

CONTENTS

目录 | 2017
报告

01 总结、展望与寄语

02 一、生物成像中心概述

02 1. 生物成像中心仪器设备一览表

02 2. 2017年度新增设备介绍

02 3. 2017年度新增服务介绍

04 4. 人员队伍

04 学术带头人

04 生物成像中心专家委员

05 专业工程师队伍

06 交流学习人员

06 2017年度新增人员介绍

07 二、生物成像中心2017年度重要工作成果

07 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）

07 VI型CRISPR-Cas系统效应蛋白Cas13a的结构研究

08 植物光合作用中高效捕光的超分子机器结构

09 基因组稳定性调控最核心激酶ATR的激活机制

10 酵母小亚基加工体90S核糖体前体的分子结构

11 内质网调控自噬小体形成的分子机制

11 结合FIB-SEM三维成像技术和可克隆标签APEX2的蛋白质三维定位研究

12 肠道病毒71劫持ERAD组分p97以促进其复制

13 细菌中脂滴结合DNA并参与转录调控的新功能

14 一种新型基因组DNA三维成像工具

15 血脑屏障发育的分子调控网络

16 肠道中的ILCreg细胞参与调节肠道炎症反应

17 哺乳期褐色脂肪细胞的特征研究

18 2. 技术研究（2017年度生物成像中心所开展的技术和方法学研究）

18 连续超薄切片扫描电镜成像方法研究

19 基于高真空光学冷台的光电关联成像方法研究进展

21 聚焦离子束法制备组织样品冷冻含水切片

22 三、装备运行和技术服务情况

22 1. 电镜样品制备技术服务

23 2. 透射电镜运行服务（FEI Titan Krios）

25 3. 透射电镜运行服务（FEI Talos）

27 4. 透射电镜运行服务（FEI Tecnai 20）

27 5. 透射电镜运行服务（FEI Tecnai Spirit-负染色）

28 6. 透射电镜运行服务（FEI Tecnai Spirit-超薄切片）

28 7. 扫描电镜运行服务（FEI Helios NanoLab 600i）

29	8. 激光共聚焦显微镜运行服务
32	9. 结构光照明超高分辨率荧光显微镜运行服务 (Delta Vision OMX)
33	10. 荧光图像分析系统运行服务
33	11. 数据处理相关设备 (高性能计算服务站)
34	四、学术交流
34	1. 生物物理所-赛默飞世尔科技生物电镜联合实验室成立
36	2. 生物成像中心主办 (承办) 活动
36	1) 第三届国际冷冻电镜图像处理前沿技术研讨班
38	2) 第三届中国结构生物学冷冻电镜培训班
39	3) 2017年度生物成像中心常规技术培训
40	3. 生物成像中心参与的学术活动
40	1) 2017年中国电子显微学学术年会
40	2) 第15次中国暨国际生物物理大会及第五届全国冷冻电子显微学与结构生物学专题研讨会
42	3) 其他参会情况
42	五、获奖情况
44	六、生物成像中心基建工作
46	七、生物成像中心在研项目统计
47	八、生物成像中心专利清单
48	九、日常活动和管理
49	十、生物成像中心精彩图片展
52	十一、利用生物成像中心设备技术所发表研究论文汇编
55	附录
55	附录一 2016-2017年生物成像中心对外服务用户申请情况统计
58	附录二 2017年生物成像中心技术支撑服务管理办法

总结、展望与寄语

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定位于发展从亚纳米级至毫米级不同尺度生物样品的高分辨率二维及三维成像技术，通过对生物结构的解析来回答生命科学的关键前沿问题。中心主任为孙飞研究员，副主任为季刚正高级工程师、李栋研究员。中心学术带头人徐涛院士、徐伟研究员、孙飞研究员、朱平研究员、章新政研究员、李栋研究员、苗龙研究员和徐平勇研究员，负责生物成像中心的发展和建设；中心专家委员会由徐伟研究员、朱平研究员、章新政研究员、李栋研究员、苗龙研究员、徐平勇研究员、张宏研究员、邓红雨研究员、李国红研究员、朱岩研究员组成，负责中心技术指导、考核等。中心现有专业技术工程师14人，技术员4人，其中正高级工程师1人，高级工程师6人，工程师6人，助理工程师1人。中心分为电镜组、光镜组、样品制备组、高性能计算组、维修组五个专业技术组，技术服务包括了高分辨率冷冻电镜技术、超分辨率光学显微技术、电子显微三维重构技术、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。由于在平台建设、运行管理、支撑服务、技术创新等方面做出突出成绩，中心荣获“2017年度中国科学院院所两级公共技术服务中心优秀集体”称号。

2017年是生物成像中心发展过程中不平凡的一年。第一，支撑服务方面，年度服务机时再创新高，服务总机时达43738.42小时，用户涵盖了京区及周边地区乃至全国科研单位、院校、高新技术企业等，依托生物成像中心工作取得了大量具有国际影响力的研究成果，部分成果发表在Science、Nature、Cell、PNAS、eLife、Nature Communication、Nature Immunology、Cell Research Journal of Structural Biology等国际一流杂志上。第二，实验室建设规划方面，中国科学院生物物理研究所-赛默飞世尔科技生物电镜联合实验室顺利挂牌、具有二级生物安全的高分辨率冷冻电镜平台正式投入使用、生物成像中心100 m²样品制备新实验室启用、100 m²光镜实验室启用，都为生物成像中心的进一步发展保驾护航。第三，在新技术新方法研究推广上再创佳绩。中心主任孙飞研究员因其在冷冻电镜方法的开发和应用上的一系列重要成就以及对冷冻电镜技术的推广所做的贡献，获得了首届中国冷冻电镜杰出贡献奖；由李喜霞高级工程师、季刚正高级工程师、孙飞研究员牵头的完全国产化的大尺度生物样品电镜三维重构新技术——AutoCUTS-SEM成功发表，已经将相关产品推向市场，目前已有1位客户；由李硕果工程师、季刚正高级工程师、孙飞研究员牵头并自主研发的基于高真空冷台的光电关联成像新技术——HOPE也得以发表，并获得美国专利一项；由生物成像中心承担的中科院科研装备研制项目“低温透射电镜成像衬度增强技术-相位系统的研制”顺利通过验收，生物物理所成为国内首家自主研发相位板的单位，更值得一提的是该相位板系统首次在全世界范围内实现了x、y、z三个方向的独立精密调节，更加方便使用。在冷冻电镜技术推广方面，中心成功举办国际冷冻电镜图像处理前沿技术研讨班，并联合清华大学、生物物理学会组织第二届中国结构生物学冷冻电镜培训班。

随着2017年冷冻电镜技术获得诺贝尔化学奖，冷冻电镜如雨后春笋般发展，进入一个全新时代，新时代、新使命、新征程，只有以钉钉子的精神扎实做好做实各项工作，才能继续保持我中心的引领作用，为冷冻电镜技术的发展提供中国方案。

生物成像中心概述

1. 生物成像中心仪器设备一览表

仪器名称	型号	安置地点	负责人
300kV场发射透射电子显微镜	Titan Krios 300kV FEG TEM	7124	朱博玲
300kV场发射透射电子显微镜	Titan Krios 300kV FEG TEM	3110-1	黄小俊
200kV场发射透射电子显微镜	Talos F200C 200kV FEG TEM	7108	郭振玺
200kV透射电子显微镜	Tecnai 20 LaB ₆ 200kV TEM	7116	范得印
120kV透射电子显微镜	Tecnai Spirit 120kV TEM	7112/7118	范得印
双束扫描电子显微镜	Helios NanoLab 600i SEM	7120	张建国
原子力显微镜	Pico-Force Multi-Mode	6121C	贾艳侠
结构照明超分辨荧光显微镜	Delta Vision OMX	6121H	李硕果
激光扫描共聚焦荧光显微镜	Olympus FV1000S	6121D	滕岩
光谱型激光扫描共聚焦荧光显微镜	Olympus FV1200	6121F	滕岩
双光子显微镜	Olympus FV1000MPE	6121E	滕岩
高速转盘荧光成像系统	Andor Revolution XD	6121B	滕岩
高速双转盘共聚焦显微镜	Marianas SDC	6121B	滕岩
多功能活细胞工作站	IX81/MicroPoint	6121H	滕岩
图像分析工作站	DELL PRECISION T7610	6121A	冯韵
高压冷冻仪	Leica EM PACT2	7204-4	孙磊
高压冷冻仪	Leica EM HPM100	7204-4	孙磊
冷冻替代仪	Leica EM AFS2	7204	王莉
超薄切片机	Leica EM UC6	7204-3	王莉
超薄切片机	Leica EM UC7	7204-3	王莉
低温超薄切片机	Leica EM UC7+FC7	7114	孙磊
自动化连续切片收集系统	AutoCUTS	7106	李喜霞
研磨修块系统	Leica EM TRIM2	7204-3	王莉
微波组织处理机	Leica EM AMW	7204	彭灿
振动切片机	Leica VT 1200S	7204-3	孙磊
等离子清洗仪	Gatan SOLARUS950	3110-4	黄小俊
徠卡投入式快速冷冻仪	Leica EM GP	3110-4	黄小俊
投入式快速冷冻仪	Vitrobot	7110-4	黄小俊
Denton镀膜机	Denton Vacuum502B	7103	范得印
北仪创新镀膜机	ZZ-300A	7103	范得印
中科科仪镀膜机	KYKY SBC-2	7103	范得印
3D打印机	Formlabs	7103	黄小俊
高性能计算机集群	浪潮TS10K	9204	牛彤欣
高真空光学冷台系统	HOPE	7104	李硕果

2. 2017年度新增仪器介绍

小型卷轴式等离子处理机

主要性能和指标:

该等离子处理机是特别为处理连续切片自动收集所需的收集带定制的仪器。它可连接两种气体：GAS1、GAS2（压力0.3-0.8bar），不可接入腐蚀性气体；等离子处理射频电源功率：300W，设定示数：0-100%；等离子真空度：0.1-1mbar；卷轴膜长度，线速度：自定义可调；处理方式：自动、手动。

主要功能和服务范围:

用于为AutoCUTS提供亲水性的收集带，以及等离子清洗大样品（硅片）等。



型号：Schwarze PI-RTR

购入（安装）时间：
2017年8月

3. 2017年度新增服务介绍

荧光图像处理与数据分析

生物成像中心配备有荧光图像分析工作站，可对显微数据进行处理及分析。中心于2016年购置Imaris软件，它是一款生命科学领域中3D/4D/多维图像展示、渲染及交互分析的主导软件，可对宽场、激光共聚焦、转盘共聚焦、多光子、超分辨荧光显微镜及电镜等成像数据进行定量和定位分析。软件拥有点计数、表面结构渲染、神经分析、细胞分析、轨迹追踪、共定位分析等模块，在生命科学研究领域广泛应用。另外，系统还安装有Amira，AutoQuant，ImageJ等多款主流图像处理软件。

荧光图像处理与数据分析是生物成像中心2017年度的新增服务项目，该图像分析系统已于2017年6月6日正式上线，工作人员可根据用户个性化需求开展图像可视化渲染、动态影片制作，并提供追踪、分割、定量统计等数据处理服务。

联系人：冯韵（010-64888821）



图1. Imaris软件

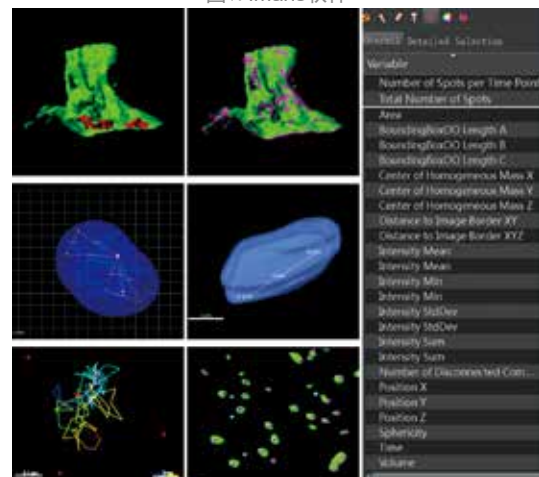


图2. 处理结果和常用统计参数

4. 人员队伍

学术带头人

孙飞	研究员	(万人计划)生物成像中心主任 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	院士	(万人计划)杰青, 教育部“长江学者奖励计划”, 中国科学院大学副校长, 交叉科学所重点实验室主任, 创新课题组组长 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 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	(万人计划)杰青, 生物成像中心专家, 创新课题组组长 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	杰青, 生物成像中心专家, 创新课题组组长 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。
章新政	研究员	(青年千人计划)生物大分子国家重点实验室创新课题组组长 研究方向: 冷冻电子显微技术, 蛋白质复合物的结构及功能研究, 病毒的三维结构及病毒入侵机制研究。
李栋	研究员	(青年千人计划)生物大分子国家重点实验室创新课题组组长 研究方向: 超分辨率显微镜成像技术、多光子荧光组织成像技术等技术的开发研究。

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	(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。
章新政	研究员	(青年千人计划)生物大分子国家重点实验室创新课题组组长 研究方向: 冷冻电子显微技术, 蛋白质复合物的结构及功能研究, 病毒的三维结构及病毒入侵机制研究。
李栋	研究员	(青年千人计划)生物大分子国家重点实验室创新课题组组长 研究方向: 超分辨率显微镜成像技术、多光子荧光组织成像技术等技术的开发研究。
苗龙	研究员	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	(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	(万人计划)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	(万人计划)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	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。

专业工程师队伍

电镜组	黄小俊 (组长)	博士, 高级工程师 中科院关键技术人才	技术方向: 常温/低温透射电镜技术和方法学研究。
	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: 常温/低温透射电镜技术和方法学研究。
	朱博玲	博士, 工程师	技术方向: 常温/低温透射电镜技术和方法学研究。
	范得印	技术员	技术方向: 常温/低温透射电镜技术及样品制备。
光镜组	滕岩 (组长)	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。
	冯韵	博士, 工程师	技术方向: 荧光图像处理与数据分析技术。
样品制备组	孙磊 (组长)	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。
	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。
	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。
	李喜霞	博士, 高级工程师	技术方向: 生物样品大尺度三维重构, 生物电镜的样品制备技术。
	彭灿	技术员	实习方向: 电镜常规样品制备技术及超薄切片技术。
高性能计算组	牛彤欣	硕士, 助理工程师	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、电子显微镜图像处理。
维修组	季刚 (组长)	博士, 正高级工程师 高级技术主管	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。
	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。
	张龙龙	技术员	技术方向: 设备维护与维修。
	谭雪珂	技术员	技术方向: 电镜样品制备技术。
博士后	贾星	博士后	技术方向: 冷冻电镜光电关联成像技术。

交流学习人员

Nick Yin. Larsen	Aarhus University Hospital	在读博士	学习方向: 大尺度连续切片光镜成像 (AutoCUTS-LM)
Steffan Moeller Soenderskov	Aarhus University Hospital	在读博士	学习方向: 冷冻电镜成像及三维重构
翟超	北京生命科学研究所	在读博士	学习方向: 线虫衰老过程中细胞结构变化的研究
何俊	上海科技大学	在读博士	学习方向: 冷冻样品制备, 冷冻电镜成像
杨雪梅	上海科技大学	在读博士	学习方向: 冷冻样品制备, 冷冻电镜成像

2017年度新增人员介绍

		
冯 韵 工程师	牛彤欣 助理工程师	贾 星 博士后
荧光图像处理与数据分析	电子显微镜图像处理	冷冻电镜光电关联成像

生物成像中心2017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（冷冻电镜单颗粒三维重构技术）

VI型CRISPR-Cas系统效应蛋白Cas13a的结构研究

课题背景:

几乎所有的古菌和约50%的细菌都具有CRISPR-Cas系统，用以抵抗病毒和质粒的侵染。CRISPR-Cas系统分为两大类，Cas13a是第二类VI型系统中的效应蛋白，具有RNA介导的RNA酶切活性，是目前第二类CRISPR-Cas系统发现的唯一能够降解RNA的蛋白（Cas9, Cpf1, C2c1均是RNA介导的DNA核酸内切酶），对开发研究RNA工具，扩展CRISPR系统在基因编辑方面的运用具有重大价值。

在该研究中，研究人员利用X-ray晶体学的方法又成功解析了LbuCas13a-crRNA-target RNA的三元复合物结构（3.08Å）。通过冷冻电镜技术，获得了3.2Å LbuCas13a-crRNA的二元复合物结构。结构显示Cas13a具有REC和NUC两个叶片，其中NUC叶片包含两个HEPN结构域、Helical-2结构域以及连接两个HEPN结构域的连接结构域，两个HEPN结构域组成了Cas13a切割target RNA的活性区域。crRNA识别序列互补的目的RNA，并与之结合形成双链RNA并被NUC叶片包围。同时，双链RNA的形成引起crRNA和Cas13a蛋白的构象变化，促使两个HEPN结构域相互靠近，进而激活Cas13a蛋白。研究人员通过结构和功能证明由crRNA和target RNA激活的Cas13a能切割任意单链的RNA。该研究发现为CRISPR-Cas13a系统的进一步开发提供了可靠的结构基础，对深入理解细菌抵御病毒入侵的分子机制提供了强有力的证据，并将对病毒引起的疾病的预防、检测、控制与治疗产生重大意义，特别是基于Cas13a高效的RNA酶切活性，对其应用于各类重大疾病的快速检测具有十分广阔的前景。

中国科学院生物物理所王艳丽研究员和章新政研究员为本文的共同通讯作者。王艳丽组的刘亮(博士后)、李雪岩(硕士研究生)、李宗强(工作人员)及章新政组的马军(博士后)为本文的共同第一作者，该研究得到科技部、国家自然科学基金、中国科学院战略性先导科技专项（B类）以及“国家青年千人项目”的资助，上海同步辐射光源（SSRF）、日本同步辐射光源SPring-8以及生物物理所生物成像中心为该研究提供了重要的技术支持。

论文发表相关信息:

Liu L, Li X, Ma J, Li Z, You L, Wang J, Wang M, Zhang X, Wang Y. (2017) The Molecular Architecture for RNA-Guided RNA Cleavage by Cas13a. *Cell*. 170(4):714-726.

生物成像中心在该研究中的主要贡献:

冷冻电镜单颗粒样品制备、筛选以及数据收集在生物成像中心完成。

技术支持: 黄小俊、季刚、郭振玺、朱博玲、范得印

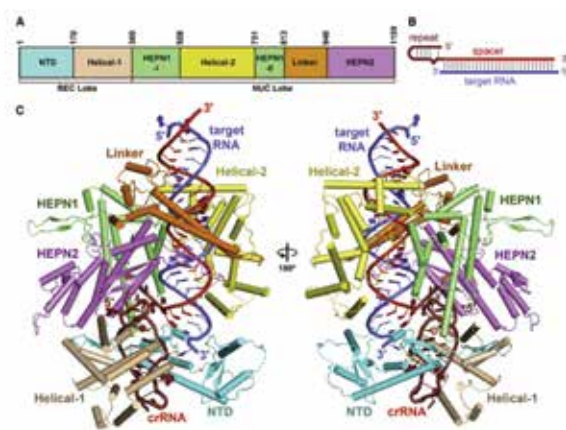


图1 LbuCas13a-crRNA-target RNA三元复合物的晶体结构

——透射电镜成像技术（冷冻电镜单颗粒三维重构技术）

植物光合作用中高效捕光的超分子机器结构

课题背景：

光合作用是地球上最为重要的化学反应之一。植物、藻类和蓝细菌进行的放氧型光合作用不仅为生物圈中的生命活动提供赖以生存的物质和能量，同时还维持着地球上的大气环境和碳氧平衡。对光合作用机理的研究不仅具有重要的理论意义，并且将为基于光合作用原理的应用研究提供具有启示性的方案。在高等植物中，光合作用的原初反应始于一个被称为光系统II的超分子机器，它能够捕获光能并将其用于驱动能量转换和在常温常压下裂解水分子。高等植物的光系统II是一个复杂的膜蛋白-色素超分子复合物，通常以二体形式存在，其每个单体包含了约30个蛋白亚基以及数百个色素分子和其它辅因子。为了适应不同的外界光照条件，高等植物光系统II与外周的捕光复合物组装成多种不同形式的超级复合物。在适应弱光条件的植物叶片中，光系统II核心复合物的外侧结合了两种主要捕光复合物LHCII（根据亲和力的不同分别被称为S-LHCII和M-LHCII）及三种次要捕光复合物（CP29、CP26和CP24）。这些捕光复合物与光系统II核心复合物组装形成C₂S₂M₂型超级复合物，使其得以在弱光条件下高效地捕获光能并完成能量转换。C₂S₂M₂型复合物是迄今为止在高等植物中能被稳定分离得到的最大的光系统II超级复合物。解析该复合物的完整结构对于人们认识其内部的亚基组成及排布方式、色素结合位置及相互取向和距离具有重要的科学意义。研究结果有助于深入理解植物高效捕获和传递光能的分子机理。

由生物物理所三个课题组组成的联合研究团队解析了处于两种不同条件下的豌豆C₂S₂M₂超级复合物的单颗粒冷冻电镜结构，分辨率分别达到2.7Å和3.2Å，其中2.7Å分辨率的结构是目前世界上通过冷冻电镜单颗粒法解析获得的分辨率最高的膜蛋白结构。该项工作首次展示了植物C₂S₂M₂型超级复合物的精确三维结构，该复合物总分子量达到140万道尔顿（1.4 megadalton, 1,400 kDa），是一个同源二聚体的超分子体系。两个结构中的每个单体分别包含了28或27个蛋白亚基、159个叶绿素分子、44个类胡萝卜素分子和众多的其它辅因子。该项工作首次解析了CP24和M-LHCII的结构，并指认了M-LHCII所特有的Lhcb3亚基；展示了不同外周捕光蛋白彼此之间以及它们与核心复合物之间相互识别和装配的位点和机制；在对豌豆C₂S₂M₂超级复合物内部高度复杂的色素网络进行深入分析的基础上，揭示了外周天线捕获光能并向核心复合物传递能量的途径。同时，两种不同状态的C₂S₂M₂结构的比较分析结果显示超级复合物中的外周捕光复合物M-LHCII和CP24的结合位置可变，提示高等植物光系统II超级复合物可对环境条件的变化做出响应，通过整体结构的变化实现对捕光过程的调节。上述研究结果对于进一步在分子水平深入理解高等植物光系统II超级复合物中的能量传递和光保护机理具有重要意义。Science杂志在同期为该项研究工作配发了题为“The complex that conquered the land”的评述。

该项工作由中国科学院生物物理研究所三个课题组密切合作共同完成（注：三个研究组为共同通讯实

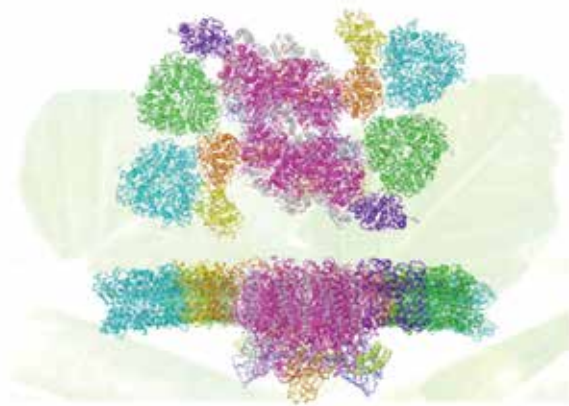


图1 以豌豆叶片为背景的C₂S₂M₂型PSII-LHCII超级复合物整体结构（上：俯视图；下：侧视图）。不同亚基以不同的颜色显示：核心跨膜大亚基，洋红色；核心跨膜小亚基，白色；放氧中心外在蛋白Psb0（蓝色），PsbP（浅橘色），PsbQ（浅绿色）；外周捕光天线蛋白S-LHCII（绿色），M-LHCII（青色），CP29（橙色），CP26（紫色），CP24（黄色）。

实验室，排名不分先后)。李梅研究员、章新政研究员和柳振峰研究员为论文的共同通讯作者，苏小东副研究员、马军博士后、魏雪鹏博士、曹鹏副研究员为该项工作的共同第一作者。这是该团队继2016年在Nature期刊上报道菠菜C₂S₂M₂型超级复合物的冷冻电镜结构之后的又一重要突破。该研究工作得到了中国科学院B类先导专项、中国科学院前沿科学重点研究项目、科技部重点研发计划、科技部973重大科学问题导向项目、自然科学基金和国家“青年千人计划”的共同资助。数据收集和样品分析等工作得到了生物物理所生物成像中心工作人员的大力支持和帮助。

论文发表相关信息:

Su X, Ma J, Wei X, Cao P, Zhu D, Chang W, Liu Z, Zhang X, Li M. (2017) Structure and assembly mechanism of plant C₂S₂M₂-type PSII-LHCII supercomplex. *Science*. 357(6353):815-820.

生物成像中心在该研究中的主要贡献:

冷冻电镜单颗粒样品制备、筛查以及数据收集在生物成像中心完成。

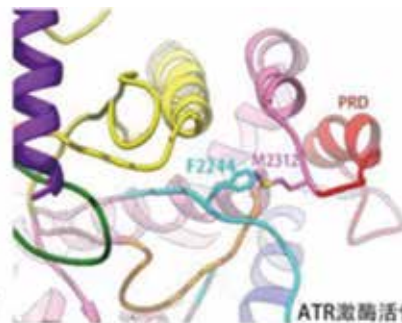
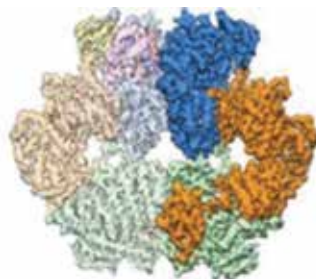
技术支持: 黄小俊、季刚、郭振玺、朱博玲、范得印

——透射电镜成像技术 (冷冻电镜单颗粒三维重构技术) 基因组稳定性调控最核心激酶ATR的激活机制

课题背景:

基因组稳定性维持是一切生命活动的基础，然而，多种外源和内源因素作用下产生的广泛DNA损伤和复制压力，构成了基因组不稳定的主要来源。ATR激酶负责启动细胞对基因组不稳定的响应和修复，全局性地调控基因组的稳定。真核生物生存严格依赖ATR激酶的活性，然而ATR激酶活化的具体分子机制尚不清楚。基因组不稳定性与易突变是肿瘤细胞的一个基本特征，通常伴随着大量稳定和修复基因组DNA的功能缺失，因此癌细胞更加依赖ATR激酶。ATR激酶抑制剂在癌症治疗上具有重要应用前景，现有ATR抑制剂的特异性和稳定性有待加强，研制新型的ATR抑制剂在肿瘤治疗上具有重要临床应用价值和意义。

中国科学技术大学蔡刚组研究发现细胞内的ATR以ATR-ATRIP异二聚体的同源二聚体的形式存在。已鉴定的和ATR激活直接相关的ATR PRD结构域和ATRIP coiled-coil构成了最主要的ATR-ATR和ATRIP-ATRIP同源二聚体的作用界面；鉴定出PRD和Bridge结构域是调节ATR生物学功能的关键位点，并发现这两个关键调节位点在mTOR，ATM和DNA-PKcs等激酶中高度保守；清晰揭示了在未激活状态下，ATR激酶的活化环被其PRD结构域通过一个特异性的疏水性相互作用所锚定，因而被锁定在待激活状态。ATR特异性激活蛋白可以利用其高度保守的疏水残基竞争性地解除PRD对活化环的抑制，迅速活化ATR的激酶。该成果不仅揭示了ATR激酶活化的



分子机制，具有帮助阐明基因组稳定性调控机制的重大科学意义；同时也揭示了ATR激酶上PRD和Bridge等调控位点可用于指导新型ATR激酶抑制剂的设计，为肿瘤治疗新型药物的研发提供了重要结构基础。

论文发表相关信息：

Wang X, Ran T, Zhang X, Xin J, Zhang Z, Wu T, Wang W, Cai G. (2017) 3.9 Å structure of the yeast Mec1-Ddc2 complex, a homolog of human ATR-ATRIP. *Science*. 358(6367):1206-1209.

