doi：10.12452/j.fxcsxb.26071102

液-液相分离研究方法的进展

凌晓婷[1,2,3]，汪海林[1,2,3,4*]

（1. 中国科学院生态环境研究中心，北京 100085；2. 中国科学院大学，北京 100190；3. 国科大杭州高等研究院环境学院，浙江 杭州 310024；4. 江汉大学 环境与健康学院，湖北 武汉 430056）

摘 要：液-液相分离(LLPS)作为生物分子凝聚体形成的基础机制，其微观物理特性与材料性质的定量表征是理解凝聚体功能与调控的关键。该文系统综述了用于解析LLPS微观形态与物理特征的多种技术方法。在尺寸与结构表征方面，动态光散射与小角散射技术可原位监测凝聚体成核、生长及内部有序性；冷冻电子显微镜与原子力显微镜则分别提供了近原子分辨率的超微结构与纳米力学信息。在动力学与流变学表征方面，微流控平台、荧光相关光谱、单分子追踪、荧光漂白恢复以及光镊技术，从宏观凝聚体融合到单分子扩散，多尺度揭示了凝聚体的黏度、界面张力及分子交换速率。在分子构象与相互作用方面，核磁共振、傅里叶变换红外、圆二色及拉曼光谱等光谱学方法，可在残基水平分辨凝聚态中蛋白质的二级结构变化与分子间弱相互作用的化学本质。此外，基于质谱的蛋白质组学方法可系统解析凝聚体的分子组成与互作网络，而荧光各向异性技术则可探测凝聚体内纤维的分子取向。最后，针对凝聚体的电化学特性，如毫秒级电泳闪离技术等zeta电势测定方法，为生物分子相互作用与生理功能提供了参考。上述技术的综合应用与交叉验证，为从分子到介观尺度全面构建LLPS的物理化学图景提供了坚实支撑。

关键词：液-液相分离；生物分子凝聚体；无膜细胞器；分析方法；单分子荧光；zeta电势；粗粒化模拟

中图分类号：O657；G535.11 **文献标识码：**A **文章编号：**1004-4957(2026)08-1797-11

Advances in Research Methods for Liquid-Liquid Phase Separation

LING Xiao-ting[1,2,3]，WANG Hai-lin[1,2,3,4*]

（1. Research Center for Eco-Environmental Sciences，Chinese Academy of Sciences，Beijing 100085，China；2. University of Chinese Academy of Sciences，Beijing 100190，China；3. School of Environment，Hangzhou Institute for Advanced Study，UCAS，Hangzhou 310024，China；4. School of Environment and Health，Jianghan University，Wuhan 430056，China）

Abstract：Liquid-liquid phase separation(LLPS) serves as the fundamental mechanism underlying the formation of biomolecular condensates，and the quantitative characterization of their microscopic physical properties and material characteristics is crucial for understanding condensate function and regulation. This paper systematically reviews a comprehensive array of analytical techniques for dissecting the microscopic morphology，physical features，and molecular grammar of LLPS systems. For size and structural characterization，dynamic light scattering and small-angle X-ray/neutron scattering enable in situ monitoring of condensate nucleation，growth kinetics，and internal ordering；cryo-electron microscopy and cryo-electron tomography provide near-atomic resolution ultrastructural visualization of condensate interiors in their native hydrated state，while atomic force microscopy delivers nanomechanical information including Young's modulus and adhesion forces. Regarding dynamics and rheological characterization，microfluidic platforms coupled with fluorescence microscopy offer precise control over phase separation conditions and real-time tracking of condensate formation and maturation；fluorescence correlation spectroscopy and single-molecule tracking resolve the diffusion coefficients and mobility of individual molecules both within and outside condensates；fluorescence recovery after photobleaching quantifies the exchange dynamics and apparent viscosity of the condensed phase；optical tweezers enable direct measurement of interfacial tension，zero-shear viscosity，and fusion kinetics；micropipette aspiration provides complementary viscoelastic character-

收稿日期：2026-07-11；**修回日期：**2026-07-22
基金项目：国家重点研发计划(2024YFA0918803)；国家自然科学基金(22234008，22274166)；中国科学院战略性先导科技专项(XDB0750100)
*通讯作者：汪海林，博士，研究方向：高灵敏DNA/RNA修饰分析新方法、新技术，E-mail：hlwang@rcees.ac.cn
网络首发日期：2026-07-24

ization; and particle-tracking microrheology probes the local mechanical environment inside condensates. For molecular conformation and weak intermolecular interactions, nuclear magnetic resonance spectroscopy reveals residue-level structural ensembles and transient contacts that drive phase separation; Fourier-transform infrared, circular dichroism, and Raman spectroscopy resolve changes in protein secondary structure(α-helix, β-sheet, random coil) and identify the chemical nature of driving forces such as π-π stacking, hydrogen bonding, hydrophobic interactions, and cation-π interactions. Mass spectrometry-based proteomics approaches, including immunoprecipitation-mass spectrometry, crosslinking mass spectrometry, and proximity labeling coupled with quantitative proteomics, systematically map the molecular composition and interaction networks of condensates. Fluorescence anisotropy and linear dichroism imaging probe the molecular orientation of amyloid fibrils and the ordered alignment of filaments within condensates. Furthermore, to address the electrochemical properties of condensate interfaces, ratiometric pH-sensitive fluorescent dyes and genetically encoded pH sensors quantify the proton gradients across condensate boundaries; membrane potential probes reveal condensate-induced changes in cellular membrane potential; zeta potential measurements via millisecond flashing electrophoretic separation, electrophoretic light scattering, microelectrophoresis, and microfluidic free-flow electrophoresis characterize condensate surface charge; and novel electrical sensing platforms based on graphene field-effect transistors enable direct detection of the electric double layer formed at condensate interfaces. In addition to experimental approaches, bioinformatic prediction tools and sequence-based algorithms facilitate the identification of phase-separating proteins, while multiscale molecular dynamics simulations, spanning all-atom and coarse-grained representations, provide complementary insights into the sequence determinants and thermodynamic driving forces of LLPS. The integrated application and cross-validation of these experimental and computational techniques provide robust support for constructing a comprehensive physicochemical picture of LLPS from the molecular to the mesoscopic scale.

Key words: liquid-liquid phase separation; biomolecular condensates; membraneless organelles; analytical methods; single-molecule fluorescence; zeta potential; coarse-grained simulation

液-液相分离(LLPS)是指蛋白质、核酸等生物大分子在特定条件下自发地从均一溶液中分离为富集相和稀相的热力学过程[1-3]。其驱动力来源于固有无序区或模块化结构域介导的多价弱相互作用，包括π-π堆积、阳离子-π作用、疏水作用和静电互补等[4-7]。当大分子浓度超过饱和浓度后，系统会形成微米级、具有流动性的液态凝聚体，典型例子包括核仁[8-10]、应激颗粒[11-14]、P颗粒[15-17]以及转录调控[18-21]相关的无膜细胞器。这些凝聚体能够选择性富集特定客户分子、加速生化反应或隔离有害蛋白，从而参与基因表达调控、信号转导和应激适应。然而，当凝聚体稳态被打破时，凝聚体转化为病理性淀粉样纤维聚集体，与肌萎缩侧索硬化症[22-25]、阿尔茨海默病[26-28]等神经退行性疾病和多种肿瘤[29-30]的发生发展密切相关。

然而，凝聚体固有的动态性、异质性及多组分复杂性，对其物理表征提出了严峻挑战，亟待发展高时空分辨率、多维度且能原位测量的技术体系。本文围绕凝聚体的微观形态与物理性质，从凝聚体检测与结构解析、内部材料性质测定、分子构象与相互作用鉴定、表面电荷与电化学属性表征等维度，系统梳理了当前应用于LLPS研究的主流与新兴物理化学技术，并探讨了这些技术在揭示凝聚体形成与功能机制中的独特贡献。

