PIBB 生物化学与生物物理进展
Progress in Biochemistry and Biophysics
2020,47(10):1090~1096
www.pibb.ac.cn

辣根过氧化物酶标记与样品后染色联用在微观脑联结组学中的应用*

王圣雄[1,2] 陈贞强[3] 韩 华[4)**] 郭爱克[1,2,5,6,7)**]

([1]) 中国科学院生物物理研究所脑与认知科学国家重点实验室，北京 100101；[2)] 中国科学院大学，北京 100049；
[3)] 上海交通大学医学院附属瑞金医院卢湾分院，上海 200020；[4)] 中国科学院自动化研究所，北京 100190；
[5)] 中国科学院神经科学研究所神经科学国家重点实验室，中国科学院脑科学与智能技术卓越创新中心，上海 200031；
[6)] 上海脑科学与类脑研究中心，上海 201210；[7)] 中国科学院上海微系统与信息技术研究所，上海 200050）

摘要 三维电子显微成像（volume electron microscopy）是微观尺度脑联结组学（micro-brain connectomics）研究的主要研究手段. 自动卷带式连续超薄切片-收片系统（automated tape-collecting ultramicrotome，ATUM）及扫描电镜序列成像系统的联合应用，是三维电镜成像中一种重要的技术手段. 该方法利用卷带式收集超薄切片，形成完整的样品切片库，进而在后续成像中形成样品三维电镜成像数据库. 根据ATUM系统镜外切片-收片、保留样本切片库等特点，对相应的生物样品制备方法进行改进，包括树脂配方及树脂渗透方式改良，神经元细胞膜辣根过氧化物酶（horseradish peroxidase，HRP）稀疏化标记与样本切片库后染色联用——从而很大程度上减少样品切片的褶皱率，并使得在整体高衬度的样品图像库中高效地识别神经元身份成为可能，最终获得符合脑联结组学所需的高质量成像数据.

关键词 脑联结组学，三维电子显微成像，样品制备
中图分类号 Q3，Q189 **DOI**：10.16476/j.pibb.2020.0011

微观尺度（纳米尺度）的神经网络研究最早始于20世纪80年代在线虫中完成的工作[1]，即利用电子显微镜的高分辨率，对脑组织样品进行精细成像，重构并分析相关神经网络的特点，以理解脑功能的结构学基础. 然而，受当时技术条件所限，难以完成对大规模数据的存储和分析，因此进展缓慢. 最近10年，基于电子显微学及计算机科学的巨大发展和进步，微观尺度的脑联结组学也有了蓬勃的发展，涌现了一批新型的技术和方法.

使用电子显微镜成像方法观察神经网络的联结方式，是微观尺度脑联结组学的“金标准”研究方法[2-3]. Jeff等[4]开发的自动卷带式连续超薄切片-收片系统及扫描电镜序列成像系统与Denk等[5]开发的样品表面原位连续切片成像系统以及聚焦离子束切片成像系统[6]、透射电镜阵列成像系统[3, 7-8]等，共同组成了目前微观尺度脑联结组学的主要研究方法. ATUM系统即在常规超薄切片机上安装一套卷带式自动收片的机械装置，随着超薄切片进程，靠近钻石切片刀的收集头通过卷带承载将水槽中的切片依次收集起来，形成一卷样品的连续超薄切片库. 随后将卷带依序粘贴于硅晶圆上，进而通过扫描电子显微成像，对感兴趣的样品区域进行自动序列成像，最终获得能够用于三维重构和网络分析的样品成像库.

