

СРАВНЕНИЕ МЕТОДОВ 3D-РЕКОНСТРУКЦИИ В ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ БИОМАТЕРИАЛОВ

Томохиро Харута, JEOL Ltd.

УДК 620.187

ПЭМ-томография широко применяется для трехмерного (3D) анализа тонких структур. Благодаря усовершенствованным компьютерам и растровым электронным микроскопам внимание многих исследователей сегодня обращено на новые методы 3D-анализа структур с помощью РЭМ, ФИП-РЭМ, Serial Block-Face РЭМ (SBF-SEM) и томографию матричным методом (Array tomography). Эти методы подходят для исследований биологических образцов, так как наблюдаемая область в этих случаях гораздо шире по сравнению с ПЭМ-томографией. Каждый метод имеет свои преимущества и недостатки, однако их сравнительных исследований на одном и том же образце проведено немного. Представлены результаты реконструкции 3D-структуры одного образца (*Escherichia coli* и фаги) методами ФИП-РЭМ, SBF-SEM, томографией матричным методом и ПЭМ-томографией, проведен сравнительный анализ, отмечены их преимущества и недостатки.

ВВЕДЕНИЕ

Для понимания функционирования клеток и тканей важно знать пространственную структуру и расположение органелл и белковых комплексов, которые являются компонентами клеток. Эта информация играет важную роль не только в академических исследованиях, но и в разработке методов лечения смертельных заболеваний. Прежде для наблюдения 3D-строения этих наноструктур использовалась ПЭМ-томография. В этом методе делают микроснимки с последовательным наклоном образца и реконструируют 3D-изображение путем обратного проецирования полученной серии изображений. ПЭМ-томография позволяет получать 3D-изображения в высоком разрешении, но имеет ограничения по толщине образца, определяемые прохождением электронного луча. Таким образом, трудно получить 3D-изображение целых клеток или тканей с помощью ПЭМ-томографии. Современная гистология и клеточная биология тесно связаны с молекулярной биологией, и поэтому важно выявить влияние морфологии и расположения наноструктур на ткани и целые клетки. По этой причине были разработаны новые методы микроскопических исследований, которые позволяют наблюдать большую область, в которой видны целые клетки или ткани, и могут поддерживать высокое разрешение изображения органелл и белковых комплексов. Объектами данного исследования являются три новых

метода 3D-наблюдения: ФИП-РЭМ, SBF-SEM и томография матричным методом [1, 2, 3] (рис. 1).

ФИП-РЭМ представляет собой РЭМ с колонной фокусированного ионного пучка (ФИП). Образец травится ФИП в камере образцов, и стравленную поверхность можно наблюдать при помощи РЭМ. ФИП редко применяется в биологии, но пользуется популярностью в материаловедении. Дело в том, что используемые в материаловедении образцы (металлы, керамика и т. д.) слишком трудно резать алмазным ножом, но на них можно сделать тонкий срез или создать новую открытую поверхность травлением с помощью ФИП. Для наблюдения за 3D-структурой через ФИП-РЭМ травится поверхность образца и наблюдают изображение в обратно-рассеянных электронах новой вскрытой поверхности через РЭМ, после чего процесс травления и наблюдения повторяется. Наконец можно восстановить 3D-структуру наложением серии последовательных изображений [1]. Преимущества ФИП-РЭМ - высокоточное определение участков травления и подготовка тонких срезов на твердых образцах, таких как кости и металлы. Недостатки: малая зона наблюдения и низкая скорость травления.

При использовании SBF-SEM применяется РЭМ с механизмом для резки алмазным ножом непосредственно в камере образцов. Чтобы восстановить 3D-изображение, поверхность образца срезается алмазным ножом,

а новая вскрытая поверхность наблюдается в РЭМ. 3D-изображения реконструируются наложением серии снимков после последовательных резов, так же, как и ФИП-РЭМ [2]. Преимуществами SBF-SEM - высокая скорость и широкая область наблюдений, так как образцы режут алмазным ножом. С другой стороны, SBF-SEM нуждается в специальном способе приготовления образцов (например, метод NCMIR), так как они должны иметь высокую электронную проводимость и сильное контрастирование тяжелыми металлами [3]. Сохранность наноструктур образцов, приготовленных таким образом, ниже, чем у подготовленных к ПЭМ обычным способом. Хотя, благодаря особому способу приготовления проводимость образца увеличивается и в некоторых случаях он может накапливать заряд.

При томографии матричным методом сначала с помощью ультрамикротомы приготавливается серия ультратонких срезов образца, затем они монтируются на проводящие пластины, выполненные, например, из кремния. Каждый срез из серии наблюдается в РЭМ, после чего изображения располагаются по порядку и реконструируются в 3D [4]. Преимущества этого метода таковы: предотвращение заряда очень тонких образцов, установленных на проводящие пластины, низкая начальная стоимость, поскольку для этого метода требуются только обычный РЭМ и ультрамикротом, и возможность использования

качественных образцов, приготовленных обычными методами пробоподготовки для ПЭМ. Недостаток этого метода заключается в том, что он требует специальных навыков, например, при подготовке серий последовательных срезов.