生物成像中心在该研究中的主要贡献：

冷冻电镜单颗粒数据收集在生物成像中心完成。

技术支持：季刚、黄小俊

——透射电镜成像技术（冷冻电镜单颗粒三维重构技术）

酵母小亚基加工体90S核糖体前体的分子结构

课题背景：

核糖体是由RNA和大量蛋白质构成的大型分子机器，负责地球上所有生物的蛋白质合成。在真核生物中，核糖体组装是个非常复杂的过程。核糖体在成熟过程中需要和大量的组装因子暂时结合，形成了一系列核糖体前体复合物。小亚基核糖体在组装过程中形成两个主要的中间体：早期的90S和晚期的pre-40S前体。90S前体是个巨大的复合物，除了含有核糖体RNA和蛋白质组分，还含有约50个非核糖体蛋白质和U3 snoRNA，分子量高达5百万道尔顿。利用冷冻电镜单颗粒技术，我们解析了接近完整的酵母90S的结构，分辨率从8.7Å至4.5Å。其中在Mtr4敲除的样品中得到了4.5Å最高分辨率的样品。中科院生物物理研究所叶克穷课题组利用已知的晶体结构、从头建模和化学交联质谱数据构建了接近完整的90S结构模型。

90S的结构显示新生核糖体小亚基折叠形成多个分离的亚结构，并和大量组装因子结合。核糖体前体RNA的5'间隔区域、U3 snoRNA和大量组装因子形成巨大的基座，支撑新生核糖体的结构。结构还揭示了U3 snoRNA和核糖体前体RNA结合的新颖方式。该结构对理解核糖体小亚基的早期组装原理和组装因子的功能具有里程碑的意义。

论文发表相关信息：

Sun Q, Zhu X, Qi J, An W, Lan P, Tan D, Chen R, Wang B, Zheng S, Zhang C, Chen X, Zhang W, Chen J, Dong MQ, Ye K. (2017) Molecular architecture of the 90S small subunit pre-ribosome. *Elife*. 6. pii: e22086.

生物成像中心在该研究中的主要贡献：

冷冻电镜单颗粒样品制备、筛查以及数据收集在生物成像中心完成。

技术支持：黄小俊、郭振玺、季刚、朱博玲、李硕果、范得印

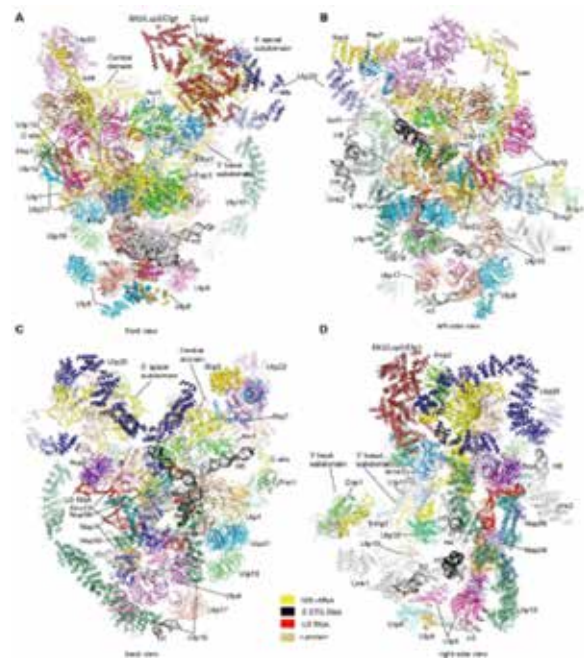


图1. 90S结构模型总图。图（A）、（B）、（C）、（D）依次分别为正视图、左视图、后视图、右视图。90S因子的颜色根据需要进行选择，18S rRNA用黄色标记，5' ETS RNA用黑色标记，U3 RNA用红色标记，核糖体蛋白用土黄色标记。

——双束扫描电镜成像技术

内质网调控自噬小体形成的分子机制

课题背景:

自噬 (autophagy) 是生物体内高度保守的降解途径。细胞通过形成双层膜结构的自噬小体, 包裹部分细胞质或受损细胞器, 并将之运送到溶酶体进行降解, 这一过程被称为自噬。自噬是细胞清除自身垃圾, 维持稳态平衡的重要生命过程。人们先前对于自噬分子机制的认识主要来源于单细胞酵母, 而多细胞生物体内的自噬过程更为复杂, 存在多个酵母中没有的步骤。例如, 自噬小体的形成过程中, 隔离膜 (IM) 与ER存在着广泛的相互作用, 但是这种相互作用的形成、维持以及解离的分子机制尚不清楚。该文阐述了生物物理所张宏课题组前期研究发现的多细胞生物特有的自噬蛋白EPG-3/VMP1参与内质网 (ER) 调控自噬小体形成过程的机制。该研究不仅揭示了ER-IM 互作建立及解离的机制, 也阐明了VMP1通过调节SERCA的活性负相调控ER与其他细胞器的互作。

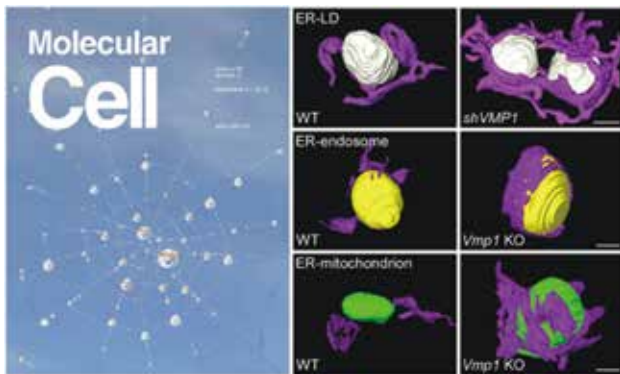


图1 多细胞生物特有的自噬蛋白EPG-3/VMP1参与内质网 (ER) 调控自噬小体的形成。在EPG-3/VMP1敲除细胞中, 内质网与细胞器的互作显著增加, 如同雨后水珠粘挂在蜘蛛网上。

一套样品的制备、修块和定位的方法。与传统的手工连续切片收集--透射电镜拍摄相比, 在数据收集速度和后期处理方面都有明显的优势。为本研究成果的提出提供了优质的影像学依据。

技术支持: 张建国

论文发表相关信息:

Zhao YG, Chen Y, Miao G, Zhao H, Qu W, Li D, Wang Z, Liu N, Li L, Chen S, Liu P, Feng D, Zhang H. (2017) The ER-Localized Transmembrane Protein EPG-3/VMP1 Regulates SERCA Activity to Control ER-Isolation Membrane Contacts for Autophagosome Formation. *Mol Cell*. 67(6):974-989.

生物成像中心在该研究中的主要贡献:

实验中使用生物成像中心双束扫描电镜进行自动化样品切削、图像采集, 快速获得大量的连续层面上的高分辨率电镜图片。工作人员与实验者一起摸索出

——双束扫描电镜样品制备技术

结合FIB-SEM三维成像技术和可克隆标签APEX2的蛋白质三维定位研究

课题背景:

蛋白质在细胞或组织的定位与其功能的发挥密切相关。传统的电子显微镜配合一些标记技术可以在超微结构的水平上揭示目标蛋白质的定位信息。然而, 三维空间中超微结构水平的蛋白质定位尚处于起步阶段, 很多方法都存在实验结果不稳定、适用范围窄和实验低耗时等缺点。孙飞研究组通过结合稳定性好、适用范围广且灵敏度高的电镜标签APEX2和自动化程度高且Z向分辨率较高的体电镜技术FIB-SEM, 建立一种蛋白质三维

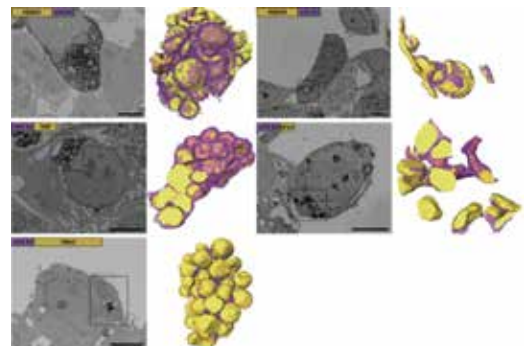


图1 通过APEX2-FIB-SEM技术对线粒体融合分裂相关蛋白的三维定位

定位的方法APEX2-FIB-SEM。并且通过该方法成功地对线粒体融合分裂相关的蛋白（MiD49/51、Fis1、Mff、Mfn2）进行了三维定位。通过定位实验我们发现全部的五种蛋白均定位于线粒体外膜，它们的过表达均可引发线粒体的聚集。MiD49/51、Fis1、Mff广泛地分布于线粒体表面，而Mfn2集中分布于聚集线粒体间接触的区域。

论文发表相关信息：

Shi, Y., Wang, L., Zhang, J., Zhai, Y., Sun, F., (2017) Determining the target protein localization in 3D using the combination of FIB-SEM and APEX2. *Biophysics Report*. 3(4):92-99

生物成像中心在该研究的主要贡献：

超薄切片、透射电镜成像、扫描电镜数据收集工作均在生物成像中心完成。

技术支持：王莉、张建国

——透射电镜样品制备技术（高压冷冻、冷冻替代、超薄切片）

肠道病毒71劫持ERAD组分p97以促进其复制

课题背景：

肠道病毒71型是引起婴幼儿手足口病（hand-foot and mouth disease; HFMD）主要病原体之一。人类肠道病毒71型于1969年首次从加利福尼亚患有中枢神经系统疾病的婴儿粪便标本中分离出来的，这些病毒可被培养在恒河猴肾脏细胞(rhesus monkey kidney cell; RhMK)及人胚二倍体细胞（human fetal diploid cell）中。

内质网相关性降解（ERAD）是细胞内稳态的重要功能。微小RNA病毒感染如何干扰ERAD的机制在之前的研究中尚不清楚。中国医学科学院病原生物学研究所赵振东课题组证实肠道病毒71（EV71）感染，并且通过使用不同机制，利用其蛋白酶2Apro和3Cpro靶向多个关键ERAD分子来显著抑制细胞ERAD。

Ubc6e被鉴定为EV71干扰ERAD中的关键E2泛素缀合酶。EV71 3C切割Ubc6e，分别在Q219G，Q260S，和Q273G。EV71 2Apro主要抑制从头合成关键ERAD分子Herp和VIMP在蛋白质翻译水平。Herp通过未知机制差异性参与不同糖基化的ERAD底物 α -1抗胰蛋白酶Null Hong Kong（NHK）和Sonic-hedgehog（SHH-C）的C末端的降解。p97被鉴定为EV71复制中的宿主因子；它与EV71诱导的复制细胞器中的病毒蛋白和其他已知的复制相关分子重新分布并共存。

通过电子显微镜和多色共焦测定显示EV71诱导的膜泡与内质网（ER）密切相关，ER膜分子RTN3在EV71感染期间重新分布到病毒复制复合体。因此得出建议EV71重新排列ER膜并从细胞ERAD中劫持p97，以使其复制受益。这些发现增加了人们对病毒如何干扰ERAD和为EV71感染提供潜在抗病毒靶点的理解。

这项研究表明了EV71与细胞ERAD系统之间的新颖关系。p97被鉴定为对EV71复制至关重要的新宿主因子；

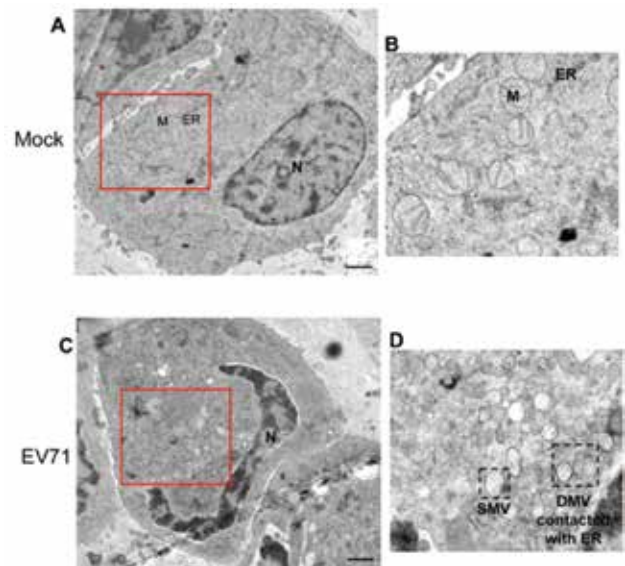


图1. EV71诱导感染细胞中的RO，并在感染期间将RTN3重新分布到病毒RO

它重新分配并与EV71病毒蛋白在EV71诱导的RO中共同定位。这些发现为EV71感染的抗病毒治疗提供了潜在的目标。

论文发表相关信息：

Wang T, Wang B, Huang H, Zhang C, Zhu Y, Pei B, Cheng C, Sun L, Wang J, Jin Q, Zhao Z. (2017) Enterovirus 71 protease 2Apro and 3Cpro differentially inhibit the cellular endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) pathway via distinct mechanisms, and enterovirus 71 hijacks ERAD component p97 to promote its replication. *PLoS Pathog.* 13(10):e1006674. doi: 10.1371.

生物成像中心在该研究中的主要贡献：

高压冷冻、冷冻替代、超薄切片等电镜样品制备以及电镜数据采集均在生物成像中心完成。孙磊老师提供了技术服务和技术指导。

技术支持：孙磊、彭灿

——结构光照明超分辨荧光显微成像技术 细菌中脂滴结合DNA并参与转录调控的新功能

课题背景：

脂滴是一种以中性脂作为内容物、由单层磷脂膜和外周蛋白包被的球型细胞器。脂滴单层磷脂膜的特异性，特别是脂滴结构蛋白对脂滴的特异识别，表明脂滴是细胞中非常特殊的且区别于其他双层磷脂膜细胞器的膜结构。

细菌脂滴的出现，给细菌提供了一种崭新的、不同于细胞质膜的细胞区隔化方式。中国科学院生物物理研究所刘平生课题组前期工作揭示了细菌脂滴的脂质和蛋白组成，发现了一个控制脂滴大小的

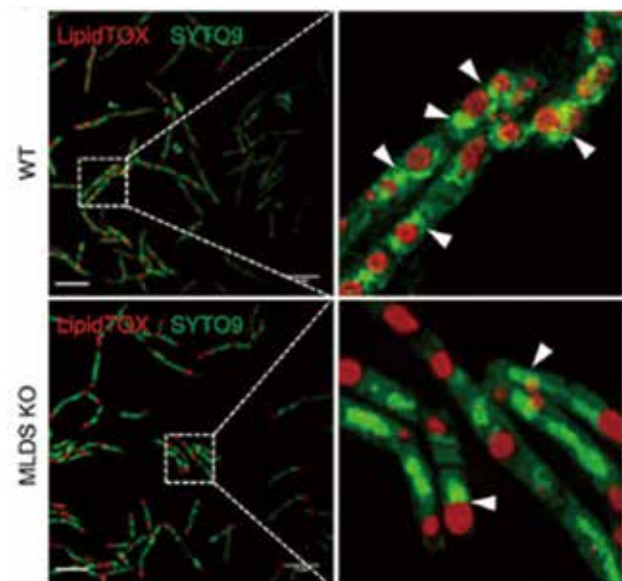


图1 对照组与实验组细菌体内脂滴（红色荧光标记）与DNA（绿色荧光标记）超分辨荧光成像

蛋白并命名为MLDS。该课题组相关研究最近取得突破性进展，发现并证明了细菌脂滴通过MLDS结合细菌基因组DNA，并在极端环境下保护基因组DNA，从而提高细菌的成活率。在对这一重要生理过程的调控机制研究中，刘平生课题组进一步揭示细菌脂滴不但保护DNA，还通过控制转录因子的有效浓度，参与DNA的转录调控。该成果(“Bacterial lipid droplets bind to DNA via an intermediary protein that enhances survival under stress”)于2017年7月6日发表在《Nature Communications》上。文章介绍了该课题组的重要发现：细菌脂滴能够通过其主要蛋白MLDS结合并保护基因组DNA，以及通过MLDSR蛋白参与转录调控，从而有利于细菌在极端环境下生存。这项研究表明：细菌脂滴通过其单层磷脂膜的特异性，储存甘油三酯并结合基因组DNA，从而提高了决定生命的两大因素-代谢和遗传-的有效性和专一性。因此，细菌脂滴

的出现，有可能是原始细胞核的雏形，是细胞由原核到真核进化的一个重要里程碑。

该实验中使用了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，利用免疫荧光技术标记尺度在百纳米级的脂滴以及细菌DNA，极高的分辨率为精确研究二者之间的相互作用提供了重要的影像证据。

论文发表相关信息：

Zhang C, Yang L, Ding Y, Wang Y, Lan L, Ma Q, Chi X, Wei P, Zhao Y, Steinbüchel A, Zhang H, Liu P. (2017) Bacterial lipid droplets bind to DNA via an intermediary protein that enhances survival under stress. Nat Commun. 8:15979.

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、单层磷脂膜的脂滴以及细菌中的DNA结构，为验证本实验结果提供了重要的影像佐证。

技术支持：李硕果

——结构光照明超分辨荧光显微成像技术 一种新型基因组DNA三维成像工具

课题背景：

人类衰老和许多衰老相关的疾病都伴随着染色质结构的改变或异常，因此探索染色质结构的动态变化对于深入理解衰老及衰老性疾病的机制具有重要的意义。基因组重复序列是隐含在人类基因组中的“暗物质”，通常被包裹在致密的异染质中，并且被认为是无用的“垃圾序列”。由于研究手段的限制，在现有的大多数基因组信息分析中，这些“垃圾序列”往往会被主观地“忽略”掉。人们所熟知的端粒其实也是一种基因组重复序列，而端粒的缩短已经成为衰老研究领域为数不多的重要分子标记物之一。尽管如此，对于衰老是否伴随更为广泛的基因组重复序列的改变，目前人们还知之甚少。

中科院生物物理研究所刘光慧课题组和徐涛课题组，以及中科院动物研究所曲静课题组合作完成的一项题为"Visualization of Aging-Associated Chromatin Alterations with an Engineered TALE System"的研究成果，该研究发展了一种新型基因组DNA三维成像工具，利用此工具实现了对衰老伴随的端粒缩短和着丝粒异染色质改变的精准成像。研究人员通过对传统TALE介导的端粒、着丝粒和核仁区核糖体DNA等基因组重复序列的成像结果进行细致分析，发现利用传统的TALE标记基因组重复序列时会在细胞内产生异常的聚集斑块（aggregates），且这些聚集斑块多数情况下脱离了基因组上的DNA靶序列，因而极大地限制了TALE在染色质三维成像中的应用。研究团队通过筛选一系列可提高细胞内蛋白溶解性的“助溶解多肽”，发现硫氧还蛋白（Thioredoxin）与TALE的融合表达（该融合蛋白称为TTALE）能够特异地清除TALE成像时伴生的聚集斑块，从而最大程度地释放TALE在染色质三维成像方面的效能。实验结果表明，同Cas9相比，TTALE具有成像信噪比高、易于操作等优点，可广泛应用于胚胎干细胞、诱导性多能干细胞、成体干细胞（如间充质干细胞和神经干细胞等）、终末分化细胞（如神经元和血管平滑肌细胞）、肿瘤细胞以及卵细胞等多种人类细胞类型。

该实验中使用了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采集荧光图像，利用免疫荧光技术标记端粒、着丝粒和核仁区核糖体DNA等，通过SIM成像技术顺利采集到了目标蛋白的荧光定位，同时借助坐标载网以及荧光珠等辅助定位手段进一步完成了光电关联成像，利用透射电子显微镜技术，观测到了细胞衰老伴随的端粒缩短和着丝粒异染色质失序等基因组结构的变化，并且首次在体内单细胞水平观察到了端粒酶缺失小鼠的端粒加速缩短现象。

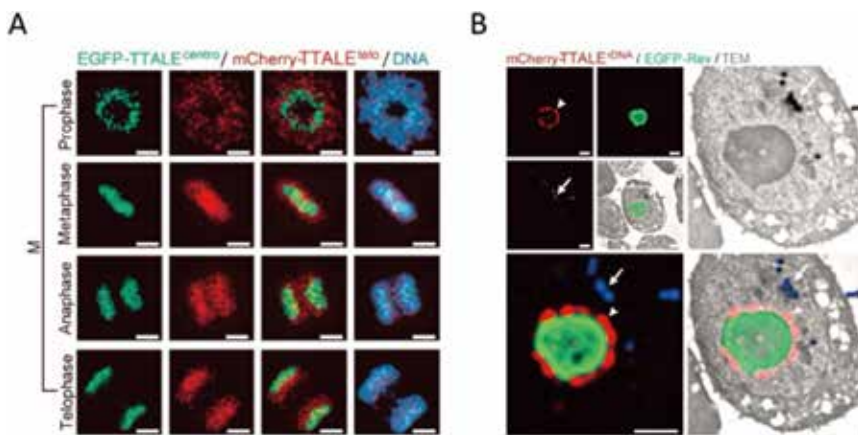


图1 利用TTALE成像系统实时观测HeLa细胞有丝分裂过程中端粒和着丝粒的动态变化(A)；TTALE介导的28S核糖体DNA在细胞核仁区的精准成像(B)。

论文发表相关信息：

Ren R, Deng L, Xue Y, Suzuki K, Zhang W, Yu Y, Wu J, Sun L, Gong X, Luan H, Yang F, Ju Z, Ren X, Wang S, Tang H, Geng L, Zhang W, Li J, Qiao J, Xu T, Qu J, Liu GH. (2017) Visualization of aging-associated chromatin alterations with an engineered TALE system. *Cell Res.* 27(4):483-504.

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，可以清晰观察到端粒、着丝粒和核仁区核糖体DNA等的细胞定位；借助坐标载网以及荧光珠等辅助定位手段进一步完成了光电关联成像，实现电镜高分辨超微结构数据采集，观测到了细胞衰老伴随的端粒缩短和着丝粒异染色质失序等基因组结构的变化，并且首次在体内单细胞水平观察到了端粒酶缺失小鼠的端粒加速缩短现象。以上为本研究工作提供了重要的影像证据。

技术支持：李硕果

——光镜成像技术、电镜样品制备技术 血脑屏障发育的分子调控网络

课题背景：

血脑屏障 (blood-brain barrier, BBB) 对维持中枢神经系统的稳态至关重要，其发育是一个由血管内皮细胞、周细胞等紧密协同的渐进过程，包括BBB诱导形成和屏障功能成熟两个阶段。尽管目前对于内皮细胞和周细胞在BBB发育中各自的功能已有报道，但二者的协同调控机制，一直是本领域的未解之谜。

生物物理所阎锡蕴组在该研究中首次报道了新生血管标志分子CD146在BBB发育过程中动态调控内皮和周细胞相互作用并促进BBB形成。在此过程中，随着BBB发育过程的演进，CD146的表达呈动态变化，在发育早期，CD146在内皮细胞中表达，而当周细胞出现后，CD146在内皮细胞上的表达被抑制，转而在周细胞上表达。随后深入的机制研究表明，CD146这种动态表达模式，是由其协调内皮细胞和周细胞的相互作用从而在时空上调控BBB发育的功能决定的。在BBB发育早期，内皮细胞中CD146调控紧密连接蛋白主要成员claudin-5的表达，诱导BBB开始形成；当周细胞出现时，周细胞表达的CD146作为共受体参与PDGF-B/PDGFR β 介导的信号通路，促进内皮细胞对周细胞的招募，形成具有屏障功能的BBB。周细胞包裹内皮细胞后，分泌TGF- β 1下调内皮细胞中CD146的表达，由此抑制CD146介导的免疫细胞浸润到脑实质的功能，促进中枢的免疫稳态，使屏障功能达到进一步的成熟。

该研究成果不仅揭示了BBB发育中内皮和周细胞的有序协同作用机制，同时也为CD146在中枢性疾病中的

作用机理提供了新证据。前期课题组发表在Scientific Report杂志的研究发现，在多发性硬化疾病中，CD146在脑内皮细胞高表达，通过调控内皮细胞与免疫细胞粘附，促进免疫细胞浸润到中枢神经系统来发挥免疫监视功能。该研究将BBB成熟期内皮细胞低表达CD146促进免疫稳态和前期发现的病理期内皮细胞高表达CD146促进免疫反应相联系，进一步为靶向CD146治疗中枢炎症疾病提供了新的理论基础。

论文发表相关信息：

Chen J, Luo Y, Hui H, Cai T, Huang H, Yang F, Feng J, Zhang J, Yan X. (2017) CD146 coordinates brain endothelial cell-pericyte communication for blood-brain barrier development. Proc Natl Acad Sci USA. 114(36):E7622-E7631.

