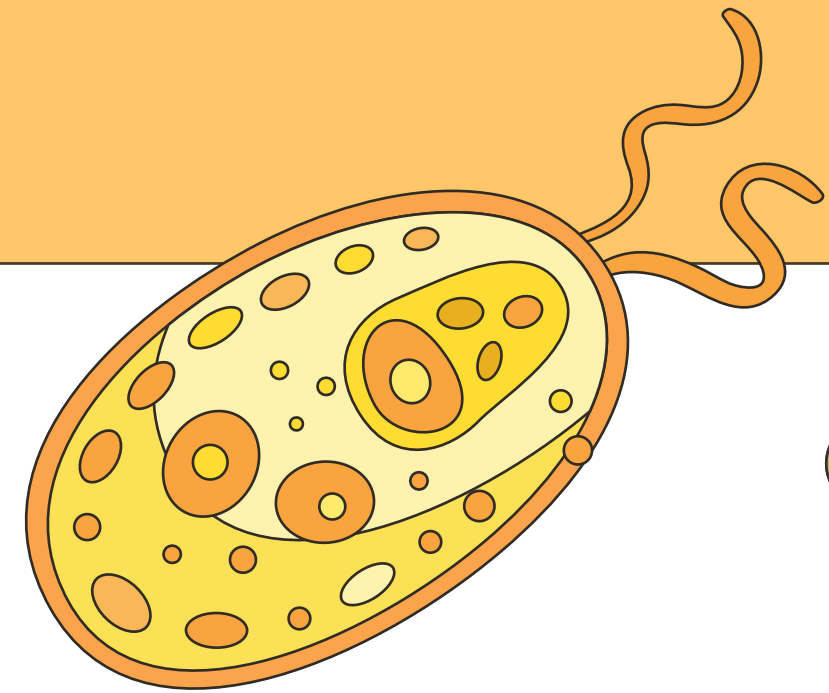
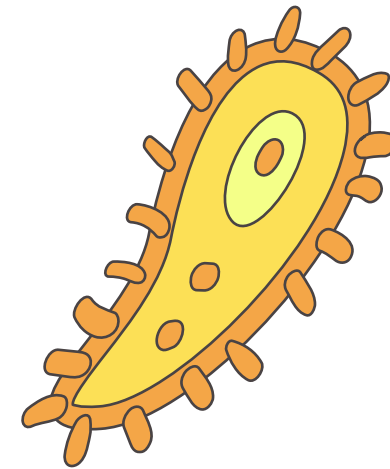
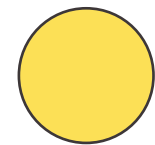
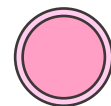
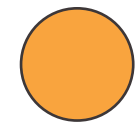
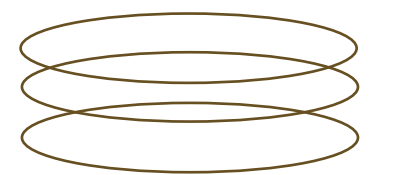


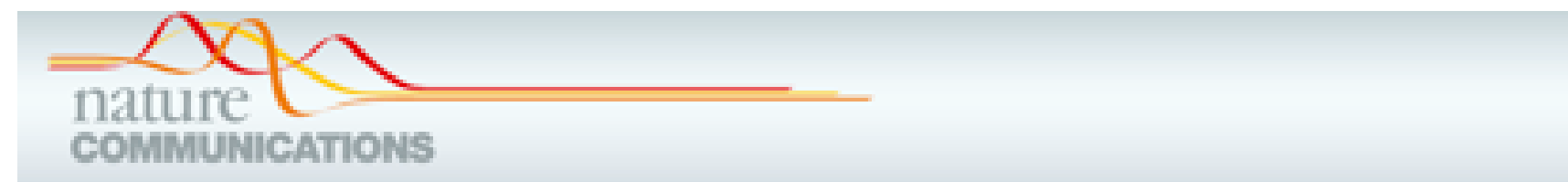
RNAscope在生殖細胞 單細胞定序後驗證中的應用



單細胞定序技術是近年來迅速發展的生命科學前瞻技術，它在單細胞層面揭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，單細胞定序技術在神經科學、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。但是單細胞定序結果的真實性，不同檢測資訊在組織中的特異性分佈，與檢測結果的生物學意義密切相關。故在單細胞定序後重要標靶的原位回溯具有重要的生物學分析意義。RNAscope原位雜交技術能直觀的觀察基因表達的空間位置，無懼新發現標靶無可用免疫組織染色用抗體，分泌性因子或者標靶為非編碼RNA等情況，因此RNAscope對於單細胞定序的結果回溯到組織原位上進行驗證提供了重要的技術方法，成為與單細胞定序並行的研究方法。本文為大家解讀2021年發表的使用RNAscope技術在單細胞定序後驗證中的應用系列文章



