



膨胀显微成像技术的原理及应用*

杨振宇^{1,2)} 关 森³⁾ 孙正龙^{1,2)**}⁽¹⁾ 昆明理工大学省部共建非人灵长类生物医学国家重点实验室, 昆明 650500; ⁽²⁾ 云南省灵长类生物医学重点实验室, 昆明 650500;⁽³⁾ 昆明理工大学生命科学与技术学院, 昆明 650500)

摘要 膨胀显微成像技术 (expansion microscopy, ExM) 是一种新型超分辨成像技术。该技术借助可膨胀水凝胶均匀地物理放大生物样本, 在常规光学成像条件下实现超分辨成像。ExM 适用于细胞、组织切片等多种类型生物样本。蛋白质、核酸、脂质等生物大分子均可借助 ExM 进行超分辨成像。ExM 可与共聚焦显微镜、光片显微镜、超高分辨显微镜联合使用, 进一步提高成像分辨率。近年来, 多种从基础 ExM 拓展而来的衍生技术进一步促进了该技术的实际应用。本文综述了 ExM 及其衍生技术的基本原理、ExM 与不同成像技术联用的研究进展及 ExM 在不同类型生物样本中的应用进展, 并对 ExM 技术的发展前景做出展望。

关键词 膨胀显微成像技术, 水凝胶, 超分辨成像, 亚显微结构成像

中图分类号 Q247, TH742

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0225

光学显微镜在生物医学研究中发挥着重要作用, 但由于光学衍射极限的存在, 普通光学显微镜无法解析空间距离小于 200 nm 的超微结构。近年来, 成功研发出了多种可突破光学衍射极限的商业化超高分辨成像技术, 如结构光照明显微术 (structured illumination microscopy, SIM)、受激发射损耗显微术 (stimulated emission depletion microscopy, STED) 和单分子定位显微术 (single molecule localization microscopy, SMLM)^[1-5]。商业化的超分辨技术虽能打破光学衍射极限, 但仍存在诸多技术缺陷, 如: SIM 过度依赖计算机算法处理, 易导致图像出现伪影^[6]; STED 的光漂白和光毒性较强, 且样本需特殊荧光染料处理^[4]; SMLM 制样复杂, 时间分辨率较低^[7]。商业超分辨显微镜的技术缺陷, 限制了其在生物医学领域的应用。

近年发明的一种便捷、温和且普适性较高的超分辨成像技术——膨胀显微成像技术 (expansion microscopy, ExM)^[8-9], 可避免商业超分辨显微镜的算法处理依赖性、光毒性强、制样复杂等技术缺陷。ExM 通过将贴壁细胞或组织切片包埋进聚电解质水凝胶中, 经水凝胶的吸水膨胀, 在物理尺度上各向均一地放大样本, 从而使样本在常规光学成

像条件下实现 60~70 nm 的 xy 方向分辨率^[8]。膨胀后样本透明度提高, 且凝胶折射率与水相近, 可有效减少激发光在生物样本中的多重散射, 提升深层次轴向成像效果。ExM 无需使用特殊荧光染料, 膨胀后的样本适用于大多数显微成像设备。此外, ExM 能够实现四色以上的多色超分辨成像, 可突破 STED、SMLM 等超分辨技术难以实现多色成像的技术障碍^[10]。近年来, 蛋白质保留膨胀显微成像技术 (protein retention expansion microscopy, proExM)^[11]、放大分析蛋白质组技术 (magnified analysis of the proteome, MAP)^[12]、迭代膨胀显微成像技术 (iterative expansion microscopy, iExM)^[13]、冷冻固定膨胀显微成像技术 (cryo-expansion microscopy, Cryo-ExM)^[14]、膨胀荧光原位杂交技术 (expansion fluorescent *in situ* hybridization, ExFISH)^[15] 和膨胀病理学技术 (expansion pathology, ExPath)^[16] 等多种基于基础

* 云南省自然科学基金 (202001BC070001, 202102AA100053) 资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 13584804523, E-mail: sunzl@lpbr.cn

收稿日期: 2022-05-18, 接受日期: 2022-07-29

ExM的改良技术方案被相继创立。该类技术也可广泛与共聚焦成像技术、光片成像技术和超高分辨成像技术联用，在多种类型生物样本成像中均能够获得优质的超分辨成像效果（表1）。本文就基础

ExM技术及其改良技术方案的原理，ExM与不同成像技术联用的研究进展和ExM在不同生物样本中的应用，以及ExM技术的未来展望等方面做出综述。

Table 1 The improvement of resolution in various imaging equipment combining with ExM
表1 ExM对各成像设备分辨率的提升

设备名称	设备类型	联用前分辨率/nm	联用后分辨率/nm
共聚焦显微镜 [8, 17]	衍射限制显微镜	220	70
光片显微镜 [18]	衍射限制显微镜	350	95
结构光照明显微镜 [19]	超分辨显微镜	100	30
受激发射损耗显微镜 [20]	超分辨显微镜	40	10
单分子定位显微镜 [21]	超分辨显微镜	20	10

