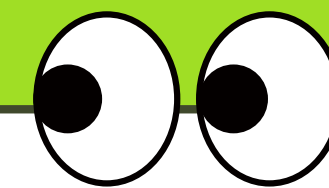


Basescope 原位雜交技術檢測 C9orf72 RNA 病灶在脊髓側索硬化症中意義



肌萎縮側索硬化症（ALS）是一類對運動功能損傷極大的神經系統疾病，病人四肢肌肉無力、萎縮，最終演變為呼吸衰竭。C9orf72六核苷酸重複序列擴增是肌萎縮側索硬化症最常見的已知基因突變，其神經病理學特徵為C9orf72 RNA病灶(RNA foci)的胞內累積。傳統對於RNA的原位定位技術，由於靈敏度和特異性的局限性，對於RNA的定量存在一定困難。在2020年1月發表在Brain Communications雜誌上的Improved detection of RNA foci in C9orf72 amyotrophic lateral sclerosis post-mortem tissue using Base-Scope™ shows a lack of association with cognitive dysfunction這篇文章中[1]，英國愛丁堡大學的Jenna M Gregory研究團隊使用Basescope™技術，在皮層、脊髓等區域對C9orf72 sense-strand RNA foci進行了檢測，對胞內C9orf72 RNA foci的定量分布有了更加準確的評估。

運動皮層和脊髓運動神經元和膠質細胞內TDP-43蛋白的聚積是ALS病人屍檢中一個重要的特徵。除了運動相關神經元外，在語言功能損傷的病人中，非運動腦區的TDP-43也存在聚積現象。C9orf72六核苷酸重複序列擴增是ALS中一個已知的基因表型，在此基因病變的ALS病例中，中樞神經系統中胞內sense-strand或antisense-strand C9orf72 RNA foci的累積是一個典型特徵。以往研究認為，antisense-strand RNA foci的聚積更加有危害性，且與TDP-43的聚積有一定相關性。目前，在除運動相關之外的其他區域，sense-strand RNA foci的胞內情況，以及對於認知的影響等都是未知。在此類研究中1) 常採用病人屍檢獲得的樣本，此類樣本存在一定程度的組織自溶和RNA降解的情況，對於RNA的檢測有一定難度；2) 傳統方法對於小片段RNA的探針設計存在難度，3) 且由於訊號無法進行有效放大，故對大面積視野內RNA和細胞的分布、區域內整體表達情況的辨認、分辨率等也存在一定局限性。

在本研究中，作者使用美國Bio-Techne旗下ACD公司的Basescope RNA原位檢測方法，對6例定性為C9orf72型ALS病人（實驗組），以及6例相近年齡、生前無明顯神經症狀的死者（對照組）做了屍檢樣本的RNA檢測。結果表明C9orf72型ALS病人，在脊髓、大腦運動皮層的神經元和膠質細胞中均有明顯的胞內C9orf72 sense-strand RNA聚積（圖1）。

