

SBF-SEM による生体内 3 次元微細構造観察の試料作製とその応用

Application and Tissue Preparation of SBF-SEM for 3D Ultrastructural Analyses of Biological Specimens

大野 伸彦^{a, b}, 齊藤 成^a, 齊藤百合花^a, 大野 伸一^a

Nobuhiko Ohno, Sei Saitoh, Yurika Saitoh and Shinichi Ohno

^a山梨大学大学院医学工学総合研究部 解剖学講座分子組織学教室

^b自然科学研究機構 生理学研究所 多次元共同脳科学推進センター

要旨 Serial block-face scanning electron microscopy (SBF-SEM) は、組み込み式マイクロームによる表層切削と SEM による試料の断面観察とを交互に反復することにより、数百 μm^2 以上に及ぶ比較的広範囲の領域から、透過型電子顕微鏡による連続切片観察に類似した画像を、数 nm 程度の解像度で迅速に取得する新しい方法である。この SBF-SEM を用いる際は、観察時の試料のチャージングを低減すると同時に、観察像のコントラストを上げるために、試料調整過程におけるブロック電子染色が必要であり、また包埋やトリミング、観察条件などの最適化が重要である。SBF-SEM は神経組織のコネクトーム解析のみならず、様々な病態や遺伝子改変動物におけるオルガネラや細胞の形態を 3 次元的に解析する上で有用である。また分子標識法などと組み合わせることで、特定の分子を 3 次元組織構造中で同定できる。SBF-SEM は、従来の透過型電子顕微鏡観察では解析が困難であった生体内組織の 3 次元微細構造についての情報を得る新たな手法として、今後広く用いられていくと考えられる。

キーワード：SBF-SEM, ダイヤモンドナイフ, ブロック染色, 三次元再構築

1. はじめに

以前より、顕微鏡による細胞や組織の形態観察は医学・生物学の根幹を形成する基礎的技術であり続けてきた。特に 1930 年代の電子顕微鏡（電顕）の開発以降、数 nm–数十 nm 程度の解像度で細胞やオルガネラなどの微細構造を詳細に解析することにより、多くの重要な知見が蓄積されてきた。しかし、従来の透過型電顕による超薄切片の観察では、細胞やオルガネラの形態学的情報が 2 次元的に限られるため、細胞組織構造の同定や、複雑な細胞突起などの連続性の評価が難しい場合が少なくなかった。こうした問題を克服するために、透過型電顕による 3 次元超微形態学的解析においては、厚い切片での電子線トモグラフィーや連続超薄切片観察が行われてきた^{1,2)}。しかし電子線トモグラフィーでは Z 軸方向の観察領域の制限が大きいこと、また連続超薄切片観察では技術的な難易度が高く、多大な労力と時間が必要であることから、生物試料の一般的な微細形態解析に広く利用することは困難であった。最近、こうした背景を元にして、走査型電顕を用いて合成樹脂に包埋された生物組織の 3 次元微細構造を観察する方法が発展してきた。その一つである Serial block-face scanning electron microscopy (SBF-SEM) は、組

み込み式のマイクロームによる試料ブロックの表層切削と、SEM による試料ブロック断面の表層部観察とを交互に反復させることにより、透過型電顕による連続超薄切片観察に類似したデジタル画像を比較的広い領域から自動で取得する方法である。本稿では、まずこうした新しい技術を取り入れる際に参考になるように、SBF-SEM の背景や特徴、試料作製法について概説し、その後最近の具体的な応用例を紹介して、その意義について述べる。

