

实验室介绍



陈鑫博士, 厦门大学生命科学学院副教授, 博士生导师, 细胞应激生物学国家重点实验室PI。课题组聚焦于生命信号规律的细胞原位空间解析, 利用/发展前沿光学成像技术揭示以细胞程序性死亡为代表的生物过程的内在运行机制。具体包括: (1) 基于单分子定位/样品膨胀的超高分辨显微成像在复杂生物系统中的策略优化; (2) 坏死样凋亡/焦亡等细胞程序性死亡关键信号转导过程的细胞原位解析; (3) 细胞生死命运失衡在感染炎症和肿瘤免疫等应激过程中的表现和作用。

<https://chenlab.xmu.edu.cn/index.htm>

基于样品膨胀的超高分辨显微成像 及其在生命医学中的应用

曹雅婷 陈鑫*

(细胞应激生物学国家重点实验室, 厦门大学生命科学学院, 厦门 361102)

摘要 膨胀显微技术(expansion microscopy, ExM)是一种基于样品膨胀的新型超分辨成像策略, 其能够突破传统光学成像的分辨极限, 实现对细胞结构和大分子复合物的纳米精度观测。更重要的是, 与其他超分辨成像技术相比, 膨胀显微成像不局限于单一显微镜仪器, 可以适用于从细胞到组织, 甚至小型生物个体等多种研究对象, 凸显其在生命医学中的重要价值。该文将从膨胀显微技术的发展简史、主要类型、应用现状及未来展望四个方面进行讨论。

关键词 膨胀显微技术; 超分辨成像; 信号转导; 病理诊断

Expansion Microscopy and Its Application in Biomedicine

CAO Yating, CHEN Xin*

(State Key Laboratory of Cellular Stress Biology, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361102, China)

Abstract ExM (expansion microscopy) is a novel super-resolution imaging strategy based on the physical expansion of biological samples. It can bypass the resolution limit of traditional optical microscopes and achieve

收稿日期: 2023-11-29

接受日期: 2024-02-11

国家自然科学基金面上项目(批准号: 32370803、32070736、31871386)、国家自然科学基金青年项目(批准号: 31501115)、福建省自然科学基金杰青项目(批准号: 2023J06003)、厦门大学校长基金(批准号: 20720210114)和厦门大学拔尖学生贵重实验仪器设备开放创新基金(批准号: KFJJ-202206、KFJJ-202316)资助的课题

*通信作者。Tel: 0592-2187923, E-mail: xchen@xmu.edu.cn

Received: November 29, 2023

Accepted: February 11, 2024

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.32370803, 32070736, 31871386, 31501115), the Fujian Provincial Natural Science Fund for Distinguished Young Scholars (Grant No.2023J06003), the Fundamental Research Funds for the Central Universities XMU (Grant No.20720210114) and the Open Innovation Fund for Undergraduate Students of Xiamen University (Grant No.KFJJ-202206, KFJJ-202316)

*Corresponding author. Tel: +86-592-2187923, E-mail: xchen@xmu.edu.cn

precise observation of cellular structures and macromolecular complexes at nanoscale. More importantly, in contrast to other optical super-resolution technologies, ExM is not restricted to one certain microscope. It has been successfully applied to diverse research objectives from cells to tissue, even to small biological individuals, showing the great value of ExM in biomedicine. This review will discuss the development, main types, research applications and future tendencies of ExM.

Keywords expansion microscopy; super-resolution imaging; signal transduction; pathological diagnosis

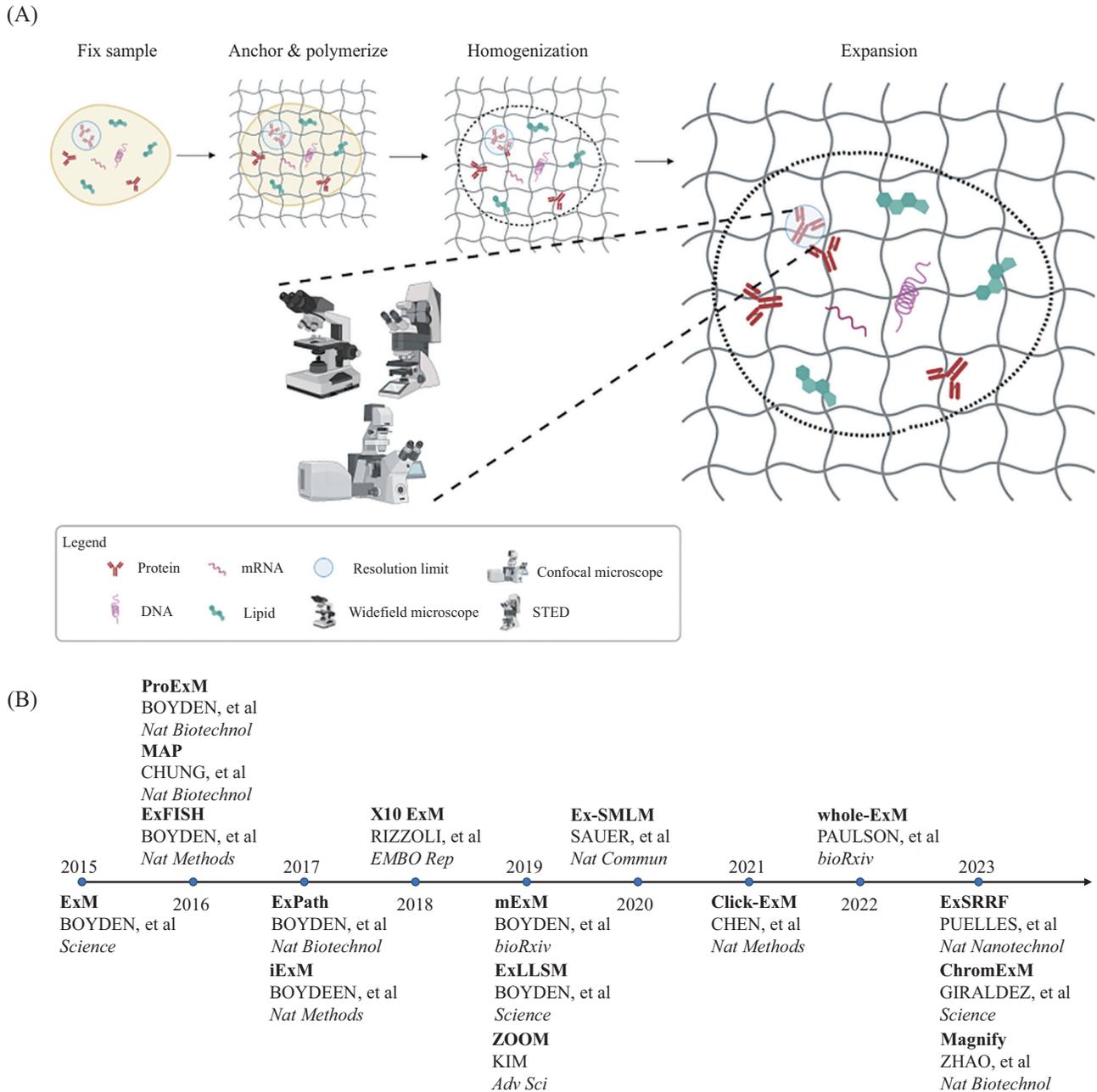
光学显微镜是生命医学研究领域应用最广泛的技术之一,它能够直接观察细胞结构以及关键生物信号分子在各种生理病理情况下的空间分布特征^[1]。然而,由于光学衍射极限的存在,常规共聚焦显微镜的横向分辨率约为220 nm,纵向分辨率约为520 nm^[2],这限制了对亚细胞器结构和大分子复合物等超精细结构的直接观测^[3-4]。为了解决这一问题,科学家们开发了超分辨显微成像技术,成功突破光学衍射极限,将分辨率推进至百纳米以内。该项技术的三位主要贡献者获得了2014年的诺贝尔化学奖。目前基于光学成像原理创新主要包括三类技术路线:结构光照明显微技术(structured illumination microscopy, SIM)^[5];受激发射损耗显微技术(stimulated emission depletion, STED)^[6];以及单分子定位技术,如随机光学重构显微技术(stochastic optical reconstruction microscopy, STORM)^[7]。尽管上述超分辨显微成像技术能够在不同分辨精度上实现亚细胞器纳米尺度的研究,但其对昂贵的硬件设施、特定的荧光染料和复杂的图像处理等要素的需求在一定程度上限制了该技术的广泛应用。