生物成像中心在该研究中的主要贡献：

荧光图像分析和处理在生物成像中心完成，滕岩老师和冯韵老师给予了很多技术指导 and 帮助。

技术支持：滕岩、冯韵

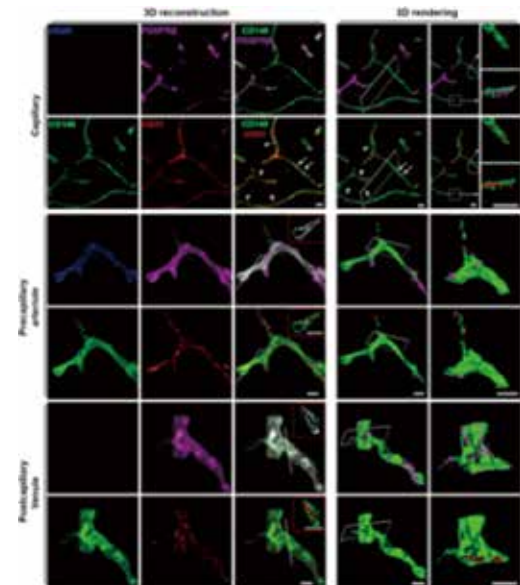


图1 CD146在BBB的内皮细胞和周细胞上动态表达（大脑皮层）

——光镜成像技术、电镜样品制备技术

肠道中的ILCreg细胞参与调节肠道炎症反应

课题背景：

天然免疫系统是机体抵抗病原体的重要防线。天然免疫系统需要精确的免疫平衡调节，免疫应答低下或者应答过度均会引起免疫平衡失调，导致严重的免疫病理反应。肠道粘膜免疫系统是机体抵抗病原体的重要场所之一。然而，肠道粘膜免疫系统同时也对不同的共生菌和食物来源的抗原产生免疫耐受。肠道免疫系统的活化和免疫耐受的失衡会导致炎性肠道疾病的发生。固有淋巴样细胞（ILC）是近年来发现的一类重要的天然免疫细胞亚群。根据ILC细胞分泌细胞因子的不同可以分为三类，即ILC1、ILC2和ILC3细胞。不同类群的ILC细胞在抵抗病原体反应中均发挥着重要的作用。ILC细胞在病原体刺激后被激活产生大量的细胞因子，如TNF、IFN-和IL-17等，激发免疫应答以清除病原体。有研究表明，肠道中的ILC细胞的过度活化会导致肠道炎症，而持续的炎症会引起炎性肠道疾病（IBD）。因此，是否存在调节性的ILC细胞一直是天然免疫研究领域重点关注的课题。

范祖森课题组利用IL-10报告小鼠，在肠道组织发现了一群能够分泌IL-10的ILC细胞新亚群，该群ILC细胞随着肠道炎症的进展而大量扩增，继而抑制过度的肠道炎症，将其命名为ILCreg细胞。研究者发现ILCreg细胞具有不同于ILC1、ILC2和ILC3的特征性分子。在炎性刺激时，ILCreg细胞能够分泌大量的IL-10和TGF-。ILCreg细胞通过分泌IL-10抑制ILC1和ILC3细胞的过度活化，从而缓解了肠道炎症，发挥负性调节作用。通过构建ILCreg特异性缺失的小鼠模型，研究者发现ILCreg的缺失会加重肠道炎症，并且导致ILC1/3细胞的过度活化。研究中还发现，ILCreg自分泌的TGF-能够维持ILCreg在炎症过程中的增殖和存活，从而维持了ILCreg细胞在炎症过程中的调节功能。该研究揭示了调节性的ILCreg细胞在肠道炎症致病机制中的重要调节作用，提示

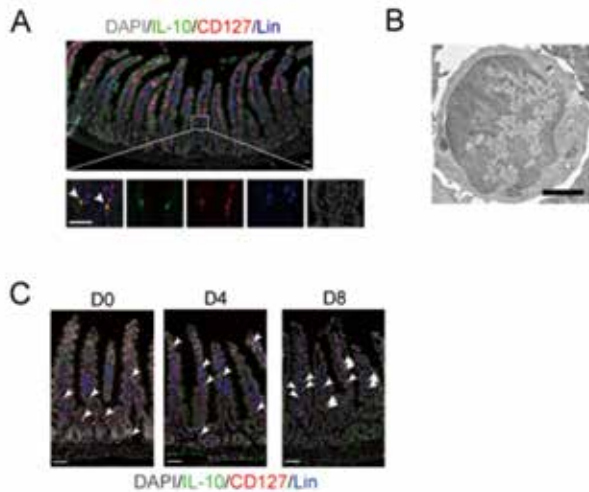


图1 激光扫描共聚焦荧光显微和透射电镜成像显示：(A) 小鼠小肠中存在Lin-CD127+IL-10+ILCreg细胞。(B) 电镜显示ILCreg细胞具有淋巴细胞形态。(C) ILCreg细胞随着炎症的发生发展细胞数目增多。

ILCreg可能在肠道的免疫耐受和稳态维持中亦具有重要作用。

论文发表相关信息：

Wang S, Xia P, Chen Y, Qu Y, Xiong Z, Ye B, Du Y, Tian Y, Yin Z, Xu Z, Fan Z. (2017) Regulatory innate lymphoid cells control innate intestinal inflammation. *Cell*. 171(1):201-216.

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Lin-CD127+IL-10+ILCreg细胞，为后续的功能研究提供了重要的成像依据，并且生物成像中心在电镜样品制备过程中提供了详细的指导和技术服务，用透射电镜Tecnai spirit能够清晰观察到ILCreg的细胞内部形态，证明该细胞有淋巴细胞的形态特征。

技术支持：滕岩、孙磊

——光镜成像技术

哺乳期褐色脂肪细胞的特征研究

课题背景：

中国科学院遗传与发育生物学研究所Speakman组为了证实是否存在来源于褐色脂肪细胞的乳腺细胞，使用了标记脂肪细胞和乳腺细胞的转基因小鼠进行细胞谱系示踪实验，观察了在非繁殖期、哺乳期和断奶后三个时期褐色脂肪组织和腹股沟乳腺组织中的细胞类型以及比例，同时结合AAV病毒标记脂肪细胞和褐色脂肪细胞移植实验观察了褐色脂肪细胞在哺乳期的变化。结果证实，哺乳期确实存在一定比例（2.5%）的褐色脂肪细胞来源和米色脂肪细胞来源的乳腺细胞，但是这些乳腺细胞只呈现乳腺基底的肌上皮细胞形态，并不具备分泌乳汁的功能，而是在幼崽吸奶时负责收缩乳腺导管以协助乳汁分泌到乳头。为验证这一小部分细胞的生理学意义，研究团队通过构建条件性敲除小鼠模型发现，清除这类褐色脂肪细胞会影响母鼠的泌乳从而导致幼崽发育迟

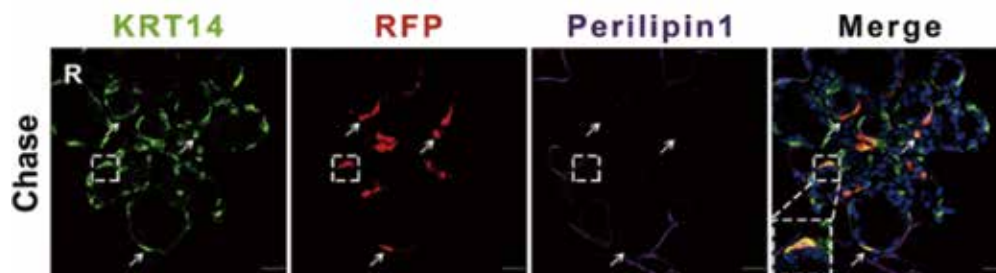


图1 激光扫描共聚焦荧光显微成像显示：在哺乳期的Ucp1-CreERT-ROSAtdtomato小鼠的乳腺中，表达KRT14蛋白的乳腺肌上皮细胞中Ucp1-RFP信号出现，同时表达KRT14的Ucp1-RFP细胞中并没有脂肪细胞特异蛋白Perilipin1的表达。

缓。此外，转录组测序分析还发现，这类来自褐色脂肪细胞的乳腺肌上皮细胞兼具脂肪细胞和肌上皮细胞的分子特征，断奶后仍有1%左右的脂肪细胞具有乳腺细胞来源的分子特征和产热能力，说明乳腺细胞可以在断奶后呈现脂肪细胞的形态。

论文发表相关信息：

Li L, Li B, Li M, Niu C, Wang G, Li T, Król E, Jin W, Speakman JR. (2017) Brown adipocytes can display a mammary basal myoepithelial cell phenotype in vivo. *Mol Metab.* 6(10):1198-1211.

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GFP或RFP蛋白与KRT14蛋白在乳腺细胞中的共定位情况，为分子机制的研究提供了重要的成像依据。

技术支持：滕岩

2.技术研究（2017年度生物成像中心所开展的技术和方法学研究）

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

连续超薄切片扫描电镜成像方法研究

（李喜霞、季刚、陈曦*、丁玮、孙磊、徐伟、韩华*、孙飞）

随着神经生物学、细胞生物学的深入发展，特别是近几年提出的脑计划相关研究，使得研究者需要获得组织层面更大尺度的三维结构信息（ $>1\text{mm}^3$ ），这就需要依赖基于连续超薄切片扫描电镜成像方法（ssSEM）这项新技术。该技术主要是通过收集带对树脂包埋样品的连续超薄切片进行自动化收集，然后将切片带转移至扫描电镜，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。它的最大优势在于：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被反复“查阅”，科研人员可针对感兴趣的区域进行分次研究，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，真正实现高通量数据采集。

成像中心自行研发的连续超薄切片自动收集器（AutoCUTS），较之于商业化的ATUM，体积更为小巧灵活、操作简单、对环境（特别是外界振动）具备更好的耐受性，该收集器目前已授权镇江乐华电子科技有限公司进行市场销售（图1）。

在此基础上，该研究已建立了全套完整的AutoCUTS-SEM解决方案及工作流程（图2）。探索了利用高压冷冻/冷冻替代方法制备适合连续切片的高质量线虫样品，并对市面上的多种收集带的选择和预处理方法进行了详细地比较和探索。最终，研究人



图1 AutoCUTS系统（AC-1）工作状态

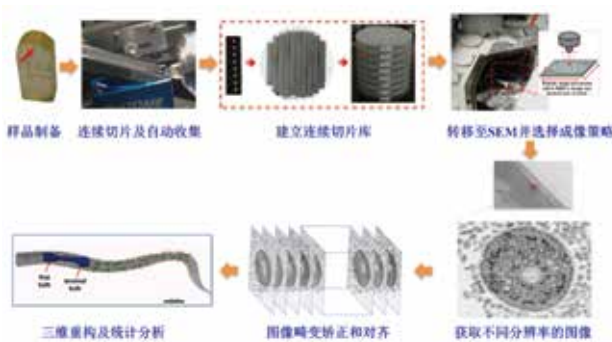


图2. 连续超薄切片扫描电镜成像方法解决方案

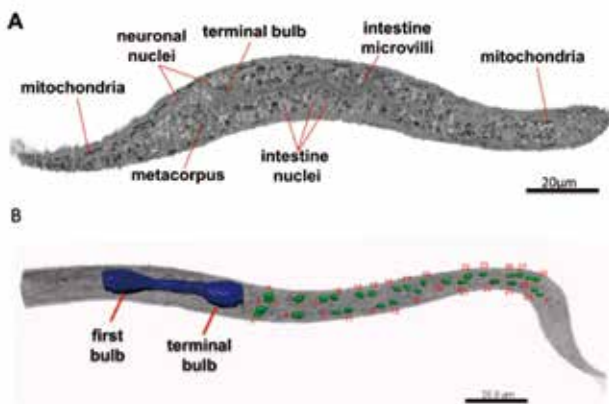


图3. 线虫幼虫三维重构结果

员利用AutoCUTS成功收集了大约2140张连续切片，建立了整条线虫幼虫的连续切片库，并利用自行开发的程序和脚本（<http://cbi.ibp.ac.cn/shared-resources/autocuts-sem>）完成了高质量的SEM图像采集，与中科院自动化所韩华课题组合作完成了数据处理和重构，开源的线虫幼虫三维结构数据库有助于研究者挖掘更多感兴趣的信息（图3）。

AutoCUTS-SEM技术应用非常广泛，它可以解决诸多神经科学、脑科学、细胞生物学、发育生物学等多学科的难题。比如：（1）绘制脑连接图谱；（2）构建线虫等生物的三维结构数据库；（3）捕捉细胞内、组织内发生的小概率事件；（4）分析三维结构差异。从组织层面上分析多种组别特定区域的三维结构差异，深刻理解其发生机理。

Publication: Li, X., Ji, G., Chen, X., Ding, W., Sun, L., Xu, W., Han, H., Sun, F., 2017. Large scale three-dimensional reconstruction of an entire *Caenorhabditis elegans* larva using AutoCUTS-SEM. *J Struct Biol.* 2017. doi: 10.1016/j.jsb.2017.09.010.

基于高真空光学冷台的光电关联成像方法研究进展

（李硕果、季刚、黄小俊、牛彤欣、贾星、孙飞、徐伟）

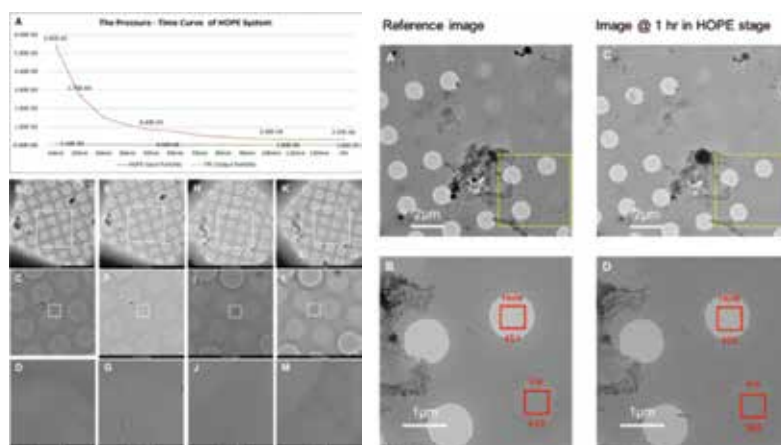
生物成像中心自2014年开始开展基于高真空冷台的光电关联成像方法研究，并承担了一项中科院仪器设备研发项目，该项目于2016年9月通过技术验收，各项指标均已达到预期要求。2017年度，项目组技术攻关重点包括：一，进一步优化腔室真空度、防污染效果等技术指标；二，优化光电关联技术流程，应用低温荧光辅助定位原位解析超微结构。

首先，基于前期工作基础，项目组系统测试了以分子泵组为真空产生装置的高真空冷台（High-vacuum Optical Platform for cryo-CLEM, HOPE）样品腔室内的极限真空值（ 3.2×10^{-4} Pa，见图1左图A所示），并在实验中发现，下样过程中干净氮气喷注可以有效减少样品转移过程中容易引入的絮状污染物（见图1左图B-M）。同时，还系统测定了极限真空下，冷冻样品在腔室内的冰层增长速率（约3.9%，见图1右图A-D所示）。

其次，基于高真空冷台的光电关联显微成像技术在关联成像过程中避免了对样品的夹取，最大限度减少了对样品的损坏，与之配套设计的光电关联定位软件可以实现光学成像与电镜成像的精确匹配，为光电关联实验提供了极大的便利。项目组选择带有荧光标签的大肠杆菌作为测试样品，基于本装置冷冻荧光辅助定位成功获得了目标物的冷冻电镜原位超微结构解析（见图2）。

2017年11月4日，该成果研究论文“High-vacuum Optical Platform for cryo-CLEM (HOPE): a New Solution for

图1 左图：A高真空冷台样品腔室内真空提升曲线；B-D冷冻样品在传输进高真空冷台不同倍数低温电镜图像；E-G冷冻样品传输进高真空冷台后不经过氮气喷注装置直接上样下样后再进行冷冻电镜成像，结果显示样品表面有明显的絮状污染物；H-J冷冻样品在传输进高真空冷台不同倍数低温电镜图像；K-M冷冻样品传输进高真空冷台后采用过氮气喷注装置在每次下样前对样品表面进行氮气喷注，再进行冷冻电镜成像，结果显示絮状污染物明显减少。右图：A-B放入高真空冷台前冷冻电镜不同倍率成像；C-D放入高真空冷台1小时后冷冻电镜不同倍率成像；通过对比同一位置冰层对电子的透过率变化来衡量冷冻样品在高真空冷台内存储过程中的冰增长速率。



“Non-integrated Multiscale Correlative Light and Electron Microscopy”在线发表在了Journal of Structural Biology杂志上，文章详细阐述了成像中心自主研发的基于高真空冷台的光电关联成像新技术HOPE: High-vacuum Optical Platform for cryo-CLEM，这种新型的可用于冷冻样品光电关联成像的高真空光学冷台系统可与透射电镜冷冻

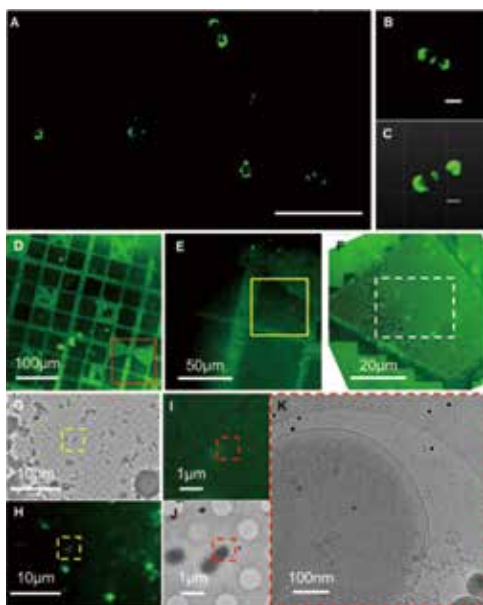


图2 A-B结构光照明超分辨荧光显微图像显示目的蛋白定位在大肠杆菌样品的两端；C通过Imaris数据处理软件进行三维可视化渲染，显示目标蛋白在大肠杆菌内的空间定位情况；D低倍冷冻荧光（10X）图片快速筛选目标所在区域；E对荧光信号合适的目标区域进行高倍荧光成像（40X）；F光电关联匹配图像进一步锁定目标区域；G-H对荧光信号区域内的目标样品进行逐步放大；I-J锁定成像目标；K对目标样品进行高分辨率三维数据采集。

样品杆适配连接，完成荧光定位后样品将随冷冻样品杆一起被转移进电镜当中进行高分辨率数据采集。较之于商业化的光电关联成像系统（FEI iCorr, CorrSight, Leica Cryo-CLEM等），HOPE可以独立搭载在不同的商业化荧光显微镜上，系统操作便捷；冷冻样品杆自身带有冷却装置；腔室真空设计可以有效隔离冷冻样品与光学物镜镜头之间的热传递，使该系统不必使用特殊设计的物镜镜头，同时也避免了光学成像窗口、腔壁结露甚至结霜的问题。该系统是对现有冷冻成像技术的提升和扩展，大大降低了冷冻光电关联成像的技术门槛，提高了实验的稳定性和可靠性。

孙飞研究员与季刚正高级工程师为文本的共同通讯作者，生物成像中心的李硕果工程师和季刚正高级工程师为本文的共同第一作者。该课题获得中科院先导B项目、中科院仪器设备功能开发技术创新项目和国家自然科学基金的支持。孙飞组博士生师扬、王圣柳，丹麦Aarhus University的Mingdong Dong课题组与孙飞组联合培养博士后Lasse Hyldgaard Klausen，生物成像中心黄小俊高级工程师、丁玮高级工程师、牛彤欣工程师，徐涛组张翔工程师等也参与了该课题的研究。本研究项目中所涉及的冷冻电镜成像、结构光照明超分辨荧光成像及图像数据处理工作等均在蛋白质科学研究平台生物成像中心完成。项目组自主设计制作的高真空光学冷台已经获得中国发明专利（ZL 201410363314.8）及美国发明专利（15/500,009）授权。

聚焦离子束法制备组织样品冷冻含水切片

(张建国、孙磊、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其相互作用的信息, 是蛋白质组学研究的重要辅助手段, 被称为“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、载网附着能力差, 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。

对于单细胞样品, 现在已经有相对比较成熟的样品制备流程, 而对于更接近于真实状态的大尺度组织样品的冷冻含水切片的研究才刚刚开始。目前, 国际上对组织样品冷冻含水切片制备技术做了一些研究, 2010年Mechael f.Hayles 等人第一次用高压冷冻的方法将酵母细胞冻在铜管里, 在低温切片机组修后用cryo-FIB方法进一步减薄, 但是样品不是真实的组织样品。2014年Micheal Marko 等人使用鳔 (toadfish bladder) 将样品冷冻在带有凹槽的carrier中, 在低温切片机组修后用cryo-FIB方法进一步减薄样品。2015年Andres Kaech和 Ohad Medalia等人将线虫冷冻在载网上后使用FIB进行直接减薄, 每片需要耗时3小时。2015年Wolfgang Baumeister和Jürgen M. Plitzko等人将高压冷冻在载网上的线虫样品在扫描电镜中使用低温的probe将样品lift-out方法制备样品。

相比细胞样品而言, 制备组织样品冷冻含水透射电镜薄片样品, 难度有很大的增加。从取材、冷冻固定、切片区域的定位、定向、样品的粗修、精修、切片样品的荧光精确定位、cryo-FIB 切片方法和模式、样品的无损伤转移, 到低温电镜成像等各个环节都需要完善或提出新的方法实现。现在世界上只有三个实验室开展这方面的工作, 目前只是证明了实验流程的可行性, 尚处于方法学研究阶段, 远未达到实际应用的程度。

本项目拟以冷冻含水组织样品的透射电镜样品制备方法为主要工作内容, 针对该技术领域存在的上述技术瓶颈, 围绕cryo-FIB 这一主要技术方法, 进行一系列的方法学研究和创新, 研究各个过程中影响样品制备成功率的因素的机理和规律, 提出适合不同样品的制样策略和解决方法, 提高制样成功率, 降低技术门槛, 建立一套可面向生物学课题应用的冷冻含水组织透射电镜样品制备流程、方法和硬件装置。

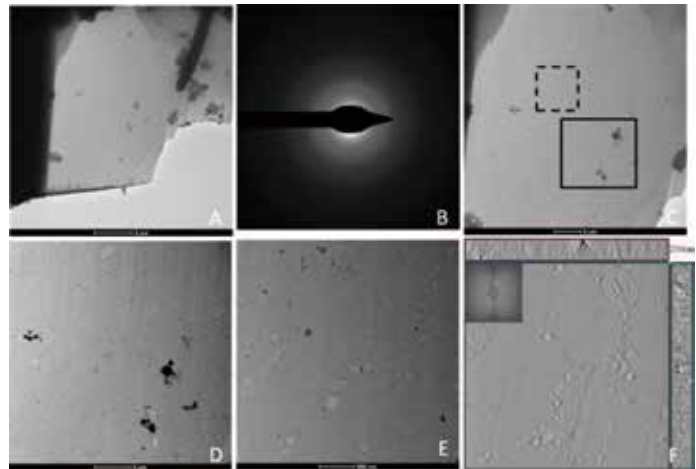


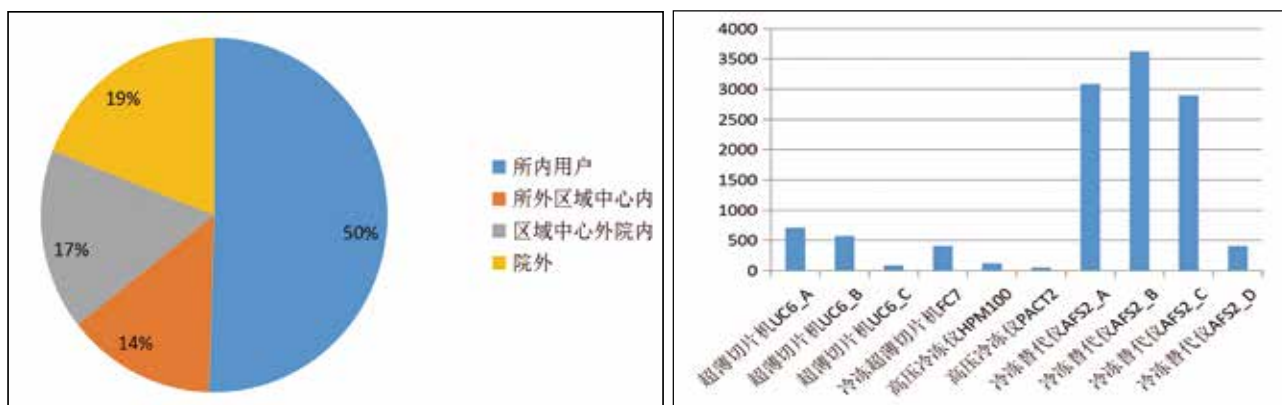
图1. 聚焦离子束法制备骨骼肌组织样品冷冻含水切片, (A) 为透射电镜下观察制备出的大面积的冷冻含水切片, (B) 电子衍射条件下样品保持非晶的状态, (C) 中等倍数下可以观察到切片的信息, (D) (E) 高倍下分别观察 (C) 中实线框和虚线框的区域, (F) IMOD软件处理电子断层成像数据后的组织样品, 样品厚度大约250nm, 横断面方向FFT可以看到衍射点。

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组全年共为用户制备电镜样品545个，对外服务情况统计如下：

样品制备各仪器运行状况良好，2017年新投入运行超薄切片机和冷冻替代仪各一台。各仪器机时统计如下：



2017年电镜样品制备技术服务产生的代表性文章：

(1)Wang S, Xia P, Chen Y, Qu Y, Xiong Z, Ye B, Du Y, Tian Y, Yin Z, Xu Z, Fan Z. (2017) Regulatory Innate Lymphoid Cells Control Innate Intestinal Inflammation. *Cell*. 171(1): 201-216.

(2)Wang T, Wang B, Huang H, Zhang C, Zhu Y, Pei B, Cheng C, Sun L, Wang J, Jin Q, Zhao Z. (2017) Enterovirus 71 protease 2Apro and 3Cpro differentially inhibit the cellular endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) pathway via distinct mechanisms, and enterovirus 71 hijacks ERAD component p97 to promote its replication. *PLoS Pathog*. 13(10):e1006674. doi: 10.1371.

(3)Zhou Y, Deng R, Zhen M, Li J, Guan M, Jia W, Li X, Zhang Y, Yu T, Zou T, Lu Z, Guo J, Sun L, Shu C, Wang C. (2017) Amino acid functionalized gadofullerene nanoparticles with superior antitumor activity via destruction of tumor vasculature in vivo. *Biomaterials*. 133: 107-118.

