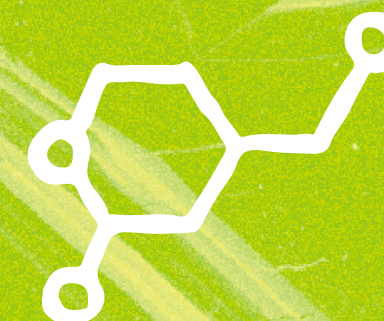
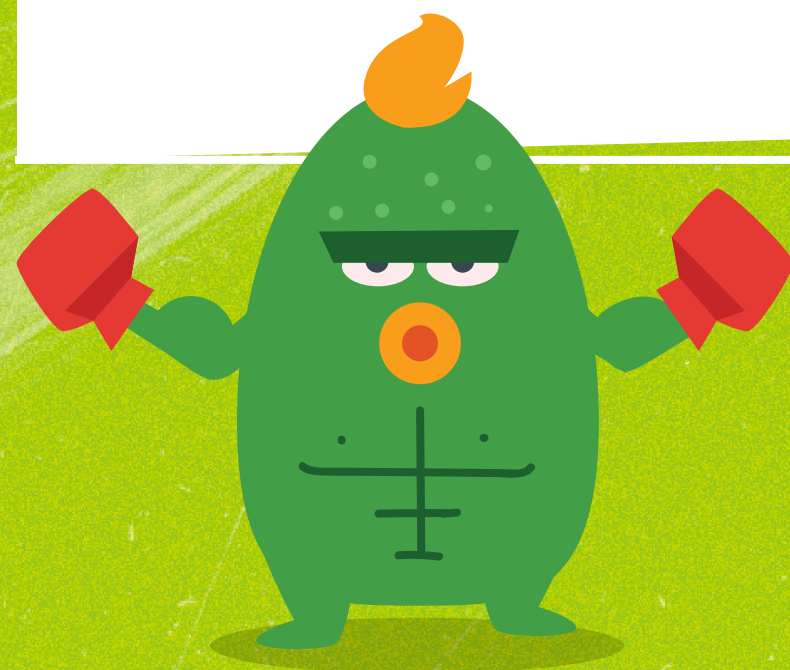




空間轉錄組學攜手Basescope技術鑑定 肌萎縮側索硬化症中GRM3和USP47的空間失調表現





肌萎縮側索硬化症（ALS）這是一種神經系統退行性疾病, 年發病率約為 0.002%。由於ALS是一種不可逆的致死性運動神經元疾病，而疾病的病因至今尚不十分明確，故人們一直以來致力於對ALS病因的研究，期望以此幫助該類疾病治療方法的開發。肌萎縮側索硬化症可大致分為家族性ALS（fALS），散發性ALS（sALS）和SOD1類ALS三類，其中，家族性ALS中的患者的基因定序結果顯示，其中一部分患者的9號染色體72開放閱讀框(Open reading frame)存在內含子六核苷酸重複序列擴增，因此此類患者被歸類為C9orf72 ALS。除了這部分基因改變外，有關其他基因在正常人和ALS患者中是否存在差異，以及這些基因在空間分佈上是否有特點，還未有太多證據。



“

2020年發表在 “Neuropathology and Applied Neurobiology” 上的一篇題為 “Spatial transcriptomics identifies spatially dysregulated expression of GRM3 and USP47 in amyotrophic lateral sclerosis” 的文章中，來自愛丁堡大學，以Gregory JM為首的研究團隊利用空間轉錄組技術，對ALS患者及非運動神經相關原因死亡的患者的腦組織進行了高通量轉錄組學分析，隨後使用來自美國Bio-Techne旗下ACD公司的Basescope技術對其中的部分差異表現基因進行了原位定位，分析了這些差異表現基因在空間分佈上的特性。





