

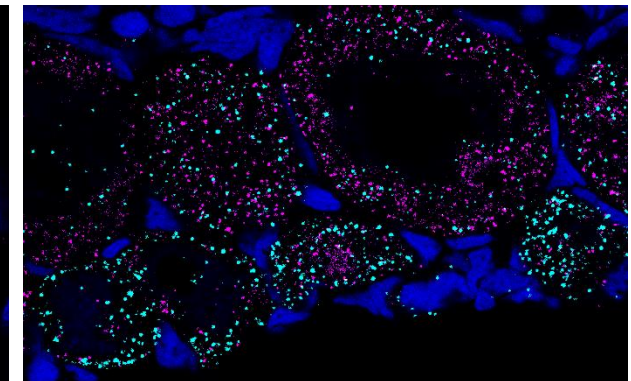
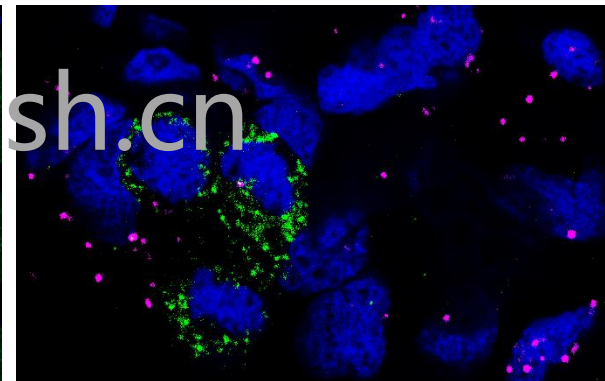
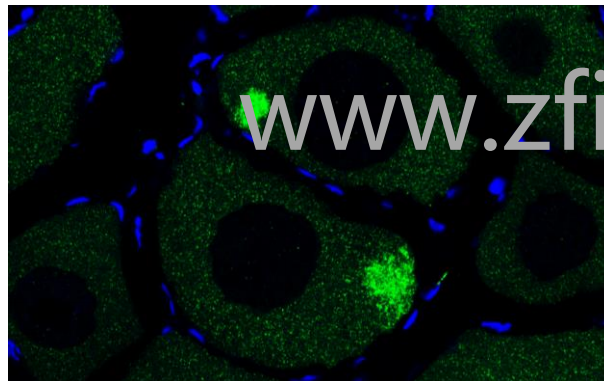
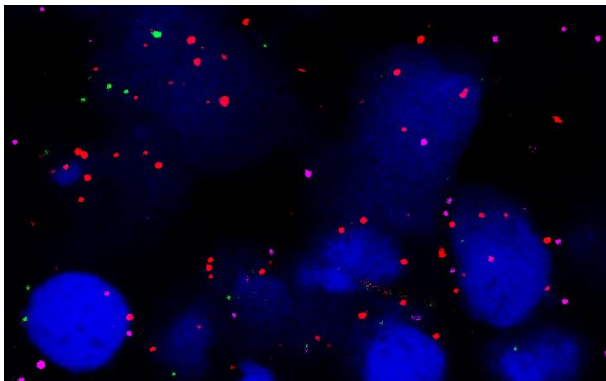
讲座五 斑马鱼中的原位杂交技术

国家水生生物种质资源库 (NABRC)

王亚青

中科院水生所

国家斑马鱼资源中心 (CZRC)
wangyaqing@ihb.ac.cn



www.zfish.cn

定义及发展历史

国家水生生物种质资源库 (NABRC)
技术应用

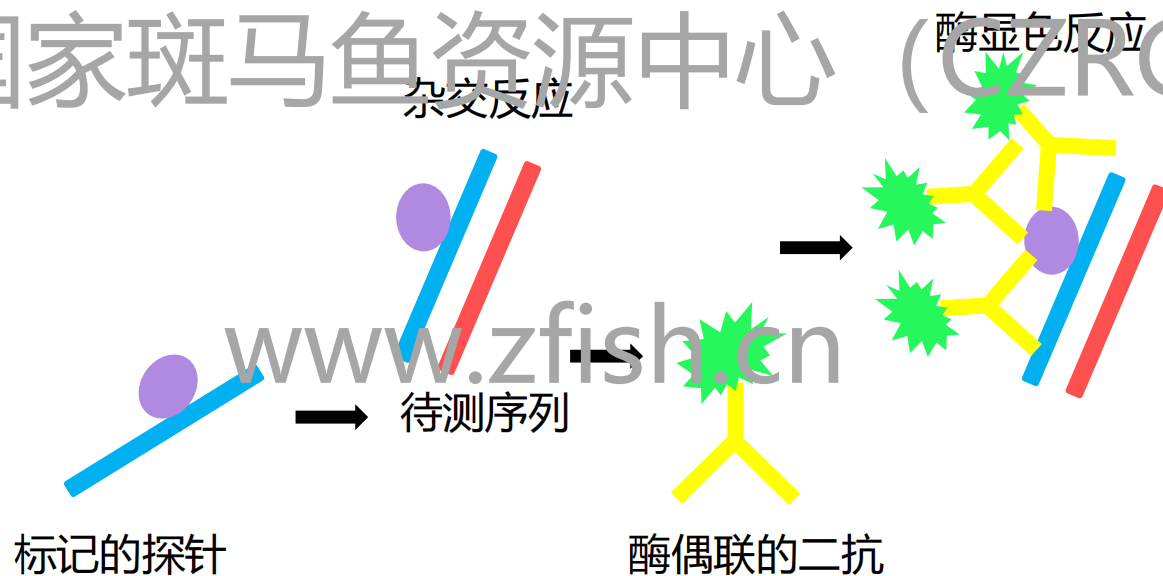
分类 国家斑马鱼资源中心 (CZRC)

基本原理

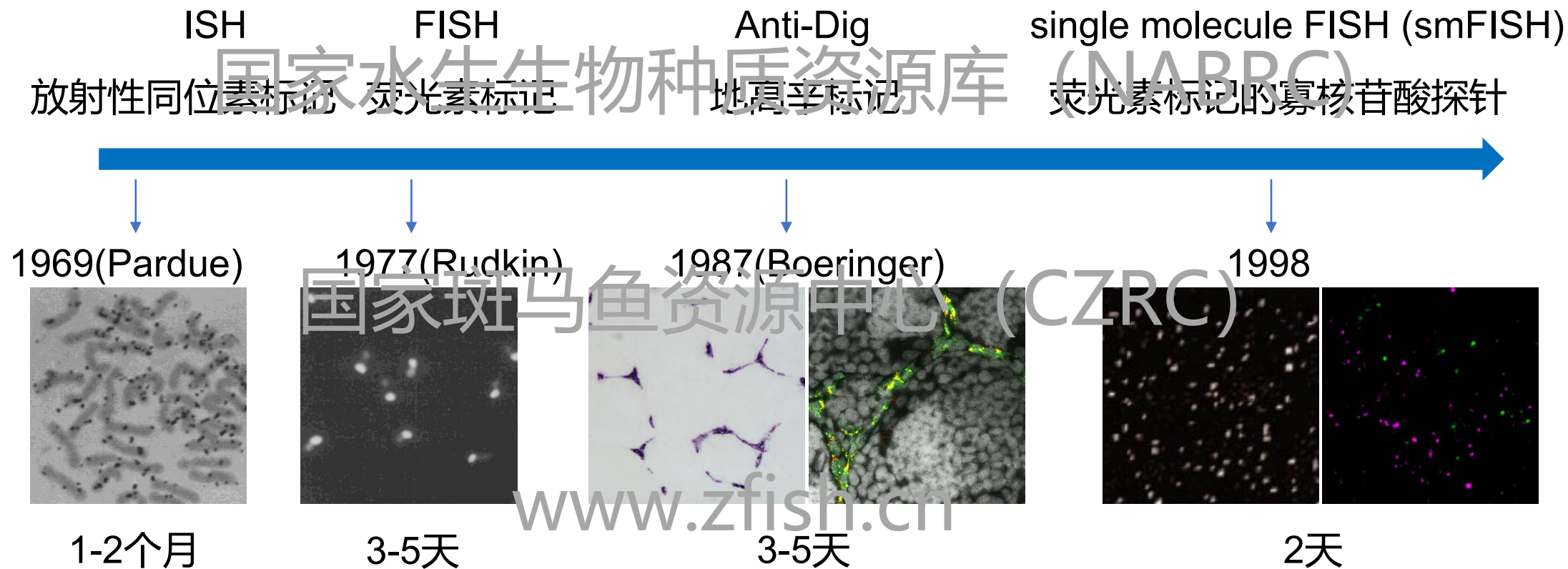
实验流程 www.zfish.cn

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



➤ 定义及发展历史

➤ 国家水生生物种质资源库 (NABRC)
➤ 技术应用

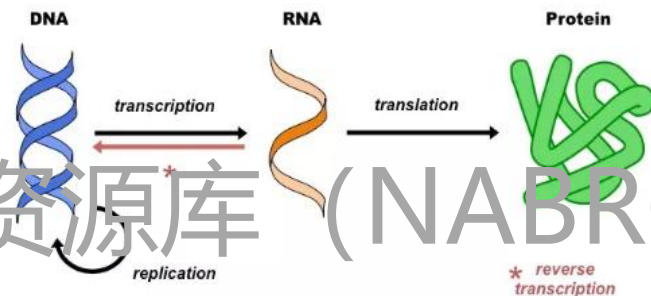
➤ 分类 国家斑马鱼资源中心 (CZRC)

➤ 基本原理

➤ 实验流程 www.zfish.cn

为什么要做RNA原位杂交?

