

抗淬灭增强的 ExM-SOFI 技术

张丽¹, 刘志佳², 费义艳², 糜岚^{2**}, 马炯^{1,2,3*}¹复旦大学生命科学学院复杂体系多尺度研究院, 上海 200433;²复旦大学信息科学与工程学院光科学与工程系, 上海 200433;³复旦大学工程技术研究院生物医学工程研究所, 上海 200433

摘要 膨胀超分辨技术是近几年出现的一种对样品制备进行改进实现分辨率提升的超分辨技术, 由于其与其他光学技术的兼容性强, 可以进一步提高分辨率, 引起了越来越多研究人员的关注。复合膨胀技术是膨胀超分辨技术改进的一个主要发展方向之一, 膨胀结合光学波动超分辨技术(ExM-SOFI)在复合膨胀技术中是一种受限较小且使用较为广泛的技术。为了增强现有 ExM-SOFI 技术的成像效果, 本课题组将成像缓冲液技术应用于 ExM-SOFI 技术, 以增强膨胀样品在拍摄过程中的抗淬灭能力, 从而使普通染料在 ExM-SOFI 中的荧光强度、荧光波动幅度和闪烁比等均有增强。微管和囊泡的染色成像结果表明, 使用这种技术可以使样品在高阶 SOFI 中保持真实结构, 伪影更少, 因而高阶 SOFI 技术可以提升膨胀样品的最终分辨率。

关键词 生物光学; ExM-SOFI; 膨胀超分辨; 光学波动超分辨; 成像缓冲液; 抗淬灭增强

中图分类号 Q63

文献标志码 A

DOI: 10.3788/CJL221255

1 引言

光学显微成像技术的进步极大地促进了生命科学的发展, 荧光显微成像技术自出现以来就在酵母分类^[1]、混合藻类细胞数目定量^[2]、活体生物成像^[3]等领域被广泛应用。随着荧光显微成像技术的发展, 超分辨显微成像技术更是突破了衍射极限, 使人们能够观察到更为精细的生物结构和生命活动^[4]。其中: 单分子定位显微成像技术(以下简称“SMLM 技术”)通过降低衍射极限内两个荧光分子的发光概率来实现每次仅激发少量荧光分子, 对其进行准确定位后再进入下一次循环, 重复多次后就可以得到一张高分辨率图像。光激活定位显微技术(以下简称“PALM 技术”)^[5]和随机光学重建显微技术(以下简称“STORM 技术”)^[6]也是众多超分辨技术中在分辨率方向上突破最大的技术。基于受激辐射损耗技术(以下简称“STED 技术”)的显微镜选择了环形光源, 通过内圈激发外圈淬灭的方式减小点扩散函数的半峰全宽, 从而取得分辨率的提升^[7]。结构光照明显微成像技术(以下简称“SIM 技术”)通过一束多重相互衍射的光束对样品进行照射获得调制图像, 再通过特定的算法对图像进行信息提取, 就可以重建出达到超分辨效果的图像^[8]。Airyscan 技术通过一个 32 通道平面探测器同时收集一个艾里斑的所有光, 再对该信息进行解析就可以得到更准确的

位置信息。Airyscan 显微镜的信噪比为传统共聚焦显微镜的 4~8 倍^[9]。超分辨光学波动显微成像技术(以下简称“SOFI 技术”)利用荧光分子发射的荧光会随时间产生波动的特性, 通过算法处理, 得到了突破衍射极限的超分辨图像^[10]。由于该技术是通过算法处理的途径来提高分辨率的, 因此也是受限制较少的一种技术。膨胀超分辨荧光显微成像技术(以下简称“ExM 技术”)通过将样品包埋在可溶胀的水凝胶中, 使样品随着水凝胶的膨胀而胀大, 以物理的方式分开衍射极限内的两个分子, 从而可以在普通显微镜下取得超分辨效果^[11-13]。ExM 技术操作简单, 功能强大, 与其他超分辨技术的兼容性强, 因此在固定生物标本研究领域得到了快速发展与应用^[14]。

ExM 技术的源头可以追踪到 20 世纪 80 年代。当时, 人们在研究水凝胶的物理性质时发现水凝胶的体积可以在溶液中膨胀多倍, 并且还发现将动物胚胎和蝌蚪包埋于丙烯酸酰胺中切片后其保留的精细形态特征与常规石蜡切片相当, 同时切片还可以通过免疫组织化学方法染色^[15]。2015 年, Boyden 小组^[11]将该技术继续推进, 形成了成熟的 ExM 技术, 该技术可使样本放大约 4 倍, 取得了约 70 nm 的分辨率。自此, ExM 技术以其在生物超分辨成像领域的诸多优势逐渐引起了众多科学家的兴趣。为了充分利用该技术与其他超分辨技术兼容性强的优势, 人们发展出了多种不同的复

收稿日期: 2022-09-18; 修回日期: 2022-10-17; 录用日期: 2022-11-25

基金项目: 国家重点研发计划(2021YFF0502900)、国家自然科学基金(61575046, 11574056)

通信作者: *Jiongma@fudan.edu.cn; **lanmi@fudan.edu.cn

合膨胀超分辨技术。比如:将 ExM 与 SIM 超分辨技术结合,可以对线粒体实现约 30 nm 的分辨率,为线粒体内外膜研究提供了重要的技术支持^[16];ExM 与 STED 超分辨技术的结合在核孔复合物中取得了约 10 nm 的精度^[17],但 STED 技术的激发光较强,容易引发膨胀凝胶形变;将 ExM 与 SMLM 超分辨技术结合,可以对网格蛋白、微管进行更为精细的观察^[18-20],但很难对膨胀样品实现高质量单分子图像;ExM 与 SOFI 算法的结合以一种更加经济方便的方式取得了相对普通 ExM 技术分辨率更高的部分细胞器图像^[21]。除了两两结合以外,近年出现了将 ExM 技术与 Airyscan 技术、SRRF 技术叠合的 FEAST 技术,该技术更是在微管上取得了约 26 nm 的分辨率^[22]。

