



用于组织样品冷冻电子断层成像的 冷冻提取 (Cryo-lift-out) 技术*

秦昌东 郭 强** 高 宁**

(北京大学生命科学院, 北京 100871)

摘要 冷冻电子断层成像术 (cryo-electron tomography, cryo-ET) 能够在近生理状态下, 解析细胞内大分子复合物的高分辨率三维结构, 为理解生命过程提供关键的结构基础。然而, 许多关键的生物学过程并非在孤立的细胞中发生, 而是源于组织内或细胞间的复杂相互作用。而且, 许多研究对象无法通过单细胞培养获得, 如神经组织、肿瘤组织、植物组织、病理样本等, 因此, 只能通过直接从个体或组织层面解剖取样来进行研究。将 cryo-ET 的应用从单细胞水平推进至更复杂的组织层面, 对于在原生环境中理解完整生命活动至关重要。基于冷冻聚焦离子束 (cryo-focused ion beam, cryo-FIB) 发展的冷冻提取 (cryo-lift-out) 技术, 作为大尺寸组织样品冷冻透射电子显微镜薄片制备的核心技术, 其流程烦琐易错, 且对操作者经验依赖性极强, 尚未实现大规模普及应用。本文系统回顾了冷冻提取技术的发展历程, 详细阐述了其技术流程, 并通过与材料科学中常温提取技术的对比, 剖析了冷冻提取技术中的关键难点与相应解决策略, 最后对该技术的未来发展方向进行了展望。对冷冻提取技术的系统剖析, 有助于明确其规模化应用的关键制约因素, 并为后续的方法优化与技术革新奠定基础。

关键词 冷冻电子断层成像, 组织, 冷冻聚焦离子束, 冷冻提取

中图分类号 Q6-3

DOI: 10.3724/j.pibb.2025.0560

CSTR: 32369.14.pibb.20250560

电子显微术是目前从原子尺度上研究物质微观结构及性能的重要方法之一, 利用电子光源和样品中原子库仑势场相互作用, 透射光和散射光的叠加形成高分辨率相位衬度像和振幅衬度像^[1]。得益于电子显微学一系列重大技术突破, 如高相干性场发射电子枪、稳定的冷冻样品台、高真空电子光路系统、玻璃化冷冻样品制备技术, 以及结构解析算法的创新等, 已实现生物大分子 (近) 原子分辨结构解析^[2-4]。这些技术突破推动了冷冻电子显微术 (cryo-electron microscopy, cryo-EM) 的变革, 该技术也因其重大贡献荣获2017年诺贝尔化学奖。

冷冻电子断层成像术 (cryo-electron tomography, cryo-ET) 作为 cryo-EM 的重要组成部分, 其核心优势在于能够在原位条件下直接可视化细胞的三维结构、大分子组装体及其相互作用, 对于理解生命活动的发生调控机制具有重要意义。需要指出的是, 本文的“原位”特指细胞或组织经玻璃化固定后的生理状态观察, 区别于材料科学中

强调的多场耦合下的实时动态演化过程的观察。Cryo-ET 是通过倾转样品台采集一系列二维投影图像, 经计算重构获得三维图像, 并结合子断层平均 (sub-tomogram average) 技术, 可在亚纳米分辨率尺度上揭示大分子复合物在细胞内的空间分布、构象状态及其相互作用。Cryo-ET 已在单细胞模型样品中取得了一系列突破性进展, 如揭示细菌鞭毛马达的原位结构^[5]、可视化肺炎支原体细菌内翻译过程的动态变化^[6]、原位捕获多纤毛发生的动态全景^[7]、应激颗粒的原位结构分析以理解应激响应中的结构功能关系^[8]、HeLa 细胞内细胞器的高分辨率原位结构分析^[9], 以及神经退行性疾病研究中神经元内蛋白酶体分析^[10]等, 为理解生命过

* 国家自然科学基金 (32230051) 资助项目。

** 通讯联系人。

郭强 Tel: 010-62751756, E-mail: guo.qiang@pku.edu.cn

高宁 Tel: 010-62744236, E-mail: gaon@pku.edu.cn

收稿日期: 2025-12-22, 接受日期: 2026-04-09

程的基本规律提供了前所未有的视角。单细胞模型无法涵盖生命系统的全部复杂性,其多细胞协同作用的结构基础无法在孤立的单细胞中得以完整呈现。更重要的是,许多研究对象无法通过细胞培养获得,因为培养体系无法模拟其天然的组织微环境,因此只能通过直接对组织取样进行研究。cryo-ET 技术应用于组织样品,不仅可以得到常规单个细胞内的蛋白质结构及分布,而且还可以揭示细胞间的相互作用,这对于理解生命过程至关重要。例如,通过对肝脏组织的研究,发现了因跨膜蛋白 41B (transmembrane protein 41B, TMEM41B) 缺失导致的脂质极端错置以及失衡状态下大量被内质网双层膜包裹的异化巨型脂滴形成,为阐明氯通道 CLIC 样蛋白 1 (chloride channel CLIC-like protein 1, CLCC1) 的调控机制提供了直观的证据^[11]。通过对胰岛组织的研究,直观展示了囊泡内胰岛素晶体在组织多细胞内的分布^[12]。临床样

本中,通过对阿尔茨海默病患者的脑组织研究,揭示了 β 淀粉样斑块与 tau 蛋白纤维的空间排布及结构构型^[13]。不仅针对于动物组织,通过优化技术流程,针对拟南芥和双色盐角草等植物组织的 Cryo-ET 研究也逐步开展,能够对叶绿体、细胞壁等实现高分辨率观察^[14-16]。组织样品的 cryo-ET 技术流程如图 1 所示,一般经过样品玻璃化、冷冻切片制备、数据收集和重构 3 个阶段。尽管组织水平的 cryo-ET 研究具有重要的生物学价值,其广泛应用仍面临严峻的技术挑战。高压冷冻 (high-pressure freezing, HPF) 技术已能够实现最高 200 μm 厚组织样品的有效玻璃化,是目前组织样品原位研究现实可行的冷冻方案。然而,玻璃化后的组织厚度仍远超非弹性散射电子的平均自由程 ($<300\text{ nm}$)^[17],无法直接进行透射电子显微镜 (transmission electron microscope, TEM) 成像。因此,样品减薄成为制约组织 cryo-ET 研究的核心瓶颈。

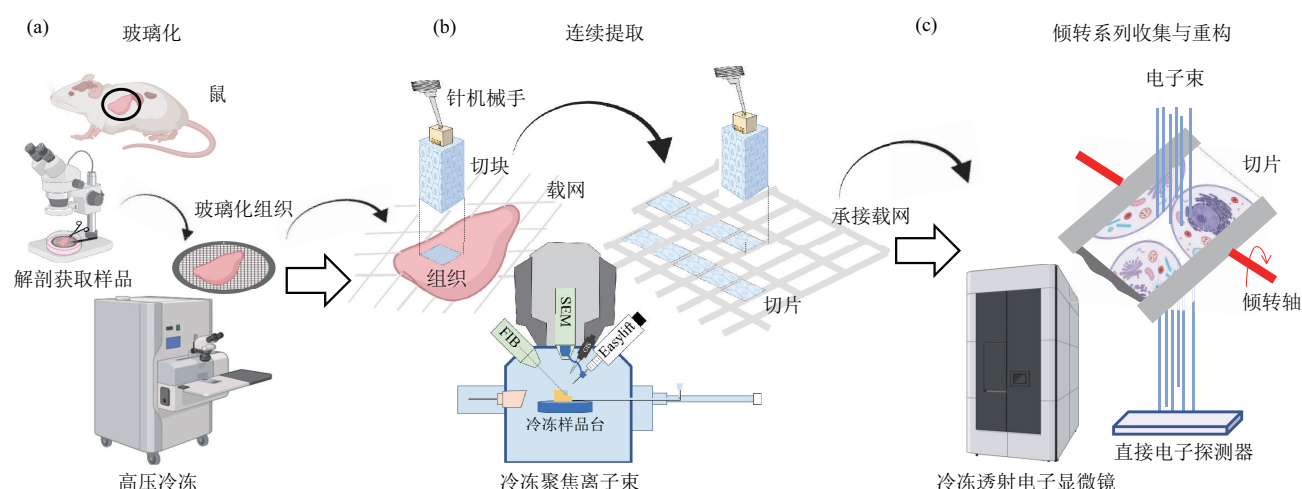


Fig. 1 Workflow of cryo-ET based on serial lift-out technology (created with BioRender.com)

图1 基于冷冻连续提取技术的cryo-ET技术流程 (使用Bioender.com绘制)

FIB: 聚焦离子束 (focused ion beam); SEM: 扫描电子显微镜 (scanning electron microscope); Easylift: 设备仪器提取系统的名称; GIS: 气体注入系统 (gas injection system)。

目前,适合制备组织含水切片的有冷冻超薄切片技术 (cryo-ultramicrotomy) 和冷冻聚焦离子束 (cryo-focused ion beam, cryo-FIB) 技术两种方法^[18-19]。冷冻超薄切片技术可以成功制备组织样品并可以获取样品连续信息,但由于该技术不可避免引入应力而产生褶皱、裂纹、刀痕等缺陷,严重影响数据收集的质量^[20]。Cryo-FIB技术的核心原理是利用高能 FIB 对冷冻样品进行高精度的刻蚀加工,该技术完全避免了超薄切片技术因机械应力而

引入缺陷的问题,是目前 cryo-ET 制备 TEM 薄片的重要方法^[21]。基于 cryo-FIB 的组织样品制备方法主要包括两种,载网上直接减薄法 (on-the-grid) 和冷冻提取技术 (cryo-lift-out)。载网上直接减薄法是将样品直接附着或生长于载网上,通过 FIB 以倾斜角度在载网上原位加工制备薄片的方法,是目前制备单细胞等薄样品冷冻切片的主要方法。当研究对象从单细胞拓展至大尺寸组织时,该种载网上减薄方法面临严峻挑战。由于离子束的加工能力有

限,传统载网上减薄策略将数百微米厚的组织样品直接减薄至百纳米级别薄片,不仅耗时极长,还需刻蚀掉大部分组织,造成样品浪费。冷冻提取技术的独特价值在于,在全程冷冻条件下,它通过机械手将目标薄片从组织内部提取并转移至专用载网,从而突破了样品尺寸的固有限制,实现了对组织内部特定区域的原位解析。从材料科学中成熟的常温提取技术发展到适用于组织样品的冷冻提取技术,经历了从常温FIB的提取技术到cyro-FIB的载网上直接减薄法、再到冷冻提取技术、进而发展到冷冻连续提取技术(serial lift-out)的演进^[21-26]。在这一过程中,科学家们成功攻克了包括冷冻样品台、冷冻传输系统和冷冻提取系统在内的多项关键技术难题^[27-28]。目前,被广泛采用且效率较高的方法是冷冻连续提取技术,该技术能够通过提取单个组织块并连续切取多个切片,显著提高制样效率,还可获取组织样品中的连续结构信息,极大推动了cryo-ET在组织样品研究中的应用。此外,冷冻提取技术的发展促进了其在材料科学中的应用,特别是在电子束敏感材料与纳米材料的界面结构的研究中发挥了重要作用,为冷冻样品制备方法提供了坚实的技术基础,有力地推动了跨学科领域的融合与发展^[29-30]。

