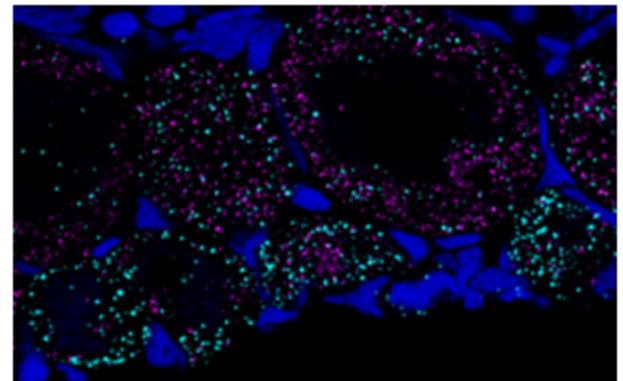
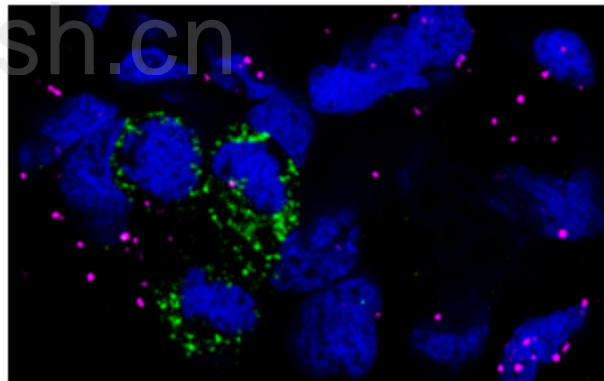
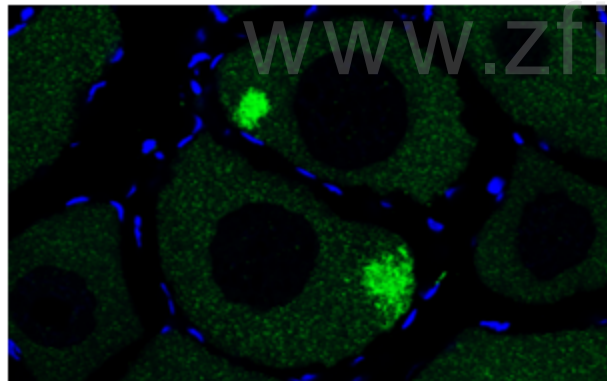
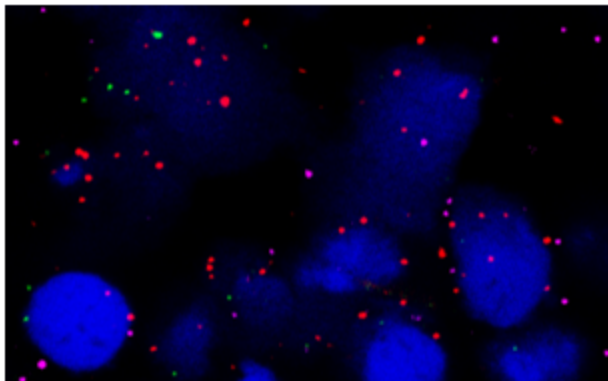


讲座六 斑马鱼中的原位杂交技术

王亚青

国家斑马鱼资源中心 (CZRC)
中科院水生所

wangyaqing@ihb.ac.cn



定义及发展历史

技术应用

分类 国家斑马鱼资源中心 (CZRC)

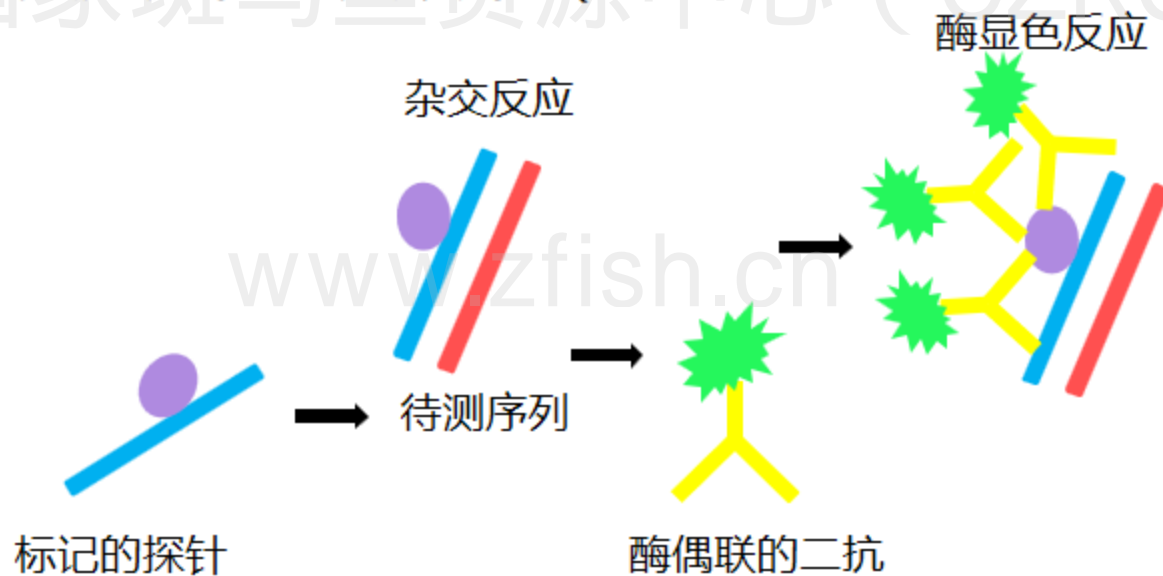
基本原理

www.zfish.cn

实验流程

原位杂交技术的定义

原位杂交技术 (*in situ* hybridization, ISH) 是指用已标记的核酸探针与组织切片或细胞中的待测核酸中的互补序列杂交, 从而对组织细胞中特定的核酸进行定性、定位和相对定量分析的过程, 是一种直接、简便的研究基因定位和表达的方法。随后又出现了荧光原位杂交技术 (Fluorescence *in situ* hybridization, FISH) 。

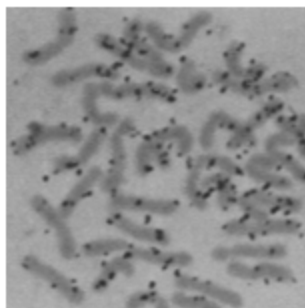


原位杂交技术的发展历史

ISH 放射性同位素标记
FISH 荧光素标记
Anti-Dig 地高辛标记
single molecule FISH (smFISH) 荧光素标记的寡核苷酸探针

