



N-STORM的定量聚类分析应用

光学超分辨率技术，如随机光学重建显微法¹（STORM）能够在衍射极限以下实现亚细胞结构的可视化，而且具有较高的分子特异性。本应用说明中，我们将着重介绍Ricci等人²的研究工作，他们运用STORM显微法探寻核小体在染色质纤维上的分布，帮助阐明染色质折叠、基因表达和多能性的机理。

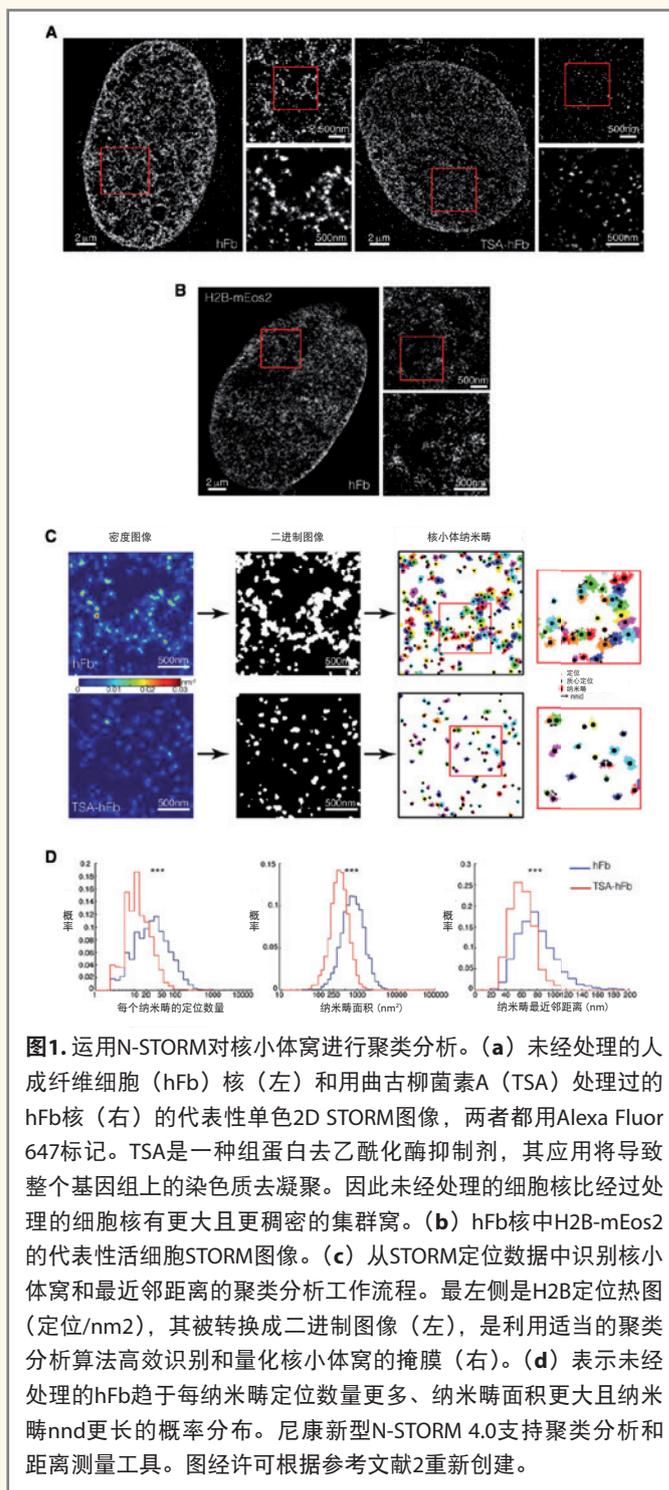
利用N-STORM量化核小体在完好细胞核中的纳米级分布

核小体结构的经典视图相对简单：沿一段DNA上排列有序的核小体和组蛋白H1，形成直径约10 nm的纤维并符合“念珠”模型。10 nm纤维被认为折叠成直径约30 nm的纤维，并进一步逐渐压缩成高阶结构。然而，Ricci等人²同时运用单色和多色STORM这两种成像表明，核小体组成了称之为“窝”（参照大小不同的鸟蛋窝）的异质纳米畴（图1c）。窝的大小、组成和结构在不同细胞类型群体内和群体之间差异悬殊。

在这项研究中，尼康N-STORM系统表现出~20 nm的横向分辨率，高于由衍射极限决定的分辨率数量级，因此理论上能够分辨宽30 nm的染色质纤维。然而，这种纤维很难用传统光学和电子显微法识别。Ricci等人²对30 nm纤维的绝对存在提出了质疑。传统光学显微法不可能分辨这种纳米级特征，而电子显微法又缺乏必要的分子特异性且需要严格的样本制备技术。因此，STORM能够填补这一特有的成像细分市场空缺，跨越分辨率与分子特异性之间的鸿沟。Ricci等人²的研究标志着人们首次分辨出了核小体在完好细胞核中的组织结构。

John R. Allen

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



利用STORM量化多能细胞中的核小体分布

选择多能小鼠胚胎干细胞 (mESC) 作为几种不同实验条件下评价核小体窝大小、密度和分布的模型系统:

- 用细胞因子白血病抑制因子 (sLif) (一种分化抑制因子) 治疗 (图2a、b)。
- 用Mek和Gsk3激酶 (2iLif) 的抑制因子治疗, 以将细胞保持在多能性的基态上 (图2c)。
- Tcf3双敲除细胞系 (mESC^{Tcf3^{-/-}})。Tcf3是Wnt/ β -连环蛋白通路的一个效应器, 帮助维持基态多能性 (图2d)。
- mESC分化成神经前体细胞 (NPC), (图2e)。
- H1 “三重敲除”: 删除了三个H1异构体的mESC (mESC^{H1^{tko}}), (图2f)。