本文系统回顾了冷冻提取技术从材料科学领域向生命科学领域发展的历程与应用。根据样品的厚度不同进行了系统分类,并通过实际操作中不同方法所涉及的几何关系变化,直观呈现冷冻提取的技术细节。本文重点阐述了该技术在组织样品制备过程中的技术难点及应对方法。最后,对该技术目前仍面临的挑战进行讨论,同时对其未来发展趋势做出展望。

1 冷冻提取技术发展历程

深入剖析冷冻提取技术的发展与演进历程,有助于深刻理解该技术的优势和不足,也能为未来该技术的探索更新以及应对更复杂的生物组织切片制备提供技术保障(图2)。根据近10年来针对组织样品的cryo-ET研究中玻璃化处理及切片制备方法的统计结果(表1),由于组织样品尺寸通常较大,具备更大玻璃化深度的高压冷冻技术已成为主流前处理方法。此外,cryo-FIB中的冷冻提取技术既能避免因冷冻超薄切片过程中机械应力导致的褶皱与裂纹等结构损伤,也克服了传统载网上减薄方法效率低、样品浪费等问题,因而逐渐发展成为当前组织样品冷冻切片制备的重要方法(表1)。

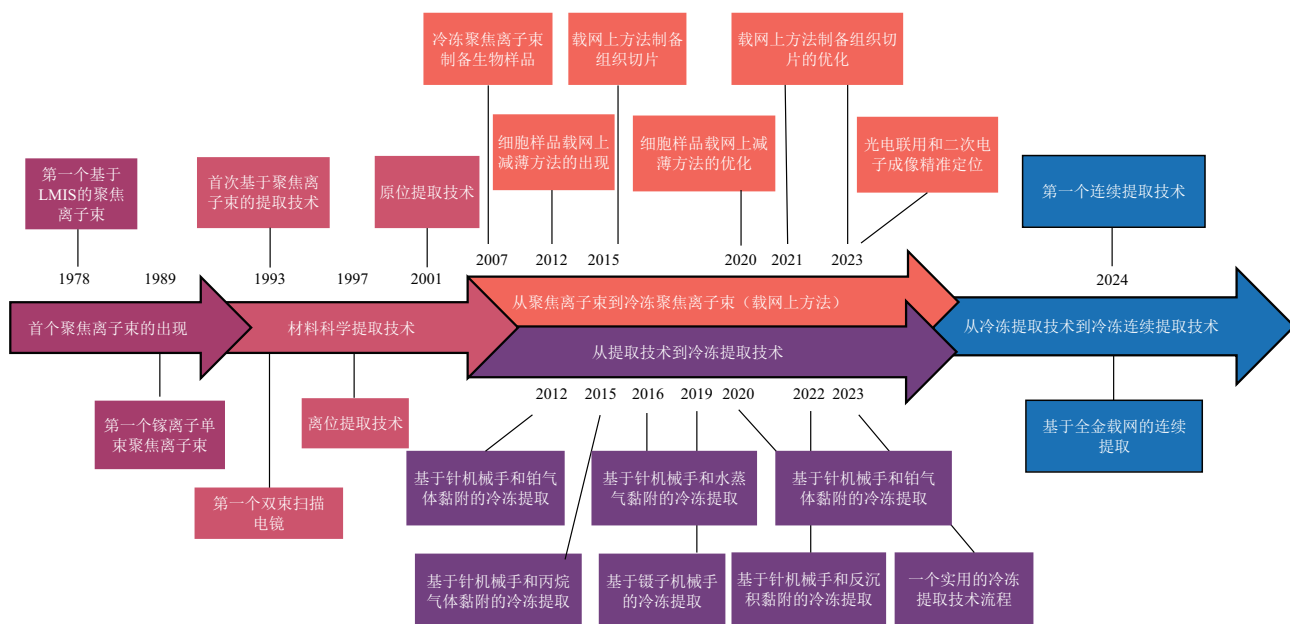


Fig. 2 Development timeline of Cryo-lift-out technology

图2 冷冻提取技术发展历程

时间轴分别列出了双束扫描电子显微镜技术的出现、常温原位提取技术的发展、从常温聚焦离子束到冷冻聚焦离子束、常温原位提取到冷冻提取再到冷冻连续提取等技术发展的关键节点。

Table 1 Statistics of vitrification and lamella preparation methods for tissue samples in cryo-ET studies

表1 Cryo-ET研究中组织样品玻璃化及切片制备方法统计

年份	样品类型	玻璃化方法		减薄方法			参考 文献
		投入式 冷冻	高压 冷冻	冷冻 切片	冷冻聚焦离子 束载网上方法	冷冻聚焦离子 束提取方法	
2015	秀丽隐杆线虫		√	√	√		[31]
2015	秀丽隐杆线虫		√	√		√	[32]
2019	秀丽隐杆线虫		√	√		√	[33]
2021	菠菜叶片, 鼠肝脏组织, 心肌组织, 骨骼肌组织		√	√	√		[34]
2023	鼠肝脏组织		√	√	√		[35]
2023	鼠胰岛		√			√	[12]
2023	鼠心肌组织, 解剖后的果蝇组织	√			√		[36]
2023	鼠肾小球		√		√		[37]
2024	来源于人端粒酶永生化包皮成纤维细胞的细胞外基质		√			√	[38]
2024	患病尸检脑组织	√			√		[13]
2024	患病尸检脑组织		√	√		√	[39]
2024	秀丽隐杆线虫幼虫		√			√	[26]
2024	鼠肝脏组织, 脑组织, 心肌组织		√			√	[40]
2025	黑腹果蝇卵巢组织		√			√	[41]
2025	小立碗藓的原丝体与叶状体, 拟南芥的胚胎, 二色补血草盐腺		√			√	[14]
2025	鼠肠道组织		√			√	[42]
2026	鼠肝脏组织		√			√	[11]

1.1 双束扫描电子显微镜的出现

双束扫描电子显微镜, 将FIB和扫描电子显微镜 (scanning electron microscope, SEM) 集成到同一个系统中实现边成像观察边离子束刻蚀纳米加工的先进设备, 目前是TEM样品制备的最重要设施之一, 已成为集高分辨率成像、样品制备、微纳器件加工、多模态多场耦合原位表征于一身的“纳米实验室”。该设备的出现得益于FIB技术的发展。20世纪70年代, 以电场中液体尖端放电为理论基础的液态金属离子源 (liquid-metal ion source, LMIS) 开始发展并逐渐成熟^[43]。1978年, 第一个基于LMIS的FIB系统被开发出来, 也验证了其纳米加工能力。20世纪90年代, 出现了商用的单束镅离子源FIB, 开启了FIB在微纳加工领域的应用。随后FIB与SEM集成, 实现了原位加工和观察操作, 现代意义的双束SEM由此产生。

1.2 常温提取技术的发展

1993年, Overwijk等^[44]提出了基于FIB的全新TEM样品制备方案, 首次实现了将FIB加工的切片从基底材料上移除并转移到TEM样品台上, 这也是“lift-out”概念的最初体现。1997年, Giannuzzi等^[21]给出了更为详细地提取切片制备流程, 但该流程仍需要在光学显微镜下借助额外的机

械手进行转移切片, 该流程被称为离位 (*ex-situ*) 提取技术。该流程也初次体现了提取技术对于块体材料定点加工观察的独特优势。2001年, Yaguchi等^[22]对将使用FIB制备切片的完整流程集成到同一个腔室内完成, 该流程也被称之为原位 (*in-situ*) 提取技术。下文所述及的提取技术, 均特指原位提取。该流程分为感兴趣区域切块刻蚀、针机械手和切块黏附、提取并转移至承接载网、切块和承接载网黏附并释放针机械手, 其中针机械手和切块连接点采用电子束或离子束诱导的化学气相沉积金属的方式进行牢固黏附, 该流程也是目前材料科学制备TEM切片样品所采用的主要方法。

1.3 从常温聚焦离子束到冷冻聚焦离子束

2000年前后, 研究人员开始尝试将FIB技术引入生命科学领域, 用于制备生物样品的透射电镜薄片。此时的生物样品通常需要经过化学固定、脱水、树脂包埋等预处理, 在常温下进行FIB减薄^[45]。尽管这一方法避免了传统超薄切片带来的机械压缩形变, 但仍面临化学固定和脱水过程可能导致细胞超微结构改变甚至塌陷, 以及树脂包埋的生物样品在离子束轰击下易产生局部热损伤和离子注入效应等问题^[46]。经进一步改进, 低温冷台集成到FIB系统中, 实现了对冷冻含水生物样品的直

接加工, 完成了从树脂包埋的脱水样品到玻璃化冷冻含水样品的转变。2007年, Marko等^[47]利用cryo-FIB技术制备生物样品冷冻切片, 并成功进行cryo-ET成像分析, 开始了该技术在cryo-ET中的应用。2012年, Rigort等^[23]将样品固定到载网上以较小的刻蚀角度对样品进行减薄, 该方法是目前制备较薄单细胞样品冷冻切片的普遍方法, 其也被称之为载网上减薄方法。由于材料科学中样品较厚, 该方法在材料科学中极少被用到。2015年, Harapin等^[31]将该载网上减薄方法从细胞样品扩展到更厚的线虫样品。国内外多个团队对组织样品载网上减薄方法做了大量的优化, 进一步提升了切片制备成功率。Kelley等^[48]采用的方法称为Waffle Method, 巧妙地设计新载网作为载体, 先经过样品处理, 使得在高压冷冻后, 组织被封装到一个约20~30 μm 厚的、类似“华夫饼块”的玻璃化圆盘内, 从而有效解决了大于200 μm 厚的组织样品的玻璃化难题, 并可直接用于后续离子束减薄来制备切片。孙飞团队^[34]的“VHUT-cryo-FIB”技术方法, 是在高压冷冻后引入冷冻超薄切片机将大组织块快速切削成一个20 μm 左右厚的切块, 并结合自主设计的载具成功利用FIB进行切片制备。李雪明团队^[35]则是针对厚组织样品对FIB减薄流程本身进行了优化, 他们设计了一套先用大电流(高达65 nA)进行粗切, 再用小束流精修的两步走切割策略, 使得直接在组织块上直接制备切片成为可能。利用刻蚀效率更高的等离子体聚焦离子束(plasma focused ion beam, PFIB)的氦离子源来替代镓离子源取得了一定的进展, 提高了减薄的效率, 一定程度上促进了载网上方法应用到组织样品切片的制备中^[49]。同时, 对细胞样品, 国内外科研团队做了大量的技术创新和优化, 光电联用^[50-52]、二次电子成像^[53]定位引入到了切片的制备过程中, 实现了目标定位下的切片制备。对细胞样品的载网上减薄方法已完全实现自动化, 真正做到无人值守, 降低了技术门槛, 也大幅提高了样品减薄的通量^[54-56]。对于组织样品, 由于实际高压冷冻制备的组织样品的厚度接近200 μm , 受离子束减薄速率的限制, 这种载网上减薄方法不仅需要耗费时间而且还会因大部分样品被离子束溅射掉而引起样品浪费。

