

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ОДИНОЧНЫХ КЛЕТОК *Escherichia coli* В СОСТОЯНИИ SOS-ОТВЕТА ПРИ ПОМОЩИ ЭКСПАНСИОННОЙ МИКРОСКОПИИ

© 2023 г. Н. А. Румянцева¹, Д. М. Голофеева¹, И. Е. Вишняков^{2, *}, А. Д. Ведякин¹

¹Научно-исследовательский комплекс “Нанобиотехнологии” Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого, Санкт-Петербург, 195251 Россия

²Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

*E-mail: innvish@incras.ru

Поступила в редакцию 23.12.2022 г.

После доработки 21.01.2023 г.

Принята к публикации 23.01.2023 г.

Экспансионная микроскопия (Expansion microscopy, ExM) — метод пробоподготовки, позволяющий добиться улучшенной визуализации структур за счет физического расширения образца. Этот метод используется в сочетании с традиционной световой микроскопией и позволяет без применения сложных технических устройств, характерных для методов сверхразрешающей микроскопии (super-resolution microscopy), добиться визуализации биологических структур с более высоким разрешением. В отличие от методов сверхразрешающей микроскопии, экспансионная микроскопия не позволяет преодолеть дифракционный предел, однако наблюдаемый эффект можно считать эквивалентным увеличению пространственного разрешения. Относительная простота метода и нетребовательность к используемому микроскопу сделали экспансионную микроскопию довольно популярным методом для визуализации различных биологических структур. В настоящей работе описано использование экспансионной микроскопии для визуализации в клетках *Escherichia coli*, находящихся в состоянии SOS-ответа, ДНК и структур, формируемых белком FtsZ. Результаты работы подтверждают полученные ранее данные о том, что белок FtsZ в клетках, находящихся в состоянии SOS-ответа, распределен неравномерно. Используемый в работе протокол визуализации клеток *E. coli*, предварительно закрепленных на поверхности стекла, с помощью метода экспансионной микроскопии может быть использован в будущем для изучения внутренних структур других клеток — как бактериальных, так и эукариотических.

Ключевые слова: экспансионная микроскопия, белок FtsZ, SOS-ответ, бактериальное деление

DOI: 10.31857/S0041377123030070, **EDN:** VDSBHA

Хорошо известно, что световая микроскопия и, в особенности, ее разновидность — флуоресцентная микроскопия — обладает множеством достоинств, которые определяют ее широкое применение при изучении биологических объектов (Sanderson et al., 2014). Наряду с достоинствами, световая микроскопия имеет и недостатки, среди которых одним из наиболее существенных является сравнительно низкое пространственное разрешение, которое ограничено дифракционным пределом на уровне примерно половины длины волны используемого светового излучения (Renz, 2013). Дифракционный предел — фундаментальное явление и следствие волновой природы света; фактически, это минимальное расстояние, на котором могут находиться 2 точечных объекта и при этом быть отличимыми друг от друга (разрешимыми). Кроме длины волны, дифракционный предел зависит от числовой апертуры, что делает предпочтительным использование объективов с высокой числовой апертурой (например, с масляной иммерсией). Для световых микроскопов предел раз-

решения обычно оценивают на уровне 200–300 нм (в фокальной плоскости).

В настоящее время описано несколько подходов, позволяющих преодолеть дифракционный предел и добиться улучшения разрешения вплоть до единиц нанометров. Принципы таких методов, собирательно называемых методами сверхразрешающей микроскопии (или микроскопии сверхвысокого разрешения), существенно отличаются, однако общая идея может быть сформулирована следующим образом: выигрыш в пространственном разрешении достигается за счет ухудшения временного разрешения и (или) применения достаточно сложных технических дополнений к световому микроскопу. Такие технические дополнения являются дорогостоящими и могут включать лазерное освещение с высокой плотностью мощности, сложные схемы сканирования образца, создание структурированной засветки образца, использование двух оппозитных объективов и др. Кроме сложных технических решений, эти методы обычно требуют продвинутого и трудного в