Сравнительный анализ особенностей и индивидуальные характеристики этих трех методов 3D-реконструкции с помощью РЭМ практически отсутствует, так как они в значительной степени основаны на аналогичных принципах. Все три метода позволяют делать серии срезов и наблюдать за новыми поверхностями. Проведено исследование 3D-структур одного образца с использованием перечисленных методов и сопоставлены результаты. Выделены особенности этих методов с указанием подходящих образцов и методов анализа. Кроме того, проанализированы некоторые образцы с помощью подходящих методов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве образца мы использовали Escherichia coli, инфицированную T4-фагом, λ-фагом и φ174-фагом. Фаги являются разновидностями вирусов, поражающих бактерии. Их размер составляет не более 200 нм, так что наблюдать их морфологию без использования электронного микроскопа невозможно (рис. 2 а-с).

Когда фаги прикрепляются к Escherichia coli, они вводят в нее свой геном в виде ДНК или РНК. Заражающие фаги

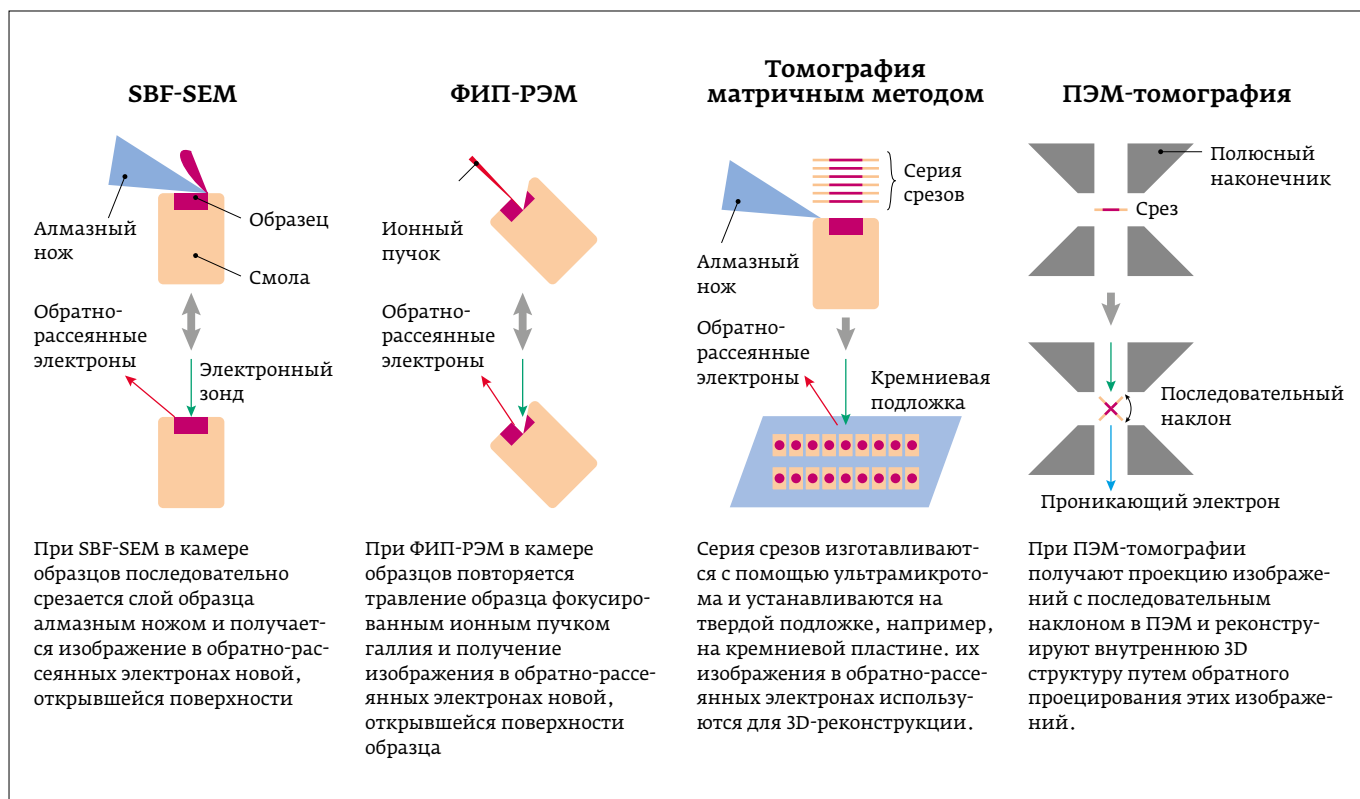


Рис.1. Схема методов 3D-реконструкции.

