

中華民國第 63 屆中小學科學展覽會 作品說明書

高中組 動物與醫學科

052006

以擴展顯微鏡探討年齡對果蠅腸道幹細胞粒線體的影響

學校名稱：國立臺灣師範大學附屬高級中學

| | |
|---------------------------------|------------------|
| 作者： 高二 陳昱衡 高二 郭柏辰 | 指導老師： 張瑜紋 |
|---------------------------------|------------------|

關鍵詞：腸道幹細胞、粒線體、擴展顯微鏡

摘要

腸道幹細胞能分化出其他細胞來維持腸道功能；個體老化時，腸道幹細胞的功能下降而導致腸道衰竭。粒線體能產生細胞所需的能量，當幹細胞分化時，粒線體形態也會跟著改變，推測粒線體的形態和幹細胞的功能相關。然而年齡是否會改變腸道幹細胞內粒線體的形態並不清楚。在本研究中，我們利用免疫螢光染色發現年齡增加會讓果蠅腸道幹細胞中的粒線體變得破碎。因為粒線體非常小，過去以電子顯微鏡觀察粒線體結構非常耗時，我們利用擴展顯微鏡技術將腸道幹細胞中的粒線體放大而不影響其結構。藉此技術，可更精準的觀察年齡對粒線體和其內膜的影響。研究結果發現年齡會影響果蠅腸道幹細胞內粒線體的形態，盼未來能有更深入的研究與醫療應用。

Abstract

Intestinal stem cells (ISCs) continuously generate new daughter cells to maintain intestinal function; during aging, ISC function declines and causes intestinal dysfunction. Mitochondria are a powerhouse of the cell, and their morphology changes during stem cell differentiation, suggesting that mitochondrial morphology is associated with stem cell behavior. However, if age affects mitochondrial morphology in ISCs remains unclear. In this study, we used the UAS-Gal4 system combined with immunostaining and found that mitochondria were more fragmented in aged ISCs. To improve the resolution of mitochondrial imaging for rigorous analysis, we utilized the expansion microscopy method to expand ISCs about 2.5-fold in combination with mitochondrial immunofluorescence labeling. Our results showed that ISCs could be expanded without disrupting mitochondrial structure. With this simple and inexpensive method for nanoscale optical imaging of mitochondria, in the future we can better understand the effects of age on mitochondrial morphology, and probably mitochondrial cristae structure, in stem cells, and hopefully have in-depth investigation and medical applications.

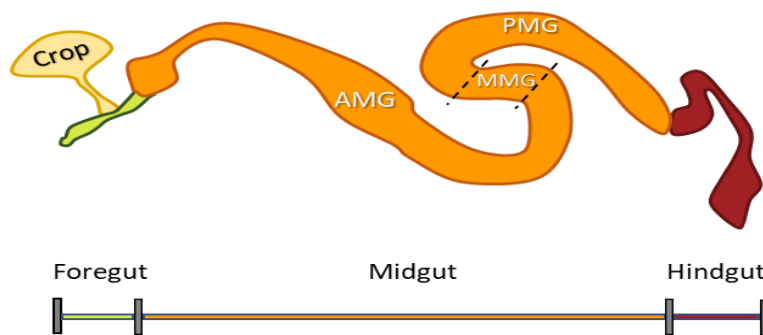
壹、前言

一、文獻回顧

(一)果蠅腸道:

1.腸道構造與功能:

果蠅腸道系統相似於人類腸道系統，但其結構上較為簡單(圖一)。我們能夠在果蠅的消化過程中觀察到許多類似於人類的部分。首先在果蠅進食後，食物會先被運送到 Crop(相當於人體當中的胃)，可進行食物的初步分解，並將食物短暫的儲存。再來，已被初步分解的食物會透過 Foregut(功能類似於人體的食道)運送到 Midgut(人體當中的小腸)。Midgut 為消化與吸收發生的主要場所，大部分的養分會在此處被分解且吸收完成。最後，剩餘的食物殘渣則會被運輸至 Hindgut(人體中的大腸)進行電解質與水分的再吸收，最後再被排出(Sadaqat et al., 2021)。Midgut 又可以在細分為三個部分，由前至後分別為 Anterior Midgut 和 Middle Midgut 還有 Posterior Midgut。當食物從 Foregut 送入時，會先進入 Anterior Midgut 開始被消化與吸收。隨後會進入到 Middle Midgut，這裡有極低的 pH 值，進一步將食物分解。再來會進入 Posterior Midgut，會將前段並未吸收完全的養分進行再吸收。與 Anterior Midgut 和 Middle Midgut 相比，Posterior Midgut 較粗，管腔較大，細胞數量更多，也具有最多的腸道幹細胞和最高的腸道幹細胞活性(Sadaqat et al., 2021)。因此，在本研究中，我們都是以 Posterior Midgut 的腸道幹細胞進行觀察。

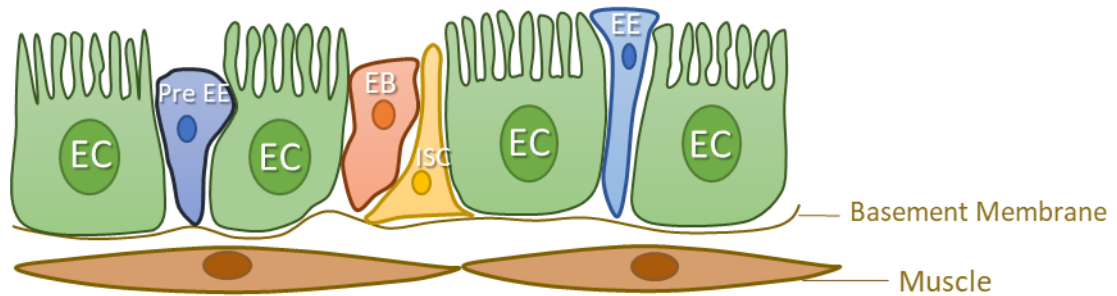


圖一:果蠅腸道構造示意圖

(AMG 代表 Anterior Midgut，MMG 代表 Middle Midgut，PMG 代表 Posterior Midgut)

2.腸道細胞種類和功用:

腸道內大致含有五種細胞(圖二)，包含：(1)Enterocyte (EC)，負責養分的吸收，其面積十分龐大，以此增加吸收效率；(2) Enteroblast (EB), 是 EC 細胞的前驅細胞 (progenitor)；(3) Enteroendocrine cell (EE), 負責分泌多種激素，主要用來殺死腸道中的病原菌以及促進腸道蠕動；Pre-enteroendocrine (preEE) 則為 EE 細胞的前驅細胞；最後，還有負責產生所有腸道細胞的腸道幹細胞 Intestinal Stem Cell (ISC)。



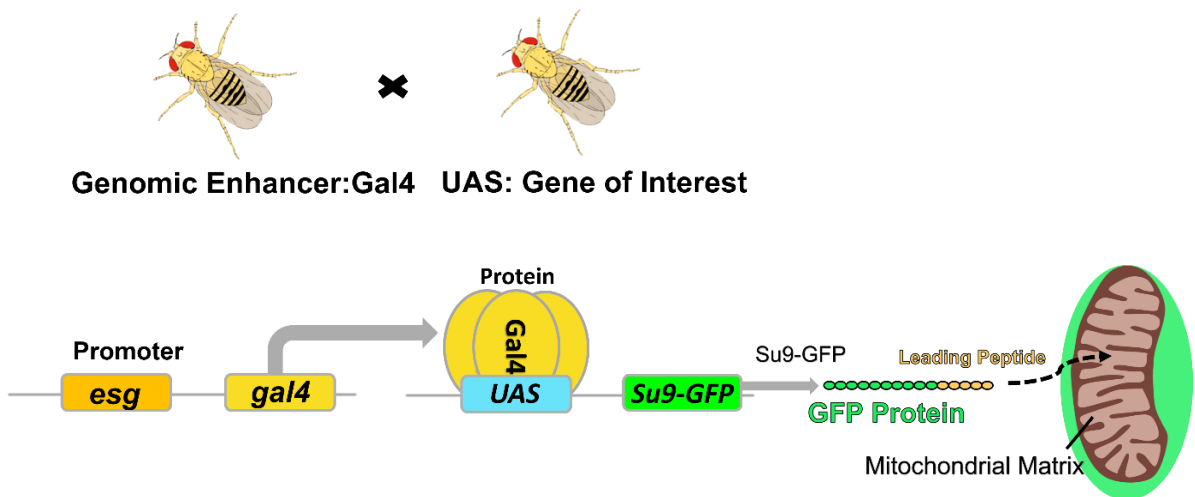
圖二:果蠅腸道內的細胞種類示意圖

(ISC 為腸道幹細胞，EC 為吸收細胞，EB 為 EC 的前驅細胞，EE 為分泌細胞，preEE 則為 EE 的前驅細胞，Basement Membrane 則為腸道上皮細胞的基底膜，Muscle 是腸道的平滑肌)

腸道幹細胞扮演維持腸道恆定的重要角色：因為腸道幹細胞會不斷的產生 EC (吸收細胞)和 EE (分泌細胞)，以遞補腸道所損耗的細胞 (圖二)。每一次的腸道幹細胞分裂都會生兩個子細胞；一個變成腸道幹細胞以進行自我更新進而維持腸道幹細胞數目的穩定，另一個則會變成 EC 或 EE 的前驅細胞。在 EB 細胞分化為 EC 細胞時，會進行核內複製 (Endo-replication)-細胞核內的染色體會進行複製但不分裂。一般的成熟 EC 細胞有 16 套染色體，也因為不分裂導致 EC 比其它的腸道細胞大。目前已經知道在個體年紀增加時時，腸道幹細胞的功能也會跟著下降，但分子機制並未完全瞭解。

(二) UAS-Gal4 (upstream activating sequence-Gal4)系統:

UAS-Gal4 系統被廣泛利用在果蠅的實驗當中，可用於控制目標基因的表現(圖三)。用於本實驗中，我們利用 *escargot (esg)-Gal4* 和 *UAS-su9-gfp* 來標定腸道幹細胞和 EC 及 EB 的前驅細胞中的粒線體。*esg-Gal4* 是讓 Gal4 的表現受到 *esg* 基因啟動子的調控。*Su9* 基因則來自於酵母菌；在 *Su9* 蛋白前端具有 mitochondrial matrix leading peptide (導肽)，會帶著 *Su9* 蛋白進入粒線體基質內。而在 *Su9* 蛋白的後端所加上 GFP (green fluorescent protein) 蛋白的序列，所以在 *Su9-GFP* 進入粒線體時，會讓粒線體帶有綠色螢光。因此，在本實驗中我們利用帶有 *esg-Gal4* 和 *UAS-su9-gfp* 的果蠅，讓 Gal4 的表現在果蠅的腸道幹細胞和 EC 及 EB 的前驅細胞，進而結合於 *UAS* 的 DNA 序列上，啟動 *UAS* 序列下游 *Su9-GFP* 的表現而標定粒線體。此外，溫度也可調控 Gal4 的蛋白質表現量。在 18°C 時，Gal4 表現量較低，而在 29°C 時 Gal4 表現量較高，因此在本實驗中我們選擇將果蠅養在 25°C(最適合果蠅生長的溫度)，以提供適當的蛋白質表現量。



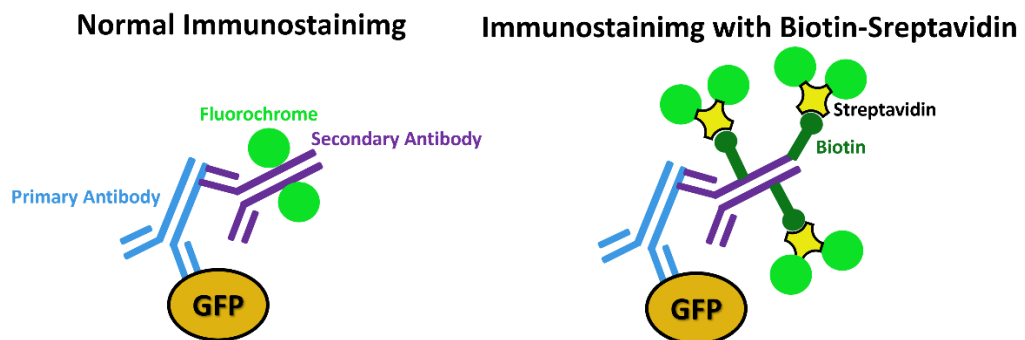
圖三:利用 UAS-Gal4 系統標定粒線體的流程圖

(三)Immunostaining 免疫染色：

免疫染色是利用抗原抗體結合的特性，在標定細胞上結合螢光物質。而在加入抗體前，皆會先進行 Cell Permeabilization (細胞透化)，我們會先加入 Triton，使其溶解細胞膜、核膜、胞器膜上的脂質，因此抗體可以進入細胞內與抗原進行結合。在實驗時，會先在欲染色組織內加入一級抗體(primary antibody)，以辨認結合組織內的標定蛋白質。之後，會再加入二級抗體(secondary antibody)以結合原先加入的一級抗體。一般的免疫染色，在此處所加入的二級抗體本身即會帶有可被雷射激發的螢光物質，因此可以在共軛焦顯微鏡底下進行掃描觀察標的蛋白的表現及位置。

然而，在進行 ExM 擴展顯微鏡實驗時，訊號會因為組織的放大而減弱，導致訊號強度過低。因此，我們在此處使用了帶有“Biotin”(生物素)的二級抗體(圖四)。帶有 Biotin 的抗體可以與多個帶有螢光訊號的 Streptavidin(鏈黴親和素蛋白)進行結合，進而將螢光訊號放大。

