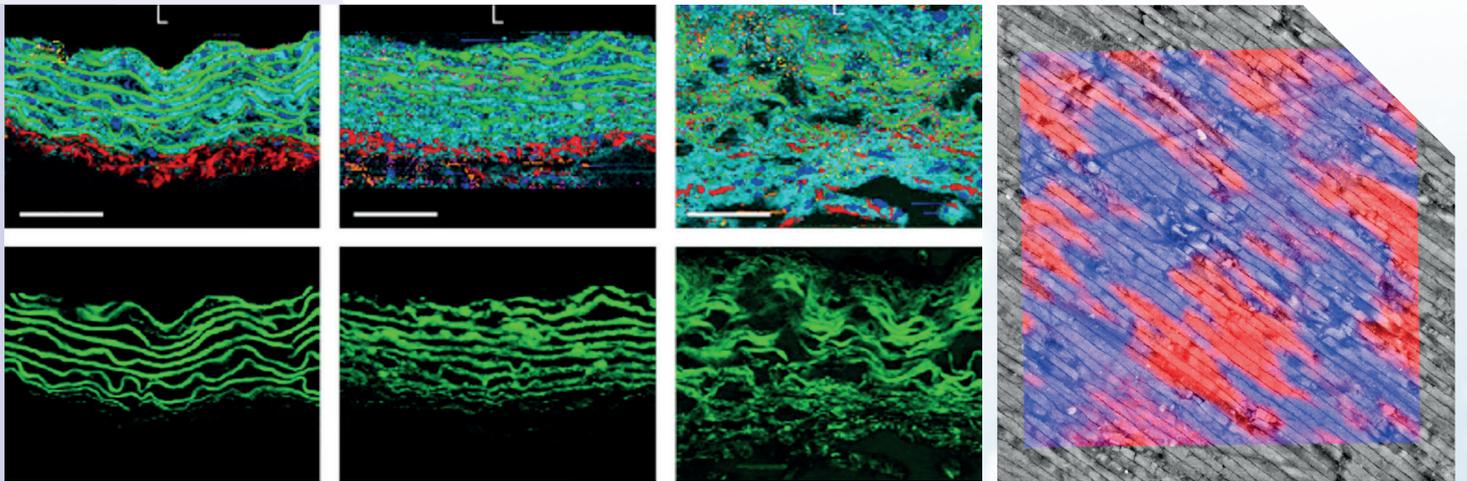
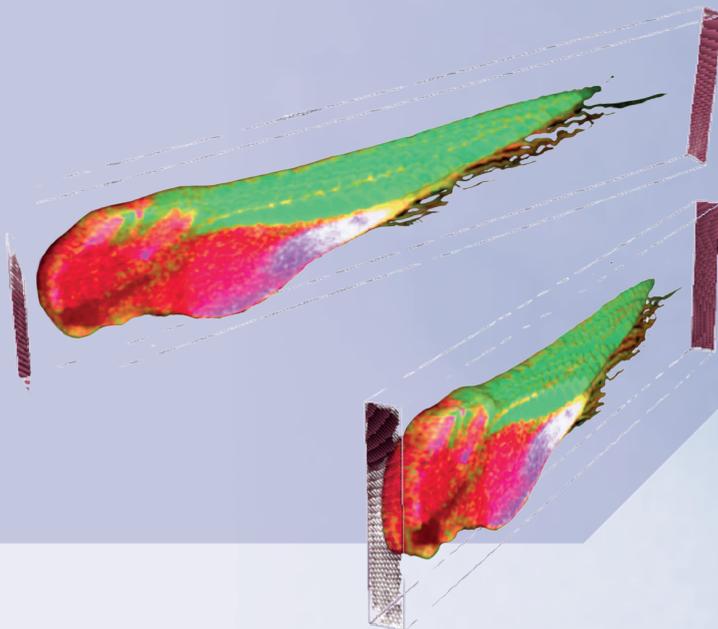


## 应用案例

# 生命科学中的 共聚焦拉曼成像及关联技术

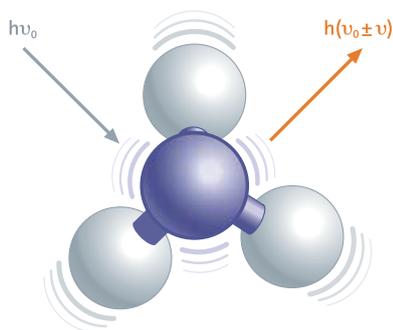


共聚焦拉曼显微镜是一种非侵入性化学分析技术,适用于高分辨率二维或三维分析,包括多种关联检测分析。该技术能够对包括细胞、组织和类器官等生物样本进行无标记成像,揭示亚细胞尺度的化学变化。



## 拉曼原理

拉曼效应是基于光与物质的非弹性散射过程，是无损且无标记样品化学结构分析的重要方法。拉曼光谱反映了激光与气、液或固体样品分子发生非弹性散射后产生的能量变化，即入射激光释放能量给化学键或吸收其能量。因此，任何化合物在被激发时都会产生特征拉曼光谱，利用该特征“指纹”可以很容易地对化合物进行定性。



## 拉曼成像

通过快速采集成像区域所有像素点的拉曼光谱，可以直观显示样品化学成分的空间分布。基于优异的共聚焦特性，WITec 拉曼系统还可以获得高质量的三维成像结果。

## 高共聚焦与高灵敏度

由于拉曼信号非常弱，所以每个拉曼光子对成像都极其重要。WITec 拉曼成像系统配备高灵敏共聚焦显微镜和高光通量光谱仪 (UHTS)。所有光学元件和机械部件的精确校准与耦合，保障可以同时获得高分辨率、超快的速度和极高的灵敏度。

优化的光学系统赋予了 WITec 拉曼系统无与伦比的优势，确保在超低的激光功率下亦可采集极微弱或极低浓度样品的拉曼信号。



## 活细胞共聚焦拉曼成像

作为一种非侵入性且无损显微技术，共聚焦拉曼成像非常适合生理环境中的活细胞研究。无需染色或复杂的样品制备流程即可直接分析活细胞的亚细胞结构及生物化学信息。

本研究使用牛津仪器 alpha300 拉曼系统对大鼠上皮细胞进行成像。定位合适的细胞后 (图 1A)，采集图像中每个像素点的拉曼全光谱 (扫描范围:  $40 \times 40 \mu\text{m}^2$ ,  $100 \times 100$  像素, 10,000 条光谱)。

图 1B 分别展示了线粒体 (蓝色)、内质网 (绿色) 和核仁 (橙色) 的特征拉曼光谱。基于这些光谱生成彩色编码拉曼图像, 可直观显示细胞内细胞器的空间分布 (图 1C)。细胞的不同结构 (如内质网) 可清晰区分, 甚至核膜也能清晰分辨。

同时, 利用  $2800-3000 \text{ cm}^{-1}$  范围内 C-H 伸缩振动的峰面积, 可以获得定量热图, 如图 1D 所示。综上所述, 共聚焦拉曼成像可实现生物样品高空间分辨的化学分析。