1 液-液相分离的微观形态与物理表征技术

1.1 动态光散射与小角散射

动态光散射通过监测散射光强度来推算粒子的水合半径及粒径分布。当蛋白浓度逐渐跨越相分离阈值时，蛋白形成凝聚体，凝聚体平均粒径增长，多分散性指数增加，能够捕捉到凝聚体成核，且无需任何标记。但该方法不能用于高浓度、多重散射的环境。基于溶液中凝聚体的布朗运动导致散射光强度随时间涨落，通过自相关函数可提取凝聚体的扩散系数，进而利用Stokes-Einstein方程计算流体力学半径[31-32]。Iserman等[31]通过动态光散射测定了Ded1p及其截短变体(Ded1ΔN、Ded1ΔC)和突变体(Ded1-IDRm)在不同温度下的平均流体力学半径，将粒径突然增大的温度定义为凝聚起始温度(T_{onset})。

Ge等[32]通过动态光散射对无标签PC-FUS凝聚体的粒径分布和组装动力学进行了时间分辨率测量，发现FUS存在两个临界浓度：在约200 nmol/L处，单体(直径~10 nm)骤变为尺寸约300~500 nm的纳米团簇，其大小不随时间粗化；在约1 μmol/L处，进一步形成微米级凝聚体，且纳米团簇始终先于凝聚体出现并持续共存。

小角X射线散射则可提供更高分辨的纳米尺度结构信息[17,33-34]。例如，Fu等[33]通过小角X射线散射对纺锤形凝聚体内的纤维堆积方式进行了研究，发现纤维间距随葡聚糖浓度增加而减小，呈现出更紧密的六角堆积，证实了葡聚糖的拥挤效应增强了内部有序性。Rawlinson等[34]通过小角X射线散射(SAXS)分析P1、P3、P3-D289N、P3-KRm验证各蛋白均富含无序区域，P3-KRm最为伸展，P3-D289N最为致密，P3介于其间，而P1主要以闭合状态存在，以上构象差异与各蛋白在RNA结合及细胞无膜细胞器靶向上的功能获得与丧失高度吻合，揭示了N端和C端区域间的长程相互作用在调控P蛋白多功能性中的核心作用。Kimball等[17]利用SAXS结合粗粒化分子动力学模拟，对两种单克隆抗体(mAb2和mAb3)在接近液-液相分离临界时的短程吸引强度(K)和团簇大小分布进行了定量表征，发现相同条件下mAb3平均团簇尺寸是mAb2团簇尺寸的28.6倍，从而从分子间相互作用和微观结构层面揭示了mAb3优先发生液-液相分离的机制。

1.2　微流控与动力学测定

在液-液相分离与生物分子凝聚体的体外重构及定量表征中，微流控技术凭借其对微小体积流体的精确操控能力，已成为解析相分离热力学与动力学的重要平台。同时，微流控装置可与荧光显微镜联用，实时监测单个凝聚体的形成、生长、融合及向淀粉样纤维的液-固转变全过程，为化学动力学分析和相变机制研究提供毫秒至小时尺度的连续、高通量数据。Morris等[35]采用微流控水包油型微液滴捕获平台，通过控制液滴在室温下逐渐脱水收缩来逐步升高内部蛋白浓度，进而对Aβ40在液-液相分离凝聚体内的聚集动力学进行了精确解析，该模型将淀粉样纤维的形成描述为由以下核心微观步骤组成的级联反应：一次成核是指单体Aβ40在均相溶液中自发发生构象转变并组装形成初始纤维核的过程；二次成核是指已形成的纤维表面催化溶液中单体发生构象转变并生成新纤维核的自催化过程，负责纤维质量的快速扩增。Dada等[36]通过微流控液滴捕获平台，对α-突触核蛋白液-液相分离临界浓度及凝聚体内淀粉样纤维形成的浓度条件进行了精确测定，确定了相分离起始浓度约为527~604 μmol/L，而纤维化起始浓度约为660 μmol/L，他们进一步验证了包含二次成核的模型能够准确描述所有浓度和种子条件下的动力学数据，而其与初级成核速率常数的比值，在凝聚体的局域高浓度环境下，纤维表面的二次成核成为了驱动快速纤维增殖的主要途径。Stender等[37]开发了一种名为Capflex的毛细管流动实验方法，用于对蛋白质液-液相分离进行高通量、定量化的热力学与动力学表征。该方法可同步监测液滴形成与成熟动力学，并可通过泰勒分散分析测定相分离蛋白与调控分子的结合亲和力，已成功应用于Ddx4n1、RP3/ssDNA复合凝聚体及α-突触核蛋白等不同体系的关键参数测定。

1.3　荧光共振能量转移

当荧光供体分子的发射光谱与受体分子的激发光谱存在重叠，且二者空间距离小于10 nm时，受激发的供体可通过非辐射偶极-偶极耦合将能量转移给受体，导致供体荧光减弱而受体荧光增强。Choi等[1]通过将3′-Cy3和5′-Cy5双标记的RNA双链预杂交后引入多相肽凝聚体，经光谱串扰校正后计算校正荧光共振能量转移(FRET)效率，对多相R10/K10/D10凝聚体内、外相中RNA双链的杂交状态与解离热力学进行了定量解析，研究表明，单链RNA优先分配进入内相，而双链RNA则倾向分配于外相，这一差异驱动了内相更强的解旋酶样活性，揭示了多相凝聚体中分区与解离热力学耦合对RNA杂交状态空间调控的关键作用。Shan等[38]通过荧光共振能量转移技术，发现METTL3与DDB1和SUV39H1/H2存在直接互作，证实METTL3/METTL14可作为CRL4的适配器介导SUV39H1/H2的泛素化降解，从而阻止H3K9me3在核仁中累积以维持液-液相分离。Hardy等[39]通过荧光寿命成像-荧光共振能量转移技术，发现cAMP诱导RIα形成凝聚体后，其内在无序连接区中的抑制性序列仍与具有催化活性的PKA-C保持直接的物理结合，形成一种非经典的全酶构象，从而将活性PKA-C限制在凝聚体内以维持胞质的低水平PKA信号。

1.4 特征扩散系数与黏度测定

1.4.1 荧光相关光谱 荧光相关光谱通过记录微小共聚焦体积(~1 fL)内荧光涨落来解析分子的扩散系数$D=w_{xy}^2/(4\tau)$[40-42]，尤其适合区分游离蛋白与凝聚体内束缚态蛋白[32,43]。荧光交叉相关光谱还能定量两种分子在凝聚体内外的互作程度，确证凝聚体内部为高度拥挤但仍保持流动性的稀疏网络结构。Ge等[32]利用荧光相关光谱对掺杂了20 nmol/L Cy3-FUS的系列浓度PC-FUS溶液进行了扩散时间测量，通过自相关函数拟合得到各组分对应的流体力学直径，确认了3种截然不同的分子状态：低于200 nmol/L时仅见快速扩散的单体(~10 nm)，200 nmol/L~1 μmol/L之间缓慢出现中等尺寸团簇，超过1 μmol/L后扩散进一步减慢，对应更大的凝聚体颗粒。Sun等[43]通过荧光相关光谱对体外不同尺寸CKAP4凝聚体中分子的扩散动力学进行了定量分析，以荧光素标记的CKAP4适配体为荧光探针，测量了各尺寸凝聚体的自相关曲线，结果显示，小凝聚体(<1 μm)内分子的扩散时间(253.7±33.7) μs显著大于大凝聚体(103.2±19.4) μs及稀溶液(66.6±25.5) μs，表明小凝聚体内部分子运动更慢、分子间相互作用更强。这一发现揭示了小尺寸凝聚体具备更高的稳定性与机械强度，为其通过界面张力有效重塑微管分支提供了物理基础。