(4)Jin X, Jiang Z, Zhang K, Wang P, Cao X, Yue N, Wang X, Zhang X, Li Y, Li D, Kang BH, Zhang Y. (2017) Three-Dimensional Analysis of Chloroplast Structures $\frac{1}{2}$ AU : Associated with Virus Infection. *Plant Physiol*. 176:1-13

(5)Cui X, Wan B, Yang Y, Ren X, Guo LH. (2017) Length effects on the dynamic process of cellular uptake and exocytosis of single-walled carbon nanotubes in murine macrophage cells. *Sci Rep*. 10;7(1):1518.

(6)Jia LP, Liang AP. (2017) An apposition compound eye adapted for nocturnal vision in the moth midge *Clogmia albipunctata* (Williston) (Diptera: Psychodidae). *J Insect Physiol*. 98:188-198.

(7)He X, Yu J, Wang M, Cheng Y, Han Y, Yang S, Shi G, Sun L, Fang Y, Gong ST, Wang Z, Fu YX, Pan L, Tang H. (2017) Bap180/Baf180 is required to maintain homeostasis of intestinal innate immune response in *Drosophila* and mice. *Nat Microbiol*. 18;2:17056. doi: 10.1038.

(8)Shi, Y., Wang, L., Zhang, J., Zhai, Y., Sun, F., (2017) Determining the target protein localization in 3D using the

combination of FIB-SEM and APEX2. Biophysics Report. DOI: 10.1007/s41048-017-0043-x

2. 透射电镜运行服务 (FEI Titan Krios)

FEI Titan Krios-1在2016年10月16日至2017年10月15日的总服务机时为4767.14小时，使用效率为297.95%（按年平均使用机时1600小时计算）。

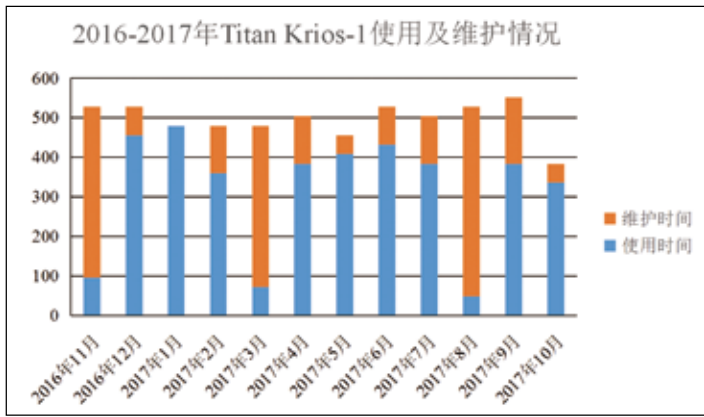


图1. 2016-2017年Titan Krios-1使用及维护情况

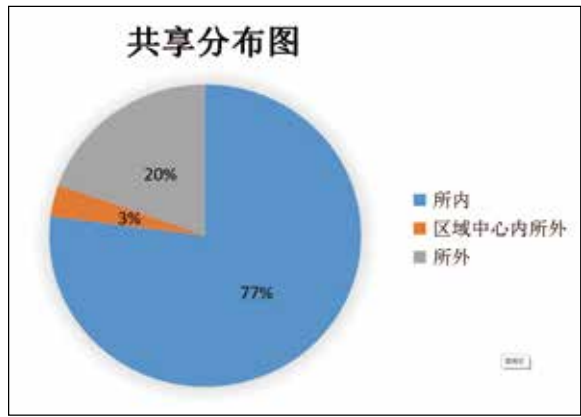


图2. 2016-2017年Titan Krios-1服务情况统计

2016年10月~2017年10月重要的升级维护事件总结如下：

时间	升级/维护内容
2016年10月19日—11月9日	更换Autoloader电路板
2017年2月14日—3月5日	更换高压箱
2017年3月9日—3月19日	更换IGPf部分电源与电路板
2017年6月7日—6月9日	Titan内间安装主动消磁器线圈
2017年7月19日—8月21日	更换Autoloader横向机械手臂
全年uptime比例为55.00%	

FEI Titan Krios-2在2017年4月6日至2017年10月15日的总服务机时为3746.9小时，使用效率为401.45%（按年平均使用机时1600小时计算）。



图3. 2016-2017年Titan Krios-2使用及维护情况

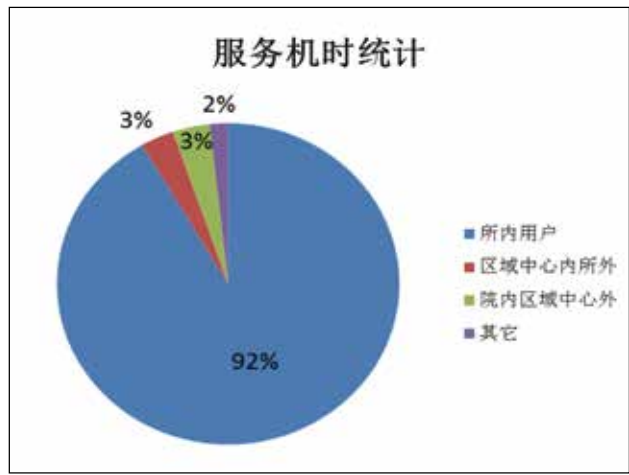


图4. 2016-2017年Titan Krios-2服务情况统计

2016年10月~2017年10月重要的升级维护事件总结如下：

时间	升级/维护内容
2016年11月	开始安装电镜
2017年2月	基本安装完成，开始SAT指标测定
2017年3月13日—3月17日	安装Gatan GIF-K2
2017年3月22日	SAT数据第一次review
2017年3月29日—3月31日	Amira软件培训、phase plate应用培训
2017年4月6日	试运行开始
2017年4月7日	主动消磁器安装
2017年5月8日—5月12日	根据第一次SAT review结果，重做部分SAT指标；调整FEG extration voltage从4000到4050；更换样品台马达；工厂Rapid远程检修Falcon protector calibration，最终调整了C2和C3的配比
2017年5月31日	SAT数据第二次review
2017年6月22日	关于电镜运行情况第三次review
2017年7月1日	正式服务开始
2017年9月13日	电镜验收
2017年10月19日—10月31日	XFEG寿命终止，待更换

2017年在这些仪器上产生的代表性文章：

(1)Sun Q, Zhu X, Qi J, An W, Lan P, Tan D, Chen R, Wang B, Zheng S, Zhang C, Chen X, Zhang W, Chen J, Dong MQ, Ye K. (2017) Molecular architecture of the 90S small subunit pre-ribosome. *Elife*. 6. pii: e22086.

(2)Yuan Y, Cao D, Zhang Y, Ma J, Qi J, Wang Q, Lu G, Wu Y, Yan J, Shi Y, Zhang X, Gao GF. (2017) Cryo-EM structures of MERS-CoV and SARS-CoV spike glycoproteins reveal the dynamic receptor binding domains. *Nat Commun*. 8:15092.

(3)Liu L, Li X, Ma J, Li Z, You L, Wang J, Wang M, Zhang X, Wang Y(2017).The Molecular Architecture for RNA-Guided RNA Cleavage by Cas13a.*Cell*170:714-726.

(4)Su X, Ma J, Wei X, Cao P, Zhu D, Chang W, Liu Z, Zhang X, Li M. (2017) Structure and assembly mechanism of plant C2S2M2-type PSII-LHCII supercomplex. *Science*. 357(6353):815-820.

(5)Wang X, Ran T, Zhang X, Xin J, Zhang Z, Wu T, Wang W, Cai G. (2017) 3.9 Å structure of the yeast Mec1-Ddc2 complex, a homolog of human ATR-ATRIP. *Science*. 358(6367):1206-1209.

3. 透射电镜运行服务 (FEI Talos)

Talos F200C透射电子显微镜自2016年10月16日至2017年10月15日的总服务机时为4300小时，平均每月使用358小时，使用效率为269%（按年平均使用机时1600小时计算），其中所外服务机时为330小时，占总服务机时的8%。服务包括所内朱平组、孙飞组、章新政组、柳振峰组、饶子和组、徐涛组、叶克穷组、常文瑞组、刘志杰组、梁栋才组、江涛组、刘迎芳组、许瑞明组、高璞组、张凯组、王艳丽组等16个课题组，所外包括北京大学、国家纳米中心、中国科学院化学研究所、天津大学、清华大学、理化所等6个单位，详细情况见图1和2。



图1 Talos F200C透射电子显微镜2016-2017年度使用情况。

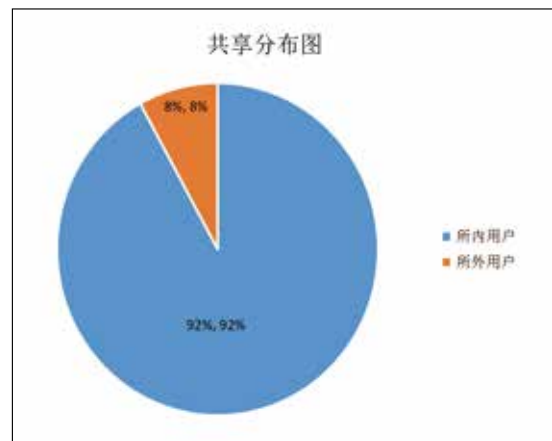


图2 TalosF200C透射电子显微镜2016-2017年度所内外共享情况统计图。

2016年10月~2017年10月重要的升级维护事件总结如下：

时间	故障描述	解决办法
2017.3.12	Optics Boards Degrades报错	OPU2B报错，重新启动光学系统电源，故障解决
2017.3.14	象散不稳定，OPU2B问题，重新启动后连接不上sever	关闭总电源，完全重新开机，故障解决
2017.3.15	相机报错：could not load plugin FeiCCD.dll	重新启动相机控制器电源，问题解决
2017.3.30	Optics Boards Degrades报错（OPU2B: OLSD2）	电镜软件上的所有Recover，问题解决
	Optics Boards Degrades报错（OLSD1 upper gun DC deflector（use for blanking））	
2017.5.19	二级循环水故障	1、更换系统盘，重新安装操作系统（还原备份系统，2016年3月21日版本），待进一步与工厂沟通后，讨论升级事宜。2、更换循环水的电容
	重新启动控制电脑，系统崩溃，系统盘损坏	
	系统升级，brickbox application “tem” crashed	
2017.5.19	拆DE相机	拆DE20相机，测试Ceta和K2 housing接口的法兰尺寸

时间	故障描述	解决办法
2017.6.4	Optics Boards Degrades报错 (OLSD1)	全部重新启动, 问题解决
2017.6.15	二级循环水报警	天气太热, 清洗外机故障排除
2017.6.28	更换Talos电镜操作面板	升级改为网络通讯, 原来是USB
2017.6.28	626 样品杆	Workstation 漏液氮
2017.7.4	CH3 626样品杆	CH3 Shutter 故障, 垫纸修好
2017.8.11	Optics: Boards Degrades, 象散非常不稳定, 变化非常快	重新启动控制电脑, 启动server可以正常使用
2017.8.16	Optics: boards degrades, OPU2B报错	重新启动控制电脑, 启动server可以正常使用
2017.8.21		换OPU 2B控制板
2017.9.4	CH2 626 样品杆和干泵	安捷伦干泵抽不上真空, 样品杆漏气, 无法使用, 更换普发泵
2017.9.20	维修CH2漏气现象和CH3杆上翘现象	清洗CH2 shutter, 发现碎屑。CH3厂家意见是自己轻轻校正样品尖端即可, 无维修, 自己处理
2017.9.22	Workstaion 漏液氮	用silicone II 2.8oz硅胶粘workstation, 处理液氮遗漏现象
2017.9.23	Optics: boards degrades, OPU2B报错	重新启动后, 恢复使用
2017.9.29	CRT显示屏不显示	保险烧坏, 换保险后正常使用
2017.9.30	电子衍射Ceta相机长度标定	在校准参数里面computer\system (c) \tecnai\data\ magnification calibration, 相机长度850 mm时, x-grating需要给一个1289左右的数值, 如果差的太多, 校准通不过

2017年在该仪器上产生的代表性文章:

- (1) Su X, Ma J, Wei X, Cao P, Zhu D, Chang W, Liu Z, Zhang X, Li M. (2017) Structure and assembly mechanism of plant C2S2M2-type PSII-LHCII supercomplex. *Science*. 357(6353):815-820.
- (2) Liu L, Li X, Ma J, Li Z, You L, Wang J, Wang M, Zhang X, Wang Y. (2017) The Molecular Architecture for RNA-Guided RNA Cleavage by Cas13a. *Cell*. 170(4):714-726.
- (3) Geng G, Chen P, Guan B, Jiang L, Xu Z, Di D, Tu Z, Hao W, Yi Y, Chen C, Liu M, Hu W. (2017) Shape-Controlled Metal-Free Catalysts: Facet-Sensitive Catalytic Activity Induced by the Arrangement Pattern of Noncovalent Supramolecular Chains. *ACS Nano*. 11(5):4866-4876.
- (4) Sun Q, Zhu X, Qi J, An W, Lan P, Tan D, Chen R, Wang B, Zheng S, Zhang C, Chen X, Zhang W, Chen J, Dong MQ, Ye K. (2017) Molecular architecture of the 90S small subunit pre-ribosome. *Elife*. 6. pii: e22086.

4. 透射电镜运行服务（FEI Tecnai 20）

FEI Tecnai 20在2016年10月16日至2017年10月15日的总服务机时为1839.88小时，使用效率为114.99%（按年平均使用机时1600小时计算）。



图1. 2016-2017年Tecnai 20使用及维护情况

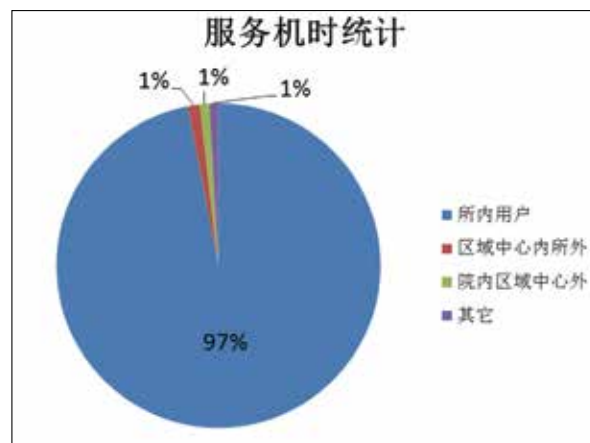


图2. 2016-2017年Tecnai 20服务情况统计

2016年10月~2017年10月重要的升级维护事件总结如下：

时间	升级/维护内容
2017年2月18日—2月20日	无法加高压，检查发现50V电源坏，需更换
2017年2月28日—3月14日	等待并最终更换50V电源
2017年4月18日—5月8日	维修真空系统
2017年5月16日	更换灯丝
2017年6月21日—6月30日	维修真空系统，更换相机为895
2017年9月8日	V12阀门sensor更换，更换两个操作面板

5. 透射电镜运行服务（FEI Tecnai Spirit-负染色）

FEI Tecnai Spirit-负染色在2016年10月16日至2017年10月15日的总服务机时为2761.02小时，使用效率为172.56%（按年平均使用机时1600小时计算）。



图1. 2016-2017年Tecnai Spirit-负染色使用及维护情况

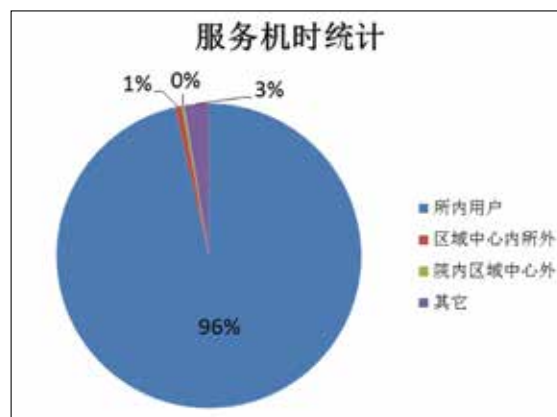


图2. 2016-2017年Tecnai Spirit-负染色服务情况统计

2016年10月~2017年10月重要的升级维护事件总结如下：

时间	升级/维护内容
2017年2月15日—2月16日	换灯丝
2017年3月5日—3月6日	更换样品杆探测簧片
2017年3月27日—3月28日	维修样品台因暴力插拔杆造成的部件扭曲
2017年5月17日	换灯丝
2017年6月13日	更换样品杆套管
2017年6月29日	循环水前级泵爆管，更换
2017年9月3日—9月5日	压缩空气管道破裂，更换
2017年10月16日—10月17日	换灯丝
2017年10月19日—10月25日	样品台X方向马达坏，更换

6. 透射电镜运行服务（FEI Tecnai Spirit-超薄切片）

FEI Tecnai Spirit-超薄切片在2016年12月2日至2017年10月15日的总服务机时为2259.84小时，使用效率为161.41%（按年平均使用机时1600小时计算）。



图1. 2016-2017年Tecnai Spirit-超薄切片使用及维护情况

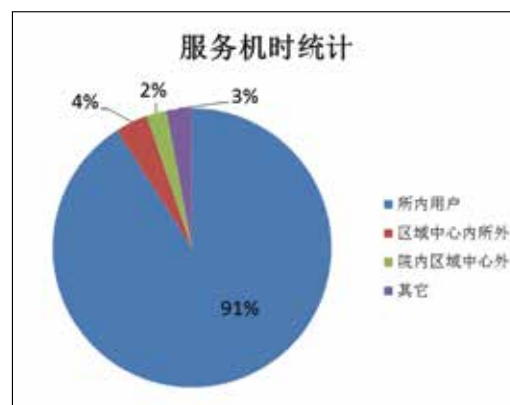


图2. 2016-2017年Tecnai Spirit-超薄切片服务情况统计

2016年10月~2017年10月重要的升级维护事件总结如下：

时间	升级/维护内容
2017年3月8日	更换PVP泵启动继电器
2017年6月16日—6月18日	循环水故障
2017年6月21日—6月22日	换灯丝

7. 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。2016年10月16日至2017年10月15日总服务机时为1801.71小时，使用效率为112.61%（按年平均使用机时1600小时计算）

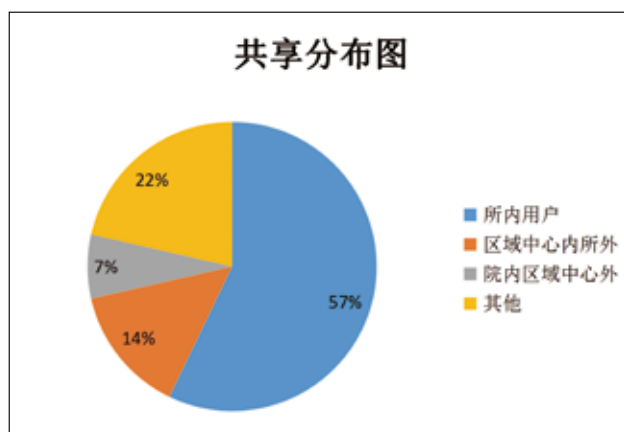


图1. 双束扫描电镜2016年11月至2017年10月所内外共享情况统计图

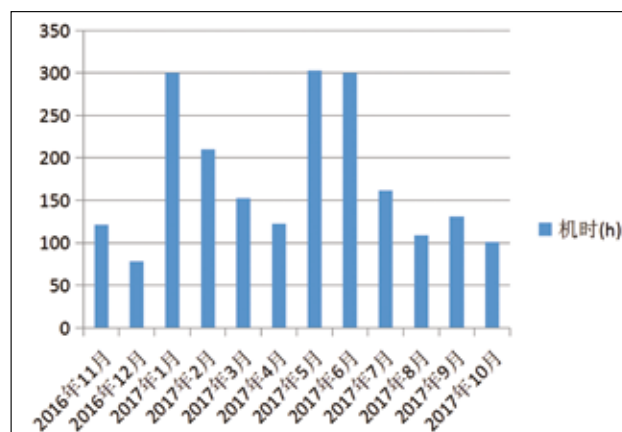


图2. 双束扫描电镜2016年11月至2017年10月机时情况统计图

升级更换设备:

试剂耗材方面, 在运行的一年多时间里, 分别于2017年1月和8月更换了两次离子源、离子枪吸取极和光阑条。

2017年在该仪器上产生的代表性文章:

(1)Jin X, Jiang Z, Zhang K, Wang P, Cao X, Yue N, Wang X, Zhang X, Li Y, Li D, Kang BH, Zhang Y. (2017) Three-dimensional analysis of chloroplast structures associated with virus infection. *Plant Physiol.* pii: pp.00871.

(2)Zhao YG, Chen Y, Miao G, Zhao H, Qu W, Li D, Wang Z, Liu N, Li L, Chen S, Liu P, Feng D, Zhang H. (2017) The ER-Localized Transmembrane Protein EPG-3/VMP1 Regulates SERCA Activity to Control ER-Isolation Membrane Contacts for Autophagosome Formation. *Mol Cell.* 67(6):974-989.

(3)Shi, Y., Wang, L., Zhang, J., Zhai, Y., Sun, F., (2017) Determining the target protein localization in 3D using the combination of FIB-SEM and APEX2. *Biophysics Report.* 3(4):92-99.

(4)Li X, Ji G, Chen X, Ding W, Sun L, Xu W, Han H, Sun F. (2017) Large scale three-dimensional reconstruction of an entire *Caenorhabditis elegans* larva using AutoCUTS-SEM. *J Struct Biol.* pii: S1047-8477(17)30161-2.

8. 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、活细胞工作站等多种荧光显微镜设备, 可以满足多领域科研需求。2017年运行总机时近7242小时。对所内40个课题组, 所外11个单位13个课题组提供服务, 具体对外服务情况统计如下:

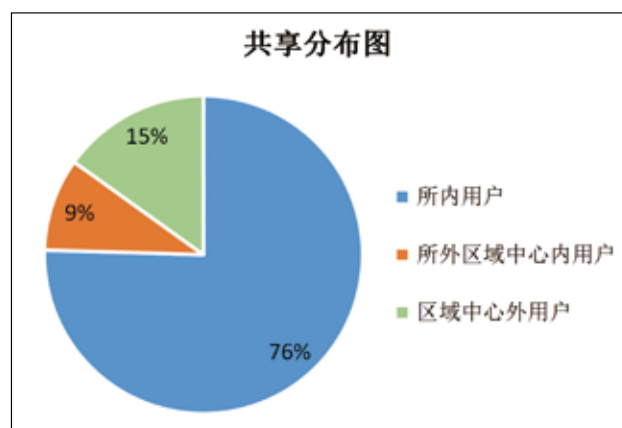


图1. 2016-2017年激光共聚焦显微镜所内外共享情况统计

2017年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（2016.11-2017.10）																										
	具体时间	内 容																											
激光共聚焦显微镜 Olympus FV1000	2017.06.19	重装电脑和系统软件	<p>使用机时 (小时)</p> <table border="1"> <caption>激光共聚焦显微镜 Olympus FV1000 使用机时统计 (2016.11-2017.10)</caption> <thead> <tr><th>月份</th><th>使用机时 (小时)</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>2016年11月</td><td>120</td></tr> <tr><td>2016年12月</td><td>270</td></tr> <tr><td>2017年1月</td><td>240</td></tr> <tr><td>2017年2月</td><td>80</td></tr> <tr><td>2017年3月</td><td>140</td></tr> <tr><td>2017年4月</td><td>200</td></tr> <tr><td>2017年5月</td><td>190</td></tr> <tr><td>2017年6月</td><td>150</td></tr> <tr><td>2017年7月</td><td>130</td></tr> <tr><td>2017年8月</td><td>150</td></tr> <tr><td>2017年9月</td><td>140</td></tr> <tr><td>2017年10月</td><td>120</td></tr> </tbody> </table>	月份	使用机时 (小时)	2016年11月	120	2016年12月	270	2017年1月	240	2017年2月	80	2017年3月	140	2017年4月	200	2017年5月	190	2017年6月	150	2017年7月	130	2017年8月	150	2017年9月	140	2017年10月	120
	月份	使用机时 (小时)																											
	2016年11月	120																											
	2016年12月	270																											
2017年1月	240																												
2017年2月	80																												
2017年3月	140																												
2017年4月	200																												
2017年5月	190																												
2017年6月	150																												
2017年7月	130																												
2017年8月	150																												
2017年9月	140																												
2017年10月	120																												
2017.08.09	FV1000 559激光光闸失灵维修																												
2017.08.23-9.18	物镜转轮维修																												
2017.9.29	物镜转换报错维修																												
双光子显微镜 Olympus FV1000 MPE	2016.11.08	背景有条纹，调试激光器光路	<p>使用机时 (小时)</p> <table border="1"> <caption>双光子显微镜 Olympus FV1000 MPE 使用机时统计 (2016.11-2017.10)</caption> <thead> <tr><th>月份</th><th>使用机时 (小时)</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>2016年11月</td><td>45</td></tr> <tr><td>2016年12月</td><td>28</td></tr> <tr><td>2017年1月</td><td>45</td></tr> <tr><td>2017年2月</td><td>22</td></tr> <tr><td>2017年3月</td><td>43</td></tr> <tr><td>2017年4月</td><td>5</td></tr> <tr><td>2017年5月</td><td>0</td></tr> <tr><td>2017年6月</td><td>38</td></tr> <tr><td>2017年7月</td><td>22</td></tr> <tr><td>2017年8月</td><td>10</td></tr> <tr><td>2017年9月</td><td>10</td></tr> <tr><td>2017年10月</td><td>10</td></tr> </tbody> </table>	月份	使用机时 (小时)	2016年11月	45	2016年12月	28	2017年1月	45	2017年2月	22	2017年3月	43	2017年4月	5	2017年5月	0	2017年6月	38	2017年7月	22	2017年8月	10	2017年9月	10	2017年10月	10
	月份	使用机时 (小时)																											
	2016年11月	45																											
	2016年12月	28																											
	2017年1月	45																											
2017年2月	22																												
2017年3月	43																												
2017年4月	5																												
2017年5月	0																												
2017年6月	38																												
2017年7月	22																												
2017年8月	10																												
2017年9月	10																												
2017年10月	10																												
2017.04.17	扫描单元内光闸维修																												
2017.05.09	激光器的一个二极管又没有电流了																												
2017.06.29	更换汞灯																												
2017.07.17	更换电源																												
高速转盘 荧光成像 系统Andor Revolution	2017.08.31	物镜转轮不顺畅	<p>使用机时 (小时)</p> <table border="1"> <caption>高速转盘荧光成像系统 Andor Revolution 使用机时统计 (2016.11-2017.10)</caption> <thead> <tr><th>月份</th><th>使用机时 (小时)</th></tr> </thead> <tbody> <tr><td>2016年11月</td><td>110</td></tr> <tr><td>2016年12月</td><td>60</td></tr> <tr><td>2017年1月</td><td>75</td></tr> <tr><td>2017年2月</td><td>10</td></tr> <tr><td>2017年3月</td><td>45</td></tr> <tr><td>2017年4月</td><td>60</td></tr> <tr><td>2017年5月</td><td>75</td></tr> <tr><td>2017年6月</td><td>60</td></tr> <tr><td>2017年7月</td><td>110</td></tr> <tr><td>2017年8月</td><td>75</td></tr> <tr><td>2017年9月</td><td>30</td></tr> <tr><td>2017年10月</td><td>10</td></tr> </tbody> </table>	月份	使用机时 (小时)	2016年11月	110	2016年12月	60	2017年1月	75	2017年2月	10	2017年3月	45	2017年4月	60	2017年5月	75	2017年6月	60	2017年7月	110	2017年8月	75	2017年9月	30	2017年10月	10
	月份	使用机时 (小时)																											
2016年11月	110																												
2016年12月	60																												
2017年1月	75																												
2017年2月	10																												
2017年3月	45																												
2017年4月	60																												
2017年5月	75																												
2017年6月	60																												
2017年7月	110																												
2017年8月	75																												
2017年9月	30																												
2017年10月	10																												
2017.09.06-11	安装SRRF像机试用测试																												

多功能活细胞工作站IX81 MicroPoint	2017.03.26	光纤老化更新	<p>使用机时 (小时)</p>
	2017.09.13-10.19	活细胞培养装置返厂维修	
	2017.10	sCMOS维修	
激光共聚焦显微镜 Olympus FV1200	2016.11.09	Ups维修	<p>使用机时 (小时)</p>
	2017.01.10	刷卡器修复	
	2017.06.28	系统的驱动修复	
	2017.06.30	汞灯更换	
	2017.08.08	559激光器数次出现使用过程中突然断掉, 待更新	

2017年在该仪器上产生的代表性文章:

- (1)Chen J, Luo Y, Hui H, Cai T, Huang H, Yang F, Feng J, Zhang J, Yan X. (2017) CD146 coordinates brain endothelial cell-pericyte communication for blood-brain barrier development. Proc Natl Acad Sci U S A. 114(36):E7622-E7631.
- (2)Wang S, Xia P, Chen Y, Qu Y, Xiong Z, Ye B, Du Y, Tian Y, Yin Z, Xu Z, Fan Z. (2017) Regulatory innate lymphoid cells control innate intestinal inflammation. Cell. 171(1):201-216.
- (3)Li L, Li B, Li M, Niu C, Wang G, Li T, Król E, Jin W, Speakman JR. (2017) Brown adipocytes can display a mammary basal myoepithelial cell phenotype in vivo. Mol Metab. 6(10):1198-1211.
- (4)Liu B, Ye B, Yang L, Zhu X, Huang G, Zhu P, Du Y, Wu J, Qin X, Chen R, Tian Y, Fan. (2017) Long non-coding RNA lncKdm2b is required for ILC3 maintenance by initiating Zfp292 expression. Nat Immunol. 18(5):499-508.
- (5)Xue M, Hou J, Wang L, Cheng D, Lu J, Zheng L, Xu T. (2017) Optimizing the fragment complementation of APEX2 for detection of specific protein-protein interactions in live cells. Sci Rep. 7(1):12039.

