图2: 使用非

接触式亚微 米分辨红外 测量系统 mIRage观察 初级神经元

结构。(A)在 1650 cm⁻¹处 获得的神经 元的红外图

像,显示了

蛋白质的分

布: (B)中对

应原始红外



低压透射电子显微镜LVEM在病毒学研究中的应用

病毒作为一种病原体一直受到学术界的广泛关注。然而由于病毒通常尺寸较小,传统的光学显微镜往往难以满足其形态观测的需求,这使得高分辨率的透射电子显微镜成为了当前病毒学研究的一个重要手段(图1),可以用来研究病毒的结构和成分。目前使用的透射电子显微镜进行病毒颗粒的检测和识别仍面临着巨大的挑战。这是因为病毒的主要组成部分多为含碳的轻元素有机物,这类样品很容易被高能电子束穿过,造成其光学衬度较低,且由于共价键化合物的低稳定性使得其在传统电子显微镜的高加速电压(一般为80-200 kV)下非常不稳定,不适合直接进行观察。因此病毒的形态学观察一般采用负染色成像技术,需要在观测前对样品进行复杂的负染操作,占有大量的时间,且可能会掩盖掉一些病毒的形貌特征,造成使用透射电子显微镜观测病毒的门槛较高。

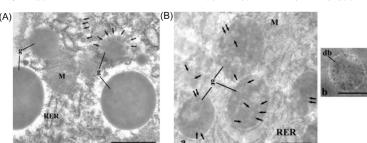


图1: (A)80 kV 和(B)5 kV加速电压下透射电子显微镜下观测到的SV40感染的小鼠 胰腺切片 (Microscopy Research and Technology, DOI:10.1002/jemt.20603)

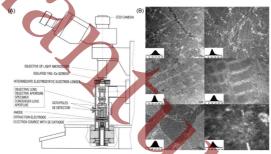


图2: LVEM 5的结构示意图(A)和小鼠心脏超微结构成像(B)。 (Microscopy Research and Technology, DOI:10.1002/jemt.22659)

然而,Delong公司的低压透射电子显微镜(Low Voltage Electron Microscope, LVEM)突破了传统透射电子显微镜的80 kV加速电压的最低限,研究人员可在低压下观察轻质生物样品,无需染色,简化了样品制备流程;同时该设备可在保证高图像对比度的前提下,使用温和的加速电压进行病毒形态学的检测和识别,能够识别以往可能被污渍和负染的瑕疵所掩盖的病毒特征。LVEM使用特殊设计的倒置式肖特基(Schottky)场发射电子枪,提供高亮度高相干性的电子束,这种低能电子束与样品的相互作用比传统透射电子显微镜中的高能电子要强得多,使得电子被轻质有机材料强烈散射,导致了特征的异常分化。在病毒学研究方面,该设备最大放大倍数高于通常观测病毒所需要的大约50,000倍的放大率,且依然保持不错的分辨率(<2 nm),可满足病毒形态和结构研究的需求。相比于高电压,5 kV 的加速电压提供的电子束与样品的作用更强,对密度和原子序数有更高的灵敏度,对低至0.005 g/cm³的密度差别仍能得到很好的样品图像对比度,有效提高了轻元素样品的成像质量,适合针对病毒学的研究。

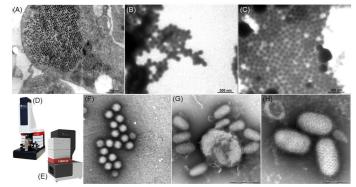


图3: (A-C) LVEM 5观察多种非负染的病毒样品; (D-E) LVEM 5&25 实物图: (F-H) LVEM 25观察多种负染后的病毒样品。

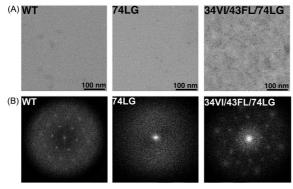


图4.: 使用LVEM 5 对HIV膜蛋白结构同时进行(A)TEM和(B)ED 分析。(Journal of Virology,DOI:10.1128/JVI.01526-19.)