1.4.2 单分子追踪 单分子追踪是一种基于单分子定位显微镜(如光激活定位显微镜或随机光学重建显微镜)的超分辨成像与动态分析技术，其核心原理是对目标生物分子进行稀疏的荧光标记，通过高斯拟合精确定位单个分子的中心位置(精度可达数十纳米级)，并在连续帧间将定位点连接为单个分子的运动轨迹，通过对轨迹的均方位移分析，可提取单个分子的扩散系数、受限面积、运动模式等动力学参数，从而在纳米精度和毫秒时间分辨率下揭示蛋白在活细胞复杂微环境中的真实动态行为[44-46]。Zhang等[45]通过渗透裂解胞饮泡将量子点导入U2OS细胞胞质，结合单粒子追踪与共聚焦成像，对应激颗粒组装过程中活细胞内纳米级探针的扩散动力学进行了定量研究，发现应激颗粒凝聚体的形成增加了胞内空间异质性及拥挤程度，并首次在活细胞中证实了降低胞内扩散能直接促进应激颗粒组装，而破坏微管相关的主动运输则会阻碍应激颗粒凝聚体的融合和生长。在Jackson等[46]的研究中，该技术被用于探究N-WASP在神经元突触前区的动力学，将光转换荧光蛋白mEos3.2融合到N-WASP的N端，并在海马神经元中表达，连续成像获取大量单分子轨迹，分析发现，N-WASP在突触前隔室中具有极高的运动性，证实了N-WASP在凝聚体或突触前区仍维持流体状动态特征。Hoffmann等[44]通过超快速单分子追踪技术，在活细胞中对内源性标记的PDZD8蛋白进行了实时成像与轨迹分析，发现PDZD8在ER-线粒体接触位点形成动态凝聚体，其单分子在凝聚体内呈现显著的瞬时停滞，且该相分离行为依赖于内在无序区。

1.4.3 荧光漂白恢复 荧光漂白恢复(FRAP)实验通过在凝聚体中心区域用高功率激光猝灭中心一个区域(盘状、条带、整体)的荧光，监测指数函数拟合的荧光恢复曲线，获得蛋白质重排的特征扩散时间，转换为蛋白质的表观扩散系数$D=R^2/\tau$[32,40,47]，可以计算凝聚体内部的$\eta=k_BT/(6\pi Da)$[40,47-48]。Choi等[1]通过测量荧光分子在光漂白后的扩散恢复速率证实了多相凝聚体的外相黏度低于内相，表明局部黏度越低、分子扩散越快。Ge等[32]开发了一种名为单团簇捕获的全内反射荧光成像平台，对单个PC-FUS纳米团簇进行实时荧光漂白后恢复测量，发现纳米团簇在30 min内即停止粗化并维持在约500 nm，纳米团簇内部分子快速交换，光漂白后恢复扩散系数(D_{app})约为1.6~2.2×10^{-4} μm^2/s，表明其具有液态特征和与凝聚体相当的分子运动性。

1.4.4 光镊技术 液态凝聚体的标志性特征之一是融合后迅速变为球形并降低总表面积。光镊技术利用高度聚焦的激光束捕获和操控单个凝聚体，通过控制两个凝聚体的接触与融合，直接测定界面张力、内部黏度和应力松弛特征[1,31,49-54]。Feric等[52]通过分析凝聚体融合弛豫动力学的反毛细管速度以及利用粒子追踪微流变学直接测量黏度，对体外纯化的核仁蛋白NPM1和FIB1凝聚体的黏度进行了测定，发现NPM1凝聚体的黏度约为0.74 Pa·s，呈单纯粘性液体；而FIB1凝聚体则表现出粘弹性，其内部探针粒子运动呈亚扩散，且凝聚体会随时间老化并变得更加固态。Ghosh和Zhou[54]通过双陷阱光镊技术，通过监测光阱检测到的力差来实时追踪凝聚体融合过程中边缘距离的减小，并将力衰减曲线拟合，发现由松散堆积的无序聚合物链组成的凝聚体融合最快，而由紧密堆积的结构域蛋白组成的凝聚体融合最慢；融合速度由大分子堆积密度决定，而非单独由表面张力或黏度主导，且堆积密度的差异源于组

分大分子的结构紧凑程度。

1.4.5　微量移液抽取　微量移液抽取（MPA）被提出作为测量凝聚液黏度和表面张力的工具。Roggeveen 等[55]通过将微管吸吮过程分解为4个流动区域，基于低雷诺数斯托克斯流和泊肃叶流的粘性耗散分析，并引入拉普拉斯界面压力项，对蛋白质凝聚体的吸入动力学进行了理论建模，推导出一个描述吸入长度$L_p(t)$随时间平方根变化的解析方程，利用该模型，仅需拟合不同施加压力下的$L_p(t)$数据，可计算凝聚体的黏度和表面张力，并进一步给出了当外部稀相黏度不可忽略时的修正模型。Huang 等[56]通过微量移液吸取技术，对光响应凝聚体与蛋白质体在紫外光刺激下的跨膜传输机制进行了研究，发现凝聚体在膜上内陷，产生瞬时渗透压差为跨膜传输提供驱动力。

1.4.6　原子力显微镜　原子力显微镜可对吸附在基底上的凝聚体进行力学压痕实验，直接测量杨氏模量和表面张力[33,43,57-60]。Sun 等[43]通过原子力显微镜对触发胞内力学感受器 CKAP4 凝聚所需的固体应力条件进行了定量研究，确定了引发 CKAP4 相分离的最小力为 2 nN，且凝聚可在 10 nN 力下 40 min 内完成，而间歇性应力则无效，结果揭示了 CKAP4 对固体应力的大小和弹性均具有严格依赖性。例如，Liao 等[59]利用原子力显微镜，结合胶体探针（直径约 15 μm）对 6xPSD 多组分蛋白质凝聚体进行了力学表征，发现凝聚体呈现两种截然不同的松弛模式：短时间（t<9 ms）的指数衰减和长时间（可达 10 s）的幂律衰减，短时指数松弛归因于可移动蛋白质的局部扩散重排，而长时幂律松弛则由该网络中弱键的结合与解离动力学主导。

1.5　荧光各向异性技术

借助对荧光分子跃迁偶极矩取向的探测，可解析生物分子凝聚体中纤维和蛋白质的分子取向与排列有序性[33,61-62]。Fu 等[33]通过偏振荧光显微镜和即时分子取向显微镜对纺锤形凝聚体内部的纤维取向进行了分析，发现纺锤形凝聚体内纤维沿长轴高度有序排列，且在葡聚糖作用下从双极构型转变为更有序的均一构型。Morelli 等[62]通过荧光检测线性二色性成像，结合 ThT 染色分析了 hnRNPA1A 凝聚体界面处原纤维的取向，发现硫黄素 T 分子（其跃迁偶极矩与原纤维长轴平行）被平行于凝聚体界面的激发光优先激发，直接证明了 hnRNPA1A 淀粉样原纤维在凝聚体界面处呈平行于界面的有序排列。Molliex 等[61]通过硫黄素 T 荧光检测和荧光各向异性技术，对 hnRNPA1 及其突变体在液-液相分离条件下的纤维化动力学进行了分析，发现疾病相关突变体 D262V 在凝聚体中迅速形成 ThT 阳性的淀粉样纤维，而野生型纤维化缓慢；并发现低复杂度结构域和 RNA 识别基序 RRMs 的多价 RNA 结合能力协同增强了 hnRNPA1 的 LLPS。

1.6　冷冻电子显微镜

冷冻电子显微镜可在近原子分辨率下原位观察细胞内无膜细胞器的三维超微结构，而无需外源标记[63-66]。Yu 等[64]结合冷冻电子断层扫描在近生理状态下对 TDP-43 小体的三维结构进行了原位高分辨解析，显示小体具有厚度约（320±20）nm 的环状壳层，其内部呈网状密度，与体外重构的相分离区室的网状结构相似；而核心区域的分子密度低于周围核质，该结果直接证明了小体是一种由多孔网状壳层包裹液态核心的无膜区室，部分分子可自由通过壳层进行交换。Ianiro 等[65]利用冷冻透射电子显微镜对 PEO_2K-b-$PCL_{10}K$ 嵌段共聚物在体外溶剂切换法自组装形成的囊泡进行了结构表征，确认了凝聚体前驱体的存在及其向囊泡的转化，直观展示了液-液相分离在最终自组装结构形成中的决定性作用。Yuan 等[66]通过冷冻电子显微镜结合全原子分子动力学（AAMD）模拟，对 Z-FF 肽的液-液相分离及后续自组装过程进行了研究，发现该肽首先通过 LLPS 形成无序的凝聚体，随后发生融合和聚并，逐步组织成纳米纤维前体，并最终演化为稳定的纤维结构。Franzmann 等[63]通过冷冻电子断层扫描技术，对酵母 Sup35 蛋白形成的凝胶状凝聚体的内部超微结构进行了研究，发现其由无定形的多孔网状结构组成，平均孔径约为 10 nm。

