



## 单分子荧光原位杂交 (smFISH) 技术及应用\*

芮涵<sup>1)</sup> 孙正龙<sup>1,2)\*\*</sup> 关森<sup>3)\*\*</sup>

(<sup>1)</sup> 昆明理工大学省部共建非人灵长类生物医学国家重点实验室, 昆明 650500; (<sup>2)</sup> 深圳湾实验室生物影像实验室, 深圳 518107;

(<sup>3)</sup> 昆明理工大学生命科学与技术学院, 昆明 650500)

**摘要** 单分子荧光原位杂交 (single-molecule fluorescence *in situ* hybridization, smFISH) 技术是一种通过用偶联荧光基团的寡核苷酸探针, 对固定细胞或组织中单个 mRNA 分子进行成像的方法。smFISH 可对 RNA 进行定位、定量, 以此对目标转录本进行实时研究。smFISH 适用于细胞、组织切片等多种类型生物样本。近年来, 多种基于基础 smFISH 的改进技术被发明, 进一步促进了该技术的实际应用。smFISH 良好的 RNA 单分子可视化能力, 使得其在发育生物学、神经生物学及肿瘤生物学等基础生物学科中得到了广泛的应用。本文综述了 smFISH 技术基本原理、smFISH 技术的局限性、smFISH 衍生技术方法、smFISH 在不同生物学科中的应用进展, 并对 smFISH 技术的发展前景做出展望。

**关键词** 单分子荧光原位杂交, 寡核苷酸探针, RNA, 成像  
**中图分类号** Q522, Q-334, Q-336

DOI: 10.16476/j.pibb.2023.0275

DNA 到蛋白质的转化是一个复杂的多阶段过程。DNA 转录为 RNA 分子后, 还需进行剪接、定位、翻译以及部分降解等加工过程。RNA 加工在将遗传信息传递到功能性 RNA 和蛋白质调节因子的过程中起着核心作用, 这些步骤在空间和时间领域都受到高度协调和严格监管。为了充分了解 RNA 的生命周期, 深入研究 RNA 如何发生变化及其调节机制, 需要开发可视化 RNA 的方法<sup>[1]</sup>。

荧光原位杂交 (fluorescence *in situ* hybridization, FISH) 是一种在细胞或组织中定位核酸序列的首选技术。其原理是, 核酸分子在变性形成双链或在能量有利的条件下形成 DNA: RNA 杂交链时, 根据碱基互补配对原则与所合成的荧光探针进行结合<sup>[2-3]</sup>, 经过固定、透化、孵育后, 探针分子与靶序列紧密结合。杂交完成后进行洗涤去除背景荧光, 再通过光学显微镜对核酸序列进行定位。1977 年 Rudkin 等<sup>[4]</sup> 首次使用带有半抗原标记核苷酸的 RNA 探针对 DNA 进行荧光原位检测, 以标记黑腹果蝇中的线性染色体。无需抗体的直接荧光原位检测后来由 Bauman 等<sup>[5]</sup> 进行, 其使用结合罗丹明的 RNA 探针标记锥虫中的线粒体 DNA。由于探针与靶核酸的紧密结合, 在显微镜下观察到的

信号分子具有一定的显著性与特异性。这种快速、准确且灵敏的技术在许多领域, 例如遗传学、产前诊断以及基因图谱分析中都得到了广泛的应用<sup>[6]</sup>。

1982 年, Singer 和 Ward<sup>[7]</sup> 率先证明了 FISH 可用于 RNA 检测, 其使用罗丹明结合亲和素偶联到生物素化的 dUTP DNA 探针检测肌动蛋白 mRNA, 此后便将 FISH 靶向 RNA 从而可视化原位基因表达的技术称为 RNA-FISH<sup>[7]</sup>。随着计算机和成像技术的进步, 可视化单个 mRNA 分子技术——单分子荧光原位杂交 (single-molecule fluorescence *in situ* hybridization, smFISH) 技术由 Femino 等<sup>[8]</sup> 开发并使用。尽管此方法可对单个 mRNA 转录本进行可视化和半自动定量, 但仍存在一些技术问题, 例如用于将荧光基团偶联到探针的氨基容易丢失等<sup>[9]</sup>。为了解决这些不足, Raj 等<sup>[10]</sup> 在 smFISH 的基础上优化出使用 48 个长 20 bp 的 (或数量更多、

\* 云南省自然科学基金 (202001BC070001, 202102AA100053), 深圳湾实验室开放基金 (SZBL2021080601012) 和深圳湾实验室-仪器通公司光学显微成像技术开发项目资助。

\*\* 通讯联系人。

孙正龙 Tel: 13584804523, E-mail: sunzl@lpbr.cn

关森 Tel: 13584851257, E-mail: mguan2021@hotmail.com

收稿日期: 2023-07-12, 接受日期: 2023-11-15

序列更短的)短寡核苷酸分别偶联荧光基团的独立探针对转录本进行定位的方法。不仅简化了探针合成和纯化步骤,而且能通过计算大量单标记探针产生的较强荧光信号准确计算 mRNA 数量<sup>[10]</sup>,使细胞内 RNA 的精确定位与定量成为可能,推动了 smFISH 技术的实际应用。

近年来,多种基于 smFISH 的优化技术,例如 SeqFISH、MERFISH、ClampFISH 等方案相继被发明,且在生命科学各分支领域中都有了广泛的应用。本文就基础 smFISH 技术基本原理、smFISH 技术的局限性、smFISH 衍生技术方法、smFISH 在不同生物学科中的应用进展,以及 smFISH 技术的发展前景等方面做出综述。

## 1 smFISH 技术基本原理

1998 年 Femino 等<sup>[8]</sup>首次描述了 smFISH 来鉴定单个 RNA 分子的技术。该技术有助于准确定量包含多个 RNA 拷贝的区域,例如转录位点等。smFISH 的基本原理是针对靶 RNA 设计长约 50 个核苷酸并用 5 个荧光团部分标记的探针以进行可视化定位(图 1)。该技术主要涉及以下步骤:首先根据目的基因的 mRNA 序列,设计并合成寡核苷酸探针;其次将荧光染料分子偶联到特异性寡核苷酸探针上的特定位点;再在特定条件下,让靶标 mRNA 与探针结合;最后在荧光显微镜下观察,获取携带探针荧光信号的细胞图像,并使用 MATLAB 编写的定制软件(The Mathworks)进行算法处理<sup>[8]</sup>。通过算法处理后,图像由许多光点组成,最亮的光点被限制在几个连续的体积元素(体素)上,建立图像阈值可去除约 95% 的体素(荧光背景),阈值建立后剩余的最离散、最亮的簇称为对象。随后计算每个对象的总荧光强度(total fluorescence intensity, TFI)。这些明亮的对象具有单个分子预期的 TFI 值,再根据之前测量已知数量探针的 TFI 与荧光染料分子的数量(每个探针 5 个)作出的回归曲线图,确定对象的荧光值分布于杂交的 1~5 个荧光基团的范围内。mRNA 分子通常相距足够远,因此可通过光学显微镜将单个点源进行分离<sup>[8]</sup>。通过此方法,单个 mRNA 分子只需 1 个寡核苷酸探针即可检测,检测过程仅包含 5 个荧光染料,灵敏度比以前增加两个数量级以上<sup>[11]</sup>。相比于其他方案,此方法可将许多生理上重要的受体、信号分子、细胞周期调节因子、转录因子的基因以及它们的核和细胞质转录本纳入到 FISH 检测范

围<sup>[8]</sup>。smFISH 简单且省时,只需一步杂交 24 h 内即可实现单次测量。因此这项技术自诞生以来一直被广泛使用,不仅适用于哺乳动物、酵母和病毒,也可用于植物研究<sup>[12]</sup>。



Fig. 1 Diagram of the smFISH

图1 smFISH原理示意图

圆形代表荧光集团,短横线代表探针。5个特异性探针偶联荧光集团后靶向目标RNA从而实现分子可视化。

自 smFISH 开发后,该技术在天然亚细胞环境中可视化 RNA 的能力,重塑了我们对基因表达和细胞功能的理解<sup>[13]</sup>。特别是允许对单个 RNA 分子进行成像为理解 RNA 调控开辟了新的途径<sup>[14]</sup>。但其应用非常受限,主要因为不能确定探针是与靶 mRNA 特异结合或是非特异性结合,因此很难将所有荧光点明确地识别为 mRNA 分子<sup>[15]</sup>。鉴于此,Raj 等<sup>[10]</sup>于 2008 年改良了基础 smFISH 技术方案,实现了在固定细胞中用 48 个单标记寡核苷酸探针检测单个 mRNA 分子。在该方案中,Raj 等首先利用 96 位高通量 DNA 合成器,合成大量探针,每个探针大约长 20 bp 并在其 3' 端用单个荧光团进行荧光标记(通常每个探针标记一个荧光团)用于检测单个 mRNA 分子。其次,研究者构建了一个可编码生成绿色荧光蛋白(GFP) mRNA 的多西环素基因,此 GFP mRNA 3' 非翻译区(3'-UTR)中具有 32 个串联重复的序列。使用 Alexa Fluor 594 荧光团与 48 个寡核苷酸探针偶联后,靶向 GFP mRNA 编码区。同时使用 4 个携带四甲基罗丹明(TMR)的探针,靶向 GFP mRNA 3'-UTR 重复序列。杂交后用荧光显微镜对细胞进行成像,使用图像处理程序对颗粒进行识别。该程序将颗粒分为使用 GFP 编码序列探针,UTR 特异性探针和两者都包含的探针。结果发现 85% 的 UTR 粒子与 GFP 粒子共定位,81% 的 GFP 粒子与 UTR 粒子共定位。Raj 等的实验证明了使用单标记探针检测内源性转录本的有效性,通过使用多个单标记探针能够产生均匀信号,这些信号可通过程序识别以得出准确的 mRNA 计数。相比之下,使用多个标记探针的方法可区分出由于单个探针错误结合或非结合事件而出现的假阳性或假阴性结果<sup>[10]</sup>。

## 2 smFISH技术的局限性

Raj 等的改良方法, 极大地促进了 smFISH 的实际应用, 应用 smFISH 发表的研究论文数量也随之呈井喷式增长。在经过对样本固定、透化、预杂

交、杂交、洗涤、拍摄、分析等步骤即可对 RNA 进行识别并定量 (图 2)。但随技术的不断应用, 该方案被发现仍存在较多的技术缺陷, 难以适应复杂样本中高光学分辨率条件下的 RNA 精确定位与定量分析。