1 ExM的基本原理

基础ExM由麻省理工Boyden实验室于2015年发明 [8]。该技术借助聚合电解质凝胶吸水后体积膨胀的性质，使包埋在凝胶内的生物样本在物理尺寸上被放大，导致标记样本荧光分子的物理空间距离扩大，在常规成像条件下实现超分辨成像 [22]。该方案主要分为以下步骤（图1）：a. 经化学固定后的生物样本，与特异性一抗以及连接有寡核苷酸的

链的二抗偶联；b. 两端分别连接有甲基丙烯酰基和化学发光基团的寡核苷酸链作为锚定分子，与二抗上的另一条链互补配对，荧光标签被靶向标记到特异性生物分子上，并在后续过程中经甲基丙烯酰基的自由基聚合反应被锚定在凝胶网络中；c. 标记后的生物样本被浸没在丙烯酸钠、丙烯酰胺和甲叉双丙烯酰胺组成的单体溶液中，加入促凝剂四甲基乙二胺和引发剂过硫酸铵后，单体分子与促凝剂连同锚定分子发生自由基聚合反应，形成凝胶-样本复

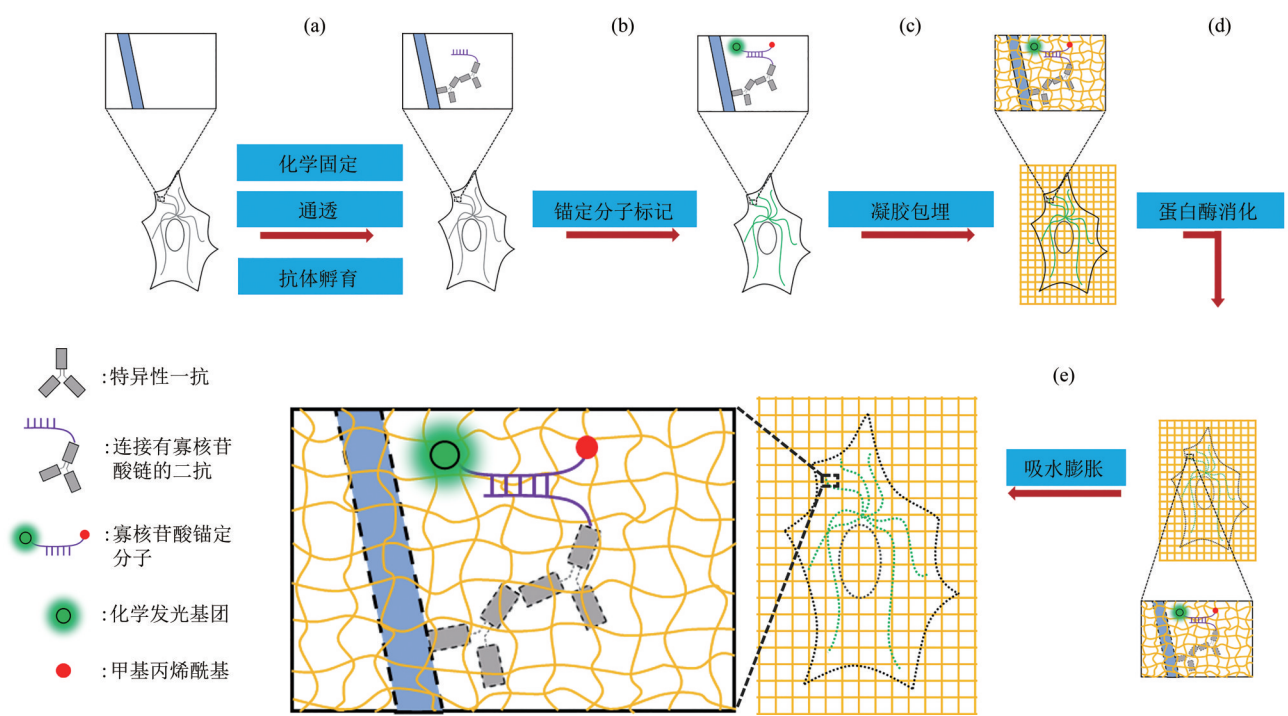


Fig. 1 Experimental steps of the basic ExM

图1 基础ExM的实验流程

(a) 生物样本经化学试剂固定和通透，并与抗体偶联；(b) 锚定分子标记特异性生物分子；(c) 多聚电解质凝胶包埋生物样本，形成凝胶-样本复合物；(d) 蛋白酶消化生物样本，凝胶-样本复合物的力学性能更为均一；(e) 凝胶-样本复合物吸水膨胀。

合物; d. 在蛋白酶K的作用下, 样本蛋白质分子的内源性相互作用被破坏, 复合物的力学性能更为均一; e. 凝胶-样本复合物吸水膨胀, 荧光信号分子在锚定分子的作用下, 随着水凝胶网络的展开而相互分离。该方案中, 凝胶-样本复合物吸水后可实现4.5倍的线性膨胀, 且膨胀后样本成像的长度误差小于1%, 可在共聚焦显微镜下实现横向~70 nm, 纵向~200 nm的成像分辨率。