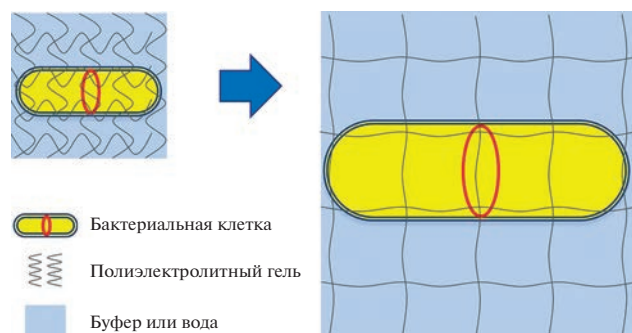


Рис. 1. Общий принцип экспансионной микроскопии на примере бактериальной клетки, заключенной в полиэлектролитный гель. Клетка обозначена желтым, красным отмечено Z-кольцо, серые линии — полимеры матрицы геля. Слева — гель с заключенной в него клеткой до расширения (в солевом буфере), справа — после расширения (в воде). Полимеризация геля осуществляется в солевом буфере, в котором заряженные молекулы, формирующие гель, экранированы и практически не взаимодействуют друг с другом, в результате чего формируются слабо упорядоченные полимеры, составляющие матрицу геля. В бессолевой среде взаимное отталкивание одноименно заряженных мономеров полиэлектролитного геля вызывает его значительное изотропное расширение. При этом полимеры геля распрямляются, а образец, заключенный в гель, увеличивается.

обращении программного обеспечения, что дополнительно увеличивает стоимость и снижает их доступность для исследователей (Клементьева и др., 2016; Feng et al., 2018).

В 2015 г. был предложен новый метод пробоподготовки, который предполагает заключение образца в гель и его последующее расширение в несколько раз. Метод получил название экспансионной микроскопии (Chen et al., 2015). Общий принцип экспансионной микроскопии на примере работы с бактериальной клеткой представлен на рис. 1. Ключевая идея метода — заключить образец в гель таким образом, чтобы внутриклеточные структуры оказались сшиты с матрицей геля, а затем осуществить расширение геля, в ходе которого связанная с гелем клетка также расширяется (Wassie et al., 2019).

Протоколы экспансионной микроскопии в опубликованных работах различаются; тем не менее их основные этапы схожи между собой. Вначале образец подвергают фиксации и пермеабиллизации, после чего в рамках некоторых протоколов (например, см.: Tillberg et al., 2016) осуществляют иммунофлуоресцентное окрашивание. К сожалению, непосредственное окрашивание объекта интереса антителами, конъюгированными с флуоресцентными красителями, на данном этапе пробоподготовки затруднено, так как в ходе дальнейшей пробоподготовки осуществляется расщепление белков, что зачастую приводит к разрушению антител и, соответственно, удалению флуоресцентной метки.

Для флуоресцентного мечения вначале был предложен подход, использующий олигонуклеотиды, которые связывают флуорофор с матрицей геля. Вторичные антитела, используемые для окрашивания, сшиты с олигонуклеотидом, который затем гибридизуется с модифицированным олигонуклеотидом (добавлены флуоресцентный краситель и группа, реагирующая с матрицей геля). Использование олигонуклеотидов позволяет сохранить положение флуоресцентных меток в геле в ходе дальнейшего протеолиза. Вместо использования антител на этом этапе пробоподготовки возможно также использование флуоресцентных белков (основано на их устойчивости ко многим протеазам) (Chozinski et al., 2016). Кроме того, в некоторых протоколах данный этап мечения пропускают, а флуоресцентное окрашивание (обычно антителами) осуществляют после протеолиза (Chozinski et al., 2016).

Далее образец подвергают дополнительной модификации (функционализации), что обеспечивает добавление к определенным молекулам образца (например, аминокислотам) реакционно-способных групп, которые в дальнейшем позволяют сшить образец с матрицей геля. Пример функционализации образца — использование реагента Acryloyl-X (Tillberg et al., 2016). Затем функционализированный образец заключают в полиакриламидный гель, при этом полимеризацию осуществляют в растворе с высокой ионной силой, что приводит к экранированию заряженных мономеров матрицы геля и обеспечивает формирование слабо упорядоченных полимеров. В дальнейшем, после основных этапов пробоподготовки, расширение геля происходит в результате электростатического отталкивания молекул, составляющих матрицу геля, при помещении геля в раствор с низкой ионной силой (например, в деионизованную воду). При этом неупорядоченные полимеры матрицы геля распрямляются — именно этим ограничена степень расширения геля (обычно примерно в 4 раза в каждом направлении, хотя некоторые протоколы позволяют добиться большей степени расширения (Li et al., 2022)).

Однако расширение образца непосредственно после его заключения в гель затруднено, так как биологические молекулы (в основном белки и их комплексы) обладают высокой прочностью и препятствуют расширению. Поэтому после заключения в гель осуществляют расщепление белковых структур образца (в основном, путем протеолиза, например, протеиназой К), а в ряде случаев — нуклеиновых кислот и клеточной стенки (у бактерий). Для расщепления белков можно использовать также нагрев. Следует отметить, что расщепление белковых структур часто приводит к уничтожению эпитопов, что делает невозможным иммунофлуоресцентное мечение образца после его обработки. Для такого мечения используют ограниченный протеолиз, одновременно сохраняющий эпитопы и делающий возможным расширение образца.