1.4 从常温提取技术到冷冻提取技术

材料科学领域的常规常温提取技术已较为成

熟, 但当该技术移植至cryo-FIB系统时, 仍面临一系列特有的技术挑战。尽管涉及冷冻样品台设计、低温样品传输系统等多个工程难题, 但操作流程中最为关键的瓶颈在于低温下机械手与样品切块之间的黏附。在常温环境下, 该黏附通常通过电子束或离子束诱导注入的气体沉积实现, 依靠沉积层形成牢固的连接。然而, 在冷冻条件下, 样品温度低无法通过束流扫描来实现定点沉积, 致使该沉积方法无法有效实施。直至2012年, Rubino等^[24]在冷冻条件下, 通过铂沉积方法, 实现了针尖机械手与样品切块之间的低温黏附, 成功将材料科学中成熟的提取技术引入cryo-FIB系统中, 推动了该技术在cryo-EM生物样品处理中的应用进程。2015年, Mahamid等^[32]采用了传统的针机械手加丙烷通过离子束诱导进行碳沉积来进行黏附的方法。2016年, Zachman等^[57]开发了一种基于水蒸气辅助沉积的黏附方法, 成功将冷冻提取技术应用于材料固液界面的研究。该方法实现了在低温条件下对界面区域样品的精确提取与稳定制备, 为后续开展原子尺度的原位结构分析提供了关键技术支持。2019年, Schaffer等^[33]采用镊子机械手直接夹取的方法取代了气体注入系统辅助黏附, 成功提取了线虫的切片样品。该方法文献报道成功率较低, 也未能在商业化市场中得到广泛应用, 还需进一步探索。2020年, Kuba等^[58]使用Rubino等^[24]相近的方法, 利用材料科学传统的针机械手在铂有机混合物气体沉积辅助下实现黏附, 该方法靠铂前驱体在低温情况下吸附到针和切块连接处起到黏附的作用, 进一步推动了商业化应用。冷冻条件下, 注入的气体极易在样品和机械手表面凝结, 整个低温物体表面会被沉积层覆盖, 造成严重污染, 影响了样品的回收再利用。这也正是后续反沉积方法在冷冻提取技术中成为主要方案的原因。2022年, Klumpe等^[25]提出了无气体沉积的黏附方法, 采用反沉积的方法来实现针和切块的连接, 即在针尖附近以远离针的方向刻蚀切块, 溅射的材料会反方向在针尖和切块的界面处沉积, 从而实现黏附的目的。2023年北京大学郭强课题组^[12]利用反沉积黏附的方法对cryo-FIB的冷冻提取技术做了进一步探索, 国内率先实现了组织样品的冷冻提取, 并借鉴材料科学的方法对半月形载网进行了设计, 大幅度提升了组织样品提取的成功率和通量, 开发出一种全流程实用的技术方法。

1.5 从冷冻提取技术到冷冻连续提取技术

冷冻提取技术实现了从组织内部获取单一薄片的突破,单一薄片仅能提供样品在某一特定位置的二维投影或有限厚度的三维重构信息,难以完整揭示复杂生物学结构的三维空间构型。在此背景下,冷冻连续提取技术应运而生,该技术的创新点在于连续提取。通过对组织样品进行序列化的薄片提取,研究者可获得一系列相邻位置的薄片,经 cryo-EM 成像后可重构出数百纳米至数微米厚度的三维体积,从而在提升了制样效率的同时揭示结构的连续性。2024 年, Schiotz 等^[26] 首先开发了冷冻连续提取技术。该技术同样基于反沉积原理,并利用铜金属反沉积效率高的特性,实现了更稳定可靠的样品提取。另外,提取实验的承接载网多采用铜为材料,易于获取,该团队首先在机械手与目标切块之间通过反沉积一个附加铜块,再在此基础上继续反沉积黏附目标切块。这种分步黏附策略有效增强了连接的可靠性,从而允许在单个切块转移后可制备多个切片。2024 年, Nguyen 等^[40] 同样基于借助铜块反沉积黏附的策略,开发了一套用于冷冻连续提取的技术流程。该流程提取技术的创新之处在于,承接载网采用了单颗粒技术中广泛使用且易于获取的常规金属膜载网,不仅有效保持了组织区域的连续性结构信息,同时一定程度上降低了操作的复杂性,从而有助于该技术的进一步推广和普及。北京大学郭强团队^[59] 以及深圳医学科学院李美静团队^[42] 分别对冷冻连续提取技术进行了系统优化,进一步提升了组织样品的制备效率。目前,冷冻连续提取技术已成为组织样品冷冻切片制备的重要方法,为进一步提升效率以及自动化程度,对该方法的持续优化仍具有重要意义。

2 冷冻提取技术流程

为了更清楚地介绍提取技术的流程,基于冷冻双束 SEM 常用的 45° 载物台,以冷冻连续提取方法为例,根据样品厚度以及制备切片的几何方向进行分类。受离子束刻蚀效率的限制,样品厚度决定了切透样品的效率,因此决定了后续提取过程中的效率。例如,实际研究中更为普遍的大的块状样品,厚度较大 (>50 μm) (图 3a), 很难切透样品,因此提取的切块需要从底部切断来释放。而像使用 Waffle Method 制备的薄膜状样品,厚度较小 (<50 μm) (图 3c), 易于切透样品,因此提取的切块无需从底部切断就能释放。因此,根据组织样品

厚度进行区分,一种是很难切透的块状样品,另外一种则是易于切透的薄膜状样品。另外,根据切片和块体样品的空间几何关系可以分为水平切片 (planar lamella) 和截面切片 (cross sectional lamella), 其切片平面分别平行和垂直于原块体或薄膜的水平面。如图 3 所示,水平切片主要展示的是样品某一 z 深度 (x, y) 平面内的信息,那么连续提取可获得 z 方向的连续信息。截面切片展示的则是 (x, z) 或 (y, z) 竖直平面内的信息,连续提取获得的是 (x, y) 平面内的连续信息,是材料表面界面分析的主要方法。无论是块状样品还是薄膜状样品均可以实现水平切片和截面切片的制备。

对于块状样品的提取,由于此类样品在高压冷冻前无需像 Waffle Method 那样进行特殊处理来限制组织样品厚度,操作简单,所以该类样品在实际组织切片样品的制备中更常见。在该类样品的提取过程中 (图 3a), 带有铜块的机械手需首先在组织切块顶部通过反沉积进行黏附,随后利用离子束从底部将组织切块切断并释放,最后通过机械手操作将切块提取出来。成功提取后,可获得一个包含部分圆柱状样品的切块 (图 3a), 该切块在黏附到承接载网上之前,转移过程中始终与针机械手连接到一起。该类样品的提取位置如图 3b 所示,此时承载组织样品的载网背对离子束,即离子束方向与载网平面夹角较小,有助于从底部更顺利地进行切断。值得注意的是,切块提取出来后其空间位置是保持不变的,切块与载网的空间相对位置及状态只能通过移动载网来实现。

提取后的样品最终制备为水平切片还是截面切片,取决于承接载网与离子束之间的空间几何关系。当承接载网背对离子束,即离子束方向与载网平面夹角较小时,所制备的切片为水平切片。此时,同一个组织切块可以制备出多个切片,切片之间具有一定的连续性,因此称为连续提取。需注意的是,高压冷冻样品表面通常覆盖一层厚度不等的冰层 (其厚度取决于冷冻过程中水分的保留量), 因此前几个切片可能仅为纯冰层,不包含任何组织信息。当承接载网正对离子束,即离子束方向与载网平面夹角较大时,所制备的切片为截面切片。该配置通常仅适用于单片切片的制备,也是材料科学研究中最常用的提取方式 (图 3a, b)。

对于薄膜状样品提取,主要是指本身体积较小的组织块以及使用 Waffle Method 制备的样品。Waffle Method 在高压冷冻前对样品厚度进行限制

的 (通常 $<50\text{ }\mu\text{m}$), 优势在于: 不仅适用于冷冻提取技术, 还可兼容载网上方法进行切片制备。然而, 该方法需要使用特殊的载网, 制样流程较为复杂, 对操作要求较高。此类样品的提取过程 (图3c) 包括: 首先将样品四周刻蚀分离, 仅保留必要连接点, 随后使用带铜块的机械手在切块侧面通过束流诱导沉积 (反沉积) 进行黏附, 最后利用离子束切断剩余连接点, 从而完成整个切块的提取。该类型的样品提取位置如图3d所示, 此时承载样品的载网接近于正对离子束, 即离子束方向与载网平面之间的夹角较大。

提取切块后, 承接载网的空间位置同样决定了最终切片的类型。当承接载网背对离子束时, 所制备的为截面切片。在该配置下可实现多片连续制备, 但样品表面的冰层将分布于每一个切片中。当承接载网接近正对离子束时, 所制备的切片为水平切片, 该参数仅适用于单一切片的制备。此时, 可通过离子束刻蚀将表面冰层完全去除 (图3c, d)。图3b和3d中单片切片的制备方法已被广泛应用于材料科学及化学等领域界面问题的研究^[57, 60], 其在生命科学领域中 (尤其是牙齿、骨骼等硬组织研究) 具广阔的应用前景^[61-62]。