2021年來自於南方醫科大學趙小陽課題組，北京大學湯富酬課題組和深圳大學常港課題組在Nature Communication雜誌上，發表了題為Cell-fate transition and determination analysis of mouse male germ cells throughout development的研究論文。該研究首次闡明了雄性生殖細胞的命運轉變過程和調控機制，發現轉變期原始生殖細胞（Transitional PGC）是一類重要的過渡態細胞群，揭示了Notch訊息傳遞路徑在有絲分裂阻滯過程中的關鍵調控功能。



ARTICLE

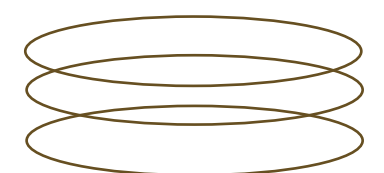
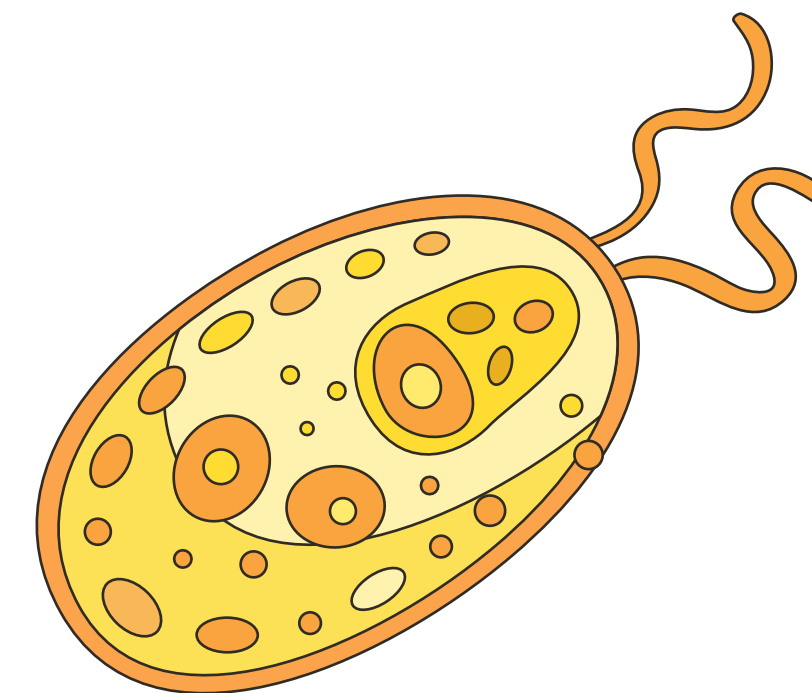
<https://doi.org/10.1038/s41467-021-27172-0>

OPEN



Cell-fate transition and determination analysis of mouse male germ cells throughout development

Jiexiang Zhao^{1,8}, Ping Lu^{2,3,8}, Cong Wan^{1,8}, Yaping Huang^{1,8}, Manman Cui¹, Xinyan Yang¹, Yuqiong Hu^{2,3}, Yi Zheng¹, Ji Dong^{2,3}, Mei Wang¹, Shu Zhang^{2,3}, Zhaoting Liu¹, Shuhui Bian^{2,4}, Xiaoman Wang¹, Rui Wang^{2,4}, Shaofang Ren¹, Dazhuang Wang¹, Zhaokai Yao¹, Gang Chang^{5,8}, Fuchou Tang^{2,3,4} & Xiao-Yang Zhao^{1,6,7}