2015年,BOYDEN团队^[8]开发了一种基于样品膨胀的超分辨显微成像技术(expansion microscopy, ExM)。与传统的超分辨显微技术不同,该方法并未着眼于显微镜的改造,而是独辟蹊径地通过物理及化学手段将生物样品放大,使得原本位于分辨极限区域的分子在空间中被分离开,从而实现了等效的成像分辨精度的提升。由于膨胀显微技术主要依赖样品制备,因此,该技术能够与多种基于创新光学仪器改造的超分辨显微技术相结合^[9-10],从而大大提升了针对不同类型生物样品的成像分辨效果,同时由于其能够与多种基于创新光学仪器改造的超分辨显微技术相结合^[9-10],从而大大提升了针对不同类型生物样品的成像分辨效果,甚至达到可以观测生物大分子的单纳米精度水平^[11]。本文旨在讨论膨胀显微

技术的诞生、发展以及其在生命医学中的应用和未来前景。

1 膨胀显微技术的发展简史

2015年,BOYDEN团队^[8]首次提出了膨胀显微技术的方案。在该方案中,锚定剂和生物分子首先形成共价交联,然后将生物样品与含有单体丙烯酸钠(sodium acrylate, SA)、丙烯酰胺(acrylamide, AA)以及交联剂*N,N'*-亚甲基双丙烯酰胺(*N,N'*-methylenebis acrylamide, BIS)的凝胶溶液共孵育。在引发剂过硫酸铵(ammonium persulfate, APS)和促凝剂四甲基乙二胺(tetramethylethylenediamine, TEMED)存在的条件下,单体分子AA与SA的烯键被APS产生的硫酸根攻击,形成自由基,自由基继续攻击单体分子的烯键,依此类推,形成不断升级的链式反应,直到所有可用的单体分子均被添加到聚合物中。在单体分子掺入过程中,AA与SA掺入聚合物的过程是随机的,而BIS分子两端各有一个烯键,使得其能够实现不同聚合链之间的相互交联,形成稳定的三维凝胶。在此过程中,锚定剂修饰的生物分子通过共价结合与凝胶网络交联,随后通过蛋白酶K消化实现对生物样品组织结构的打断。最后,聚电解质水凝胶由于聚合物侧链的离子基团在水中发生静电排斥作用而实现膨胀,扩大了生物分子间的物理距离,从而等效实现了空间成像分辨率的提升(图1A)^[8]。在最初的ExM方案中,锚定剂是一种定制的三官能团标记物,包括一条能够与抗体分子上偶联的DNA单链识别的互补配对链,其5'-末端和3'-末端分别修饰一个能够与聚合物实现共价连接的甲基丙烯酰基,和一个用于后续检测的荧光基团。这就要求研究人员必须合成特定的锚定剂,从而极大限制了该方法的广泛应用。2016年,VAUGHAN实验室^[12]和CHUNG实验室^[13]分别独立开发了替代的商业化试剂6-[(丙烯酰)氨基]己酸(acryloyl-X, AcX)。同年,BOYDEN团队^[14]提出改进方案ProExM,其原理是AcX分子通过其碳



A: 膨胀显微技术原理, 包括固定、目标分子锚定、聚合、均质化、膨胀和后续与多种显微镜结合进行成像; B: 膨胀显微技术的发展简史。加粗字体显示膨胀显微技术名称。

A: the principle of expansion microscopy, including fixation, anchoring of target molecules, polymerize, homogenization, expansion, and subsequent imaging in combination with various microscopes; B: a timeline of the development of expansion microscopy. The bold words show the name of Expansion Microscopy.

图1 膨胀显微技术原理及发展简史

Fig.1 The principle and timeline of Expansion Microscopy

二胺基与蛋白质的伯胺形成稳定的酰胺键, 并释放N-羟基琥珀酰亚胺(N-hydroxysuccinimide, NHS), 同时其自身的烯基基团可参与自由基聚合反应并掺入凝胶网络中, 实现原位内源蛋白质分子的锚定。自此, 样品膨胀开启了超分辨显微成像的新篇章, 迅速成为了新的研究方向和热点(图1B)。在随后几年

