

DOI:10.19344/j.cnki.issn1671-5276.2025.02.001

面向细胞液-液相分离的医工检测方法研究进展

赵尉杰¹, 朱程君², 梁晋铭¹, 刘凯¹, 张瑛琪³, 姚佳烽¹

- (1. 南京航空航天大学 机电学院, 江苏 南京 210016;
2. 南京医科大学第一附属医院 肿瘤科, 江苏 南京 210029;
3. 河北医科大学第三医院急诊科, 河北 石家庄 050052)

摘要:液-液相分离(LLPS)在细胞生命活动中起着重要的作用,LLPS 的稳态失衡与多种疾病的发展相关。因此,探究 LLPS 的原理并对其进行检测十分重要。概括 LLPS 近年来的发展情况,说明细胞中 LLPS 现象与人体健康的紧密联系。对 LLPS 的产生原理从热力学与细胞内部驱动力两方面进行分析与总结,指出细胞中 LLPS 现象与自由能、化学势以及多种物质的驱动作用有关。重点介绍几种 LLPS 的检测方法,主要讨论显微镜与荧光标记在 LLPS 检测中的应用,提出将电阻抗成像(EIT)技术用于 LLPS 检测,满足实时、快速、免标记的检测需求,同时对 LLPS 未来的发展情况进行了展望。

关键词:液-液相分离;形成原理;检测方法;电阻抗成像技术;发展应用

中图分类号:TP274+.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1671-5276(2025)02-0001-13

Research Progress of Liquid-liquid Phase Separation and Detection Methods in Cells

ZHAO Weijie¹, ZHU Chengjun², LIANG Jinming¹, LIU Kai¹, ZHANG Yingqi³, YAO Jiafeng¹

- (1. College of Electrical and Mechanical Engineering, Nanjing University of Aeronautics and Astronautics, Nanjing 210016, China;
2. Department of Oncology, the First Affiliated Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing 210029, China;
3. Emergency Department of the Third Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050052, China)

Abstract: Since liquid-liquid phase separation (LLPS) plays an important role in cell life activities, and its abnormal activities may lead to the production of diseases, it is very important to explore the principle of LLPS and detect it. This paper summarizes the recent development of LLPS, and illustrates the close relationship between LLPS phenomenon in cells and human health. The generation principle of LLPS is analyzed and summarized from two aspects of thermodynamics and internal driving force of cells, which indicates that LLPS phenomenon in cells is related to free energy, chemical potential and driving effect of various substances in the body. Several LLPS detection methods are introduced, and the application of microscope and fluorescent labeling in LLPS detection is mainly discussed. The electrical impedance tomography (EIT) technology applied to the LLPS detection is proposed to meet the requirements of real-time, fast and free marker detection, and the LLPS future development is prospected as well.

Keywords: liquid-liquid phase separation; formation principle; detection method; electrical impedance tomography; developing application

0 引言

液-液相分离(liquid-liquid phase separation, LLPS)是指二元或多元混合物在一定条件下分离为不同液相的过程,而细胞中的 LLPS 一般表现

为生物大分子在一定条件下聚集形成不同的液滴状结构。随着不断的研究发现,LLPS 作为解释无膜细胞器的形成机制正在被更多人所接受^[1-2]。LLPS 在细胞中起到十分重要的作用,生物体众多的生命活动过程受到 LLPS 的调控。因此研究细

基金项目:国家自然科学基金面上项目(62471225);2023 年度河北省中央引导地方科技发展资金项目(236Z7731G)

第一作者简介:赵尉杰(2001—),男,山西晋中人,硕士研究生,研究方向为智能医工检测和电阻抗成像技术,zhao_wj@nuaa.edu.cn。

通信作者简介:姚佳烽(1984—),男,河南巩义人,副教授,博士,主持国家自然科学基金项目 3 项,国家重点研发计划课题 1 项,获得省部级奖项 4 项,共发表学术论文 100 余篇,日文专著章节 1 部,英文专著章节 1 部,发明专利 40 余项,转化 4 项,获批二类医疗器械注册证 2 项,jiaf.yao@nuaa.edu.cn。

胞中的 LLPS 现象对探索无膜细胞器与相关蛋白质的形成以及有关疾病的致病机理具有重要意义^[3]。

对于 LLPS 现象,国内外众多学者进行了大量的研究。1899 年,美国生物学家 WILSON^[4]提出细胞质可能包括“多种液体的混合”,其中有“不同化学性质的悬浮液滴”。这是早期对 LLPS 现象的发现与探索。20 世纪 90 年代,研究人员开始探索相分离是否与疾病或细胞架构相关。但这些理论由于具有假设性,并未成为主流观点。直到 2009 年,BRANGWYNNE 等^[5]发表了关于线虫中 P 颗粒的研究,指出了 P 颗粒表现出类似液体的行为。2011 年,BRANGWYNNE 等^[6]共同发现细胞中的核仁也有类似的液体现象,这进一步说明细胞内有 LLPS 现象的发生,同时调控细胞的生命活动。2012 年,LI 等^[7]研究蛋白质与 RNA 分子,发现这些分子在试管中由于微小作用力形成了小液滴或胶冻样小圆斑。这表明研究相分离可以在体外通过试管进行。2015 年底,有多项研究发现蛋白质存在相分离现象^[8-9]。在进一步的研究中发现,某些相分离形成的蛋白质与疾病相关,这主要是由于蛋白质的异常分离使液体不可逆地转化成了固体。细胞需要相分离将内部物质进行区分,但异常的相分离可能形成更稳定更难逆转的结构,这将可能导致疾病^[10]。

作为细胞中的重要现象,LLPS 在免疫、信号

传递、遗传信息转录等方面均起到重要作用。正常的 LLPS 产生多种蛋白质,支撑生物体正常的生命活动。如 LLPS 介导了突触前和突触后致密信号部件的形成,而 ZENG 等^[11-12]发现突触后致密物可能是由 PSD-95 和 SynGAP 之间的相互作用并通过相分离形成,其中 SynGAP 和 PSD-95 是两种含量非常丰富的蛋白^[13]。异常的 LLPS 与疾病的产生有关^[14-15],影响生物体的健康。在异常情况下,LLPS 会导致产物变为凝胶状态或者转化成固相,这种不可逆的 LLPS 是致病的根本原因。Tau 蛋白在异常情况下经 LLPS 产生的液滴失去流动性,硬化为固体状态,这与阿尔兹海默症的产生相关,图 1 展示了 Tau 蛋白的 LLPS 的聚集过程^[16-18]。II 型糖尿病(T2DM)的形成与胰岛素抵抗和 β 细胞衰竭有关^[19],其本质原因是淀粉样蛋白的 LLPS 失调与胰腺 β 细胞中蛋白质的异常聚集^[20]。淀粉样蛋白 A β 和 p62 与代谢性骨病的形成有关,其 LLPS 导致的异常聚集分别与骨质疏松症和佩吉特骨病(PDB)有关^[21-23]。新冠病毒的核衣壳蛋白(N 蛋白)能够与宿主细胞 Ras-GTP 酶激活蛋白结合蛋白(G3BP)相互作用并发生 LLPS 现象,抑制宿主细胞应激颗粒的形成,阻止细胞的防御反应,从而为新冠病毒提供了复制场所,促进了病毒的组装^[24]。LLPS 对细胞生命活动有重要的调控作用,因此对 LLPS 进行可靠的检测就显得十分重要。