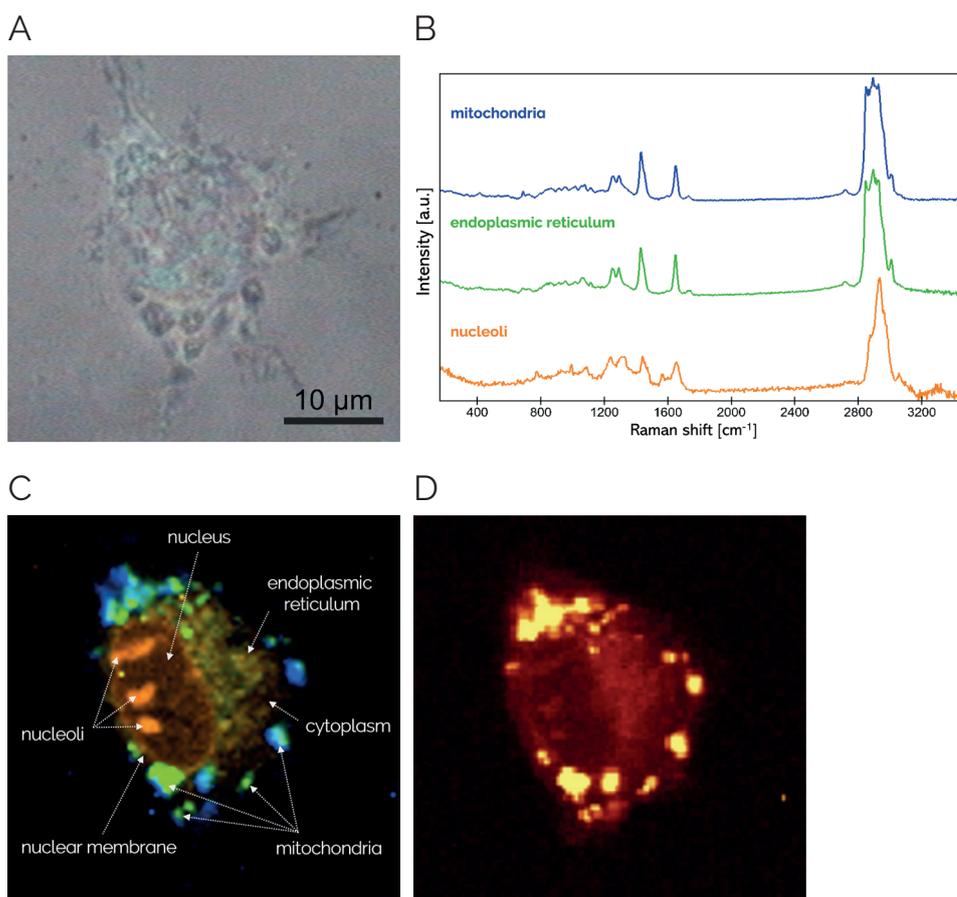


图 1: 大鼠细胞拉曼成像分析

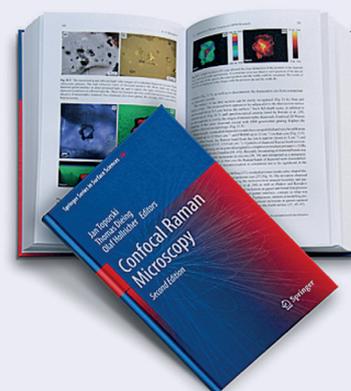
- (A) 大鼠上皮细胞光学图像。
- (B) 线粒体 (蓝色)、内质网 (绿色) 和核仁 (橙色) 的特征拉曼光谱。
- (C) 彩色编码拉曼图像。
- (D)  $2800 - 3000 \text{ cm}^{-1}$  C-H 伸缩振动峰面积拉曼成像。

样品来自 Angelika Ruck, ILM, Ulm, Germany

更多共聚焦拉曼成像应用, 可参阅:

### Confocal Raman Microscopy [1]

J. Toporski, T. Dieing, O. Hollricher, eds.  
Confocal Raman Microscopy.  
2<sup>nd</sup> ed. 2018, Springer International  
Publishing AG. DOI: 10.1007/978-3-  
319-75380-5.



## 巨噬细胞中的药物递送研究

活细胞的生理监测对于揭示细胞和组织中的动态过程至关重要。耶拿莱布尼茨光子技术研究所的 Jürgen Popp 教授团队成功通过拉曼研究实时展示了脂质被巨噬细胞摄取的过程[2]。

巨噬细胞通过摄取低密度脂蛋白 (LDL) 进行循环和代谢。如果代谢能力超负荷，细胞会储存脂质并发展为泡沫细胞，进而可能会诱发如动脉粥样硬化等心血管疾病。通过拉曼成像，可以长时间跟踪 (>35 h) 巨噬细胞摄取脂质的动态过程，揭示出显著的细胞间异质性。巨噬细胞摄取脂质是在活细胞上进行的，该实验使用氘代油酸模拟脂质。利用  $2050-2275\text{ cm}^{-1}$  处的 C-D 伸缩振动峰的相对强度来量化脂质摄取量。图 2 清晰显示，细胞内脂质浓度随时间推移逐渐增加，并以脂滴形式储存。脂滴的出现是泡沫细胞形成的重要标志。

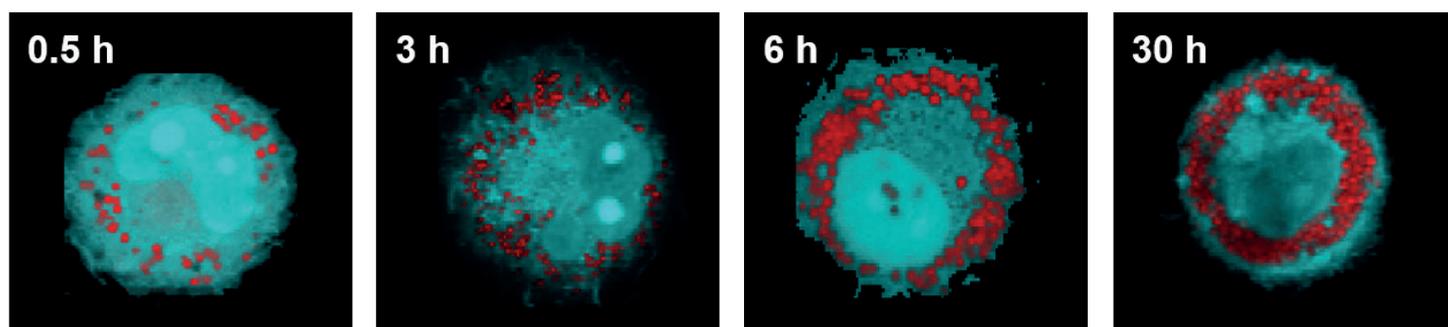


图 2：巨噬细胞的拉曼成像

通过  $2104\text{ cm}^{-1}$  的 C-D 伸缩振动峰 (红色) 和  $2800 - 3020\text{ cm}^{-1}$  的 C-H 伸缩振动峰 (蓝色) 的强度获得巨噬细胞的拉曼图像。培养 30 小时后，细胞储存了过量脂质从而发育为泡沫细胞。

图片由 Christian Matthaus, Leibniz Institute of Photonic Technology, Jena, Germany 提供。

## 单个细菌的拉曼光谱研究

拉曼成像在微生物研究领域也展现出独特优势。通过该技术不仅能精准区分细菌种类，还能分析其生理状态、药敏性及抗药性反应。

本研究对蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*) 进行拉曼成像分析。激发波长为  $532\text{ nm}$ ，空间分辨率  $320\text{ nm}$ 。图 3A 展示了菌落局部结构。拉曼成像 (图 3B) 则清晰区分了不含存储聚合物聚羟基丁酸酯 (PHB) 的营养细胞 (黄色)、含 PHB 的营养细胞 (绿色) 和孢子 (紫色)。不同组分的特征可通过以下波数区分：孢子对应  $1018\text{ cm}^{-1}$  处的 Ca-DPA 拉曼峰，PHB 对应  $1773\text{ cm}^{-1}$  的 C=O 伸缩振动峰以及  $2800-3000\text{ cm}^{-1}$  处的 CH 伸缩带。

