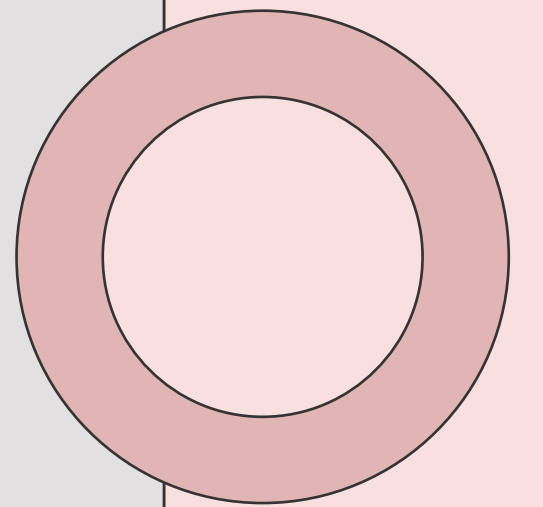
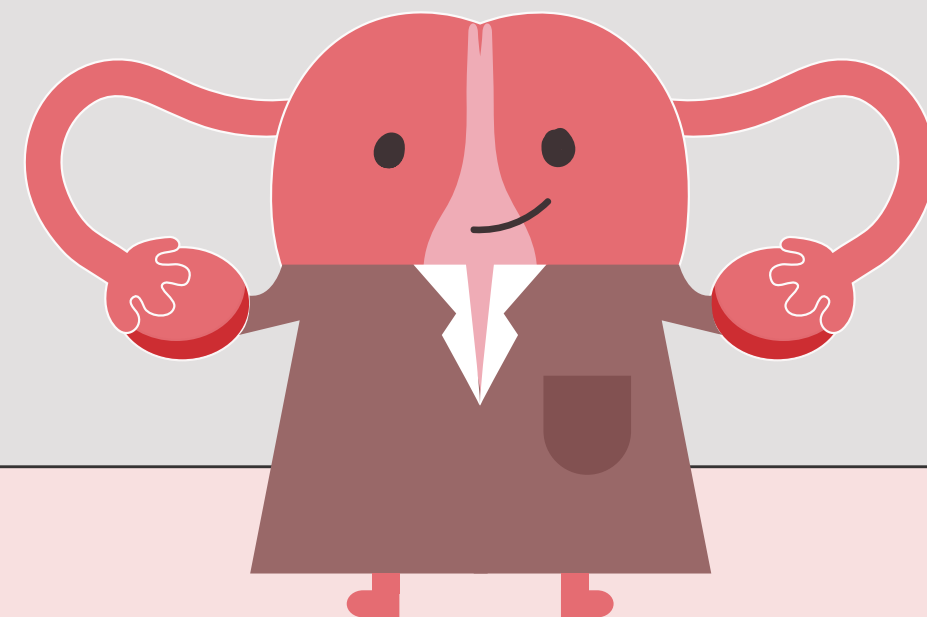
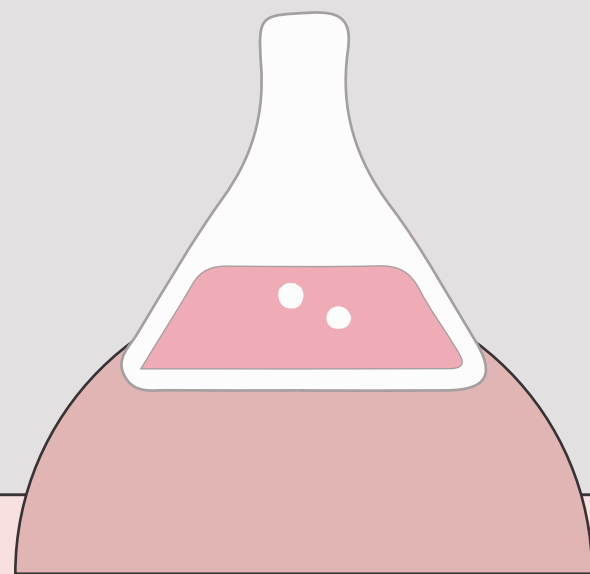