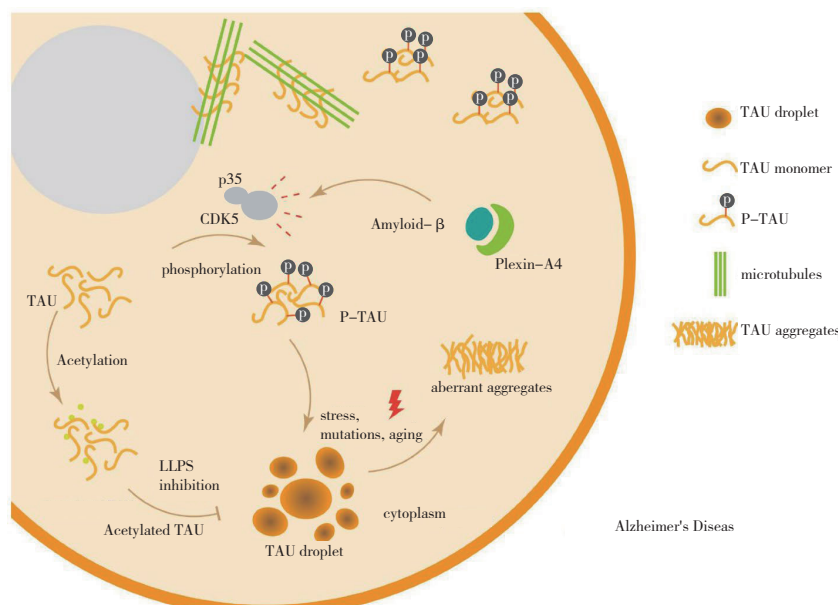


图 1 淀粉样蛋白 Tau 和 A β 在阿尔兹海默病患者(AD)的大脑中 LLPS 的聚集过程

对于 LLPS 现象目前有如显微镜观察、荧光标记检测、核磁共振检测、浊度检测、质谱分析等

检测方法。这些方法实现了对 LLPS 的有效检测,但在检测成本、操作便捷性以及实时检测等方

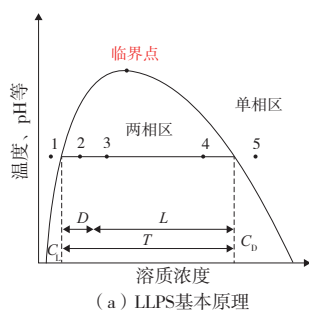
面仍有不足之处。电阻抗成像技术 (electrical impedance tomography, EIT) 是一种新型的成像技术,其根据生物不同组分的电导率差异,利用电磁原理进行成像。EIT 具有的实时动态成像特点很好地弥补了当前检测方法的不足,而免标记的检测方式可以简化操作流程,保证细胞活性,是细胞 LLPS 检测的发展方向。本文首先分析了 LLPS 的形成原理,接着介绍了几种现有的 LLPS 检测方法,其中重点讨论了显微镜观测与荧光标记检测两种方法,同时阐述 LLPS 检测的发展趋势,提出将电阻抗成像技术用于 LLPS 检测以满足实时、快速、免标记的需求。最后对 LLPS 未来的发展与应用情况进行了展望。

1 细胞液-液相分离的原理

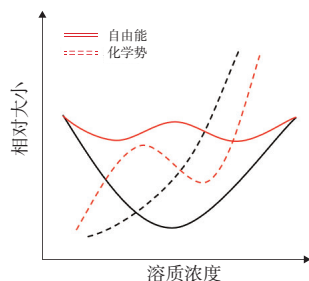
LLPS 现象的产生与物质的浓度梯度有关^[25],因此可以从热力学平衡的角度出发解释 LLPS 现象^[26],同时讨论环境条件例如温度、pH 等对 LLPS 的影响。考虑到细胞内环境复杂,还存在蛋白质、核酸等维持生命活动所必须的物质,这些物质的结构变化与相互作用对细胞内 LLPS 起到了驱动作用^[27-28]。本文将从这两个角度分析细胞内 LLPS 的原理。

1.1 热力学原理

热力学中两个重要的概念是自由能与化学势,通过这两个概念可以对 LLPS 原理进行解释。在此之前,本文先从浓度梯度的角度分析 LLPS 现象产生的本质,LLPS 原理如图 2 所示。



(a) LLPS基本原理



(b) LLPS的热力学原理

图2 LLPS原理图

细胞中存在多种不同浓度的物质。根据分子科学的经典概念,多价分子在混合时会自然地组成大的低聚物或聚合物,这种组装降低了分子的溶解度。当分子溶解度到达溶液中的溶解阈值时,将会产生相分离^[29]。可以用一个简易的模型阐述浓度梯度对 LLPS 的影响,如图 2(a) 所示,以一种生物大分子的 LLPS 过程为例。图中横截线上的 5 个点代表 LLPS 不同溶质浓度下相分离的 5 个阶段,且在条件适宜时,这几个阶段可以相互转化,说明通常情况下 LLPS 是一种高度动态的过程。对于细胞中的无膜细胞器而言,其 LLPS 过程进行完全,使其停留在高浓度“液滴”状态,从而形成了稳定的结构与功能。与此对应,当细胞处于不利的外界条件下,由于 LLPS 动态性,导致某些细胞器结构的损坏,从而导致细胞功能的损伤。

从热力学角度进行分析,如图 2(b) 所示,黑线表示溶质之间不进行相互作用或溶质之间不形成稳定溶液,自由能为单峰状态,化学势作为自由能的 1 阶导数为单增形态;红线表示溶质分子间作用力大于溶质与水之间的作用力,混合物有分为两相的趋势,并将系统自由能最小化(本刊为黑白印刷,疑问之处请咨询作者)。自由能指的是整个系统可以向外输出的能量,而化学势表示了系统向外输出能量的能力大小,化学势越大,系统越容易向外输出能量,因此也可以将化学势理解为一种能量梯度。细胞中不同生物大分子自由能和化学势不同,当大分子之间的作用力大于与水之间的作用力时,整个系统自由能处于高形态,存在能量梯度,因此发生 LLPS 现象。当相分离之后,整个系统处于低自由能水平,系统达到较稳定状态。Fick 定律是用来描述分子扩散过程中传质通量与浓度梯度关系之间的定律,可以结合自由能与化学势这两个热力学概念对 Fick 定律进行分析^[30-31],从而对 LLPS 现象进行有关的定量分析与计算。生物细胞中的温度、pH、大分子浓度对 LLPS 过程的进行程度有所影响。CINAR 等^[32]探究了温度、静水压力以及渗透压对蛋白质 LLPS 的影响。JIN 等^[33]研究了 pH 对蛋白质 LLPS 的影响,表明 pH 影响蛋白质的溶解度并且传递压力信号,调控 LLPS 过程。

1.2 细胞内物质的驱动作用

细胞中的蛋白质和 RNA 广泛地参与各项生命活动,因此会参与到细胞中的 LLPS 过程,其结

构或分子特性对 LLPS 产生驱动或影响作用^[34]。蛋白质或核酸之间的异型、多价相互作用是 LLPS 的基本生化原理^[35]。

生物大分子的特殊结构对 LLPS 过程会有促进作用。蛋白质中无序区域(IDP)的长度与相分离能力有关^[36-37]。研究发现蛋白质无序性越高,其相分离能力越强,这与热力学分析相一致。同时,LLPS 能力也与氨基酸总链长度有关。LIN 等^[38]研究了一系列长度相同的多两性蛋白序列的 LLPS 临界温度与回转半径之间的关系,发现相关性很高,蛋白的折叠也对 LLPS 有促进作用。WANG 等^[39]研究发现核糖核蛋白的折叠结构域可以聚集更多的蛋白质分子,同时增加单个颗粒间的相互作用能力,促进 LLPS 的发生。

大分子之间的相互作用也会促进 LLPS 过程。固有无序蛋白(IDP)含有带电氨基酸,其电荷之间的相互作用会促进特定 LLPS 过程的发生。这种电荷状态也会受到 pH 值等外部因素的影响,从而造成不同程度的促进作用。在 RNA 中也存在电荷驱动 LLPS 的现象,众多研究发现 RNA 的负电荷和序列特异性特征影响 LLPS 的发生^[40]。而在蛋白质中,多价 $\pi-\pi$ 、疏水性等相互作用会使得生物大分子容易发生多价相互作用,促进 LLPS 的发生。WANG 等^[41]发现朊病毒结构残基和 RNA 结合蛋白之间的多价相互作用产生了 LLPS 现象。

