个

Corner，此处可选YES（上面四个Pt条目会自动删除）或者NO（保留四个Pt条目）均可，不影响下一步操作。

选中新生成的Poly条目，在Navigator中勾选Acquire(A)和New file at item使该Poly条目后出现“AF”字样（见下图）：



勾选New file at item时会出现系列选择对话框。

第一个跳出的对话框为properties of file to open。该对话框须选择Montaged images和Fit montage to polygon。点击OK继续。

第二个跳出的对话框为Montage setup。确认勾选Move stage instead of shifting image和Use View parameters in Low dose mode，点击OK继续下一步操作。

第三个跳出的对话框为File properties。确认数据存储参数，点击OK继续。

第四个跳出的对话框为Save As。指定存储位置及文件名。

e) 移动到下一个square，按照步骤b, c和d进行设置，直至所有需要进行数据收集的square都已完成标定。每个完成标定的square将生成一个条Type为Poly的条目（有AF标记）。

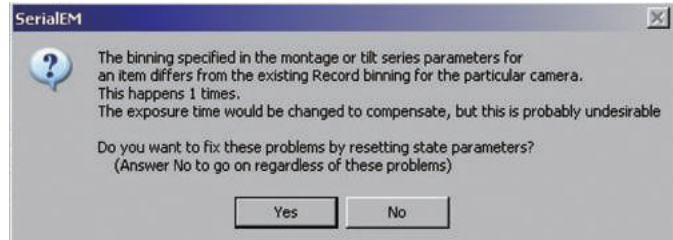
保存navigator，SerialEM菜单navigator -> save

f) 按照设定自动拍摄Corner地图

按Ctrl键 + 鼠标左键点击macro 18，查看macro18的内容，并确认其与附注中的macro18内容一致。

点击SerialEM菜单栏navigator->Acquire at Points，并在initial actions after movingstage中勾选Run macro #18和在Primary Task中选择Acquire map image。选择GO开始自动地图拍摄。

若跳出以下提示对话框，则选No。



所有地图拍摄完毕后，注意保存navigator。

SerialEM菜单navigator -> save。

4 选择数据收集位点

在navigator窗口中点击Add Points按钮（随即该按钮变为Stop Adding）。

然后在大地图上点击左键，设置数据收集的位点。点击选定的点会自动在navigator窗口添加一个条目，并在照片上出现该点在navigator窗口中的序号。选择完成后，点击Stop Adding退出选择位点的状态。

Group是指从点击Add Points开始到点击Stop Adding结束的整个期间里，所选定的所有点。

请注意每个group的第一个位点为Focus位点（通常选择在碳膜上）。随后的其它位点为需要进行数据收集的位点。请注意每个group只在第一个Focus位点进行自动聚焦（只改变Z值，不改变obj lens），随后的其它点采用与Focus位点相同的Z值进行数据收集，不再聚焦。因此，每个group的点分布的范围不宜过大，通常1/1的支持膜内，4 * 4个孔的范围可为一个group。

group选择完成后，勾选Collapse groups选项时，可将同一个group中的所有点归至一个条目内。逐个选定每个group，勾选Acquire选项，让group内的每个点都带上标记A，在Collapse groups状态中，每个group带上All Acq标记。在Talos或者在Titan但不用capture进行数据收集时，还需勾选New file at group，以设定数据收集的存储位点，使每个数据收集位点条目带上AG标记。在Titan用capture进行数据收集时，不需要选择勾选New file

at group, 使每个数据收集位点条目只带A标记, 因为capture会自动获取exposure time超过一秒的照片进行输出。

注意保存navigator。SerialEM菜单navigator -> save
离线选择数据收集位点

为了缩短自动数据收集的设置时间, 可在选择了少量点运行数据收集的同时, 进行离线的选择数据收集位点。具体步骤如下:

a) 将自动拍摄好的所有大地图文件 (map*.st) 和自动拍摄完大地图后保存的nav文件 (nav.nav), 拷贝到supportPC上。

b) 启动supportPC上的SerialEM-offline。

c) 在离线版的SerialEM中打开拷贝过来的nav文件 (nav.nav)。

打开方式为: 点击SerialEM菜单navigator ->Read & Open。在打开方式对话框中找到和拍摄好的地图文件放在一起的nav文件, 点击open。

d) 在弹出的navigator窗口中按步骤4 (选择数据收集位点) 的描述选取聚焦和拍照位点。

注意保存navigator。SerialEM菜单navigator -> save as -> nav01.nav (与第一个nav文件不一样的名字)。

e) 当所有大地图都已经选点结束, 可在SerialEM的在线运行版本上停止正在进行的数据收集后, 将离线版选择的点merge到在线版的navigator中。具体步骤如下:

将离线版的SerialEM中含有选点信息的nav文件拷贝至在线版所在的电脑。注意只需拷贝nav文件, 无需拷贝地图文件。

在线版的SerialEM菜单 -> Navigator -> Merge File -> 选择离线版最后保存的nav文件 (文件名与在线版当前文件名不同)。则两个nav文件被融合成一个。此前在线版已收集了数据的点仍维持A标志去除状态。

5 启动自动数据收集

按Ctrl键 + 鼠标左键点击macro 20, 查看macro20的内容, 并确认其与附注中的macro20内容一致。

当检查以上macro都无误后, 在Titan Krios用capture收集的, 按capture的步骤进行扣相机背底和启动capture的操作。

确认相机设置无误 (参照步骤2) 后, 确认“Low dose control”界面Area to show when screen down选择Foc.模式, 以上设置无误后, 启动自动数据收集。

SerialEM菜单 -> Navigator -> Acquire at Points ->

在Initial Actions after Moving Stage栏中, 不选择任何选项

在Primary Task栏中, 选择Run Macro # 20

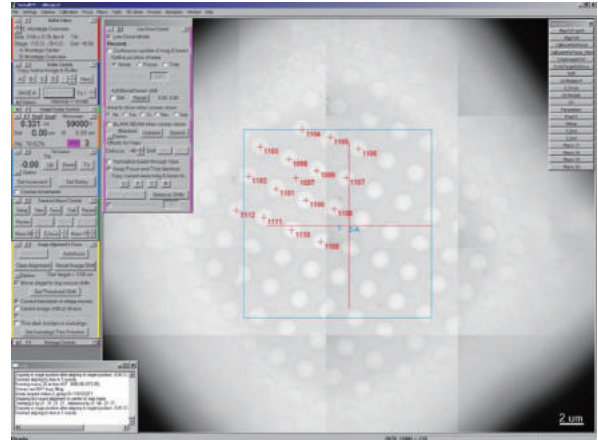
点击GO开始自动数据收集。

6 停止自动数据收集

实验结束或是需要为低温杆加注液氮 (仅对于使用外置冷冻杆的电镜, 如Talos。而Titan Krios会在液氮灌注时自动暂停数据收集, 并在灌注完毕后自动开始) 时, 需要停止数据收集。

点击SerialEM菜单 -> Navigator ->stop acquire

等待有弹出窗口出现, 并看到SerialEM主界面右下角状态中显示”stopped nav macro ”字样, 则自动数据收



集已停止。

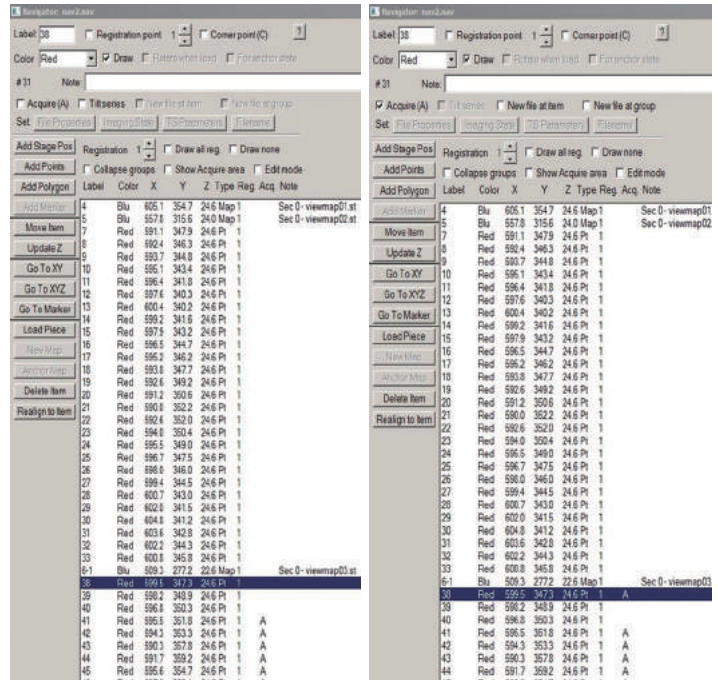
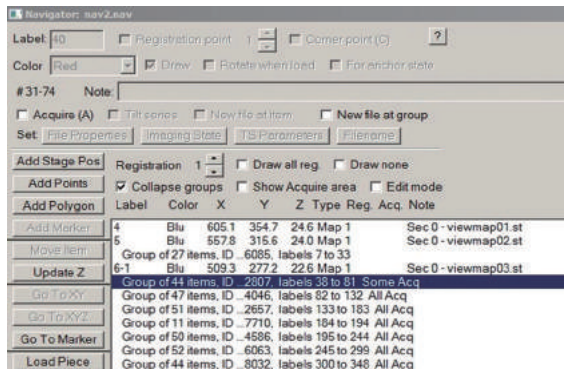
7 暂停后重启自动数据收集