在有性生殖中，生殖細胞承載著將遺傳物質傳遞到下一代的任務，這也構成了生命繁衍生息的基礎。胚胎期和青春期雄性生殖細胞的發育對於雄性生殖力的建立至關重要，然而雄性生殖細胞的全面發育狀況尚不明確。哺乳動物雄性生殖細胞的發育是一個逐步的細胞命運轉換過程，其完整發育軌跡包括原始生殖細胞（PGC）特化、PGC遷移、生殖細胞性別決定、性腺PGC增殖停滯、原始精原細胞-精原細胞轉化和精子發生，為了闡明其中關鍵的細胞發育階段和調控機制，在這篇研究論文中，研究人員首先建立了雙轉殖基因螢光報告小鼠（Blimp1-mVenus和Stella-ECFP，BVSC），利用單細胞定序分析了涵蓋小鼠雄性生殖細胞發育28個關鍵時間點的11896個細胞的轉錄組數據，獲得了小鼠雄性生殖細胞全時程發育的高精度單細胞轉錄組圖譜。然後通過降維和聚類分析，鑑定出了18種生殖細胞類型，包括：特化的原始生殖細胞，遷移的原始生殖細胞，有絲分裂的原始生殖細胞和有絲分裂阻滯的原始生殖細胞等（圖1）。

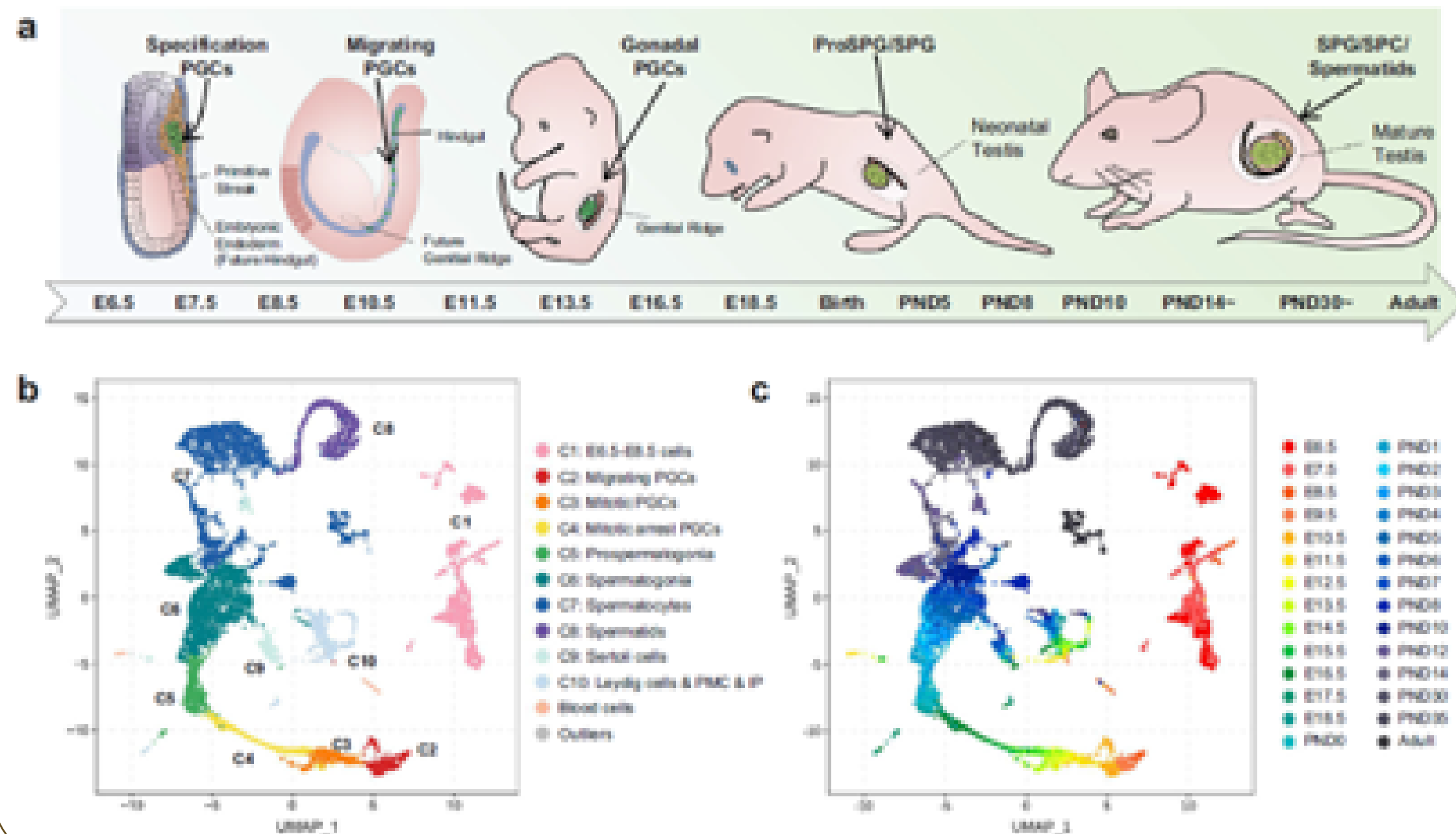
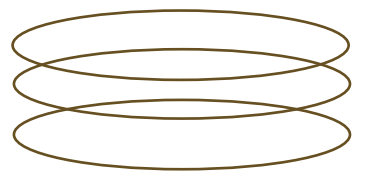