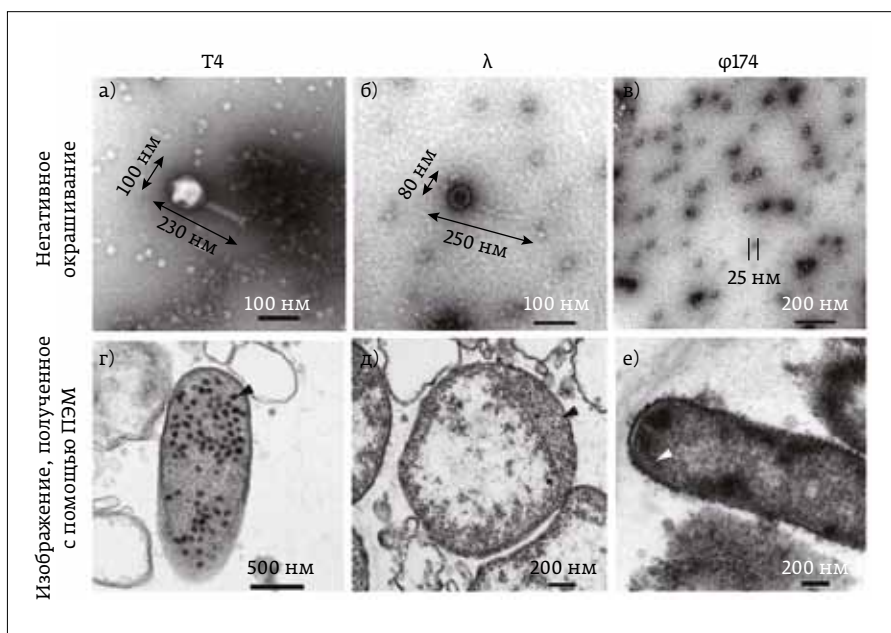


Рис.2. Изображения фагов, полученные с помощью ПЭМ. Негативно окрашенные изображения фага (а-с) и размножения в *Escherichia coli* (d-f, стрелки).

захватывают системы транскрипции, трансляции и репликации клеток-хозяев и размножаются в них. На этом этапе можно наблюдать размножение фагов в *Escherichia coli* (рис. 2 d–f). Когда в клетке-хозяине образуется достаточное количество фагов, они выходят из нее. Эти новые образовавшиеся фаги прикрепляются к другим клеткам и заражают их.

Сначала положили мягкий LB агар, содержащий *Escherichia coli*, на твердый LB агар. При попадании раствора, содержащего фаги, на этот агар, фаги инфицировали *Escherichia coli*. Удалось определить область фагов, инфицированную *Escherichia coli* в виде бляшек после инкубации агара и получить инфицированную *Escherichia coli* путем изъятия этих бляшек.

Образцы для ПЭМ-томографии и томографии матричным методом были предварительно обработаны 2,5% глутаральдегидом в 0,1 М какодилате натрия (pH 7,2) и постобработаны 1% OsO₄ в 0,1 М какодилате натрия (pH 7,2). Обработанные образцы были помещены в эпоксидную смолу. Эти образцы были нарезаны ультрамикротомом на тонкие срезы и установлены на кремниевые пластины для томографии матричным методом. Тонкие срезы были окрашены ацетатом уранила и лимоннокислым свинцом.

Для ФИП-РЭМ и SBF-SEM применили метод NCMIR для насыщенного окрашивания тяжелыми металлами [3]. С ФИП-РЭМ также можно использовать образцы, приготовленные обычным способом, но в настоящем исследовании применили метод NCMIR для получения изображения с более высоким контрастом. После фиксации и окрашивания образцы были помещены в эпоксидную

смолу. Условия наблюдения приведены в таблице 1.

Изображения серийных срезов, полученные методами ФИП-РЭМ, SBF-SEM и при помощи томографии матричным методом были выровнены по Fiji [5], а 3D-изображения реконструировали с помощью укладчика (System In Frontier Inc. Japan). ПЭМ-томография использовалась для снимков с последовательным наклоном изображения и 3D-реконструкции. Полученные 3D-изображения были сегментированы и проанализированы с помощью Colorist (System In Frontier Inc. Japan).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнение методов 3D-реконструкции с использованием

электронного микроскопа

Получены плоские изображения с помощью ФИП-РЭМ, SBF-SEM (изображения в обратно-рассеянных электронах поверхности объемного образца, ускоряющее напряжение составляло 1,0 кВ и 3,0 кВ соответственно), томографии матричным методом (изображения в обратно-рассеянных электронах тонкого среза образца, установленного на кремниевой подложке, ускоряющее напряжение составляло 7,0 кВ) и ПЭМ-томографии (проецированное изображение тонкого среза образца, без поворота, ускоряющее напряжение составляло 120 кВ). Результаты наблюдений поверхности объемного образца посредством ФИП-РЭМ и SBF-SEM уступали результатам наблюдений тонкого среза из томографии матричным методом и ПЭМ-томографии в резкости изображения (рис. 3). В этих образцах большая часть области наблюдения была покрыта смолой с низкой проводимостью и регистрацию проводили с низким ускоряющим напряжением для предотвращения накопления заряда. Качество единичных изображений, полученных при томографии матричным методом и ПЭМ-томографии идентичны. Такой результат предполагает, что улучшение проводимости образцов и наблюдение при повышенном ускоряющем напряжении являются важными факторами для 3D-структурного наблюдения биологических образцов в РЭМ (рис. 3). Кроме того, качество изображений, полученных при использовании ФИП-РЭМ и SBF-SEM, ниже по сравнению с другими двумя методами, однако они сохраняли разделение при наблюдении фаговых частиц.

