

High-performance multiplexed
fluorescence in situ hybridization
in culture and tissue with matrix
imprinting and clearing

侯建云

主要内容

- ◆背景简介
- ◆研究意义
- ◆研究过程
- ◆取得的成果
- ◆总结

背景简介

荧光原位杂交 (fluorescence in situ hybridization, FISH) 是在20世纪80年代末在放射性原位杂交技术的基础上发展起来的一种非放射性分子细胞遗传技术, 以荧光标记取代同位素标记而形成的一种新的原位杂交方法, 探针首先与某种介导分子结合, 杂交后再通过免疫细胞化学过程连接上荧光染料. FISH的基本原理是将DNA (或RNA) 探针用特殊的核苷酸分子标记, 然后将探针直接杂交到染色体或DNA纤维切片上 (RNA), 再用与荧光素分子偶联的单克隆抗体与探针分子特异性结合来检测DNA (RNA) 序列在染色体或DNA (RNA) 纤维切片上的定性、定位、相对定量分析。FISH具有安全、快速、灵敏度高、探针能长期保存、能同时显示多种颜色等优点, 不但能显示中期分裂相, 还能显示于间期核。

本文中是用于RNA的标记。

研究意义

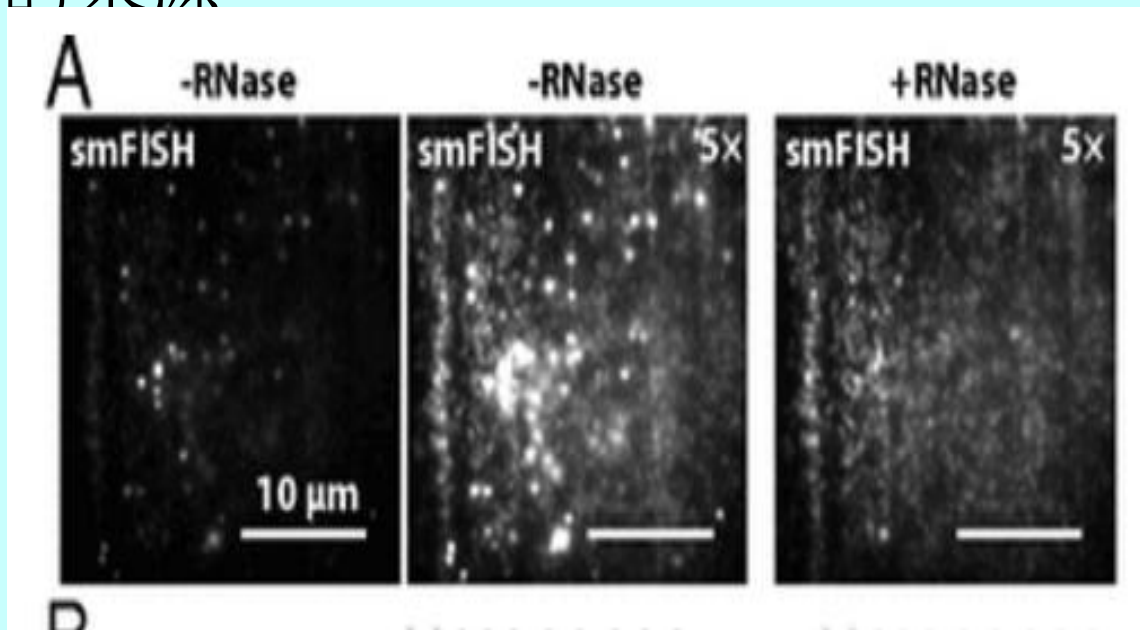
高效多路复用的单分子荧光原位杂交技术已经成为了一种可在空间上解决单细胞转录的方法，因为它有能力直接在它们的原生细胞环境中对大量的RNA进行成像和剖析。然而，由于FISH探针和细胞自身荧光的离靶结合，这种与非RNA结合形成的背景会成为我们检测样品的限制。

