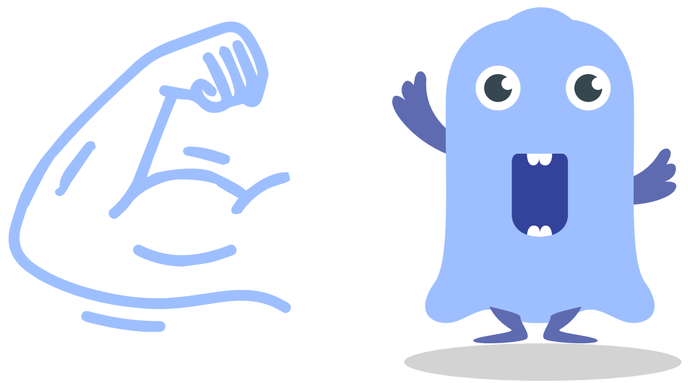


a bio-techne® brand

RNAscope在
肌腱組織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，它在單細胞層面顯示細胞的基因表現狀態，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，同時由於單細胞定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RNAscope對於單細胞定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，成為單細胞定序下游驗證的研究方法。今天為大家分享2020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。

2020年在Am J Physiol Cell Physiol雜誌發表的題為Single-cell Transcriptomic Analyses Identifies Extensive Heterogeneity in the Cellular Composition of Mouse Achilles Tendons的研究論文，使用單細胞RNA定序確定了小鼠跟肌腱內細胞群的異質性，鑑定了11種不同類型的細胞，包括3種以前未描述的肌腱纖維母細胞。對研究機械負荷和疾病如何影響健康和患病肌腱中的不同細胞群，可能會對肌腱疾病的治療產生進一步的影響。



Am J Physiol Cell Physiol. 2020 Nov 1; 319(5): C885–C894.
Published online 2020 Sep 2. doi: 10.1152/ajpcell.00372.2020
PMCID: PMC7701267
PMID: 32877217
Deconstructing Organs: Single-Cell Analyses, Decellularized Organs, Organoids, and Organ-on-a-Chip Models

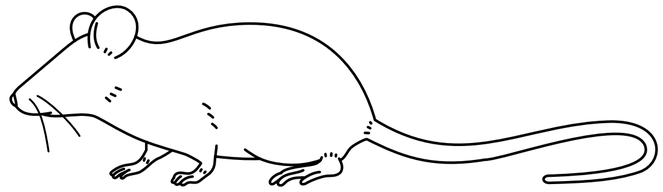
Single-cell transcriptomic analysis identifies extensive heterogeneity in the cellular composition of mouse Achilles tendons

Andrea J. De Micheli,[1,2,*] Jacob B. Swanson,[1,*] Nathaniel P. Disser,[1] Leandro M. Martinez,[1] Nicholas R. Walker,[1,3] David J. Oliver,[1] Benjamin D. Cosgrove,[2] and Christopher L. Mendias[1,3]

肌腱是一種緻密的結締組織，在肌肉和骨骼之間儲存和傳遞力量。細胞異質性越來越被認為是組織內環境穩定和疾病生物學基礎中的一個重要因素，但對肌腱中細胞類型的多樣性知之甚少。為了解決這個問題，本文研究人員使用單細胞RNA定序確定了小鼠跟肌腱內細胞群的異質性。首先從6週齡大小的雄性小鼠身上分離跟腱組織，然後處理成單細胞懸浮液進行單細胞定序分析。在質量控制驗證後，總共分離獲得了1197個細胞，這些細胞聚集成11個不同的細胞群。單細胞定序鑑定的這11種不同類型的細胞包括3種以前未描述的肌腱纖維母細胞，研究人員將其稱之為肌腱纖維母細胞1和2，以及連接纖維母細胞，這些細胞共同表現I型膠原Col1a1。



在顯著差異表現基因中，研究人員注意到兩個細胞外基質結合基因Spp1和Dpt分別在肌腱纖維母細胞1和2中大量表現，可以分別作為肌腱纖維母細胞1和2的分子marker。在此基礎上研究人員需要在組織原位證實肌腱纖維母細胞1和2的存在。由於兩個新發現的目標基因缺乏有效的免疫組織染色用抗體，該研究團隊透過RNAscope原位雜交的方法檢測了Spp1與Dpt這兩個基因在小鼠跟腱組織原位的表現與分佈（圖1 A）。從下圖中可以看到，RNAscope檢測了纖維母細胞的marker Col1a1（綠色訊號），標示了小鼠跟腱組織中的纖維母細胞（圖1 B）。 RNAscope檢測到Spp1（紅色訊號）與Dpt（綠色訊號）分別位於不同的纖維母細胞中，即分別代表了纖維母細胞1和2，在組織原位證實了單細胞定序的結果。