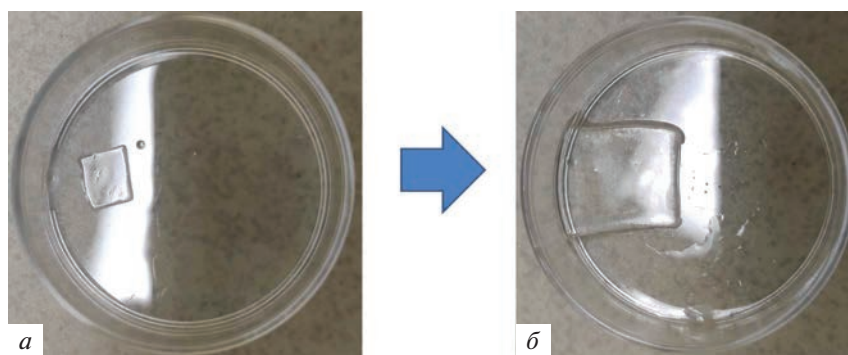


Рис. 2. Расширение полиэлектrolитного геля. Исходно фрагмент геля находится в солевом растворе (а), а затем переносится в деионизованную воду, где происходит его расширение в несколько раз (б).

После расщепления иногда проводят иммунофлуоресцентное окрашивание образца (зависит от протокола подготовки), а также окрашивание ДНК и (или) других структур соответствующими красителями. После этого гель с заключенным в него образцом переносят в раствор с низкой ионной силой (например, деионизованную воду), где происходит его изотропное расширение в несколько раз (см. рис. 2). Затем образец визуализируют.

Основное преимущество метода экспансионной микроскопии — возможность визуализации образца с четырехкратным выигрышем в разрешении структур с использованием стандартного флуоресцентного микроскопа, что эквивалентно использованию методов сверхразрешающей микроскопии. Более того, в результате применения некоторых протоколов удается получить и более высокую степень расширения, например, за счет последовательного перезаключения образца в гель (Chang et al., 2017). Другое важное преимущество метода экспансионной микроскопии заключается в том, что в ходе расширения образца увеличивается доступность структур для окрашивания, в том числе белковых эпитопов, поэтому экспансионная микроскопия может существенно помочь в изучении локализации компонентов в сложных белковых комплексах.

Наряду с достоинствами, метод экспансионной микроскопии обладает и недостатками. В частности, в случае недорасщепления структур расширение образца может оказаться недостаточным или неоднородным (последнее приводит к искажению исследуемых структур). Напротив, чрезмерное расщепление, как уже отмечено выше, уничтожает эпитопы белков, что препятствует иммунофлуоресцентному мечению структур после расщепления образца и даже может полностью разрушить структуру образца, что делает невозможным его визуализацию. Поэтому оптимизация протокола расщепления образца является одним из важнейших условий успешной реализации всего метода. Другой недостаток связан с тем, что в процессе полимеризации геля может происходить обесцвечивание флуоресцентных мо-

лекул (Tillberg et al., 2016). Это ограничивает флуоресцентное мечение структур до заключения образца в гель. Для преодоления такого недостатка необходимо использовать только совместимые с методом флуоресцентные красители. Кроме того, можно метить структуры уже после расщепления образца.

В русскоязычной литературе нам удалось найти несколько работ, посвященных использованию экспансионной микроскопии для исследования тканей. Например, в одной из статей авторы продемонстрировали использование метода экспансионной микроскопии для изучения тканей головного мозга (Деревцова и др., 2021). Работы, использующие этот метод для изучения одиночных клеток, нам не удалось найти.

В настоящей работе метод экспансионной микроскопии был использован для визуализации одиночных клеток *Escherichia coli*, предварительно закрепленных на поверхности стекла. Использование метода позволило показать, что в состоянии SOS-ответа белок FtsZ неравномерно распределен по клетке, что свидетельствует о неполной разборке полимеров, формируемых данным белком. Кроме того, было охарактеризовано распределение ДНК в бактериальной клетке в состоянии SOS-ответа. Протокол пробоподготовки, используемый в настоящей работе, может быть использован в будущем для визуализации иных объектов, например, адгезивных культур клеток эукариот, а также бактерий.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