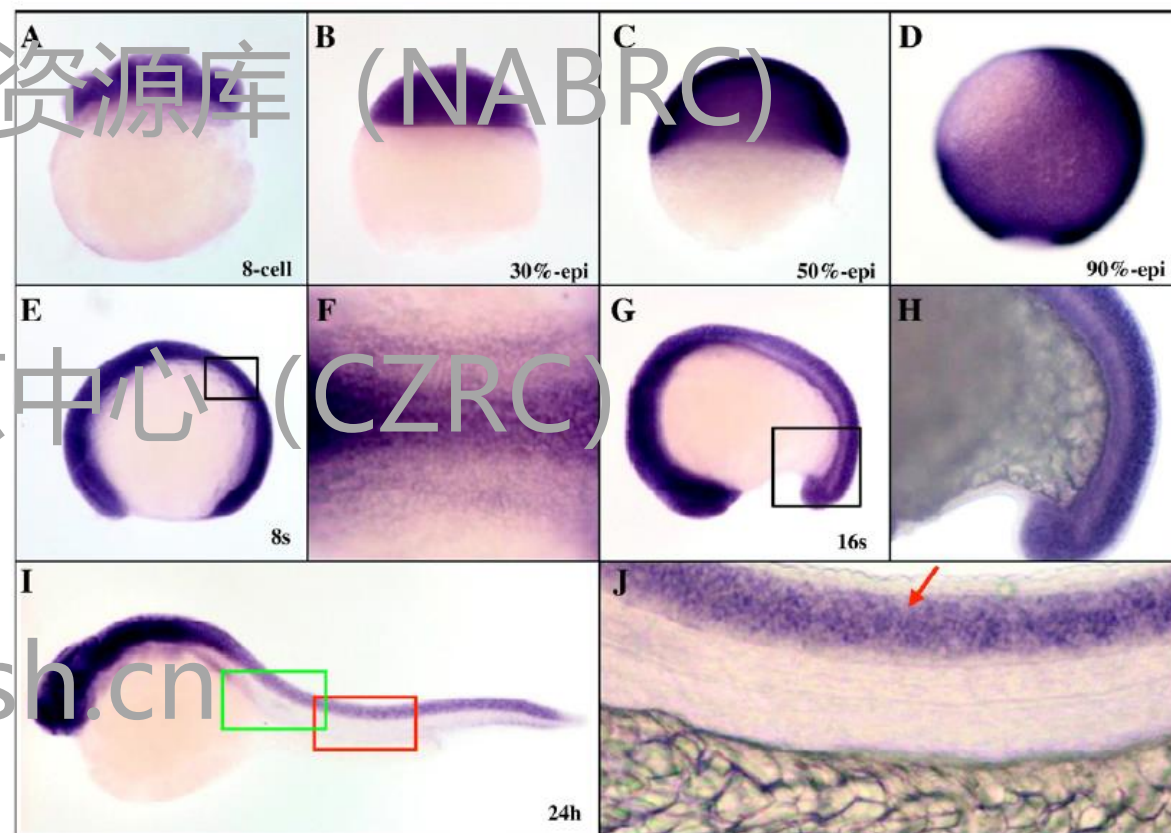
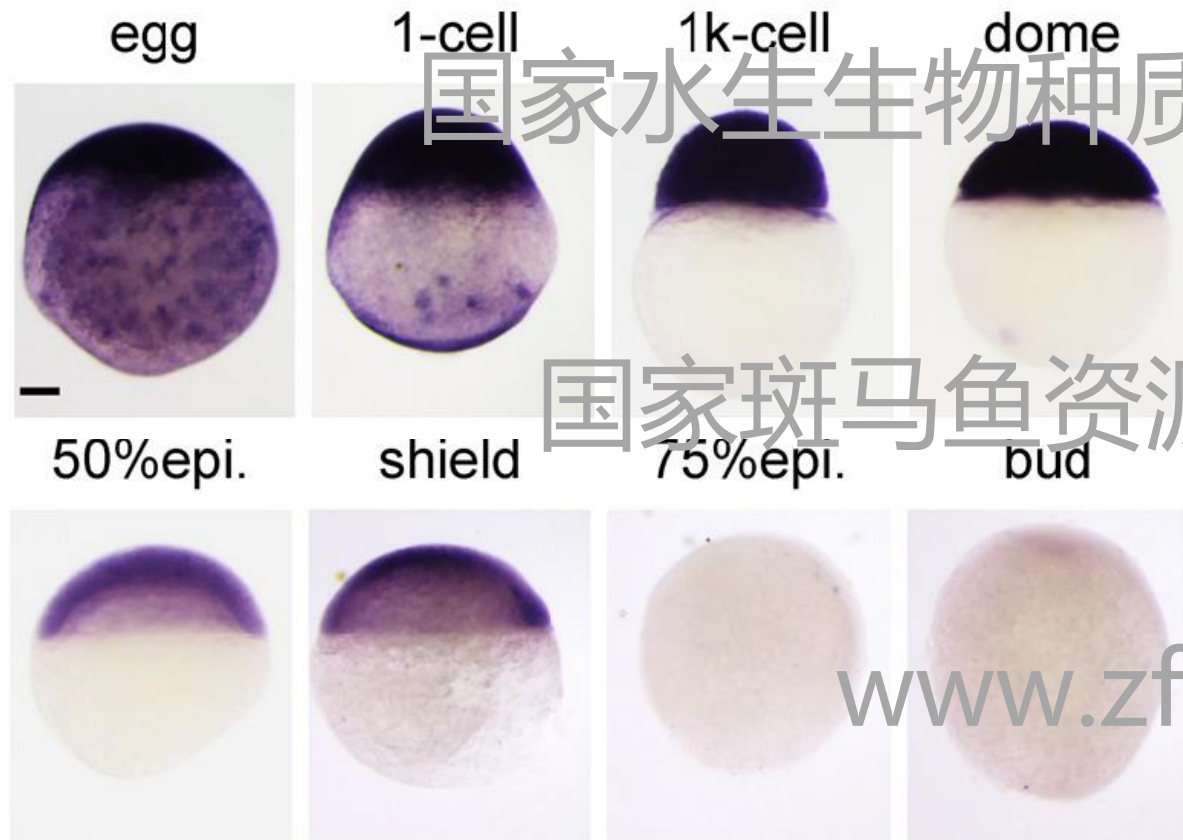
- RNA和蛋白质是相辅相成的;
- 非编码RNA的功能研究;
- 探针合成仅需要1天, 而抗体的制备需要几个月的时间;
- 对于分泌型蛋白, 免疫组化结果有很大的局限性;
- RNA原位杂交的细胞水平定位分辨率高, 可以精确地定量。