ATUM相比于其他系统，具有成像范围大（可接受样品尺寸在百微米至数毫米级别）、保留样品切片库、可实现样品切片后处理及多次不同尺度成像等优点. 与此同时，由于其切片-收片处于非真空环境，如图1a所示，不仅要求切片方式具有较高的稳定性，而且大规模连续切片的收集（图1b）和保存（图1c）、扫描电镜序列成像（图1d）以及感兴趣区域的后处理和多次成像都对生物样品本身

* 中国科学院战略性先导科技专项(B类)(XDB32010100)资助项目.
** 通讯联系人.
Tel：021-54921785，E-mail：akguo@ion.ac.cn
收稿日期：2020-04-18，接受日期：2020-07-31

有很高的要求，因此也存在一系列的问题. 本文针对该方法存在的问题，以及其保留样品库的优势，以黑腹果蝇（*Drosophila melanogaster*）脑组织样品为例，提出了相应的解决和改进方法. 黑腹果蝇作为一种模式生物，是现阶段较为合适的脑联结组学的研究对象：一方面，黑腹果蝇具有较为丰富的行为模式，是脑功能及神经环路研究的合适研究对象；另一方面，与哺乳动物相比，黑腹果蝇脑的神经元数量少得多，是现阶段脑联结组学研究技术所能承受的尺度. 在研究果蝇视觉系统前景-背景分辨功能相关的一类LC神经元（lobulacolumnarneuron）的同时，为了获得更高质量的三维电镜数据组，我们改良了制样过程中使用的树脂配方和渗透方式，使样品更好地被树脂填充，以避免超薄切片时产生的样品褶皱；针对特异性生物学标记易被重金属染色掩蔽的特点，我们采用特异标记和样品后染色联用的方式，兼顾标记识别率和样品成像的整体衬度. 使用改进的样品制备方法，成功重构了感兴趣的神经元类群.

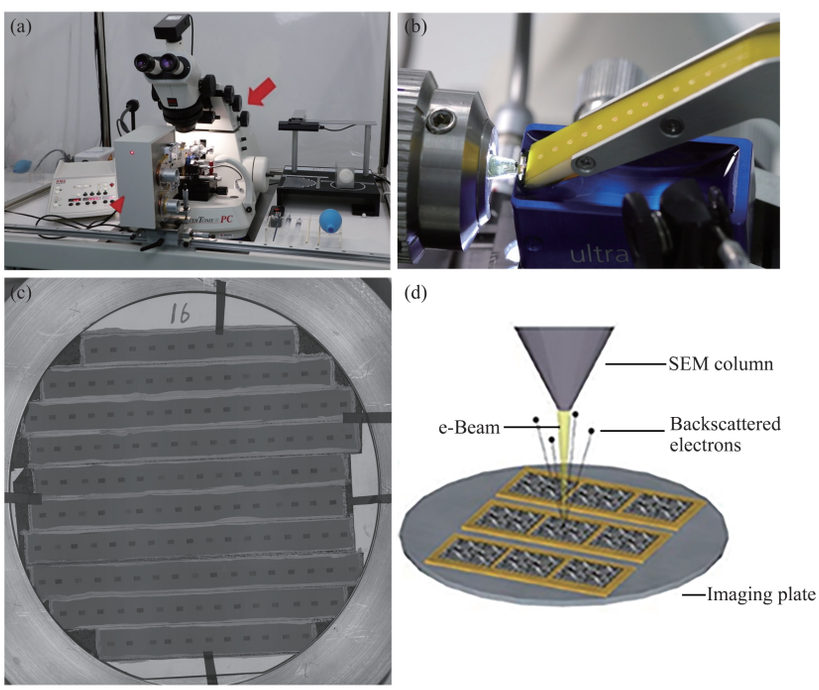


Fig. 1　ATUM system collecting serial sections and subsequent SEM array scanning

(a) ATUM system consisting of a UC-7 ultra-thin microtome (arrow) and an automated tape-collecting machine (arrow head). (b) The automated tape-collecting machine collects serial sections by rolling up the tape in the water boat while the ultra-thin microtome sectioning. (c) A silicon wafer loaded with tapes reserving sections sequentially. (d) SEM array scanning of sample sections to form a connectomic dataset (adapted from[9]).

