

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解析度至奈米等級。目前所使用的ExM方法，無法有效地標定細胞膜、胞器膜與脂質，也因採用受質專一性低的蛋白酶K (Proteinase K)，導致螢光訊號流失。為改善上述缺點，我先用酪氨酸胺訊號放大技術 (Tyramide signal amplification) 增加螢光強度，再用受質專一性高的胰蛋白酶 (Trypsin) 以減少螢光訊號流失。因新方法使用酪氨酸胺和胰蛋白酶，故稱為TT-ExM。此改善技術不但可更清楚標定細胞的蛋白質，也可標定細胞膜、核膜、內質網和粒線體等脂質結構。結合DNA染色可觀察染色體與粒線體DNA，以及細胞核內球狀脂質，和核分裂時貼附在染色體上的脂質結構。本研究論文已投稿專業期刊審查。

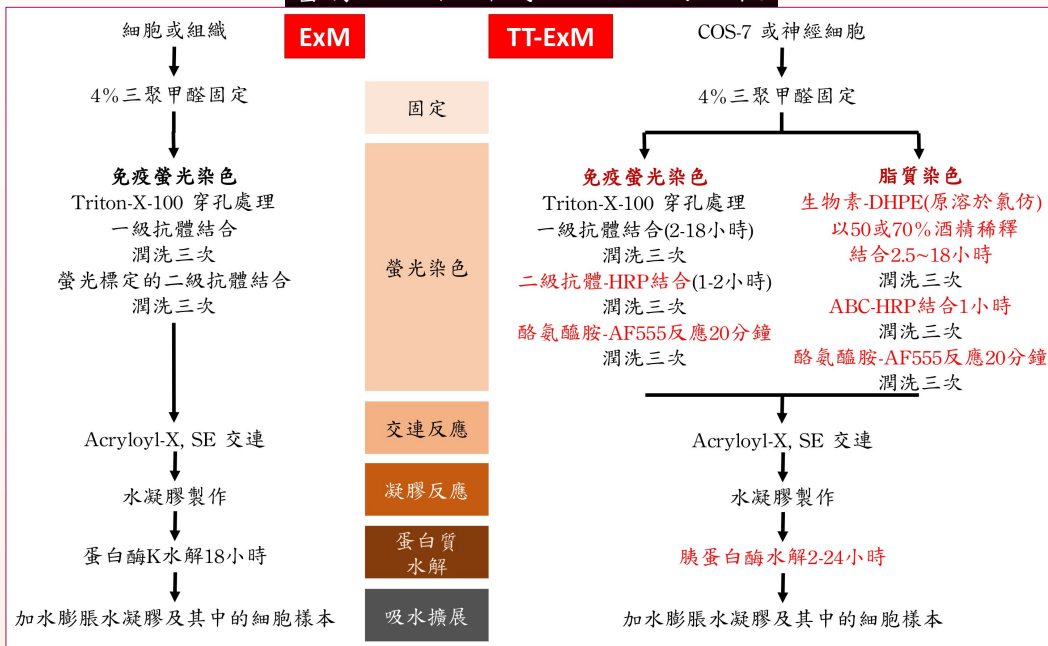
研究動機及目的

探討擴展顯微鏡術的基本原理，了解其所運用的水凝膠高分子聚合物化學，實際操作並改善舊有系統的三項缺點：一、訊號微弱。二、使用受質專一性低的蛋白酶K。三、不利於觀察細胞微細結構全貌。

擴展顯微鏡技術的原理

因光學極限200奈米的限制，距離小於200奈米的兩個物體是無法以一般光學顯微鏡分辨。擴展顯微鏡技術克服光學極限的方法不是架設精密的顯微鏡，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，等比例的擴展生物樣品，間接提高光學解析度，理論上可將解析度推進到奈米等級。