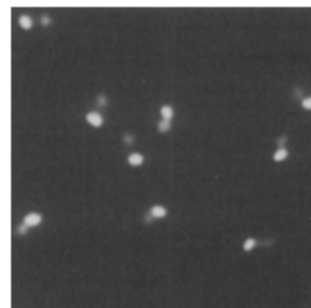


1969



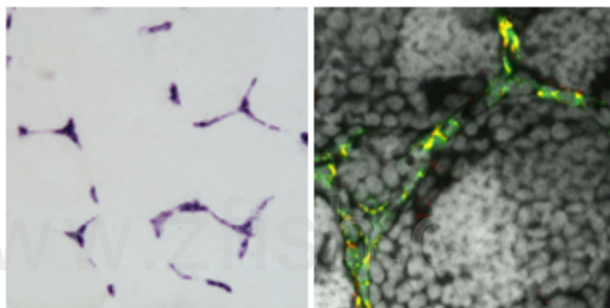
1-2个月

1977



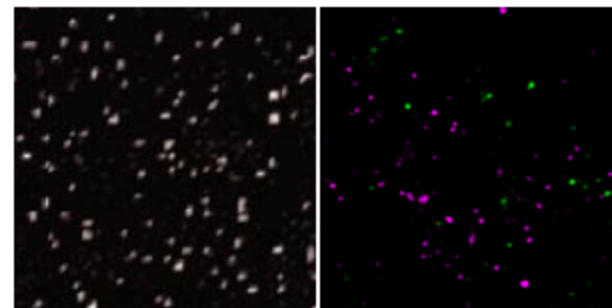
3-5天

1987



3-5天

1998

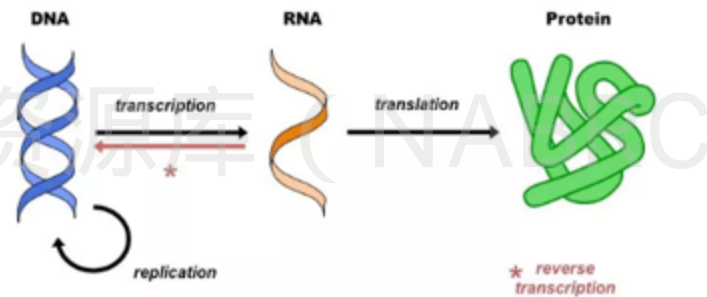


2天

- 定义及发展历史
 - 技术应用
 - 分类 国家斑马鱼资源中心 (CZRC)
 - 基本原理
 - 实验流程
- www.zfish.cn

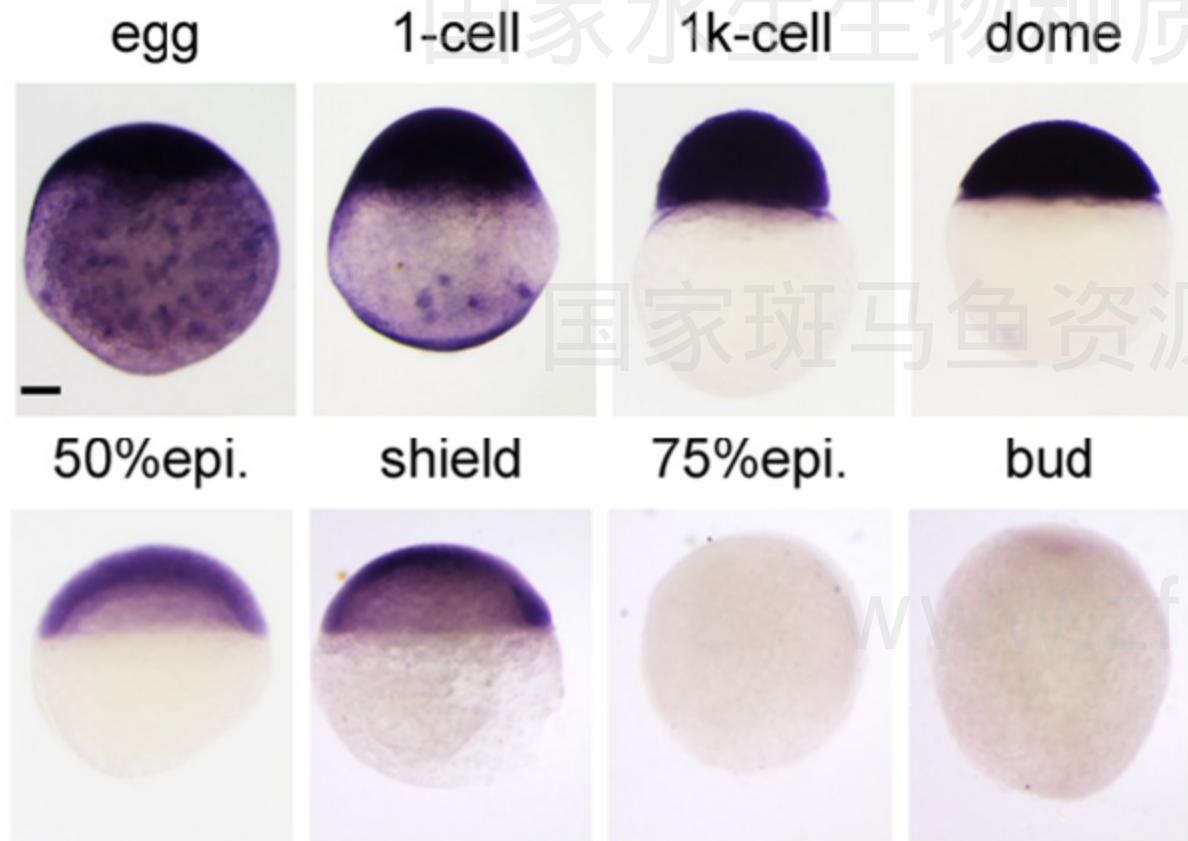
为什么要做RNA原位杂交？

- RNA和蛋白质是相辅相成的；
- 非编码RNA的功能研究；
- 探针合成仅需要1天，而抗体的制备需要几个月的时间；
- 对于分泌型蛋白，免疫组化结果有很大的局限性；
- RNA原位杂交的细胞水平定位分辨率高，可以精确地定量