2 ExM衍生技术

基础 ExM 虽能提高成像分辨率, 但在该方案

中, 由于寡核苷酸锚定分子结构复杂, 制备困难, 且该分子无法将生物内源性蛋白质或其他生物大分子直接锚定在凝胶上, 因此该方案的应用范围受到限制。为了优化 ExM 实验流程, 拓展 ExM 应用范围, 并对样本膨胀倍数做出提升, 诸如 proExM、ExFISH 和 iExM 等改良技术方案相继被发明^[11, 13, 15]。不同 ExM 改良技术的发明, 使得该类技术能够更便捷地应用于不同类型生物分子, 获得分辨率更高、信号保真度更好的超分辨成像效果 (表2)。

Table 2 Characteristics of ExM derivative technology
表2 ExM衍生技术特点比较

技术名称	成像分子	膨胀倍数	关键改进	技术特点
proExM ^[11]	蛋白质分子	4.5倍	使用AcX作为交联分子	制样便捷, 并适用于内源性荧光蛋白成像
MAP ^[12]	蛋白质分子	~4倍	改变凝胶单体配方	适用于大尺寸生物样本成像
iExM ^[13]	蛋白质分子	16~22倍	改变凝胶单体配方及成胶实验流程	膨胀倍数增大, 成像分辨率提高
Cryo-ExM ^[14]	蛋白质分子	4~4.5倍	使用冷冻固定方法固定生物样本	高保真成像亚细胞结构
ExFISH ^[15]	RNA	~4倍	使用锚定分子Label X锚定RNA	适用于RNA分子成像
Click-ExM ^[23]	脂质、多糖和小分子代谢物	~4倍	使用Click反应锚定生物分子	适用于脂质、多糖、小分子代谢物成像
ExPath ^[16]	蛋白质分子	4-5倍	使用二甲苯去除封片介质	适用于临床病理切片成像

AcX: 6-((丙烯酰)氨基)己酸琥珀酰亚胺酯。

2.1 蛋白质保留膨胀显微成像技术 (proExM)

Tillberg 等^[11] 在 ExM 方案的基础上, 开发了 proExM。在该方案中, 寡核苷酸锚定分子被替换为 6-((丙烯酰)氨基)己酸琥珀酰亚胺酯 (succinimidyl ester of 6-((acryloyl)amino) hexanoic acid, AcX)。AcX 分子的丙烯酰胺官能团可对蛋白质引入双键结构, 使外源性蛋白质标签 (如抗体) 和内源性蛋白质分子在自由基聚合反应中被直接锚定在凝胶聚合物中, 无需进行繁琐的寡核苷酸杂交步骤。凝胶-样本复合物经蛋白酶消化后, 其内部荧光信号强度可保留 50%。除 AcX 外, 甲基丙烯酸 N-羟基琥珀酰亚胺酯 (methacrylic acid N-hydroxysuccinimidyl ester, MA-NHS) 和戊二醛 (glutaraldehyde, GA) 也可替代基础 ExM 方案中的寡核苷酸锚定分子^[24]。该类方案已应用于多种生物样本的超分辨成像, 包括与神经元轴突膜蛋白相关的微丝骨架纳米级成像^[25], 人脑组织神经胶质细胞的亚显微结构成像^[26] 以及人肾脏组织足细胞足突、肾小球基底膜和细胞骨架超微结构成像^[27]。

2.2 放大分析蛋白质组技术 (MAP)

生物组织在化学固定与凝胶包埋过程中, 蛋白质分子产生的相互交联影响了凝胶的膨胀倍数与均一性。同时, 蛋白酶消化可导致样本部分蛋白质结构缺失, 影响样本成像的信号完整性。该类现象在大尺寸生物样本膨胀成像中更为明显, 为避免上述问题, Ku 等^[12] 开发了 MAP。MAP 使用的高浓度丙烯酰胺, 可与组织固定过程产生的活性羟甲基发生反应, 从而减少生物样本内因蛋白质固定产生的亚甲基桥交联, 最大限度地保证后续样本膨胀的均一性。MAP 通过加热变性样本蛋白质促进样本均一化, 避免蛋白酶消化导致的蛋白质结构缺失, 能够在 3D 层面完整解析组织内的亚细胞超微结构和细胞间连接结构。通过 MAP 技术, 小鼠大脑冠状位的单个连续神经元纤维的树突棘细节结构^[12], 狢猴大脑组织突触前支架蛋白 Bassoon 与突触后密度蛋白 PSD-95 的分布细节^[28], 以及 microRNA 在肝癌细胞 Hep3B 中的定位^[29], 均可被清楚解析。

2.3 迭代膨胀显微成像技术 (iExM)

