

## 原位细胞3D切割成像技术成功应用于青鳞胚胎组织的单细胞提取

单细胞的原位组织提取一直以来都是一项十分困难的工作，这主要受制于组织之间连接致密难以消化，而机械力往往很难精确地将单个细胞与组织完整的分离。激光切割具有传统切割技术所难以匹及的切割精度，是目前一种比较理想的切割手段，因此围绕激光切割技术的相关显微产品也孕育而生，并在科研领域中越来越受到关注。但是激光切割也有其局限性，首先显微激光切割往往要从表面开始，无法对深层组织进行切割；另一方面激光的光源往往采用紫外激光光源，这种类型的光源很容易造成组织灼伤，从而影响切割下来样品的品质，因此激光切割的应用发展也受到了诸多限制。

如今ROWIAK公司推出的一款全新的单细胞分离系统有望解决这一难题。它采用了近红外双光子激光切割技术，在保留了激光切割精度优势的同时，采用近红外波长的激光从而避免了激光灼伤中对组织灼烧的问题。因此能够实现精准的原位组织中的单个细胞的分离。

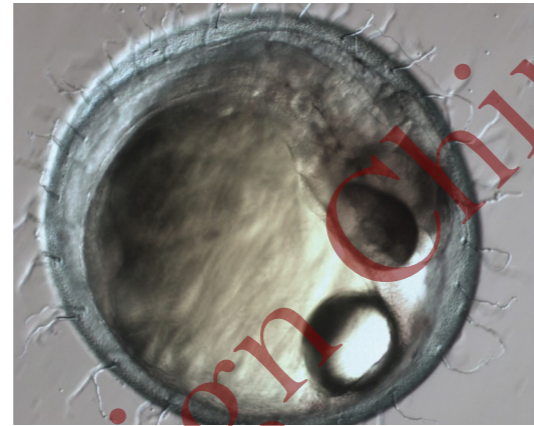


图2: 发育中的青鳞胚胎

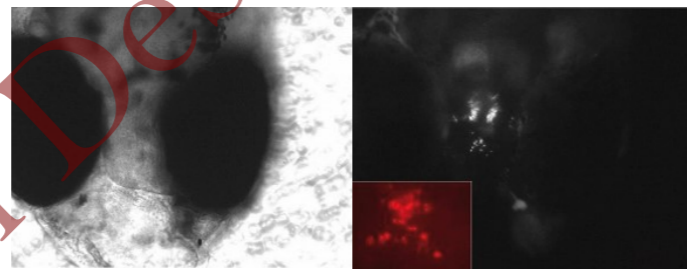


图3: 青鳞胚胎中感知神经中表达mcherry的细胞成像

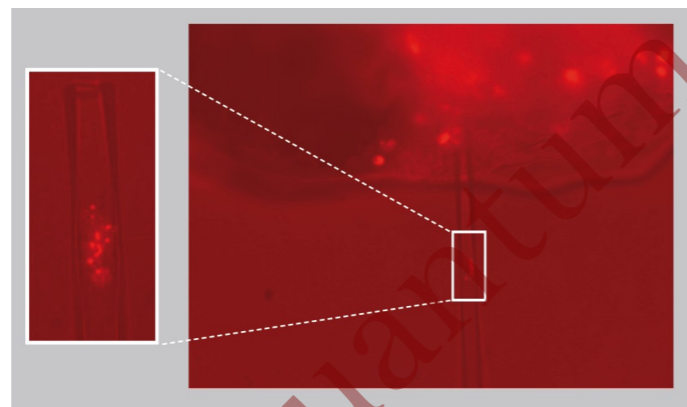


图4: 从青鳞胚胎中分离特定表达mcherry的细胞团

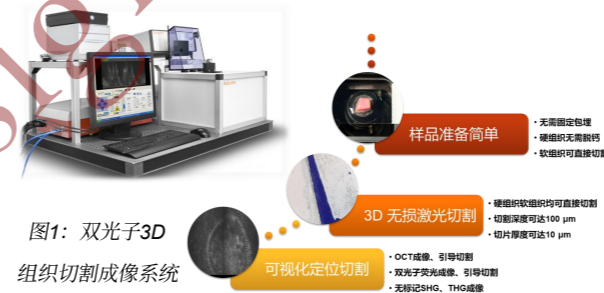
### 参考文献:

