

文章编号: 1000-6281(2020) 01-0090-10

共聚焦和超分辨率显微荧光图像的共定位分析浅谈

关苑君^{1,2}, 容 婵¹, 梁翠莎¹, 李 娟¹, 蓝秀健^{1,2*}, 吴珏珩^{1,2}

(1. 中山大学中山医学院科研仪器管理中心, 广东 广州 510080; 2. 中山大学热带病防治研究教育部重点实验室, 广东 广州 510080)

摘 要 共定位分析是研究蛋白或分子相互作用的有效工具。荧光显微图像的共定位分析包括定性分析和定量分析两部分。严格而言, 共定位分析是使用共定位系数去描述两个或以上的分子间变量关系。目前, 许多研究工作者对荧光显微图像的共定位分析需求大。然而, 对需要做共定位分析的样品要求、采图要求和分析方法等普遍存在疑问。在本文中, 笔者结合多年成像类设备共享服务的经验, 基于激光共聚焦和超分辨率荧光显微图像, 详细阐述共定位定性和定量分析的方法, 以供其他科研工作者参考和借鉴。

关键词 显微图像; 共定位; 光学显微镜; 共聚焦显微镜(confocal); 超分辨率显微镜(SIM/STORM)

中图分类号: TH74; Q336 文献标识码: A doi: 10. 3969/j. issn. 1000-6281. 2020. 01. 016

在细胞生物学和分子生物学等研究领域中, 常用免疫荧光染色检测同一样品中的两个或多个分子的表达情况, 以荧光显微图像的共定位情况对相关的生物学现象进行描述^[1], 如阐明蛋白功能、分子的胞间运输等^[2]。共定位的现象使用宽场荧光显微镜、共聚焦显微镜和超分辨率荧光显微镜都可获得共定位的荧光图像, 尽管很多文献都已说明如何定量分析共定位^[1, 3-4], 但许多科研工作者仍未透彻了解共定位的概念, 仍然抱持着红绿通道叠加变成“黄色”就是共定位的想法。显微图像的采集是量化共定位程度的首要工作, 如何正确地使用相关设备采集图像, 以及配合一些开源或付费的分析软件进行共定位定性分析和定量分析是共定位分析的核心要点。在本文中, 将通过列举实际工作中遇到的例子, 从图像采集、共定位定性分析、共定位定量分析以及超分辨率显微图像的共定位分析方法和相关的注意事项进行阐述, 以帮助科研工作者更好地使用共定位这个分析工具。

1 共定位的定义

共定位在广义上而言, 是指不同荧光标记的不同蛋白在同一空间位置分布。对于荧光显微图像而言有两层含义: ① 共现(co-occurrence 或 overlap) 指两种(或两种以上) 不同荧光分子团在

像素空间上重叠。② 相关(correlation) 指在共现基础上, 荧光基团间有着显著的统计学关系, 重叠部分的荧光强度变化趋势一致。共定位的生物学含义则是用于描述细胞中, 两个或者多个不同分子位于同一生物结构上。图像共定位分析, 可将分子间的相互作用、相对位置关系、空间距离等数据可视化、直观化。由于蛋白质参与对大多数的生物学过程, 通过图像共定位分析研究蛋白互作, 有助于阐明机理机制、发现作用靶点、细胞调控、信号通路和分子构象等。

共定位研究, 许多科研工作者会混淆或者不清楚自己的研究是需要定性研究还是定量研究。而无论是定性还是定量, 始终有两个基础, 第一是怎样采集到一张“可靠”的图像, 包括空间信息、光谱信息和时间信息; 第二是如何将共定位的程度量化^[4]。

依据实验的目的, 决定了共定位分析是做定性分析、定量分析还是两者相结合。共定位分析在显微图像中, 一般是指狭义的定义, 即用皮尔森相关系数或曼德斯系数等共定位系数去描述的变量关系, 例如 A 蛋白增加, B 蛋白也增加, 一种正相关变量关系的定量分析, 更着重于变化趋势。如实验只需做空间分布的变化, 与所标记蛋白的荧光强度不相关, 则可使用定性分析, 如: 标记蛋白空间分布,

收稿日期: 2019-06-24; 修订日期: 2019-07-28

基金项目: 2017年度广东省本科高校高等教育教学改革项目(升级仪器共享平台, 提升医科高端贵重仪器设备共享效益)。

作者简介: 关苑君(1985-), 女(汉族), 广东开平人, 硕士, 助理实验师, 技术员。E-mail: gyuanj@mail.sysu.edu.cn

* 通讯作者: 蓝秀健(1972-), 女(汉族), 广东罗定人, 硕士, 高级实验师。E-mail: lanxj@mail.sysu.edu.cn

如: 某蛋白锚定在某个亚细胞器位置上; 处理后入核/其他亚细胞结构, 空间分布的改变, 与细胞核/亚细胞结构本身固有的量没有关系。

无论是共定位的定性分析还是定量分析, 这种基于显微图像的分析方法只是分析分子相互作用的其中一种实验手段, 除此以外, 其他相关的实验包括免疫共沉淀 (Co-IP)、蛋白质体外结合实验 (Pull-down)、荧光能量共振转移 (FRET)、邻位连接技术检测蛋白互作用 (PLA/Duolink)、双分子荧光互补技术 (BiFC、NanoBiT)、蛋白间相互作用检测 (生物分子相互作用仪 (Biacore)、微量热等温滴定量热仪等)、运用蛋白标记系统检测表面蛋白结合 (SNAP-tag 和 CLIP-Tag) 等^[5-9], 科研工作者需要根据实验的目的选择完成。

2 共定位分析的图像获取和处理

准确的共定位分析依赖于可靠的图像。可靠的图像取决于样品的制备、图像采集和处理, 色差、强度和分辨率对共定位分析有着重要的影响。所以进行共定位分析的图像采集和分析前, 需要注意以下事项^[3-4]。