由于 SOFI 技术受仪器和染料限制较小^[23-25],因此 ExM 技术与 SOFI 技术结合的 ExM-SOFI 技术在复合膨胀超分辨技术中是最有利于普通实验室获得超分辨图像的技术。然而在该技术中,SOFI 算法的重构需要对膨胀样品进行连续拍摄,而膨胀样品一般会因荧光信号的稀释以及凝胶聚合过程中产生的自由基对荧光分子的损伤等导致膨胀样品本身的荧光信号偏弱^[26-27],因此在连续拍摄过程中往往不能获得最佳的成像效果。目前解决该问题的方法是膨胀后进行标记以避免一部分荧光损失,或者选用抗淬灭能力较强的量子点对样品进行标记^[21,27]。但是量子点由于尺寸和生物相容性问题并不是最佳的适用于生物的染料。

在这里,本课题组提出了一种抗淬灭增强的 ExM-SOFI 技术,即:在膨胀样品拍摄过程中加入成像缓冲液对荧光信号进行调制。由于氧气在光漂白过程中具有重要作用,因此实验中选用以葡萄糖、葡萄糖氧化酶、过氧化氢酶为主要成分的除氧系统缓冲液来减少光漂白。此外,该技术的实现还需要考虑以下问题:膨胀样品膨胀系数的保持需要低浓度渗透缓冲液,而除氧系统添加了许多成分,导致溶液浓度较高,因此不能直接将膨胀样品与除氧缓冲液结合。在 Zwettler 等^[20]的研究中,为了增加 STORM 技术与膨胀技术的联合,采用了一种二次包埋不带电荷水凝胶的技术来实现 STORM 缓冲液与膨胀样品结合,该技术虽然使膨胀系数缩小为 3.2,但由于缓冲液的加入增强了荧光信号在 STORM 中的表现,因此依然取得了较好的分辨率与实验效果。本课题组将采用这种方法来解决成像缓冲液浓度与水凝胶膨胀系数之间的矛盾,实现抗淬灭增强的 ExM-SOFI。

2 实验材料与方法

2.1 材料

质粒 pLVX-CD63-EGFP 是为了构建细胞稳定株而构建的;pLVX-Puro、psPAX2 和 pMD2.G 来自董彪实验室的赠送。

2.2 细胞培养

采用补充有 10% FBS 和 100 units/mL 青霉素-链霉素的 DMEM 培养基,以供 HeLa 和 HEK 293T 细胞生长。采用补充有 10% FBS 和 100 units/mL 青霉素-链霉素的 MEM 培养基,以供 BSC-1 细胞生长。根据不同的实验要求将细胞接种在细胞爬片或培养皿中,并过夜培养,使细胞达到 60%~80% 的汇合度,以备后续使用。使用 Lipofectamine 3000 试剂盒进行细胞的瞬时转染,使用 Lipofectamine 3000 试剂盒和慢病毒转染的方式构建稳定株。构建了稳定表达 EGFP 标记的 CD63 蛋白的 HeLa 细胞株,以用于后续实验。

2.3 样品制备

对于微管染色,在用 4% 多聚甲醛和 0.1% 戊二醛固定细胞之前,先用预热的微管抽提液(0.1 mol/L PIPES+1 mmol/L EGTA+1 mmol/L MgCl₂+0.2% Triton X-100)处理细胞 40 s 并用 PBS 洗涤。固定后,先用新鲜制备的含 0.5% (质量分数) NaBH₄ 的 PBS 溶液孵育爬片 7 min,再使用含 0.5% Triton X-100 的 PBS 溶液给细胞打孔 5 min,随后根据不同的目的细胞器将细胞与不同的抗体一起孵育。

2.4 免疫染色

1) 微管染色。将制备好的 BSC-1 细胞爬片用含 3% 牛血清白蛋白、5% 驴血清和 0.5% Triton X-100 的封闭液孵育 30 min,然后与抗 α 微管蛋白抗体(Abcam, ab18251, 稀释比为 1:200)一起孵育 1 h,随后将细胞在 PBS 中洗涤 3 次,每次 5 min,接着使用生物素修饰的二抗(Abcam, ab6720, 稀释比为 1:400)孵育 40 min。

2) CD63 标记的囊泡染色。选用 HeLa 稳定株进行染色,染色步骤与微管染色相似,选用的一抗是抗 GFP 抗体(Abcam, ab13970, 稀释比为 1:200),二抗同样选择的是生物素修饰的抗体(Abcam, ab6876, 稀释比为 1:400)。

2.5 膨胀样品制备

膨胀样品的制备参考 BOYDEN 实验室开发的 ExM 方法^[11]。为了增加样本与水凝胶的连接,将免疫染色后的细胞样品与 0.25% 戊二醛一起孵育 10 min,随后用 PBS 洗涤,备用。同时在冰上制备新鲜的单体溶液和催化剂。单体溶液包含 8.625% 丙烯酸钠(408220, Sigma-Aldrich)、2.5% 丙烯酰胺(A4058, Sigma-Aldrich)、0.15% N,N'-亚甲基双丙烯酰胺(M7279, Sigma-Aldrich)、2 mol/L NaCl(S5886, Sigma)和 0.01 mol/L PBS。催化剂包含工作浓度为 0.2% (质量分数)的过硫酸铵(APS, 17874, Thermo Fisher Scientific)和工作浓度为 0.2% (体积分数)的四甲基乙二胺(TEMED, 17919, Thermo Fisher Scientific)。单体溶液与催化剂混合后,覆盖细胞,并在 37 °C 条件下保持 2 h 使水凝胶形成。之后用蛋白酶 K 消化凝胶完成的样品,并用蒸馏水使样品膨胀,其间每 30 min 更换一次水,直到凝胶的大小不再变化。

2.6 二次包埋方法

为了防止水凝胶在成像缓冲液中收缩,根据之前的研究对样品进行了二次包埋^[20]。为了将水凝胶固定在盖玻片上,使用硅烷化处理的盖玻片。先用去离子水和无水乙醇洗涤盖玻片,然后用 200 μL Bind-Silane 溶液(8 μL Bind-Silane 溶于 950 μL 无水乙醇+20 μL 冰醋酸+22 μL 去离子水)孵育并放置大约 1 h,直到溶液完全蒸发,最后用乙醇清洗盖玻片以去除多余的未结合试剂。将水凝胶切成合适的大小和厚度,并在二次包埋溶液[10% 丙烯酰胺+0.15% N,N'-亚甲基双丙烯酰胺+0.05% APS+0.05% TEMED+5 mmol/L Tris(pH 8.9)]中孵育 30 min(重复 2 次),其间不断摇晃以免水凝胶凝固(此时水凝胶的膨胀系数减小为 3.2)。将孵育好的水凝胶放置在硅烷化的盖玻片上,然后一起放入充满氮气的环境中等待凝胶聚合(约 2 h)。聚合后,二次包埋的凝胶样品在双蒸水中洗涤至少 3 次,每次 1 h。