Таблица 1. Условия наблюдения методов 3D-наблюдения.

	SBF-SEM	ФИП-РЭМ	Томография матричным методом	ПЭМ-томография
Инструмент	JSM-7800F с Gatan 3View 2XP	JIB-4610F	JSM-7800F	JEM-1400Plus
Исследованная зона (X, Y)	24 × 24 мкм ²	18 × 24 мкм ²	19 × 24 мкм ²	3,5 × 3,5 мкм ²
Исследованная глубина (Z)	7,5 мкм (изображение 50 нм × 150)	10,8 мкм (изображение 20 нм × 543)	1,4 мкм (изображение 70 нм × 20)	200 нм
Размер пикселя (X, Y)	3 нм	9,4 нм	4,7 нм	1,72 нм
Размер пикселя (Z)	50 нм	20 нм	70 нм	1,72 нм
Количество пикселей	8192 × 8192	1920 × 2560	3840 × 5120	2048 × 2048
Ускоряющее напряжение	1,0 кВ	3,0 кВ	7,0 кВ	120 кВ
Время исследования	2,5 ч	48 ч	4 ч	1 ч

Далее сравним результаты 3D-реконструкции. При использовании ПЭМ-томографии толщина среза (200 нм) меньше диаметра *Escherichia coli* (около 2 мкм), так что целое изображение одной бактерии *Escherichia coli* не может быть реконструировано в 3D (рис. 4 г). С другой стороны, ФИП-РЭМ и SBF-SEM показали успешные результаты в 3D наблюдении большого объема (рис. 4 а, б). При использовании томографии матричным методом область наблюдения плоскости XY сравнима с областями наблюдения в методах SBF и ФИП-РЭМ. Однако, плотность наблюдаемого объема была снижена, так как для данного исследо-

вания было приготовлено только 20 срезов (рис. 4 в). Хотя это требует высоких навыков и много времени, возможно увеличить плотность 3D-реконструкции изображения путем приготовления большего количества более тонких срезов и увеличения числа микроснимков. В результате извлечения одной бактерии и сегментации фагов, содержащихся в этой бактерии, а также внеклеточной мембраны, удалось визуализировать строение *Escherichia coli* и 3D-расположение фагов всеми способами, хотя имеются различия в пространственном разрешении (рис. 4 д-з). При фокусировании на одной вирусной частице, форма фага



Рис.3. Сравнение области наблюдения и качества изображения для каждого метода.

Таблица 2. Краткое описание особенностей 3D-структурного анализа с помощью электронной микроскопии

	SBF-SEM	ФИП-РЭМ	Томография матричным методом	ПЭМ-томография "антенных решеток"
Поле зрения (X, Y)	100 мкм свыше	1 ~ 100 мкм	100 мкм свыше	5 мкм меньше
Глубина зрения (Z)	Очень глубокое	Глубокое	Узкое	Очень узкое
3D разрешение (Z)	50 нм	20 нм	70 нм	1 нм
Время получения модели	Несколько десятков часов	Несколько дней	Несколько дней	1–2 часа
Усилия для обнаружения	Небольшие	Небольшие	Огромные	Небольшие
Оптимальные образцы	Ткани, мозг	Ткани, культивируемые клетки	Ткани, эмбрион, культивируемые клетки	Органеллы, Вирус
Оптимальное применение	Коннектом. Исчерпывающий анализ	Морфологические наблюдения, количественный анализ	Количественный анализ, Корреляционная свето-электронная микроскопия	Морфологические наблюдения

вытягивается в направлении Z в методах SBF-SEM и томографии матричным методом, поскольку разрешение по оси Z недостаточно для размера фагов (рис. 4 и, л). При использовании ФИП-РЭМ, хотя фаг был реконструирован в форме шара, детали при его 3D-реконструкции были утрачены по сравнению с результатами ПЭМ-томографии (рис. 4 к, м). Учитывая результаты сравнений, обнаружено, что количественный анализ морфологии *Escherichia coli* и анализ распределения фагов в бактерии можно осуществить любым методом 3D-реконструкции в РЭМ, а ПЭМ-томография обеспечивает высокое пространственное разрешение, необходимое для наблюдения за такой наноструктурой, как фаги. Очень похожие результаты получены с SBF-SEM и ФИП-РЭМ, которые имеют общую основу нарезки и наблюдения объемных образцов в камерах для образцов. Почти одинаковые объемы получены в этом исследовании для SBF-SEM и ФИП-РЭМ, но для SBF-SEM потребовалось примерно в 20 раз меньше времени (2,5 ч), чем для FIB-SEM (48 ч) (табл. 1). Однако, с помощью ФИП-РЭМ получено реконструированное изображение 3D-структуры с более высоким разрешением по Z, чем при применении SBF-SEM. Причина в разной толщине среза: 20 нм для ФИП-РЭМ и 50 нм для SBF-SEM.