如若是实验中因故暂停了数据收集（如，为液氮罐加注液氮等），之后需要继续收集数据，则需要重启自动收集程序，步骤如下：

a).在Navigator中找到并选中自动数据收集暂停点Group，该条目后显示为Some Acq。如无”Some Acq”，则跳过步骤b)，直接进行步骤c)的操作。

b).取消勾选Navigator中Collapse groups，展开当前Group，默认自动选中该Group内第一个点（每个group的第一个位点为Focus位点），若该点条目后面没有A，则需要勾选Navigator中的Acquire使条目后出现A字样，如下图所示：

c).设置完成后，保存Navigator，点击Acquire at points重新启动自动数据收集。



附注一：在View模式（低倍2000-4000倍）下仅利用stage Z进行聚焦（Z_byV）

MacroName Z_byV

This macro is written by Xiaojun Huang and Fei Sun in Institute of Biophysics,

Chinese Academy of Sciences, Beijing, China

Echo ==> Running Z_byV ...

target_value = -60 #可根据实际情况更改，当前设置的-60um是由于offset for View:Defocus设置为-50um

Gotolowdosearea F

setstandardFocus 0.0 #obj lens重置到eucentric focus

Autofocus -1 1 #测量当前离焦量

reportAutofocus

recent_value = \$reportedValue1

move_value = -1 * \$recent_value + \$target_value

MoveStage 0 0 \$move_value #移动stage Z

echo --> Z moved \$move_value micron

Loop 4

autocenterbeam

Autofocus -1 1 #测量当前离焦量

reportAutofocus

recent_value = \$reportedValue1

move_value = -1 * \$recent_value + \$target_value

#如果离焦值无法收敛，则使用倾斜样品台方式进行调整Z高度

if \$move_value > 10 or \$move_value < -10

echo --> switch to eucentric rough

Eucentricity 1

#Titan中倾斜样品台测量的Z高度时与obj lens的eucentric focus有差距，通过这项进行调整。

MoveStage 0 0 -7

break #退出循环

Endif

#如果离焦值可以收敛，则继续利用stage Z聚焦，直至测量的欠焦值与设定的欠焦值误差小于1um

if \$move_value < 0

if \$move_value > -1

```

        echo --> focus error $move_value micron
        break
    endif
else
    if $move_value < 1
        echo --> focus error $move_value micron
        break
    endif
endif
endif
MoveStage 0 0 $move_value
echo --> Z moved $move_value micron
EndLoop
附注二：在Focus模式（数据收集的放大倍数下）下仅利用stage Z
进行聚焦（Z_focus）
MacroName Z_focus
# This macro is written by Xiaojun Huang and Fei Sun in Institute
of Biophysics,
# Chinese Academy of Sciences, Beijing, China
target_valuve = -3.5 #目标欠焦值，单位um
Gotolowdosearea F
setstandardFocus 0.0 #obj lens重置到eucentric focus
Loop 10
    Autofocus -1 #测量当前离焦量
    reportAutofocus
    recent_value = $reportedValue1
    move_value = -1 * $recent_value + $target_valuve
    #继续利用stage Z聚焦，直至测量的欠焦值与设定的欠焦值误差
    小于0.2um
    if $move_value < 0
        if $move_value > -0.2
            echo --> focus error $move_value micron
            break
        endif
    else
        if $move_value < 0.2
            echo --> focus error $move_value micron
            break
        endif
    endif
endif
MoveStage 0 0 $move_value #移动stage Z
echo --> Z moved $move_value micron
EndLoop
附注三：自动地图拍摄（macro 18）
# This macro is written by Xiaojun Huang in Institute of
Biophysics,
# Chinese Academy of Sciences, Beijing, China