所以为消除这种背景来源，使用了矩阵印迹和清除的方法。

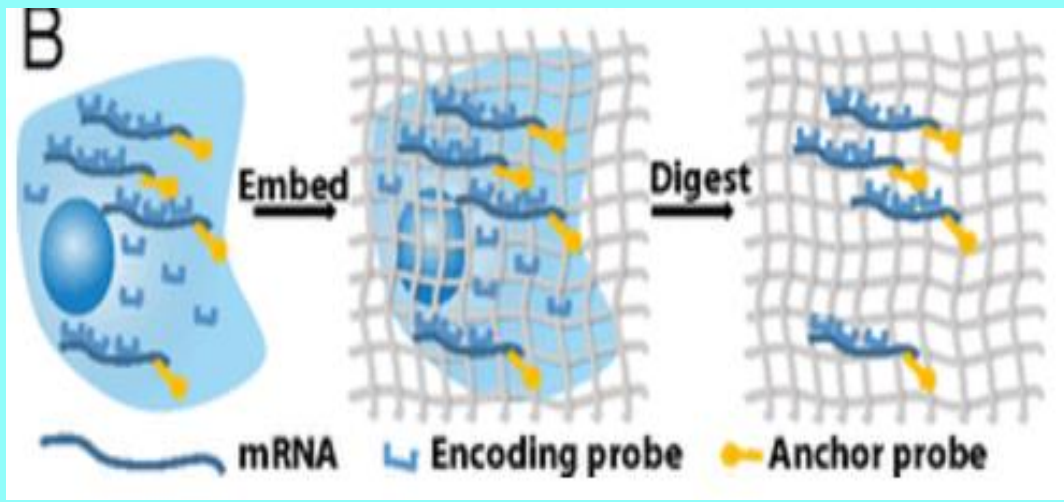
研究过程

1. RNA与经荧光标记的寡核苷酸探针杂交，进行标记。

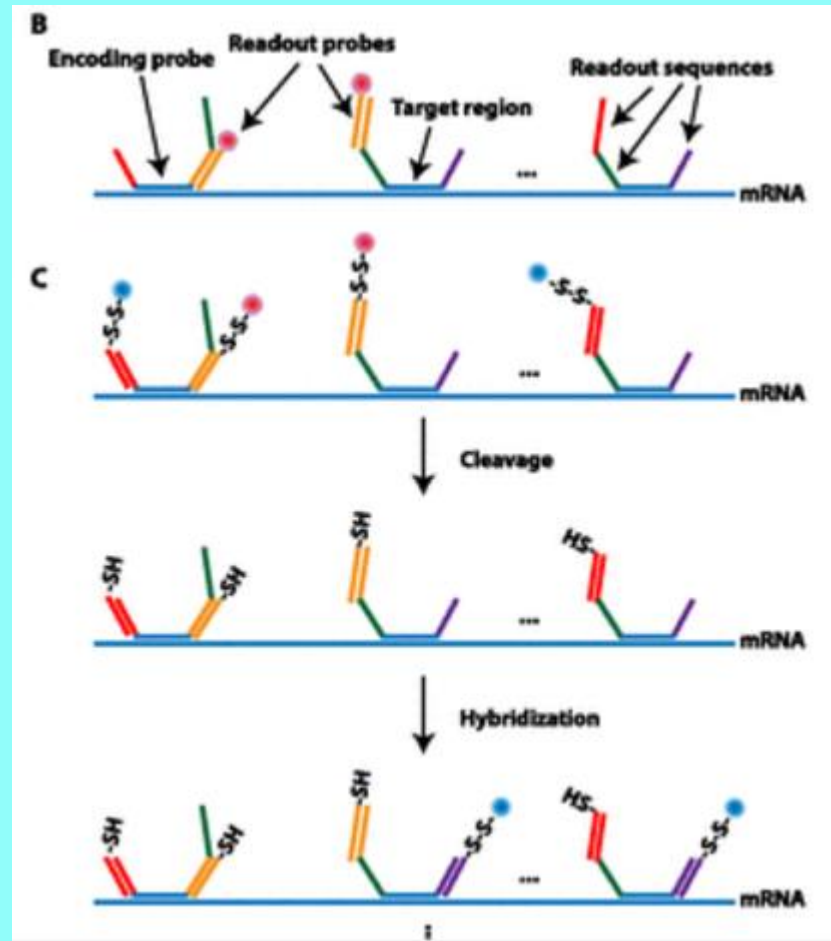
出现的背景荧光对目标检测有影响，确定寡核苷酸探针的脱靶结合的来源



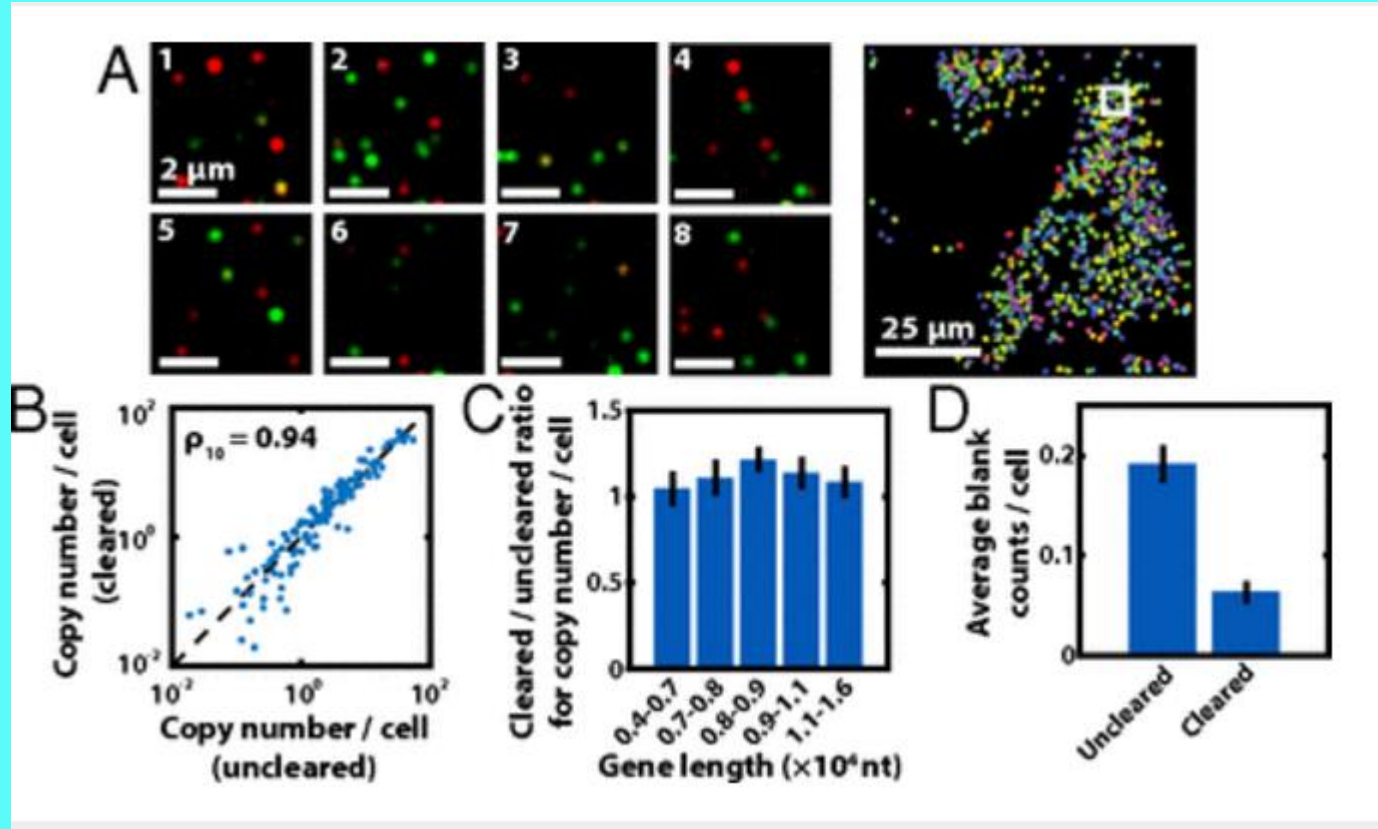
2. 背景荧光的清除-----矩阵印迹和清除方法



3. 测试这种清除方法是否导致了脱靶结合的减少

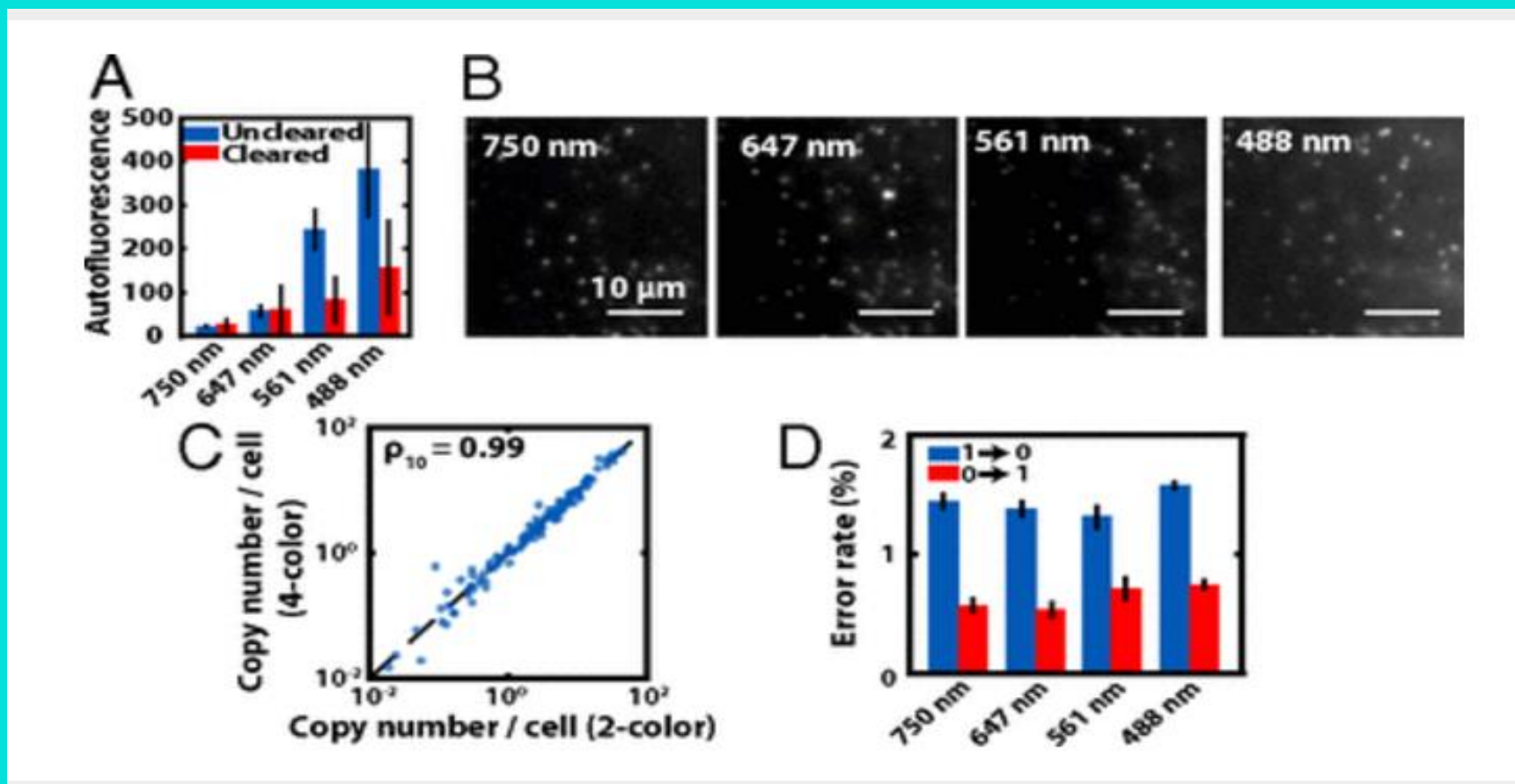


