

# High-throughput single-cell gene-expression profiling with multiplexed error-robust fluorescence in situ hybridization

Jeffrey R. Moffitt<sup>a,b,1,2</sup>, Junjie Hao<sup>a,b,1</sup>, Guiping Wang<sup>a,b,1</sup>, Kok Hao Chen<sup>a,b</sup>, Hazen P. Babcock<sup>c</sup>, and Xiaowei Zhuang<sup>a,b,c,d,2</sup>

---

报告人：徐 青  
2016年12月7日

Background

Materials and Methods

Results

Discussion

# 庄小威 (Xiaowei Zhuang)

1972年 出生于江苏省如皋县

1987年 毕业于苏州中学的科大少年班预备班

1991年 获得中国科学技术大学物理学学士

1997年 获美国加州大学伯克利分校物理学博士

2006年 成为哈佛的化学和物理双学科正教授

2012年 当选为美国国家科学院院士

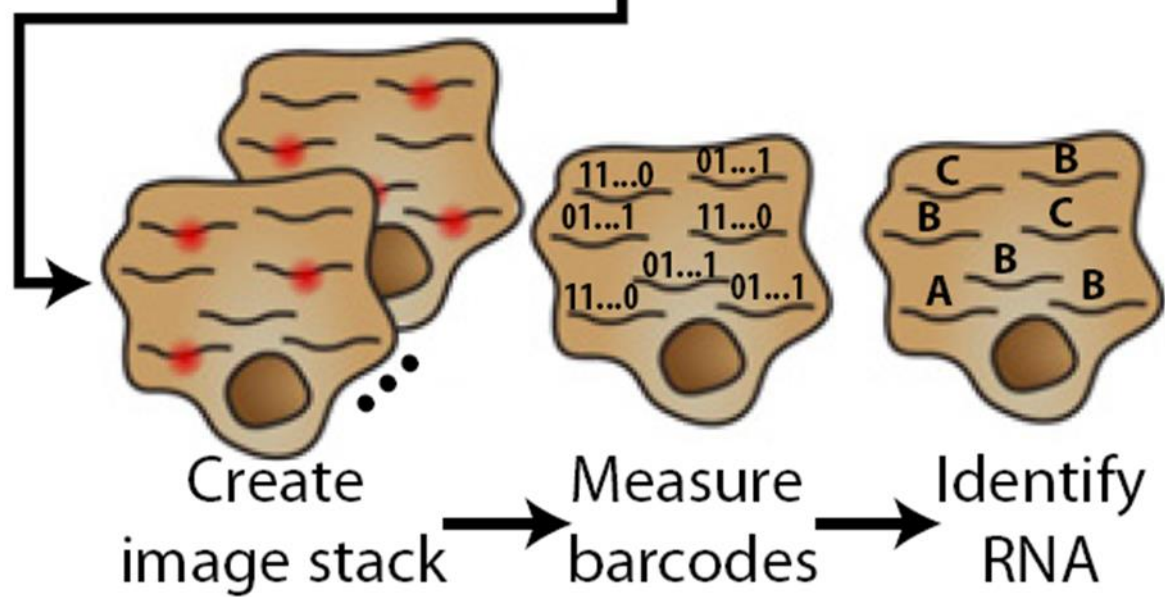
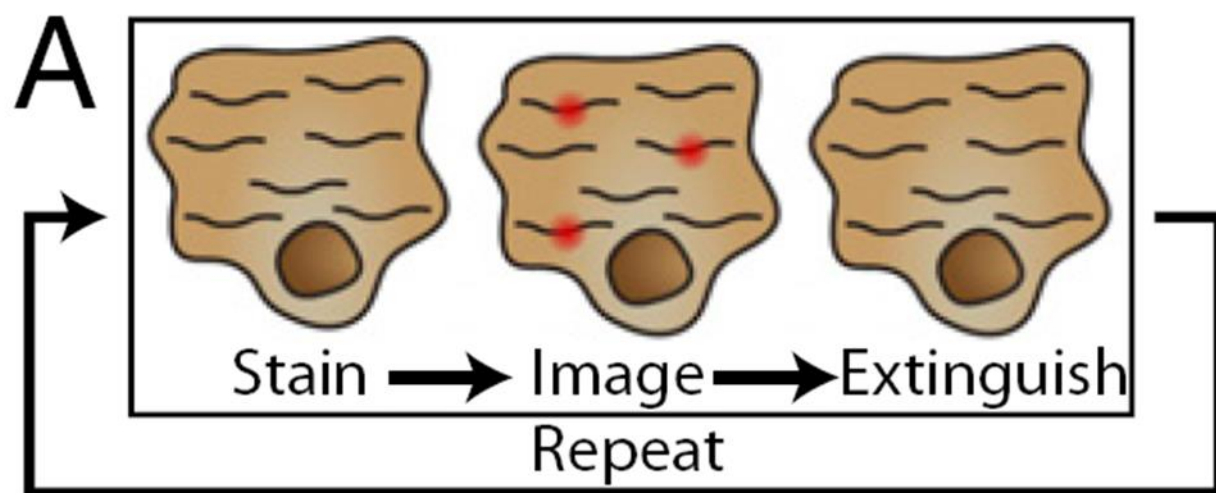
2015年 当选中国科学院外籍院士

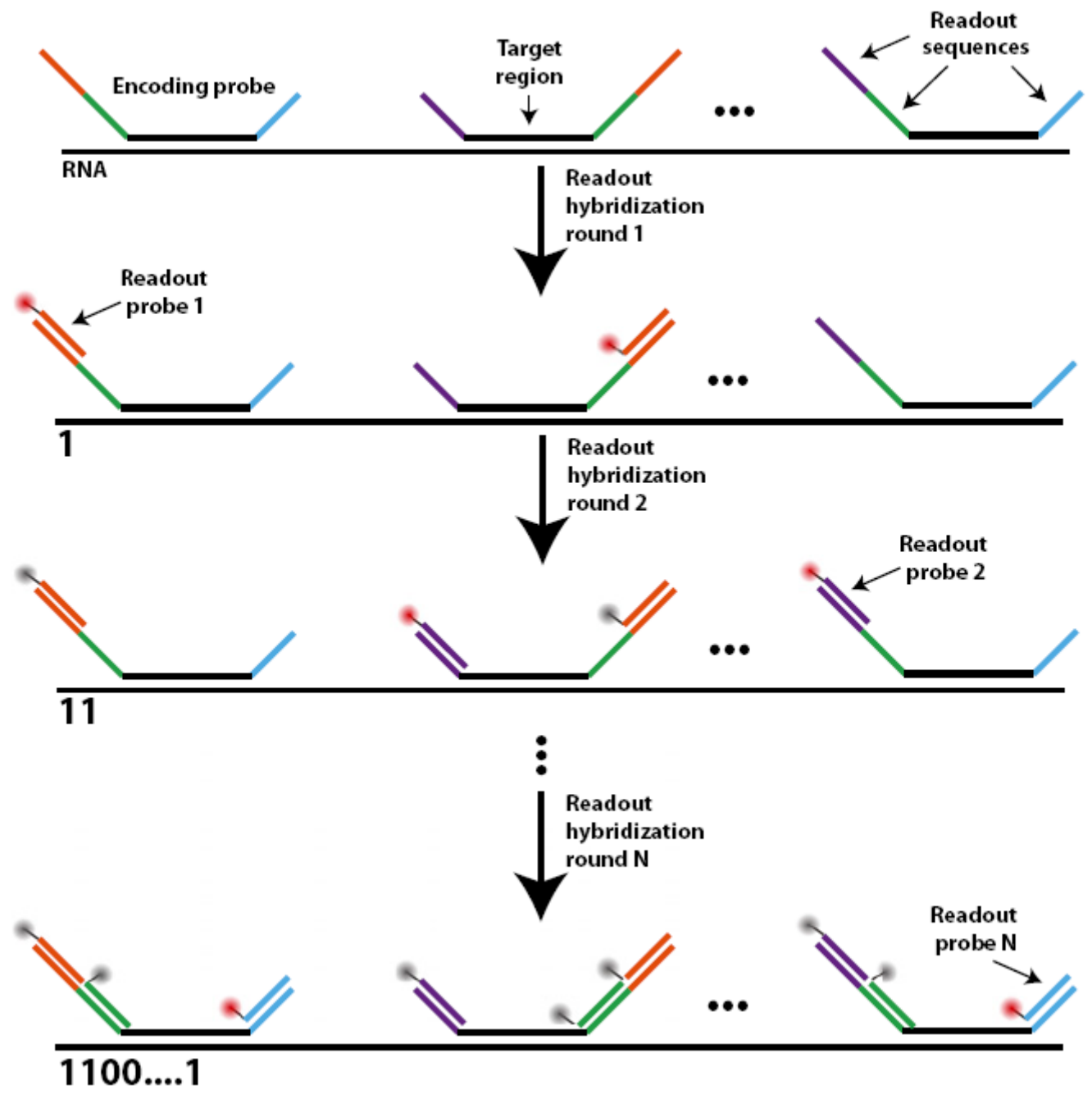


“我的秘诀就是忘掉过去的成功和失败，一切从头开始，绝不轻言放弃。”