Dec 2020

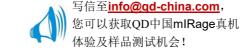
2nd

LVEM 5&25显微镜可用于检测腺病毒(图3A)、HIV(图3B)、轮状病毒(图3C)、球状病毒(图3F)、棒状病毒(图3 G-H)、星形病毒、杯状病毒、诺瓦克样病毒、疱疹病毒和乳头瘤病毒等。对于类病毒载体的研究,它能够在不负染的情况下直接观测类病毒载体的形态,可快速筛选载体,解决传统电镜制样难,机时紧张等问题。高对比度成像技术匹配快速的时间-图像周期、高通量研究,可作为一种快速诊断方法,用于识别病毒感染源和辅助病理研究,是快速检测具有公共卫生重要性病原体的有力工具。LVEM 5&25具有四种不同的成像模式:透射电镜(TEM)、扫描电镜(SEM)、扫描透射电镜(STEM)和电子衍射(ED),能够同时提供多种表征所需的成像模式,全面地对病毒样品的结构和成分进行分析(图4)。LVEM 5&25的体积小(无需专业实验室),维护费用低廉(无需冷却水和专用电源),在使用期间基本不会产生任何额外的费用,大大降低了研究所需的成本。采用了真空自闭锁技术,换样仅需3分钟,降低了仪器操作难度,对广大的非专业用户变得更加友善。

我们相信随着低压透射电镜的不断发展,LVEM 5&25将成为一个强有力的工具,极大提高研究人员对病毒结构成分的认知,为人们的科研和生活服务。



作者: 胡西博士



Dec 2020



在这种情况下,mlRage有望在β片层结构在活神经元的突触附近的化学成像中发挥关键作用,并提供一个新的机会来研究神经毒性淀粉样蛋白如何从一个患病的神经元传播到一个健康的神经元,揭示阿尔茨海默症的形成和发展机制。该工作发表在2020年的Advanced Sciences上(DOI: 10.1002/advs.201903004)。

作者: 胡西博士



科学家借助全新非接触式亚微米红外光谱首次成功直观揭示神经元中淀粉样蛋白聚集机理

美国Photothermal Spectroscopy (PSC) 公司开发的全新非接触式亚微米分辨红外测量系统mlRage,是基于独家专利的光学光热诱导共振(O-PTIR) 技术,它克服了传统FTIR技术的衍射极限和米氏散射效应,红外光谱空间分辨率高达500 nm,且无需对样品进行标记,不再需要衰减全反射(ATR)技术进行厚样品测试,且能够无接触和无损探测样品,全程对样品无污染,可以帮助科研人员更全面地了解亚微米尺度下样品表面微小区域的化学信息,使得在亚细胞水平揭示生物分子结构成为了可能。

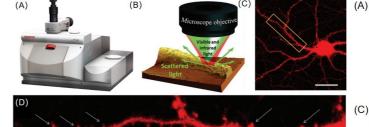
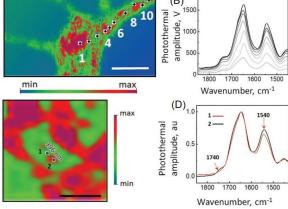


图1: (A)美国PSC公司非接触式亚微米分辨红外测量系统mlRage实物图; (B)亚微米红外成像示意图: 神经元树突的AFM形貌图,其中神经元直接在CaF₂基底下生长。mlRage采用两束共线性光束: 532 nm可见(绿色)提取光束和脉冲红外(红色)探测光束,样品的光热响应被检测为样品由于对脉冲红外光束的吸收而引发的绿色光部分强度的损失,使红外检测的空间分辨率提高到≈500 nm; (C)小鼠大脑皮层初级神经元,在CamKII促进下表达为tdTomato荧光蛋白,使得神经元结构填满红色,图片标尺为20μm。(D)图C区域放大图片,箭头指示树突上的神经元刺。