间, 针对不同的靶标分子及样品类型, 多个研究团队开发出了不同的膨胀显微技术改进方案(表1)。

2 膨胀显微技术的主要类型

2.1 基于不同的靶标分子

2.1.1 蛋白质分子锚定方案

蛋白质分子是膨胀

表1 主要膨胀方案类型

Table 1 The major types of expansion microscopy

| 膨胀方案 Expansion protocol | 膨胀系数 Expansion factor | 单体分子 Monomer | 锚定剂 Anchor | 分子类型 Molecular type | 组织类型 Tissue type |
|----------------------------|--------------------------|-----------------|------------------------|-------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| ExM ^[8] | 3-4 | SA, AA | Trifunctional molecule | Protein | Neuron, mouse brain slices |
| ProExM ^[14] | ~4 | SA, AA | AcX | Protein | Cells |
| MAP ^[13] | ~4 | SA, AA | AA | Protein | Cells, mouse brain slices |
| ExFISH ^[18] | ~4 | SA, AA | LabelX | Nucleic acid | Cells, mouse brain slices |
| iExM ^[36] | ~15 | SA, AA | AcX | Protein | Cells, neuron, mouse brain slices, mouse liver tissue slices |
| X10 ExM ^[24] | ~10 | SA, DMAA | AcX | Protein | Neuron, rat brain slices |
| ZOOM ^[29] | 8-9 | AA | NAS | Protein | Cells, <i>Escherichia coli</i> , mouse brain slices, human brain slices, <i>Caenorhabditis elegans</i> |
| U-ExM ^[16] | ~4 | SA, AA | AA | Protein | Cells |
| mExM ^[20] | 3-4 | SA, AA | Trifunctional molecule | Protein | Cells |
| Click-ExM ^[21] | ~4.5 | SA, AA | AcX, GA | Protein, nucleic acid, lipids | Cells, neuron, mouse brain slices |
| ChromExM ^[37] | ~16 | SA, AA | AA | Nucleic acid | Cells, embryo |
| Magnify ^[22] | ~11 | SA, AA, DMAA | Methacrolein | Protein, nucleic acid, lipids | Cells, multiple tissue slices of mouse (heart, intestines, kidneys, liver, lungs, brain), human pathological tissues (lymph node, kidney, lung) |

SA: 丙烯酸钠; AA: 丙烯酰胺; AcX: 6-[(丙烯酰)氨基]己酸; LabelX: AcX与Label IT合成的双功能锚定剂; DMAA: *N,N*-二甲基丙烯酰胺; NAS: *N*-丙烯酰氧基琥珀酰亚胺; GA: 戊二醛; methacrolein: 甲基丙烯醛。

SA: sodium acrylate; AA: acrylamide; AcX: acryloyl-X; LabelX: AcX with Label IT synthesized bifunctional anchoring agent; DMAA: *N,N*-dimethylacrylamide acid; NAS: *N*-acryloxysuccinimide; GA: glutaraldehyde.

显微技术中最早被靶向的生物分子。BOYDEN团队2015年首次提出了膨胀显微技术^[8],并于2016年提出改进版膨胀方案ProExM^[14]。该方案使用多种商业化的荧光抗体或实验室常用的荧光蛋白(如GFP),样品膨胀后荧光信号保留约为50%。通过该方案,该团队成功实现了对细胞和组织样品进行多色纳米尺度成像。

在上述膨胀方案中,为了实现各向均质膨胀,通常需要借助蛋白酶(如蛋白酶K)进行充分消化。然而这种消化将导致靶蛋白的大量丢失,从而影响后续对其识别和检测。为了解决这一问题,CHUNG实验室^[13]对ExM中的锚定和均质化过程进行了优化,并提出了新方案MAP。在甲醛固定过程中,蛋白质分子会过度交联,形成大量亚甲基桥。为防止这种过度交联,MAP方案在锚定过程中引入丙烯酰胺,其自身的氨基能够参与与甲醛介导的亚甲基桥的形成。随后,丙烯酰胺以一种目前无法解释的化学方式实现

蛋白质与凝胶的共价锚定^[15]。使用加热的表面活性剂十二烷基硫酸钠(sodium dodecylsulfate, SDS)溶液对样品进行蛋白质变性,从而既打断了原有细胞结构便于膨胀,又较大程度上保留了便于后续荧光信号的标记和识别。这种锚定和均质化方案在U-ExM中也得到了验证,从而清楚地观测到了细胞中心粒的9组筒状蛋白质超微结构^[16]。

2.1.2 核酸分子锚定方案 核酸分子主要包括DNA和RNA两类,由于二者的性质及分布有所不同,故二者的膨胀方案也存在差异。

基因组DNA较为复杂,分子尺寸较大,因此大多数的DNA分子能够在膨胀后的凝胶中得到原位保留。赵永新等^[17]利用FISH探针,成功在临床样本中进行了DNA FISH成像,实现了DNA核酸分子的纳米级可视化。

RNA分子无法像DNA分子一样有效保留在凝胶中,大部分都在膨胀过程中被洗脱。因此,为了将

RNA分子锚定至凝胶网络, CHEN等^[18]开发了用于ExM中RNA成像的ExFISH: AcX与Label IT的胺发生NHS脂反应, 形成稳定的酰胺键, 而Label IT还包含一个能够通过烷基化与核酸中碱基共价连接的活性基团。由此二者一步合成的双功能锚定剂被命名为LabelIX, 它既能掺入凝胶网络, 又能与核酸实现共价连接。通过与荧光团偶联的DNAoligo探针进行读取, 实现了对RNA分子的膨胀后标记和成像^[18]。

2.1.3 脂质分子锚定方案 细胞膜在维持细胞生命活动中具有重要功能, 它包含多种脂质分子, 如胆固醇和鞘磷脂等。尽管目前存在很多的脂质染料可用于脂质分子的定位, 但这些染料都难以与ExM兼容^[13,19]。

为解决这一问题, BASKIN实验室^[20]设计了一种三官能脂质探针用于膜膨胀显微技术mExM。该三官能团脂质探针包括一个能插入细胞质膜的棕榈酰基、一个能提供伯胺与AcX发生NHS脂反应的赖氨酸链, 以及一个生物素分子。后者通过识别带有荧光基团标记的链霉亲和素实现膨胀后标记, 以及对细胞膜的纳米精度成像。同时, 该脂质的锚定方案还能与蛋白质的锚定方案相结合, 实现对样品的膜和相关蛋白质同时保留的膨胀显微成像。

2.1.4 生物分子的通用锚定方案 上述针对三种不同的主要生物分子涉及多种合成化学分子, 操作步骤也不尽相同, 限制了其在生物医学应用中的应用。

为了解决这一瓶颈, 2021年陈兴课题组^[21]开发了一种通用的锚定方案Click-ExM。该方案通过代谢标记的生物分子与叠氮化物-生物素反应实现特定类型分子锚定。例如, 通过叠氮高丙氨酸(azido-homoalanine, AHA)进行蛋白质代谢掺入标记; 用5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(5-ethynyl-2'-deoxyuridine, EdU)进行核酸代谢掺入标记; 用烷基胆碱(alkyne-choline, Alk-Cho)进行脂质代谢掺入标记, 然后用带有荧光基团的链霉亲和素识别染色, 实现靶向特定生物分子的高效通用膨胀方案^[21]。

2023年, KLIMAS等^[22]开发了另一种通用的锚定方案Magnify。该方案无需单独的锚定步骤, 也不需要针对不同的生物分子定制或掺入化学试剂。其主要原理是使用了一种小分子化合物——甲基丙烯醛。它的醛基通过形成亚甲基桥修饰生物分子实现样品分子的固定, 而异丙烯基则通过自由基反应掺

入凝胶网络中。该分子具有极强的稳定性, 能够与单体溶液共存, 因此实现了一步法完成ExM中的锚定及凝胶过程。此外, 在凝胶溶液中, 加入*N,N*-二甲基丙烯酰胺(*N,N*-dimethylacrylamide acid, DMAA), 其既可以像AA一样作为单体分子实现线性延伸, 还可以像BIS一样作为交联剂实现凝胶的网络交联, 从而改变凝胶网络的结构, 增加凝胶的韧性, 实现更高的膨胀系数11倍。