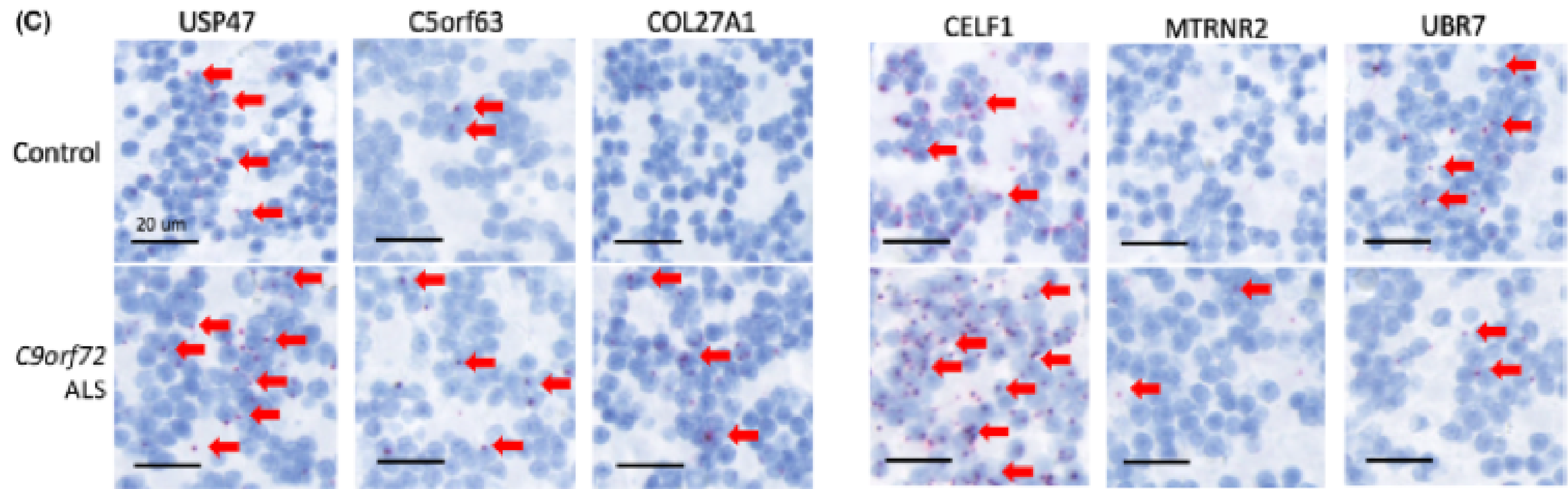
在文章中，作者首先使用空間轉錄組技術，對比正常組（非運動神經相關原因死亡的患者）和實驗組（C9orf72 ALS患者）差異表現的基因，篩選出16個具有整體差異表現的基因。隨後使用Basescope技術對這些基因進行原位定位驗證，結果顯示其中有8個基因在對照組樣本和患者樣本中的表現確實不同，在患者中存在表現失調的現象。此外，由於Basescope能夠達到單細胞分辨率，幫助研究者觀察到GRM3基因在患者小腦樣本的中間神經元中的表現相較於正常組樣本明顯增多；對於YWHAE基因，相較於對照組，患者的中間神經元中表現增多，浦肯野細胞(Purkinje cell)中表現量降低（結果見圖1）。

“

在文章中，作者首先使用空間轉錄組技術，對比正常組（非運動神經相關原因死亡的患者）和實驗組（C9orf72 ALS患者）差異表現的基因，篩選出16個具有整體差異表現的基因。隨後使用Basescope技術對這些基因進行原位定位驗證，結果顯示其中有8個基因在對照組樣本和患者樣本中的表現確實不同，在患者中存在表現失調的現象。此外，由於Basescope能夠達到單細胞分辨率，幫助研究者觀察到GRM3基因在患者小腦樣本的中間神經元中的表現相較於正常組樣本明顯增多；對於YWHAE基因，相較於對照組，患者的中間神經元中表現增多，浦肯野細胞(Purkinje cell)中表現量降低（結果見圖1）。