舊有ExM和新式TT-ExM的比較



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

HRP催化酪氨酸胺和酪胺酸形成共價鍵結

運用於免疫染色

運用於脂質染色

Biotin(生物素)-DHPE結構式

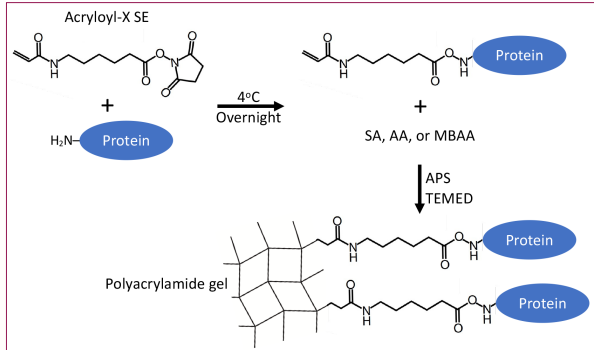
1,2-dihexadecanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DHPE)

Biotin

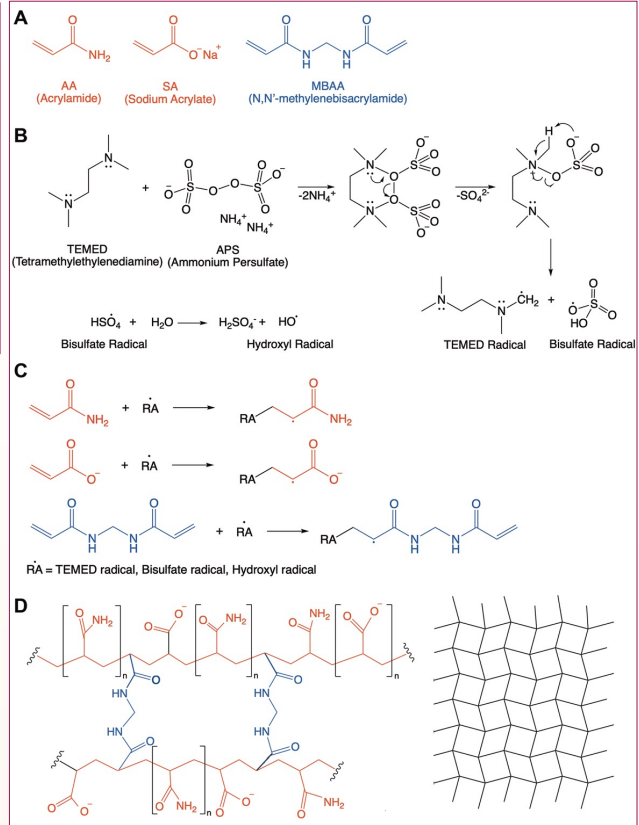
改良擴展顯微鏡技術觀察蛋白質、脂質、及細胞核與粒線體DNA

