

中華民國第 63 屆中小學科學展覽會
作品說明書

高中組 工程學(二)科

052414

新創多功能擴展顯微鏡技術

學校名稱：國立臺灣師範大學附屬高級中學

作者： 高二 王月廷	指導老師： 江青釗 張瑜紋
-------------------	-----------------------------

關鍵詞：擴展顯微鏡技術、胰蛋白酶、酪氨醯胺訊號
放大技術

摘要

擴展顯微鏡技術是以高分子化學與物理化學原理放大生物樣品的體積，相對地提高光學顯微鏡解析度至奈米等級。目前所使用的方法，無法有效標定細胞膜、胞器膜與脂質，且採用受質專一性低的蛋白酶 K，易導致螢光訊號流失。為改善上述缺點，本研究先用酪氨醯胺訊號放大技術增加螢光強度，再用受質專一性高的胰蛋白酶以減少螢光訊號流失。因新方法使用酪氨醯胺和胰蛋白酶，簡稱為 TT-ExM。實驗結果顯示此方法可更清楚標定細胞內多種生物大分子，如蛋白質及脂質，也適用於 DNA 染色。利用共軛焦顯微鏡即可進行超高解析度觀察，含各種微細的胞器、脂膜、和脂球結構，及染色體與粒線體 DNA。本研究論文已投稿專業期刊審查。

壹、研究動機

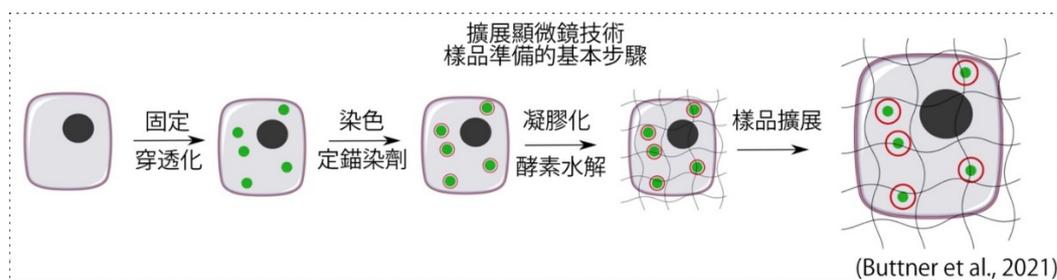
藉由 19 世紀末阿貝 (Ernst Abbe) 所提出的「阿貝繞射極限 (Abbe diffraction limit)」，我們得知光學顯微鏡的解析度約為光波長的二分之一。因為人類肉眼所能看到的可見光 (由紫光至紅光) 的波長範圍為 380-750 奈米 ($380-750 \times 10^{-9}$ 公尺)，所以傳統光學顯微鏡的最佳解析度即落在約 200 奈米左右，為紫光波長的二分之一 (曾小東和安毓英, 2004)。為了觀察奈米大小的物體，電子顯微鏡 (Electron microscope) 在 20 世紀初期發展出來，我們才得以觀察比光學極限還小的顯微樣品。電子顯微鏡雖然大幅提高解析度，但有許多局限，如造價昂貴、樣品準備步驟複雜不易、柔軟組織又容易在樣品製備過程受到破壞、對特定蛋白質分子的觀察較不容易 (楊永盛和楊慶宗, 1975)。所以雖然是光學顯微鏡解析度沒有電子顯微鏡高，前者仍是生命科學的主要研究工具。

近年來科學家致力於突破光學顯微鏡「阿貝繞射極限」的侷限，以提高解析度，其中一項突破就是本文所要討論的「擴展顯微鏡技術 (Expansion Microscopy, 簡稱 ExM)」。此技術濫觴於 2015 年，由美國麻省理工學院生物工程系愛德華博伊頓 (Edward S. Boyden) 教授實驗室發展出來 (Chen et al., 2015)。大致步驟流程如圖一所示。擴展顯微鏡技術雖然名稱中有顯微鏡，但重點不是架構新式奈米螢光顯微鏡，而是改變樣品制備方法，以「水凝膠 (hydrogel)」高分子聚合物化學方法，將水凝膠分子鍵結於生物樣本的生物大分子上，再利用水凝膠吸水膨脹的特性，等比例膨脹生物樣品，相對地提高光學顯微鏡的解析度，間接突破「阿貝繞射極限」。博伊頓教授實驗室最初發展的水凝膠，主要組成為聚合單體「丙烯酸鈉 (sodium

acrylate)」、「丙烯醯胺(acrylamide)」與交聯劑「雙丙烯醯胺(N,N'-methylenebisacrylamide)」。含有丙烯酸鈉的丙烯醯胺凝膠有強大吸水性，加水充分膨脹後，樣品的長寬高可各增加至少四倍，所以該方法被稱為“四倍擴展顯微鏡技術”。因為單一面向可增加四倍，相對解析度可提高至約 50 奈米。

德國席維歐瑞佐利教授(Silvio O. Rizzoli)和奧地利約翰丹佐教授(Johann G. Danzl) 成功發展“十倍擴展顯微鏡技術”(Truckenbrodt et al., 2018; Truckenbrodt et al., 2019)，進一步提高水凝膠的膨脹倍率，將光學顯微鏡相對解析度再提升至最高約 20 奈米。十倍擴展顯微鏡技術利用具有聚合單體與自我交聯劑(self crosslinker)雙重功能的「N,N'-二甲基丙烯醯胺(DMAA, N,N'-dimethylacrylamide)」來取代「雙丙烯醯胺」。

水凝膠高分子聚合物化學是促成擴展顯微鏡術的基本原理，本次研究的動機就是為探討這項突破性的技術，實際操作水凝膠高分子聚合物的形成，了解並設法改良這項新穎技術。



圖一、擴展顯微鏡技術的基本步驟 (圖引自 Buttner et al., 2021)。

貳、研究目的

雖然擴展顯微鏡技術的突破性進展已顯著提高光學解析度，仍有缺點待持續改善。部分問題和困難分述如下：

一、訊號微弱

首先，四倍擴展顯微鏡技術可將樣品的長寬高各增加四倍，總體積就增加為初始體積的六十四倍。若為十倍擴展顯微鏡技術，總體積就增加為初始體積的一千倍。在增加解析度的同時，樣品內的生物分子及用以標定生物分子的螢光染劑也同樣被稀釋六十四倍或一千倍，微弱的螢光訊號造成無法清楚辨識所欲觀察結構的缺點，增加觀察上的困難度。

二、使用受質專一性低的蛋白酶 K

再者，為了讓生物樣品可以伴隨水凝膠膨脹而等比例擴展，原先的擴展顯微鏡技術

利用蛋白酶 K (proteinase K)，水解切斷蛋白質的胜肽鍵(peptide bond)。然而蛋白酶 K 的高效能水解能力，將蛋白質水解切成長度過短的胜肽(peptide)，這些小片段的胜肽常和水凝膠失去交聯，不再被固定在膨脹後的水凝膠內，導致螢光訊號減弱，不利光學觀察。先前的研究也曾使用其他的蛋白酶，如胰蛋白酶(Trypsin)，但效果不佳(Yu et al., 2020)，究其原因，他們用高鹽分的緩衝溶液來進行胰蛋白酶的水解。然而，已知高鹽溶液會抑制胰蛋白酶的活性，可能因此導致實驗失敗(請見 ThermoFisher 公司的產品說明書)，值得降低鹽濃度來測試胰蛋白酶的效能。

三、不利於觀察細胞微細結構全貌的缺點

因上述兩項缺點，很多細胞微細結構反而不容易以一般的螢光顯微鏡觀察。此外，脂質結構會因傳統的擴展顯微鏡技術處理大量流失，無法觀察。

針對這三個問題，本研究的目的是利用單層非洲綠猴腎纖維細胞 COS-7 和體外培養的神經細胞為模式系統，改良四倍擴展顯微鏡技術，先用酪氨醯胺訊號放大技術 (Tyramide signal amplification) 改善標定方法以增加螢光強度，再用受質專一性高的胰蛋白酶 (Trypsin) 保留擴展後的螢光訊號。因新方法使用酪氨醯胺和胰蛋白酶，故稱為 TT-ExM。並運用螢光顯微鏡來觀察細胞微細結構，確認改進方法的效能。

參、研究設備及器材

一、生物樣品

- (一) 細胞株 COS-7 (非洲綠猴腎纖維細胞)
- (二) 初始培養的小鼠神經細胞(感謝胡曉棠博士提供)

二、試劑

- (一) 培養基含如下成分：

88% DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco, 11965-084)

10% 胎牛血清 (Fetal bovine serum, HyClone, SH30084.03)

1% 麩氨醯胺酸 (200 mM L-Glutamine, Gibco, A29168-01)

1% 盤尼西林/鏈黴素(Penicillin/Streptomycin, Gibco, 15140-122)

- (二) 磷酸鹽緩衝生理食鹽水 (10X PBS, Ph7.4, Lonza, 17-517Q)，稀釋成 1X 使用。

- (三) 胰蛋白酶 (0.05%Trypsin-EDTA, Gibco 25300-054)。

- (四) 三聚甲醛 (Paraformaldehyde, Merck, 1.04005.1000), 使用濃度 4%, 以 1X PBS 配製。
- (五) 胍鹽酸鹽 (即亞胺基甲二胺鹽酸鹽 Guanidine HCl, Sigma-Aldrich, cat. no. G4505)。
- (六) 蛋白酶 K (proteinase K, Sigma-Aldrich, P4850)。
- (七) 聚乙二醇辛基苯基醚 (Triton X-100, SIGMA, T8787), 非離子型表面活性劑。
- (八) 三羥甲基胺基甲烷 (Tris, VRW, 0826)。
- (九) Tris 緩衝生理食鹽水(TBS)和 TBST (TBS+0.3%Triton-X-100), 由三羥甲基胺基甲烷配製的生理食鹽水。
- (十) 免疫染色阻斷試劑(Blocking Reagent for immunostaining, PerkinElmer, 581428), 由酪氨醯胺訊號放大試劑套組(Tyramide Signal Amplification kit, PerkinElmer) 提供。
- (十一) 辨識粒線體細胞色素 C 氧化酶 5B 次單元(cytochrome c oxidase subunit 5B; COX5B) 的兔子多株抗體 (Proteintech, Rabbit PolyAb, 11418-2-AP)。
- (十二) 辨識內質網蛋白質雙硫鍵異構酶(protein disulfide isomerase; PDI)的兔子多株抗體 (Proteintech, Rabbit PolyAb, 11245-1-AP)。
- (十三) 辨識 B 型微管蛋白的小鼠單株抗體 (Beta-tubulin monoclonal antibody, Sigma-Aldrich, mouse monoclonal Ab, T4026)。
- (十四) 結合紅螢光染劑(Alexa Fluor-555)的酪氨醯胺(Alexa fluor-555-conjugated tyramide, Invitrogen, B40955)。
- (十五) 結合過氧化酶的抗兔子免疫球蛋白二級抗體(HRP-conjugated anti-rabbit IgG, 2nd antibody, Jackson ImmunoResearch Laboratory, 711-035-152)。
- (十六) 結合綠螢光染劑(Alexa fluor-488)的抗小鼠免疫球蛋白的二級抗體(Alexa fluor-488-conjugated anti-mouse IgG, 2nd antibody, ThermoFisher, A28175)。
- (十七) 結合紅螢光染劑(Alexa fluor-555)的抗兔子免疫球蛋白二級抗體(Alexa fluor-555-conjugated anti-rabbit IgG, 2nd antibody, ThermoFisher, A32732)。
- (十八) 結合生物素的磷脂酰乙醇胺 (N-(Biotinoyl)-1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine, triethylammonium salt (Biotin-DHPE), Biotium, 60022), 以下簡稱生物素-DHPE。
- (十九) 抗生物素和生物素-過氧化酶結合物試劑套組(VECTASTAIN ABC-HRP Kit, peroxidase (standard), Vector Laboratory, PK-4000)。
- (二十) 訊號放大稀釋劑(Amplification Diluent, PerkinElmer, FP1050), 由酪氨醯胺訊號放大試劑套組提供。
- (二十一) DNA 染劑 PicoGreen (ThermoFisher, P11495), 一千倍稀釋後使用。

- (二十二) 2,5-二氧杂吡咯烷-1-基 6-丙烯酰胺基己酸酯(Acryloyl-X, SE, Thermo Fisher, A-20770)，一種水凝膠交連劑，可將蛋白質交連在水凝膠聚合物上。
- (二十三) 丙烯酸鈉 (Sodium acrylate (SA), ALDRICH, 408220)。
- (二十四) 丙烯醯胺 (Acrylamide (AA), Sigma-Aldrich, A9099)。
- (二十五) N,N'-亞甲基二丙烯醯胺 (N, N'-methylenebisacrylamide (MBAA), ThermoFisher, 1551624)。
- (二十六) 過硫酸銨 (Ammonium persulfate (APS), Sigma-Aldrich, A9164)。
- (二十七) 四甲基乙二胺 (N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED), Sigma-Aldrich, T7024)。
- (二十八) 4-羥基-2,2,6,6-四甲基-1-氧化哌啶(4-Hydroxy-TEMPO, ALDRICH, 176141)，水凝膠凝膠阻斷劑，使凝膠聚合反應減慢，使單分子可以充分進入細胞再形成聚合物。
- (二十九) 氯化鈉 (Sodium Chloride, J.T.Baker, 3624-69)。
- (三十) 二甲基亞砜 (Dimethyl sulfoxide, ThermoFisher, D12345)。
- (三十一) 聚離胺酸溶液 (poly-L-lysine, Sigma-Aldrich P26360)，配成 1 mg/ml 使用。

三、設備與器材

- (一) 15 毫米圓形蓋玻片 (Fisher, 1942-10015)
- (二) 12 孔盤 (12-well plate, FALCON, 353043)
- (三) 5 號鑷子
- (四) 10 公分培養皿
- (五) 3.5 公分培養皿
- (六) 層流操作台
- (七) 離心機
- (八) 倒立式螢光顯微鏡
- (九) 微量吸管
- (十) 吸管輔助器
- (十一) 吸管 (pipet)
- (十二) 離心管
- (十三) 酒精燈
- (十四) 石蠟膜 (Parafilm, Bemis, PM-996)
- (十五) 微量離心管