由于水凝胶的不均匀网状拓扑结构限制, ExM 方案中的凝胶-样本复合物无法实现高于 4.5 倍的膨

胀倍数。为进一步提高生物样本膨胀倍数, Chang等^[13]通过改进基础ExM方案中的水凝胶配方及成胶实验流程, 开发出iExM。在该方案中, 生物样本经两次凝胶包埋与吸水膨胀, 其线性膨胀倍数被提升至16~22倍。首次成胶时, 细胞或组织切片首先在N,N'-(1,2-二羟乙烯)双丙烯酰胺(N,N'-(1,2-dihydroxyethylene) bisacrylamide, DHEBA)作为交联剂的凝胶中膨胀4.5倍。该凝胶块可在高pH环境下发生降解。第一次膨胀后的凝胶块, 再次被包埋进N,N'-亚甲基双丙烯酰胺(N,N'-methylenebis(acrylamide), BIS)作为交联剂的凝胶中。经高pH溶液降解与第二次吸水膨胀, 生物样本最终可达16~22倍的膨胀倍数, 且在共聚焦显微镜下实现25 nm的超分辨成像。利用iExM技术, 小鼠脑组织突触前后支架蛋白Bassoon、Homer1、Gephyrin以及神经递质受体GluR1和GABAAR α 1/ α 2的相对位置被详细解析^[13]。同样在提高样本膨胀倍数方面, Truckenbrodt等^[30]采用N,N-二甲基丙烯酰胺(N,N-dimethylacrylamide, DMAA)同时作为水凝胶的单体分子与交联剂, 将水凝胶单次吸水后膨胀倍数提升至10倍, 并成功解析了小鼠神经细胞过氧化物酶体及突触后膜蛋白Homer 1的亚显微结构。

2.4 冷冻固定膨胀显微成像技术(Cryo-ExM)

在基础ExM方案中, 需借助化学试剂如多聚甲醛或冰甲醇等完成生物样本固定。固定试剂会不可避免地改变样本内部结构的原生状态, 导致出现错误信号。为解决这一问题, Laporte等^[14]借鉴电子显微镜制样方法, 开发出Cryo-ExM。在该方案中, 生物样本首先在液态乙烷-丙烷混合物中被迅速低温固定, 形成玻璃态冰。而后, 样本被转移至液氮冷却的丙酮中, 并在干冰上孵育过夜, 直至温度上升至-80℃。除去干冰1.5 h后, 0℃的生物样本依次在浓度为100%、95%、70%和50%的乙醇中再水化, 并经1.4%甲醛和2%丙烯酰胺处理, 在丙烯酸含量为10%的单体溶液中进行凝胶包埋^[31]。相较于化学试剂固定, Cryo-ExM可更好地保存内质网、微管、微丝和线粒体等亚细胞结构的原生状态信号。应用Cryo-ExM, 内质网与线粒体的纠缠状态以及内质网纳米尺寸的孔状结构被清晰解析^[14]。

2.5 非蛋白质分子的膨胀显微成像技术

ExM不仅可用于蛋白质结构的超分辨成像, 也可实现RNA、脂质、多糖、小分子代谢物和药

物分子的超分辨成像^[15, 23, 32]。Chen等^[15]将荧光原位杂交(fluorescent *in situ* hybridization, FISH)技术与膨胀显微成像技术结合, 开发出ExFISH技术, 推动了RNA纳米级成像技术的发展。该方案采用自制新型锚定分子Label X, 将细胞内RNA锚定在凝胶上, 并在吸水膨胀的凝胶块中实施FISH实验。ExFISH不仅可实现单分子RNA信号识别, 也可检测膨胀前无法检测的高密度重叠荧光信号。

Sun等^[23]在传统ExM的基础上开发出可用于脂质、多糖、小分子代谢物、药物分子的“一站式”纳米成像技术——Click-ExM。在该方案中, 使用含有炔基或叠氮基的单体生物分子标记脂质、多糖和小分子代谢物等分子, 这类分子通过Click反应与生物素发生偶联^[33]。而后, 结合有荧光分子和交联分子(AcX或GA)的链霉亲和素再与生物素反应, 将脂质、多糖和小分子代谢物等分子锚定在凝胶中。通过Click-ExM技术, 标记大鼠心肌细胞的线粒体磷脂, 成功解析了心肌细胞线粒体的高密度网络结构^[23]。

2.6 膨胀病理学技术(ExPath)

在病理切片中实现纳米级分辨率成像, 可有效提高临床诊断的准确性。为了在普通光学成像条件下, 将病理切片分析提升至超分辨水平, Zhao等^[16]通过改进proExM技术, 开发出ExPath。在该实验方案中, 需预先使用二甲苯去除病理切片的封片介质, 再对病理组织进行膨胀成像。通过对乳腺、前列腺、肺、结肠、胰腺等组织进行ExPath成像分析表明, 不同类型人体组织在ExPath方法中的膨胀效果相似, 膨胀倍数均为4~5倍, 畸变程度均接近10%^[16, 34]。通过ExPath技术, 在微小病变性肾病(kidney minimal change disease, MCD)^[35]临床标本中观测到足细胞的足突消失现象^[16]。因分辨率的提升, ExPath也可辅助提升计算机病理诊断的准确性^[16]。