圖1.
小鼠雄性生殖細胞發育
的單細胞圖譜。



研究人員通過分析定序後的雄性生殖細胞的增殖狀態和轉錄組特徵，發現一類處於有絲分裂向有絲分裂阻滯轉變過程的過渡態細胞類型，它們獨立聚群並展現出特有的基因表達特徵（圖2），因此將這類細胞定義為轉變期原始生殖細胞（Transitional PGC）。進一步的通過與有絲分裂PGC和有絲分裂阻滯PGC的比較，分析了轉變期PGC的細胞特徵。發現轉變期PGC的特徵基因在基因功能分類分析中主要集中在如“細胞週期調節”、“細胞週期調控”和“APC/C介導的細胞週期蛋白降解”中，表明細胞週期可能參與PGC發育這一階段的調節。在這些基因中，Wee1被選為轉變期PGC的特異性標記物，以供進一步研究。



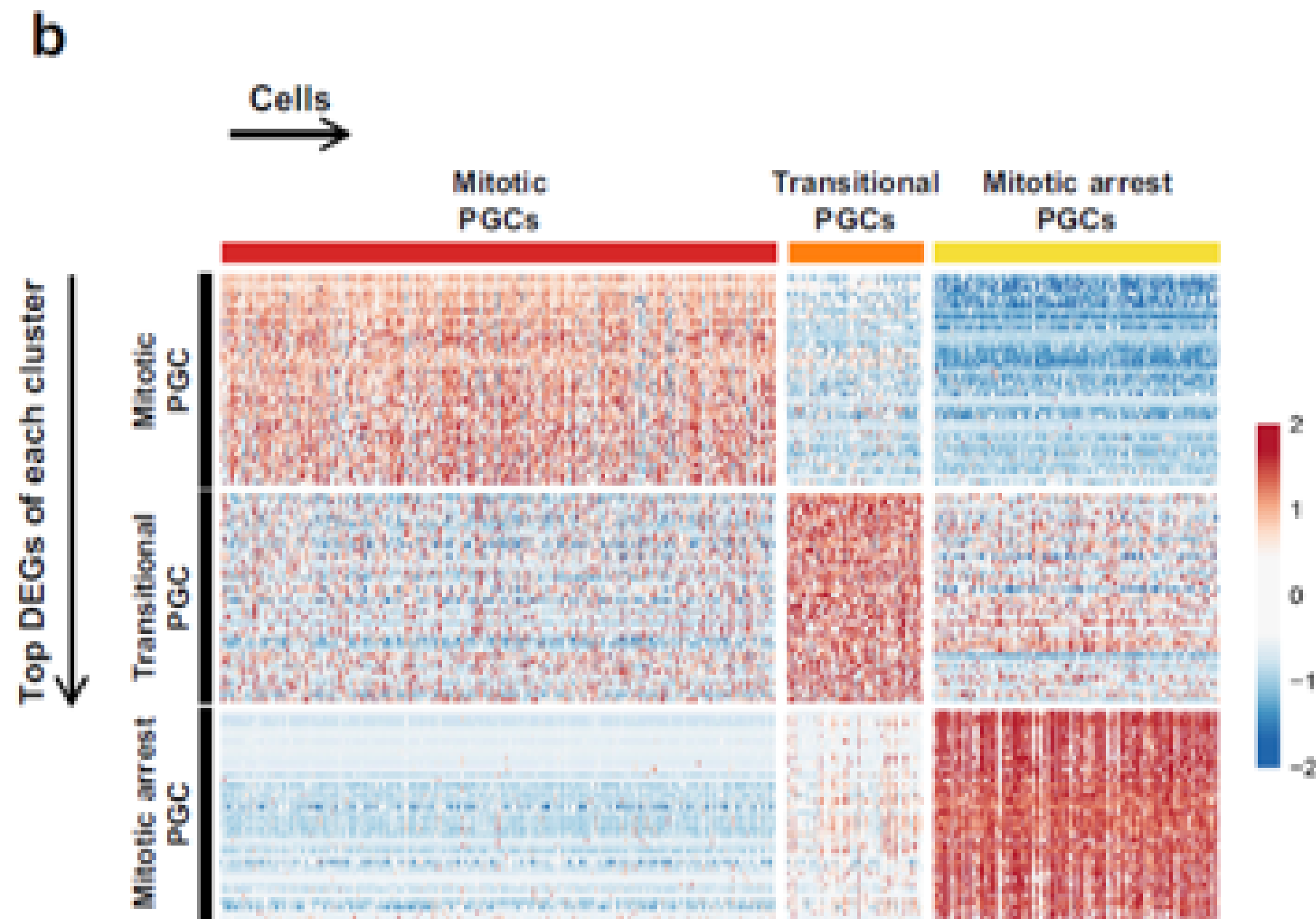
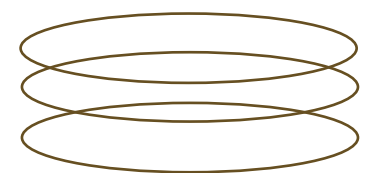
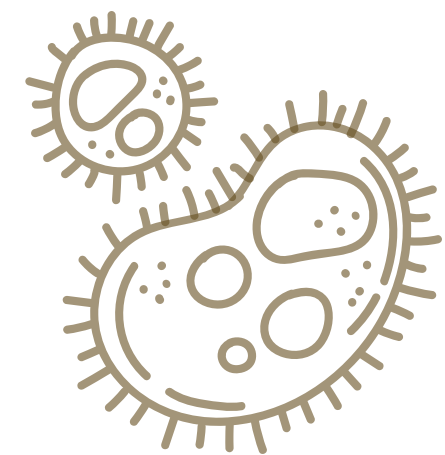
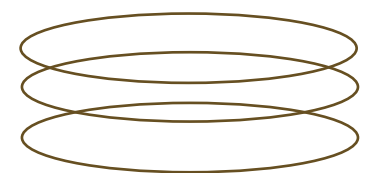