1　材料与方法

1.1　动物与试剂

实验果蝇为出蛹后3～7日龄，其品系为LC-Gal4 > UAS-HRP-mCD8-GFP，实验流程符合国家及提供实验动物单位制订的有关实验动物福利的规则和制度.

试剂为25%戊二醛、16%多聚甲醛、磷酸氢钠、磷酸二氢钠、Tris-HCl晶体、二氨基联苯胺（DAB）、30%过氧化氢、低融点琼脂、柠檬酸铅（以上试剂购于Sigma Aldrich公司）；2%四氧化锇/四氧化锇晶体、醋酸铀、EPON812树脂套装（以上试剂购于EMS公司）；无水乙醇、纯丙酮.

1.2　样品制备流程

麻醉：将出蛹后3～7天的果蝇置于小管中，将小管置于冰上，对果蝇进行低温麻醉.

解剖：在含有2.5%戊二醛及2%多聚甲醛的0.1 mol/L磷酸缓冲液中进行果蝇脑的解剖，以保证组织及时固定.

预固定：4℃环境下，在上述固定液中将果蝇脑组织固定12 h. 低温条件下延长固定时间，能够保证较好的组织固定效果的同时，减少对细胞内容

物的抽提作用.

DAB反应：用0.1 mol/L磷酸缓冲液漂洗果蝇脑组织3次，10 min/次. 配制DAB溶液，即1 ml浓度0.1 mol/L、pH=7.4的Tris-HCl缓冲液中含有1 mg DAB、1 μl 30%过氧化氢溶液. 离心后加入上清液，4℃静置20 min. 随后置于室温15 min. DAB试剂通常比较难溶，因此需要选择溶解度较高的类型，比如其盐酸盐等.

后固定及染色：果蝇脑组织用缓冲液漂洗后，加入含有1%锇酸的0.1 mol/L磷酸缓冲液，4℃，2 h. 漂洗后加入2%醋酸铀溶液，4℃，12 h.

预包埋：用2%的低融点琼脂对果蝇脑组织样品进行预包埋，并按需求将包有组织的琼脂块切割成合适的大小及形状. 琼脂预包埋可以用来保护后固定后变脆的组织，且方便树脂包埋时组织位置及朝向的确定.

脱水及渗透：用50%、70%、90%的酒精溶液、45%酒精-45%丙酮的混合液、90%的丙酮溶液各1次及100%的丙酮溶液3次对脑组织进行梯度脱水，10 min/次. 用树脂：丙酮体积比为1∶3、1∶1、3∶1的梯度渗透液及纯树脂液对脑组织进行渗透，分别为4 h、4 h、12 h、4 h/梯度.

包埋及聚合：用平板包埋法将脑组织包埋于树脂中，在烘箱中37℃ 12 h、45℃ 12 h、60℃ 24 h进行梯度升温聚合.

切片及收片：使用ATUM系统对样品进行切片，并将连续切片收集于亲水化预处理的收集条带上，并将条带贴于4英寸硅晶片上.

后染色：用去除二氧化碳的双蒸水配制浓度0.2%的柠檬酸铅染液，并加入1～2滴10 mol/L氢氧化钠溶液，使柠檬酸铅染液从乳白色至澄清. 在低二氧化碳浓度的环境中对样品进行染色3～5 min，随后漂洗.

2　结　　果

2.1　样品切片褶皱问题的解决

样品超薄切片时常见的问题是切片在应力作用下产生褶皱. 在常规电镜成像中，由于仅需要以取样的方法获得小样本量数据，因此可以选取无褶皱区域进行观察. 在联结组学研究中，由于需要观察由数百甚至数千神经元构成的网络联结，因此需要对同一区域样品连续切片进行成像及后续神经元投射追踪、突触识别等重构工作. 样品切片褶皱产生的人工痕迹（artifacts）将严重影响数据质量及重构的准确性，甚至可能性[3]. 我们尝试了不同树脂配方，发现树脂聚合程度及树脂渗透情况对样品切片的褶皱情况存在显著影响，而预期有影响的树脂硬度实际对样品切片的褶皱情况影响很小.