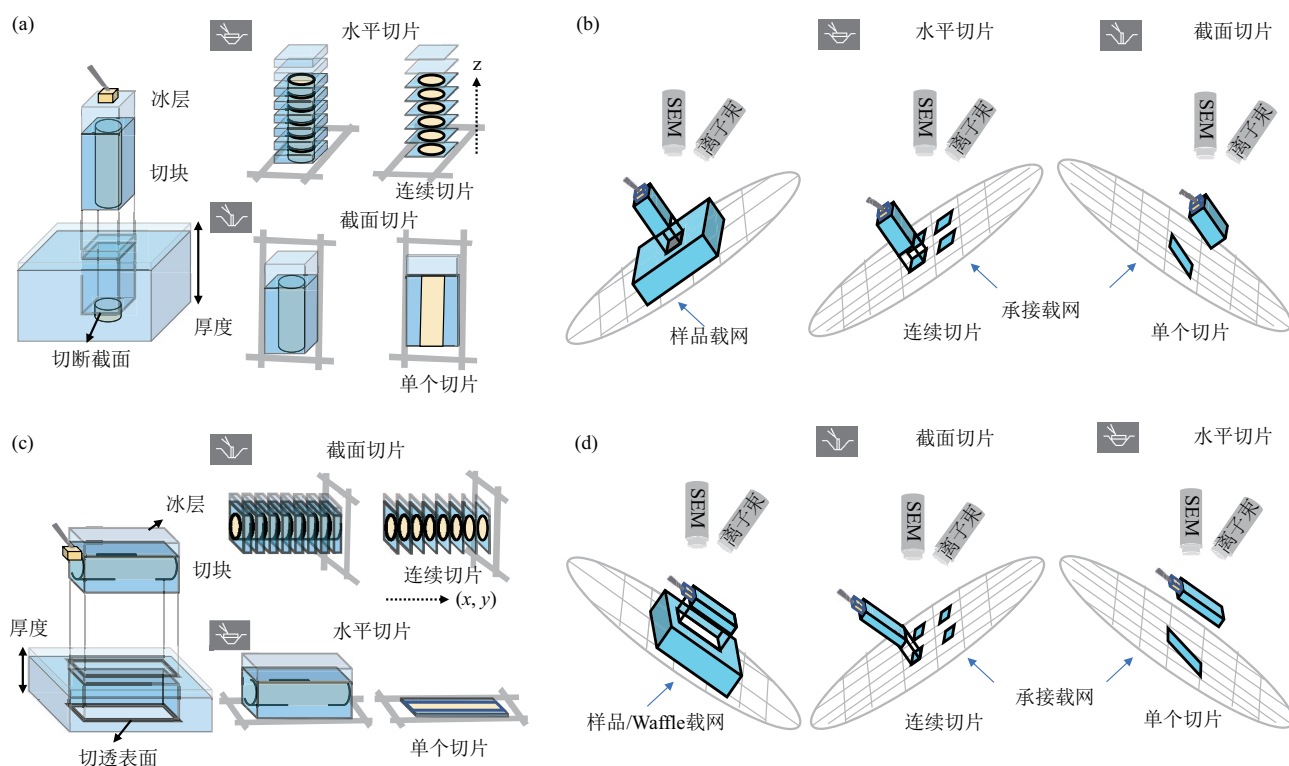


Fig. 3 Schematic diagram of sample classification and geometric relationships in the serial lift-out

图3 冷冻连续提取技术中样品分类和几何关系示意图

根据样品厚度可以分为块状 (a, b) 和薄膜状 (c, d) 样品, 根据切片方向可分为水平切片和截面切片。为清楚展示不同方法提取的组织样品在切片中的分布以及更好对比水平切片和截面切片的区别, 示意图中使用蓝色立方体代表冰, 黄色圆柱体代表需要提取的组织切块。SEM: 扫描电子显微镜。

根据以上分类及提取几何关系的介绍, 接下来以更普遍的块状组织样品提取水平切片为例, 简述冷冻提取的技术流程。该流程基于冷冻双束扫描电镜系统, 并搭配使用 45° 载物台, 承接载网选用的作者团队设计的专利载网^[63]。需说明的是, 根据以上介绍的几何关系, 载网的选择对本操作流程影

响较小, 不同载网的对比会在3.3节中讨论。

冷冻连续提取技术的流程可分为4个主要阶段 (图4): 铜连接块的制备、组织切块的提取、连续切片的制备, 以及减薄。首先, 通过离子束减薄在半月形铜载网边缘制备一个铜连接块, 并利用反沉积技术将其与针机械手黏附固定后提取出来备用

(图4a~c)。随后,利用离子束刻蚀进行切块的切取,移动机械手将铜块和组织切块接触,同样通过反沉积方式将铜块和目标切块黏附牢固并提取出来(图4d~f)。接着,将提取出来的组织切块与承接载网空隙的两端分别进行反沉积固定,再利用离子束

刻蚀释放切片,完成单个切片的制备,并通过重复两端黏附与刻蚀释放步骤实现连续切片的制备(图4g, h)。最后,精细减薄切片厚度至200 nm以下(图4i)。

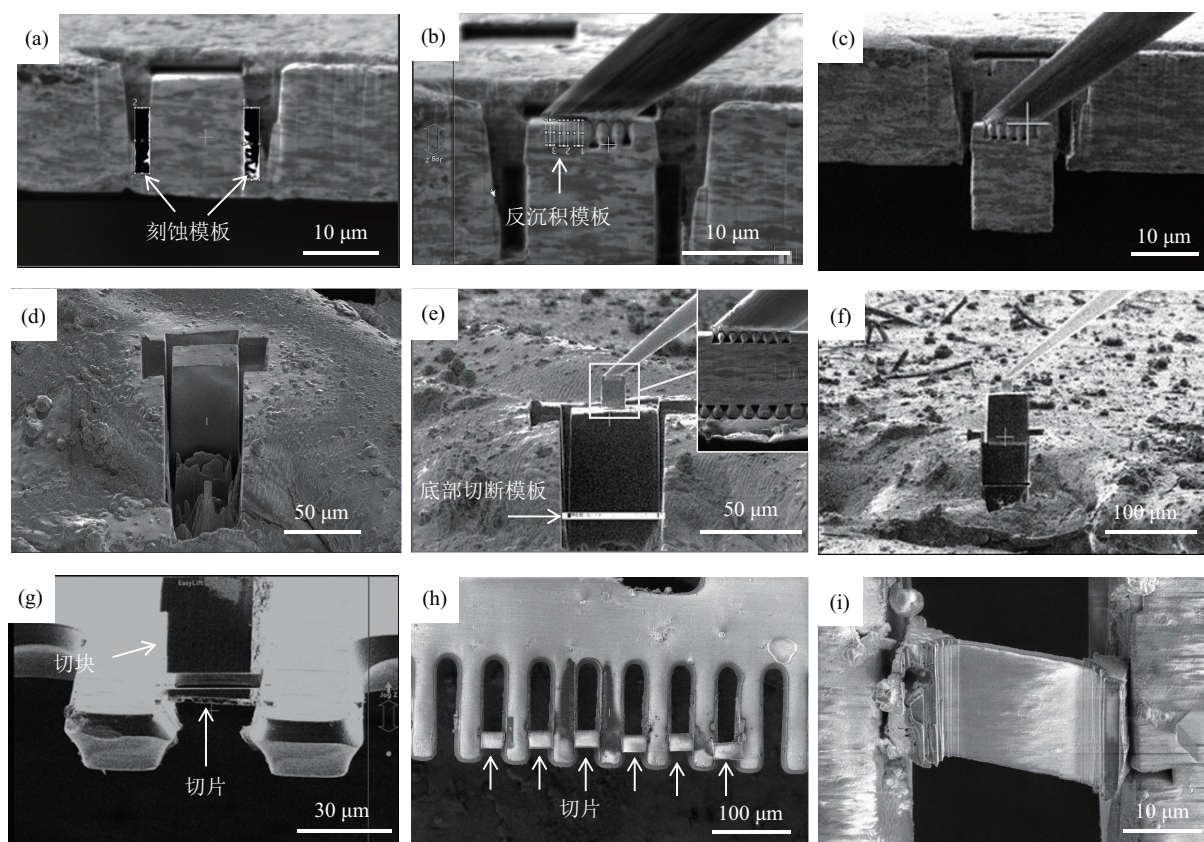


Fig. 4 Workflow of lamella preparation based on serial lift-out technology

图4 基于冷冻连续提取技术的切片制备流程

(a~c) 铜连接块的制备, (d~f) 组织切块的提取, (g~i) 连续切片的制备与减薄。

3 冷冻提取技术的难点分析

在冷冻连续提取技术中,组织切块的制备、针机械手与切块之间的可靠黏附,以及切块与承接载网的有效连接,是决定提取成败与后续冷冻电断层成像质量的核心环节。然而,与常温条件相比,低温环境对样品加工、材料沉积及操作精度提出了更为严苛的要求,由此衍生出一系列技术难点。以下将从组织切块的制备、针机械手与切块的黏附方式,以及切块与承接载网的黏附策略与选型3个方面,对冷冻提取技术的关键难点进行系统分析(表2)。

3.1 组织切块的制备

在冷冻连续提取技术流程中,组织切块的制备是核心操作环节,其关键在于从整个组织样品中精确分离出尺寸适宜的目标切块。除保留用于防止掉落的连接点外,切块四周需与基体完全分离。图5a展示了一个已制备完成、待提取的切块的剖面结构示意图。该结构主要通过3个刻蚀模板加工形成,其制备过程中存在多个影响提取成功率与后续切片质量的关键难点。a. 切块表面不平整引发的严重窗帘效应:该问题主要源于模板1所刻蚀的切块表面。由于连续切片制备时该表面在前端,将作为连续切片减薄过程的起始面,其不平整会导致窗帘效应加剧。在倾转系列成像过程中,薄片表面的窗

Table 2 Summary of key challenges and corresponding strategies in cryo-lift-out technology
表2 冷冻提取技术的主要挑战与解决策略总结

挑战类别	具体难点	解决策略/方法	关键操作要点	参考文献
组织切块制备	切块表面不平整引发的严重窗帘效应	优化刻蚀参数和保护层处理	降低图5a中模板1束流多次反复刻蚀; 对气体注入系统冷吸附沉积的铂保护层进行离子束表面扫描, 使其密实平整	[12]
	底部未完全切断	调整刻蚀模板参数协同作用	图5a中, 模板1设置较大y值确保深位切断; 模板2设置较大z值或多次运行; 增加模板2刻蚀深度以补偿间距增大带来的切断难度	
			将切断模板位置向针移动, 但牺牲切块大小	
针机械手与切块黏附	低温下GIS沉积黏附成功率低	利用图5a所示的反沉积方法替代	利用离子束刻蚀时的材料溅射效应, 使溅射原子沉积在针尖与样品接触点形成黏附	[25]
	直接利用组织样品反沉积成功率低	调整针尖接触方式引入专用反沉积块	将点接触转变为线接触, 扩大可沉积面积借助铜块作为中间介质实现连接 (主流策略)	
	反沉积操作参数控制要求高	精确调控离子束角度、模板位置、刻蚀深度	采用最优参数的Regular Cross Section模板, 以远离机械手方向进行单次刻蚀; 被提取切块略高于铜块; 确保接触面紧密贴合 (离子束预刻蚀平整); 根据铜块厚度动态调整刻蚀深度	[26]
切块与载网黏附	单边连接切片时易弯折卷曲	减薄采用两端连接方式	借鉴材料科学, 利用离子束加工凹槽实现切片两端固定或新设计载网	[12]
	高通量多切片同时固定的需求	开发新型载网结构	自主设计的半月形多齿载网 (支持两端连接); 矩形铜网格载网 (高通量); 单颗粒金膜载网 (兼容于小尺寸样品)	
				[40]