總結來說，Biotin-Streptavidin 系統能提高螢光訊號並進一步提高檢測之靈敏度。

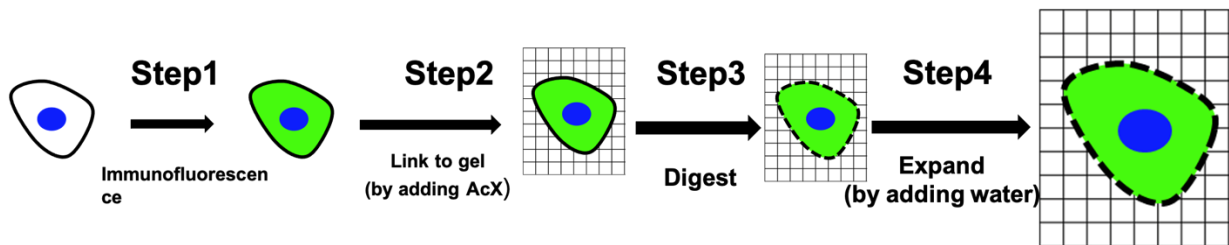


圖四:一般免疫螢光染色與使用 Biotin-Streptavidin 系統的免疫螢光染色比較圖

(左圖為一般的免疫螢光染色步驟，右圖則是加入特殊抗體 Biotin-Streptavidin 系統)

(四)擴展顯微鏡 Expansion Microscopy (ExM) :

由於腸道幹細胞相當微小，在一般的情況下很難觀察清楚細胞內的胞器的結構。而我們的實驗正是需要觀察粒線體，所以需借助擴展顯微鏡的技術來達到放大組織細胞的效果。擴展顯微鏡是一種使樣本體積增大的方法，其原理主要是透過將組織置入於水凝膠，並使其聚合 (圖五)(Chen et al., 2015)。因此，組織可被固定於水凝膠內。由於水凝膠本身的吸水性佳，所以接著會加入水使得樣本吸水而膨脹，達到放大組織的效果。而我們實驗室先前的研究顯示，擴展顯微鏡能夠被應用於放大果蠅的卵巢生殖幹細胞，其放大係數為 3.2 ± 0.2 ，其細胞形狀也並未有明顯差異 (Lin et al., 2022)。而目前擴展顯微鏡的技術並未被應用在腸道。



圖五:擴展顯微鏡流程圖

(進行免疫螢光染色後，在樣本中加入 AcX 使其固定於膠內，再使其凝膠

隨後利用 Digestion Buffer 裂解肽鍵，最後加水放大)

(五)粒線體:

1.形態

粒線體大致可以依照其形態分為兩種，其中較為破碎化的稱為碎片形粒線體 (Fragmentation)、而較長的稱為長形粒線體 (Elongation)。兩種粒線體之間具備著動態平衡的關係，其形態可透過以下所提及的融合與分裂互相轉換。

2.粒線體動力學 Mitochondrial Dynamics:

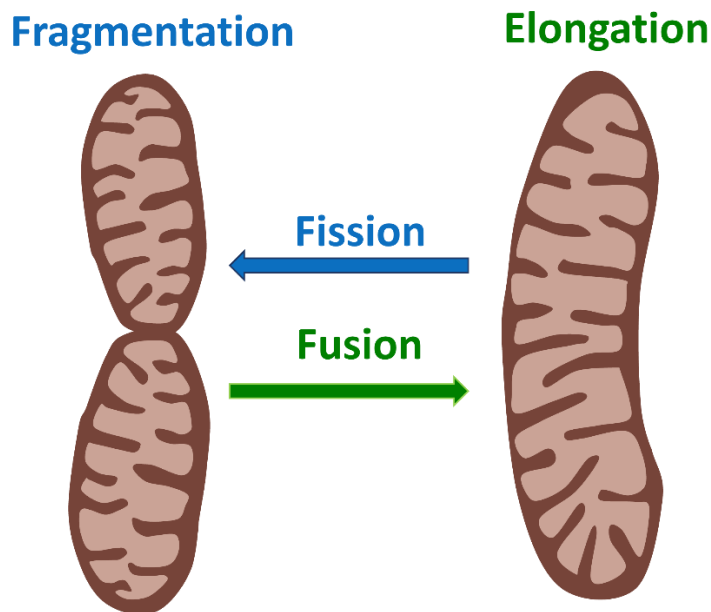
粒線體動力學，即粒線體與細胞內的一切動態活動，其中包括粒線體分裂 (Fission) 和粒線體融合 (Fusion) 等 (圖六)。而粒線體透過融合與分裂維持動態平衡。

(1)粒線體分裂 (Fission)

當粒線體互相分離，彼此之間不再相接，此過程稱作粒線體分裂 (Fission)，會導致碎片形粒線體 (Fragmentation) 的產生。

(2)粒線體融合 (Fusion):

當粒線體互相聚集，彼此之間相互合併，此過程稱為粒線體融合 (Fusion)，會導致長形粒線體 (Elongation) 的產生。



圖六:粒線體融合與分裂

(六)共軛焦顯微鏡超解析螢光模組 Airyscan

共軛焦顯微鏡經常被用來掃描帶有螢光訊號的 3D 影像。在一般的共軛焦顯微鏡中，主要是藉由針孔光圈去阻隔非聚焦面之光線，並成像在單個檢測器上。而通過針孔時繞射所形成的光斑範圍稱作艾里班(Airy pattern)。當我們要提高所得影像之解析度時，需要透過降低針孔大小來達成。然而，在縮小針孔的同時，伴隨的代價是通過的光子數量也會隨之降低，導致訊號下降，進一步讓訊號雜訊比降低(Signal to noise ratio 其定義為訊號功率與雜訊功率之比率)。而 Airyscan 則是將艾里班成像於蜂窩狀排列的 32 個檢測器上，可在多個位置上掃描收集針孔所成之平面圖像。首先，其上的每一個檢測器皆為 0.2AU 的小針孔(一般鏡頭為 1AU)，因此收集到的影像解析度較高，且因其所具備之檢測器數量較多(總尺寸達 1.25AU)，收集影像的效率也不會降低。再者，由於 Airyscan 的總尺寸大，可得到的訊號量較一般的鏡頭(1AU)多出了 50%，使得訊號雜訊比能夠提高。簡言之，Airyscan 不僅可以提高影像解析度，還可以提高訊號雜訊比等解析度相關數據。

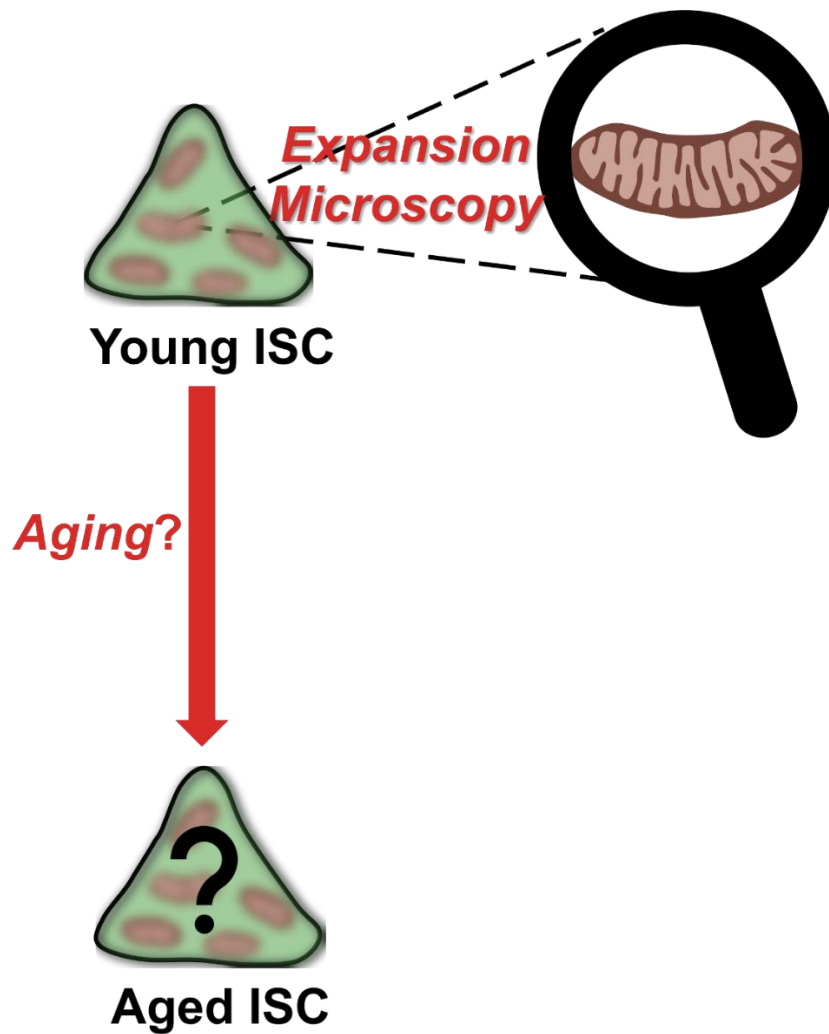
二、研究動機

幹細胞對維持生物組織的正常運作十分重要，也會對受傷或死亡的細胞進行取代，當幹細胞的數量或功能下降時，可能無法維持組織的生存。而幹細胞也會進行不對稱分裂，產生兩個子細胞，其中一個子細胞將取代原有的幹細胞，而另一個子細胞則會分化以補充組織所損耗的細胞。粒線體為細胞的能量工廠，能為幹細胞提供其不斷分化時所需的能量，粒線體可依其形態分為長形和碎片形。而我們已知當幹細胞的分化時，粒線體的形態也會跟著改變。然而年齡是否會改變粒線體的形態並不清楚，因此我們想要瞭解幹細胞的粒線體形態與老化之間的關係。此外，由於一般的免疫螢光染色法所處理的樣本在螢光顯微鏡下所產生的影像解析度不足，而腸道幹細胞的粒線體也十分微小，導致無法精準測量粒線體的長度及大小，又因為樣本經由化學固定法處理，且利用電子顯微鏡拍攝更會耗掉許多精力與時間，但所得到的粒線體樣本數卻相當有限。因此，我們想要嘗試將擴展顯微鏡技術應用在果蠅腸道幹細胞，希望能更仔細的觀察其粒線體甚至是粒線體內膜結構（此結構和粒線體活性十分相關）。

三、研究目的

(一)探討年齡對果蠅腸道幹細胞粒線體形態之影響

(二)將擴展顯微鏡技術應用於果蠅腸道幹細胞



圖七:實驗目的示意圖

貳、研究設備與器材

一、標本製作

(一)果蠅與生長環境

esg-Gal4>UAS-su9-gfp, 在 25 度中保存，每兩天換一次食物。

(二)免疫染色

1. 10x Phosphate Buffer Saline (PBS)
(UniRegion Bio-Tech; #UR-PBS001-5L)
2. 16% Paraformaldehyde (PFA) (Alfa Aesar; #50-00-0)
3. Mouse Green Fluorescent Protein (GFP) primary antibody
4. Triton X-100 (Sigma-Aldrich; #9036-19-5)
5. 5% Normal Goat Serum (NGS)
6. Mouse Green Fluorescent Protein (GFP) secondary antibody
7. 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma-Aldrich; #28718-90-3)

(三)凝膠、裂解、放大

1. Acryloyl X-SE(AcX) (Life Technologies: #A20770)
2. Sodium acrylate (Sigma-Aldrich; #408220)
3. Acrylamide (Sigma-Aldrich; #49099)
4. N-N'-Methylenebisacrylamide (BIS) (Sigma-Aldrich; #M7292)
5. Sodium chloride (MERCK; #7647-14-5)
6. 4-Hydroxy-TEMPO (4HT) (Sigma-Aldrich; #176141)
7. N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED) (Sigma-Aldrich; #T7024)
8. Bovine serum albumin (BSA)
9. Poly-L-lysine solution (Sigma-Aldrich; #25988-63-0)
10. Ammonium Persulfate (APS) (Sigma-Aldrich; #A3678)
11. Triton X-100 (Sigma-Aldrich; #9036-19-5)
12. Ethylenediaminetetraacetic (EDTA) (Sigma-Aldrich; #60-00-4)

13. Tris (Base) (J.T.Baker; #77-86-1)

14. Proteinase K (Pro K) (New England Biolabs; #P8107S)

(四)拍照

1. Zeiss LSM 900 confocal laser scanning microscope (Zeiss, German)

2. airyscan (Zeiss, German)

(五)作圖及影像分析

1. imagej (version: 1.53t, from National Institutes of Health)

