

多种超高分辨率显微成像技术结合解析核仁的亚显微结构

涂溢晖

(中国科学院 分子细胞科学卓越创新中心, 上海 200031)

摘要: 细胞分析技术平台拥有先进的荧光显微成像设备及其成熟技术方法, 从厘米尺度的组织器官到纳米级细胞器、蛋白等, 都可以获得清晰、高分辨率的图像。本案例基于多种超高分辨率显微镜成像技术的结合, 辅助课题组解析核仁的亚显微结构。

关键词: 核仁;亚显微结构;超高分辨率显微成像技术

1 专业技术成果介绍

细胞分析技术平台拥有先进的荧光显微成像设备及其成熟技术方法, 从厘米尺度的组织器官到纳米级细胞器、蛋白等, 都可以获得清晰、高分辨率的图像, 为细胞生物学的研究提供了重要的技术支撑。

人类发现核仁已有 200 多年, 直到近几十年才对核仁展开了初步的探索。核仁是哺乳动物细胞核内最为重要的无膜细胞亚结构 (nuclear body), 其主要功能是产生并加工核糖体 RNA (ribosomal RNA, rRNA), 从而形成成熟的核糖体, 参与蛋白质的翻译, 并在调控细胞增殖、细胞有丝分裂、响应细胞应激反应中起着重要的作用。基于电子显微镜的观察, 核仁具有三个独立亚区域, 分别被称为纤维中心 (fibrillar center, FC), 致密纤维组分 (dense fibrillar component, DFC) 以及颗粒组分 (granular component, GC)。

然而由于核仁结构致密而精细、电子密度高的特性以及电子显微镜在观测单种蛋白的定位上不具有荧光显微成像的优势, 目前人们对核仁亚结构的细节知之甚少。研究手段的局限性使得 rRNA 转录的具体位点的确定与 rRNA 前体 47S 的具体定位存在长久的争议。

利用传统的激光共聚焦显微成像技术能够观察到核仁亚区域的定位, 但无法观察到他们之间更准确的空间定位情况。得益于超高分辨率显微成像技术近年来的快速发展, 使得我们可以在细胞生理状态下, 结合多种超高分辨率显微成像技术解析核仁的亚显微结构。

首先利用结构照明显微技术 (structured illumination microscopy, SIM, 通过调制照明光, 并通过傅里叶变换将空间域和频域进行变化从而提高分辨率的一种超高分辨率显微技术), 详细研究了核仁的亚显微结构。利用 SIM, 我们在多种人类细胞中观察到了更加清晰和更多细节的核仁结构: 人类核仁包含镶嵌于颗粒组分 GC 当中的数十到上百个由致密纤维组分

DFC 围绕纤维中心 FC 构成的 FC/DFC 转录单元(图 1A), 用于转录产生并加工 rRNA 前体。活细胞 SIM 成像显示的核仁中 FC/DFC 转录单元数量远高于电镜观察到的结果, 并发现 Pol I 聚集于 FC 边缘处(图 1B), 并非过去猜测的均匀分布于 FC 区域。之前研究发现, 细胞核内存在活跃的核仁组织区与非活跃的核仁组织区, 核仁只围绕活跃核仁组织区形成并产生 rRNA。而我们利用 SIM 发现, 活跃核仁组织区中实际包含了活跃转录的 rDNA 与非活跃的 rDNA, FC/DFC 转录中心只会在活跃 rDNA 上形成, 并且观察到活跃的 rDNA 主要存在于 FC 与 DFC 的交界处, 该观察与 Pol I 聚集于 FC 边缘处相吻合。

接下来, 通过随机光学重建显微技术 (stochastic optical reconstruction microscopy, STORM, 利用荧光探针在暗态与亮态之间随机切换, 精准定位单个荧光分子发光光斑中心位置, 通过计算、重构出超高分辨率图像。)和生物化学定量手段, 我们确定了一个 FC/DFC 转录单元中含有 2-3 个拷贝的活跃 rDNA (图 1C)。

进一步, 我们利用 SIM、受激发射损耗荧光显微技术 (stimulated emission depletion microscopy, STED, 通过减小照射到样品上的激光光斑尺寸, 从而突破衍射极限, 实现超高分辨率荧光成像) 以及数学建模, 首次发现了核仁 DFC 区域的 rRNA 加工因子并非均匀分布, 而是规律地围绕 FC 聚集为 18-24 个簇状结构 (图 1D)。