2. SBF-SEM の開発

走査型電顕内において試料の切削を行って観察するという発想自体はそれほど新しいものではない。すでに 30 年ほど前の時点で、組み込み式のガラスナイフを使用して生物試料を切削し、露出した表面の染色もしくは導電処理を行った後、SEM を用いて 2 次電子像を観察する試みが報告されていた³⁾。しかしこの方法ではガラスナイフの耐久性の低さに加え、切削の厚みが平均 500 nm と精度が不十分であったこと、生物試料の処理方法が不適切であるために十分な解像度が得られなかったことなどがあり、ほとんど利用されることはなかった。その転機となったのは 1990 年代に入り、SEM を用いた樹脂包埋試料の観察法が報告されたことであった^{4,5)}。これらの報告から、導電染色を行い、樹脂包埋された生物試料ブロックの表面から SEM で反射電子を検出することによって、ブロック表面近傍の情報を反映した透過型電顕観察

^a 〒409-3898 山梨県中央市下河東 1110

E-mail: nohno@yamanashi.ac.jp

2014 年 8 月 25 日受付

による超薄切片像に類似したデジタル画像を取得できることが明らかになった。

こうした背景をもとにして、最近開発された方法が SBF-SEM である⁶⁾。この SBF-SEM では、特別仕様のダイヤモンドナイフを走査型電顕の鏡体内に組み込むことによって、切削の精度と耐久性が高められている。そして SEM による樹脂ブロックの断面観察と表層切削を自動で反復することによって (図 1)、数百枚から数千枚の透過型電顕観察像に類似した連続断面デジタル画像を樹脂包埋された生物試料断面から取得する方法が確立されたのである。現在、SBF-SEM による画像取得は、一般的に Gatan 社によって商用化された 3View と呼ばれるマイクローム、ディテクターおよびそれらの制御装置が組み込まれたユニットを走査型電顕に装着して行うことができる。

3. SBF-SEM 用の試料の作製法と注意点

SBF-SEM などの SEM を用いた試料ブロック断面の観察法においては、合成樹脂に包埋された生物ブロックの導電性が最終的な画像データの質に大きく影響するため、その試料作製法は透過型電顕の試料作製法とは異なる。このような観察法では、固定された生物試料を合成樹脂に包埋し、ダイヤモンドナイフを用いた切削などによりブロックの表面に露出させて直接観察する。そのため試料の包埋前に比較的強い電子染色を行った方が、観察時の試料ブロック表面のチャージアップを軽減し、かつ画像のコントラストを上げることができる。こうした試料作製法は既に確立されており^{7,8)}、ここではその一連の処理行程について概説する (図 1)。

試料の前固定では、一般的に用いられているパラホルムアルデヒドやグルタルアルデヒドを含む緩衝固定液が用いられる。この緩衝液としては、一般的に試料の保存状態を向上させる目的で 0.1 M カコシル酸緩衝液 (pH 7.4) が使用されるが、ヒ素を含むために取扱いに注意が必要である。また一部代替法として、前固定時にリン酸緩衝液を使用し、その後カコシル酸緩衝液で洗浄することもできる。次に後固定では四酸化オスミウムを用いるが、オスミウムの沈着量を増やし、生物試料の導電性と最終的な画像のコントラストを高める目的で、オスミウム-チオカルボヒドラジド-オスミウム法 (OTO 法) がよく用いられる⁹⁾。また、四酸化オスミウム処理の際にフェロシアン化カリウムにより還元されたオスミウムを用いると、膜のコントラストを高められることが知られており、ターゲットとする構造に応じてこれらを併用すると効果的である¹⁰⁻¹²⁾。後固定の後、酢酸ウランやアスパラギン酸鉛によるブロック染色を行い、アルコールによる脱水の後合成樹脂に包埋する^{13,14)}。酢酸ウランやアスパラギン酸鉛は、pH による染色性の変化が起こりやすいので注意が必要である^{13,14)}。また、樹脂の重合状態は良好な切削の成否に直結するため、合成樹脂の調整や不完全な熱重合にも注意する必要がある。試料ブロックができたなら、厚切り切片の光学顕微鏡観察から観察部位を選択して、トリミング後、