2.7 包埋后染色

将凝胶用质量浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的修饰有 Alexa488 的链霉亲和素在链霉亲和素结合缓冲液(10 mmol/L Tris+1 mmol/L EDTA+100 mmol/L NaCl)中染色。样品在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育至少 16 h。染色后的样品用 PBS 洗涤 30 min(重复 3 次)。成像时,将样品放在成像缓冲液中[0.5 mg/mL 葡萄糖氧化酶(G2133, Sigma-Aldrich)+40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 过氧化氢酶(C100-50MG, Sigma-Aldrich)+10% 葡萄糖+10 mmol/L 2-氨基乙硫醇(MEA, Fluka)]。

2.8 图像的采集与处理

采用自行搭建的宽场荧光显微镜对图像进行收集。使用油镜(150 \times ,数值孔径为 1.45)和 EMCCD 相机(Evolve 512)对样品进行拍摄,像素大小为 106 nm。对于荧光分子 Alexa488,激发波段选择 472 nm \pm 15 nm,收集波段选择 520 nm \pm 17.5 nm,使用 520 nm 带通滤波器(FF01-520/35-25, Semrock)进行收集。在获取 SOFI 图像时,连续拍摄 5000 张图像,功率为 0.3 mW,单张曝光时间为 50 ms。在分析图像亮度时,功率为 0.3 mW,单张曝光时间为 100 ms。

2.9 数据分析

图像的常规调整以及数据分析主要通过 Image J 和 Origin 软件实现。采用 Geissbühler 等^[28]的研究方法进行 SOFI 分析,采用 Image J 的插件 NanoJ SQUIRREL 对图片的 RSP(分辨率缩放皮尔逊系数)进行分析。

3 实验结果

图 1 是该实验的标记策略原理图。先将目的蛋白用带生物素的抗体识别(生物素耐消化,因此可以膨胀后染色),之后将样品进行水凝胶包埋并膨胀。为了防止水凝胶在成像缓冲液中剧烈缩小,需要对膨胀后的水凝胶进行二次包埋。参考 Zwettler 等^[20]的研究,此步水凝胶的膨胀系数减小到 3.2。之后用修饰有链霉亲和素的染料对生物素进行识别,达到对膨胀后目的蛋白染色的目的。染色后的水凝胶可以放在成像缓冲液中进行连续拍摄,从而实现荧光波动分析和 SOFI 处理。

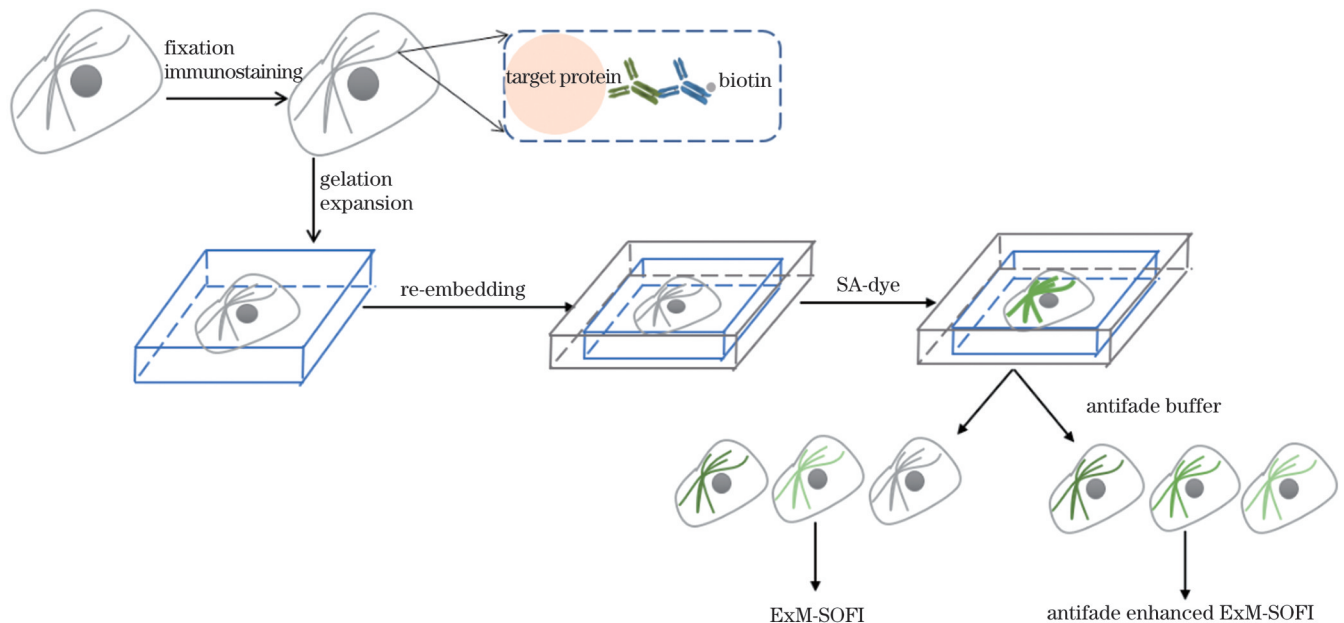


图 1 标记策略原理图

Fig. 1 Principle of tagging strategy

为了观察添加成像缓冲液对样品的影响,对缓冲液处理前后的图像进行了分析,结果如图 2 所示。其中图 2(a)是未加入成像缓冲液时的微管图片,图 2(b)