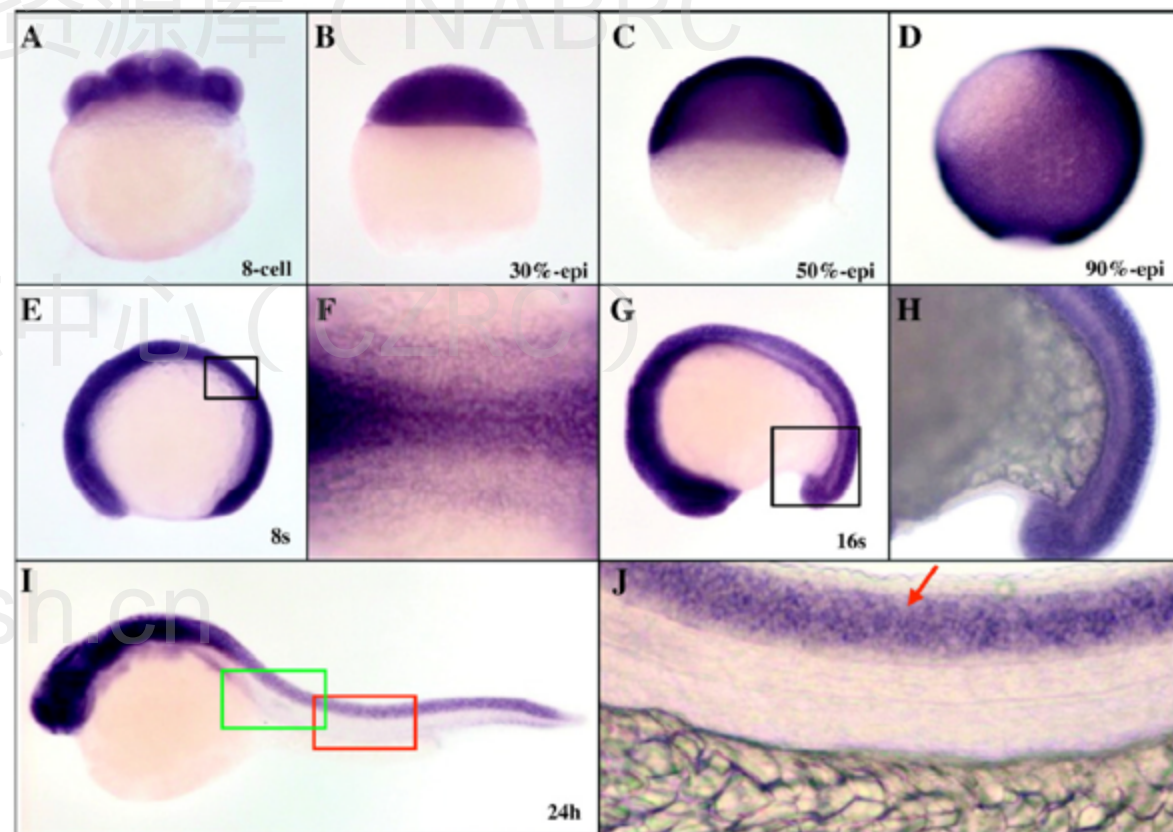
应用1：研究基因在发育过程中时空表达

nanog



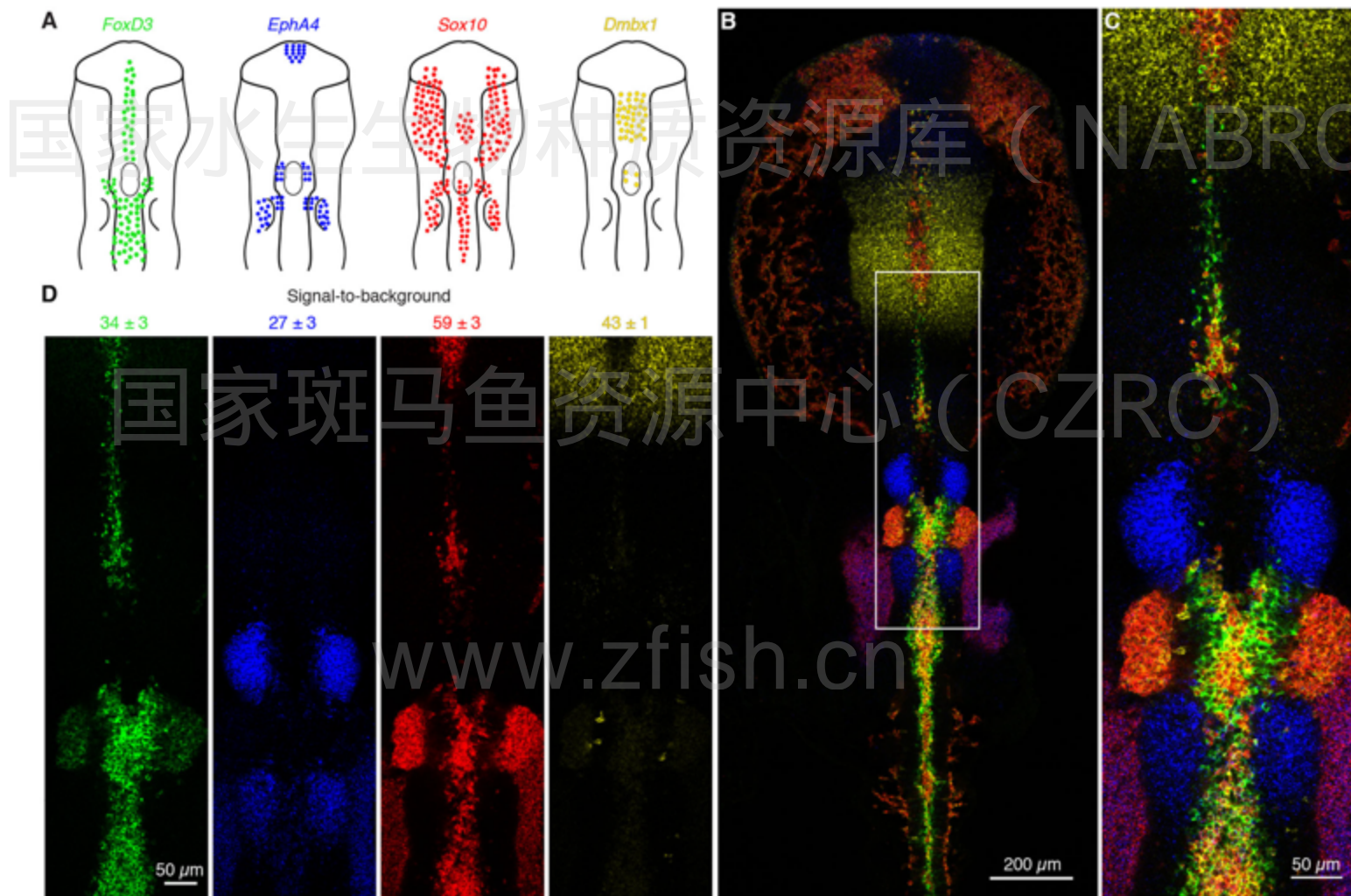
He, et al., *PLOS BIOLOGY*, 2020

marcksb

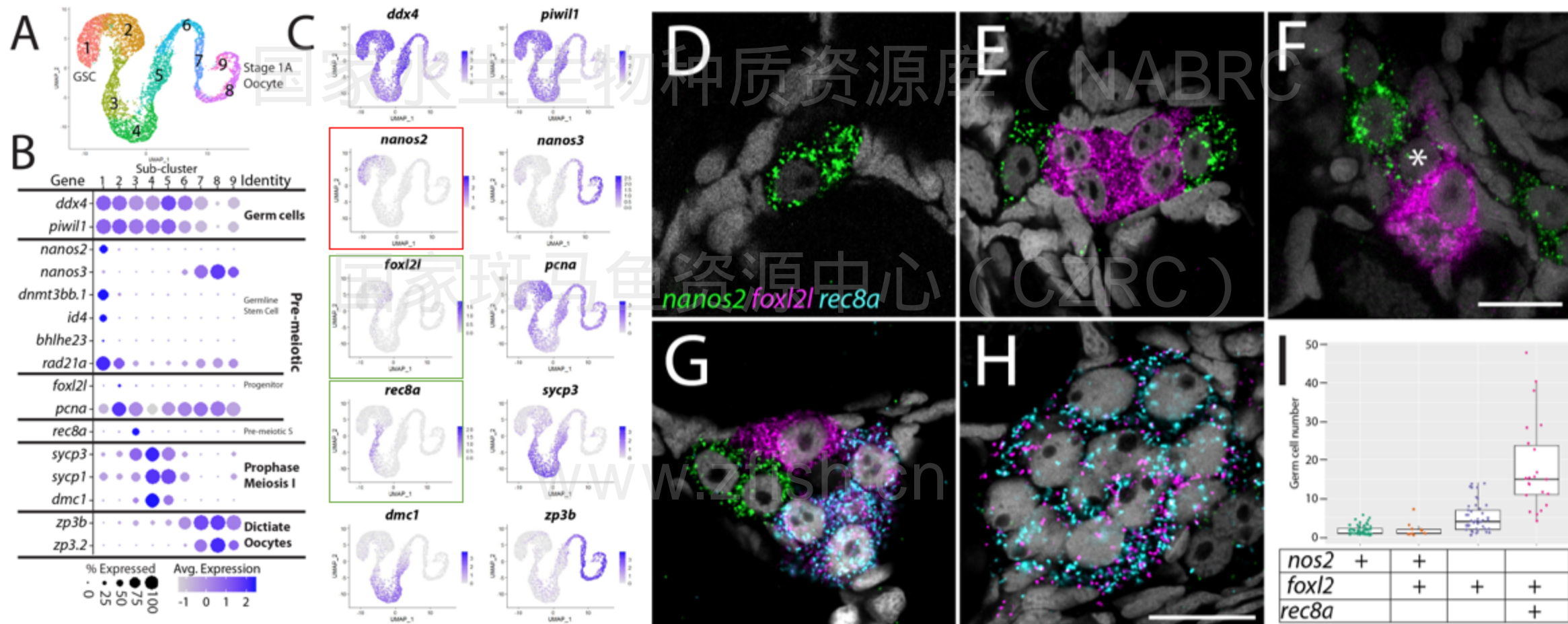


Wang, et al., *Gene*, 2013

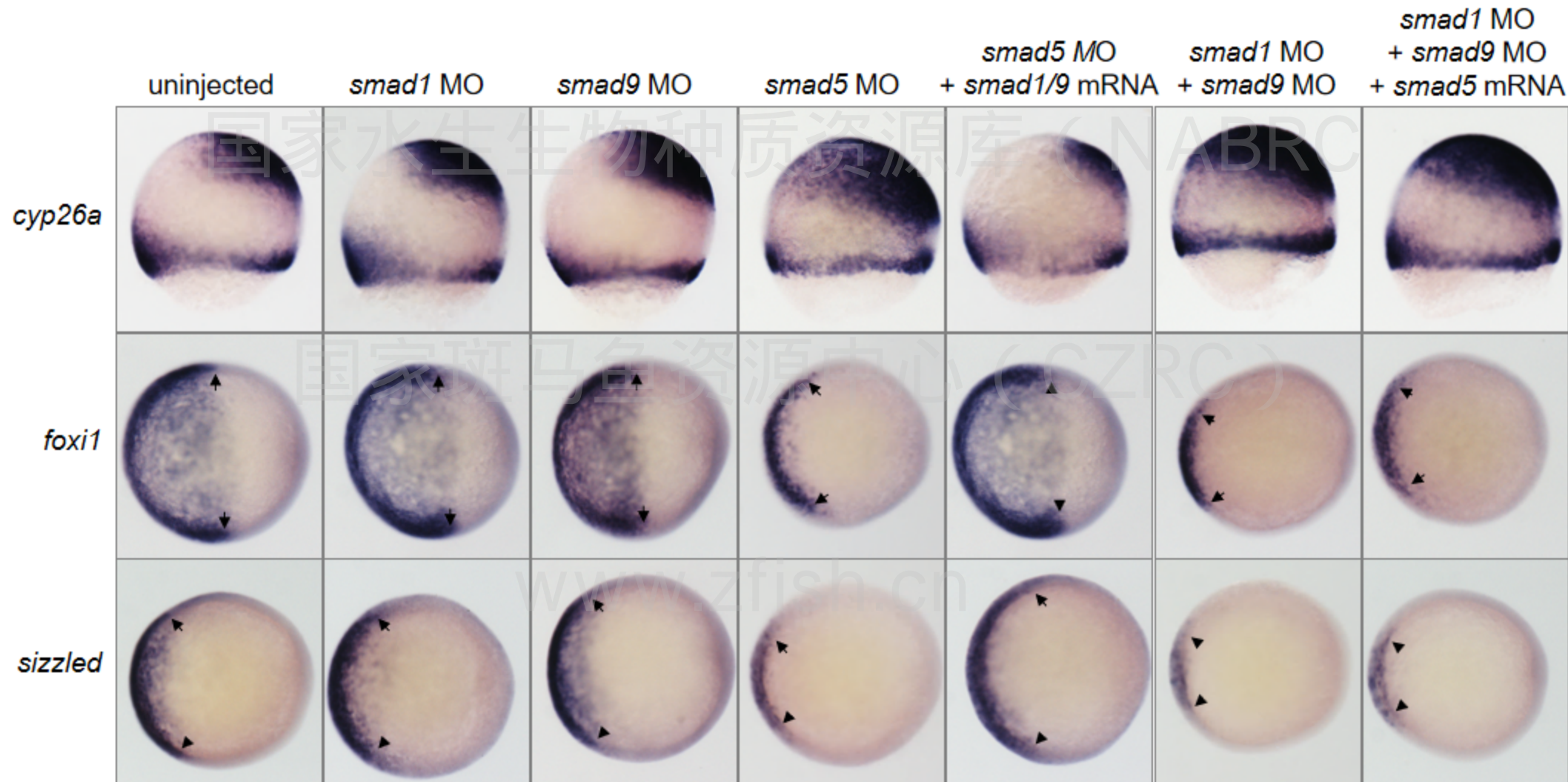
应用2：对比多个基因的相对表达位置



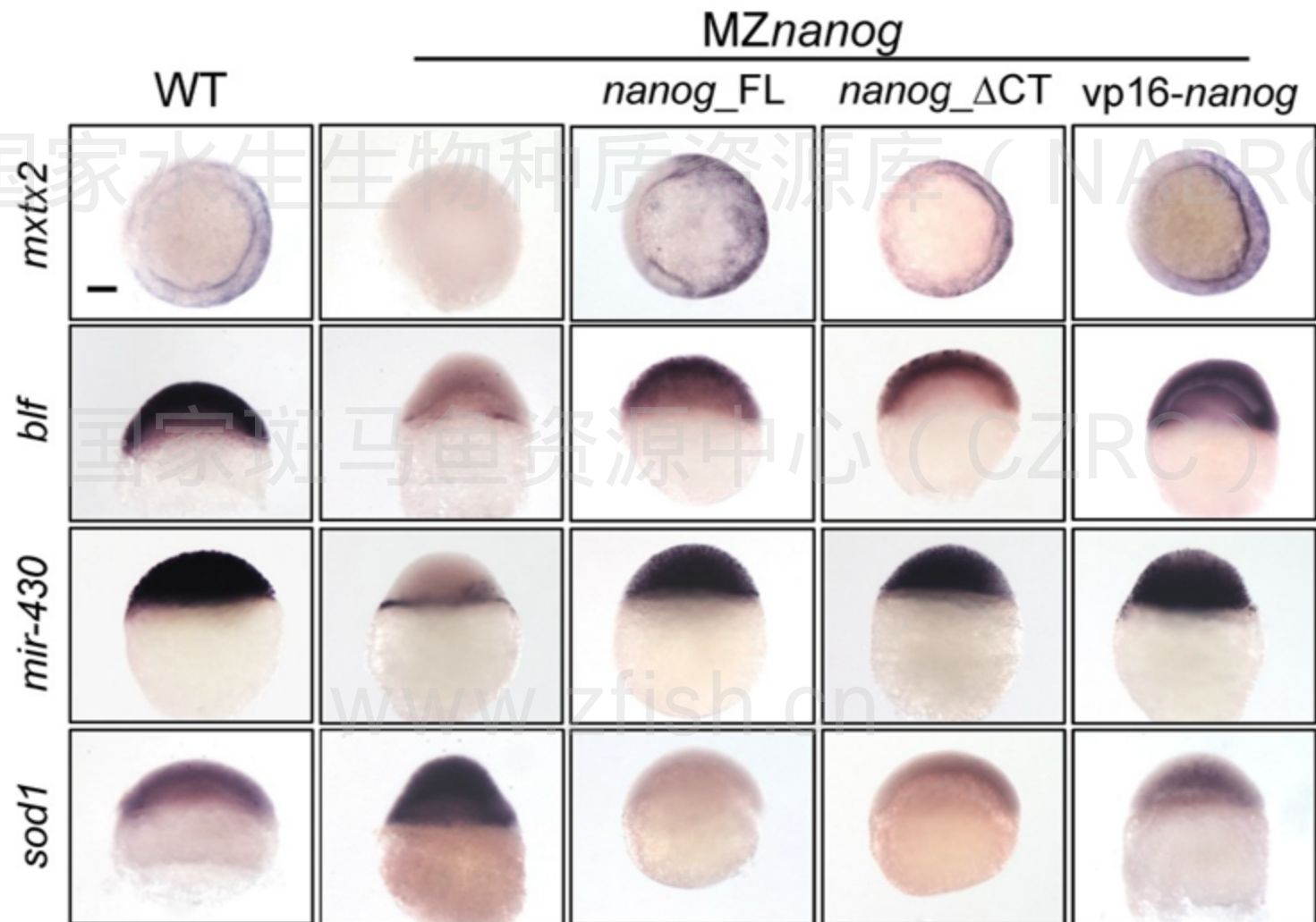
应用3：验证单细胞测序数据中的结果