在顯著差異表現基因中，研究人員注意到兩個細胞外基質結合基因Spp1和Dpt分別在肌腱纖維母細胞1和2中大量表現，可以分別作為肌腱纖維母細胞1和2的分子marker。在此基礎上研究人員需要在組織原位證實肌腱纖維母細胞1和2的存在。由於兩個新發現的目標基因缺乏有效的免疫組織染色用抗體，該研究團隊透過RNAscope原位雜交的方法檢測了Spp1與Dpt這兩個基因在小鼠跟腱組織原位的表現與分佈（圖1 A）。從下圖中可以看到，RNAscope檢測了纖維母細胞的marker Col1a1（綠色訊號），標示了小鼠跟腱組織中的纖維母細胞（圖1 B）。 RNAscope檢測到Spp1（紅色訊號）與Dpt（綠色訊號）分別位於不同的纖維母細胞中，即分別代表了纖維母細胞1和2，在組織原位證實了單細胞定序的結果。

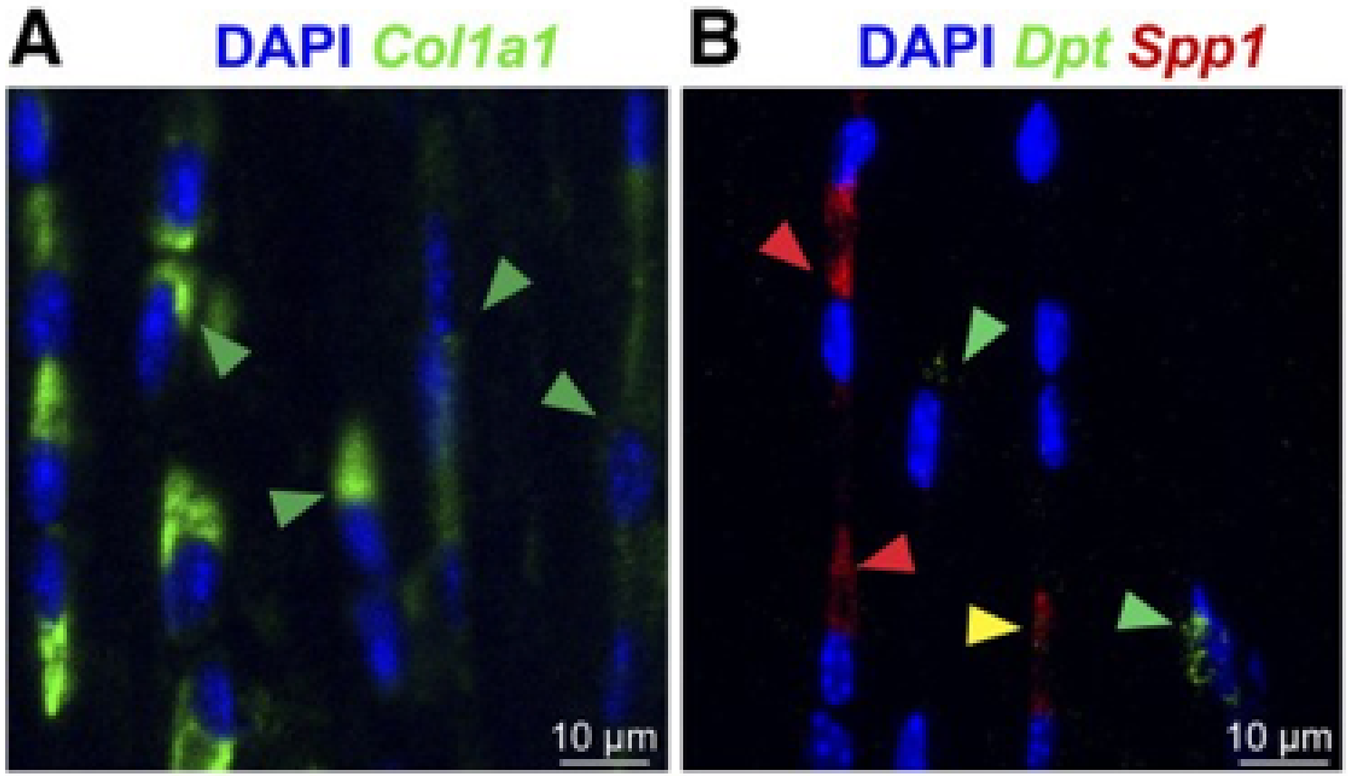
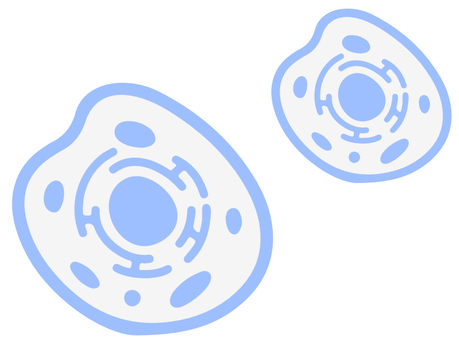