Бактерии. Использовали бактерии *Escherichia coli* штамма BW27783 с геном белка слияния FtsZ:mNeon-Green (Moore et al., 2013). Культуру выращивали в жидкой среде LB при 37°C в термошейкере до величин оптической плотности среды (OD_{600}) 0.2, затем активировали (при необходимости) SOS-ответ облучением ультрафиолетовым светом в течение 1 мин в трансиллюминаторе (Vilber Lourmat Infinity-1500/36M). Через 30 мин или 1 ч после активации SOS-ответа

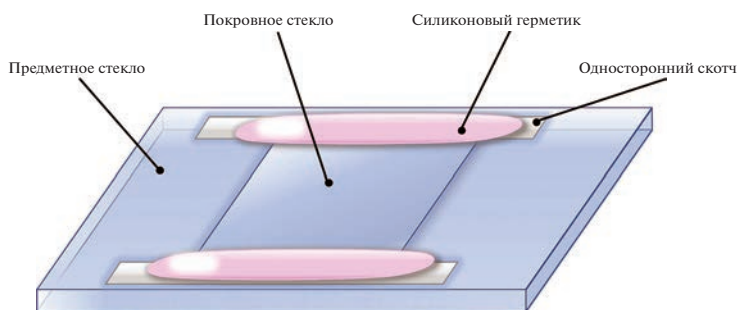


Рис. 3. Слайд, используемый для закрепления бактериальных клеток на поверхности покровного стекла. Слайд состоит из предметного и покровного стекла, разделенных слоем одностороннего скотча (скотч обращен липкой стороной к предметному стеклу). Силиконовый герметик обеспечивает быстрое и надежное крепление стекол и при этом позволяет легко разбирать слайд в ходе дальнейшей работы. Бактерии закрепляются на внутренней поверхности покровного стекла, для улучшения закрепления стекло покрыто поли-*L*-лизинем.

отбирали образцы для дальнейшей пробоподготовки. В качестве контроля брали культуру, не подвергавшуюся облучению ультрафиолетом.

Пробоподготовка. Клетки подготавливали согласно протоколу (Basic protocol 1; Asano et al., 2018) с небольшими изменениями. Фиксацию осуществляли добавлением в среду формальдегида до конечной концентрации 2.6%, глутаральдегида — 0.04% и натрий-фосфатного буфера (pH 7.5) — 32 мМ. Затем клетки инкубировали 10 мин на льду и 50 мин при комнатной температуре. Клетки трижды промывали фосфатно-солевым буферным раствором (PBS), каждый раз центрифугируя образцы при 6000 g в течение 2 мин. После этого клетки помещали в промываемую камеру, полученную из предметного и покровного стекла, которые разделены скотчем (рис. 3). По-

кровные стекла для камеры подвергали плазменной очистке. Камеру предварительно обрабатывали поли-*L*-лизинем в течение 10 мин для лучшего закрепления бактерий на поверхности стекла.

Далее камеру переворачивали и оставляли на 30 мин для закрепления бактерий на покровном стекле. Дальнейшие операции выполняли путем смены растворов в полученной промываемой камере. Для разрушения клеточной стенки клетки инкубировали при 37°C в течение ночи в растворе лизоцима в PBS в концентрации 2 мг/мл. На следующий день клетки трижды промывали PBS. Далее действовали согласно протоколу (Asano et al., 2018). В частности, раствор Acryloyl-X SE (10 мг/мл в DMSO) разводили в PBS до конечной концентрации 0.1 мг/мл. Далее клетки инкубировали в полученном растворе в течение 2–3 ч при комнатной температуре. Затем клетки дважды промывали PBS.

Заклучение бактериальных клеток в гель осуществляли с использованием специальной камеры для заливки геля (рис. 4). Алгоритм заливки схематично изображен на рис. 5. Вначале удаляли силиконовый герметик, соединяющий покровное стекло с другими частями промываемой камеры. Затем покровное стекло с закрепленными на нем клетками отделяли и накрывали им камеру для заливки геля с налитым в нее раствором для полимеризации геля. Для заливки геля использовали раствор Stock X (86 г/л акрилата натрия, 25 г/л акриламида, 1.5 г/л N,N-метиленбисакриламида, 117 г/л NaCl; в качестве основы использовали PBS), воду, 10%-ный TEMED (объем/объем) и 10%-ный PSA (вес/объем), которые смешивали в соотношении 47 : 1 : 1 : 1. Затем камеру оставляли при 37°C на 1 ч для полимеризации геля.