帘效应转化为投影图像中的周期性衬度变化, 这些伪影会贯穿整个倾转系列, 当使用这些含伪影的投影数据进行三维重构时, 窗帘条纹会被重构为三维空间中的虚假结构或背景噪声^[64-66]。在切块准备阶段, 可通过降低模板1的束流多次反复刻蚀来改善, 直至表面平整。另外, 靠气体注入系统 (gas injection system, GIS) 冷吸附沉积的铂保护层比常温束流诱导沉积的铂保护层要疏松且表面不平整, 需要使用离子束进行表面扫描使其密实牢固且平整, 这也有利于降低窗帘效应的影响^[67]。b. 底部未完全切断的问题: 该难点与模板1和模板2的协同作用密切相关。模板1的y值需设置较大值, 以确保从较深位置进行切断, 从而保证提取切块的尺寸; 模板2的z值也需设置较大值或通过多次运行模板2确保后续底部切断能成功进行。此外, 模板1与模板2的间距越大, 所得水平切片面积也越大, 但同时也增加了底部完全切断的难度。可行的解决方案是进一步增加模板2的z向刻蚀深度, 以补偿间距增大带来的底部切断挑战。

3.2 针机械手和切块之间的黏附

相较于常温提取, 冷冻提取最大的挑战在于切块的提取过程, 其核心在于如何实现稳定可靠的黏附。在整个提取流程中, 需完成两次关键黏附: 一是机械手与切块之间的黏附, 二是切块与承接载网网格之间的黏附, 其中前者的实现难度更高。如图5c所示, 在常温条件下, 材料科学通常采用电子

束或离子束诱导GIS进行铂沉积, 可实现精确定位并形成牢固的连接, 成功率高。然而, 在冷冻样品中, 由于样品及机械手处于低温状态 (通常低于-170℃), GIS前驱气体易直接凝结或吸附于样品表面, 造成污染并阻碍沉积反应, 导致常规的束流诱导沉积方法无法有效实施。目前可实现针机械手与样品切块之间连接的方式主要有两种: 一是基于冷吸附的GIS铂沉积方法 (图5b), 二是反沉积方法 (图5c)。

GIS冷吸附沉积方法通过原位沉积铂层填充针尖与切块之间的空隙以实现连接, 可视为材料科学常温提取技术在冷冻条件下的延伸。尽管该方法能够实现样品提取, 但由于每次沉积均会在整个样品表面形成较厚的铂层, 多次沉积后易导致铂污染累积, 影响后续加工与成像。此外, 与常温条件下束流诱导沉积形成的高强度铂层相比, 冷冻吸附沉积所形成的连接层机械强度较低, 易出现连接不牢固等问题, 导致该方法在实际应用中的成功率较低。

反沉积方法因其高成功率而逐渐成为冷冻样品提取中的主流黏附手段。其原理巧妙在于利用离子束刻蚀产生的溅射效应 (图5c): 当离子束轰击刻蚀区域时, 溅射出的原子以一定角度飞散, 且回溅概率较高。若机械手针尖恰好位于溅射路径上, 这些原子便会沉积于针尖与样品的接触点, 形成牢固黏附。反沉积效率受材料溅射率与表面迁移率的共同影响: 溅射率越高、表面迁移率越低, 反沉积效

率通常越高^[68]。铜因其高溅射率和低表面迁移率，成为理想的沉积材料。需注意的是，反沉积同样会引入污染，因此应避免在已减薄的切片附近使用。该方法最大优势在于无需气体沉积，避免了相应污染问题，且全程在液氮温度下完成，特别适用于对

污染敏感的生物组织样品。但其对实验参数控制要求较高，需精确调控离子束入射角度、针尖位置及刻蚀深度，否则效率显著下降。反沉积操作通常采用 Regular Cross Section 模板，沿远离机械手方向进行单次刻蚀（图5c）。

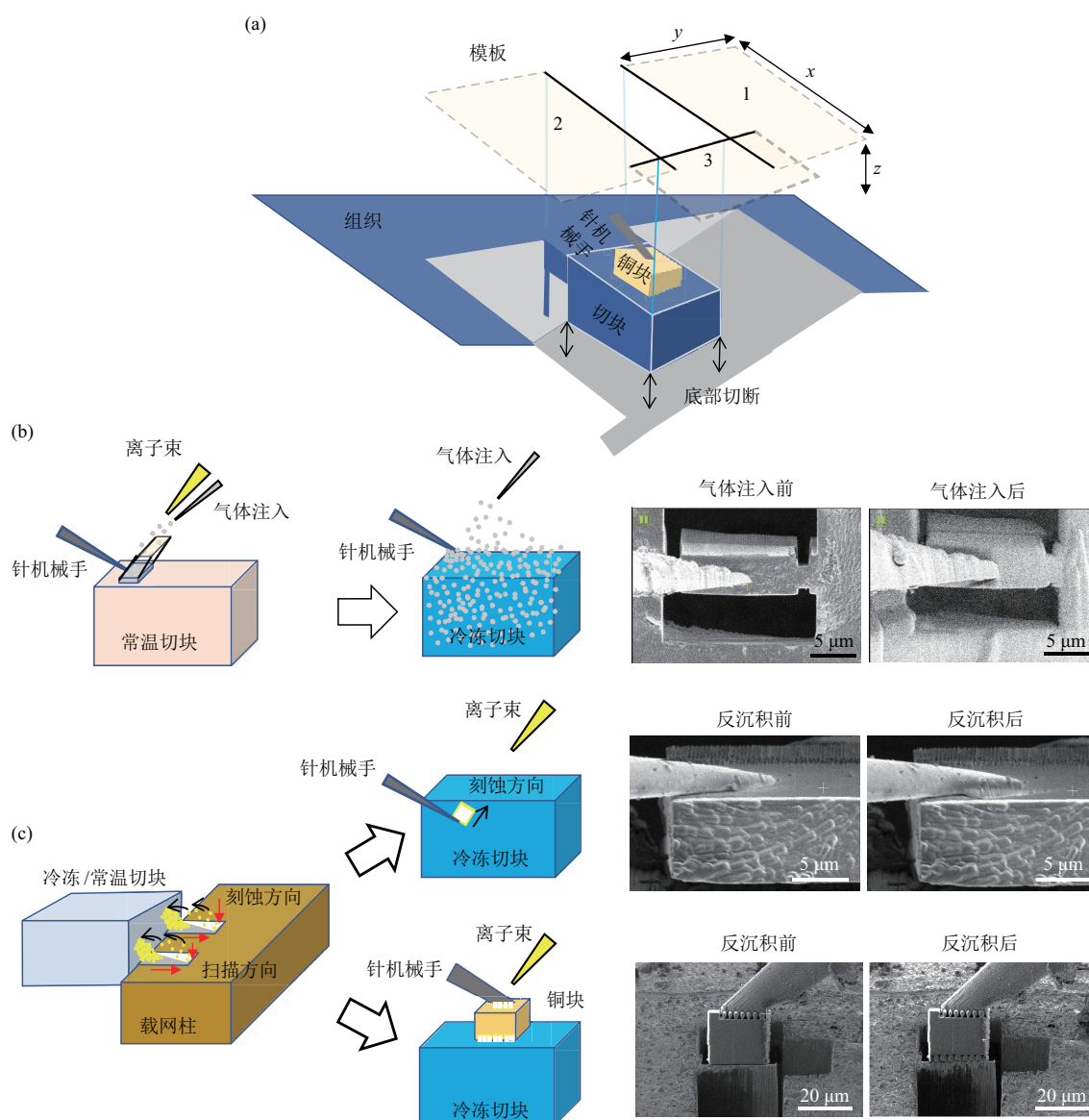


Fig. 5 Schematic of chunk preparation and attachment methods in the cryo-lift-out process

图5 冷冻提取过程中切块准备和黏附方法示意

(a) 切块完成提取前准备的剖面示意图，顶端虚线矩形框代表冷冻聚焦离子束中Regular Cross Section模板。(b) 常温提取中离子束诱导铂GIS沉积过程示意图和冷冻提取基于冷冻吸附气体注入系统沉积过程示意图，以及对成功案例。(c) 反沉积原理示意以及两种反沉积方法（基于提取组织自身材料反沉积和基于额外铜块反沉积）和对应反沉积前后二次电子成像图片。

反沉积方法根据所选沉积材料的来源可分为两类：一是直接利用待提取样品自身材料进行反沉积；二是额外引入专用反沉积块作为反沉积来源。直接利用组织样品材料进行反沉积，主要难点在于

同一切块内可供反沉积的区域有限，且该过程不可重复，因此对单次反沉积的成功率要求较高。为提高成功率，通常通过调整样品倾转角度，将针尖与切块之间的接触方式由点接触转变为线接触，从而

扩大可沉积面积。此外, 该方法还需确保针尖尺寸小且结构完整, 任何针尖的缺陷或尺寸不当都会显著影响反沉积的效率与最终黏附的成功率。另外一种方法是当前广泛采用的主流策略, 其核心是借助铜材料的高反沉积效率, 通过铜块作为中介介质实现与目标切块的连接。该方法的关键在于提高反沉积的效率与可靠性, 主要依赖以下几项技术要点: 首先, 被提取切块应略高于铜块, 以增加其阻挡溅射材料的概率; 其次, 需确保铜块与切块接触面紧密贴合, 可在反沉积前使用离子束将接触面刻蚀平整; 此外, 刻蚀模板参数的设置也至关重要, 特别是刻蚀深度需根据铜块厚度动态调整, 以避免将接触区域被完全切透进而影响强度。该方法对针尖的要求较低, 无需频繁修复或更换机械手, 同时具备

连接牢固、成功率高的显著优势, 因此已成为冷冻样品提取中的优先选择。

3.3 切块与承接载网的黏附方式和承接载网选择

在材料科学的提取实验中, 切片与承接载网之间通常采用单边连接或两端连接的方式, 并使用四齿半月形常规载网。然而, 单边连接的切片在减薄过程中极易发生弯折或卷曲, 主要原因在于薄的切片机械强度较低, 难以支撑自身在加工过程中的应力。因此, 单边连接方式 (图 6a) 已逐渐无法满足需求, 材料科学中通常借助离子束加工凹槽以实现两端连接。为提高对切片的支撑稳定性并增大减薄后的有效面积, 目前普遍采用两端连接方式 (图 6b)。