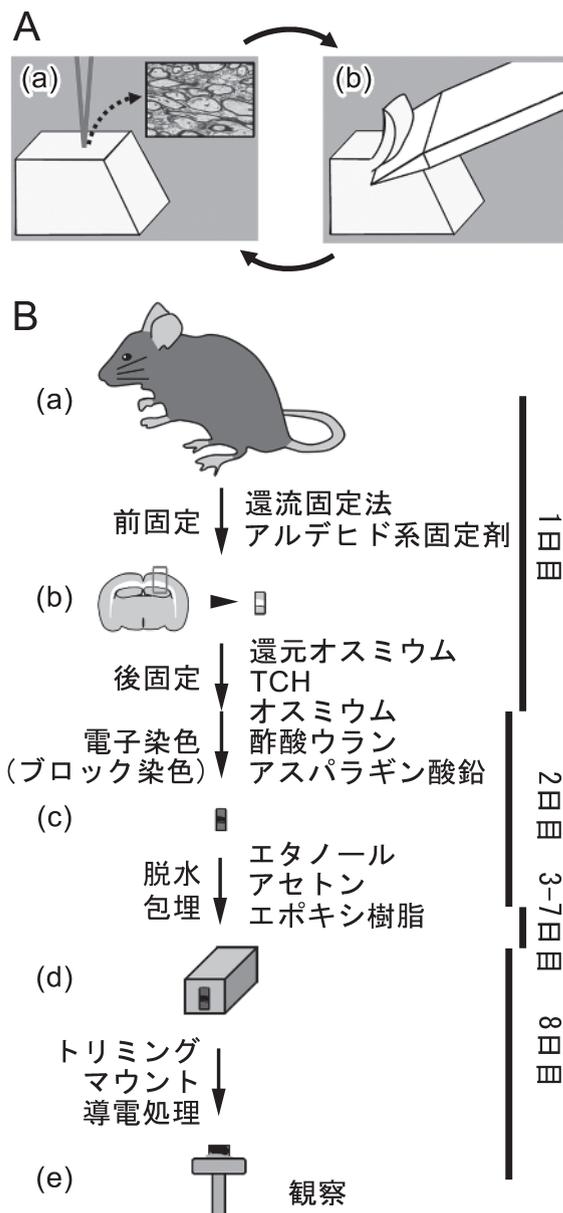


図 1 SBF-SEM 用試料作製と観察の概要。(A) SBF-SEM では試料ブロック表面の観察 (a) と試料ブロック表層の切削 (b) を反復することで、連続断面画像を取得する。(B) 実験動物・試料は前固定された後、四酸化オスミウム (OTO 法) による後固定、ウランと鉛のブロック染色による電子染色を経て、脱水後に合成樹脂に包埋される。包埋された試料ブロックはトリミングされ、試料台に導電性接着剤でマウントされた後、金蒸着などにより導電処理を施されて、SEM 観察が可能となる。エポキシ樹脂の重合に 3 日間を要した場合、前固定から SEM 観察まで、約 8 日間程かかる。TCH: チオカルボヒドラジド。

SBF-SEM 専用の試料台に導電性樹脂の接着剤でマウントする。そして、金蒸着もしくは銀ペースト塗布などにより試料周囲の導電性を高めた後、SBF-SEM にセットして試料の観察が可能になる。以上の一連の試料調整には、樹脂の重合に要する時間にも左右されるが、少なくとも約 1 週間程度を要する (図 1)。

SBF-SEMでは、ダイヤモンドナイフでの切削面積は約 1×1 mm程度であるため、それより狭い任意のサイズの断面が観察可能となる。しかし、一般的に試料サイズが小さい(切削される面積が小さく、試料台からの試料ブロックの高さが低い)ほど、SEM観察時の試料のチャージアップは起こりにくい傾向がある。また、血管、尿管などの管腔が多い組織では、相対的に樹脂の占める割合が高く、チャージアップと電子線による試料ダメージが引き起こされやすい。SBF-SEMの試料作製では、こうした装置の特性や観察する試料、目標とする構造の特徴などを考慮した上で、必要な解像度に応じて、包埋・染色・トリミングの方法や観察条件を最適化する必要がある。