是加入成像缓冲液之后的微管图片。对图像进行分析可以发现,添加成像缓冲液后,样品的信号亮度相比未加成像缓冲液时增强了约 60%,如图 2(c)所示。对信

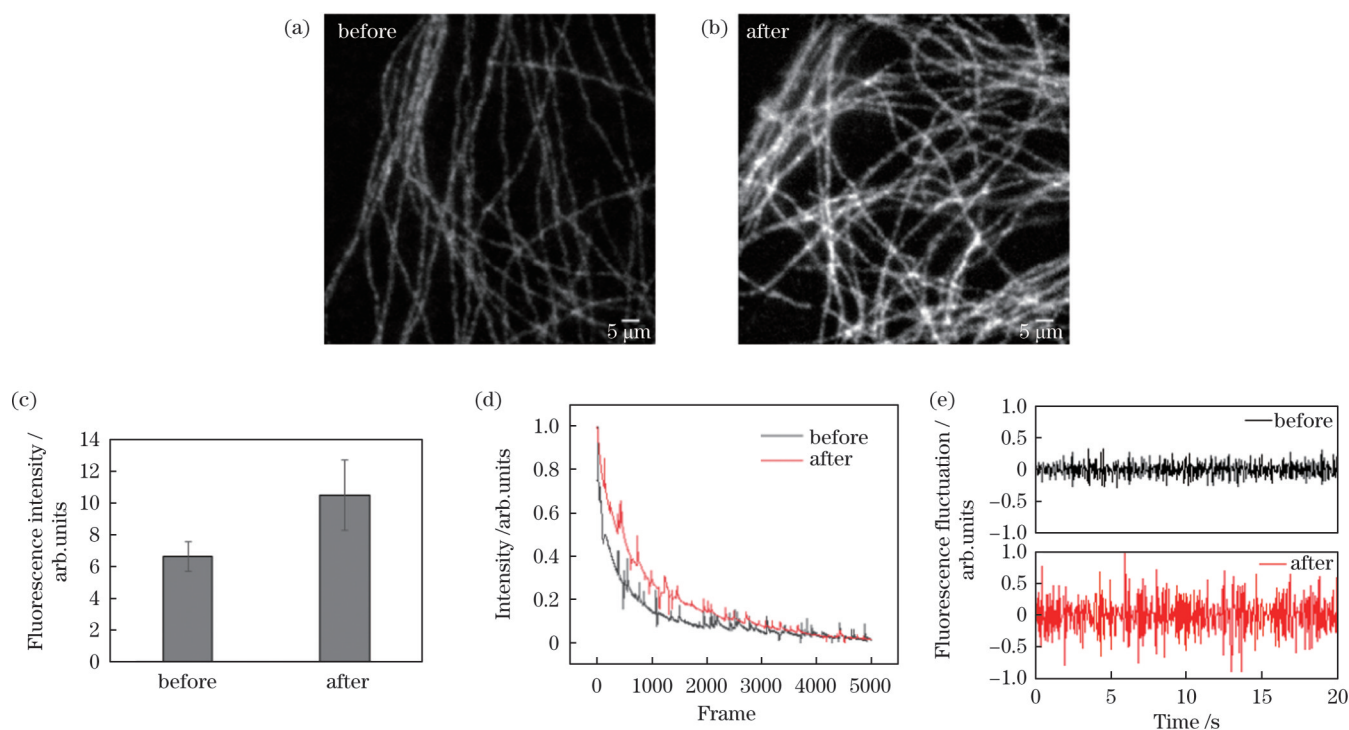


图 2 加入缓冲液前后的图像变化,以微管为例,用 Alexa488 染色。(a)未加入缓冲液的图像;(b)加入缓冲液之后的图像;(c)缓冲液处理前后图像的亮度;(d)缓冲液处理前后荧光信号的抗淬灭能力;(e)缓冲液处理前后荧光信号的波动幅度

Fig. 2 Image changes before and after buffer treatment, taking microtubules as an example, stained with Alexa488. (a) Image without buffer; (b) image after adding buffer; (c) image brightness before and after buffer treatment; (d) anti-quenching ability of fluorescence signal before and after buffer treatment; (e) fluctuation amplitude of fluorescence signal before and after buffer treatment

号淬灭的速度进行分析后发现,加入缓冲液之后的样品在拍摄过程中的信号淬灭速度明显减慢,如图 2(d)所示。在图 2(e)所示的荧光波动振幅分析中可以看到,缓冲液处理后荧光信号的波动振幅相较缓冲液处理前提高了数倍。整体的荧光信号增强、抗淬灭特性增强和荧光波动幅度增强都是提高 SOFI 成像质量和空间分辨率的重要因素。

另一个影响 SOFI 成像质量的重要参数是闪烁比。常规染料常由于闪烁比太高不利于 SOFI 分析,为了观察缓冲液处理前后图像的变化,本文对图像的闪烁比进行了分析,结果如图 3 所示。图 3(a)是未加缓冲液时的图像闪烁比分布,图 3(b)对应的图像闪烁比的统计结果;图 3(c)和图 3(d)是加入缓冲液后图像闪烁比的分布和统计。分析图 3 可以发现,添加缓冲液后的图像闪烁比由未加入缓冲液时的 80%~95% 下降到 35%~40%。有研究显示,根据 SOFI 算法累积量和闪烁比的关系,这个区间的闪烁比更佳^[29]。

荧光闪烁参数的变化可能是影响 SOFI 图像质量的重要因素,因此继续研究了缓冲液处理前后 ExM-SOFI 图像的分辨率。以微管为例,收集了其经缓冲液处理前后的 5000 张图像进行 SOFI 处理,处理结果如图 4 所示。图 4(a)和图 4(b)是未加入成像缓冲液时的微管原图以及 SOFI 分析结果,图 4(a)中的 5 张图从左到右依次是微管原图、一阶 SOFI 图像、二阶 SOFI