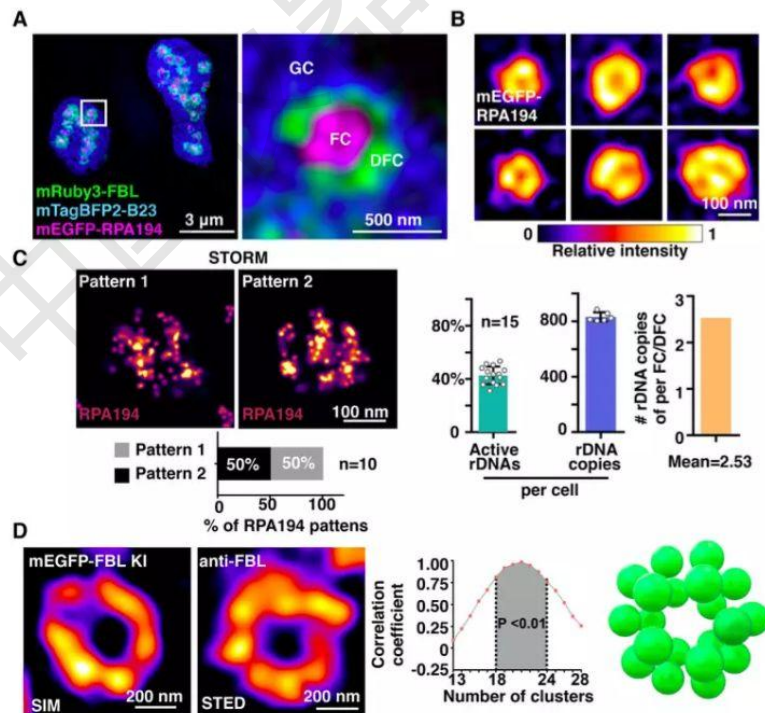


图 1

对于 rRNA 前体的转录位点以及 rRNA 前体的定位的研究，长久以来主要基于免疫电镜，难以对多个特定结构的相对定位进行细致研究。我们利用单分子荧光原位杂交（Single-molecule RNA fluorescence in situ hybridization, smFISH）标记单个的 rRNA 前体分子，分别标记了其 1-414 nt 以及 498-977 nt 部分。结果显示，rRNA 前体前 414 nt 主要定位在 DFC 区域而后续部分（498-977 nt）主要定位在 FC 边界区域（图 2）。同一条分子具有不同的空间定位，这一现象说明 rRNA 前体在转录时，其前 414nt 部分会快速进入 DFC 区域，而后续部分依然在 FC 边界处继续转录，这是一个快速的空间转运过程（*sorting*），直接解释了长久以来基于电镜的研究对 rRNA 前体的转录位点以及 rRNA 前体的定位的争议。