4. SBF-SEMの観察法と注意点

SBF-SEMでは比較的容易に大容量のデータを自動で取得

することが可能である。したがって、不必要なデータでハードディスクがいっぱいにならないように、研究目的に応じて適切な解像度やブロック組織の観察範囲を事前に設定することが肝要である(図2)。一定容積の組織の撮像に必要な時間とデータ容量は、主に1 pixelのサイズ(1枚の画像上の解像度)と切削の厚さ(深さ方向の解像度)、撮像速度、試料切削時のナイフの速度に依存する。デジタル画像取得の際に1 pixelあたりに費やす時間(dwelling time)が長いほど(つまり撮像速度が遅いほど)、撮像に長時間を要し、また試料への電子線照射量は増加するが、その一方でシグナル・ノイズ比を向上させることができる。例えば、3View 2XPを使用して 4000×4000 pixelsのデジタル画像を撮像する場合は、画像1枚の取得に $1 \mu\text{sec}/\text{pixel}$ の観察速度では約16秒かかり、 $2 \mu\text{sec}/\text{pixel}$ では約32秒が必要である。画像の解像度の設定はさらにデータ取得の速度とデータ容量に影響するため、よ

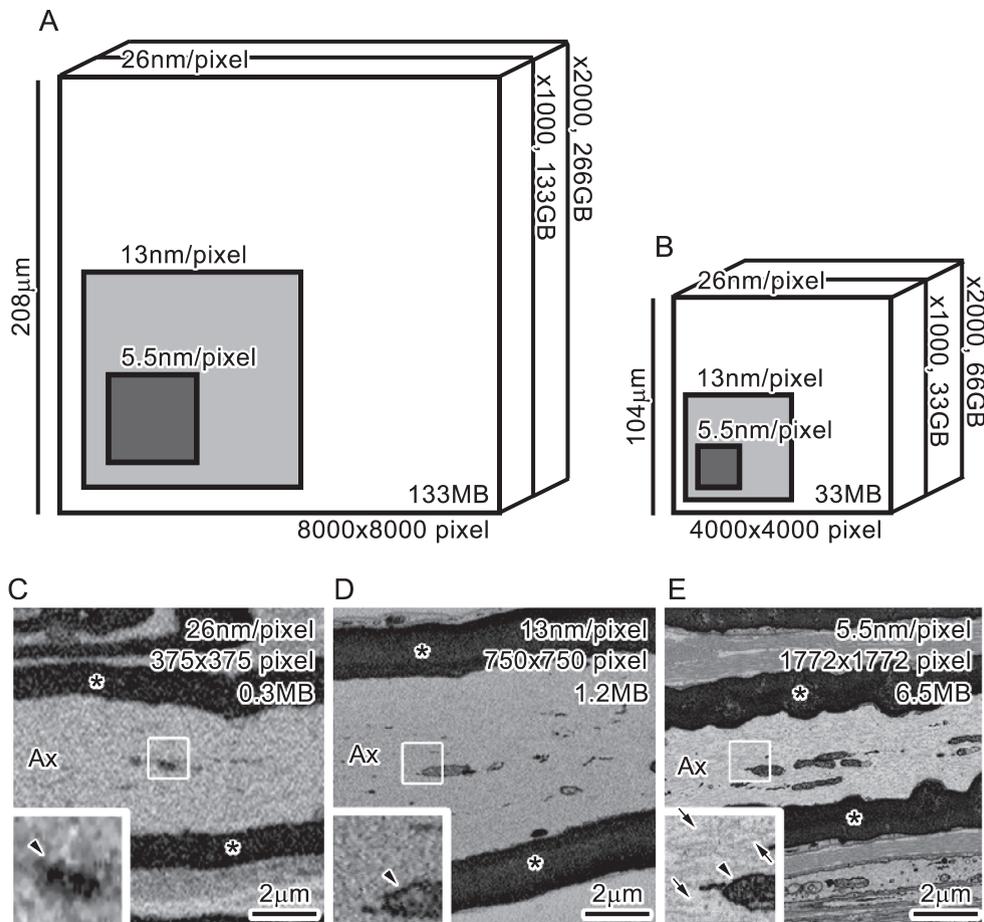


図2 撮像条件の違いによるSBF-SEM観察像の変化。(A, B) 同じ解像度で撮像した場合(白: 26 nm/pixel), 画素数が多い(A: 8000×8000 pixel, B: 4000×4000 pixel)方が、広い領域(A: $208 \times 208 \mu\text{m}^2$, B: $104 \times 104 \mu\text{m}^2$)を観察できる。一方、同じ画素数(A: 8000×8000 pixel, B: 4000×4000 pixel)で撮像した場合、解像度が高くなるほど(白: 26 nm/pixel, 淡灰: 13 nm/pixel, 濃灰: 5.5 nm/pixel), 1枚あたりのデータサイズは同じであるが(A: 133 MB, B: 33 MB), 相対的な撮像範囲が狭くなる。また総撮像枚数に比例して総データ量は増加する(A: 133 GB/1000枚, 266 GB/2000枚, B: 33 GB/1000枚, 66 GB/2000枚)。