使用镜外切片的方式收集样品，尘埃颗粒和样品褶皱是两大主要的人工痕迹来源. 前者可以通过提高环境洁净度加以改善，而后者在大数据图像库中，是较难控制和解决的问题，如图2a所示. 我们发现树脂的聚合程度及渗透情况对样品褶皱起到了重要影响——同样使用树脂供应方EMS公司推荐的medium硬度树脂，及更多的树脂渗透次数和时间条件下（树脂与丙酮混合渗透液从1∶2、2∶1比例渗透2次，4 h/次增加为1∶3、1∶1、3∶1比例渗透3次，分别为4 h、4 h、12 h/次），使用预配制并冻存的树脂（提前3～5天配制），其聚合程度较高，不利于树脂渗透填充样品内部空间，超薄切片时样品会产生严重褶皱，如图2 b；使用新鲜配置的树脂（当天配制），能更好地渗透填充样品，样品内部与外部材质更为均一，超薄切片时所受应力变化较小，样品能够保持平整，如图2 c. 在电镜下观察，也没有发现样品产生细小的褶皱，如图2 d. 另一方面，树脂硬度被认为是造成样品褶皱的因素之一，因此我们比较了不同硬度EPON812树脂对样品褶皱的影响，即在我们改进的树脂渗透方式下，使用EMS公司推荐的soft，medium，hard 3种配方树脂进行实验，如表1所示. 实验结果表明，对于果蝇脑组织样品，可接受的树脂软硬程度范围

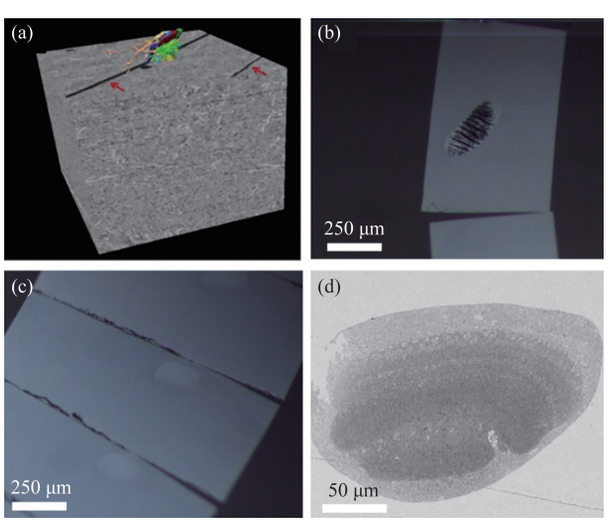


Fig. 2　Samples with and without folds while undergoing distinct preparation processes

(a) Folds (arrows) often seen in volume EM dataset[3]. (b) Folds on samples undergoing regular preparation process. (c) Flat samples prepared with modified process. (d) EM image of samples in (c).

Table 1　Volume ratio of components in Epon 812 resin

Resin hardness	Soft	Medium	Hard
Epon 812	1	1	1
DDSA	1.1	0.8	0.45
NMA	0.25	0.4	0.6

较大，在3组实验中样品均没有产生明显的褶皱（图3）. 因此，对于果蝇脑组织样品，树脂的渗透程度对于样品切片褶皱情况的影响远大于树脂硬度的影响.

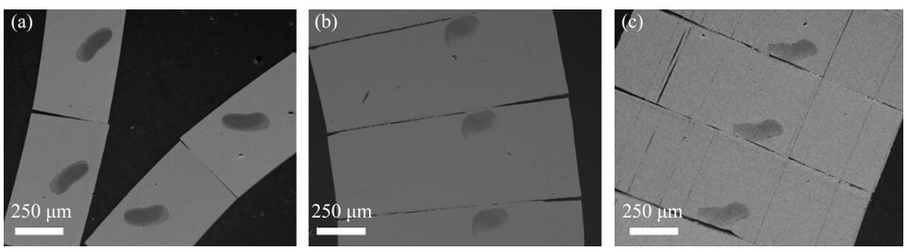


Fig. 3　Samples prepared with resins of distinct hardness

(a), (b) and (c) represent samples prepared with soft, medium and hard resins respectively.