2 液-液相分离检测方法

目前被广泛接受的相分离检测标准是:形成球状结构且能够融合,同时使用荧光漂白恢复(fluorescence redistribution after photobleaching, FRAP)实验,证明其能够发生荧光漂白恢复。然而 FRAP 技术对于 LLPS 的检测仍然存在着很多问题。对于相分离检测,目前的难点在于如何鉴别细胞内某些特殊结构是否是相分离产生的。同时,相分离的产生需要一定的浓度,在低浓度时发生的一些相分离现象难以检测到。对于细胞这样的活体而言,还应当考虑外源过表达带来的影响。这些难点也在不断促使相分离检测的发展,更多可靠、便捷的检测方法应运而生。

当前相分离检测方法众多,主要使用的有显微镜检测、荧光标记检测,还有如核磁共振、浊度检测、质谱分析等检测方法,本章对这些检测方法将进行介绍与分析。

2.1 显微镜检测

显微镜是在微观研究中的必需设备,对于 LLPS 检测可以通过显微镜得到可靠的检测结果^[42]。除普通显微镜外,具有特殊结构的显微镜可以有效提高检测结果的准确性,本文主要介绍使用共聚焦显微镜、微分干涉对比显微镜以及超分辨率显微镜进行 LLPS 检测,显微镜原理如图 3 所示。

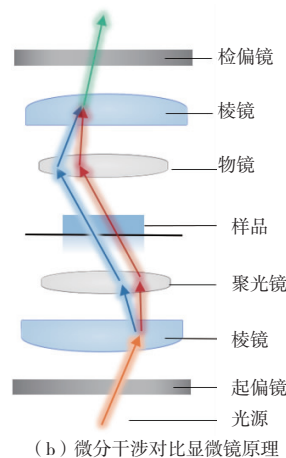
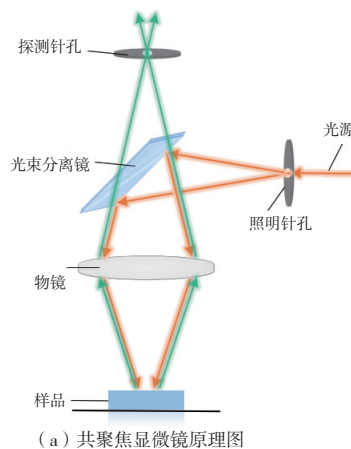


图 3 显微镜原理图

共聚焦显微镜(CLSM)原理如图 3(a)所示,其使用聚焦光束作为激发光源,在被测物焦平面的共轭平面放置两个小孔,一个放在光源前,另一个放在探测器前。当被测物位于焦平面时,在探测端可以得到最大的光强,此时获得的图像最清晰。而非焦平面时,探测光产生弥散现象,无法穿过小孔,导致探测成像为黑色。正是由于强烈的光强对比以及合适的小孔提高了分辨率与信噪比,使得成像效果显著优于一般显微镜。

微分干涉对比显微镜(DIC)原理如图 3(b)所示,其利用了偏振原理。通过起偏镜实现对光

源的偏振,之后被偏振的光线经过被测物,根据被测物的厚度与折射率特性改变光线光路,最终通过检偏镜对光线进行分析,实现 LLPS 的检测。这种方法的优势在于无需荧光标记,同时可以清晰地检测出 LLPS 所形成的动态边界。

超分辨率显微镜(SMLM)克服了光学显微镜的衍射极限,通过在时间或空间上调节荧光顺序来定位单个荧光团,提高了荧光显微镜的空间分辨率。荧光分子通过被激活、激发、定位和光漂白步骤的重复,重新整合所有局部荧光分子的信息,可以生成完整的超分辨率图像。常用的方法有光激活定位显微镜(PALM)和随机光学重建显微镜(STORM),其中 STORM 采用可切换荧光团取

代了光漂白步骤,超分辨率图像采集速率则更高。

表 1 所示是近年来采用显微镜对 LLPS 进行研究的实例,可以看出共聚焦显微镜(CLSM)与微分干涉对比显微镜(DIC)应用较多。LE 等使用精密的原位液体透射电子显微镜(in-situ liquid transmission electron microscopy)获取 LLPS 成核和初始生长步骤,为进一步研究 LLPS 现象奠定了基础。MURAKAMI 等使用拉曼显微镜(raman microscopy)观测 ataxin-3 蛋白的 LLPS 并评估单个液滴中的浓度。拉曼显微镜是一种利用光谱和空间信息生成图像的技术,可用于评估材料性能与研究成分分布。可见显微镜在 LLPS 检测上发挥着重要的作用。

表 1 显微镜法检测 LLPS

作者(出版年份)	检测方法	内容
LE 等(2019) ^[43]	原位液体透射电子显微镜	获取 LLPS 成核和初始生长步骤,进一步分析 LLPS 现象
MA 等(2020) ^[44]	CLSM	观测大分子 LLPS 界面与分区研发全水微流控
DANG 等(2021) ^[45]	DIC	通过 DIC 与 NMR 表征 ATP 对 TDP-43PLD 和 7 个突变体 LLPS 的影响
MURAKAMI 等(2021) ^[46]	拉曼显微镜	观测 ataxin-3 蛋白 LLPS 并评估单个液滴中的浓度
ZENG 等(2022) ^[47]	DIC	探究 TDP-43 LCD 的 LLPS 现象
GAO 等(2022) ^[48]	CLSM	锌对 Tau 蛋白 LLPS 的影响
HUANG 等(2022) ^[49]	CLSM	钙离子促进 α -Syn 的 LLPS
CHANG 等(2022) ^[50]	CLSM	以无序蛋白质 LLPS 为基础开发新型低污染生物材料
ZHANG 等(2022) ^[51]	SMLM	使用 SMLM 研究 LLPS 冷凝物的形态、材料特性和动力学
PATEL 等(2023) ^[52]	CLSM	大分子通过焓驱动的多价疏水相互作用促进 Tf 的同种型 LLPS
HE 等(2023) ^[53]	SMLM	使用 SMLM 揭示了 FUS 冷凝物老化时的纳米级表面聚集体
LI 等(2023) ^[54]	DIC	反馈调控泛素化和 LLPS 是调控 HECTE3 连接酶的一般机制
FU 等(2024) ^[55]	CLSM	相分离产生的 UPy-Gly 超分子聚合物形成的触须的液体性质
COCHEREAU 等(2024) ^[56]	CLSM	pH 和蛋白浓度对 LLPS 和蛋白-膜相互作用的影响
MENDES 等(2024) ^[57]	DIC	液-液相分离(LLPS)在 GRH1 (GRASP 酵母同源)的缩聚过程中的关键作用

2.2 荧光标记检测

荧光标记检测是指使用荧光染色剂或荧光基团标记的反应物与样本作用,使特定结构产生荧光发光,并用显微镜观察样本发光情况,分辨样本组成结构的方法。对于 LLPS 检测,则用荧光显微镜观察被标记过的蛋白质或 RNA,判别 LLPS 现象是否发生。由于荧光标记检测有准确度高、技术成熟等优势,因此在 LLPS 检测上应用广泛。

与荧光标记法对比,明场显微成像不使用染色剂,使用显微镜进行直接观察。将样品放置在

载玻片上,采用光线照射,物镜将图像放大后投射到目镜上。在明亮的背景下,样品会呈现暗色,因此称为“明场成像”。对于 LLPS 的观测,在显微镜下可以观察到溶液由澄清变为浑浊,镜检时可以在溶液中观察到液滴结构,从而证明 LLPS 现象的发生。SUREWICZ 等^[58]通过明场显微技术结合浊度测定方法,探索了促进相分离液滴成熟的分子基础,探讨了液滴环境对蛋白质聚集的潜在影响。这种明场显微成像优势在于操作简单,无需标记,对样品影响较小,通常用于体外重构实