样品处理: ① 两种或以上的染料间的激发和发射波长要足够分开, 不能串色; ② 所选染料的特异性要高, 背景信号要低; ③ 所有组别样品处理步骤

要一致; ④ 使用相同的封片剂, 以免造成背景信号不一致; ⑤ 需检测样品的自发荧光; ⑥ 准备单个荧光染料染色的样品; ⑦ 正对照与负对照。

图像采集: ① 所有组别样品采集参数一致, 包含物镜; ② 图像亮度不能过曝, 一般以强度高的组别不过曝为准; ③ 如果使用共聚焦扫描, 尽量使用顺次扫描, 以防串色; ④ 两个通道之间的强度要相当; ⑤ 图像分辨率在采集时, 建议按照奈奎斯特采样定理 (Nyquist) 以获得足够的图像分辨率; ⑥ 建议拍摄 Z-Stack 三维图像。

图像处理: ① 保存图像的原始格式, 如 czi、lsm、nd2 等, 如果保存 tiff 图像不能更改图像的灰度值; ② 建议反卷积处理; ③ 所有图像处理参数一致。

3 共定位的定性分析和展示

3.1 剖面图 (Profile View)

以蔡司激光扫描共聚焦软件 ZEN (black) 为例^[10], 采集的二维图/多维图中具有剖面图 Profile View 的功能, 用于展现图像中任意一条直线或曲线上的强度分布 (图 1)。剖面图可用于显微图像的定性分析, 也可根据两个或多个通道峰型变化的同步性初步判断是否具有共定位 (图 1b)。剖面图只能展示某一光切厚度的图像中, XY 平面上的亮度变化, 该层的光切厚度是由共聚焦针孔大小所决定。

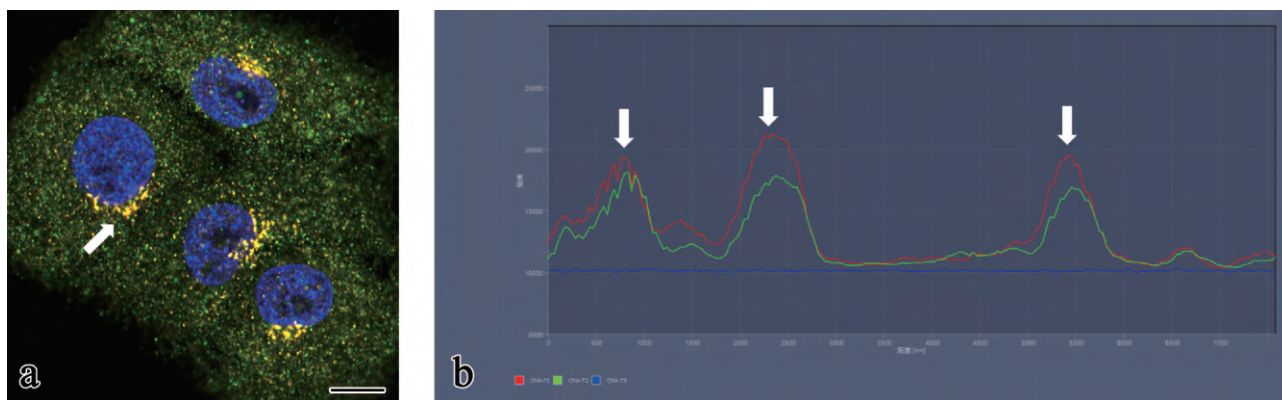


图 1 蔡司 ZEN (black) 软件中的 Profile View。Bar = 10 μm

a. 蛋白 A: Alexa 488; 蛋白 B: Alexa 594; 细胞核: DAPI。使用直线工具在白色箭头所示位置画出直线, 直线粗细可调, 默认粗细是 1 像素, 直线所经过的像素, 各通道荧光强度数值以二维折线图展现在图中; b. 各通道荧光强度折线图, 白线箭头所示位置就是像素中红绿通道共同变化的峰值位置, 由此可看出强度变化趋势。X 轴是所画线条的长度, Y 轴是荧光强度灰度值。

Fig.1 Profile view in Zeiss ZEN (black edition) software.

a. Protein A: tagged with Alexa Fluor 488; Protein B: tagged with Alexa Fluor 594; nucleus: tagged with DAPI. Use the line tool to draw a straight line at the position in the image, which is shown by the white arrow. The thickness of the line is adjustable and the default thickness is one pixel. Each channel's intensity of the passed by line is shown in the figure as a two-dimensional polyline graph. b. The polyline graph of the intensity. The peak position of the red and green channels is indicated by the white arrow, which indicates the trend of intensity change. X axis is the length of the straight line, Y axis is the grey value of the fluorescent intensity.

剖面图的功能除了可获得线条上的荧光强度值外,还可以看图像是否过度曝光。过度曝光的图像,会在最大灰度值处出现平直一段的直线,提示图像过度曝光(图 2)。荧光强度超出成像单元所能