和预计的一样, 多能mESC中的每纳米畴定位数量及其nnd比mNPC中的值更小。此外, Ricci等人²利用五个标记物 (Nanog、TRA1-60、SSEA4、Oct4和Sox2) 的既有基因卡技术给多能性评分, 证明人诱导的多能干细胞 (hiPSC) 中核小体窝大小与多能性之间存在较高的反相关性。

各种细胞系中具有H1和RNA聚合酶II的H2B的多色STORM成像

使用尼康N-STORM系统完成的双通道STORM成像发现RNA聚合酶II优先关联小窝, 而组蛋白H1则集中在大窝中 (图3)。这一观察与“窝越小且压缩程度越差对转录因子与聚合酶 (如PolII) 的结合越开放”的预期是吻合的。H1是核小体压缩的关键且集中在异染色质中。此外还发现H1在异染色质最集中的细胞核外围最为丰富。

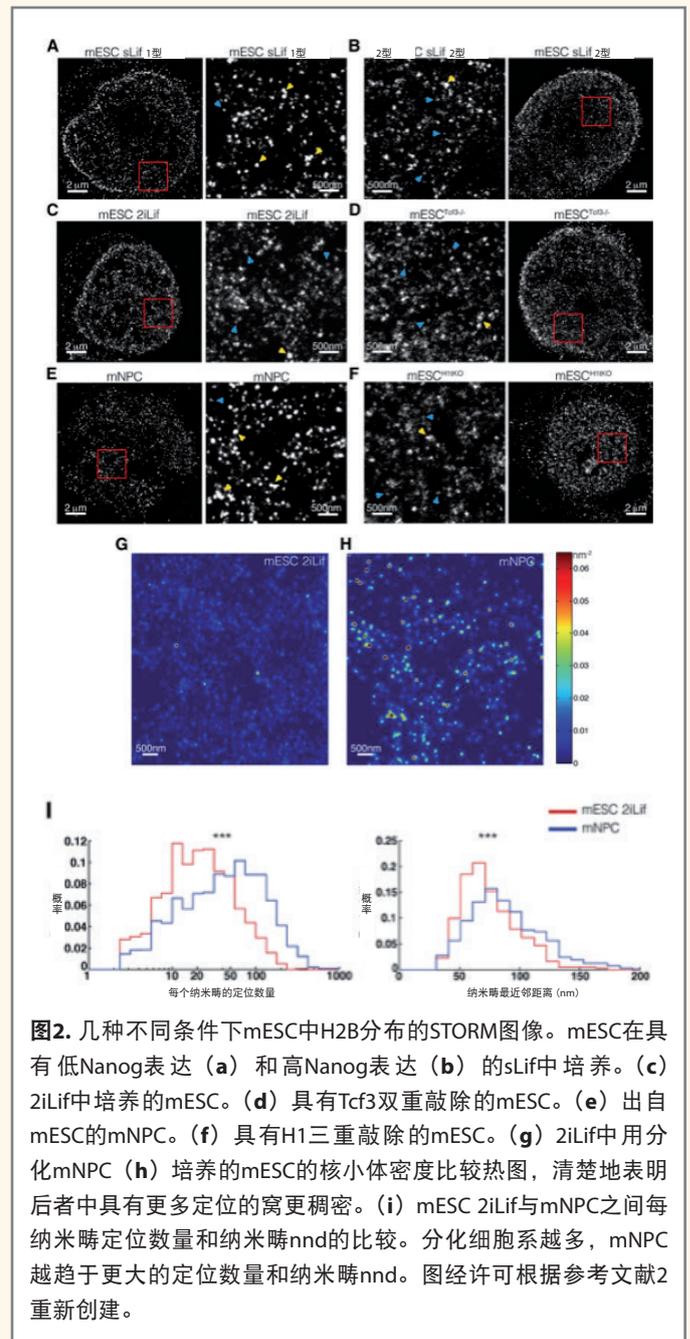


图2. 几种不同条件下mESC中H2B分布的STORM图像。mESC在具有低Nanog表达 (a) 和高Nanog表达 (b) 的sLif中培养。(c) 2iLif中培养的mESC。(d) 具有Tcf3双重敲除的mESC。(e) 出自mESC的mNPC。(f) 具有H1三重敲除的mESC。(g) 2iLif中用分化mNPC (h) 培养的mESC的核小体密度比较热图, 清楚地表明后者中具有更多定位的窝更稠密。(i) mESC 2iLif与mNPC之间每纳米畴定位数量和纳米畴nnd的比较。分化细胞系越多, mNPC越趋于更大的定位数量和纳米畴nnd。图经许可根据参考文献2重新创建。

结论

正如Ricci等人所论证的那样，实践证明尼康N-STORM是多蛋白复合物可视化的强大平台。尼康新型N-STORM 4.0包含针对聚类分析和距离测量的综合分析工具，并提高了三维和速度性能。如欲了解更多有关尼康超分辨率解决方案的信息，请访问我们的官网 (www.nikoninstruments.com/sr)。

1. Rust, M.J., Bates, M. & Zhuang, X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). *Nat. Methods* **3**, 793-795 (2006).
2. Ricci, M.A., Manzo, C., Garcia-Parajo, M.F., Lakadamyali, M. & Cosma, M.P. Chromatin Fibers Are Formed by Heterogeneous Groups of Nucleosomes In Vivo. *Cell* **160**, 1145-1158 (2015).