营养细胞只能在细菌生长到稳定期并积累足够的 PHB 后才能发育。这三种成分都能被轻易检测到，突显了共聚焦拉曼成像在单细胞水平识别表型异质性的诊断能力。

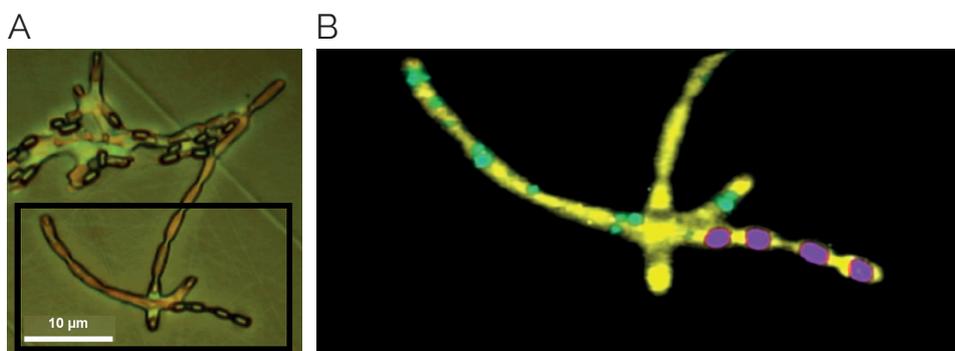


图 3：蜡样芽孢杆菌的拉曼成像

(A) 生长中的蜡样芽孢杆菌的光学图像。(B) 来自 (A) 中矩形区域的拉曼成像，黄色表示不含 PHB 的营养细胞，绿色表示含 PHB 的营养细胞，紫色表示孢子。

图片由 Antje Hermelink, Robert-Koch-Institute, Berlin, Germany 提供，修改自[3]。

## 拉曼成像与荧光联用

在生命科学的众多研究领域中,通过荧光标记可视化特定分子仍是金标准。尽管无标记的拉曼成像可直接分析样本中的分子成分,但某些场景仍需采用荧光技术。

由于拉曼信号相比荧光非常微弱,荧光通常被认为是拉曼成像的障碍。通过选择合适的染料和拉曼激光波长,我们仍然可以从染色过的细胞样品获得高质量的拉曼图像,由此我们展示了将两种成像技术联合分析的可能性。

利用 alpha300 Ri 倒置显微镜系统对 DAPI 染色细胞(图 4A)进行拉曼成像。DAPI 是一种荧光染料,其发射波长位于蓝光区,可有效标记真核细胞的细胞核。选择 532 nm 激光进行拉曼成像,可以识别其他胞质组分,如内质网(绿色)和核仁(橙色)(图 4B),且不受荧光信号的干扰。两类组分的特征性拉曼光谱数据详见图 4D。

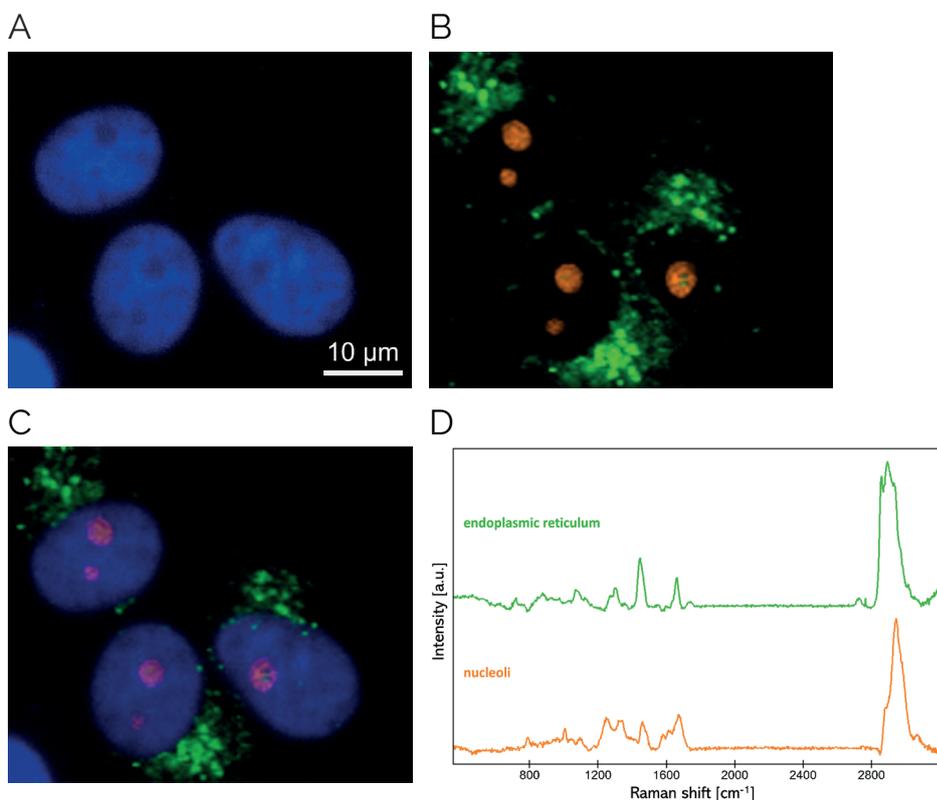


图 4: 真核细胞的关联拉曼-荧光显微镜成像

(A) DAPI 染色的细胞核(蓝色)。(B) 内质网(绿色)和核仁(橙色)的拉曼成像。

(C) 荧光与拉曼图像叠加。(D) 核仁(橙色)和内质网(绿色)的拉曼光谱。

样品由 Claudia Scalfi-Happ ILM, Ulm, Germany 提供。

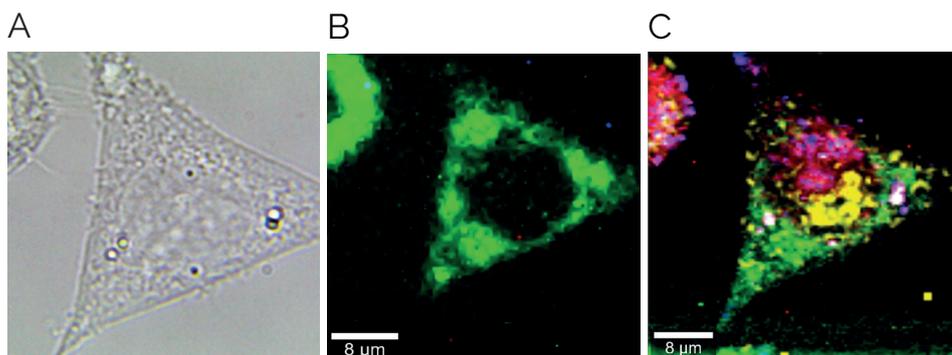


图5: 真核细胞的关联荧光和拉曼显微成像

稳定表达线粒体 GFP 的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞的可视化。

(A) 光学图像。(B) 线粒体荧光成像。(C) 同区域拉曼成像。

样品由 Claudia Scalfi-Happ ILM, Ulm, Germany 提供。

另一项关联拉曼-荧光研究,在表达线粒体定位绿色荧光蛋白(GFP)的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞上进行了拉曼成像。在成像区域的每个像素点获取拉曼光谱,总计 1,4000 个光谱。伪彩拉曼图像清晰显示了可区分的细胞质(绿色)、细胞核(黄色)和核仁(粉红色),如图 5C。值得注意的是,GFP 荧光(图 5B)并未干扰拉曼信号。