3 ExM与其他光学成像技术联合使用

3.1 ExM与光学衍射限制显微镜的联合使用

ExM可打破光学衍射极限, 借助该技术, 生物样本在诸如共聚焦显微镜、光片显微镜等衍射受限光学成像系统下, 能够实现超分辨率成像。通过ExM与共聚焦显微镜联合使用, Klimas等^[17]在超分辨条件下, 观察到小鼠大脑纹状体中酪氨酸羟化酶的分布细节。Kunz等^[36]则通过ExM与共聚焦显微镜联合使用, 精确解析了衣原体效应蛋白

CPAF 和 Cdu1 在沙眼衣原体细胞内的定位。ExM 与光片显微镜联用, 可实现大尺寸生物组织在三维空间中的超分辨成像。Düring 等^[37] 将 proExM 与光片显微镜结合, 对斑胸草雀脑组织开展了快速、深度、低漂白的超分辨成像, 解析了其神经元的树突棘细节结构。Mascheroni 等^[18] 采用 ExM 与光片显微镜联用技术, 在 95 nm 分辨率下得到细胞中囊泡表面甲型流感病毒核蛋白浓度, 推动了病毒粒子在细胞中组装与转运的研究进程。Gao 等^[38] 则通过 ExM 与晶格光片显微镜 (lattice light-sheet microscopy, LLSM) 结合, 解析了小鼠大脑皮层神经细胞的细胞器体积和树突棘形态特征, 同时量化了果蝇不同脑区多巴胺神经元的突触密度, 推动了对神经发育和神经活动相关结构的研究。

3.2 ExM 与超分辨显微镜的联合使用

在各种超分辨显微镜中, SIM 成像条件温和, 对样本制备技术要求较低^[6, 39], 但因技术原理限制, SIM 无法解析 100 nm 以下的超微结构。Kunz 等^[10] 通过 ExM 与 SIM 联用, 将成像分辨率提升至 30 nm, 解析了 Mic60 蛋白和 PRX3 蛋白在线粒体嵴中的定位。Halpern 等^[40] 通过 ExM 与 SIM 联用技术, 在 30 nm 分辨率条件下, 解析了兰伯氏贾第虫黏附盘微管的精细结构。理论上 ExM 直接与 STED 联用可进一步提高光学分辨率, 但生物样本在凝胶中膨胀后, 荧光信号密度会随膨胀倍数增加而降低, 较低的信号密度使 ExM 与 STED 的联合使用受到限制。为提升膨胀后生物样本的荧光信号密度, Gao 等^[20] 开发了多位点荧光共染色技术, 并在此基础上将 STED 与 ExM 联用, 实现 10 nm 的横向分辨率成像, 成功解析了细胞内微管、初生纤毛、运动纤毛以及中心粒等超微结构。Kim 等^[41] 开发了一种生物素——亲和素信号放大技术, 将荧光信号强度提升至最初的 7.2 倍。通过对细胞骨架蛋白以及内质网结构的高信噪比超分辨成像, 证明了该方案可有效减少 STED 成像对样本产生的光漂白。ExM 可与 SMLM 联用, 进一步提升成像分辨率。Xu 等^[21] 借助 ExM 与 SMLM 联用技术, 对小鼠精母细胞减数分裂时期的连接丝复合物 (synaptonemal complex, SC) 进行结构解析, 在 10 nm 分辨率下解析了 SC 不同蛋白元件在染色体轴内的分布结构。Zwettler 等^[42] 采用 ExM 与 SMLM 联用技术, 解析了细胞微管以及中心体的 3D 超分辨结构, 并将免疫标记连锁误差由 17.5 nm 降低至 4.4 nm。

4 膨胀显微成像技术在不同类型生物样本中的应用

4.1 ExM 在大尺寸生物样本成像中的应用

生物组织在水凝胶中膨胀时, 其内部抗原表位间隔增大, 空间位阻减少, 荧光抗体的结合效率得以提高^[8]。由于凝胶块的折光系数与水相近, 且膨胀后的样本几乎完全透明, 样本即使未经透明化处理也可达几百微米的成像深度, 因此 ExM 适于大尺寸生物组织的超分辨成像。Tillberg 等^[11] 在开发出 proExM 后, 成功将其运用在小鼠的大脑、胰腺、脾脏和肺组织的超分辨成像中。Crittenden 等^[43] 在对多巴胺分泌调控相关神经束的研究中, 使用 ExM 技术解析了纹状体神经纤维与多巴胺树突形成的神经纤维束的精细 3D 结构。Mosca 等^[44] 运用 proExM, 在大脑嗅觉神经元中观察到 LRP4 蛋白与突触前蛋白 Bruchpilot 的共定位, 证明了 LRP4 蛋白可在兴奋性突触前区室中定位, 推动了该蛋白质在指导兴奋性突触发育中的研究进程。Hafner 等^[45] 则在 ExM 中, 采用嘌呤霉素代谢标记突触前神经元新生蛋白质的方法, 解析了神经元突触前蛋白合成的翻译特征。而在其他模式生物的超分辨成像研究中, ExM 也应用于斑马鱼和秀丽隐杆线虫的亚显微结构解析^[46-47]。