接收的范围后,就无法体现出荧光强度的真正数值。荧光强度定量分析或共定位分析首要条件就是不能过曝。

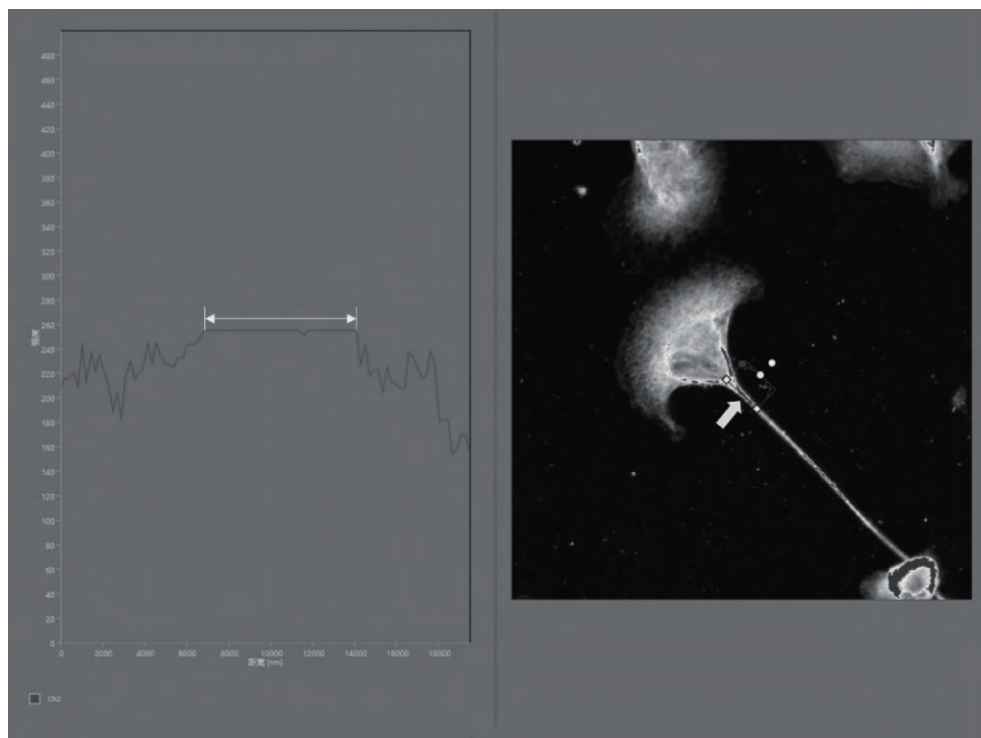


图 2 剖面图与图像过度曝光。

成像设备: 蔡司激光扫描共聚焦显微镜 (LSM780)。图中箭头所示,在位深 8 位的图像中,最大强度灰度值 255 上出现一条平直的直线,提示该处出现过曝,未能真实体现荧光强度数值。

Fig.2 Profile view and image overexposure.

Imaging equipment: Zeiss LSM 780. As shown by the arrow in the figure, a straight line is drawn in an 8 bits image. A straight line appears around the intensity gray value 255 from the polyline graph, indicating that there is overexposure. And the fluorescence intensity value cannot be truly read out.

3.2 正交视图 (Orthogonal View)

正交视图 Orthogonal View^[10],可用于三维图像的共定位定性分析。二维图像的共定位有可能是假的共定位,有以下几种原因造成: ① 面照明和面成像的二维显微图像,在共定位研究图像采集中,建议使用共聚焦显微镜,这是由于共聚焦具有针孔,可阻挡非焦平面杂散光进入采集光路中。宽场荧光显微镜光路是面照明、面成像,所有被光源激发的光线都会被收集,可能出现假的共定位(图 3a)。② 焦平面的主观性,二维图像的焦平面手动调节,如果带有主观性选择,会导致不完整、不科学的共定位分析(图 3b)。在共聚焦显微镜或超分辨率显微镜采图软件中,拍摄三维图像后,可切换至正交视图观察(图 4,图 5)。正交视图可直观显示两条垂直直线相交位置在 XY、XZ、YZ 三个方向上

的情况,如果三个方向上都体现两个荧光通道在相同像素中共现,可对共定位有个初步的判断。正交视图除了用于共定位的初步判断,更适合用于蛋白的定位,例如所标记蛋白与胞浆、胞核、胞膜的空间位置关系。Zhang 等^[11]运用结构光照明超分辨率显微镜 (SIM) 拍摄三维图像后,使用正交视图说明经载体或奥沙利铂处理后的大鼠背根神经节组织切片中 δ -连环蛋白和 DHHC3 蛋白的关系。

3.3 表面间共定位 (Surface-surface colocalization)

运用其他图像处理软件,如 Bitplane Imaris 软件中的拓展模块 XTension,其中一个插件表面件共定位 (Surface-surface colocalization)^[12]可计算出两个通道的共定位像素或体素重叠 (overlap) 的区域(图 6),获得相关的数据。此运算并不涉及相关性的计算,

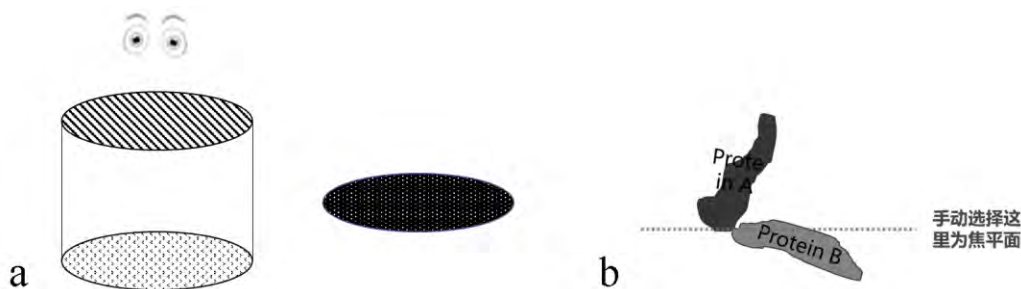


图3 二维共定位图像的伪共定位情况。a. 面照明和面成像所致; b. 焦平面的主观选择所致。

Fig.3 Fake colocalization caused by the two-dimensional imaging.

a. Fake colocalization caused by plane lighting and plane imaging mode; b. Fake colocalization caused by the subjective choice of focal plane.