图像、三阶 SOFI 图像和四阶 SOFI 图像,图 4(b)是图 4(a)中 5 张图同一画线区域的分析。在图 4(b)中可以看出,随着 SOFI 阶数增加,伪影渐渐增加。对画线处一个原图上可分辨的分叉结构进行分析后发现,随着 SOFI 阶数增加,分叉部分消失。图 4(c)和图 4(d)是添加成像缓冲液后的微管原图以及 SOFI 分析结果,图 4(c)中的 5 张图从左到右依次是添加缓冲液后微管的原图、一阶 SOFI 图像、二阶 SOFI 图像、三阶 SOFI 图像和四阶 SOFI 图像,图 4(d)是上述 5 张图中同一画线区域的分析。在图 4(d)中可以看出,添加缓冲液后,随着 SOFI 阶数增加,微管的真实结构一直保持得较好。对画线处一个原图上不可分辨的分叉结构进行分析后发现,随着 SOFI 阶数增加,分叉结构慢慢出现,出现了约 170 nm 的分叉结构并且分叉结构较为稳定地存在。这一结果表明在缓冲液存在的条件下,对实际样品的宽场成像图进行 SOFI 分析可以达到约 170 nm 的分辨率。此外,本文还对缓冲液处理前后的 RSP 值进行了分析,该值越高表明一致性越好。缓冲液处理前的二阶和四阶 RSP 值分别为 0.929 与 0.658,缓冲液处理后的二阶和四阶 RSP 值分别为 0.953 与 0.724。缓冲液处理后的四阶 RSP 值高于缓冲液处理前的,表明缓冲液处理后的四阶图像的真实性较缓冲液处理前更高。对比两组图片可以看出,添加缓冲液后,图像在高阶 SOFI 中更能保持真实信息,

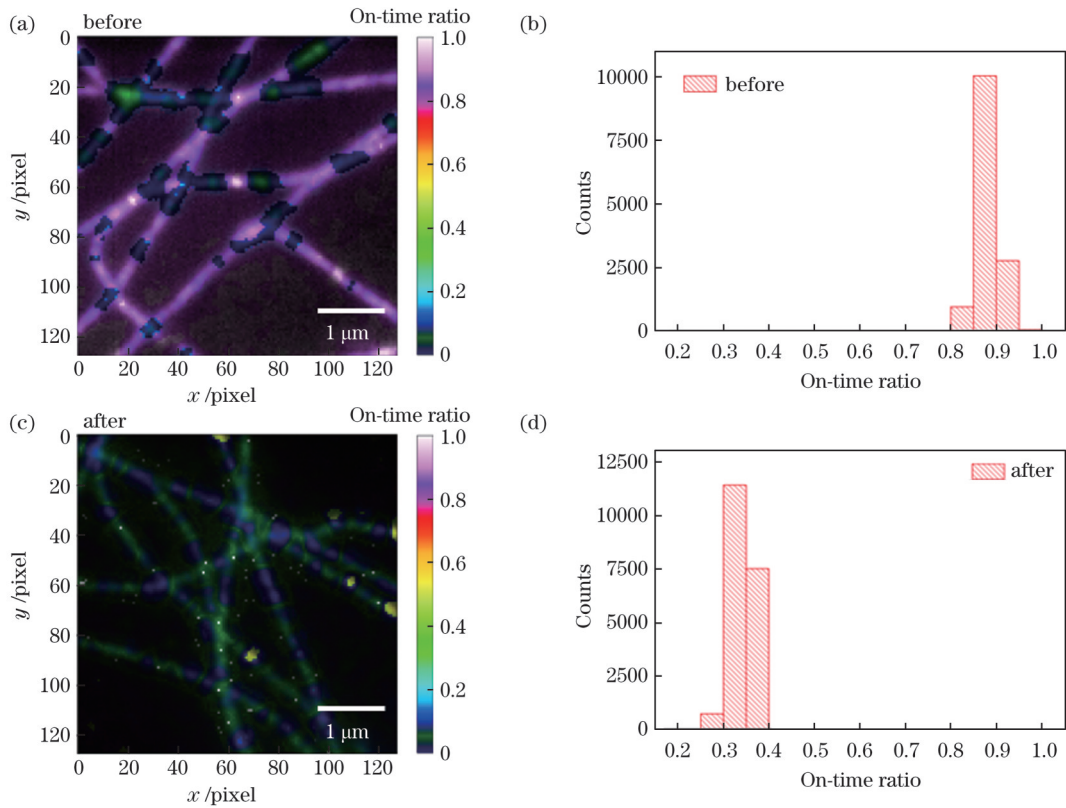


图 3 缓冲液处理前后图像闪烁比的变化。(a)未加缓冲液时的图像闪烁比分布;(b)未加缓冲液时图像闪烁比的统计;(c)加入缓冲液后的图像闪烁比分布;(d)加入缓冲液后图像闪烁比的统计

Fig. 3 Changes of image on-time ratio before and after buffer treatment. (a) Distribution of image on-time ratio before adding buffer; (b) statistics of image on-time ratio before adding buffer; (c) distribution of image on-time ratio after adding buffer; (d) statistics of image on-time ratio after adding buffer