Эти результаты обобщены в таблице 2. Качество изображения при применении SBF-SEM хуже, чем у других методов, однако SBF-SEM отличается непревзойденно широким полем и скоростью наблюдения. Кроме того, качество изображения образцов с высокой проводимостью может быть улучшено при повышении ускоряющего напряжения. Из-за этих особенностей SBF-SEM подходит для очень крупных образцов с высокой проводимостью и для всестороннего анализа. Например, образцы тканей отличаются большим размером, малой областью смолы и высокой проводимостью. Так же для изучения коннектома необходим всесторонний анализ.

При ФИП-РЭМ требуется больше времени для исследования по сравнению с SBF-SEM, однако преимуществом ФИП-РЭМ является очень высокое разрешение по оси Z. Однако этот метод подходит только для узкого поля наблюдения. ФИП-РЭМ подходит для маленьких образцов, например, небольших тканей или одной целой клетки. ФИП-РЭМ удобен для количественного анализа, так как для высокой квантитативности требуется высокое разрешение. Кроме того, с помощью этого метода можно резать кости и металлы, что обеспечивает 3D анализ твердых тканей и контактной области между металлами и тканями.

При томографии матричным методом образцы сохраняются и после наблюдения; между тем, для увеличения наблюдаемой глубины требуются развитые методы получения серий срезов и долгое время исследования. Томография матричным методом подходит для детального анализа редких явлений в большой зоне наблюдения. Ожидалось, что прозрачный субстрат, например, стекло, позволит использовать различные корреляционные методы, включая корреляцию световой и электронной микроскопии (CLEM). Томография матричным методом эффективна для наблюдения за отдельными клетками, бактериями и эмбрионами, которые имеют низкую проводимость, в окруженных смолой образцах, так как образцы представляют собой тонкие срезы, уложенные на проводящую подложку, заряд стекает, что позволяет использовать высокое ускоряющее напряжение.

Анализ 3D реконструкции изображения

1. Связь морфологии *Escherichia coli*, которая инфицирована T4 фагами и внутренних частиц фагов

SBF-SEM было достаточно для анализа морфологии кишечной палочки и распределение T4 фагов. Была проанализирована взаимосвязь морфологии *Escherichia coli* и внутренних фагов, используя результаты SBF-SEM. Сна-