验。但由于辨识度差,成象可能不明显,同时对检验人员要求极高,也存在着不便,因此一般不建议采用。由于荧光显微成像的优势,其广泛应用于体内与体外的 LLPS 检测中。DZURICKY 等^[59]利用人工无序蛋白质研究细胞内缩合物。ZHOU 等^[60]研究 LLPS 对胰岛素信号的调控,其中 LLPS

荧光显微实验结果如图 4 所示。用重组 His 标记的 4 个片段 IRS1-GFP 和 3%PEG8000 进行体外 LLPS 测定。His 标记的 IRS1N243-600-GFP 液滴的融合。红色箭头显示了在实验期间融合的两个液滴。时间零点在添加 PEG8000 后 90 s 开始。比例尺为:10 μm。

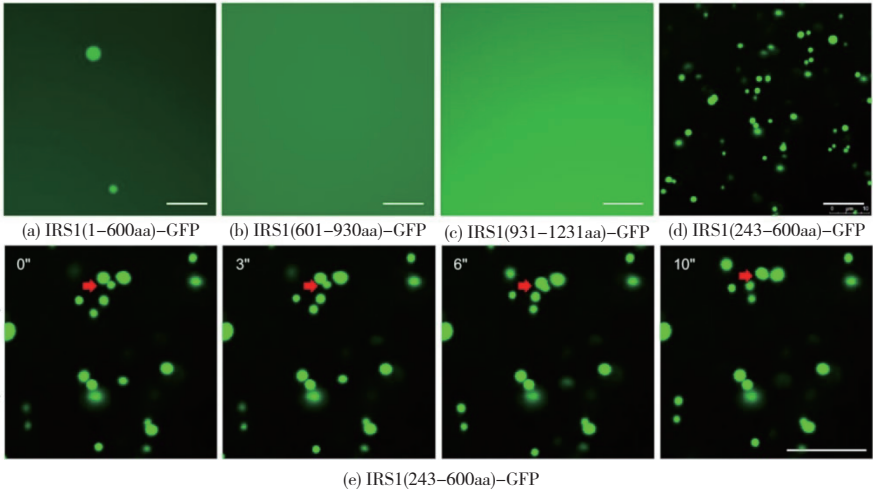


图 4 胰岛素信号 LLPS 蛋白的体外验证

在荧光检测过程中,荧光漂白恢复 (fluorescence redistribution after photobleaching, FRAP) 实验也起到重要作用。FRAP 实验是用荧光物质标记膜蛋白或膜脂,然后用激光照射某一区域,被照射区域荧光淬灭变暗,最后由于细胞膜的流动性,亮度逐渐恢复的过程^[61]。这一实验作为当前检测 LLPS 的一项标准,对各项实验起到了重要的评判作用。

表 2 展示了近年来国内外学者采用荧光法对 LLPS 进行的研究。STENDER 等进行蛋白质液-液相分离热力学和动力学特性的毛细管流动实验。TAN 等研究发现了一种细胞支架 PodJ 通过相分离方式形成生物分子凝聚物,调节细菌及其他生物体不对称细胞分裂 (ACD) 的过程,实验的 FRAP 结果如图 5 所示。

表 2 荧光标记法检测 LLPS

作者(出版年份)	检测方法	内容
RAY 等(2020) ^[62]	荧光	α-Syn 聚集致病与 LLPS 相关
LIU 等(2020) ^[63]	荧光-FRAP	Par 复合物簇的形成
STENDER 等(2021) ^[64]	荧光-FRAP	对 Ddx4n1 的 LLPS 表征进行探究
LYU 等(2022) ^[65]	荧光	O-GlcNAcylation 调节 SynGAP/PSD-95 的 LLPS
MUZZOPAPPA 等(2022) ^[66]	half-FRAP (MOCHA-FRAP)	精准检测与区分 LLPS 产物
TAN(2022) ^[67]	荧光-FRAP	YFP-PodJ_NY 液滴是高度动态的
MATSUURA 等(2023) ^[68]	自荧光	揭示致病蛋白 ataxin-3 液滴的聚集过程
POUDYAL 等(2023) ^[69]	荧光	分子间相互作用是蛋白质相分离的基础
FUKUYAMA 等(2023) ^[70]	荧光-FRAP	LLPS 抑制 Sup35NM 纤维成核
LI 等(2024) ^[71]	荧光-FRAP	Smad2/3/4 复合物可以通过 LLPS 激活 TAT 转录,进而激活 caspase-9 诱导肝癌细胞凋亡
XIANG 等(2024) ^[72]	荧光-FRAP	单宁酸(TA)通过疏水相互作用和氢键的结合调节 tau 相分离
HUANG(2024) ^[73]	荧光	开发一种生物传感器检测 LLPS 过程中的蛋白质相互作用
LIU(2024) ^[74]	荧光-FRAP	无序蛋白质 SERF 通过液-液相分离促进突触核蛋白聚集

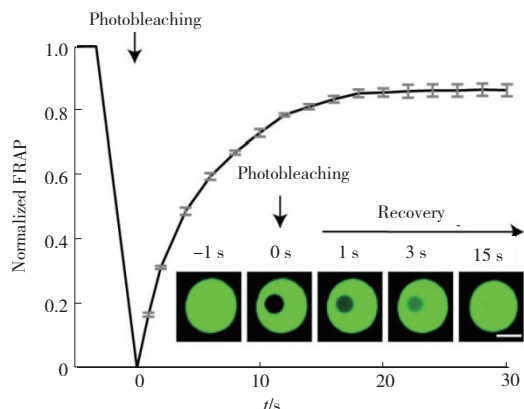


图5 YFP-PodJ_NY液滴相分离荧光漂白恢复实验结果

MUZZOPAPPA等采用半荧光漂白实验精确区分LLPS产物,这种方法是将一半荧光标记的物质进行漂白实验,同时观测两部分物质荧光情况的实验方式,具有良好的对照验证效果。MATSUURA等使用自动荧光寿命显微镜观察了液滴内 ataxin-3 的结构变化。由于色氨酸(Trp)残基的存在,每个液滴都显示出自荧光,其寿命随着时间的推移而增加,反映了结构向聚集的变化。HUANG等应用了一组二聚化依赖性荧光蛋白(ddFP)开发生物传感器系统,用于研究与LLPS相关的蛋白质之间的相互作用,其中ddFP系统在与特定蛋白结合时会复现不同的荧光颜色。

荧光标记检测与荧光漂白恢复实验以其精确度高、技术成熟等优势在LLPS检测中被广泛使用,但荧光标记需要一定的时间,难以实现LLPS的实时检测。因此,对于LLPS进行实时同步的精确检测还有待检测技术的进一步发展。

2.3 核磁共振检测

核磁共振(NMR)可以对LLPS进行检测^[75-76],其原理是通过核磁共振仪观测待测物中的射频能量与原子核的相互作用来确定物质的分子结构,从而辨别样品中的不同成分,实现LLPS的检测。RITSCH等^[77]通过磁共振法观察特异性核糖核酸结合后核内异构核糖核蛋白A1的相分离。BRAMHAM等^[78]使用探针分子三氟乙醇(TFE)通过NMR光谱法表征蛋白质LLPS动力学。ZHANG等^[79]利用NMR波谱探测生物分子LLPS驱动力,通过两种方法探测LLPS过程中重要的分子相互作用,研究方法如图6所示。方案1将蛋白质稀释至LLPS缓冲液中,或将其混合制备双相样品,然后将其离心分离稀相与冷凝相;方案2使用NMR波谱表征均相条件下分子相互作用,并在基于光学的液滴形成测定中通过突变,翻译后的修饰或小分子验证相互作用。核磁共振法可以做到任意角度检测,提高检测结果的可靠性,但实验条件相对严格,同时还存在检测设备价格较高等问题,因此较荧光检测其应用不够广泛。