2. Imaris(version:9.9.1, from Oxford Instruments)

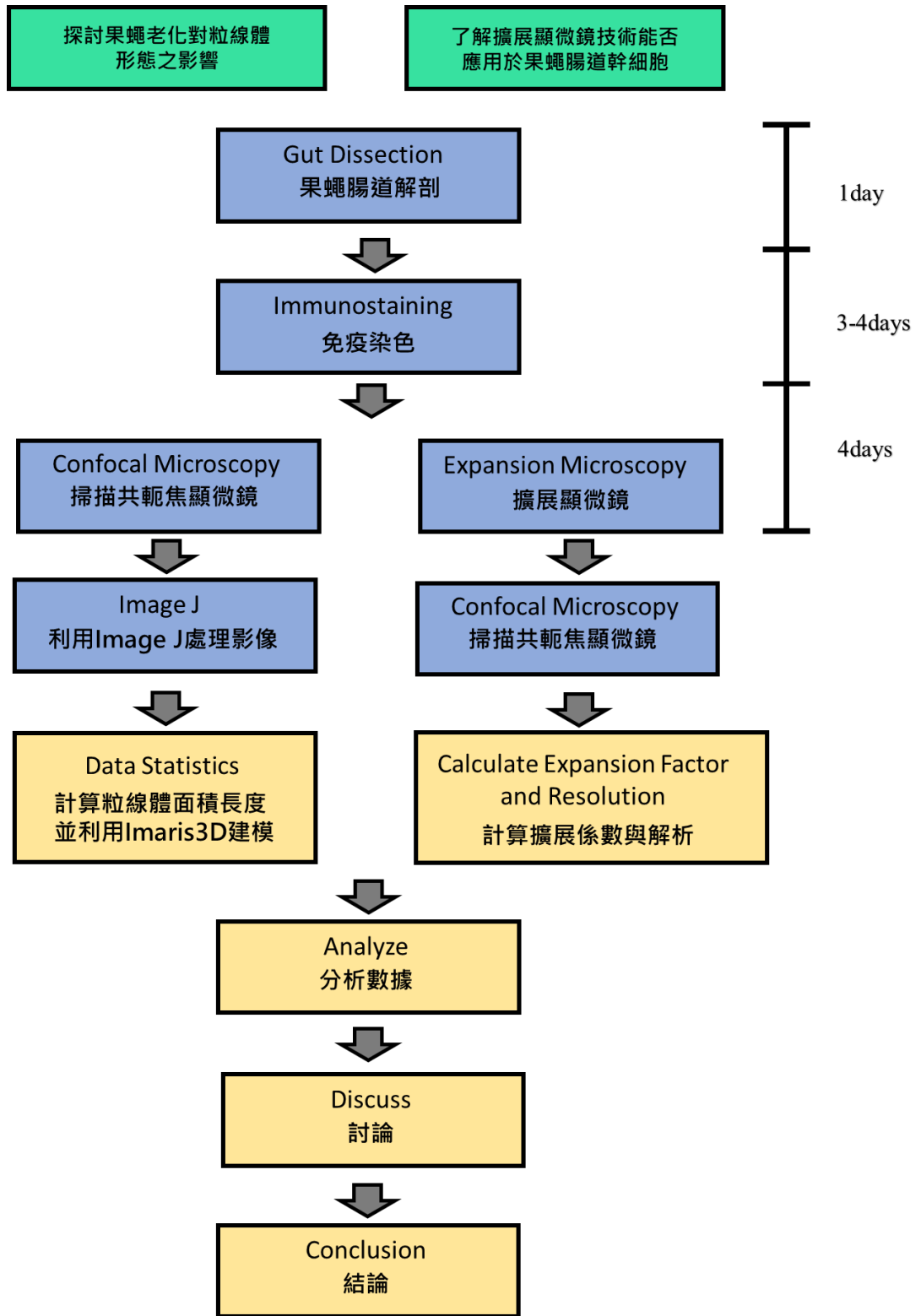
3. Photoshop(version:24.1.1, from Adobe Inc.)

4. Excel(version:21, from Microsoft)

5.GraphPad Prism (version:8.3.0, from GraphPad Software Inc.)

參、研究過程與方法

一、實驗流程圖



圖八:實驗流程圖

一、免疫染色

(一)溶液配製

- 1.1xPBS：將 5ml 的 10xPBS 與 45ml 的 ddH₂O 均勻混合，置於 4°C。
- 2.PFA+1xPBS 固定溶液：將 125 μ l 的 16%PFA+375 μ l 的 1xPBS 中。
- 3.PBST:20 μ l 的 0.1%Triton+18ml 的 1xPBS+1ml 的 5%NGS。

(二)實驗流程

- 1.在 1xPBS 中解剖各三隻果蠅的腸子。
 - (1)PBS 能模仿果蠅體內環境，可防止果蠅的腸道組織壞死。
- 2.取出腸子立即用鑷子轉移腸子，放入 PFA+1xPBS 固定溶液中 2 小時，置於室溫。
 - (1)PFA 為防腐劑
- 3.用 1xPBS 洗三次組織，每次 15 分鐘。
 - (1)PBS 可作為緩衝溶液，洗淨殘餘藥物。
- 4.將組織移至一級抗體中（1 μ l Primary Mouse GFP antibody+499 μ l PBST），置於 4°C 中搖晃，放過夜。
- 5.用 1xPBS 清洗三次，每次 15 分鐘。
- 6.加入 2.5 μ l 的 Biotin+497.5 μ l 的 PBST，置於 4°C 中搖晃，放過夜。
 - (1)Biotin 為可辨認抗老鼠抗體的二級抗體。
- 7.用 1xPBS 清洗三次，每次 15 分鐘。
- 8.加入 2.5 μ l 的 Streptavidin+497.5 μ l 的 PBS，置於 4°C 中搖晃，放過夜。
 - (1)Streptavidin 可接在 Biotin 上，發出螢光訊號。
- 9.用 1xPBS 清洗三次，每次 15 分鐘，最後一次清洗時用 1 μ l DAPI+499 μ l 1xPBS。
 - (1)DAPI 可標定細胞核。
- 10.可將組織至於玻片上利用共軛焦顯微鏡觀察螢光標記並拍攝圖片，或是將組織利用以下流程，利用水凝膠將組織擴大。

二、凝膠、裂解、擴展

(一)溶液配製

1.Acryloyl-X SE(AcX):5mg Acryloyl-X SE in 500 μ l DMSO

2.Stock X: 2.25ml Sodium Acrylate+0.511ml Acrylamide+ 0.75ml

N.N' -Methylenebisacrylamide+4ml Sodium chloride(5M)+10x PBS 1ml+0.889ml water

3.Gelling solution: 188 μ l Stock X+2 μ l 4HT+4 μ l TEMED+ (4 μ lAPS)

(二)實驗流程

1.將染色好的組織，放入 5 μ l AcX+495 μ l PBS 中，置於 4°C 中搖晃，放過夜。

(1)AcX 一端可與胺基酸結合，另一端可與水凝膠結合，固定螢光訊號。

2.用 1xPBS 洗三次組織，每次 15 分鐘。

3.用 BSA 潤洗 tube，將組織放入 tube 中。

(1)為了讓腸道不黏在管壁上。

4.加入不含 APS 的 Gelling Solution，靜置 30 分鐘;同時在玻片上貼上圓環貼紙，在貼紙中間加入 Poly-L-lysine，加熱至 55°C，乾掉後靜置一旁。

(1) 加入 Poly-L-lysine 可使腸道固定在玻片上

(2) 先不加入 APS 是避免在操作過程時動作太慢使其太快凝膠。

5.將組織從 tube 中取出，放置於玻片上圓環中，加入 8 μ l Gelling solution (包含 APS) 在圓環貼紙上，並在蓋玻片上加上 2 μ l Gelling solution (包含 APS)，垂直放上載玻片上

(1)加入 APS 作為凝膠的促進器，使聚合單體 Sodium Acrylate、Acrylamide 與聚合交聯劑 N.N' -methylenebisacrylamide 發生反應。

6.在玻片周圍加上一點 Gelling solution，在室溫下靜置 3 小時

(1)使蓋玻片固定於在玻片上

7.用刀片將蓋玻片取下，移除圓環貼紙，用沾過 digestion buffer 的水彩筆輕輕將膠體移入培養品中，加入 15 μ l 的 Proteinase K+1485 μ l 的 digestion buffer，在室溫搖晃 24 小時。

(1)Proteinase K 可切割胺基酸的羧基肽鍵，使組織能更好地被撐開。

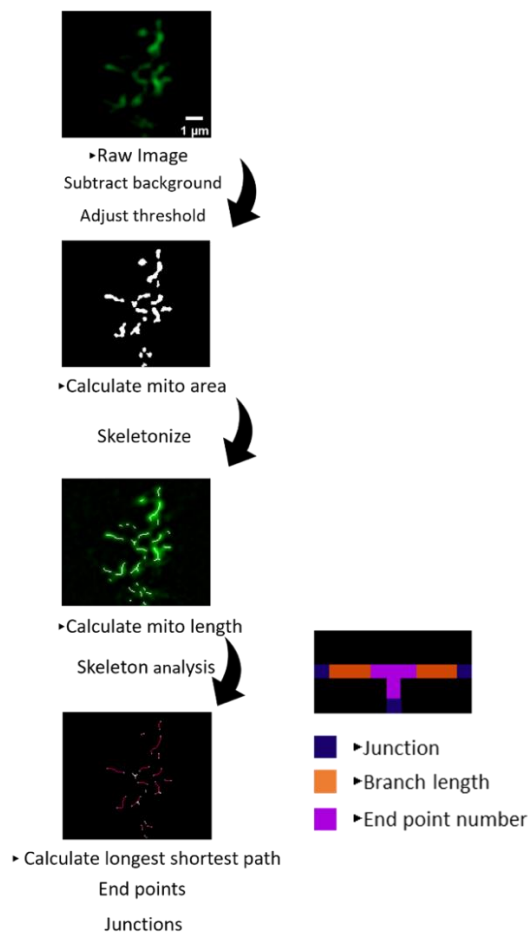
8.將培養皿中液體吸出，加入水，使其膨脹。加三次，每次 30 分鐘，靜置於室溫陰暗處。

9.將放大後的水凝膠至於玻片上，置於共軛焦顯微鏡底下觀察。

四、影像處理與計算

(一)流程

- 1.使用共軛焦顯微鏡觀察果蠅腸道幹細胞的影像。
- 2.使用 airyscan 將影像保存下來。
- 3.使用 image j 進行影像處理（圖八）
- 4.使用 excel 將實驗結果記錄下來，並計算期平均值、標準差、不確定度與顯著差異程度。
- 5.使用 Prism 繪製圖表。

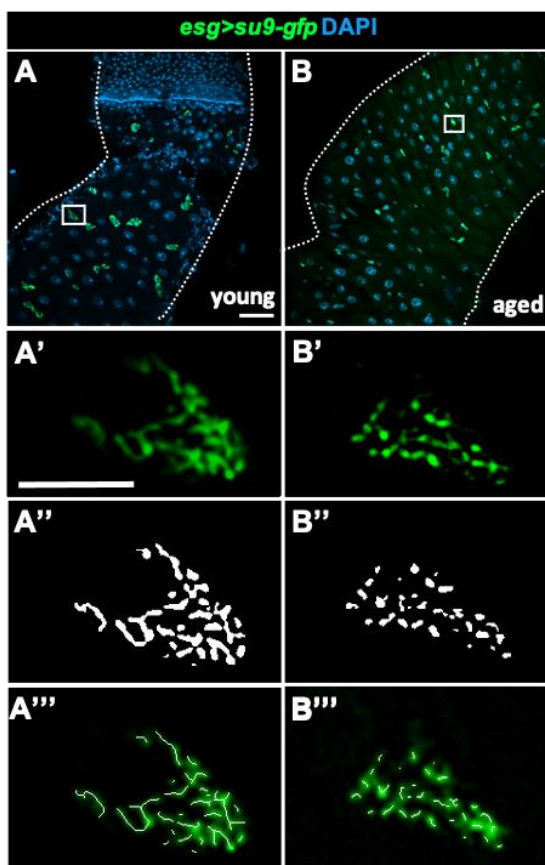


圖九:影像處理流程圖

肆、研究結果

一、腸道幹細胞的粒線體會因為年齡增加而較為破碎化

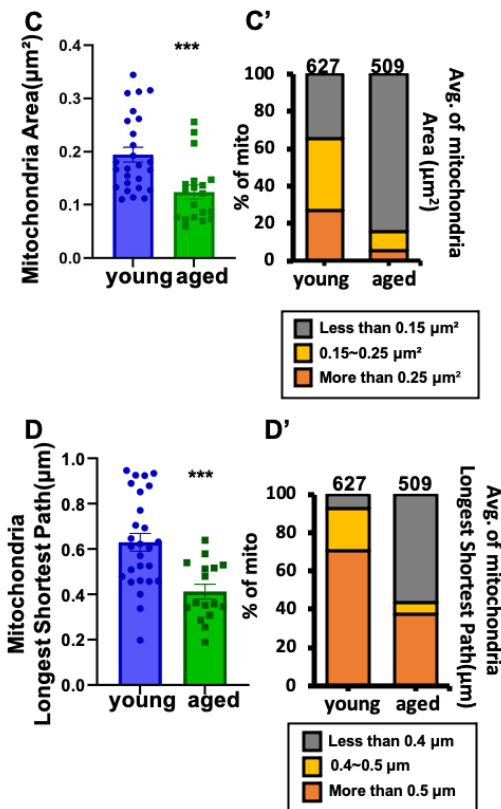
首先，我們將 3-5 天的果蠅定義為年輕果蠅腸道，且由先前研究已知果蠅腸道在 30 天已有部分 Dysplasia Phenotype(發育不良或分化異常的表現)，因此定義 30 天的果蠅腸道為老化的腸道。再來，我們的數據來自於 20-25 個 posterior midgut 的腸道幹細胞 (共五個果蠅腸道，每個到任意挑 4-5 顆腸道幹細胞)。為了觀察粒線體形態，我們對粒線體截面積與粒線體長度進行統計並分析:



- A : 5-days-old (年輕果蠅腸道) scale bar, 20 μ m
A' : 來自 A 圖方形框中腸道幹細胞的放大圖, scale bar, 5 μ m
A'' : 來自 A 圖方形框中腸道幹細胞的細胞遮罩圖
A''' : 來自 A 圖方形框中腸道幹細胞的細胞骨架圖
B : 30-days-old (老果蠅腸道)
B' : 來自 B 圖方形框中腸道幹細胞的放大圖
B'' : 來自 B 圖方形框中腸道幹細胞的細胞遮罩圖
B''' : 來自 B 圖方形框中腸道幹細胞的細胞骨架圖
(*esg>su9-gfp* 綠色, 標定腸道幹細胞/先驅細胞; DAPI, 藍色, 標定 DNA; A 和 B 的 scale bar; A-A''' 以及 B-B''' 的 scale bar 一樣)