即不能单一作为共定位定量描述的指标,但可以得出共定位像素或体素的占比或作为一个展示。

4 共定位的定量描述与分析

4.1 散点图

共定位定量分析的基础是两个通道中,所有像素的强度分布散点图,共定位程度越高,散点图越趋向于对角线分布,Zinchuk等^[13]使用散点图来展示不同百分比的共定位情况。散点图中(图7),每个点的坐标代表的是该像素中通道1和通道2的荧光强度值。从散点图可得知:①共定位分析要求两个荧光通道在成像时强度要相当,如果一个通道强、一个通道弱,散点图分布偏离对角线,则相关性下降,以极限情况而言,横着一条,两者就不相关。②要求抗体特异性要高,背景要低,不然会导致相关性下降。

4.2 共定位系数

共定位系数用于描述两个通道重叠的程度。通常,显微图像的共定位系数是用于描述线性变化的图像。皮尔森相关系数(Pearson's)和曼德斯系数(Mander's)最为常用^[13],在多种分析软件中共定位系数可能名字会不一样,需以公式^[3-4,10,13]为准(表1)。从公式得知,大部分的共定位系数都与荧光强度有关,除了c1和c2,只与像素数目有关。多种系数综合选择或者比较,可更好地阐述共定位的情况。除上述常用的共定位系数以外,还有Spearman's、Intersection、Li's ICQ、Van Steensel's CCF等系数可用于描述非线性共定位的程度。

4.3 共定位分析的影响因素

无论是共定位的定性分析和定量分析,影响因素可以分为硬件方面和制样方面(表2)。在这些因素中,对图像进行反卷积处理很重要。通过反卷积

对整个光学系统因衍射等所产生的“系统误差”进行纠正,找到图像当中真正的物象^[14],这对于共定位分析极为重要(图8)。

5 共定位与超分辨率显微图像

5.1 结构光照明(SIM)显微图像

结构光照明(SIM)显微镜是通过对其照明方式的改进,以特定结构光成像,从而突破衍射极限,获得高频样品信息,进而由傅里叶逆变换获得样品显微图像的一种光学显微镜。宽场荧光显微镜的成像过程可以用公式(1)表示:

$$D(\vec{r}) = E(\vec{r}) \otimes \text{PSF}, \quad (1)$$

$$E(\vec{r}) \propto C(\vec{r}) I(\vec{r}), \quad (2)$$

$D(\vec{r})$ 是像面上的光场强度分布,表征显微镜系统获得的样品图像, $E(\vec{r})$ 表示样品面发射光的光场强度,PSF是显微镜系统的点扩散函数, \otimes 表示卷积运算,这是一个线性平移不变系统。

而对于荧光显微镜,发射光光场强度 $E(\vec{r})$ 和照明光场强度分布 $I(\vec{r})$ 成线性关系,对于采用匀场照明的宽场荧光显微镜 $I(\vec{r})$ 是常量,而 $C(\vec{r})$ 为荧光分子浓度,表征的是样品的结构信息,所以从公式得知 $E(\vec{r})$ 可以用来表征样品结构信息,与 $D(\vec{r})$ 呈线性关系。

公式(1)经过傅里叶变换获得公式(3), $D(\vec{k})$ 表示显微镜系统获得的样品图像的频域信息,OTF是显微镜系统的光学传递系数, $E(\vec{k})$ 表示样品面出射光场的频域信息,OTF的大小直接限定了通过显微镜系统的样品信息量。二维结构光照明荧光显微镜突破衍射极限限制不在于改变OTF,而在于改变照明光的样式,所以 $I(\vec{r})$ 并不为常量,

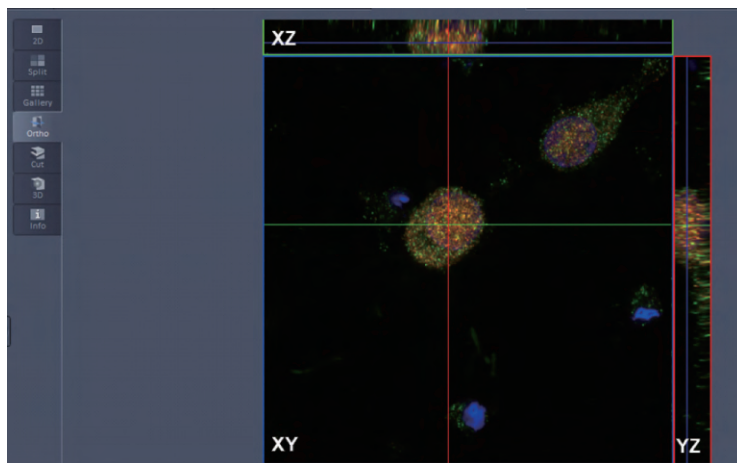


图 4 ZEN 软件中 Z-Stack 三维图像正交视图。成像设备: 蔡司激光扫描共聚焦显微镜(LSM 880 with Airyscan)。

Fig.4 Orthogonal view of 3D Z-Stack image in Zeiss ZEN (black edition) software.

Imaging equipment: Zeiss LSM 880 with Airyscan.

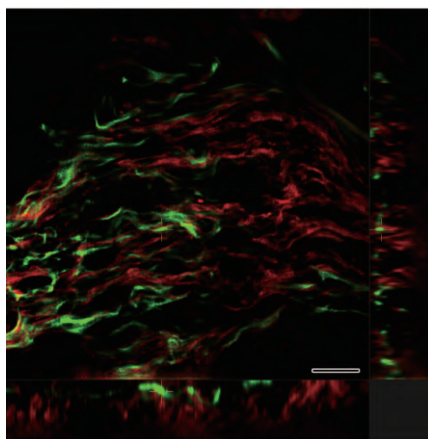


图 5 结构光照明超分辨率显微镜(SIM) 三维图像。正交视图。成像设备: 尼康超分辨率显微镜 A1 N-SIM。Bar=10 μm

Fig.5 Orthogonal view of structured light illumination super-resolution microscope 3D Z-Stack image. Imaging equipment:

Nikon super resolution microscope(A1 N-SIM) .