——庄小威

- FISH (fluorescence in situ hybridization)
- smFISH (single molecule fluorescence in situ hybridization )
- MERFISH (multiplexed error-robust fluorescence in situ hybridization)





# Significance:

- 不仅量化了细胞内RNA的拷贝数，而且还定位RNA位置和组织内细胞的空间结构
- 通量的剧烈增加有利于鉴定和研究罕见细胞群以及组织区域内转录组细胞类型的表征



# Materials:

Human U-2 OS cell

UPLSAPO 60XS2, Olympus, sCMOS camera(成像系统)

Wash buffers contained ethylene carbonate

Human transcriptome (hg38) sequences

Encoding probes

Probes with homology to the human transcriptome

Readout probes



# Methods:

- Encoding Probe Design
- Encoding Probe Construction
- Readout Probe Construction
- High-Throughput Imaging Platform
- Encoding Probe Staining
- MERFISH Imaging
- Cell Segmentation.
- RNA-Seq

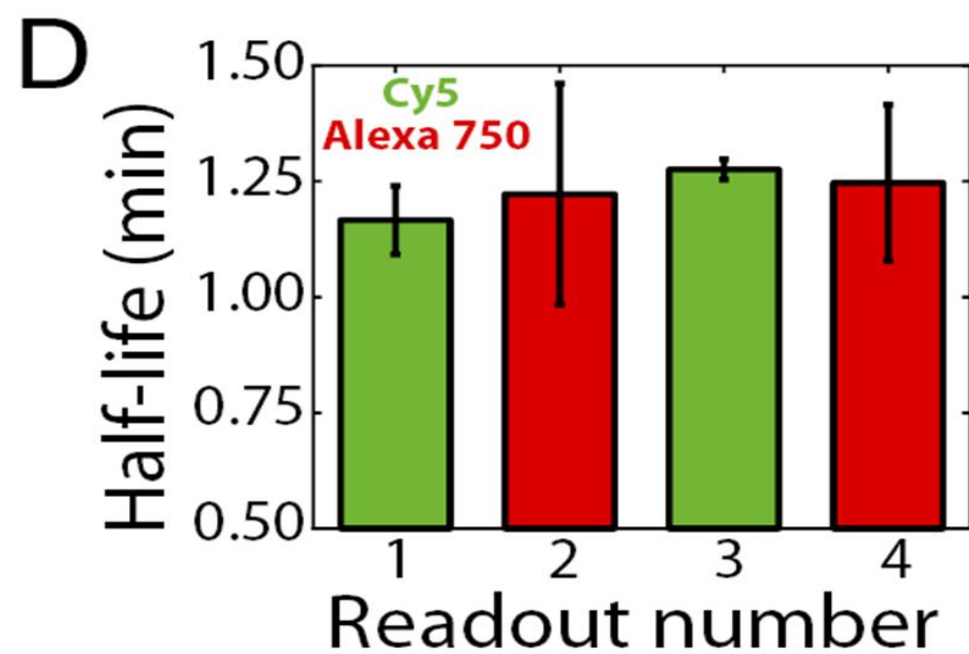
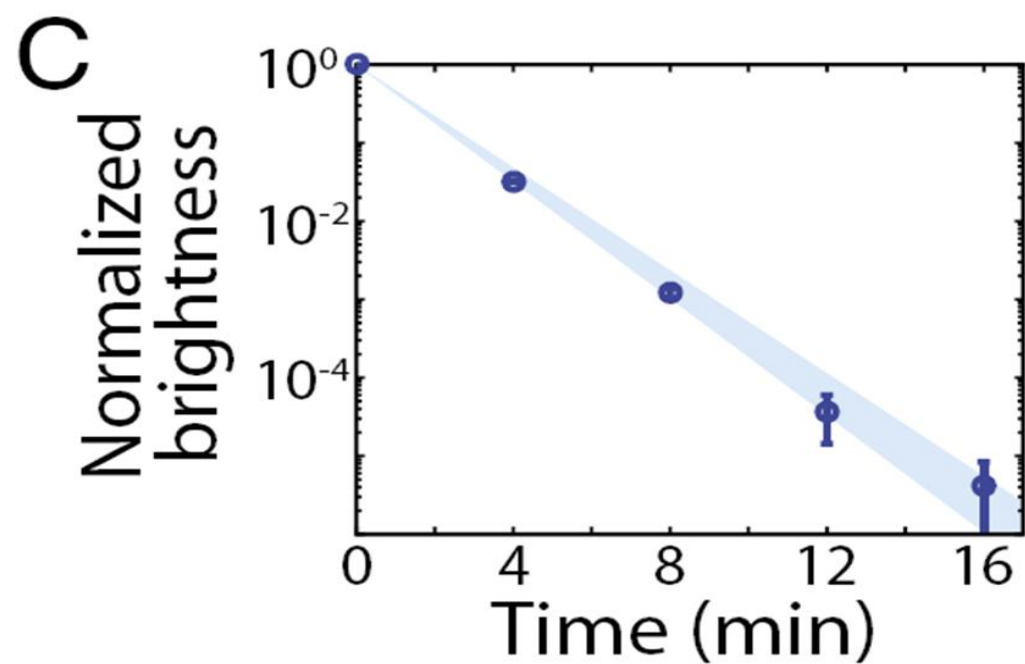
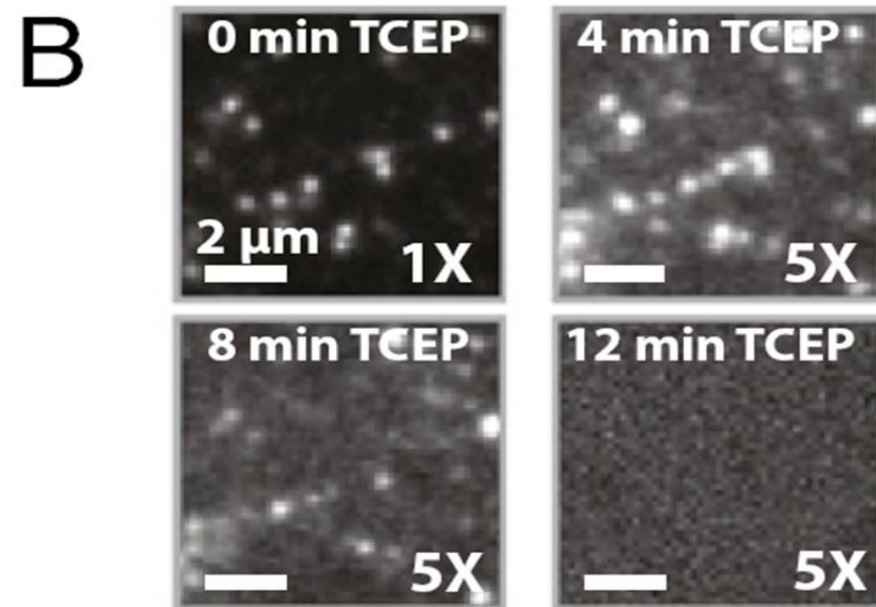
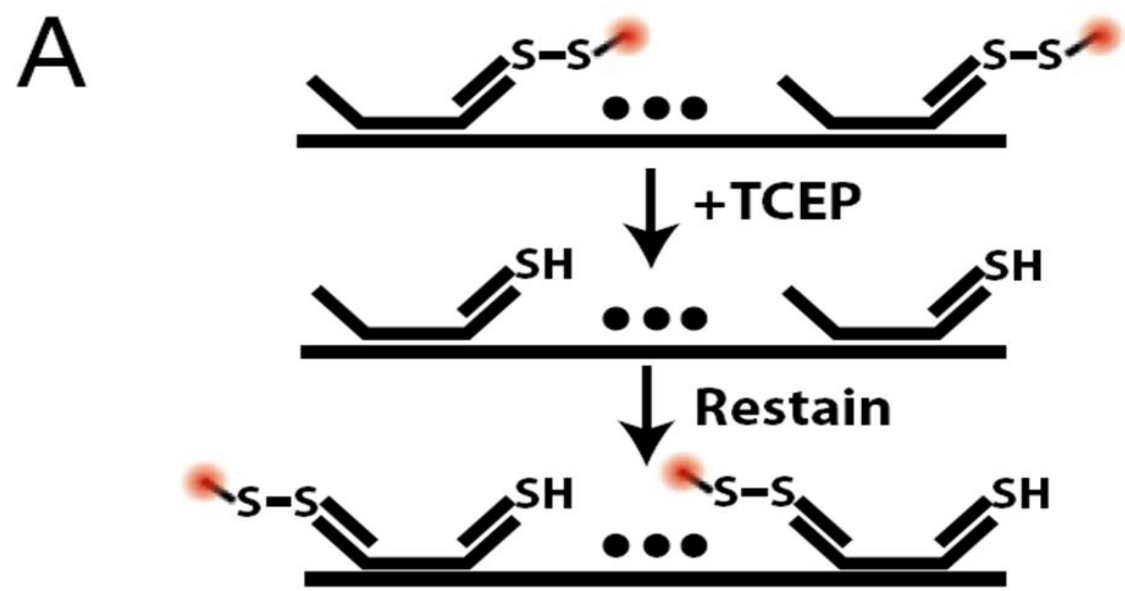