圖1.
RNAscope檢測小鼠肌腱纖維母細胞中Dpt與Spp1的表達。

單細胞定序結果也顯示了兩種肌腱的標記物Scx與Tnmd在肌腱纖維母細胞中的表現，少數纖維母細胞1表達Scx，部分纖維母細胞1和2表達Tnmd。由於缺乏可用免疫組織染色抗體，在此研究人員同樣的使用RNAscope技術在小鼠肌腱纖維母細胞中原位觀察Scx與Tnmd的表現，從而對單細胞定序的結果在組織原位進行驗證。如下圖所示，RNA–scope檢測的結果與單細胞定序結果一致，僅有部分纖維母細胞共同表達Scx與Tnmd（圖2 D，黃色箭頭所示），部分纖維母細胞表現Tnmd但不表現Scx（圖2 E，紅色箭頭所示），部分纖維母細胞既不表現Tnmd也不表現Scx（白色箭頭所示）。



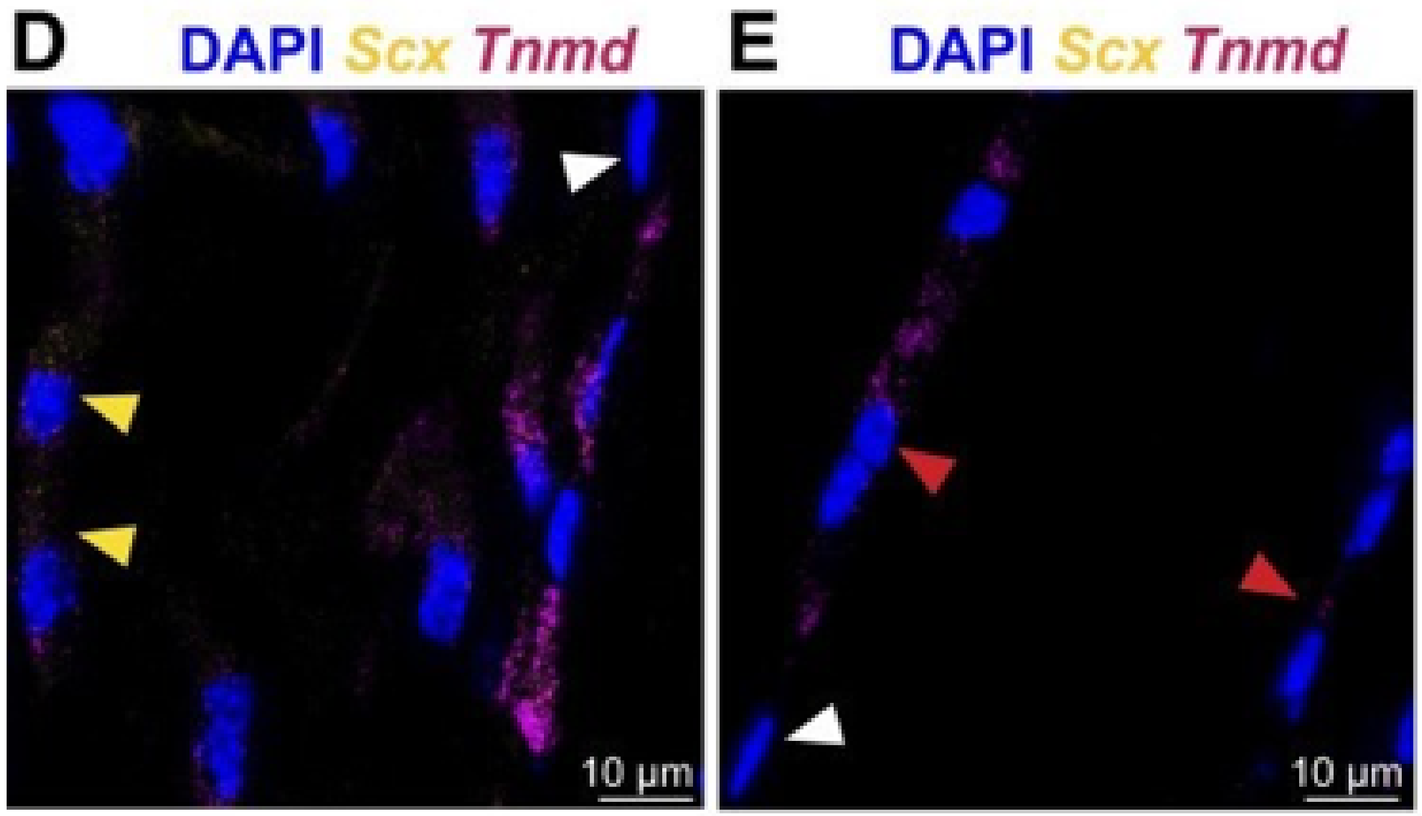


圖2.
RNAscope檢測小鼠肌腱纖維母細胞中Scx與Tnmd的表現。

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信號放大分子結合位點，並會在雜交過程中被洗掉，從而防止非特異性信號的放大，使得探針的信號具有高度特異性。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信號的可視化。

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信號。 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信號放大，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 :

Andrea J. De Micheli, Jacob B. Swanson, Nathaniel P. Disser, et al. Sin–gle–cell Transcriptomic Analyses Identifies Extensive Heterogeneity in the Cellular Composition of Mouse Achilles Tendons. Am J Physiol Cell Physiol. 2020; 319(5): C885—C894