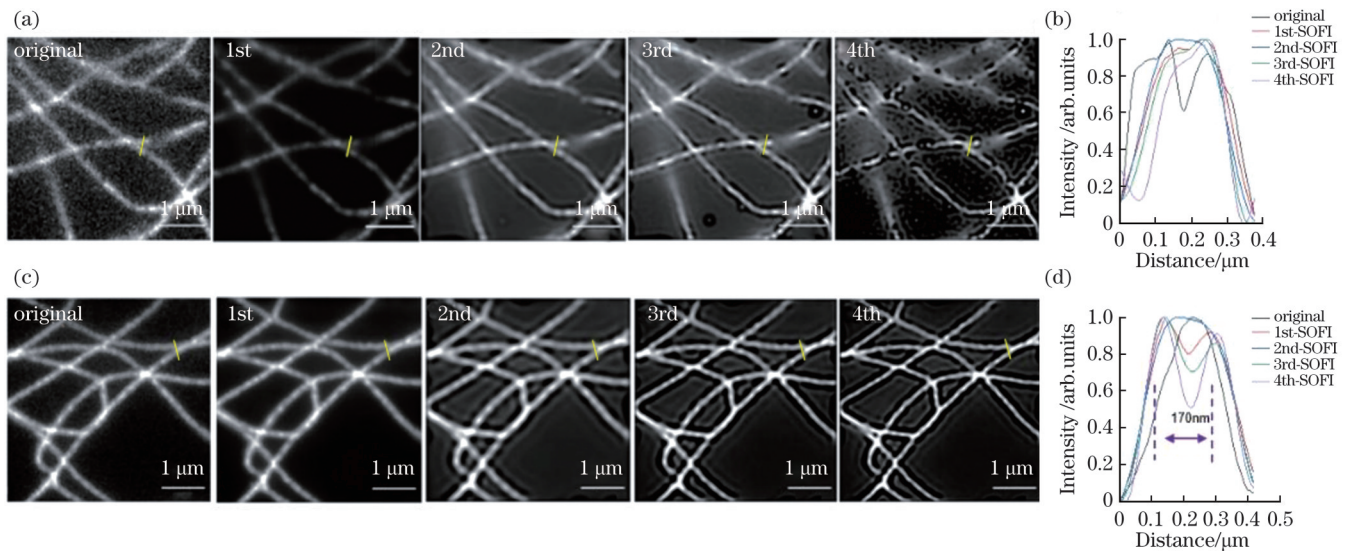


图 4 缓冲液处理前后微管的 SOFI 重构图。(a)未加入缓冲液时的微管原图以及 SOFI 处理后的一阶、二阶、三阶、四阶图像;(b)图 (a)中画线部分的亮度分布;(c)添加缓冲液后的微管原图以及 SOFI 处理后的一阶、二阶、三阶、四阶图像;(d)图 (c)中画线部分的亮度分布

Fig. 4 SOFI reconstruction images of microtubules before and after buffer treatment. (a) Original images of microtubules without buffer treatment and the first-order, second-order, third-order, and fourth-order images after SOFI processing; (b) brightness distribution of underlined part in figure (a); (c) original image of microtubules after adding buffer and the first-order, second-order, third-order, and fourth-order images after SOFI processing; (d) brightness distribution of underlined part in figure (c)

伪影出现得较少,并且更有利于通过 SOFI 算法来获得膨胀样品分辨率的提升。

接下来,对 CD63 标记的囊泡(与微管样品的处理过程相同)进行分析,结果如图 5 所示。图 5(a)和图 5(b)是加入成像缓冲液前的囊泡原图以及 SOFI 分析结果,图 5(a)中的 5 张图从左到右依次是未处理的囊泡原图、一阶 SOFI 图像、二阶 SOFI 图像、三阶 SOFI 图像和四阶 SOFI 图像,图 5(b)是 5 张图中同一画线区域的分析结果。在图 5(b)中可以看出,囊泡的分析结果与微管类似,随着阶数增加,伪影渐渐增多。对一个囊泡的膜边界进行分析后发现,原图中可看见的囊泡边界形成的双峰结构的信号随着 SOFI 算法阶

数的增加渐渐变得杂乱。这表明部分真实结构在高阶 SOFI 中丢失。图 5(c)和图 5(d)是加入成像缓冲液后的囊泡原图以及 SOFI 分析结果,图 5(c)中的 5 张图从左到右依次是添加缓冲液后的囊泡原图、一阶 SOFI 图像、二阶 SOFI 图像、三阶 SOFI 图像和四阶 SOFI 图像,图 5(d)是 5 张图中同一画线区域的分析结果。由图 5(c)可以看出囊泡的真实结构在 SOFI 阶数增加过程中一直保持得较好。对一个囊泡的膜边界进行分析后发现,随着阶数增加,双峰结构一直较为稳定。对比囊泡经缓冲液处理前后的图像可以看出,添加缓冲液后,囊泡在高阶 SOFI 中的伪影较少且更真实,结构保持得更好。

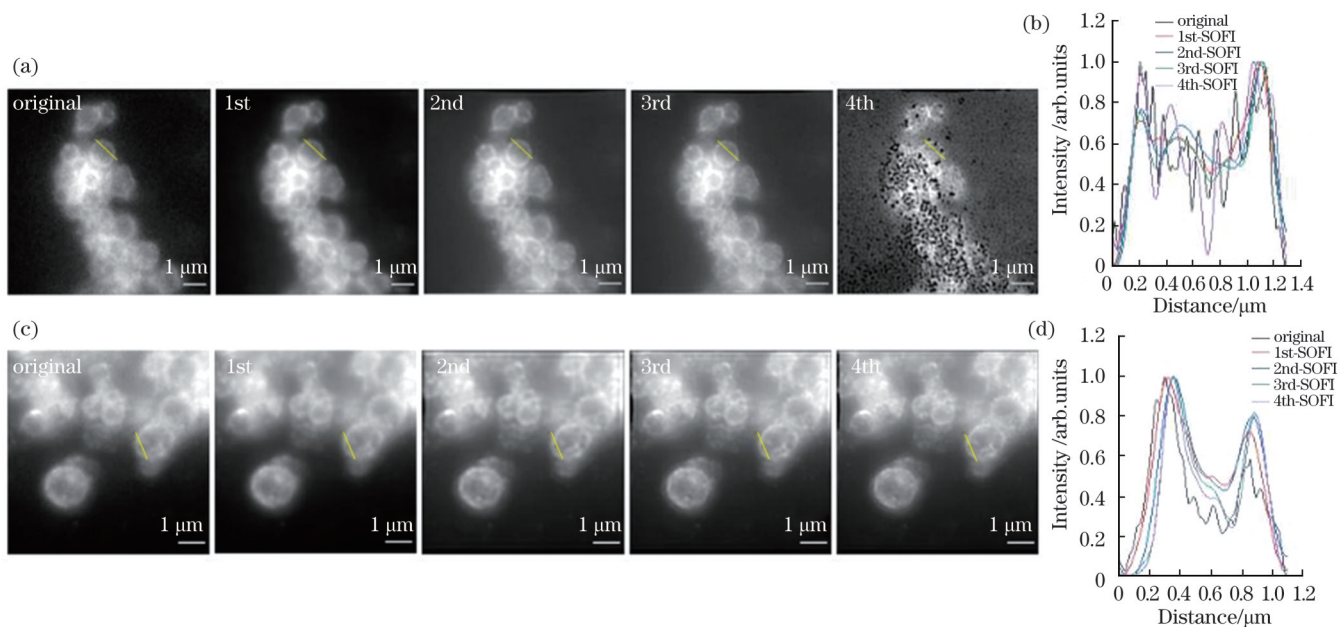


图 5 缓冲液处理前后囊泡的 SOFI 重构图。(a)未加入缓冲液的囊泡原图以及 SOFI 处理后的一阶、二阶、三阶、四阶图像;(b)图(a)中画线部分的亮度分布;(c)添加缓冲液后的囊泡原图以及 SOFI 处理后的一阶、二阶、三阶、四阶图像;(d)图(c)中画线部分的亮度分布