## 生物组织的无标记拉曼成像分析

生物组织是生物医学研究的重要基础,对于揭示生物体内细胞网络的异质性、结构复杂性以及其中所涉及的综合性生物学过程具有关键作用。然而,如何在组织中实现高特异性、高空间分辨率的多组分与多过程检测,仍是一个重大挑战。当前基于染色技术的成像方法不仅受限于可用抗体的种类与数量,还面临标记物多样性有限、样本在规模化染色过程中易受损以及背景信号干扰较强等问题。

相比之下,拉曼成像作为一种无标记技术,非常适合多种成分同时分析。该技术广泛应用于各种生物医学研究领域的组织分析,如癌症研究[4,5]、细胞分化[6]、炎症反应[7]及神经退行性疾病[8]和肥胖[9]等。

在以下示例中,研究人员通过拉曼成像技术对膀胱癌药物治疗相关类器官模型进行了详细表征[10]。该研究借助拉曼成像成功地揭示了亚细胞组分及其药物作用过程。

膀胱癌类器官从原代肿瘤标本生成,并用不同浓度的药物处理。处理后的活体类器官在 37 °C 下立即成像,无需进一步样品制备。实验使用配备内置培养室和 532 nm 激光器的倒置 WITec 拉曼系统。本研究重点探究药物顺铂(cis)和 Venetoclax(vtx)对来源于尿液(UCO)、膀胱癌细胞系(RT112)和原代肿瘤活检(BCO)的类器官的直接影响。通过拉曼成像与真成分分析(TCA)技术,在类器官样本中成功鉴定出六种成分(图 6A):线粒体(红色)、核酸(蓝色)、细胞质(绿色)、脂质(黄色)、基质胶(橙色)以及一种未知成分(青绿色)。对应的拉曼光谱特征峰(图 6B)表明各成分中存在特定化学物质,包括细胞色素c(Cyt c)、苯丙氨酸(Phe)、酰胺 I 键、CH<sub>2</sub> 基团及 C=C 双键等。

通过不同组分光谱特征峰的变化,发现顺铂处理改变了 DNA 结构。相比之下,vtx 影响了原代肿瘤活检和尿液中的线粒体细胞色素 c,表明该药物通过线粒体途径诱导细胞凋亡。

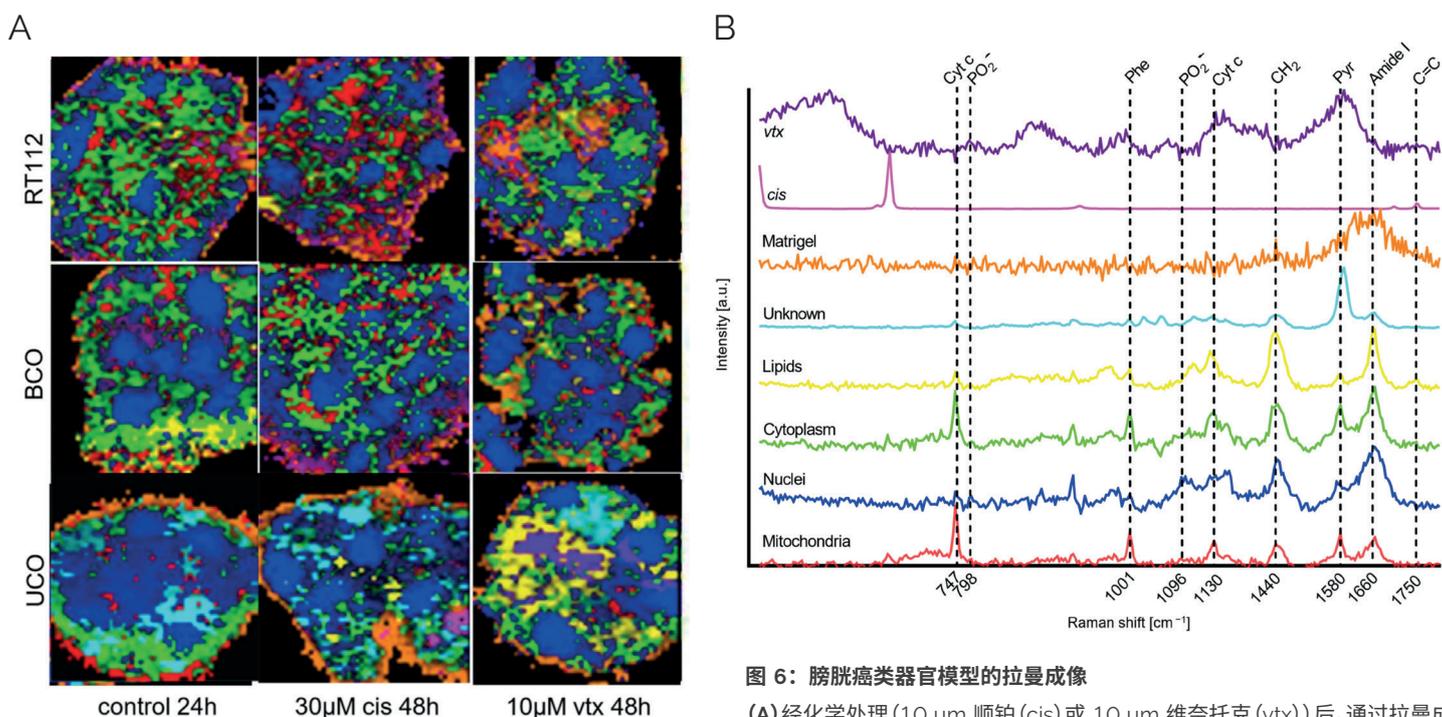


图 6: 膀胱癌类器官模型的拉曼成像

(A) 经化学处理(10 µm 顺铂(cis)或 10 µm 维奈托克(vtx)后,通过拉曼成像和真实成分分析(TCA)识别出的膀胱类器官(RT112、BCO 和 UCO)中的成分。比例尺为 20 µm。(B) 已识别成分的特征拉曼光谱。

由 Julia Marzi, Department for Medical Technologies and Regenerative Medicine, Uniklinikum Tübingen, Germany 提供[10]。

## 斑马鱼的三维拉曼成像

对于复杂多层生物样本的三维分析,需要使用具备高共聚焦性能的仪器来获取单个图像平面的数据。WITec 共聚焦拉曼显微镜能够以卓越的横向和纵向分辨率对样品进行三维成像。英国一研究小组的工作展示了 WITec 拉曼成像技术在分析整个类器官 [11] 和斑马鱼胚胎 [12] 方面的质量和潜力。斑马鱼作为广泛使用的脊椎动物模式生物,其透明的胚胎结构为观察活体生物内部的生物过程提供了可能。标准标记技术耗时费力且仅能显示有限预设的成分组合,本研究采用拉曼成像技术作为便捷且全面的研究手段。

在整个斑马鱼胚胎中以 10  $\mu\text{m}$  的横向和深度分辨率记录拉曼光谱,既保留了生物体的完整性,又提供了特定的生物分子和空间信息。分析结果显示存在三种不同组分(蛋白质、脂质和类胡萝卜素),如三维全身体可视化图 7A 所示。这些光谱显示拉曼特征峰(图 7B),蛋白质中  $\text{CH}_3$  基团的拉曼峰位于