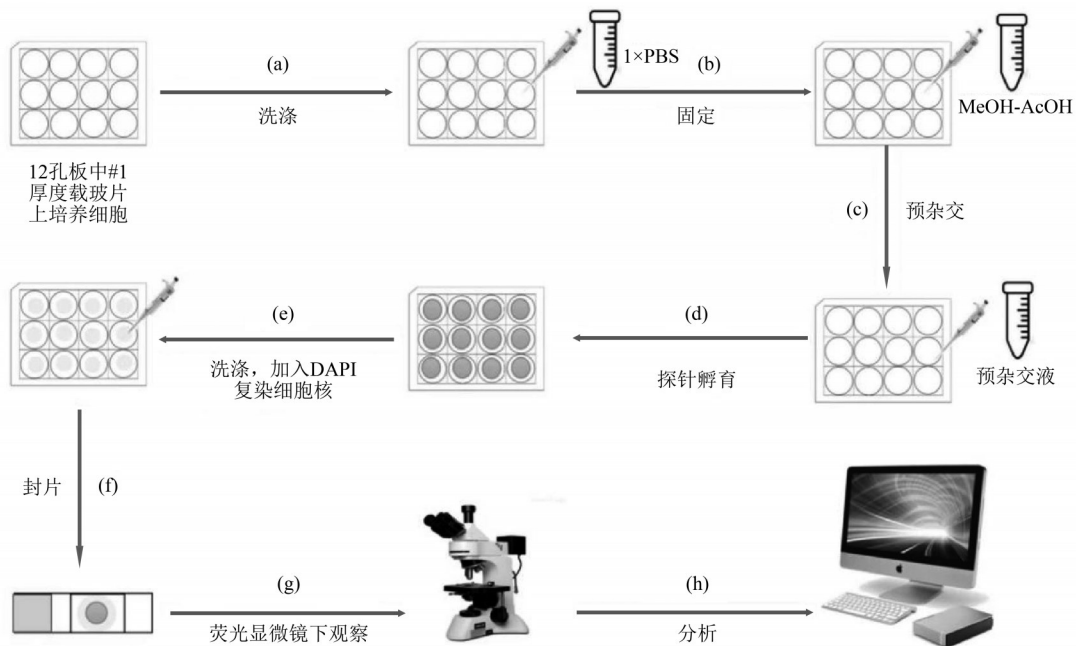


Fig. 2 Experimental steps of the smFISH

图2 smFISH的实验流程

(a) 在12孔细胞培养板中18 mm圆形#1厚度盖玻片上培养细胞, 用1 ml 1×PBS洗涤液进行洗涤; (b) 加入1 ml的甲醇-醋酸 (MeOH-AcOH) 固定液以固定和透化细胞; (c) 加入1 ml预杂交液后室温孵育2~5 min; (d) 盖玻片倾斜, 细胞面朝下, 转移到100 µl含有探针的杂交缓冲液滴上37°C下避光孵育2 h; (e) PBS洗涤后DAPI复染细胞核; (f) 显微镜载玻片上加入一小滴防荧光猝灭封片剂, 并将盖玻片盖到载玻片上, 细胞面朝下; (g) 荧光显微镜观察; (h) 图像软件进行分析。

### 2.1 探针特异性低

smFISH所用的寡核苷酸探针是一种用短单链合成的DNA探针混合物。每个单独的探针分子都可单独在其5'端或3'端用荧光团标记。探针特异性低易产生非特异性结合, 导致在显微镜下观察不到目标序列或背景杂乱等。为了确保使用smFISH获得可靠的结果, 使用对其RNA靶标具有高度特异性的荧光探针是至关重要的。在设计探针时必须仔细考虑结合特异性、探针长度、间距、GC含量, 形成二级结构的倾向和质量等<sup>[16]</sup>。探针设计时, 需保证40%~50%的GC含量, 以确保探针的稳定性和后续杂交温度的设定; 探针长度应在20~25 bp左右, 小型探针能够更有效地穿透组织并保证一定的特异结合效率; 探针没有重复序列, 减少多碱基重复导致的错配; 基因组中非靶基因的序列同一性

<50%, 避免探针的非特异性结合。此外最佳杂交温度取决于探针的长度和组成。尽管应单独针对每个探针进行实验以优化杂交温度, 但短寡核苷酸探针 (20~50个核苷酸) 通常需要37°C的较低杂交温度, 在后续实验中可直接进行杂交<sup>[17]</sup>。

### 2.2 荧光强度较弱

探针可携带不同的荧光染料, 例如Cy3、Cy5、Alexa fluor或Quasar等, 以便在荧光显微镜下对靶RNA进行定位定量, 但在拍摄过程中易发生荧光太弱或不发光等现象, 因此选择合适的荧光染料是smFISH实验中需要考虑的重要因素。此外激发光的长时间照射是荧光猝灭的最常见原因, 在拍摄时应注意不要长时间预览或提前加入抗猝灭剂防止荧光猝灭, 以保证拍摄效果。

### 2.3 杂交效率低

杂交是为了将探针与靶 RNA 高效、完全地结合,但在实际操作过程中经常出现结合效率低或未结合等情况,因此在最后的拍摄中会出现不能准确定位到单个靶 RNA 分子以致没有代表性的模式分布等情况。针对以上情况可从组织制备和透化组织两部分进行优化。在组织制备时样本不能过厚,固定时根据样本种类选择合适的固定剂(通常为4%多聚甲醛)、固定时间、固定温度(对于核酸可视化,已证明4°C条件下可以在整个固定过程中保存RNA<sup>[18]</sup>)等。此外,透化是确保探针能够顺利穿透的先决条件,其可使杂交试剂更好渗透。渗透时可用蛋白酶K等非特异性蛋白酶处理样本,利于将靶核酸分子从结合的蛋白质(例如RNA结合蛋白)中释放,使它们更容易进行杂交<sup>[17]</sup>。

### 2.4 背景荧光过高

任何成像方法的灵敏度都受到背景信号的限制,单个分子水平的最高灵敏度只能在无背景环境中有效<sup>[19]</sup>。smFISH背景荧光大体可归为两类:仪器设置和成像参数导致的背景荧光,以及探针未与靶标相结合造成的多余荧光染料所产生的背景荧光。因此,在smFISH实验过程中,针对仪器可在调试时确定最佳激光发射波长,设置好曝光时间及增益强度等。对于非特异性结合则可在杂交组织液中加入葡聚糖硫酸盐(通过吸收水分子以减少反应中的游离水迫使探针和靶标更靠近<sup>[20]</sup>)或来自大肠杆菌或酵母的剪切鲑鱼精子DNA或tRNA(使探针的非特异性结合位点饱和)以降低背景荧光。此外杂交后洗涤也可分离非特异性杂交体并从组织中去除此类未结合的探针分子,以最大程度减少背景信号。

## 3 smFISH衍生技术

自smFISH发展以来,多学科领域都用此技术解决了细胞内单分子可视化的问题,也能够准确定量RNA的表达水平。然而,随着研究的深入,实验所需的高分辨率成像及信号放大等一系列要求并不能满足,因此一系列衍生技术被相继发明。这些衍生技术在信噪比、特异性等不同方面对smFISH进行了优化,进一步推进了smFISH的广泛应用。

### 3.1 杂交链反应(hybridization chain reaction, HCR) FISH

HCR是由Dirks和Pierce<sup>[21]</sup>于2004年提出的一种简单有效的等温扩增过程。在典型的HCR中,单链DNA引发剂触发形成双螺旋聚合物的两个发

夹之间的交替杂交,导致其形成具有数十到数百个重复单元的刻痕双螺旋直到发夹耗尽。由于其等温、无酶和高放大效率的特点,HCR常被用作各种生物传感和生物医学领域的信号放大技术<sup>[22]</sup>。2010年,Choi等<sup>[23]</sup>开发了一种基于正交扩增与HCR的多重荧光原位杂交方法(图3)。通过这种方法,与mRNA靶标互补的RNA探针触发链式反应,其中荧光团标记的RNA发夹自组装成荧光扩增聚合物。这些扩增级联的可编程性和序列特异性使多个HCR放大器能够在同一样品中同时正交工作。HCR放大器具有深度样品穿透、高信噪比和清晰的信号定位,可实现稳健的单分子定位定量,显著改善了此前信号弱的问题。

### 3.2 SeqFISH (sequential fluorescence *in situ* hybridization, SeqFISH)

2014年,Lubeck等<sup>[24]</sup>发明出SeqFISH技术。通过对细胞中的mRNA连续杂交、成像和探头剥离以进行条形码编码(图4)。作为固定细胞中的转录本,mRNA相应的荧光点可保留在多轮原位杂交过程中,条形码序列也可唯一标识靶序列从而实现信号放大,减少非特异性结合。在每一轮杂交过程中,通过一组FISH探针靶向每个转录本且用单一类型的荧光团标记的探针,接着对样本进行成像,最后使用脱氧核糖核酸酶I(DNase I)处理以去除FISH探针。在随后的一轮中,mRNA被相同的FISH探针杂交,但此轮用不同的染料标记。如此一来,条形码的数量可用比例为 $F^N$ ,其中 $F$ 是荧光团的数量, $N$ 是杂交轮数。例如用4种染料,8轮杂交即可覆盖整个转录组( $4^8=65\ 536$ )<sup>[24]</sup>。随后Eng等<sup>[25]</sup>在此基础上优化出SeqFISH+技术,SeqFISH+一共进行4轮成像编码,而对于每一轮成像编码增加到20。不仅如此,荧光成像通道也由单激光增加到了3个(640 nm、561 nm、488 nm)。凭借SeqFISH+的基因组覆盖率和空间分辨率,现可直接在原位水平进行研究。此外,SeqFISH+的基因组学覆盖率也将允许发现疾病样本中细胞类型特异性的新靶点,并实现精确的空间基因组学和基于单细胞的诊断测试。