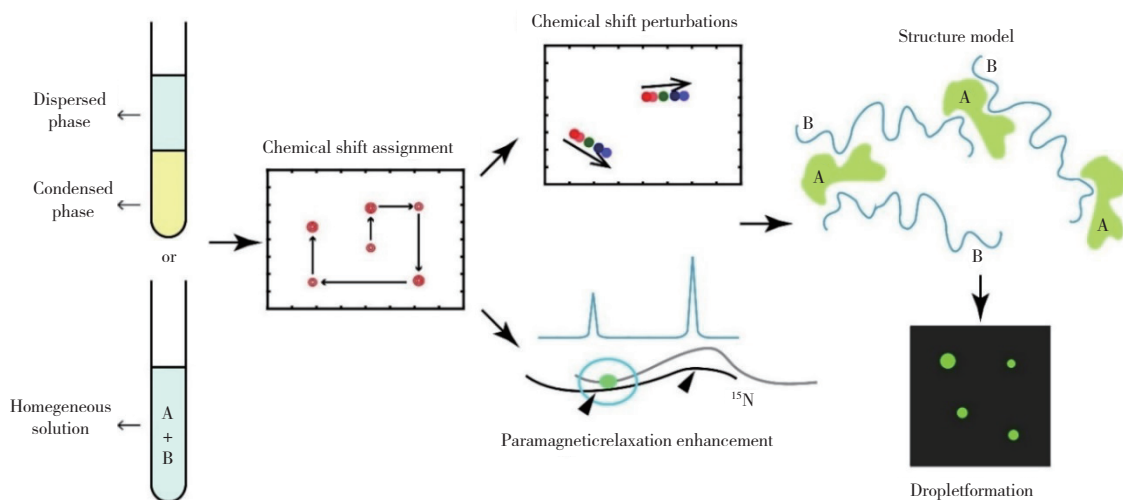


图6 利用核磁共振波谱探究LLPS分子间相互作用方案

2.4 浊度检测

浊度检测也可应用于LLPS的检测,如图7所示。其主要原理是溶液中不同直径的颗粒对光的散射能力不同,通过传感器检测不同颗粒对光的

散射结果,即可辨别溶液中成分的改变,从而检测LLPS现象。HUANG等^[80]分析了浊度检测法对于蛋白质LLPS检测的优劣,并证明不溶性样品的稀释与液滴成像可以提高浊度检测的准确性。

同时,浊度检测也适合检测蛋白质的液-固相分离(LLPS)现象。上海交通大学宋阳教授团队在液-液相分离型肽基荧光探针的研究中进行试验,利用浊度变化测试凝聚相发生时的最低临界多肽浓度^[81]。

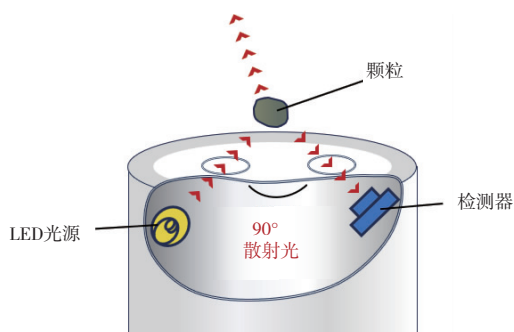


图7 浊度检测原理示意

与浊度检测相关,丹麦技术大学的 Alexander K. Buell 实验与 Fidabio 合作,利用 FIDA 这项全新的技术,开发了定量表征 LLPS 的方法。与 FRAP 这类定性实验不同,这种方法可以高通量、快速和准确地定量 LLPS 的多个关键参数,如轻相浓度、相对液滴大小分布等。同样,离心沉淀方法也可以检测 LLPS 现象。

浊度检测可以做到实时监测、动态观测检测情况,但其对仪器依赖性很强,传感器的污垢或环境变化都会影响其检测效果。

2.5 质谱检测

质谱检测(MS)是通过微粒质核比不同在电场或磁场中将微粒分离的方法。首先将待检测液体引入质谱仪,通过电离方式将液体分子分解成带电碎片与带电粒子,并将其置于电场或磁场中。由于不同粒子核质比不同,会产生不同程度的偏转,从而对 LLPS 现象进行检测。SAHIN 等^[82]针对质谱检测的最新进展,发现其可对不溶性蛋白(如淀粉样蛋白)的研究提供价值,同时可以应用在 LLPS 的研究中。LEPPERT 等^[83]结合显微镜与质谱研究蛋白质序列、离子和调控结构域对蜘蛛蛋白 LLPS 的影响,发现盐析效应通过重复结构域中的亲和力标签驱动 LLPS。这种方法优势在于检测范围广、种类多,检测灵敏度好,但是在分子量接近时谱图会出现重叠,难以分辨 LLPS 现象,且杂质会严重影响检测灵敏度,从而限制了其应用范围。

3 液-液相分离检测方法发展趋势

当前,LLPS 检测的需求正在向实时与免标记

检测的趋势发展。因此,实时、快速、免标记的检测方法正在成为主流。目前广泛使用的荧光检测法虽然检测结果准确,但由于需要进行标记,会对细胞造成一定程度的损伤,难以满足未来的检测需求。而如浊度检测、质谱检测、核磁共振检测等无需标记的检测方法都存在着如检测步骤繁琐,检测成本高昂等不足,因此需要一种满足检测趋势的方法实现对 LLPS 的检测。

电阻抗断层成像技术(electrical impedance tomography, EIT)是一种新型的成像技术,其利用电磁原理进行成像,免标记、实时、动态的特点很好地弥补了当前检测方法的不足。随着微尺度检测的进一步研究与发展,电阻抗断层成像技术是一种可用于 LLPS 检测的良好方法。

1) EIT 检测原理

EIT 技术的成像原理是在待测物周围布置一组电极阵列,对电极施加安全的交流激励信号,同时测量其余电极对的电压信号,同时使用图像重构算法反应待测物内部的电导率分布情况,从而实现成像,检测原理如图 8 所示。EIT 技术目前在临床领域的发展迅速,可以生成胸部的功能断层扫描,用于检测区域肺通气量的变化^[84-85],同时利用 EIT 原理制成的乳腺传感器可以检测肿瘤的存在^[86],在医学领域的发展前景广阔。

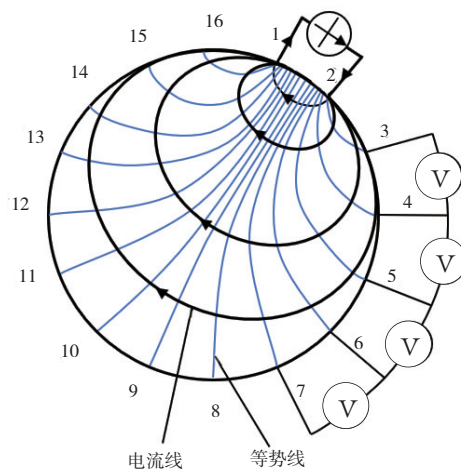


图8 16电极 EIT 检测原理图

2) EIT 技术在微尺度检测的应用

近年来,EIT 技术在微尺度检测方面有众多研究与应用。爱丁堡大学杨云杰课题组开发了一种具有径向分布的微型 EIT 传感器,实现了实时非破坏性的 3D 细胞成像^[87]。南京航空航天大学姚佳峰等^[88]开发了一种微流控芯片,实现了对微流道中细胞位置分布的成像。而采用虚拟电极测

量,可以提高 EIT 对细胞成像的精度^[89]。针对相分离检测,考虑到细胞尺寸较小,也可以开发一款微流控芯片用于硬件的辅助设备,同时针对 LLPS 中的检测目标开发一种算法,实现更精确的检测。

3) EIT 对相分离的检测

细胞主要由细胞膜、细胞质和细胞器构成。通常情况下,细胞质导电性较好,可以视作电阻,而细胞膜对电流有阻碍作用,可以将其视作电容。针对 LLPS 检测,可以将无膜细胞器视为电阻,以此为基础建立等效电路模型,如图 9(a)所示,再通过 EIT 方法对其进行检测。