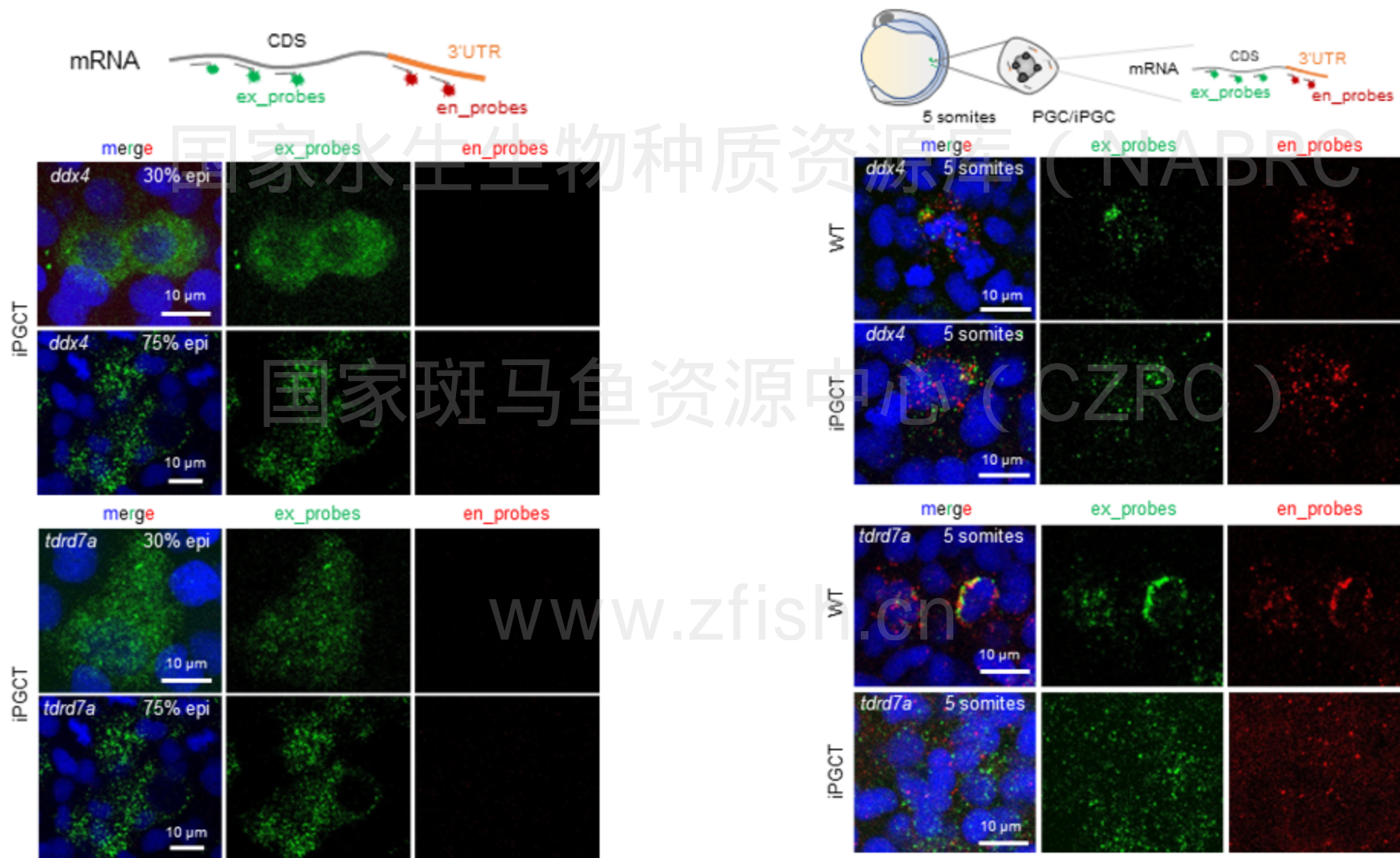
应用4： 基因的表达部位或细胞类型是否变化



应用5：基因的表达水平是否变化



应用6：区分内源与诱导表达的基因



- 定义及发展历史
 - 技术应用
 - 分类 国家斑马鱼资源中心 (CZRC)
 - 基本原理
 - 实验流程
- www.zfish.cn

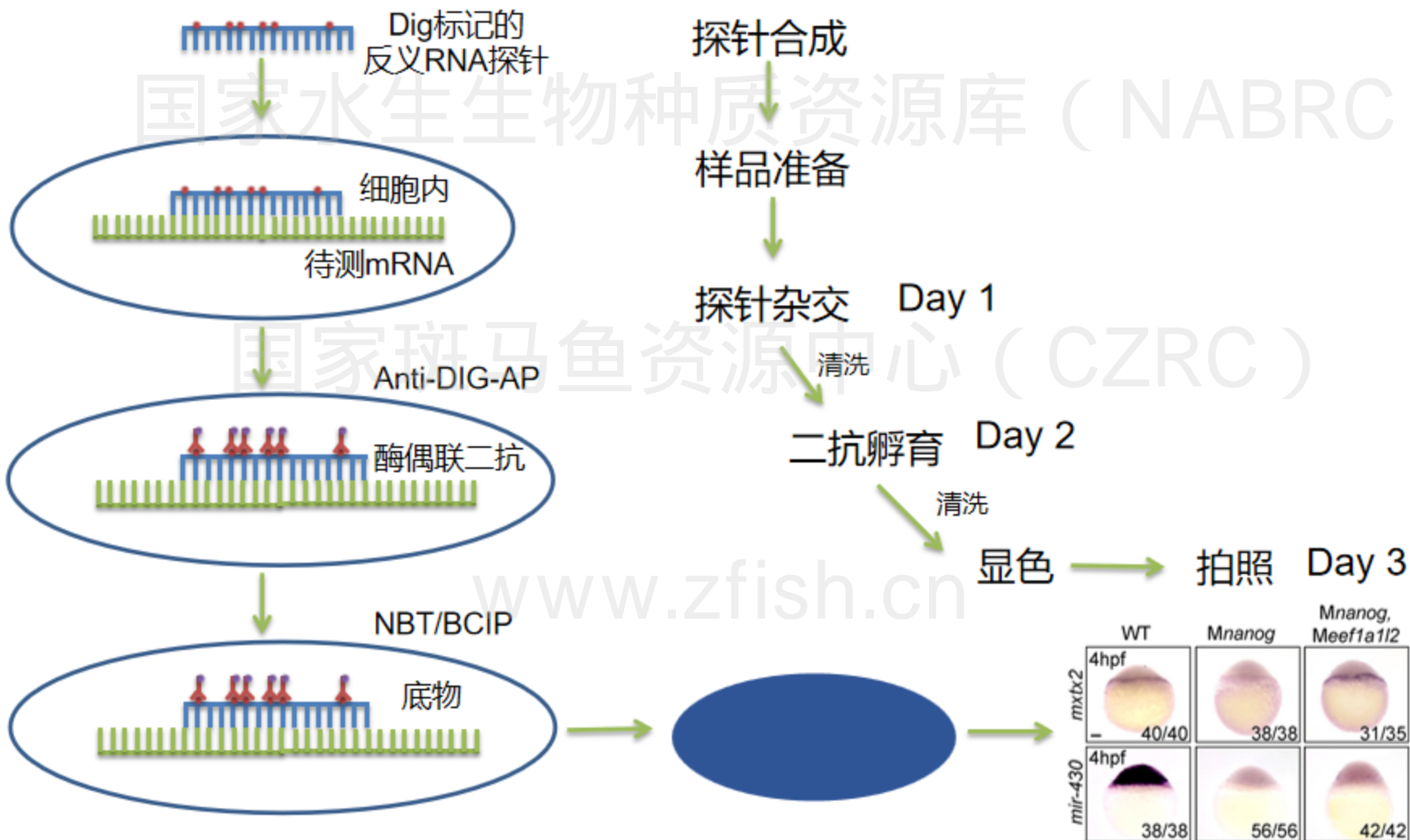
分类



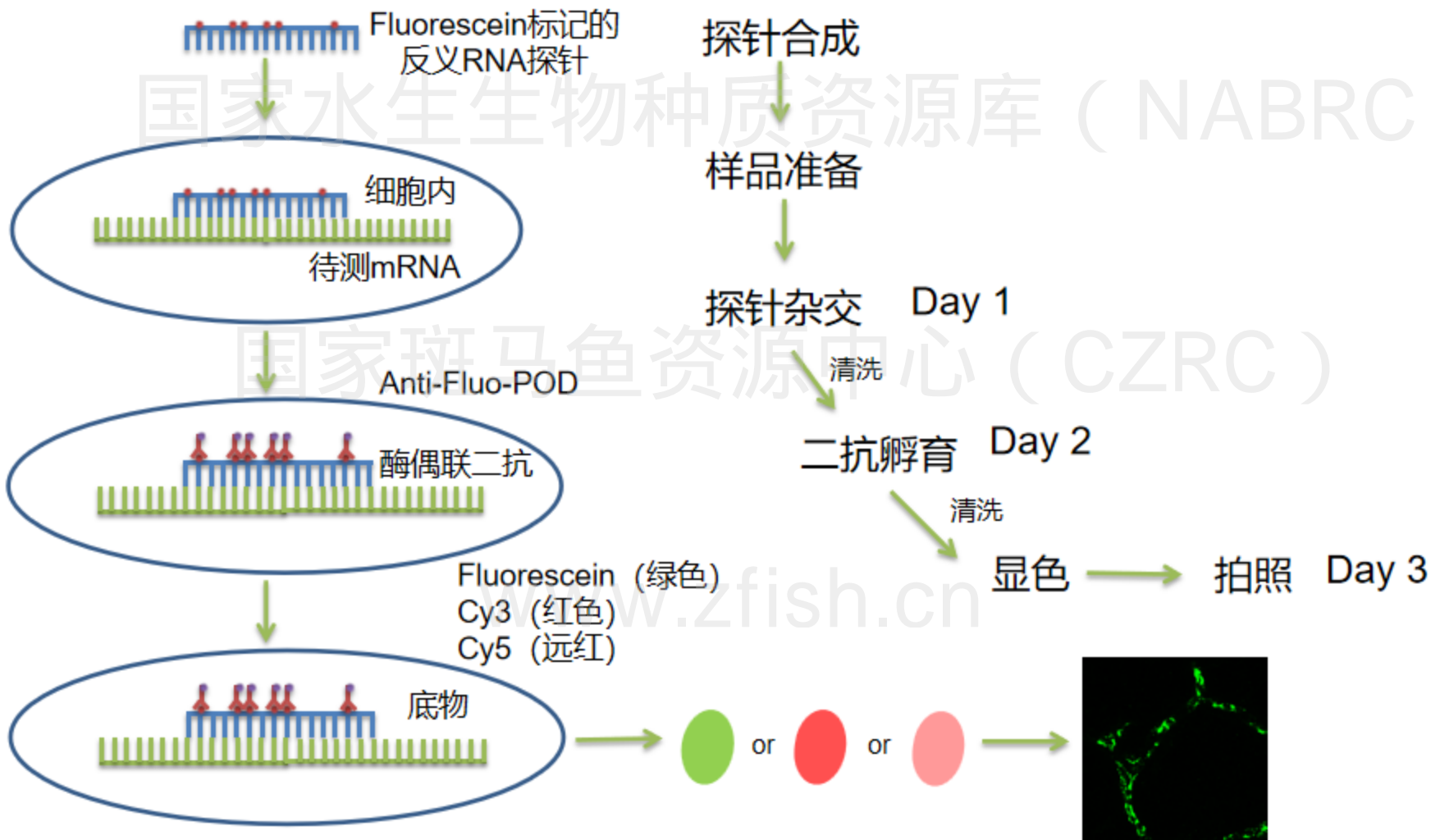
- 定义及发展历史
- 技术应用
- 分类 国家斑马鱼资源中心 (CZRC)
- 基本原理
- 实验流程

www.zfish.cn

化学显色的基本原理



荧光显色的基本原理



多色荧光原位杂交

- 三种探针携带不同抗原标记：