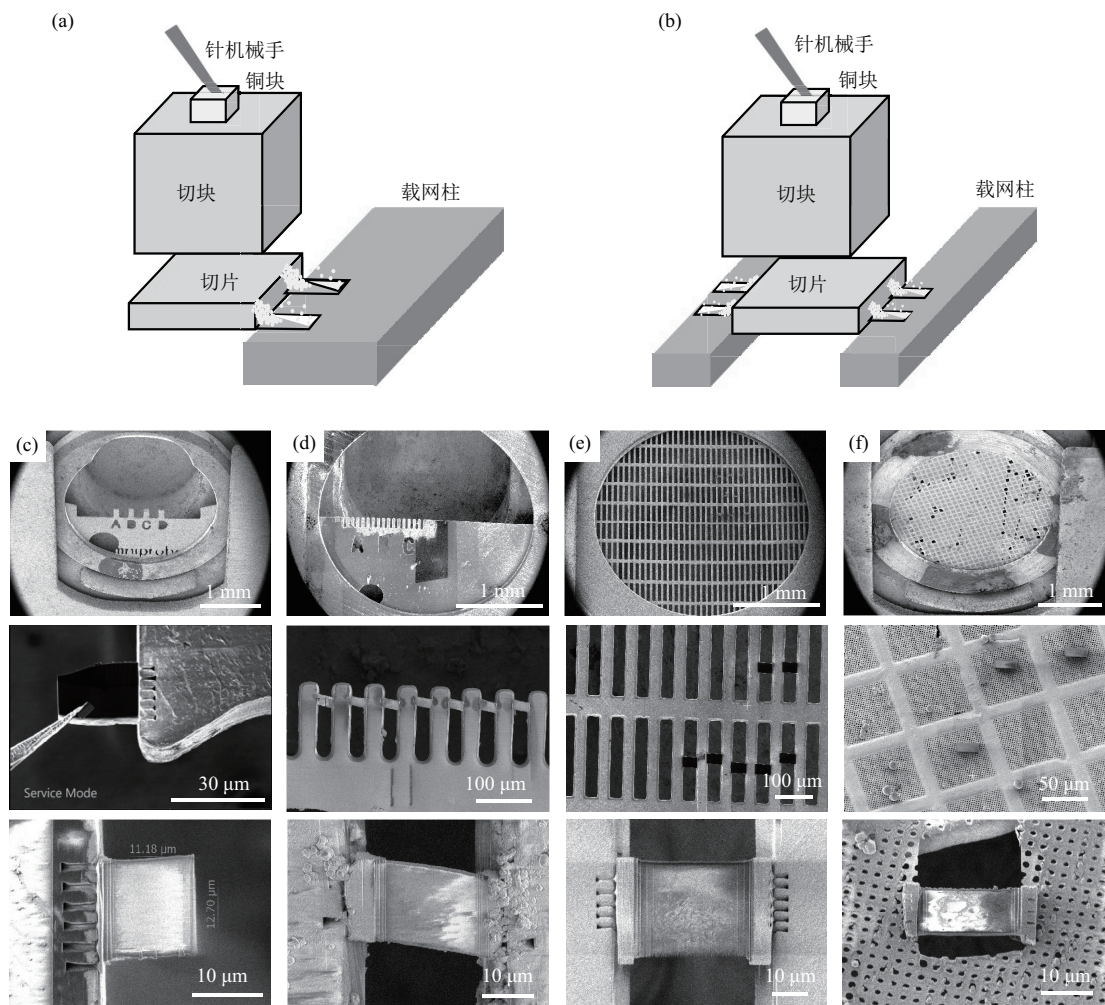


Fig. 6 Attachment methods between the sample chunk and support grid bar, along with cryo-lift-out successful cases by using different type of adaptor grids

图6 切块与承接载网之间的黏附方式和不同承接载网冷冻提取的成功案例

(a, b) 切片单边黏附以及两端黏附的示意图。四种承接载网及成功冷冻提取后的载网以及切片照片, 分别为: (c) 常规四齿半月形载网; (d) 北京大学冷冻电镜平台团队研制的高通量半月形载网; (e) 矩形铜网格载网; (f) 单颗粒金属膜载网。

在生命科学领域中, cryo-ET 技术对切片的要求与材料科学领域存在明显区别。Cryo-ET 的核心优势之一在于能够在近原生状态下解析细胞内部及其之间的超微结构与相互作用信息。由于细胞尺寸通常在微米级范围, 因此要求切片具备足够大的面积, 以完整包裹更多目标细胞结构。相比之下, 材料科学更侧重于原子尺度的高分辨率直接成像, 因此通常制备的切片面积较小。在数据采集方面, cryo-ET 需进行倾转系列成像, 典型倾转角度范围为 $\pm 65^\circ$, 而材料科学中受限于电子显微镜物镜极靴间距, 常规双倾转样品杆的倾转范围通常仅为 $\pm 30^\circ$ 左右。为适应 cryo-ET 的大角度倾转并避免电子束遮挡, 承载冷冻切片的载网需设计更长的凹槽结构。此外, 为满足冷冻提取技术的高通量操作需求, 载网还应支持多切片的同时黏附固定, 这对载网的几何设计、材料机械性能和整体稳定性都提出了更高要求。

作者对常用的 4 类载网进行了冷冻提取实验测试, 包括半月形四齿载网、作者自主设计的半月形多齿载网、商业化网格载网, 以及单颗粒技术常用载网。这 4 类载网各具特点, 分别适用于不同的实验场景与技术需求。如图 6c 所示, 作者采用单边连接方式成功制备了组织样品切片, 半月形四梳齿载网的每个梳齿边缘或顶部均可用于连接切片。该类载网虽为单边连接, 但通用性强, 特别适用于仅需单片提取的截面切片研究, 例如生物组织表面结构分析或能源材料表界面性能表征等。第二种为作者自行设计的载网 (图 6d), 其在继承半月形结构的基础上, 借鉴了材料科学中常用的两端连接策略, 并针对高通量实验需求作出优化, 可支持冷冻连续提取技术中多个切片的制备。第三种为 Schiotz 等^[26]在连续提取技术中提出的矩形铜网格载网 (图 6e), 该类载网具备更高的通量能力, 适用于大批量切片的制备。然而, 第二与第三种载网在实际使用中面临一个共同挑战: 将其载入双束 SEM 后, 难以确保其凹槽方向与离子束完全平行, 从而可能导致反沉积稳定性和效率下降。第四类巧妙利用了 cryo-EM 单颗粒技术中常用的金膜载网进行提取实验 (图 6f)。第二、三种载网网格间隙通常固定为 30 μm 左右, 难以满足小尺寸样品的实验需求, 而该种载网最大优势在于可适用于尺寸更小的细胞或组织样品。此外, 该类载网在装入电子显微镜时无需特别调整方向, 操作便捷性显著提升。针对第四类单颗粒载网, 作者测试了无定型碳膜微

栅载网、常规单颗粒多孔碳膜载网及单颗粒非晶金属膜载网冷冻提取的可行性。测试结果表明, 三者均能够完成多片连续提取任务, 但金属膜凭借更优的机械支撑性能, 成为更理想的选择, 因此在实验中多被采用。

4 讨 论

目前, 冷冻连续提取技术流程仍高度依赖人工操作, 尤其在机械手精确定位与切块黏附等关键步骤中, 对操作人员的经验有较高要求。这一局限性不仅制约了该技术的处理通量与实验可重复性, 也影响了其更广泛的推广应用。相比之下, 材料科学领域已实现常温样品的自动化提取, 大幅提升了切片制备的效率。然而, 在 cryo-FIB 系统中实现自动化提取仍存在诸多挑战。首先, 机械手与切块之间的黏附策略与材料科学中成熟方法存在显著差异, 是当前自动化发展的主要瓶颈。目前普遍采用的反沉积法虽成功率较高, 但连续提取技术还需引入额外铜块作为中介进行黏附, 增加了流程的复杂性与不确定性。其次, 冷冻生物组织样品与常规材料样品在物理性质上存在根本差异: 高压冷冻后的生物组织样品表面形态复杂、异质性强, 往往需依赖人工干预与经验判断进行识别和处理。因此, 为实现冷冻提取技术的全面自动化, 仍需进一步开展系统化的技术攻关与流程优化研究。

无论是载网上方法还是冷冻提取方法, FIB 减薄方法都存在一个显著缺点: 需要刻蚀并去除大量样品, 最终仅保留 100~200 nm 的薄片用于成像。然而, 对细胞或组织样品的研究往往需要获取更完整的三维结构信息, 这就要求在更小的尺度内进行更为密集的采样。Klumpe 等^[69]对冷冻体电子显微学技术 (volume electron microscopy, vEM) 与冷冻连续提取技术相结合进行了展望, 可利用 vEM 的三维成像能力, 获取被刻蚀区域的详细信息, 并由此实现精确定位, 从而准确减薄目标区域并制备出适用于高分辨率 cryo-ET 技术分析的切片。清华大学李雪明团队^[53]通过优化标准的二次电子成像模式, 给出了切片样品制备时对细胞内物质进行三维定位的方法, 为 vEM 和 cryo-ET 结合提供优化方法。另一种策略则致力于增加连续提取技术中相邻切片之间的空间覆盖率, 尽可能实现大体积连续切片。Brenner 等^[70]通过调节离子束的像散以控制束流尺寸, 成功实现了更密集的切片采样, 证明了基于冷冻连续提取技术的体积连续切片方案的可行

行性。

Cryo-ET 技术在动物组织中发展迅速, 但在植物组织中进展缓慢, 主要归因于一系列技术壁垒, 如植物细胞尺寸较大且以大液泡为主导的结构特点导致的玻璃化困难、样品高度异质性带来的靶向精度要求高, 以及高压冷冻与 cryo-FIB 减薄工作流程尚未在植物体系中成熟建立等问题。Pöge 等^[14]系统总结了适用于植物组织的 cryo-ET 样品制备工作流程, 并在多种植物材料中验证了其可行性, 展示了该方法特别是冷冻提取技术在植物原位结构研究中的巨大潜力, 有望推动植物 cryo-ET 研究的快速发展。

冷冻提取技术已成为连接冷冻样品制备与 cryo-ET 的关键环节, 在生命科学领域的应用日益广泛。尽管通过流程优化和设备改进, 该技术在通量、稳定性和标准化方面已取得显著进展, 但其操作仍高度依赖人工经验, 自动化程度有限, 极大限制了技术的可重复性与广泛应用。未来, 该技术发展应侧重于自动化操作与智能控制、高通量载网与仪器系统优化, 以及多模态原位成像技术的融合。这些方向的突破将有望实现更稳定、高效的组织样品制备, 并系统性地获取更大尺度的组织样品的原位连续结构信息, 为进一步完整揭示组织功能及生命过程提供结构基础。