師大附中1560班王月廷
陳壁彰、江青釗老師指導

交連反應



本研究所使用的水凝膠化學

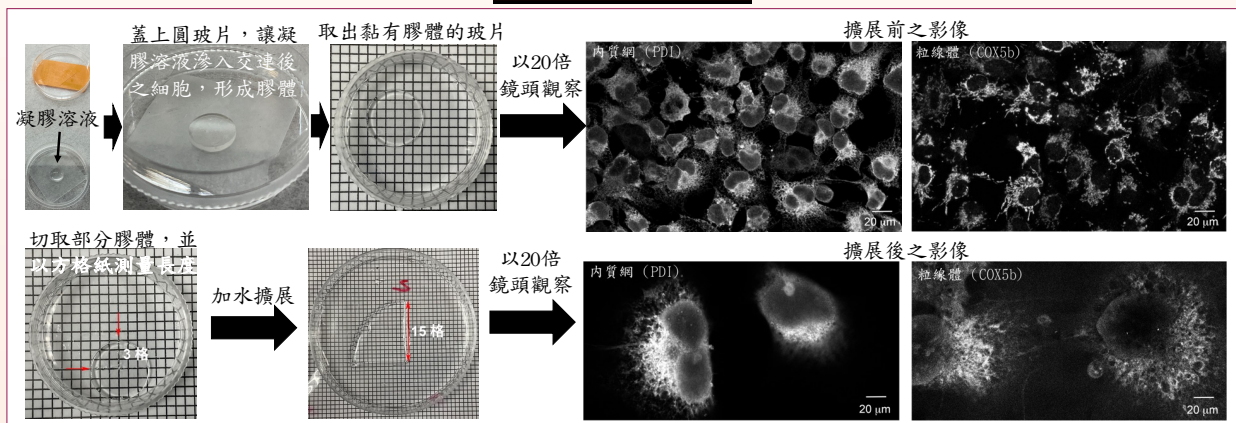


蛋白酶K和胰蛋白酶的比較

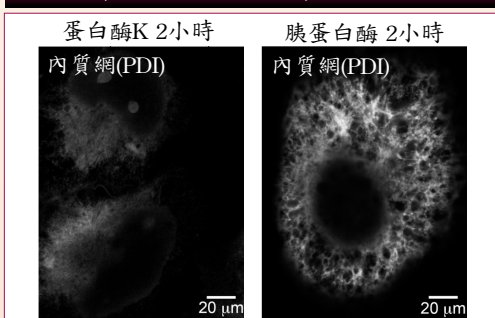
	蛋白酶K	胰蛋白酶
切割位點	脂肪族胺基酸或芳香族胺基酸，含白胺酸(7.6%)、丙胺酸(7.4%)、缬胺酸(6.8%)、異白胺酸(3.8%)、甘胺酸(7.4%)、苯丙胺酸(4%)、脯胺酸(5%)、色胺酸(1.3%)、酪胺酸(3.3%)	賴氨酸(7.2%)或精氨酸(4.2%)
預測切割頻率	46.6%	11.4%
水解後的平均肽段長度	2.1個胺基酸	8.8個胺基酸