“



“

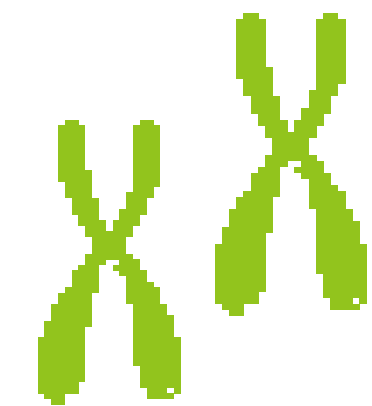
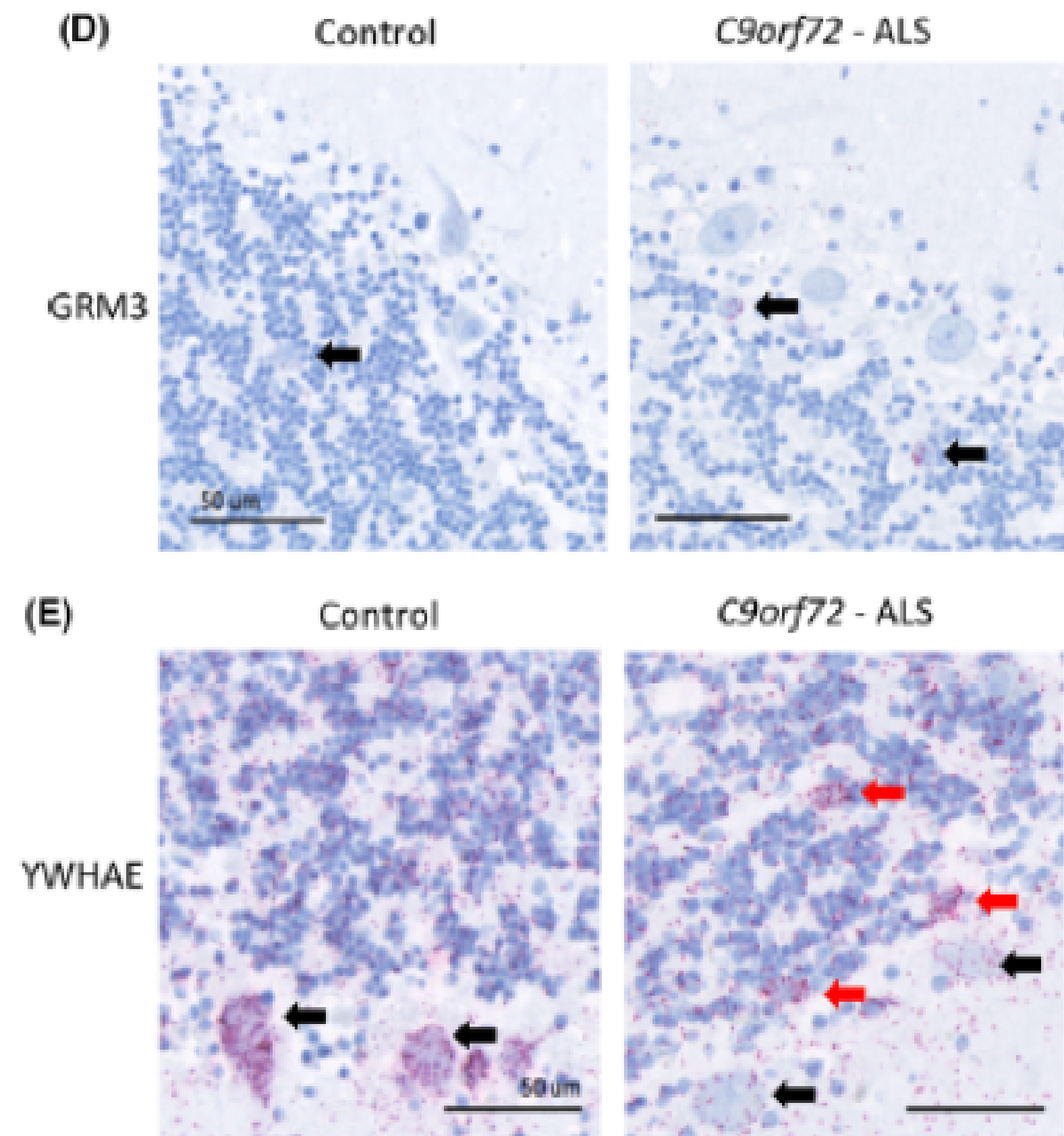
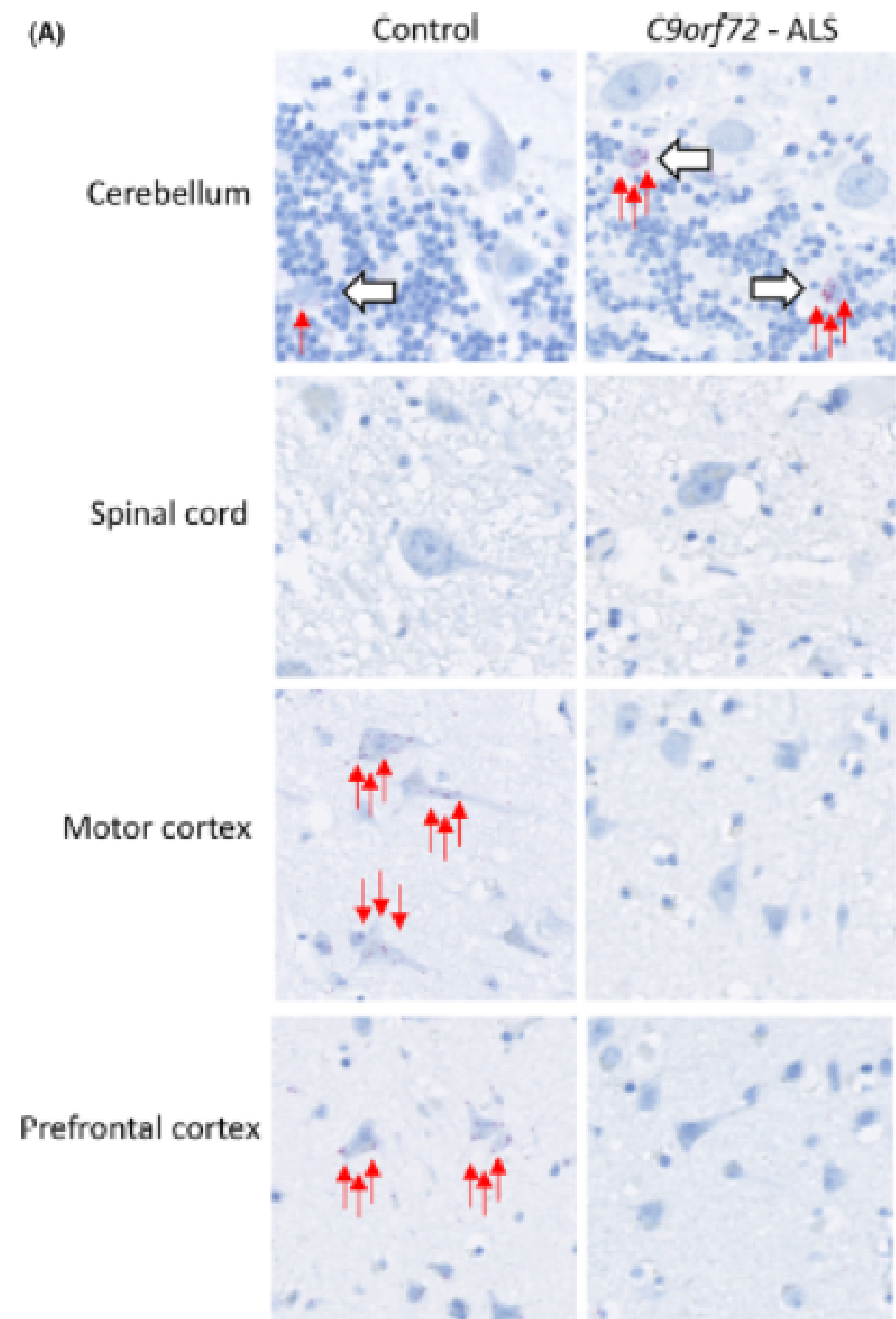
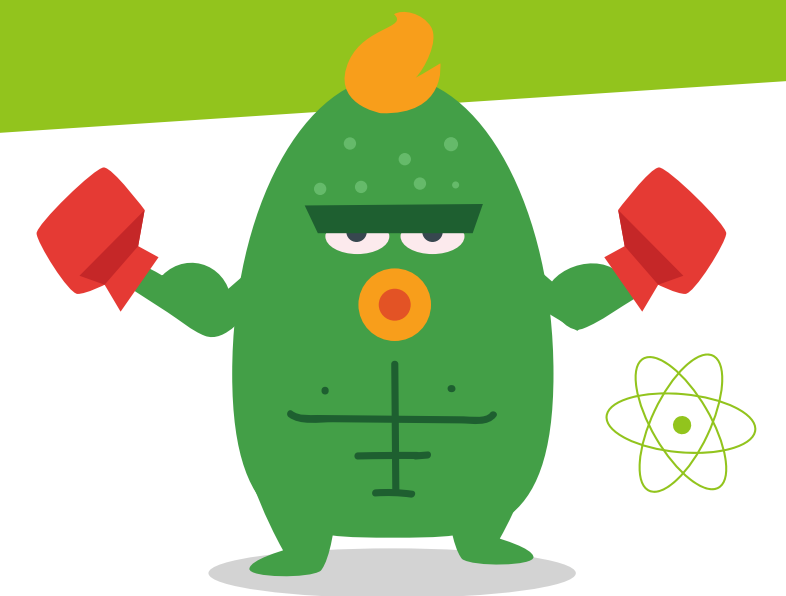