### 3.3 多重误差稳定 FISH (multiplexed error-robust fluorescence *in situ* hybridization, MERFISH)

SeqFISH虽能有效提高信号,增加可一次性检测mRNA数量,但其探针的数量需随着杂交轮数的增加而增加,这使得SeqFISH既昂贵又耗时。因

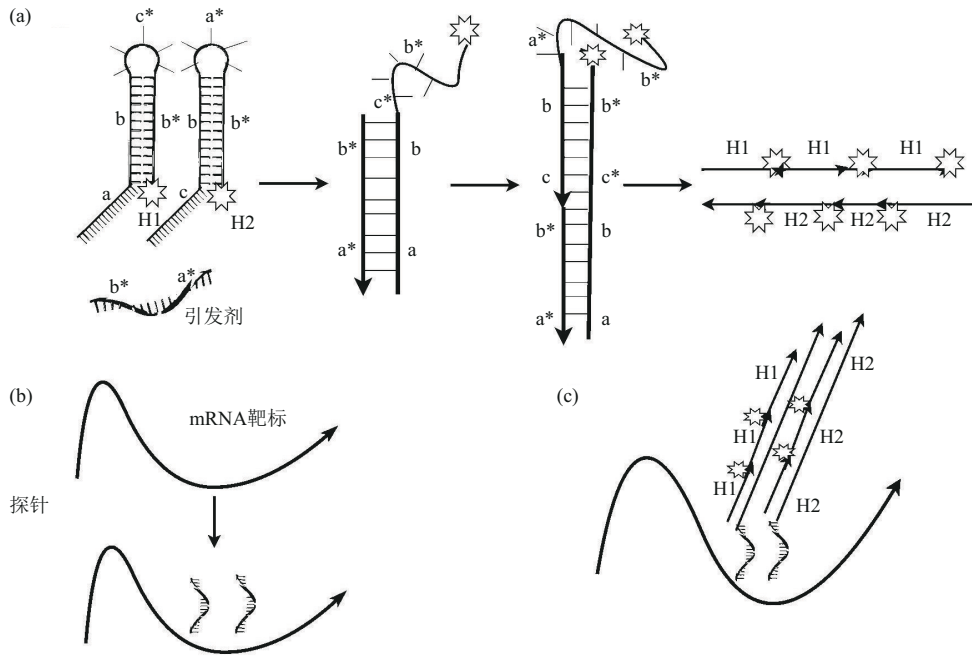


Fig. 3 Diagram of the HCR-FISH

图3 HCR-FISH示意图

(a) RNA发夹在检测到特定RNA引发剂时自组装成荧光扩增聚合物。引发剂 (initiator) 通过碱基配对与发夹H1结合, 介导分支迁移打开发夹形成包含单链段“c\*-b\*”的复合物。这种复合物通过碱基配对与发夹H2结合, 介导分支迁移, 打开发夹形成包含单链片段“b\*-a\*”的复合物。如此反复, 引发剂序列被再生, 为交替的H1和H2聚合步骤的链式反应提供了基础。(b) 检测阶段。将探针组与mRNA靶标杂交, 然后从未使用的探针中洗涤样品。(c) 放大阶段。引发剂触发系留荧光扩增聚合物的自组装, 然后从样品中洗去未使用的发夹。本图由Figdraw绘制。

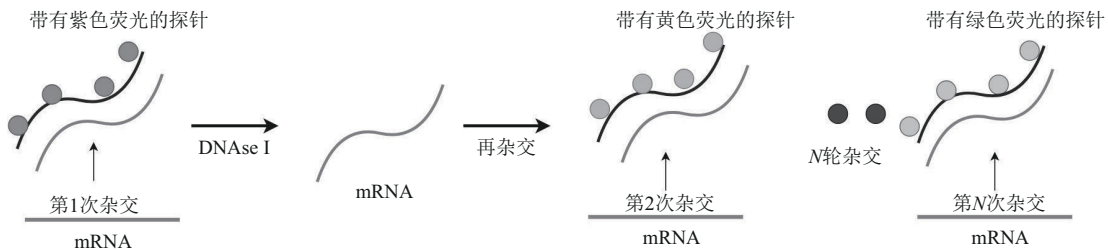


Fig. 4 Diagram of the SeqFISH

图4 SeqFISH示意图

在每一轮杂交中, 每个转录本上杂交24个探针, 成像然后通过脱氧核糖核酸酶I (DNAse I) 处理剥离探针。相同的探针序列用于不同轮次的杂交, 但探针耦合不同的荧光团。

此Chen等<sup>[26]</sup>开发了MERFISH。它结合了此前改进技术的优点, 利用组合标签、连续成像等技术来提高检测通量, 并通过二进制条形码来抵消单分子标记和检测错误, 具有更高级的内置纠错功能, 可有效提高结果的准确性。在该方案中, 第一轮标记

对RNA的一个子集进行染色。如果在此轮中发出荧光, 则RNA在第一位被分配为“1”。如果不发出荧光, 则分配“0”。同理将第二组探针杂交到同样品上并再次对该样品进行成像, 以此类推。该过程在N轮成像中重复, 允许为样品中的每个标记

RNA 构建  $N$  位条形码 (图 5)。可以想象此方法可在单个样本中识别大量 RNA。MERFISH 也有望将

此优势扩展到转录组规模, 以此提供单个细胞内数百到数千个 RNA 的精确拷贝数。

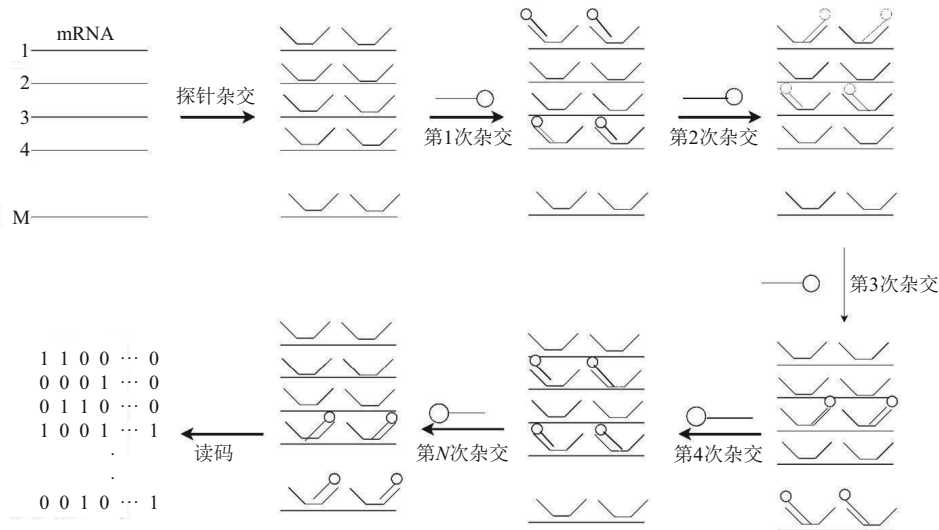


Fig. 5 Diagram of the MERFISH

图5 MERFISH示意图

用于RNA鉴定的MERFISH实施示意图。每个RNA首先用~192个编码探针标记, 此可将RNA转化为读出序列的独特组合。这些编码探针每个都包含一个中心RNA靶向区域, 两侧是两个读出序列, 这些序列来自  $N$  个不同序列的探针池, 每个序列都与特定的杂交轮次相关。特定RNA物种的编码探针包含  $N$  个读出序列中的4个独特组合, 这些序列对应于该RNA应该读为“1”的4个杂交轮。随后的  $N$  轮与荧光读出探针的杂交用于探测读出序列。结合的探针在连续几轮杂交之间通过光漂白而失活。M代表此技术中的一种代码modified HD4 code (MHD4) 的首字母简称。

### 3.4 点击扩增 FISH (click-amplifying fluorescence *in situ* hybridization, ClampFISH)

HCR 技术仅依靠杂交来放大信号, 并且通常缺乏多重检测的灵活性。此外依赖于酶活性以获得信号增益的方法有时会受到酶连效率的影响, 导致扩增不一。因此 Rouhanifard 等<sup>[27]</sup> 发明了 ClampFISH 技术。这是一种非酶促的指数扩增方案, 具有高灵敏度 (检测效率)、非常高的增益 (信号放大) 和特异性 (低背景) 等优点。ClampFISH 探针在以双螺旋方式与目标序列杂交时形成“C”构型后, 其末端使用生物正交点击化学 (铜 (I) 催化的叠氮化物-炔烃环加成, CuAAC) 连接在一起, 如此便能够有效地将探针锁定在目标周围并防止探针在扩增显微镜中脱离 (图 6)。此外 ClampFISH 2.0 也在 2022 年问世, 通过更新的探针设计和合成方案, 大大降低了整体方法成本, 提高了其可扩展性, 并消除了细胞外非特异性斑点。因其技术优势, 该技术未来将会在空间转录组学研究中得到更广泛的应用<sup>[28]</sup>。

### 3.5 RNAscope

此前改善 RNA 原位杂交性能的努力主要集中在提高灵敏度上, 例如在杂交前扩增 mRNA 靶标或杂交后扩增信号, 但由于放大偏差使信号放大后定量成为问题, 并且信号放大也会相应提高噪声, 从而限制了信噪比的改善。因此在 2012 年, Wang 等<sup>[29]</sup> 开发出 RNAscope。该技术的核心在于通过使用新颖的探针设计策略和基于杂交的信号放大系统放大自身信号的同时并抑制背景。两个相邻的“Z-probes”与目标 RNA 转录物结合, 形成所需的结合位点, 供后续的放大分子杂交使用, 从而实现单个细胞中单分子高信号特异性可视化。由于其具有在常规临床标本中进行原位分析基因表达的能力以及高灵敏度和特异性, 使 RNAscope 具有良好的应用前景 (图 7)。

### 3.6 分裂式 FISH (split fluorescence *in situ* hybridization, Split-FISH)

随着研究的需要, 此前的技术有时难以在复杂的组织环境中准确检测单个 RNA 分子。因此 Goh 等<sup>[30]</sup> 开发出 Split-FISH 技术, 利用分裂探针来实

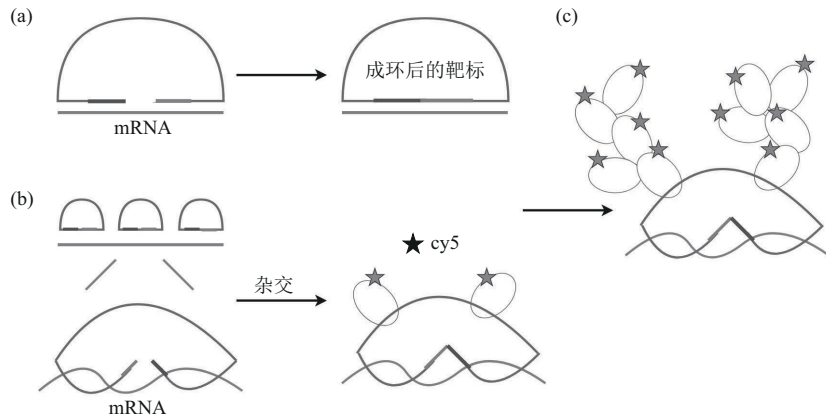


Fig. 6 Diagram of the ClampFISH

图6 ClampFISH示意图

ClampFISH的设计与验证。(a, b) 使用CuAAC的ClampFISH探针结合和连接示意图。(c) ClampFISH工作流程, 用于在每一轮杂交中加倍荧光信号。