该膨胀方案适用于多种生物分子的锚定, 有趣的是, 作者发现在甲基丙烯醛参与条件下, 此前报道的无法与ExM兼容的脂质染料可与Magnify良好兼容, 膨胀后的脂质荧光信号可保留90%以上^[22]。由于该方案中甲基丙烯醛的浓度配比以及后续热变性均质化的时间对于实验结果至关重要, 因此需要对不同样品进行细致的测试和优化, 以实现最佳的膨胀超分辨效果。

2.2 基于不同分析样品

2.2.1 细胞样品 细胞样品是目前应用最广泛的ExM分析样品类型。体外培养的单层细胞均质性好, 易于多种化学试剂的扩散, 可以有效避免在ExM各个阶段出现的不均匀或不完整的反应^[8,23]。

然而, 对于更为复杂的体外培养细胞样品, 如多层细胞或类器官细胞团等, 其样品锚定和均质化过程就显得尤为重要。DANZL等^[24]发现在原代神经元培养进行X10膨胀方案时, 样品出现了明显的破裂, 其主要是机械阻力和膨胀水凝胶之间的拉锯导致的。这一问题可以通过稳定蛋白酶K功能, 即在消化缓冲液中去离子螯合剂EDTA并添加2 mmol/L钙离子得以解决。此外, 均质化有可能导致凝胶中AcX锚定的抗体信号丢失, 为解决这一问题, 需要使用更强的碱性条件(pH8.3 vs pH7.0)进行蛋白质锚定, 从而促进NHS-酯与伯胺的反应^[12]。

U-ExM方案的诞生解决了此前ProExM及MAP等处理方式带来的样品变形问题, 实现了细胞中心粒的超微结构保存^[13-14,16]。GAMBAROTTO等^[16]通过大幅降低锚定溶液中反应试剂的浓度(0.7% PFA和0.15%~1.00% AA)以及更改单体溶液丙烯酰胺与丙烯酸钠的比例(U-ExM, 19% SA+10% AA; MAP, 7% SA+20% AA; ProExM, 8.625% SA+20% AA), 进一步降低了高度交联化合物对凝胶膨胀的机械抗性。目前, U-ExM方案中的单体溶液配比使得膨胀凝胶基质具有最佳密度, 并且它能以较理想的空间

覆盖率对嵌入其中的生物标本进行锚定交联, 是一个值得推荐的首选样品膨胀方案。

2.2.2 组织样品 与细胞相比, 各种类型的组织具有更强的机械韧性、更大的结构异质性以及通常更大的厚度。这些特征都会影响膨胀化学试剂对样品的均匀渗透, 从而进一步影响后续各向同性均质化的膨胀效果。因此, 如何有效避免样品在膨胀过程中可能发生的破裂或变形问题, 就显得尤为重要。

以脊椎动物器官切片为例, 其中结缔组织含量较高(主要成分为机械抗性较高的胶原蛋白), 因此必须采用胶原酶处理, 以实现组织的各向同性的膨胀效果^[25]。

此外, 许多生理病理组织样品被包埋在石蜡或树脂环境中, 无法与ProExM兼容。为解决这一问题, BOYDEN团队^[17]开发了第一个适用于临床样品的膨胀策略——ExPath。ExPath通过在膨胀前用二甲苯溶解石蜡, 并在pH8.0和100 °C下用20 mmol/L柠檬酸钠处理, 逆转由福尔马林固定引入的蛋白质过度交联^[17,26-27]。该项技术的开发使得研究临床样品可以更便捷地实现超分辨显微成像, 提升成像效果的同时降低实验成本, 具有良好的病理诊断应用前景^[17,28]。

2.2.3 小型多细胞个体 完整生物个体的膨胀显微成像首次在秀丽隐杆线虫中实现^[29]。秀丽隐杆线虫体壁的主要结构成分是胶原蛋白, 这些胶原蛋白通过二硫键交联形成结构紧密的三聚体纤维, 但二硫键可以被 β -巯基乙醇还原破坏^[30-31]。ZOOM方案中, 通过高温和高pH值的作用, 使得单体分子AA中的伯酰胺转化为羧酸盐, 后者的带电离子残基取代单体分子SA的功能, 在后续过程中实现膨胀, 因此ZOOM方案中仅有AA这一种单体分子。AA分子量较小, 易于穿透细胞质膜, 从而形成更加均匀的凝胶网络。此外, 该方案中使用N-丙烯酰氧基琥珀酰亚胺(N-acryloxysuccinimide, NAS)代替AcX作为锚定剂。NAS结构与AA类似, 分子量更小, 溶解度更高, 能够实现更均匀的凝胶网络。最终通过热变性均质化生物体的其余部分, 膨胀系数达到3倍, 实现成像分辨率的突破。值得注意的是, ZOOM方法原则上允许高达8~9倍的膨胀系数, 但在秀丽隐杆线虫的扩增系数仅为3.1倍^[29]。这可能是由于样品组分的抗膨胀性或不完全均质化而导致样品的损坏, 类似于使用X10方案膨胀神经元细胞观察到的情况^[23]。