圖十:未使用擴展顯微鏡技術的年輕與老化果蠅腸道幹細胞粒線體型態

在(圖十)中，圖 A 與圖 B 分別為年輕與老化果蠅腸道幹細胞在腸道內的分布情形，而白框中則是圖 A' 與圖 B' 的細胞所對應到的位置。圖 A'' 與圖 B'' 是圖 A' 與圖 B' 經過影像遮罩處理後的結果，使得訊號強度統一，不會出現強度不一難以定義粒線體邊界的問題，以利於進行截面積的統計；而圖 A''' 與圖 B''' 為影像經過骨架化處理的結果，骨架化後的數據則有利於我們進行長度的統計。



C：年輕與老果蠅腸道幹細胞粒線體截面積平均圖，

*** $P < 0.001$

C'：年輕與老果蠅腸道幹細胞粒線體截面積百分比圖

D：年輕與老果蠅腸道幹細胞粒線體截面積平均圖，

*** $P < 0.001$

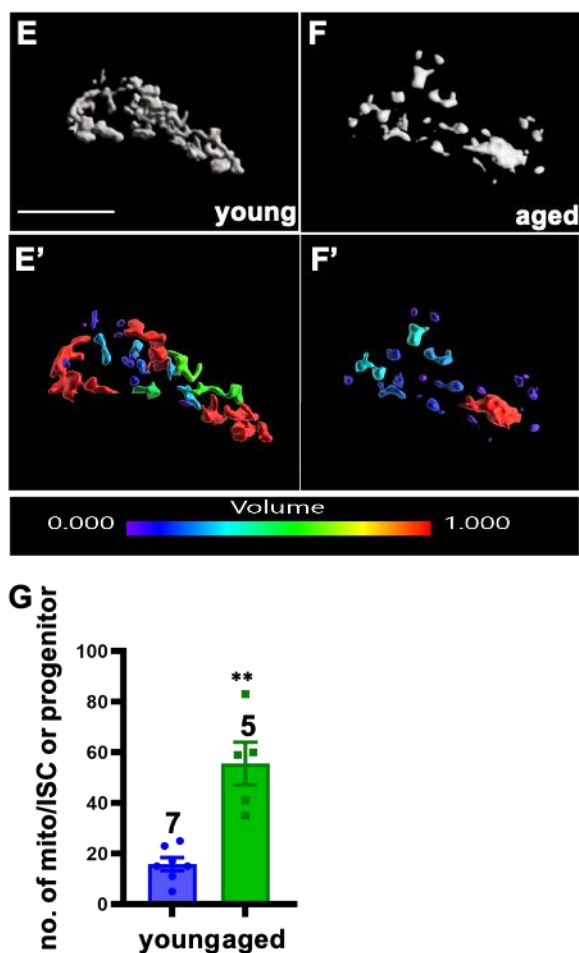
D'：年輕與老果蠅腸道幹細胞粒線體長度百分比圖

圖十一：年輕與老化果蠅腸道幹細胞與其粒線體型態分析

(一)在(圖十一)中，圖 C 代表分別為年輕與老化果蠅的粒線體的平均截面積，年輕果蠅之粒線體平均截面積約為 $0.19\mu\text{m}^2$ ，而老化果蠅粒線體截面積約為 $0.12\mu\text{m}^2$ ，經過 T-test 計算後具備非常顯著(三顆星)差異，圖 C' 的百分比分布圖上方的數字代表著採計的粒線體數量，我們將粒線體面積定義為小、中、大三個部分。其中，"小"代表小於 $0.15\mu\text{m}^2$ ，"中"則代表介於 $0.15\sim 0.25\mu\text{m}^2$ ，"大"代表大於 $0.25\mu\text{m}^2$ 。由圖可知，屬於"大"的粒線體在年輕果蠅中所佔比例較老化果蠅高。因此在年輕果蠅中，粒線體之截面積大於老化果蠅腸道幹細胞。

(二)我們以 LSP(Longest Shortest Path，即一粒線體分支之中最長、最直接的距離)作為計算果蠅長度之方法。圖 D 代表二者之粒線體 LSP 平均值，年輕果蠅 LSP 約為 $0.62\mu\text{m}$ ，而老化果蠅 LSP 約為 $0.41\mu\text{m}$ ，且具備非常顯著(三顆星)的差異。圖 D' 的百分比分布圖，圖形上方的數字代表採計的粒線體數量，我們將 LSP 定義為短、中、長三個部分。其中"短"代表 LSP 小於 $0.4\mu\text{m}$ ，"中"則代表 LSP 介於 $0.4\sim 0.5\mu\text{m}$ ，"長"代表 LSP 大於 $0.5\mu\text{m}$ 。由圖可知，屬於"短"的粒線體在年輕果蠅中所佔的比例較老化果蠅低。

因此，我們可以得知年輕果蠅腸道幹細胞的粒線體 LSP 大於老化果蠅腸道幹細胞。

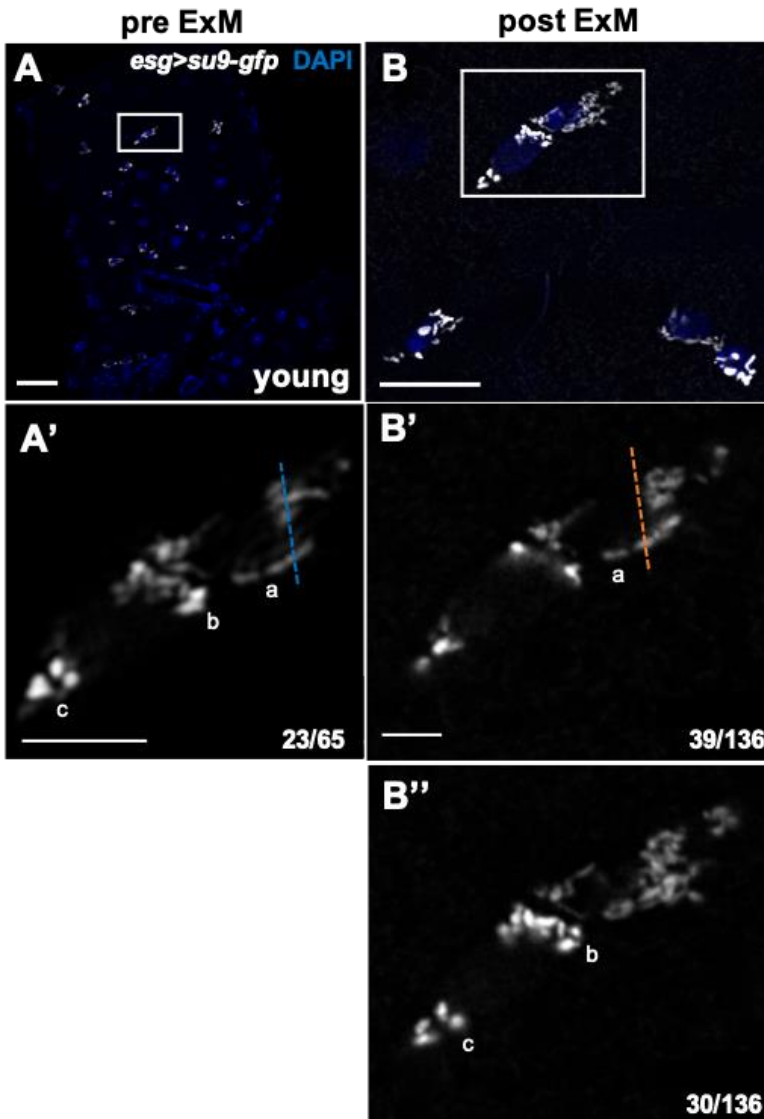


圖十二: 年輕與老化果蠅腸道幹細胞其粒線體形態 3D 建模與分析

(三)在(圖十二)中，由於前述所及的數據皆為 2D，為了增加 2D 數據的可信度，我們進行了腸道細胞的 3D 建模。而圖 E 與 F，則分別為年輕與老化果蠅腸道細胞的 3D 建模圖形；圖 E' 與 F' 則是將粒線體依據體積大小進行分類，由紫色至紅色代表粒線體體積小到大(0- $1\mu\text{m}^3$)，我們可以發現，在年輕果蠅腸道細胞中，擁有較多紅色粒線體，而在老化果蠅腸道細胞中，則擁有更多的紫色粒線體，可推論在年輕果蠅中的粒線體體積大於老化果蠅的粒線體體積。最後，關注圖 G，上方的數字代表採計的細胞數量，由長條圖可以知道老化的粒線體數量平均值高於年輕的，其中具備顯著的關係(兩顆星)，推論老化果蠅腸道幹細胞的粒線體數量大於年輕。

綜合上述(一)(二)(三)，我們可以得知年輕果蠅腸道幹細胞的粒線體較老化果蠅腸道幹細胞長；反之，老化果蠅腸道幹細胞的粒線體較年輕果蠅腸道幹細胞破碎。

二、擴展顯微鏡能將腸道幹細胞放大而增加粒線體影像的解析度



A : 年輕果蠅腸道 pre ExM,
scale bar, 10 μ m

A' : 圖 A 方框中的放大圖,掃描 65
層中第 23 層

B : 年輕果蠅腸道 post ExM

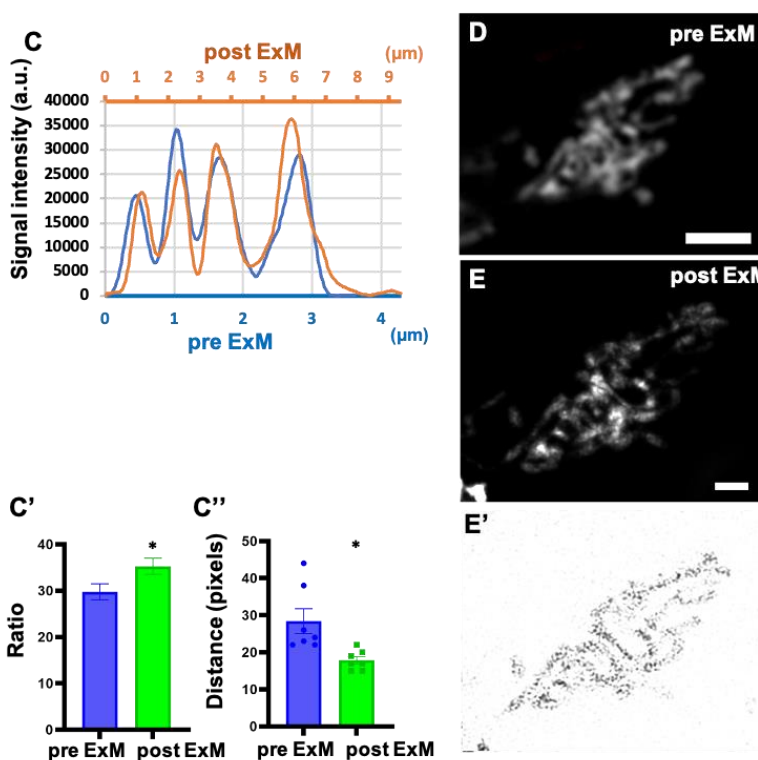
B' : 圖 B 方框中的放大圖,掃描 136
層中第 39 層,

B'':圖 B 方框中的放大圖,掃描 136
層中第 30 層,

A'-A''以及 B-B''的 scale bar 一樣

圖十三: 擴展顯微鏡技術之粒線體影像

在(圖十三)中，圖 A 與圖 B 分別為放大前後的腸道幹細胞在腸道內的分布情形，我們先找到相同細胞，並將對放大前後的相同細胞影像進行比較。再來，圖 A'、圖 B'與圖 B''的影像來自於圖 A 與圖 B 的白框中的細胞，我們可以發現放大後較放大前的粒線體多出了許多細節，可推論解析度提高了。此外，原本放大前的影像中大致有 abc 三個區域(在第 23 層)，在經過 ExM 後，三個區域被拉到不同層(在第 39 層與 30 層)，由此可知，ExM 讓影像在 Z 方向也被放大。



C : A',B' 畫線處的螢光訊號強度連續分布圖

C' : A',B'畫線處的訊號雜訊比

C' : A',B'畫線處的半峰全寬

D : A' 圖中 a 區域的粒線體 3D 疊圖, scale bar, 2 μ m

E : B' 圖中 a 區域的粒線體 3D 疊圖, scale bar, 2 μ m

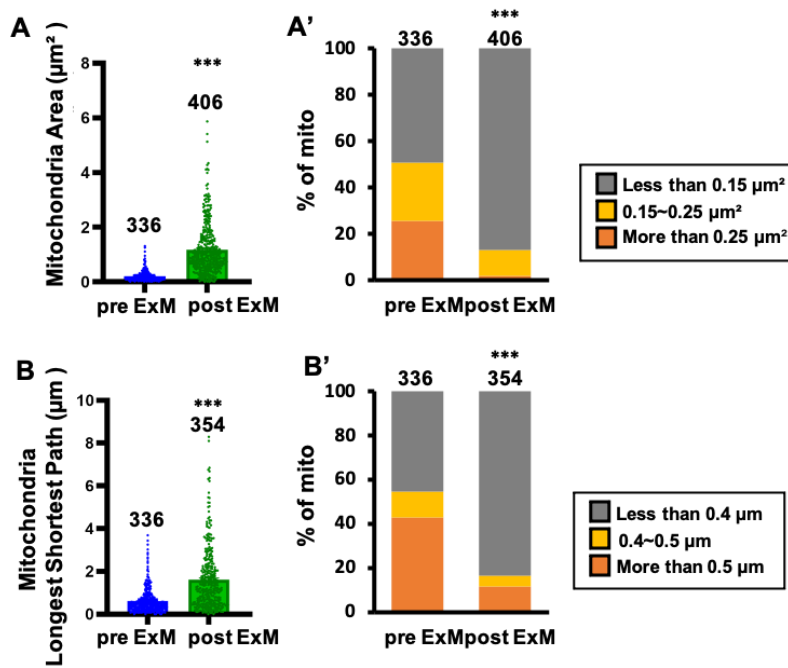
E' : 將圖 E 的影像以負片效果處理

統計分析方法 : student *t*-test

圖十四: 擴展顯微鏡技術影像分析

由(圖十四), 圖 C 的線條所代表之意義為圖 A'與圖 B'中的虛線位置訊號強度變化。包含圖 C 在內, 我們一共分析了 7 條線的相關數據。關注圖 C', 此圖為 ExM 放大前後的訊號雜訊比(訊號功率與雜訊功率的比值), 由長條圖可知真實訊號所佔之比例提高了, 其中具備顯著的關係(一顆星)。關注圖 C'', 此圖為圖 C 之半峰全寬(一個峰當中, 前後兩個等於峰值一半的點之間的距離), 由長條圖可知半峰全寬在經過 ExM 後下降, 代表訊號變得更加鋒利, 影像模糊的區域降低。