1.7　质谱分析相互作用网络

基于质谱的蛋白质组学方法可系统解析生物分子凝聚体的分子组成、相互作用网络与动态构象[34,43,64,67-68]。Dai 等[68]通过基于温敏性 RLP 多肽上临界溶解温度相行为的离心分离策略，结合电感耦合等离子体质谱，对凝聚体形成前后细胞裂解液中稀相的离子分布变化进行了定量分析，得到了凝聚体可显著富集 Mg^{2+}和 Ca^{2+}，从而导致胞质中这两种离子浓度分别降低约 2 倍和 1.4 倍的结论。Sun 等[43]

通过免疫沉淀-质谱联用技术对固体应力诱导CKAP4相分离后的分子互作网络进行了鉴定，结合液相色谱-串联质谱分析及GO功能注释，揭示这些差异蛋白主要富集于细胞骨架相关通路，特别是微管蛋白和肌动蛋白，证实了CKAP4凝聚体在应力条件下直接与微管骨架系统发生物理互作。Rawlinson等[34]对GFP、GFP-P1和GFP-P3相互作用蛋白进行免疫沉淀，经胰蛋白酶消化后进行液相色谱-串联质谱分析，结果显示P3和P1分别有410和377个显著富集的互作蛋白，拥有高度重叠的MLO蛋白互作网络，提示P1和P3共享保守的蛋白结合界面。随后通过交联质谱对RABV P1、P3及其功能获得性突变体P3-D289N和功能缺失性突变体P3-KRm的相互作用网络进行了比较解析，结果显示，突变影响了N端和C端结构域间及域间的分子内/分子间接触。

为全面捕获凝聚体内瞬息万变的蛋白质组成，邻近标记酶融合到目标蛋白上，在活细胞中短时加入生物素底物，使凝聚体内的邻近蛋白被共价标记，结合质谱鉴定可绘制高时空分辨率的相分离互作组[64,67]。Yu等[64]利用APEX2邻近标记技术结合稳定同位素标记定量蛋白质组学，对TDP-43球壳小体内部的分子组成进行了鉴定，发现了HSP70分子伴侣家族5个成员(HSPA1A、HSPA1L、HSPA5、HSPA6、HSPA8)均被富集6~16倍，成为核心的主要组分，而mRuby2标记的活细胞荧光成像进一步验证了这些HSP70蛋白定位在核心内部而非壳层。Patil等[67]通过TurboID邻近标记联合TMT定量质谱、免疫沉淀-质谱以及免疫荧光共定位分析，发现ARID1A N端无序区序列通过驱动cBAF凝聚体形成来招募转录相关因子，而DNA结合域则稳定cBAF与转录因子的直接结合，二者协同保障cBAF染色质靶向与活性。

1.8 光谱学与蛋白质构象变化

1.8.1 核磁共振光谱 核磁共振光谱是一种能够在生理条件下对蛋白质提供残基分辨率原子级结构信息的关键技术[69-72]。其原理在于，通过监测稀相和凝聚相中蛋白质主链及侧链化学位移的变化，可以直接评估二级结构和局部构象。在液-液相分离研究中的核心发现是，尽管许多蛋白质含有的重复序列低复杂性结构域具有组装倾向，但在液态凝聚相中，这些结构域依然保持固有的无序状态，而非形成刚性结构[70]。此外，结合同位素标记，NMR能够直接探测凝聚相内密集的多价弱相互作用网络，揭示芳香族、极性及带电残基间的空间邻近关系，从而在不破坏凝聚体结构的前提下解析驱动相分离的分子语法。Berkeley等[71]利用分裂内含肽介导的分段同位素标记策略，结合魔角旋转固体核磁共振技术，对HSPB1寡聚体中各结构域的构象与动力学进行了高分辨解析，区分刚性与动态组分，并结合二维^{13}C-^{13}C相关谱，发现在寡聚物环境中，HSPB1的N端结构域是刚性的，采用多种异质构象，而C端结构域则保持高度动态，HSPB1最终形成笼状多分散寡聚体。Reis等[72]采集了可溶态与LLPS态P7的2D^{1}HTOCSY、ROESY和^{1}H，^{13}C HSQC谱，通过主链化学位移归属并利用CSI3.0预测二级结构倾向，在残基水平上对比了两种状态的构象差异，结果显示，LLPS态肽呈现典型的β-发夹特征——由转角分隔的两段伸展链，而可溶态仅显示松弛的类发夹结构。Wang等[69]通过异核NMR波谱，对Antp同源域与D/E重复序列融合蛋白的自抑制机制进行了研究，证实D/E重复序列通过静电相互作用与DNA结合域发生动态结合。

1.8.2 傅里叶变换红外光谱 傅里叶变换红外光谱的原理是基于分子化学键对红外光的特征吸收，蛋白质主链酰胺基团的C=O伸缩振动对二级结构高度敏感，通过去卷积和高斯拟合等手段可定量解析α-螺旋、β-折叠和无规卷曲等构象的相对含量[72-73]。在液-液相分离研究中，傅里叶变换红外光谱的核心目的是原位鉴定凝聚相与稀相中蛋白质二级结构的差异，判断相分离是否伴随构象转变。Reis等[72]利用衰减全反射傅里叶变换红外光谱采集酰胺I带(1 550~1 720 cm^{-1})，通过去卷积定量解析P7在3种状态下的二级结构组成，结果表明，可溶态以1 640 cm^{-1}无规卷曲为主并含少量1 685 cm^{-1}转角；LLPS态β-折叠的含量骤增至约70%(1 623、1 663 cm^{-1})，结合1 683 cm^{-1}转角信号，确证了β-发夹的形成；而聚集态β-折叠成分大幅降低、无序度增加。

1.8.3 圆二色光谱 圆二色光谱的原理是手性分子对左旋和右旋圆偏振光的吸收存在差异，产生的椭圆偏振光谱在远紫外区(180~260 nm)能灵敏地报告蛋白质主链构象——α-螺旋在208和222 nm呈双负峰，β-折叠在216 nm呈单负峰，而无规卷曲在195 nm附近呈强负峰[72-74]。Reis等[72]通过远紫外圆二色光谱分析了催化肽P7在可溶态、液-液相分离态及聚集体态下的二级结构，结果显示，P7凝聚体则

失去有序特征。该实验直接证明凝聚体可约束柔性肽的构象，将其稳定为规则的β-发夹结构域。Powell 等[74]通过远紫外圆二色光谱测量了 N-糖基化 K18 及 2N4R tau 在溶液中的二级结构，并记录了 200/217 nm 椭圆率比值随温度的变化，得到所有糖基化构建体均以无序结构为主、N-糖基化未显著改变 tau 整体折叠状态及温度依赖性构象变化的结论。

1.8.4　拉曼光谱　相干反斯托克斯拉曼散射是一种基于分子本征振动光谱的非线性光学成像技术，以亚微米空间分辨率和视频级速度直接可视化生物样品中特定化学键的分布及其结构变化。蛋白质主链酰胺 Ⅰ 带（1 600~1 700 cm^{-1}）的振动频率对二级结构高度敏感：1 570 cm^{-1}为 DNA/RNA 嘌呤环骨架振动；1 650 cm^{-1}为蛋白质α-螺旋酰胺 Ⅰ 带及不饱和脂肪酸顺式双键；1 667 cm^{-1}为蛋白质β-折叠酰胺 Ⅰ 带[75]。Ishibashi 等[75]通过相干反斯托克斯拉曼散射光谱成像技术，对细胞衰老过程中核仁蛋白质酰胺 Ⅰ 带的波数位移进行了研究。此外，Zhou 等[76]通过拉曼光谱分析，对四肽 WXWW 在溶液和凝聚体状态下的分子相互作用进行了研究，发现凝聚体形成后色氨酸的疏水作用显著增强（I_{1360}/I_{1340}比值升高），氢键和范德华力参与其中，但无明显的阳离子-π 相互作用，表明疏水作用、π-π 堆积和氢键协同驱动液-液相分离。