9. 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 2016年11月至2017年10月运行总机时2586小时，服务所内25个课题组，所外11个科研单位，对外服务情况统计如下：



图1. 2016-2017年结构光照明超分辨荧光显微镜OMX用户群体分布

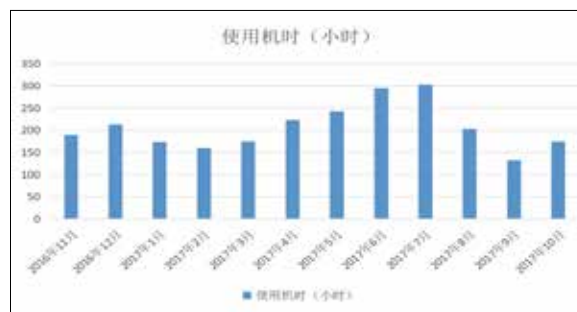


图2. 2016-2017年结构光照明超分辨荧光显微镜OMX对外服务机时统计

仪器维护事宜：

2017年9月结构光照明超分辨荧光显微镜OMX发生光栅角度旋转台故障，数据采集过程中仅能进行光栅三个角度的旋转，无法完成每个角度的五个相位移动，更换旋转台后恢复。

2017年度重要的维护事件总结如下：

时间	维护内容
2017年7月4日	405nm和488nm激光器光纤入口处偏移，导致出光极弱，校准反光镜角度后恢复
2017年8月28日	OMX结构光与宽场光路切换反射镜控制器（Motorized Flipper）故障，已修复
2017年9月25日	OMX光栅角度旋转台故障，更换新旋转台后恢复
2017年10月30日	OMX结构光与宽场光路切换反射镜控制器（Motorized Flipper）故障，已修复

2017年度在该仪器上所产生的代表性文章：

(1)Zhang C, Yang L, Ding Y, Wang Y, Lan L, Ma Q, Chi X, Wei P, Zhao Y, Steinbüchel A, Zhang H, Liu P. (2017) Bacterial lipid droplets bind to DNA via an intermediary protein that enhances survival under stress. Nat Commun. 8:15979.

(2)Ren R, Deng L, Xue Y, Suzuki K, Zhang W, Yu Y, Wu J, Sun L, Gong X, Luan H, Yang F, Ju Z, Ren X, Wang S, Tang H, Geng L, Zhang W, Li J, Qiao J, Xu T, Qu J, Liu GH. (2017) Visualization of aging-associated chromatin alterations with an engineered TALE system. Cell Res. 27(4):483-504.

10. 荧光图像分析系统运行服务

生物成像中心的荧光图像分析系统于2017年6月6日正式开始对外服务，目前运行状态良好，无维护记录。截止至2017年10月31日，共对所内9个课题组、所外2个单位提供服务，服务总机时为229.18小时，共享情况及使用机时统计如下：

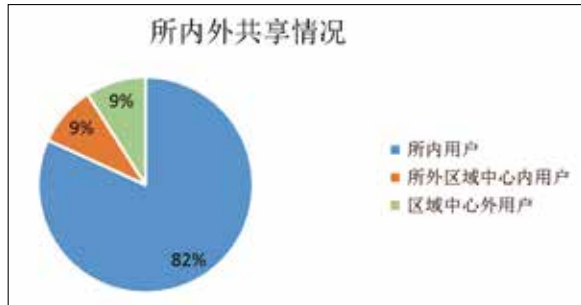


图1. 2017年6月至2017年10月荧光图像分析系统所内外共享情况统计图



图2. 2017年6月至2017年10月荧光图像分析系统机时情况统计图

2017年度在该仪器上产生的代表性文章：

(1)Chen J, Luo Y, Hui H, Cai T, Huang H, Yang F, Feng J, Zhang J, Yan X (2017) CD146 coordinates brain endothelial cell-pericyte communication for blood-brain barrier development. Proc Natl Acad Sci USA 114: E7622–E7631.

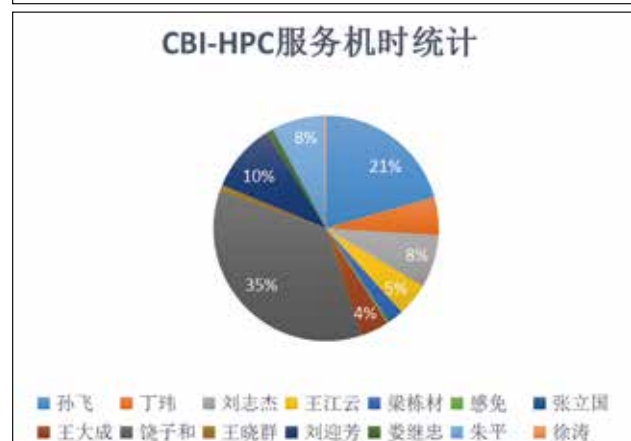
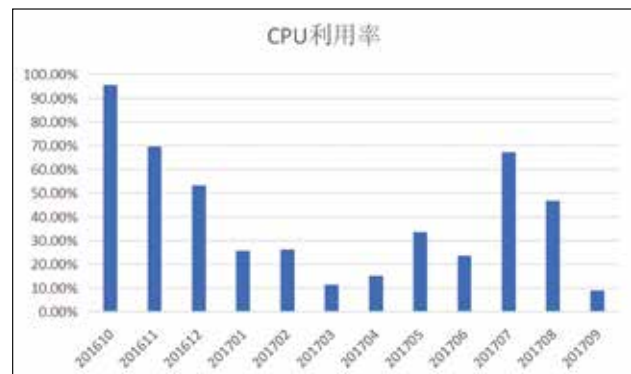
11. 数据处理相关设备（高性能计算服务站）

2017年度（从2016年10月16日至2017年10月15日）生物成像中心高性能服务站的有效服务机时为405万CPU小时，按可用机时为950万CPU小时算（330*24*1200），使用效率为42.7%；服务对象包括本研究所多个领域，其中主要是生物大分子（及其复合物）结构的电镜三维重构领域，比如饶子和、孙飞等研究组。

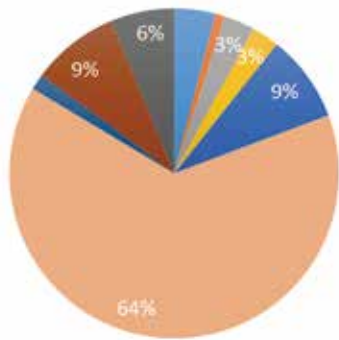
2017年度在该设备上所产生的代表性文章：

(1)Wang X, Zhu L, Dang M, Hu Z, Gao Q, Yuan S, Sun Y, Zhang B, Ren J, Kotecha A, Walter TS, Wang J, Fry EE, Stuart DI, Rao Z. (2017) Potent neutralization of hepatitis A virus reveals a receptor mimic mechanism and the receptor recognition site. Proc Natl Acad Sci U S A. 114(4):770-775.

(2)Wang X, Li SH, Zhu L, Nian QG, Yuan S, Gao Q, Hu Z, Ye Q, Li XF, Xie DY, Shaw N, Wang J, Walter TS, Huiskonen JT, Fry EE, Qin CF, Stuart DI, Rao Z. (2017) Near-atomic structure of Japanese encephalitis virus



“元”超级计算系统服务机时统计



■ 朱平 ■ 章新政 ■ 王晓群 ■ 王祥喜 ■ 饶子和
■ 孙飞 ■ 刘志杰 ■ 刘迎芳 ■ 丁玮

reveals critical determinants of virulence and stability. Nat Commun. 8(1):14.

(3) Shi Y, Zhang Y, Lou J. (2017) The influence of cell membrane and SNAP25 linker loop on the dynamics and unzipping of SNARE complex. PLoS One. 12(4):e0176235.

2016年10月份起，生物物理所与中国科学院网络中心签订了节点租用合同，租用了网络中心“元”超级计算系统的CPU计算节点，从生物物理所至“元”超级计算系统铺设了万兆光纤链路，为我所用户高性能计算提供便利。“元”超级计算系统采用Intel Xeon E5-2680v3处理器（2.5GHz、2*12核），单节点CPU计算能力为0.96Tflops，计算性能略高于生物物理所高性能计算集群，并且“元”超级计算系统配备了256G内存，采用100Gb EDR Infiniband 高速交换网络互联。以此，保证了生物物理所用户访问“元”超算系统更快的数据传输、更便利的资源、更高效的计算。

2017年度“元”超级计算系统开始为生物物理所用户提供高性能计算服务后，总服务机时为579万CPU小时，其中包括了电镜三维重构、生物信息计算等多个领域的用户。

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。2017年8月，生物成像中心主办（承办）了“第三届国际冷冻电镜图像处理前沿技术研讨班”和“第三届中国结构生物学冷冻电镜培训班”；9月，中国科学院生物物理研究所-赛默飞世尔科技生物电镜联合实验室在生物成像中心成立；此外，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. 生物物理所-赛默飞世尔科技生物电镜联合实验室成立

2017年9月13日，中国科学院生物物理研究所-赛默飞世尔科技生物电镜联合实验室揭牌仪式在生物物理所9408会议室成功举办。中国科学院生物物理研究所所长许瑞明研究员、结构生物学家饶子和院士和ThermoFisherScientific公司Material & Structure Analysis Division部门副总裁暨亚太区总裁荆亦仁先生出席仪式并讲话。中国科学院生物物理研究所生物成像中心主任孙飞研究员对联合实验室的发展方向进行了整体介绍。中国科学院生物物理研究所朱平研究员、章新政研究员、王艳丽组刘亮博士分别就依托生物成像中心技术服务所发表的最新研究成果进行了汇报。ThermoFisherScientific公司Material & Structure Analysis Division部门亚太区生命科学应用经理王庆博士就公司仪器最新进展进行了精彩的讲述。揭牌仪式由孙飞主持。

许瑞明研究员指出，冷冻电镜对结构生物学的研究已经全面铺开，其发展速度令人感叹，我所电镜平台建设并不是跟风式建设，而是从2009年就开始重点建设的，在中国乃至亚洲都处于领先水平。我所与ThermoFisherScientific公司共同建立生物电镜联合实验室是生物电镜技术发展的新阶段和新要求，将主要在三个方面进行合作——一是科学研究方面的应用，要用最新的设备、最新的技术来发现未知的科学问题；二是合作研究方面，要挖掘仪器潜力，更进一步开展新技术、新方法的研究；三是培训学习方面起到示范带头作用，自2010年第三届郭可信暑期培训班在我所举办以来，生物物理所每年都会举办电镜、图像处理、样品制备等方面的技术培训班，希望联合实验室能进一步加强这方面的工作。最后许瑞明研究员代表研究所对ThermoFisherScientific公司对我所电镜方面的支持表示感谢，希望公司在未来能给予生物物理研究所更多的支持。

荆亦仁先生发言表示，他于2008年加入FEI公司（现ThermoFisherScientific公司），那时公司才刚刚开始推动新一代冷冻电镜技术，而生物物理所已经开始准备采购新一代高端冷冻透射电镜，并在2009年成功安装了中国的第二台300 kV Titan Krios电镜。中国科学院生物物理研究所-赛默飞世尔科技生物电镜联合实验室的建立将会为生物物理所提供更好的售后服务，在科学研究上尽最大努力做出自己的贡献。同时，ThermoFisherScientific公司在亚太区的工作任务中也增加了进一步加强与中国科学家的技术合作，在中国进行相关技术的研发和合作，并推向世界。ThermoFisherScientific公司愿与生物物理所紧密合作，同整个行业一起成长，把我国科研水平提升到一个新的高度。

在饶子和院士的讲话中，他指出，我国现在是仪器进口大国，尤其在高端电镜方面，基本全部是进口。2013年冷冻电镜技术取得突破后，当时预测未来中国对高端透射电镜的需求巨大。ThermoFisherScientific公司要加强在中国的售后服务质量，不仅要卖得出去，而且要保证设备用得起来，要真正实现这些高端设备服务于科学研究。另外他还指出，自生物物理研究所成立以来，一直注重生命科学技术方法的研究，电镜结构生物学研究是一个正在上升的领域，这个领域的合作非常重要，成立的中国科学院生物物理研究所-赛默飞世尔科技生物电镜联合实验室要担当起新技术新方法研究的重任，加强仪器研制合作，共同开展方法学研究，推动生命科学发展，推动新技术的发展。



图1 生物电镜联合实验室揭牌仪式



图2 孙飞研究员主持揭牌仪式



图3 许瑞明所长在揭牌仪式上讲话



图4 饶子和院士在揭牌仪式上讲话

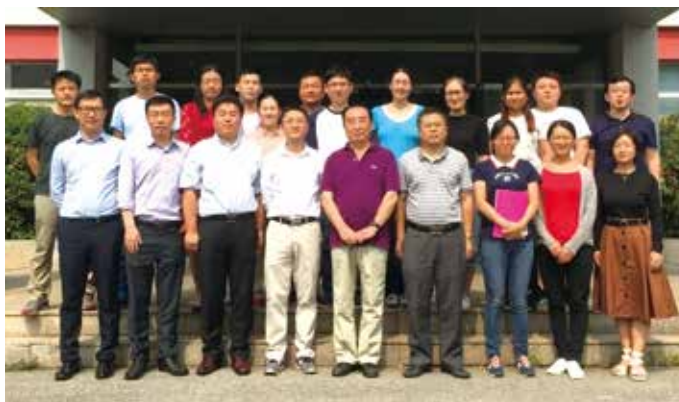


图5 生物成像中心成员与ThermoFisherScientific公司成员代表合影

之后，孙飞研究员介绍了中国科学院生物物理研究所生物成像中心的整体概况，并就联合实验室未来的发展方向进行了介绍。在学术交流环节，朱平研究员系统介绍了从病毒到高级染色质结构的最新研究，章新政研究员介绍了1.4 MDa捕光复合体2.7 Å的结构解析以及优势取向对解析样品分辨率的影响，刘亮博士汇报了最新的利用冷冻电镜单颗粒技术解析Cas13a3.2 Å的结构，王庆博士介绍了ThermoFisherScientific公司冷冻电镜设备的最新进展以及未来发展方向。

出席本次揭牌仪式的领导和专家还有蛋白质科学研究平台主任韩玉刚、科技合作与成果转化处处长孙哲博士、北京大学尹长城教授、南方科技大学王培毅教授、清华大学雷建林研究员、生物物理所徐伟研究员和生物成像中心副主任季刚正高级工程师。ThermoFisherScientific公司Material & Structure Analysis Division部门的亚太区售后服务经理何佳明、中国区售后服务经理王宇、中国区生命科学销售经理叶洋、北方区生命科学客户经理苏志聪作为公司代表参加了此次揭牌仪式。此外，生物成像中心的工程师和部分研究所的老师学生也到场见证了联合实验室的成立。

2. 生物成像中心主办（承办）活动

（1）第三届国际冷冻电镜图像处理前沿技术研讨班

2017年8月6日-10日，由中国生物物理学会、中国科学院生物物理研究所和清华大学联合举办的第三届国际冷冻电镜图像处理前沿技术研讨班（International Workshop of Advanced Image Processing of Cryo-Electron Microscopy，简称IWAIP）在我所成功举办，本期培训班共邀请到来自美国（Abbas Ourmazd、Brandon Frenz）、法国（Slavica Jonic）、德国（Florian Schur）、英国（Sai Li、Ardan Patwardhan）以及国内（Fa Zhang、Shaobai Li）8位本领域内的专家学者做主题报告。来自中国大陆、中国香港、新加坡及韩国的127名青年科技工作者报名参加了此期培训，其中28名学员报名参加上机实习。中国生物物理学会冷冻电镜分会的7位理事及20名志愿者共同参与了此次培训的组织工作。

近年来，基于冷冻电镜方法的单颗粒技术已建立了成熟的流程，多数本领域的研究人员也比较熟悉这一领域的内容。而如电子断层扫描和基于电子断层扫描的亚单位平均技术在最近取得了长足进展，尤其是3.4埃分辨率HIV病毒包被蛋白结构的发表更是加深了人们对于这一技术能力的认知。除此而外，蛋白质的多构象，动态变化等问题也处在研究的前沿。



图1 第三届国际冷冻电镜图像处理前沿技术研讨班全体学员合影

本期培训班除介绍电子三维扫描重构的最新进展外，还着重培训了参会学员利用流形嵌入分析蛋白质动态变化，利用Rosseta和Normal mode方法构建蛋白质的不同构象。以及相应的，如何在得到结果之后利用EMDB和EMPIAR上传与储存数据和结果，如何利用EMDB上的数据和有价值的服务帮助自己进行研究工作。本期培训班为更大程度上方便学员实践练习，调整培训形式为前三天上午安排专家专题报告，下午上机实习，晚上答疑，第四天全天上机实习几个部分。通过面对面交流软件的使用方法和操作技巧，培训班学员能够更加高效的了解冷冻电镜图像处理软件的使用方法。为弥补部分学员没能上机实习的遗憾，组织方安排了下午上机实习的全程视频转播。

同时，在培训午休期间，组织方还安排学员参观了生物物理研究所平台生物成像中心的相关设备。实地参观一方面增进了学员对于理论知识的认识，一方面也展现了近些年生物物理所科研基础投入的发展现状，更全面地加深了培训双方的了解，为以后的学术活动、科研合作打下了良好的基础。

本期培训班为国内外从事冷冻电镜图像处理的青年科技工作者提供了一个良好的学习交流平台，促进了青年科技工作者对国际相关领域科学前沿研究的了解，会后受到了与会学员的一致好评。



图2 专题报告现场



图3 上机实习培训现场

（2）第三届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ThermoFisher Scientific公司联合举办的第三届中国结构生物学冷冻电镜培训班（Get Acquainted with Cryo-Electron Microscopy: Third Chinese Workshop for Structural Biologists）于2017年7月30日—8月5日在清华大学和生物物理研究所成功举办。

此次培训班特别聘请清华大学的李雪明、王宏伟、王佳伟、雷建林四位教授，生物物理所的孙飞、章新政、朱平三位研究员，黄小俊高级工程师，北京大学的尹长城教授和ThermoFisher Scientific公司的应用工程师王庆博士等十位经验丰富的指导教师参与技术讲座。技术讲座分两天进行，详细讲述了透射电镜的发展历史、基本概念、构造、工作原理、操作要领，冷冻电镜三维重构的原理、流程、样品制备、数据收集、数据处理以及三维模型搭建，给学员提供了较为全面的入门级的冷冻电镜技术培训。讲座后安排的自由讨论环节，为学员们提供了和讲座教师充分交流的机会，不仅解答了培训内容的相关问题，还为有一定冷冻电镜经验的学员提供了解决实际工作难题的思路。

除讲座外，培训班还安排所有学员在生物物理所和清华大学两处参加为期两天的从负染、冷冻样品制备、常温和冷冻电镜观察操作到RELION使用的实习课程，使学员从理论到实践全面接触和了解冷冻电镜技术。实习过程中，教学演示和学员亲自动手实践相结合。演示和操作指导的教师队伍由清华大学和生物物理所长期培训电镜用户和数据处理的教师组成。

本次培训班旨在为原本未使用冷冻电镜技术的结构生物学工作者提供了解冷冻电镜技术讲解，并使其初步掌握使用该技术的基本技能的专项学习和实践课程。培训班圆满完成了这一任务，成功培训了来自全国各地各大高校、科研院所和企业的80位学员，降低了我国结构生物学工作者使用冷冻电镜技术的门槛，进一步推动了国内冷冻电镜领域的发展。

更多详细信息可查看以下网页链接：

<http://www.icsb.tsinghua.edu.cn/GACryoEM2017/index.html>



图1第三届中国结构生物学冷冻电镜培训班学员合影

(3) 2017年度生物成像中心常规技术培训

2017年9月-10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的培训课程主要包括：电子显微成像技术及电镜样品制备技术，激光扫描共聚焦与结构光照明超分辨荧光显微成像技术，荧光图像处理与数据分析技术，高性能计算机集群应用以及图像三维数据处理技术等培训。

			
郭振玺	朱博玲	黄小俊	张建国
透射电子显微镜基本结构和成像原理	低温透射电镜技术	样品负染色技术	双束扫描电镜原理与应用

			
滕岩	李硕果	冯韵	牛彤欣
激光扫描共聚焦显微镜成像技术	结构光照明超分辨荧光显微镜	荧光图像处理及数据分析技术	高性能计算集群使用与电子显微三维重构技术

		
王莉	李喜霞	孙磊
超薄切片技术原理及操作	高压冷冻和冷冻替代技术	低温切片及免疫电镜技术

3. 生物成像中心参与的学术活动

(1) 2017年中国电子显微学学术年会

2017年10月17 – 22日，生物成像中心孙飞研究员带领生物成像中心孙磊、李喜霞、王莉、冯韵、朱博玲、郭振玺、张龙龙、彭灿、谭雪珂等10人赴四川成都参加了由中国电镜年会主办的每年一度的全国电子显微学学术盛会——2017年全国电子显微学学术年会。孙飞研究员作为中国电子显微学会理事参加了中国电镜学会第十届理事会第二次会议，并在生命科学研究分会做题为“HOPE: a new solution for non-integrated cryo correlative fluorescence and electron microscopy”的邀请报告。另外，郭振玺受邀在生命科学研究分会做冷冻电镜数据收集过程中实时消象散策略报告，此外，李喜霞获得了本次大会的优秀poster奖。本次会议上生物成像中心作为国内冷冻电镜领域的重要参与者、贡献者、引领者，所报告的新技术新方法，受到了与会专家学者的的好评。通过本次年会，中心成员不仅学到了最前沿的电子显微学知识，而且通过与同行之间的相互交流学习，进一步拓展了大家的工作思路。



(2) 第15次中国暨国际生物物理大会及第五届全国冷冻电子显微学与结构生物学专题研讨会

2017年11月2–6日，生物成像中心孙飞研究员、季刚正高级工程师、李硕果、牛彤欣、贾星、范得印等六人赴上海科技大学参加了由中国生物物理学会主办的第15次中国暨国际生物物理大会及第五届全国冷冻电子显微学与结构生物学专题研讨会。孙飞研究员、季刚正高级工程师作为生物物理学会理事参加了冷冻电镜理事会会议，孙飞研究员在第五届全国冷冻电子显微学与结构生物学专题研讨会上做题为“Methodology development for in situ structural biology”的邀请报告，季刚正高级工程师做题为“HOPE: a new solution for non-integrated cryo correlative fluorescence and electron microscopy”的邀请报告。孙飞研究员在中国生物物理大会中以分会场主持人的身份主持了“青年人才托举工程”专题研讨会。

生物物理大会是国内生物物理科学研究领域最大规模、最高水准的学术盛会。本次大会设结构生物学、膜生物学、纳米生物物理、神经生物物理、医学生物物理、代谢与代谢疾病、及高分辨显微镜和现代电镜技术等20多个学术专题，100多位国内外知名学者在本次大会上做了邀请报告，探讨生物、健康，以及生物学与物理学交叉领域的最新研究进展及发展趋势。大会还设置冷冻电镜卫星会，中日、中美双边论坛，青年科研生涯论坛，“青年人才托举工程”专题研讨会，女科学家论坛等专题研讨，墙报交流，生物物理技术与成果展览，高新技术讲座，科普展板展示，诺贝尔奖解读等科普活动。通过本次参会，中心成员不仅学到了最前沿的技术知识，也获得了不同领域学科间的交流机会。