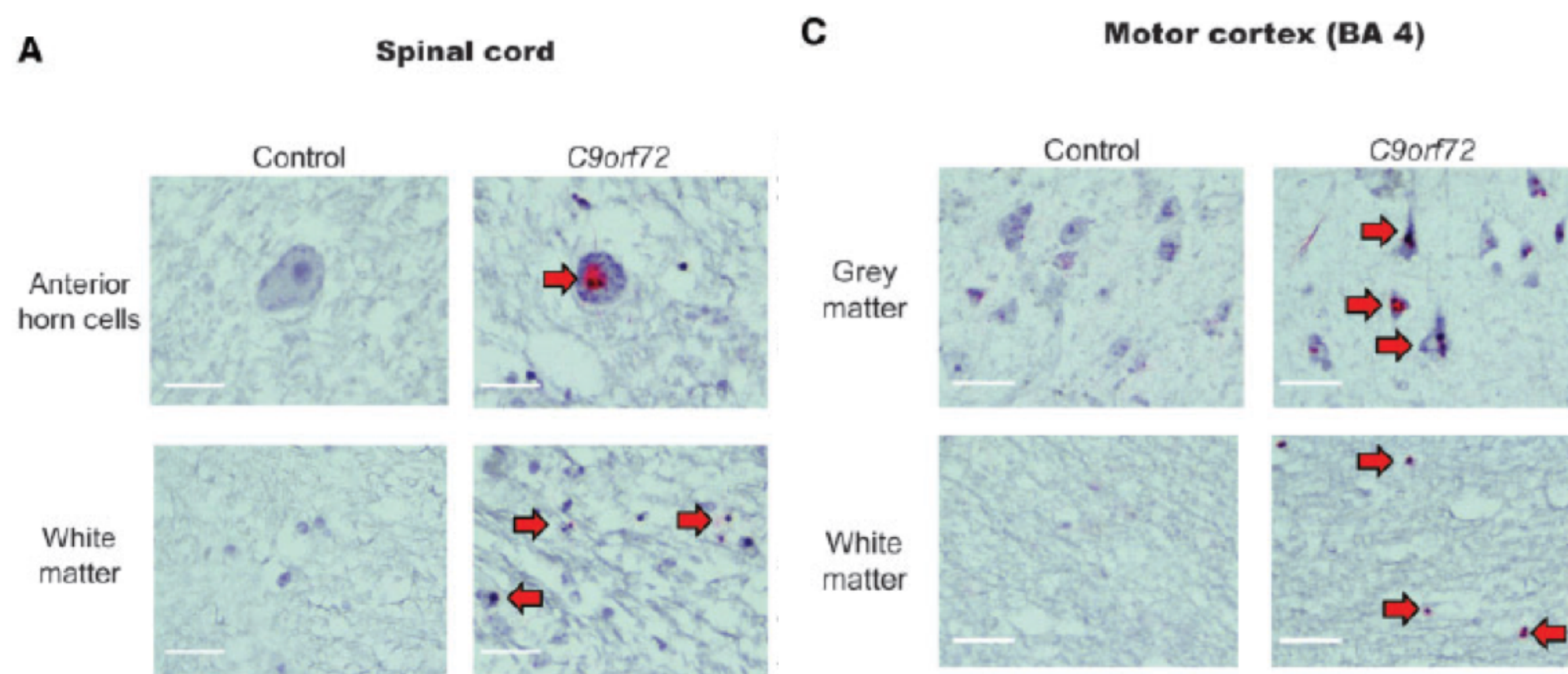


圖1.
C9orf72在脊髓和運動皮層
神經元及膠質細胞中的表達。

由於有些ALS病人會出現認知缺陷、語言受損等症狀，因此作者在分運動皮層區域也檢測了C9orf72的表達情況，發現相較於對照組，C9orf72在病人的非運動區域神經元和膠質細胞內也存在聚積的現象（圖2）。

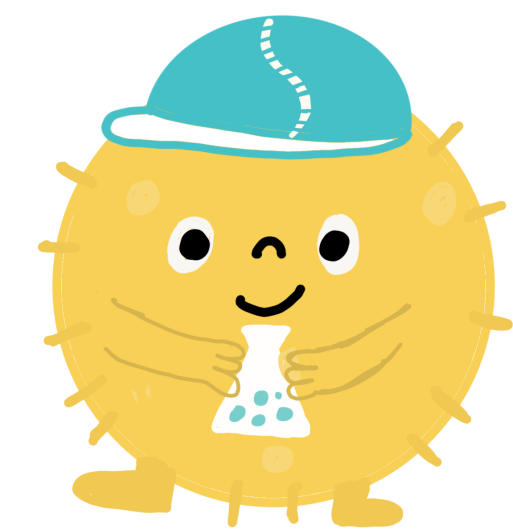
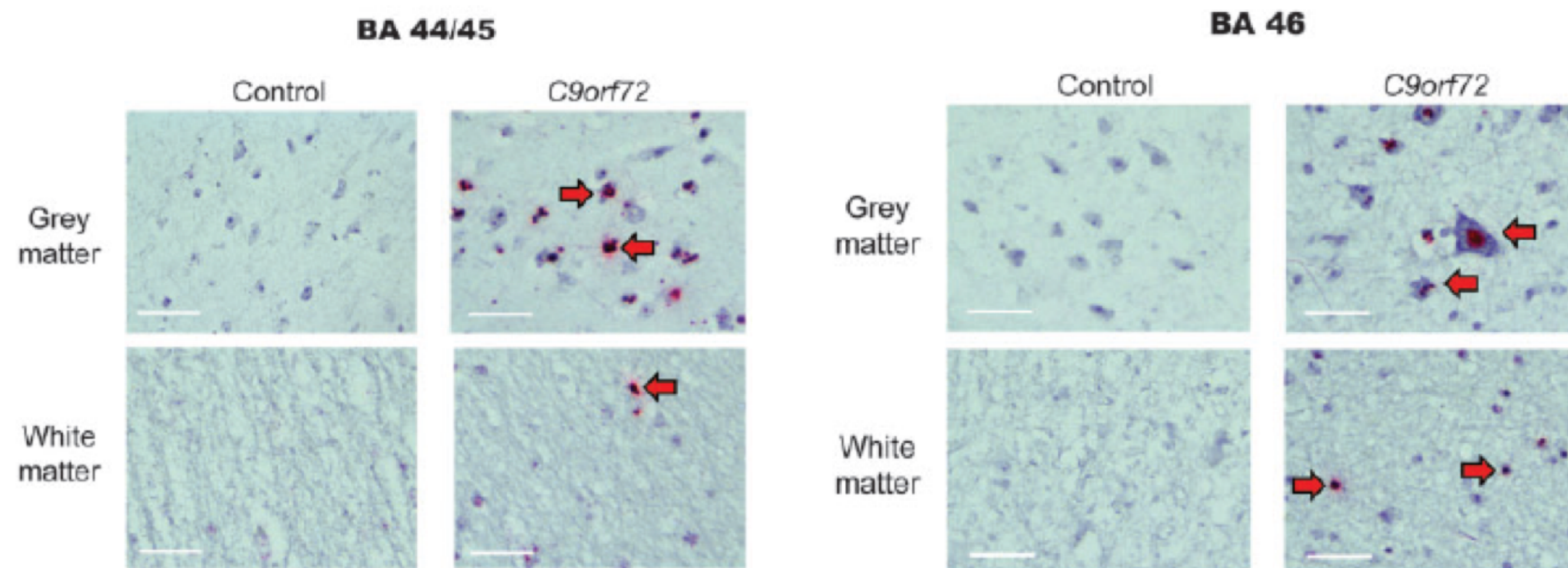
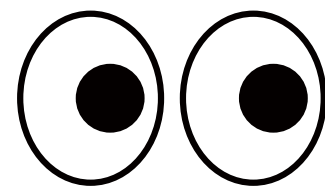