(C-E) 解像度が高くなるに従い(C: 26 nm/pixel, D: 13 nm/pixel, E: 5.5 nm/pixel), マウス坐骨神経組織の髄鞘(*)のみならず、ミトコンドリア(矢頭)や線状の細胞骨格(矢印)がより明瞭に観察されるが、同じ大きさ(約 $10 \times 10 \mu\text{m}$)の範囲の撮像に必要な画素数(C: 375×375 pixels, D: 750×750 pixels, E: 1772×1772 pixels)とデータ容量(C: 0.3 MB, D: 1.2 MB, E: 6.5 MB)が増加する。

り注意深く決定する必要がある。同じピクセル数の画像を撮像する場合、高解像度の（1 pixel 当たりの長さが短い）ほうが、画像1枚あたりの観察領域が狭くなってしまふ（図2A, B）。例えば解像度 26 nm/pixel では 4000 × 4000 pixels の画像1枚あたりで 104 × 104 μm²、8000 × 8000 pixels では 208 × 208 μm² の範囲が撮像可能であるが、一方 5.5 nm/pixel の解像度で撮像される画像1枚当たりの範囲は、4000 × 4000 pixels ではわずか 22 × 22 μm² となり、8000 × 8000 pixels でも 44 × 44 μm² に限られる（図2A, B の濃灰）。また解像度は構造の同定に直接影響を及ぼすため、その設定の際には対象としていゝる構造を考慮して決定する必要がある（図2C-E）。例えば、弱拡大での髄鞘や細胞などの概形の観察なら 10–20 nm/pixel 程度で十分であるが、細胞骨格などを含む細胞内微細構造の高拡大での観察には 5 nm/pixel 前後が必要である。一方、試料ブロックの深さ（Z 軸）方向の解像度は、切削厚によって決められ、SBF-SEM では通常は >20 nm の範囲で観察対象の構造に応じて設定される。特に薄い切削厚の場合には、同じ切削回数で撮像できる深さ方向の長さが短くなることに加えて、安定した切削を連続して行うために、切削速度を十分遅くする必要があるのであるため、試料全体の撮像時間が長くなることが多い。

SBF-SEM で長時間にわたって自動的にデータを取得するためには、機器の設置環境、撮像条件の変化に特に気を付ける必要がある。例えば、SBF-SEM 稼働時の室内温度を適切に管理して、昼夜を通して大きな温度変化が起こらないようにすべきであり、また撮像開始前に数時間かけて、チャンパー内の真空度を安定化させるなどの工夫が必要になる場合もある。