图 9(b)所示为 LLPS 检测开发的专用微流控

芯片。芯片由下方电极板与上盖 PDMS 流道组成。电极板上覆盖 8 个金电极用于后期 EIT 电学检测与成像。考虑到 EIT 对微尺度下成像分辨率有限,因此引入有机电化学晶体管 (organic electrochemical transistors, OECT) 进行增敏作用,制作 OECT-EIT 传感器以实现更高精度的成像效果。使用微注射泵将细胞注入流道,并通过调控使其停在芯片中央的待检测区,后通过采集电压数据与算法处理得到细胞重建图像,对细胞内发生的 LLPS 现象进行有效检测,实验所用设备如图 9(c)所示。

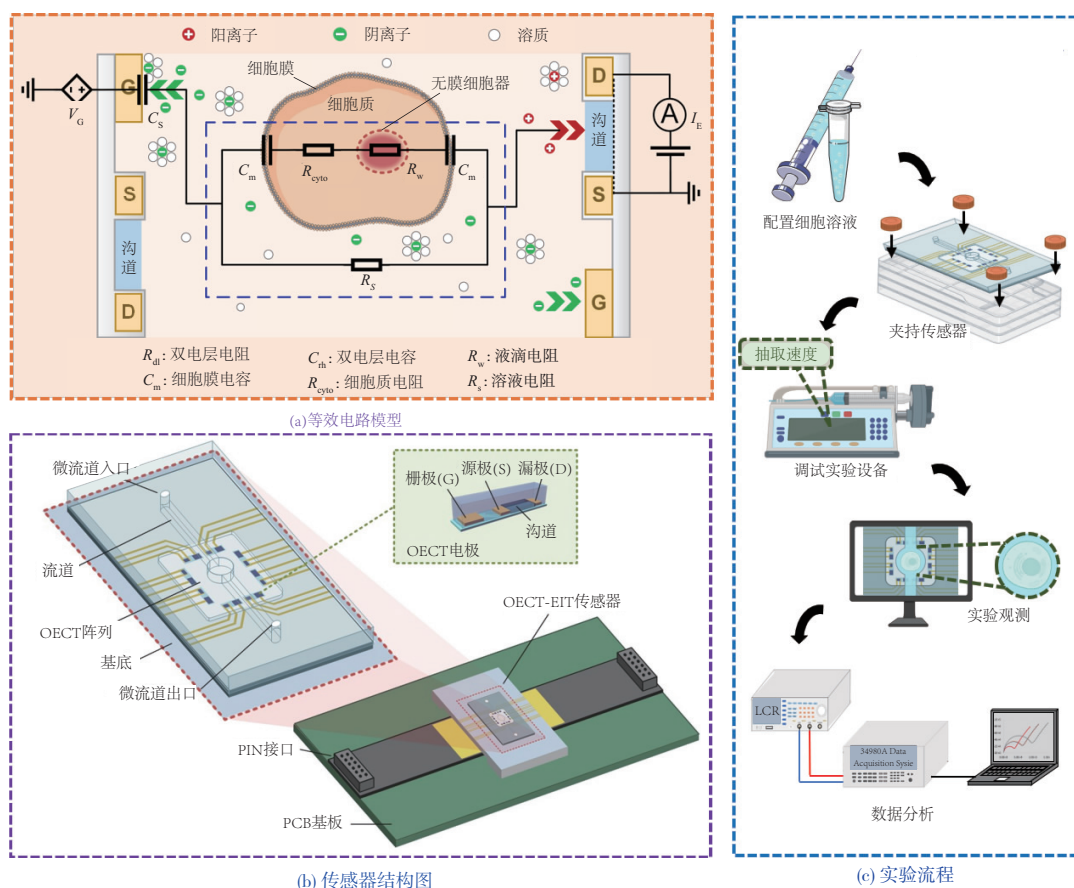


图 9 基于 EIT-OECT 的 LLPS 检测方法

4 总结与展望

液-液相分离 (LLPS) 在细胞中是一种广泛存在的现象。通过相分离,一些特定的分子可以在细胞内形成凝聚物或液滴状结构,使得特定的生物活动得以进行,而异常的 LLPS 与某些疾病的产生有着密切关系。本文主要总结了现有的 LLPS 检测方法,其中显微镜检测与荧光标记法凭借准确度高、检测特征明显等优势被广泛使用,但

这些方法也存在着如成本较高、操作复杂、对细胞造成损伤等问题。EIT 技术的实时、快速、免标记等特点弥补了现有方法的不足,有利于进一步完善现有的检测体系,为 LLPS 检测带来便利,因此探究使用 EIT 技术对 LLPS 进行检测有重要意义。随着更多先进技术应用在 LLPS 的检测中,未来将能够更及时地发现疾病,保障人们的身体健康。

参考文献:

[1] JING H R, BAI Q W, LIN Y N, et al. Fission and internal

- fusion of protocell with membraneless " organelles " formed by liquid - liquid phase separation [J]. *Langmuir*,2020,36(27):8017-8026.
- [2] LIU J H, ZHORABEK F, CHAU Y. Biomaterial design inspired by membraneless organelles[J]. *Matter*,2022, 5(9):2787-2812.
- [3] ZHANG Y J, JIN C K, XU X L, et al. The role of liquid-liquid phase separation in the disease pathogenesis and drug development[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2024,180:117448.
- [4] WILSON E B. The structure of protoplasm [J]. *Science*, 1899, 10(237): 33-45.
- [5] BRANGWYNNE C P, ECKMANN C R, COURSON D S, et al. Germline P granules are liquid droplets that localize by controlled dissolution/condensation [J]. *Science*,2009,324(5935):1729-1732.
- [6] BRANGWYNNE C P, MITCHISON T J, HYMAN A A. Active liquid-like behavior of nucleoli determines their size and shape in *Xenopus laevis* oocytes [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,2011,108(11):4334-4339.
- [7] LI P L, BANJADE S, CHENG H C, et al. Phase transitions in the assembly of multivalent signalling proteins[J]. *Nature*,2012,483(7389):336-340.
- [8] LIN Y, PROTTER D S W, ROSEN M K, et al. Formation and maturation of phase-separated liquid droplets by RNA-binding proteins [J]. *Molecular Cell*, 2015, 60(2):208-219.
- [9] RAUT A S, KALONIA D S. Liquid - liquid phase separation in a dual variable domain immunoglobulin protein solution;effect of formulation factors and protein-protein interactions[J]. *Molecular Pharmaceutics*,2015, 12(9):3261-3271.
- [10] ZBINDEN A, PÉREZ-BERLANGA M, DE ROSSI P, et al. Phase separation and neurodegenerative diseases: A disturbance in the force [J]. *Developmental Cell*, 2020,55(1):45-68.
- [11] ZENG M L, SHANG Y, ARAKI Y, et al. Phase transition in postsynaptic densities underlies formation of synaptic complexes and synaptic plasticity[J]. *Cell*, 2016,166(5):1163-1175, e12.
- [12] ZENG M L, CHEN X D, GUAN D S, et al. Reconstituted postsynaptic density as a molecular platform for understanding synapse formation and plasticity[J]. *Cell*,2018,174(5):1172-1187, e16.
- [13] CHENG D M, HOOGENRAAD C C, RUSH J, et al. Relative and absolute quantification of postsynaptic density proteome isolated from rat forebrain and cerebellum * S[J]. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2006,5(6):1158-1170.
- [14] DING M R, XU W F, PEI G F, et al. Long way up: rethink diseases in light of phase separation and phase transition[J]. *Protein & Cell*,2024,15(7):475-492.
- [15] CHEN Z H, HUAI Y, MAO W J, et al. Liquid-liquid phase separation of biomacromolecules and its roles in metabolic diseases[J]. *Cells*,2022,11(19):3023.
- [16] FU Q G, ZHANG B X, CHEN X P, et al. Liquid-liquid phase separation in Alzheimer's disease[J]. *Journal of Molecular Medicine*,2024,102(2):167-181.
- [17] DONG X W, BERA S, QIAO Q, et al. Liquid-liquid phase separation of tau protein is encoded at the monomeric level[J]. *The Journal of Physical Chemistry Letters*,2021,12(10):2576-2586.
- [18] AINANI H, BOUCHMAA N, BEN MRID R, et al. Liquid-liquid phase separation of protein tau;an emerging process in Alzheimer's disease pathogenesis[J]. *Neurobiology of Disease*,2023,178:106011.
- [19] YONG J, JOHNSON J D, ARVAN P, et al. Therapeutic opportunities for pancreatic β - cell ER stress in diabetes mellitus[J]. *Nature Reviews. Endocrinology*, 2021,17(8):455-467.
- [20] PYTOWSKI L, LEE C F, FOLEY A C, et al. Liquid-liquid phase separation of type II diabetes-associated IAPP initiates hydrogelation and aggregation [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117 (22): 12050-12061.
- [21] YANG B, LI S F, CHEN Z, et al. Amyloid β peptide promotes bone formation by regulating Wnt/ β -catenin signaling and the OPG/RANKL/RANK system [J]. *FASEB Journal*,2020,34(3):3583-3593.
- [22] YANG B, CAI Z Y, ZHANG W L, et al. Autophagy alleviates the decrease in proliferation of amyloid β 1-42-treated bone marrow mesenchymal stem cells via the AKT/mTOR signaling pathway [J]. *Molecular Medicine Reports*,2019,19(5):4091-4100.
- [23] FENG X Z, DU W Q, DING M R, et al. Myosin 1D and the branched actin network control the condensation of p62 bodies[J]. *Cell Research*,2022,32(7):659-669.
- [24] LUO L L, LI Z A, ZHAO T J, et al. SARS-CoV-2 nucleocapsid protein phase separates with G3BPs to disassemble stress granules and facilitate viral production [J]. *Science Bulletin*, 2021, 66 (12): 1194-1204.
- [25] ALBERTI S, GLADFELTER A, MITTAG T. Considerations and challenges in studying liquid-liquid phase separation and biomolecular condensates [J]. *Cell*, 2019, 176 (3): 419-434.