 - DIG-RNA labeling
 - Fluorescein-RNA labeling
 - DNP-RNA labeling
- 三种酶联抗体：
 - Anti-DIG-peroxidase
 - Anti-Fluorescein-peroxidase
 - Anti-DNP-peroxidase
- 三种底物显现不同颜色：
 - TSA-Fluorescein (绿色)
 - TSA-Cy3 (红色)
 - TSA-Cy5 (远红)



存在的问题:

- 步骤繁琐, 至少需要3天的时间, 多则5天;
- 只能在空间水平上显示基因的定位和定性, 不能在分子水平上进行准确的定量;
- 显色时间不好把握, 容易产生强烈的背景色。



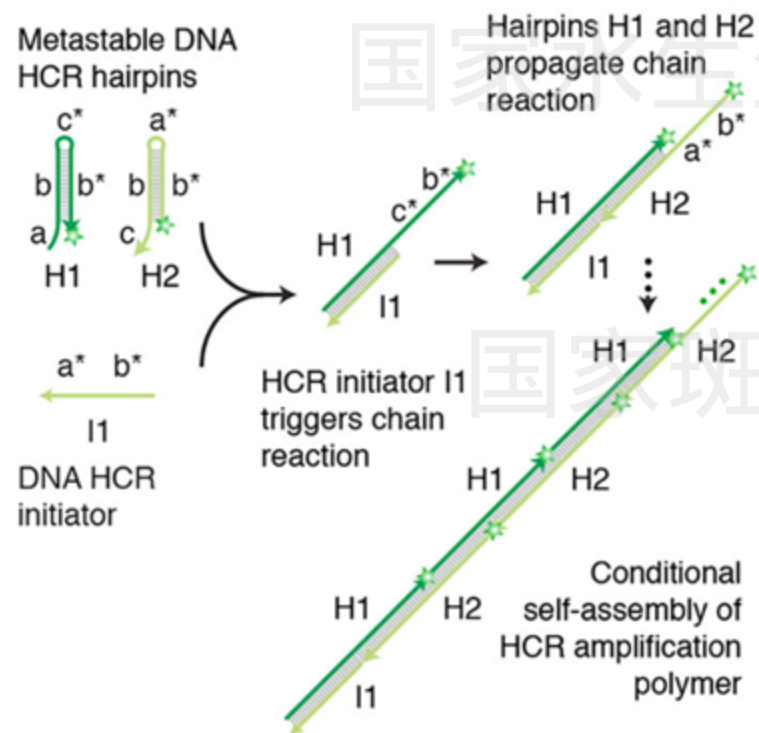