使用Basescope法對染色體外環狀DNA在 極惡性漿液型卵巢癌中的特性研究

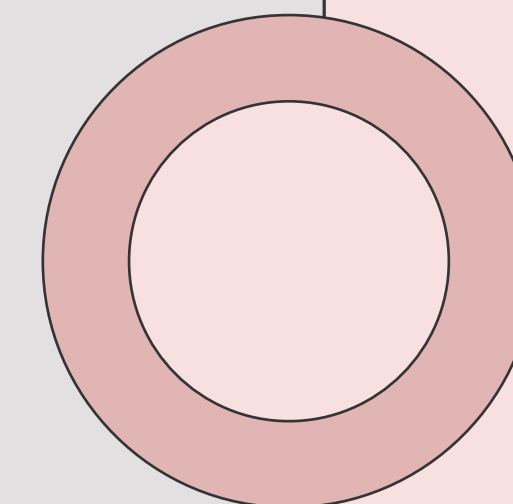
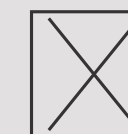


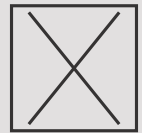
Global characterization of extrachromosomal circular DNAs in advanced high grade serous ovarian cancer

Yixuan Cen^{1,6}, Yifeng Fang^{2,6}, Yan Ren¹, Shiyuan Hong³ , Weiguo Lu^{1,4,5}  and Junfen Xu^{4,1} 

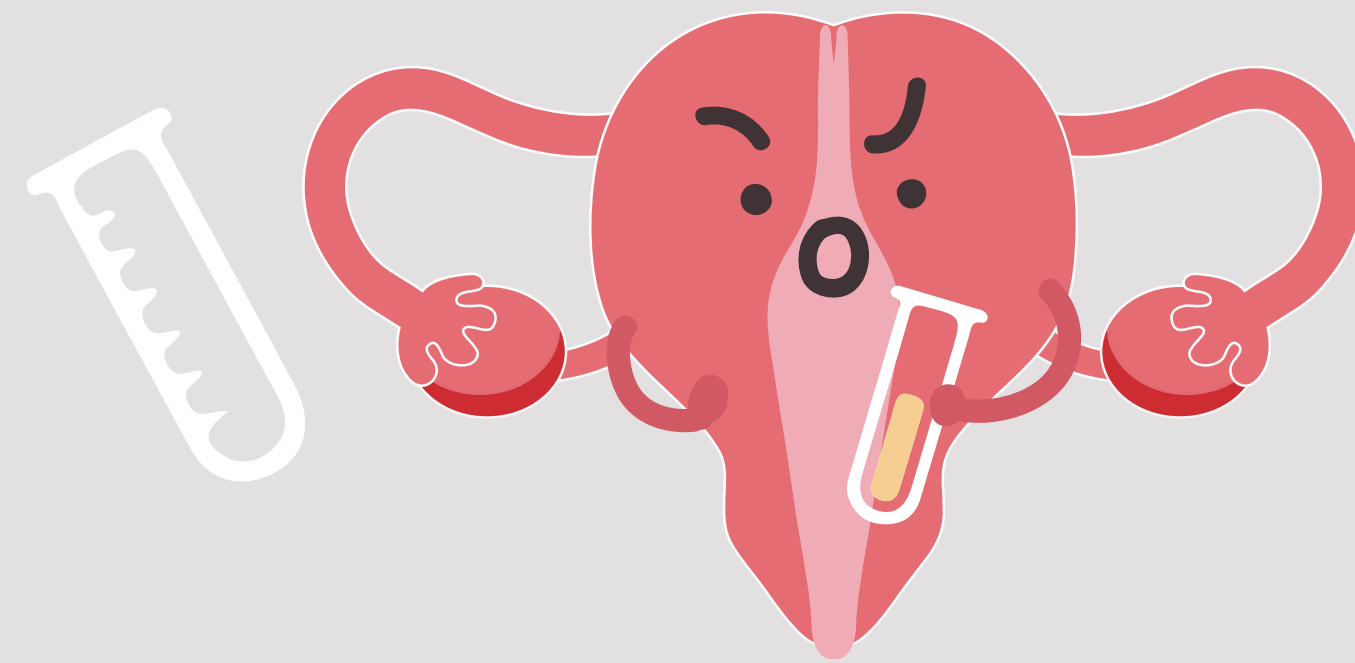
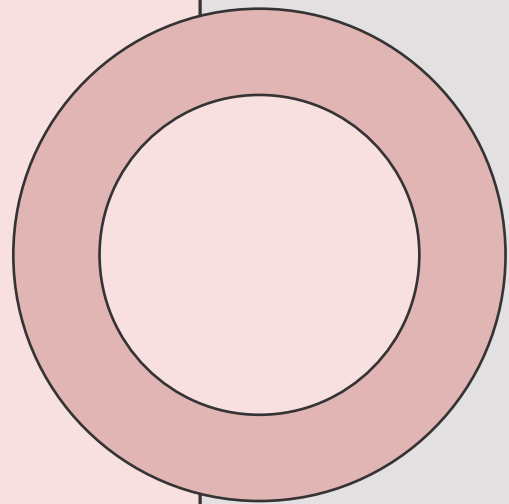
© The Author(s) 2022