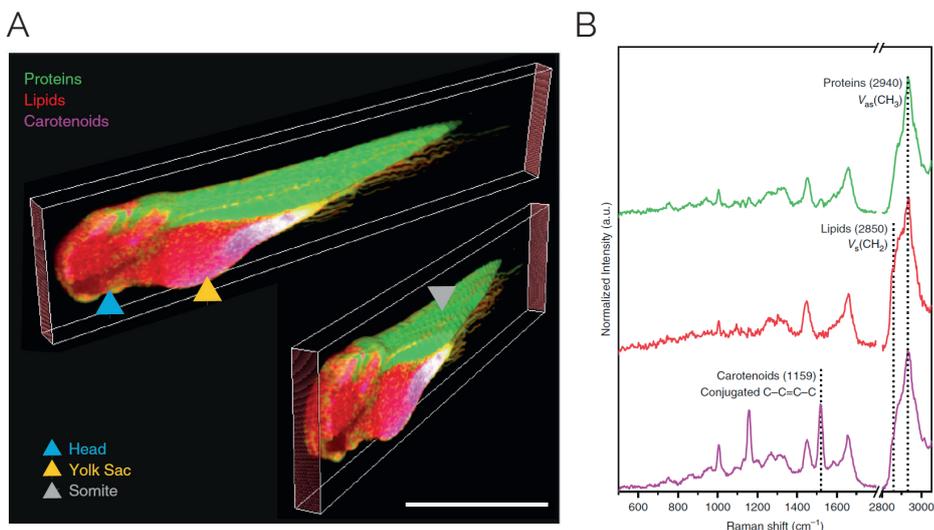


图 7: 固定斑马鱼胚胎的共聚焦拉曼成像

(A) 胚胎的拉曼 3D 成像,可视化蛋白质(绿色)、脂质(红色)和类胡萝卜素(品红色)。头部(蓝色箭头)、卵黄囊(黄色箭头)和体节(灰色箭头)等不同身体部位清晰可辨。比例尺 1 mm。

(B) 蛋白质(绿色)、脂质(红色)和类胡萝卜素(品红色)的代表性光谱。组分分别通过积分特征拉曼谱带  $2940 \pm 16 \text{ cm}^{-1}$ 、 $2850 \pm 5 \text{ cm}^{-1}$  和  $1159 \pm 16 \text{ cm}^{-1}$ (相对波数)进行分析

$2940 \text{ cm}^{-1}$ ,脂质的  $\text{CH}_2$  基团峰位于  $2850 \text{ cm}^{-1}$ ,类胡萝卜素 C-C-C-C 伸缩的峰中心位于  $1159$  和  $1528 \text{ cm}^{-1}$ 。

## 体内拉曼分析

在研究的第二阶段,对活体斑马鱼胚胎进行了拉曼测试。斑马鱼分别感染了作为结核病模型的野生型(WT)和突变株( $\Delta\text{RD1}$ )海分枝杆菌(*Mycobacterium marinum*)。利用拉曼成像追踪了它们的感染和伤口愈合过程。使用近红外拉曼(785 nm)进行成像,通过监测扫描前后的心跳、血流等生命体征,确认了动物的存活状态。分枝杆菌簇(图 8A)通过其独特的拉曼光谱模式(图 8B)识别,其中包含蛋白质( $1004$  和  $1665 \text{ cm}^{-1}$ )、DNA( $789$  和  $1581 \text{ cm}^{-1}$ )和脂质( $1065$ 、 $1128$ 、 $1298$ 、 $1439$  和  $1450 \text{ cm}^{-1}$ )特征谱段。两种菌株显示出细微的代谢差异。最后,使用不同时间下感染区域的三维拉曼成像来评估和表征组织创伤。有关该研究和结果的更多信息可在开放获取出版物 [12] 中找到。

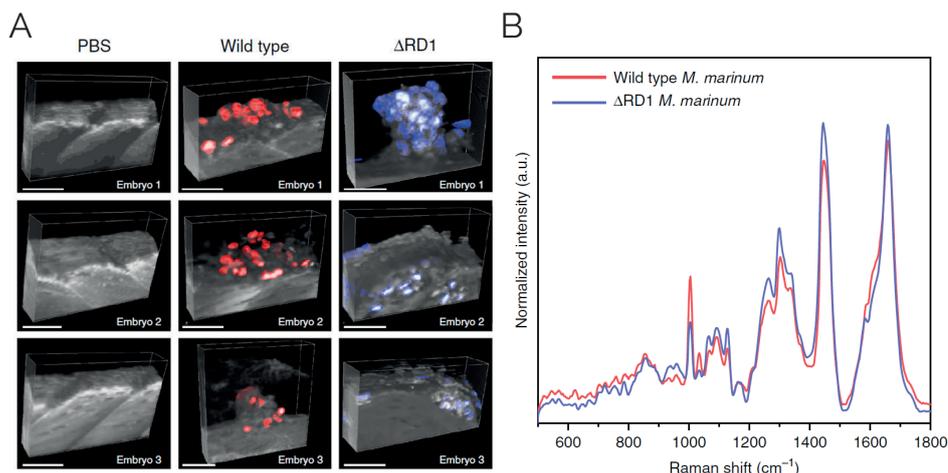


图 8: 斑马鱼分枝杆菌感染部位的拉曼成像

(A) 斑马鱼胚胎感染野生型(WT)或  $\Delta\text{RD1}$  海分枝杆菌(*M. marinum*)四天后,或 PBS 处理的注射部位作为阴性对照的 3D 拉曼图像。分枝杆菌簇以红色(WT)或蓝色(ARD1)显示。比例尺 50  $\mu\text{m}$ 。(B) 海分枝杆菌 WT(红色)和  $\Delta\text{RD1}$  突变株(蓝色)的平均拉曼光谱。

研究由 Institute for Biomedical Engineering and the Department of Physiology, Anatomy & Genetics at the University of Oxford, UK, Dame Molly Stevens 教授慷慨提供[12]。

## 生物拉曼数据的分析与处理

与某些研究领域中样本通常仅含少量明确成分不同，生命科学领域涉及的样本往往具有令人惊叹的复杂性。单一变量方法(如对特征拉曼波段峰面积来分析样本成分)在某些生命科学应用中可能具有挑战性，因为它们需要深入了解每个成分的光谱特征。因此，该领域的最新研究探索了多元数据分析和组学技术的转化，以更好地评估生物拉曼数据 [11,13-16]。

WITec Suite 软件提供了多种多变量分析方法，包括聚类分析(CA)、主成分分析(PCA)以及真成分分析(TCA)和非负矩阵分解(NMF)等光谱解混算法。其中，TCA 是将原始高光谱数据转化为具有实际意义的拉曼图像的理想工具。它支持在高光谱数据集中自动和手动检测光谱组分，并能够解混光谱并分配其在图像中的位置，最终可生成包含不同成分的拉曼图像。

## 拉曼成像揭示云杉针叶结构的复杂性

本研究采用拉曼光谱分析方法，旨在确定挪威云杉针叶角质层与表皮层化学成分的最佳可视化方案。实验使用同一拉曼成像数据，分别应用拉曼谱峰积分(单变量分析)、聚类分析(CA)和非负矩阵分解(NMF)三种方法进行比较。对厚度为 15–20  $\mu\text{m}$  的针叶横截面样本进行了拉曼成像，横向分辨率为0.5  $\mu\text{m}$ ，激发波长为785 nm。

特征峰谱带积分是检测果胶、木质素、纤维素及芳香族化合物等组分的成熟方法。该方法能够清晰显示结构信息，例如表皮蜡层(图 9A, 黄色和橙色区域)。在聚类分析(CA, 图 9B)中，上蜡质层(橙色)与下角质(黄色)被明确区分，但部分化学成分分布信息有所丢失。例如，草酸钙(蓝色)这类由微小晶体组成的化合物在图像中表现不够明显，这可能是由于在含多种组分的像素中其他成分信号占主导所致。

在此示例中应用解混算法如 NMF 时，在数据集中识别出单个组分的“最纯”光谱，即所谓的端元(EMs)。如图 9C，这种端元如草酸钙(EM2, 青色)在丰度图中可以实现可视化，这允许更详细地观察样品的复杂分层结构丰度分布图(图 9C)。