单分子荧光原位杂交

单分子荧光原位杂交的定义

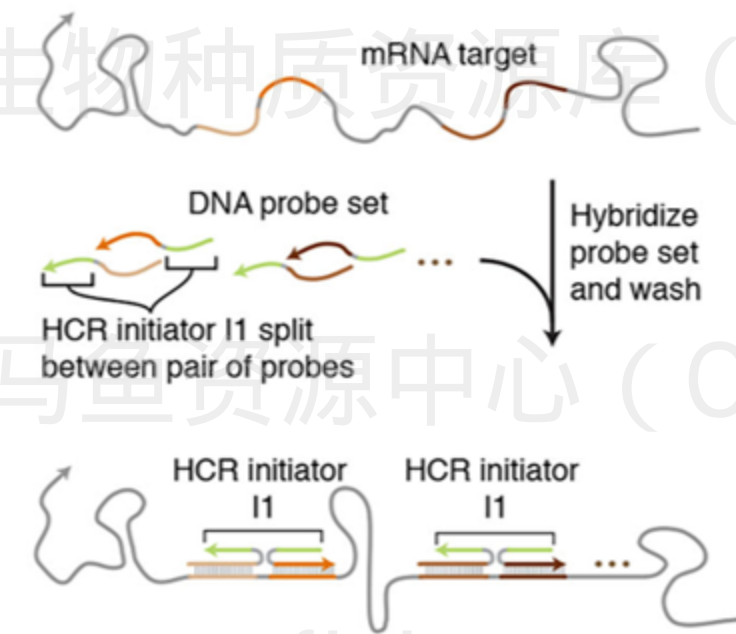
单分子荧光原位杂交 (Single molecular fluorescence *in situ* hybridization, smFISH) 是基于杂交链式反应 (Hybridization chain reaction, HCR) 而衍生出来的。HCR是一种基于DNA自组装反应的信号放大技术, 该体系通常包含两种或多种DNA发夹, 在目标分子存在下, 引发DNA发夹交替开环自组装, 形成包含大量重复单元的切口双链DNA结构, 实现对目标分子的信号放大。HCR具有等温、无酶、高灵敏度、高分辨率、多功能性和操作简单等显著优势, 在生物传感、生物成像和生物医药领域中具有重要的应用价值。