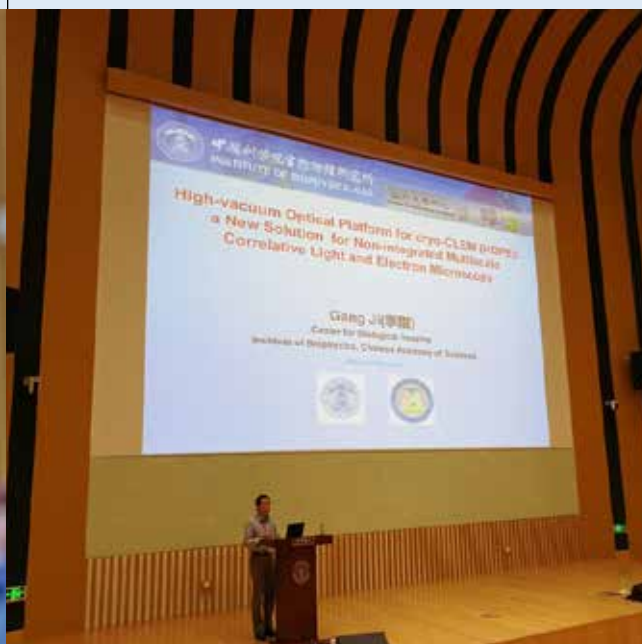
第五届全国冷冻电子显微学与结构生物学专题研讨会参会人员合影



第15次中国暨国际生物物理大会开幕式现场



生物成像中心主任孙飞研究员在冷冻电子显微学与结构生物学专题研讨会上做大会专题报告，并获得“2017第一届中国冷冻电镜杰出贡献奖”



生物成像中心副主任季刚正高级工程师在冷冻电子显微学与结构生物学专题研讨会上做大会专题报告

(3) 其他参会情况

时间	地点	会议	事件
2017.3.21	北京	北京市2017年度激光共聚焦超高分辨显微学学术研讨会	李硕果：3D-SIM超高分辨荧光显微镜使用经验分享
2017.4.11	武汉	武汉大学生命科学院电镜样品制备技术研讨会	孙磊：生物电镜低温样品制备技术
2017.4.24	北京	北京大学生命科学院电镜样品制备技术研讨会	李喜霞：高压冷冻在大尺度三维重构中的应用
2017.7.21-7.25	无锡	北京市电子显微学研讨会暨2017年全国实验室科学管理交流会	李喜霞：生物电镜成像前沿技术
2017.8.6-8.10	美国圣路易斯	Microscopy & Microanalysis 2017 Meeting	孙磊、李喜霞参会
2017.9.6-9.7	北京	2017人工智能计算大会(AICC)	牛彤欣、冯韵、李喜霞参会
2017.9.14-9.16	无锡	超级计算创新联盟全体会议	牛彤欣参会
2017.9.27-9.29	北京	中国科学院2017年生命领域区域中心所级中心工作交流会	黄小俊：低温透射电镜单颗粒技术自动化数据收集的流程设置与问题探讨
2017.10.12-10.15	重庆	2017年中科院超级计算环境研讨会	牛彤欣参会
2017.10.29	杭州	2017全国多尺度脑成像技术培训班	季刚：基于聚焦离子束和连续超薄切片的大尺度电子显微三维重构技术
2017.11.20	昆明	中科院昆明动物所生物电镜制样技术研讨会	孙磊：生物电镜低温样品制备技术

获奖情况

1. 生物成像中心获得“区域中心2017年度院所两级优秀集体”奖

根据《中国科学院院所两级公共技术服务中心评优工作暂行规定》，为进一步促进我院技术支撑工作发展，鼓励和引导院属各单位加快推进技术支撑体系建设，2017年开始表彰和奖励为院所两级公共技术服务中心建设和发展做出突出贡献的集体和个人。从2017年开始，条财局每年在全院评选5个优秀集体和10个优秀个人。

优秀集体是指在平台建设、运行管理、支撑服务、技术创新等方面做出突出成绩的院所两级中心中已经运行三年以上的科研平台和大型机组。对基础科学研究、重大科技任务的完成发挥直接支撑作用，为国家、区域和行业经济发展做出实质性重要贡献；推动大型仪器设备高效利用，促进仪器设备共用共享取得显著成效；通过仪器设备功能开发或方法创新、技术培训与交流、高水平人才引进与培养等显著提升支撑能力。

经北京生命科学大型仪器区域中心组织专家评审，研究所平台生物成像中心作为唯一一个技术团队代表

北京生命科学区域中心参加了2017年4月27日在青岛召开的全院区域中心管委会主任会议，经15个区域中心管委会主任评审，生物成像中心获得了“区域中心2017年度院所两级优秀集体”奖，同时奖励集体一个功能开发项目（50万元）。

获得“区域中心2017年度院所两级优秀集体”奖是对生物成像中心多年来坚持提供高水平技术服务的极大肯定，我中心也会继续发扬团队精神，不断地提升技术服务能力，更好地支撑国家重大科技需求。



图1. 团队合影

2. 孙飞研究员获得“2017第一届中国冷冻电镜杰出贡献奖”

2017年11月2—3日，第五届全国冷冻电子显微学与结构生物学专题研讨会在上海科技大学举行。会上揭晓了“2017第一届中国冷冻电镜杰出贡献奖”获奖者名单，并于11月2日晚举行了颁奖典礼。中国科学院生物物理所研究员，中科院生物物理所蛋白质科学研究平台生物成像中心主任孙飞获得该奖项，奖励其在冷冻电镜方法学的开发和应用上的一系列重要成就以及对冷冻电镜技术的推广所做的贡献。另外获奖的还有中科院院士、清华大学隋森芳教授以及清华大学雷建林研究员。

“中国冷冻电镜杰出贡献奖”是由中国生物物理学会冷冻电子显微学分会（简称中国冷冻电镜分会）于2017年设立的。旨在奖励在冷冻电镜的方法学开发与应用方面获得重要突破、在中国冷冻电镜的重要设施建设与技术服务做出杰出贡献、在中国冷冻电镜的人才培养和推广中做出杰出贡献的国内科学家，以进一步推进中国冷冻电镜学科的发展，全面加强中国冷冻电镜的人才队伍建设。



图1. 成像中心主任孙飞研究员上台领奖

生物成像中心基建工作

1. 新样品制备实验室启用

随着生物成像中心电镜及各种设备的增多，原7号楼一层实验区域已非常紧张。经研究所规划协调，将7号楼二层7204房间调整分配给我中心，作为电镜样品制备实验室，用作中心工作人员和用户进行电镜制样的实验区，并放置各电镜制样相关仪器。同时对人员办公区域也进行了相应调整。实验室整体改造经过招投标，在2017年3月开工，于2017年5月整体完工，并于同月完成了搬迁工作。

新实验室7204房间根据功能进行了区域划分，包括：

- 1) 切片室，放置超薄切片机三台（Leica UC6 & UC7）、修块机一台（Leica EM Trim2）、振动切片机一台（Leica VT 1200S）；
- 2) 高压冷冻区，放置高压冷冻仪两台（Leica EM HPM100 & Leica EM Pact2）；
- 3) 冷冻替代区，放置冷冻替代仪四台（Leica EM AFS2）；



图1. 新样品制备实验室

4) 通风橱与烘箱区，摆放通风橱两个，烘箱三台，其中通风橱内放置微波组织处理仪一台（Leica EM AMW）；

5) 实验区，包括5.1米长实验台三行，其中又针对不同的实验划分了区域，在相关区域台面上摆放离心机、天平、pH计、旋转混合仪等相关设备；

6) 储藏室，放置冰箱、药品试剂柜、液氮罐等。

从2017年6月开始，细胞学方面的电镜样品制备工作在7204进行，包括固定包埋、高压冷冻、冷冻替代、超薄切片等等。

原冷冻超薄切片室未搬迁，依旧位于7号楼一层7114房间，其中放置冷冻超薄切片机两台（Leica FC7）。房间根据实验需要进行了专门的控温控湿处理。

原电镜样品制备室7104房间重新布置为负染色样品制备及其它对湿度控制无严格要求的实验专用，设置通风橱和摆放辉光放电仪（Plasma cleaner PDC-32G和FINE COAT ion sputter JFC-1100）。

3号楼3110-5室设为投入式冷冻样品制备专用。8月加装除湿系统，为相关实验开辟良好的低湿度环境。该样品制备室为非感染性样品专用，放置设备包括FEI vitrobot、Leica EM GP、Gatan Solarus、和3110-1室Titan Krios的上样平台及工具。

改造后的电镜样品制备室功能明确，区域清晰，实验空间充裕。用户可根据需要在相应空间进行实验。请用户遵守实验室各项管理规定，按规程正确使用仪器，维护公共卫生，保持良好的实验环境和秩序，共同打造安静洁净高效的实验区。

2. 成像中心评审系统建立

生物成像中心（center for biological imaging, CBI）评审系统于2017年3月部署成功并开放使用，登录网址为<http://cbi.ibp.ac.cn:8181/cbi/>，内容包括了组织细胞电镜成像申请、分子病毒电镜成像申请、荧光成像申请、图像处理申请、合作研究申请等6部分技术服务申请。评审系统的开放使用，方便了用户申请、实时跟踪实验进度、在线反馈意见等，同时为成像中心的管理提供了便利。



图1 CBI评审系统首页



图2 CBI评审系统主页

生物成像中心在研项目统计

生物成像中心2017年度在研项目情况统计表

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	200万	2013年-2017年
高分辨率生物电镜数据库镜像及生物信息学研究	中国科学院前沿科学重点研究项目	孙飞	250万	2016年-2020年
蛋白质机器的原子分辨率冷冻电镜单颗粒分析技术及应用	国家重点研发计划	章新政	1077万	2017年-2022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
蛋白质机器的时间分辨率冷冻电镜成像技术	国家重点研发计划	季刚	1080万	2017年-2022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	20万	2016年-2018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	20万	2016年-2018年
连续超薄切片的扫描电镜自动成像策略及软件开发	科学院仪器功能开发项目	李喜霞	40万	2016年-2018年
基于荧光辅助定位的冷冻电镜离子减薄样品制备系统研制	科学院仪器功能开发项目	张建国	80万	2017年-2019年
利用聚焦离子束技术制备低温电镜组织样品冷冻含水切片的方法研究及应用	国家自然科学基金面上基金项目	张建国	60万	2018年-2021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
新型显微镜活细胞培养自动微灌流加药一体化系统研制	科学院仪器功能开发项目	滕岩	50万	2017年-2019年

生物成像中心专利清单

名称	授权国别	类别	发明人	专利权人	专利号	专利申请日	授权公告日
摇床装置	中国	发明专利	季刚, 王莉, 徐伟, 孙飞	中国科学院生物物理研究所	ZL 2014 1 0550483.2	2014年10月16日	2017年4月5日
聚焦离子束法制备冷冻含水切片的样品夹持工具和转移盒子	中国	发明专利	张建国, 季刚, 徐伟, 孙飞	中国科学院生物物理研究所	201510010319.7	2015年1月9日	2017年6月6日
一种用于透射电镜的载网	中国	实用新型专利	张建国, 季刚, 孙飞	中国科学院生物物理研究所	2016211395381	2016年10月19日	2017年9月22日
透射电子显微镜载网制备方法	中国	发明专利	黄小俊, 季刚, 孙飞	中国科学院生物物理研究所	ZL 2015 1 0355339.8	2015年6月24日	2017年5月10日
一种光镜电镜关联成像用光学真空冷台	中国	发明专利	季刚, 李硕果, 孙飞	中国科学院生物物理研究所	ZL201410363314.8	2014年7月28日	2017年2月15日
OPTICAL VACUUM CRYO-STAGE FOR CORRELATIVE LIGHT AND ELECTRON MICROSCOPY	美国	发明专利	季刚, 李硕果, 孙飞	中国科学院生物物理研究所	15/500,009	2017年9月21日	

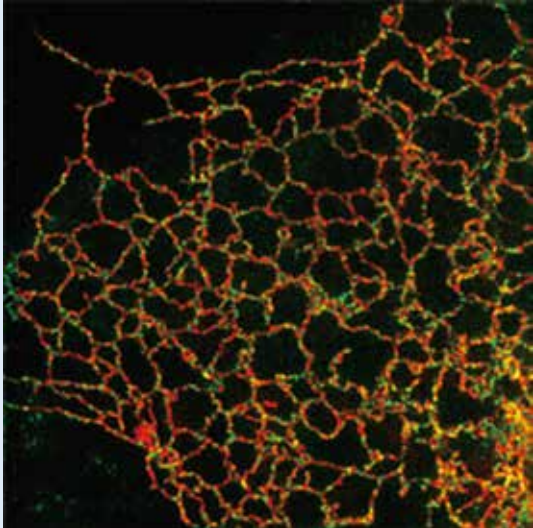
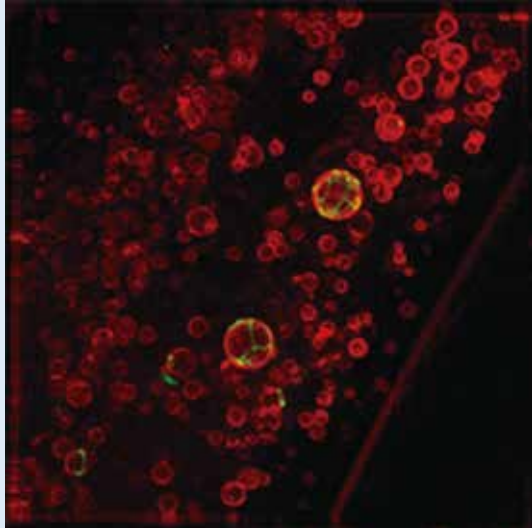

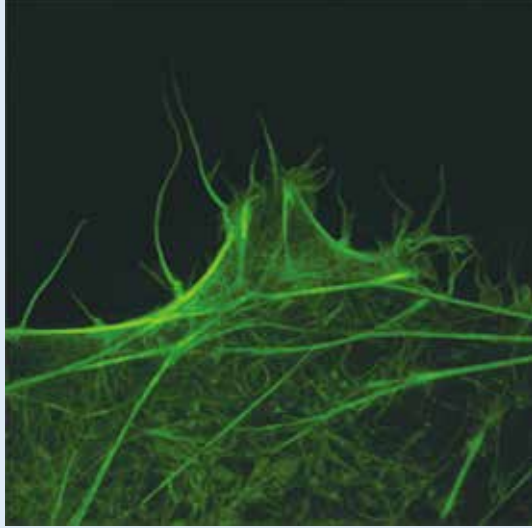
日常活动和管理

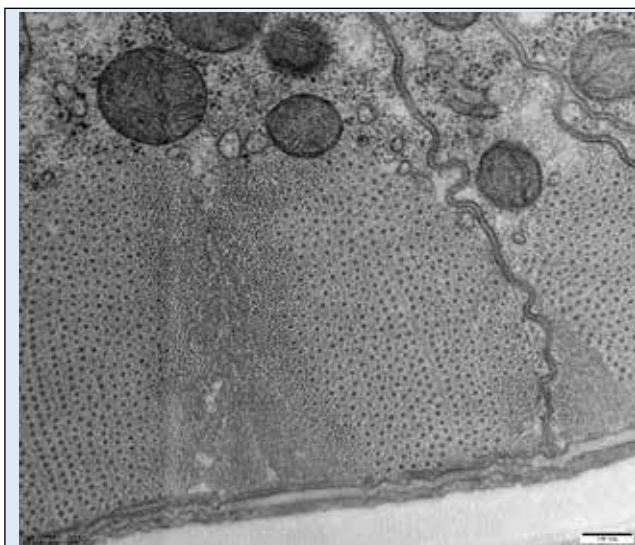
生物成像中心日常活动主要包括周一例会与方法学讨论会。其中，周一例会定于每月前三周周一下午1:30在7号楼一层生物成像中心会议室召开，例会内容主要包括：生物中心运行管理相关事务谈论、生物成像中心小组工作汇报、以及生物成像中心成员学习心得分享交流活动。方法学讨论会定于每月第四周周一下午1:30在7号楼一层生物成像中心会议室召开。讨论会由中心主任孙飞研究员主持，徐伟研究员、章新政研究员作为特邀专家参与指导，中心参与方法学研究的各位成员分别就近期项目研究进展情况进行总结汇报，并与与会的各位专家和中心成员展开深入讨论。

生物成像中心2017年度Journal Club内容及时间表

日期	报告人	报告题目
2017.02.13	张建国	Optimized cryo-focused ion beam sample preparation aimed at in situ structural studies of membrane proteins
2017.02.20	滕岩	Nanometer resolution imaging and tracking of fluorescent molecules with minimal photon fluxes
2017.03.13	黄小俊	Single particle data collection
2017.03.20	孙磊	Adaptation of Cryo-Sectioning for IEM Labeling of Asymmetric Samples
2017.04.10	李硕果	Direct Evidence of Lack of Colocalisation of Fluorescently Labelled Gold Labels Used in Correlative Light Electron Microscopy
2017.04.17	季刚	Imaging ATUM ultrathin section libraries with Wafer Mapper: a multi-scale approach to EM reconstruction of neural circuits
2017.05.08	滕岩	Introduction of Fluorescence Microscopy
2017.05.18	王莉	Tandem High-pressure Freezing and Quick Freeze Substitution of Plant Tissues for Transmission Electron Microscopy
2017.06.05	李硕果	Introduction to the cell
	郭振玺	Real-time detection and single-pass minimization of TEM objective lens
2017.06.12	陈永圣	Spotiton: A prototype for an integrated inkjet dispense and vitrification system for cryo-TEM
2017.06.19	李喜霞	Conductive resins improve charging and resolution of acquired images in electron microscopic volume imaging
	冯韵	Fluorescence Image Processing and Data Analysis Technology
2017.06.26	朱博玲	Breaking-Cryo-EM-Resolution-Barriers-to-Facilitate-Drug-Discovery
2017.07.03	牛彤欣	subtomogram analysis using the Volta phase plate
2017.07.17	李硕果	Introduction of Structured illumination microscopy
2017.09.04	黄小俊	Phase plate data collection
2017.09.18	孙磊	Optimizing CLEM protocols for plants cells
2017.09.22	李硕果	Introduction of Optical Elements (1)
2017.10.23	Steffan Moeller Soenderskov	Achievable resolution of 70S ribosomes on carbon and graphene support films - a comparative study
	Nick Yin. Larsen	Characterization of minicolumns and volume tensors of neurons in Brodmann Area 46 in normal, schizophrenic and depressive human autopsy brains
2017.10.30	杨雪梅	冷冻电镜技术学习-数据处理
	何俊	电镜样品制备与数据采集

生物成像中心精彩图片展

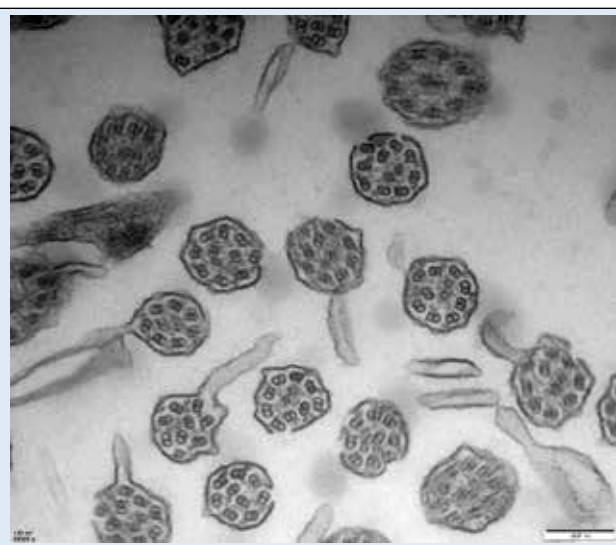
	
<p>COS7 cells immunostained with antibodies against ER membrane protein (green) and ER-Tracker Red were analysed by 3DSIM</p>	<p>C.elegans transfected with lipid droplet protein - RFP (red) and interest protein - GFP (green) analyzed by 3DSIM</p>
<p>Courtesy of Qi Liu, Pingyong Xu's Group, Institute of Biophysics, CAS Image Details: Imaged by Delta Vision OMX Mode: Structured Illumination Microscopy (SIM) Image Size: 40 *40μm</p>	<p>Courtesy of Kang Xie, Pingsheng Liu's Group, Institute of Biophysics, CAS Image Details: Imaged by Delta Vision OMX 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>
	
<p>HeLa cells transfected with intermediate filament structural protein - RFP (red) were analysed by 3DSIM</p>	<p>COS7 cells transfected with lifeact- EFGP (green) analyzed by 3DSIM</p>
<p>Courtesy of Xiaohong Sun, Tianjin University Image Details: Imaged by Delta Vision OMX 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 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>



高压冷冻制备的松材线虫

Courtesy of Jianghua Sun's Group IOZ, CAS.
Instrument used: FEI Tecnai Spirit TEM Accelerating voltage: 120kV.

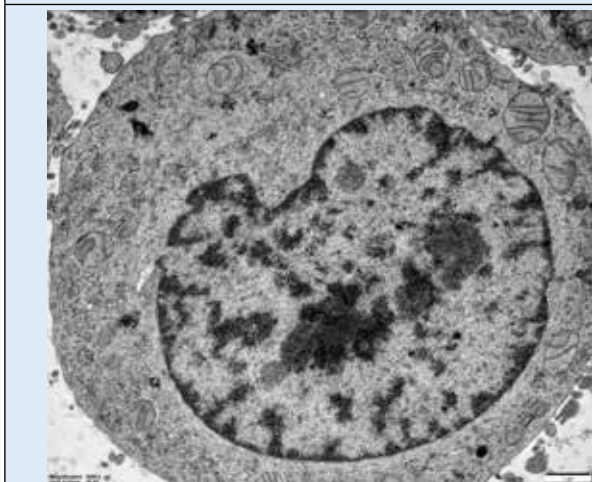
图片供稿：李喜霞



病人支气管上皮超薄切片

Courtesy of Lin Yang's Group, Tianjin Medical University
Instrument used: FEI Tecnai Spirit TEM Accelerating voltage: 120kV.

图片供稿：李喜霞



高压冷冻制备的病毒感染的细胞

Courtesy of Tao Wang, Zhendong Zhao's Group, Chinese Academy of Medical Sciences.

Image Details:

Instrument used: FEI Tecnai Spirit TEM Accelerating voltage: 80kV.

图片供稿：孙磊



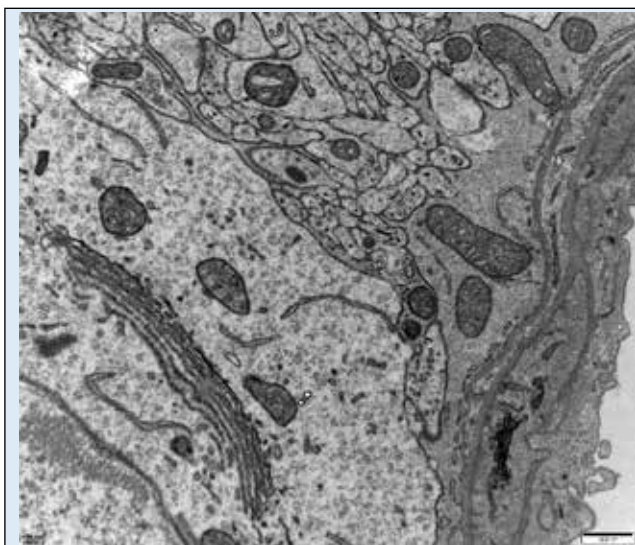
免疫金标记的细菌冷冻超薄切片

Courtesy of Yong Zhang, Cuihua Liu's Group, Institute of Microbiology, CAS.

Image Details:

Instrument used: FEI Tecnai Spirit TEM Accelerating voltage: 120kV.

图片供稿：孙磊

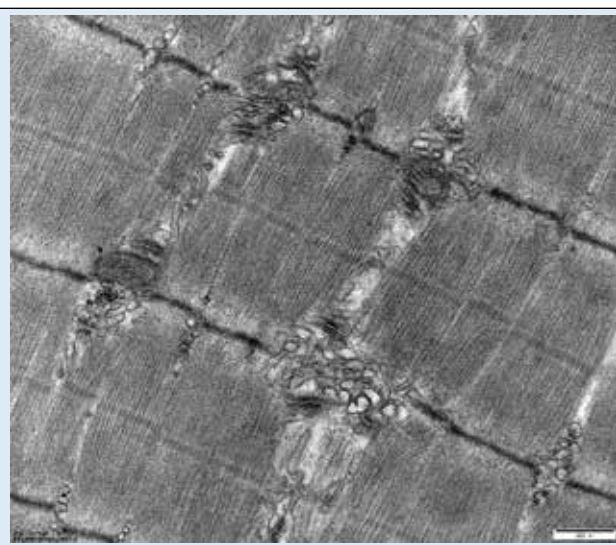


小鼠脑组织超薄切片

Courtesy of Bin Zhou, Ruotian Jiang's Group, West China Hospital, Sichuan University.

Instrument used: FEI Tecnai Spirit TEM Accelerating voltage: 100kV.

图片供稿: 王莉



小鼠肌肉组织超薄切片

Courtesy of Pingdong Hu, Rongqiao He's Group, Institute of Biophysics, CAS.

Instrument used: FEI Tecnai Spirit TEM Accelerating voltage: 120kV.