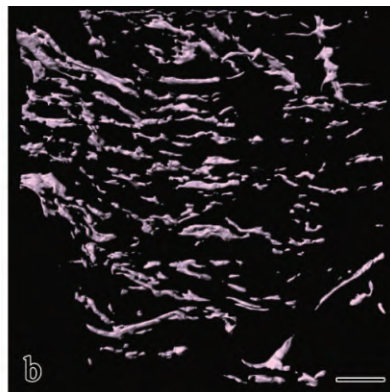
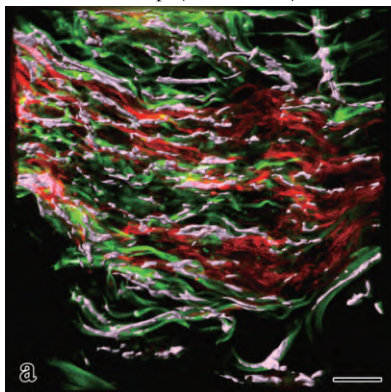


图 6 Imaris XTension 中的表面间共定位重叠的体素区域。Bar=10 μm

a. 488 nm 和 561 nm 通道图像 白色区域为两个通道的功能定位重叠区域; b. 重叠区域的表面渲染图。

Fig.6 The overlap voxel area after surface-surface colocalization calculation in Imaris XTension.

a. The merged image of the channel 488 nm ,561 nm and the overlap surface of the two channels;

b. The surface image of the overlap voxels.

而是由条纹照明平均强度 I_0 和初相位 φ 两个变量决定的一个余弦形式照明光(公式(4))。 k_0 是余弦条纹照明的空间频率,即条纹周期的倒数^[15]。

$$D(\vec{k}) = E(\vec{k}) \text{OTF}, \quad (3)$$

$$I(\vec{r}) = I_0 [1 + \cos(2\pi k_0 + \varphi)]。 \quad (4)$$

由此可知,采用傅里叶逆变换所获得的 SIM 图像,其样品信息 $E(\vec{k})$ 与像面信息 $D(\vec{k})$ 不呈线性关系,不能用于表征样品的强度信息。所以,经过傅里叶逆变换的图像并不能用于强度计量。

线性结构光照明显微镜分辨率的提高取决于结构照明光空间频率 k_0 的大小,结构照明光也是通过光学系统照射到样品表面,它同样受到衍射极限的限制,分辨率无法突破 2 倍衍射极限^[16]。SIM 图像由于在重构运算时是将高频信息分离、移位、重

表 1 部分共定位系数简介与公式
Table 1 Partial colocalization coefficients and formula

系数名称	数值范围	ZEN 软件中的名称	备注与建议	公式
Pearson's correlation coefficient	-1 ~ +1。 0 表示没有相关性。 越接近 -1, 负相关性越高。 越接近 +1, 正相关性越高。 平方值的百分比, 如: 0.82 = 0.64, 可表示 64% 有共定位。	Correlation coefficient	线性图像; 对背景值敏感; 与强度相关, 建议反卷积处理。	$R_p = \frac{\sum_i (Ch1_i - Ch1_{aver}) * (Ch2_i - Ch2_{aver})}{\sqrt{\sum_i (Ch1_i - Ch1_{aver})^2 * \sum_i (Ch2_i - Ch2_{aver})^2}}$
Overlap coefficient according to Manders	0 ~ 1。 0.5 表示两个所选通道间 50% 的共定位。	Overlap coefficient, Overlap coefficient after Manders	任何共定位实验都可应用, 特别适用于一个通道强度大于另一个通道。	$r = \frac{\sum_i Ch1_i * Ch2_i}{\sqrt{\sum_i (Ch1_i)^2 * \sum_i (Ch2_i)^2}}$
Colocalization Coefficients m1 and m2	0 ~ 1。 如 m1 = 1.0, m2 = 0.2 这样的红-绿对表示所有红色通道都与绿色通道重叠, 但只有 20% 的绿色通道与红色通道重叠。与通道的强度相关。	Weighted colocalization coefficients	任何共定位实验都可应用, 每个通道中与另一个通道中的某一强度重合的部分。亮的像素比弱的像素贡献要大。由于对强度阈值敏感, 建议反卷积处理。	$M_1 = \frac{\sum_i Ch1_{i_{coloc}}}{\sum_i Ch1_{i_{total}}} \quad M_2 = \frac{\sum_i Ch2_{i_{coloc}}}{\sum_i Ch2_{i_{total}}}$
Colocalization coefficients M1 and M2	0 ~ 1。 等同于 m1 和 m2, 但用于分析散点图 ROI。	同上	同上	同上
Overlap coefficient k1 and k2	范围是变化的。	无	任何共定位实验都可应用。对强度阈值敏感, 建议反卷积。	$k_1 = \frac{\sum_i S1_i * S2_i}{\sum_i (S1_i)^2} \quad k_2 = \frac{\sum_i S1_i * S2_i}{\sum_i (S2_i)^2}$
Colocalization coefficient	0 ~ 1。 表示两通道之间共定位的像素比值, 与通道的强度值无关, 与图像背景相关。	Colocalization coefficient	任何共定位实验都可以应用。	$c_1 = \frac{pixels_{Ch1_{coloc}}}{pixels_{Ch1_{total}}} \quad c_2 = \frac{pixels_{Ch2_{coloc}}}{pixels_{Ch2_{total}}}$

表 2 部分共定位分析的影响因素
Table 2 Impact factors of the colocalization analysis

影响因素	制样或硬件因素	解决方案
点扩散函数(PSF)	硬件	反卷积处理。
色差	硬件	平场复消色差物镜。
串色	制样、硬件	更换染料, 通道间激发/发射波长间隔更远; 荧光滤片选择更短或区分度更合适的以区分信号。
背景	制样	选择特异性更好的抗体、反卷积处理。
通道间的荧光差异太大	制样	提高抗体浓度, 如果是表达量存在差异, 考虑选用与强度不相关的共定位系数进行分析。