综上所述，通过拉曼成像和 NMF 分析，揭示了针叶[15]表皮层与角质层中存在的化学异质性。研究发现，香豆酸、类黄酮等芳香族组分存在于所有层中，并与角质层中的脂质混合。偏振分辨拉曼分析则进一步确定表面结晶层中脂肪链和香豆酸的取向。

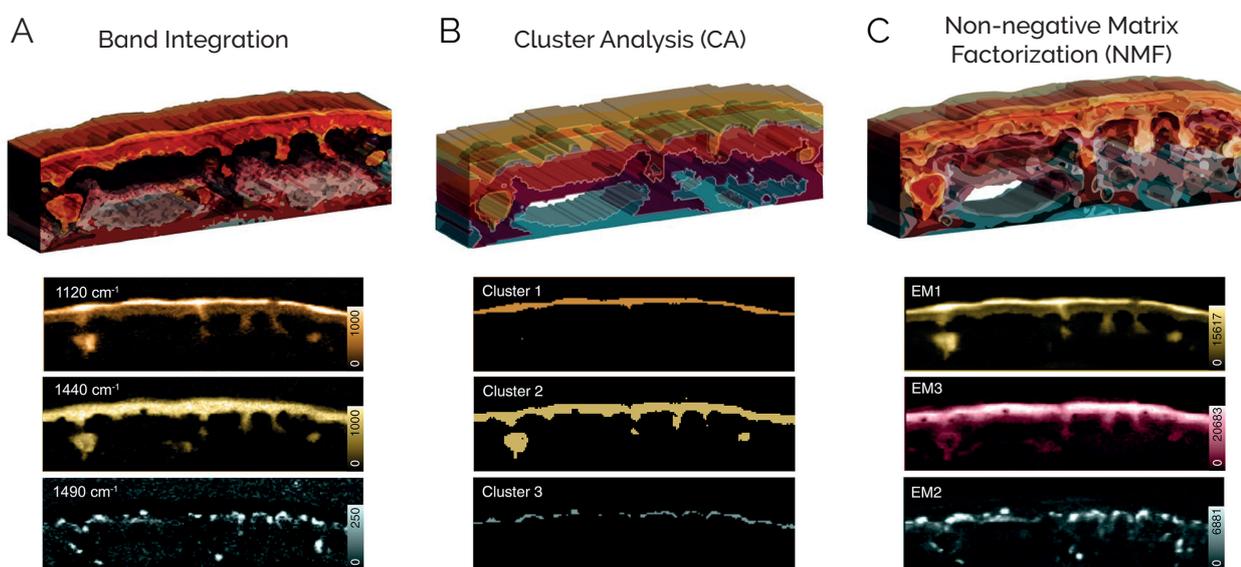


图 9：三种不同方法对云杉针叶结构的拉曼分析

(A) 单变量分析，(B) 聚类分析(CA)和(C)非负矩阵分解(NMF)。上图：各方法处理后所有化合物的三维立体呈现。下图：每种方法识别出的三种组分的单独拉曼图像。这些图像展示了针叶层结构的组成部分：表皮层(黄色)、表皮蜡质层(橙色)和草酸钙(青色)。

本研究由 Notburga Gierlinger, Department of Nanobiotechnology (DNBT), University of Natural Resources and Life Sciences (BOKU), Vienna, Austria 慷慨提供。图像改编自[15]。

## 动脉瘤特异性生物标志物的拉曼鉴定

拉曼成像与多变量数据分析也可用于识别生物标志物。以下研究以升胸主动脉瘤 (aTAAs) 为例展示了这一点。利用牛津 alpha300 R 共聚焦拉曼系统 (激光波长: 532 nm, 63x 水镜) 的对小鼠和人体组织样本进行成像。分别

以  $2 \times 2 \mu\text{m}^2$  或  $1 \times 1 \mu\text{m}^2$  的分辨率进行了大面积 ( $100 \times 200 \mu\text{m}^2$ ) 和高分辨率 (小鼠:  $10 \times 150 \mu\text{m}^2$  / 人:  $50 \times 500 \mu\text{m}^2$ ) 扫描。

首先, 通过 TCA 方法可视化了小鼠动脉组织

的结构特征, 图 10A。这种基于拉曼的方法能以高空间分辨率识别不同细胞外基质 (ECM) 组成的结构, 其效果可与免疫染色方法相媲美 (图 10C)。

在 aTAA 小鼠突变模型 Fbln5<sup>TM</sup> 和 Fbln4<sup>TM</sup> 的组织样本中, 弹性和胶原纤维呈断裂且紊乱的形状。相比之下, 野生型 (WT) 品系显示出清晰的结构。接下来, 使用主成分分析 (PCA) 和多元曲线分辨 (MCR) 进一步分析拉曼光谱数据, 成功识别出健康与动脉瘤主动脉之间的亚分子差异。该关联分析方法将 TCA 识别的弹性和胶原纤维区域内的拉曼光谱分解为子成分, 从而检测到病变组织与健康组织中特定光谱丰度的变化。以胶原纤维为例, 名为 Cc6 的光谱 (图 10D 橙色光谱) 仅存在于 Fbln4<sup>SMKO</sup> 动脉瘤组织中 (图 10E)。组分 Cc1 代表天然胶原纤维 (图 10D 红色光谱)。与 Cc1 光谱相比, Cc6 含有多个氨基酸特异性拉曼峰。例如, 在 749、1018、1336 和 1455  $\text{cm}^{-1}$  处可观察到归属于色氨酸的特征峰, 这表明突变引发了色氨酸代谢的变化。不仅在胶原纤维中, 在弹性纤维中也监测到了动脉瘤特异的拉曼光谱。人体组织中同样可以重现小鼠样本的结果; 在人类 aTAA 组织样本中发现了两种光谱特征, 与健康对照组相比表现出显著差异 [16]。