早在1965年，人們就發現了存在於染色質外的環狀DNA，這種染色體外環狀DNA被認為是自然界普遍存在的一類DNA分子形式（eccDNA），在酵母、線蟲、果蠅和哺乳動物體內都發現有環狀DNA的存在。隨著近年來對eccDNA的研究逐步深入，人們逐漸認識到染色體外環狀DNA與腫瘤、衰老等生理病理過程密切相關，並確認這類DNA攜帶非單一基因組位點，發揮著影響腫瘤驅動基因、影響抗藥性、進行腫瘤異質性調控等多種作用。





在此基礎上，2022年4月13日，浙江大學醫學院附屬婦產科醫院呂衛國/許君芬課題組在Cell Death & Disease雜誌上發表了一篇題為“Global characterization of extrachromosomal circular DNAs in advanced high grade serous ovarian cancer”的文章[1]，研究eccDNA在原發和轉移型極惡性漿液型卵巢癌（HGSOC）樣本中的分佈差異。





在研究之初，該研究團隊對四對極惡性漿液型卵巢癌的原發和轉移瘤病人樣本進行了eccDNA的定序分析(Circle-seq)分析。根據Circle-seq定序結果，與HGSOC的原發組織相比，在轉移組織中篩選出464個有表現差異的eccDNAs，篩選閾值為 $|FC| \geq 2$ 和 $P < 0.05$ 。在對比確認後，該研究團隊著重對DNMT1circle10302690–10302961的分佈及功能進行了研究，為了驗證該eccDNA的分佈以及在原發及轉移瘤中的分佈差異，作者進行了包括原位雜交在內的一系列驗證性實驗。下圖為使用Basescope對該eccDNA，DNMT1circle10302690–10302961在原發漿液型卵巢癌（HGSOC）以及轉移瘤（HGSOC-M）石蠟樣本切片中的檢測結果。左圖中的紅色訊號點為檢測到的eccDNA的分佈位置。