圖2.
C9orf72在分運動相關皮層神經元及膠質細胞中的表達。



TDP-43在細胞內的聚積是ALS病人一個明顯的病理特徵。作者根據在不同腦區及細胞內C9orf72的表達情況，與TDP-43在同腦區的表達情況做了比較和相關性分析，結果顯示，只有在脊髓運動神經元中，C9orf72與TDP-43的表達量有明顯的正相關現象，在運動皮層神經元，以及膠質細胞中，C9orf72與TDP-43的表達沒有明顯相關性（圖3）。

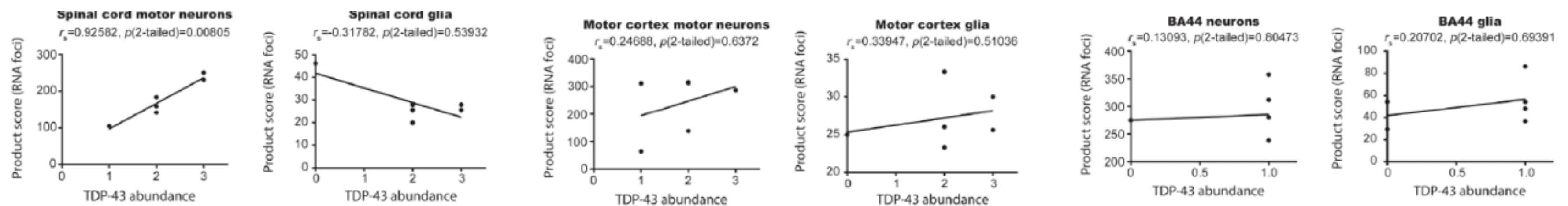


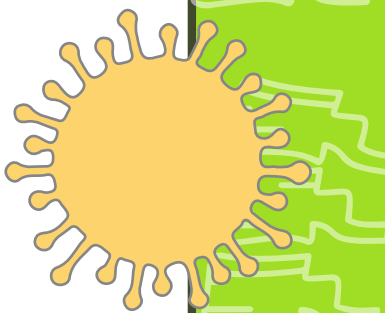
圖3. 在脊髓運動神經元中，C9orf72與TDP-43的表達量有正相關現象。

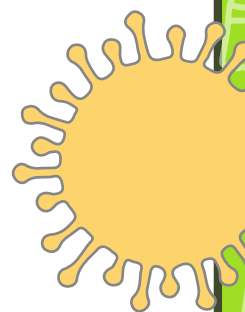
作者利用Basescope技術，對C9orf72 RNA進行了高靈敏度的檢測，並統計了較大腦區範圍內，C9orf72表達的整體情況，修正了之前被低估的C9orf72 RNA表達量，並發現C9orf72與TDP-43表達區域上的相互關係，為日後進一步的工作提供了線索