После этого покровное стекло отделяли и переносили гель в 6-луночный планшет, где осуществляли расщепление протеиназой K, окрашивание ДНК и расширение геля. Протеолиз проводили в буфере (0.5%-ный Triton X-100, 1 мМ EDTA, 50 мМ Tris-HCl pH 8.0, 46.7 г/л NaCl) с добавлением протеиназы K до концентрации 8 ед./мл. Гель инкубировали в рас-

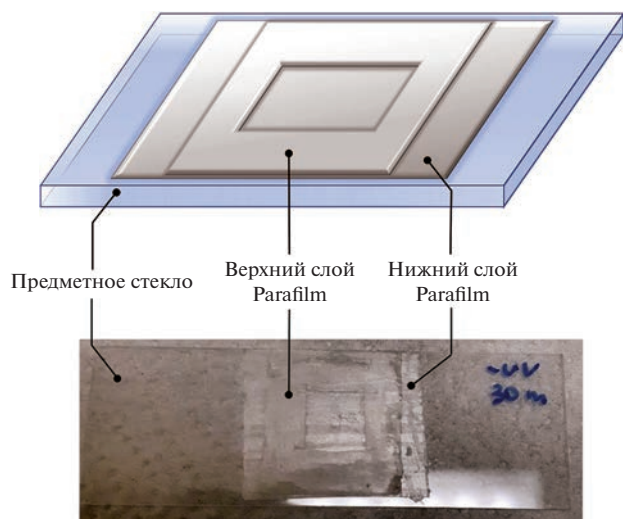


Рис. 4. Слайд, используемый для заливки геля. Данный слайд состоит из предметного стекла и двух слоев пленки Parafilm: нижний слой сплошной, играет роль нижней границы камеры; верхний слой имеет прямоугольный вырез посередине с размерами примерно 7 × 7 мм и играет роль боковых границ камеры.

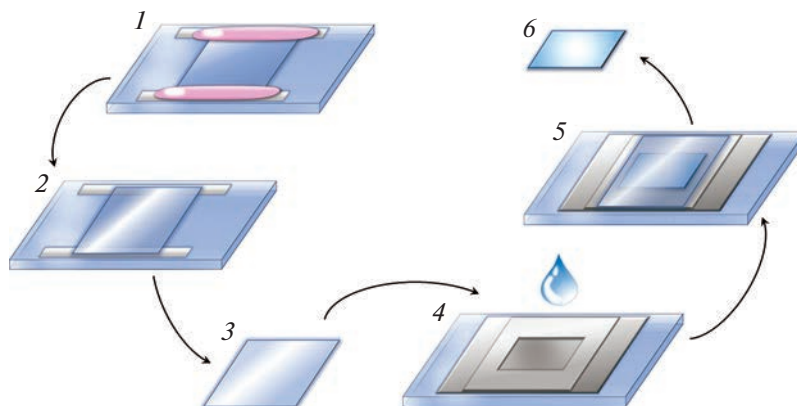


Рис. 5. Алгоритм заключения бактериальных клеток в полиэлектrolитный гель. 1 – Вначале собирают слайд, описанный на рисунке 3а; бактериальные клетки помещают в слайд для их закрепления на поверхности покровного стекла; далее с ними осуществляют подготовительные операции, такие как химическая фиксация, пермеабилзация, функционализация амино-групп и т.д. 2 – Слайд разбирают, для этого удаляют силиконовый герметик. 3 – Покровное стекло с бактериальными клетками снимают, сохраняя его ориентацию. 4 – В слайд для заливки геля помещают раствор компонентов для геля. 5 – Слайд для заливки накрывают покровным стеклом (клетками в сторону геля) и инкубируют в течение необходимого времени с целью полимеризации геля. 6 – Полученный брусочек полиэлектrolитного геля с заключенными в него бактериальными клетками отделяют от заливочной формы и осуществляют дальнейшие этапы пробоподготовки.

творе в течение ночи в темноте при комнатной температуре. После раствор с протеиназой удаляли, гель промывали PBS. Для расширения гель инкубировали в дистиллированной воде в течение 1 ч, каждые 20 мин заменяя воду на свежую. Окрашивание ДНК проводили в течение 5 мин красителем DAPI в концентрации 100 нМ после расширения.

Микроскопия. Для наблюдения под микроскопом использовали фрагмент полученного расширенного геля, помещая его между покровным и предметным стеклом с использованием разделителя между стеклами, соответствующего толщине геля. Для предотвращения высыхания геля полученный слайд герметизировали валапом (смесь вазелина, ланолина и парафина).

Для съемки использовали инвертированный микроскоп Nikon Ti-E (Япония) с иммерсионным объективом Nikon CFI Plan Apochromat VC 100x H (N.A.1.40, W.D.0.13 mm), с камерой sCMOS Andor Zyla 4.2 и с набором фильтров Semrock YFP-2427B. Обработку изображений (настройка яркости и контраста, конвертирование формата и т.д.) проводили в программе ImageJ.