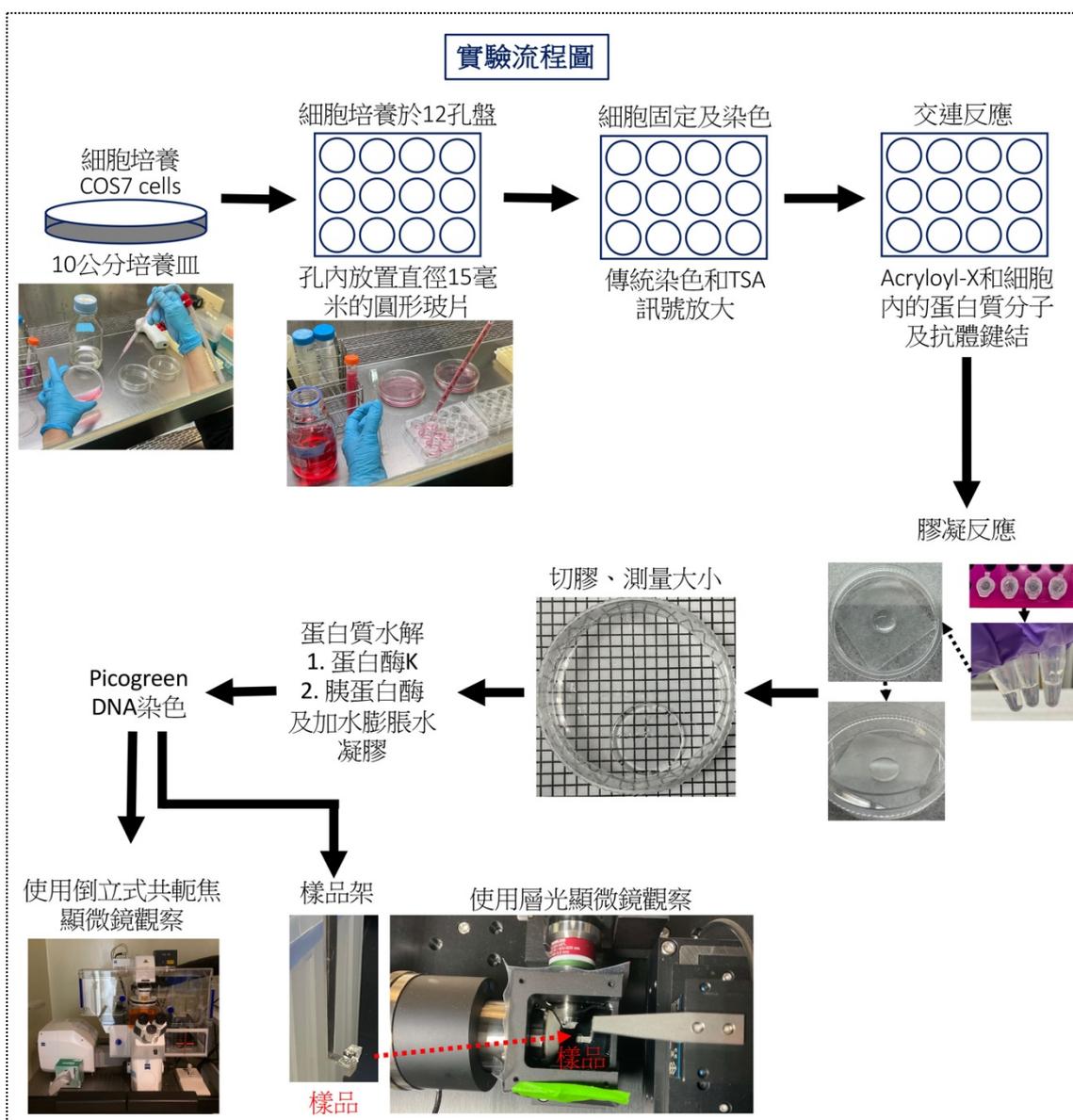
(十六) 倒立式共軛焦顯微鏡 (德國蔡氏公司 Carl Zeiss Co. Ltd., LSM700 and 980)

(十七) 層光螢光顯微鏡 (自行組裝)

肆、研究過程或方法

一、細胞解凍與培養

自攝氏-80 度超低溫冷凍櫃中取出一管(vial, 1 mL)冷凍細胞株(COS-7)，迅速將其置入 37 度水浴槽水浴。細胞液完全融化，立即以微量吸管吸起，加入離心管中，管中加入已於水浴槽回溫的培養基 9 毫升，經每分鐘 900 轉之離心 5 分鐘後，去除上清液，再加入 10 毫升培養基使其均勻混合，放置於 10 公分培養皿，於攝氏 37 度的 5%二氧化碳細胞培養箱培養。



圖二、本研究的實驗流程圖。詳細步驟見內文。

二、蓋玻片準備

於層流操作台中以鑷子夾取蓋玻片浸入酒精中，使其上覆蓋少量酒精，使用酒精燈燒乾酒精，完成滅菌，依序放入 12 孔盤中，並於每個孔中加入 1 毫升聚離胺酸溶液，靜置隔夜，以滅菌水潤洗兩次。加入 1 毫升細胞培養基，備用。

三、細胞準備

抽乾已 100%鋪滿細胞的 10 公分培養皿內的培養基，使用 PBS 潤洗兩次。加入 1 毫升胰蛋白酶(0.05%Trypsin-EDTA, Gibco 25300-054)，使其完整覆蓋培養皿的表面，於室溫靜置 1 分鐘後，加入 9 毫升的培養基，以吸管將貼附於培養皿表面的細胞沖洗入培養基中，充分混合後，並於已準備好的 12 孔盤每孔依次加入 0.4 毫升的細胞液，輕輕的前後左右搖晃，使細胞均勻分布，放置於攝氏 37 度的 5%二氧化碳細胞培養箱培養。

四、免疫螢光染色

若欲觀察粒線體先將 PBS 和 4%三聚甲醛置於 37 度水浴槽水浴。抽乾已 100%鋪滿細胞的十二孔盤內的培養基，使用攝氏 37 度的 PBS 快速潤洗兩次。快速加入攝氏 37 度的三聚甲醛，並於攝氏 37 度細菌培養箱靜置 30 分鐘。若不觀察粒線體，則使用室溫下的試劑即可。接著使用 TBS 潤洗兩次，加入 TBST (TBS+0.3%Triton-X-100) 靜置 10 分鐘，再使用 TBST 潤洗一次，加入 TNB (TBS+0.5% 免疫染色阻斷試劑) 靜置 30 分鐘。剪裁適當大小石蠟膜使其緊貼於方形塑膠盤上，於石蠟膜上分別滴上 100 微升第一級抗體，從十二孔盤中取出細胞玻片，使長有細胞的面朝下，置於第一級抗體在石蠟膜上形成的液珠上，靜置兩小時後，使用 TBST 潤洗三次。加入第二級抗體，靜置一個半小時後，使用 TBST 潤洗三次。所用的抗體組合列於表一。若時間允許，增長抗體結合時間可增加最後的螢光訊號。其中第一組、第二組進行酪氨醯胺訊號放大實驗，加入以稀釋劑稀釋 100 倍的紅螢光酪氨醯胺 (Alexa Fluor-555-conjugated tyramide)，靜置 10-30 分鐘充分反應，再使用 TBST 潤洗三次。

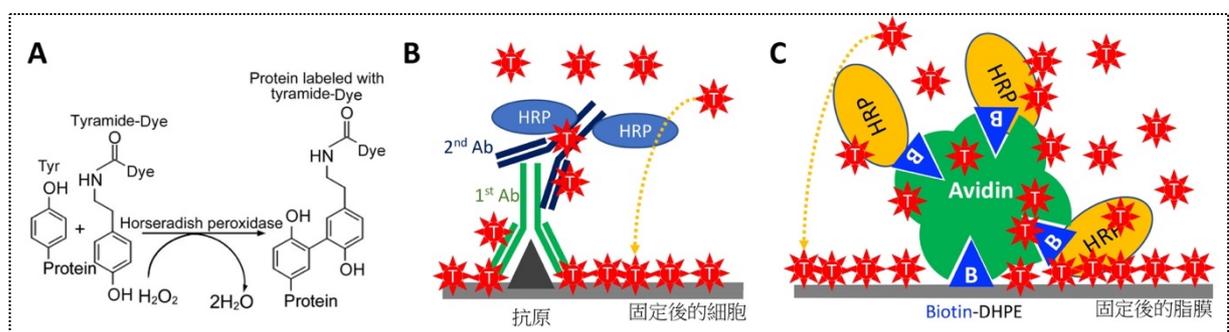
	第一抗體	第二抗體
第 1 組	COX5B (3 微克/毫升)	HRP conjugated anti-rabbit IgG (1:500)
第 2 組	PDI (1 微克/毫升)	HRP conjugated anti-rabbit Ig (1:500)
第 3 組	COX5B (6 微克/毫升)	anti-rabbit Ig Alexa-555 (1:500)

第 4 組	PDI (2 微克/毫升)	anti-rabbit Ig Alexa-555 (1:500)
第 5 組	COX5B (6 微克/毫升) Beta-Tubulin (6 微克/毫升)	anti-rabbit Ig Alexa-555(1:500) anti-mouse Ig Alexa-488 (1:500)
第 6 組	PDI (2 微克/毫升) Beta-tubulin (6 微克/毫升)	anti-rabbit Ig Alexa-555 (1:500) anti-mouse Ig Alexa-488 (1:500)

表一、六組染色的第一及第二級抗體的組合。第一、二組是用於酪氨醯胺訊號放大(見下圖三)，第三至六組則是傳統染色方法，而在第五、六組多加微管(microtubule)的抗體，測試辨識不同胞內結構抗體的效果。第一至四組將用 PicoGreen 後染 DNA。

五、免疫螢光的放大訊號

本研究使用四倍擴展顯微鏡技術，預期生物樣本的體積會膨脹至少六十四倍，其螢光訊號強度在水凝膠膨脹後也就減弱為 1/64。為了能清楚看到影像，我們使用了酪氨醯胺訊號放大(Tyramide Signal Amplification, TSA, PerkinElmer)技術來增加螢光訊號強度。此技術有多種不同的試劑組合，分別達成數十倍甚至一千倍的放大效果(詳見 PerkinElmer 的使用說明)。針對免疫螢光染色的部，預估增加螢光訊號強度數十倍應已足夠彌補 64 倍的稀釋，因此我們挑選最簡單的方法來測試，將第一級抗體搭配結合過氧化酶的 second 級抗體(2nd Ab-HRP)，再加入結合紅螢光的酪氨醯胺進行訊號放大。過氧化酶的酵素活性可以將紅螢光的酪氨醯胺共價鍵結在酪胺酸的「4 羥苯 (4-hydroxyphenol)」官能基上(圖三 A)。藉由這樣的酵素反應，可以專一地在抗體所在之處放大螢光訊號(圖三 B)。



圖三、酪氨醯胺訊號放大(Tyramide Signal Amplification, TSA)技術原理之示意圖。(A) 酪氨醯胺訊號放大的原理是經由過氧化酶 (HRP) 催化酪氨醯胺和蛋白質分子的酪胺酸「4 羥苯(4-hydroxyphenol)」官能基的化學反應，可進而形成共價鍵，將螢光標定的酪氨醯胺鍵結在蛋白質分子上。(B)使用第一級抗體(1st Ab)和過氧化酶鍵結的第二級抗體(2nd Ab-

HRP)的放大技術。(C) 合併使用 ABC 試劑(Avidin-biotin-HRP complex)的放大反應。在此以生物素-DHPE 標定脂膜或脂質，因為 ABC 可帶入更多的生物素-HRP(biotin-peroxidase)，可以進一步放大螢光訊號。圖中 T 代表螢光標定的酪氨酸胺。A 圖改自 Watabe et al., 2011。

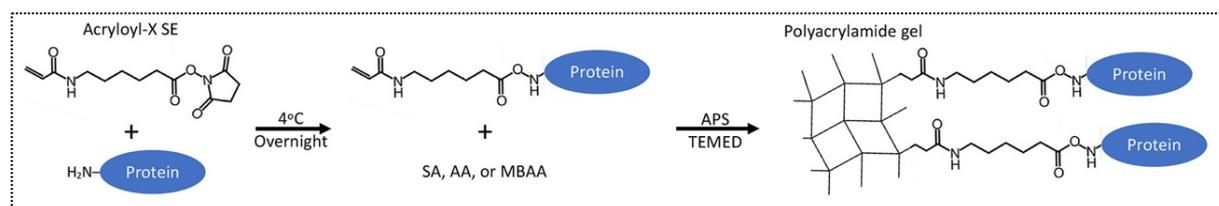
六、脂質染色及螢光訊號放大

為了觀察細胞脂膜，將生物素-DHPE 以 10 mg/ml 的濃度溶解在氯仿中。將 COS-7 細胞以 4% PFA 固定後，用 Tris 緩衝鹽水 (TBS) 洗滌 3 次，將固定細胞轉移到含有 0.1 mg/ml 生物素-DHPE 的 70% 和 50% 乙醇中，以進行脂質標定。反應時間為 2.5 小時和隔夜。以 PBS 充分潤洗細胞的同時，將等量的試劑 A 和 B (ABC-HRP 套組提供) 以 1:50 的稀釋度稀釋於 TBS，至少 30 分鐘。然後再加入到生物素-DHPE 標記的細胞中，反應 1 小時。充分洗滌後，將結合紅螢光的酪氨酸胺以 1:100 稀釋在訊號放大稀釋劑中，再加入到細胞反應 15 分鐘。徹底清洗後，染色的細胞可準備進行交連。

在以上實驗中，因為脂質是以生物素標定，所以我們運用改良的 ABC 酪氨酸胺訊號放大系統(圖三 C)。ABC 代表 Avidin-biotin-HRP complex 抗生物素-生物素-過氧化酶複合體。利用一個抗生物素結合四個生物素的原理來放大螢光訊號。訊號放大效果比單純使用過氧化酶鍵結的第二級抗體更大(第五點所使用的方法)。

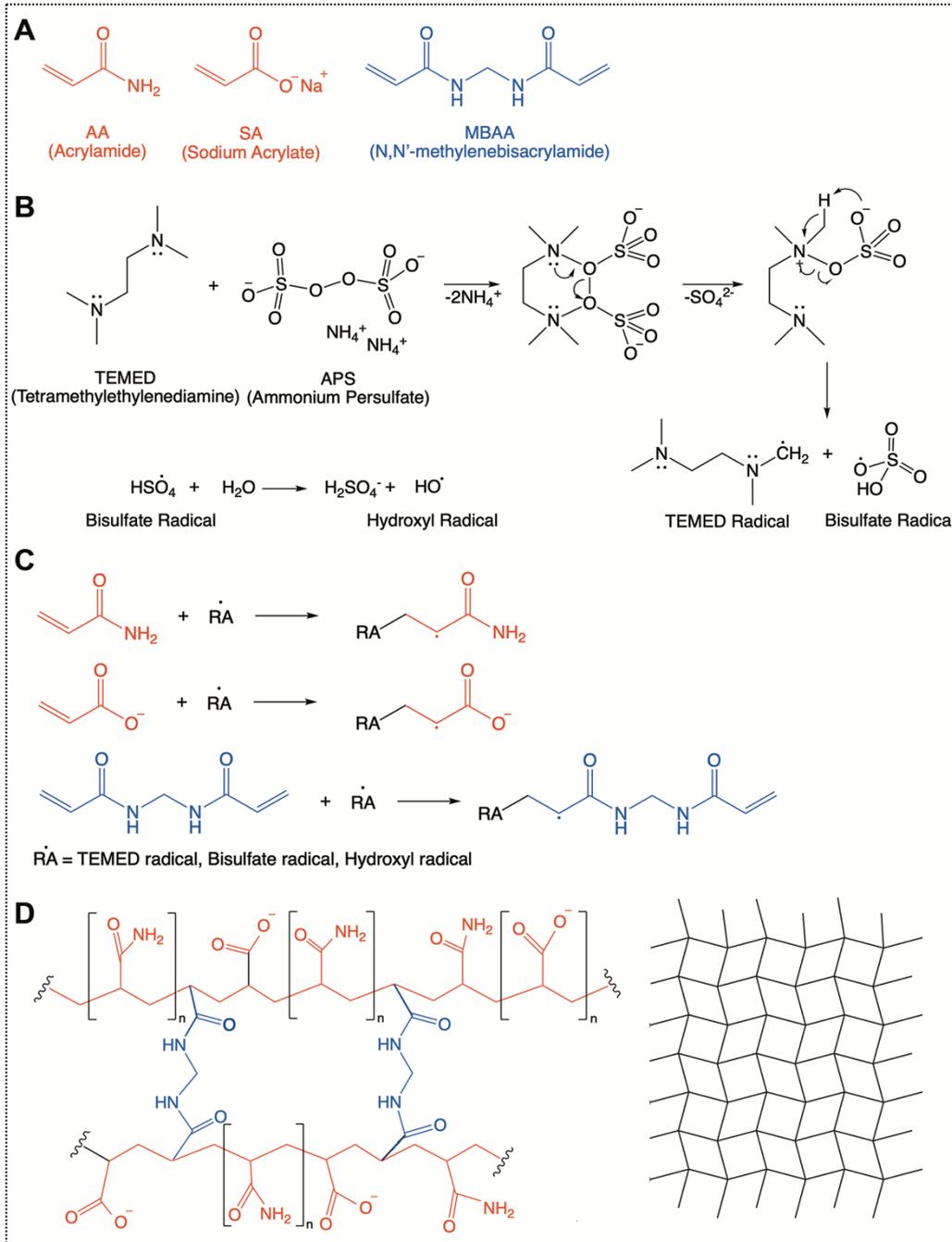
七、交連反應

為使細胞內的生物分子在膨脹後能保持其相對的位置，需要有交連劑(crosslinker)來聯結細胞內的蛋白質分子和聚丙烯醯胺凝膠。在此，我們使用原始論文(Chen et al., 2015)所建議的 Acryloyl-X SE。其交連蛋白質和丙烯醯胺的反應如圖五所示。首先使用 PBS 潤洗染色後的樣品一次，加入 Acryloyl-X, SE (0.1 mg/mL in PBS) 於攝氏 4 度靜置隔夜，接著使用 PBS 潤洗三次，馬上進行膠凝反應(如下步驟八)即可。



