

(11) Hybridization Chain Reaction (HCR) 法を用いた 新規高感度FISH法の開発

山口 剛士¹・川上 周司^{1,2*}・幡本 将史¹・高橋 優信¹

久保田 健吾³・井町 寛之⁴・荒木 信夫⁵・山口 隆司¹

¹長岡技術科学大学大学院 環境システム工学専攻 (〒940-2188 新潟県長岡市上富岡町1603-1)

²阿南工業高等専門学校 建設システム工学科 (〒774-0017 徳島県阿南市見能林町青木265)

³東北大学大学院 工学研究科 土木工学専攻 (〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉6-6-06)

⁴海洋研究開発機構 海洋・極限環境生物圏領域 (〒237-0061 神奈川県横須賀市夏島町2-15)

⁵長岡工業高等専門学校 環境都市工学科 (〒940-8532 新潟県長岡市西片貝町888)

* E-mail: shuji@anan-nct.ac.jp

高感度FISH法の一つであるTSA-FISH法は、FISH法で検出が困難な活性の低い微生物へ適応されている。しかしTSA-FISH法は、高分子であるHRP酵素を細胞内へ浸透させる必要があり細胞壁処理が必須である。そこで、我々は、酵素を用いなくとも蛍光強度の増幅が可能なhybridization chain reaction (HCR) 法を用い、細胞浸透性が低い微生物群にも適用可能な高感度FISH法であるin situ HCR法の開発を行った。*Escherichia coli*のrRNAを対象に原核生物への適応を検討したところ、FISH法に比べて高い蛍光強度を示した。さらに、微生物活性及び細胞浸透性が低い海洋性細菌に対しin situ HCR法を適用したところ、細胞壁処理を施さずともTSA-FISH法 ($68.5 \pm 3.5\%$) よりも高い検出率 ($80.1 \pm 4.8\%$) を達成した。In situ HCR法は、細胞浸透性が低い微生物群に対しても高感度な検出が可能であり、これまで検出が難しいとされてきた微生物群への適用が期待される。

Key Words : hybridization chain reaction (HCR), in situ HCR, highly sensitive FISH, Microbial community analysis, uncultured microorganisms

1. はじめに

Fluorescence in situ hybridization (FISH) 法は、標的微生物を分離培養を介さずに原位置で検出が可能であり、今や微生物群集構造解析において必須なツールである¹⁾。しかしながら、FISH法で得られる蛍光強度は、rRNAの含有量に依存しているため、貧栄養や至適温度条件外で生息している微生物は、微生物活性の低下とともにrRNAの存在数も減少し検出が困難になる場合がある^{2), 3)}。このような問題に対して、近年、いくつかの高感度FISH法が報告されている⁴⁾⁻⁷⁾。中でもhorseradish peroxidase (HRP) を用いたtyramide signal amplification (TSA)-FISH法はその汎用性の高さから様々なサンプルに適用されている⁸⁾⁻¹²⁾。

Pernthalerらは、微生物活性が低い海洋微生物に対しTSA-FISH法を適用し、FISH法での検出よりも約2倍の検出率を達成できたと報告している¹³⁾。

高感度FISH法の多くは、分子量の大きな酵素や数百塩基からなるポリヌクレオチドプローブを用いることで高い蛍光強度を得ている。また、それら大きな分子を細胞内に透過させるための適切な細胞壁処理が要求される。しかしながら、全ての微生物に一律に効果を示す細胞壁処理方法は報告されておらず、標的微生物に応じて最適な処理方法を検討しているのが現状である¹⁴⁾。

近年、酵素反応を用いない遺伝子増幅技術であるHybridization chain reaction (HCR)¹⁵⁾を利用したFISH法 (in situ HCR法) が真核生物のmRNAを対象に報告された¹⁶⁾。