1.9　凝聚体表面电荷与ζ电位表征技术

1.9.1　pH 敏感化学染料与膜电位染料　基因编码和化学合成的荧光探针为解析凝聚体内部的 pH 梯度及膜电位变化提供了多维度、高时空分辨率的定量工具[68,77]。Dai 等[68]在该研究中综合运用多种荧光探针，从不同维度解析了凝聚体对细胞电化学平衡的调控。为监测胞内 pH 梯度，先后使用比率式染料 C-SNARF-4-AM 和基因编码探针 pHluorin，证实凝聚体形成导致细胞质酸化、凝聚体内部碱化。膜电位评估方面，采用快速响应探针 DI-4-ANEPPS 以及基于 Nernst 平衡原理的阳离子染料 ThT 和阴离子染料 $DiBAC_4(3)$，一致揭示凝聚体诱发膜超极化。此外，通过融合 mEGFP 定量胞质蛋白浓度，利用带净负电荷的 sfGFP 改造序列以检验膜电位变化的可编程性。Yu 等[77]通过比率型荧光染料（C-SNARF-4）成像，对 RLP 凝聚体内部的 pH 进行了实时定量，发现凝聚体在老化过程中呈现从中性到碱性、再回到酸性的两阶段 pH 转变，且表面活性剂和带电表面等界面效应可显著调节凝聚体内部的 pH。

1.9.2　zeta 电势测定　凝聚体与稀相之间的电位差可通过电化学电位法测定[77]。Yu 等[77]通过电化学电位法，直接测量了相分离稀相和密相之间的开路电位差，发现老化 2 h 的凝聚体相间电位差约为 6.7 mV，而老化 24 h 后降至约 2.2 mV，表明凝聚体老化会削弱相间电化学电位梯度。

表面电荷和 zeta 电势是决定凝聚体稳定性和功能的核心要素。传统的 zeta 电势测定通过 Malvern Zetasizer 测定仪测定。Malvern Zetasizer 基于激光多普勒电泳原理[33,72,77-79]：带电粒子在电场中迁移时，入射激光被运动粒子散射后产生频率偏移（多普勒效应），通过检测散射光频率变化计算电泳迁移率，进而利用 Smoluchowski 或 Henry 方程转换为 zeta 电位。例如，Yu 等[77]利用该技术（Malvern ZEN3600）比较了不同老化时间 RLP 凝聚体的表面电位，发现老化后 zeta 电位显著降低，表明表面电荷密度随凝聚体成熟而下降。

此外还有新颖的 zeta 电势检测方法。van Haren 等[48]通过微电泳技术，对单个凝聚体在电场中的运动轨迹进行显微追踪和自动化图像分析，测定了凝聚体的电泳迁移率，并结合 Ohshima 关于可极化凝聚体电泳的理论，计算了凝聚体的 zeta 电位。研究发现，凝聚体的电泳迁移率具有尺寸依赖性（大凝聚体迁移更快）。Welsh 等[80]结合微流控自由流电泳（μFFE）方法，使凝聚体在垂直于流动方向的电场中发生偏转，通过量化单个凝聚体的位移来测定其电泳迁移率，从而计算出单凝聚体水平的 zeta 电位分布，研究发现凝聚体 zeta 电位的绝对值越高，其抵抗融合和聚结的被动稳定性越强。Hoffmann 等[81]利用单原子层石墨烯对表面电场变化极其敏感的特性，开发了一种基于石墨烯场效应晶体管的全新界面电学表征方法，当带电生物分子或凝聚体吸附在石墨烯表面并形成双电层时，会通过静电耦合效应诱导石墨烯中的载流子浓度发生变化，表现为器件的狄拉克点发生位移，以直接探测 synapsin 1 凝聚体在界面处形成的电场梯度。

作者实验室近期开发了无需成像的毫秒级电泳闪离耦合激光诱导荧光检测平台[82]，该平台融合了毛细管电泳的高分离效率与激光诱导荧光的超高灵敏度，仅需约 10 nL 样品体积和纳摩尔浓度的标记分子，在生理缓冲条件下实现了对天然凝聚体ζ电位分布的单凝聚体分辨率定量。借助 msFES-LIF 平

台，Ling等[82]首次揭示了hcGAS-dsDNA凝聚体的双峰ζ电势分布，并发现带有正ζ电位的凝聚体能够抵抗负调控因子TREX1的降解。

2 液-液相分离预测与模拟方法

2.1 相分离蛋白预测工具与数据库

基于序列特征的预测模型通过分析固有无序区长度、π-π接触倾向、净电荷分布等参数，可快速筛选潜在相分离蛋白。PhaSepDB[83-88]、LLPSDB[86,89-92]和DrLLPS[93-95]等专业数据库整合了已知相分离蛋白、实验条件及功能注释，为数据挖掘和假设驱动研究提供支撑。Monti等[96]通过开发catGRANULE 2.0 ROBOT算法，整合蛋白质的理化性质与AlphaFold衍生结构特征，对液-液相分离蛋白质的相分离倾向进行了单氨基酸分辨率预测，得到了该算法能够准确评估突变对LLPS倾向的影响，并得到显微成像等实验验证的结论。

2.2 全原子和粗粒化分子动力学模拟

全原子分子动力学模拟基于经典牛顿力学，其原理在于利用高分辨率力场刻画成键、范德华及长程静电等相互作用，从而对蛋白质构象空间进行充分采样，进而理解这些弱相互作用并为相分离提供分子基础[97-102]。Rauscher和Pomes[100]进行了最早的全原子模拟，模拟了短弹性蛋白状肽液态，强调组装态中存在与实验一致的构象无序。

粗粒化分子动力学模拟将多个重原子合并为一个粗粒化珠子，通过简化势能面牺牲部分化学细节，以大幅减少系统自由度，换取对多链凝聚体系的有效采样，同时保留关键的物理化学特征[101-102]。粗粒化模型基于HPS-Urry残基水平相互作用势，将折叠结构域(如保守螺旋区)作为刚性体处理，而固有无序区则保持柔性；离子屏蔽效应通过Debye-Hückel静电势引入[69,102-103]。

此前的研究利用全原子和粗粒分子动力学模拟，表征TDP-43 C末端结构域与全长蛋白分离相的结构、动力学和相互作用[97-99,104]。Xu等[104]通过累计20 μs的全原子分子动力学模拟，发现TDP-43三聚体为纤维形成的临界核，四聚体为最小稳定核，且ATP通过π-π、阳离子-π、盐桥和氢键等多重相互作用结合于原纤维N端以增强β-折叠和氢键含量。Feito等[105]通过直接共存分子动力学模拟，系统比较了HPS、HPS-cation-π、CALVADOS2、Mpipi和Mpipi-Recharged五种残基分辨粗粒化蛋白模型对hnRNPA1低复杂度结构域及其芳香族突变体相行为的预测能力。Berkeley等[71]通过全原子分子动力学模拟和基于HPS-Urry模型的粗粒化共存分子动力学模拟，揭示了HSPB1 N末端结构域被包埋于笼状寡聚体内部，HSPB1二聚体能完全分配入凝聚体且其N末端结构域对这一分配不可或缺，在分子层面确立了HSPB1 N末端结构域的可及性是HSPB1调控和参与生物凝聚体的关键决定因素。Wang等[106]通过优化Martini 3力场的键合参数(包括主链二面角、侧链取向等)，开发了Martini3-IDP粗粒分子动力学模型，对内在无序蛋白的构象、多结构域蛋白动力学、配体/膜结合及液-液相分离等多种过程进行了研究，发现该模型能产生更伸展的无序蛋白构象，显著改善实验回转半径的再现，且在不破坏整体相互作用平衡的前提下，成功描述了涉及无序蛋白的复杂生物分子行为。Zhou等[76]通过结合MARTINI粗粒化和CHARMM36m全原子的多尺度分子动力学模拟，发现WRWW的β-链更稳定且易聚集形成有序内核，而YRYY的β-链不稳定、有序核心消散，揭示了强同源π-π相互作用是形成核壳结构的关键驱动力，并表明液态外壳可阻止水分子渗入以保护有序内核。