2.2　辣根过氧化物酶标记及后染色方法联用在ATUM系统下的应用

辣根过氧化物酶标记是电镜成像中的常用生物学标记方法[10-12]. 在脑联结组学研究中，在感兴趣神经元细胞膜上表达辣根过氧化物酶，加入底物二氨基联苯胺（diaminobenzidine，DAB）及过氧化氢，完成HRP酶促反应，在细胞膜上沉积具有较高电子密度的产物，可在电镜成像数据组中用以标记相应神经元，以避免通过形态学方法在工作量极大的密集型重构工作中识别神经元身份. 微观尺度的脑联结组学通常使用双锇酸后固定及染色的样品制备方法，使膜结构整体衬度较高，便于神经元投射追踪和亚细胞结构的识别. 然而由于需要在电镜成像数据组中确认细胞膜加深标记，所以使用双锇酸方法将掩蔽标记信号. 在ATUM系统中，我们对具有特异性标记的样品连续切片进行一次成像，定位相应神经元. 通过样品切片的后染色等处理，可以进一步提高样品的整体衬度，并进行二次成像获得图像质量更高的电镜成像数据组. 通过两套数据组的比对，就能实现在高质量的数据组中定位感兴趣的神经元.

我们以黑腹果蝇脑组织样本为例，利用果蝇系统中的二元基因表达工具Gal4-UAS系统对视叶小叶区域的LC神经元细胞膜进行HRP标记，再如**1.2**中所述加入底物DAB及过氧化氢进行HRP酶促反应，呈现特异的深色着色，从而识别感兴趣的LC神经元类群（图4a，b）. 由于样品仅采用单锇染色，除被HRP标记的细胞膜外，其他细胞膜结构衬度较低，难以在后续的三维分析中被完整地重构（图4c）. 我们通过柠檬酸铅后染色的方法，对经过一次成像的样品进行染色，从而使细胞结构在二次成像时具有更高的衬度（图4d）. 比对一次成像和二次成像数据，即可在整体较高衬度的数据组中识别感兴趣神经元，达到稀疏化标记目的的同时提高了三维重构的可能性和准确性.

2.3　基于本样品制备方法完成的神经元超微三维重构

基于上述方法，获得了一套体积约90 μm × 60 μm × 100 μm，横向分辨率3 nm，纵向分辨率50 nm的包含黑腹果蝇视叶小叶区的电镜数据库，并对其中一类LC神经元进行了标记、追踪和重构. 在该数据组中，可见较为完整和清晰的细胞结构，包括细胞膜、线粒体、囊泡、突触前加深等（图5a）. HRP标记的细胞膜和未标记的细胞膜，在电镜成像中具有显著的衬度差异性（图5b），可以作为感兴趣神经元的特异标记进行身份识别，与其他脑联结组学工作相比较，在神经元类型识别上具有明显优势[13-14].

在具有标记信息且整体衬度较高的数据组中，我们使用机器学习（machine learning）的方法自动重构了感兴趣神经元的三维形态及突触联结位点，并结合人工校验使获得的联结组数据具有可靠的生物学意义. 对于突触结构的识别，由于其分布较为稀疏，直接采用全卷积神经网络进行分割容易陷入局部极值，因此我们采用了基于Mask R-CNN的检测分割方法来实现突触联结位点的定位，能够有效