4.2 ExM 在单细胞亚显微结构成像中的应用

细胞内各细胞器对细胞正常生理状态的维持起着重要作用, 利用 ExM 在单细胞内观察各细胞器的亚显微结构, 有助于更准确地描述细胞的各项生理功能及其变化。细胞核在调控细胞代谢活动以及维持细胞整体生理结构方面起着重要作用, 因此对其超微结构的解析, 在细胞核功能研究中极为重要。Woodworth 等^[48] 利用 ExM 技术, 开发了一种单细胞翻译后表观遗传编码评估 (single cell evaluation of post-translational epigenetic encoding, SCEPTRE) 的方法, 可在 3D 环境中量化单个细胞核内基因组位点的组蛋白标记丰度。通过运用 ExM, Cahoon 等^[49] 在 3D 层面上精确解析了果蝇胚胎细胞核中 SC 的纳米级结构特征。在线粒体超微结构成像方面, Suofu 等^[50] 利用 ExM 技术, 解析了线粒体外膜标记物 TOM20 和褪黑素 1 型受体 (melatonin type 1 receptor, MT₁) 的共定位情况, 证明了 MT₁ 存在于线粒体外膜。Kunz 等^[10] 则使用 ExM 实现了对线粒体嵴的超分辨成像。此外, 内质网、高尔基体、纤毛等亚细胞器的超微结构也通

过ExM技术得到精确的解析^[51-53]。

5 展 望

ExM可在常规光学成像条件下,实现生物样本的纳米级超分辨成像。近年来开发的各种ExM衍生技术,优化了ExM的实验方案,扩展了ExM的应用领域。通过与其他显微成像技术联用,ExM可进一步将样本的光学分辨率提升至10~60 nm,以解析更加细微的生物结构。大尺寸动物组织样本、贴壁细胞等多种类型生物样本,都可运用ExM获得更高的成像分辨率。目前,ExM仍存在一些技术与应用缺陷,例如膨胀后出现样本抗原表位部分缺失、深度成像时由于凝胶折射系数的细微差异而出现球面像差以及膨胀后样本的畸变现象等。未来,随着研究的深入,上述缺陷将进一步被克服,ExM技术也将在生物医学领域发挥更大作用。

参 考 文 献

- [1] Gustafsson M G. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *J Microsc*, 2000, **198**(Pt2): 82-87
- [2] Rust M J, Bates M, Zhuang X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat Methods*, 2006, **3**(10): 793-795
- [3] Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, *et al.* Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science*, 2006, **313**(5793): 1642-1645
- [4] Blom H, Widengren J. Stimulated emission depletion microscopy. *Chem Rev*, 2017, **117**(11): 7377-7427
- [5] Hell S W. Far-field optical nanoscopy. *Science*, 2007, **316**(5828): 1153-1158
- [6] Heintzmann R, Huser T. Super-resolution structured illumination microscopy. *Chem Rev*, 2017, **117**(23): 13890-13908
- [7] Feng H, Wang X, Xu Z, *et al.* Super-resolution fluorescence microscopy for single cell imaging. *Adv Exp Med Biol*, 2018, **1068**: 59-71
- [8] Chen F, Tillberg P W, Boyden E S. Optical imaging. Expansion microscopy. *Science*, 2015, **347**(6221): 543-548
- [9] Zhang Y S, Santiago G T, Alvarez M M, *et al.* Expansion mini-microscopy: an enabling alternative in point-of-care diagnostics. *Curr Opin Biomed Eng*, 2017, **1**: 45-53
- [10] Kunz T C, Gotz R, Gao S, *et al.* Using expansion microscopy to visualize and characterize the morphology of mitochondrial cristae. *Front Cell Dev Biol*, 2020, **8**: 617
- [11] 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. *Nat Biotechnol*, 2016, **34**(9): 987-992
- [12] Ku T, Swaney J, Park J Y, *et al.* Multiplexed and scalable super-resolution imaging of three-dimensional protein localization in size-adjustable tissues. *Nat Biotechnol*, 2016, **34**(9): 973-981
- [13] Chang J B, Chen F, Yoon Y G, *et al.* Iterative expansion microscopy. *Nat Methods*, 2017, **14**(6): 593-599
- [14] Laporte M H, Klena N, Hamel V, *et al.* Visualizing the native cellular organization by coupling cryofixation with expansion microscopy (Cryo-ExM). *Nat Methods*, 2022, **19**(2): 216-222
- [15] Chen F, Wassie A T, Cote A J, *et al.* Nanoscale imaging of RNA with expansion microscopy. *Nat Methods*, 2016, **13**(8): 679-684
- [16] Zhao Y, Bucur O, Irshad H, *et al.* Nanoscale imaging of clinical specimens using pathology-optimized expansion microscopy. *Nat Biotechnol*, 2017, **35**(8): 757-764
- [17] Klimas A, Gallagher B, Zhao Y. Basics of expansion microscopy. *Curr Protoc Cytom*, 2019, **91**(1): e67
- [18] Mascheroni L, Scherer K M, Manton J D, *et al.* Combining sample expansion and light sheet microscopy for the volumetric imaging of virus-infected cells with optical super-resolution. *Biomed Opt Express*, 2020, **11**(9): 5032-5044
- [19] Kubalova I, Schmidt Cernohorska M, Huranova M, *et al.* Prospects and limitations of expansion microscopy in chromatin ultrastructure determination. *Chromosome Res*, 2020, **28**(3-4): 355-368
- [20] Gao M, Maraschini R, Beutel O, *et al.* Expansion stimulated emission depletion microscopy (ExSTED). *ACS Nano*, 2018, **12**(5): 4178-4185
- [21] Xu H, Tong Z, Ye Q, *et al.* Molecular organization of mammalian meiotic chromosome axis revealed by expansion STORM microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, **116**(37): 18423-18428
- [22] Wassie A T, Zhao Y, Boyden E S. Expansion microscopy: principles and uses in biological research. *Nat Methods*, 2019, **16**(1): 33-41
- [23] Sun D E, Fan X, Shi Y, *et al.* Click-ExM enables expansion microscopy for all biomolecules. *Nat Methods*, 2021, **18**(1): 107-113
- [24] Chozinski T J, Halpern A R, Okawa H, *et al.* Expansion microscopy with conventional antibodies and fluorescent proteins. *Nat Methods*, 2016, **13**(6): 485-488
- [25] Martínez G F, Gazal N G, Quassollo G, *et al.* Quantitative expansion microscopy for the characterization of the spectrin periodic skeleton of axons using fluorescence microscopy. *Sci Rep*, 2020, **10**(1): 2917
- [26] Deshpande T, Li T, Herde M K, *et al.* Subcellular reorganization and altered phosphorylation of the astrocytic gap junction protein connexin43 in human and experimental temporal lobe epilepsy. *Glia*, 2017, **65**(11): 1809-1820
- [27] Chozinski T J, Mao C, Halpern A R, *et al.* Volumetric, nanoscale optical imaging of mouse and human kidney via expansion microscopy. *Sci Rep*, 2018, **8**(1): 10396
- [28] Park J, Khan S, Yun D H, *et al.* Epitope-preserving magnified