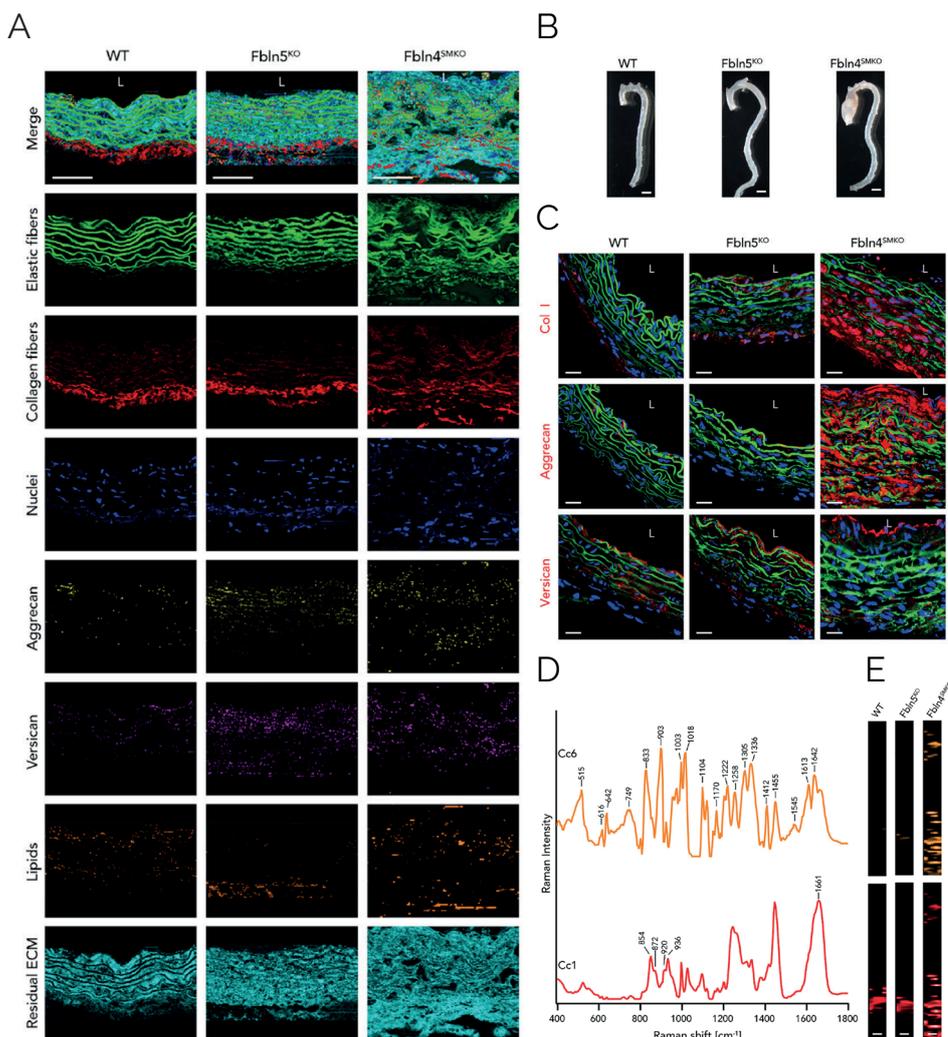


图 10: 通过拉曼显微镜鉴定升胸主动脉瘤中的生物标志物。

(A) 来自 WT、Fbln5<sup>TM</sup> 和 Fbln4<sup>TM</sup> 的小鼠升主动脉组织的拉曼图像, 以伪彩热图显示弹性纤维 (绿色)、胶原纤维 (红色)、细胞核 (蓝色)、聚集蛋白聚糖 (aggrecan) (黄色)、多功能蛋白聚糖 (versican) (粉红色)、脂质 (橙色) 和残余 ECM (青色)。比例尺 50  $\mu\text{m}$ 。(B) 小鼠主动脉概览图, Fbln4<sup>TM</sup> 主动脉中存在动脉瘤。比例尺 1 mm。(C) I 型胶原、聚集蛋白聚糖和多功能蛋白聚糖 (红色)、弹性蛋白自发荧光 (绿色) 和细胞核 (蓝色) 的免疫荧光染色显示的结构与 A 中拉曼成像可见的结构相似。比例尺 20  $\mu\text{m}$ 。(D) 多元曲线分辨 (MCR) 识别出胶原纤维中动脉瘤特异性组分 Cc6 (橙色) 和天然胶原纤维 Cc1 (红色) 的光谱。(E) Cc6 和 Cc1 的 MCR 图像。

总之, 通过对拉曼数据的详细分析, 能够获得组织的特征性“指纹”信息, 以实现对 aTAA 标志物的快速无损诊断。

## RISE 拉曼成像-SEM 联用技术在生命科学中的应用

由于共聚焦拉曼成像是一种非破坏性技术，因此非常适合与原子力显微镜 (AFM)、扫描电子显微镜 (SEM) 等成像技术结合使用。在本例中，使用 SEM 中的背散射电子 (BSE) (图 11A-C)、能量色散谱 (EDS, 图 11D-F) 和拉曼显微镜 (图 11G-I) 对海胆牙齿进行了关联分析。

海胆牙齿由有序的方解石结构元素组成的复杂网络构成，包含不同摩尔分数的镁 (Mg)。本研究以海胆牙齿为模式生物，系统研究了多相体系中镁的空间分布规律。

根据镁离子对拉曼光谱产生峰位偏移大小，拉曼成像可以提供 Mg 元素的分布及丰度信息。本研究采用文献中已知浓度样本的拉曼峰位数据作为校准曲线，用于计算镁的绝对摩尔分数 (图 11G-I)。通过分析整颗海胆牙齿，拉曼成像揭示了一个具有高 Mg 含量的“石质区域”，两侧是中等 Mg 水平的区域和低 Mg 含量的龙骨区。BSE 分析识别了电子密度的差异 (图 11 A-C)，这与方解石晶体晶格中镁含量的差异密切相关。对应的 EDS 元素分布图 (图 11 D-F)，清晰呈现了各区域钙元素 (蓝色) 和镁元素 (品红色) 的分布情况。综合运用这些关联成像技术，为绘制海胆牙齿中镁元素的详细分布图谱提供了强大的工具支持。

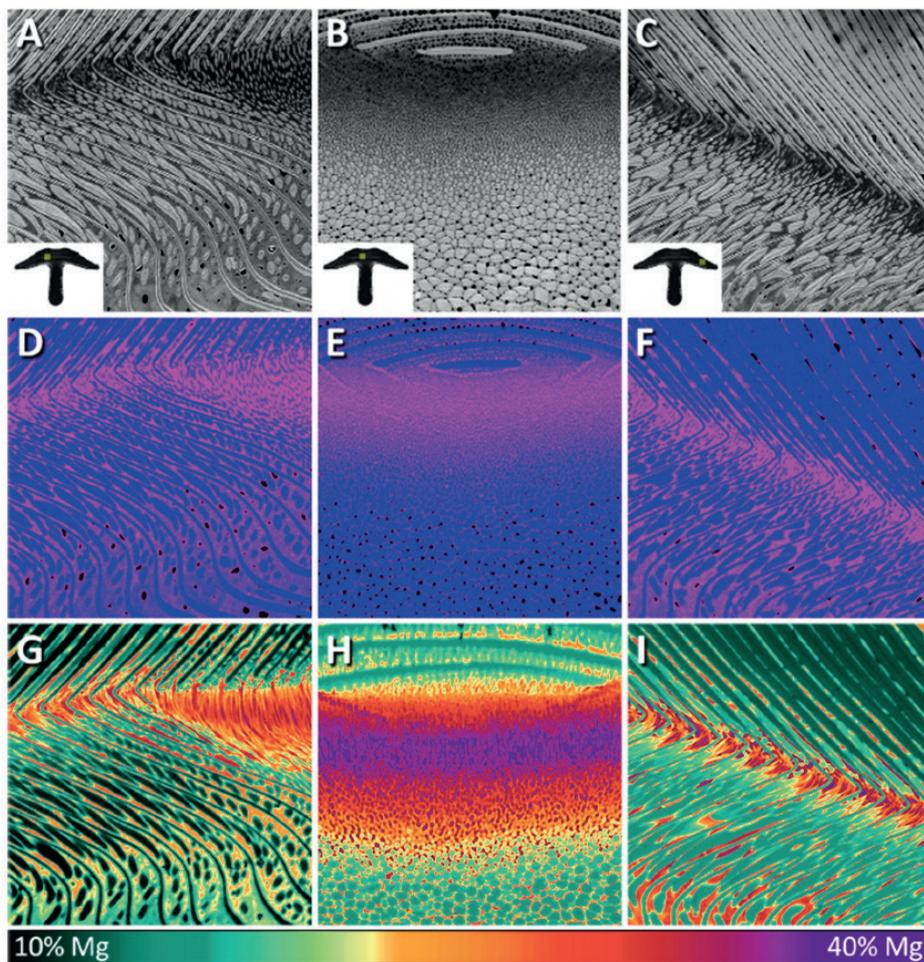


图 11: 海胆牙齿的关联成像

(A-C) 背散射电子 (BSE) 显微镜揭示了牙齿不同区域的电子密度。(D-F) 能量色散谱 (EDS) 显示了钙 (蓝色) 和镁 (品红色) 的化学成分分布。(G-I) 拉曼成像说明了局部 Mg 浓度。A-C 中的小插图显示了整个牙齿横截面概览图中描绘的感兴趣区域。