参 考 文 献

- [1] Spence J C H. High-Resolution Electron Microscopy. Oxford, UK: Oxford University Press, 2013
- [2] Henderson R, Alsari M. History of cryo-EM. SciVPro, 2018, **1**(1): 1-4
- [3] Oikonomou C M, Jensen G J. The development of cryo-EM and how it has advanced microbiology. Nat Microbiol, 2017, **2**(12): 1577-1579
- [4] Xu B, Liu L. Developments, applications, and prospects of cryo-electron microscopy. Protein Sci, 2020, **29**(4): 872-882
- [5] Murphy G E, Leadbetter J R, Jensen G J. *In situ* structure of the complete *Treponema primitia* flagellar motor. Nature, 2006, **442**(7106): 1062-1064
- [6] Xue L, Lenz S, Zimmermann-Kogadeeva M, *et al.* Visualizing translation dynamics at atomic detail inside a bacterial cell. Nature, 2022, **610**(7930): 205-211
- [7] Ma S, Li L, Li Z, *et al.* *In situ* cryo-electron tomography reveals the progressive biogenesis of basal bodies and cilia in mouse ependymal cells. Nat Commun, 2025, **16**(1): 5932
- [8] Wu Y, Wang X, Meng L, *et al.* Translation landscape of stress granules. Sci Adv, 2025, **11**(40): eady6859
- [9] Mahamid J, Pfeffer S, Schaffer M, *et al.* Visualizing the molecular sociology at the HeLa cell nuclear periphery. Science, 2016, **351**(6276): 969-972
- [10] Guo Q, Lehmer C, Martínez-Sánchez A, *et al.* *In situ* structure of neuronal C9orf72 poly-GA aggregates reveals proteasome recruitment. Cell, 2018, **172**(4): 696-705.e12
- [11] Wu L, Wang J, Wang Y, *et al.* CLCC1 governs ER bilayer equilibration to maintain lipid homeostasis. Nature, 2026, **652**(8109): 471-480
- [12] Wu Y, Qin C, Du W, *et al.* A practical multicellular sample preparation pipeline broadens the application of *in situ* cryo-electron tomography. J Struct Biol, 2023, **215**(3): 107971
- [13] Creekmore B C, Kixmoeller K, Black B E, *et al.* Ultrastructure of human brain tissue vitrified from autopsy revealed by cryo-ET with cryo-plasma FIB milling. Nat Commun, 2024, **15**(1): 2660
- [14] Pöge M, Dickmanns M, Xu P, *et al.* Making plant tissue accessible for cryo-electron tomography. Elife, 2025. DOI: 10.7554/eLife.106455.1
- [15] Daraspe J, Bellani E, de Bellis D, *et al.* Targeted imaging of specialized plant cell walls by improved cryo-CLEM and cryo-electron tomography. Nat Commun, 2025, **16**(1): 11354
- [16] Liu Z, Liang Z, Liao M, *et al.* Electron microscopy-based three-dimensional subcellular imaging of plant male gametophyte. J Integr Plant Biol, 2026. DOI:10.1111/jipb.70143
- [17] Rice W J, Cheng A, Noble A J, *et al.* Routine determination of ice thickness for cryo-EM grids. J Struct Biol, 2018, **204**(1): 38-44
- [18] Bernhard W, Viron A. Improved techniques for the preparation of ultrathin frozen sections. J Cell Biol, 1971, **49**(3): 731-746
- [19] Turk M, Baumeister W. The promise and the challenges of cryo-electron tomography. FEBS Lett, 2020, **594**(20): 3243-3261
- [20] Al-Amoudi A, Studer D, Dubochet J. Cutting artefacts and cutting process in vitreous sections for cryo-electron microscopy. J Struct Biol, 2005, **150**(1): 109-121
- [21] Giannuzzi L A, Drown J L, Brown S R, *et al.* Focused ion beam milling and micromanipulation lift-out for site specific cross-section tem specimen preparation. MRS Online Proc Libr, 1997, **480**(1): 19-27
- [22] Yaguchi T, Urao R, Kamino T, *et al.* A FIB micro-sampling technique and a site-specific TEM specimen preparation method for precision materials characterization. MRS Online Proc Libr, 2001, **636**(1): 9351
- [23] Rigort A, Bäuerlein F J, Villa E, *et al.* Focused ion beam micromachining of eukaryotic cells for cryoelectron tomography. Proc Natl Acad Sci USA, 2012, **109**(12): 4449-4454
- [24] Rubino S, Akhtar S, Melin P, *et al.* A site-specific focused-ion-beam lift-out method for cryo Transmission Electron Microscopy. J Struct Biol, 2012, **180**(3): 572-576
- [25] Klumpe S, Kuba J, Schioetz O H, *et al.* Recent advances in gas injection system-free cryo-FIB lift-out transfer for cryo-electron tomography of multicellular organisms and tissues. Micros Today, 2022, **30**(1): 42-47
- [26] Schioetz O H, Kaiser C J O, Klumpe S, *et al.* Serial Lift-Out: sampling the molecular anatomy of whole organisms. Nat

- Methods, 2024, **21**(9): 1684-1692
- [27] Antoniou N, Graham A, Hartfield C, *et al.* Failure Analysis of Electronic Material Using Cryogenic FIB-SEM//ASM International. Proceedings of the ISTFA 2012: Conference Proceedings from the 38th International Symposium for Testing and Failure Analysis. Phoenix, Arizona USA: ASM, 2012: 399-405
- [28] Parmenter C D, Nizamudeen Z A. Cryo-FIB-lift-out: practically impossible to practical reality. J Microsc, 2021, **281**(2): 157-174
- [29] Li Y, Huang W, Li Y, *et al.* Opportunities for cryogenic electron microscopy in materials science and nanoscience. ACS Nano, 2020, **14**(8): 9263-9276
- [30] Li W, Weng S, Su D, *et al.* Expanding the cryogenic electron microscopy from biology to materials science. Renewables, 2024, **2**(1): 73-87
- [31] Harapin J, Börmel M, Sapra K T, *et al.* Structural analysis of multicellular organisms with cryo-electron tomography. Nat Meth, 2015, **12**(7): 634-636
- [32] Mahamid J, Schampers R, Persoon H, *et al.* A focused ion beam milling and lift-out approach for site-specific preparation of frozen-hydrated lamellas from multicellular organisms. J Struct Biol, 2015, **192**(2): 262-269
- [33] Schaffer M, Pfeiffer S, Mahamid J, *et al.* A cryo-FIB lift-out technique enables molecular-resolution cryo-ET within native *Caenorhabditis elegans* tissue. Nat Methods, 2019, **16**(8): 757-762
- [34] Zhang J, Zhang D, Sun L, *et al.* VHUT-cryo-FIB, a method to fabricate frozen hydrated lamellae from tissue specimens for *in situ* cryo-electron tomography. J Struct Biol, 2021, **213**(3): 107763
- [35] Wang S, Zhou H, Chen W, *et al.* CryoFIB milling large tissue samples for cryo-electron tomography. Sci Rep, 2023, **13**(1): 5879
- [36] Bäuerlein F J B, Renner M, El Chami D, *et al.* Cryo-electron tomography of large biological specimens vitrified by plunge freezing. bioRxiv, 2023. DOI:10.1101/2021.04.14.437159
- [37] Birtasu A N, Wieland K, Ermel U H, *et al.* The molecular architecture of the kidney slit diaphragm. bioRxiv, 2023. DOI: 10.1101/2023.10.27.564405
- [38] Zens B, Fäßler F, Hansen J M, *et al.* Lift-out cryo-FIBSEM and cryo-ET reveal the ultrastructural landscape of extracellular matrix. J Cell Biol, 2024, **223**(6): e202309125
- [39] Gilbert M A G, Fatima N, Jenkins J, *et al.* CryoET of β -amyloid and tau within postmortem Alzheimer's disease brain. Nature, 2024, **631**(8022): 913-919
- [40] Nguyen H T D, Perone G, Klena N, *et al.* Serialized on-grid lift-in sectioning for tomography (SOLIST) enables a biopsy at the nanoscale. Nat Methods, 2024, **21**(9): 1693-1701
- [41] Klumpe S, Senti K A, Beck F, *et al.* In-cell structure and snapshots of copia retrotransposons in intact tissue by cryo-ET. Cell, 2025, **188**(8): 2094-2110.e18
- [42] Tang X, Liu J, Zheng J, *et al.* Step-by-step procedure for an optimized serial lift-out cryo-focused ion beam milling technique in tissue analysis. Swwlxb, 2025, **11**: 1
- [43] Seliger R L, Ward J W, Wang V, *et al.* A high-intensity scanning ion probe with submicrometer spot size. Appl Phys Lett, 1979, **34**(5): 310-312
- [44] Overwijk M H F, van den Heuvel F C, Bulle-Lieuwma C W T. Novel scheme for the preparation of transmission electron microscopy specimens with a focused ion beam. J Vac Sci Technol B Microelectron Nanometer Struct Process Meas Phenom, 1993, **11**(6): 2021-2024
- [45] Leser V, Drobne D, Pipan Z, *et al.* Comparison of different preparation methods of biological samples for FIB milling and SEM investigation. J Microsc, 2009, **233**(2): 309-319
- [46] McDonald K L. Out with the old and in with the new: rapid specimen preparation procedures for electron microscopy of sectioned biological material. Protoplasma, 2014, **251**(2): 429-448
- [47] Marko M, Hsieh C, Schalek R, *et al.* Focused-ion-beam thinning of frozen-hydrated biological specimens for cryo-electron microscopy. Nat Methods, 2007, **4**(3): 215-217
- [48] Kelley K, Raczkowski A M, Klykov O, *et al.* Waffle Method: a general and flexible approach for improving throughput in FIB-milling. Nat Commun, 2022, **13**(1): 1857
- [49] Berger C, Dumoux M, Glen T, *et al.* Plasma FIB milling for the determination of structures *in situ*. Nat Commun, 2023, **14**(1): 629
- [50] Klein S, Wimmer B H, Winter S L, *et al.* Post-correlation on-lamella cryo-CLEM reveals the membrane architecture of lamellar bodies. Commun Biol, 2021, **4**(1): 137
- [51] Li S, Wang Z, Jia X, *et al.* ELI trifocal microscope: a precise system to prepare target cryo-lamellae for *in situ* cryo-ET study. Nat Methods, 2023, **20**(2): 276-283
- [52] Li W, Lu J, Xiao K, *et al.* Integrated multimodality microscope for accurate and efficient target-guided cryo-lamellae preparation. Nat Methods, 2023, **20**(2): 268-275
- [53] Lin C, Zhang L, Zhang Z, *et al.* Locating cellular contents during cryoFIB milling using cellular secondary-electron imaging. J Struct Biol, 2023, **215**(3): 108005
- [54] Zachs T, Schertel A, Medeiros J, *et al.* Fully automated, sequential focused ion beam milling for cryo-electron tomography. eLife, 2020, **9**: e52286
- [55] Klumpe S, Fung H K, Goetz S K, *et al.* A modular platform for automated cryo-FIB workflows. Elife, 2021, **10**: e70506
- [56] Klykov O, Bobe D, Paraan M, *et al.* *In situ* cryo-FIB/SEM specimen preparation using the waffle method. Bio Protoc, 2022, **12**(21): e4544
- [57] Zachman M J, Asenath-Smith E, Estroff L A, *et al.* Site-specific preparation of intact solid-liquid interfaces by label-free *in situ* localization and cryo-focused ion beam lift-out. Microsc Microanal, 2016, **22**(6): 1338-1349
- [58] Kuba J, Mitchels J, Hovorka M, *et al.* Advanced cryo-tomography workflow developments - correlative microscopy, milling automation and cryo-lift-out. J Microsc, 2021, **281**(2): 112-124
- [59] Du W, Yang J, Guo Q. Optimized tissue sample preparation for cryo-electron tomography using serial lift-out. Swwlxb, 2025, **11**: 1
- [60] Zachman M J, Tu Z, Choudhury S, *et al.* Cryo-STEM mapping of