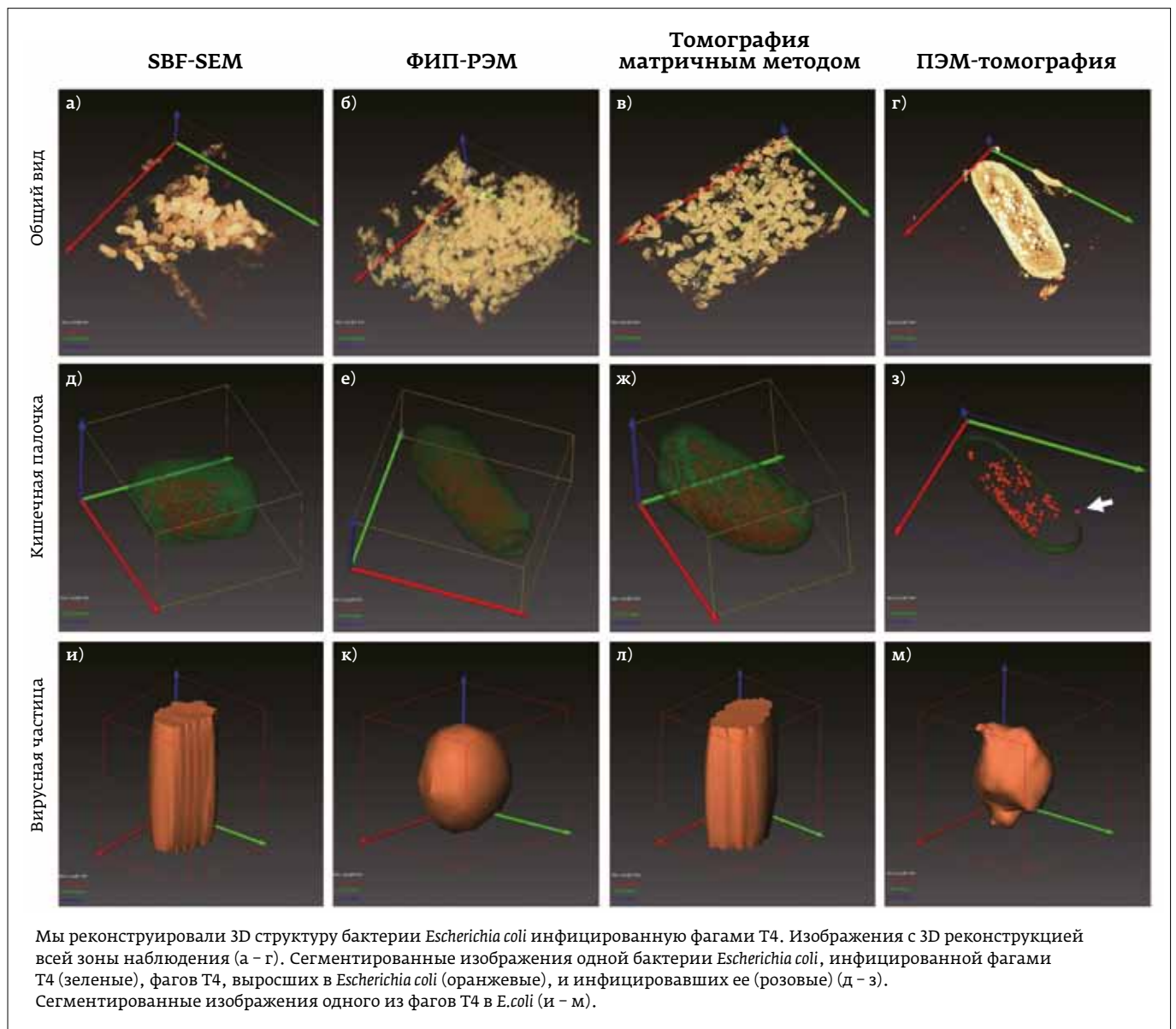


Рис.4. Сравнение результатов 3D-реконструкции.

чала исследовали взаимосвязь между объемом кишечной палочки и количеством фагов (рис. 5а). Результаты показывают, что максимальное число внутренних фагов в *Escherichia coli* составляет около 280 частиц. Бактерий *Escherichia coli*, содержащих большее количество фаговых частиц, не наблюдалось. Мы считаем, что дальнейший рост количества фаговых частиц приводит к разрыву *Escherichia coli*. Рост количества содержащихся фаговых частиц обычно приводит к росту и объема *Escherichia coli*. Однако эта зависимость не линейная: разница в количестве фаговых частиц наблюдалась даже при одинаковом объеме *Escherichia coli* (В и С, D, Е на рис. 5 а). Поэтому мы выбрали характерную *Escherichia coli* (А-Е на рис. 5 а, с). Были выбраны следующие группы клеток *Escherichia coli*.

В первой группе были клетки малого объема с небольшим количеством фаговых частиц (А, В на рис. 5 а, с). Клетки во второй группе тоже имели малый объем, но в них было много фаговых частиц (С-Е на рис. 5 а, с). Клетки третьей группы имели большой объем и содержали большое количество фаговых частиц (F на рис. 5 а, с). Клетки *Escherichia coli* были разделены на три зоны в направлении длинной оси, центральная зона, боковая зона и промежуточная зона. Мы проанализировали локализацию фаговых частиц T4 (рис. 5b). Большинство фаговых частиц локализованы в центральной зоне, если фаговых частиц мало. По мере роста количества фаговые частицы из центральной зоны перемещались через промежуточную зону к боковой. Более того, по мере увеличения объема *Escherichia coli*, наблюда-