Реактивы. В работе использовали среду LB, фосфатно-солевой буфер (PBS), акриламид и N,N-метиленбисакриламид (Amresco, США); формальдегид, глутаральдегид, поли-L-лизин, DMSO и акрилат натрия (Sigma Aldrich, США); лизоцим, тетраметилэтилендиамин (TEMED), персульфат аммония (PSA) и Triton X-100 (Хеликон, Россия); Acryloyl-X SE и DAPI (Thermo Fisher Scientific, США); протеиназу К (Евроген, Россия).

РЕЗУЛЬТАТЫ

В состоянии SOS-ответа в клетках *E. coli* Z-кольца отсутствуют, при этом распределение белка FtsZ является неравномерным. Полученные при использовании экспансионной микроскопии результаты демонстрируют, что в контрольном образце (клетки *E. coli* без обработки ультрафиолетом) видны Z-кольца, то есть бактерии находятся в процессе деления. У клеток в SOS-ответе (после обработки ультрафиолетом) деление остановлено и Z-колец не наблюдается (рис. 6). Однако на рисунке видно, что даже при заблокированном делении при отсутствии Z-колец белок FtsZ не распределяется по цитоплазме клетки равномерно. Видны некоторые скопления белка и неоднородности, вероятно, связанные с тем, что полимеры FtsZ разбираются не до конца и продолжают формировать некие структуры, отличные от Z-колец.

Аналогичные результаты были получены ранее при использовании метода локализационной микроскопии (Vedyaykin et al., 2014, 2020): в SOS-ответе при этом также наблюдали неравномерное распределение белка FtsZ по клетке *E. coli*.

ДНК, как в контрольных *E. coli*, так и в состоянии SOS-ответа, распределена по клетке неравномерно. Визуализация ДНК в клетках *E. coli* с использованием экспансионной микроскопии позволила показать, что как в состоянии нормального деления, так и в состоянии SOS-ответа ДНК распределена неравномерно (рис. 7), что согласуется с данными, полученными при помощи традиционной флуоресцентной микроскопии. Однако все же в состоянии SOS-ответа такое распределение представляется несколько более однородным.

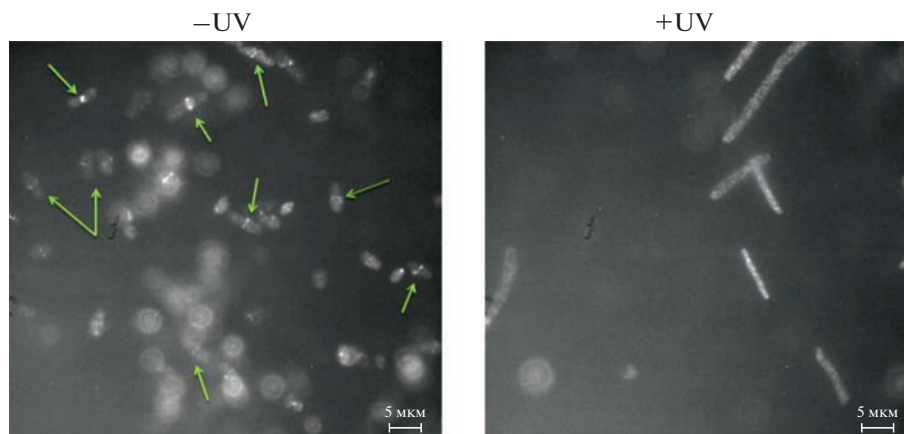


Рис. 6. Распределение FtsZ в клетках во время нормального деления (–UV) и после облучения ультрафиолетом во время SOS-ответа (+UV). Стрелками на рисунке слева обозначены Z-кольца.

ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе метод экспансионной микроскопии был использован для визуализации структур, формируемых белком FtsZ и ДНК в состоянии SOS-ответа с более высоким разрешением. Результаты сравнили с данными, полученными для клеток, находящихся в состоянии нормального деления. Это позволило наглядно показать, что активация SOS-ответа не приводит к полной разборке структур, формируемых белком FtsZ. При этом ДНК в состоянии SOS-ответа распределена по клетке более однородно, чем в контрольном образце.