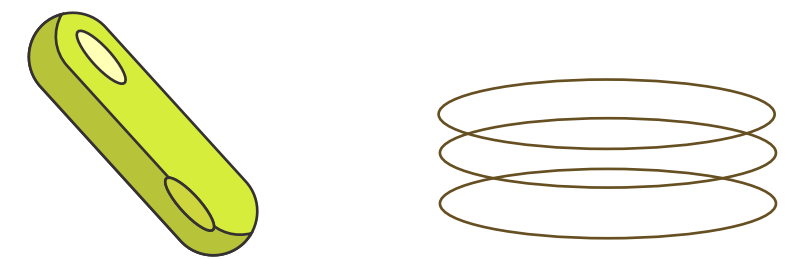
圖2. 轉變期PGC，有絲分裂
PGC，有絲分裂阻滯PGC三種
細胞群的基因表達特徵。



隨後，研究人員通過使用美國Bio-Techne公司旗下子品牌ACD公司開發的RNA原位檢測（RNAscope）技術協同蛋白共檢測方法（ICW，該方法通過整合RNAscope檢測與免疫螢光染色可以實現在同一個樣本中同時檢測RNA與蛋白的表達）在胚胎期14.5天雄性小鼠性腺石蠟切片中原位鑑定出轉變期PGC，有絲分裂PGC，有絲分裂阻滯PGC這三種細胞群的存在（圖3）。從圖中可以看出，免疫螢光檢測的MKI67陽性（綠色訊號），RNAscope檢測的Wee1 RNA高表達（紅色訊號）的細胞群為轉變期PGC；MKI67陽性，Wee1低表達的細胞群為有絲分裂PGC；MKI6陰性，Wee1低表達的細胞群為有絲分裂阻滯PGC。