由 Admir Masic, Associate Professor at the Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, USA 提供, 修改自[17]。

## RISE™ 显微技术：关联拉曼和 SEM 成像

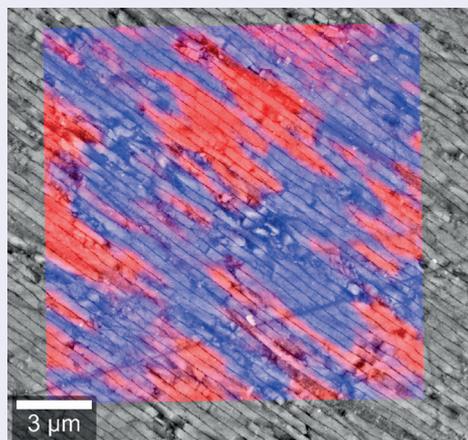


图 12：鲍鱼壳的 RISE 显微图像

珍珠母由文石的几种晶型组成。不同的晶体取向可以通过其拉曼光谱区分。RISE 显微图像说明了各向异性（蓝色和红色）如何与材料的结构特征相关联。

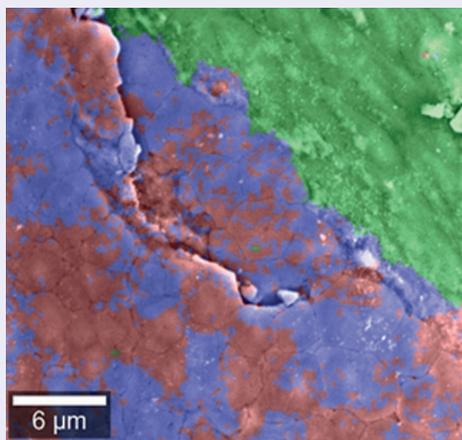


图 13：珍珠的 RISE 显微图像

共聚焦拉曼成像表明该珍珠由两种碳酸钙多晶型物组成，即文石（蓝色、红色）和球霏石（绿色）。结构特征用 SEM 成像。两种技术的信息共同生成 RISE 显微镜图像。

RISE™ 显微技术是我们屡获殊荣的创新成果，将拉曼成像与扫描电子显微镜 (SEM) 功能整合于同一设备。拉曼成像可精准识别并定位样品中的分子化合物，而 SEM 则能从毫米级到纳米级分辨率全方位解析物体的形貌与表面结构。在 RISE 显微系统中，拉曼测量直接在 SEM 的真空腔内进行。精密的位移台便于样品在拉曼和 SEM 测量模式之间自动转换，并能精确返回到样品内的同一位置。这种设计极大提升了系统的操作便捷性，尤其适用于结构均匀的样品分析。

## 参考文献

- [1] Toporski, J., Dieing, T., & Hollricher, O. (Eds.). (2018). *Confocal Raman Microscopy* (Vol. 66). Springer. DOI: 10.1007/978-3-319-75380-5.
- [2] Stiebing, C., et al. (2017). Realtime Raman and SRS imaging of living human macrophages reveals cell-to-cell heterogeneity and dynamics of lipid uptake. *Journal of biophotonics*, 10(9), 1217-1226. DOI: 10.1002/jbio.201600279.
- [3] Hermelink, A., et al. (2009). Phenotypic heterogeneity within microbial populations at the single-cell level investigated by confocal Raman microspectroscopy. *Analyst*, 134(6), 1149-1153. DOI: 10.1039/b822574e.
- [4] Abramczyk, H., et al. (2019). Advances in Raman imaging combined with AFM and fluorescence microscopy are beneficial for oncology and cancer research. *Nanomedicine*, 14(14), 1873-1888. DOI: 10.2217/nnm-2018-0335.
- [5] Mamede, A. P., et al. (2022). Breast cancer or surrounding normal tissue? A successful discrimination by FTIR or Raman microspectroscopy. *Analyst*, 147(21), 4919-4932. DOI: 10.1039/d2an00622g.
- [6] Stanek, E., et al. (2022). The distinct phenotype of primary adipocytes and adipocytes derived from stem cells of white adipose tissue as assessed by Raman and fluorescence imaging. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 79(7), 383. DOI: 10.1007/s00018-022-04391-2.
- [7] Czamara, K., et al. (2021). Lipid droplets formation represents an integral component of endothelial inflammation induced by LPS. *Cells*, 10(6), 1403. DOI: 10.3390/cells10061403.
- [8] Stiebing, C., et al. (2020). Biochemical characterization of mouse retina of an Alzheimer's disease model by Raman spectroscopy. *ACS Chemical Neuroscience*, 11(20), 3301-3308. DOI: 10.1021/acschemneuro.0c00420.
- [9] Majka, Z., et al. (2021). A new approach to study human perivascular adipose tissue of the internal mammary artery by fiber-optic Raman spectroscopy supported by spectral modelling. *Analyst*, 146(1), 270-276. DOI: 10.1039/d0an01868f.
- [10] Becker, L., et al. (2022). Data-driven identification of biomarkers for in situ monitoring of drug treatment in bladder cancer organoids. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(13), 6956. DOI: 10.3390/ijms23136956.
- [11] LaLone, V., et al. (2023). Quantitative chemometric phenotyping of three-dimensional liver organoids by Raman spectral imaging. *Cell Reports Methods*, 3(4). DOI: 10.1016/j.crmeth.2023.100440.
- [12] Høgset, H., et al. (2020). In vivo bio-molecular imaging of zebrafish embryos using confocal Raman spectroscopy. *Nature Communications*, 11(1), 6172. DOI: 10.1038/s41467-020-19827-1.
- [13] Haessler, A., et al. (2023). Unraveling Molecular Composition in Biological Samples—Systematic Evaluation of Statistical Methods for the Analysis of Hyperspectral Raman Data. *Analytical Chemistry*, 95(48), 17646-17653. DOI: 10.1021/acs.analchem.3c03368.
- [14] Sigle, M., et al. (2023). Translating genomic tools to Raman spectroscopy analysis enables high-dimensional tissue characterization on molecular resolution. *Nature Communications*, 14(1), 5799. DOI: 10.1038/s41467-023-41417-0.
- [15] Sasani, N., et al. (2021). Raman imaging reveals in-situ microchemistry of cuticle and epidermis of spruce needles. *Plant Methods*, 17, 1-15. DOI: 10.1186/s13007-021-00717-6.
- [16] Sugiyama, K., et al. (2021). Raman microspectroscopy and Raman imaging reveal biomarkers specific for thoracic aortic aneurysms. *Cell Reports Medicine*, 2(5).
- [17] Masic, A., & Weaver, J. C. (2015). Large area sub-micron chemical imaging of magnesium in sea urchin teeth. *Journal of structural biology*, 189(3), 269-275. DOI: 10.1016/j.jsb.2014.12.005.

# WITec Microscopes



**alpha300 S:**  
Scanning Near-field  
Optical Microscope

**alpha300 A:**  
Atomic Force  
Microscope

**alpha300 R:**  
Confocal Raman  
Microscope

**alpha300 Ri:**  
Inverted Confocal  
Raman Microscope

**RISE®:** Raman Imaging  
and Scanning Electron  
Microscope

**alpha300 apyrion™:** Automated  
Confocal Raman Microscope

**alpha300 access:**  
Confocal Micro-Raman System



官方网站



官方服务号



在线服务商城

🌐 欢迎访问: [www.oxinst.cn](http://www.oxinst.cn)

☎ 热线电话: [400 678 0609](tel:4006780609)