而圖 D 與圖 E 為同一顆細胞同一區域的粒線體(圖 A'和 B'的 a 區)在經過 ExM 放大前後的對比, 我們可以很明顯地看到影像解析度提高非常多, 許多影像的細節也是在 ExM 後才能夠被看見。圖 E'則是圖 E 經過 Photoshop 黑白顏色對調後的結果圖, 我們可以得到粒線體的 Cristae(粒線體內膜皺褶構造, 主要負責 ATP 的合成), 在此前, 尚未有人得到過腸道幹細胞如此清晰的皺褶影像。



A：粒線體截面面積的放大倍率,***P<0.001

A'：放大前後的年輕果蠅腸道幹細胞粒線體截面面積百分比分佈圖,***P<0.001

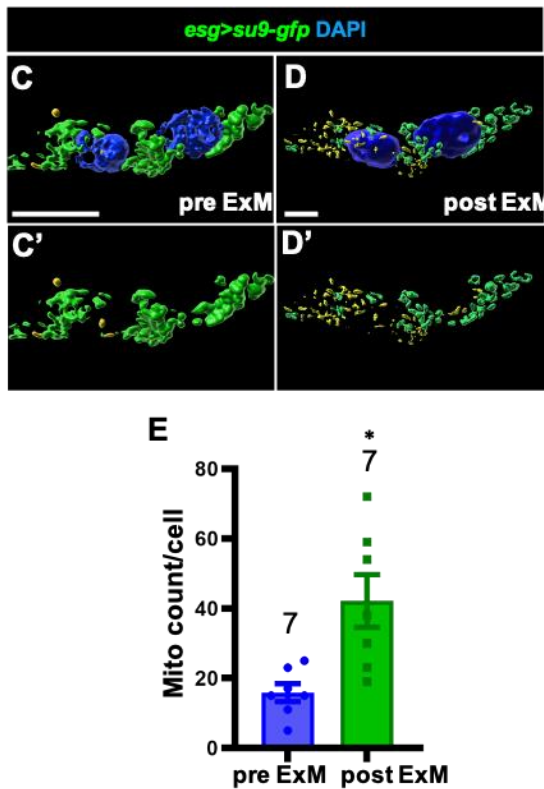
B：粒線體截面 LSP 的放大倍率,***P<0.001

B'：放大前後年輕果蠅腸道幹細胞粒線體截面 LSP 百分比分佈圖,***P<0.001

圖十五：擴展顯微鏡對腸道幹細胞粒線體型態的分析

(一)由(圖十五)圖 A 為粒線體的截面面積長條圖。圖形上分布的每一個點皆為一個粒線體的截面面積，其中放大前的粒線體平均截面面積約為 $0.21\mu\text{m}^2$ ，而放大後的平均截面面積則約為 $1.17\mu\text{m}^2$ ，因此截面面積放大約 5.64 倍(開根號約為 2.37 倍)，經 student *t*-test 計算後有非常顯著的差異(三顆星)。而圖 A' 為粒線體放大前後的截面面積百分比分布圖。放大的截面面積計算是以實際量到的大小除以放大係數所得到的相對值。我們將粒線體面積定義為小、中、大三個部分。其中，"小"代表粒線體截面面積小於 $0.15\mu\text{m}^2$ ，"中"代表粒線體截面面積介於 $0.15\sim 0.25\mu\text{m}^2$ ，"大"代表截面面積大於 $0.25\mu\text{m}^2$ 。由圖可知屬於"小"的粒線體在放大後所佔的比例提高。由此可知，影像變得更加清晰。

(二)圖 B 為粒線體的 LSP 長條圖。圖形上分布的每一個點皆為一個粒線體的 LSP 其中放大前的粒線體平均 LSP 約為 $0.61\mu\text{m}$ ，而放大後的平均 LSP 則約為 $1.61\mu\text{m}$ ，因此 LSP 放大約 2.63 倍，且具有非常顯著的差異(三顆星)。而圖 B' 為粒線體放大前後的 LSP 百分比分布圖。放大的 LSP 計算是以實際量到的大小除以放大係數所得到的相對值。我們將粒線體 LSP 定義為短、中、長三個部分。其中，"短"代表粒線體 LSP 小於 $0.4\mu\text{m}$ ，"中"則代表粒線體 LSP 介於 $0.4\sim 0.5\mu\text{m}$ ，"長"代表 LSP 大於 $0.5\mu\text{m}$ 。由圖可知屬於"短"的粒線體在放大後所佔的比例提高了。因此，影像變得更加清晰。



圖十六：擴展顯微鏡前後腸道幹細胞粒線體 3D 建模

(三)由(圖十六)，最後關注圖 C 與圖 D 其為相同細胞在經過 ExM 放大的前後 3D 建模對比圖，而圖 C'與圖 D'則為細胞核(DAPI)去除後的 3D 建模。由圖 C'與 D'，我們可以發現粒線體的細節增加了，原本許多相連的粒線體，在經過放大後都分開了，粒線體體積也隨之而下降。再關注圖 E，該圖上的每個點代表每個細胞內的粒線體數量，而長條圖為放大前後的平均值，分別為 15.8 個與 42.1 個，其具備著非常顯著(三顆星)的差異。因此，我們可以知道粒線體數量在放大前後明顯提升，影像也變得更加細節。

綜合上述(一)(二)(三)，我們可知擴展顯微鏡於粒線體之放大倍率約為 2.5 ± 0.15 倍，且影像的細節程度在經過放大後得到極大的提升。

C and C' : 5 days 年輕腸道幹細胞粒線體 preExM 3D 建模。 *esg>su9-gfp* (綠色，粒線體), DAPI (藍色，核), scale bar, $5 \mu\text{m}$

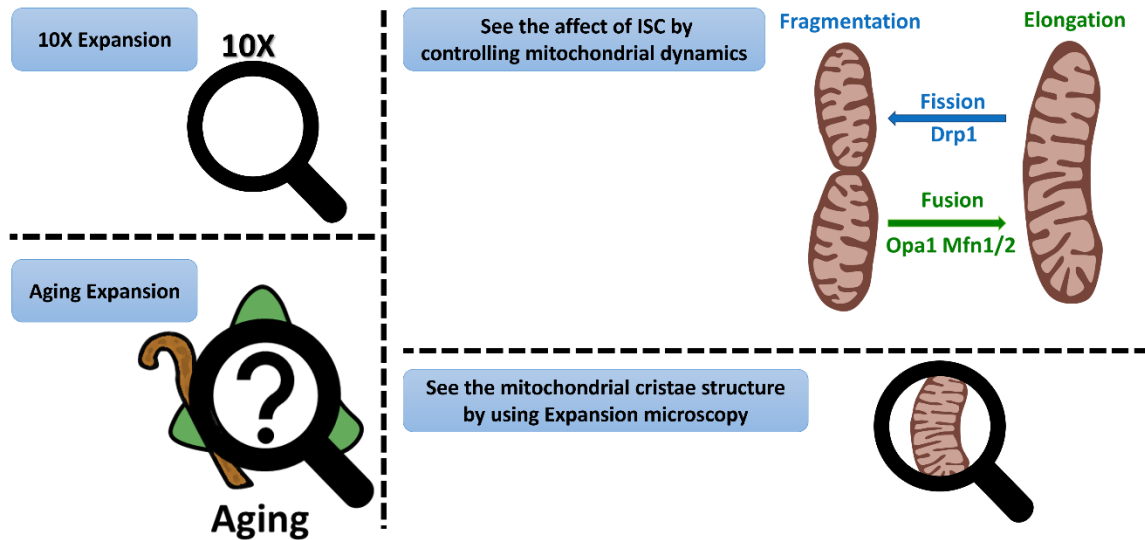
D and D' : 5 days 年輕腸道幹細胞粒線體 post ExM 3D 建模。 *esg>su9-gfp* (綠色，粒線體), DAPI (藍色，核), scale bar, $5 \mu\text{m}$ 。

E : 使用擴展顯微鏡技術前後年輕腸道幹細胞粒線體粒線體個數比較

統計分析方法 : student *t*-test

伍、討論

本研究首次利用擴展顯微鏡，對腸道幹細胞進行放大，將能夠提升日後再進行腸道幹細胞相關實驗時的解析度，進一步得到更精準的數據，盼望未來能夠應用於腸道的相關實驗上。再者，本實驗也了解到果蠅腸道幹細胞的粒線體與老化的關係，我們希望未來能夠應用於完善腸道幹細胞之分化機制，並盼望進一步將其應用於老化等醫療相關議題之上。



圖十七 :未來展望示意圖

一、進行擴展顯微鏡的 10X 放大:

若在日後進行果蠅腸道幹細胞的相關實驗時，需要使用更高的放大倍率以提高解析度，則可先確認 10 倍放大倍率的擴展顯微鏡能否應用於果蠅的腸道幹細胞，其過程是否會破壞粒線體的形態，再進一步觀察其放大倍率為多少，使的研究技術能夠再被擴充與完善。

二、利用擴展顯微鏡觀察粒線體內膜皺褶

粒線體內膜上有 Crystae(皺褶)構造，其扮演著呼吸作用中極為重要的角色，主要負責進行 ATP 的合成。然而，在未經過擴展顯微鏡放大的樣本內，很難觀察到粒線體內膜的皺褶結構。若想針對能量的產生進行更深入的探討，則可以透過擴展顯微鏡的幫助得到更精確的數據。而若想針對腸道幹細胞的粒線體皺褶構造進行觀察，則可透過本研究的腸道幹細胞擴展顯微鏡技術的幫助，提高實驗數據的可信度。

三、探討粒線體動平衡與果蠅腸道幹細胞的關係:

(一)探討粒線體動平衡與果蠅腸道幹細胞維持的關係:

1.粒線體動平衡介紹

(1)粒線體分裂

粒線體分裂有助於確保粒線體的品質控管和分布適當。在 Dynamin-like 1 (Dnm1)的蛋白質之中，Drp1(Dynamin related protein 1)為進行粒線體分裂中的主要蛋白質。而在進行粒線體分裂前，來自粒線體外的 Drp1 蛋白會與粒線體外膜上的接收蛋白 Fis1(Fission Mitochondria, 1)結合，經此過程後粒線體才可以分裂。因此，若能夠抑制 Drp1 蛋白的產生，我們便可抑制粒線體分裂，可觀察粒線體分裂對於細胞的影響 (Seo et al., 2018)。

(2)粒線體融合(Fusion):

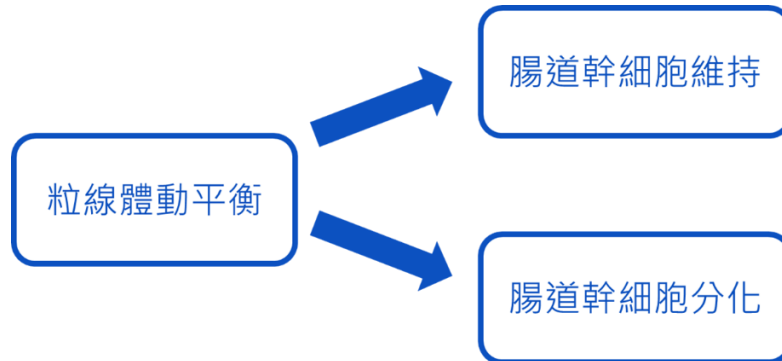
當粒線體互相聚集，彼此之間相互合併，此過程稱為粒線體融合(Fusion)。粒線體融合依照順序可分為外膜與內膜兩步驟。在進行粒線體分裂時，有三種主要蛋白:位於外膜的 Mitofusin 1/2(Mfn1/2)，融合過程中需要 Mfn 2 協助蛋白質間的相互作用，同時，Mfn1 也會與位於內膜的 Optic atrophy 1(Opa1)結合，再經由 Opa1 蛋白去誘導粒線體融合。(Seo et al., 2018)

(3)實驗方法:

在前述中，我們有提及粒線體分裂所需的 Marf, Opa1 蛋白與粒線體融合所需的 Drp1 蛋白對於粒線體動平衡的重要性，而我們可透過 RNAi 系統去抑制上述兩種蛋白質的表現量，並達到抑制粒線體分裂或融合的效果。而透過檢測抑制粒線體融合或抑制粒線體分裂時，在果蠅的不同年齡階段檢測含有 D1-signal 的細胞數量，可了解到粒線體動平衡會如何直接影響幹細胞的維持(正常情況下，老化果蠅的幹細胞將較原本難以維持)，而此部分可以與我們的實驗進行結合，且依據我們的實驗結果可進行初步的推測:老化的果蠅幹細胞可能會進行較多的粒線體分裂，而在粒線體分裂的同時幹細胞也較難維持；反之，若粒線體較傾向融合，則幹細胞較容易維持。

2.探討粒線體動平衡與果蠅腸道幹細胞分化的關係:

此外，我們也可在控制粒線體動平衡時，觀察其分化情形，並可得知粒線體動平衡與腸道幹細胞分化的關係，以完善釐清整個腸道幹細胞分化的過程與故事。



圖十八:結合粒線體動平衡與腸道幹細胞之未來研究方向

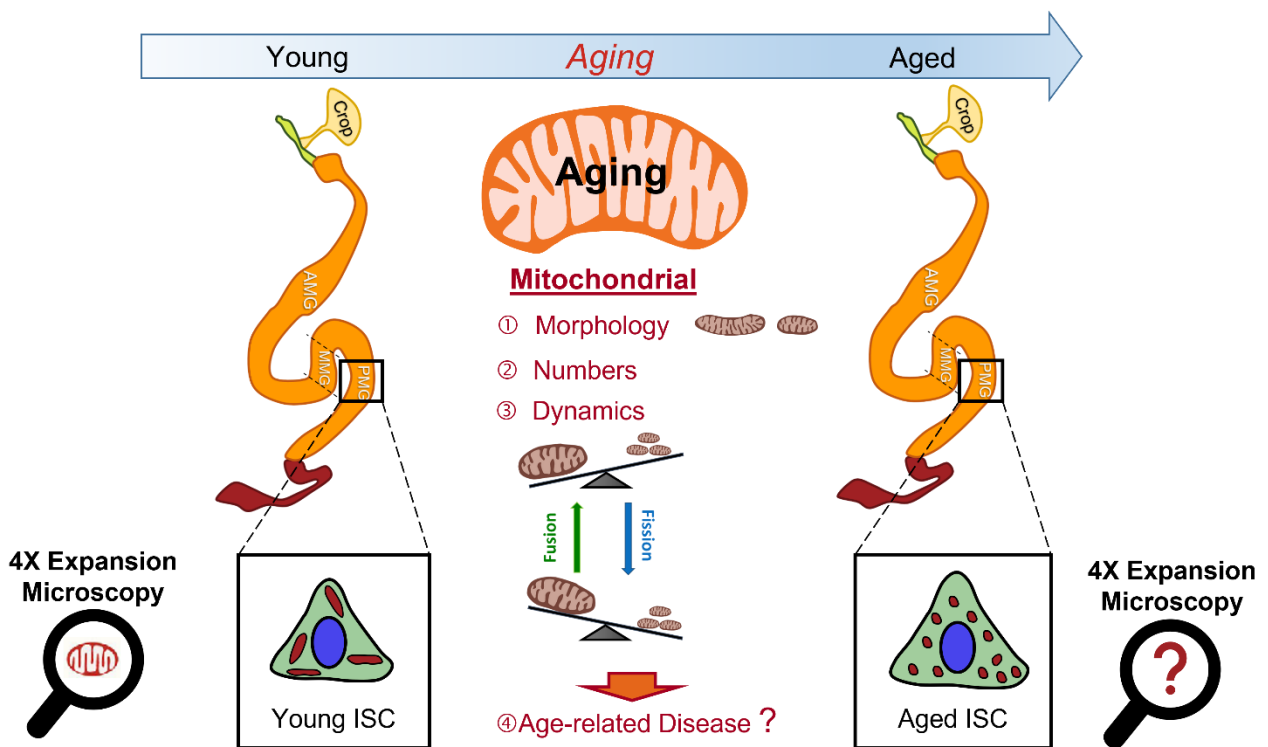
四、老化果蠅的擴展顯微鏡技術

我們為首例將擴展顯微鏡技術嘗試利用於腸道幹細胞，並且取得成功。然而，我們將擴展顯微鏡嘗試利用於老化果蠅的腸道幹細胞，卻觀察到來自於粒線體的螢光訊號散佈在細胞質之間，難以取得粒線體清晰完整的影像。我們推測老化果蠅的粒線體較為脆弱，在進行實驗的過程中，受擴展顯微鏡影響，使其形態改變。盼望未來能夠針對老化果蠅腸道幹細胞之擴展顯微鏡進行相關實驗步驟調整，以完善擴展顯微鏡於腸道幹細胞應用。

五、老化粒線體與老化相關疾病的潛在關聯性

從實驗結果顯示，年老果蠅的腸道幹細胞中粒線體的型態較為破碎形，使得粒線體數量增加，推測會影響粒線體的動平衡。未來我們可以利用擴展顯微鏡技術觀察年老果蠅的腸道幹細胞，更進一步探索老化粒線體的相關數據。再藉由這些數據，深入研究粒線體的生理運作機制。此外，也能探索老化相關疾病，如心血管疾病、阿茲海默症、帕金森氏症等，了解疾病與粒線體動態平衡的關係。

現在人類平均壽命延長，藉由研究果蠅的粒線體之技術提升，未來也能推廣到人類疾病中粒線體的觀察與探索。



圖十九:老化粒線體與老化相關疾病的潛在關聯性

陸、結論

一、探討果蠅老化對粒線體形態之影響

(一)觀察果蠅腸道細胞單一截面的粒線體面積

老化果蠅腸道幹細胞的粒線體截面積較年輕果蠅小，具有顯著差異。

(二)觀察果蠅腸道細胞單一粒線體的最短路徑

老化果蠅腸道幹細胞的 LSP 較年輕果蠅短，具有顯著差異

(三)對果蠅粒線體進行 3D 建模

老化果蠅腸道幹細胞粒線體數量較年輕多，具有顯著差異

結合(一)(二)(三)，老化果蠅腸道幹細胞之粒線體較傾向破碎形；反之，年輕果蠅腸道幹細胞粒線體較傾向長形。

三、四倍擴展顯微鏡技術

(一)擴展顯微鏡

- 1.擴展顯微鏡並不會破壞腸道幹細胞之結構
- 2.擴展顯微鏡可以提高訊號雜訊比，具顯著差異
- 3.擴展顯微鏡可以降低半峰全寬，具顯著差異
- 4.擴展顯微鏡能提高解析度，看輕粒線體內膜皺褶 Cristae 結構

擴展顯微鏡能夠在不破壞細胞結構的情況下，提升影像的解析度，使訊號更加清楚。此外，藉由解析度的提升，能夠清楚掃描粒線體內膜皺褶影像。

(二)利用擴展顯微鏡觀察粒線體

- 1.擴展顯微鏡放大粒線體截面積約 5.64 倍(開根號 2.37)，具顯著差異，並使相連的粒線體分開，還原實際情況，降低大截面積粒線體的比例
- 2.擴展顯微鏡可放大粒線體 LSP 約 2.63 倍，具顯著差異，並使相連的粒線體分開，還原實際情況，降低長粒線體的比例
- 3.擴展顯微鏡可使相連的粒線體分開，以提高粒線體數量，具顯著差異

擴展顯微鏡可使腸道幹細胞影像放大約 2.5 ± 0.15 倍，透過放大影像，拉長粒線體間的距離，使原本因解析度過低而被判定相連的粒線體得以被分辨，降低了大粒線體與長粒線體的比例，也提高了粒線體數量。

柒、參考資料與其他

- 一、Chen, F., Tillberg, P.W., Boyden, E.S., 2015. Expansion microscopy. *Science* 347, 543-548.
- 二、Lin, C.-H., Lin, T.-Y., Hsu, S.-C., Hsu, H.-J., 2022. Expansion Microscopy-based imaging for visualization of mitochondria in *Drosophila* ovarian germline stem cells. *FEBS Open Bio* 12, 2102-2110.
- 三、Sadaqat, Z.C., 2015 #20}, Kaushik, S., Kain, P., 2021. Gut Feeding the Brain: *Drosophila* Gut an Animal Model for Medicine to Understand Mechanisms Mediating Food Preferences.
- 四、Seo, B.J., Yoon, S.H., Do, J.T., 2018. Mitochondrial Dynamics in Stem Cells and Differentiation. *Int J Mol Sci* 19.
- 五、https://asset-downloads.zeiss.com/catalogs/download/mic/104cc06d-f997-4cc0-b679-b2cf93bfc863/EN_wp_LSM-880_Basic-Principle-Airyscan.pdf (from Zeiss The Basic Principle of Airyscanning)

【評語】 052006

研究以新的擴展顯微鏡技術，加上螢光標記果蠅的腸道幹細胞，進行觀察，很漂亮地證明擴展顯微鏡技術的優點，可以更精準地探究粒線體的型態。並因此看到衰老的果蠅粒線體比較破碎化。是一項非常傑出、新穎的研究工作。作者展現了擴展顯微鏡技術的優點，對於像粒線體這樣微小的胞器，也可以詳細觀察。在科學上，是很重要的進展。

本研究探討年老與年輕果蠅腸道幹細胞的粒線體型態的不同點，發現年輕果蠅腸道幹細胞的粒線體較老化果蠅腸道幹細胞的粒線體長。已知年齡對粒腺體破碎化具有影響，因此，此結論的新穎性較不如預期。但是，果蠅腸道幹細胞居然也會老化，則是嶄新的發現。另外，粒線體能產生能量，然而年齡是否會改變腸道幹細胞內粒線體的形態並不清楚。該研究無法確定粒線體破碎是否與腸道幹細胞功能的關聯性。未來可以進行更多的功能試驗和機制研究。

作品海報

摘要

腸道幹細胞能產生新的細胞來維持腸道功能；個體老化時，腸道幹細胞的功能會下降導而致腸道衰竭。粒線體負責產生細胞所需的能量，然而當幹細胞分化時，粒線體形狀也會跟著改變，推測粒線體的形態和幹細胞行為相關。然而年齡是否會改變腸道幹細胞內粒線體的形態並不清楚。在本研究中，我們利用免疫螢光染色發現年齡增加會讓果蠅腸道幹細胞中的粒線體變得破碎。因為粒線體非常小，若利用電子顯微鏡觀察其結構十分耗時，因此我們利用擴展顯微鏡技術將腸道幹細胞和粒線體放大而不影響其結構。利用這項技術，我們將可以更精準觀察年齡對粒線體和其內膜的影響。我們研究發現年齡會影響幹細胞內粒線體的形態，盼未來能有更深入的研究與醫療應用。