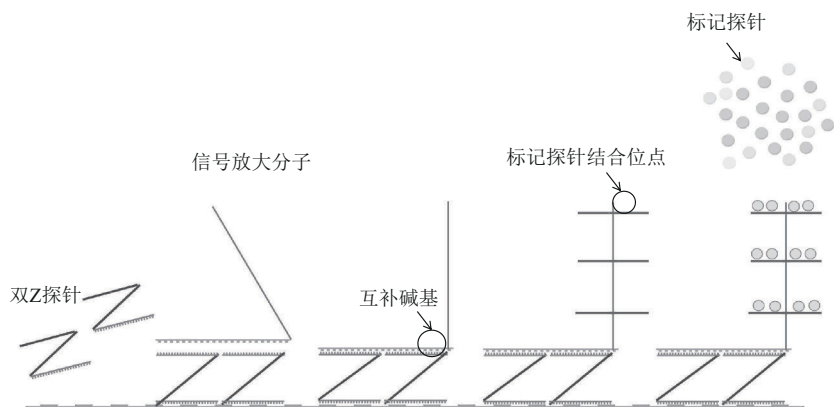


Fig. 7 Diagram of the RNAscope

图7 RNAscope示意图

添加双Z探针 (Z型探针底端是一段长约18~25个碱基的序列) 与靶RNA分子进行杂交; 依次杂交信号放大分子 (Z型探针顶端是一段14个碱基长度的序列, 两个探针引物的顶端序列共同构成一段28个碱基长度的结合区, 可与信号放大前体序列结合) 和标记探针; 信号可视化: 在光学显微镜或者多光谱荧光成像系统下检测标记探针, 每一个目标RNA分子以一个点状信号的形式呈现。本图由Figdraw绘制。

现信号增强。研究者首先设计一段桥式序列, 其可与桥式探针和编码探针序列之间互补配对。桥式探针无法与任何单个编码探针结合, 只有当一对编码探针在靶RNA的相邻位置杂交时才会有足够的互补碱基配对, 使桥式探针有效结合目标RNA。接着, 荧光标记的探针与桥式探针杂交以产生信号 (图8)。Split-FISH可减少背景荧光及假阳性结果, 即使在未清除的组织中也能够进行准确的转录组学分析。该方法已成功运用检测小鼠肾脏切片中5个基因 (*Ppl*、*Sptbn2*、*Irs1*、*Notch3*、*Osbp18*) 的表达水平, 揭示了复杂组织中转录组空间调节的不同

定位模式<sup>[18]</sup>。

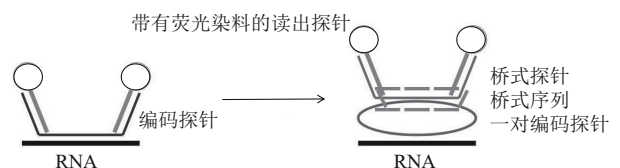


Fig. 8 Diagram of the Split-FISH

图8 Split-FISH示意图

传统探针和Split-FISH探针的比较示意图。图中显示了细胞RNA、编码探针、染料标记的读出探针和桥式探针。

### 3.7 扩大FISH (amplification fluorescence *in situ* hybridization, AmpFISH)

smFISH能够在荧光显微镜下检测细胞或组织中核酸的空间位置和表达水平，但通常仅限于长RNA分子 (>3 kb)。为了解决短分子成像这一问题，Cao等<sup>[31]</sup>开发出AmpFISH，这是一种通过可控滚动圆扩增 (controllable rolling-circle amplification, CRCA) 制备长单链DNA连接体 (long single-strand DNA concatemers, lssDNAc) 的方法。研究者首先设计出两段互补DNA寡核苷酸序列，分别命名为挂锁 (Padlock) 和适配器

(Adaptor)。适配器5'端有一段称为立足点 (Toehold) 的序列与目标RNA分子碱基互补，挂锁有两段特异性序列称为B1和B2，分别和适配器上的一段序列互补。退火后B1与B2相连接称为环状双链DNA。之后再加入DNA聚合酶及dNTP进行反应后，环状双链DNA便能够无限扩增实现信号放大 (图9)。研究者已成功在NIH1T2细胞系中检测具有不同表达水平的4种转录本 (Actin $\beta$ 、Lox、Txn3和Sla3)，证明了AmpFISH可有效放大培养细胞中转录本的荧光信号<sup>[19]</sup>。

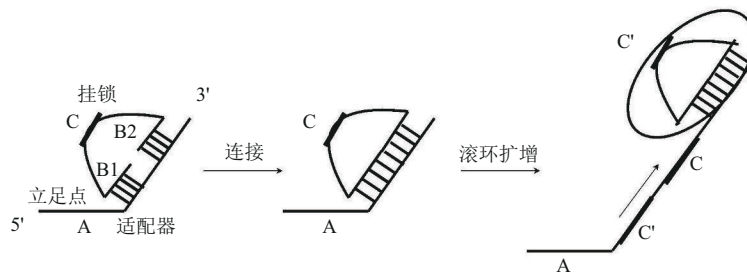


Fig. 9 Diagram of the AmpFISH

图9 AmpFISH示意图

lssDNAc延伸反应示意图。挂锁的5'和3'端的核苷酸都可以互补地结合到适配器的3'端。接下来，挂锁通过DNA连接酶在5'和3'端连接以形成一个闭合的圆圈。适配器单链DNA可以使用封闭的挂锁作为滚环扩增的模板进行扩展。

### 3.8 环状 FISH (circular fluorescent *in situ* hybridization, CircFISH)

环状 RNA (circRNA) 是一种调节 RNA，据报道，circRNA 富集在细胞外囊泡中，这也突显了它们在神经系统疾病、心脏病和许多癌症等各种病理中有希望作为新兴生物标志物的作用<sup>[32]</sup>。因大多数 circRNA 与线性 RNA 共享相同的序列，所以传统的荧光原位杂交技术不能直接用于区分线性和

环状亚型的信号<sup>[28]</sup>。为了解决这一需求，Koppula等<sup>[28]</sup>开发了CircFISH技术。在此方案中使用两组独特的探针：PC探针和PL探针，两种探针都标记有不同颜色的荧光团。之后选择circRNA中包含的外显子作为PC探针组的目标区域，而仅存在于线性RNA中的外显子作为PL探针组的靶标，最后通过荧光显微镜观察即可同时可视化线性和圆形转录本 (图10)。此外CircFISH可与流式细胞术结合使

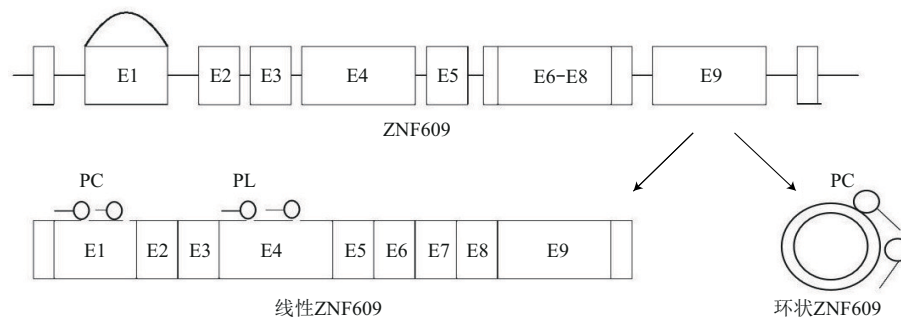


Fig. 10 Diagram of the CircFISH

图10 CircFISH示意图

使用CircFISH可视化circZNF609。用于线性和圆形ZNF609同时成像的CircFISH示意图。PL和PC探针分别与ZNF609的线性和圆形亚型结合。



用, 以实现临床样品中 circRNA 的高通量表征。通过此方法研究者已成功量化了 3 种细胞系中单个细胞 ZNF609 RNA 分子的平均数量。因此 CircFISH 可用于同时鉴定单个细胞中 circRNA 的组织特异性表达和差异分布, 并且可同时确定 circRNA 和线性 RNA 的分布模式。

### 3.9 $\pi$ -FISH 彩虹 ( $\pi$ -fluorescent *in situ* hybridization rainbow, $\pi$ -FISH rainbow)

在单细胞测序和空间多组学生物学时代, 需要具有更高灵敏度和稳健性的荧光原位杂交技术, 特别是用于检测短 RNA 和其他生物分子。2023 年 Tao 等<sup>[33]</sup> 开发出  $\pi$ -FISH rainbow 技术, 可以在单分子水平上同时检测 DNA, RNA 和蛋白质。该方案需设计一种  $\pi$ -FISH 靶探针, 此探针由两段序列组

成, 两者中间区域包含 2~4 个互补碱基对, 在形成“ $\pi$ ”一样的构型后则可以与靶 RNA 结合。之后使用二级和三级 U 形放大探针来扩增信号, 最后使用偶联在放大探针上的荧光探针对目标 RNA 分子进行可视化 (图 11)。此外, 通过组合不同的荧光信号探针 ( $\pi$ -FISH rainbow), 研究者可在一轮实验中实现多类型目标分子检测。通过此方法, Tao 等研究了 HeLa 细胞中长非编码 RNA (lncRNA) MALAT1 的亚细胞定位。分析明确证明了 MALAT1 在不同细胞中的细胞核及细胞质分布模式。 $\pi$ -FISH rainbow 的高效率和特异性也进一步推进生物分子原位检测技术的发展。目前,  $\pi$ -FISH rainbow 已实现产业转化, 相关 FISH 试剂盒将广泛助力临床诊断和生命科学研究。

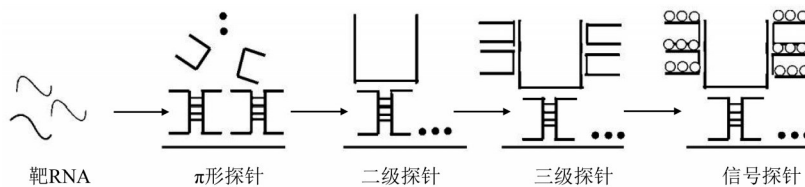


Fig. 11 Diagram of the  $\pi$ -FISH rainbow

图11  $\pi$ -FISH rainbow示意图

$\pi$ -FISH彩虹程序示意图。 $\pi$ 形探针与靶RNA结合。之后使用二级和三级U形放大探针来扩增信号, 最后使用偶联在放大探针上的荧光探针对目标RNA分子进行可视化。