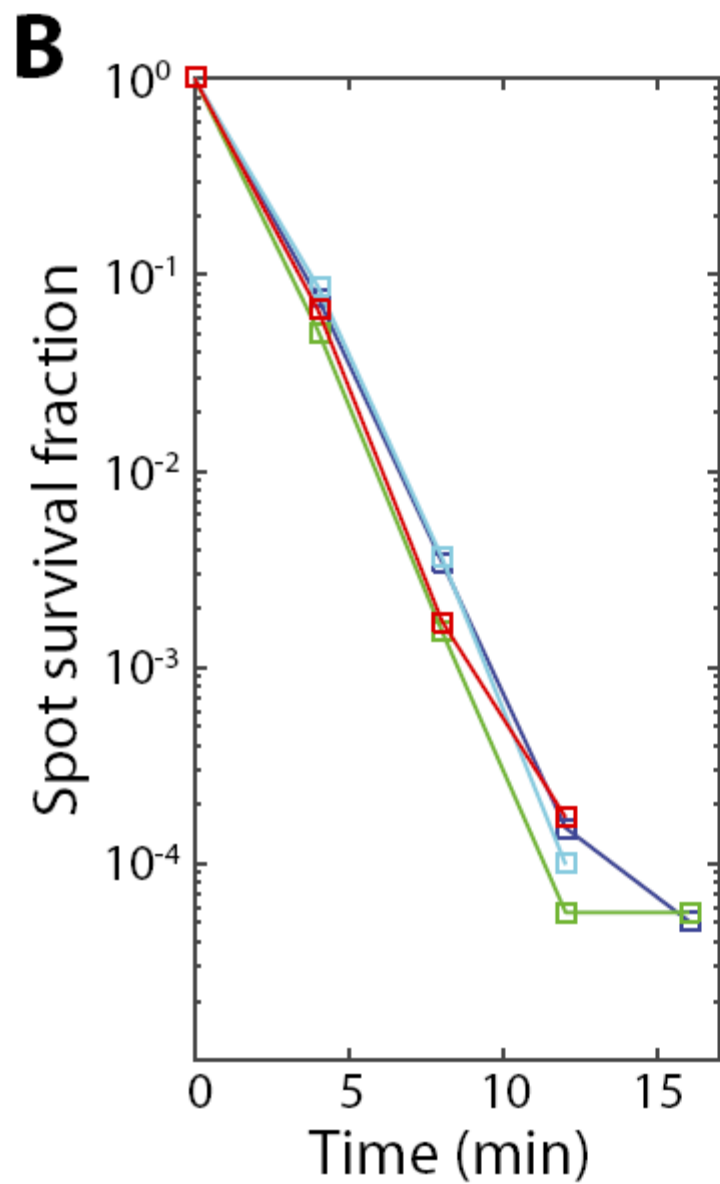
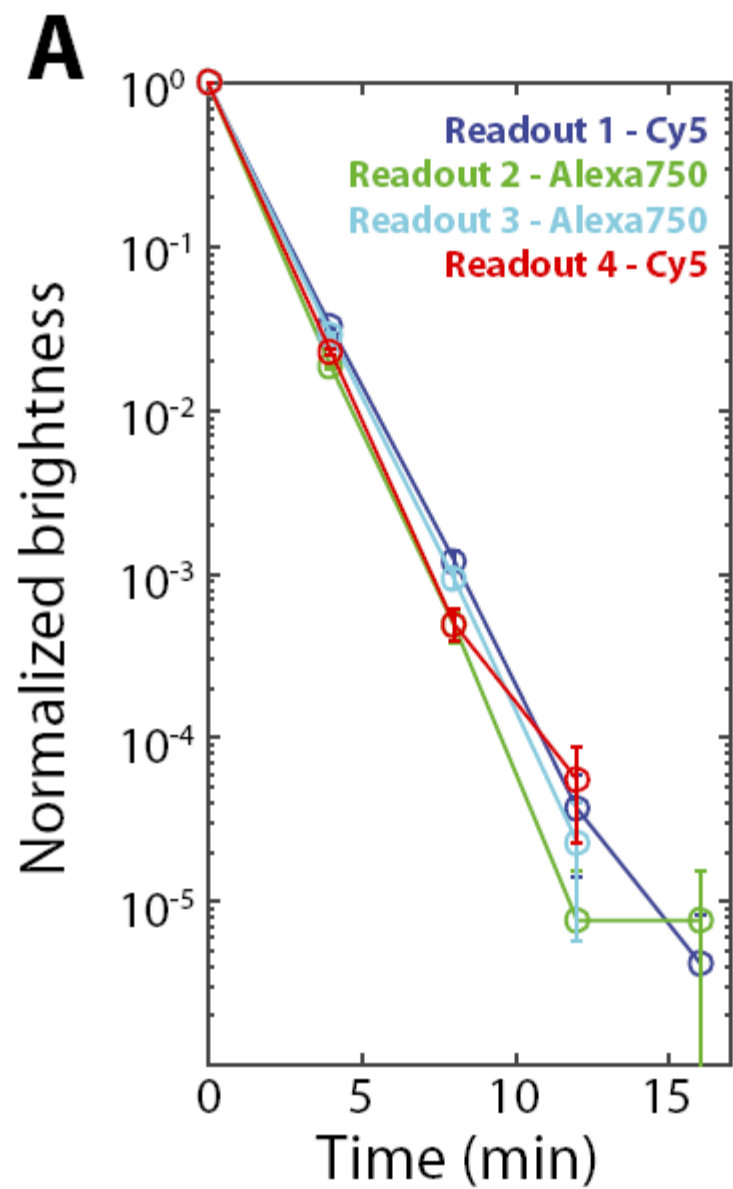
# 结论一：提高MERFISH的通量