- Wittbrodt, J. et al. Medaka — a model organism from the Far East. Nature Reviews Genetics 3, 53-64.  
Yamamoto, T. (ed.) MEDAKA (Killifish): Biology and strains. Yamamoto, T. (ed.) Keigaku Pub. Co., Tokyo, 1975, pp.365.  
Kristin Tessmar-Raible et al. Removal of fluorescently-labeled sensory-neurosecretory cells from forebrain of transgenic Medaka embryos, focusonmicroscop. 2011.

作者: 胡西博士

## 双光子显微切割系统带你领略硬组织切割的高效新玩法

硬组织的病理观测对于研究骨骼、牙齿等器官疾病的发展具有很重要的意义。但是硬组织由于其本身硬度大难以被传统的薄片切割机直接切割，因此在切割之前往往需要脱钙处理，使其软化以达到刀片所能够承受的硬度范围内进行切割。但是钙质作为骨骼和牙齿的组成部分，进行脱钙将不可避免的丢失所研究器官中的信息，尤其是在含钙量高的牙釉质等部位中。同时，钙在早期硬组织愈合如骨质修复、骨创伤愈合等过程中也起着重要作用。另外脱钙还不可避免的改变硬组织的形貌，诸如厚度变化、褶皱、软硬组织分离等问题。因此寻找无需脱钙的切割方法对于研究硬组织研究是十分必要的。随着激光技术的发展，这一难题有望得到解决。对于刀片切割来说，受到刀片材料本身的限制，无法切割比刀片更硬的物体，但是这个困难在激光切割中并不存在。然而激光切割也有其缺点：首先作为一种高能光束，其本身蕴含的能量较高容易灼伤物体表面，从而影响切割效果；另外受到激光在穿透物体时将不可避免的被所穿透物体中的组分散射，从而限制了激光切割的深度。近几年发展较为迅速的双光子聚焦技术给激光3D切割带来了新的可能。



双光子切割具有如下优势：首先双光子能够穿透一定深度的样品，因此能够直接在物体内部进行切割，进而实现对组织深层区域的切割；其次双光子的聚焦点能够精准控制，可实现以往切割设备不能实现的3D切割；另外双光子一般采用近红外激光作为激发光源，这类激光往往拥有最佳穿深并且对于蛋白的吸收较低，基本不会灼伤样品。最后双光子切割相比于传统打磨方法来说更为精准，样品的损失更少。

在制样上来说，双光子切割也十分简单。根据目前文献上主要采用的方法可以总结为：首先使用甲醛固定，然后使用PMMA包埋，接下来使用双光子激光切割设备切割，经过简单打磨后，就可以染色压片了。这比起传统的硬组织切割步骤更为简单，制备时间更短。并且制备效果比传统方法更优。