构, 所以不能用于强度计算, 无法进行共定位的定量分析, 但仍然可以使用像素占比、剖面图、正交视图(图 5)、距离等^[11, 17]定性工具对共定位进行描述。结构光照明超分辨率显微镜在突破衍射极限的基础上, 具备较快的成像速度, 对标记样品的荧

光染料没有特殊要求, 所以在生物样品的结构特性静态观察或部分样品的动态特性上有着广泛地应用前景。

5.2 随机光学重建(STORM)显微图像

随机光学重建显微镜(STORM)成像是报告荧

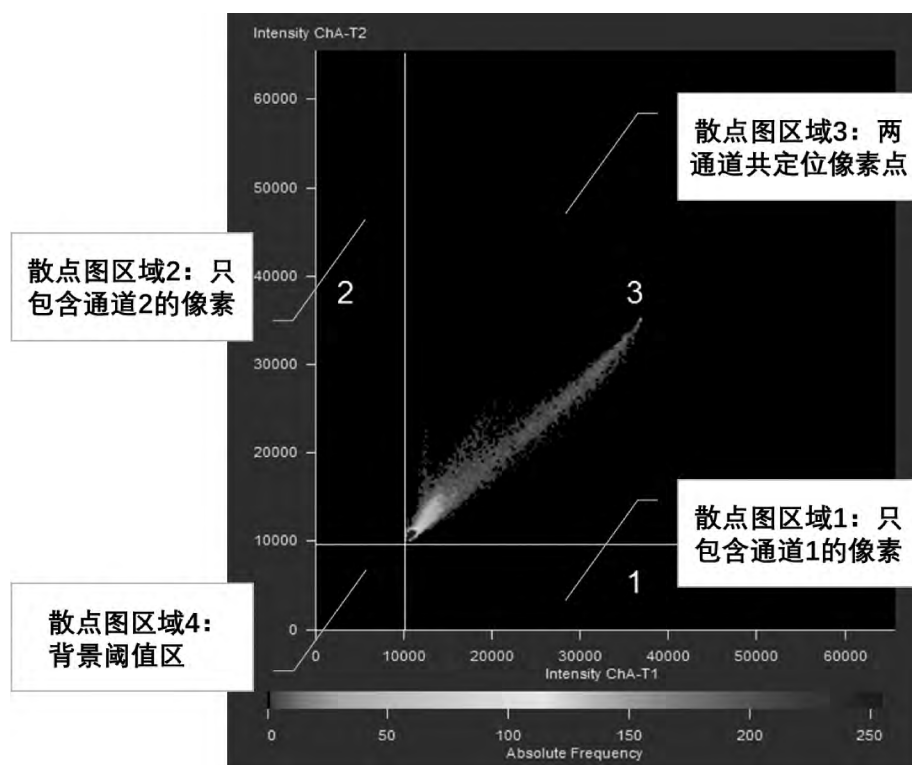


图 7 散点图。横轴: 通道 1 的荧光强度灰度值; 纵轴: 通道 2 的荧光强度灰度值。

Fig.7 Scatter diagram. X axis: intensity grey value of channel 1; Y axis: intensity grey value of channel 2.

光染料分子随机、多次闪烁,信号收集的是荧光基团的定位点信息,每个蛋白或结构中的抗体染料数量是不确定的。STORM 是通过定位点来计算最终的图像,以高斯拟合的方式去展现,所以 STORM 的图像不能直接用于荧光强度测定,定量的共定位系数并不能在此应用。Malkusc 等^[18]通过两个染料周围定位的空间分布,修正了单个荧光分子的多次开关周期,结合 Spearman 系数,以距离排序的方式给出定义范围内距离共定位基团 A_i 的 B 分子数目。通过距离计算单个荧光分子的共定位情况(图 9), Ma 等^[19]将 STORM 获得的两通道信号图像,在 Bitplane Imaris 软件中依据点状信号的大小转化为球(Spot),其中 TRIM28 蛋白因有聚团的部分,所以分成 2 种不同大小直径的小球(绿色)。建立小球后,使用 Imaris XTension 中的 Colocalize Spots 以球心自定义的球心距离得出共定位小球的数目,例如:红色小球和绿色小球以球心距离 ≤ 10 nm 则定义为共定位,红色小球以绿色大球以球心距离 ≤ 100 nm 定义为共定位,从而得出相关的数据。

Veeraraghavan 等^[20]运用 Matlab 软件中的算法识别 STORM 的定位点信息后,依据 DBSCAN 算法对定位点信息进行分簇(Cluster),并以 quickhull 算法将成簇的信号点以凸多边形形式进行包裹,并以

凸多边形表面的重叠(Overlap)和距离边界间最短距离来描述分子 Cx-43 和 $Na_v 1.5$ 之间的关系。此外,STORM 结合 Z-STACK 三维成像,也许能更好地阐述分子间的相互作用。Xu 等^[21]通过采集双通道的 3D-STORM 图像,以剖面图 Profile View 的方式观察细胞核内组蛋白 H3K4me3 和 H3K9ac 的共定位情况。

综上所述,超分辨率显微图像,无论是 SIM 还是 STORM,目前并不能用与强度相关的共定位系数来描述共定位关系,但可以点间距离、所占据的像素比例等其他参数描述共定位情况。在图像反卷积处理上, SIM 图像可以考虑反卷积处理以获得更好的分辨率。

6 总结

基于免疫荧光显微图像的共定位分析,在研究蛋白或分子相互作用的过程中是重要的工具。本文从激光共聚焦显微镜和超分辨率显微镜(SIM/STORM)采集的显微图像出发,总结分享了共定位定性、定量的分析在样品制备、采图要求、图像处理等方面的核心要点和注意事项,以期引导有相关需求的科研工作者更高效地使用各类共定位分析工具。