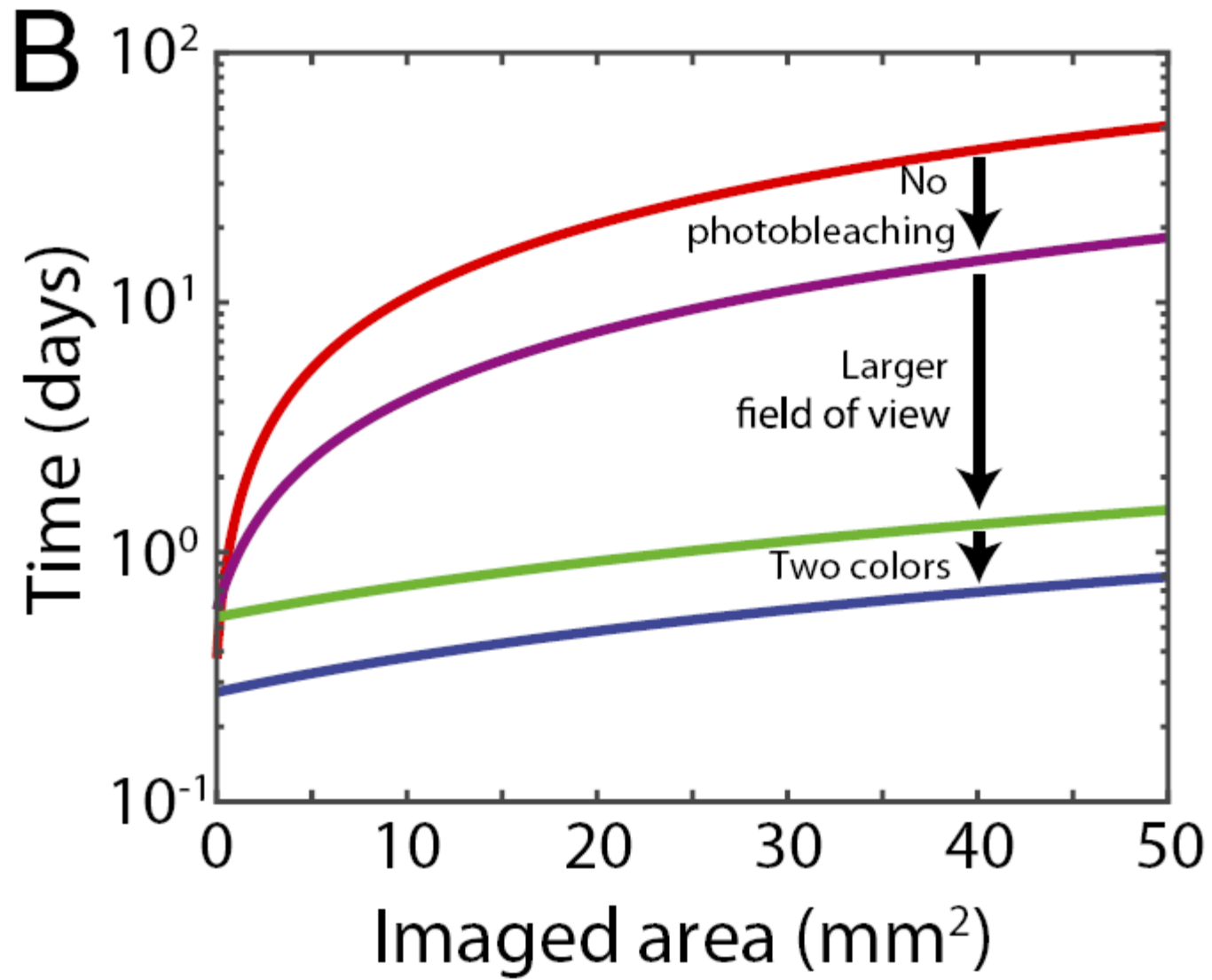
1. 设法减少面积相关时间

2. 扩大FOV尺寸进一步减小面积相关时间

3. 使用多色成像







red line :

uses photobleaching to remove smFISH signal

purple line :

a modified protocol with TCEP

green line :

a modified protocol with TCEP and a larger FOV

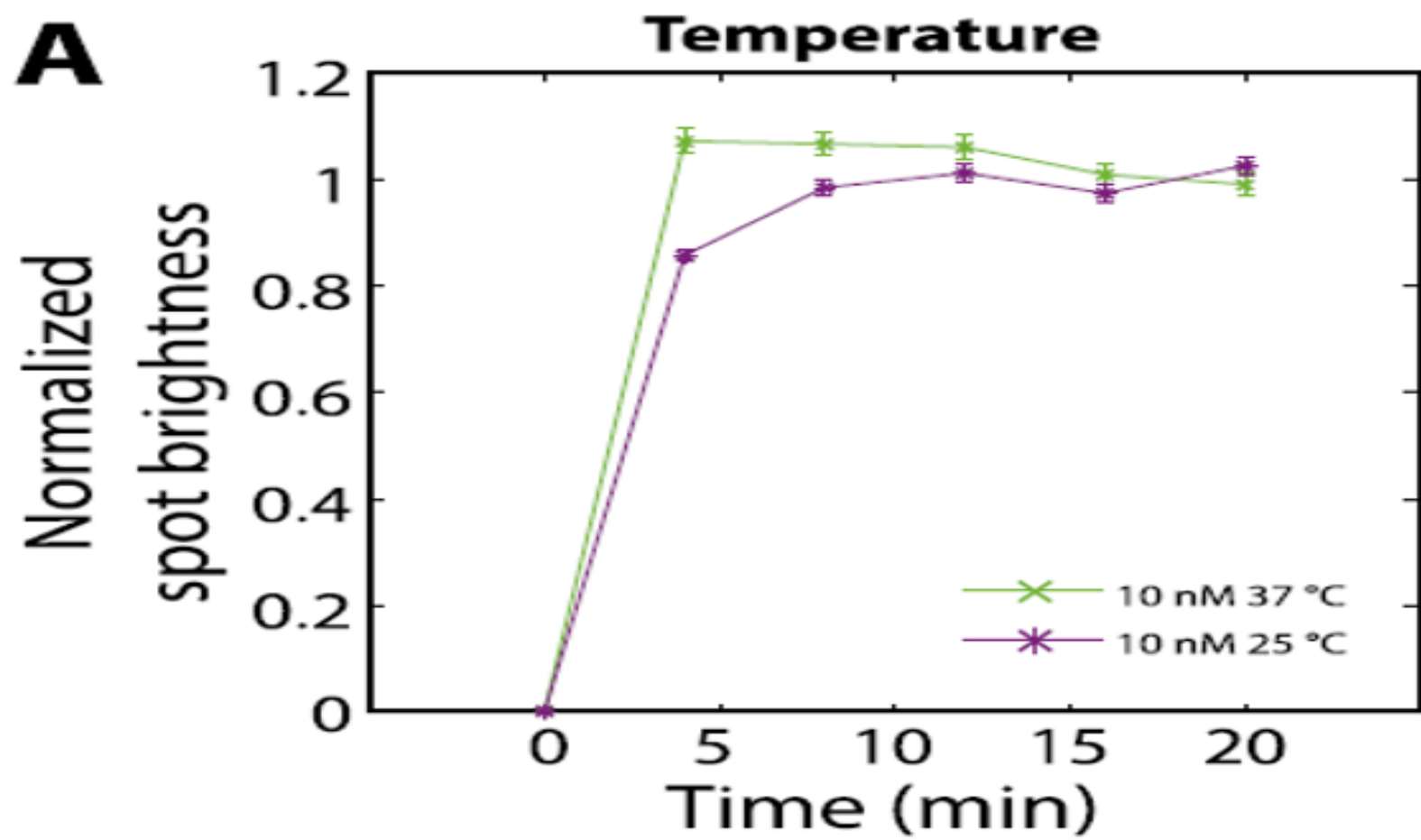
blue line :