その他、SBF-SEM による観察法で問題となる点について述べる。SBF-SEM では比較的広い領域を切削・観察することが可能なために、前述したようにチャージングの影響を受けやすく、撮像の際にはいくつかの典型的なアーチファクト（画像コントラストの低下、観察像のゆがみや移動など）がみられることがある。また合成樹脂の電子線照射に伴う熱ダメージによって、樹脂の切削障害が起こることがある。これは、例えば不均一な切削や試料ブロック表面の割れ・亀裂などであり、こうした問題は正常な撮像を困難にするとともに、ダイヤモンドナイフの劣化を早める可能性があるため、できる限り避ける必要がある。具体的には、撮影条件の再検討（加速電圧や解像度の低減、dwelling time の短縮など）、あるいは試料ブロックの再トリミングによる試料サイズの縮小などの対策が考えられる。

撮像時の加速電圧の設定は、画像の質に特に大きな影響を及ぼす。SEM による樹脂包埋試料の観察に関する初期の報告でも、加速電圧を上げることで試料ブロック表面からさらに深い部位の組織からも情報を取得できることが示された^{4,5}。このように加速電圧を上げることによって、画像のコントラストを上げることが可能であるが、一方で解像度が悪くなることに加えて、電子線照射に伴うエポキシ樹脂の熱

ダメージの増加や切削不良を引き起こすことが多いために、過剰な加速電圧の上昇は避ける必要がある。

得られた画像データの基本的な処理は、一般に Fiji (Image J, <http://fiji.sc/Fiji>) などの画像解析ソフトを用いて行うことができる。コンピューターの使用可能なメモリ容量に比較して取得したデータ量（通常数 10 GB）が大きい場合は、デジタル画像データの圧縮処理（16 bit → 8 bit 変換、解像度低減、切り取りなど）によって、取り扱うデータ量を小さくするなどの対策が必要である。また、必要に応じて画像間の位置ズレや画像輝度や画質の補正などを行う。その後、解析対象となる任意の構造を抽出するセグメンテーションと呼ばれる作業を行う。現在もっとも多くの時間が、このセグメンテーションに費やされる。マニュアル（手動）もしくはセミオート（半自動）によるセグメンテーションのためのソフトは、Reconstruct, TrakEM2 などの無料のものを含め^{15,16}、多数の選択肢がある。一方、オート（自動）セグメンテーションソフトの開発も進められている¹⁷。さらに、セグメンテーションをゲーム化して公開することで、より多くの人にセグメンテーションに参加してもらうような実験的な試みも行われている¹⁸。

5. SBF-SEM の応用と有効なターゲット

既に述べたように、SBF-SEM により得られる画像は従来の透過型電顕による画像に類似しており、またオスミウム処理を用いることにより脂質膜が高コントラストで描出される。そのため、細胞全体や膜性オルガネラの超微形態を観察する上で非常に有効である。そして自動で得られた多数の連続断面画像から立体再構築を行うことで、3次元微細構造の詳細な解析を行うことができる。こうした特徴から、SBF-SEM は神経細胞間のシナプス形成の解析をはじめとする、いわゆる“コネクトーム解析”に広く応用されている^{19–22}。こうしたアプローチによる複雑な中枢神経系シナプスの網羅的解析は、今後神経系の情報処理に関する詳細な理解をもたらすブレイクスルーになることが期待されている。このようなことをふまえて、切削可能な試料範囲の拡大やチャージアップの軽減につながる試みが報告されてきている^{23,24}。こうした改良が応用されれば、今後の大規模な組織領域における神経ネットワークの微細構造解析において、SBF-SEM がさらに有効な手段になりうる。

一方、SBF-SEM は細胞形態の解析のみならず、ミトコンドリアや小胞体、ライソゾームなどの膜性オルガネラの分布や形状の描出にも有用である。例えば、遺伝子改変動物や複数の病態下における神経細胞とグリア細胞、さらにこれらの細胞内オルガネラの形状を比較する研究でも用いられている。例えば、マウスを用いた炎症性脱髄疾患モデルの詳細な解析では、血液中の単球由来マクロファージが軸索を被覆する髄鞘を引き剥がすことで、脱髄において主導的な役割を果たしている可能性が示唆された²⁵。さらに、SBF-SEM を遺伝子改変マウスにおける脱髄病変モデルに用いることで、ミトコンドリアと細胞骨格の相互作用が、脱髄に伴うミトコン