- analysis of proteome (eMAP). *Sci Adv*, 2021, **7**(46): eabf6589
- [29] Woo J, Seo J M, Lee M, *et al.* A Modified magnified analysis of proteome (MAP) method for super-resolution cell imaging that retains fluorescence. *Sci Rep*, 2020, **10**(1): 4186
- [30] Truckenbrodt S, Sommer C, Rizzoli S O, *et al.* A practical guide to optimization in X10 expansion microscopy. *Nat Protoc*, 2019, **14**(3): 832-863
- [31] Gambarotto D, Zwettler F U, Le Guennec M, *et al.* Imaging cellular ultrastructures using expansion microscopy (U-ExM). *Nat Methods*, 2019, **16**(1): 71-74
- [32] Tsanov N, Samacoits A, Chouaib R, *et al.* smiFISH and FISH-quant - a flexible single RNA detection approach with super-resolution capability. *Nucleic Acids Res*, 2016, **44**(22): e165
- [33] Takayama Y, Kusamori K, Nishikawa M. Click chemistry as a tool for cell engineering and drug delivery. *Molecules*, 2019, **24**(1): 172
- [34] Bucur O, Fu F, Calderon M, *et al.* Nanoscale imaging of clinical specimens using conventional and rapid-expansion pathology. *Nat Protoc*, 2020, **15**(5): 1649-1672
- [35] Waldman M, Crew R J, Valeri A, *et al.* Adult minimal-change disease: clinical characteristics, treatment, and outcomes. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2007, **2**(3): 445-453
- [36] Kunz T C, Gotz R, Sauer M, *et al.* Detection of chlamydia developmental forms and secreted effectors by expansion microscopy. *Front Cell Infect Microbiol*, 2019, **9**: 276
- [37] Düring D N, Rocha M D, Dittrich F, *et al.* Expansion Light sheet microscopy resolves subcellular structures in large portions of the songbird brain. *Front Neuroanat*, 2019, **13**: 2
- [38] Gao R, Asano S M, Upadhyayula S, *et al.* Cortical column and whole-brain imaging with molecular contrast and nanoscale resolution. *Science*, 2019, **363**(6424): eaau8302
- [39] Wu Y, Shroff H. Faster, sharper, and deeper: structured illumination microscopy for biological imaging. *Nat Methods*, 2018, **15**(12): 1011-1019
- [40] Halpern A R, Alas G C M, Chozinski T J, *et al.* Hybrid structured illumination expansion microscopy reveals microbial cytoskeleton organization. *ACS Nano*, 2017, **11**(12): 12677-12686
- [41] Kim D, Kim T, Lee J, *et al.* Amplified expansion stimulated emission depletion microscopy. *ChemBioChem*, 2019, **20**(10): 1260-1265
- [42] Zwettler F U, Reinhard S, Gambarotto D, *et al.* Molecular resolution imaging by post-labeling expansion single-molecule localization microscopy (Ex-SMLM). *Nat Commun*, 2020, **11**(1): 3388
- [43] Crittenden J R, Tillberg P W, Riad M H, *et al.* Striosome-dendron bouquets highlight a unique striatonigral circuit targeting dopamine-containing neurons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, **113**(40): 11318-11323
- [44] Mosca T J, Luginbuhl D J, Wang I E, *et al.* Presynaptic LRP4 promotes synapse number and function of excitatory CNS neurons. *Elife*, 2017, **6**: e27347
- [45] Hafner A S, Donlin-Asp P G, Leitch B, *et al.* Local protein synthesis is a ubiquitous feature of neuronal pre- and postsynaptic compartments. *Science*, 2019, **364**(6441): eaau3644
- [46] Freifeld L, Odstreil I, Forster D, *et al.* Expansion microscopy of zebrafish for neuroscience and developmental biology studies. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, **114**(50): E10799-E10808
- [47] Yu C J, Barry N C, Wassie A T, *et al.* Expansion microscopy of *C. elegans*. *Elife*, 2020, **9**: e46249
- [48] Woodworth M A, Ng K K H, Halpern A R, *et al.* Multiplexed single-cell profiling of chromatin states at genomic loci by expansion microscopy. *Nucleic Acids Res*, 2021, **49**(14): e82
- [49] Cahoon C K, Yu Z, Wang Y, *et al.* Superresolution expansion microscopy reveals the three-dimensional organization of the *Drosophila* synaptonemal complex. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, **114**(33): E6857-E6866
- [50] Suofu Y, Li W, Jean-Alphonse F G, *et al.* Dual role of mitochondria in producing melatonin and driving GPCR signaling to block cytochrome c release. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2017, **114**(38): E7997-E8006
- [51] Sun Q, Picascia T, Khan A U M, *et al.* Application of ethyl cinnamate based optical tissue clearing and expansion microscopy combined with retrograde perfusion for 3D lung imaging. *Exp Lung Res*, 2020, **46**(10): 393-408
- [52] Kalichava A, Ochsenreiter T. Ultrastructure expansion microscopy in *Trypanosoma brucei*. *Open Biol*, 2021, **11**(10): 210132
- [53] Campbell L A, Pannoni K E, Savory N A, *et al.* Protein-retention expansion microscopy for visualizing subcellular organelles in fixed brain tissue. *J Neurosci Methods*, 2021, **361**: 109285