圖四、利用 Acryloyl-X SE 進行交連反應，以便將蛋白質分子固定在聚丙烯醯胺凝膠中，保持生物分子在膨脹後相對位置不變。

八、四倍擴展顯微鏡技術的水凝膠化學



圖五、本研究使用的水凝膠化學 (引自 Chen et al., 2015; Truckenbrodt et al., 2019; 王月廷, 2022A)。Sodium acrylate (SA); Acrylamide (AA); N, N'-methylenebisacrylamide (MBAA)。

在本研究中，我們運用四倍擴展顯微鏡技術，其所使用之原料，有丙烯醯胺 (acrylamide, AA) 與丙烯酸鈉(sodium acrylate, SA) 兩種聚合單體，和交聯劑雙丙烯醯胺 (N,N'-methylenebisacrylamide, MBAA) (圖五 A) (Wilson and Walker, 2005)。在初始聚合反應中，過硫酸銨(APS)和四甲基乙二胺(TEMED)在水中反應所產生的三種自由基 (以 RA 代表，詳見圖五 B)，和三種聚合原料(詳見圖五 A)進行乙烯基加成(ethylene addition)

聚合反應（圖五 C），誘發連鎖聚合反應，進一步形成凝膠聚合物（圖五 D）。因為丙烯酸鈉有極強的吸水力，使整個水凝膠可以吸收大量水分子而膨脹（引自 Chen et al., 2015; Truckenbrodt et al., 2019; 王月廷, 2022A）。

九、水凝膠製作

大致流程如上述「實驗流程圖」（圖二）中的「膠凝反應」。剪裁約 3.5 公分見方的石蠟膜，平整攤在 6 個 3.5 公分培養皿中，使其緊貼於培養皿上。取 564 微升聚合單體混合液（含 8.6% 丙烯酸鈉、2.5% 丙烯醯胺、0.15% N,N-亞甲基二丙烯醯胺、2 M 氯化鈉（11.7%）於一倍磷酸鹽緩衝生理食鹽水）、12 微升四甲基乙二胺（10% 溶液）、6 微升 TEMPO（1% 溶液）、6 微升二次蒸餾水置入微量離心管，最後加入 12 微升過硫酸銨（10% 溶液），總體積 600 微升，使之充分混合，迅速於每片石蠟膜上滴 88 微升聚合單體混合液。從十二孔盤中取出細胞玻片（直徑 15 毫米），使長有細胞的面朝下置於聚合單體混合液在石蠟膜上形成的液珠上，使用石蠟膜密封培養皿後，置於攝氏 37 細菌培養箱靜置 2 小時，使之形成直徑 15 毫米、高 0.5 毫米圓盤狀水凝膠。若是使用直徑 18 毫米的細胞玻片製作圓盤狀水凝膠，則混合總體積 800 微升聚合單體混合液，每片取 127 微升。若是製作 0.75 毫米高的圓盤狀水凝膠，則上述所有材料均增加 50%。

十、蛋白質水解

以手術刀切割 4 分之 1 圓盤狀水凝膠，以方格紙測量其實際大小，以扁平狀的水彩筆輕輕將其挑起，置於含蛋白酶的溶液中，進行水解。除了蛋白酶 K，胰蛋白酶之效能也被測試。兩種酵素分別測試兩小時及隔夜兩個反應時間。兩種酵素的濃度、水解溶液之成份及其切割位點列於表二。

	蛋白酶 K	胰蛋白酶
蛋白酶濃度	8 units/ml	0.015%
水解溶液成份及濃度	Tris, pH 8.0, 50 mM; EDTA, 1 mM; Triton-X-100, 0.5%; Guanidine HCl, 0.8 M	Tris, pH 8.0, 50 mM; EDTA, 1 mM; Triton-X-100, 0.5%
切割位點	脂肪族胺基酸或芳香族胺基酸，含白胺酸(7.6%)、丙胺酸 (7.4%)、纈胺酸	賴胺酸 (7.2%) 或精胺酸 (4.2%)

	(6.8%)、異白胺酸(3.8%)、甘胺酸(7.4%)、苯丙胺酸(4%)、脯胺酸(5%)、色胺酸(1.3%)、酪胺酸(3.3%)	
--	--	--

表二、蛋白酶 K 和胰蛋白酶之比較。Guanidine HCl 是離散劑(chaotropic agent)，可破壞生物分子內與分子間的氫鍵，藉以解開蛋白質與核酸的立體結構，加強蛋白酶的水解效能。此離散劑只用於蛋白酶 K 水解反應中，不使用於胰蛋白酶水解反應。胺基酸後面括弧內所示之百分比，是脊椎動物各胺基酸的平均使用頻率(Lehmann, 2018)。所代表的意義是在理想狀況下，蛋白酶切割長度為一百個胺基酸的蛋白質分子，預期水解切斷某特定胺基酸的胜肽鍵(peptide bond)的次數。

十一、水凝膠擴展

經蛋白酶水解的水凝膠放入裝有二次蒸餾水的 10 公分培養皿中，使之完全浸入，靜置至少三十分鐘後，更換二次蒸餾水，重複至少 3 次。以方格紙測量膨脹後的水凝膠大小。

十二、DNA 後染

將已擴展的水凝膠放入含有 DNA 染劑 PicoGreen (一千倍稀釋)的水中，靜置 2 小時使 PicoGreen 完全滲入。此時的水凝膠即可用倒立式共軛焦顯微鏡觀察。若要進一步利用層光顯微鏡觀察，則需將其放入二次蒸餾水中，靜置十分鐘後更換二次蒸餾水，重複 3 次，藉以去除多餘的染劑，避免污染層光顯微鏡載物台。

十三、使用倒立共軛焦顯微鏡觀察膨脹前後的細胞樣品

切取適當大小的膨脹後水凝膠，將黏有細胞的那面倒過來放置於 24x50 mm 的蓋玻片上，小心將水凝膠旁多餘水份吸除，放置在倒立共軛焦顯微鏡的載物台上，以 20X 或 40X 物鏡觀察細胞樣品，並以雷射掃描，截取影像。除了單層焦平面的影像，少數亦截取 Z 軸方向連續影像。對未膨脹的樣品，直接封片，亦用 20X 物鏡觀察，可以直接和膨脹後樣品比較。螢光影像是以蔡氏公司的 Zen 軟體 2009 截取，並以 ImageJ 影像分析軟體分析，再轉檔成一般影像軟体能辨識的格式。

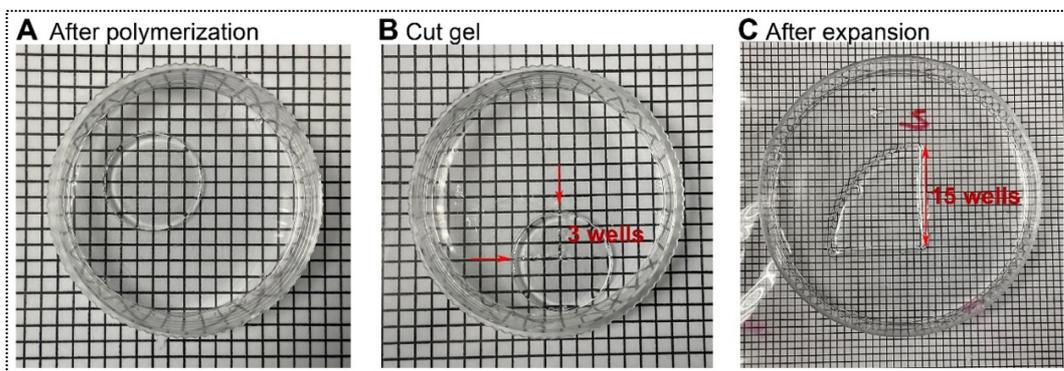
十四、使用層光顯微鏡截取膨脹後的細胞影像

依層光顯微鏡的載物台樣品架的設計需求，切取適當大小膨脹後水凝膠來觀察。對其中一種機型，需將水凝膠切薄，厚度不超過 1 毫米，再修成直徑約 3 毫米的圓盤形的水凝膠，將未黏有細胞的水凝膠側面黏著於以聚離氨酸處理後的直徑 5 毫米的圓形蓋玻片上，而後上機。另一機型則比較簡單，只需配合樣品架大小，切取適當大小水凝膠，將側面黏在玻片上，再置於樣品架上機。以層光掃描，用 50X 物鏡觀察細胞樣品，截取 Z 軸方向連續影像。影像以實驗室自行開發的軟體截取，並加以重組成 3D 影像。以 ImageJ 影像分析軟體分析，再轉檔成一般影像軟體能辨識的格式。

伍、研究結果

一、水凝膠之製作與膨脹係數

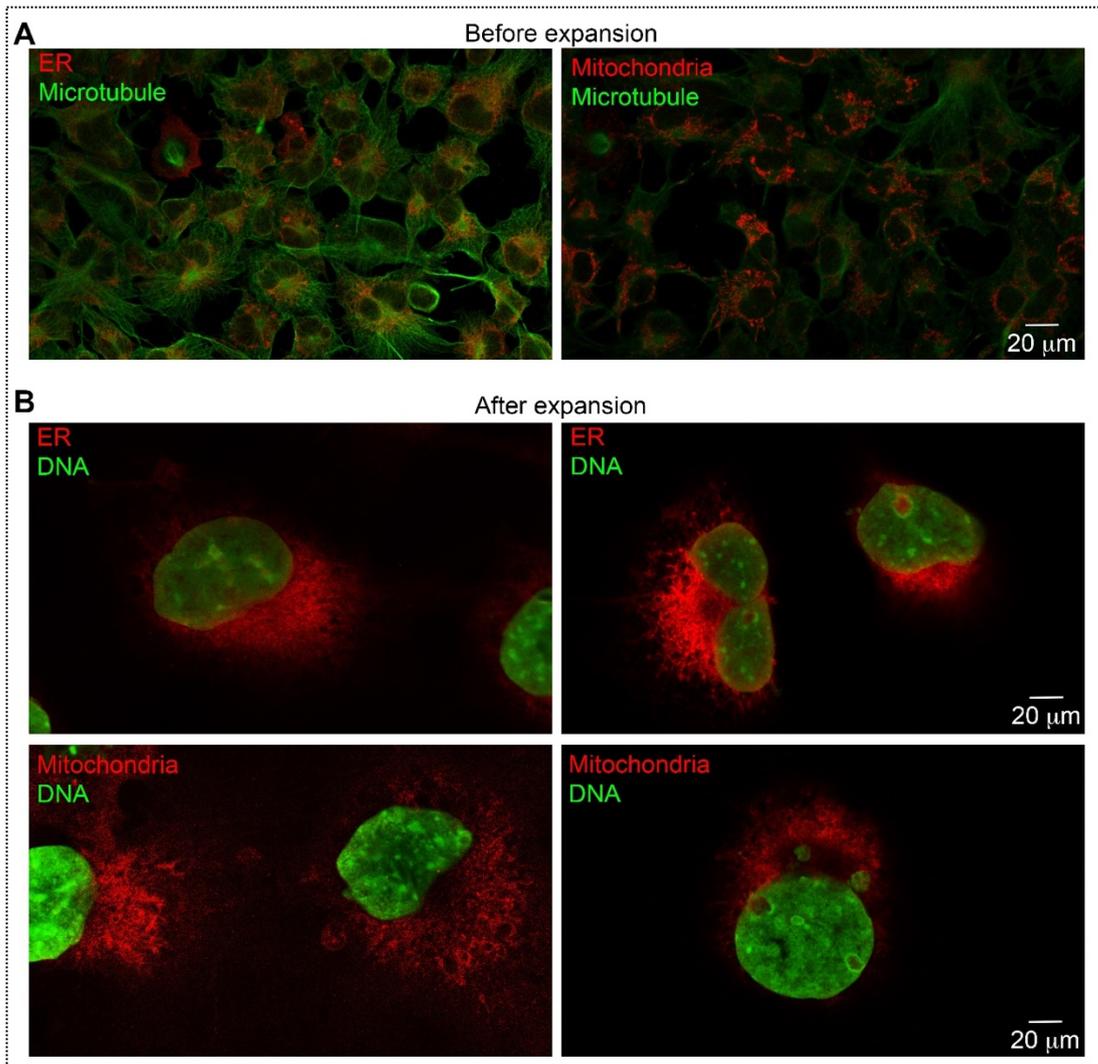
我們先將 COS7 細胞長於玻片上，完成染色及交連反應後(即研究方法一至六)，則將這些帶有細胞的玻片用於水凝膠的製作(如研究方法八)。在膨脹前，先將玻片水凝膠整個放在培養皿上，水凝膠的那面朝上(圖六 A)。使用每格邊長為 2.5 毫米的方格紙，來度量長度。切取約四分之一的凝膠，拍照紀錄切取的大小(圖六 B)。接著將水凝膠剝離，置於蛋白酶水解溶液中。原本貼附在玻片上的細胞因為已包埋和固定在凝膠內，會隨著凝膠一起剝離。在蛋白酶水解後，進行充足的擴展，再次拍照測量水凝膠大小(圖六 C)。結果發現原本單邊長約 3 格(7.5 毫米)之水凝膠擴展成單邊長約 15 格(37.5 毫米)(如圖七 B、C)，得膨脹係數約為 5，即單一面向增加 5 倍，總體積增加為初始體積之 125 倍。