应用1：研究基因在发育过程中时空表达

nanog

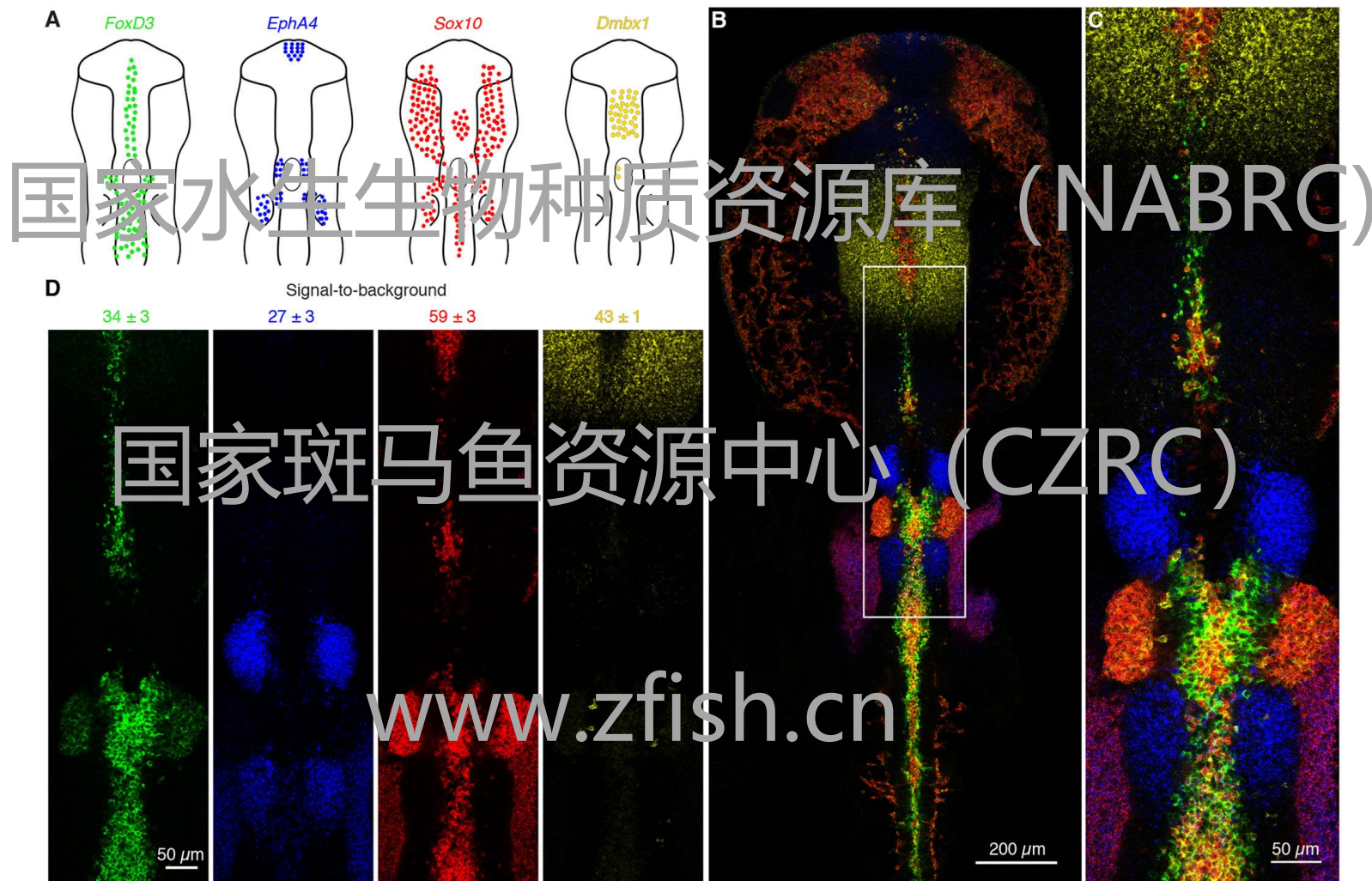
marcksb



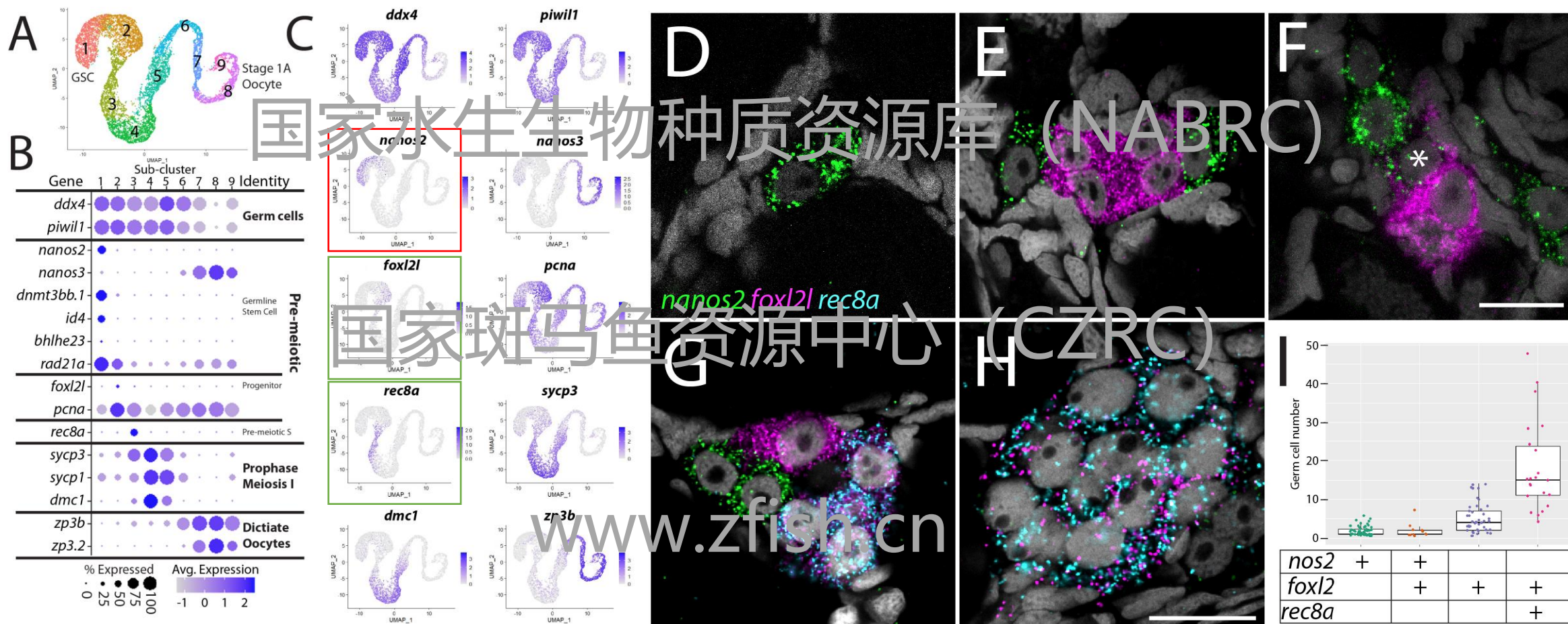
He, et al., *PLOS BIOLOGY*, 2020

Wang, et al., *Gene*, 2013

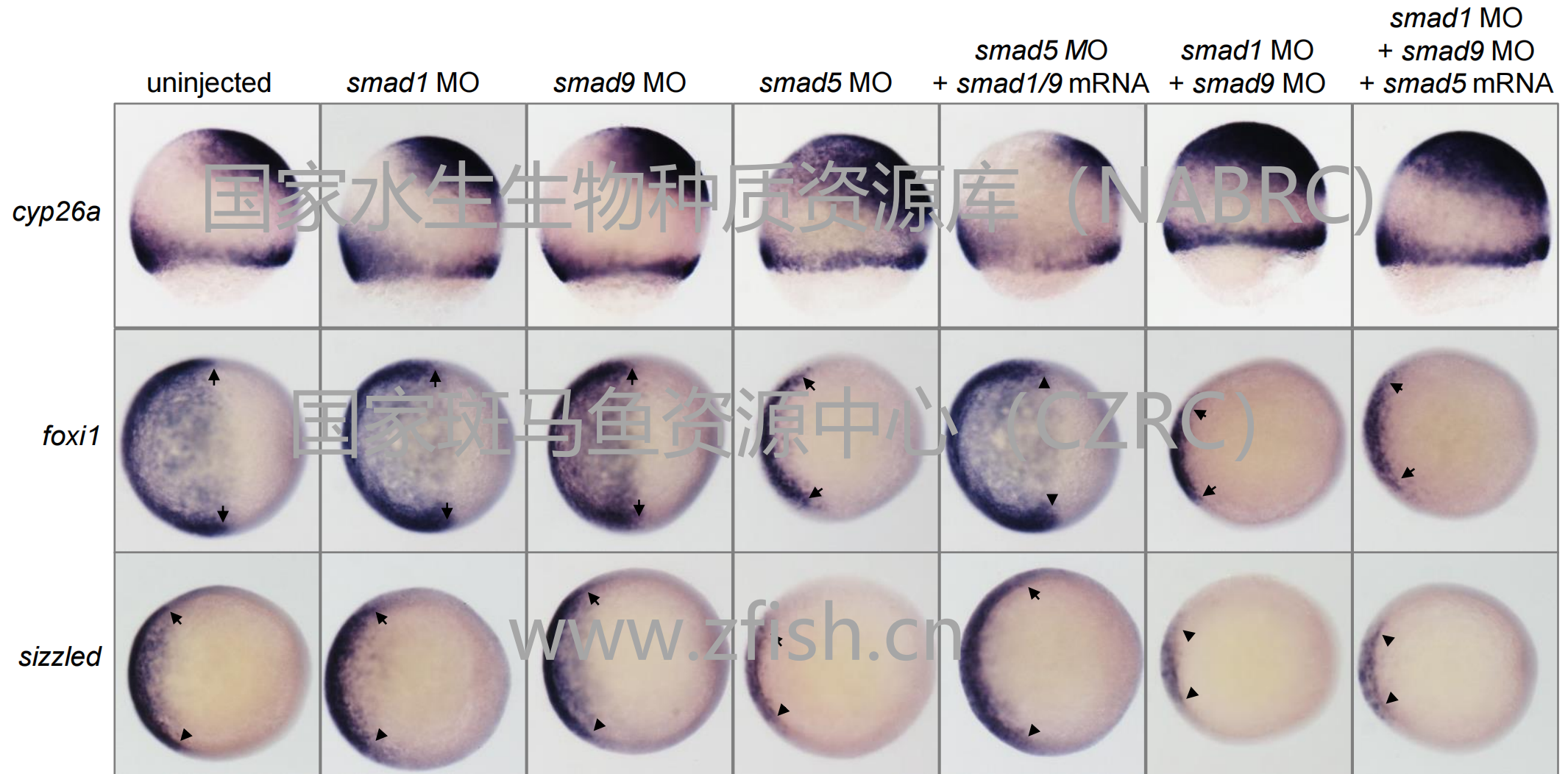
应用2：对比多个基因的相对表达位置



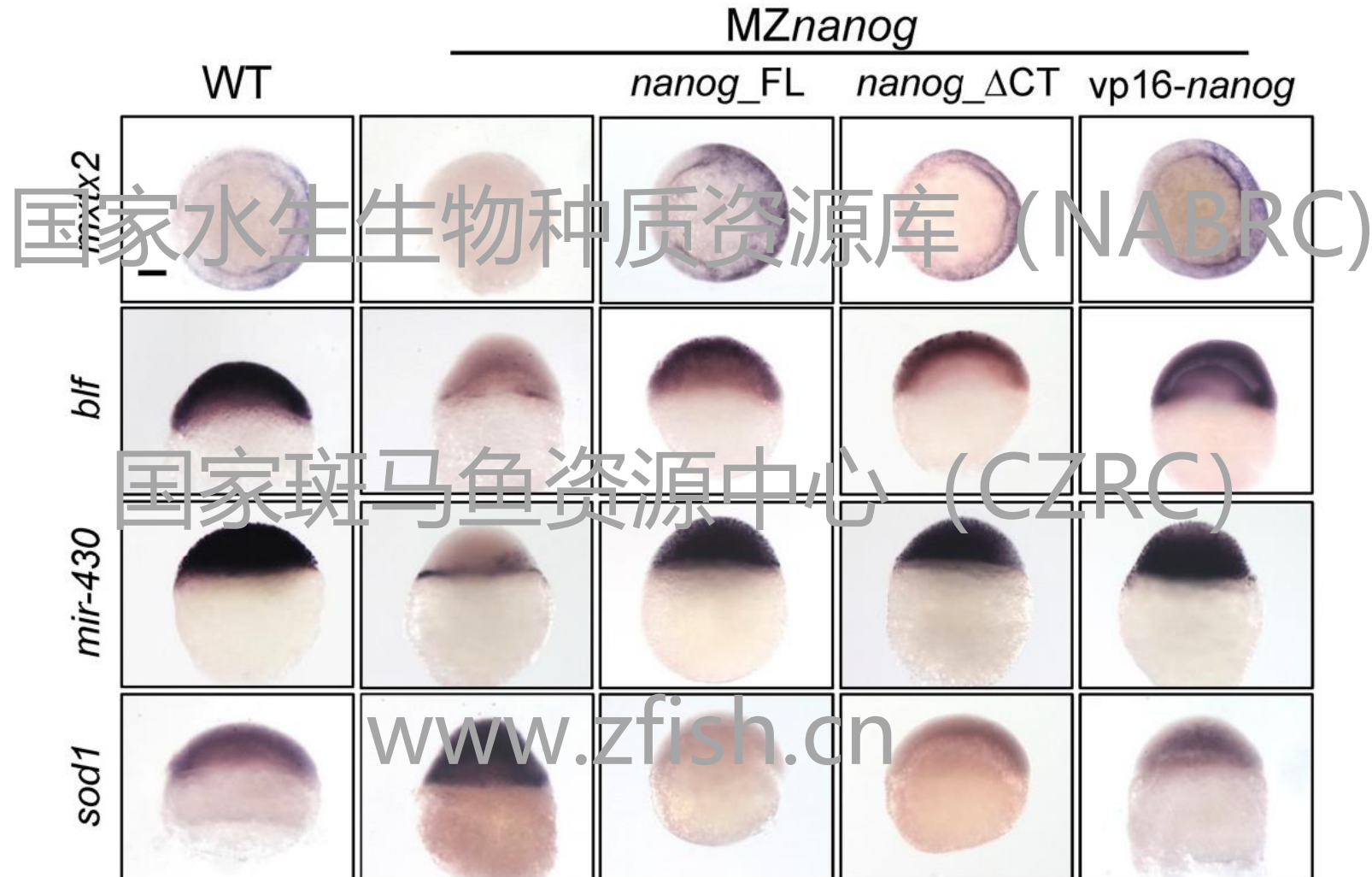
应用3：验证单细胞测序数据中的结果