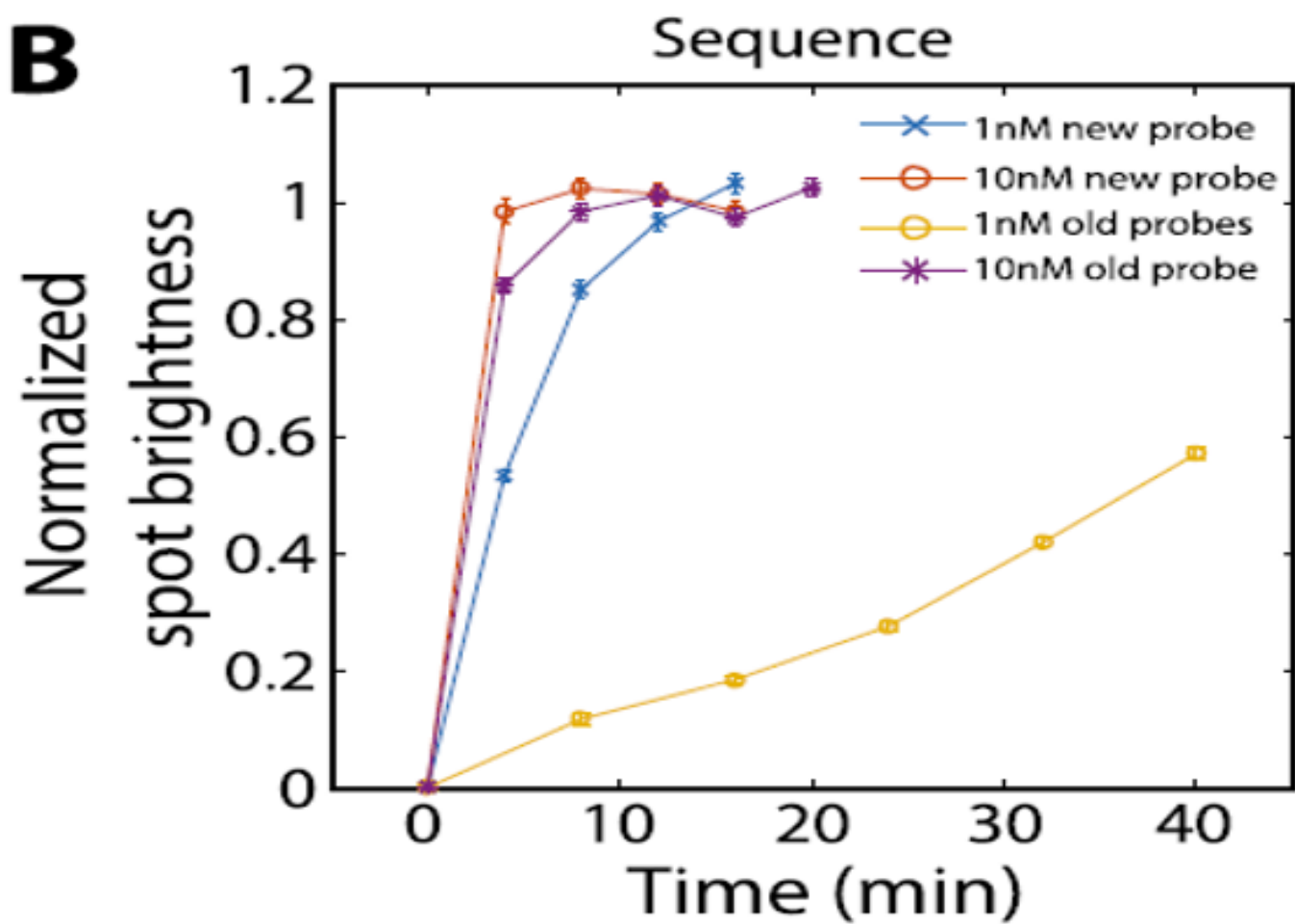
a modified protocol with TCEP, a large FOV, and two-color imaging

## 结论二：提高MERFISH的测量性能

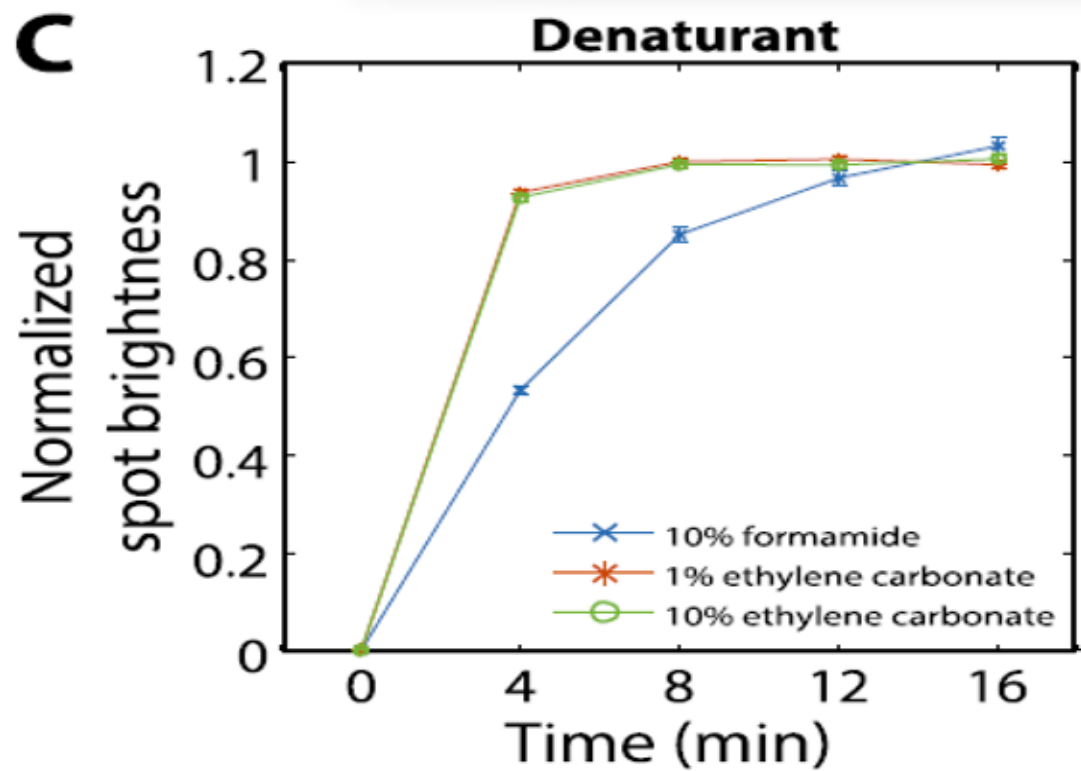
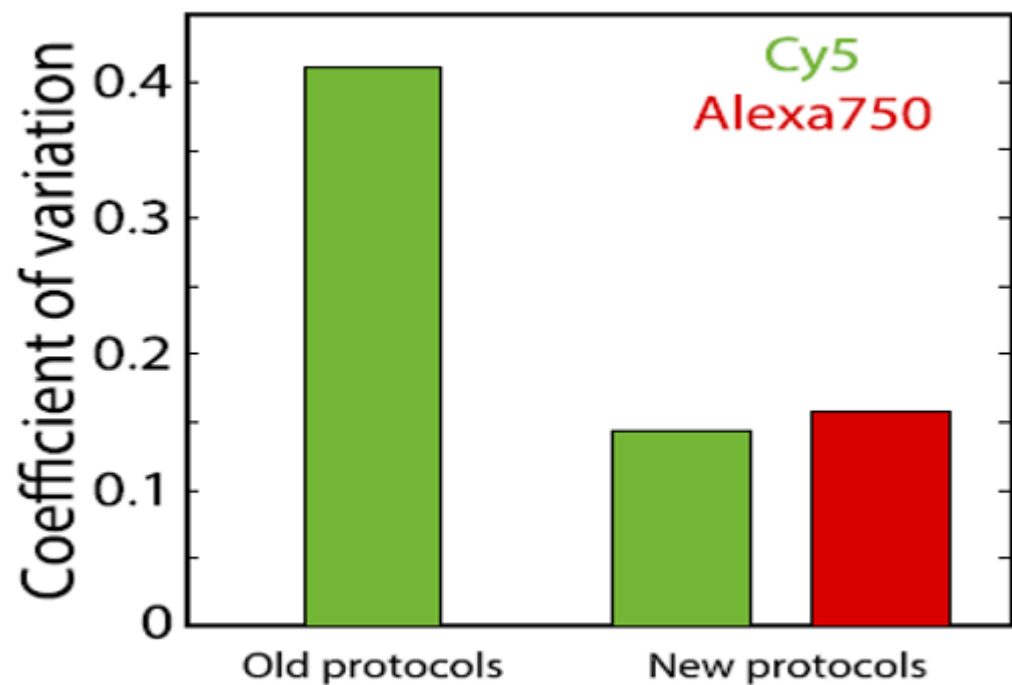
目的：简化测量程序，提高测量鲁棒性