2022年, PAULSON团队^[32]进一步开发了完整斑马鱼个体的膨胀方案, 通过脱钙的方式解决了骨均质化的问题, 并将其命名为whole-ExM。

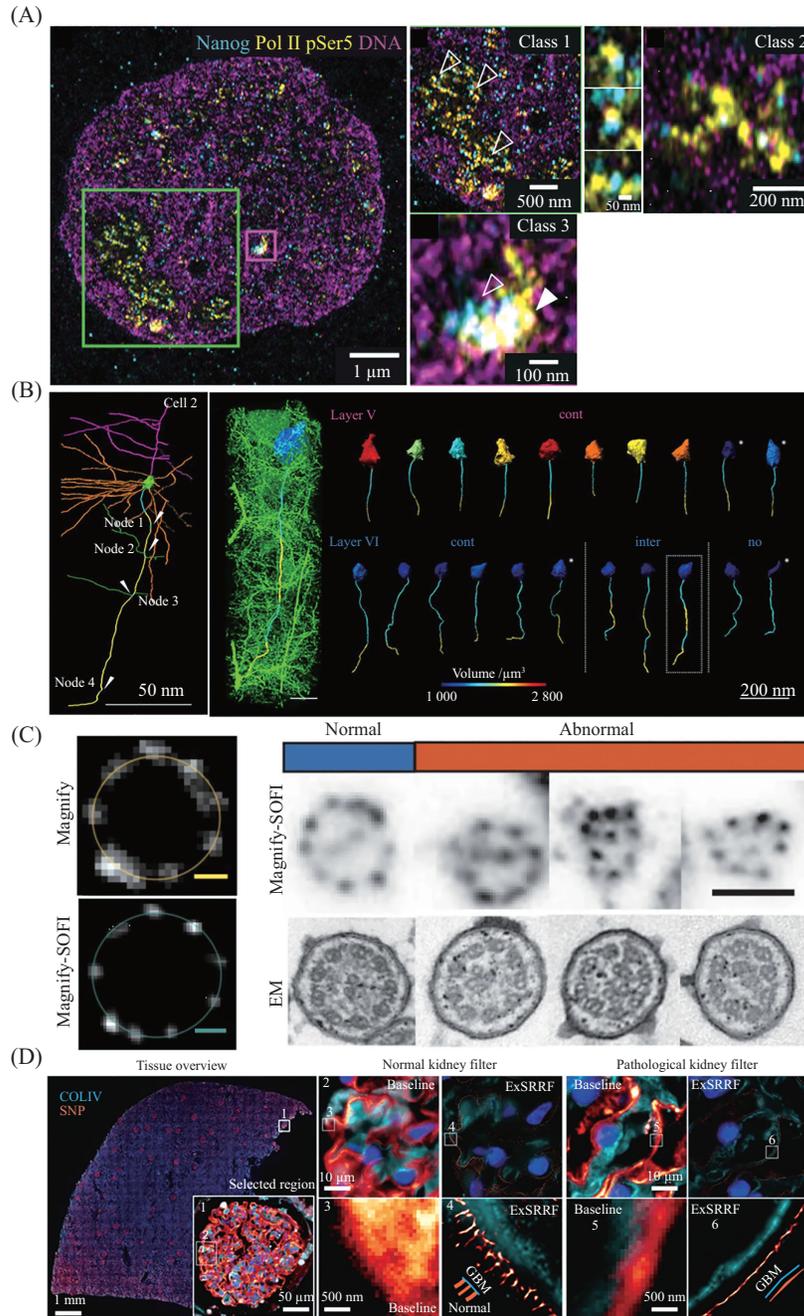
此外, KAO和NODINE^[33-34]实现了拟南芥胚珠和种子的1.3倍至2.0倍的扩张。然而, 由于植物细胞壁的分子结构具有很强的机械刚性, 因此需要多种酶如果胶酶、纤维素酶和半纤维素酶^[34-35]等的组合使用。迄今为止, 尚无植物组织实现显著扩增(3~4倍)的方案。未来, 针对此类难以膨胀的复杂样品, 实现其高效均质化放大将成为ExM技术发展的一个重要方向。

3 膨胀显微技术的生命医学应用实例

3.1 基因转录调节的分子机制

哺乳动物在受精后会形成复杂的多细胞胚胎。在此过程中, 胚胎需经历由母体向合子的转变过程, 并伴随着合子染色质的重塑和基因组的转录激活^[38-40]。其中, 转录关键因子Nanog被认为能够打开染色质, 招募RNA聚合酶II(Pol II)并激活转录^[38,41]。然而, 转录因子在基因组激活过程中如何实现精细调节的分子机制仍不清楚。

2023年, ANTONIO GIRALDEZ实验室^[37]研发了染色质膨胀显微技术(ChromExM), 用于可视化胚胎内的染色质、转录和转录因子空间互作等重要事件。转录关键因子Nanog与核小体及RNA聚合酶(Pol II)相互作用的精细过程, 包括与启动子结合、延伸和与增强子结合的3个阶段(图2A)。在该方案中, 通过改进迭代膨胀方案iExM^[36], 利用更长时间、更温和的锚定方案处理胚胎, 同时通过调整热变性溶液的pH值实现更严格的均质化过程, 最终实现14.5~16.0倍的线性膨胀系数。同时, 为解决约4 000倍体积膨胀后荧光信号降低的问题, 引入(2'S)-2'-脱氧-2'-氟-5-乙炔尿苷[(2'S)-2'-deoxy-2'-fluoro-5-ethynyluridine, f-ara-EdU]代谢标记DNA^[40], 并在扩增后进行荧光吡啶甲酰叠氮化物检测^[42], 将标记强度提高了约45倍, 最终实现了单个核小体的超分辨可视化。这一开创性工作揭示了关键因子Nanog与核小体和RNA聚合酶II(Pol II)相互作用的精细过程, 并直观展示了转录延伸过程的弦状纳米结构。而阻断转录延伸, 将导致更多的Pol II颗粒聚集在Nanog周围, Pol II停滞在启动子和Nanog结合的增强子处。通过对胚胎发育过程中的关键转录事件的直接超分辨观察, 作者修



A: (左)代表性图像显示在4 hpf时的Nanog和Pol II pSer5染色结果。(右)放大展示了左侧的绿色和红色方框区域里的1类组织结构(空心箭头所示区域放大到右侧)以及2类和3类组织结构(箭头指示富含Nanog(空心箭头)和Pol II pSer5(实心箭头)的区域)。B: (左)追踪到的第二层V锥形神经元的分支。(右)来自第V层(10个, 上行)和来自第VI层(超过11个, 下行)的锥形神经元分割的细胞体(按体积大小着色)和轴突上髓鞘化(黄色)和非髓鞘化(青色)部分。方框内的神经元显示在左侧。C: (左)无缺陷纤毛的Magnify图像和Magnify-SOFI图像之间的比较。(右)有缺陷和无缺陷纤毛的Magnify-SOFI图像(顶部)和电子显微镜图像(底部)之间的比较。D: 在正常人和病人的肾脏样品中, ExSRRF通过突触素(SNP)(标记足突, 橙色)和胶原蛋白IV(COLIV)(标记肾小球基底膜, 青色)染色结果识别正常和脱落的足突。

A: (left) representative images displaying Nanog and Pol II pSer5 staining at 4 hpf. (Right) Depicts the green and magenta boxed region from the left, showcasing class 1 organization (areas indicated with arrowheads are magnified to the right); class 2 and class 3 organization (arrowheads indicate regions enriched for Nanog (open arrowhead) and Pol II pSer5 (closed arrowhead)). B: (left) traced arborization of a second layer V pyramidal neuron. (Right) Segmented somata (color-coded by volume) and axons, exhibiting myelinated (yellow) and unmyelinated (cyan) segments, for 10 pyramidal neurons from layer V (top row) and 11 more from layer VI (bottom row). The boxed neuron is displayed at the left. C: (left) comparison between Magnify and Magnify-SOFI of cilia without defects. (Right) Side-by-side comparison between Magnify-SOFI images (top) and electron micrographs (bottom) of cilia with and without defects. D: ExSRRF identified both normal and effaced the foot processes using SNP (synaptopodin) (labelling the foot processes; orange) and collagen IV (COLIV) (labelling the glomerular basement membrane; cyan) in kidney samples from normal and pathological individuals.