```

```

MoveToNavItem #移动样品台至poly中心点
#监测是否处于自动液氮灌注状态，如是，则暂停，直至灌注完毕
Loop 10
    AreDewarsFilling
    Filling = $reportedValue1
    If $Filling == 0
        Break
    Endif
    Delay 2 min
EndLoop
LongOperation Bu 2 #监测empty buffer，使每2小时empty
buffer一次
call Z_byV #使用macro Z_byV进行聚焦
UpdateItemZ #在navigator中更新当前Z值
附注四：自动数据收集（macro 20）
# This macro is written by Xiaojun Huang and Fei Sun in Institute
of Biophysics,
# Chinese Academy of Sciences, Beijing, China
GroupSize = 20 #根据实际每个group中的点的大致个数
进行修改
MinDefocus = -2.0 #欠焦最小值
MaxDefocus = -3.0 #欠焦最大值
Step = 10
#监测是否处于自动液氮灌注状态，如是，则暂停，直至灌注完毕
Loop 10
    AreDewarsFilling
    Filling = $reportedValue1
    If $Filling == 0
        Break
    Endif
    Delay 5 min
EndLoop
LongOperation Bu 2 #监测empty buffer，使每2小时empty
buffer一次
ReportGroupStatus #检测该位点为整个group中的第几个点
GS = $reportedValue1
RealignToNavItem 1 #通过与地图匹配的方式，精确移动至所选
位点
#如果该位点为整个group中的第一个点，则该点用作聚焦使用
If $GS == 1
    ReportNavItem
    TargetIndex = $reportedValue1
    GroupIndex = $TargetIndex / $GroupSize
    TargetStep = $GroupIndex
    Loop 10000
        If $TargetStep < $Step

```

```

        Break
    Endif
    TargetStep = $TargetStep - $Step
EndLoop
FocusRange = $MaxDefocus - $MinDefocus
    TargetDefocus = $MinDefocus + $FocusRange / $Step *
$TargetStep
GoToLowDoseArea F
ScreenDown      #降荧光屏，烧出泡泡，以方便聚焦
Delay 15
ScreenUp
#聚焦操作，类似与Z_focus
    target_valuve = $TargetDefocus
Gotolowdosearea F
setstandardFocus 0.0
Loop 10
Autofocus -1
reportAutofocus
recent_value = $reportedValue1
        move_value = -1 * $recent_value + $target_
valuve

        if $move_value < 0
if $move_value > -0.2
    echo --> focus error $move_value micron
    break
endif
    else
if $move_value < 0.2
    echo --> focus error $move_value micron
    break
endif
endif
MoveStage 0 0 $move_value
echo --> Z moved $move_value micron
EndLoop
MoveStage 0 0 $TargetDefocus
UpdateGroupZ    #更新navigator中整个group的Z值
Else
    Delay 15    #移动样品台后稳定15秒后再拍照
R        #用Record模式拍照
# save        #如后台输出则无需存储照片
Endif

```

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。

四、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。

五、如有用户使用生物成像中心相关仪器设备或技术服务获得实验数据，且相关实验数据、照片等被引用到发表文章中，而文章致谢中未提及生物成像中心相关贡献，生物成像中心将视情况拒绝该用户所在单位或者课题组在未来一年到两年时间内，在生物成像中心的仪器预约以及技术服务申请。对于出现两次及以上恶意忽略生物成像中心所提供技术服务贡献的用户，生物成像中心将把该用户所在单位列入服务黑名单，该单位其他课题组或个人在未来预约生物成像中心仪器设备或技术服务时也将受到一定影响。

最后，用户的认可与支持是生物成像中心前进的动力，感谢大家对生物成像中心的信任，生物成像中心也将继续完善管理规章制度，不断提升技术服务水平，为科研工作发展贡献一份力量！

科学研究平台生物成像中心

2015年11月