1. 发现读出探针在室温下结合编码探针的速率与37°C 下相似
2. 将读出探针从30nt减小到20nt
3. 用无毒的碳酸亚乙酯代替有毒的甲酰胺

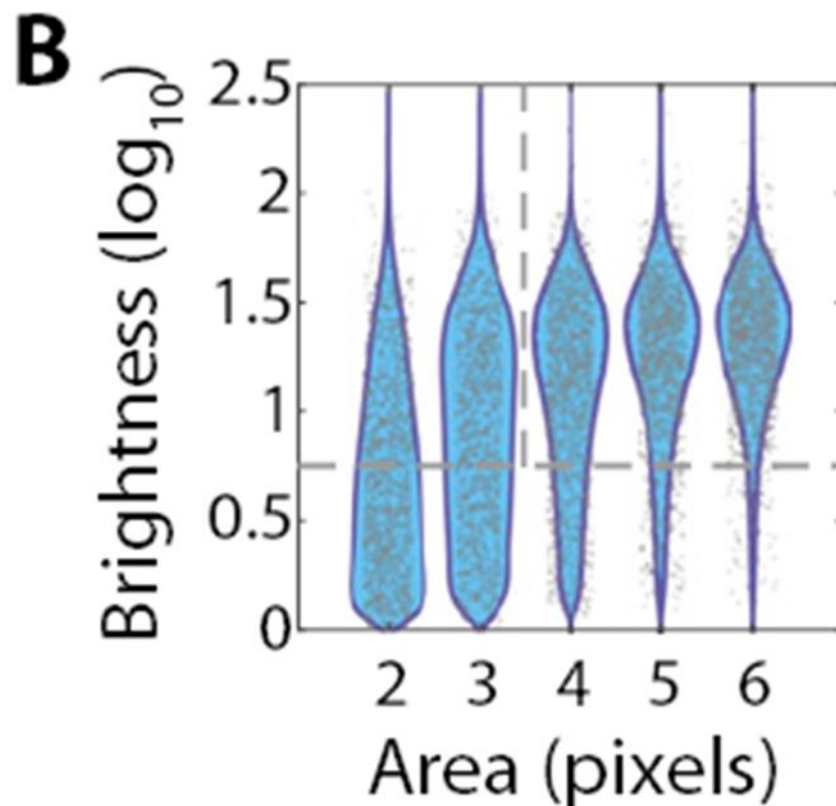
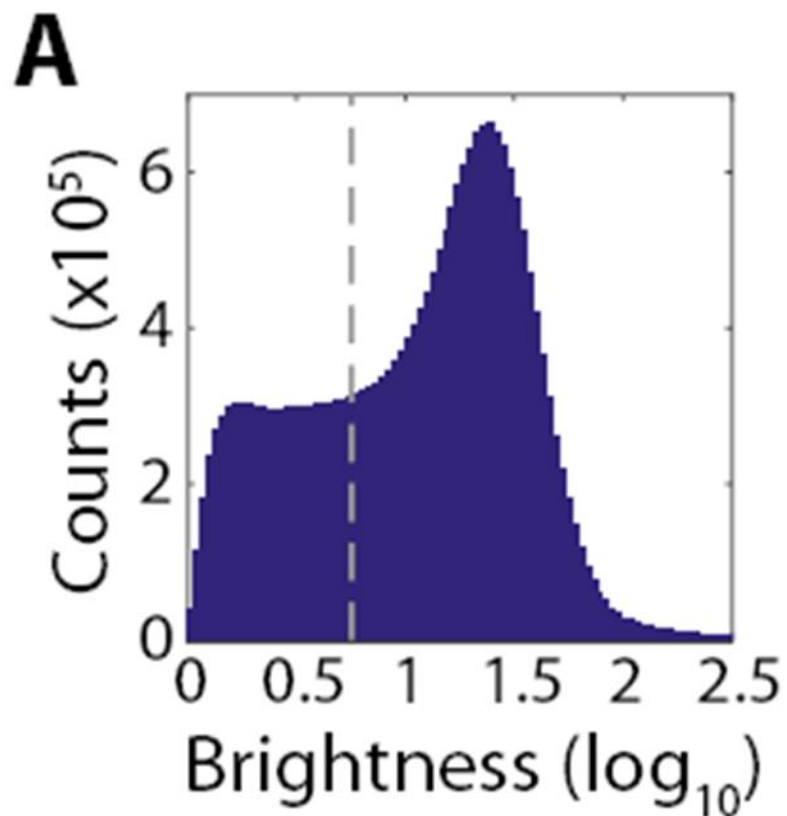
**A**

