



## N-SIM在核纤层超微结构定量分析中的应用

超分辨率结构化照明显微法 (SIM) 所拍摄到的细胞结构可达到通过衍射极限光学成像法 (例如共聚焦显微法) 所拍摄的约两倍<sup>1</sup>。在本应用说明中, 我们将着重介绍Shimi等人<sup>2</sup>的研究, 他们利用尼康N-SIM系统进行定量多色3D-SIM成像, 绘制并比较核纤层中核纤层蛋白异构体的分布。

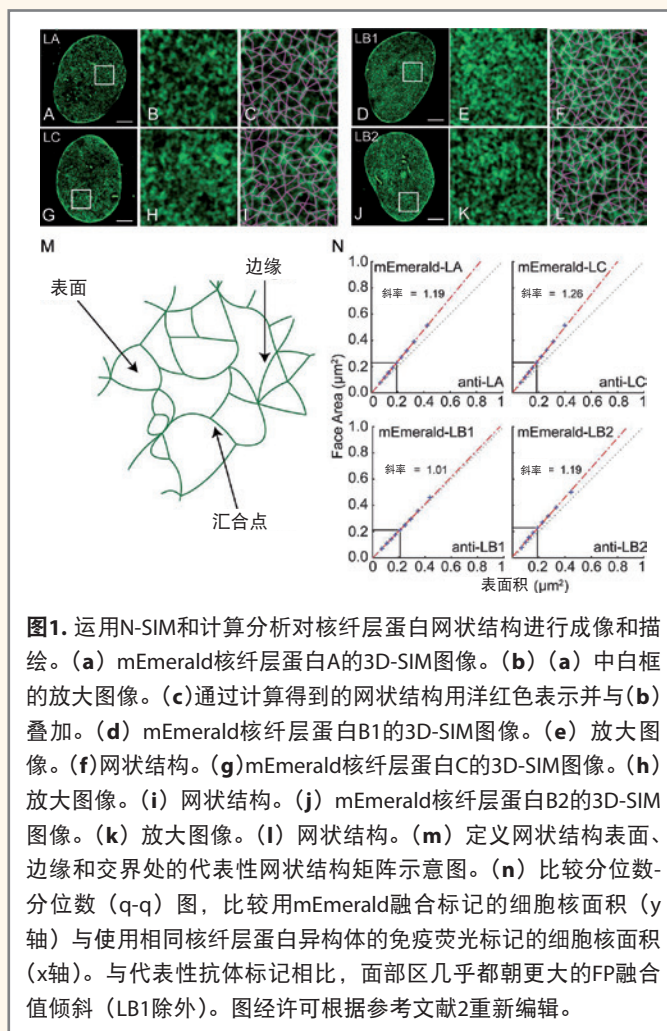
### 利用N-SIM阐释核纤层中核纤层蛋白的分布特征

核纤层蛋白是形成核纤层“脚手架”的V类中间丝, 为核被膜提供支撑和结构。Shimi等人<sup>2</sup>对存在的四种主要异构体进行了研究: 核纤层蛋白A (LA)、核纤层蛋白C (LC)、核纤层蛋白B1 (LB1) 和核纤层蛋白B2 (LB2)。核纤层蛋白在染色体组结构上以及维持细胞核形状和定位上有着重要作用。变异 (主要是LMNA基因中的变异) 牵涉各种遗传疾病, 这些疾病被统称为核纤层蛋白病。核纤层蛋白在体外形成双股超螺旋二聚体, 后者而后结合在交错的头尾相连四聚体中, 形成原丝的基础, 并最终聚合到类结晶阵列中。然而, 有关完好细胞中核纤层蛋白组织的信息我们知之甚少。Shimi等人<sup>2</sup>在其研究中试图利用尼康N-SIM系统的多色3D-SIM成像阐明小鼠胚胎成纤维细胞 (MEF) 中的核纤层蛋白组织。

为了量化每种核纤层蛋白异构体在其各自“网状结构”中的分布, 可以利用计算分析在于核纤层基部对应的3D-SIM切片图像上进行图像分割 (图1c、f、i、l)。用可操控的线滤波器发现并增强线路信号, 接着通过阈值处理识别线的中心, 并用非最大信号抑制进行清除。

John R. Allen

Applications and Marketing Specialist, Nikon Instruments Inc. 1300 Walt Whitman Road, Melville NY 11747-3064, USA



**图1.** 运用N-SIM和计算分析对核纤层蛋白网状结构进行成像和描绘。(a) mEmerald核纤层蛋白A的3D-SIM图像。(b) (a)中白框的放大图像。(c)通过计算得到的网状结构用洋红色表示并与(b)叠加。(d) mEmerald核纤层蛋白B1的3D-SIM图像。(e)放大图像。(f)网状结构。(g) mEmerald核纤层蛋白C的3D-SIM图像。(h)放大图像。(i)网状结构。(j) mEmerald核纤层蛋白B2的3D-SIM图像。(k)放大图像。(l)网状结构。(m)定义网状结构表面、边缘和交界处的代表性网状结构矩阵示意图。(n)比较分位数-分位数 (q-q) 图, 比较用mEmerald融合标记的细胞核面积 (y轴) 与使用相同核纤层蛋白异构体的免疫荧光标记的细胞核面积 (x轴)。与代表性抗体标记相比, 面部区几乎都朝更大的FP融合值倾斜 (LB1除外)。图经许可根据参考文献2重新编辑。