图片供稿: 王莉

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.Chen Y, Wang Z, Zhang J, Li L, Wan X, Sun F, Zhang F. (2017) Accelerating electron tomography reconstruction algorithm ICON with GPU. *Biophys Rep.* 3(1):36-42.
- 2.Han R, Wan X, Wang Z, Hao Y, Zhang J, Chen Y, Gao X, Liu Z, Ren F, Sun F, Zhang F. (2017) AuTom: A novel automatic platform for electron tomography reconstruction. *J Struct Biol.* 199(3):196-208.
- 3.Wang S, Li S, Ji G, Huang X, Sun F. (2017) Using integrated correlative cryo-light and electron microscopy to directly observe syntaphilin-immobilized neuronal mitochondria in situ. *Biophys Rep.* 3(1):8-16.
- 4.Shi, Y., Wang, L., Zhang, J., Zhai, Y., Sun, F., (2017) Determining the target protein localization in 3D using the combination of FIB-SEM and APEX2. *Biophysics Report.* 3(4):92-99.
- 5.Wang T, Wang B, Huang H, Zhang C, Zhu Y, Pei B, Cheng C, Sun L, Wang J, Jin Q, Zhao Z. (2017) Enterovirus 71 protease 2Apro and 3Cpro differentially inhibit the cellular endoplasmic reticulum-associated degradation (ERAD) pathway via distinct mechanisms, and enterovirus 71 hijacks ERAD component p97 to promote its replication. *PLoS Pathog.* 13(10):e1006674.
- 6.Zhou Y, Deng R, Zhen M, Li J, Guan M, Jia W, Li X, Zhang Y, Yu T, Zou T, Lu Z, Guo J, Sun L, Shu C, Wang C. (2017) Amino acid functionalized gadofullerene nanoparticles with superior antitumor activity via destruction of tumor vasculature in vivo. *Biomaterials.* 133:107-118.
- 7.He X, Yu J, Wang M, Cheng Y, Han Y, Yang S, Shi G, Sun L, Fang Y, Gong ST, Wang Z, Fu YX, Pan L, Tang H. (2017) Bap180/Baf180 is required to maintain homeostasis of intestinal innate immune response in *Drosophila* and mice. *Nat Microbiol.* 2:17056.
- 8.Yuan Y, Cao D, Zhang Y, Ma J, Qi J, Wang Q, Lu G, Wu Y, Yan J, Shi Y, Zhang X, Gao GF. (2017) Cryo-EM structures of MERS-CoV and SARS-CoV spike glycoproteins reveal the dynamic receptor binding domains. *Nat Commun.* 8:15092.
- 9.Su X, Ma J, Wei X, Cao P, Zhu D, Chang W, Liu Z, Zhang X, Li M. (2017) Structure and assembly mechanism of plant C2S2M2-type PSII-LHCII supercomplex. *Science.* 357(6353):815-820.
- 10.Li X, Ji G, Chen X, Ding W, Sun L, Xu W, Han H, Sun F. (2017) Large scale three-dimensional reconstruction of an entire *Caenorhabditis elegans* larva using AutoCUTS-SEM. *J Struct Biol.* pii: S1047-8477(17)30161-2.
- 11.Li S, Ji G, Shi Y, Klausen LH, Niu T, Wang S, Huang X, Ding W, Zhang X, Dong M, Xu W, Sun F. (2017) High-vacuum optical platform for cryo-CLEM (HOPE): A new solution for non-integrated multiscale correlative light and electron microscopy. *J Struct Biol.* 201(1):63-75.

致谢文章

1. Zhao YG, Chen Y, Miao G, Zhao H, Qu W, Li D, Wang Z, Liu N, Li L, Chen S, Liu P, Feng D, Zhang H. (2017) The ER-Localized Transmembrane Protein EPG-3/VMP1 Regulates SERCA Activity to Control ER-Isolation Membrane Contacts for Autophagosome Formation. *Mol Cell*. 67(6):974-989.
2. Liu L, Li X, Ma J, Li Z, You L, Wang J, Wang M, Zhang X, Wang Y. (2017) The Molecular Architecture for RNA-Guided RNA Cleavage by Cas13a. *Cell*. 170(4):714-726.
3. Geng G, Chen P, Guan B, Jiang L, Xu Z, Di D, Tu Z, Hao W, Yi Y, Chen C, Liu M, Hu W. (2017) Shape-Controlled Metal-Free Catalysts: Facet-Sensitive Catalytic Activity Induced by the Arrangement Pattern of Noncovalent Supramolecular Chains. *ACS Nano*. 11(5):4866-4876.
4. Zhang C, Yang L, Ding Y, Wang Y, Lan L, Ma Q, Chi X, Wei P, Zhao Y, Steinbüchel A, Zhang H, Liu P. (2017) Bacterial lipid droplets bind to DNA via an intermediary protein that enhances survival under stress. *Nat Commun*. 8:15979.
5. Ren R, Deng L, Xue Y, Suzuki K, Zhang W, Yu Y, Wu J, Sun L, Gong X, Luan H, Yang F, Ju Z, Ren X, Wang S, Tang H, Geng L, Zhang W, Li J, Qiao J, Xu T, Qu J, Liu GH. (2017) Visualization of aging-associated chromatin alterations with an engineered TALE system. *Cell Res*. 27(4):483-504.
6. Sun Q, Zhu X, Qi J, An W, Lan P, Tan D, Chen R, Wang B, Zheng S, Zhang C, Chen X, Zhang W, Chen J, Dong MQ, Ye K. (2017) Molecular architecture of the 90S small subunit pre-ribosome. *Elife*. 6. pii: e22086.
7. Chen J, Luo Y, Hui H, Cai T, Huang H, Yang F, Feng J, Zhang J, Yan X. (2017) CD146 coordinates brain endothelial cell-pericyte communication for blood-brain barrier development. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 114(36):E7622-E7631.
8. Wang S, Xia P, Chen Y, Qu Y, Xiong Z, Ye B, Du Y, Tian Y, Yin Z, Xu Z, Fan Z. (2017) Regulatory innate lymphoid cells control innate intestinal inflammation. *Cell*. 171(1):201-216.
9. Li L, Li B, Li M, Niu C, Wang G, Li T, Król E, Jin W, Speakman JR. (2017) Brown adipocytes can display a mammary basal myoepithelial cell phenotype in vivo. *Mol Metab*. 6(10):1198-1211.
10. Wang X, Zhu L, Dang M, Hu Z, Gao Q, Yuan S, Sun Y, Zhang B, Ren J, Kotecha A, Walter TS, Wang J, Fry EE, Stuart DI, Rao Z. (2017) Potent neutralization of hepatitis A virus reveals a receptor mimic mechanism and the receptor recognition site. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 114(4):770-775.
11. Wang X, Li SH, Zhu L, Nian QG, Yuan S, Gao Q, Hu Z, Ye Q, Li XF, Xie DY, Shaw N, Wang J, Walter TS, Huiskonen JT, Fry EE, Qin CF, Stuart DI, Rao Z. (2017) Near-atomic structure of Japanese encephalitis virus reveals critical determinants of virulence and stability. *Nat Commun*. 8(1):14.
12. Shi Y, Zhang Y, Lou J. (2017) The influence of cell membrane and SNAP25 linker loop on the dynamics and unzipping of SNARE complex. *PLoS One*. 12(4):e0176235.
13. Jin X, Jiang Z, Zhang K, Wang P, Cao X, Yue N, Wang X, Zhang X, Li Y, Li D, Kang BH, Zhang Y. (2017) Three-dimensional analysis of chloroplast structures associated with virus infection. *Plant Physiol*. pii: pp.00871.2017.

14. Cui X, Wan B, Yang Y, Ren X, Guo LH. (2017) Length effects on the dynamic process of cellular uptake and exocytosis of single-walled carbon nanotubes in murine macrophage cells. *Sci Rep.* 7(1):1518.
15. Jia LP, Liang AP. (2017) An apposition compound eye adapted for nocturnal vision in the moth midge *Clogmia albipunctata* (Williston) (Diptera: Psychodidae). *J Insect Physiol.* 98:188-198.
16. Wang X, Ran T, Zhang X, Xin J, Zhang Z, Wu T, Wang W, Cai G. (2017) 3.9 Å structure of the yeast Mec1-Ddc2 complex, a homolog of human ATR-ATRIP. *Science.* 358(6367):1206-1209.
17. Liu B, Ye B, Yang L, Zhu X, Huang G, Zhu P, Du Y, Wu J, Qin X, Chen R, Tian Y, Fan. (2017) Long non-coding RNA lncKdm2b is required for ILC3 maintenance by initiating Zfp292 expression. *Nat Immunol.* 18(5):499-508.
18. Xue M, Hou J, Wang L, Cheng D, Lu J, Zheng L, Xu T. (2017) Optimizing the fragment complementation of APEX2 for detection of specific protein-protein interactions in live cells. *Sci Rep.* 7(1):12039.
19. Zhang Y, Li J, Li B, Wang J, Liu CH. (2017) Mycobacterium tuberculosis Mce3C promotes mycobacteria entry into macrophages through activation of $\beta 2$ integrin-mediated signalling pathway. *Cell Microbiol.* doi: 10.1111.

附 录

附录一 2016-2017年生物成像中心对外服务用户申请情况统计

从2016年12月到2017年10月共收到对外技术服务申请书总计194份，审核通过171份，通过率88%，其中冷冻电镜74份，常规电镜37份，扫描电镜7份，样品制备53份，详情见下表：

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 (300 kV & 200 kV)	中科院生物物理研究所	孙飞课题组	5	5
		朱平课题组	5	5
		章新政课题组	5	4
		常文瑞课题组	3	3
		柳振峰课题组	2	2
		饶子和课题组	14	12
		徐涛课题组	8	4
		许瑞明课题组	1	1
		江涛课题组	2	1
		王大成课题组	2	2
		刘志杰课题组	1	1
		刘迎芳课题组	2	1
		梁栋材课题组	3	3
		叶克穷课题组	4	4
		周政课题组	1	1
	王艳丽课题组	1	1	
	中科院微生物研究所	高福课题组	1	1
	中科院上海生化所	雷鸣课题组	1	1
	北京大学医学部	尹长城课题组	2	2
	北京大学	陈雷课题组	1	1
	北京师范大学	任海云课题组	2	2
	复旦大学	张文课题组	2	1
复旦大学	徐彦辉课题组	10	9	
中国科学技术大学	蔡刚课题组	6	5	
杭州师范大学	徐晓玲课题组	1	1	
University of Manchester UK	Robert C. Ford	1	1	
扫描电镜 Helios NanoLab 600i	中科院生物物理所	王晓晨课题组	1	通过
		郭爱克课题组	1	通过
		李岩课题组	1	通过
	四川大学华西医院	蒋若天课题组	1	通过
	中科院过程工程研究所	杜逸群课题组	1	通过
		刘会洲	1	通过
	北京化工大学	李媛	1	通过

服务类型	申请单位	课题组	申请份数	批复情况
透射电子显微镜 Tecnai 20 (200kV)	中国农业大学	潘腾	1	通过
	武汉病毒所	李峰	1	通过
	清华大学	张希课题组	1	通过
	理化所	牛忠伟课题组	1	通过
	中国矿业大学	马广华	1	通过
	中科院化学所	王毅林课题组	1	通过
	阜外医院	李健楠	1	通过
	中科院过程所	张锁江课题组	1	通过
	北京师范大学	任海云课题组	1	通过
	北京依生生物科技	王立良	1	通过
透射电子显微镜 Spirit 120kV-负染色	北京大学第一医院	张旭	1	通过
	北京师范大学	孙颖郁课题组	1	通过
		任海云课题组	1	通过
	北京民海	徐颖之	8	通过
	中科院化学所	王春儒课题组	1	通过
	军科院十所	田常玉	1	通过
	中国农业科学院	张桂山	1	通过
	中国农业大学	潘腾	1	通过
	四川大学	梁朋课题组	1	通过
	武汉大学	蔡杰课题组	1	通过
	医科院病原所	赵振东课题组	1	通过
	中生北控		2	通过
	透射电子显微镜 Spirit 120kV-超薄切片	中国农业科学院	张桂山	2
四川大学		徐阳课题	1	通过
辽宁师范大学		逢越	1	通过
辽宁依生生物		王星	1	通过
军事科学院十所		袁静课题组	1	通过
北京生命科学研究所		曹鹏课题组	1	通过
电镜样品制备	中科院生物物理研究所	饶子和课题组	2	通过
		赫荣乔课题组	1	通过
		邓红雨课题组	2	通过
		李岩课题组	1	通过
		徐平勇课题组	1	通过
		阎锡蕴课题组	5	通过
		刘光慧课题组	2	通过
		刘平生课题组	1	通过
		吴瑛课题组	1	通过
		姬广聚课题组	1	通过
		杨福愉课题组	1	通过
		王晓晨课题组	1	通过
		张先恩课题组	1	通过

服务类型	申请单位	课题组	申请份数	批复情况
中科院系统	中科院系统	微生物所刘翠华组	1	通过
		动物所康乐组	1	通过
		动物所刘长梅组	1	通过
		动物所孙江华组	1	通过
		遗传所杨维才组	1	通过
		生态中心曲久辉组	1	通过
		生态中心郭良宏组	2	通过
		基因组所王前飞组	1	通过
		化学所王春儒组	4	通过
		过程所刘会洲组	1	通过
电镜样品制备	其他科研单位	北京大学郑瑞茂组	1	通过
		北京大学杨瑞莉组	1	通过
		中山大学郑颖丰组	1	通过
		天津大学高瑞昶组	1	通过
		南开大学刘斌组	1	通过
		首都医科大学王晓民组	1	通过
		北京化工大学李媛组	1	通过
		生命科学研究所王涛组	1	通过
		中国医科院石磊组	1	通过
		中国农科院田健组	1	通过
		江南大学关锋组	1	通过
		内蒙古大学郑琳琳组	1	通过
		四川大学蒋若天组-	1	通过
		安徽农业大学蔡荟梅组	1	通过
		天津医科大学杨琳组	1	通过
		河南新乡医学院王计奎组	1	通过
		二零二医院王艺瑾组	1	通过
		天津泌尿外研究所刘晓强组	1	通过
		聚束科技	1	通过

附录二 2017年生物成像中心技术支撑服务管理办法

生物成像中心技术支撑服务管理办法

生物成像中心的职责是为科学研究提供高效率高质量的技术支撑服务；针对科研需求进行技术方法创新；为广大用户介绍、培训、使其掌握生物成像相关技术及仪器的使用方法。

目前生物成像中心拥有六台 ThermoFisherScientific (原FEI)透射电子显微镜 (Titan Krios 300 kV场发射低温透射电镜两台、Talos F200C 200 kV 场发射低温透射电镜一台、Tecnai 20 200 kV透射电镜一台、Tecnai Spirit 120 kV透射电镜两台)，双束扫描电镜一台 (FEI Helios Nanolab 600i、配备了Quaroum PP3000T低温样品载台)，原子力显微镜一台，结构照明超分辨率光学显微镜 (Delta Vision OMX) 一台，光激活定位 (PALM) 超分辨率显微镜一台，全内反射荧光 (TIRF) 显微镜一台，激光扫描共聚焦显微镜两台 (FV1000, FV1200)，转盘共聚焦显微镜两台 (Andor SDC, 3I Marianas XL)，双光子显微镜一台 (FV1000MPE)。生物成像中心围绕这些显微成像设备的配套了相关的样品制备仪器，包括高压冷冻固定仪、快速冷冻仪、冷冻替代仪、临界点干燥仪、低温/常温超薄切片仪、真空镀膜仪、表面等离子清洗仪、离子溅射仪、低温样品杆以及自主研发的连续切片自动化收集装置等。此外，生物成像中心还建成了完整的显微图像数据采集、存储和处理计算机网络系统。系统包括：浪潮倚天GPU图形工作站四台，Amira、Imaris 图像处理软件，浪潮天梭高性能计算机集群一套 (100个计算节点，1200个计算核心) 以及具有22台计算机终端的多媒体教室 (用于图像处理软件教学)。

生物成像中心成员：

主任：孙飞

副主任：季刚、李栋

电子显微成像小组：黄小俊 (组长)、张建国、郭振玺、朱博玲、范得印

样品制备小组：孙磊 (组长)、王莉、贾艳侠 (兼原子力)、李喜霞、彭灿

荧光显微成像小组：滕岩 (组长)、李硕果、冯韵、贾星 (博士后)

维修小组：季刚 (兼组长)、陈永圣、张龙龙、谭雪珂

网络及高性能计算：牛彤欣

生物成像中心学术带头人：孙飞研究员、徐涛院士、徐伟研究员、朱平研究员、苗龙研究员、徐平勇研究员、章新政研究员、李栋研究员

生物成像中心专家委员会：徐伟研究员、朱平研究员、苗龙研究员、徐平勇研究员、张宏研究员、邓红雨研究员、李国红研究员、朱岩研究员、章新政研究员

第一章 生物成像中心工作人员日常工作守则

第一条 各司其职，分工协作。在自己负责范围内要尽职尽责、积极主动地完成工作。

第二条 个人仪容仪表要整洁干净，谈吐举止大方得体。

第三条 早晚例行门窗、水电暖及设备安全检查。随时保持实验室常用耗材充足，物品摆放整洁有序。

第四条 工作有计划，按时按计划完成当日的工作任务。

第五条 早中晚三次网上预约审核，提前一天完成实验登记和预约网上日志。

第六条 做好用户的技术培训、考核工作，有序合理地安排实验，协助用户进行实验，耐心解答用户问题，及时纠正用户不规范实验操作，随时发现和改正工作中的不足，确保工作质量和效率。

第七条 仪器设备如有故障、更新、升级（硬件变动、软件升级、增加新的附件或功能）、培训等情况，应及时通知用户。

第八条 实验结束后，协助用户拷贝数据并提醒用户登记。

第九条 及时清理和规范公共数据存储空间，确保公共软件可正常使用。

第十条 检查当天晚上（或非工作时间）是否有人实验，实验人是否符合非工作时间实验规定，实验用品等是否齐备，并做好交代。

第十一条 中心工作人员应严格遵照中心规定，不对用户做超出规定之外的承诺。组长协调监督组内人员工作。如有用户提出超出本规定范围的要求或违反本规定的情况，需立即请示组长和主任。

第十二条 对违反中心规定、工作拖沓、推诿搪塞用户、态度不好、等影响正常技术服务工作秩序、损害中心形象和名誉的行为，做约谈、批评教育、警告、再培训等处理措施。

第二章 生物成像中心用户守则

第一条 新用户须接受培训考核方可使用仪器（培训内容包括预约、仪器操作、注意事项、实验室规定等，细则详见附件1）。

第二条 每台仪器的使用及预约规定不尽相同（细则详见附件2），不清楚之处请及时与该仪器管理员联系。

第三条 实验结束将实验用具及时归位，清洁实验台并做好记录和登记。

第四条 实验中遇到异常情况须及时通报仪器管理员，切勿擅自处理。在公共实验区域或仪器（样品制备实验台、通风处、摇床、烘箱等）内放置物品必须注明单位或研究组、使用人姓名、联系方式，以便在仪器发生故障等紧急情况时通知本人。

第五条 实验数据应放在指定的存储空间内，实验用本地硬盘只做暂存数据之用，数据转移后需及时清理。

第六条 对于用户放置在生物成像中心的物品和数据，如：实验橱、冰箱、液氮罐、实验数据等，由用户自行确保物品和数据的安全。

第七条 使用设备须经考核，只有具有独立使用仪器资格的用户方可在非工作时间使用相应仪器。

第八条 因特殊情况需要中心工作人员加班协助实验的用户，需要提前提出申请，并经主任审核同意，方视为有效。

第九条 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），应在成果中对生物成像中心予以致谢（具体规定见附件3）。

第十条 对违反实验室规定的用户，将给予相应处罚（具体规定详见附件4）。

第十一条 中心对高值工具、用品、耗材、试剂采用领用的方式：

工具：以Vitrobot工具为例，中心准备了两套完整的Vitrobot工具和耗材。（冷冻镊子、液氮泡沫容器、保温杯、竹镊子、滤纸等）放置在两个抽屉中。工作时间，需要使用的用户找管理人员领取钥匙，清点检查好用品。用完后将钥匙归还工作人员，并登记，工作人员检查用品是否完好。用户需非工作时间使用，请提前领取钥匙并保管好，等工作日归还工作人员。工作人员必须保证实验用品的完好。用户也可自行购置冷冻样品的用品。其他高值用品也可照此管理。

试剂：以样品制备试剂为例，如用户经工作人员认可进行实验，需要用到的普通试剂（酒精、丙酮、树脂等）可向工作人员领用，用毕归还，亦可自行购买使用；特殊试剂（钨酸、醋酸铀等）需向工作人员领用并在

工作人员监督下一次性使用，用多少领多少，不可多领。

第三章 生物成像中心服务类别及服务流程

针对不同的用户需求，不同技术方法特点，生物成像中心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。详细规定请参照附件5《生物成像中心对外技术服务类别》。

第一类 合作研究服务

第二类 日常技术服务

第一条 技术服务流程：

电镜：机时预约—项目申请网站上填写申请—审核结果—通知送样—用户送样—制样完成—电镜成像—实验结果交付用户。

样品制备：项目申请网站上填写申请—审核结果—通知送样—用户送样—制样完成—电镜成像—实验结果交付用户。

项目申请网站网址：<http://cbi.ibp.ac.cn:8181/cbi/>

第二条 电镜技术服务规定：

1. 区域中心内课题组电镜预约优先级大于区域中心外用户，区域中心内课题组可预约不超过第三个自然周的机时，而区域中心外课题组用户只能预约不超过第二个自然周的机时。同样，区域中心内课题组样品制备优先级大于区域中心外用户，根据实验繁忙程度决定是否接受区域中心外课题组申请。

2. 项目申请网站上填写申请，随时查看实验进度。高端电镜项目申请暂不支持网上申请。

3. 电镜技术服务时间承诺：对区域中心外用户从申请书审核通过到实际电镜实验最长不超过14天。

4. 样品制备技术服务时间承诺：从实际接收合格样品到制备完成（获得切片）最长不超过21天。特殊实验流程或特殊样品情况协商决定，报主任签字确认。

5. 建立委托技术服务存档：技术服务申请书/专家意见/实验日志/实验结果及组长认可及下一步实验建议/委托人课题组PI意见及签字。

6. 用户如对实验结果不满意或有异议，应及时告知组长、主任和首席专家，以便采取相应措施。

7. 对于用户有特殊需求，如急于得到结果、执意要做被否定的样品、预先预料到很难达到用户实验预期等情况，需请示主任或经专家讨论后再行决定，并在申请书上注明实验风险及预计实验结果。

第三类 仪器使用服务

参照用户守则及生物成像中心相关规定实验即可。

本《办法》的最终解释权归生物成像中心所有。

主任（签章）

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

附件1:

生物成像中心培训考核说明

1. 首次来本中心进行实验的人员要主动联系中心工作人员，并接受实验室管理规定、实验操作、仪器使用、实验安全等的培训。用户不得随意带领人员来成像中心做实验或参观，如有需要请提前联系告知中心管理人员，征得同意后方可进行，并有义务对其所带领人员在成像中心的行为负责。

2. 各仪器均有相应的培训规定。以Spirit、Tecnai 20 透射电镜为例，培训和考核分为三个等级：初级培训/考核、中级培训/考核和高级培训/考核。

2.1 培训内容

(1) 初级培训内容（电镜独立成像）

初级培训主要针对透射电镜使用零基础用户，主要培训透射电镜独立成像方法。培训分为两部分内容：第一部分为常温电镜独立成像操作。具体培训内容包括：找样品、常规合轴、Eucentric height调整、聚焦、物镜光阑对中、物镜消像散、CCD拍照、升降高压、升降灯丝电流、Cryo cycle、图像格式转化、数据拷贝以及安全紧急情况处理等内容。第二部分为冷冻电镜独立成像操作。具体培训内容包括：合轴操作、成像剂量计算与测量、成像条件确定、Low Dose成像技术、冰层及样品质量判断等。仅做常温切片样品的用户可以仅培训常温电镜成像内容。

(2) 中级培训内容（独立更换常温样品）

参加完初级培训并通过初级考核的用户可申请参加中级培训。中级培训主要内容为更换常温样品。主要培训内容为常温样品使用杆过程中的注意事项。

(3) 高级培训内容（独立更换冷冻样品）

参加完中级培训并通过中级考核的用户可申请参加高级培训。高级培训主要内容为更换冷冻样品。主要培训内容为冷冻样品杆使用过程中的注意事项。

2.2 申请培训方法

生物成像中心电镜组每月会进行两次常规电镜培训，培训内容以电镜独立成像为主，样品杆使用方法为辅，具体内容会根据用户需要情况调整。每次培训时长约2小时，培训时间、地点会提前一周在CBI用户群公布。用户可电话（Tel: 64888419）联系管理员报名申请培训。为避免报名被遗漏，请勿用其他方式报名。为保证培训质量，尽量让每个用户在培训期间都能亲自实践，每次培训限报人数上限为5人，每个课题组限报人数上限为2人。

2.3 申请考核流程

生物成像中心电镜组每月会进行1次常规考核，考核内容（电镜独立成像或独立更换常温/冷冻样品）根据用户本月报名培训情况设定。具体考核内容、考核时间、地点会提前一周在CBI用户群公布。为保证考核质量，每次考核限报人数上限为4人，每个课题组限报人数上限为1人。仅接受电话预约考核（Tel: 64888419），为避免预约被遗漏，请勿用其他方式预约。

经过初级培训后，在电镜管理员或者已通过考核的用户陪同下电镜独立成像时间累积超过两个月（使用时间累积至少达到40个小时）的用户，可申请参加初级考核。考核通过后可独立电镜成像，但不授予样品更换权利，即不可独立使用样品杆。仅培训过常温电镜成像的常温切片样品的用户，在电镜管理员或者已通过考核的用户陪同下电镜独立成像时间累积超过1个月（使用时间累积至少达到20个小时），可申请参加常温电镜成像初级考核。

通过初级考核后的用户可申请参加中级培训。经过中级培训，且在电镜管理员或者已通过考核的用户陪同下独立更换常温样品累积超过两个月（使用时间累积至少达到40个小时）的用户，可申请参加中级考核。考核通过后用户可独立操作常温电镜，可预约非工作时间常温电镜机时。

通过中级考核后的用户可申请参加高级培训（仅通过常温电镜成像考核的中级用户，需重新申请初级培训且满足要求通过初级考核后方可申请高级培训）。经过高级培训，且工作日工作时间在电镜管理员陪同下独立更换冷冻样品累积超过两个月（使用时间累积至少达到40个小时）的用户，可申请参加高级考核。考核通过后用户可独立操作冷冻电镜，可预约非工作时间冷冻电镜机时。

2.4 考核流程

每个级别的考核均分两部分内容进行。一为电镜操作，二为口试问答考核。初级考核通过后可独立电镜成像，可在电镜管理员或已通过中级或高级考核用户帮助更换常温/冷冻样品的前提下，预约非工作时间电镜机时。中级考核通过后用户可独立操作常温电镜，可预约非工作时间常温电镜机时。高级考核通过后用户可独立操作冷冻电镜，可预约非工作时间冷冻电镜机时。

