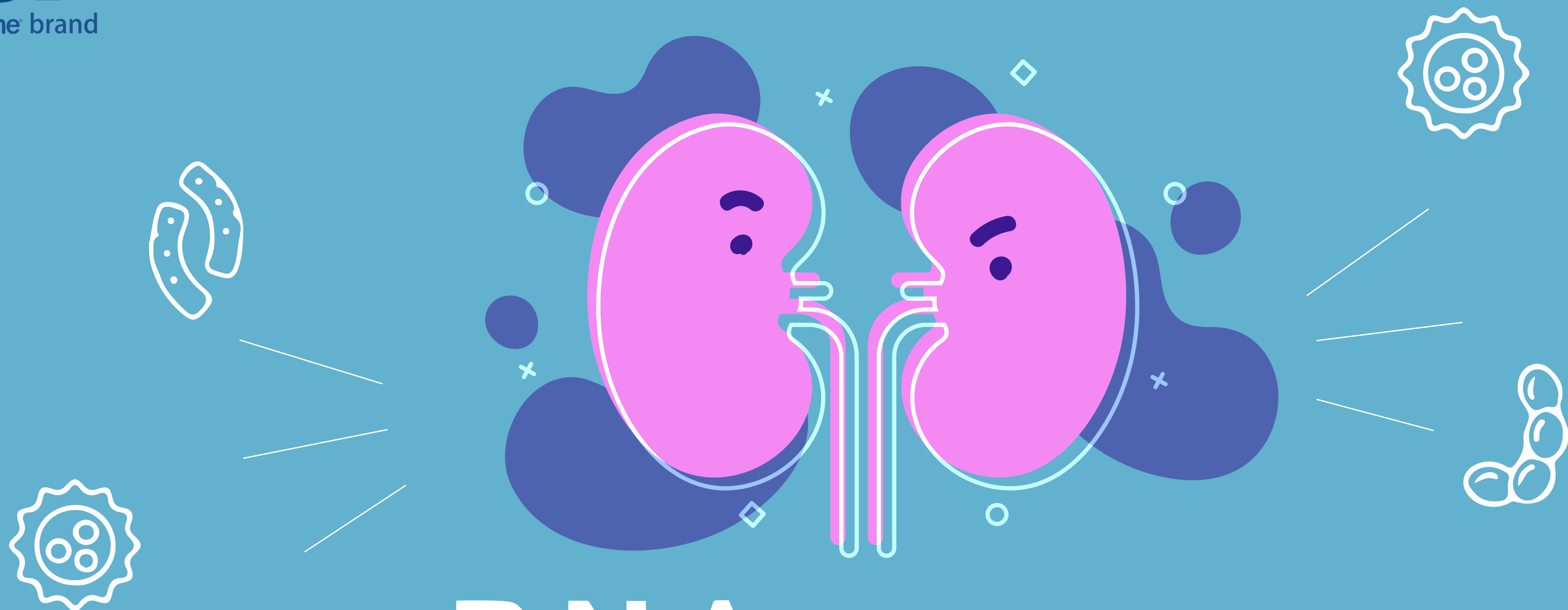
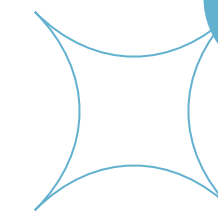