In situ HCR法の概要を図-1に示す。まず、標的遺伝子に交雑する部位と伸長起点の配列の2つを持つconnectorプローブが標的遺伝子に交雑する。次に、伸長に利用する2種の蛍光標識したプローブがconnectorプローブを伸長起点とし連続的に互い違いに交雑することで蛍光標識のプローブが比例的に標的に結合していく。結果、酵素反応を利用しなくても高い蛍光感度が得られる。In situ HCR法の最大の特徴は、増幅起点（標的配列）が存在しない場合、決して伸長反応が起きない事と、用いるプローブが50塩基程度であることである¹⁵⁾。従ってin situ HCR法は標的の有無を識別可能であり、FISH法に適用する際と同程度の細胞壁処理でも高感度化が可能ではないかと思われる。

本研究の目的は、in situ HCR法を原核生物に適用し、rRNAの低含有量微生物の検出及び細胞壁処理を行わない新規高感度FISH法を開発することである。我々は、原核生物にHCR法を適応するために、まず*Escherichia coli*のrRNAを標的とし細菌の代表的な標的部位であるEUB338領域に対してconnectorプローブを設計し、純粋菌株を用いた実験系にてin situ HCR法を試みた。さらに、微生物活性が低くまた細胞浸透性の低い海洋性細菌¹³⁾に対してin situ HCR法を試み、FISH法及びTSA-FISH法と比較することで高感度FISH法としての優位性及びプローブの浸透性を評価した。

2. 実験方法

(1) モデル微生物の選定及び海洋サンプルの調整

モデル微生物には、*E. coli* (ATCC700296) を選定し、標的分子としてrRNAのEUB338領域とした。また、ネガティブコントロール微生物には、*Methanococcus maripaludis* (JCM13030) を選定した。*M. maripaludis*はJCM (Japan collection of microorganisms, Saitama, Japan) が指示する培地で培養し、*E. coli* は、LB培地で培養した。培養した菌体は対数増殖期に回収後4%パラホルムアルデヒドで4℃、12時間固定し、エタノールとPBS (137 mM NaCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 2.68 mM KCl, 1.47 mM KH₂PO₄ [pH 7.4]) を1:1

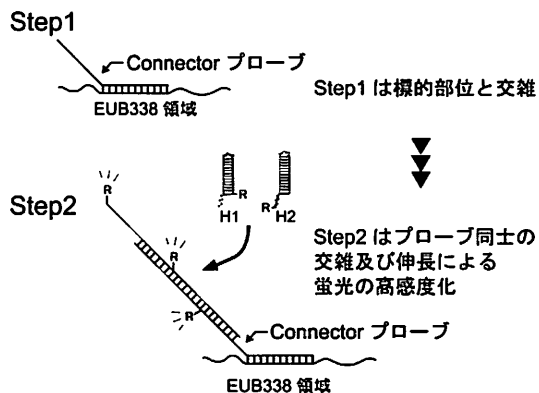


図-1 In situ HCR 法の概要

で混合した溶液中で-20℃で保存した。海洋サンプルは新潟県柏崎市の海岸において海表面の海水を浜辺より採取した（北緯37度32分，東経138度40分，海水温度12.0℃，採取日時2011年3月6日）。サンプルは回収後、上述の方法と同様に固定した。さらに、メンブレンフィルター（pore size: 3 μm）を用いて砂利等を除去し、さらに、メンブレンフィルター（pore size: 0.2 μm）を用いて集菌後、-20℃で保存した。

(2) プローブの選定

FISH法、TSA-FISH法及びin situ HCR法に用いたプローブを表-1に示す。In situ HCR法は、EUB338領域に交雑する部位と伸長起点の配列の両者を持つconnectorプローブを設計し用いた。また、その間にはスパーサーとして5つのアデニンを設けた。伸長に用いる2種のプローブは、Choiらが用いたプローブ1 (H1) 及びプローブ2 (H2) を若干改良し使用した¹⁶⁾。