壹、前言

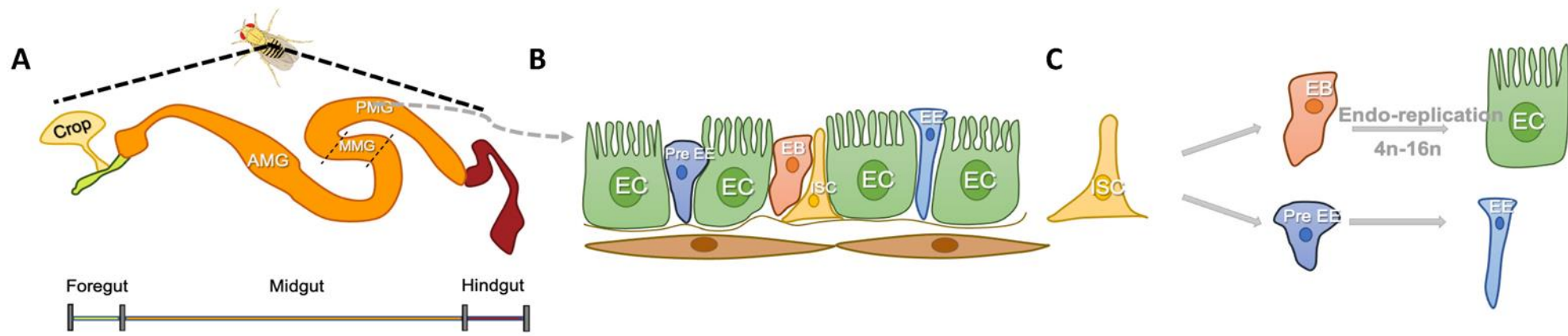


Fig1: ▲(A)腸道構造 ▲(B)腸道細胞種類 ▲(C)腸道幹細胞分化機制

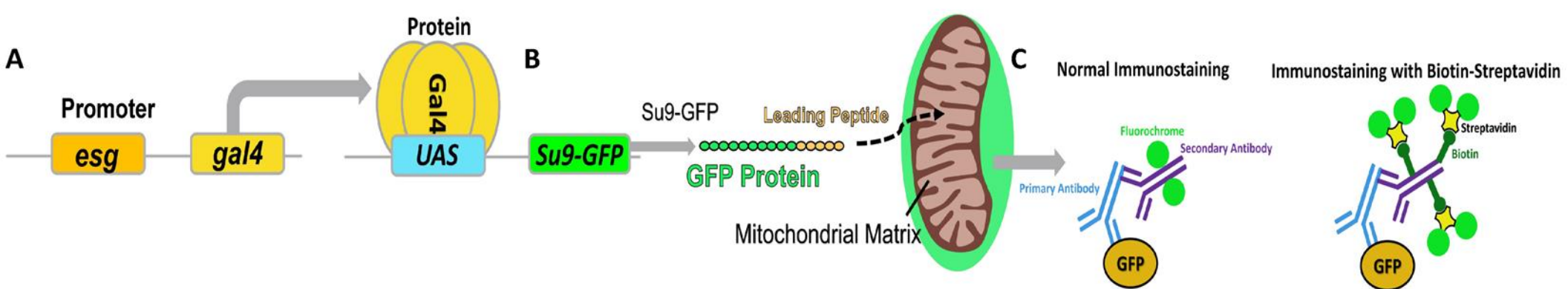
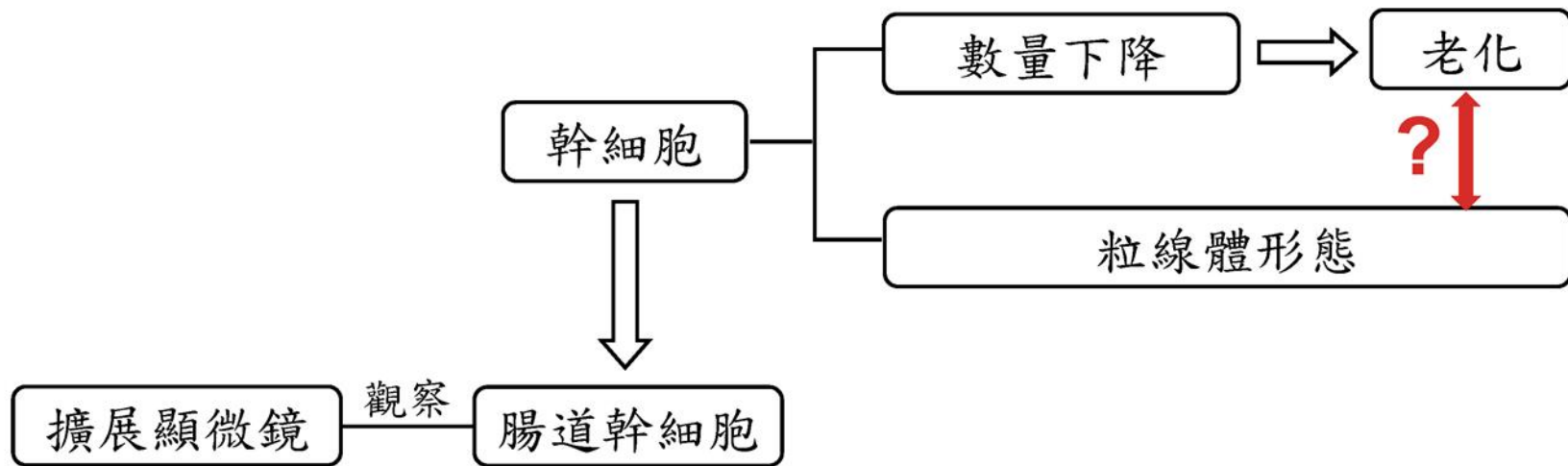
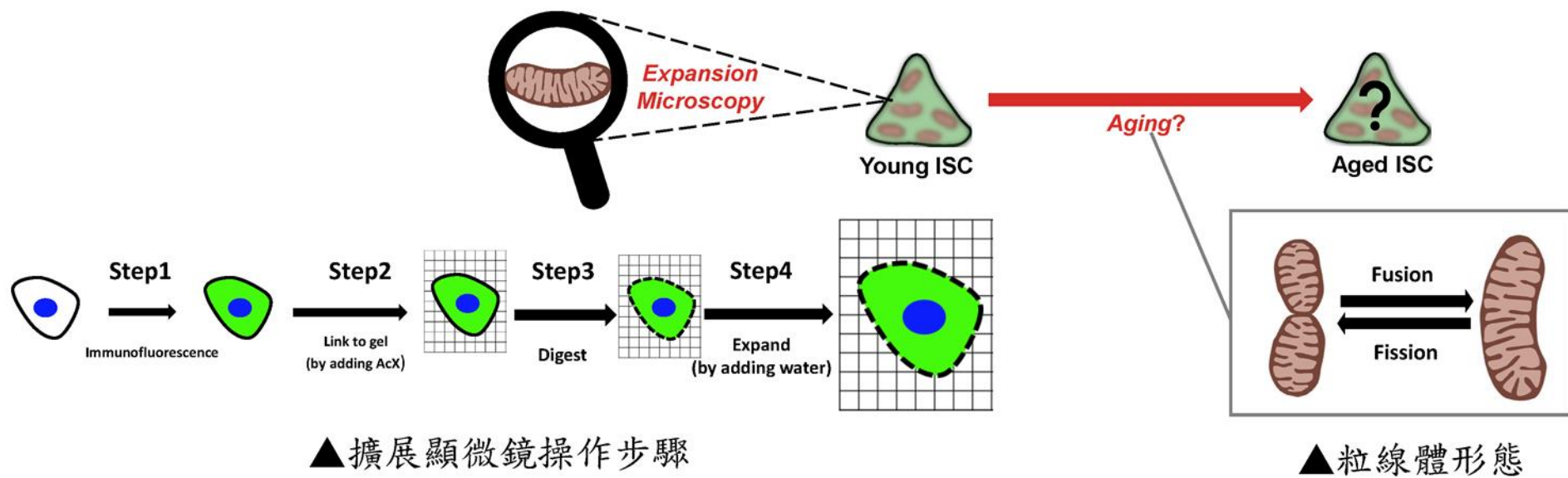


Fig2 : ▲(A)UAS-Gal4 系統 ▲(B)Su9-GFP ▲(C)免疫螢光染色

貳、研究動機與目的



參、研究過程與方法



▲擴展顯微鏡操作步驟

▲粒線體形態

實驗一 探討年齡對果蠅腸道幹細胞粒線體的影響

解剖果蠅腸道 → 免疫螢光染色
young: 5 days
aged: 30 days

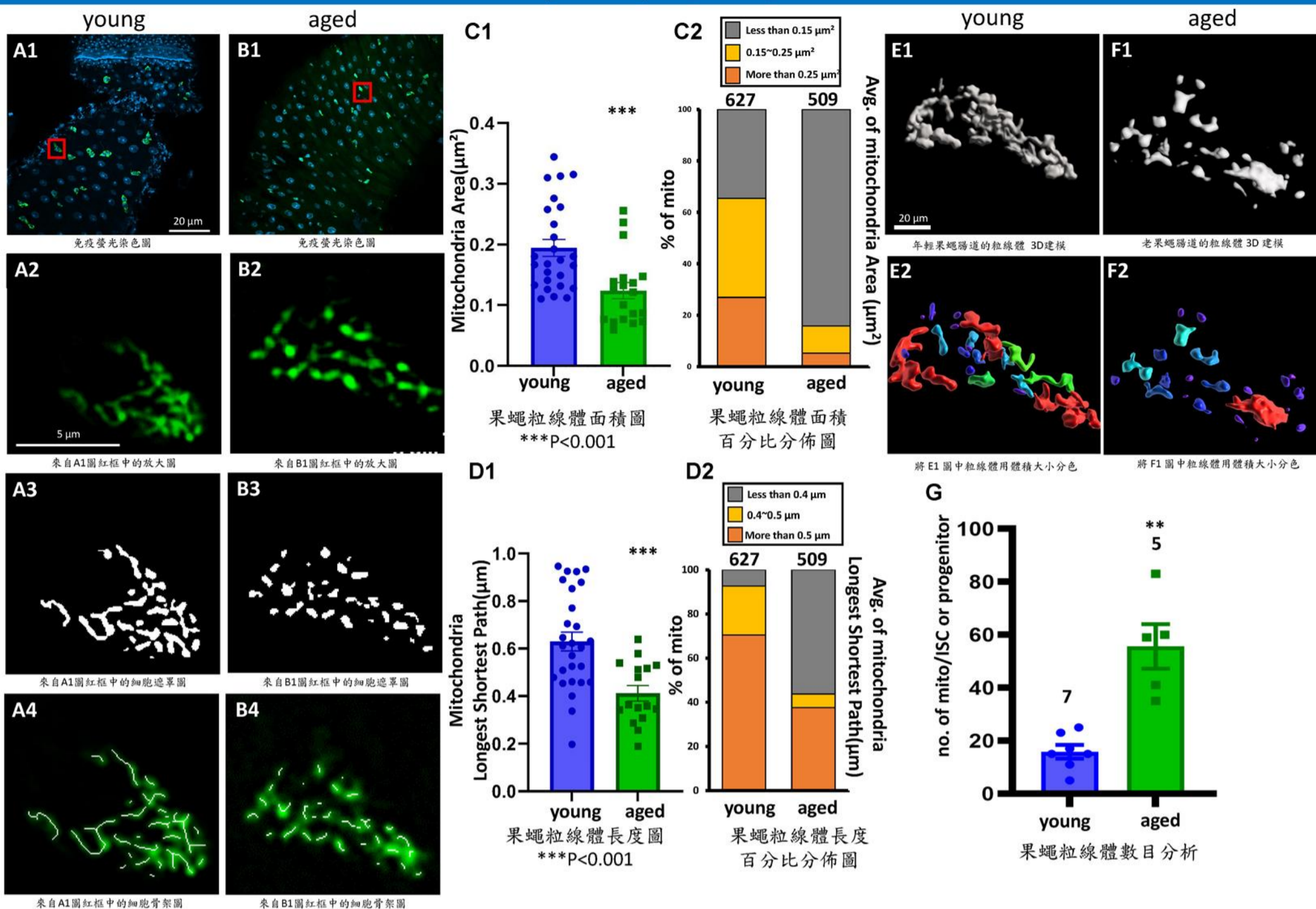
ImageJ : 粒線體的長度、面積 → 統計與分析
Imaris : 3D建模、粒線體個數

實驗二 將擴展顯微鏡技術應用於果蠅腸道幹細胞

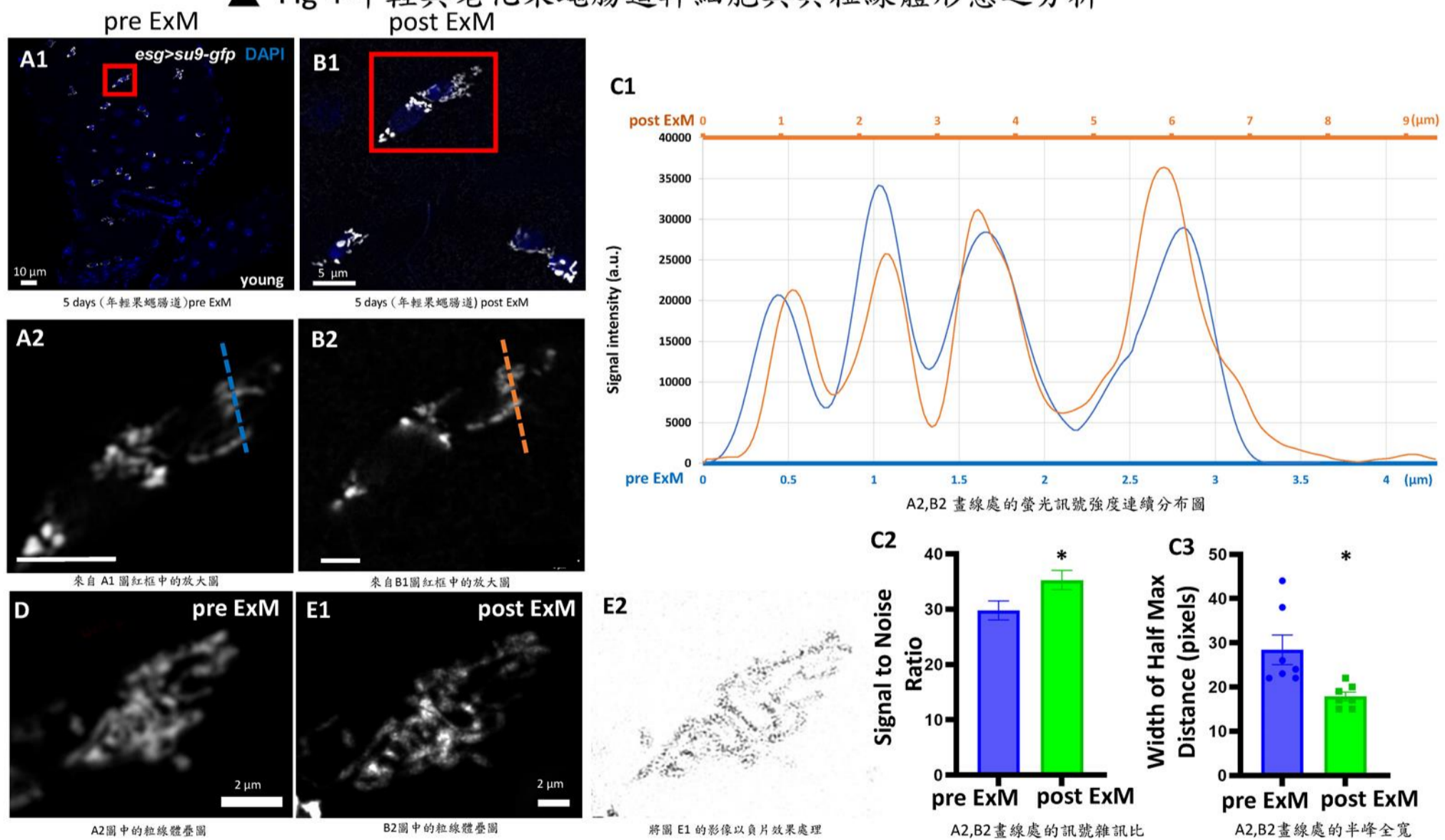
解剖果蠅腸道 → 免疫螢光染色 → 擴展顯微鏡
young: 5 days
aged: 30 days