3 总结与展望

尽管当前技术已能对凝聚体的多尺度物理特性进行丰富表征，但该领域仍面临多重挑战与广阔发展空间。首先，凝聚体的本质是非平衡态的动态系统，目前多数测量仍依赖于平衡态或稳态假设，未来需发展能捕捉凝聚体形成、老化及溶解全过程中瞬态物理性质变化的时分辨原位测量技术。其次，单一技术往往只能揭示凝聚体某一侧面的性质，多模式联用技术(如光镊与共聚焦显微镜、微流控与单分子荧光、冷冻电镜与质谱的跨尺度关联分析)将有助于建立结构-动力学-功能的完整论证。此外，当前对凝聚体界面的物理化学认知仍十分有限，界面处的电场分布、分子取向、渗透性和表面粘弹性等关键参数的表征工具亟待开发和普及。最后，从体外重构到细胞内原位测量的跨越是另一重要方向，例如如何将具有分子水平分辨率的光谱技术、力学测量技术、zeta电势测定技术等适配于复杂的活细

胞环境，实现对内源性凝聚体物理特性的定量解读，将是未来研究的关键突破点。这些方向的发展，不仅将深化对LLPS基础物理原理的理解，也将为靶向凝聚体的药物设计及人工合成细胞的构建提供定量依据和全新思路。

参考文献：

[1] Choi S，Meyer M O，Bevilacqua P C，Keating C D. *Nat. Chem.*，**2022**，14(10)：1110-1117.
[2] Avanzini F，Aslyamov T，Fodor E，Esposito M. *J. Chem. Phys.*，**2024**，161(17)：174108.
[3] Riback J A，Zhu L，Ferrolino M C，Tolbert M，Mitrea D M，Sanders D W，Wei M T，Kriwacki R W，Brangwynne C P. *Nature*，**2020**，581(7807)：209-214.
[4] Guo Q，Shi X，Wang X. *Non-Coding RNA Res.*，**2021**，6(2)：92-99.
[5] Alberti S，Gladfelter A，Mittag T. *Cell*，**2019**，176(3)：419-434.
[6] Hyman A A，Weber C A，Jülicher F. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*，**2014**，30(1)：39-58.
[7] Zhang C，Lai L. *Acta Phys. -Chim. Sin.*，**2020**，36(1)：1907053.
[8] Hayes M H，Peuchen E H，Dovichi N J，Weeks D L. *ELife*，**2018**，7：e35224.
[9] King M R，Ruff K M，Lin A Z，Pant A，Farag M，Lalmansingh J M，Wu T，Fossat M J，Ouyang W，Lew M D，Lundberg E，Vahey M D，Pappu R V. *Cell*，**2024**，187(8)：1889-1906.e24.
[10] Lafontaine D L J，Riback J A，Bascetin R，Brangwynne C P. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*，**2021**，22(3)：165-182.
[11] Gasset-Rosa F，Lu S，Yu H，Chen C，Melamed Z，Guo L，Shorter J，Da Cruz S，Cleveland D W. *Neuron*，**2019**，102(2)：339-357.e7.
[12] Santofimia-Castaño P，Fraunhoffer N，Liu X，Bessone I，di Magliano M，Audebert S，Camoin L，Estaras M，Brenière M，Modesti M，Lomberk G，Urrutia R，Soubeyran P，Neira J，Iovanna J. *EMBO Mol. Med.*，**2024**，16(3)：475-505.
[13] Shang Z，Zhang S，Wang J，Zhou L，Zhang X，Billadeau D D，Yang P，Zhang L，Zhou F，Bai P，Jia D. *Nat. Commun.*，**2024**，15(1)：4127.
[14] Yang P，Mathieu C，Kolaitis R M，Zhang P，Messing J，Yurtsever U，Yang Z，Wu J，Li Y，Pan Q，Yu J，Martin E W，Mittag T，Kim H J，Taylor J P. *Cell*，**2020**，181(2)：325-345.e28.
[15] Brangwynne C P，Eckmann C R，Courson D S，Rybarska A，Hoege C，Gharakhani J，Jülicher F，Hyman A A. *Science*，**2009**，324(5935)：1729-1732.
[16] Rey T，Zaganelli S，Cuillery E，Vartholomaiou E，Croisier M，Martinou J C，Manley S. *Nat. Cell Biol.*，**2020**，22(10)：1180-1186.
[17] Kimball W D，Lanzaro A，Hurd C，Jhaveri N，Huang J，Lewandowski J，Qian K K，Woldeyes M A，Majumdar R，Witek M A，Feng J，Gillilan R E，Huang Q，Marras A E，Truskett T M，Johnston K P. *J. Phys. Chem. B*，**2025**，129(11)：2856-2871.
[18] Guo Y E，Manteiga J C，Henninger J E，Sabari B R，Dall'Agnese A，Hannett N M，Spille J H，Afeyan L K，Zamudio A V，Shrinivas K，Abraham B J，Boija A，Decker T M，Rimel J K，Fant C B，Lee T I，Cisse I I，Sharp P A，Taatjes D J，Young R A. *Nature*，**2019**，572(7770)：543-548.
[19] Henninger J E，Oksuz O，Shrinivas K，Sagi I，LeRoy G，Zheng M M，Andrews J O，Zamudio A V，Lazaris C，Hannett N M，Lee T I，Sharp P A，Cissé I I，Chakraborty A K，Young R A. *Cell*，**2021**，184(1)：207-225.e24.
[20] Tang G，Xia H，Huang Y，Guo Y，Chen Y，Ma Z，Liu W. *Genome. Biol.*，**2024**，25(1)：67.
[21] Zhou H，Song Z，Zhong S，Zuo L，Qi Z，Qu L J，Lai L. *Angew. Chem. Int. Ed.*，**2019**，58(15)：4858-4862.
[22] Conicella A E，Zerze G H，Mittal J，Fawzi N L. *Structure*，**2016**，24(9)：1537-1549.
[23] Arseni D，Hasegawa M，Murzin A G，Kametani F，Arai M，Yoshida M，Ryskeldi-Falcon B. *Nature*，**2022**，601(7891)：139-143.
[24] Ross C A，Poirier M A. *Nat. Med.*，**2004**，10(7)：S10-S17.
[25] Kim H J，Kim N C，Wang Y D，Scarborough E A，Moore J，Diaz Z，MacLea K S，Freibaum B，Li S，Molliex A，Kanagaraj A P，Carter R，Boylan K B，Wojtas A M，Rademakers R，Pinkus J L，Greenberg S A，Trojanowski J Q，Traynor B J，Smith B N，Topp S，Gkazi A S，Miller J，Shaw C E，Kottlors M，Kirschner J，Pestronk A，Li Y R，Ford A F，Gitler A D，Benatar M，King O D，Kimonis V E，Ross E D，Weihl C C，Shorter J，Taylor J P. *Nature*，**2013**，495(7442)：467-473.
[26] Huang Q，Xu S，Mo M，Yang Q，Li J，Zhong Y，Zhang J，Zhang L，Ye X，Liu Z，Cai C. *J. Mass Spectrom.*，**2018**，53(7)：590-594.
[27] Padhi D，Baruah P，Ramesh M，Moorthy H，Govindaraju T. *Redox. Biol.*，**2024**，71：103119.
[28] Silva P N，Furuya T K，Braga I L，Rasmussen L T，Labio R W，Bertolucci P H，Chen E S，Turecki G，Mechawar N，Payão S L，Mill J，Smith M C. *J. Alzheimers Dis.*，**2013**，38(1)：165-170.
[29] Khoo L T，Chen L. *EMBO Rep.*，**2018**，19(12)：e46935.
[30] Li T，Chen Z J. *J. Exp. Med.*，**2018**，215(5)：1287-1299.
[31] Iserman C，Desroches Altamirano C，Jegers C，Friedrich U，Zarin T，Fritsch A W，Mittasch M，Domingues A，Hersemann L，Jahnel M，Richter D，Guenther U P，Hentze M W，Moses A M，Hyman A A，Kramer G，Kreysing M，Franzmann T M，Alberti S. *Cell*，**2020**，181(4)：818-831.