(3) FISH法及びTSA-FISH法

FISH法は、Sekiguchiらの方法¹⁷⁾に準拠し行った。プローブには5'末端にCy3を標識した。

TSA-FISH法は、Kubotaらの方法⁷⁾に準拠し行った。プローブには5'末端にHRPを標識し、tyramide-Cy3を用いて可視化した。

表-1 本研究で用いたプローブ

方法	名前	塩基配列 (5' -3')	塩基長	参考文献
FISH	EUB338-Cy3	Cy3 - GCTGCCTCCCGTAGGAGT	18	17
TSA-FISH	EUB338-HRP	HRP - GCTGCCTCCCGTAGGAGT	18	7
in situ HCR	connector プローブ	CCGAATACAAAGCATCAACGACTAGAAAAAagctgcctccgtaggag ^{a)}	49	本研究
	H1	TCTAGTCGTTGATGCTTTGTATTGGCGACAGATAACCGAATACAAAGCATC - Cy3	51	16
	H2	Cy3 - CCGAATACAAAGCATCAACGACTAGAGATGCTTTGTATTGCGTTATCTGTCG	51	16

a) 下線部は既報で用いられる initiator の配列、小文字はEUB338の配列。

(4) In situ HCR法

In situ HCR法に用いる純粋菌株は、低融点アガロースで包埋し、10穴のスライドガラス (Matsunami) に固着させた。固定した海洋サンプルはフィルター上で固定し、ウェル内に収まるようにフィルターを調整し、低融点アガロースを用いて包埋した。各スライドは60°Cで乾燥後、50, 80, 96 %のエタノールにそれぞれ3, 1, 1分に浸して脱水を行った。ハイブリダイゼーションバッファー1 (20 mM Tris-HCl [pH 7.5], 0.9 M NaCl, 20% formamide, 5 mM EDTA, 0.01% SDS) に最終濃度 0.5 μ M になるように connectorプローブを混合させ、各穴に 10 μ l 滴下し、46°Cで4時間以上交雑させた。その後、洗浄バッファー1 (20 mM Tris-HCl [pH 7.5], 0.9 M NaCl, 20% formamide, 5 mM EDTA, 0.01% SDS) に48°Cで30分浸し、洗浄を行った。さらに、ハイブリダイゼーションバッファー2 (50 mM Na_2HPO_4 , 0.9 M NaCl, 0.01% SDS) にCy3を標識したH1及びH2を最終濃度 5 μ M になるように加え、46°Cで12時間以上交雑させた。さらに、洗浄バッファー2 (50 mM Na_2HPO_4 , 0.9 M NaCl, 0.01% SDS) に室温で30分浸し洗浄を行い、超純水で1分間、エタノールで1分間浸し、風乾させた。

(5) 顕微鏡観察

FISH法、TSA-FISH法及びin situ HCR法に用いたサンプルは、褪色防止剤 (ProLong Gold Antifade Reagent with DAPI, Invitrogen) で封入後、顕微鏡観察に供した。顕微鏡には、落射蛍光顕微鏡BX-50 (OLYMPUS) を用い、写真の撮影にはCCDカメラDP70 (OLYMPUS) を用いた。

(6) 検出率の算出

海洋性細菌の検出率は、DAPI蛍光で得られる菌体数を全微生物と定義し、蛍光標識による蛍光で得られる菌体数を全微生物から除して算出した。また、撮影方法は、各手法により目視で最適な露光時間を決定し撮影した。

3. 実験結果及び考察

(1) 原核生物に対するin situ HCR法の適用

まず、EUB338 領域に交雑するように設計した connectorプローブを用いて、*E. coli* に対し in situ HCR法を試みた。FISH法で用いられるプロトコル¹⁷⁾を参考に in situ HCR法で用いるすべてのプローブを0.5 μ Mとして実験を行ったところ、菌体から蛍光が得られたがFISH法で得られる蛍光強度と同程度であった (データ非表示)。そこで HCRの伸長を促すことで蛍光強度を