4. RNA在基质印迹和清除过程中被保留



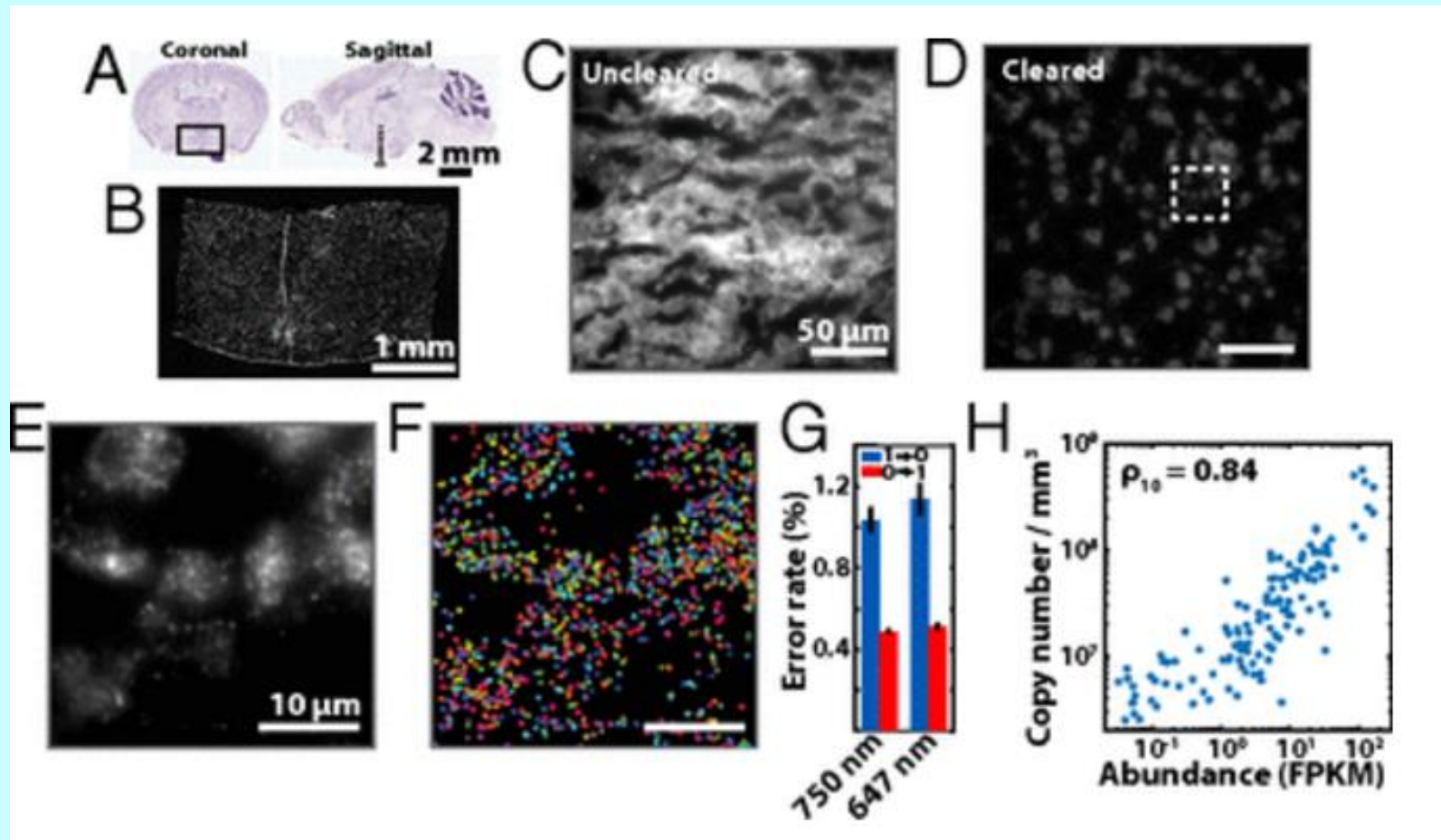
5. 量化非RNA成分的减少

除了由于FISH探针的脱靶结合而使背景显著降低外，从样品中去除蛋白质和脂质也可能降低自体荧光的水平。为了量化这种减少，我们测量了未标记和清除的样品在U-2 OS细胞中的荧光，其具有四种激发波长：750, 647, 561和488nm。



6. 在脑组织中的测量

为了探讨清除是否能够克服我们在组织中观察到的背景增加，我们对从成年小鼠海芋取得的四个冷冻切片进行了130个RNA物种的MERFISH测量



所得成果