### 3.10 高通量 smFISH (high-throughput smFISH, HT-smFISH)

此前 smFISH 的一个主要障碍是难以以中高通量或高通量形式进行系统实验, 主要是因为生成单个荧光探针组的成本很高。为避免上述问题, Safieddine 等<sup>[13]</sup> 开发出 HT-smFISH 技术。HT-smFISH 首先需设计一个寡核苷酸池, 这是一种包含 10 000~100 000 个针对不同 RNA 物种的 DNA 寡核苷酸溶液。之后在 96 孔板中使用两轮 PCR 和体外转录合成识别一种 RNA 的单个特异性探针组, 此后在每个孔中进行原位杂交。由于原位杂交在 96 孔板中进行, 因此该技术较适用于中到大型 smFISH 筛选 (图 12)。此外, 寡核苷酸池的内部扩增也降低了每个 RNA 探针的合成成本。HT-smFISH 已成功运用于 HeLa、HEK293T、HCT116、RPE1 细胞, 成功标记了不同 mRNA 在各种亚细胞的定位以及小鼠神经元中的 NSMF mRNA 和小鼠结肠组织切片中的 KIF563C mRNA<sup>[13]</sup>。

smFISH 是一种广泛使用的单分子成像技术, 能够定量研究基因表达及其调控机制。衍生技术的不断发明也扩大了其应用规模 (表 1), 这反过来又需要足够的数据分析和探索工具。当前的大多数 smFISH 应用都为定性而非定量, 因此没有最大程度利用这些潜在的成像数据集。市售 smFISH 平台具有多重检测的能力, 理论上可进行以分子和空间定义的不同细胞类型中的差异表达分析。然而, 用于分析这些数据的下游计算工具却远远落后于平台的使用, 并且大多数没有强大计算专业知识的生物学实验室仍然无法使用这些工具<sup>[34]</sup>。因此一系列简单可靠的数据分析工具也随 smFISH 衍生技术的发展而改进。例如, Maynard 等<sup>[34]</sup> 开发了 dotdotdot——一种直观且适应性强的计算工作流程, 其具有的高效成像采集和分析策略能够用于检测和去除 smFISH 数据中的组织自发荧光, 以提高转录本定量的准确性。此外作者也向读者证明 dotdotdot 可适用于各种数据文件格式、具有成像采

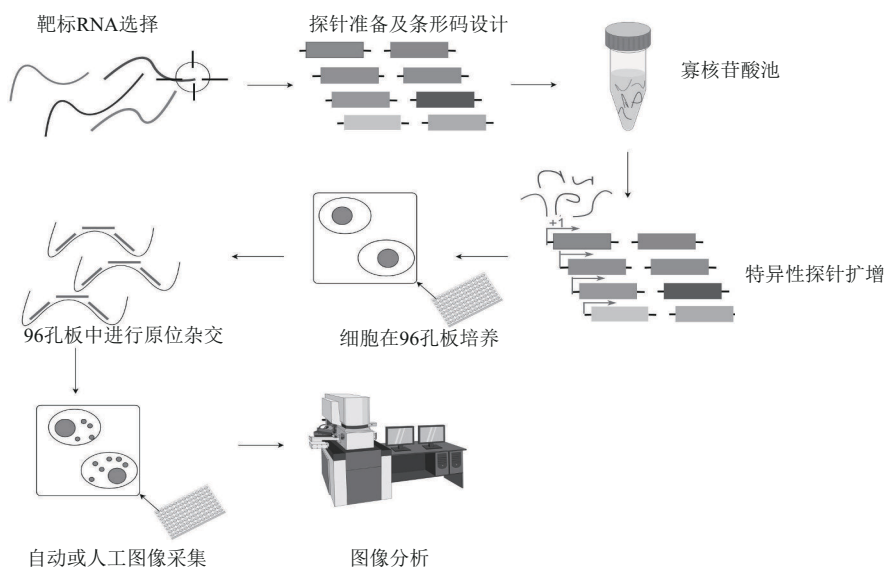


Fig. 12 Diagram of the HT-smFISH

图12 HT-smFISH示意图

程序从所需的RNA靶标选择和序列提取开始。然后，序列作为专用代码（Oligostan-HT）的输入，用于生成热力学优化的探针组以及条形码。然后将探针组作为单链DNA寡核苷酸订购在定制的寡核苷酸池中。这些寡核苷酸用于通过PCR扩增和体外转录生成转录本特异性RNA探针组。对于高通量RNA筛选实验，细胞在96孔板中生长，还可直接在96孔板上进行原位杂交和成像。图像可以使用各种工具直接可视化和分析。本图由Figdraw绘制。

Table 1 Different derivative smFISH technologies

表1 不同smFISH衍生技术对照表

名称	发明年份	适用类型	优点	缺点
smFISH	1998	组织	实现单分子可视化	通量低，非特异性高
HCRFISH	2010	固定细胞、胚胎、组织切片和微生物种群	20倍信号放大，高信噪比背景和清晰的信号定位	受到酶作用影响较大，需要严格的杂交条件
RNAscope	2012	细胞，石蜡包埋组织样品	同时进行信号放大和背景抑制	步骤较繁琐
SeqFISH	2014	细胞	编码效率高，具有高杂交效率	昂贵且费时
MERFISH	2015	细胞	时间短，错误率低	RNA密集的结构中可能无法辨别
ClampFISH	2018	细胞，组织切片	可与流式结合，检测低转录水平，不依赖酶	可能难以进入转录位点
Split-FISH	2020	细胞，复杂的组织切片	简化多重FISH的组织制备方案	探针比较不稳定
AmpFISH	2021	细胞，组织切片	同时检测组织中的FISH信号和荧光蛋白或免疫荧光	单链DNA大小对信号扩大能力有待进一步调查
CircFISH	2022	细胞，组织切片	区分线性和环状RNA	环状RNA可能会在实验操作中降解
$\pi$ -FISH rainbow	2023	动物、植物和病原微生物的冷冻、石蜡切片	高效多路复用	探针合成难度较大
HT-smFISH	2023	细胞，组织切片	高通量	需要的探针较多

集参数广和多路复用实验灵活等优点，从而提高了其对不同类型的smFISH数据的实用性。此外，还有例如FISH-quant v2<sup>[35]</sup>，用于smFISH图像分析的

可扩展模块化工具。允许用户分割细胞核和细胞，检测分离的RNA，分解密集的RNA簇，量化RNA定位模式，并在单细胞水平和细胞群内的变化中可

视化这些结果。该工具可在一个框架中执行整个分析, 大大提高了分析效率。未来后续分析工具的不断改进也将使 smFISH 流程更加完善。

## 4 smFISH在基础生物学中的应用进展

### 4.1 smFISH在肿瘤生物学中的应用

癌症是由癌细胞突变积累驱动的疾病。癌症特征的获得和维持(例如, 维持增殖信号传导、抵抗细胞死亡、诱导血管生成、激活侵袭和转移、引发肿瘤促进炎症以及避免免疫破坏等)在不同程度上都取决于肿瘤微环境(tumor microenvironment, TME)的作用<sup>[36]</sup>。TME中有许多不同种类的细胞, 各种细胞的表型和功能可能高度依赖于细胞的确切空间位置以及与相邻细胞的相互作用。因此在TME中深入了解其细胞成分与空间位置至关重要。smFISH技术是一种良好的分子定位手段, 能对细胞中单个RNA进行直接定量<sup>[26, 37]</sup>。如果将smFISH与单细胞RNA测序(scRNA-seq)等空间信息整合, 将显著提高对TME中细胞间相互作用和空间效应的理解。例如, Massalha等<sup>[38]</sup>使用smFISH验证了关键细胞类型特异性标记物的表达, 确定了人肝肿瘤微环境中的17种细胞, 生成了细胞图谱, 解析了肿瘤和基质细胞之间的相互作用。

在过去的几年中, 多区域测序和单细胞测序技术表明, 肿瘤内异质性(intra-tumor heterogeneity, ITH)在许多癌症类型中都很普遍, 然而, 这些基于测序技术手段的一个重要局限性是它们本质上无法提供有关不同亚克隆的空间排列和选定表达生物标志物细胞的分布信息。相比之下, 尽管荧光原位杂交通常要低得多, 但其不仅可以提供更可靠的定量信息, 还可以提供所选DNA和RNA靶标在其细胞和组织环境中的位置<sup>[39]</sup>。在RNA层面, smFISH能够可视化、精确定位和计数固定细胞和组织中的单个RNA分子。因此Semrau等<sup>[40]</sup>应用smFISH量化了慢性粒细胞白血病中致癌融合基因*BCR-ABL*的肿瘤内转录异质性, Barreca等<sup>[41]</sup>研究了滤泡性淋巴瘤细胞系中免疫球蛋白基因表达的细胞间变异性。借助smFISH这一技术, ITH对癌症影响作用的研究更深入了一个层次。

耐药性是肿瘤治疗的主要障碍之一。由于癌细胞是异质性的, 即使在来自单个患者的组织内, 也应该在单细胞水平上考虑癌细胞耐药性的整个过程<sup>[42]</sup>。smFISH因其可检测和区分内源性RNA分子及其剪接变体, 已被用于阐明某些细胞群如何获

得耐药性<sup>[43]</sup>。例如, Kim等<sup>[42]</sup>利用smFISH量化了两种丙酮酸激酶M(PKM)亚型在单细胞水平上20个碱基对差异的表达, 从而阐明了糖酵解酶代谢转变在获得耐药性中的作用。Shaffer等<sup>[43]</sup>在药物治疗前利用高通量单分子RNA FISH对数千个黑色素瘤细胞中选定抗性基因的mRNA进行计数, 表明可以在单细胞水平上显示出深刻的转录变异性, 从而预测哪些细胞最终会抵抗药物治疗。综上, smFISH作为一种检测RNA分子在细胞中定位和表达的技术, 在单细胞水平上推进了肿瘤生物学的发展。未来可利用smFISH追踪细胞中有关癌基因的特异性表达, 并对微环境中的成分进行研究以阐明其在肿瘤形成及扩散中的重要作用, 为肿瘤生物学研究带来新的突破。

### 4.2 smFISH在发育生物学中的应用

smFISH技术自被创立以来, 就被运用在发育生物学研究的各个方面, 例如发育相关基因的转录延伸<sup>[44-45]</sup>、剪接<sup>[46-47]</sup>、细胞内等位基因的表达<sup>[48-50]</sup>等。smFISH技术的运用推进了发育生物学的发展, 使之在单分子水平上有了更深一步的研究。