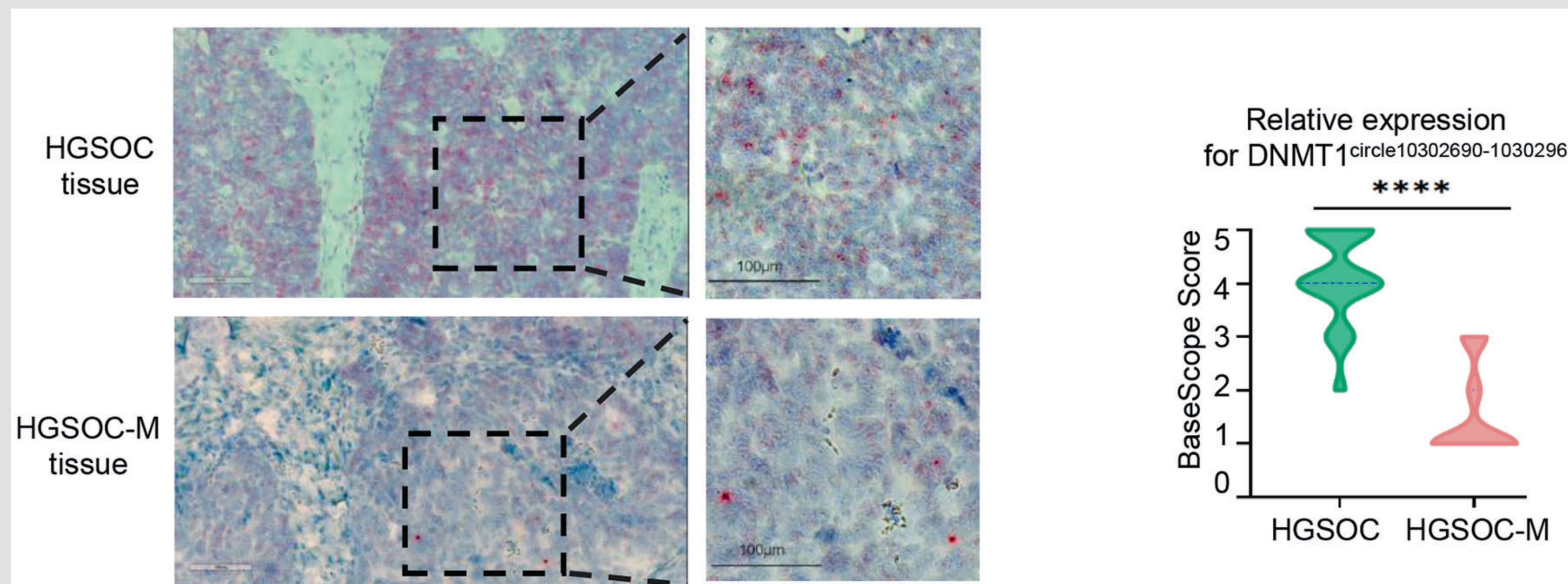
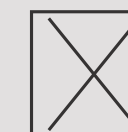
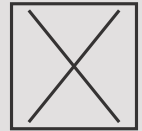
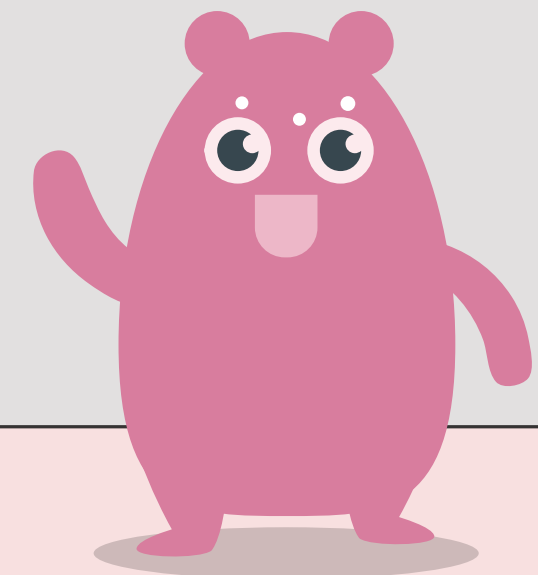


圖1，Basescope法檢測環狀DNA，DNMT1^{circular}10302690-10302961在原發漿液型卵巢癌（HGSOC）以及轉移瘤（HGSOC-M）石蠟樣本切片中的分佈，圖中紅色訊號點位元檢測到的該eccDNA的分佈。



Basescope Technology是美國Bio-Techne公司旗下ACD公司的RNA原位雜交技術，該技術通過對首尾成環區域的RNA或者非染色體DNA進行探針設計，可以特異性檢測環狀RNA或者eccDNA首尾成環區域，下圖為該技術對環狀RNA Kihl2進行的探針設計示意圖。針對於Kihl2成環區域的外顯子2（E2）和外顯子4（E4）連接區域，進行Basescope探針設計，可以特異性對該環狀RNA進行檢測；針對於線性RNA的E4/E5連接區域位元點進行探針設計，可以原位確認該RNA線性分佈；而針對於非成環區域的E2/E3連接點進行探針設計，則可以檢測Kihl2包括線性和環狀RNA的分佈。本研究中的環狀DNA（eccDNA）的設計原理同環狀RNA設計原理。