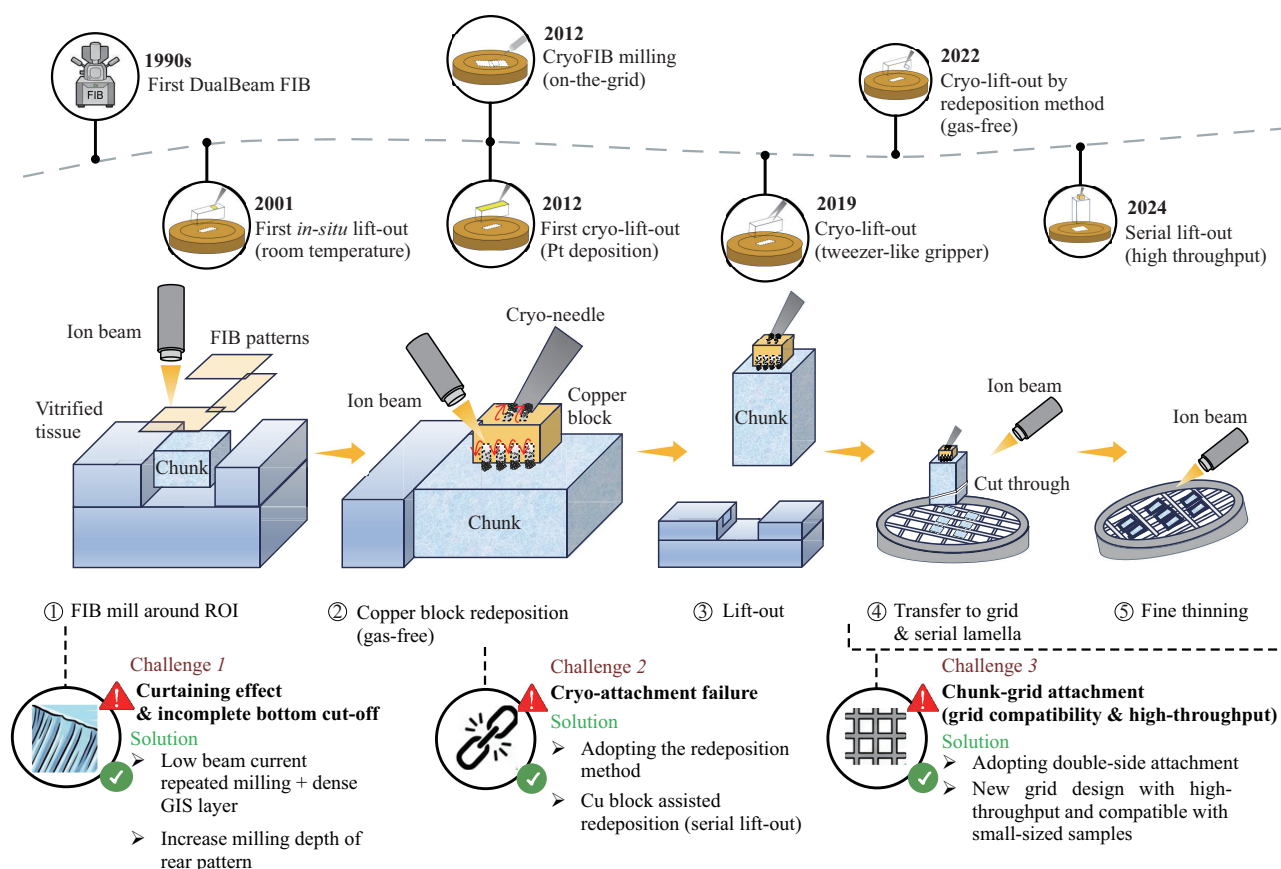
- solid-liquid interfaces and dendrites in lithium-metal batteries. *Nature*, 2018, **560**(7718): 345-349
- [61] Sezen M, Ow-Yang C, Karahan Ö, *et al.* Micro and nanostructural analysis of a human tooth using correlated focused ion beam (FIB) and transmission Electron microscopy (TEM) investigations. *Micron*, 2018, **115**: 17-24
- [62] Grandfield K, Vuong V, Schwarcz H P. Ultrastructure of bone: hierarchical features from nanometer to micrometer scale revealed in focused ion beam sections in the TEM. *Calcif Tissue Int*, 2018, **103**(6): 606-616
- [63] 秦昌东, 郭振玺, 郭强, 等. 冷冻双束提取透射电镜样品的新型高通量半月形载网: 中国, CN114486432B. 2023-09-29
Qin C, Guo Z, Guo Q, *et al.* Novel high-throughput half-moon grid for cryo-FIB lift-out of TEM samples: China, CN114486432B. 2023-09-29
- [64] Berger C, Premaraj N, Ravelli R B G, *et al.* Cryo-electron tomography on focused ion beam lamellae transforms structural cell biology. *Nat Methods*, 2023, **20**(4): 499-511
- [65] Schaffer M, Mahamid J, Engel B D, *et al.* Optimized cryo-focused ion beam sample preparation aimed at *in situ* structural studies of membrane proteins. *J Struct Biol*, 2017, **197**(2): 73-82
- [66] Wagner F R, Watanabe R, Schampers R, *et al.* Preparing samples from whole cells using focused-ion-beam milling for cryo-electron tomography. *Nat Protoc*, 2020, **15**(6): 2041-2070
- [67] Hayles M F, Stokes D J, Phifer D, *et al.* A technique for improved focused ion beam milling of cryo-prepared life science specimens. *J Microsc*, 2007, **226**(Pt 3): 263-269
- [68] Yamamura Y, Tawara H. Energy dependence of ion-induced sputtering yields from monatomic solids at normal incidence. *At Data Nucl Data Tables*, 1996, **62**(2): 149-253
- [69] Klumpe S, Schioetz O H, Kaiser C, *et al.* Developments in cryo-FIB sample preparation: targeting in cryo-lift-out preparation of tissues and machine learning models for fully automated on-grid lamella preparation. *Microanal*, 2023, **29**(Supplement_1): 511-513
- [70] Brenner J, Plitzko J M, Klumpe S. Exploring shaped focused ion beams for lamella preparation. *Ultramicroscopy*, 2026, **282**: 114302

Cryo-lift-out Technique for Cryo-electron Tomography of Tissue Samples*

QIN Chang-Dong, GUO Qiang**, GAO Ning**

(School of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871, China)

Graphical abstract



Abstract Cryo-electron tomography (cryo-ET) enables the determination of high-resolution three-dimensional structures of macromolecular complexes within cells in a near-physiological state, providing crucial structural insights into fundamental life processes. Cryo-ET has achieved landmark successes in single-cell models. However, many critical biological processes do not occur in isolated cells but emerge from intercellular coordination within tissues. Furthermore, many research subjects, including neural tissues, tumor biopsies, plant

* This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (32230051).

** Corresponding author.

GUO Qiang. Tel: 86-10-62751756, E-mail: guo.qiang@pku.edu.cn

GAO Ning. Tel: 86-10-62744236, E-mail: gaon@pku.edu.cn

Received: December 22, 2025 Accepted: April 9, 2026

tissues, and clinical pathological samples, cannot be obtained through single-cell culture and must be directly dissected from organisms or tissue blocks. Advancing cryo-ET from single-cell to tissue-level applications is therefore crucial for capturing the full complexity of biological activities in their native context. A major technical bottleneck for tissue cryo-ET lies in the preparation of sufficiently thin (<300 nm) lamellae from vitrified tissue specimens. Although high-pressure freezing can vitrify tissues up to 200 μm thick, these samples are far too thick for direct transmission electron microscopy imaging. Among the available thinning methods, cryo-focused ion beam (cryo-FIB) milling has emerged as the most promising approach, as it avoids the mechanical artifacts inherent to cryo-ultramicrotomy. However, conventional on-the-grid cryo-FIB milling is inefficient for thick tissues, requiring excessive milling time and discarding most of the sample. To overcome these limitations, cryo-lift-out has been developed—a technique in which a micromanipulator physically extracts a chunk of interest from deep within the tissue and transfers it to a dedicated grid for final thinning. This approach bypasses the thickness barrier and enables site-specific analysis of internal structures. This review systematically traces the evolution of cryo-lift-out from its origins in materials science to its adaptation for biological tissues. In room-temperature lift-out, reliable attachment is achieved by gas-injection system (GIS)-assisted metal deposition. Transferring this approach to cryogenic conditions proved challenging because precursor gases condense on all cold surfaces, leading to contamination and poor adhesion. The development of copper-assisted redeposition marked a critical turning point: instead of relying on gas deposition, this method uses ion-beam sputtering to deposit copper atoms at the needle-chunk interface, creating a strong, low-contamination bond. This innovation has enabled robust cryo-lift-out workflows and paved the way for serial lift-out, in which multiple consecutive lamellae are prepared from a single tissue chunk, substantially increasing throughput and enabling volumetric imaging. Despite these advances, several technical challenges remain. Curtaining effects caused by uneven chunk surfaces can introduce artifacts into tomograms, requiring careful optimization of milling parameters and protective coating. The cryo-adhesion step still demands precise control of beam angle, needle positioning, and milling depth, making the process highly operator-dependent. Additionally, the choice of grid geometry is critical. Custom-designed grids with double-sided attachment improves stability and offer better compatibility with cryo-ET tilt series. Automation, which has greatly improved room-temperature lift-out, has not yet been achieved for cryo-lift-out due to the complexity of handling heterogeneous biological tissues and the need for real-time adaptation. Future progress will likely focus on integrating cryo-lift-out with volume electron microscopy to correlate ultrastructure across scales, developing intelligent control systems to reduce user intervention, and extending the technology to challenging samples such as plant tissues and some material science samples for interface study. A systematic analysis of the cryo-lift-out technique clarifies the key limiting factors for its large-scale application and lays a foundation for methodological refinement and technological innovation. By consolidating recent advances and identifying remaining bottlenecks, this review aims to support the broader adoption of cryo-lift-out and accelerate the development of tissue-scale *in situ* structural biology.

Key words cryo-electron tomography, tissue, cryo-focused ion beam, cryo-lift-out

DOI: 10.3724/j.pibb.2025.0560

CSTR: 32369.14.pibb.20250560