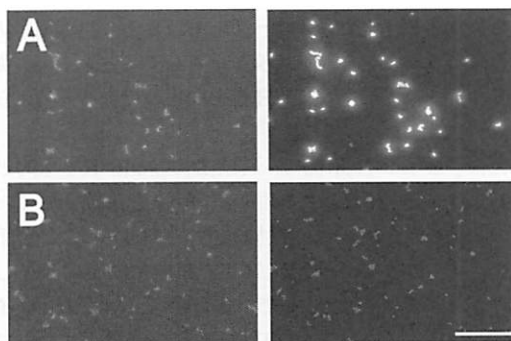


図-2 FISH法及びin situ HCR法による*E. coli*の検出。(A) in situ HCR法による検出。(B) FISH法による検出。左図はUV励起によるDAPI蛍光視野、右図はG励起による蛍光視野である。プローブ濃度はそれぞれ5.0 μ Mとした。露光時間は、両者ともに同一時間とした。スケールバーは20 μ mを示す。

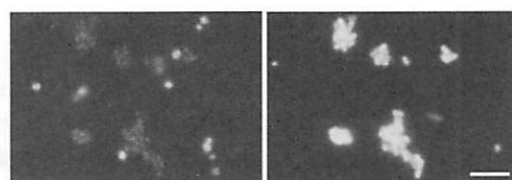


図-3 *E. coli* と *M. maripaludis* を混合したサンプルを用いた in situ HCR法による特異的な検出。左図はUV励起によるDAPI蛍光視野、右図はG励起による蛍光視野である。露光時間は500 ms。スケールバーは5 μ mを示す。

増加できないかと考え、伸長に用いる2種のプローブの濃度を0.5 μ M, 1 μ M, 2 μ M, 5 μ M, 10 μ Mと段階的に上昇させた。結果、濃度の上昇とともに蛍光強度は増加したが、10 μ Mになると菌体が固着されていない箇所からの非特異的な蛍光が得られた。従って、プローブの最適濃度を5 μ Mとした。図-2に最適条件下で行った in situ HCR法の実験結果を示す。同一の露光時間において、in situ HCR法から極めて高い蛍光強度が得られ、*E. coli* 全体から蛍光が確認された。次に、コントロール微生物である古細菌の *M. maripaludis* を用い、connectorプローブの交雑時におけるストリンジエンシーを変化させ、両者を識別できるか検討を行った。*M. maripaludis* の rRNA は、本研究で用いた connector プローブと交雑が予想される箇所がすべて5塩基以上のミスマッチであった。結果、*E. coli* のみから特異的な蛍光を得ることに成功した (図-3)。また、コントロール実験として connector プローブを交雑させず H1 および H2 プローブのみを用いて実験を行ったが、全てのサンプルにおいて蛍光は全く得られなかった (データ非表示)。これは、本手法の特異性が、connector プローブが標的分子に交雑する段階で決定されていることを示している。Connector プローブが標的分子に交雑する段階において、connector プローブ

はオリゴヌクレオチドプローブを用いる通常の FISH 法と同様のカイネティクスで交雑していると思われる。従って本手法の特異性は、FISH 法と同程度であると考えられる。

既報の *in situ* HCR 法は、真核生物の mRNA を標的としているが、本研究は原核生物の rRNA を標的としており、標的領域が複雑な高次構造内に存在することが予想される。こうした問題に対して原核生物を対象とした FISH 法に対するこれまでの報告から、ハイブリダイゼーションバッファーに SDS を入れること、プローブ交雑温度を 46°C と高めることが有効であることが知られている¹⁸⁾。本研究でもそれら実験条件を最適化することで *in situ* HCR 法が原核生物の rRNA でも十分に適用可能であることがわかった。