对动物来说, 基因表达的控制是其发育和体内平衡的核心。为了实现这种控制, 发育调节因子的表达通常在多个水平上受到精细控制。Robinson-Thiewes等<sup>[51]</sup>则使用smFISH研究了秀丽隐杆线虫3个保守基因:*mpk-1*、*lag-1*和*lag-3/sel-8*的发育表达。借助单分子RNA定位技术, 研究者发现, 秀丽隐杆线虫中存在两种不同的活性转录位点(active transcription sites, ATS), 并认为ATS的调控可能是发育基因调控的关键模式。除此之外, Phillips等<sup>[52]</sup>成功使用smFISH检测小鼠成纤维细胞中的核心时钟转录本:*Rev-erba*(*Nr1d1*)、*Cry1*和*Bmal1*, 旨在定量研究核心昼夜节律基因的mRNA分布如何在昼夜周期中进化, 通过smFISH技术表明单个细胞中的昼夜节律期由许多不同基因的mRNA数量及其他原因所决定。此外, 生物体不断适应环境变化, 对不同刺激的转录反应也在发育和生存中起着关键作用。细胞在一段时间的抑制后再增加其激活动力的现象称为转录记忆<sup>[53]</sup>, 但近年来关于转录记忆的大多数机制都来自批量分子测定。因此Ferraro等<sup>[53]</sup>为了进一步了解核孔成分Nup98对记忆的机制和贡献, 使用smFISH来检查反复暴露于类固醇激素蜕皮激素后果蝇细胞的转录动力学, 并将smFISH分析与数学建模相结合, 揭

示了处于记忆状态的活性位点启动新转录的速度比活跃的非记忆位点快约15倍。

转座元件在基因组重组和基因表达调控中发挥着积极作用,被认为是基因组进化、基因组组织和基因调控的驱动力,在早期胚胎发育中尤为重要<sup>[54]</sup>。笔者之前利用smFISH原理设计探针以进行逆转录转座子和DNA转座子中LINE1、B1、MuERV-L和IAP的定位研究<sup>[55]</sup>,以探明小鼠胚胎早期发育过程中转座元件动态变化对染色质空间位置形成的影响。

综上,smFISH在发育生物学中可用于研究特定基因的表达、转录产物的性质、单分子RNA空间位置等。技术的进步极大地影响了发育生物学研究<sup>[56]</sup>。虽然现阶段对于一些动物的发育已经有所了解,但了解的广度和深度仍然参差不齐。因此,进一步利用smFISH对发育过程中特定基因的表达和转录进行更深层次的研究,在各个水平上进一步解释过去尚未阐明现象,将有利于发育生物学的发展。

#### 4.3 smFISH在神经生物学中的应用

研究神经元和突触的结构和功能,探索神经元和突触的基本工作原理和信号传递机制,以及神经元和突触的可塑性和变化机制,是神经生物学中的热门研究问题。mRNA通过使新蛋白质在需要的时间和地点合成而导致的不同树突定位促进了突触可塑性的特异性<sup>[57]</sup>。因此,在记忆相关神经元中可视化单个树突定位的mRNA对于理解神经元可塑性过程至关重要。Mitchell等<sup>[58]</sup>利用smFISH技术,可视化了成年果蝇大脑中的CaMKII mRNA,展示了mRNA在蘑菇体输出神经元(mushroom body output neurons, MBON)树突中的三维定位,进一步表明CaMKII mRNA选择性地定位于MBON树突中。此外,神经元发育过程中的变化也存在一个有趣的现象即真核翻译延伸因子eEF1A变体1(eEF1A1)到eEF1A2的转变。因此,Wefers等<sup>[59]</sup>通过smFISH分析了神经元中eEF1A变体表达的整个过程。此技术相比免疫荧光有两点优势:首先两者之间的核苷酸序列在编码区中相似性为75%,并且它们具有不同的3'-UTR和5'-UTR<sup>[60]</sup>,因此避免了交叉识别其他eEF1A变体的问题。其次,smFISH可检测固定细胞中90%的mRNA,并提供单分子分辨率和精确定量<sup>[8]</sup>。因此,通过smFISH技术可理解这些mRNA在神经元中表达过程中复杂调控的第一步。

smFISH技术对于研究基因表达和mRNA定位非常有效。可视化神经元内的mRNA揭示了其选择性定位,并使转录、翻译和运动行为参数能够在诱导活化行为前后被表征<sup>[61]</sup>。随着技术的不断发展与应用,相信未来smFISH对研究神经元基因表达,特异性RNA在神经发育过程中的作用等方面将会发挥更大的作用。

#### 4.4 smFISH在植物学中的应用

在植物中,smFISH首先应用于拟南芥根细胞中的单个mRNA分子,Duncan等<sup>[62]</sup>对管家基因蛋白磷酸酶2A(phosphatase 2A, PP2A)的mRNA和新生转录本进行了检测。这一研究的开启,开辟了植物水平上单分子RNA的精确定量。尽管作者使用红色和远红色染料一起最大化了mRNA信号,但植物组织因具有非常特殊的光学特性,许多天然分子会发出高水平的背景自发荧光且固有的光散射会对激发和检测效率产生不利影响,因此对成像过程具有一定的挑战性<sup>[63]</sup>。此外,要想获得单层细胞就必须破坏组织形态。为了突破这两个局限性,不同的改进方法被不断研发。例如,Huang等<sup>[64]</sup>将PIPES、HEPES、EGTA、MgSO<sub>4</sub> 4种缓冲液引入固定步骤,以确保处理后的植物细胞的完整性,此外还引入了线性光谱分解和发射指纹成像模式,以消除植物自身荧光的干扰。Duncan等<sup>[65]</sup>则使用根挤压法用于分离拟南芥根顶端分生组织,使之产生单细胞层并直接进行smFISH定量分析从而降低一定程度的自发荧光。不同方法的改进,大力推动了植物学中smFISH的应用,为其研究内容带来了新的视角。

尽管smFISH允许对植物基因转录进行特异性和定量分析,但其缺乏有关最终基因产物(蛋白质)的信息。此前,Maekiniemi等<sup>[66]</sup>利用smFISH及免疫荧光量化了酿酒酵母中单细胞mRNA和目标蛋白的表达。但植物因需要mRNA和蛋白质的顺序杂交和成像<sup>[66]</sup>因此现有的方案难以执行。为解决这一问题,Zhao等<sup>[67]</sup>开发了一种检测并定量完整植物组织中几种RNA单分子的方法(WM-smFISH)。该方法还可用于以亚细胞分辨率同时定位和定量单细胞中的mRNA和蛋白质。通过这种方法,可在细胞和亚细胞分辨率下充分探索植物组织中的转录本及蛋白质水平。smFISH也将成为模拟转录和研究与发育及生理过程相关调控机制的重要工具,为植物研究提供令人兴奋的新手段。

#### 4.5 smFISH在病毒学中的应用

病毒感染是一个多步骤的过程, 包括病毒进入、基因组运输、病毒基因表达的激活、基因组的复制、粒子组装和后代的释放。传统上, 病毒感染机制已通过群体水平的测定进行了研究, 例如, 蛋白质免疫印迹、RT-qPCR、宿主转录组的批量RNA测序等。尽管这些测定的结果为分子病毒学提供了大部分基础, 但这些类型的测定只提供了有关病毒感染的平均信息<sup>[68]</sup>, 而smFISH因其具有良好的单分子定位能力, 可在单细胞水平提供病毒个体信息, 使之在病毒学中具有广泛的应用。2020年, 新冠疫情肆虐全球, 尽管科研人员对严重急性呼吸综合征冠状病毒2 (SARS-CoV-2) 进行了大量的研究工作, 但对早期复制事件仍然知之甚少。Lee等<sup>[69]</sup>使用smFISH量化了其正链RNA基因组, 同时可视化负链基因组及亚基因组RNA。此外还观察到SARS-CoV-2的复制在细胞之间变化很大, 只有一小部分细胞群显示出高载量的病毒RNA。Geravandi等<sup>[70]</sup>则利用smFISH在1型糖尿病(T1D)患者胰腺中检测到肠道病毒RNA, 确定了肠道病毒RNA能够在胰腺中表达。Hu等<sup>[71]</sup>将smFISH与scRNA-seq连用, 鉴定和表征了调节原代神经元中潜伏病毒基因组再激活的细胞宿主因子。

综上所述, 单分子mRNA荧光原位杂交技术因其可在形态完整的单个细胞内检测、计数和定位mRNA分子, 因此可揭示个体病毒在细胞内的各种感染状态和动力学特征, 大大提高了我们对宿主-病毒相互作用的理解<sup>[72]</sup>, 为未来病毒学的研究提供了一种强大的技术方法。

## 5 总结与展望

smFISH是一种分析细胞间细微转录差异并为细胞内mRNA定位提供新见解的技术方法<sup>[73]</sup>。可从单细胞、组织切片、整体生物等多个尺度上研究生物系统中基因表达的空间模式和机制, 在基础生物学中具有广泛的应用前景。然而, 我们也应看到smFISH仍存在一些技术方面的缺陷, 例如: 探针的特异性低、探针携带的荧光基团易猝灭、成像时背景信号高及实验后数据分析难等。未来的smFISH的技术研发, 需着眼于解决上述难题, 如: 开发新型算法, 提升smFISH探针设计的特异性<sup>[74]</sup>; 开发新型的抗猝灭效果更优、光谱范围更窄的荧光染料或加入鲑鱼精子以阻断探针与膜表面

的非特异性吸附<sup>[17]</sup>; 开发效率更高的图像处理算法, 便于满足大型数据集的分析要求<sup>[35]</sup>等。相信随着技术的不断开发与改进, smFISH将在生物医学研究中得到更广泛的应用。