**B**



**C****D**

# 结论三：开发一种处理高通量MERFISH数据图像的分析算法



## 结论四：高通量MERFISH 测量数万细胞

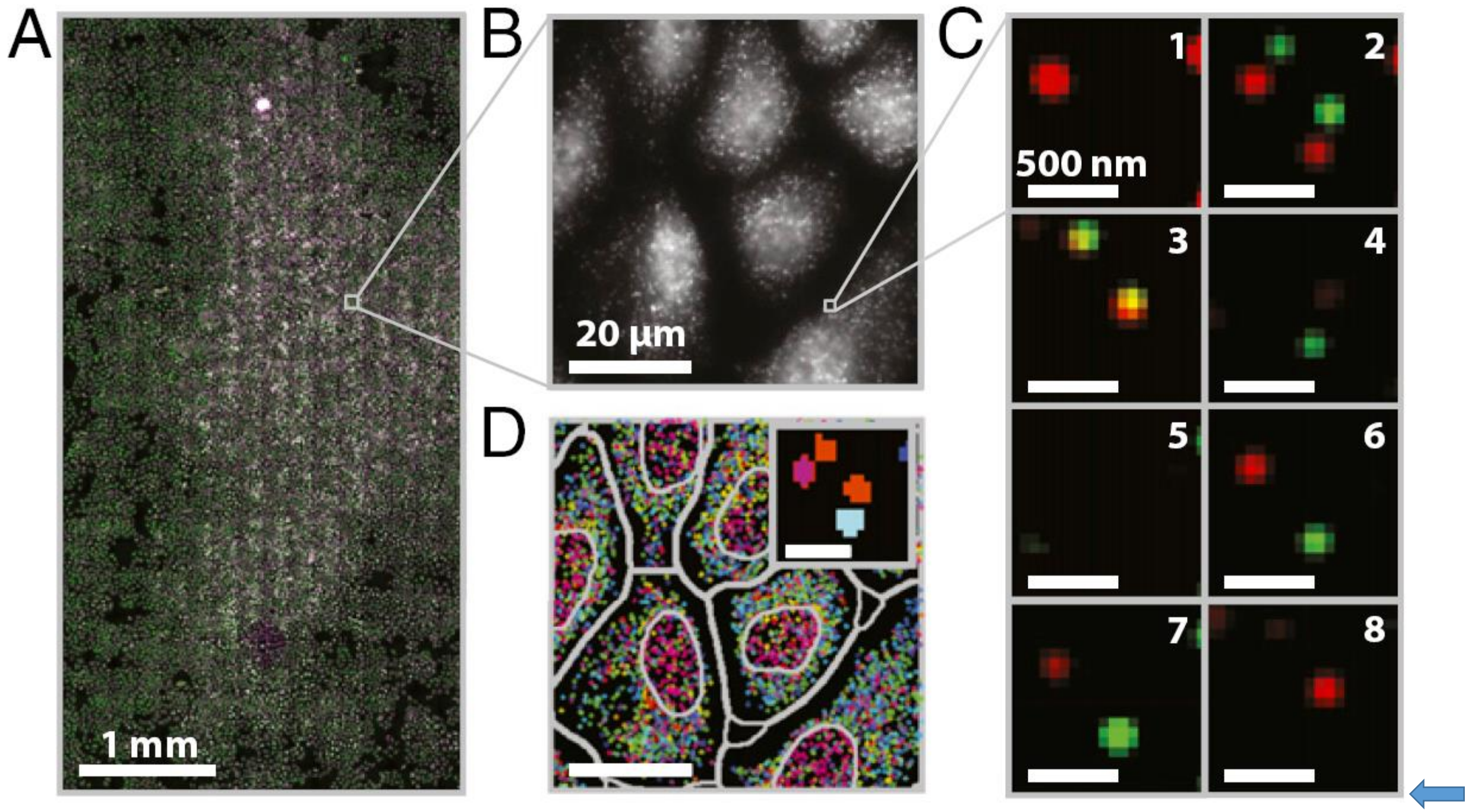
证明通量的提高，在U-2 OS 细胞中测量了130种RNA

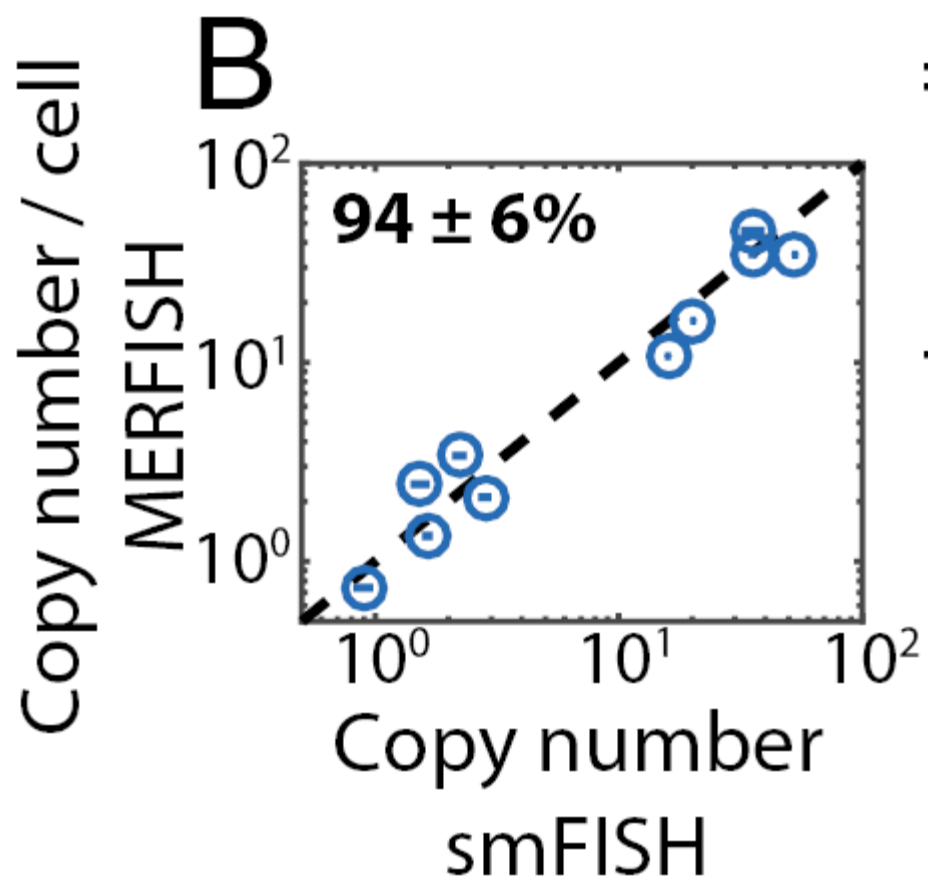
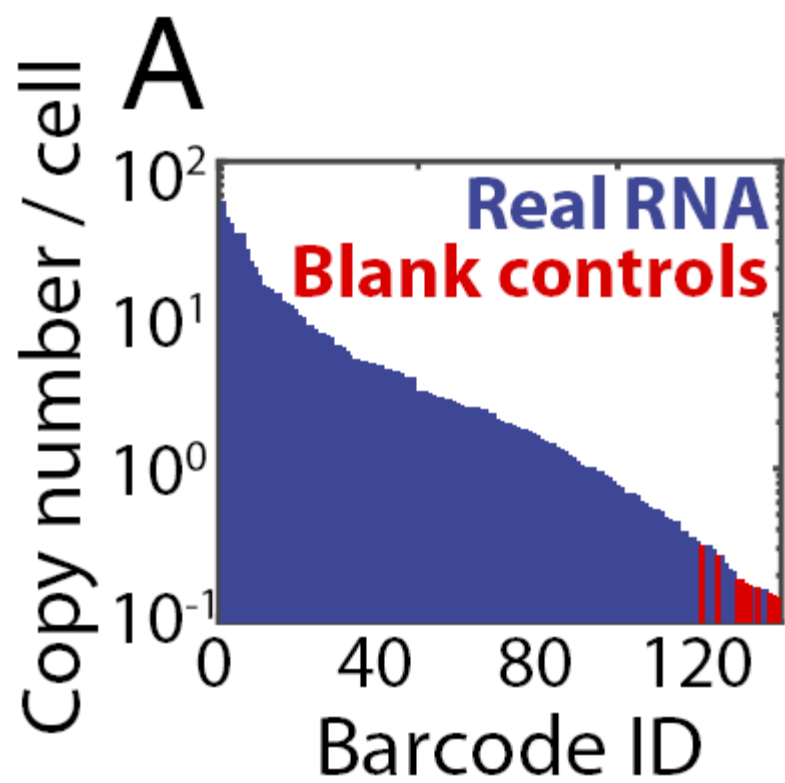
### 确定RNA的解码质量