(2) *In situ* HCR 法による海洋性細菌の検出

我々は、*in situ* HCR 法が低活性かつ細胞浸透性が低い微生物群に適用可能か確認するために、海洋サンプルを用い検討を行った。図-4 に海洋性細菌を標的とした FISH 法、TSA-FISH 法及び *in situ* HCR 法を適用した実験結果を、また、表-2 に細胞壁処理の有無による検出率の比較を示す。まず、FISH 法および細胞壁処理を施した後に行った TSA-FISH 法及び *in situ* HCR 法で得られた検出率を比較すると、FISH 法が $57.6 \pm 6.2\%$ と低い一方で、TSA-FISH 法、*in situ* HCR 法ではそれぞれ $87.6 \pm 6.4\%$ 、 $88.1 \pm 3.0\%$ と高かった。これは本研究で用いた海洋サンプル中に生息する微生物の活性が低く、標的分子である rRNA の存在数も低いため、FISH 法では十分な蛍光感度が得られず検出率が低下したものと思われる。また *in situ* HCR 法は、TSA-FISH 法と同程度の検出率が得られたことから、高感度 FISH 法として環境サンプルに十分に適用可能であることが示された。

次に、細胞壁処理を施さずに行った TSA-FISH 法と *in situ* HCR 法の検出率を比較すると、それぞれ $68.5 \pm 3.5\%$ 、 $80.1 \pm 4.8\%$ であり *in situ* HCR 法の方が高い検出率を示した。これは、50 塩基程度の蛍光標識プローブの方が HRP 酵素を標識したプローブよりも浸透性が高いことに起因すると思われる。このことは、*in situ* HCR 法が細胞浸透性の低い微生物群に対して有効な検出技術である事を示している。

4. まとめ

本研究では、まず、connector プローブを我々で設計し、純粋菌株を用いた検討により *in situ* HCR 法が原核生物にも適用できることを確認した。さらに、海洋性細菌

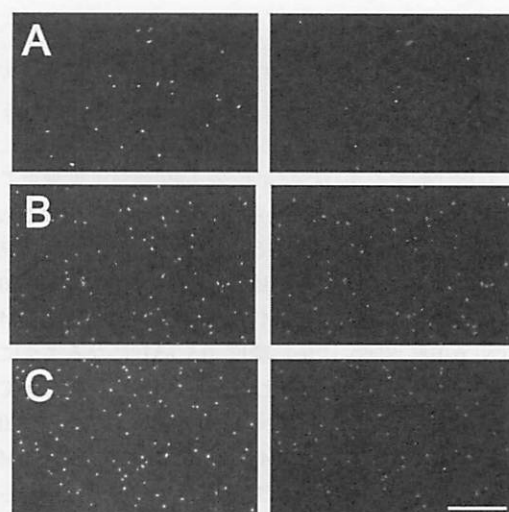


図-4 FISH 法、TSA-FISH 法及び *in situ* HCR 法による海洋性細菌の検出。細菌を標的。(A) FISH 法による検出。(B) TSA-FISH 法による検出。(C) *In situ* HCR 法による検出。左図は UV 励起による DAPI 蛍光視野、右図は G 励起による蛍光視野である。露光時間は各手法においてシグナルを最適化し撮影した。スケールバーは 20 μm を示す。

表-2 細胞壁処理の有無による検出率の比較

方法	細胞壁処理の有無	
	-	+
FISH	57.6 ± 6.2	N T
TSA-FISH	68.5 ± 3.5	87.6 ± 6.4
<i>in situ</i> HCR	80.1 ± 4.8	88.1 ± 3.0

+ : 1 mg/ml リゾチームを用いて 37°C で 30 分間反応させた。

- : 細胞壁処理なし。NT : 実験なし。

に *in situ* HCR 法を適用させ、微生物活性及び細胞浸透性の低い微生物の検出技術としての有用性を示した。*in situ* HCR 法は、有効な細胞壁処理方法が確立されていない微生物群や未培養微生物群に対して有効な方法であると考えられる。さらに、内在性パーオキシダーゼ活性を有するサンプル¹⁹⁾に対して TSA-FISH 法の適用は難しく、我々も内在性活性を完全には失活できないサンプルにも遭遇している (未発表データ)。こうした背景を考慮すると、*in situ* HCR 法は、現在のところ細胞壁処理方法を課題とする高感度 FISH 法において極めて有効な方法であるといえる。