然后, 利用基于荧光强度的质量控制措施对间隙进行封闭, 并对网状结构进行分割, 得到最终结果。网状结构具有若干重要的可量化特征: 面积 (封闭部分的面积)、边缘长度、汇合点 (两条或两条以上边缘的相交处)、圆度等 (图1m)。N-SIM提供了识别和评价核纤层蛋白网状结构所需的分辨率。

利用多色SIM比较大分子组装体中的蛋白质联合分布

Shimi等人<sup>2</sup>认为核纤层大分子结构确定中一个尚待解决的重大课题是核纤层蛋白的组织。具体来说就是异构体是否形成了特有的聚合物网络，如果没有，不同网状结构会在多大程度上相互影响。双色SIM成像（图2）在成对成像组合中发现了少量核纤层蛋白异构体的重叠。尽管形成了定量相似的网状结构，但不同异构体倾向于在空间上彼此不同，以及具有少量重叠。然而，shRNA介导沉默实验揭示了异构体在网状结构形态中的相互依存性。重要的是，Lmnb1-/-MEF的106/226核表现出LA/C网状结构面部明显扩大，表面尺寸与野生类型相比增大了34%。在其他敲除MEF中也发现了类似结果，但明显比使用Lmnb2<sup>-/-</sup>MEF少。

结论

尼康N-SIM系统为完好细胞和活细胞多维超分辨率成像提供了一个强大的平台。完好细胞中的多蛋白大分子组装体（如核纤层）尤其适合超分辨率分析且具有比电子显微法更好的分子特异性。此外，尼康的新型N-SIM E平台使得超分辨率SIM成像比过去更简单、更易用，而成本仅约为N-SIM的一半。核纤层蛋白网状结构的表征（以及类似应用）也有可能从超分辨率STORM成像中受益。SIM得到的典型横向分辨率约为90-120 nm，相比之下STORM得到的横向分辨率仅为10-40 nm。此外，NIS-Elements还具备一些用于完成图像分割的综合分析功能。如欲了解更多有关尼康超分辨率解决方案以及如何到您的研究中进行应用的信息，请访问以下网址（www.nikoninstruments.com/sr）。

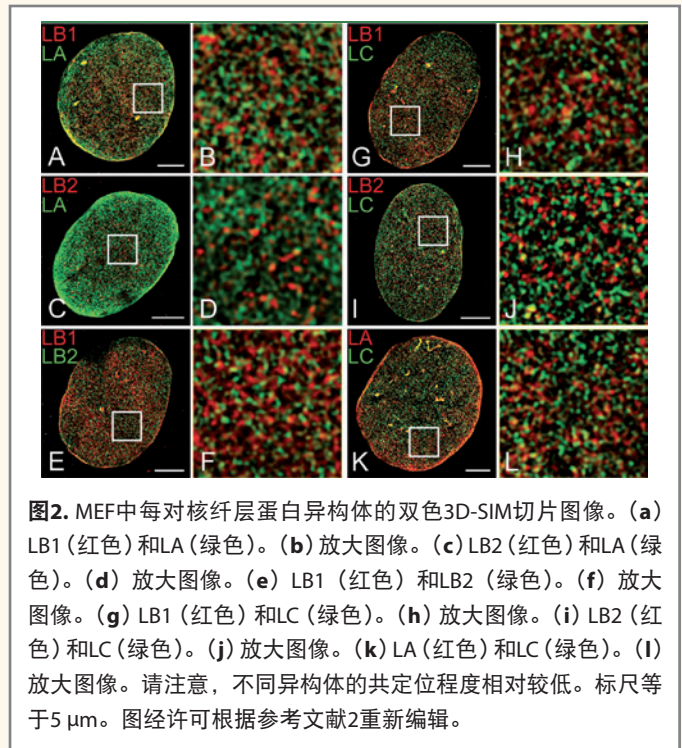


图2. MEF中每对核纤层蛋白异构体的双色3D-SIM切片图像。(a) LB1 (红色) 和LA (绿色)。(b) 放大图像。(c) LB2 (红色) 和LA (绿色)。(d) 放大图像。(e) LB1 (红色) 和LB2 (绿色)。(f) 放大图像。(g) LB1 (红色) 和LC (绿色)。(h) 放大图像。(i) LB2 (红色) 和LC (绿色)。(j) 放大图像。(k) LA (红色) 和LC (绿色)。(l) 放大图像。请注意，不同异构体的共定位程度相对较低。标尺等于5 μm。图经许可根据参考文献2重新编辑。

1. Gustafsson, M.G.L. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *J. Microsc.* **198**, 82-87 (2000).
2. Shimi, T., et al. Structural organization of nuclear lamins A, C, B1, and B2 revealed by superresolution microscopy. *Mol. Biol. Cell.* **26**, 4075-4086 (2015).