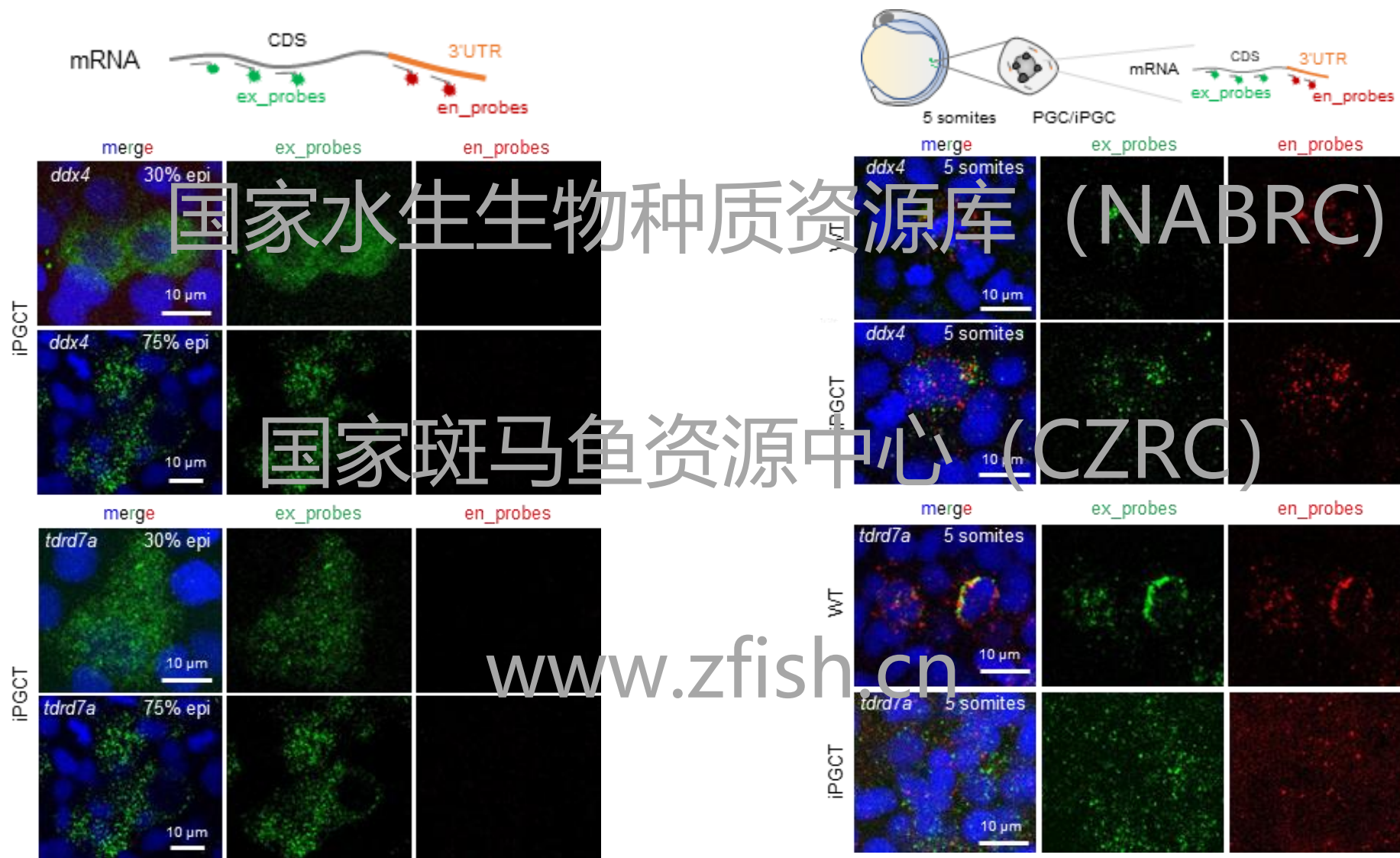
应用4： 基因的表达部位或细胞类型是否变化



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



国家水生生物种质资源库 (NABRC)

国家斑马鱼资源中心 (CZRC)

www.zfish.cn

- 定义及发展历史
- 国家水生生物种质资源库 (NABRC)
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

国家水生生物种质资源库 (NABRC)

冰冻切片



石蜡切片