图2 膨胀显微技术在生命医学中的应用(根据参考文献[37]、[10]、[22]和[28]修改)

Fig.2 The application of Expansion Microscopy in biomedicine (modified from references [37], [10], [22] and [28])

订了此前广泛提及的“Kiss and Run”模式, 提出了基于“所见即所得”的新模型“Kiss and Kick”, 加深了人们对染色质重塑介导的转录调节的理解深度^[43]。

3.2 神经元的信号转导

人脑是一个质量约为1.5 kg的器官, 尽管其体积很小, 却包含超过800亿个神经元^[44]。每个神经元通过大约7 000个突触连接形成一个极其复杂的网络^[10]。神经结构的尺寸十分广泛, 按照不同结构的典型尺寸可依次排列为: 突触小泡、树突棘、神经元突起、神经元、局部神经元回路以及全脑结构。其空间跨度从约为40 nm的突触小泡到约为10 cm的人类全脑^[44-46]。然而, 要精细研究全脑内多种神经元间的纳米尺度连接及互作仍面临很大的技术困难。

2019年, BETZIG实验室^[10]将ProExM方案与晶格光片显微镜(lattice light-sheet microscopy, LLSM)结合, 并将其命名为ExLLSM方案。传统研究方案中, 研究人员对体积约为340 μm ×660 μm ×90 μm 的果蝇全脑样品成像需几天甚至几周的时间。此外, 膨胀后较厚的样品如果采用常规光学显微镜进行3D层扫, 将加剧样品荧光信号的漂白。因此, 采用晶格光片显微镜可以在提高7倍的成像速度的同时, 减缓10倍以上的光漂白速率。这项工作成功实现了在突触细胞内对亚细胞体积的成像量化, 其对线粒体及溶酶体的体积测定同电镜结果一致^[47]。更重要的是, 该项工作明确了约1 500个树突棘的形态参数, 以及突触前和突触后关键蛋白质之间距离的变化, 揭示了相邻锥体神经元突触后表达的巨大差异, 以及轴突髓鞘形成的特异性纵向变化(图2B)。基于这些高质量的超分辨成像结果, 作者提出了前髓磷脂轴突段(premyelin axonal segment, PMAS)长度是神经元控制动作电位(action potential, AP)的关键因素的创新假说, 为我们更深刻地理解大脑的复杂功能提供了新的认识。

3.3 病理诊断的临床应用

初级纤毛几乎存在于每个哺乳动物细胞的顶端表面。而纤毛病是一种复杂的人类遗传性病, 其特征是原发纤毛和运动纤毛功能失调。运动纤毛病影响多种重要器官, 如气道、大脑、中耳、精子和输卵管等^[48]。在纤毛病的诊断和治疗中, 对纤毛形成的调节因素的鉴定和纤毛结构变化的监测具有重要临床意义。传统方案中, 纤毛结构可通过透射电

镜进行观测, 但其耗时耗力且无法很好地展现纤毛的三维结构^[49-50]。

赵永新实验室^[22]将Magnify方案与计算超分辨SOFI技术结合, 发现在健康人肺样品中纤毛结构表现为规则的九重对称性结构, 而在紫杉醇处理的正常人样品或纤毛病病人样品中, 纤毛结构对称性被明显破坏(图2C)。尽管未达到透射电镜的分辨率, 但Magnify-SOFI方案通过样品膨胀和常见的基础共聚焦成像的组合, 观测到正常和有缺陷的纤毛超微结构, 对纤毛病的临床诊断和致病机制研究具有显著的应用价值。

同时, PUELLES实验室^[28]将ExPath方案与增强图像分辨率的计算方法(super-resolution radial fluctuations, SRRF)结合, 并将其命名为ExSRRF方案。方案中采用了最基础的凝胶方案用于避免更大的膨胀系数带来的视野缩小、荧光信号减弱等问题, 同时采集用于SRRF计算的图像时间序列, 实现了基于宽场显微镜的超分辨成像(等效分辨率25 nm)。足细胞是肾小球滤器的重要组成部分。当受伤时, 足突(foot processe, FP)会缩回细胞质, 并发生变宽和融合等结构变化。这是一种在肾活检中被称为“足突脱落”的病理变化, 也是临床诊断治疗的重要参考指标^[51]。ExSRRF能够观测到肾小球滤器足细胞的精细形态结构, 在患有微小病变肾病的病人样本中检测到“足突脱落”现象(图2D), 显著提升人肾活检足细胞损伤的诊断效果^[28]。上述应用案例展示了样品膨胀技术在病理诊断方面的潜力。随着不断发展, 该研究技术未来有望成为现有病理诊断的替代或升级方案。

4 膨胀显微技术现有瓶颈和未来发展

ExM作为一种样品制备的革新策略, 能够在传统光学显微镜上实现分辨极限的突破。它与依赖复杂光学仪器的SIM、STED和STORM等超分辨成像技术相比, 对大部分不具备前沿光学成像基础的生物学实验室来说更具吸引力。然而, 为了在实际研究应用中获得真实准确的超分辨成像效果, 需要特别注意以下事项。

4.1 样品膨胀的均质性

各向同性放大是膨胀显微技术成功的关键^[52]。为实现这一效果, 需要确保样品本身具备相近的机械强度均质性, 否则样品不同区域的膨胀系数差异

可能导致样品发生扭曲、变形甚至断裂。细胞样品通常具有较好的均质性。但对于大多数含有大量维持韧性的胶原蛋白的组织样品,在膨胀前往往需要使用胶原酶或蛋白酶K进行消化,以实现各向同性膨胀。

此外,在如中心粒等蛋白质密集的复合物中,例如中心粒,容易发生膨胀变形。一些方案如ExM、MAP等均观察到了目标结构的明显变形^[8,13]。在U-ExM方案中,采用温和的固定方式并调整单体溶液的比例,实现了对中心粒结构的高保真性放大^[16]。这表明蛋白质在固定过程中的交联程度将对后续膨胀效果产生重要影响,需要根据具体研究目标进行细致优化。

目前,蛋白质均质化的方法主要分为两类:蛋白酶K消化和热变性处理。尽管蛋白酶K消化通常能够实现更好的均质化效果^[8,14,17],但可能导致大量蛋白质丢失,从而影响后续的信号识别。出于对蛋白质抗原保留的考虑,热变性均质化逐渐成为主要的处理手段。通过对热变性条件的优化,如调整热变性时间,最长可达到80 h^[16,22];调整热变性溶液中试剂的比例以及pH值等,已实现对于机械性极强的人类肾脏及肝脏组织的均质化膨胀^[22]。

当然,关于样品是否发生局部失真,目前仍缺乏可靠的评估方案。最近报道了一种名为GelMap的方法,通过引入可膨胀的蛋白荧光规则网格,实现了对样品膨胀效果的评估以及畸变矫正,对样品膨胀显微成像领域长期存在的技术担忧提供了一种可行的评价和改善方案^[53]。然而,目前该方法主要适用于二维成像,对于三维分布的生物样品膨胀效果的评估和矫正仍是未来亟待解决的关键技术问题。