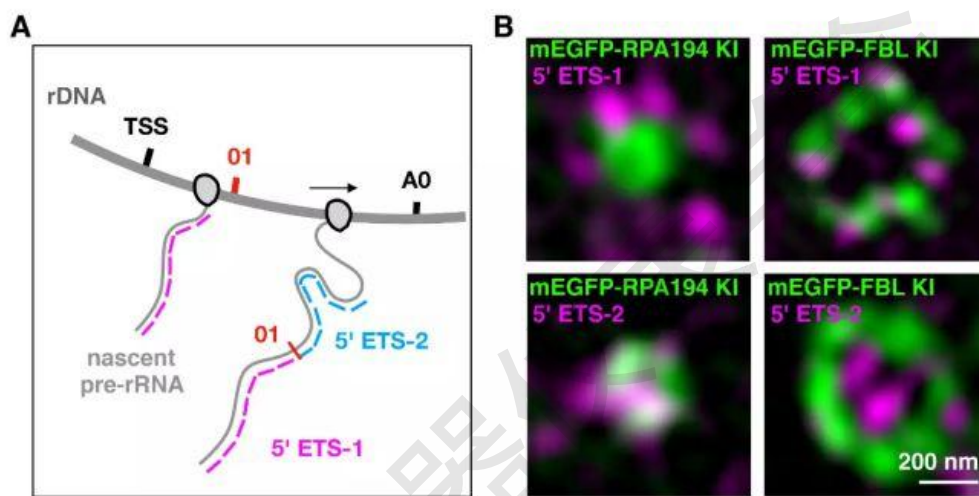


图 2

蛋白质或者核酸分子可以通过多价相互作用，在原本均一的环境中产生物理化学性质不同的另一相，形成无膜细胞器或者是细胞结构，这一过程称之为相分离。我们首先利用体外相分离技术，成功观察到了 rRNA 前体的 1-414nt 部分可以迅速进入 FBL 相分离液滴内，GAR 结构域中 IDR 的长度决定了 FBL 自相关强度，并直接影响了 FBL 对 rRNA 前体的定向转运能力，FBL 的自相关特性越强，对 rRNA 前体的分选能力也越强。细胞内同样证实该过程（图 3）。

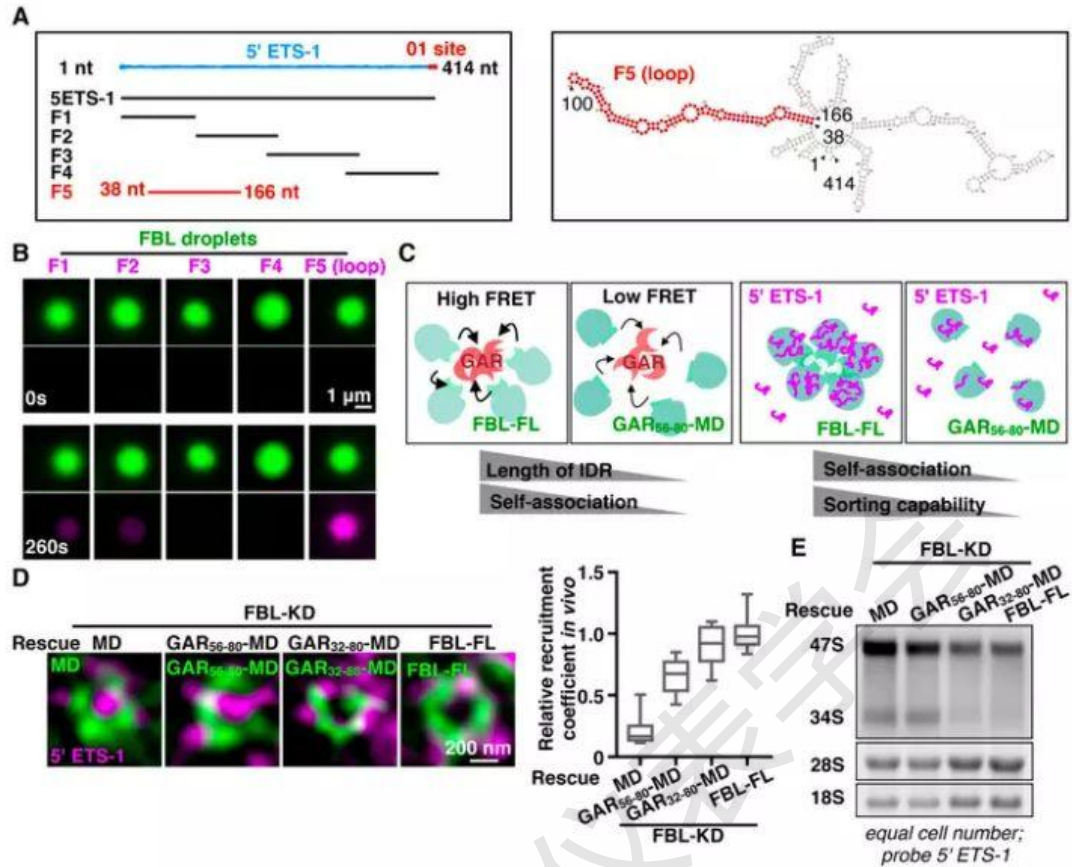


图 3

最后，我们在实验中发现，能被定向分选的 rRNA 能显著增大 FBL 相分离液滴的尺寸大小，其中的簇状结构也更少（图 4A）。在细胞内，在不影响 rRNA 前体加工的条件下，通过阻碍 FBL 与 rRNA 前体结合来抑制 FBL 对 rRNA 的定向转运。结果发现在阻碍了 rRNA 前体定向转运过程之后，DFC 区域从球壳状结构坍塌为了实心的球状结构，证实了 rRNA 前体的定向转运过程可以促进核仁 DFC 区域的组装（图 4B）。