ImageJ : 粒線體的長度、面積 → 統計與分析
粒線體內膜皺褶
Excel : 訊號雜訊比、半峰全寬
Imaris : 3D建模、粒線體個數

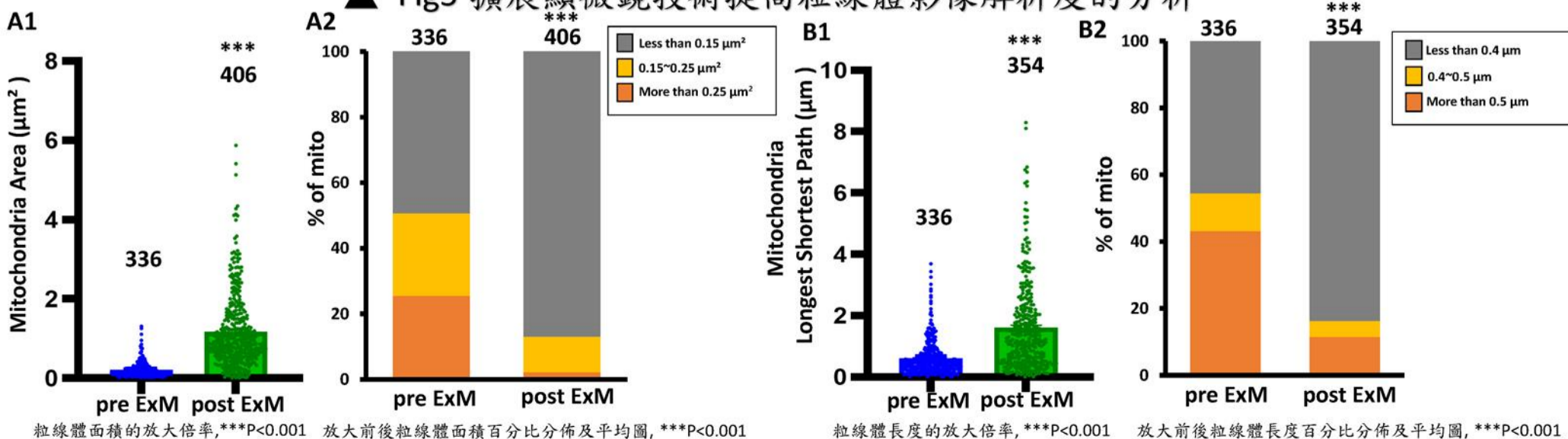
肆、研究結果

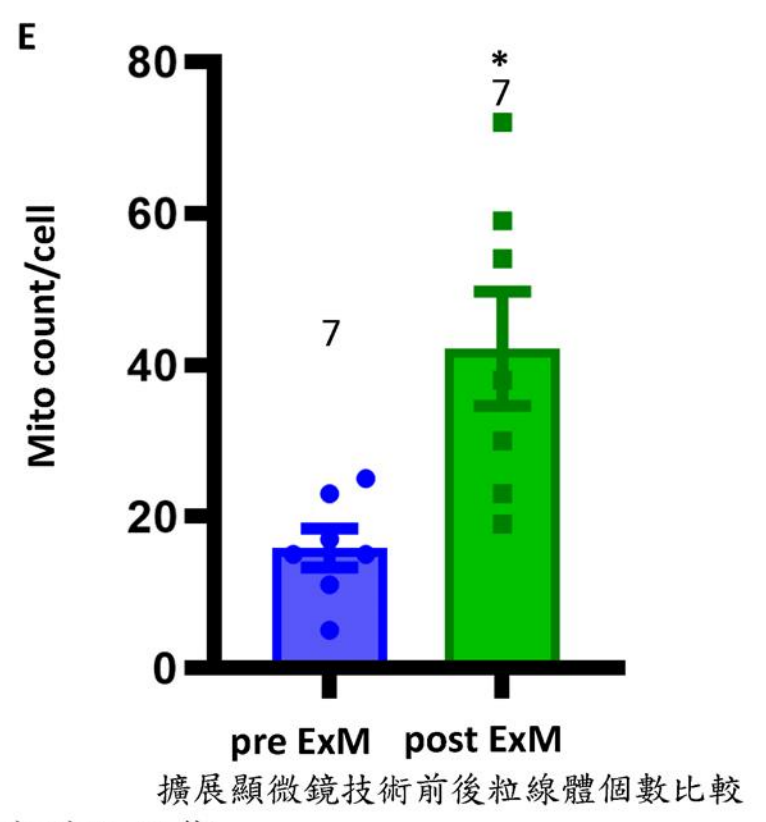
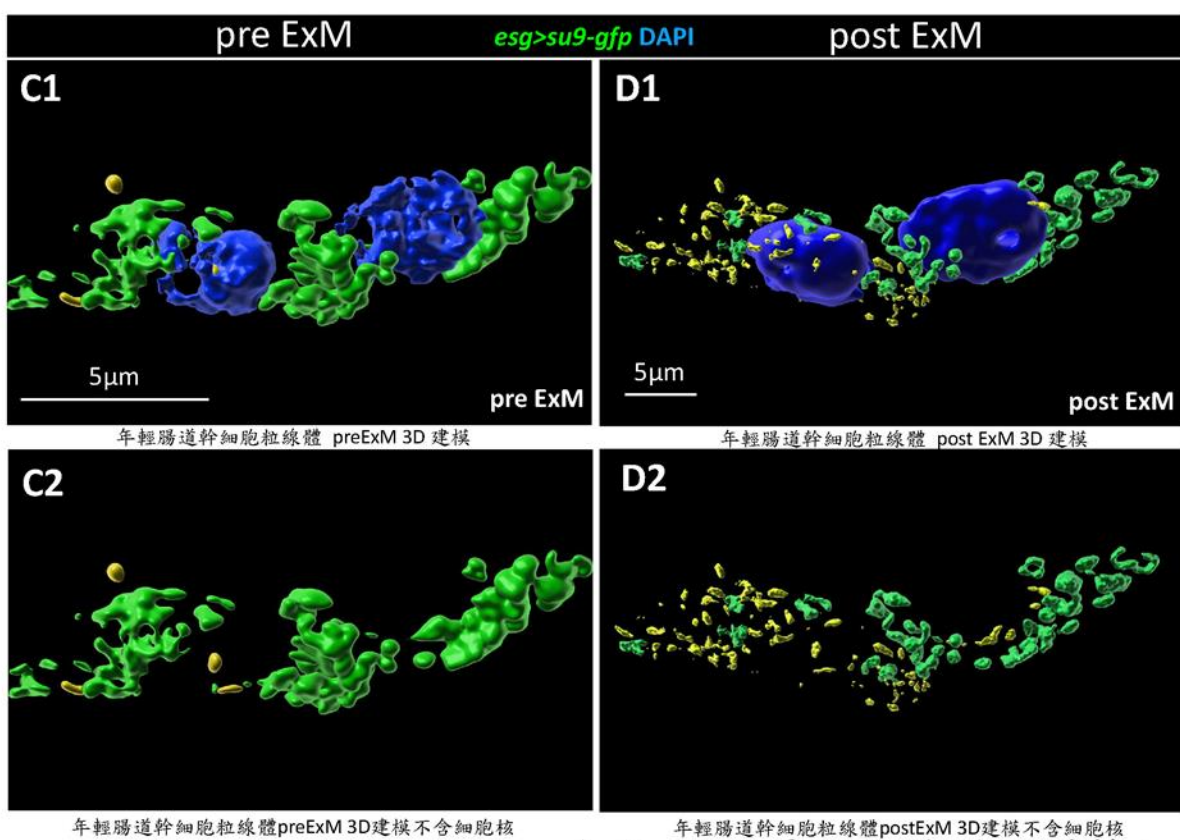


▲ Fig 4 年輕與老化果蠅腸道幹細胞與其粒線體形態之分析



▲ Fig5 擴展顯微鏡技術提高粒線體影像解析度的分析





▲ Fig 6 擴展顯微鏡對腸道幹細胞粒線體的影響

結論

實驗一 探討年齡對果蠅腸道幹細胞粒線體的影響

- (一) 老化果蠅腸道幹細胞的粒線體面積較年輕果蠅小
- (二) 老化果蠅腸道幹細胞的長度較年輕果蠅短
- (三) 老化果蠅腸道幹細胞粒線體數量較年輕多

老化果蠅腸道幹細胞之粒線體較傾向破碎形；反之，年輕果蠅腸道幹細胞粒線體較傾向長形。

實驗二 將擴展顯微鏡技術應用於果蠅腸道幹細胞

(一) 擴展顯微鏡

1. 擴展顯微鏡並不會破壞腸道幹細胞之結構
2. 擴展顯微鏡可以提高訊號雜訊比
3. 擴展顯微鏡可以降低半峰全寬
4. 擴展顯微鏡能提高解析度，看清粒線體內膜皺褶結構

擴展顯微鏡能夠在不破壞細胞結構的情況下，提升影像的解析度，使訊號更加清楚。此外，藉由解析度的提升，能夠清楚掃描粒線體內膜皺褶影像。

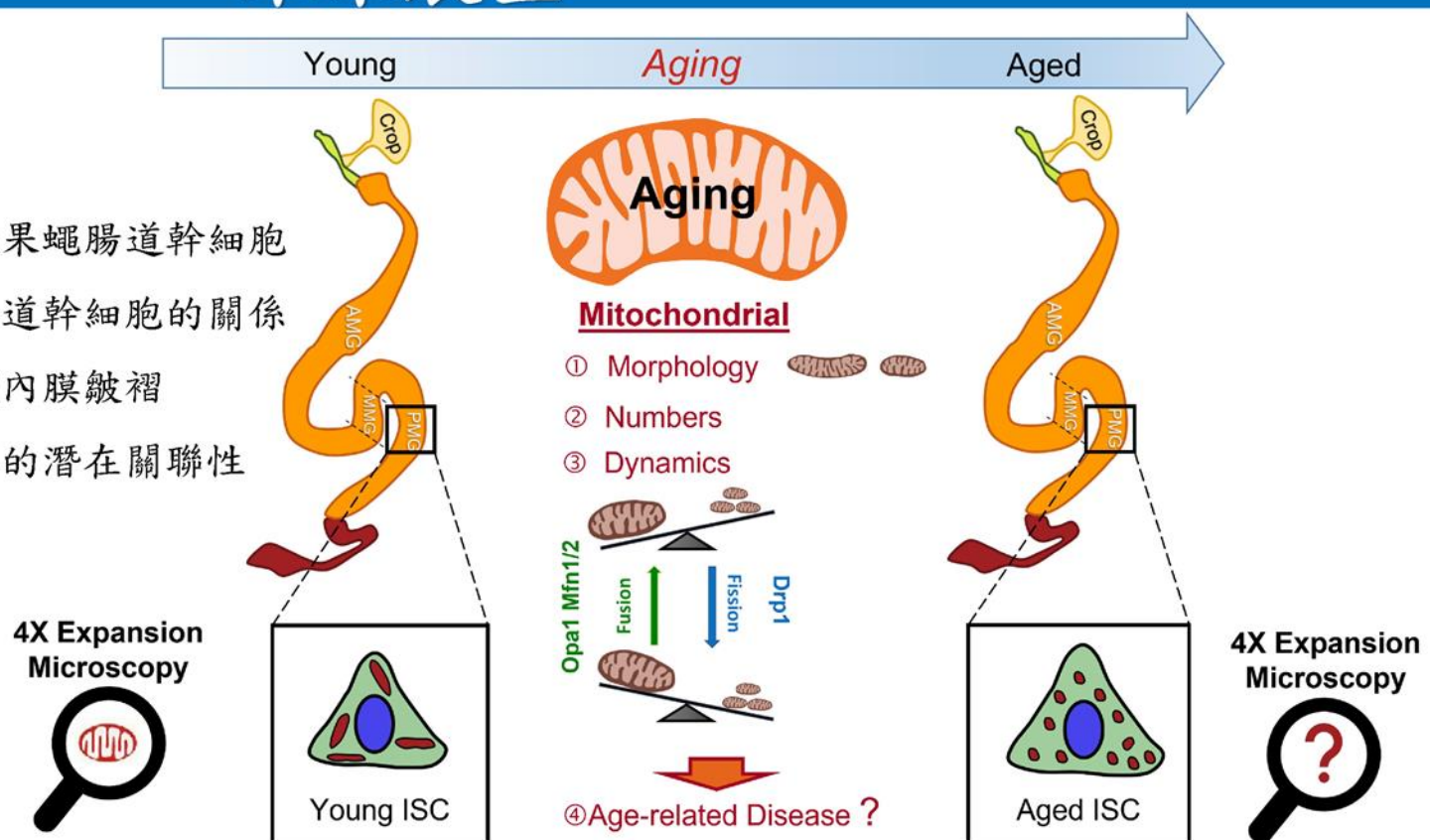
(二) 利用擴展顯微鏡觀察粒線體

1. 擴展顯微鏡放大粒線體面積約**5.64**倍(開根號2.37)，使相連的粒線體分開，降低大面積粒線體的比例
2. 擴展顯微鏡可放大粒線體長度約**2.63**倍，使相連的粒線體分開，降低長粒線體的比例
3. 擴展顯微鏡可使相連的粒線體分開，以提高粒線體數量

擴展顯微鏡可使腸道幹細胞影像放大約**2.5±0.15**倍，透過放大影像，拉長粒線體間的距離，使原本因解析度過低而被判定相連的粒線體得以被分辨，降低了大粒線體與長粒線體的比例，也提高了粒線體數量。

未來展望

- (一) 進行擴展顯微鏡的10X放大
- (二) 擴展顯微鏡技術應用於老化果蠅腸道幹細胞
- (三) 探討粒線體動平衡與果蠅腸道幹細胞的關係
- (四) 利用擴展顯微鏡觀察粒線體內膜皺褶
- (五) 探討粒線體與老化相關疾病的潛在關聯性



參考資料

- (一)Chen, F., Tillberg, P.W., Boyden, E.S., 2015. Expansion microscopy. Science 347, 543-548.
- (二)Lin, C.-H., Lin, T.-Y., Hsu, S.-C., Hsu, H.-J., 2022. Expansion Microscopy-based imaging for visualization of mitochondria in Drosophila ovarian germline stem cells. FEBS Open Bio 12, 2102-2110.
- (三)Seo, B.J., Yoon, S.H., Do, J.T., 2018. Mitochondrial Dynamics in Stem Cells and Differentiation. Int J Mol Sci 19.
- (四) https://asset-downloads.zeiss.com/catalogs/download/mic/104cc06d-f997-4cc0-b679-b2cf93bfc863/EN_wp_LSM-880_Basic-Principle-Airyscan.pdf (from Zeiss The Basic Principle of Airyscanning)
- (五)Amartuvshin, O., Lin, C.-H., Hsu, S.-C., Kao, S.-H., Chen, A., Tang, W.-C., Chou, H.-L., Chang, D.-L., Hsu, Y.-Y., Hsiao, B.-S., Rastegari, E., Lin, K.-Y., Wang, Y.-T., Yao, C.-K., Chen, G.-C., Chen, B.-C., Hsu, H.-J., 2020. Aging shifts mitochondrial dynamics toward fission to promote germline stem cell loss. Aging Cell 19, e13191.