## 参 考 文 献

- [1] Le P, Ahmed N, Yeo G W. Illuminating RNA biology through imaging. *Nat Cell Biol*, 2022, **24**(6): 815-824
- [2] Felsenfeld G, Miles H T. The physical and chemical properties of nucleic acids. *Annu Rev Biochem*, 1967, **36**: 407-448
- [3] Milman G, Langridge R, Chamberlin M J. The structure of a DNA-RNA hybrid. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1967, **57**(6): 1804-1810
- [4] Rudkin G T, Stollar B D. High resolution detection of DNA-RNA hybrids *in situ* by indirect immunofluorescence. *Nature*, 1977, **265**(5593): 472-473
- [5] Bauman J G, Wiegant J, Borst P, *et al.* A new method for fluorescence microscopical localization of specific DNA sequences by *in situ* hybridization of fluorochromelabelled RNA. *Exp Cell Res*, 1980, **128**(2): 485-490
- [6] Murthy S K, Demetrick D J. New approaches to fluorescence *in situ* hybridization. *Methods Mol Biol*, 2006, **319**: 237-259
- [7] Singer R H, Ward D C. Actin gene expression visualized in chicken muscle tissue culture by using *in situ* hybridization with a biotinylated nucleotide analog. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1982, **79**(23): 7331-7335
- [8] Femino A M, Fay F S, Fogarty K, *et al.* Visualization of single RNA transcripts *in situ*. *Science*, 1998, **280**(5363): 585-590
- [9] Femino A M, Fogarty K, Lifshitz L M, *et al.* Visualization of single molecules of mRNA *in situ*. *Methods Enzymol*, 2003, **361**: 245-304
- [10] Raj A, Van Den Bogaard P, Rifkin S A, *et al.* Imaging individual mRNA molecules using multiple singly labeled probes. *Nat Methods*, 2008, **5**(10): 877-879
- [11] Xing Y, Johnson C V, Moen P T, JR., *et al.* Nonrandom gene organization: structural arrangements of specific pre-mRNA transcription and splicing with SC-35 domains. *J Cell Biol*, 1995, **131**(6 Pt 2): 1635-1647
- [12] Du J, Dartawan R, Rice W, *et al.* Fluorescent platforms for RNA chemical biology research. *Genes (Basel)*, 2022, **13**(8): 1348
- [13] Safeddine A, Coleno E, Lionneton F, *et al.* HT-smFISH: a cost-effective and flexible workflow for high-throughput single-molecule RNA imaging. *Nat Protoc*, 2023, **18**(1): 157-187
- [14] Arora A, Goering R, Velez P T, *et al.* Visualization and quantification of subcellular RNA localization using single-molecule RNA fluorescence *in situ* hybridization. *Methods Mol Biol*, 2022, **2404**: 247-266
- [15] Larsson C, Koch J, Nygren A, *et al.* *In situ* genotyping individual DNA molecules by target-primed rolling-circle amplification of padlock probes. *Nat Methods*, 2004, **1**(3): 227-232
- [16] Kucho K, Yoneda H, Harada M, *et al.* Determinants of sensitivity and specificity in spotted DNA microarrays with unmodified

- oligonucleotides. *Genes Genet Syst*, 2004, **79**(4): 189-197
- [17] Young A P, Jackson D J, Wyeth R C. A technical review and guide to RNA fluorescence *in situ* hybridization. *PeerJ*, 2020, **8**: e8806
- [18] Bussolati G, Annaratone L, Medico E, *et al.* Formalin fixation at low temperature better preserves nucleic acid integrity. *PLoS One*, 2011, **6**(6): e21043
- [19] Ceresa L, Chavez J, Kitchner E, *et al.* Imaging and detection of long-lived fluorescence probes in presence of highly emissive and scattering background. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2022, **247**(20): 1840-1851
- [20] Lederman L L, Kawasaki e S, Szabo P. The rate of nucleic acid annealing to cytological preparations is increased in the presence of dextran sulfate. *Anal Biochem*, 1981, **117**(1): 158-163
- [21] Dirks R M, Pierce N A. Triggered amplification by hybridization chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, **101**(43): 15275-15278
- [22] Zhou R, Zeng Z, Sun R, *et al.* Traditional and new applications of the HCR in biosensing and biomedicine. *Analyst*, 2021, **146**(23): 7087-7103
- [23] Choi H M, Chang J Y, Trinh LE A, *et al.* Programmable *in situ* amplification for multiplexed imaging of mRNA expression. *Nat Biotechnol*, 2010, **28**(11): 1208-1212
- [24] Lubeck E, Coskun A F, Zhiyentayev T, *et al.* Single-cell *in situ* RNA profiling by sequential hybridization. *Nat Methods*, 2014, **11**(4): 360-361
- [25] Eng C L, Lawson M, Zhu Q, *et al.* Transcriptome-scale super-resolved imaging in tissues by RNA seqFISH. *Nature*, 2019, **568**(7751): 235-239
- [26] Chen K H, Boettiger A N, Moffitt J R, *et al.* RNA imaging. Spatially resolved, highly multiplexed RNA profiling in single cells. *Science*, 2015, **348**(6233): aaa6090
- [27] Rouhanifard S H, Mellis I A, Dunagin M, *et al.* ClampFISH detects individual nucleic acid molecules using click chemistry-based amplification. *Nat Biotechnol*, 2019, **37**: 84-89
- [28] Koppula A, Abdelgawad A, Guarnerio J, *et al.* CircFISH: a novel method for the simultaneous imaging of linear and circular RNAs. *Cancers (Basel)*, 2022, **14**(2): 428
- [29] Wang F, Flanagan J, Su N, *et al.* RNAscope: a novel *in situ* RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Mol Diagn*, 2012, **14**(1): 22-29
- [30] Goh J J L, Chou N, Seow W Y, *et al.* Highly specific multiplexed RNA imaging in tissues with split-FISH. *Nat Methods*, 2020, **17**(7): 689-693
- [31] Cao D, Wu S, Xi C, *et al.* Preparation of long single-strand DNA concatemers for high-level fluorescence *in situ* hybridization. *Commun Biol*, 2021, **4**(1): 1224
- [32] Li X, Yang L, Chen L L. The biogenesis, functions, and challenges of circular RNAs. *Mol Cell*, 2018, **71**(3): 428-442
- [33] Tao Y, Zhou X, Sun L, *et al.* Highly efficient and robust  $\pi$ -FISH rainbow for multiplexed *in situ* detection of diverse biomolecules. *Nat Commun*, 2023, **14**(1): 443
- [34] Maynard K R, Tippianni M, Takahashi Y, *et al.* dotdotdot: an automated approach to quantify multiplex single molecule fluorescent *in situ* hybridization (smFISH) images in complex tissues. *Nucleic Acids Res*, 2020, **48**(11): e66
- [35] Imbert A, Ouyang W, Safieddine A, *et al.* FISH-quant v2: a scalable and modular tool for smFISH image analysis. *Rna*, 2022, **28**(6): 786-795
- [36] Xiao Y, Yu D. Tumor microenvironment as a therapeutic target in cancer. *Pharmacol Ther*, 2021, **221**: 107753
- [37] Lee J H, Daugharthy E R, Scheiman J, *et al.* Fluorescent *in situ* sequencing (FISSEQ) of RNA for gene expression profiling in intact cells and tissues. *Nat Protoc*, 2015, **10**(3): 442-458
- [38] Massalha H, Bahar Halpern K, Abu-Gazala S, *et al.* A single cell atlas of the human liver tumor microenvironment. *Mol Syst Biol*, 2020, **16**(12): e9682
- [39] Annaratone L, Simonetti M, Wernersson E, *et al.* Quantification of HER2 and estrogen receptor heterogeneity in breast cancer by single-molecule RNA fluorescence *in situ* hybridization. *Oncotarget*, 2017, **8**(12): 18680-18698
- [40] Semrau S, Crossetto N, Bienko M, *et al.* FuseFISH: robust detection of transcribed gene fusions in single cells. *Cell Rep*, 2014, **6**(1): 18-23
- [41] Barreca A, Martinengo C, Annaratone L, *et al.* Inter- and intratumoral heterogeneity of BCL2 correlates with IgH expression and prognosis in follicular lymphoma. *Blood Cancer J*, 2014, **4**(10): e249
- [42] Kim S H, Wi J H, Gwak H, *et al.* Single-cell FISH analysis reveals distinct shifts in PKM isoform populations during drug resistance acquisition. *Biomolecules*, 2022, **12**(8): 1082
- [43] Shaffer S M, Dunagin M C, Torborg S R, *et al.* Rare cell variability and drug-induced reprogramming as a mode of cancer drug resistance. *Nature*, 2017, **546**(7658): 431-435
- [44] Nelles D A, Fang M Y, O'connell M R, *et al.* Programmable RNA tracking in live cells with CRISPR/Cas9. *Cell*, 2016, **165**(2): 488-496
- [45] Stöhr N, Lederer M, Reinke C, *et al.* ZBP1 regulates mRNA stability during cellular stress. *J Cell Biol*, 2006, **175**(4): 527-534
- [46] Vargas D Y, Shah K, Batish M, *et al.* Single-molecule imaging of transcriptionally coupled and uncoupled splicing. *Cell*, 2011, **147**(5): 1054-1065
- [47] Waks Z, Klein A M, Silver P A. Cell-to-cell variability of alternative RNA splicing. *Mol Syst Biol*, 2011, **7**: 506
- [48] Levesque M J, Ginart P, Wei Y, *et al.* Visualizing SNVs to quantify allele-specific expression in single cells. *Nat Methods*, 2013, **10**(9): 865-867
- [49] Hansen C H, Van Oudenaarden A. Allele-specific detection of single mRNA molecules *in situ*. *Nat Methods*, 2013, **10**(9): 869-871
- [50] Ginart P, Kalish J M, Jiang C L, *et al.* Visualizing allele-specific expression in single cells reveals epigenetic mosaicism in an H19 loss-of-imprinting mutant. *Genes Dev*, 2016, **30**(5): 567-578
- [51] Robinson-Thiewes S, McCloskey J, Kimble J. Two classes of active transcription sites and their roles in developmental