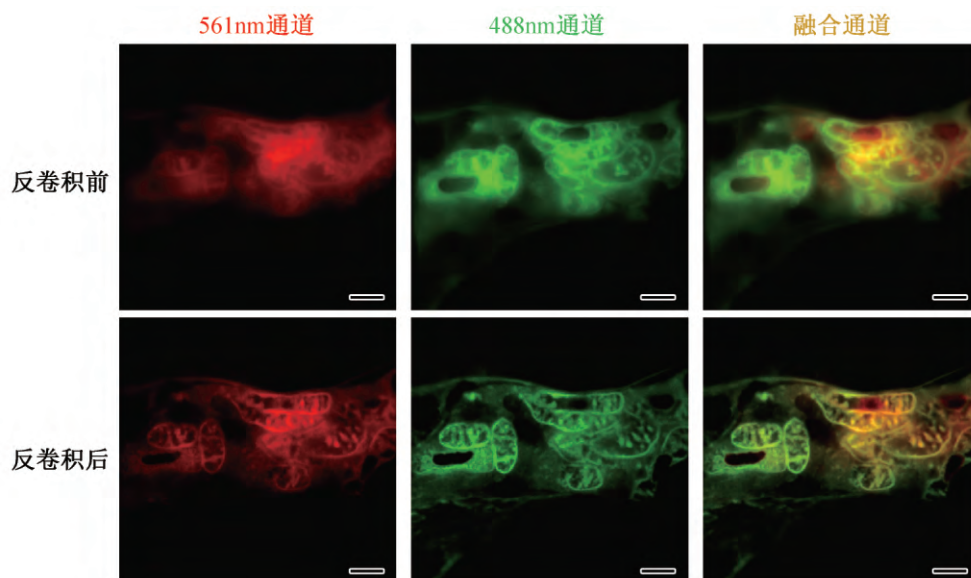
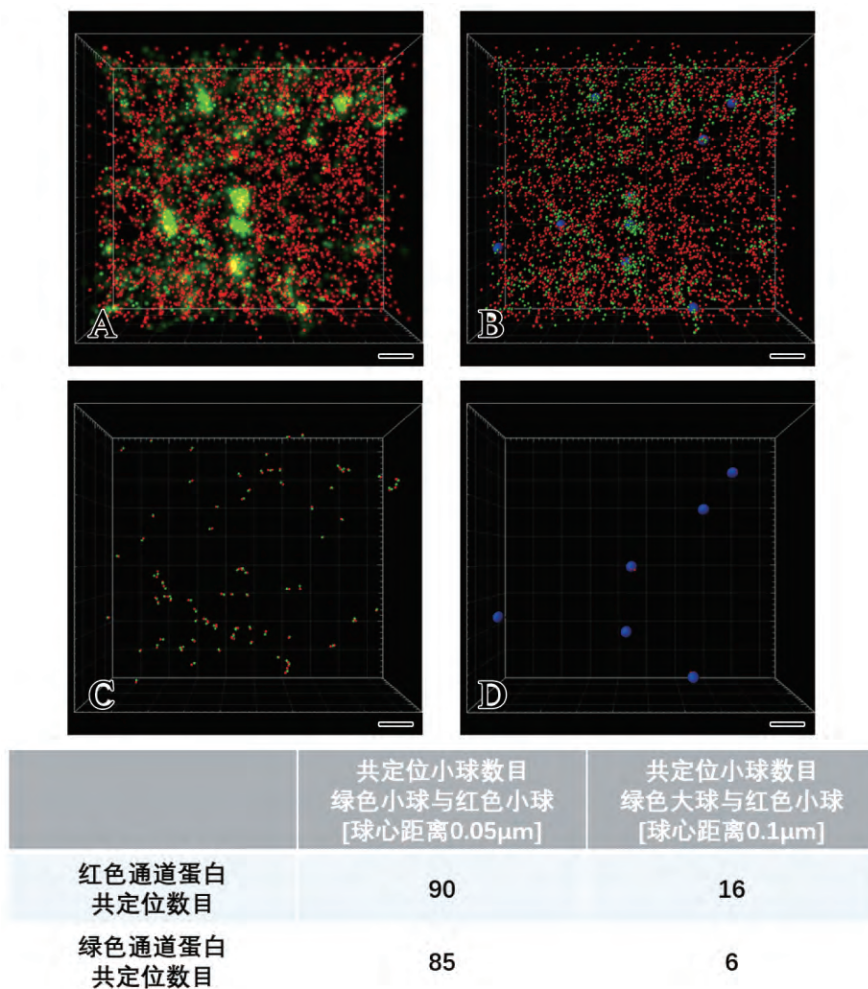
图 8 反卷积处理前后对比图。Bar=10 μm

Fig.8 The comparison image before and after deconvolution.

图 9 STORM 图像渲染小球后计算共定位小球数目。Bar=0.5 μm

A. STORM 选点分析后的图像; B. 依据信号点不同大小渲染的小球图,分为绿色大球(直径 0.2 μm)、绿色小球(直径 0.046 μm)和红色小球(直径 0.05 μm); C. 距离定义为 0.05 μm 共定位的绿色小球和红色小球示意图; D. 距离定义为 0.1 μm 共定位的绿色大球和红色小球示意图。

Fig.9 Colocalized spots number of the analyzed STORM image.

A. The image after the STORM analysis; B. According to different diameter, the image signal has been transferred into spots, including the big green spots (diameter: $0.2\ \mu\text{m}$), the small green spots (diameter: $0.04\ \mu\text{m}$) and the red spots (diameter: $0.05\ \mu\text{m}$); C. The colocalized spots between the small green spots and red spots, defining the distance as $0.05\ \mu\text{m}$; D. The colocalized spots between the big green spots and red spots, defining the distance as $0.1\ \mu\text{m}$.