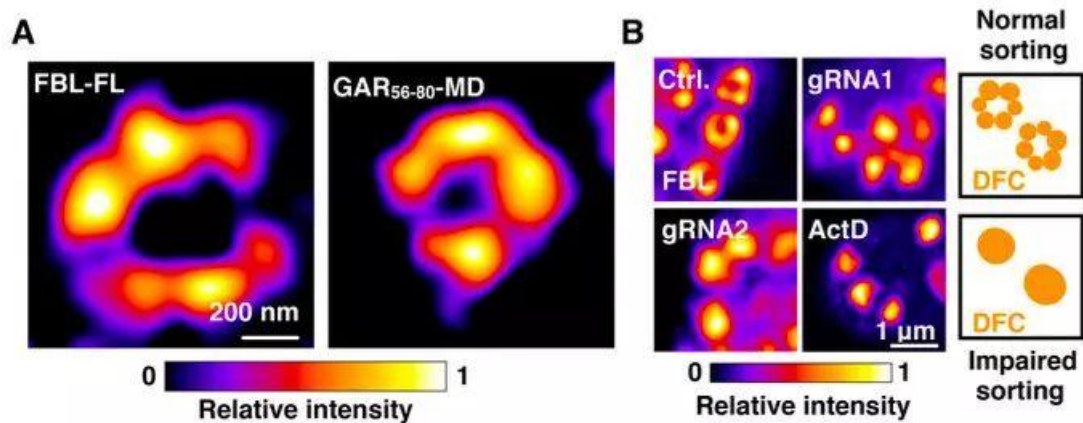


图 4

该研究同时用到了 SIM, STED, STROM 三大超高分辨率成像技术,并运用了 smFISH, 相分离技术, FRAP, FRET 等多种成像实验手段,成功揭示了核仁的超微三维结构,相分离促进新生成 pre-rRNA 定向转运的模型,并发现了新生成 pre-rRNA 定向转运过程可以促进核仁致密纤维组分的组装。

2 专业技术人才介绍

2.1 个人简介

涂溢晖, 学士, 高级工程师, 现任中国科学院分子细胞科学卓越创新中心细胞分析技术平台高级技术主管。2001年毕业于河北医科大学, 2004年加入中科院生物化学和细胞生物学研究所细胞分析技术平台, 致力于细胞分析新技术新方法的开发及应用推广、大型仪器运行维护及技术服务的共享和显微成像、流式专业人才的培养, 到目前完成了三个中科院功能开发项目并获专利一项。

2.2 专业技术研究方向

主要利用共聚焦显微成像技术、超高分辨率显微成像技术、光片成像技术、流式细胞分选技术、多维流式细胞分析技术等, 围绕细胞命运与功能改造、核酸新功能及调控、粘膜免疫及肿瘤免疫等方向搭建专业性的硬件设施条件, 提升特异性的样品制备技术, 开发针对性的细胞成像、分析手段, 提供全方位的技术支撑, 形成有特色的有影响力的国际前沿科学研究平台体系, 为相关疾病诊断、治疗提供重要理论基础、新的研究方向以及核心技术支撑等。

2.3 承担科技项目及代表论著

- (1) 《双光子显微镜系统二次谐波成像的功能开发》
(项目编号: 1731317600311, 2013年)
- (2) 《提高高压冷冻及冷冻替代技术电镜制样成功率的功能开发》
(项目编码: Y51LS11, 2015年)
- (3) 《针对流式细胞仪分选后细胞活性提升的功能开发》
(项目编码: Y81LS21, 2018年)
- (4) 《荧光显微镜细胞超高分辨率动态成像功能开发》
(项目编码: E11L3101, 2021)
- (5) 上海市专业技术人才知识更新工程急需紧缺人才培养项目-荧光显微成像技术培训
(2020年)

代表论著：

[1] 常用细胞周期流式检测方法， Flow Cytometry Protocol eBook ，
DOI:10.21769/BioProtoc.1010328.

3 获奖及荣誉

- (1) 2010 年度和 2012 年度 上海市大型科学仪器设施共享服务先进个人.
- (2) 2016 年度和 2019 年度 生化细胞所优秀员工。

中国仪器仪表表学会