ドリアの分布変化と軸索の生存に重要な役割を果たしていることが示された²⁶⁾。また、広い範囲の細胞外基質の形態、線維配列や分布を解析する上でも、SBF-SEMは有用である²⁷⁾。例えば、コラーゲン線維の直径などの形態学的特徴を、SBF-SEMで得られたデータから半自動的に計測する方法が研究されている²⁸⁾。

最後に、SBF-SEMによる観察では、特定の生体内分子を標識する方法も用いられている。こうした分子標識のための蛋白分子として、光学顕微鏡による蛍光観察との併用にも利用可能なminiSOGや、DAB-オスミウムによる可視化に蛍光照射が不要なAPEXなどが開発されている^{29,30)}。このような標識技術を併用することによって、3次元構造中における特定の分子の分布を明らかにすることや、標識された特定の細胞形態やオルガネラの形状と分布を解析することが可能になってきている³¹⁾。

6. 終わりに

以上のように、生物試料の作製や観察時に注意すべき点があるが、SBF-SEMは迅速に自動で連続断面画像を取得し、3次元再構築して生体組織の微細構造を立体的に解析する上で非常に有用な方法である。20世紀後半に普及した電顕観察は、その後の技術の発展に伴って2次元から3次元解析へと変化し、得られる情報が急速に増加している。今後は、大量データの解析技術の発達にも伴って、さらにその有用性が高まると考えられる。SBF-SEMは様々な生体組織の3次元微細構造解析を高いスループットで行うことのできる方法であることから、これまでの透過型電顕による超薄切片観察では得ることが困難であった動物生体内の超微形態学的情報を解析する有効な方法として、今後益々広く用いられていくと考えられる。