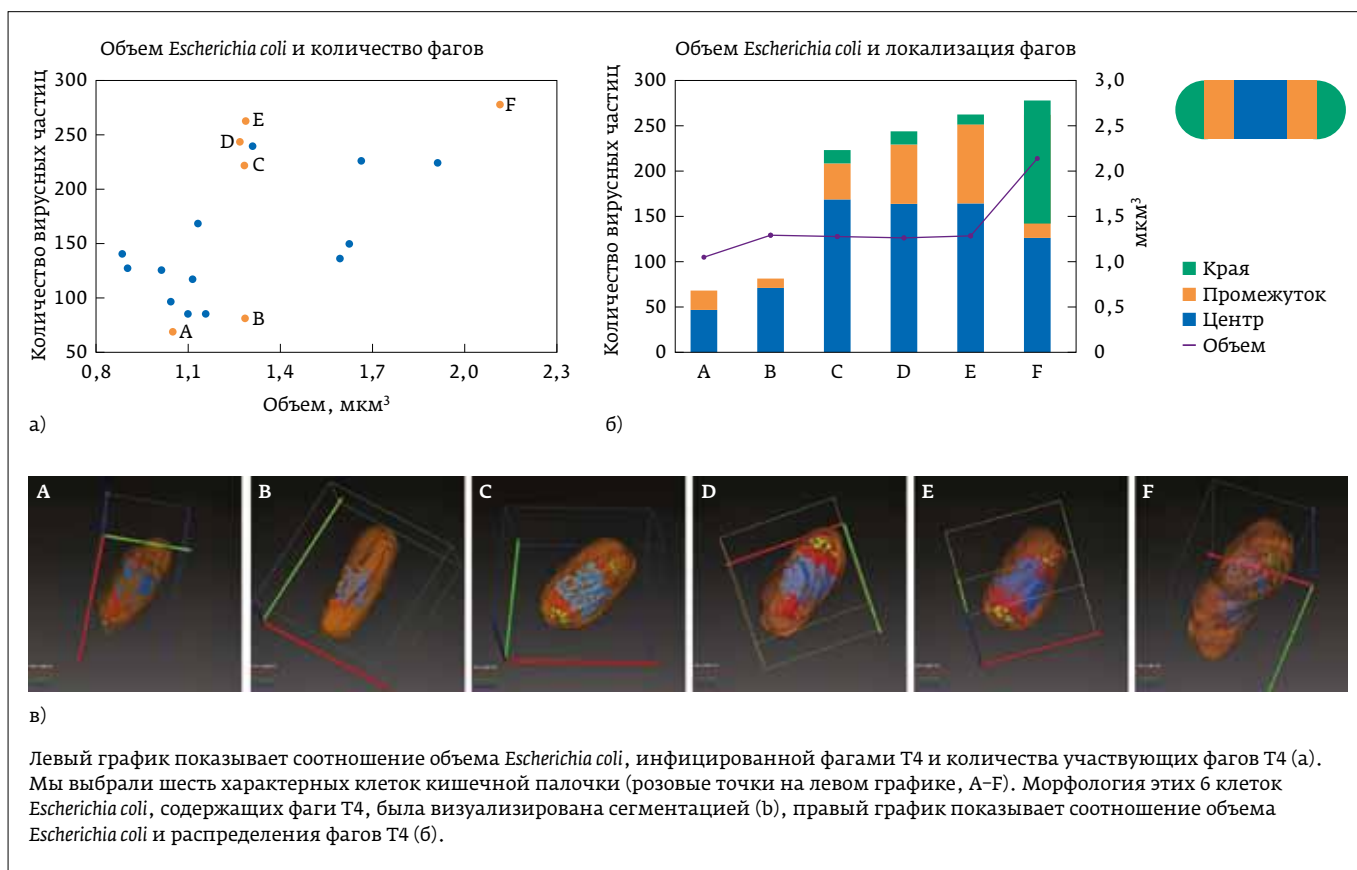


Рис.5. Отношение морфологии *Escherichia coli* и участвующих фагов.

лось значительное уменьшение количества фаговых частиц в центральной зоне, а их количество в боковой зоне увеличивалось. Далее мы сосредоточились на форме кишечной палочки. Клетки *Escherichia coli* с малым количеством фаговых частиц T4 имели форму стержня (рис. 5 с В). При увеличении количества внутренних фаговых частиц T4, клетки *Escherichia coli* расширялись по малой оси и приобретали бочкообразную форму (рис. 5 с С-Е).

2. Взаимосвязь между типом фагов и их распределением в клетке *Escherichia coli*

Фаги T4 можно обнаружить при любом 3D анализе структуры с применением РЭМ, так как они заметно контрастируют в *Escherichia coli*. А вот фаги λ и φ174 обнаружить в *Escherichia coli* было сложно из-за слабого контраста с *Escherichia coli* и слишком малого размера фагов φ174 (рис. 2 е, с, ф). По этой причине сравнение между *Escherichia coli*, инфицированной фагом T4, фагом λ и фагом φ174 проводилось с помощью 3D-реконструкции изображения томографией матричным методом. Сначала мы проанализировали морфологию *Escherichia coli*. Форма *Escherichia coli*, инфицированной фагом λ, изменилась со стержнеобразной на шарообразную. Мы разделили *Escherichia coli*, инфицированную фагами, на три слоя: внутренний, сред-

ний и наружный, и рассмотрели, какие фаги были сосредоточены в каждом слое (рис. 6 а). Результаты показали, что фаги T4 и φ174 были рассеяны в *Escherichia coli* без смещения, однако почти все частицы фагов φ были сосредоточены в наружном слое. Фаги T4 и φ174 являются литическими бактериофагами. С момента инфицирования *Escherichia coli* фагами, они начинают размножаться в хозяйских клетках, что приводит к разрыву (лизису) хозяйских клеток. С другой стороны, фаг λ является умеренным бактериофагом. При инфицировании *Escherichia coli*, когда фаги этого типа вводят свой геном в хозяйские клетки, лизис не происходит сразу же. После инфицирования ведут себя как часть хозяйской клетки (лизогенизация). Однако после блокировки активности репрессора, подавляющего распространение фагов, в результате изменения окружающей среды, фаги начинают размножаться, что приводит к лизису хозяйской клетки. Разница в наблюдаемых морфологических изменениях и локализации фагов может происходить из области размножения, литические бактериофаги немедленно начинают размножаться в инфицированной области, в то время как умеренные бактериофаги размножаются через геном хозяйской клетки. Фаги φ174 не проявляют равномерного распределения в трех слоях, но локализуются в определенной части (рис. 6 d). В ходе этого эксперимента