BaseScope probe design circular RNA

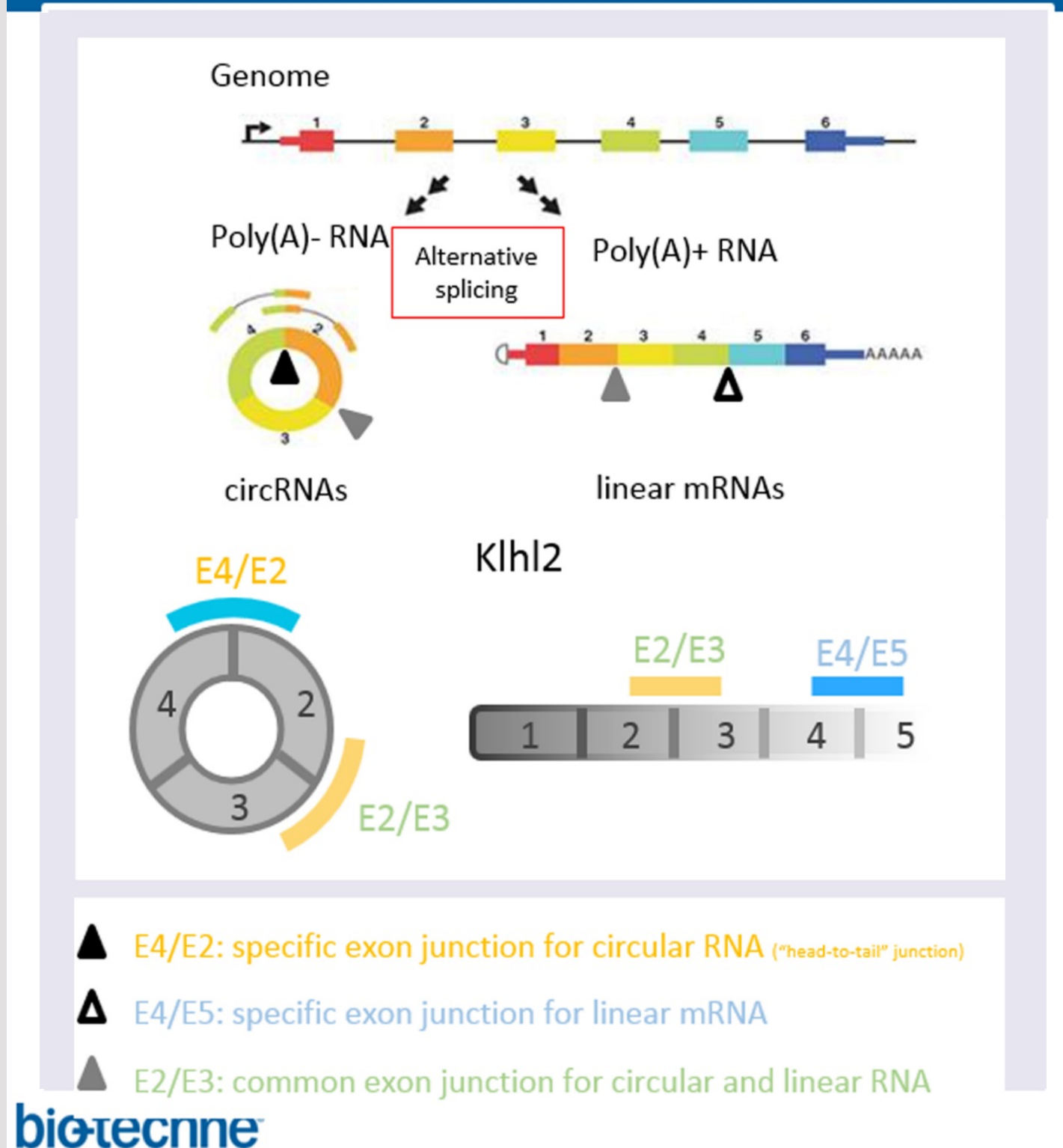
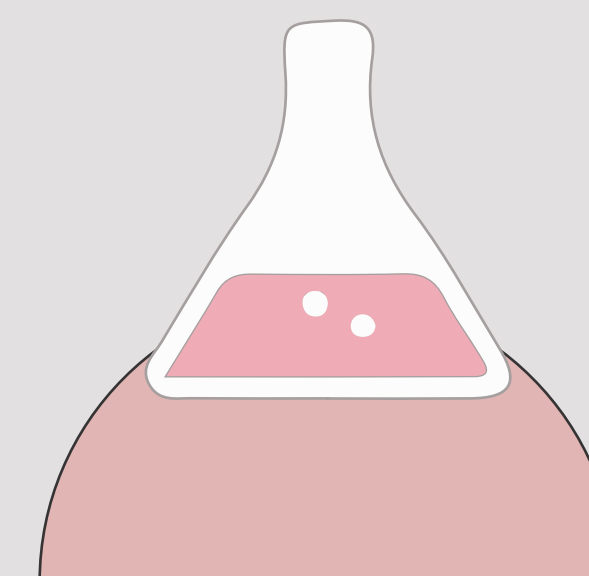