通過這種免疫螢光染色和RNAscope聯合分析的方法，直觀的驗證了單細胞定序分析的結果。單細胞定序分析和RNAscope驗證結果表明原始生殖細胞在歸巢後從有絲分裂向有絲分裂阻滯的轉變中，伴隨著的是細胞週期的轉變，多能性向雄性生殖細胞單分化潛能的轉變，以及細胞能量代謝的轉變，而轉變期PGC代表了這一過程的過渡態細胞。之後的研究中，研究人員在這一轉變過程中鑑定出一系列具有潛在功能的調控因子，並且通過體內的小分子抑制實驗揭示了Notch訊號傳遞路徑對於啟動有絲分裂阻滯過程的關鍵作用。



d

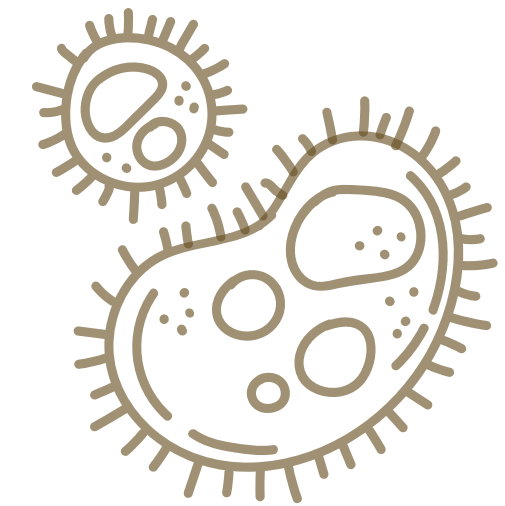
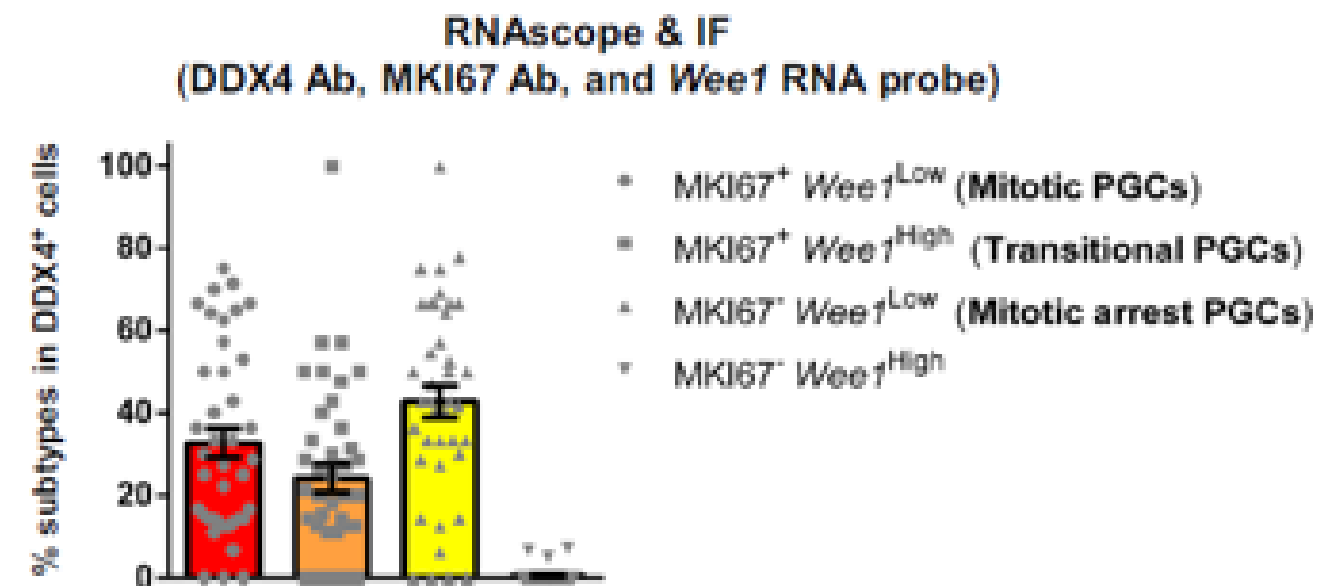
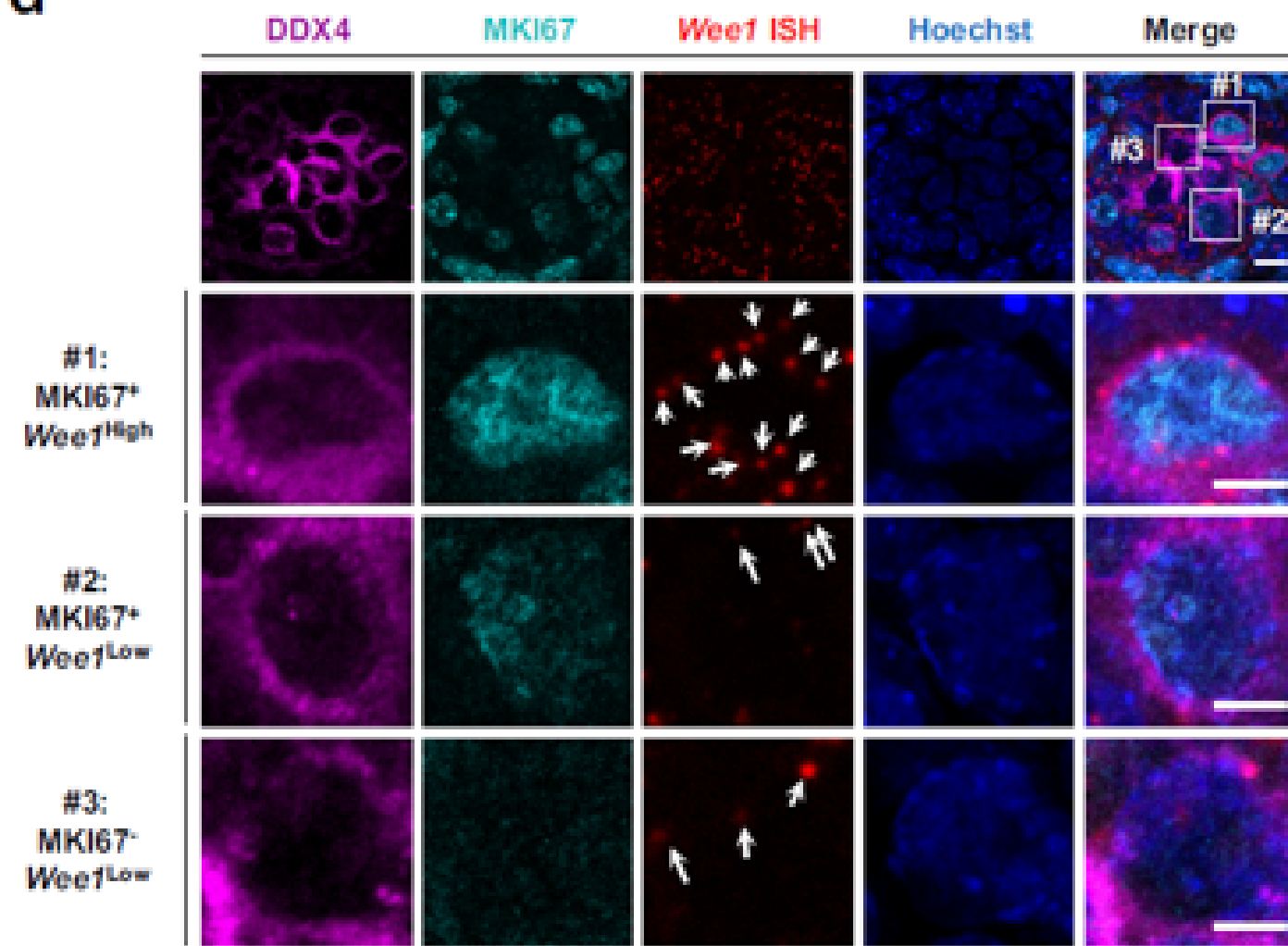
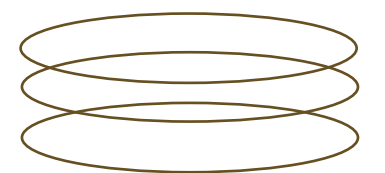
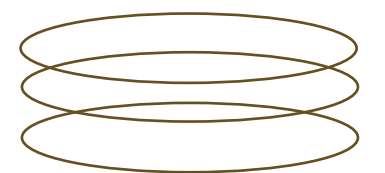


圖3. RNA-蛋白共檢測 (ICW) 在胚胎期14.5天雄性小鼠性腺石蠟切片中原位鑑定轉變期PGC，有絲分裂PGC，有絲分裂阻滯PGC三種生殖細胞群。



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 單分子觀察和單細胞定量：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。

References :

Jiexiang Zhao, Ping Lu, Cong Wan, et al. Cell-fate transition and determination analysis of mouse male germ cells throughout development. Nat Commun. 2021, 12(1):6839.