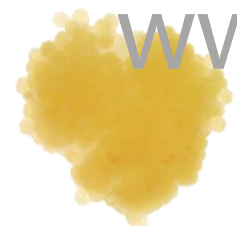
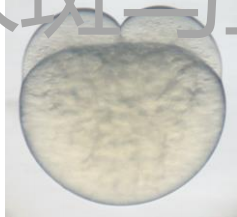
按方法
分类

组织切片

整体

早期胚胎

组织器官



按成像
分类

化学成像

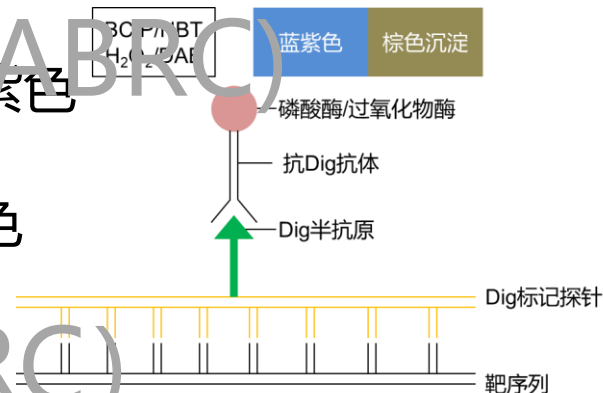
荧光成像

蓝紫色

棕色

单色

多色

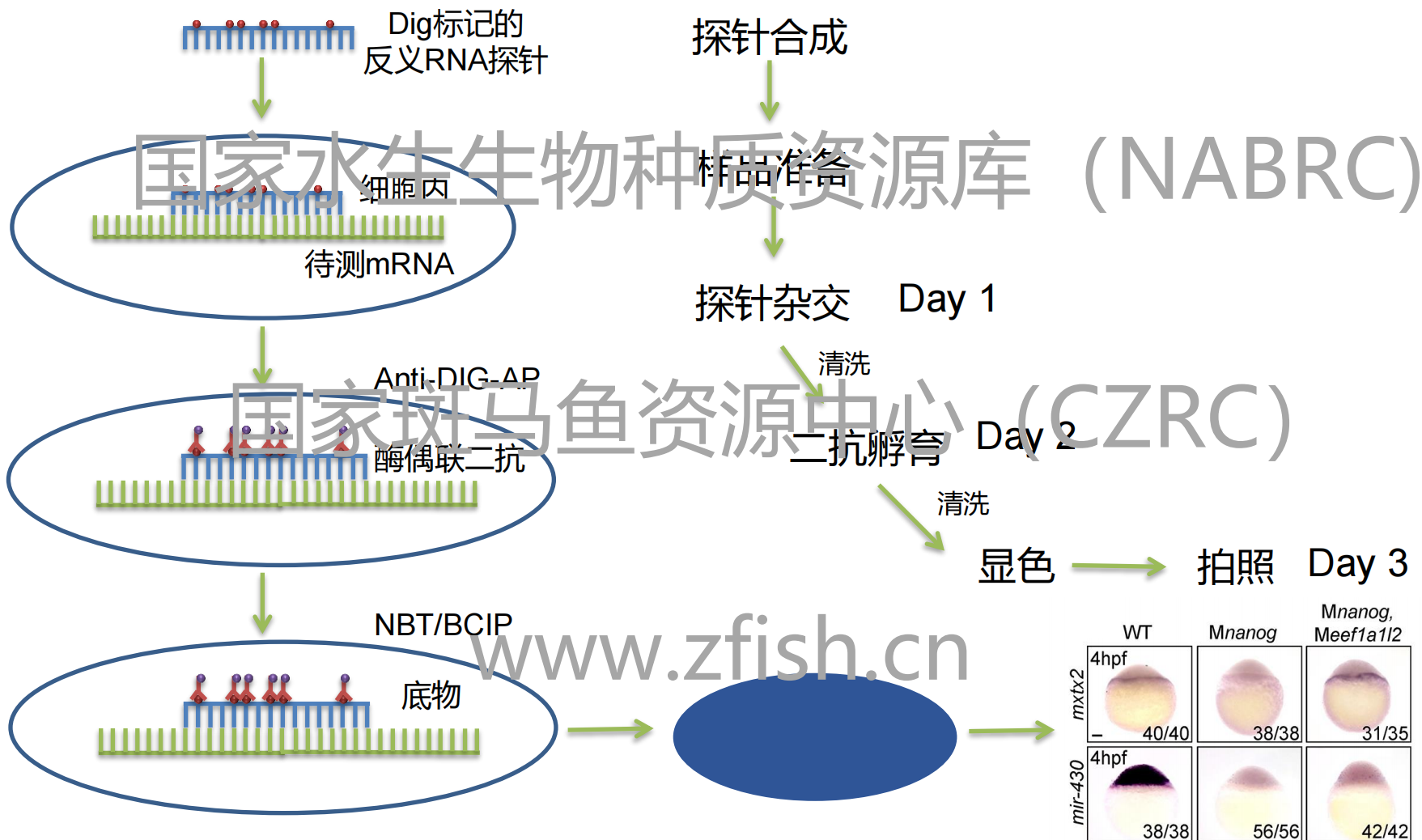


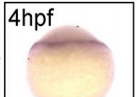





www.zfish.cn

国家斑马鱼资源中心 (CZRC)