光谱的位置用数字和圆点表示,图片标尺为20 μ m; (C)在1650 cm⁻¹处获得的树突的红外图像,数字表示D图中获得光谱的位置,图片中标尺为20 μ m; (D)在C图中两点处取的归一化红外光谱,体现了该方法的亚微米空间分辨率。红色箭头表示蛋白质结构的化学变化。

近日,瑞典隆德大学的Klementieva教授团队与美国PSC公司的Mustafa Kansiz博士合作,使用全新非接触式亚微米分辨红外测量系统mlRage在亚微米尺度上研究了淀粉样蛋白沿着神经突直到树突棘的聚集行为(图1B和C),这是以往的实验技术手段所不可能实现的。在该研究中,他们使用了大脑皮层初级神经元,这是因为它们易发生AD病变,且具有独特的结构。初级神经元的这种形态特征使得可以在单个神经元层面上来测试mlRage的分辨率和准确性。首先他们在反射模式下获得了高质量的红外光谱,且不受米氏散射或基线失真等人为因素的干扰(图2A,B)。值得注意的是,mlRage约为400 nm的横向分辨率,使得他们能够通过比较1740 cm⁻¹处的峰强度来检测脂质含量的差异,以及通过对比酰胺II(1540 cm⁻¹)与酰胺I特征峰强度(1654 cm⁻¹)的比值来比较氨基酸(蛋白质)的种类和数量上的差异(图2C,D)。这是科学家们首次获取单个树突棘的高分辨率的化学图像和红外光谱,以往其它测试方法是无法做到的。为了在亚细胞层面上定位神经元中β片层结构,作者对APP-KO神经元进行了为时半小时的合成Aβ(1-42)处理(2×10⁻⁶ M),并使用mlRage进行了化学结构的成像分析(图3A)。对Aβ处理后的APP-KO神经元的红外光谱进行分析证实,β片层结构可以在亚细胞水平上进行分辨。有趣的是,纯Aβ(1-42)纤维在1625 cm⁻¹位置处有特征的红外峰,当加入到神经元结构中后,β片层结构的特征峰移动到1630 cm⁻¹处,表明淀粉样原纤维结构发生了变化,可能是由于其与细胞蛋白和/或细胞膜发生相互作用导致的(图3B, C)。基于该发现我们可以得出,在神经元中的淀粉样蛋白的构型变化可能会引发阿尔茨海默症进程中的不同机制。

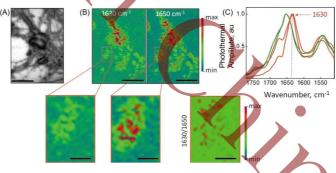


图3: 使用非接触式亚微米分辨红外测量系统mIRage观察β片结构在处理后的初级神经元中的聚集行为。(A,B)APP-KO初级神经元在1650和1630 cm⁻¹处的明场和光热红外成像,彩色标度表示光热振幅的强度,从最小值(蓝色)到最大值(红色),阈值为50%(以0为中心),插图为放大或叠加后的红外成像图,图片标尺为20 μm; (C)神经元中淀粉样蛋白结构在2×10⁻⁶ M Aβ(1-42) (红色)处理或不处理(绿色)后分别对应的红外光谱。β片结构对应的特征红外峰用红色箭头表示,光谱数据点间距为2 cm⁻¹,数据进行50次均一化处理。

综上所述,借助全新非接触式亚微米分辨红外测量系统mlRage 科学家成功首次揭示了初级神经元的分子结构,无需标记,且因为该 技术是在非接触模式下工作,不会对神经元造成损伤,这在研究脆弱

或粘性的物质时显得尤为重要。另外,该技术还能获得亚微米尺度的红外光谱,且不含由于背景失真或米氏散射造成的散射伪影。最新的技术进步表明,mlRage现在可以用来做活细胞成像,并保持相同的亚微米空间分辨率。

扫码了解更多产品详情

___FRONTIER 前沿·技术