4.2 信号标记采集的效率和偏差

此前提到,蛋白酶K的消化过程会导致大量蛋白质分子的丢失,同时不同锚定剂对于生物分子的保留效率也存在差异,这些都会影响后续抗体对于抗原的识别^[8,20,23,36]。值得注意的是,凝胶网络本身孔径的大小也是一个重要的影响因素,特别是在采用常规抗体(分子大小约150 kDa)进行染色标记的方案中^[9]。通过不同尺度葡聚糖分子的光漂白恢复实验(fluorescence recovery after photobleaching, FRAP),生物大分子在凝胶网络的扩散效果与其自身的尺寸和凝胶网络的孔径大小有着密切关联^[22]。为提高抗体的扩散效率,可以使用更小的抗体,如Fab和Nanobody等(分子大小约为20 kDa)^[9]。

膨胀显微技术还存在一个不容忽视的问题,即膨胀后荧光信号的大幅降低(10倍的线性膨胀导致信号密度至少降低 10^3 倍)。此外,自由基诱导的聚合反应会不同程度地破坏有机染料或荧光蛋白,降低能够被观测到的荧光信号^[14,23-24]。值得注意的是,在单分子定位超分辨成像中最重要的菁染料如Cy5,在聚合过程中几乎完全被破坏^[23]。

为了改善这一困境,多个研究团队提出了两种主要的解决思路:使用三官能团分子增加信号保留,以及通过杂交链式反应(HCR)进行信号放大。HOFKENS实验室^[19]证明稳定剂4-硝基苯丙氨酸(4-nitrophenylalanine, NPA)修饰的有机荧光团在自由基诱导的聚合步骤中显示出更好的荧光信号保留。这些四官能连接子不仅可以增加荧光强度,还可以改善染料扩增后的光稳定性,并且不会对后续聚合反应产生负面影响。CHEN等^[18]将杂交链式反应(HCR)与ExFISH相结合,通过在生物素化DNA HCR引发剂的5'-末端引入丙烯酸酯基团,标记的生物分子可以共价锚定在水凝胶上并在扩增后得以保留,实现荧光信号的放大。与ExM中的标准免疫染色方法相比, isHCR使荧光信号增加了 10^3 倍,使高质量的膨胀显微技术的超分辨成像成为可能。

5 总结语

自2015年问世以来,ExM目前正处在高速发展的黄金时期。截至2023年已有超过360篇研究论文(PubMed)。作为一种创新的样品处理策略,ExM能够与基于显微镜硬件和图像分析的几乎所有的超分辨显微成像技术相结合,已经产生许多令人意想不到的优异效果。例如,ExM与SRRF(ONE)^[11]的结合使有效的空间分辨率达到1 nm,同时,该方案正朝着成本更低、速度更快、针对性更强的方向发展。可以预见,在解决当下制约该技术更广泛应用的一些技术瓶颈,如膨胀保真性以及信号保留和增强等问题的前提下,ExM有望成为一种通用且广泛适用的研究技术策略。我们非常期待未来5~10年间,ExM能够在生命医学的各个领域,包括分子机制及病理检测等方面获得更多突破性的应用,不断扩展人类对自然和对生命的认知边界。

参考文献 (References)