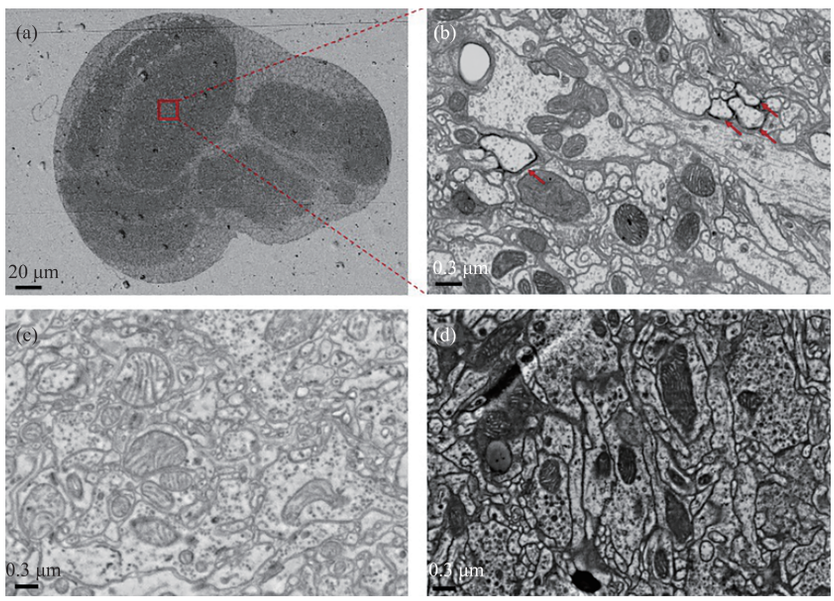


Fig. 4　HRP labelling and post-staining applied in ATUM system

(a) EM image of *Drosophila* optic lobe. (b) HRP labelled neuronal membrane(arrow). (c) EM image of samples without post-staining. (d) EM image of post-stained samples.

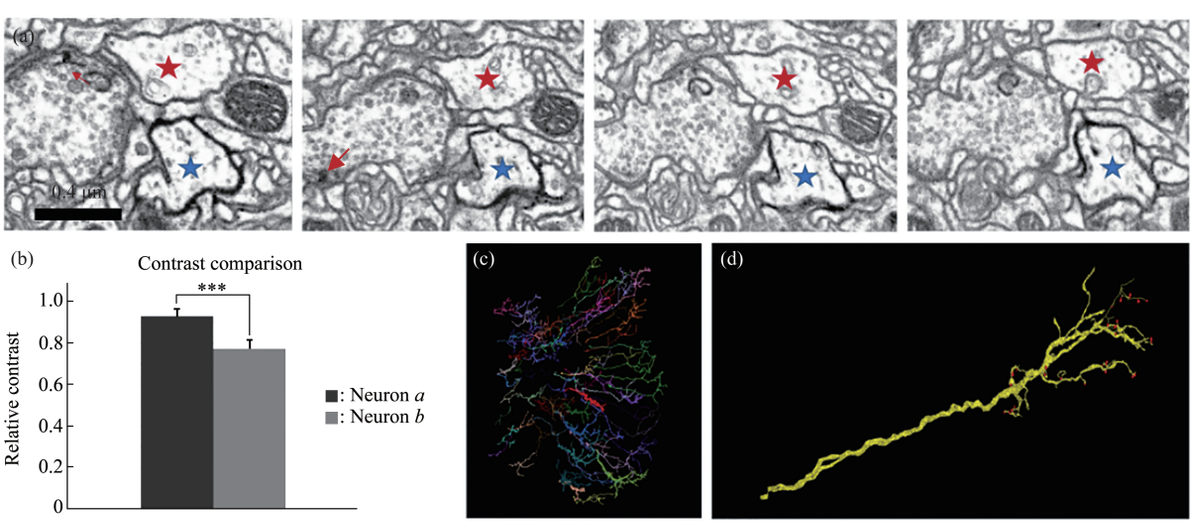


Fig. 5　3D-reconstruction of one LC type neurons

(a) SEM images of serial sections showing a labelled neuron (blue pentangle), a non-labelled one (red pentangle) and T-bar ribbons as presynaptic density (arrows). (b) Statistic data indicating significant variance of relative contrast between labelled membranes and non-labelled ones in (a). $P<0.05$. Blue pentangle labelled neuron is denoted as neuron *a* and red one, neuron *b*. (c) ~100 reconstructed LC neurons. (d) One of the reconstructed neurons projecting along the neuropil for ~100 μm. Red balls represent synaptic connections.