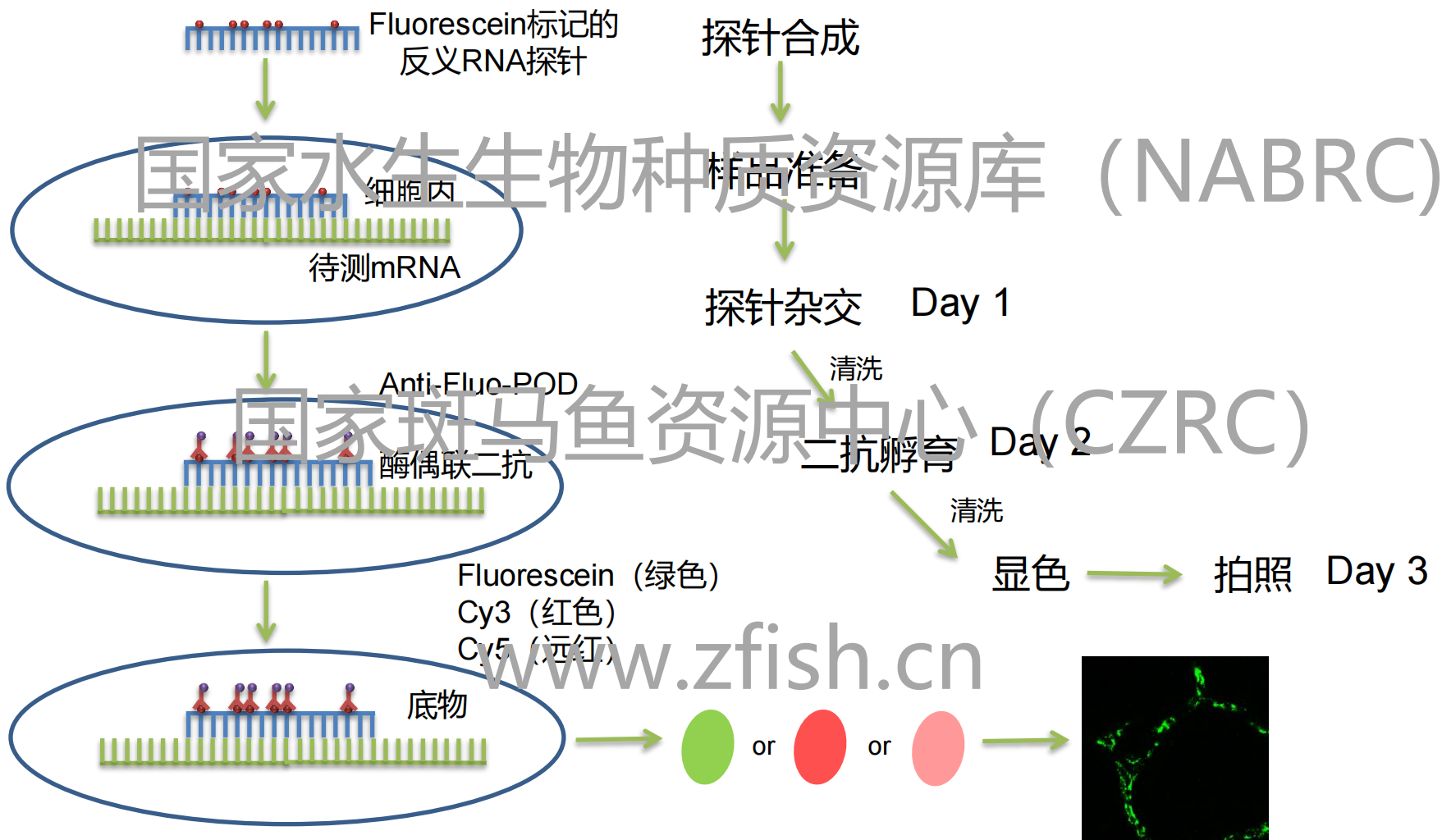
- 定义及发展历史
- 国家水生生物种质资源库 (NABRC)
技术应用
- 分类 国家斑马鱼资源中心 (CZRC)
- 基本原理
- 实验流程 www.zfish.cn

化学显色的基本原理



	WT	Mnanog	Mnanog, Meef1a12
4hpf			
-	40/40	38/38	31/35
4hpf			
mir-430	38/38	56/56	42/42

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)

探针合成

↓
样品准备

↓
探针杂交 Day 1

↓ 清洗

二抗孵育 Day 2

↓ 清洗

显色 → 二抗孵育 Day 3

↓
显色 → 二抗孵育 Day 4

↓
显色 → 拍照 Day 5

国家水生生物种质资源库 (NABRC)

国家斑马鱼资源中心 (CZRC)

www.zfish.cn

多色荧光原位杂交

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

国家斑马鱼资源中心 (CZRC)

www.zfish.cn

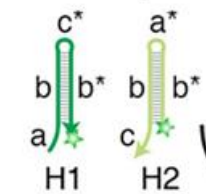
单分子荧光原位杂交的定义

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。

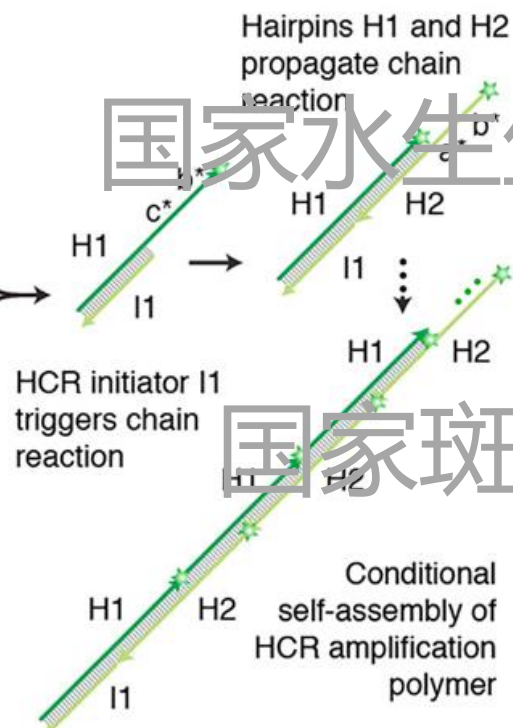
单分子荧光原位杂交的基本原理

A HCR mechanism

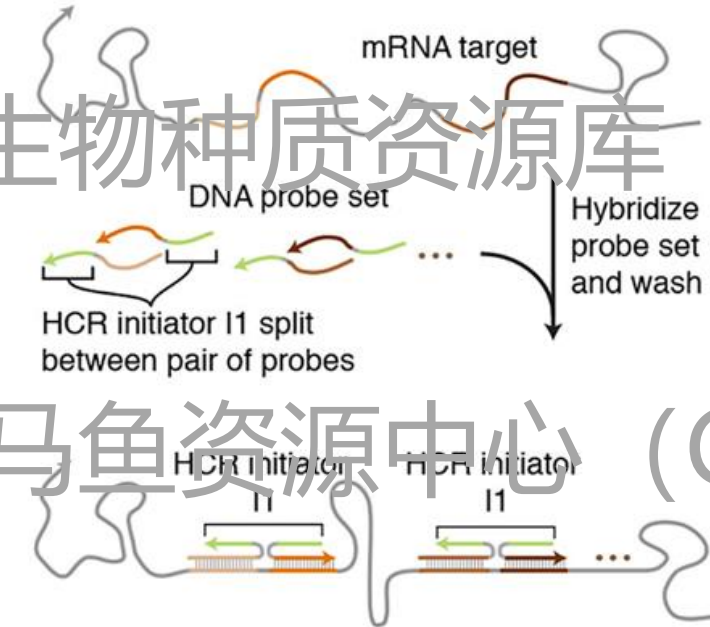
Metastable DNA HCR hairpins



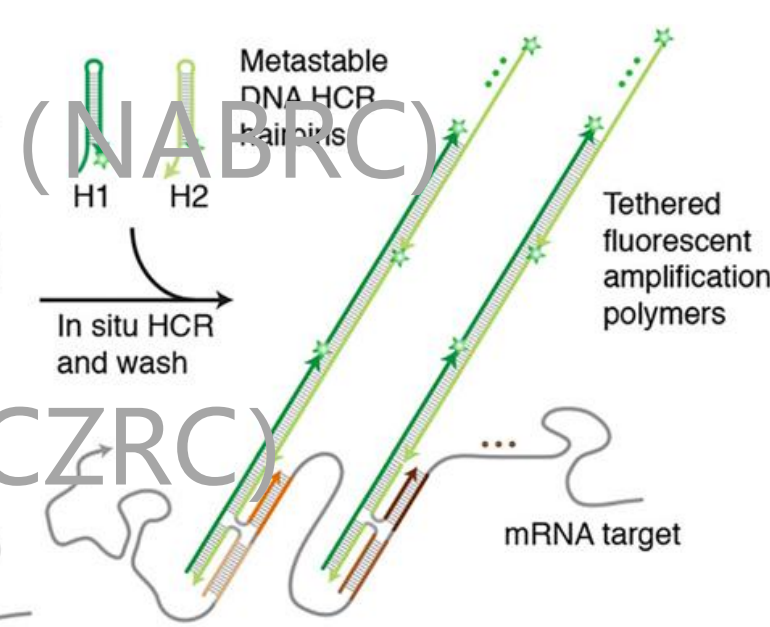
HCR initiator I1 triggers chain reaction