圖六、水凝膠的擴展。(A) 凝膠後，擴展前。(B) 切下擴展前約四分之一的圓形水凝膠。(C) 擴展後的四分之一圓形水凝膠。背景的方格紙每格為 2.5 毫米。

二、擴展前後細胞影像之比較

為了觀察細胞擴展，使用免疫螢光染色技術和 DNA 染劑標定次細胞構造。所使用的第一抗體含辨識內質網內的蛋白質雙硫鍵異構酶(PDI)、粒線體內膜上的細胞色素 C 氧化酶 5B 次單元(COX5B)、組成微管的微管蛋白 (tubulin)。所使用的 DNA 染劑為 PicoGreen。於倒立式共軛焦顯微鏡下，固定使用 20 倍物鏡觀察擴展前後之細胞，以此比較大小的變化，和觀察細胞影像。



圖七、擴展前後細胞影像的比較。(A)擴展前；使用傳統免疫螢光染色法。(B)擴展後；使用酪氨醯胺訊號放大技術和胰蛋白酶水解蛋白質分子。均以倒立式共軛焦顯微鏡觀察，使用 20 倍物鏡，均為單層焦平面的影像。所觀察的標的以同色字標於左上角，共有內質網(ER)、粒線體(mitochondria)、微管(microtubule)、和細胞核(DNA)。同一列的放大比例相同，比例尺標註在右下角。

在使用免疫螢光染色技術標定次細胞構造時，若使用傳統方法，即第一抗體結合螢光標定的第二抗體，雖然擴展前的訊號十分清晰 (如圖七 A 的微管)，但擴展後的訊號非常微弱，無法用共軛焦顯微鏡截取可信賴的影像。推測可能是因為體積大幅擴增，以及酵素水解蛋白質分子的活性太高，無法保留螢光訊號所致。因此採用酪氨醯胺訊號放大技術來增強螢光訊號。如圖三所說明，酪氨醯胺訊號放大是運用過氧化酶(oxidase)將有螢光染劑結合的酪氨醯胺共價鍵結在蛋白質分子的酪胺酸的 4 羥基官能基上，因為酵素催化反應，可以大幅提高螢光訊號。

圖七 B 內質網和粒線體的訊號即為經酪氨醯胺訊號放大增強的結果，訊號清楚，內質網和粒線體次細胞結構能清晰地呈現。比較圖七 A、B，擴展前細胞核直徑約在 20 微米(micrometer)左右，而擴展後大約是 80 微米左右，細胞核的擴展倍率大約為四。比水凝膠的五倍膨脹係數略小。推測可能原因有幾個。首先，方格紙的最小單位是 2.5 mm，不是非常精準，尤其在膨脹後，水凝膠變厚，拍攝紀錄時，不同角度也會影響測量出來的長度，故以方格紙來估算凝膠長度的誤差是無法避免。再者，COS7 的細胞大小也不一致，我們這裡估算的是兩批細胞，而非同一顆細胞的擴展前後的結果，可能也是誤差來源之一。另外，水凝膠在載物台上是直接曝露在空氣中，為避滑動，已儘可能去除玻片上多餘水分，可能影像截取的時間內，水凝膠輕微脫水，導致膨脹倍率變小。最後，細胞可能沒有百分之百固定在水凝膠內，所以細胞的膨脹倍率可能比凝膠略小。

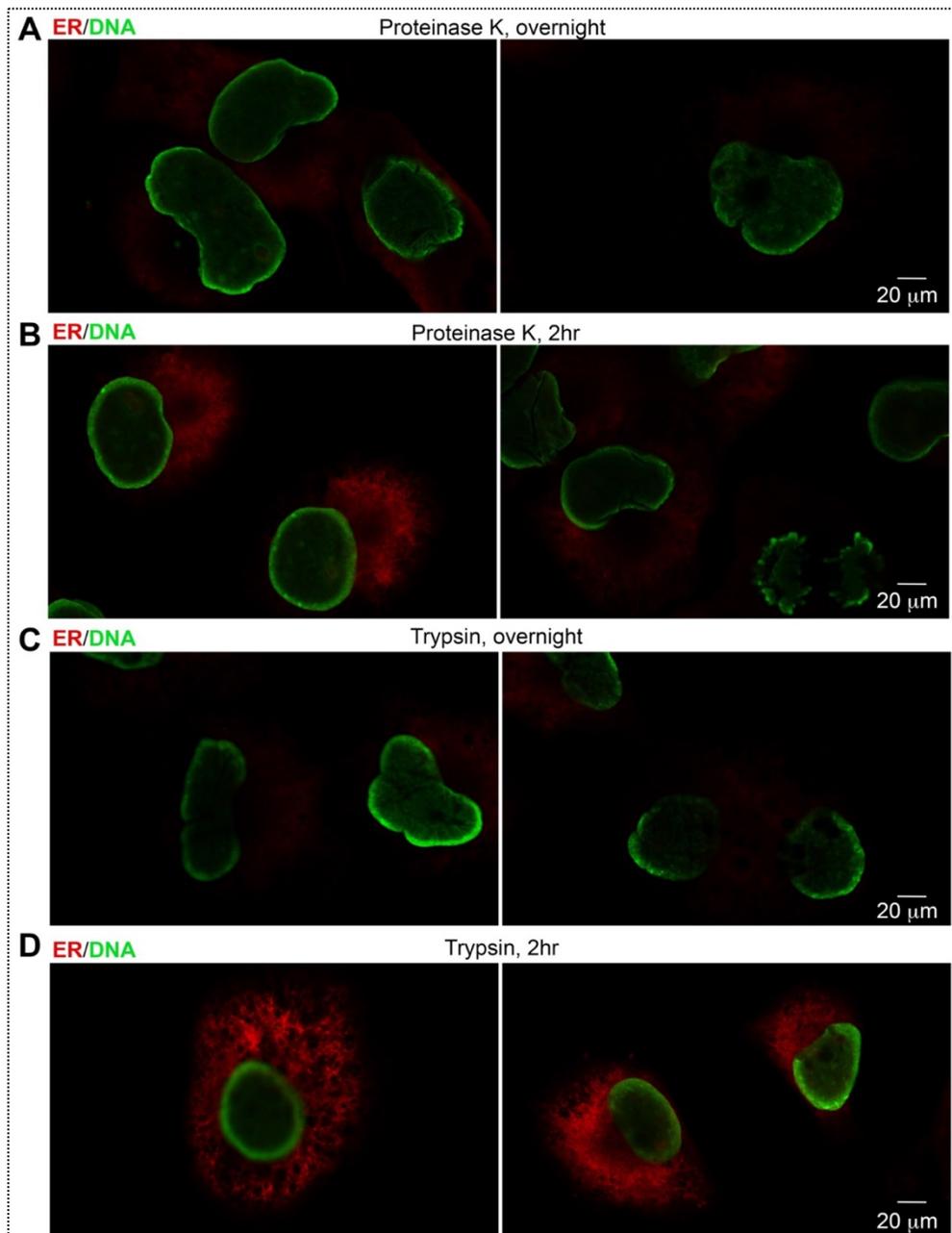
不論如何，細胞大概至少有四倍擴展的效果，藉由影像的分析，膨脹後的細胞影像相當均勻，沒有不規則的形變。最重要的是，因為放大四倍，細胞內微細結構可以清楚觀察。所以，結合酪氨醯胺訊號放大和四倍擴展顯微鏡技術，在 20 倍的物鏡下即可清楚觀察細胞內微細結構。

三、比較蛋白酶 K 和胰蛋白酶對影像的影響

在過去文獻中，蛋白質水解步驟使用蛋白酶 K (proteinase K)。我們實作測試時，發現對單層細胞樣品而言，蛋白酶 K 水解隔夜後，就算這些樣品已經藉由 TSA 放大訊號，螢光仍非常微弱 (如圖八 A)。因為酵素水解前的訊號很清楚，推測其原因為水解時間過長或蛋白酶 K 的水解活性太高所致。因此我也測試蛋白酶 K 水解兩小時後的結果，以相同條件截取影像，發現有改善，但是訊號還是偏弱 (如圖八 B)。

蛋白酶 K 是高活性的蛋白水解酶，其水解溶液中又加入了離散劑 (Guanidine HCl) (表二)，用以破壞生物分子內與分子間的氫鍵，解開受質蛋白質的立體結構，加強蛋白酶 K 作用的效能。另外，蛋白酶 K 主要切割位點是脂肪族胺基酸或芳香族胺基酸的羧

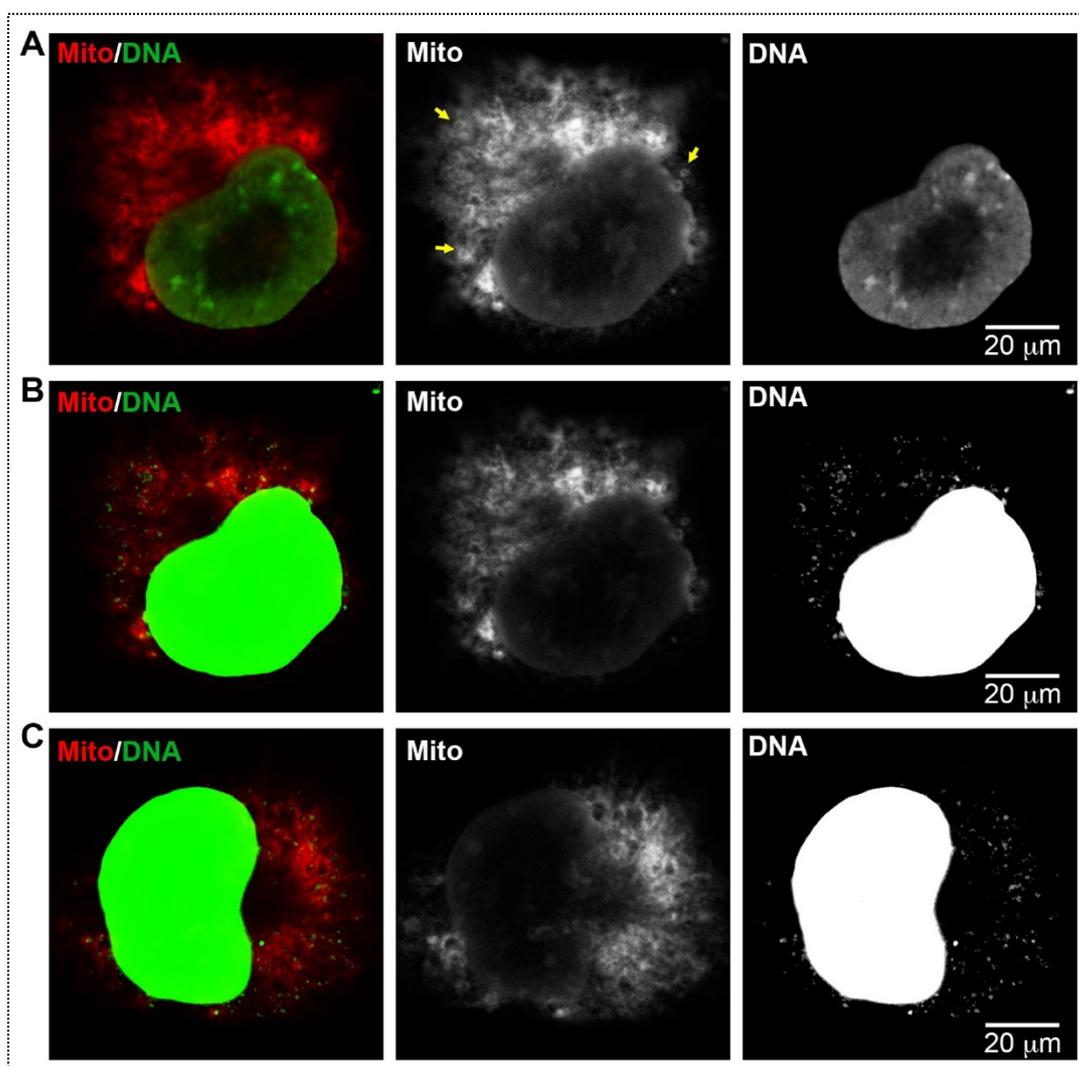
基端肽鍵，這些位點在脊椎動物蛋白質中的出現頻率總合估計為 46.6%(表二)。換言之，若蛋白酶 K 水解作用完全，平均每兩個胺基酸就有一個蛋白酶 K 的切割位點。因此蛋白酶 K 水解後，帶有螢光染劑的蛋白質受質小碎片容易與水凝膠失去聯結，不再固定在水凝膠中的原位點，經布朗運動而稀釋或流失可能性大幅提升，是造成螢光訊號強度減弱的主因。



圖八、蛋白酶 K 和胰蛋白酶在水解反應二小時及隔夜後的結果。(A) 蛋白酶 K 作用隔夜; (B) 蛋白酶 K 作用二小時; (C) 胰蛋白酶作用隔夜; (D) 胰蛋白酶作用二小時。PDI 抗體和 PicoGreen 用來標定內質網(ER)和 DNA(即細胞核)。結果發現胰蛋白酶作用二小時有最好保留螢光訊號的效果。

考慮上述因素，我們嘗試用胰蛋白酶（*trypsin*）來取代蛋白酶 K，因其切割位點只有在賴氨酸和精氨酸的羧基所構成的肽鍵，估算這些位點在脊椎動物蛋白質中的出現頻率總合為 11.4%(表二)。如果在理想條件下，胰蛋白酶完全作用時，平均約九個胺基酸長度的胜肽鏈會有一切點。然而胰蛋白酶在作用時不加入離散劑，受質的三維立體結構會限制它的作用，所以切點會比預測的更少，也就有機會保留較多的螢光訊號在水凝膠內。實作測試後，發現作用隔夜的訊號仍弱（圖八 C）。然而若作用二小時，螢光訊號保留效果最好，幾乎每顆細胞都有清楚訊號（圖八 D）。

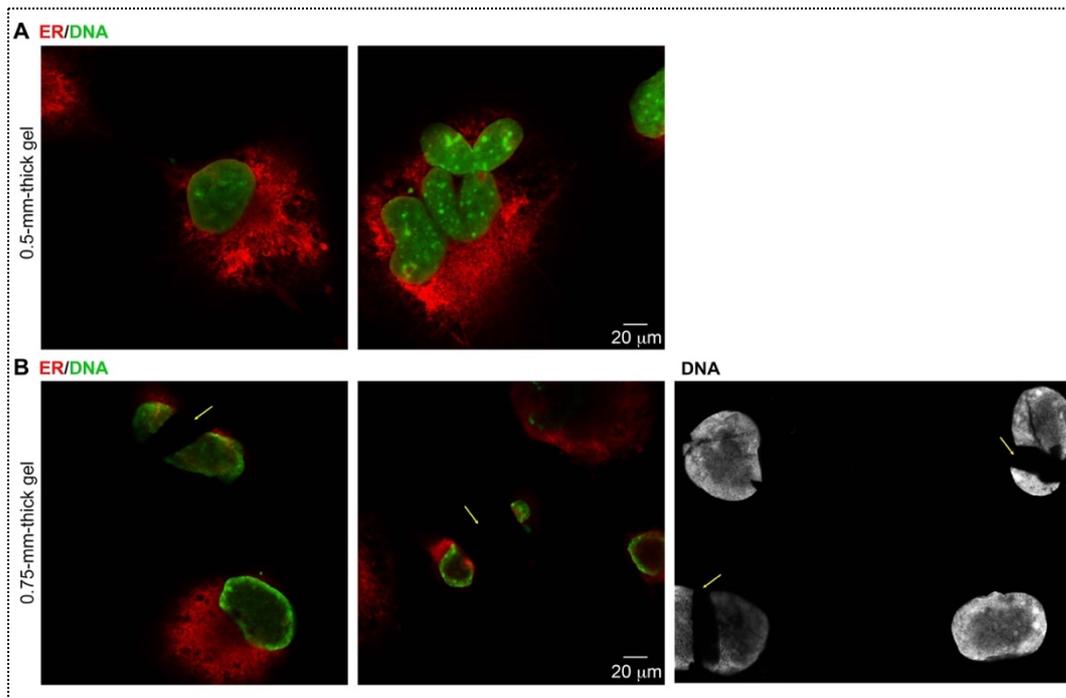
所以，在測試的四種條件下，發現胰蛋白酶作用二小時有最好的訊號保留效果。



圖九、細胞核外 DNA 和粒線體的影像分析。(A)和(B) 是同一細胞影像，差別在 B 圖的 DNA 亮度調到最大。(C) 另一個細胞影像，DNA 亮度同樣調到最高。所有細胞樣品均共染粒線體 COX5B 的抗體。在 B、C 圖，幾乎所有核外 DNA 的訊號均和粒線體的訊號重疊或被粒線體訊號包圍包起來，判斷這些核外 DNA 應該就是粒線體的 DNA。

