



ultivue

与DNA-PAINT结合，面向可靠多色&三维单分子定位成像的N-STORM

Ultivue Inc.提供的新型DNA-PAINT免疫标记试剂可以利用尼康N-STORM 4.0超分辨率显微镜实现没有光漂白的单分子定位成像。在此将展示深度大于5 μm 的多色和三维成像。

什么是DNA-PAINT？

过去十年我们见证了针对纳米级成像的超分辨率STORM¹和类似单分子定位显微镜的问世。这些技术通常依靠荧光团的光化学操作产生长寿命的非荧光“暗”状态，从而识别非重叠单发射体的发射图谱。相反，纳米级成像点累积（PAINT）是利用荧光团的短寿命可逆性结合来定位单个分子的一系列技术²。这种方法的优势在于，由于弱信号的荧光团被连续替换，它几乎抵消了光漂白的的影响，理论上允许对每个关注分子进行次数不受限制的采样。

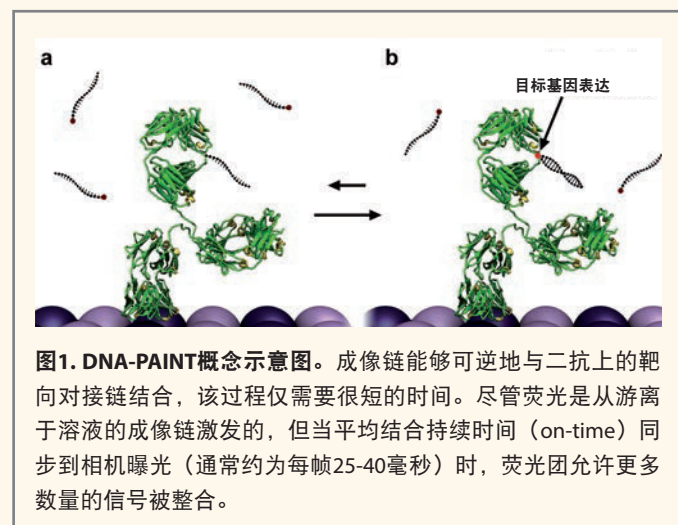


图1. DNA-PAINT概念示意图。成像链能够可逆地与二抗上的靶向对接链结合，该过程仅需要很短的时间。尽管荧光从游离于溶液的成像链激发的，但当平均结合持续时间（on-time）同步到相机曝光（通常为每帧25-40毫秒）时，荧光团允许更多数量的信号被整合。

John R. Allen

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

DNA-PAINT³是PAINT的变种，采用了传统的一抗-二抗免疫标记技术。不过，二抗不是荧光团，而是被称为**对接链**的短的单链DNA低聚物。成像缓冲液含有用荧光团标记的被称为**成像链**的互补低聚物。成像链表现出的结合持续时间（on-time）为数十毫秒，这段时间内由于荧光团被暂时固定，本底上作为荧光团观察到的荧光大大增强（图1），这对单分子定位十分有利。

Ultivue Inc.

(www.ultivue.com)

向市场推出了完整DNA-PAINT试剂盒，包括二抗、成像链和缓冲液，提供了方便的成套解决方案。



面向PAINT成像的N-STORM 4.0超分辨率显微镜

略微更改标准免疫标记协议，而无需改装显微镜，即可在尼康N-STORM 4.0上进行DNA-PAINT。提供的DNA-PAINT试剂盒中既包含山羊抗小鼠二抗，也包含山羊抗兔二抗，两种二抗都具有唯一的对接链序列。这样既能应用通过不同荧光团标记的成像链进行同步成像，也能应用通过相同荧光团标记的成像链进行顺序成像（Ex-change-PAINT³）。需要注意的是，使用具有相同荧光团的不同成像链时，一定要在用一组荧光团标记之前洗掉另一组荧光团。