- [26] CHE X L, WU J J, LIU H, et al. cellular liquid-liquid phase separation: concept, functions, regulations, and detections[J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2023, 238(5):847-865.
- [27] DIGNON G L, BEST R B, MITTAL J. Biomolecular phase separation: from molecular driving forces to macroscopic properties[J]. *Annual Review of Physical Chemistry*, 2020, 71:53-75.
- [28] 张长胜, 来鲁华. 生物分子液-液相分离的物理化学机制[J]. *物理化学学报*, 2020, 36(1):154-168.
- [29] BANANI S F, LEE H O, HYMAN A A, et al. Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry [J]. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 2017, 18(5):285-298.
- [30] BOTHE D, DRUET P É. On the structure of continuum thermodynamical diffusion fluxes: a novel closure scheme and its relation to the Maxwell - stefan and the fick - Onsager approach [J]. *International Journal of Engineering Science*, 2023, 184:103818.
- [31] ZHANG M P, CHEN P R, ZHONG W R. Collective diffusion coefficient in limited channel: two methods for fluid particles[J]. *The European Physical Journal B*, 2022, 95(8):127.
- [32] CINAR H, FETAHAJ Z, CINAR S, et al. Temperature, hydrostatic pressure, and osmolyte effects on liquid-liquid phase separation in protein condensates: physical chemistry and biological implications [J]. *Chemistry*, 2019, 25(57):13049-13069.
- [33] JIN X J, ZHOU M, CHEN S X, et al. Effects of pH alterations on stress- and aging-induced protein phase separation[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2022, 79(7):380.
- [34] PENG P H, HSU K W, WU K J. Liquid-liquid phase separation (LLPS) in cellular physiology and tumor biology [J]. *American Journal of Cancer Research*, 2021, 11(8):3766-3776.
- [35] NOTT T J, PETSALAKI E, FARBER P, et al. Phase transition of a disordered nuage protein generates environmentally responsive membraneless organelles [J]. *Molecular Cell*, 2015, 57(5):936-947.
- [36] QUIROZ F G, CHILKOTI A. Sequence heuristics to encode phase behaviour in intrinsically disordered protein polymers[J]. *Nature Materials*, 2015, 14(11):1164-1171.
- [37] DIGNON G L, ZHENG W W, KIM Y C, et al. Sequence determinants of protein phase behavior from a coarse-grained model[J]. *PLoS Computational Biology*, 2018, 14(1):e1005941.
- [38] LIN Y H, CHAN H S. Phase separation and single-chain compactness of charged disordered proteins are strongly correlated [J]. *Biophysical Journal*, 2017, 112(10):2043-2046.
- [39] WANG A L, CONICELLA A E, SCHMIDT H B, et al. A single N-terminal phosphomimic disrupts TDP-43 polymerization, phase separation, and RNA splicing[J]. *The EMBO Journal*, 2018, 37(5):e97452.
- [40] MARTIN E W, HOLEHOUSE A S, PERAN I, et al. Valence and patterning of aromatic residues determine the phase behavior of prion-like domains[J]. *Science*, 2020, 367(6478):694-699.
- [41] WANG J, CHOI J M, HOLEHOUSE A S, et al. A molecular grammar governing the driving forces for phase separation of prion-like RNA binding proteins[J]. *Cell*, 2018, 174(3):688-699, e16.
- [42] ZHANG X F, LI H Y, MA Y, et al. Study liquid-liquid phase separation with optical microscopy: a methodology review[J]. *APL Bioengineering*, 2023, 7(2):021502.
- [43] LE FERRAND H, DUCHAMP M, GABRYELCZYK B, et al. Time-resolved observations of liquid-liquid phase separation at the nanoscale using in situ liquid transmission electron microscopy [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2019, 141(17):7202-7210.
- [44] MA Q M, SONG Y, SUN W T, et al. Cell-inspired all-aqueous microfluidics: from intracellular liquid-liquid phase separation toward advanced biomaterials [J]. *Advanced Science*, 2020, 7(7):1903359.
- [45] DANG M, LIM L, KANG J, et al. ATP biphasically modulates LLPS of TDP-43 PLD by specifically binding arginine residues[J]. *Communications Biology*, 2021, 4(1):714.
- [46] MURAKAMI K, KAJIMOTO S, SHIBATA D, et al. Observation of liquid-liquid phase separation of ataxin-3 and quantitative evaluation of its concentration in a single droplet using Raman microscopy [J]. *Chemical Science*, 2021, 12(21):7411-7418.
- [47] ZENG Y T, BI L L, ZHUO X F, et al. Different intermolecular interactions drive nonpathogenic liquid-liquid phase separation and potentially pathogenic fibril formation by TDP-43 [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, 23(23):15227.
- [48] GAO Y Y, ZHONG T, WANG L Q, et al. Zinc enhances liquid-liquid phase separation of Tau protein and aggravates mitochondrial damages in cells [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2022, 209:703-715.
- [49] HUANG S, XU B K, LIU Y H. Calcium promotes α -synuclein liquid-liquid phase separation to