四、細胞核外的去氧核醣核酸與粒線體

在觀察四倍擴展細胞影像時，若調高亮度，發現去氧核醣核酸(DNA)染劑 PicoGreen 可以染到細胞核外許多微小點狀結構（比較圖九 A、B）。在動物細胞核外，粒線體是惟一具有自身 DNA 的胞器。內共生理論（endosymbiotic theory）認為粒線體是由於好氧細菌被吞噬進細胞內所演化而來的胞器，其基因組在演化過程中就成為我們所稱的粒線體 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA)。在觀察由 DNA 與粒線體的疊合影響後，我們確認幾乎所有核外 DNA 皆分布於的粒線體內、或與其重疊（如圖九 B、C），因此推測這些細胞核外的點狀 DNA 就是 mtDNA。這些 mtDNA 在擴展前，因為影像非常細小，且訊號微弱，不容易觀察。在單向擴展四倍後，我們可以輕易在 20 倍物鏡下觀察到 mtDNA，證明擴展顯微鏡的功效。



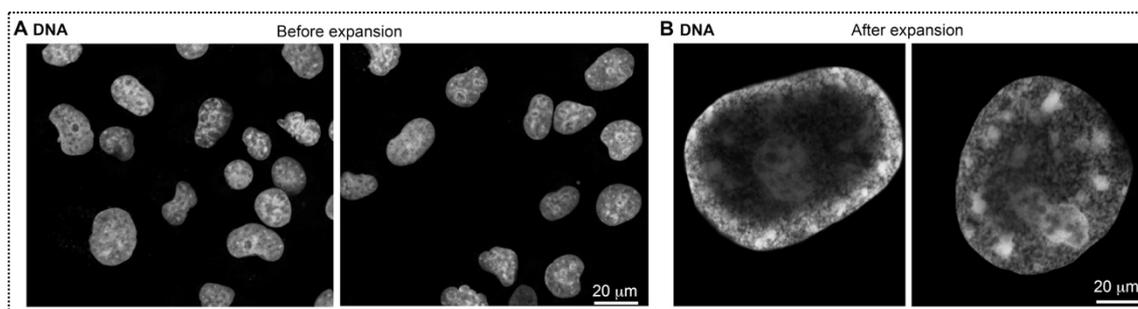
圖十、比較不同厚度的水凝膠。(A) 0.5 毫米的水凝膠。(B) 0.75 毫米的水凝膠。在 0.5 毫米的水凝膠中，細胞均勻擴展，沒有裂痕。然而在 0.75 毫米的水凝膠中，常常發現破裂的細胞，細胞核清楚的裂為了兩部分。黃色箭號所指即為破裂的細胞核。

五、水凝膠厚度與細胞擴展的效果

不同厚度的水凝膠在充分擴展後，預期應均能達到相同倍率的放大效果，然而 0.75 毫米的水凝膠和 0.5 毫米的水凝膠相比較時，前者細胞在擴展後容易有明顯的裂痕（圖十 A 和 B 比較）。推測其原因為厚度的增加導致三維網狀的水凝膠在吸水擴展時不均勻的拉扯，而造成靠近水凝膠表面的細胞碎裂。這個結果顯示，0.5 毫米的水凝膠是比較適合四倍擴展顯微鏡技術。

六、擴展後的細胞核觀察

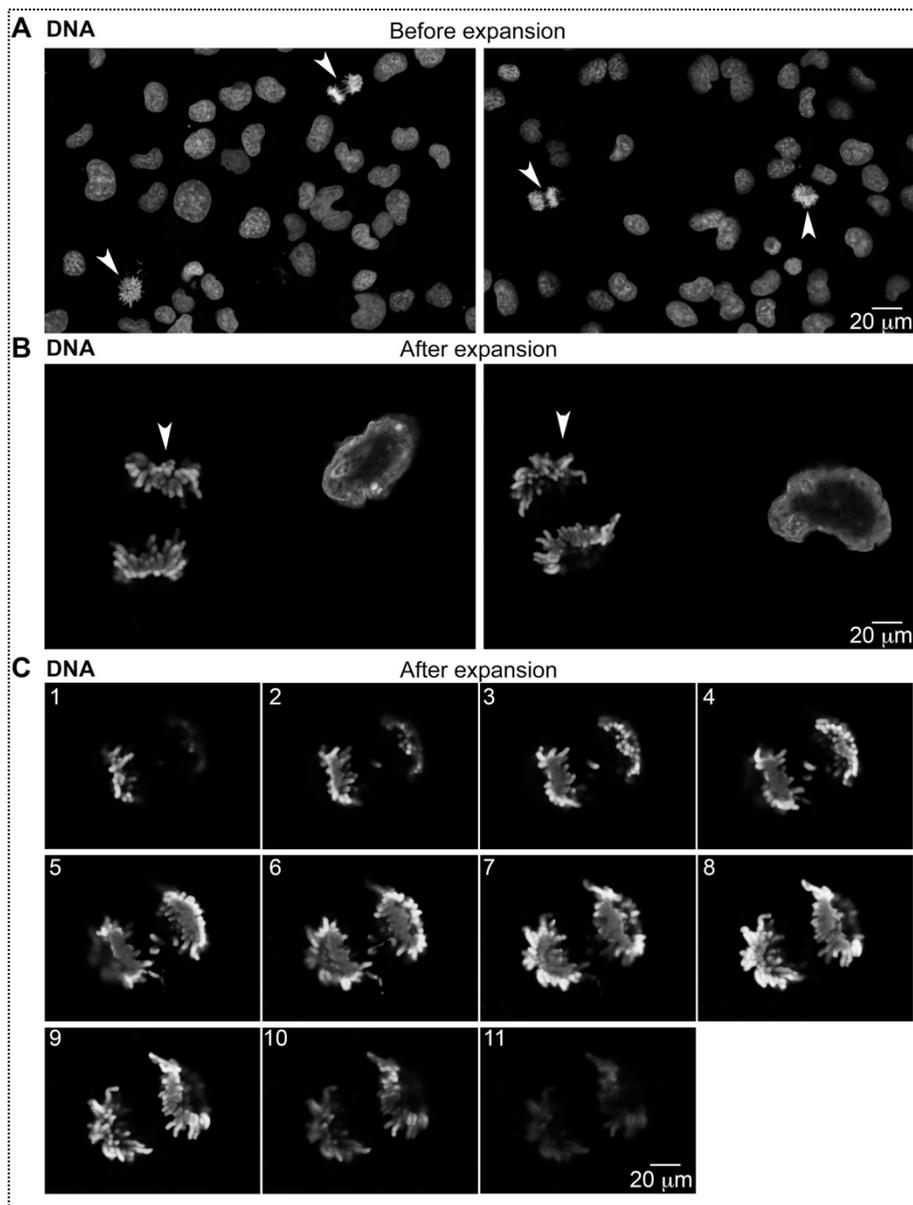
對比擴展前後的細胞核影像，皆可見 DNA 在細胞核內分布的情形，推測 DNA 伴隨水凝膠一同均勻擴展。因為單向放大四倍，可以更清楚觀察 DNA 在擴展後的核內分布與形狀（圖十一 A、B）。



圖十一、擴展前後細胞核之比較。(A)擴展前。(B)擴展後。二者均用 PicoGreen 染色。

七、擴展後的細胞分裂觀察

因為 COS7 細胞可不斷分裂增生，除了間期細胞核擴展後清晰的樣貌，亦可見正處於細胞分裂期的染色體。不論擴展前後，均可觀察到(圖十二 A、B)。在有絲分裂前期，DNA 會與相關蛋白質分子有序地相互結合，逐漸纏繞與濃縮成染色體。即便染色體是高度複雜的結構，我們透過改良後的擴展顯微鏡技術依舊能將其均勻放大。在擴展前，COS7 細胞的濃縮染色體的粗細約在 0.7 微米。擴展後，依比例尺估算，圖十二 B 的染色體平均寬度約為 3.5 微米，估計被擴展放大 5 倍。和水凝膠的放大比例相當（圖六）。



圖十二、 擴展前後細胞核和染色體的觀察。(A) 擴展前。(B) 擴展後。(C) 分裂中細胞的染色體觀察。共有 Z 軸的 11 個連續片。此樣品和 B 圖右邊的分裂中細胞是同一細胞，只是旋轉了角度，利於呈現。

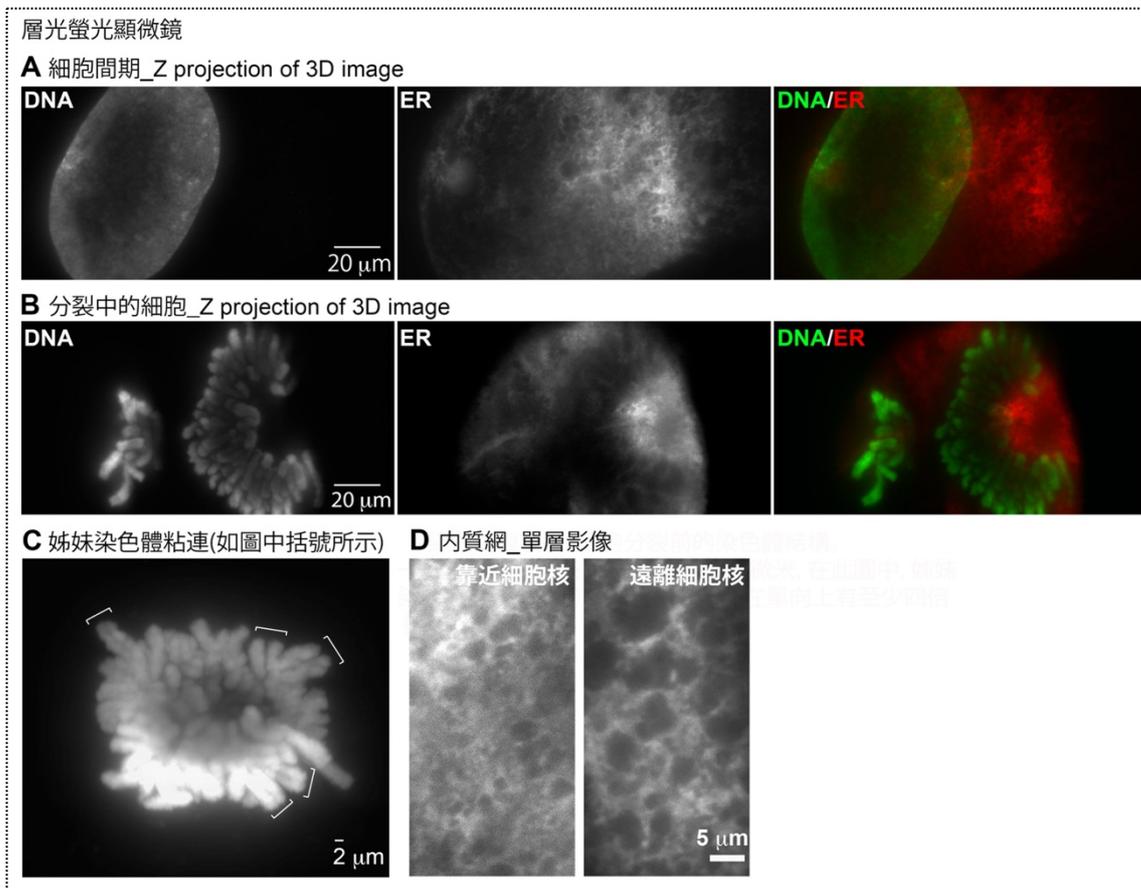
八、層光螢光顯微鏡下的擴展後細胞

雖然共軛焦顯微鏡可以拍攝清楚單層影像，但由於其使用高斯光束，拍攝以點為單位，再將其組成影像，因此有「耗時長」與「光損害高」等缺點，無法兼顧 z 軸的解析度與影像的明亮度。而層光螢光顯微鏡具「快速」且「光損害低」的優點，能在較短時間連續拍攝多層影像並將其堆疊，藉以觀察細胞與染色體 3D 整體結構（圖十三）。為易於呈現拍攝結果，我們將 3D 影像利用 Z 軸投射，堆疊成 2D 影像，非常清楚的看到細胞核內 DNA 和細胞核外內質網的影像（如圖十三 A）。同樣也可以發現正在分裂的

細胞（如圖十三 B）。尤其有一顆細胞已完成染色體複製，處於細胞週期前期，可清楚看見複製後的成對的姊妹染色體單體完全黏連在一起（如圖十三 C），證明我們的改良後的方法，除了能更清楚地觀察濃縮後染色體的細部結構，也能觀察「姊妹染色體單體凝聚(sister chromatid cohesion)」(將姊妹染色體配對並保持在一起的過程)，顯示可以簡易的光學顯微鏡術研究染色體三維結構與形態變化。

除了三維整體結構，我們也可以只截取單層影像。如圖十三 D，所呈現的就是內質網在不同位置的單層影像，清楚的觀察到內質網的網狀結構的差異。

綜合而言，不論使用共軛焦顯微鏡還是層光螢光顯微鏡，均可清楚地觀察到擴展後均勻的染色體影像和細胞質內的胞器影像，顯示擴展顯微鏡技術可以適用於觀察單細胞內的生物大分子(如蛋白質和 DNA)的三維分佈與形態特徵。