参考文献:

- [1] ZINCHUK V, ZINCHUK O, OKADA T. Quantitative colocalization analysis of multicolor confocal immunofluorescence microscopy images: pushing pixels to explore biological phenomena [J]. *Acta Histochem Cytochem*, 2007, 40(4): 101–111.
- [2] DUNN K, KAMOCKA M, MCDONALD J. A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2011, 300(4): C723–C742.
- [3] BOLTE S, CORDELIÈRES F. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy [J]. *J Microsc*, 2006, 224(3): 213–232.
- [4] OHEIM M, LI D. Quantitative colocalisation imaging: concepts, measurements, and pitfalls [M]. In: *Imaging cellular and molecular biological functions*. SHORTE S L, FRISCHKNECHT F, eds. Berlin: Springer, 2007.
- [5] SONG J, LIU Y, GAO P, et al. Mapping the nonstructural protein interaction network of porcine reproductive and respiratory syndrome virus [J]. *J Virol*, 2018, 92(24): e01112–01118.
- [6] ZHOU R, SHAO Z, LIU J, et al. COPS5 and LASP1 synergistically interact to downregulate $14-3-3\sigma$ expression and promote colorectal cancer progression via activating PI3K/AKT pathway [J]. *Int J Cancer*, 2018, 142(9): 1853–1864.
- [7] ARTEAGA-ILECUTTL R, SANCHEZ-SANDOVAL A, RAMIREZ-CORDERO B, et al. Increase of CaV3 channel activity induced by HVA $\beta 1b$ -subunit is not mediated by a physical interaction [J]. *BMC Res Notes*, 2018, 11(1): 810.
- [8] HERBERT L, NITTA C, YELLOWHAIR T, et al. PICK1/calceinurin suppress ASIC1-mediated Ca^{2+} entry in rat pulmonary arterial smooth muscle cells [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2016, 310(5): C390–400.
- [9] SINGH A, YADAV A, KAUR K, et al. A protein phosphatase 2C, AP2C1, interacts with and negatively regulates the function of CIPK9 under potassium-deficient conditions in *Arabidopsis* [J]. *J Exp Bot*, 2018, 69(16): 4003–4015.
- [10] LSM 710, LSM 780, LSM 710 NLO, LSM 780 NLO and ConfoCor 3 ZEN 2011 (black edition) Operating Manual [EB/OL]. P397. (2011 年 9 月) [2019 年 6 月].
- [11] ZHANG X, DING H, XU T, et al. Palmitoylation of delta-catenin promotes kinesin-mediated membrane trafficking of Na(v)1.6 in sensory neurons to promote neuropathic pain [J]. *Front Pharmacol*, 2019, 9: 1510.
- [12] <http://open.bitplane.com/tabid/235/Default.aspx?id=111> (surface-surface colocalization)
- [13] ZINCHUK V, WU Y, GROSSENBACHER-ZINCHUK O. Bridging the gap between qualitative and quantitative colocalization results in fluorescence microscopy studies [J]. *Sci Rep*, 2013, 3: 1365.
- [14] SEDARAT F, LIN E, MOORE E, et al. Deconvolution of confocal images of dihydropyridine and ryanodine receptors in developing cardiomyocytes [J]. *J Appl Physiol*, 2004, 97(3): 1098–1103.
- [15] 吴美瑞. 结构光照明荧光显微成像系统研究 [D]. 长春: 中国科学院研究生院(长春光学精密机械与物理研究所), 2014.
- [16] 吴美瑞, 杨西斌, 熊大曦, 等. 结构光照明荧光显微镜突破衍射极限的原理和在生命科学中的应用 [J]. *激光与光电子学进展*, 2015, 52(1): 23–33.
- [17] PASTOREK L, SOBOL M, HOZÁK P. Colocalization coefficients evaluating the distribution of molecular targets in microscopy methods based on pointed patterns [J]. *Histochem Cell Biol*, 2016, 146(4): 391–406.
- [18] MALKUSCH S, ENDESFELDER U, MONDRY J, et al. Coordinate-based colocalization analysis of single-molecule localization microscopy data [J]. *Histochem Cell Biol*, 2012, 137(1): 1–10.
- [19] MA X, YANG T, LUO Y, et al. TRIM28 promotes HIV-1 latency by SUMOylating CDK9 and inhibiting P-TEFb [J]. *Elife*, 2019, 8: e42426.
- [20] VEERARAGHAVAN R, GOURDIE R. Stochastic optical reconstruction microscopy-based relative localization analysis (STORM-RLA) for quantitative nanoscale assessment of spatial protein organization [J]. *Mol Biol Cell*, 2016, 27(22): 3583–3590.
- [21] XU J, MA H, JIN J, et al. Super-resolution imaging of higher-order chromatin structures at different epigenomic states in single mammalian cells [J]. *Cell Rep*, 2018, 24(4): 873–882.

Colocalization analysis of confocal and super resolution microscopy fluorescence images

GUAN Yuan-jun^{1,2}, RONG Chan¹, LIANG Cui-sha¹, LI Juan¹, LAN Xiu-jian^{1,2*}, WU Jue-heng^{1,2}

(1. Core Lab Plat for Medical Science , Zhongshan School of Medicine , Sun Yat-Sen University , Guangzhou Guangdong 510080;

2. Key Laboratory of Tropical Disease Control (Sun Yat-Sen University) , Ministry of Education , Guangzhou Guangdong 510080 , China)

Abstract Colocalization analysis is an effective tool for analyzing interaction between proteins or molecules. Based on the fluorescent microscopy images , colocalization analysis include the qualitative and the quantitative parts. Utilizing the colocalization coefficients to describe the relation between two or more molecules is the strictest analysis. However , many researchers have not fully mastered the sample preparations and have questions about capturing requirements and image processing methods for colocalization analysis. Here , we summarized the colocalization methods , both qualitative and quantitative for confocal and super-resolution microscopy images , which might help researchers make better use of the tool.

Keywords microscopy imaging; colocalization; optical microscope; confocal microscope; super-resolution microscope (SIM/STORM)

* Corresponding author