[32] Ge Y, Paul T, Gordiychuk M, Das N, Zhang Y, Myong S. *Nat. Commun.*, **2025**, 16(1): 9956.
[33] Fu H, Huang J, Van Der Tol J J B, Su L, Wang Y, Dey S, Zijlstra P, Fytas G, Vantomme G, Dankers P Y W, Meijer E W. *Nature*, **2024**, 626(8001): 1011-1018.
[34] Rawlinson S M, Chakraborty S, Sethi A, David C T, Harrison A R, Bird L E, Rozario A M, Uthishtran S, Ardipradja K, Zhao T, Oksayan S, Jans D A, Ang C S, Lu Z H, Yan F, Williamson N A, Arumugam S, Sundaramoorthy V, Bell T D M, Gooley P R, Moseley G W. *Nat. Commun.*, **2025**, 16(1): 9491.
[35] Morris O, Toprakcioglu Z, Röntgen A, Cali M, Knowles T, Vendruscolo M. *Sci. Rep.*, **2024**, 14(1): 22633.
[36] Dada S T, Hardenberg M C, Toprakcioglu Z, Mrugalla L K, Cali M P, McKeon M O, Klimont E, Michaels T C T, Knowles T P J, Vendruscolo M. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2023**, 120(9): e2208792120.
[37] Stender E G P, Ray S, Norrild R K, Larsen J A, Petersen D, Farzadfard A, Galvagnion C, Jensen H, Buell A K. *Nat. Commun.*, **2021**, 12(1): 7289.
[38] Shan Y, Zhang Y, Wei Y, Zhang C, Lin H, He J, Wang J, Guo W, Li H, Chen Q, Zhou T, Xing Q, Liu Y, Chen J, Pan G. *Nat. Commun.*, **2024**, 15(1): 7186.
[39] Hardy J, Pool E, Bruystens J, Zhou X, Li Q, Zhou D, Palay M, Tan G, Chen L, Choi J, Lee H, Strack S, Wang D, Taylor S, Mehta S, Zhang J. *Mol. Cell*, **2024**, 84(8): 1570-1584.
[40] Michieletto D, Marenda M. *JACS Au*, **2022**, 2(7): 1506-1521.
[41] Schrimpf W, Barth A, Hendrix J, Lamb D C. *Biophys. J.*, **2018**, 114(7): 1518-1528.
[42] Petrášek Z, Schwille P. *Biophys. J.*, **2008**, 94(4): 1437-1448.
[43] Sun X, Zhou Y, Sun S, Qiu S, Peng M, Gong H, Guo J, Wen C, Zhang Y, Xie Y, Li H, Liang L, Luo G, Wu W, Liu J, Tan W, Ye M. *Cell Discov.*, **2024**, 10(1): 114.
[44] Hoffmann C, Nagao T, Tsunoyama T A, Tromm J V, Logan C, Nakamura K, Wang H, Bianchi F, van den Bogaart G, Kusumi A, Hirabayashi Y, Milovanovic D. *Mol. Cell*, **2026**, 86(1): 135-149.e9.
[45] Zhang M, Zhang Z, Niu X, Ti H, Zhou Y, Gao B, Li Y, Liu J, Chen X, Li H. *Adv. Sci.*, **2024**, 11(19): 2308338.
[46] Jackson J, Hoffmann C, Scifo E, Wang H, Wischhof L, Piazzesi A, Mondal M, Shields H, Zhou X, Mondin M, Ryan E, Döring H, Prehn J, Rottner K, Giannone G, Nicotera P, Ehninger D, Milovanovic D, Bano D. *Cell Death Dis.*, **2024**, 15(4): 304.
[47] Elbaum-Garfinkle S, Kim Y, Szczepaniak K, Chen C C H, Eckmann C R, Myong S, Brangwynne C P. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2015**, 112(23): 7189-7194.
[48] van Haren M H I, Visser B S, Spruijt E. *Nat. Commun.*, **2024**, 15(1): 3564.
[49] Kota D, Prasad R, Zhou H X. *J. Am. Chem. Soc.*, **2024**, 146(2): 1326-1336.
[50] Castelletto V, Seitsonen J, Pollitt A, Hamley I. *Biomacromolecules*, **2024**, 25(8): 5321-5331.
[51] Litschel T, Kelley C, Cheng X, Babl L, Mizuno N, Case L, Schwille P. *Nat. Commun.*, **2024**, 15(1): 4986.
[52] Feric M, Vaidya N, Harmon T S, Mitrea D M, Zhu L, Richardson T M, Kriwacki R W, Pappu R V, Brangwynne C P. *Cell*, **2016**, 165(7): 1686-1697.
[53] Pokhrel P, Jonchhe S, Pan W, Mao H. *J. Am. Chem. Soc.*, **2023**, 145(31): 17143-17150.
[54] Ghosh A, Zhou H. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2020**, 59(47): 20837-20840.
[55] Roggeveen J, Wang H, Shi Z, Stone H. *Biophys. J.*, **2024**, 123(11): 1393-1403.
[56] Huang Y, Chen H, Qiao X, Li S, Wang X, Liu X, Huang X. *Nat. Commun.*, **2025**, 16(1): 5231.
[57] Shebanova A, Perrin Q, Zhu K, Gudlur S, Chen Z, Sun Y, Huang C, Lim Z, Mondarte E, Sun R, Lim S, Yu J, Miao Y, Parikh A, Ludwig A, Miserez A. *Adv. Sci.*, **2024**, 11(42): 2402652.
[58] Munder M C, Midtvedt D, Franzmann T, Nüske E, Otto O, Herbig M, Ulbricht E, Müller P, Taubenberger A, Maharana S, Malinovska L, Richter D, Guck J, Zaburdaev V, Alberti S. *ELife*, **2016**, 5: e09347.
[59] Liao Z, Jia B, Guan D, Chen X, Zhang M, Tong P. *Nat. Commun.*, **2025**, 16(1): 5237.
[60] Ganar K, Nandy M, Turbina P, Chen C, Suylen D, Nihoul E, Pascoe E, van der Beelen S, Plaum M, van den Bos L, Koenraadt C, Dijkgraaf I, Deshpande S. *Nat. Chem.*, **2025**, 17(2): 186.
[61] Molliex A, Temirov J, Lee J H, Coughlin M, Kanagaraj A P, Kim H J, Mittag T, Taylor J P. *Cell*, **2015**, 163(1): 123-133.
[62] Morelli C, Faltova L, Capasso Palmiero U, Makasewicz K, Papp M, Jacquat R P B, Pinotsi D, Arosio P. *Nat. Chem.*, **2024**, 16(7): 1052-1061.
[63] Franzmann T M, Jahnel M, Pozniakovsky A, Mahamid J, Holehouse A S, Nüske E, Richter D, Baumeister W, Grill S W, Pappu R V, Hyman A A, Alberti S. *Science*, **2018**, 359(6371): eaao5654.
[64] Yu H, Lu S, Gasior K, Singh D, Vazquez-Sanchez S, Tapia O, Toprani D, Beccari M S, Yates J R, Da Cruz S, Newby J M, Lafarga M, Gladfelter A S, Villa E, Cleveland D W. *Science*, **2021**, 371(6529): eabb4309.
[65] Ianiro A, Wu H, van Rijt M M J, Vena M P, Keizer A D A, Esteves A C C, Tuinier R, Friedrich H, Sommerdijk N A J M, Patterson J P. *Nat. Chem.*, **2019**, 11(4): 320-328.
[66] Yuan C Q, Levin A, Chen W, Xing R R, Zou Q L, Herling T W, Challa P K, Knowles T P J, Yan X H. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2019**, 58(1): 18116.
[67] Patil A, Strom A R, Paulo J A, Collings C K, Ruff K M, Shinn M K, Sankar A, Cervantes K S, Wauer T, St. Laurent J D, Xu G, Becker L A, Gygi S P, Pappu R V, Brangwynne C P, Kadoch C. *Cell*, **2023**, 186(22): 4936-4955.e26.