Полученные данные о неравномерном распределении FtsZ по клетке *E. coli* в состоянии SOS-ответа согласуются с оценкой концентрации Sula, достаточной для остановки клеточного деления (Vedyay-

kin et al., 2020). Для его блокирования достаточно присутствия белка Sula в концентрации, в несколько раз более низкой, чем концентрация FtsZ, при этом полной разборки полимеров FtsZ не происходит. Таким образом, новые данные о неполной разборке полимеров FtsZ в клетках *E. coli* в состоянии SOS-ответа находятся в согласии с полученными нами ранее данными. В то же время, они также противоречат модели секвестрации мономеров FtsZ в состоянии SOS-ответа (Chen et al., 2012).

Визуализация ДНК показала, что при нормальном делении нуклеоид представлен в клетке в виде тяжей, протяженных филаментов и других неоднородных структур, а во время SOS-ответа распределение ДНК по клетке является более однородным, при этом происходит некоторая компактизация ДНК ближе к середине клетки. Визуализация ДНК с большим разрешением может быть востребована в будущем для исследования пространственной организации ДНК в бактериальной клетке (Verma et al., 2019).

Таким образом, описанный в настоящей работе протокол экспансионной микроскопии представляется авторам хорошо подходящим для изучения клеток, которые могут быть закреплены на поверхности покровного стекла или на другой плоской поверхности, например, адгезивных клеток эукариот в культуре, бактерий, способных к закреплению на поверхности, и других одиночных клеток.

БЛАГОДАРНОСТИ

Работа была выполнена с использованием оборудования ЦКП “Аналитический центр нано- и биотехнологий “СПбПУ” на базе Санкт-Петербургского политехнического университета Петра Великого (ФГАОУ ВО “СПбПУ”).