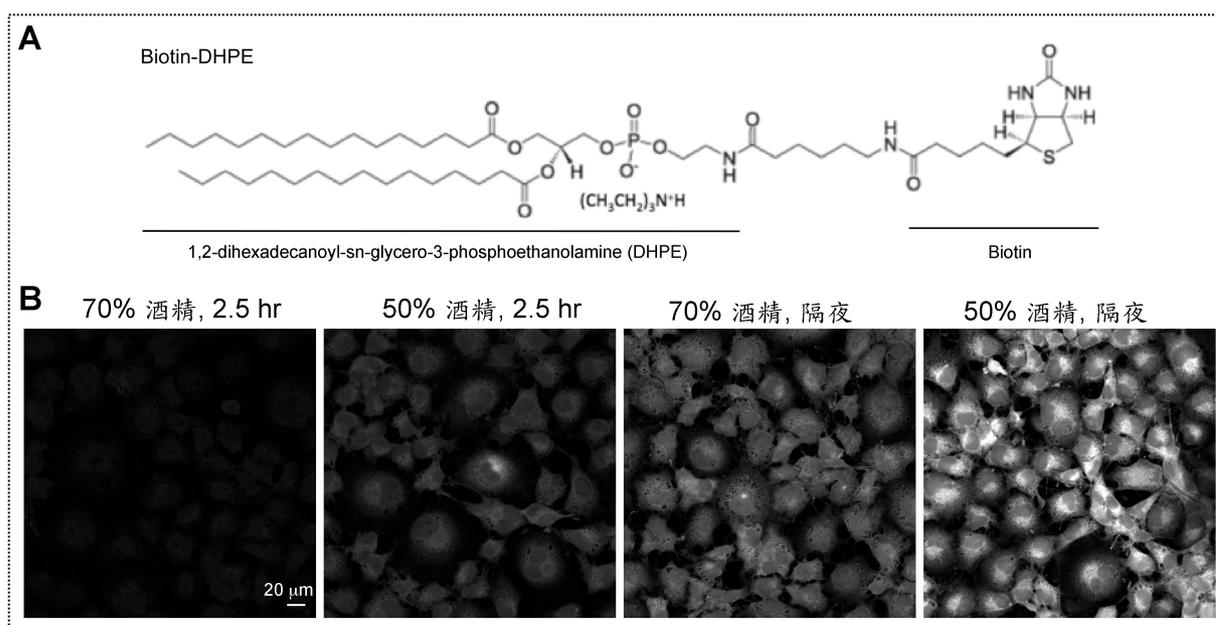


圖十三、以層光螢光顯微鏡（王月廷, 2022B）分析擴展後的細胞樣品。(A)-(C) 均為將 3D 影像投射為 2D 影像的結果。(A)-(B) 顯示 DNA 和內質網的分布情形。(C)顯示粘連的姊妹染色體。括號所示是幾個清楚的例証。(D) 兩個單層的內質網影像，和 A 圖來自同一細胞樣品。一個是較靠近細胞核，另一是較遠離細胞核，清楚顯現內質網構造。

九、細胞內脂質分佈的觀察

成功改善免疫染色之後，接著運用酪氨酸胺訊號放大技術和胰蛋白酶水解於脂質染色。先前研究曾直接將螢光分子標記在細胞的脂質分子上，但需要使用代謝標定的方法，步驟較多，脂質分子也容易在處理過程中流失(White et al., 2022)。我們改善的方法是使用 1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DHPE)，它帶有兩個 16 個碳的長鏈(圖十四 A)，可以插入生物膜。所以我利用生物素-DHPE(圖十四 A)來標定細胞內的含脂質結構，細胞膜、內質網、核膜應該都可以被生物素-DHPE 標定。再結合 ABC 酪氨酸胺訊號放大技術(圖三 C)，可以將螢光標定的酪氨酸胺交連在生物素-DHPE 週圍的蛋白分子上，藉此間接標定出脂膜或脂質的位置。

先測試十二組脂質染色條件，分別是溶劑、染色時間、和濃度三個變因的排列組合。首先，因為生物素-DHPE 的脂溶性特點，所以廠商建議用氯仿溶解，但是氯仿不適用於細胞染色，需稀釋於酒精。所以，第一個變因是酒精濃度。我們測試 70%和 50%酒精兩種條件。再者是反應時間，比較反應 2.5 小時和隔夜兩個條件。最後是生物素-DHPE 的濃度，測試 0.1, 0.01, 0.001 mg/ml 三個條件。結果發現 0.01 和 0.001mg/ml 生物素-DHPE 的訊號太弱，完全不適合進行凝膠擴展。而所剩四組(0.1 mg/ml)中，很明顯地，讓生物素-DHPE 和細胞作用隔夜有效提升訊號(圖十四 B)。而若比較 50%和 70%酒精溶液，則前者有較好的標定效果(圖十四 B)。所以我選用 50%酒精染隔夜的樣本，進行更進一步的胰蛋白酶水解、擴展和觀察。



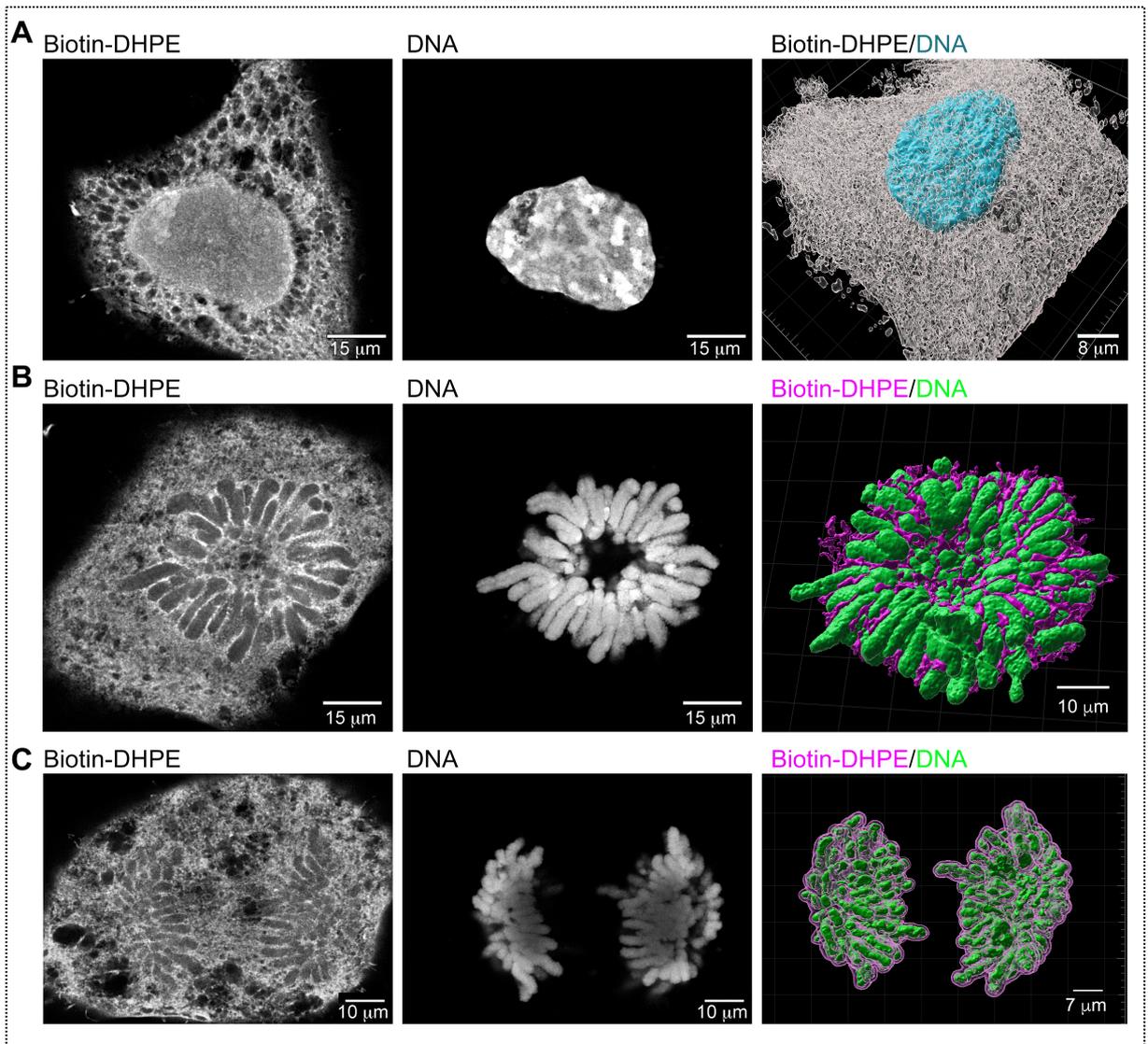
圖十四、生物素-DHPE 標定的結果。(A) 生物素-DHPE 的化學結構式。(B) 生物素-DHPE 標定的測試結果。運用 ABC 酪氨酸胺訊號放大技術來放大螢光訊號。本圖所有

樣本均是處理 0.1 mg/ml 生物素-DHPE，在擴展前用共軛焦顯微鏡觀察。以相同的雷射強度及條件截取單層焦平面的影像。若增加雷射強度，70% EtOH, 2.5 hr 那組也可以看到訊號，只是 50% EtOH, overnight 那組就會過曝。

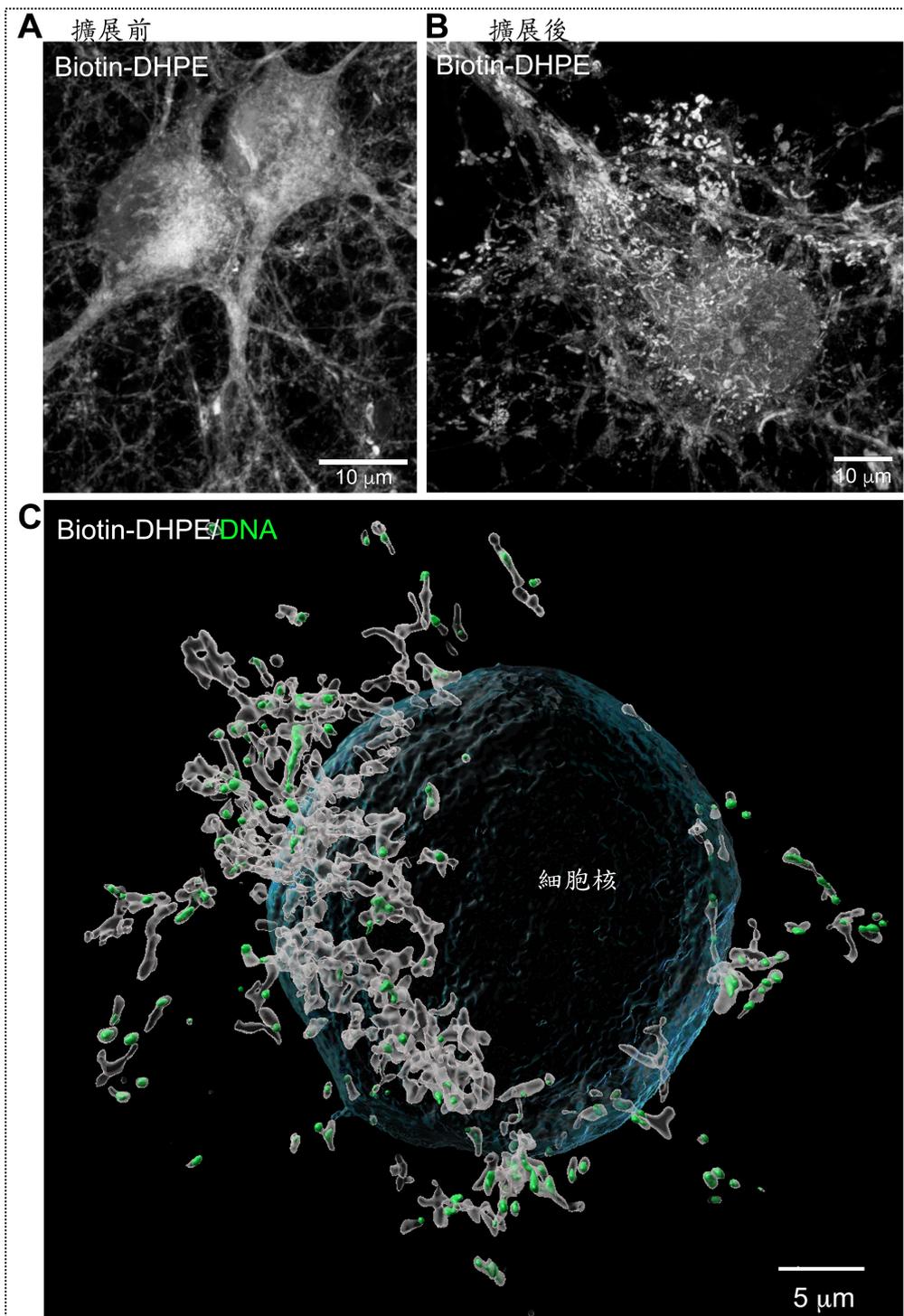
生物素-DHPE 染色效果非常好，整個細胞的脂膜構造均可被染上螢光(圖十五 A)。以共軛焦顯微鏡觀察擴展後的細胞，在單層焦平面的影像中，清楚看到生物素-DHPE 可標定內質網、核膜、甚至細胞核內部(圖十五 A，左邊和中間)。三維立體模擬影像也顯現整個細胞複雜的膜狀結構(圖十五 A 右邊)。我們也觀察到分裂中的細胞，如圖十五 B 和十五 C 分別是在細胞分裂前中期和後期的細胞。哺乳類細胞分裂時，核膜會暫時裂解開來。此時可以觀察到棒狀染色體週邊有緻密的脂質構造(圖十五 A、B 右邊)。雖然不知這些脂質構造的來源，但它們聚集在染色體間的接觸面，推測可能的功能是分隔染色體，以利染色體分離。

我也觀察不再進行細胞分裂的神經細胞。與 COS-7 細胞一樣，生物素-DHPE 可以成功染上神經細胞(圖十六 A)。擴展後影像更清楚，可以看到細胞質內的許多短細棒狀結構(圖十六 B)。因為共染 DNA 染劑 PicoGreen，我注意到這些短細棒狀結構常有點狀 DNA 訊號，推測可能是粒線體。為進一步確認，接著運用 Imaris 來分析影像，可以清楚看到細胞質內的點狀 DNA 會被短細棒狀脂質結構包圍，而這些短細棒狀結構寬約 0.5-1 微米(圖十六 C)。根據這些特徵，這些結構應該是神經細胞的粒線體。