多色DNA-PAINT

在此我们展示的是用光谱特异的荧光团进行免洗同步双色DNA-PAINT成像。如图2所示，N-STORM 4.0上最多可提供三个颜色通道，满足三色成像或双色成像，后者用第三个颜色通道跟踪漂移校正需要的基准标志。

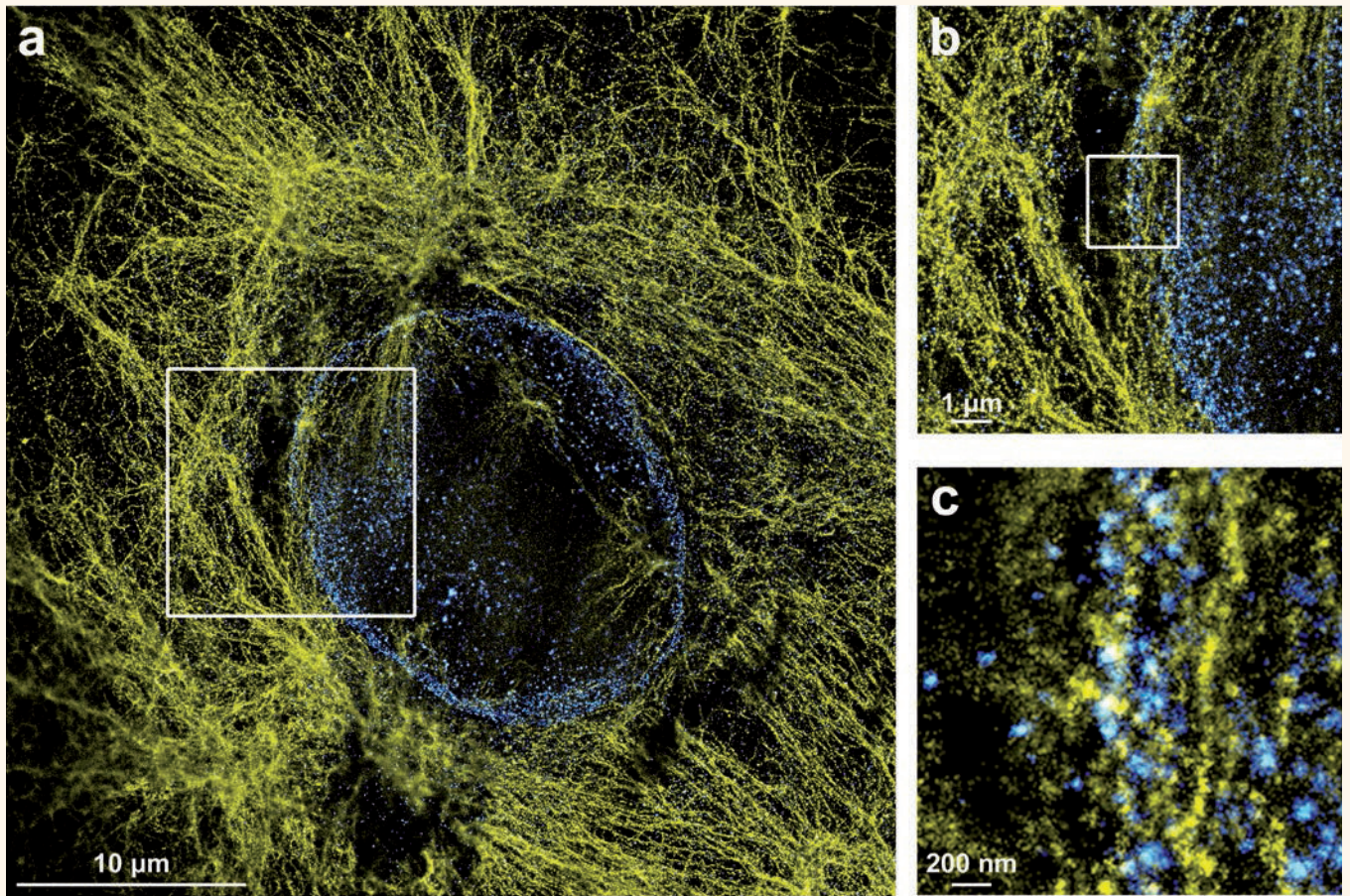
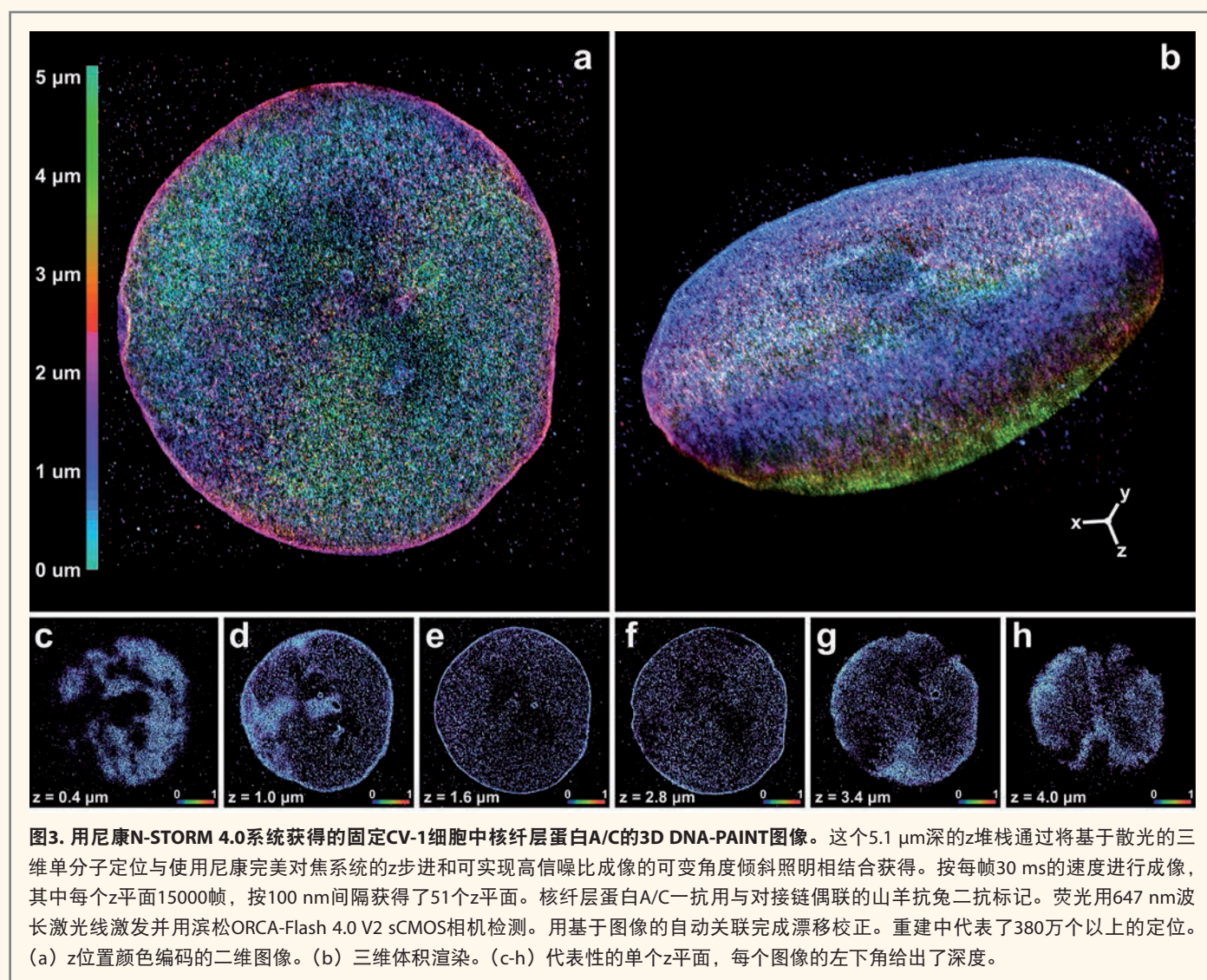