*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

擴展前後的比較



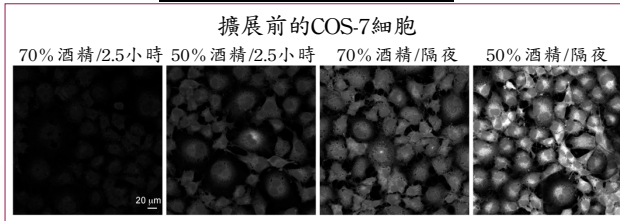
蛋白酶K和胰蛋白酶處理的比較



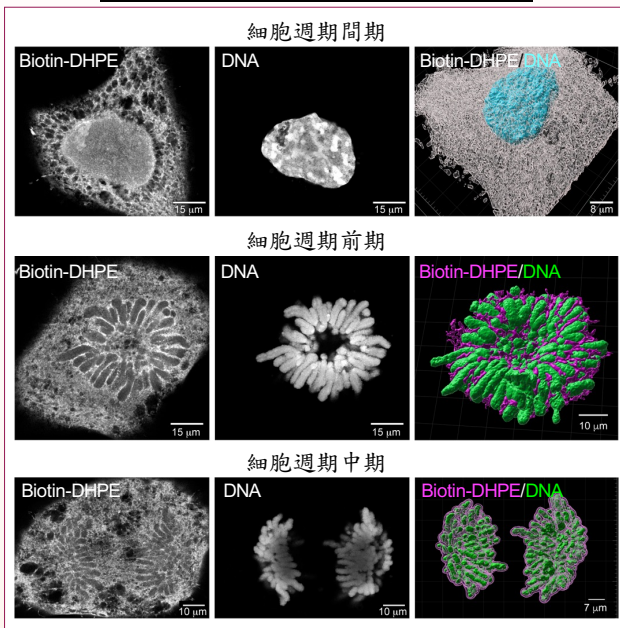
細胞核外DNA之觀察



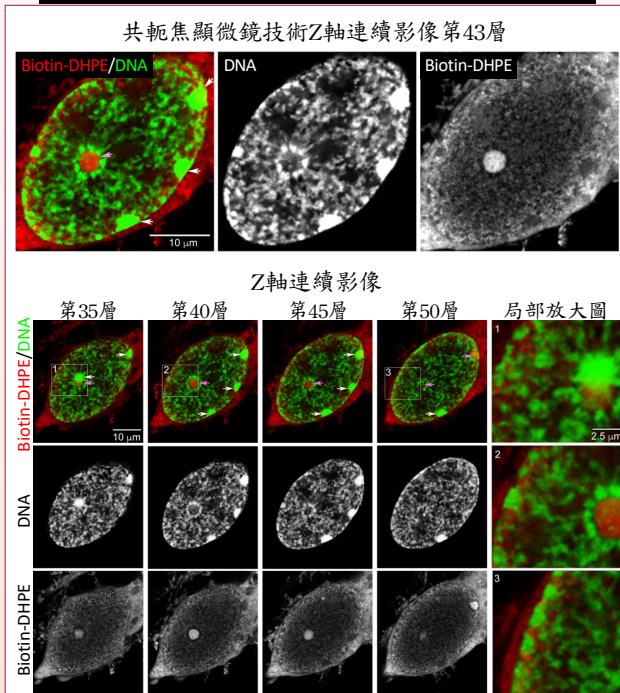
脂質染色條件測試



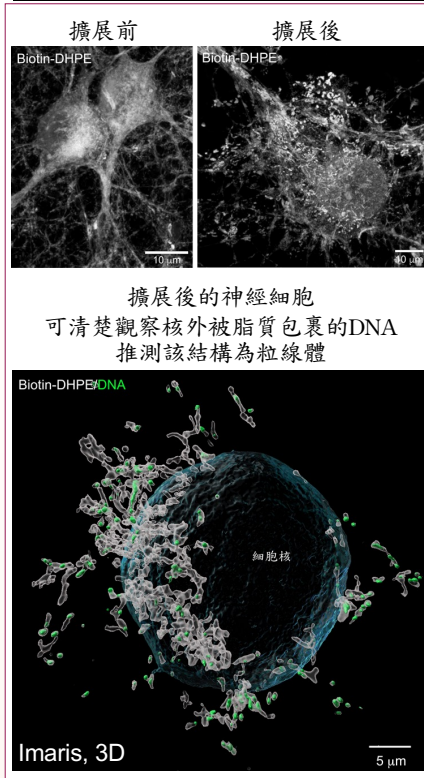
COS-7細胞的脂質/DNA染色



擴展後神經細胞核的脂質/DNA分佈



神經細胞的脂質/DNA染色



討論與結論

已成功地改善舊有系統的三項缺點，分述如下：

一、訊號微弱：以酪氨酸胺訊號放大技術來克服。此放大技術的關鍵核心是引入過氧化酶，再將酪氨酸胺共價鍵結在所標定的位置。我運用兩種方法引入過氧化酶，其放大效果不同，可依需求使用。

二、使用專一性低的蛋白酶K：以胰蛋白酶取代。我成功保留較多的螢光訊號在細胞樣本內。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，尤其是結構緊密的染色體DNA亦可漂亮地擴展放大，顯示胰蛋白酶的適用性。未來應進一步使用組織來測試胰蛋白酶的效能。

三、不利於觀察細胞微細結構全貌：因為上述的改變，我們可以清楚地觀察到整個細胞的許多微細結構。在20倍或40倍物鏡下可以高解析地觀察內質網、粒線體、整個細胞的膜狀結構、染色體、和核外粒線體的mtDNA。之後，可再使用其他專一性的標定染色，進一步確認和分析我們所觀察到的微細結構。

結論，本研究成功優化擴展顯微鏡技術，建立TT-ExM，高解析地觀察細胞內許多微細結構，強化我們這套改良後系統的可信度和未來運用的可能性。