[68] Dai Y, Zhou Z, Yu W, Ma Y, Kim K, Rivera N, Mohammed J, Lantelme E, Hsu-Kim H, Chilkoti A, You L. *Cell*, **2024**, 187(21): 5951-5966.e18.
[69] Wang X, Bigman L S, Greenblatt H M, Yu B, Levy Y, Iwahara J. *Nucl. Acids Res.*, **2023**, 51(10): 4701-4712.
[70] Mohanty P, Rizuan A, Kim Y, Fawzi N, Mittal J. *Protein Sci.*, **2024**, 33(2): e4891.
[71] Berkeley R, Plonski A, Phan T, Grohe K, Becker L, Wegner S, Herzik M J, Mittal J, Debelouchina G. *J. Am. Chem. Soc.*, **2025**, 147(18): 15181-15194.
[72] Reis D, Pereira S, Ramos A, Pereira P, Morgado L, Calvário J, Henriques A, Serrano M, Pina A. *Nat. Commun.*, **2024**, 15(1): 9368.
[73] Yang S, Yu Y, Jo S, Lee Y, Son S, Lee K. *Nat. Commun.*, **2024**, 15(1): 10394.
[74] Powell W, Jing R, Herlory M, Holland P, Poliyenko D, Ebmeier C, Stowell M, Walczak M. *J. Am. Chem. Soc.*, **2025**, 147(8): 6995-7007.
[75] Ishibashi S, Inoko A, Oka Y, Leproux P, Kano H. *Sci. Rep.*, **2024**, 14(1): 27584.
[76] Zhou L, Zhu L, Wang C, Xu T, Wang J, Zhang B, Zhang X, Wang H. *Nat. Commun.*, **2025**, 16(1): 2706.
[77] Yu W, Guo X, Xia Y, Ma Y, Tong Z, Yang L, Song X, Zare R N, Hong G, Dai Y. *Nat. Chem.*, **2025**, 17(1): 756.
[78] Dora Tang T Y, Rohaida Che Hak C, Thompson A J, Kuimova M K, Williams D S, Perriman A W, Mann S. *Nat. Chem.*, **2014**, 6(6): 527-533.
[79] Agrawal A, Douglas J F, Tirrell M, Karim A. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2022**, 119(32): e2203483119.
[80] Welsh T J, Krainer G, Espinosa J R, Joseph J A, Sridhar A, Jahnel M, Arter W E, Saar K L, Alberti S, Collepardo-Guevara R, Knowles T P J. *Nano Lett.*, **2022**, 22(2): 612-621.
[81] Hoffmann C, Murastov G, Tromm J V, Moog J B, Aslam M A, Matkovic A, Milovanovic D. *Nano Lett.*, **2023**, 23(23): 10796-10801.
[82] Ling X, Song X, Zhang D, Lai W, Liu C, Jiang G, Zhao Q, Wang H. *Nat. Commun.*, **2026**, 17(1): 7034.
[83] Chen T, Tang G, Li T, Yanghong Z, Hou C, Du Z, You K, Ma L, Li T. *Genom. Proteom. Bioinf.*, **2025**, 23(1): qzaf014.
[84] Hou C, Wang X, Xie H, Chen T, Zhu P, Xu X, You K, Li T. *Nucl. Acids Res.*, **2023**, 51(D1): D460-D465.
[85] Li Q, Wang X, Dou Z, Yang W, Huang B, Lou J, Zhang Z. *Int. J. Mol. Sci.*, **2020**, 21(18): 6796.
[86] Pu X, Zhang C, Jin J, Jin Y, Ren J, Zhou S, Patel H, Chen J, Wu B, Chen L, Qian H, Lin T. *Cancer Lett.*, **2025**, 613(31): 217508.
[87] You K, Huang Q, Yu C, Shen B, Sevilla C, Shi M, Hermjakob H, Chen Y, Li T. *Nucl. Acids Res.*, **2020**, 48(D1): D354-D359.
[88] You K, Li R, Lian R, Li Y, Yang H, Zhou Y, Chen Y, Wang L, Fan Z, Ma L, Li T. *Nucl. Acids Res.*, **2026**, 54(D1): D445-D450.
[89] Bhattacharya K, Khanal P, Chand J, Chanu N R, Das D, Bhattacharjee A. *Biophysica*, **2025**, 5(4): 52.
[90] Li Q, Peng X, Li Y, Tang W, Zhu J, Huang J, Qi Y, Zhang Z. *Nucl. Acids Res.*, **2020**, 48(D1): D320-D327.
[91] Chu X, Sun T, Li Q, Xu Y, Zhang Z, Lai L, Pei J. *BMC Bioinformatics*, **2022**, 23(1): 72.
[92] Wang X, Zhou X, Yan Q, Liao S, Tang W, Xu P, Gao Y, Li Q, Dou Z, Yang W, Huang B, Li J, Zhang Z. *Bioinformatics*, **2022**, 38(7): 2010-2014.
[93] Wang J, Meng F, Mao F. *Front. Oncol.*, **2022**, 12(1): 1005472.
[94] Ning W, Guo Y, Lin S, Mei B, Wu Y, Jiang P, Tan X, Zhang W, Chen G, Peng D, Chu L, Xue Y. *Nucl. Acids Res.*, **2020**, 48(D1): D288-D295.
[95] Jiang T, Li Y, Ma N, Chen J, Song H, Xu Y, Song J. *Front. Immunol.*, **2026**, 16(1): 1694377.
[96] Monti M, Fiorentino J, Miltiadis-Vrachnos D, Bini G, Cotrufo T, de Groot N, Armaos A, Tartaglia G. *Genome Biol.*, **2025**, 26(1): 33.
[97] Fawzi N L, Parekh S H, Mittal J. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **2021**, 70(1): 78-86.
[98] Conicella A E, Dignon G L, Zerze G H, Schmidt H B, D'Ordine A M, Kim Y C, Rohatgi R, Ayala Y M, Mittal J, Fawzi N L. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2020**, 117(11): 5883-5894.
[99] Mohanty P, Shenoy J, Rizuan A, Mercado-Ortiz J F, Fawzi N L, Mittal J. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **2023**, 120(34): e2305625120.
[100] Rauscher S, Pomès R. *ELife*, **2017**, 6: e26526.
[101] Yuan J, Tanaka H. *Nat. Commun.*, **2025**, 16(1): 1517.
[102] Rekhi S, Garcia C G, Barai M, Rizuan A, Schuster B S, Kiick K L, Mittal J. *Nat. Chem.*, **2024**, 16(7): 1113-1124.
[103] Ramirez D, Hough L, Shirts M. *Biophys. J.*, **2024**, 123(6): 703-717.
[104] Xu Z, Tang J, Gong Y, Zhang J, Zou Y. *J. Chem. Inf. Model*, **2024**, 64(19): 7639-7649.
[105] Feito A, Sanchez-Burgos I, Rey A, Collepardo-Guevara R, Espinosa J, Tejedor A. *Mol. Phys.*, **2024**, 122(21/22): e2425757.
[106] Wang L, Brasnett C, Borges-Araujo L, Souza P, Marrink S. *Nat. Commun.*, **2025**, 16(1): 2874.

（责任编辑：丁　岩）