单分子荧光原位杂交的基本原理

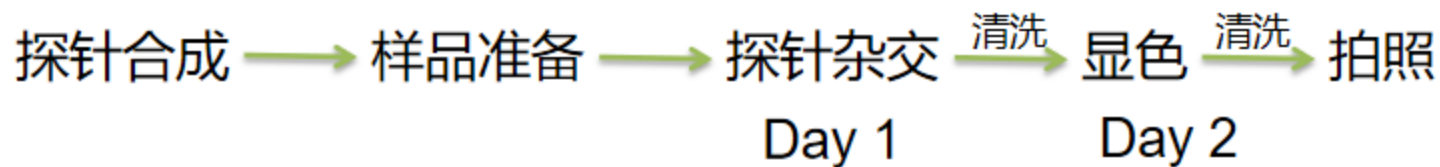
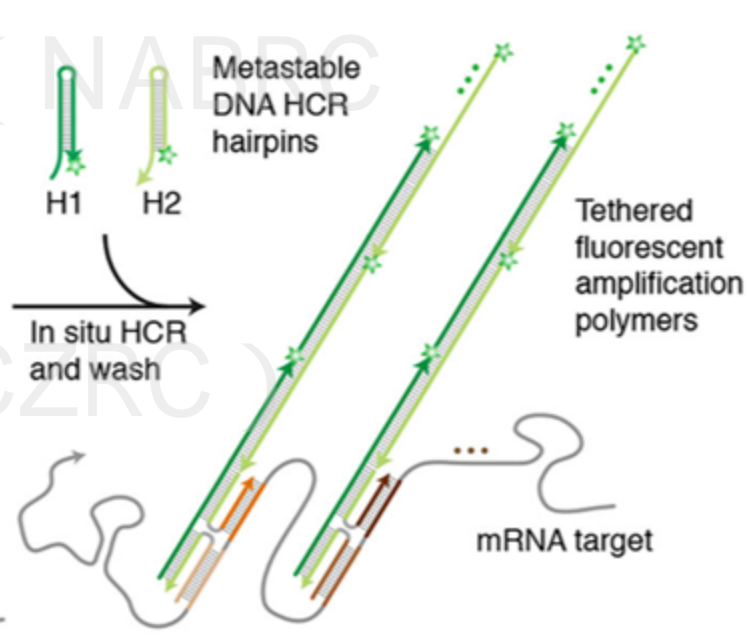
A HCR mechanism



B Detection stage



Amplification stage



单分子荧光原位杂交的优势

传统FISH存在的问题:

- 步骤繁琐, 至少需要3天的时间, 多则5天;
- 只能在空间水平上显示基因的定位和定性, 不能在分子水平上进行准确的定量;
- 显色时间不好把握, 容易产生强烈的背景色。

smFISH的优势:

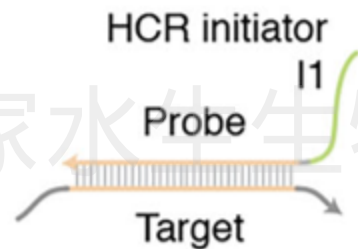
- 步骤简单, 多色的杂交也只需要2天;
- 不仅能在空间水平上显示基因的定位和定性, 也能在单个分子水平上进行准确的定量;
- 反应有平台期, 信噪比高。

- 定义及发展历史
 - 技术应用
 - 分类 国家斑马鱼资源中心 (CZRC)
 - 基本原理
 - 实验流程
- www.zfish.cn

- ▶ 技术要点：保持细胞结构、保持细胞内DNA或RNA的水平、使探针易于进入细胞或组织、并且不产生自发荧光。因此，组织样品离体后，立即使用新鲜配制的4% (wt/vol) PFA-PBS在4 °C固定过夜。
- ◆ 胚胎整体：甲醇梯度脱水：25% → 50% → 75% → 100% → -20 °C保存
- ◆ 组织切片：过梯度蔗糖溶液 → 包埋剂 (OCT) 包埋 → 液氮速冻 → -80 °C保存

实验流程—探针设计

Standard probe (v2.0)



Split-initiator probe pair (v3.0)



探针由1st half of Initiator I1a (18nt) +spacer (2nt) +probe (25~39bp) , 以及Probe Sequence (25~39nt)+spacer+2nd half of Initiator I1b 组成, 两端探针相邻, 并且相隔2nt, 探针应与目标序列反向互补。

	P1	P2
5-FAM (绿光)	5-GTCCCTGCCTCTATATCTTT+探针序列-3	5'-探针序列TTCCACTCAACTTTAACCCG-3'
Cy3 (红光)	5'-CCTCGTAAATCCTCATCAAA+探针序列-3'	5'-探针序列AAATCATCCAGTAAACCGCC-3'
Cy5 (远红)	5'-CCTCAACCTACCTCCAACAA+探针序列-3'	5'-探针序列ATTCTCACCATATTCGCTTC-3'

实验流程—探针杂交 (day 1)

技术要点：样品要透化完全，利于探针进入细胞。

杂交液的组成：

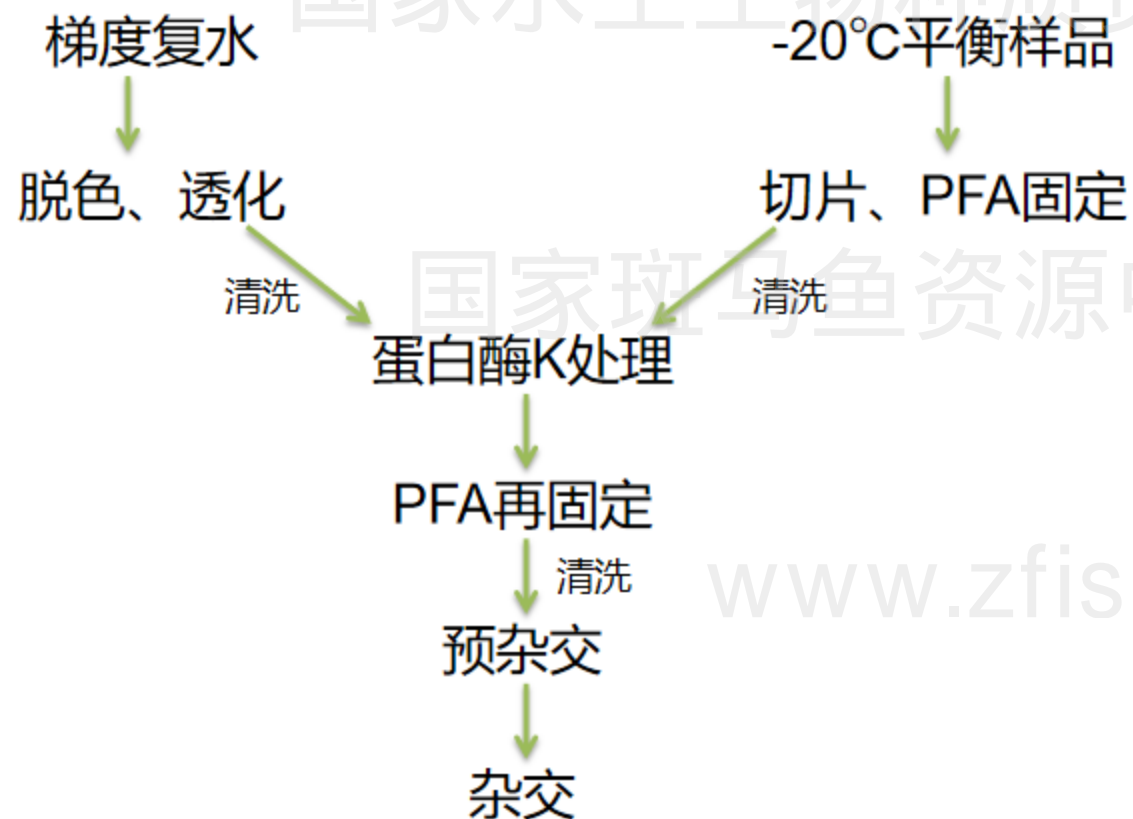
探针：预变性的探针；

柠檬酸钠：增加杂交体的稳定性；

甲酰胺：降低解链温度；

硫酸葡聚糖：提高杂交反应速度；

Denhardt's solution：封阻杂交过程中的非特异性结合，提高灵敏度与信噪比。



实验流程—显色 (day 2)

技术要点: 显色过程要严格避光, 防止荧光基团被淬灭

探针清洗液清洗 (1.5h)

常用的不同发光波长的荧光基团有

5-FAM (522 nm)