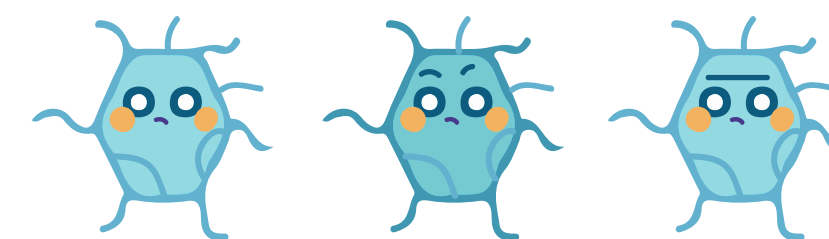


RNAscope

在腎臟單細胞測序後的應用



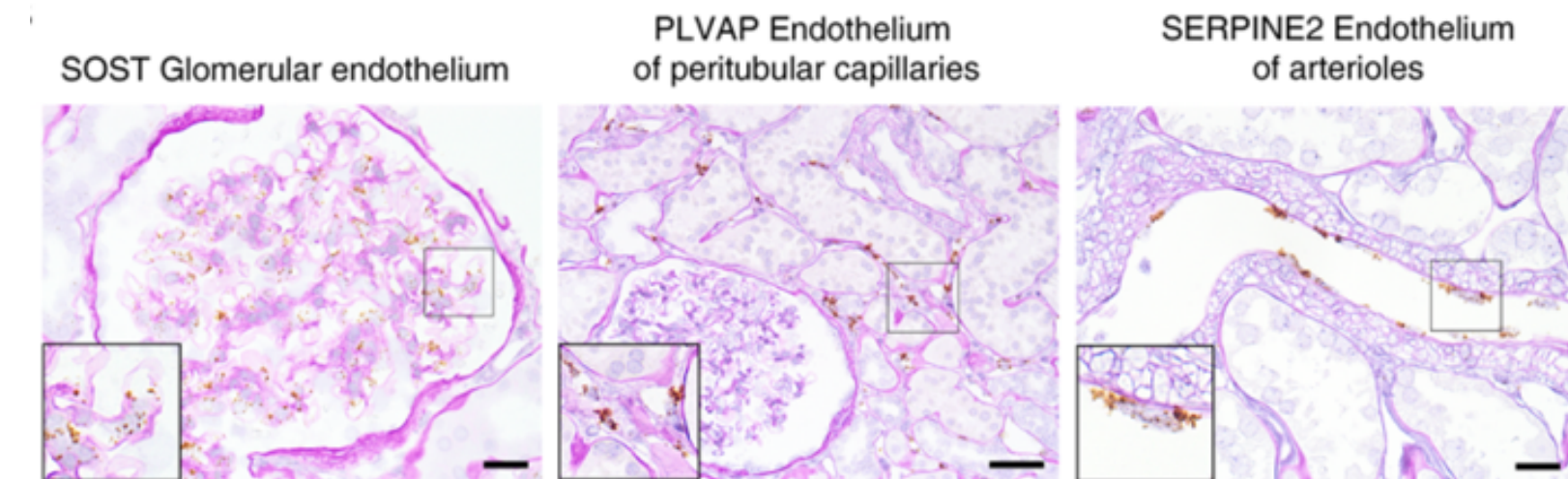
單細胞測序技術是近年來迅速發展的生命科學前瞻技術，它在單細胞層面顯示細胞的基因表達狀態，反映細胞間的異質性，為生命科學的研究提供了獨特的視角。近年來，單細胞測序技術在神經科學、腫瘤、發育生物學、微生物學等眾多領域發揮著重要的作用，成為了生命科學極具潛力的研究工具。但是單細胞測序結果還是缺乏基因在組織中的具體位置資訊，RNAscope原位雜交技術能直觀的觀察基因表達的空間位置，同時由於單細胞測序產生的大量待驗證分子標靶缺乏有效的免疫組織染色用抗體，因此RNA-scope對於單細胞測序的結果回溯到組織原位進行驗證提供了重要的技術手段，成為單細胞測序下游驗證的研究方法。今天為大家分享的使用RNAscope技術在單細胞測序後驗證中的應用系列文章之二，來自於2020年在JCI Insight發表的一篇題為Single cell transcriptomics identifies focal segmental glomerulosclerosis remission endothelial biomarker的文章，該研究利用單細胞測序生成了一個完整的成人腎臟的單細胞轉錄組圖譜，確定了已知和潛在的新細胞類型，文章中也是利用RNA-scope技術對單細胞測序的結果在組織空間原位進行了驗證。



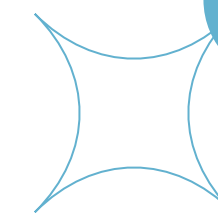
Single cell transcriptomics identifies focal segmental glomerulosclerosis remission endothelial biomarker

Rajasree Menon,¹ Edgar A. Otto,¹ Paul Hoover,² Sean Eddy,¹ Laura Mariani,¹ Bradley Godfrey,¹ Celine C. Berthier,¹ Felix Eichinger,¹ Lalita Subramanian,¹ Jennifer Haeder,¹ Wenjun Ju,¹ Viji Nair,¹ Maria Larkina,¹ Abhijit S. Naik,¹ Jinghui Luo,¹ Sanjay Jain,¹ Rachel Sealfon,² Olga Troyanskaya,⁴ Nir Hacohen,² Jeffrey B. Hodglin,¹ Matthias Kretzler,¹ Kidney Precision Medicine Project (KPMP),¹ and Nephrotic Syndrome Study Network (NEPTUNE)¹