若未通过初级考核，需再在电镜管理员或者已通过考核的用户陪同下独立电镜成像时间累积超过两个月（使用时间累积至少达到40个小时），方可申请下次考核。仅培训过常温电镜成像的常温切片样品的用户，需再在电镜管理员或者已通过考核的用户陪同下电镜独立成像时间累积超过1个月（使用时间累积至少达到20个小时），方可申请下次考核。

若未通过中级考核，需再在电镜管理员或者已通过考核的用户陪同下使用常温电镜累积超过两个月（使用时间累积至少达到40个小时），方可申请下次考核。

若高级考核首次考核未通过，需再在工作日工作时间，且在电镜管理员陪同下使用冷冻电镜累积超过两个月（使用时间累积至少达到40个小时），方可申请下次考核。若二次考核仍未通过，需重新培训后，且累积使用冷冻电镜超过40小时后，方可申请第三次考核。三次考核仍未通过者，不再考核。

超过一年未使用电镜的用户，需申请重新考核，考核通过后才可继续使用电镜。若未通过，需重新培训。

2.5 培训考核收费标准

每次考核或培训，每人收费为0.5小时电镜机时费（350元/小时），以电镜机时费或电镜耗材方式收取。

2.6 声明

科学研究平台生物成像中心低端透射电镜用户培训考核只针对生物物理所用户开放。

如有其他问题，欢迎联系生物成像中心相关工作人员。

科学研究平台生物成像中心透射电镜用户培训使用记录表

——FEI Tecnai Spirit及FEI Tecnai 20透射电镜

(2017年7月版)

编号:

用户姓名	所在课题组	联系方式	
		电话	
		Email	
初级（电镜独立成像）			
内容	日期	使用时长 (小时)	培训人或陪同人 签名
培训（常温 <input type="checkbox"/> 冷冻 <input type="checkbox"/> ）电镜成像			
（常温 <input type="checkbox"/> 冷冻 <input type="checkbox"/> ）电镜成像			
（常温 <input type="checkbox"/> 冷冻 <input type="checkbox"/> ）电镜成像			
（常温 <input type="checkbox"/> 冷冻 <input type="checkbox"/> ）电镜成像			
（常温 <input type="checkbox"/> 冷冻 <input type="checkbox"/> ）电镜成像			
（常温 <input type="checkbox"/> 冷冻 <input type="checkbox"/> ）电镜成像			
（常温 <input type="checkbox"/> 冷冻 <input type="checkbox"/> ）电镜成像			
（常温 <input type="checkbox"/> 冷冻 <input type="checkbox"/> ）电镜成像			
（常温 <input type="checkbox"/> 冷冻 <input type="checkbox"/> ）电镜成像			
（常温 <input type="checkbox"/> 冷冻 <input type="checkbox"/> ）电镜成像			
（常温 <input type="checkbox"/> 冷冻 <input type="checkbox"/> ）电镜成像			
（常温 <input type="checkbox"/> 冷冻 <input type="checkbox"/> ）电镜成像			
（常温 <input type="checkbox"/> 冷冻 <input type="checkbox"/> ）电镜成像			
（常温 <input type="checkbox"/> 冷冻 <input type="checkbox"/> ）电镜成像			

备注：培训完成后请交予电镜管理员保管。电镜管理员会根据《电镜设备使用记录登记本》的登记记录，填写培训使用记录表。

中级（独立更换常温样品）			
内容	日期	使用时长 (小时)	培训人或陪同人 签名
培训			
独立操作常温电镜			
独立操作常温电镜			
独立操作常温电镜			
独立操作常温电镜			
独立操作常温电镜			
独立操作常温电镜			
独立操作常温电镜			
独立操作常温电镜			
独立操作常温电镜			

独立操作常温电镜			
独立操作常温电镜			
独立操作常温电镜			
独立操作常温电镜			
独立操作常温电镜			
独立操作常温电镜			
独立操作常温电镜			
独立操作常温电镜			
独立操作常温电镜			
独立操作常温电镜			
独立操作常温电镜			
独立操作常温电镜			
独立操作常温电镜			
独立操作常温电镜			

备注：培训完成后请交予电镜管理员保管。电镜管理员会根据《电镜设备使用记录登记本》的登记记录，填写培训使用记录表。

高级（独立更换冷冻样品）			
内容	日期	使用时长 (小时)	培训人或陪同人 签名
培训			
独立操作冷冻电镜			
独立操作冷冻电镜			
独立操作冷冻电镜			
独立操作冷冻电镜			
独立操作冷冻电镜			
独立操作冷冻电镜			
独立操作冷冻电镜			
独立操作冷冻电镜			
独立操作冷冻电镜			
独立操作冷冻电镜			
独立操作冷冻电镜			
独立操作冷冻电镜			
独立操作冷冻电镜			
独立操作冷冻电镜			
独立操作冷冻电镜			
独立操作冷冻电镜			
独立操作冷冻电镜			
独立操作冷冻电镜			
独立操作冷冻电镜			
独立操作冷冻电镜			
独立操作冷冻电镜			
独立操作冷冻电镜			
独立操作冷冻电镜			
独立操作冷冻电镜			
独立操作冷冻电镜			
独立操作冷冻电镜			
独立操作冷冻电镜			
独立操作冷冻电镜			
独立操作冷冻电镜			

备注：培训完成后请交予电镜管理员保管。电镜管理员会根据《电镜设备使用记录登记本》的登记记录，填写培训使用记录表。

科学研究平台生物成像中心透射电镜用户考核登记表

——FEI Tecnai Spirit及FEI Tecnai 20透射电镜

(2017年7月版)

编号:

用户姓名	所在课题组	联系方式	
		电话	
		Email	
初级（电镜独立成像）			
日期			
口试	通过 <input type="checkbox"/>	未通过 <input type="checkbox"/>	
常温电镜成像	通过 <input type="checkbox"/>	未通过 <input type="checkbox"/>	
冷冻电镜成像	通过 <input type="checkbox"/>	未通过 <input type="checkbox"/>	
考核结果	重新培训 <input type="checkbox"/> 可申请中级培训 <input type="checkbox"/>		
被考核人签字			
考核人签字			
中级（独立更换常温样品）			
日期			
口试	通过 <input type="checkbox"/>	未通过 <input type="checkbox"/>	
常温电镜成像	通过 <input type="checkbox"/>	未通过 <input type="checkbox"/>	
更换常温样品	通过 <input type="checkbox"/>	未通过 <input type="checkbox"/>	
考核结果	重新培训 <input type="checkbox"/> 可申请高级培训 <input type="checkbox"/> 可独立操作常温电镜 <input type="checkbox"/> 可预约非工作时间常温电镜机时 <input type="checkbox"/>		
被考核人签字			
考核人签字			
高级（独立更换冷冻样品）			
日期			
口试	通过 <input type="checkbox"/>	未通过 <input type="checkbox"/>	
冷冻电镜成像	通过 <input type="checkbox"/>	未通过 <input type="checkbox"/>	
更换冷冻样品	通过 <input type="checkbox"/>	未通过 <input type="checkbox"/>	
考核结果	重新培训 <input type="checkbox"/> 可独立操作冷冻电镜 <input type="checkbox"/> 可预约非工作时间冷冻电镜机时 <input type="checkbox"/>		
被考核人签字			
考核人签字			

备注：考核期间用户保存，全部考核通过后交予电镜管理员存档。

附件2:

生物成像中心仪器预约规定

1. 网上委托单填写要求:

每个连续时间段需单独预约一个委托单, 委托单信息要填写详尽, 实验人和联系方式应为实际实验人, 预约时间要符合各仪器的规定(见下文)。违反上述规定的均视为无效委托单予以否决。不允许不预约而使用设备。预约的机时如因实验变动需取消的需及时在网上申请撤销。预约的机时不能按时使用的, 或提前完成而空余较多机时的, 需通知仪器管理员, 以便另行安排协调别的用户使用, 避免浪费机时。由此而造成的机时浪费, 除承担相应的机时费外, 作为违反规定处理。屡次浪费机时者减少其机时的预约时间。

2. Spirit、Tecnai 20 透射电镜预约要求:

区域中心内课题组电镜预约优先级大于区域中心外用户, 区域中心内课题组可预约不超过第三个自然周的机时, 区域中心外课题组用户只能预约不超过第二个自然周的机时。

2.1 未通过电镜中级考核的用户每日可预约的机时时间区间:

常温和冷冻电镜实验均可预约工作时间(9:00-12:00, 13:00-17:30)、非工作时间(17:30-22:00)。实验过程中需电镜管理员或已通过电镜考核人员全程陪同(操作常温电镜需通过中级考核人员陪同, 操作低温电镜需通过高级考核人员陪同), 辅助更换样品。电镜机时预约单中需备注陪同人员姓名, 《电镜设备使用记录登记本》上需实验预约人和陪同人员同时签名。

2.2 通过常温电镜(新版/旧版中级)考核的用户每日可预约的机时时间区间以及实验内容:

常温电镜实验可预约早上7:00-凌晨3:00区间机时, 可独立更换常温样品; 冷冻电镜实验均可预约工作时间(9:00-12:00, 13:00-17:30)、非工作时间(17:30-22:00)。实验过程中需电镜管理员或已通过电镜高级考核人员全程陪同, 辅助更换样品。若练习更换冷冻电镜样品, 仅可预约工作时间(9:00-12:00, 13:00-17:30)电镜机时, 且需要电镜管理员全程陪同练习。

2.3 通过冷冻电镜(新版/旧版高级)考核的用户能预约的每日机时区间以及实验内容:

常温和冷冻电镜实验均可预约早上7:00-凌晨3:00区间机时。

a) Spirit-负染色和Tecnai 20的用户在预约和开展实验前必须到平台办公室办理刷卡权限开启手续

必须办理。并且保证用户卡与预约账户关联。刷卡用电镜时只能刷与预约账户对应的用户卡。建议用户开卡权限后, 第一次预约仅预约工作时间, 以便测试能否成功刷卡。因无法刷卡而耽误机时使用, 机时收费仍按预约时长收取。如因无法刷卡而引起无法做cryo cycle, 并影响后续其他用户使用的用户, 将被取消预约资格, 直至确保可以成功刷卡。两次以上因无法刷卡影响其他用户使用的用户, 将被取消预约和使用非工作时间机时的资格。

b) 用户预约的机时是否仅供自己使用

一般情况下, 仅供预约者自己使用, 区域中心内部用户的预约按预约账户和预约机时收费, 代替他人预约可能会引起机时费误收。此外, 如果预约的为非工作时间, 且实际使用者未获得非工作时间使用资格(即未通过相关考核), 实验过程中需电镜管理员或已通过电镜考核人员全程陪同(操作常温电镜需通过中级考核人员陪同, 操作低温电镜需通过高级考核人员陪同), 辅助更换样品。电镜机时预约单中需备注陪同人员姓名, 《电镜设备使用记录登记本》上需实验预约人和陪同人员同时签名。若发现无人陪同或陪同人中途离开, 一经发现, 预约者将被取消预约和使用非工作时间机时的资格。

c) 预约了机时的用户取消预约办法

首先，区域中心内的用户在CBI用户群（微信群）中发信息通告机时取消详情，信息内容包括预约电镜名称、具体日期、具体时间段。然后，在预约网上申请撤销机时预约单。区域中心外用户可直接联系管理员代理预约取消。通常，建议用户尽可能提前一天取消预约。如预约时间开始后提出取消预约，将以浪费机时为由，按照预约时长照常收费。每月三次以上预约时间开始后提出取消预约，将取消预约其资格一个月。

2.7实验提前结束处理办法

首先，区域中心内的用户在CBI用户群（微信群）中发信息通告机时提前结束详情，信息内容包括预约电镜名称、具体日期、具体时间段。然后，通知管理员修改预约单，以方便其他用户预约使用。区域中心外用户可直接联系管理员代理预约单修改。通常，建议用户按需要预约使用。每月三次以上提前超过一小时结束使用的用户将以浪费机时为由，按照原有预约时长照常收费。每月三次以上提前超过一小时结束使用的用户将取消预约资格一个月。

3.Talos透射电镜预约要求：

用户使用Talos电镜前，必须填写《Titan_Krios_user_application_ENG》或者《Titan_Talos_application_renew》（可在生物成像中心网站<http://cbi.ibp.ac.cn>下载）。用户请按照申请书中的填写说明“英文规范填写”。填好申请表发给管理人员（CBI高端电镜申请专用邮箱：ibptem@ibp.ac.cn），由专家委员会评审后批准机时。

Talos机时预约以每个月最后一周为时间节点开始预约下个月的机时。

Talos电镜机时每天分为两个时段，分别是8:30 am至5:00 pm和18:00 pm至第二天8:00 am；预约时必须注明是哪个时段或是全天。

需要长时间进行数据收集工作或通过了Talos电镜中级技术考核的用户可预约全天机时。未通过Talos中级技术考核且仅需要检查样品或短时间数据收集的用户只允许预约工作日第一时段机时。

需要进行数据收集且不能进行自主电镜使用和程序设置的用户，需提前筛选好样品。由于数据收集的准备工作（电镜合轴、参数调整、程序设置、地图拍摄等）需要2~4小时，请您在数据收集当天最晚午后时间即确定合适样品。我们的电镜工程师会协助您进行数据收集的准备等相关工作。

当月机时分配通知收到后，请尽快在预约网进行预约。截止当月1日未在网上预约的机时视为自动放弃，会作为二次预约调整给其他课题组。

4.Titan透射电镜预约要求：

用户使用Titan电镜前，必须填写《Titan_Krios_user_application_ENG》或者《Titan_Talos_application_renew》（可在生物成像中心网站<http://cbi.ibp.ac.cn>下载）。用户请按照申请书中的“填写说明”英文规范填写。填好申请表发给管理人员（CBI高端透射电镜专用邮箱：ibptem@ibp.ac.cn），由专家委员会评审后批准机时。Titan年度机时中的30%为院先导项目专用机时。区域中心外用户的机时总数不得超过15%。

Titan电镜机时每天分为两个时段（第一时段8:30 am—6:00 pm，第二时段6:00 pm至第二天8:30 am）；预约时默认预约全天，特殊情况请注明预约哪个时段。

由于Titan电镜机时紧张，如果用户准备的样品质量不理想，请及时向管理员提出，以通知下一个用户使用。

当月机时分配通知收到后，请尽快在预约网进行预约。截止当月1日未在网上预约的机时视为自动放弃，会作为二次预约调整给其他课题组。

为更加科学的分配机时，成像中心将启动用户机时使用报告制度。本中心要求，每位用户在使用完电镜后

1个月内向生物成像中心提交本次机时使用情况报告《高端透射电镜机时使用情况报告_v2》。成像中心将根据报告内容了解机时使用效率，据此调整该项目的第三个月的使用机时。逾期不交者，将被取消第三月电镜预约资格。

5. Helios双束扫描电镜预约要求：

用户使用Helios电镜前，必须填写申请书。预约填好申请书发给管理员，由专家委员会评审后批准机时。

Helios电镜机时可以每天分小时预约，需要长时间进行数据收集工作的用户可预约全天机时。每个用户最多预约5个工作日/月（如可以独立操作机器的用户可以增加相邻的周末的时间），其余时间为其他用户预约，每组最多预约5个工作日/月。管理员每月保留4-5天作为机器调试和维修时间。

当月机时分配通知收到后，请尽快在预约网进行预约。当月1日未在网上预约的机时视为自动放弃，会作为二次预约调整给其他课题组。

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

初次实验者，实验前应与管理人研究制定实验方案。

6. 电镜制样设备预约要求：

电镜制样设备包括：

（1）需要网上预约的设备包括：高压冷冻仪HPM100、高压冷冻仪Pact2、冷冻替代仪AFS2（A、B、C三台）、超薄切片机UC6（两台）、低温超薄切片机FC7。

（2）无需网上预约的设备包括：修块机、制刀机

无论（1）或（2），使用后均需在登记本上登记。

用户如委托工作人员进行制样的，需先和样品制备组联系，按要求填写申请书，待审核通过后安排实验，再按要求预约相应仪器机时，由工作人员独立使用或带领用户使用。

经过考核可独立实验的用户可网上自行预约机时；原则上只能预约不超过第三个自然周的机时。

未经考核认可独立实验资质的用户不可自行预约机时。如有合作课题，要求实际使用人必须是经过考核可独立实验的用户，预约时必须在联系人处备注。

应按实际需要时间预约机时。不得多占抢占或少约不约。冷冻替代仪一个流程内时间需连贯（一天为0:00-23:59），高压冷冻仪和冷冻超薄切片机需包括预冷时间。

7. 光镜预约要求：

登陆仪器预约网<http://samp.cas.cn>，详实填写预约单。

（1）提前一周（7天）预约（每年收费结点后一周的预约推迟至5月16日和11月16日开始预约）。

（2）取消预约或更改使用时间，必须提前至少2小时通知管理员，否则将收取已经预约的机时费。

（3）当某仪器使用高峰时，会限制每个课题组的预约次数和使用机时（通常最多8小时/周/组），尽量实现公平、合理使用；当仪器需要维护或维修时，管理员会尽早通知预约使用人。

附件3:

生物成像中心违规处理办法

对违反中心管理规定未造成不良后果的用户，每次违反规定，会通知劝告；以课题组为单位年度累计3次者，中心约谈相关责任人；年度累计6次者，约谈并正式通知课题组PI，课题组实验人员再培训；累计10次以上者，该课题组实验限制使用机时一周~一月不等。

对违反中心规定，造成不良后果但不严重的用户1次者通知课题组PI，再培训，2次者视情节暂停其使用权1周~1月不等，加强培训；对违反中心规定，造成不良后果但不严重的用户3次者，或造成严重后果的用户1次者，通知课题组PI，加强培训，暂停其使用权（时间视其认识态度和培训结果，最少为1个半月）。

对课题组建立诚信记录档案，诚信度差（屡次违反中心规定、不按规定致谢、拖欠机时费等）的课题组或单位采取降低优先级、暂停技术服务、直至拒绝技术服务的措施。

如违反文章致谢规定，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的技术服务申请。对于出现两次及以上恶意用户，生物成像中心将该用户所在单位列为诚信度差用户，该单位其他课题组或个人在生物成像中心的技术服务也将受到一定影响。

用户在实验完成后无故不缴纳或恶意拖欠机时费的课题组将视情况降低使用优先级、暂停技术服务、拒绝技术服务等惩罚。

注：上述情况将使用分数扣减的方式进行记录。年度末根据剩余分数和违规情况，确定当年的诚信等级（优、良、中、差）。

诚信记录表

时间	课题组	人员	违规事项	措施	累计次数	本次扣分	剩余分数

减分标准（满分50分，每一年度为一周期）：

1. 未造成不良后果或影响，每人减1分。
2. 造成一定影响和后果，但未造成损失，每人减3分。
3. 造成严重后果，造成损失，单不严重，每人减10分。
4. 屡次或故意违规，造成严重后果和损失，每人减25分。

附件4:

生物成像中心对外技术服务类别

中国科学院生物物理研究所生物成像中心针对不同的用户，不同的技术方法需求，提供不同层次的技术服务。包括：合作研究服务、日常技术服务、以及仪器使用服务。

第一层次：合作研究服务

合作研究服务的宗旨是基于用户的科研需求和成像中心自身方法学创新研究，成像中心与用户合作致力于开发和利用新技术来解决某些重大的科学问题。

一、合作研究的方式

目前主要有两种合作研究的方式：第一种方式，用户基于成像中心现有的方法学研究项目与成像中心共同合作在发展新方法的同时用于解决一些重大课题；第二种方式，创新型合作研究——用户可以针对自身的课题需要提出一些具有前瞻性、挑战性的技术需求，成像中心可以组织人员与课题组共同开发这项新技术用于解决重大的科学问题。

（一）基于成像中心现有方法学研究项目开展的合作研究服务

生物成像中心开展了多种先进的显微成像相关技术的方法学研究，用户可参与到感兴趣的项目中，与成像中心共同在发展技术的同时解决自己的课题需求。目前正在开展的项目包括：

1.透射电镜相位衬度增强技术——相位板系统研究

低温电镜图像衬度差、信噪比低对后期数据处理三维重构带来很大影响。对图像对齐、求取向等操作产生较大误差。相位板技术可有效提高正焦成像条件的衬度。

目前，项目研制了具有三维纳米精度定位相位板系统，得到的薄膜型相位板衬度成像的初步结果表明，相位板成像可以获得正焦条件下很高的图像衬度，可实现低温电镜的电子断层数据收集。

2.连续超薄切片扫描电镜成像方法研究

基于连续超薄切片扫描电镜成像方法可以对制备的连续超薄切片按照感兴趣的对象进行多次扫描成像，并且可以实现并行成像；同时在研究尺度上，可以达到1mm以上的尺度。

目前小型化改进版连续超薄切片自动化收集装置可实现稳定收集连续切片12000片，切片厚度60nm，切片面积约1*2mm²，并且切片基本没有褶皱问题。该项目正在利用该方法建立一套针对线虫的完整三维重构数据库。该方法可以用于脑组织等其他样品的大尺度三维重构。

3.基于高真空光学冷台的光电关联成像方法

光电关联显微成像技术（Correlative Light and Electron Microscopy CLEM）通过荧光显微成像对目标进行标记定位，然后再用电镜三维重构技术获取目标区域的更高分辨率的三维结构，最后，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。

目前，项目已经完成了高真空光学冷台的搭建，样品温度可以维持在液氮温度。同时，项目还设计了一款基于低温透射电镜(Tecnai 20)和倒置荧光显微镜(Olympus IX73)硬件坐标系统的光电关联定位软件，可以实现光电坐标与电镜坐标的精确匹配。

4.聚焦离子束法制备冷冻含水切片

低温电子断层成像三维重构（cryo-ET）技术可以得到接近天然状态的细胞内部高分辨率三维结构、蛋白质等大分子在细胞原位的定位和相互作用信息。细胞cryo-ET的传统样品制备方法为含水冷冻超薄切片，该技

术存在严重的压缩、振颤、皱缩、断裂以及载网附着能力差等缺点，并且技术难度大、成功率低。聚焦离子束可以加工冷冻至玻璃态的生物样品，并且没有重结晶现象出现，是一种更好地制备生物样品含水冷冻超薄切片的方法。

目前，项目更新设计和制作了冷冻样品转移和支持装置，并建立了一套较成熟的，从样品快速冷冻、冷冻样品转移至双束SEM腔室、FIB 减薄加工、冷冻含水超薄切片转移至低温电镜到低温电子断层三维成像的技术流程，成功完成了基于聚焦离子束技术的生物样品含水冷冻超薄切片的制备和成像，可观察到细胞内部的亚细胞结构。

5.低温透射电镜高分辨率成像用支持膜的研发

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。作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。目前，GiG载网上覆盖的碳微阵列支持膜有孔径为2 μm ，孔间距2 μm （2/2）；孔径为2 μm ，孔间距1 μm （2/1）；孔径为1 μm ，孔间距1 μm （1/1）等多种规格，并继续针对其微阵列孔径/孔间距尺寸，支持膜厚度、制材（增强导电能力）、表面修饰基团以及亲水性能继续进行优化。目标是针对不同尺寸/性质的样品制备出适合其制作冷冻样品的载网，提高制作适合高分辨数据收集的冷冻样品的成功率。

6.新型生物电镜染色剂的开发与研制

电子染色(electron stain)是绝大多数生物电镜中不可或缺的重要步骤，一般来说，生物样品都是由碳、氢、氧、氮等轻元素组成，不具有很好的电子散射能力，在电镜下很难有良好的反差，不利于超微结构的辨识和成像。一些特定的组织结构也依赖于良好的固定和染色才能凸显。因此，在进行生物电镜观察时，通常用醋酸双氧铀进行染色。然而铀盐具有一定的放射性，不利于环境和健康，我国目前也已对其进行了进口控制，因此我们开发研制无放射性、价钱低廉、使用方便的新型生物电镜染色剂，来取代醋酸双氧铀，应用于超薄切片染色观察、扫描电镜观察和透射电镜的负染色观察。

目前已经开发和合成了几种新型染色剂，在超薄切片染色、扫描电镜染色（块染色）和负染色方面取得良好效果。

7.快速冷冻替代

现在的冷冻替代周期比较长。此项目旨在研制一种能够适用于Leica EM AFS2冷冻替代仪的快速冷冻替代装置，建立起适应于多种样品快速冷冻替代的实验方法。此快速冷冻替代装置，利用冷冻替代仪精确控制条件，并通过微型“摇床”加速冷冻替代过程，节约了资源，提高了效率，大大促进相关科研工作的快速开展。

目前，项目已经初步设计并完成了快速冷冻替代装置，经测试，该装置在Leica EM AFS2的低温样品室内运行良好。

（二）创新型合作研究服务

用户针对自身的课题需要提出比较具有前瞻性、挑战性的创新型技术需求，成像中心可以利用资源和技术人员优势，组织相关人员与课题组共同开发此项新技术，用于解决重大的科学问题。

二、合作研究服务的流程

合作研究服务需要用户提前准备好申请书（详见成像中心网站管理规定<http://cbi.ibp.ac.cn>），详细列明课题的研究背景、进展阶段、要解决的科学问题、以及预期目标等方面。申请书将会提交到生物成像中心专家咨询委员会进行审批。每年合作研究服务的名额有限。如果审批通过，课题组和生物成像中心会进一步洽谈具体的合作细节等问题，并签订正式的合作协议，以及根据需要签订相应的保密协议。协议签订后将立刻组织人员开展合作。

第二层次：日常技术服务

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。其中样品制备具体开展的技术服务项目包括：化学固定方法、高压冷冻冷冻替代方法、低温包埋免疫标记方法、包埋前免疫标记方法、冷冻切片免疫标记（Tokuyasu）方法、冷冻含水切片方法（CEMOVIS）、临界点干燥方法，以及光电关联的样品制备等等。

此服务项目同样需要用户提前递交各类相关技术服务的申请书（详见成像中心网站管理规定<http://cbi.ibp.ac.cn>）。申请书中需详细列明样品来源，需要的技术服务种类，预期达到的目标，以及期望的实验周期等内容。成像中心将针对用户的申请，安排特定的工程师根据用户的需求完成从样品制备到后期图像的采集及处理整个实验过程。

第三层次：仪器使用服务

这一层次的服务对象主要针对的是可以独立操作仪器（诸如spirit透射电镜、T20透射电镜、超薄切片机、高压冷冻仪等）的用户。实验前用户无需填写申请书，只需自己在网上预约机时即可。成像中心负责保证每台仪器正常运转，实时解决难题。

附件5:

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半年~两年在生物成像中心的仪器使用权。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课题组列入服务黑名单。

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！