B Detection stage



Amplification stage



www.zfish.cn

国家斑马鱼资源中心 (CZRC)

国家水生生物种质资源库 (NABRC)

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。

www.zfish.cn

- 定义及发展历史
- 技术应用 国家水生生物种质资源库 (NABRC)
- 分类 国家斑马鱼资源中心 (CZRC)
- 基本原理
- 实验流程 www.zfish.cn

实验流程—样品准备

- ▶ 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——探针类型及设计原则

探针的分类：基因组DNA探针，cDNA探针，cRNA探针，寡核苷酸探针

基因组DNA探针：某一基因的全部或部分序列，或非编码序列 (NABRC)

cDNA (complementary DNA) 探针：互补于mRNA的单链DNA分子。

cRNA探针：以cDNA为模板，通过体外转录合成的单链探针。

寡核苷酸探针：根据靶分子而设计序列，以核苷酸为原料通过DNA合成仪合成的。

寡核苷酸探针设计原则：

1. 长度一般为30 ~ 50个bp，过长者杂交时间较长，信号弱，过短者，特异性较差。
2. 碱基中(G + C)含量应在40% ~ 60%，超出此范围则会增加非特异性杂交。
3. 探针分子内不应存在互补区，否则会出现抑制探针杂交的“发夹”状结构。

寡核苷酸探针的更新迭代



Niles Pierce

California Institute of Technology | CIT · Division of Biology and Biological Engineering
Doctor of Philosophy
国家水生生物种质资源库 (NABRC)

nature biotechnology

Explore content ▾ About the journal ▾ Publish with us ▾

nature > nature biotechnology > letters > article

Letter | Published: 31 October 2010

Programmable *in situ* amplification for multiplexed imaging of mRNA expression

[Harry M.T. Choi](#), [Joann Y. Chang](#), [Le A. Trinh](#), [Jennifer E. Padilla](#), [Scott E. Fraser](#) & [Niles A. Pierce](#) 

[Nature Biotechnology](#) **28**, 1208–1212 (2010) | [Cite this article](#)

16k Accesses | 496 Citations | 19 Altmetric | [Metrics](#)

> [ACS Nano](#). 2014 May 27;8(5):4284–94. doi: 10.1021/nn405717p. Epub 2014 Apr 8.

Next-generation *in situ* hybridization chain reaction: higher gain, lower cost, greater durability

[Harry M.T. Choi](#)¹, [Victor A. Beck](#), [Niles A. Pierce](#)

Affiliations + expand

PMID: 24712299 | PMCID: [PMC4046802](#) | DOI: [10.1021/nn405717p](#)

> [Development](#). 2018 Jun 26;145(12):dev165753. doi: 10.1242/dev.165753.

Third-generation *in situ* hybridization chain reaction: multiplexed, quantitative, sensitive, versatile, robust

[Harry M.T. Choi](#)¹, [Maayan Schwarzkopf](#)¹, [Mark E. Fornace](#)², [Aneesh Acharya](#)¹, [Georgios Artavanis](#)¹, [Johannes Stegmaier](#)^{3,4,5}, [Alexandre Cunha](#)^{3,6}, [Niles A. Pierce](#)^{7,8,9}

Affiliations + expand

PMID: 29945988 | PMCID: [PMC6031405](#) | DOI: [10.1242/dev.165753](#)

www.zfish.cn

Choi, et al., *Nat Biotechnol*, 2010
Choi, et al., *ACS Nano*, 2014
Choi, et al., *Development*, 2018

实验流程—探针设计

Standard probe (v2.0)

HCR initiator
I1

Probe

Target

Split-initiator probe pair (v3.0)

HCR initiator
I1

Probe P1

Probe P2

Target

国家水生生物种质资源库 (NABRC)

探针由1st half of Initiator I1a (18nt) +spacer (2nt) +probe (25~39nt) , 以及Probe Sequence (25~39nt)+spacer+2nd half of Initiator I1b 组成, 两条探针相邻, 并且相隔2nt, 探针应与目标序列反向互补。

国家斑马鱼资源中心 (CZRC)