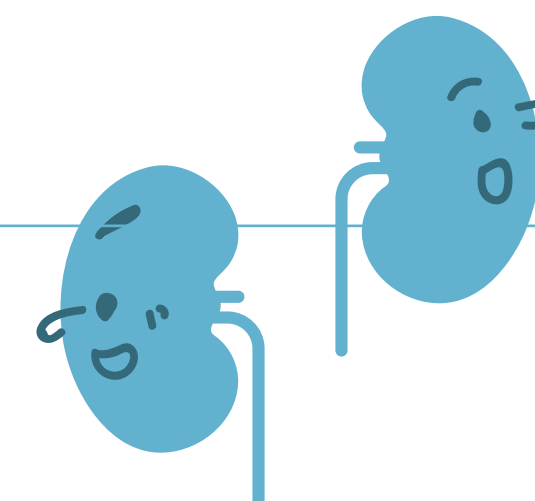
圖1 RNAscope檢測三種內皮細胞亞群的標記基因SOST, PLVAP, SERPINE2



在這項研究中，研究人員從16例來自腫瘤腎切除樣本，5例腎移植樣本，3例腎活檢樣本，總共24例成人腎臟樣本中獲得了22268個細胞，單細胞測序將22268個細胞根據特異的基因表達特徵分為31個亞細胞群。其中，單細胞測序鑑定的3種內皮細胞亞群中每一種都有1個不同標記物的表達，作者使用RNAscope原位雜交對這3種內皮細胞亞群進行了組織原位的驗證，針對這三種內皮細胞亞群表達的不同標記基因SOST, PLVAP, SERPINE2的RNA進行了RNAscope探針設計，之後利用RNAscope棕色可見光檢測的方法在腎臟組織中檢測了這三種標誌基因的表達。RNAscope檢測結果發現SOST特異性定位在腎小球內皮細胞中，PLVAP的RNA在環腎小管微血管內皮細胞中分佈，SERPINE2的RNA訊號在小動脈內皮細胞中可見（圖1，棕色訊號點是RNAscope檢測到的SOST, PLVAP, SERPINE2的mRNA表達）。



由於內皮功能障礙促進腎臟疾病的發生和進展，因此研究人員進一步聚焦內皮細胞亞群，在這3種內皮細胞亞群中確定了選擇性表達的26個基因和78個腎小球內皮細胞（GEC）特異性基因，並根據腎小球內皮細胞特異性基因集建立了GEC評分，GEC評分隨後應用於患有多種腎小球疾病的患者獲得的顯微解剖腎小球（Glom）的大量基因表達數據集的分析。觀察了GEC特異性基因在不同疾病中的差異調節，並進一步確定了局灶節段性腎小球硬化症（FSGS）中GEC特異性基因激活的2個亞組患者。對兩個GEC定義的FSGS亞組患者的基因表達差異的分析表明A2M是與FSGS異質性相關的下游標靶。A2M是一種非特異性蛋白酶抑製劑，能夠影響多種蛋白質的功能。



研究人員進一步使用RNAscope螢光檢測的方法檢測了腫瘤腎切除術（tumor-nephrectomy）的未受影響部分的腎臟組織（對照組）以及FSGS患者腎臟組織中A2M的組織原位表達（圖2，紅色訊號點是RNAscope檢測到的A2M的mRNA表達）。RNAscope檢測結果表明A2M在腎小球中表達豐富，在FSGS患者腎臟組織腎小球中表達升高，因此RNAscope檢測提供了直觀可視化的證據驗證了單細胞測序的結果。