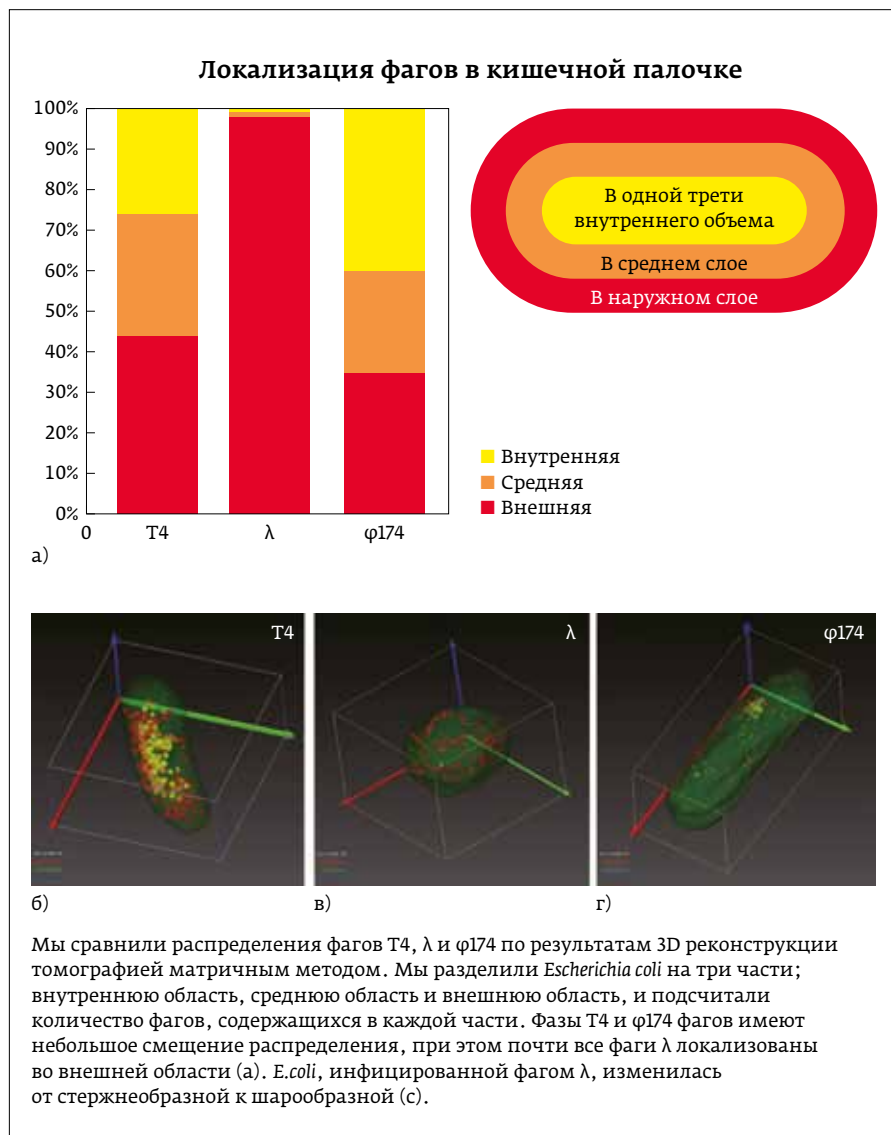


Рис. 6. 3D-распределение фагов в *Escherichia coli*.

мы не смогли идентифицировать первое инфицированное место, но место локализации может быть связано с инфицированием.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У каждого метода 3D-реконструкции с применением РЭМ есть свои достоинства и недостатки, которые зависят от метода пробоподготовки и условий исследований, например, ускоряющего напряжения. При применении SBF-SEM и ФИП-РЭМ набор данных осуществляется автоматически, с другой стороны, анализ после сегментации часто выполняется вручную. Сегментация с выделением рассматриваемых тканей и областей часто выполняется на основе контрастности изображения. Однако биологические образцы имеют небольшие различия в контрастности, и иногда сегментацию невозможно провести

на основе одной только контрастности. В качестве ориентира можно сегментировать морфологию, сохраняя высокое разрешение изображения, и, таким образом, она поможет повысить эффективность сегментации. Для SBF-SEM и ФИП-РЭМ необходимо использовать специальные инструменты, в то время как томография матричным методом может быть проведена с обычными РЭМ и ультрамикротомом, но при этом необходимы определенные навыки. Выбор правильного метода является важной стратегией эффективного проведения исследований. Мы надеемся, что данная работа поможет исследователям, которые планируют начать использовать 3D-анализ с помощью электронной микроскопии.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор хотел бы поблагодарить сотрудников JEOL, которые поддерживают данное исследование; Н. Nishioka за поддержку руководства исследования, М. Suga за поддержку исследования томографией матричным методом, Н. Matsushima за поддержку исследования ФИП-РЭМ, Y. Yamaguchi за полезные дискуссии и техническое руководство SBF-SEM, К. Hasumi за помощь с сегментацией. Автор также благодарен National Institute of Technology and Evaluation, National Institute of Advanced Industrial Science and

Technology за предоставление бактерий *Escherichia coli* и фагов.

ССЫЛКИ

1. Knott G, Marchman H, Wall D, Lich B. Serial section scanning electron microscopy of adult brain tissue using focused ion beam milling. *J Neurosci*. (2008).
2. Micheva KD, Smith SJ. Array tomography: a new tool for imaging the molecular architecture and ultrastructure of neural circuits. *Neuron*. (2007).
3. Deerinck, T. J. & Bushong, Eric & Thor, A & Ellisman, Mark. NCMIR methods for 3D EM: A new protocol for preparation of biological specimens for serial block face scanning electron microscopy. *Nat Center Microsc Imag Res*. 6–8. (2010).
4. Denk W, Horstmann H. Serial block-face scanning electron microscopy to reconstruct three-dimensional tissue nanostructure. *PLoS Biol*. (2004).
5. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*. (2012).