Cy3 (570 nm)

Cy5 (670 nm)

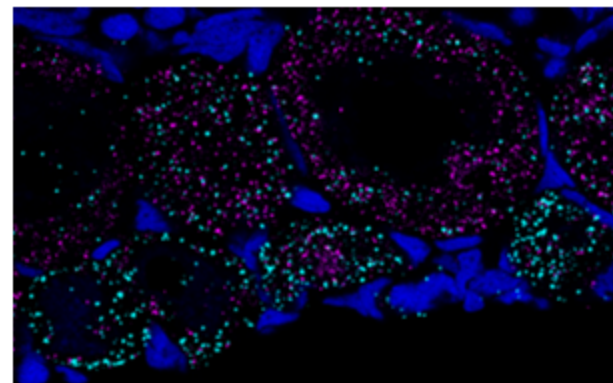
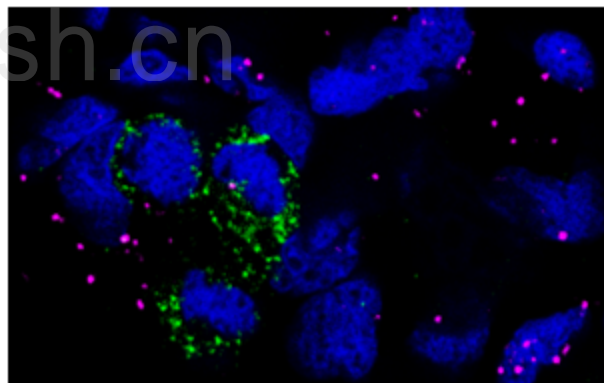
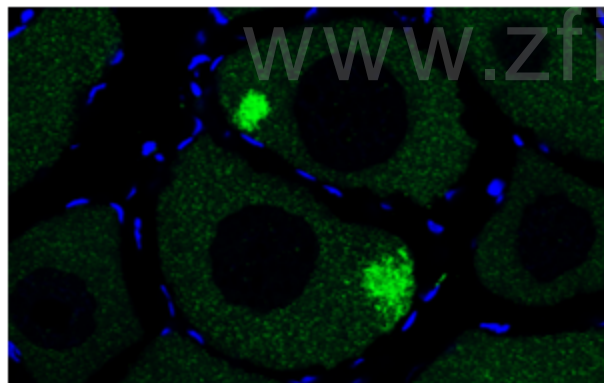
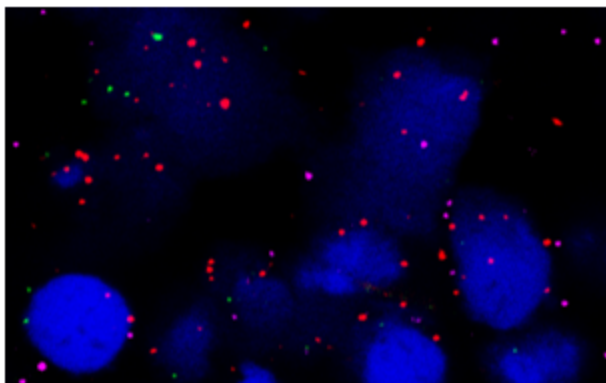
↓
Amplification (H1/H2)

↓ 清洗

DAPI staining

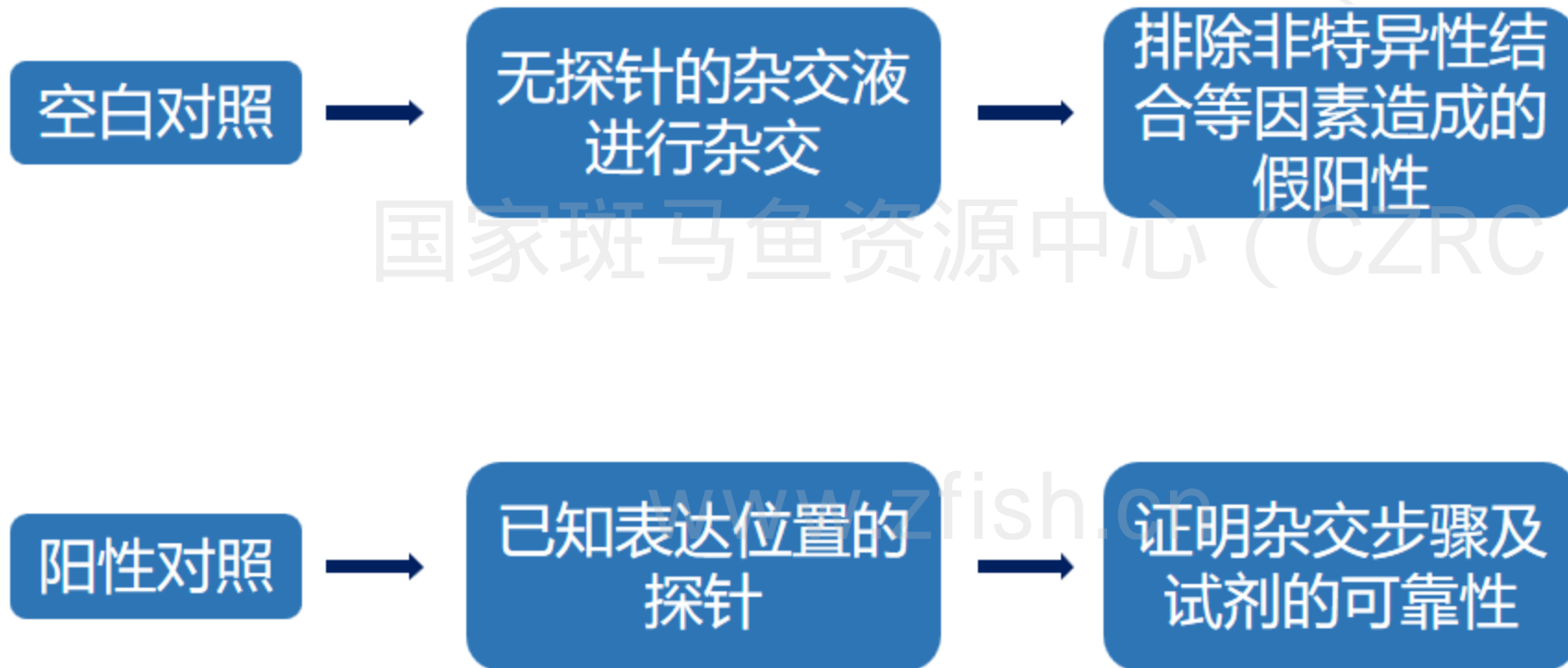
↓ 清洗

拍照



实验流程—对照实验

目的：保证实验结果的准确性与特异性



实验流程—常见问题

常见问题	可能原因	解决方案
胚胎破碎	蛋白酶 K 处理太过	严格把控蛋白酶K处理的浓度和时间
	胚胎固定问题	用新鲜配制的4%PFA-PBS溶液, 控制好固定时间
	吸取胚胎用力过猛	操作胚胎时, 动作一定要轻柔
染色背景过高	杂交温度太低	探针杂交温度最好为39°C, 严格控制杂交温度
	清洗不彻底	保证清洗所需的时间及温度
	杂交液中的甲酰胺质量欠佳	使用优质产品

实验流程—常见问题

常见问题	可能原因	解决方案
无染色	探针设计与合成问题	探针合成选择Page纯化的方式
	基因表达时间与胚胎时期不一致	用RT-PCR 检测基因表达时间
	蛋白酶K处理时间不合理	对于与蛋白结合的RNA, 若RNA没有被蛋白释放出来, 则不会被染色
染色只在表面	透化时间过短或未进行透化	在加入探针之前要对样品进行彻底的透化
	PFA固定时间太长或固定温度过高	用新鲜配制的4%PFA-PBS溶液, 控制好固定时间和温度
	胚胎发生黏连	控制好蛋白酶K处理时间, 遇到黏连情况应及时将胚胎轻轻吹散开

本讲内容完毕

欢迎交流

国家斑马鱼资源中心 (CZRC)



中国斑马鱼信息中心