- regulation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2020, **117**(43): 26812-26821
- [52] Phillips N E, Hugues A, Yeung J, *et al.* The circadian oscillator analysed at the single-transcript level. *Mol Syst Biol*, 2021, **17**(3): e10135
- [53] Ferraro T, Esposito E, Mancini L, *et al.* Transcriptional memory in the *Drosophila* embryo. *Curr Biol*, 2016, **26**(2): 212-218
- [54] Dirusso J A, Clark A T. Transposable elements in early human embryo development and embryo models. *Curr Opin Genet Dev*, 2023, **81**: 102086
- [55] Hayward A, Gilbert C. Transposable elements. *Curr Biol*, 2022, **32**(17): R904-R909
- [56] Huang X, Lin X, Liu F, *et al.* The rise of developmental biology in China. *Dev Growth Differ*, 2022, **64**(2): 106-115
- [57] Holt C E, Martin K C, Schuman E M. Local translation in neurons: visualization and function. *Nat Struct Mol Biol*, 2019, **26**(7): 557-566
- [58] Mitchell J, Smith C S, Titlow J, *et al.* Selective dendritic localization of mRNA in *Drosophila* mushroom body output neurons. *Elife*, 2021, **10**: e62770
- [59] Wefers Z, Alecki C, Huang R, *et al.* Analysis of the expression and subcellular distribution of eEF1A1 and eEF1A2 mRNAs during neurodevelopment. *Cells*, 2022, **11**(12): 1877
- [60] Browne G J, Proud C G. Regulation of peptide-chain elongation in mammalian cells. *Eur J Biochem*, 2002, **269**(22): 5360-5368
- [61] Mitchell J, Chao J A. Single-molecule mRNA and translation imaging in neurons. *Biochem Soc Trans*, 2021, **49**(5): 2221-2227
- [62] Duncan S, Olsson T S G, Hartley M, *et al.* A method for detecting single mRNA molecules in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Methods*, 2016, **12**: 13
- [63] Donaldson L. Autofluorescence in plants. *Molecules*, 2020, **25**(10): 2393
- [64] Huang K, Batish M, Teng C, *et al.* Quantitative fluorescence *in situ* hybridization detection of plant mRNAs with single-molecule resolution. *Methods Mol Biol*, 2020, **2166**: 23-33
- [65] Duncan S, Johansson H E, Ding Y. Reference genes for quantitative *Arabidopsis* single molecule RNA fluorescence *in situ* hybridization. *J Exp Bot*, 2023, **74**(7): 2405-2415
- [66] Maekiniemi A, Singer R H, Tutucci E. Single molecule mRNA fluorescent *in situ* hybridization combined with immunofluorescence in *S. cerevisiae*: dataset and quantification. *Data Brief*, 2020, **30**: 105511
- [67] Zhao L, Fonseca A, Meschichi A, *et al.* Whole-mount smFISH allows combining RNA and protein quantification at cellular and subcellular resolution. *Nat Plants*, 2023, **9**(7): 1094-1102
- [68] Suomalainen M, Greber U F. Virus infection variability by single-cell profiling. *Viruses*, 2021, **13**(8): 1568
- [69] Lee J Y, Wing P A C, Gala D S, *et al.* Absolute quantitation of individual SARS-CoV-2 RNA molecules provides a new paradigm for infection dynamics and variant differences. *Elife*, 2022, **11**: e74153
- [70] Geravandi S, Richardson S, Pugliese A, *et al.* Localization of enteroviral RNA within the pancreas in donors with T1D and T1D-associated autoantibodies. *Cell Rep Med*, 2021, **2**(8): 100371
- [71] Hu H L, Srinivas K P, Wang S, *et al.* Single-cell transcriptomics identifies Gadd45b as a regulator of herpesvirus-reactivating neurons. *EMBO Rep*, 2022, **23**(2): e53543
- [72] Vincent F, Sheyn U, Porat Z, *et al.* Visualizing active viral infection reveals diverse cell fates in synchronized algal bloom demise. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2021, **118**(11): e2021586118
- [73] Roovers E F, Bartscherer K. Single-molecule fluorescent *in situ* hybridization (smFISH) on Whole-Mount Planarians. *Methods Mol Biol*, 2023, **2680**: 93-106
- [74] Piskadlo E, Eichenberger B T, Giorgetti L, *et al.* Design, labeling, and application of probes for RNA smFISH. *Methods Mol Biol*, 2022, **2537**: 173-183

## Technique and Application of Single-molecule Fluorescence *in situ* Hybridization\*

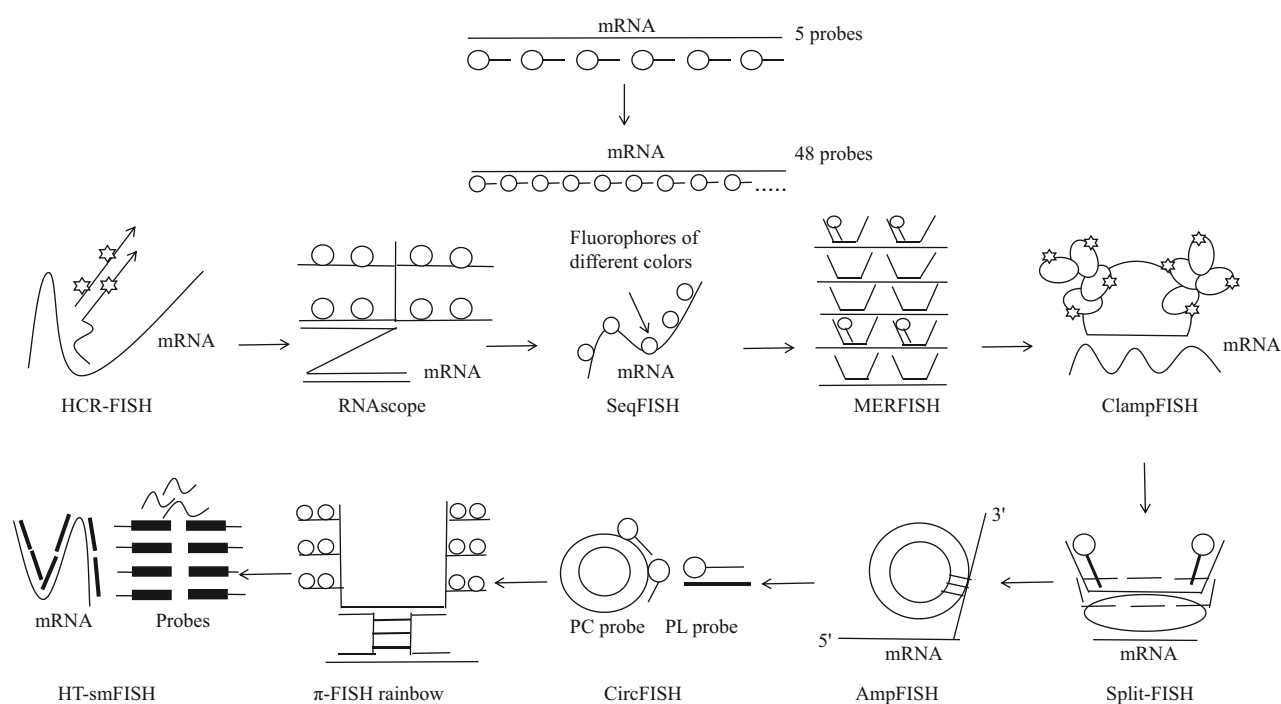
RUI Han<sup>1)</sup>, SUN Zheng-Long<sup>1,2)\*\*</sup>, GUAN Miao<sup>3)\*\*</sup>

<sup>1)</sup>State Key Laboratory of Primate Biomedical Research, Institute of Primate Translational Medicine, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China;

<sup>2)</sup>Bio-imaging Lab, Shenzhen Bay Laboratory, Shenzhen 518107, China;

<sup>3)</sup>Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

### Graphical abstract



**Abstract** Single molecule fluorescence *in situ* hybridization (smFISH) is a method for imaging single mRNA molecule in fixed cell or tissue using oligonucleotide probes coupled with fluorophores. It can realize real-time study of interested transcripts by RNA localization and quantification. smFISH is widely suitable for many types of biological samples such as cell and tissue sections. It was invented in 1982 which opened up the application of visualizing single molecules. However, due to its shortcomings such as poor binding specificity, Raj *et al.*

\* This work was supported by grants from The Natural Science Foundation of Yunnan Province (202001BC070001, 202102AA100053), Shenzhen Bay Laboratory Open Program (SZBL2021080601012), and Shenzhen Bay Laboratory-Evident Company Cooperation Fund.

\*\* Corresponding author.

SUN Zheng-Long. Tel: 86-13584804523, E-mail: sunzl@lpbr.cn

GUAN Miao. Tel: 86-13584851257, E-mail: mguan2021@hotmail.com

Received: July 12, 2023 Accepted: November 15, 2023



optimized this technique in 2008, using 48 independent probes that were separately coupled with fluorophores to locate transcripts. In contrast, methods using multiple labeled probes can distinguish false positive or false negative results due to a single probe misbinding or unbinding event. However, with the continuous application of the technique, it was found that the scheme still has many technical defects, such as low probe specificity, weak fluorescence intensity, low hybridization efficiency, and high background fluorescence. Since then, a series of derivative technologies have been developed. For example, HCR-FISH is a multi-fluorescence *in situ* hybridization method based on orthogonal amplification and hybridization chain reaction, which significantly improves the problem of weak signal. SeqFISH amplifies the signal and reduces nonspecific binding by continuously hybridizing the mRNA in the cell, imaging it, and stripping the probe in order to barcode RNA. MERFISH utilizes combination labeling, continuous imaging and other technologies to increase detection throughput, and uses binary barcodes to offset single-molecule labeling and detection errors, with more advanced built-in error correction functions to effectively improve the accuracy of results. ClampFISH uses biological orthogonal click chemistry to effectively lock the probe around the target and prevent the probe from disengaging in amplification microscopy. RNAscope amplifies its own signal while simultaneously suppressing the background by using novel probe design strategy and hybridization-based signal amplification system. Split-FISH uses splitting probes for signal enhancement to accurately detect single RNA molecule in complex tissue environments. AmpFISH achieves imaging of short RNA molecules by preparing long single-strand DNA concatemers through controlled rolling circle amplification. CircFISH uses two unique sets of probes (PC probes and PL probes) to distinguish between linear and circular RNAs.  $\pi$ -FISH rainbow enables simultaneous detection of DNA, RNA, and proteins at the single-molecule level with  $\pi$ -FISH target probes. HT-smFISH is more suitable for large or high throughput form of systematic experiments. With the development of technology, the subsequent data analysis process is particularly important. Different analysis software, such as dotdotdot and FISH-quant v2, also improve the process of smFISH. The excellent ability of smFISH to visualize single molecule of RNA makes that it is widely used in basic biological disciplines such as tumor biology, developmental biology, neurobiology, botany, virology. In this paper, we reviewed the basic principle of smFISH technology, its development process and improvement, limitations of smFISH technology and how to avoid them, its derivative technologies include HCR-FISH, SeqFISH, MERFISH, ClampFISH, RNAscope, Split-FISH, AmpFISH, CircFISH,  $\pi$ -FISH rainbow and HT-smFISH. The application progress of smFISH in different biological disciplines, such as developmental biology, tumor biology, neurobiology. Finally, the development prospect of smFISH technology is prospected.

**Key words** single-molecule fluorescence *in situ* hybridization, oligonucleotide probe, RNA, imaging

**DOI:** 10.16476/j.pibb.2023.0275