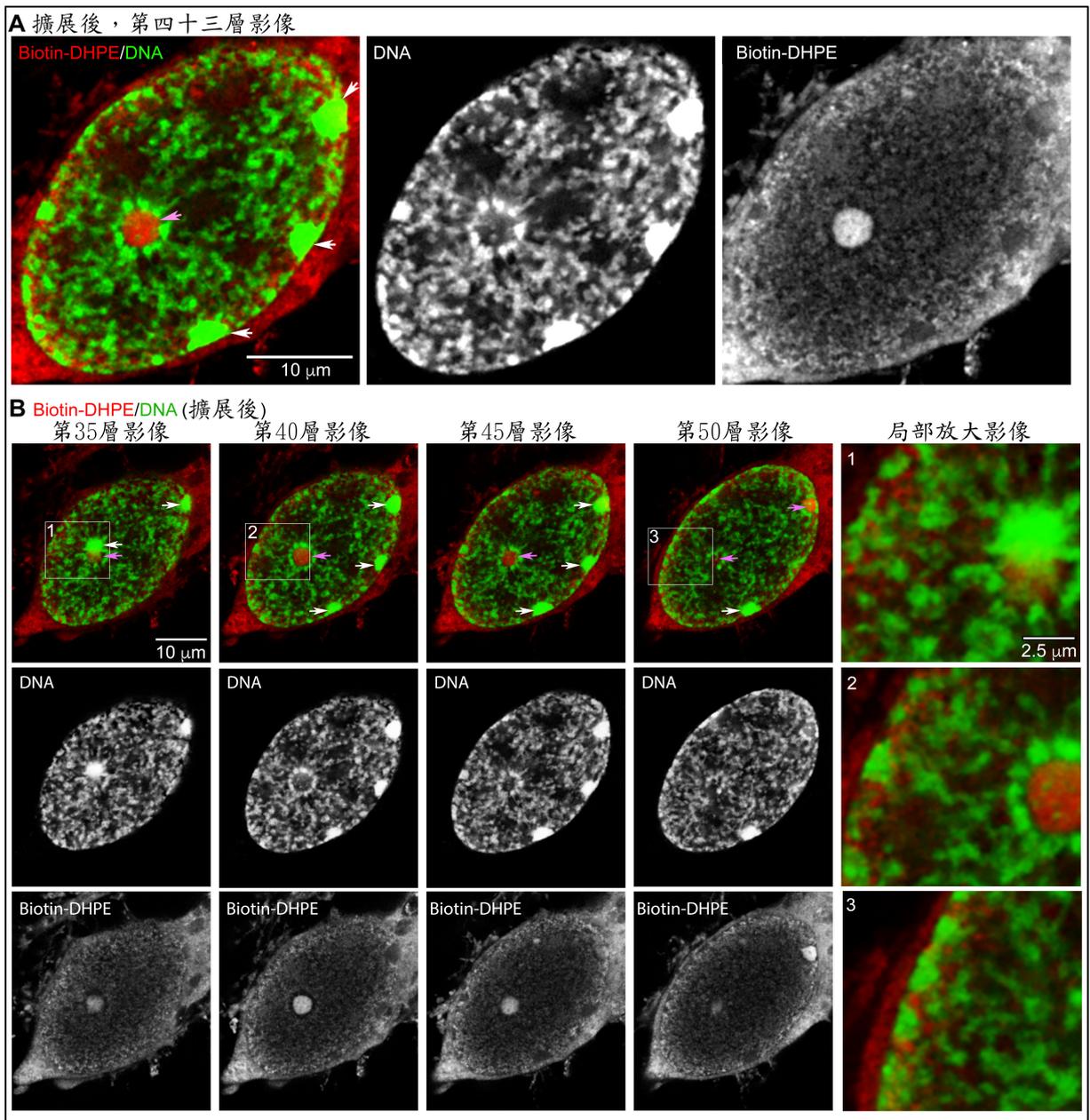
在神經細胞的細胞核，我注意到生物素-DHPE 可以標定到濃密的球形脂質結構，擴展後直徑大小可達 3-4 微米(圖十七 A, B, 粉紅色箭號所指)。這樣的球狀物質常與大塊的染色體聚集結構相鄰(圖十七 A, B, 白色箭號所指)，可能和染色體 3D 立體分佈的調控或基因表現有關，值得日後進一步研究。



圖十五、生物素-DHPE 脂質染色突顯整個 COS-7 細胞複雜的含脂質結構。(A) 間期細胞。(B) 前中期細胞。(C) 後期細胞。染色和擴展後的細胞以共軛焦顯微鏡 LSM980/AiryScan2 觀察。左、中兩圖為單層影像；右圖是 3D 影像並以 Imaris 處理，(A) 著重在細胞質，可見複雜的膜狀構造；(B)、(C) 則只著重於染色體的部分，可見脂質構造貼附在染色體間（標示為紫紅色）。



圖十六、神經細胞脂質染色的結果。(A) 擴展前。(B) 擴展後。(C) 擴展後的影像以Imaris處理。上述均為3D影像進行Z軸投射為2D的結果，以便呈現。在(C)，同時去除非粒線體的訊號，以突顯粒線體及其DNA的影像。



圖十七、生物素-DHPE 脂質染色顯現神經細胞核內的球形脂質結構。擴展後的神經細胞樣本以共軛焦顯微鏡 LSM980/Airyscan2 觀察 Z 軸連續影像，本圖所示均為單層影像，在連續影像中的片數標示於圖中。粉紅色箭號指生物素-DHPE 所染的球狀物質，而白色箭號指染色體聚集的結構。(A) 第 43 層影像。(B) 第 35、40、45、50 層影像。

陸、討論

一、訊號微弱：以酪氨醯胺訊號放大改進

本研究結合酪氨醯胺訊號放大技術來放大螢光訊號。基本原理是藉由過氧化酶的催化，將帶有螢光的酪氨醯胺鍵結在過氧化酶周圍的酪胺酸支鏈上，利用這樣的酵素反應可以大幅增加螢光訊號（圖三）。如本研究中的生物素-DHPE 相關方法，我們可以結合

酪氨酸胺訊號放大技術以及生物素和抗生物素蛋白(biotin-avidin)，可放大訊號數百至一千倍。對生物膜這樣大範圍染色很有幫助，也可以考慮用於「十倍擴展顯微鏡技術」。然而，需注意的是，當訊號高度放大後，螢光所標定的位置是否與原始抗原相同，是否容易有位差產生？如何克服這個問題？這是在使用酪氨酸胺訊號放大技術該注意的問題。

二、使用受質專一性低的蛋白酶 K：以胰蛋白酶取代

表二和研究結果的第三點已清楚比較和討論蛋白酶 K 和胰蛋白酶的差異和優缺點。簡而言之，蛋白酶 K 活性強，平均切點約佔整個蛋白質分子胺基酸總量的二分之一。在離散劑的協助下，可以有效地水解蛋白質分子，可能因此切斷大部分結合螢光染劑的肽鏈，大幅降低螢光訊號強度。對胰蛋白酶而言，其水解反應不添加離散劑，預期只能切位於蛋白質分子表面的切點。再加上平均切點只佔蛋白質分子胺基酸總量的九分之一，和蛋白酶 K 相比明顯可以保留較多的螢光訊號。

而我們實際的結果也証實我們的推論。單層的 COS7 細胞中，不論是粒線體、還是內質網的螢光訊號，在蛋白酶 K 的處理後，訊號往往太弱不易觀察。若改為胰蛋白酶作用兩個小時，則效果非常良好，每次實驗都可以看到非常清楚的螢光訊號，在不同次的實驗裡，均可重複實驗結果。所以針對單層細胞而言，胰蛋白酶的使用可以是一項很好的改善方法，增強擴展顯微鏡技術的訊號。

先前擴展顯微鏡技術使用蛋白酶 K 來水解組織或細胞(Chen et al., 2015; Truckenbrodt et al., 2019)。本研究只使單層細胞，尚未測試胰蛋白酶對組織的效果，這是未來值得測試的實驗。除了胰蛋白酶，我們也尚未測試其他蛋白質水解酶。另外，在本研究中，COX5B 在胰蛋白酶水解後，其訊號流失的似乎比 PDI 多，可能因為不同蛋白質胺基酸序列不同，對水解酶的反應可能不同。這些都是實作時需注意的地方。

三、成功觀察到各種細胞微細結構

(一) 粒線體和粒線體 DNA 的觀察

因為四倍擴展，20 倍物鏡已經相當是一般顯微技術的 80 倍鏡。再增強螢光訊號後，許多微細結構可以在不論是內質網的網狀結構、細胞間期的核內 DNA、或是粒線體內的 mtDNA 都清楚的觀察到，不需依賴造價太昂貴的超解析顯微鏡。原本以 PicoGreen 後染 DNA 的目的是為了標定細胞核，意外的觀察到核外的 mtDNA。因

為 mtDNA 很小，一般無法在 20 倍物鏡下觀察，本研究提供一個相對簡單的系統，可以方便觀察粒線體內的 mtDNA。

(二) 染色體的擴展

細胞分裂時期的染色體是由 DNA 和許多蛋白質分子纏繞在一起的結構，是一個高度有序的緊實結構。在胰蛋白酶的處理下，一樣也可以等比例的擴展開來(圖十二、十三、十四、十五)。不但可以看到單獨的姐妹染色體，也可以看到粘連在一起的姐妹染色體。這表示我們的處理方式可以保留染色體的整體架構不變，並且能等比例的擴展開來。這是一個很好的系統，可用來研究染色體和蛋白質的交互作用，甚至觀察在特定蛋白質分子缺失或突變的情形下，染色體結構是否產生異常。

(三) 脂質染色

脂膜染色是生物大分子染色發展最慢的領域。在本論文中，我們成功的運用生物素-DHPE 來標定細胞膜狀結構，可以清楚觀察到細胞膜、內質網、核膜，是一大突破。我們發現以 50% EtOH 來稀釋生物素-DHPE 可以達到最好的染色效果。實際上，在免疫染色的實驗中，50% EtOH 常被用於穿膜處理(permeabilization)(詳見 Leica 公司的建議實驗步驟)。推論這種情況下，酒精大概有最佳的狀態和細胞膜的脂質作用，所以染色效果最好。

結合 PicoGreen 後染 DNA，我們還觀察到兩個有趣的現象。首先，細胞核也是充滿脂質的結構，DNA 聚集處脂質較少，但旁邊常有脂質特別濃密的球狀構造。另外，在分裂中的細胞，棒狀染色體之間也有特別濃密的脂質，推測功能是在分隔染色體。這些都值得運用其他標定物進一步確認。本論文提供了方法來觀察這些脂質構造，有利以後的研究。

柒、結論

本研究的主要貢獻是利用酪氨醯胺訊號放大技術增強螢光訊號，搭配胰蛋白酶來保留較多的訊號，建立 TT-ExM，用以優化擴展顯微鏡技術。以單層 COS-7 和神經細胞為材料，觀察蛋白質分子的分佈，並標定脂質和脂膜在細胞內的分佈。我們運用共軛焦顯微鏡和層光顯微鏡截取單層焦平面和三維立體的影像，確認擴展後的影像品質。脂質分佈、染色體的結構、和粒線體 DNA 的觀察，更強化我們這套改良後系統的可信度和未來運用的可能性。

捌、參考資料

- 曾小東、安毓英(2004)。光學感測與測量。五南圖書出版公司。
- 楊永盛、楊慶宗(1975)。電子顯微鏡原理與應用。文京圖書。
- Chen, F., Tillberg, P. W., & Boyden, E. S. (2015). Optical imaging. Expansion microscopy. *Science*, 347, 543-548.
- Truckenbrodt, S., Maidorn, M., Crzan, D., Wildhagen, H., Kabatas, S., & Rizzoli, S.O. (2018). X10 expansion microscopy enables 25-nm resolution on conventional microscopes. *EMBO Reports* 19, e45836.
- Truckenbrodt, S., Sommer, C., Rizzoli, S.O., & Danzl, J.G. (2019). A practical guide to optimization in X10 expansion microscopy. *Nat Protocol*, 14, 832-863.
- Büttner, M., Lagerholm, C.B., Waithe, D., Galiani, S., Schliebs, W., Erdmann, R., Eggeling, C., & Reglinski, K. (2021). Challenges of Using Expansion Microscopy for Super-resolved Imaging of Cellular Organelles. *Chembiochem*, 22, 686-693.
- Yu, C.J., Barry, N.C., Wassie, A.T., Sinha, A., Bhattacharya, A., Asano, S., Zhang, C., Chen, F., Hobert, O., Goodman, M.B., Haspel, G., Boyden, E.S. (2020) Expansion microscopy in *C. elegans*. *eLife* 9:e46249.
- https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0011821_Pierce_Trypsin_Protease_MS_Grade_UG.pdf
- Watabe, S., Sakamoto, Y., Morikawa, M., Okada, R., Miura, T., & Ito, E. (2011) Highly sensitive determination of hydrogen peroxide and glucose by fluorescence correlation spectroscopy. *PLoS One* 6, 222955.
- https://resources.perkinelmer.com/lab-solutions/resources/docs/BRO_tsasignalamplificationsystems.pdf
- Wilson, K., & Walker, J. (2005). Principles and techniques of biochemistry and molecular biology (6th ed.). Cambridge University Press.
- 王月廷 (2022A) 擴展顯微鏡技術的水凝膠化學。中華民國全國高級中等學校小論文寫作比賽第 1110315 梯次。
- 王月廷 (2022B) 層光螢光顯微鏡技術的簡介、拆解與組裝。中華民國全國高級中等學校小論文寫作比賽第 11101015 梯次。
- <http://www.nimbios.org/%7Egross/bioed/webmodules/aminoacid.htm>
- Lehmann, J. (2018) Genetic Code Degeneracy and Amino Acid Frequency in Proteomes. In Biodiversity and Evolution. Edited by Grandcolas, P. and Maurel, M.-C. Published by Elsevier.
- White, B.M., Kumar, P., Conwell, A.N., Wu, K., Baskin, J.M. (2022) Lipid expansion microscopy. *J Am Chem Soc* 144: 18212-18217.

【評語】 052414

傳統擴展顯微技術(expansion microscopy 通過嵌入超膨脹凝膠材料，將生物樣本膨脹，以利光學顯微鏡觀察)會因膨潤稀釋而降低螢光訊號。本作品採用新的蛋白水解酶(胰蛋白酶)，可去除干擾螢光的雜訊，提升觀測品質。實驗內容之描述略嫌簡要；所觀察的樣品不多，且未與對照組相比較，以顯現其優點。本研究所使用製程設備與分析儀器先進昂貴，應屬大學以上之研究機構才能進行相關製作與量測試驗；相關研究論文已投稿專業期刊審查中，但無法判定參展者之貢獻。

作品海報

新創多功能擴展顯微鏡技術

摘要

擴展顯微鏡技術(Expansion Microscopy, ExM)是以高分子化學與物理化學原理放大生物樣品的體積，相對地提高光學顯微鏡的解析度。目前使用的方法，對於標定細胞膜、胞器膜與脂質尚有改善的空間，且採用受質專一性低的蛋白酶K，易導致免疫螢光染色法的訊號流失。為改善上述缺點，本研究先用酪氨酸胺訊號放大技術增加螢光強度，再用受質專一性高的胰蛋白酶減少螢光訊號流失。因新方法使用酪氨酸胺和胰蛋白酶，簡稱為TT-ExM。實驗結果顯示此方法可更清楚標定細胞內多種生物大分子，如蛋白質及脂質，也適用於DNA染色。利用共軛焦顯微鏡即可進行超高分解度觀察細胞微細結構。本研究論文已經美國化學學會專業期刊ACS Nano初審，並完成修改，送回ACS Nano複審中。

壹、研究動機及目的

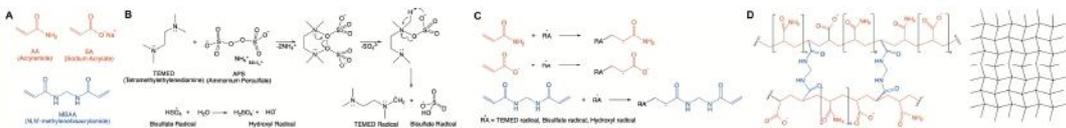
因光學繞射極限的限制，一般光學顯微鏡距離無法分辨距離小於200奈米的兩個物體。擴展顯微鏡技術克服光學極限的方法不是架設新式顯微鏡，而是先將生物樣品固定於水凝膠聚合物中，利用水凝膠吸水膨脹的原理，等比例擴展生物樣品，間接提高光學解析度，理論上可將解析度推進到奈米等級。