關於技術的任何問題，請參見Bio-Techne ACD官網 (<https://acdbio.com/rnascope-hiplex-assays>)

RNAscope技術是由Bio-technne旗下Advanced Cell Diagnostics (ACD)公司研發的RNA原位雜交產品，在近年來的生物檢測領域發展迅速。與傳統的RNA原位雜交相比，RNA-scope技術屬於新一代RNA原位雜交技術，其特異性的雙Z探針設計避免了傳統長鍊RNA探針的弊端，配以自身級聯放大檢測原理，可以高效敏感地檢測到目標RNA。該方法的具體優勢如下：

- 1 應用廣泛：**使用RNAscope®技術，目標RNA為大於等於300個鹼基的特異序列，即可進行探針設計。因而RNAscope®技術可以應用於幾乎所有物種，所有組織以及所有基因的檢測。
- 2 特異性強：**RNAscope®獨特的雙Z (ZZ) 探針設計有效的防止了探針的非特異性結合，同時降低了背景干擾。由於結合在非特異性位點的單個的Z 探針不會產生完整的訊號放大分子結合位點，並會在雜交過程中被洗脫洗掉，從而防止非特異性訊號的放大，使得探針的訊號具有高度特異性。探針設計合成需要4週時間即可完成。
- 3 靈敏度高：**RNAscope®方法檢測每個RNA 分子時，只需三對雙Z (ZZ) 探針即可完成雜交和訊號的可視化。



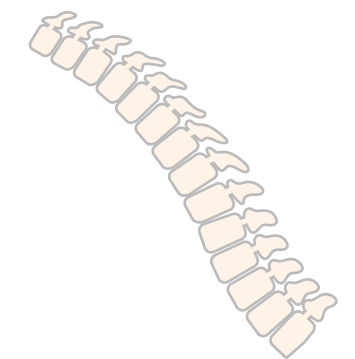


- 4 單分子檢測和單細胞定量：**使用RNAscope®技術雜交上三對及以上雙Z 探針即可在標準的顯微鏡下呈現可觀察到的點狀訊號。ACD公司建議的分析軟件更可以定量每一個單細胞內RNA 的表達量。
- 5 兼容降解的RNA：**由於RNAscope®三對雙Z探針即可檢測到目標RNA，而通常針對目標RNA設計的探針為20對雙Z 探針，因而即使目標RNA發生部分降解，仍可以穩定有效地檢測到目標RNA。
- 6 檢測結果穩定一致性：** RNAscope®技術用到的探針以及所有檢測試劑全部由工業化合成，且該技術針對不同樣本類型（冰凍切片，石蠟切片，懸浮細胞，貼壁細胞等）已經有成熟的實驗操作流程，故使得RNAscope®技術檢測結果具有穩定性和一致性。除了可以在實驗室進行手工操作外，該產品也可以在Leica以及羅氏Ventana自動平台上運行，為結果的一致性和穩定性提供了可靠的依據。
- 7 多通道多目標同時檢測：**由於RNAscope®技術可以同時進行多通道探針雜交以及訊號放大，故在可見光檢測中可以在同一張切片上同時檢測兩個目標；而在螢光檢測過程中，可以在同一張切片上檢測三個或三個以上目標RNA。

Basescope /

Basescope屬於ACD公司RNAscope技術基礎上的新一代產品。與傳統的RNA原位雜交相比，RNAscope技術與Basescope技術因其特異性的雙Z探針設計，避免了傳統長鍊RNA探針的弊端，配以自身級聯放大檢測原理，可以高效敏感地檢測到目標RNA，且不需要像傳統原位雜交那樣要求RNase free的環境。RNAscope技術可以在高度敏感地原位檢測大於300bp的RNA，而Basescope則可以實現RNAscope檢測範圍以外的更短序列的檢測。

Basescope assay主要應用於檢測短序列的RNA目標（50-300bp），例如本文中提到的pre-miRNA；高度同源性序列；RNA點突變，例如EGFR T790M，BRAKV600E，KRAS G12D, PIK3CA H1047R等；外顯子跳躍，例如檢測非小細胞肺癌中的METD14，環狀RNA以及基因融合。



Reference:

Brain Commun. 2020 Jan 31;2(1):fcaa009. doi: 10.1093/braincomms/fcaa009. Improved detection of RNA foci in C9orf72 amyotrophic lateral sclerosis post-mortem tissue using BaseScope™ shows a lack of association with cognitive dysfunction