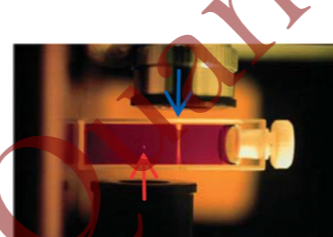


图2: 双光子VS单光子

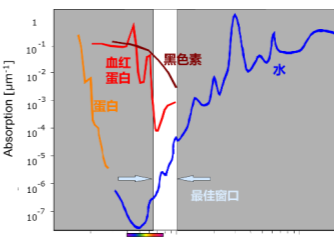


图3: 近红外激光光源

### 观察骨组织的修复过程

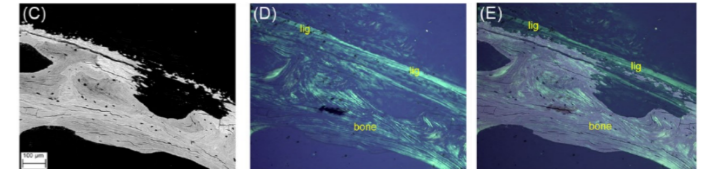


图4: 激光切割人体第四腰椎垂直切片前部。

C. SEM; D. PLM; E. SEM + PLM。从图中可以清晰看到骨组织表面修复。

### 观察基因缺陷对骨组织的影响

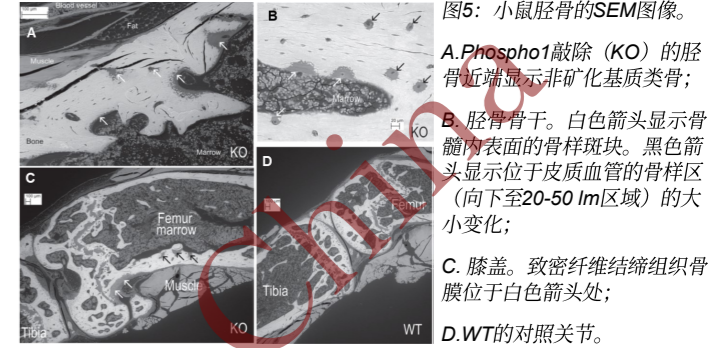


图5: 小鼠胫骨的SEM图像。

A. Phospho1敲除 (KO) 的胫骨近端显示非矿化基质类骨；  
B. 胫骨骨干。白色箭头显示骨髓内表面的骨样斑块。黑色箭头显示位于皮质血管的骨样区 (向下至20-50 μm区域) 的大小变化；  
C. 膝盖。致密纤维结缔组织骨膜位于白色箭头处；  
D. WT的对照关节。

### 观察手术后的骨组织再生

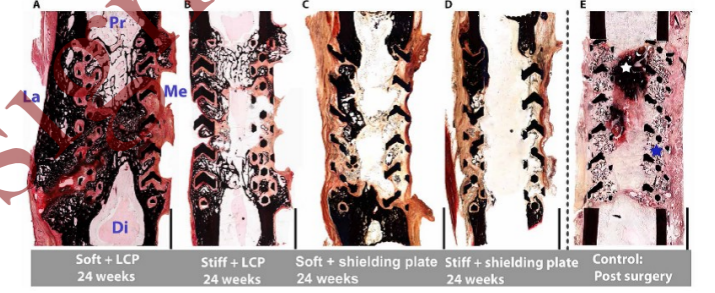


图6: 节段性缺损愈合的组织形态学评价。

A-D: Safranin Orange/von Kossa染色观测修复手术愈合效果的胫骨代表性图片, LA, 外侧; ME, 内侧; PR, 近端; DI, 远端, 对侧钢板。

E: 手术后第一周内采集的对照样本作标本图片。自体松质骨移植 (ABG) 对蜂巢的增强作用黑色 (蓝色星) 和支架中心孔内明显的截骨术水肿 (白色星) 仍然可见。

### 牙齿病理观测

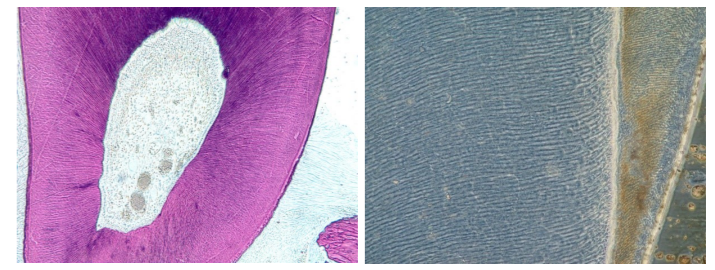


图7: 大鼠牙本质切片观测

图8: 人牙齿切片观测

作者: 胡西博士