考虑了每种RNA存在的两种类型的错误：

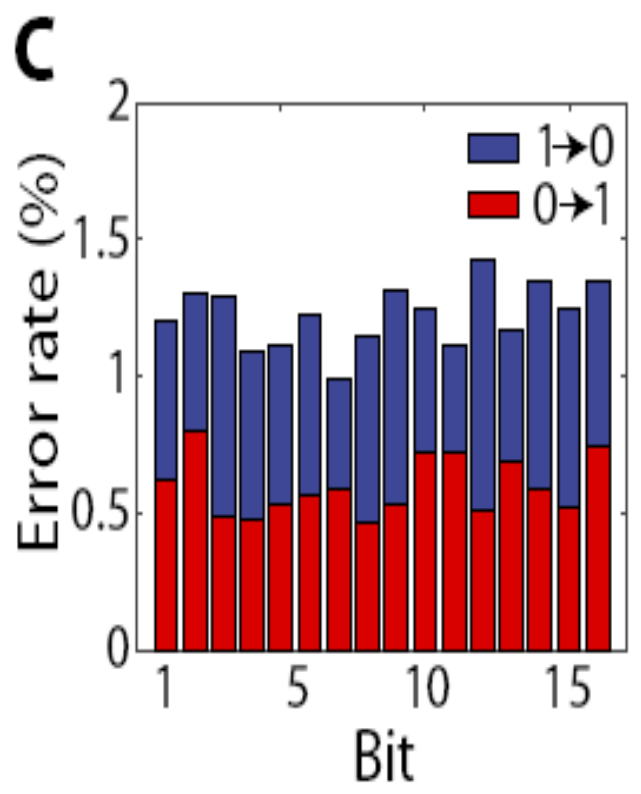
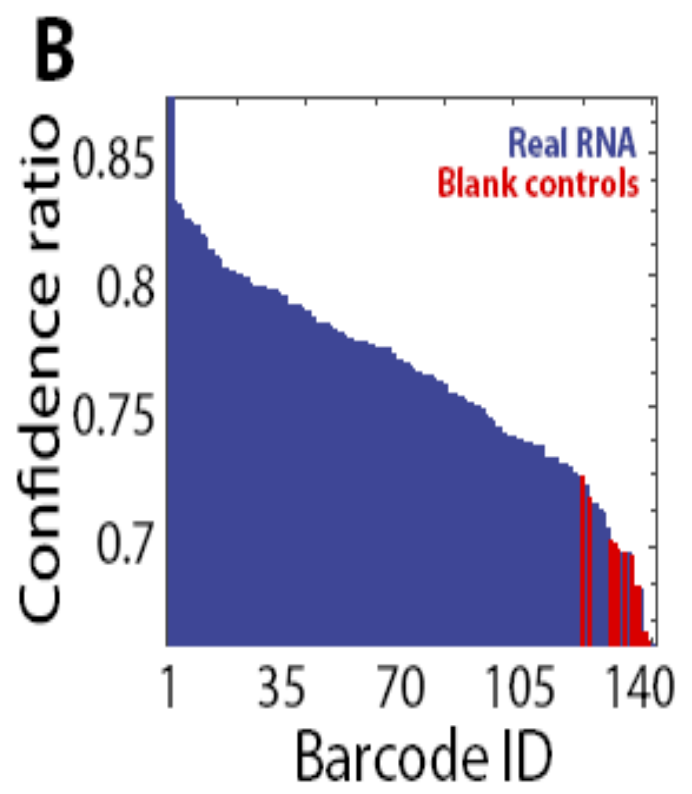
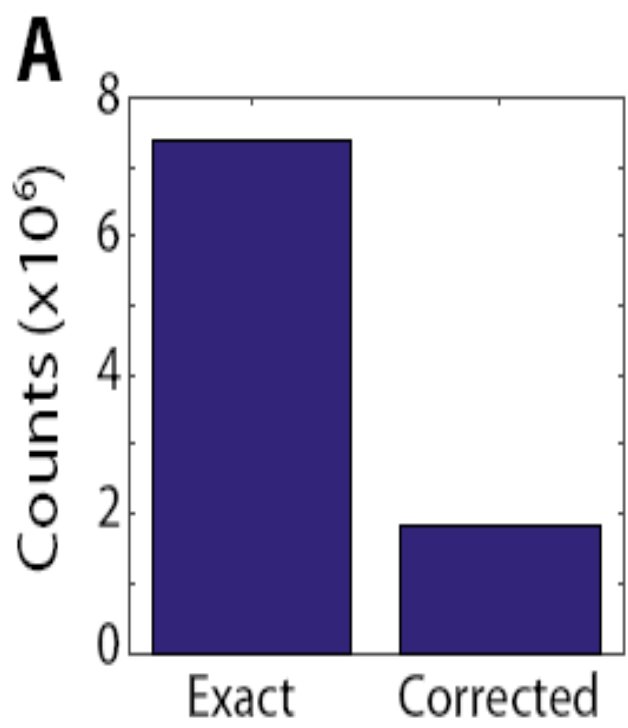
RNA可能被错误识别成错误物种，导致非0的错误识别率

RNA可能被错过，未读出

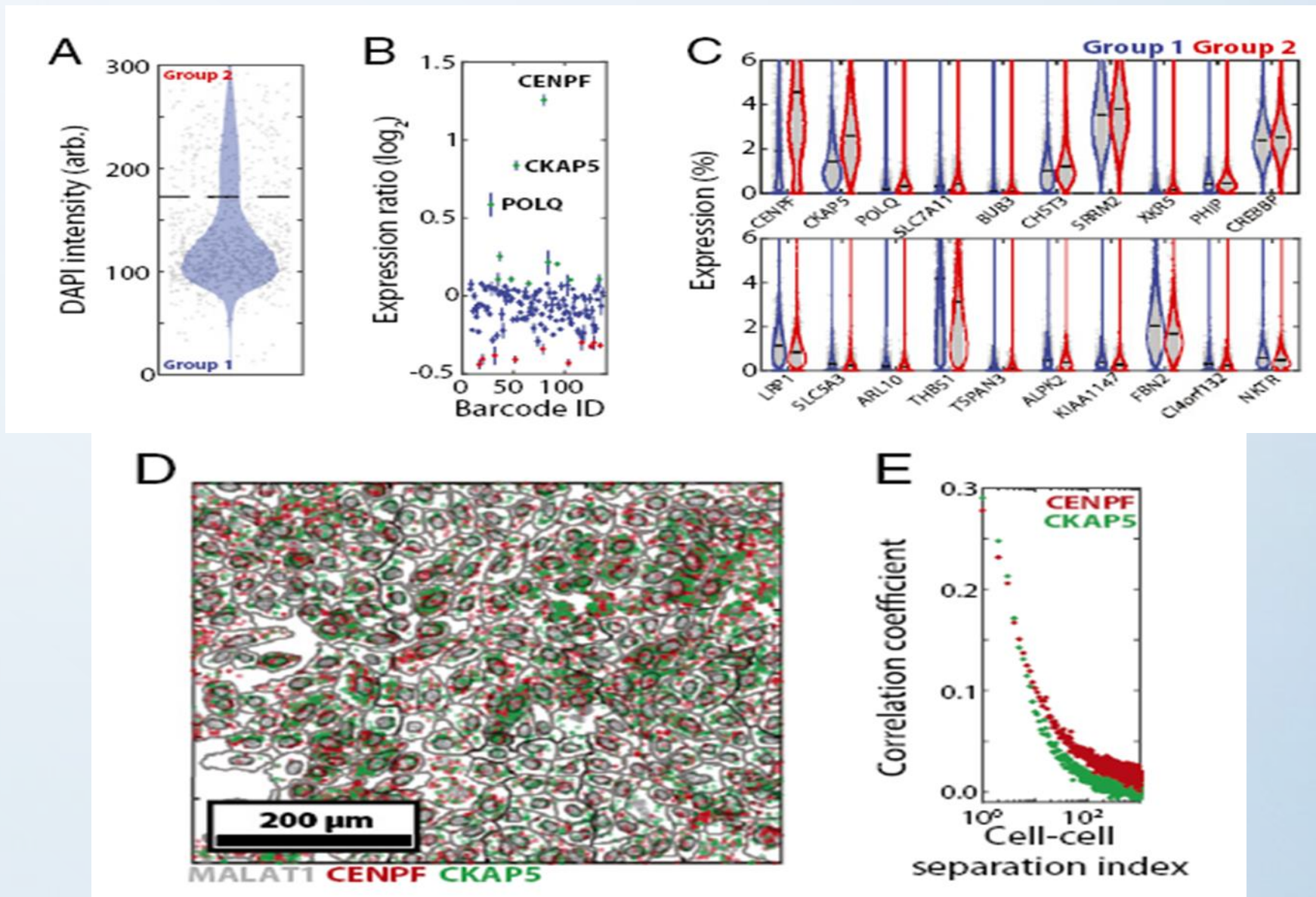








# 结论五：细胞亚群的表征



# Discussion

MERFISH使用大规模多重化smFISH在转录组规模进行单细胞的空间解码RNA，本文采取一定的措施通量提高两个数量级，这种通量的增加可以用于测量数千个RNA，同时扩大了可通过MERFISH解决的问题范围。

## 展望：

- 成像通量的增加将有助于应用MERFISH对大量的组织中的细胞类型进行从头识别。
- 通过进一步优化杂交方案，利用更快的荧光信号去除方案，及光学上的其他改进，以增加FOV面积和减少成像时间，从而进一步增加MERFISH的通量，以表征数百万个单个细胞。



## 个人小结：

创新点：通量提高两个数量级

使用条形码的方式去鉴别不同的RNA

使用无毒的试剂代替有毒的试剂

启发：考虑问题要全面，多角度看待问题，最后才会有所突破、创新

问题：文中用U-2 OS细胞测量了130种RNA，但远远少于所说的可以测量约1000种RNA，还要用实验进一步的验证

文章说使用多色成像，但只是用了双色成像，是否可以用更多颜色去成像，从而减少时间，进一步提高通量，也还需进一步探究

THANKS!