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：

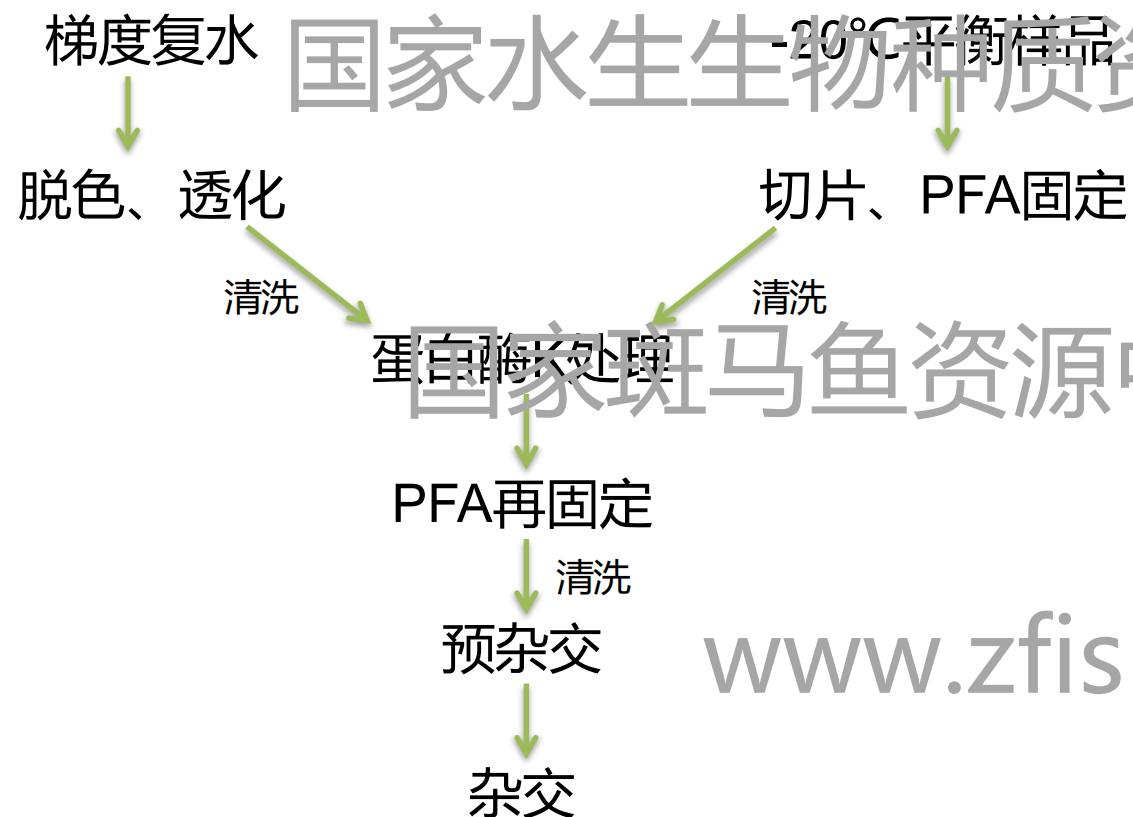
探针：预变性的探针；

柠檬酸钠：增加杂交体的稳定性；

甲酰胺：降低解链温度；

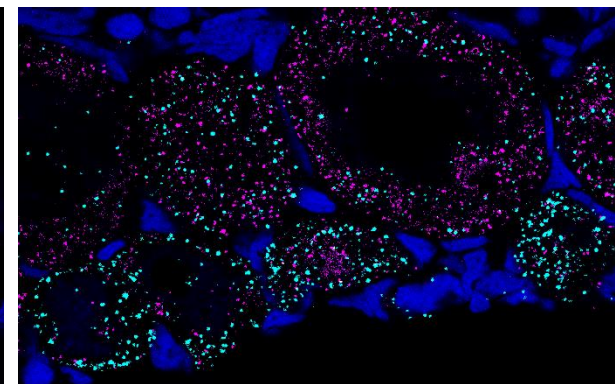
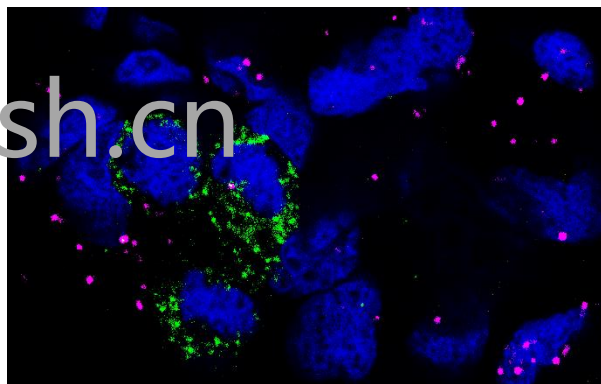
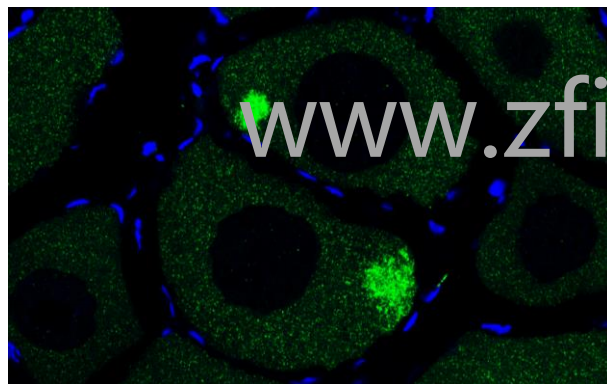
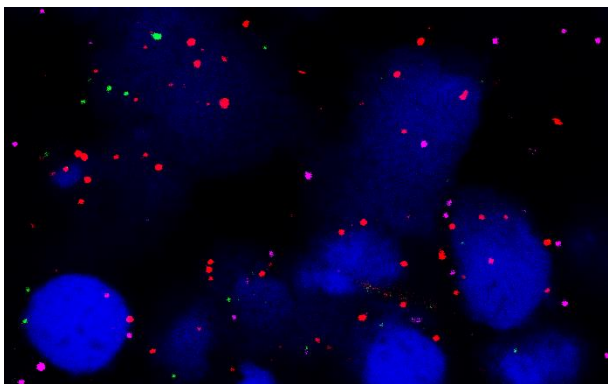
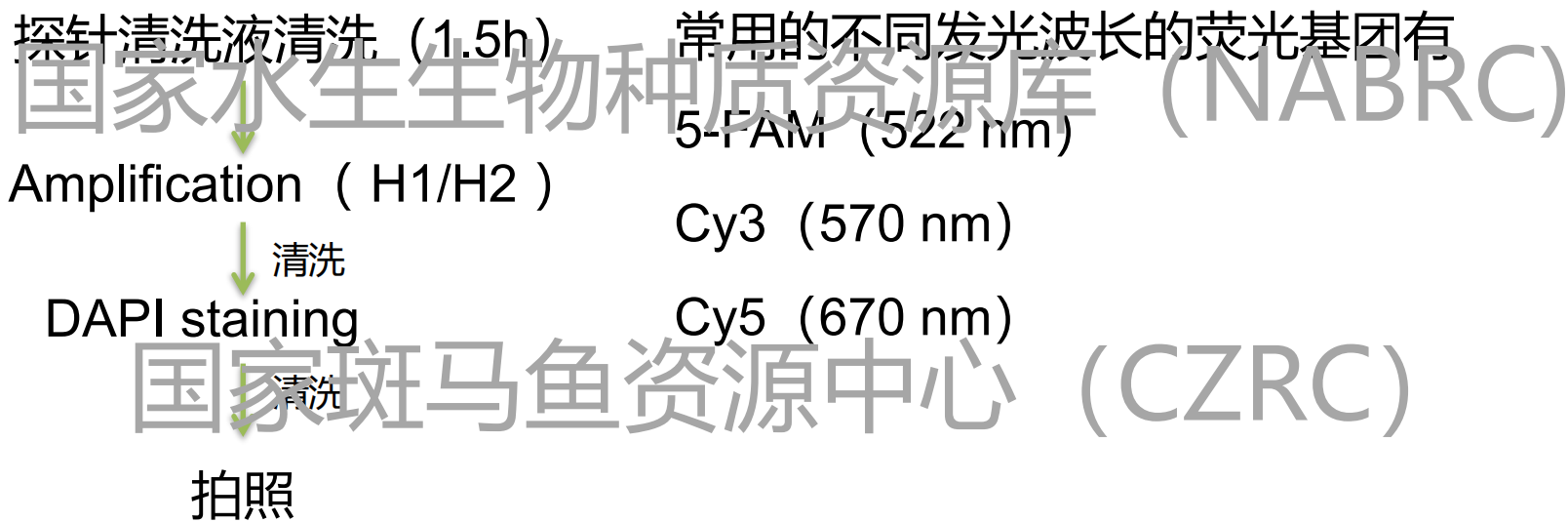
硫酸葡聚糖：提高杂交反应速度；

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。



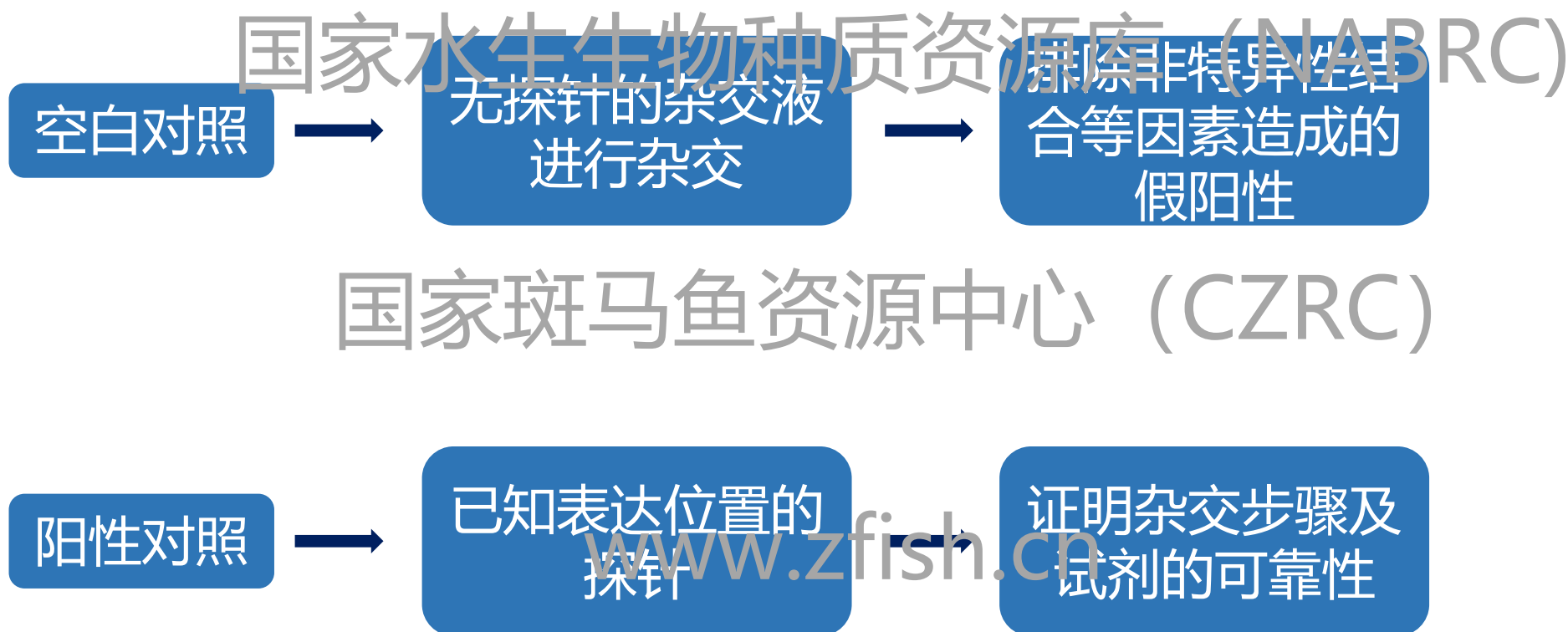
实验流程—显色 (day 2)

技术要点：显色过程要严格避光，防止荧光基团被淬灭



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	严格控制蛋白酶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
染色背景过高	吸取胚胎用力过猛	操作胚胎时,动作一定要轻柔
	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 基因表达时间与胚胎时期不一致	探针合成选择Page纯化的方式, 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

全国斑马鱼技术培训会议

本讲内容完毕

国家水生生物种质资源库 (NABRC)
欢迎交流

国家斑马鱼资源中心 (CZRC)



国家斑马鱼资源中心
CHINA ZEBRAFISH RESOURCE CENTER



中国斑马鱼信息中心