The Basic Principles and Application of Expansion Microscopy*

YANG Zhen-Yu^{1,2)}, GUAN Miao³⁾, SUN Zheng-Long^{1,2)**}

(¹)State Key Laboratory of Primate Biomedical Research, Institute of Primate Translational Medicine, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China;

²)Yunnan Key Laboratory of Primate Biomedical Research, Kunming 650500, China;

³)Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

Abstract Expansion microscopy (ExM) is a new super-resolution imaging technique. With the aid of expandable hydrogel, biological samples are uniformly physically amplified and can be imaged in super resolution by using conventional optical imaging microscopes. In ExM, after immunofluorescence staining, gel embedding, protease digestion and water swelling, the relative distance of fluorescent labeled molecules inside the biological samples was increased, so the sample can bypass the optical diffraction limit in conventional fluorescence microscope to achieve the super-resolution imaging. ExM is widely suitable for many types of biological samples such as cell and tissue sections. Proteins, nucleic acids, lipids and other biological macromolecules can also be imaged by ExM. ExM can be combined with confocal microscopy, light-sheet microscopy and super-resolution microscopy to further improve imaging resolution. In recent years, a variety of derivative technologies have been developed from base ExM, which further promotes the practical application of this technology. Protein retention expansion microscopy (proExM) can avoid complicated sample preparation process and directly image endogenous fluorescent proteins. Magnified analysis of the proteome (MAP) was suitable for super-resolution imaging in large biological samples. Iterative expansion microscopy (iExM) can increase the final expansion factor of biological samples to 16–22 times by changing the gel embedding steps. Cryo-expansion microscopy (Cryo-ExM) can provide better image fidelity. Expansion fluorescent *in situ* hybridization (ExFISH) and Click-ExM can achieve super-resolution imaging in nonprotein biomolecules, such as RNA, lipids, and polysaccharides. Expansion pathology (ExPath) can be used for clinicopathologic specimens imaging. The combination of ExM and light-sheet microscope can improve the image resolution to super-resolution level in the deep imaging depth. The application of ExM in super-resolution microscopy can further increase the resolution of images to 10–30 nm. In this paper, we reviewed the basic principles of ExM and its derivative technology, the research progress of combining ExM with different imaging technologies, the application progress of ExM in observing different types of biological samples, and the prospective of spreading ExM technology in the future.

Key words expansion microscopy, hydrogel, super-resolution imaging, submicroscopic structure imaging

DOI: 10.16476/j.pibb.2022.0225

* This work was supported by grants from The Natural Science Foundation of Yunnan Province (202001BC070001, 202102AA100053).

** Corresponding author.

Tel: 86-13584804523, E-mail: sunzl@lpbr.cn

Received: May 18, 2022 Accepted: July 29, 2022