



N-STORM的定量分析工具和相关成像应用

超分辨率技术对我们在分子水平上认知生物过程有着重要影响。然而，该技术广泛应用的困难之一在于我们对复杂生物组织的超分辨率图像进行定量分析的能力有限。在本应用说明中，我们将着重介绍Dudok等人近期的工作，他们利用尼康的N-STORM系统开发出新的相关成像方法和定量分析工具，用以研究大脑中的大麻素信号传导机理。

随机光学重建显微法（STORM）是一种基于定位的超分辨率技术，使分辨率在传统光显微法基础上提高了十倍¹。和免疫金电子显微法不同的是，STORM成像可以不影响样本大小而实现蛋白定位，同时还能具有相似的精度。

用N-STORM对脑组织中的大麻素受体成像

Dudok等人²提出了一个针对3D-STORM的高效的组织处理、免疫标记方案，和一个高效的工作流程，用于以xy方向6 nm、z方向41 nm的定位精度研究大麻素受体（CB₁）在组织剖面的7051个GABAergic轴突末梢中的分布。从CB₁⁺小鼠中得到的海马剖面3D N-STORM成像发现CB₁在含胆囊收缩素（CCK）的GABAergic轴突末梢上密度较高，其在CB₁免疫阴性锥体细胞胞体周围形成篮框状阵列（图1）。

相干膜片钳、共聚焦和N-STORM成像

为了以细胞类型特定方式确定大麻素受体的纳米级构造，Dudok等人²将N-STORM与共聚焦成像和膜片钳电生理学相结合。作者首先在急性切片制剂上完成了全细胞膜片钳记录，以便确定个别神经元的特有脉冲发放模式。然后用共聚焦显微法对记录期间用生物胞素填充的这些相同神经元进行成像，再用NeuroLucida重建，以辨别胞体周围中间神经元与树枝状中间神经元。图2a-c表示典型胞体周围中间神经元的电压跟踪和重建。

Lynne Chang

Nikon Instruments, Inc., Melville, New York, USA. Correspondence should be addressed to L.C. (lchang@nikon.net) or Steve Ross (sross@nikon.net).

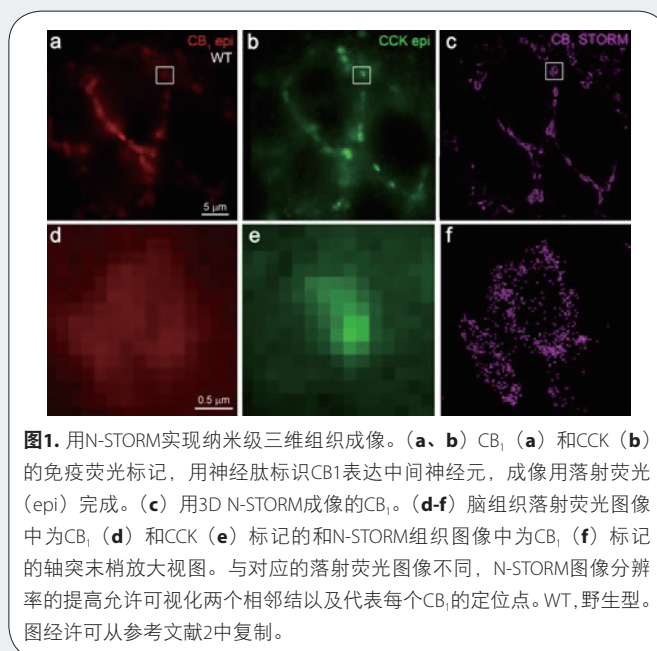


图1. 用N-STORM实现纳米级三维组织成像。(a、b) CB₁ (a) 和CCK (b) 的免疫荧光标记，用神经肽标识CB₁表达中间神经元，成像用落射荧光 (epi) 完成。(c) 用3D N-STORM成像的CB₁。(d-f) 脑组织落射荧光图像中为CB₁ (d) 和CCK (e) 标记的和N-STORM组织图像中为CB₁ (f) 标记的轴突末梢放大视图。与对应的落射荧光图像不同，N-STORM图像分辨率的提高允许可视化两个相邻结以及代表每个CB₁的定位点。WT, 野生型。图经许可从参考文献2中复制。

接着，从急性切片和为N-STORM成像而免疫染色的CB₁中准备20μm剖面。运用共聚焦显微法，以识别用生物胞素填充的轴突末梢（图2d），然后用3D N-STORM可视化这些细胞中的CB₁定位点（图2e、f）并叠加在对应的共聚焦图像上。对于相应的共聚焦和N-STORM成像，作者使用了一个同时配备共聚焦系统（尼康C2）和尼康N-STORM模块的显微镜平台（尼康Ti-E）。这种由膜片钳电生理学、共聚焦显微法和N-STORM成像结合的新颖组合使得Dudok等人²从一个高度复杂组织的同一神经元中获得了生理学、解剖学和纳米级分子分布信息。