Fig. 5 SOFI reconstruction images of vesicles before and after buffer treatment. (a) Original images of vesicles without buffer and the first-order, second-order, third-order, and fourth-order images after SOFI treatment; (b) brightness distribution of underlined part in figure (a); (c) original images of vesicle after adding buffer and the first-order, second-order, third-order, and fourth-order image after SOFI treatment; (d) brightness distribution of underlined part in figure (c)

4 结 论

ExM-SOFI 技术是一种受仪器设备限制较小且又可以增加分辨率的复合膨胀技术,但由于膨胀样品本身信号较弱,在 SOFI 连续拍摄过程中不能达到最佳效果。鉴于此,本课题组提出了一种抗淬灭增强的 ExM-SOFI 技术。该技术在原来 ExM-SOFI 的基础上通过添加成像缓冲液来降低荧光信号在拍摄过程中的淬灭,同时增强了样品的荧光信号强度、荧光波动幅度和闪烁比,使普通染料也可以在 ExM-SOFI 中有较好表现。以实际样品为例证明了这种方法可以使样品在高阶 SOFI 中保留更多真实信息,减少了伪影,是一种效果更好的 ExM-SOFI 超分辨成像方法。

参 考 文 献

- [1] 钟佳慧, 伍君鑫, 孔亚伟, 等. 酵母自体荧光寿命显微图像的自动分析方法[J]. 激光与光电子学进展, 2022, 59(6): 0617019. Zhong J H, Wu J X, Kong Y W, et al. Automated analysis methods for autofluorescence lifetime microscopic images of yeast [J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2022, 59(6): 0617019.
- [2] 王璐, 殷高方, 赵南京, 等. 基于可变荧光统计分布的水体藻类活体细胞数分析方法[J]. 光学学报, 2022, 42(6): 0617001. Wang L, Yin G F, Zhao N J, et al. Analytical method of viable algae cells in water based on variable fluorescence statistical distribution[J]. Acta Optica Sinica, 2022, 42(6): 0617001.
- [3] 冯哲, 钱骏. 近红外二区荧光活体生物成像技术研究进展[J]. 激光与光电子学进展, 2022, 59(6): 0617001. Feng Z, Qian J. Advances on *in vivo* fluorescence bioimaging in the second near-infrared window[J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2022, 59(6): 0617001.
- [4] 李文文, 王中阳. 基于量子关联的超分辨荧光显微技术研究进展

- [J]. 激光与光电子学进展, 2021, 58(10): 1011012.
- Li W W, Wang Z Y. Research progress of super-resolution fluorescence microscopy based on quantum correlation[J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2021, 58(10): 1011012.
- [5] Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution[J]. Science, 2006, 313(5793): 1642-1645.
- [6] Hess S T, Gould T J, Gunewardene M, et al. Ultrahigh resolution imaging of biomolecules by fluorescence photoactivation localization microscopy[J]. Methods in Molecular Biology, 2009, 544: 483-522.
- [7] Klar T A, Jakobs S, Dyba M, et al. Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(15): 8206-8210.
- [8] Gustafsson M G L. Nonlinear structured-illumination microscopy: wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(37): 13081-13086.
- [9] 林曼娜, 向承林, 李建军, 等. LSM 880 with Airyscan 激光扫描共聚焦显微镜高级功能和管理[J]. 电子显微学报, 2019, 38(3): 271-275.
- Lin M N, Xiang C L, Li J J, et al. Advanced functions and management of laser scanning confocal microscopy LSM 880 with Airyscan[J]. Journal of Chinese Electron Microscopy Society, 2019, 38(3): 271-275.
- [10] Dertinger T, Colyer R, Iyer G, et al. Fast, background-free, 3D super-resolution optical fluctuation imaging (SOFI)[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(52): 22287-22292.
- [11] Chen F, Tillberg P W, Boyden E S. Expansion microscopy[J]. Science, 2015, 347(6221): 543-548.
- [12] Chozinski T J, Halpern A R, Okawa H, et al. Expansion microscopy with conventional antibodies and fluorescent proteins[J]. Nature Methods, 2016, 13(6): 485-488.
- [13] Gambarotto D, Hamel V, Guichard P. Ultrastructure expansion microscopy (U-ExM)[J]. Methods in Cell Biology, 2021, 161: 57-81.
- [14] Tillberg P. Protein-retention expansion microscopy (ExM): scalable and convenient super-resolution microscopy[J]. Methods in Molecular Biology, 2021, 2304: 147-156.
- [15] Hausen P, Dreyer C. The use of polyacrylamide as an embedding medium for immunohistochemical studies of embryonic tissues[J]. Stain Technology, 1981, 56(5): 287-293.
- [16] Kunz T C, Götz R, Gao S Q, et al. Using expansion microscopy to visualize and characterize the morphology of mitochondrial cristae[J]. Frontiers in Cell and Developmental Biology, 2020, 8: 617.
- [17] Pesce L, Cozzolino M, Lanzanò L C, et al. Measuring expansion from macro- to nanoscale using NPC as intrinsic reporter[J]. Journal of Biophotonics, 2019, 12(8): e201900018.
- [18] Shi X Y, Li Q, Dai Z P, et al. Label-retention expansion microscopy[J]. The Journal of Cell Biology, 2021, 220(9): e202105067.
- [19] Wunderlich L C S, Ströhl F, Ströhl S, et al. Superresolving the kidney: a practical comparison of fluorescence nanoscopy of the glomerular filtration barrier[J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2021, 413(4): 1203-1214.
- [20] Zwettler F U, Reinhard S, Gambarotto D, et al. Molecular resolution imaging by post-labeling expansion single-molecule localization microscopy (Ex-SMLM)[J]. Nature Communications, 2020, 11: 3388.
- [21] Liu J, Fang X F, Liu Z H, et al. Expansion microscopy with multifunctional polymer dots[J]. Advanced Materials, 2021, 33(25): e2007854.
- [22] Wang B J, Yao L F, Jing Y Y, et al. Multicomposite super-resolution microscopy: enhanced Airyscan resolution with radial fluctuation and sample expansions[J]. Journal of Biophotonics, 2020, 13(5): e2419.
- [23] Dertinger T, Heilemann M, Vogel R, et al. Superresolution optical fluctuation imaging with organic dyes[J]. Angewandte Chemie, 2010, 49(49): 9441-9443.
- [24] Liu Z H, Liu J, Zhang Z, et al. Narrow-band polymer dots with pronounced fluorescence fluctuations for dual-color super-resolution imaging[J]. Nanoscale, 2020, 12(14): 7522-7526.
- [25] Glogger M, Spahn C, Enderlein J, et al. Multi-color, bleaching-resistant super-resolution optical fluctuation imaging with oligonucleotide-based exchangeable fluorophores[J]. Angewandte Chemie, 2021, 60(12): 6310-6313.
- [26] 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]. Nature Biotechnology, 2016, 34(9): 987-992.
- [27] Li R Q, Chen X Z, Lin Z X, et al. Expansion enhanced nanoscopy[J]. Nanoscale, 2018, 10(37): 17552-17556.
- [28] Geissbühler S, Bocchio N, Dellagiocoma C, et al. Balanced super-resolution optical fluctuation imaging (bSOFI)[J]. Proceedings of SPIE, 2012, 27(92): 262-272.
- [29] Wang B J, Liu Z J, Zhou L, et al. Active-modulated, random-illumination, super-resolution optical fluctuation imaging[J]. Nanoscale, 2020, 12(32): 16864-16874.