In situ HCR 法の利点の一つに、シグナル増幅に配列特異性があることが挙げられる。したがって、connector プローブ中の標的領域に交雑する部位の配列を変えるだけで、標的領域を容易に変更できる。また Choi らは、

複数種のプローブセットを用いることで同時に複数種の mRNA を検出しており¹⁶⁾、多重染色の適用も可能である。

細胞壁構造が未知な微生物や有効な細胞壁処理方法がない微生物群や、微生物活性が低い微生物群は、特に深海微生物や地殻微生物をはじめとする極限環境下に多数生息している。In situ HCR法は、細胞浸透性が低い微生物群に対しても高感度な検出が可能であり、これまで検出が難しいとされてきた微生物群への適用が期待される。

参考文献

- 1) Amann R., Ludwig W. and Schleifer K. H.: Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation, *Microbiology Reviews*, Vol. 59, pp.143-169, 1995.
- 2) Oda Y., Slagman S. J., Meijer W. G., Fomey L. J. and Gottschal J. C.: Influence of growth rate and starvation on fluorescence in situ hybridization of *Rhodospseudomonas palustris*, *FEMS Microbiology Ecology*, Vol. 32, pp. 205-213, 2000.
- 3) Pernthaler A., Preston C. M., Pernthaler J., Delong E. F. and Amann R.: Comparison of fluorescently labeled oligonucleotide and polynucleotide probes for the detection of pelagic marine bacteria and Archaea, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 68, No. 2, pp. 661-667, 2002.
- 4) Hodson R. E., Dustman W. A., Garg R. P. and Moran M. A.: In situ PCR for visualization of microscale distribution of specific genes and gene products in prokaryotic communities, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 61, No. 11, pp. 4074-4082, 1995.
- 5) Maruyama F., Kenzaka T., Yamaguchi N., Tani K. and Nasu M.: Visualization and enumeration of bacteria carrying a specific gene sequence by in situ rolling circle amplification, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 71, No. 12, pp. 7933-7940, 2005.
- 6) Zwilling-Kruger K., Ludwig W. and Schleifer K. H.: Recognition of individual genes in a signal bacterial cell by fluorescence in situ hybridization - RING-FISH, *Molecular Microbiology*, Vol. 51 No. 1, pp. 89-96, 2004.
- 7) Kubota K., Ohashi A., Imachi H. and Harada H.: Visualization of mcr mRNA in a methanogen by fluorescence in situ hybridization with an oligonucleotide probe and two-pass tyramide signal amplification (two-pass TSA-FISH), *Journal of Microbiological Methods*, Vol. 66, pp. 521-528, 2006.
- 8) Schonhuber W., Fuchs B., Juretschko S. and Amann R.: Improved sensitivity of whole-cell hybridization by the combination of horseradish peroxidase-labeled oligonucleotide and tyramide signal amplification, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 68, No. 8, pp. 3268-3273, 1997.
- 9) Hoshino T., Yilmaz L.S., Noguera D.R., Daims H. and Wagner M.: Quantification of target molecules needed to detect microorganisms by fluorescence in situ hybridization (FISH) and catalyzed reporter deposition-FISH, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 74, No. 16, pp. 5068-5077, 2008.
- 10) Tujula N. A., Holmstrom C., Mubmann M., Amann R., Kjelleberg S. and Crocetti G. R.: A CARD-FISH protocol for the identification and enumeration of epiphytic bacteria on marine algae, *Journal of Microbiological Methods*, Vol. 63, pp. 604-607, 2006.
- 11) Knittel K., Losekann T., Boetius A., Kort R. and Amann R.: Diversity and distribution of methanotrophic archaea at cold seeps, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 71, No. 1, pp. 467-479, 2005.
- 12) Schreiber L., Holler T., Knittel K., Meyerdierks A. and Amann R.: Identification of the dominant sulfate-reducing bacterial partner of anaerobic methanotrophs the ANME-2 clade, *Environmental Microbiology*, Vol. 12, No. 8, pp. 2327-2340, 2010.
- 13) Pernthaler A., Pernthaler J. and Amann R.: Fluorescence in situ hybridization and catalyzed reporter deposition for the identification of marine bacteria, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 68, No. 6, pp. 3094-3101, 2002.
- 14) Kubota K., Imachi H., Kawakami S., Nakamura K., Harada H. and Ohashi A.: Evaluation of enzyme cell treatments for application of CARD-FISH to methanogens, *Journal of Microbiology Methods*, Vol. 72, pp. 54-59, 2008.
- 15) Dirks R. M. and Pierce N. A.: Triggered amplification by hybridization chain reaction, *Proceedings of the National Academy of Science*, Vol. 43, No. 101, pp.15275-15278, 2004.
- 16) Choi H. M. T., Chang J. J., Trinh L. A., Padilla J. E., Fraser S. E. and Pierce N. A.: Programmable in situ amplification for multiplexed imaging of mRNA, *Nature biotechnology*, Vol. 28, No. 11, pp.1208-1214, 2010.
- 17) Sekiguchi Y., Kamagata Y., Syutsubo K., Ohashi A., Harada H. and Nakamura K.: Phylogenetic diversity of mesophilic and thermophilic granular sludges determined by 16S rRNA gene analysis, *Microbiology*, Vol. 144, pp. 2655-2665, 1998.
- 18) Behrens S., Fuch B.M., Mueller F. and Amann R.: Is the in situ accessibility of the 16S rRNA of *Escherichia coli* for Cy3-labeled oligonucleotide probes predicted by a three-dimensional structure model of the 30S ribosomal subunit?, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol. 69, pp. 4935-4941, 2003.
- 19) Ishi K., Mubmann M., MacGregor B. J. and Amann R.: An improved fluorescence in situ hybridization protocol for the identification of bacteria and archaea in marine sediments, *FEMS Microbiology Ecology*, Vol. 50, pp. 203-212, 2004.