- [1] ADAM N, BEATTIE T L, RIABOWOL K. Fluorescence mi-

- croscopy methods for examining telomeres during cell aging [J]. *Ageing Res Rev*, 2021, 68: 101320.
- [2] HUANG B, BATES M, ZHUANG X. Super-resolution fluorescence microscopy [J]. *Annu Rev Biochem*, 2009, 78: 993-1016.
- [3] CHEN X, ZHU R, ZHONG J, et al. Mosaic composition of RIP1-RIP3 signalling hub and its role in regulating cell death [J]. *Nat Cell Biol*, 2022, 24(4): 471-82.
- [4] HELL S W, WICHMANN J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy [J]. *Opt Lett*, 1994, 19(11): 780-2.
- [5] BETZIG E, PATTERSON G H, SOUGRAT R, et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution [J]. *Science*, 2006, 313(5793): 1642-5.
- [6] HESS S T, GIRIRAJAN T P, MASON M D. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy [J]. *Biophys J*, 2006, 91(11): 4258-72.
- [7] RUST M J, BATES M, ZHUANG X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM) [J]. *Nat Methods*, 2006, 3(10): 793-5.
- [8] CHEN F, TILLBERG P W, BOYDEN E S. Optical imaging. Expansion microscopy [J]. *Science*, 2015, 347(6221): 543-8.
- [9] ZWETTLER F U, REINHARD S, GAMBAROTTO D, et al. Molecular resolution imaging by post-labeling expansion single-molecule localization microscopy (Ex-SMLM) [J]. *Nat Commun*, 2020, 11(1): 3388.
- [10] GAO R, ASANO S M, UPADHYAYULA S, et al. Cortical column and whole-brain imaging with molecular contrast and nanoscale resolution [J]. *Science*, 2019, 363(6424): eaau8302.
- [11] SHAIB A H, CHOUAIB A A, CHOWDHURY R, et al. Expansion microscopy at one nanometer resolution [J]. *BioRxiv*, 2022, doi: <https://doi.org/10.1101/2022.08.03.502284>.
- [12] CHOZINSKI T J, HALPERN A R, OKAWA H, et al. Expansion microscopy with conventional antibodies and fluorescent proteins [J]. *Nat Methods*, 2016, 13(6): 485-8.
- [13] KU T, SWANEY J, PARK J Y, et al. Multiplexed and scalable super-resolution imaging of three-dimensional protein localization in size-adjustable tissues [J]. *Nat Biotechnol*, 2016, 34(9): 973-81.
- [14] TILLBERG P W, CHEN F, PIATKEVICH K D, et al. Protein-retention expansion microscopy of cells and tissues labeled using standard fluorescent proteins and antibodies [J]. *Nat Biotechnol*, 2016, 34(9): 987-92.
- [15] WEN G, LEEN V, ROHAND T, et al. Current progress in expansion microscopy: chemical strategies and applications [J]. *Chem Rev*, 2023, 123(6): 3299-323.
- [16] GAMBAROTTO D, ZWETTLER F U, LE GUENNEC M, et al. Imaging cellular ultrastructures using expansion microscopy (U-ExM) [J]. *Nat Methods*, 2019, 16(1): 71-4.
- [17] ZHAO Y, BUCUR O, IRSHAD H, et al. Nanoscale imaging of clinical specimens using pathology-optimized expansion microscopy [J]. *Nat Biotechnol*, 2017, 35(8): 757-64.
- [18] CHEN F, WASSIE A T, COTE A J, et al. Nanoscale imaging of RNA with expansion microscopy [J]. *Nat Methods*, 2016, 13(8): 679-84.
- [19] WEN G, VANHEUSDEN M, LEEN V, et al. A universal labeling strategy for nucleic acids in expansion microscopy [J]. *J Am Chem Soc*, 2021, 143(34): 13782-9.
- [20] WHITE B M, KUMAR P, CONWELL A N, et al. Lipid expansion microscopy [J]. *J Am Chem Soc*, 2022, 144(40): 18212-7.
- [21] SUN D E, FAN X, SHI Y, et al. Click-ExM enables expansion microscopy for all biomolecules [J]. *Nat Methods*, 2021, 18(1): 107-13.
- [22] KLIMAS A, GALLAGHER B R, WIJESEKARA P, et al. Magnify is a universal molecular anchoring strategy for expansion microscopy [J]. *Nat Biotechnol*, 2023, 41(6): 858-69.
- [23] TRUCKENBRODT S, SOMMER C, RIZZOLI S O, et al. A practical guide to optimization in X10 expansion microscopy [J]. *Nat Protoc*, 2019, 14(3): 832-63.
- [24] TRUCKENBRODT S, MAIDORN M, CRZAN D, et al. X10 expansion microscopy enables 25-nm resolution on conventional microscopes [J]. *EMBO Rep*, 2018, 19(9): e45836.
- [25] MAO C, LEE M Y, JHAN J R, et al. Feature-rich covalent stains for super-resolution and cleared tissue fluorescence microscopy [J]. *Sci Adv*, 2020, 6(22): eaba4542.
- [26] PILERI S A, RONCADOR G, CECCARELLI C, et al. Antigen retrieval techniques in immunohistochemistry: comparison of different methods [J]. *J Pathol*, 1997, 183(1): 116-23.
- [27] SHI S R, COTE R J, TAYLOR C R. Antigen retrieval immunohistochemistry: past, present, and future [J]. *J Histochem Cytochem*, 1997, 45(3): 327-43.
- [28] KYLIES D, ZIMMERMANN M, HAAS F, et al. Expansion-enhanced super-resolution radial fluctuations enable nanoscale molecular profiling of pathology specimens [J]. *Nat Nanotechnol*, 2023, 18(4): 336-42.
- [29] PARK H E, CHOI D, PARK J S, et al. Scalable and isotropic expansion of tissues with simply tunable expansion ratio [J]. *Adv Sci*, 2019, 6(22): 1901673.
- [30] SHOULDERS M D, RAINES R T. Collagen structure and stability [J]. *Annu Rev Biochem*, 2009, 78: 929-58.
- [31] LIVANEC P W, DUNN R C. Single-molecule probes of lipid membrane structure [J]. *Langmuir*, 2008, 24(24): 14066-73.
- [32] SIM J, PARK C E, CHO I, et al. Nanoscale resolution imaging of the whole mouse embryos and larval zebrafish using expansion microscopy [J]. *BioRxiv*, 2021, doi: <https://doi.org/10.1101/2021.05.18.443629>.
- [33] KAO P, NODINE M D. transcriptional activation of *Arabidopsis* zygotes is required for initial cell divisions [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 17159.
- [34] KAO P, NODINE M D. Application of expansion microscopy on developing *Arabidopsis* seeds [J]. *Methods Cell Biol*, 2021, 161: 181-95.
- [35] VAVRDOVÁ T, ŠAMAJOVÁ O, KŘENEK P, et al. Multicolour three dimensional structured illumination microscopy of immunolabeled plant microtubules and associated proteins [J]. *Plant Methods*, 2019, 15: 22.
- [36] CHANG J B, CHEN F, YOON Y G, et al. Iterative expansion microscopy [J]. *Nat Methods*, 2017, 14(6): 593-9.
- [37] POWNALL M E, MIAO L, VEJNAR C E, et al. Chromatin expansion microscopy reveals nanoscale organization of transcription and chromatin [J]. *Science*, 2023, 381(6653): 92-100.
- [38] VASTENHOUW N L, CAO W X, LIPSHITZ H D. The maternal-to-zygotic transition revisited [J]. *Development*, 2019, 146(11): dev161471.
- [39] SCHULZ K N, HARRISON M M. Mechanisms regulating zy-

- gotic genome activation [J]. *Nat Rev Genet*, 2019, 20(4): 221-34.
- [40] WIKE C L, GUO Y, TAN M, et al. Chromatin architecture transitions from zebrafish sperm through early embryogenesis [J]. *Genome Res*, 2021, 31(6): 981-94.
- [41] SOUFI A, DONAHUE G, ZARET K S. Facilitators and impediments of the pluripotency reprogramming factors' initial engagement with the genome [J]. *Cell*, 2012, 151(5): 994-1004.
- [42] FREDERICK M A, WILLIAMSON K E, FERNANDEZ GARCIA M, et al. A pioneer factor locally opens compacted chromatin to enable targeted ATP-dependent nucleosome remodeling [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2023, 30(1): 31-7.
- [43] CHO W K, SPILLE J H, HECHT M, et al. Mediator and RNA polymerase II clusters associate in transcription-dependent condensates [J]. *Science*, 2018, 361(6400): 412-5.
- [44] HERCULANO-HOUZEL S. The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain [J]. *Front Hum Neurosci*, 2009, 3: 31.
- [45] ALLEGRA MASCARO A L, SILVESTRI L, SACCONI L, et al. Towards a comprehensive understanding of brain machinery by correlative microscopy [J]. *J Biomed Opt*, 2015, 20(6): 61105.
- [46] MORSCH M, PROTTI D A, CHENG D, et al. Cannabinoid-induced increase of quantal size and enhanced neuromuscular transmission [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 4685.
- [47] LIU Q A, SHIO H. Mitochondrial morphogenesis, dendrite development, and synapse formation in cerebellum require both Bcl-w and the glutamate receptor delta2 [J]. *PLoS Genet*, 2008, 4(6): e1000097.
- [48] MITCHISON H M, VALENTE E M. Motile and non-motile cilia in human pathology: from function to phenotypes [J]. *J Pathol*, 2017, 241(2): 294-309.
- [49] SHINOHARA K, CHEN D, NISHIDA T, et al. Absence of radial spokes in mouse node cilia is required for rotational movement but confers ultrastructural instability as a trade-off [J]. *Dev Cell*, 2015, 35(2): 236-46.
- [50] ZHU L, CHEN L. Progress in research on paclitaxel and tumor immunotherapy [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2019, 24: 40.
- [51] GARG P. A review of podocyte biology [J]. *Am J Nephrol*, 2018, 47(Suppl 1): 3-13.
- [52] ZHUANG Y, SHI X. Expansion microscopy: a chemical approach for super-resolution microscopy [J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2023, 81: 102614.
- [53] DAMSTRA H G J, PASSMORE J B, SERWETA A K, et al. Gel-Map: intrinsic calibration and deformation mapping for expansion microscopy [J]. *Nat Methods*, 2023, 20(10): 1573-80.