文 献

- Baumeister, W.: *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **12**, 679–684 (2002)
- Harris, K.M., Perry, E., Bourne, J., Feinberg, M., Ostroff, L. and Hurlburt, J.: *J. Neurosci.*, **26**, 12101–12103 (2006)
- Leighton, S.B.: *Scan. Electron Microsc.*, 73–76 (1981)
- Richards, R.G. and Gwynn, I.A.: *J. Microsc.*, **177**, 43–52 (1995)
- Wergin, W.P., Yaklich, R.W., Roy, S., Joy, D.C., Erbe, E.F., Murphy, C.A. and Pooley, C.D.: *Scanning*, **19**, 386–395 (1997)
- Denk, W. and Horstmann, H.: *PLoS Biol.*, **2**, e329 (2004)
- Deerinck, T.J., Bushong, E.A., Lev-Ram, V., Shu, X., Tsien, R.Y. and Ellisman, M.H.: *Microsc Microanal.*, **16**, 1138–1139 (2010)
- Tapia, J.C., Kasthuri, N., Hayworth, K.J., Schalek, R., Lichtman, J.W., Smith, S.J. and Buchanan, J.: *Nat. Protoc.*, **7**, 193–206 (2012)
- Seligman, A.M., Wasserkrug, H.L. and Hanker, J.S.: *J. Cell Biol.*, **30**, 424–432 (1966)
- De Bruijn, W.C.: 4th European Regional Conference on Electron Microsc., Rome, 65 (1968)
- Karnovsky, M.J.: 11th Meeting Am Soc Cell Biol, New Orleans, LA, 146 (1971)
- Willingham, M.C. and Rutherford, A.V.: *J. Histochem. Cytochem.*, **32**, 455–460 (1984)
- Hayat, M.A.: *Principles and techniques of electron microscopy*. 3 ed., Cambridge University Press, New York, (1989)
- Walton, J.: *J. Histochem. Cytochem.*, **27**, 1337–1342 (1979)
- Fiala, J.C.: *J. Microsc.*, **218**, 52–61 (2005)
- Cardona, A., Saalfeld, S., Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Preibisch, S., Longair, M., Tomancak, P., Hartenstein, V. and Douglas, R.J.: *PLoS ONE*, **7**, e38011 (2012)
- Kreshuk, A., Straehle, C.N., Sommer, C., Koethe, U., Cantoni, M., Knott, G. and Hamprecht, F.A.: *PLoS ONE*, **6**, e24899 (2011)
- Kim, J.S., Greene, M.J., Zlateski, A., Lee, K., Richardson, M., Turaga, S.C., Purcaro, M., Balkam, M., Robinson, A., Behabadi, B.F., Campos, M., Denk, W. and Seung, H.S.: *Nature*, **509**, 331–336 (2014)
- Briggman, K.L., Helmstaedter, M. and Denk, W.: *Nature*, **471**, 183–188 (2011)
- Helmstaedter, M., Briggman, K.L., Turaga, S.C., Jain, V., Seung, H.S. and Denk, W.: *Nature*, **500**, 168–174 (2013)
- Holcomb, P.S., Hoffpauir, B.K., Hoyson, M.C., Jackson, D.R., Deerinck, T.J., Marrs, G.S., Dehoff, M., Wu, J., Ellisman, M.H. and Spiro, G.A.: *J. Neurosci.*, **33**, 12954–12969 (2013)
- Wilke, S.A., Antonios, J.K., Bushong, E.A., Badkoobehi, A., Malek, E., Hwang, M., Terada, M., Ellisman, M.H. and Ghosh, A.: *J. Neurosci.*, **33**, 507–522 (2013)
- Mikula, S., Binding, J. and Denk, W.: *Nat. Methods*, **9**, 1198–1201 (2012)
- Titze, B. and Denk, W.: *J. Microsc.*, **250**, 101–110 (2013)
- Yamasaki, R., Lu, H., Butovsky, O., Ohno, N., Rietsch, A.M., Cialic, R., Wu, P.M., Doykan, C.E., Lin, J., Cotleur, A.C., Kidd, G., Zorlu, M.M., Sun, N., Hu, W., Liu, L., Lee, J.C., Taylor, S.E., Uehlein, L., Dixon, D., Gu, J., Floruta, C.M., Zhu, M., Charo, I.F., Weiner, H.L. and Ransohoff, R.M.: *J. Exp. Med.*, **211**, 1533–1549 (2014)
- Ohno, N., Chiang, H., Mahad, D.J., Kidd, G.J., Liu, L., Ransohoff, R.M., Sheng, Z.H., Komuro, H. and Trapp, B.D.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **111**, 9953–9958 (2014)
- Young, R.D., Knupp, C., Pinali, C., Png, K.M., Ralphs, J.R., Bushby, A.J., Starborg, T., Kadler, K.E. and Quantock, A.J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **111**, 687–692 (2014)
- Starborg, T., Kalson, N.S., Lu, Y., Mironov, A., Cootes, T.F., Holmes, D.F. and Kadler, K.E.: *Nat. Protoc.*, **8**, 1433–1448 (2013)
- Shu, X., Lev-Ram, V., Deerinck, T.J., Qi, Y., Ramko, E.B., Davidson, M.W., Jin, Y., Ellisman, M.H. and Tsien, R.Y.: *PLoS Biol.*, **9**, e1001041 (2011)
- Martell, J.D., Deerinck, T.J., Sancak, Y., Poulos, T.L., Mootha, V.K., Sosinsky, G.E., Ellisman, M.H. and Ting, A.Y.: *Nat. Biotechnol.*, **30**, 1143–1148 (2012)
- Boassa, D., Berlanga, M.L., Yang, M.A., Terada, M., Hu, J., Bushong, E.A., Hwang, M., Masliah, E., George, J.M. and Ellisman, M.H.: *J. Neurosci.*, **33**, 2605–2615 (2013)