圖1.
使用Basescope技術對篩選出的
基因驗證其原位單細胞表現。



“

除小腦之外，作者還利用Basescope技術在多種類型ALS患者的死後腦組織樣本及對照組樣本中，對GRM3和USP47做了進一步的原位鑑定研究。研究結果顯示，在小腦外腦組織中，*C9orf72* ALS患者的GRM3和USP47轉錄與對照組腦中相比有明顯降低（圖2）。



根據不同基因的生物意義並結合實驗結果，作者推斷GRM3有可能可以作為ALS的其中一個治療標靶。而USP47作為蛋白抑制機制的重要組成部分，可能由於其缺失造成無法對由於基因錯誤重複造成的蛋白錯誤折疊及時修復和抑制，最終導致疾病發生、神經元壞死。

對於ALS死後患者，腦組織容易發生嚴重的自溶現象。作者利用Basescope高效準確的檢測效率，對死後剖檢樣本進行RNA原位檢測，很好地給出了部分差異調節基因的原位訊息，對於我們日後了解和治療ALS疾病產生深遠的意義。

關於技術的任何問題，請參見Bio-Techne ACD官網（<https://acdbio.com/rnascope-hi-plex-assays>）獲取更多資訊。



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，其特異性的双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:

Neuropathol Appl Neurobiol. 2020 Aug;46(5):441-457. Spatial transcriptomics identifies spatially dysregulated expression of GRM3 and USP47 in amyotrophic lateral sclerosis