- accelerate amyloid aggregation [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2022, 603: 13-20.
- [50] CHANG R, CHEN J L, ZHANG G Y, et al. Intrinsically disordered protein condensate - modified surface for mitigation of biofouling and foreign body response [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2022, 144(27): 12147-12157.
- [51] ZHANG H C, SHAO S P, SUN Y J. Characterization of liquid-liquid phase separation using super-resolution and single-molecule imaging [J]. *Biophysics Reports*, 2022, 8(1): 2-13.
- [52] PATEL C K, RANI C, KUMAR R, et al. Macromolecular crowding promotes re-entrant liquid-liquid phase separation of human serum transferrin and prevents surface-induced fibrillation [J]. *Biomacromolecules*, 2023, 24(8): 3917-3928.
- [53] HE C D, WU C Y, LI W, et al. Multidimensional super-resolution microscopy unveils nanoscale surface aggregates in the aging of FUS condensates [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2023, 145(44): 24240-24248.
- [54] LI J Y, ZHU K, GU A H, et al. Feedback regulation of ubiquitination and phase separation of HECT E3 ligases [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2023, 120(33): e2302478120.
- [55] FU H L, HUANG J Y, VAN DER TOL J J B, et al. Supramolecular polymers form tactoids through liquid-liquid phase separation [J]. *Nature*, 2024, 626(8001): 1011-1018.
- [56] COCHEREAU R, VOISIN H, SOLÉ-JAMAULT V, et al. Influence of pH and lipid membrane on the liquid-liquid phase separation of wheat γ -gliadin in aqueous conditions [J]. *Journal of Colloid Interface Science*, 2024, 668: 252-63.
- [57] MENDES L F S, GIMENES C O, DA SILVA M D O, et al. The potential role of liquid-liquid phase separation in the cellular fate of the compartments for unconventional protein secretion [J]. *Protein Science*, 2024, 33(7): e5085.
- [58] BABINCHAK W M, SUREWICZ W K. Liquid-liquid phase separation and its mechanistic role in pathological protein aggregation [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2020, 432(7): 1910-1925.
- [59] DZURICKY M, ROGERS B A, SHAHID A, et al. De novo engineering of intracellular condensates using artificial disordered proteins [J]. *Nature Chemistry*, 2020, 12(9): 814-825.
- [60] ZHOU K, CHEN Q L, CHEN J M, et al. Spatiotemporal regulation of insulin signaling by liquid-liquid phase separation [J]. *Cell Discovery*, 2022, 8(1): 64.
- [61] SHIN Y, BRANGWYNNE C P. Liquid phase condensation in cell physiology and disease [J]. *Science*, 2017, 357(6357): eaaf4382.
- [62] RAY S, SINGH N, KUMAR R, et al. α -Synuclein aggregation nucleates through liquid-liquid phase separation [J]. *Nature Chemistry*, 2020, 12(8): 705-716.
- [63] LIU Z H, YANG Y, GU A H, et al. Par complex cluster formation mediated by phase separation [J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 2266.
- [64] STENDER E G P, RAY S, NORRILD R K, et al. Capillary flow experiments for thermodynamic and kinetic characterization of protein liquid-liquid phase separation [J]. *Nature Communications*, 2021, 12(1): 7289.
- [65] LYU P O, DU Y F, HE C D, et al. O-GlcNAcylation modulates liquid-liquid phase separation of SynGAP/PSD-95 [J]. *Nature Chemistry*, 2022, 14(7): 831-840.
- [66] MUZZOPAPPA F, HUMMERT J, ANFOSSI M, et al. Detecting and quantifying liquid-liquid phase separation in living cells by model-free calibrated half-bleaching [J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 7787.
- [67] TAN W, CHENG S H, LI Y Y, et al. Phase separation modulates the assembly and dynamics of a polarity-related scaffold - signaling hub [J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1): 7181.
- [68] MATSUURA U, TAHARA S, KAJIMOTO S, et al. Label-free autofluorescence lifetime reveals the structural dynamics of ataxin-3 inside droplets formed via liquid-liquid phase separation [J]. *Scientific Reports*, 2023, 13(1): 6389.
- [69] POUDYAL M, PATEL K, GADHE L, et al. Intermolecular interactions underlie protein/peptide phase separation irrespective of sequence and structure at crowded milieu [J]. *Nature Communications*, 2023, 14(1): 6199.
- [70] FUKUYAMA M, NISHINAMI S, MARUYAMA Y, et al. Detection of fibril nucleation in micrometer-sized protein condensates and suppression of Sup35 NM fibril nucleation by liquid-liquid phase separation [J]. *Analytical Chemistry*, 2023, 95(26): 9855-9862.
- [71] LI J, WANG W D, LI S, et al. Smad2/3/4 complex could undergo liquid liquid phase separation and induce apoptosis through TAT in hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Cell International*, 2024, 24(1): 176.

- [72] XIANG J N, CHEN J X, LIU Y Q, et al. Tannic acid as a biphasic modulator of tau protein liquid - liquid phase separation[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2024, 275:133578.
- [73] HUANG Y N, CHEN J L, HSIUNG C H, et al. Detecting protein - protein interaction during liquid - liquid phase separation using fluorogenic protein sensors[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2024, 35(3):ar41.
- [74] LIU H N, WANG T, HU J J, et al. The disordered protein SERF promotes α - Synuclein aggregation through liquid - liquid phase separation[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2024, 300(3):105667.
- [75] GABRYELCZYK B, CAI H, SHI X Y, et al. Hydrogen bond guidance and aromatic stacking drive liquid - liquid phase separation of intrinsically disordered histidine-rich peptides[J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1):5465.
- [76] ALDERSON T R, KAY L E. NMR spectroscopy captures the essential role of dynamics in regulating biomolecular function [J]. *Cell*, 2021, 184(3):577-595.
- [77] RITSCH I, LEHMANN E, EMMANOULIDIS L, et al. Phase separation of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 upon specific RNA - binding observed by magnetic resonance[J]. *Angewandte Chemie (International Ed)*, 2022, 61(40):e202204311.
- [78] BRAMHAM J E, GOLOVANOV A P. Temporal and spatial characterisation of protein liquid-liquid phase separation using NMR spectroscopy [J]. *Nature Communications*, 2022, 13(1):1767.
- [79] ZHANG H Y, FAN W W, NSHOGOZA G, et al. Driving force of biomolecular liquid - liquid phase separation probed by nuclear magnetic resonance spectroscopy[J]. *Biophysics Reports*, 2022, 8(2):90-99.
- [80] HUANG Y N, BAI Y L, JIN W H, et al. Common pitfalls and recommendations for using a turbidity assay to study protein phase separation [J]. *Biochemistry*, 2021, 60(32):2447-2456.
- [81] YANG S, YU H, XU X L, et al. AIEgen - conjugated phase-separating peptides illuminate intracellular RNA through coacervation - induced emission [J]. *ACS Nano*, 2023, 17(9):8195-8203.
- [82] SAHIN C, LEPPERT A, LANDREH M. Advances in mass spectrometry to unravel the structure and function of protein condensates [J]. *Nature Protocols*, 2023, 18(12):3653-3661.
- [83] LEPPERT A, CHEN G F, LAMA D, et al. Liquid - liquid phase separation primes spider silk proteins for fiber formation via a conditional sticker domain [J]. *Nano Letters*, 2023, 23(12):5836-5841.
- [84] MORAIS C C A, BERRA L, KASSIS E B, et al. Electrical impedance tomography - based ventilation patterns for evaluating proper ventilator settings and to classify lung morphofunction[J]. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 2024, 209(12):1516-1518.
- [85] CLASEN D, WINTER I, RIETZLER S, et al. Changes in ventilation distribution during general anesthesia measured with EIT in mechanically ventilated small children[J]. *BMC Anesthesiology*, 2023, 23(1):118.
- [86] GANESAN A, DURGAMAHANTHI V. Non - invasive breast cancer detection using electrical impedance tomography: design, analysis and comparison of reconstruction algorithms [J]. *Traitement Du Signal*, 2023, 40(6):2809-2817.
- [87] YIN X P, WU H C, JIA J B, et al. A micro EIT sensor for real-time and non-destructive 3-D cultivated cell imaging [J]. *IEEE Sensors Journal*, 2018, 18(13):5402-5412.
- [88] 姚佳烽, 刘夏移, 徐梓菲, 等. 基于微流控芯片的生物细胞电阻抗成像检测技术 [J]. *机械工程学报*, 2019, 55(2):1-9.
- [89] YANG L, WU H T, LIU K, et al. An image reconstruction algorithm for electrical impedance tomography using measurement estimation of virtual electrodes [J]. *IEEE Sensors Journal*, 2022, 22(13):13012-13022.

收稿日期:2024-11-29