避免过拟合现象. 另外，由于目标较小，采用 Feature Pyramid Network（FPN）[15] 的金字塔结构，能够有效地保留细节信息，实现小目标的检测和分割. 在测试集中，评价算法的检测效果，准确率和召回率分别为 49.4% 和 86%. 对于神经元形态的自动重构，首先人工标记感兴趣神经元在每一层上的骨架点，并以这些骨架点作为初始种子点，向外扩充直至神经元的边界停止，得到神经元的 2D 分割结果，最后在同一根骨架上的分割结果串联在一起，实现感兴趣神经元的 3D 重建. 其中从种子点

向外扩充的部分是此流程中的重点，我们采用了一种迭代神经网络（flood filling network，FFN）[16]来实现. 在测试集中，我们计算了该算法的准确率和召回率，分别是 94% 和 74%.

通过标记信息，我们识别并重构了一种类群的 LC 神经元，共 105 个. 联结组数据包含这些神经元的形态结构、分布状况、化学突触联结位点及长程投射模式等详细信息：该类神经元在整个视叶小叶区广泛分布，其树突主要分布于小叶第二至第四层，轴突从小叶区以两支并行的方式投射至视小球（opticglomeruli），总长度约 100 μm. 重构的部分结果如图 5c，d 所示.

3　讨　　论

电子显微成像是微观尺度脑联结组学最重要的研究手段. 样品表面原位连续切片成像系统和聚焦离子束切片成像系统采用镜内切片并成像的方式，能够获得纵向分辨率更高的三维成像数据库，然而在横向尺度上难以容纳切面面积较大的样品，且无法保留样品切片. ATUM 系统可以建立并完整保存大样品的超薄切片库，使得获取大样本数据及后续的生物学操作例如光电联用（corelated light and electron microscopy）等成为可能.

本文通过对制样流程的改进，成功解决了 ATUM 系统在样品收集过程中容易产生的样品褶皱问题，提高了三维重构的准确性. 同时结合 HRP 标记方法和柠檬酸铅后染色的方法，对感兴趣神经元进行稀疏化标记，避免了通过密集重构获取神经元形态学特征，从而识别神经元身份这一工作量极大的过程，降低了后续三维重构工作的任务量和难度. 随着对脑结构和功能研究的深入，小型哺乳类乃至非人灵长类的脑联结组研究亦将纳入日程. 面对极为庞大的样品库及后续分析的数据量，前期样品的制备方法必然对整个研究过程起到至关重要的影响. 从制样的角度减少脑联结组学研究的工程量，是本研究的初衷和目的.

参　考　文　献

[1] Jarrell T A, Wang Y, Bloniarz A E, *et al*. The connectome of a decision-making neural network. Science, 2012, **337**(6093): 437-444

[2] Lichtman J W, Denk W. The big and the small: challenges of imaging the brain's circuits. Science, 2011, **334**(6056): 618-623

[3] Takemura S Y, Bharioke A, Lu Z, *et al*. A visual motion detection circuit suggested by Drosophila connectomics. Nature, 2013, **500**(7461): 175-181

[4] Hayworth K J, Morgan J L, Schalek R, *et al*. Imaging ATUM ultrathin section libraries with WaferMapper: a multi-scale approach to EM reconstruction of neural circuits. Front Neural Circuits, 2014, **8**: 68

[5] Denk W, Horstmann H. Serial block-face scanning electron microscopy to reconstruct three-dimensional tissue nanostructure. PLoS Biol, 2004, **2**(11): e329

[6] Takemura S Y, Aso Y, Hige T, *et al*. A connectome of a learning and memory center in the adult *Drosophila* brain. Elife, 2017, **6**: e26975