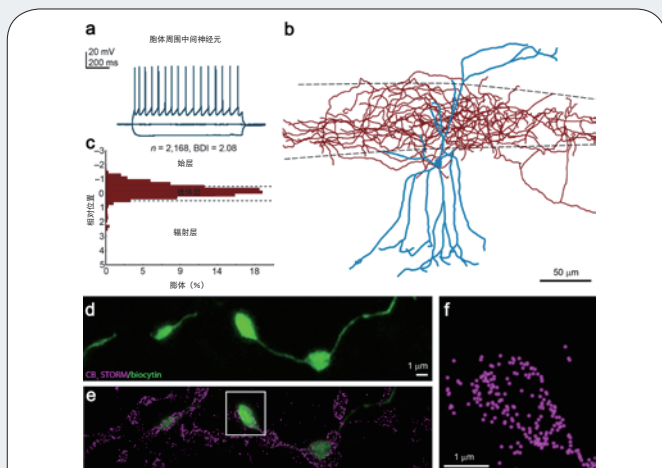


图2. 关联N-STORM成像与共聚焦显微镜法和膜片钳电生理学。和纳米级成像一起完成了生理学特性和解剖学参数的综合分析，以便用细胞类型特定的方式确定轴突末梢的纳米构造。在急性脑切片上进行全细胞膜片钳记录。(a-c) 代表性胞体周围中间神经元 (a) 的电压记录。记录期间用生物胞素填充的同一细胞通过共聚焦显微镜法成像并用NeuroLucida (b) 重建。根据生理学 (a) 和解剖学 (c) 测量结果，该神经元被识别为胞体周围中间神经元。(d、e) 免疫染色后，同一细胞的轴突末梢分别用相关的共聚焦显微镜法 (d) 和3D N-STORM (e, 紫色) 成像，以便确定CB₁在轴突末梢中的纳米级分布。(f) (e) 中方框区域显示的轴突末梢中CB₁定位点的高倍率视图。BDI, 结分布指数。图经许可从参考文献2中复制。

双色3D N-STORM数据的定量分析

为了查明CB₁是否会根据细胞类型显示到效应器的不同偶联距离，Dudok等人²对CB₁和Bassoon蛋白（释放装置的要素之一）进行了双色3D N-STORM成像。双色3D N-STORM成像与共聚焦成像结合，以便可视化识别的胞体周围中间神经元和树枝状中间神经元中的CB₁和Bassoon（图3a、b）。为了定量分析CB₁与Bassoon之间的空间关系，作者测量了3D中CB₁与Bassoon N-STORM定位点之间的欧式距离（图3c）。由于G蛋白耦联受体（如CB₁）在细胞质膜中完成了它们的功能，作者还分析了CB₁与Bassoon之间沿细胞质膜表面的距离关系。Dudok等人通过将3D凸包拟合到CB₁定位点得到了该轴突末梢的近似细胞质膜轮廓。他们将另一个凸包拟合到Bassoon定位点并将其投影在CB₁表面上。用作者提出的一个近似数学算法计算CB₁表面上每个CB₁定位点与最近投影Bassoon点之间的最短距离。不论在胞体周围中间神经元突触还是在树枝状中间神经元突触中，欧式距离测量结果和基于表面的距离测量结果都揭示出CB₁与Bassoon之间相似的空间关系。然而，与表现出均匀分布的CB₁不同，Bassoon集中在集群上。利用基于密度的分析（图3e、f），作者认为胞体周围结中存在的Bassoon集群数量比树枝状结中的Bassoon集群数量高。不过，胞体周围结中每个集群的定位点数量较低。当Bassoon定位点的数量规范化为CB₁定位点的数量时，胞体周围结表现出明显高于树枝状结的受体/效应器比。受体/效应器比上的这种差异可能会影响与特定细胞类型有关的大麻素信号传导效率。

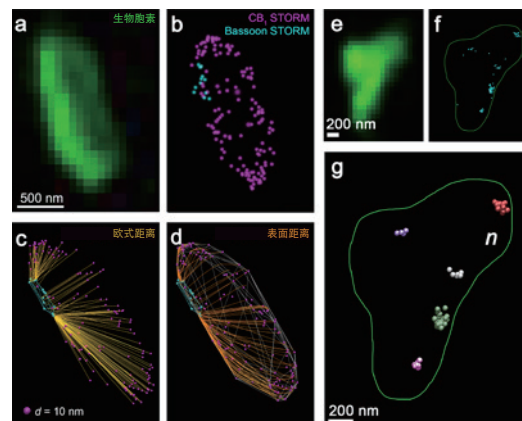


图3. 多色3D N-STORM数据的定量分析。(a、b) Dudok等人²提出的确定单个轴突末梢 (a) 双通道N-STORM图像 (b) 中CB₁定位点 (紫色) 与Bassoon定位点 (蓝色) 之间距离的自定义分析工具。(c、d) 欧式距离测量结果 (c) 和表面距离测量结果 (d)。(e-g) 单通道生物胞素样本 (e) 和Bassoon免疫染色样本 (f) 上用于分析Bassoon集群数量和每一Bassoon集群n上定位点数量的基于密度的测量结果 (g)。给出了来自胞体周围中间神经元结的代表性数据。图出自参考文献2。

超分辨率显微法是探索细胞分子景观的有力工具，该领域变革了我们对生物过程的认识，并且近期该技术获得了诺贝尔化学奖。然而，不少超分辨率技术的初期实现曾受制于时间分辨率不良、缺乏广泛的背景信息和缺乏提取定量数据的分析工具。超分辨率显微法的最新发展正在扩展其技术能力。尼康最新的4.0版N-STORM提供了新的综合分析工具，包括确定集群大小和测量距离的工具，此外成像速度也比以往版本快了十倍以上。N-STORM还可以轻松地与其他成像模式结合，例如共聚焦显微镜法和N-SIM（结构化照明显微法），以扩大N-STORM实验的功能性。有关尼康超分辨率系统的更多信息请登录我们的网站 (https://www.microscope.healthcare.nikon.com/zh_CN/products/super-resolution-microscopes)。

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. Dudok, B. *et al.* Cell-specific STORM super-resolution imaging reveals nanoscale organization of cannabinoid signaling. *Nat. Neurosci.* **18**, 75-86 (2015).