本研究重點在學習尖端的擴展顯微鏡術的基本原理、實際操作，改善目前廣為使用擴展顯微鏡方法的三項缺點：

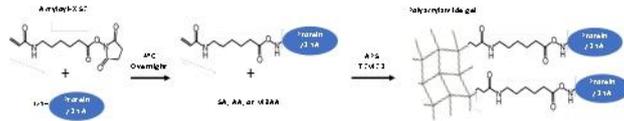
- 一、螢光訊號因體積膨脹而被稀釋減弱。
- 二、使用受質專一性低的蛋白酶K，造成螢光訊號流失。
- 三、不易於觀察細胞微細結構，如各種微細胞器、脂膜和脂球結構，染色體與粒線體DNA。

貳、材料與方法

一、水凝膠化學聚合反應

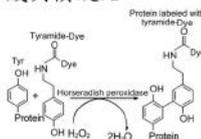


二、交聯反應



三、酪氨酸胺訊號放大(Tyramide Signal Amplification, TSA)技術原理

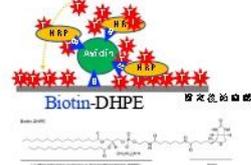
A. HRP催化酪氨酸胺和酪胺酸形成共價鍵結



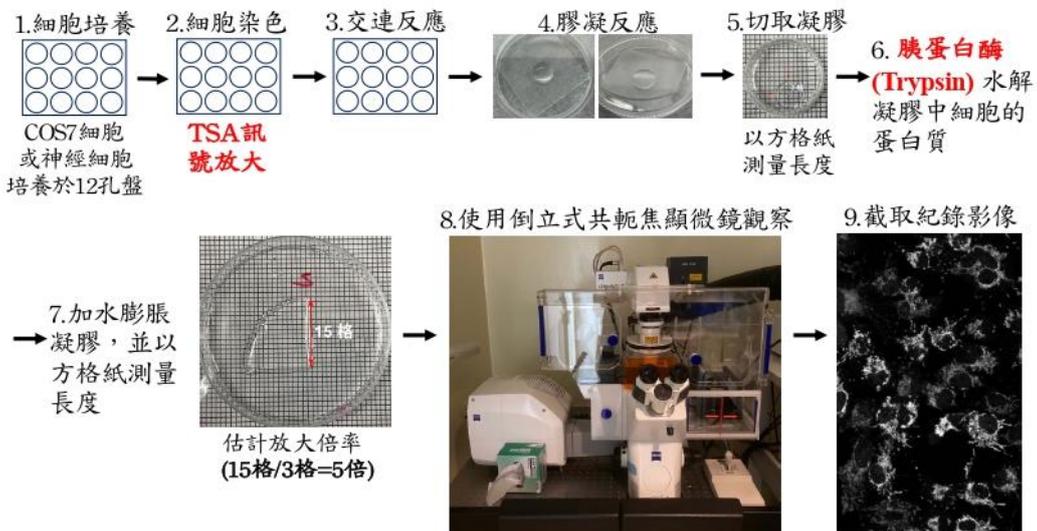
B. 運用於免疫染色



C. 運用於脂質染色

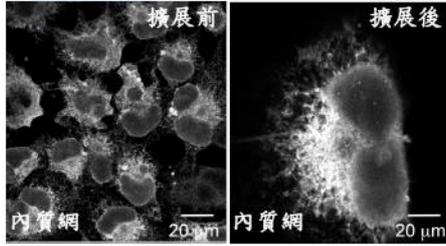


參、實驗流程

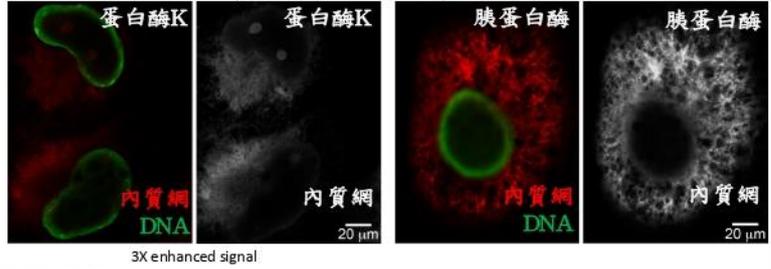


肆、實驗結果

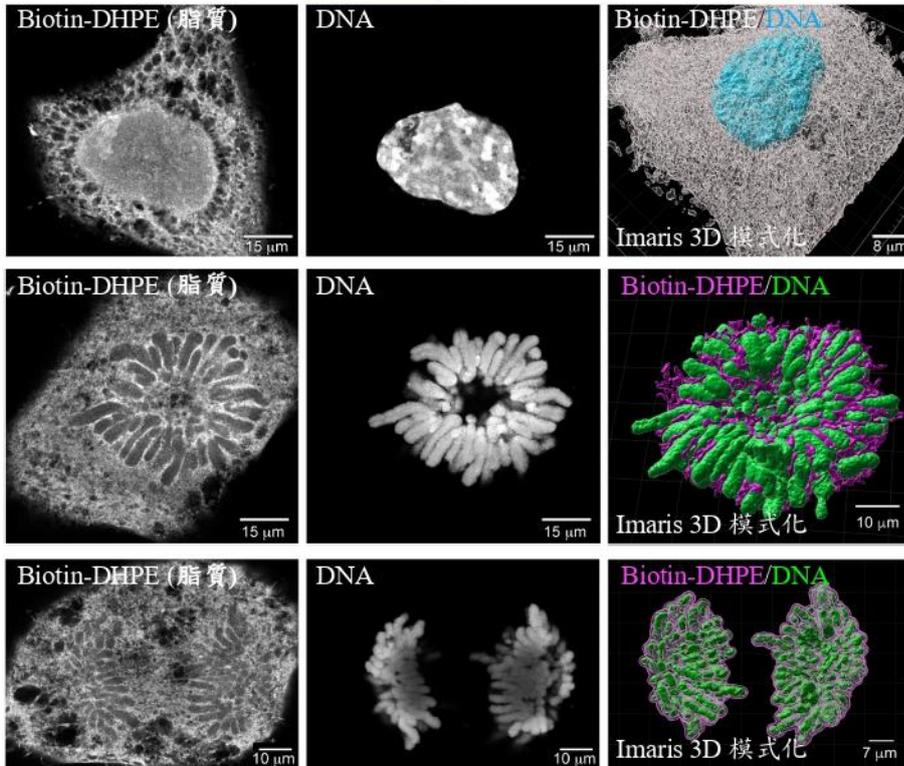
圖一、COS7(非洲綠猴腎細胞) 擴展前後比較:免疫染色的結果



圖二、以蛋白酶K和胰蛋白酶水解COS7細胞擴展後之比較: 內質網/DNA免疫染色的結果



圖三、COS7細胞擴展後脂質/DNA染色的結果



3-1. 細胞週期間期

TSA放大脂質訊號，可以清楚標定整個細胞內的脂膜和細胞核內脂質

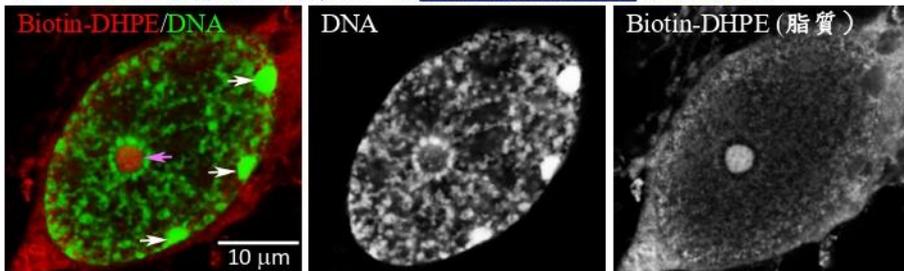
3-2. 細胞分裂前中期

首次發現濃縮後成對的姐妹染色體周邊有濃密脂類物質

3-3. 細胞分裂後期

不論是前中期或後期，染色體可均勻的隨著細胞質擴展，證明胰蛋白酶處理的效能

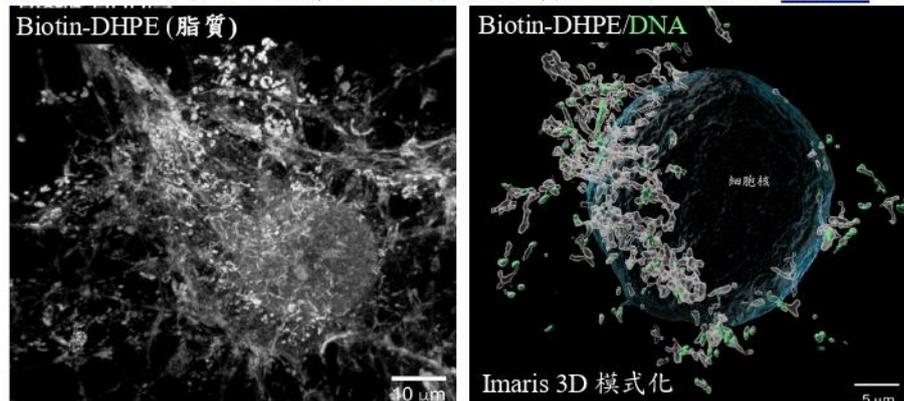
圖四、初始培養的小鼠神經細胞擴展後脂質/DNA染色的結果



神經細胞細胞核

擴展後神經細胞核內染色質亦可自然擴展，顯露微細絲狀結構和聚集於核仁的結構。TSA脂質染色突顯核仁的脂質構造

圖五、初始培養的小鼠神經細胞擴展後脂質/DNA染色可突顯粒線體結構

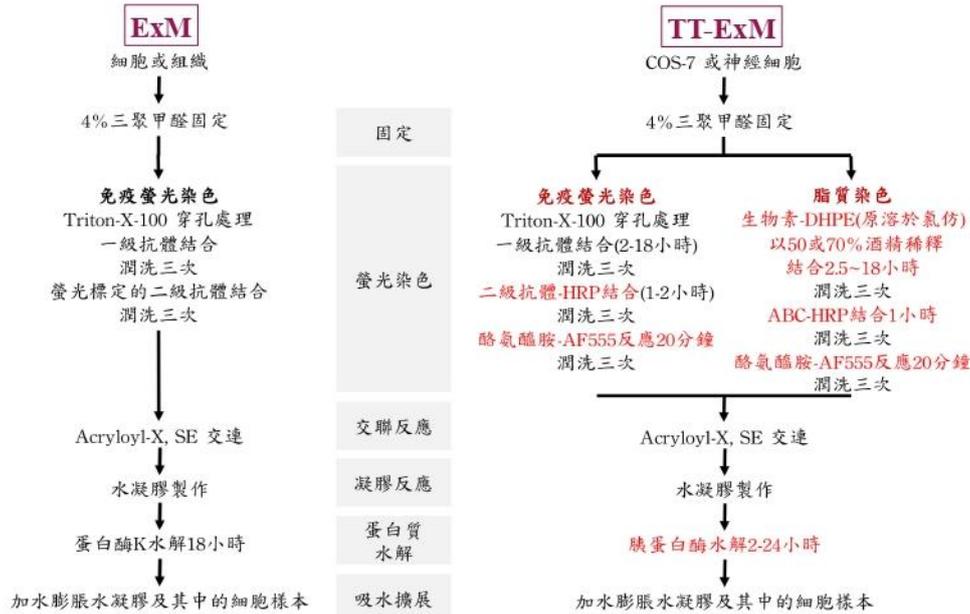


神經細胞粒線體

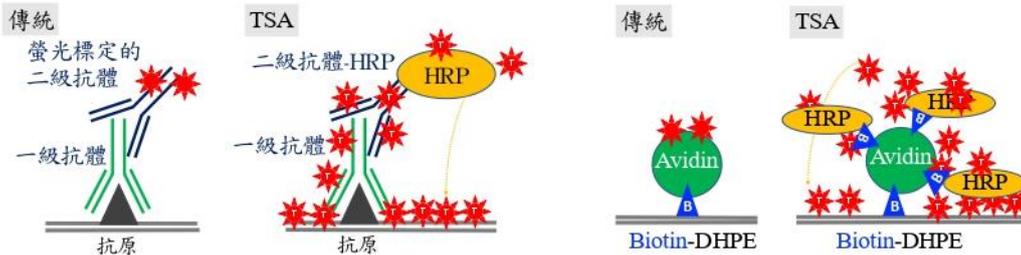
擴展後神經細胞細胞質內可觀察到許多點狀DNA被粗條狀的膜狀結構包裹。依據這些結構的大小和特質，推測為神經細胞的粒線體

伍、討論

一、ExM和TT-ExM方法的比較



二、傳統染色和TSA訊號放大之比較



三、蛋白酶K和胰蛋白酶的比較

	蛋白酶K	胰蛋白酶 (eLife 9e46249, 2020)	胰蛋白酶 (本研究)
蛋白酶濃度	8 units/ml	0.1~1 mg/mL	0.15 mg/mL (0.015%)
水解緩衝液主要成份及濃度	Tris, pH8.0, 50mM; EDTA, 1mM; Triton-X-100, 0.5%; Guanidine HCl, 0.8M	Tris, pH8.0, 50mM; NaCl, 0.5M; CaCl ₂ , 40mM	Tris, pH 8.0, 35mM; NaCl, 41.4mM; EDTA, 1mM; Triton-X-100, 0.35%
切割位點	白胺酸(7.6%)、丙胺酸(7.4%)、纈胺酸(6.8%)、異白胺酸(3.8%)、甘胺酸(7.4%) 苯丙胺酸(4%)、脯胺酸(5%)、色胺酸(1.3%)、酪胺酸(3.3%)	賴胺酸(7.2%)、精胺酸(4.2%)	*高濃度的鹽份(>100 mM NaCl)會抑制胰蛋白酶的活性 **胺基酸後面括弧內所示之百分比, 是脊椎動物各胺基酸的平均使用頻率
預測總切割頻率	46.6%	11.4%	

陸、結論

成功地改善舊有系統的三項缺點，分述如下：

- 一、螢光訊號因體積膨脹而被稀釋：以酪氨酸胺訊號放大技術克服。此技術的關鍵是引入過氧化酶，將帶有螢光分子的酪氨酸胺共價鍵結在所標定的位置。
- 二、使用專一性低的蛋白酶K：以胰蛋白酶取代。細胞樣本在胰蛋白酶水解後，仍然可以均勻地隨著水凝膠吸水膨脹而擴展，並保留較多的螢光訊號在細胞樣本內。
- 三、不利於觀察細胞微細結構全貌：因為上述的改變，TT-ExM可以清楚地觀察到整個細胞的許多微細結構。在20倍或40倍一般物鏡下即可以高解析度地觀察內質網、粒線體、整個細胞的膜狀結構、染色體、和核外粒線體的mtDNA。

結論：本研究的主要貢獻是運用酪氨酸胺訊號放大技術和胰蛋白酶水解，優化擴展顯微鏡技術，建立TT-ExM，高解析地觀察細胞內微細結構，強化這套改良後系統的可信度和運用的可能性。

參考資料

1. Chen, F.; Tillberg, P. W.; Boyden, E. S. Expansion microscopy. *Science* 2015, 347, 543-548.
2. https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0011821_Pierce_Trypsin_Protease_MS_Grade_UG.pdf
3. Expansion microscopy with trypsin digestion and tyramide signal amplification (TT-ExM) for protein and lipid staining. *bioRxiv* 2023, <https://doi.org/10.1101/2023.03.20.533392>.