(2011. 5. 30受付)

Development of a novel sensitive fluorescence in situ hybridization (FISH) technique
by using in situ hybridization chain reaction (in situ HCR)

Tsuyoshi YAMAGUCHI¹, Shuji KAWAKAMI^{1,2}, Masashi HATAMOTO¹
Masanobu TAKAHASHI¹, Kengo KUBOTA³, Hiroyuki IMACHI⁴
Nobuo ARAKI⁵, Takashi YAMAGUCHI¹

¹Dept. of Environmental Systems Engineering, Nagaoka University of Technology

²Dept. of Construction systems Engineering, Anan National College of Technology

³Dept. of Civil and Environmental Engineering, Tohoku University

⁴Institute of Biogeosciences, Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology (JAMSTEC)

⁵Dept. of Civil Engineering, Nagaoka National College of Technology

Highly sensitive fluorescence in situ hybridization (FISH) with enzymes or polynucleotide probes is routinely used to detect microorganisms with a low number of rRNA molecules. However, some cell-wall treatment is required for better penetration of these enzymes or probes. Here, we developed a new highly sensitive cell-permeable FISH technique by using in situ hybridization chain reaction (in situ HCR) with 3 oligonucleotide probes (approximately 50 mer). Applicability of rRNA-targeted in situ HCR was verified using *Escherichia coli*. The signals obtained using in situ HCR were more sensitive than those obtained using conventional FISH; however, this technique showed the same specificity as conventional FISH. Applicability of in situ HCR was further evaluated using a seawater sample. Tyramide signal amplification (TSA)-FISH and in situ HCR showed the same detection rates for the marine bacterium after cell-wall treatment (approximately 88%). Without the cell-wall treatment, in situ HCR showed a higher detection rate (mean, $80.1 \pm 4.8\%$) than conventional FISH (mean, $57.6 \pm 6.2\%$) and TSA-FISH (mean, $68.5 \pm 3.5\%$). These results indicate that the sensitivity of in situ HCR is almost as high as that of TSA-FISH; however, it shows higher cell permeability than TSA-FISH.