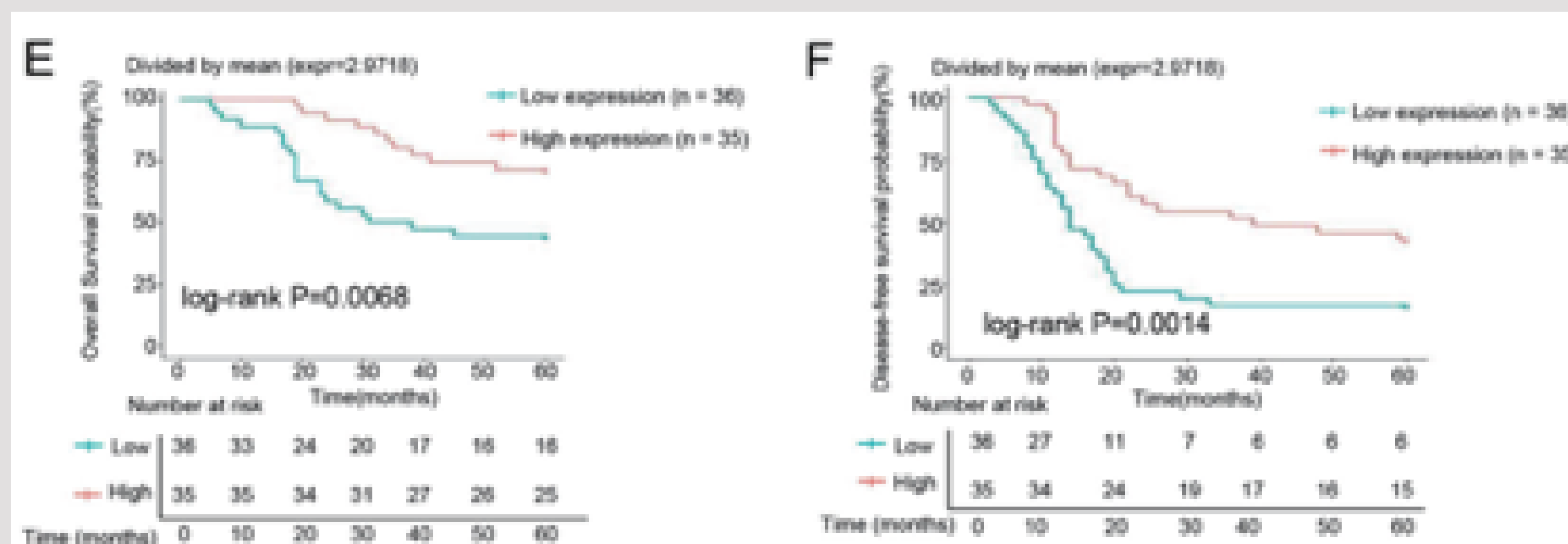
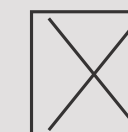
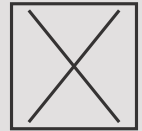