[7] Takemura S Y, Xu C S, Lu Z, *et al*. Synaptic circuits and their variations within different columns in the visual system of Drosophila. Proc Natl Acad Sci USA, 2015, **112**(44): 13711-13716

[8] Ohyama T, Schneider-Mizell C M, Fetter R D, *et al*. A multilevel multimodal circuit enhances action selection in *Drosophila*. Nature, 2015, **520**(7549): 633-639

[9] Briggman K L, Bock D D. Volume electron microscopy for neuronal circuit reconstruction. Curr Opin Neurobiol, 2012, **22**(1): 154-161

[10] Millard S S, Lu Z, Zipursky S L, *et al*. *Drosophila* dscam proteins regulate postsynaptic specificity at multiple-contact synapses. Neuron, 2010, **67**(5): 761-768

[11] Watts R J, Schuldiner O, Perrino J, *et al*. Glia engulf degenerating axons during developmental axon pruning. Curr Biol, 2004, **14**(8): 678-684

[12] Larsen C W, Hirst E, Alexandre C, *et al*. Segment boundary formation in *Drosophila* embryos. Development, 2003, **130**(23): 5625-5635

[13] Vishwanathan A, Daie K, Ramirez A D, *et al*. Electron microscopic reconstruction of functionally identified cells in a neural integrator. Curr Biol, 2017, **27**(14): 2137-2147 e2133

[14] Wanner A A, Vishwanathan A. Methods for mapping neuronal activity to synaptic connectivity: Lessons from larval zebrafish. Frontiers in Neural Circuits, 2018, **12**: 89

[15] Lin T Y, Dollár P, Girshick R, *et al*. Feature pyramid networks for object detection//Proceedings of the IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition. Honolulu, HI, USA: IEEE, 2017: 2117-2125

[16] Januszewski M, Kornfeld J, Li P H, *et al*. High-precision automated reconstruction of neurons with flood-filling networks. Nature Methods, 2018, **15**(8): 605-610

Application of Horseradish Peroxidase Labeling Along With Post-Staining Improves Data Quality in Micro-Brain Connectomics*

WANG Sheng-Xiong[1,2], CHEN Zhen-Qiang[3], HAN Hua[4]**, GUO Ai-Ke[1,2,5,6,7]**

([1]*State Key Laboratory of Brain and Cognitive Science, Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100101, China;
[2]*University of Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100049, China;
[3]*Ruijin Hospital, Luwan Branch, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai* 200020, China;
[4]*Institute of Automation, Chinese Academy of Sciences, Beijing* 100190, China;
[5]*Institute of Neuroscience, State Key Laboratory of Neuroscience, CAS Center for Excellence in Brain Science and Intelligence Technology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai* 200031, China;
[6]*Shanghai Center for Brain Science and Brain-Inspired Intelligence Technology, Shanghai* 201210, China;
[7]*Shanghai Institute of Microsystem and Information Technology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai* 200050, China)

Abstract For micro-brain connectomic research, volume electron microscopy is a main method in which it plays an important role for the application of automated tape-collecting ultramicrotome (ATUM) system and array imaging with scanning electron microscopy together. ATUM system enables collecting a large amount of serial sections to be imaged with SEM to form a huge dataset. With regard to the nature of non-vacuum sectioning and sample reserving, we modified and improved the sample preparation process including resin recipe, HRP labelling and post-staining method in order to reduce folding rate of sample sections and make it possible for identifying certain types of neurons in high-contrast imaging dataset, thus obtaining dataset of high quality for connectomic research.

Key words brain connectomics, volume electron microscopy, sample preparation
DOI：10.16476/j.pibb.2020.0011

* This work was supported by a grant from the Strategic Priority Research Program of Chinese Academy of Science（XDB32010100）.
** Corresponding author.
Tel：86-21-54921785，E-mail：akguo@ion.ac.cn
Received：April 18，2020 Accepted：July 31，2020