(1) 这种方法的许多重要应用和进展受到这些实验中遇到的荧光背景的限制。之后提出了一种清除方法，通过有效地将所需的RNA信号印记到惰性，非荧光的PA基质上，然后去除引起背景的不需要的细胞成分，从而大大减少了RNA FISH测量中的几个背景来源。通过这种方法提供的荧光背景的减少使得在MERFISH测量中的检测效率和检测限度得以改善。(2) 荧光试剂和探针经济、安全；探针稳定，一次标记后可在两年内使用；实验周期短、能迅速得到结果、特异性好、定位准确；FISH可定位长度在1kb的RNA序列，其灵敏度与放射性探针相当；多色FISH通过在同—个核中显示不同的颜色可同时检测多种序列。

(3) 使用这种方法，我们已经在具有两种不同编码方案的单个细胞中成像**140**和**1,000**种**RNA**物种，其中一种允许错误检测和校正，另一种允许错误检测，并且可根据**RNA**种类的数量可以进一步改变使用不同的编码方案。

总结

(1) 结论：高效多路复用的荧光原位杂交可对单个细胞内基因表达的过程进行空间上的解析，可成像各种RNA分子，利用矩阵印迹和清除的方法使得荧光原位杂交过程中检测效率得以提升。

(2) 启发：通过本文章了解到了一种可成像各种RNA分子的荧光原位杂交技术，学习运用矩阵印迹和清除的方法来消除背景荧光，而且对目标样品的荧光标记不会产生不良的影响，这种互补的方法对此技术有重要的作用。

(3) 不足：对于每个RNA，这种方法需要使用数十个探测的编码来进行MERFISH，无法检测到一些小的RNA。

希望可以用相对极少的FISH探针检测RNA分子，同时也要显著提高区分RNA同种型的能力。