圖2，Basescope對環狀RNA成環的E2/E4區域進行探針設計，用以檢測環狀RNA；對E4/E5連接區域進行探針設計，用以檢測線性RNA；對E2/E3連接區域進行探針設計，用以檢測環狀及線性RNA。

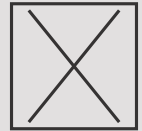


在接下來的研究中，該研究團隊通過4個線上資料庫(TCGA、GSE9891、GSE26712和GSE102073)分析了DNMT1表現程度與HGSOC患者預後的關係。最終結果顯示原發性HSGOC腫瘤中DNMT1circle10302690-10302961的低表現，與較短的整體存活率(OS)和較低的無病存活率(DFS)相關，顯示DNMT1circle10302690-10302961的減少會造成HGSOC的預後不良（下圖）。



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：

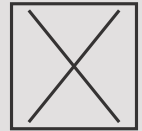
- 1 應用廣泛：** 使用RNAscope技術，目標RNA為大於等於300個鹼基的特異序列，即可進行探針設計。因而RNAscope技術可以應用於幾乎所有物種，所有組織以及所有基因的檢測。



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元點，並會在雜交過程中被洗脫掉，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2~4周時間即可完成。

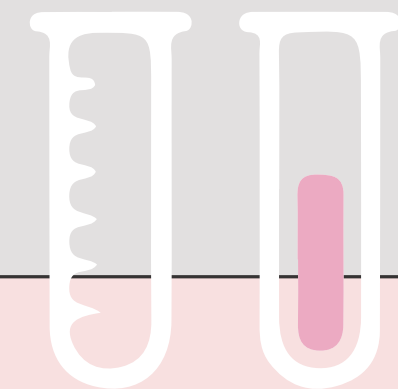
3 靈敏度高：RNAscope方法檢測每個RNA分子時，只需三對雙Z（ZZ）探針即可完成雜交和訊號的視覺化。

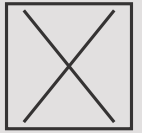




4 單分子檢測和單細胞定量：使用RNAscope技術雜交上三對及以上雙Z 探針即可在標準的顯微鏡下呈現可觀察到的點狀訊號。ACD公司提供的分析軟體更可以定量每一個單細胞內RNA 的表現量。

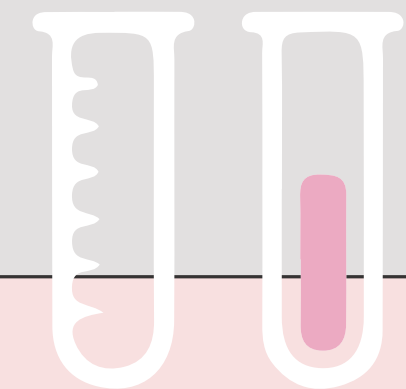
5 相容降解的RNA：由於RNAscope三對雙Z探針即可檢測到目標RNA，而通常針對目標RNA設計的探針為20對雙Z 探針，因而即使目標RNA發生部分降解，仍可以穩定有效地檢測到目標RNA。

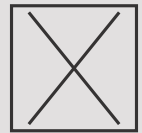




6 檢測結果穩定一致性： RNAscope技術用到的探針以及所有檢測試劑全部由工業化合成，且該技術針對不同樣本類型（冰凍切片，石蠟切片，懸浮細胞，貼壁細胞等）已經有成熟的實驗操作流程，故使得RNAscope技術檢測結果具有穩定性和一致性。除了可以在實驗室進行手工操作外，該產品也可以在Leica以及羅氏Ventana自動平臺上運行，為結果的一致性和穩定性提供了可靠的依據。

7 多通道多靶點同時檢測： 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靶點；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靶點RNA。





在RNAscope技術的基礎上，ACD公司旗下的Basescope技術可以檢測RNA水準的外顯子跳躍，點突變，環狀RNA等；miRNAscope可以原位對小RNA，包括miRNA, siRNA, ASO進行追蹤定位；而近年來推出的RNAscope HiPlex技術則可以在一張石蠟切片上同時檢測最多12個RNA靶標的分佈定位，成為神經科學，腫瘤微環境研究以及單細胞測序後驗證等領域的常用檢測方法。

Reference:

- 1 · Cell Death Dis. 2022 Apr; 13(4): 342. doi: 10.1038/s41419-022-04807-8.
Global characterization of extrachromosomal circular DNAs in advanced
high grade serous ovarian cancer,