Anti-Quenching Enhanced ExM-SOFI Technology

Zhang Li¹, Liu Zhijia², Fei Yiyan², Mi Lan^{2**}, Ma Jiong^{1,2,3*}

¹The Multiscale Research Institute of Complex Systems (MRICS), School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China;

²Department of Optical Science and Engineering, School of Information Science and Engineering, Fudan University, Shanghai 200433, China;

³Institute of Biomedical Engineering and Technology, Academy for Engineer and Technology, Fudan University, Shanghai 200433, China

Abstract

Objective Expansion super-resolution technology, in which resolution is improved by improving the corresponding sample, has emerged in recent years. Owing to its strong compatibility with other optical technologies and its high resolution, it has attracted an increasing amount of research attention. The combination of expansion super-resolution technology and other super-resolution techniques is one main development direction for expansion super-resolution technology. Expansion combined with optical fluctuation

super-resolution technology (ExM-SOFI) is a widely used compound expansion technology with relatively few restrictions. To enhance the imaging of the existing ExM-SOFI, we applied an imaging buffer to enhance the anti-quenching ability of the expansion sample during shooting. The fluorescence intensity, fluorescence fluctuation amplitude, and on-time ratio of common dyes in ExM-SOFI were improved. Finally, the staining results of the microtubules and vesicles indicate that the use of this technique can make the sample more realistic, with fewer artifacts, and can improve the final resolution of expansion samples in high-order SOFI technology.

Methods In this study, we derived an anti-quenching-enhanced ExM-SOFI technique by improving the existing ExM-SOFI technique using an imaging buffer. First, the samples were labeled with biotinylated antibodies. Biotins can retain recognition sites after expansion, for post-expansion staining, to reduce signal loss. An expanded hydrogel was then obtained using a common expansion protocol. Next, the expanded hydrogel was cut into a suitable size and re-embedded in a high-concentration solution to prevent it from shrinking. After re-embedding, the expanded hydrogel was incubated with a dye modified with streptavidin. During photography, the stained hydrogel was immersed in an imaging buffer for imaging. We used an imaging buffer with an oxygen-scavenging system as the main component. The fluorescence intensity, anti-quenching ability, and fluorescence fluctuation amplitude of the images before and after the buffer treatment were analyzed. In addition, the on-time ratio and artifacts of the SOFI images before and after buffer treatment were analyzed, and the changes in different orders of SOFI were compared.

Results and Discussions The experimental design is illustrated in Fig. 1. According to the analysis results of the images before and after the imaging buffer treatment, the fluorescence intensity of the sample with the imaging buffer was approximately 60% higher than that without the imaging buffer [Fig. 2(c)]. The signal quenching speed of the sample with the imaging buffer was slower during the shooting process compared with that of the sample without the imaging buffer [Fig. 2(d)]. In the analysis of the fluorescence fluctuation amplitude [Fig. 2(e)], the fluorescence fluctuation amplitude of the image after the buffer was added was several times larger than that of the image before the buffer was added. Enhancements in the fluorescence intensity, anti-quenching ability, and fluorescence fluctuation amplitude are important to improve the quality and resolution of SOFI imaging. The on-time ratio is an important parameter that affects the imaging quality of SOFI; conventional dyes are often not conducive to SOFI analysis because of their high on-time ratios. We analyzed the on-time ratio of the images before and after the imaging buffer was added, and the results are shown in Fig. 3. Compared with the image without a buffer, the overall on-time ratio of the image with a buffer decreased from 80%–95% to 35%–40%. In a study by Wang *et al.* on SOFI, an on-time ratio in this interval was better for SOFI analysis. In addition, we analyzed the resolution-scaled Pearson (RSP) correlation values before and after the buffer was added; higher values indicate a better agreement. The RSP value after the buffer was added was higher than that before, indicating that the image with buffer was more authentic. In the comparison of different orders of SOFI (Figs. 4 and 5), in the imaging results of both the microtubule or vesicle, fewer image artifacts existed after the buffer treatment than before, and the real structure was better maintained in high-order SOFI.

Conclusions ExM-SOFI technology is a composite expansion technology that has relatively few equipment limitations and can increase resolution. However, owing to the loss and dilution of fluorescence signals during the preparation of expanded samples, the signal of the expanded samples can be weak, making it difficult to achieve the best results during SOFI continuous shooting. In this study, we proposed an anti-quenching enhanced ExM-SOFI technology that combines imaging buffer technology with the original ExM-SOFI to reduce fluorescence quenching during shooting. We found that this technique enhanced both the intensity and fluctuation amplitude of the fluorescence. The on-time ratio was also reduced to a range that was more suitable for SOFI analysis, enabling ordinary dyes to perform better in ExM-SOFI. An increase in the RSP value also indicated that this technique increases the credibility of the image. Finally, a comparison of different order SOFI images showed that this method reduced artifacts and better maintained the real structure in high-order SOFI.

Key words bio-optics; ExM-SOFI; expansion super-resolution; optical fluctuation super-resolution; imaging buffer; enhanced anti-quenching