图2. 波形蛋白（黄色）和核纤层蛋白B1（蓝绿色）的双色DNA-PAINT图像。这张双色单平面DNA-PAINT图像是用具有倾斜照明的尼康N-STORM 4.0获得的。两个颜色通道都以每帧40 ms的速度成像。CV-1细胞用小鼠抗波形蛋白抗体和兔抗核纤层蛋白B1抗体染色。与对接链偶联的山羊抗小鼠二抗和山羊抗兔二抗由Ultivue Inc.提供。按1 nM浓度向成像缓冲液中加入了对应的与红色荧光团（564_{ex}/590_{em}，波形蛋白）和远红外荧光团（646_{ex}/664_{em}，核纤层蛋白B1）偶联的成像链。荧光用561nm和647 nm波长的激光线激发并用滨松ORCA-Flash 4.0 V2 sCMOS相机检测。通过跟踪用488 nm波长激光线激发的基准标志（0.04 μm绿色荧光FluoSpheres®）完成漂移校正。该重建中代表了4000万个以上的定位。(a) 完整图像（256 x 256像素）；(b) (a) 中方框内放大区域；(c) (b) 方框内放大区域。

与多色dSTORM相比，多色DNA-PAINT具有若干固有优势。DNA-PAINT探针在所有受试的颜色通道中表现出相似的亮度——在每个通道中提供了一致的分辨率性能，性能与该领域当前的标杆Alexa Fluor 647不相上下。多色dSTORM一般依靠绿色（如Atto 488）和红色（如Cy3B）通道来成像性能明显下降的荧光团。使用DNA-PAINT时的定位精度与成像链的结合动力学以及荧光探针的亮度有关，不需要专用的短寿命（1-2小时）还原/氧化缓冲液。成像链只需在提供的盐缓冲液中稀释——得到的成像缓冲液在室温下最多可维持几天，且这段时间内每帧中定位的分子数量几乎没有减少。

3D DNA-PAINT

N-STORM 4.0为使用尼康完美对焦系统进行单分子成像提供了专有的z步进机制。可获得厚度超过5μm的高质量单分子z-stacks。通过TIRF与倾斜照明的专门组合可增强信噪比并抑制本底背景，并且照明角度随成像深度改变，从而选择性地激发要观察的z平面。使用基于图像的自动关联分析完成图3中数据的漂移校正。



虽然可以在N-STORM 4.0上用传统STORM标签和缓冲液进行z轴成像，但DNA-PAINT方法提供了改善的性能，用户不再需要在每个z轴位置采集周期中去平衡光漂白现象（发生在整个样品体积层面）。

展望

Ultivue Inc.的DNA-PAINT探针为在尼康N-STORM 4.0系统上用传统免疫标记技术进行高质量三维和多色单分子成像提供了一种方便的标准化方法。DNA-PAINT探针与其他经过PAINT成像验证的染料结合兼顾了潜在的三色单分子成像和三维成像。我们也期待未来开发的各种DNA-PAINT探针能继续扩大这一技术的潜在应用范围。

参考文献

1. Rust, M.J., Bates, B.和Zhuang, X. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy. *Nature Methods* **3**, 793-796 (2006年)。
2. Sharonov, A.和Hochstrasser, R.M. Wide-field subdiffraction imaging by accumulated binding of diffusing probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 18911-18916 (2006年)。
3. Jungmann, R., Avendano, M.S., Woehrstein, J.B.等 人。Multiplexed 3D cellular super-resolution imaging with DNA-PAINT and Exchange-PAINT. *Nature Methods* **11**, 313-318 (2014年)。