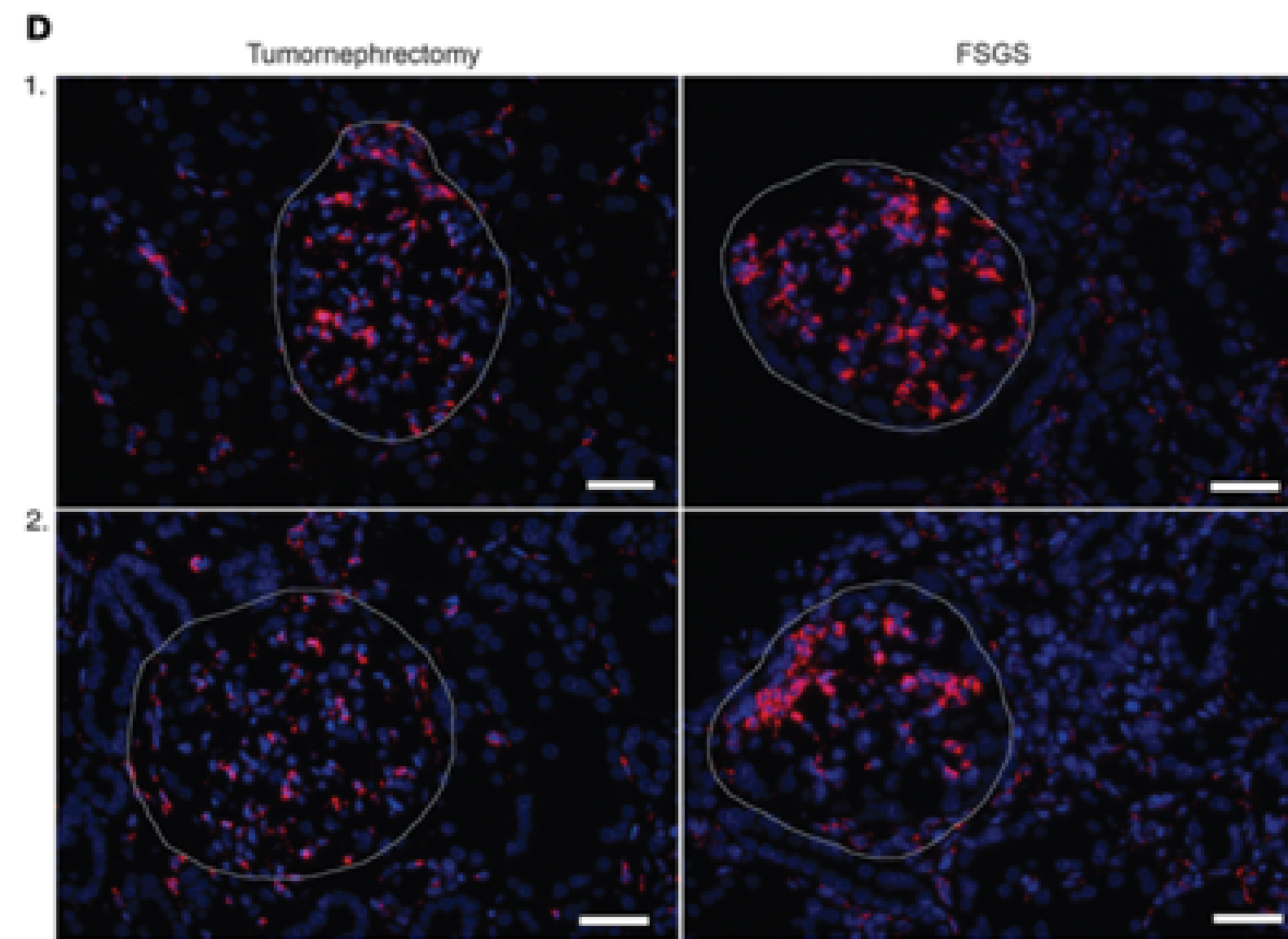
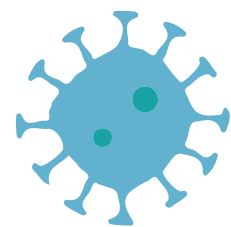
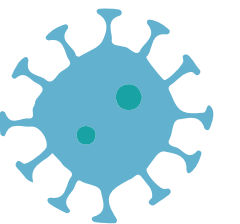
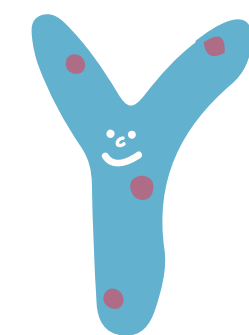


圖2 RNAscope檢測腫瘤腎切除術的未受影響部分的腎臟組織以及FSGS患者腎臟組織中A2M的表達



RNAscope技術是由Bio-Techne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，RNAscope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鏈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。

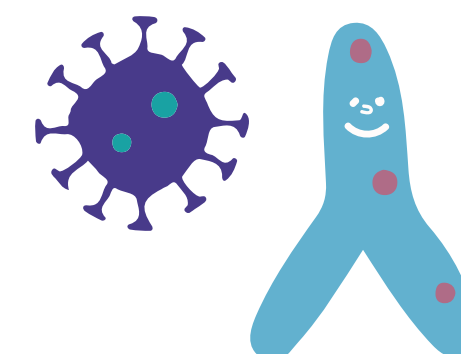


4 單分子檢測和單細胞定量：使用RNAscope®技術雜交上三對及以上雙Z 探針即可在標準的顯微鏡下呈現可觀察到的點狀訊號。ACD公司建議的分析軟件更可以定量每一個單細胞內RNA 的表現量。

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。



References :

Llorenç Solé-Boldo, Günter Raddatz, Sabrina Schütz, et al. Single-cell transcriptomes of the human skin reveal age-related loss of fibroblast priming. Commun Biol. 2020; 23;3(1):188.