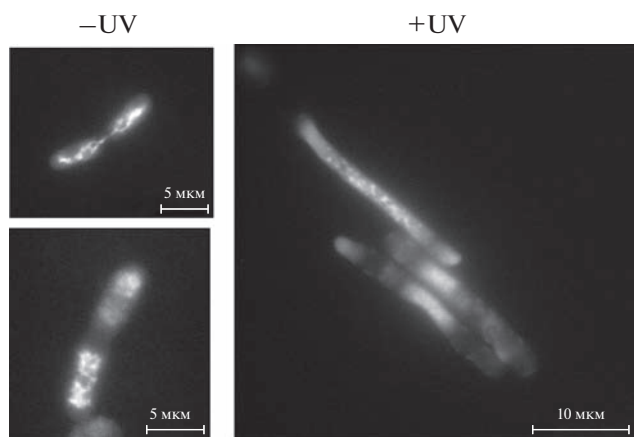


Рис. 7. Распределение ДНК в клетках во время нормального деления (–UV) и SOS-ответа после облучения ультрафиолетом (+UV). При нормальном делении ДНК распределяется по будущим дочерним клеткам, тогда как в состоянии SOS-ответа хромосомы пространственно не разделены и локализуются ближе к середине клетки.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена при финансовой поддержке Минобрнауки РФ (Президента РФ; проект № МК-1345.2022.1.4).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Деревцова К.З., Пичицкая Е.И., Раковская А.В., Безпрозванный И.Б. 2021. Применение метода экспансионной микроскопии в нейробиологии. Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. Т. 107. № 4–5. С. 568. (Derevtsova K.Z., Pchitskaya E.I., Rakovskaya A.V., Bezprozanny I.B. 2021. Applying the expansion microscopy method in neurobiology. Rossiyskiy fiziologicheskii zhurnal im. I.M. Sechenova. V. 107. № 4–5. P. 568.)
- Клементьева Н.В., Загайнова Е.В., Лукьянов К.А., Мишин А.С. 2016. Принципы флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения (обзор). Современные технологии в медицине. Т. 8. С. 130. (Klementieva N.V., Zagaynova E.V., Lukyanov K.A., Mishin A.S. 2016. The Principles of super-resolution fluorescence microscopy (review). Sovremennye tehnologii v medicine. V. 8. P. 130.)
- Asano S.M., Gao R., Wassie A.T., Tillberg P.W., Chen F., Boyden E.S. 2018. Expansion microscopy: protocols for imaging proteins and RNA in cells and tissues. Curr. Prot. Cell Biol. V. 80. P. e56. <https://doi.org/10.1002/cpcb.56>
- Chang J.-B., Chen F., Yoon Y.-G., Jung E.E., Babcock H., Kang J.S., Asano S., Suk H.-J., Pak N., Tillberg P.W., Wassie A.T., Cai D., Boyden E.S. 2017. Iterative expansion microscopy. Nat. Methods. V. 14. P. 593.
- Chen F., Tillberg P.W., Boyden E.S. 2015. Expansion microscopy. Science. V. 347. P. 543.
- Chen Y., Milam S.L., Erickson H.P. 2012. Sula inhibits assembly of FtsZ by a simple sequestration mechanism. Biochemistry. V. 51. P. 3100.
- Chozinski T.J., Halpern A.R., Okawa H., Kim H.-J., Tremel G.J., Wong R.O.L., Vaughan J.C. 2016. Expansion microscopy with conventional antibodies and fluorescent proteins. Nat. Methods. V. 13. P. 485.
- Feng H., Wang X., Xu Z., Zhang X., Gao Y. 2018. Super-resolution fluorescence microscopy for single cell imaging. In: Single cell biomedicine. Singapore: Springer Singapore. P. 59.
- Li H., Warden A.R., He J., Shen G., Ding X. 2022. Expansion microscopy with ninefold swelling (NIFS) hydrogel permits cellular ultrastructure imaging on conventional microscope. Science Advances. V. 8. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abm4006>
- Moore D.A., Whatley Z.N., Joshi C.P., Osawa M., Erickson H.P. 2017. Probing for binding regions of the FtsZ protein surface through site-directed insertions: discovery of fully functional FtsZ-fluorescent proteins. J. Bacteriol. V. 199. P. e00553-16. <https://doi.org/10.1128/JB.00553-16>
- Renz M. 2013. Fluorescence microscopy – a historical and technical perspective. Cytometry Part A. V. 83. P. 767.
- Sanderson M.J., Smith I., Parker I., Bootman M.D. 2014. Fluorescence microscopy. Cold Spring Harbor Protocols. V. 2014. P. pdb.top071795. <https://doi.org/10.1101/pdb.top071795>
- Tillberg P.W., Chen F., Piatkevich K.D., Zhao Y., Yu C.-C., English B.P., Gao L., Martorell A., Suk H.-J., Yoshida F., DeGennaro E.M., Roossien D.H., Gong G., Seneviratne U., Tannenbaum S.R., et al. 2016. Protein-retention expansion microscopy of cells and tissues labeled using standard fluorescent proteins and antibodies. Nat. Biotech. V. 34. P. 987.
- Vedyaykin A., Rumyantseva N., Khodorkovskii M., Vishnyakov I. 2020. Sula is able to block cell division in *Escherichia coli* by a mechanism different from sequestration. Biochim. Biophys. Res. Commun. V. 525. P. 948.
- Vedyaykin A.D., Sabantsev A.V., Vishnyakov I.E., Borchsenius S.N., Fedorova Y.V., Melnikov A.S., Serdobintsev P.Y., Khodorkovskii M.A. 2014. Localization microscopy study of FtsZ structures in *E. coli* cells during SOS-response. J. Phys. Conf. Ser. V. 541. P. 012036. <https://doi.org/10.1088/1742-6596/541/1/012036>
- Verma S.C., Qian Z., Adhya S.L. 2019. Architecture of the *Escherichia coli* nucleoid. PLoS Genet. V. 15. P. e1008456. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008456>
- Wassie A.T., Zhao Y., Boyden E.S. 2019. Expansion microscopy: principles and uses in biological research. Nat. Methods. V. 16. P. 33.

Visualization of *Escherichia coli* Single Cells in the State of SOS Response Using Expansion Microscopy

N. A. Rumyantseva^a, D. M. Golofeeva^a, I. E. Vishnyakov^{b, *}, and A. D. Vedyaykin^a

^aPeter the Great St. Petersburg Polytechnic University, NIK “Nanobiotechnologies”, St. Petersburg, 195251 Russia

^bInstitute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064 Russia

*e-mail: innvish@incras.ru

Expansion microscopy (ExM) is a sample preparation method that allows to achieve improved visualization of structures due to the physical expansion of the sample. This method is used in combination with traditional light microscopy and allows, without the use of complex technical devices typical for super-resolution microscopy, to achieve visualization of biological structures with higher resolution. Unlike the methods of super-resolution micros-

copy, expansion microscopy does not make it possible to overcome the diffraction limit; however, the observed effect can be considered equivalent to an increase in the spatial resolution. The relative simplicity of the method and the undemanding nature of the microscope used have made expansion microscopy a fairly popular method to visualize various biological structures last time. This paper describes the use of expansion microscopy to visualize DNA and structures formed by the FtsZ protein in *Escherichia coli* cells during the SOS response. The results of the work confirm the previously obtained data that the FtsZ protein in cells in the state of the SOS response is unevenly distributed. The protocol used in this work for visualization of *E. coli* cells preliminarily fixed on the glass surface using the expansion microscopy method can be used in the future to study the internal structures of other cells, both bacterial and eukaryotic.

Keywords: expansion microscopy, FtsZ, SOS response, bacterial division