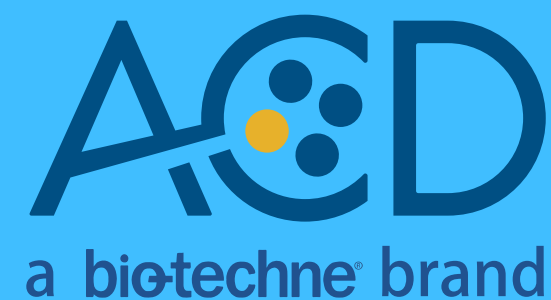


*RNAscope*助力單細胞定序 以及空間轉錄組結果的後續驗證

—熱烈慶祝RNAscope技術發表文章突破6200篇—





隨著美國Bio-Techne公司旗下ACD公司精益求精的新一代RNA原位雜交技術的開發，全球使用該技術發表的文章在2022年五月已經達到約6300篇（圖1）。使用該公司包括RNA-scope技術，Basescope技術，Highplex技術，miRNAscope技術以及RNA蛋白共染技術在神經、幹細胞發育、腫瘤、病毒、基因治療、藥物安全性評估乃至近年來熱門的單細胞定序以及空間轉錄組研究的後續驗證等領域都有廣泛應用。

就新近發表的使用RNAscope技術在單細胞定序研究後驗證以及空間轉錄組研究後驗證的應用舉例，希望為正在從事該類研究的廣大研究學者提供一些參考。

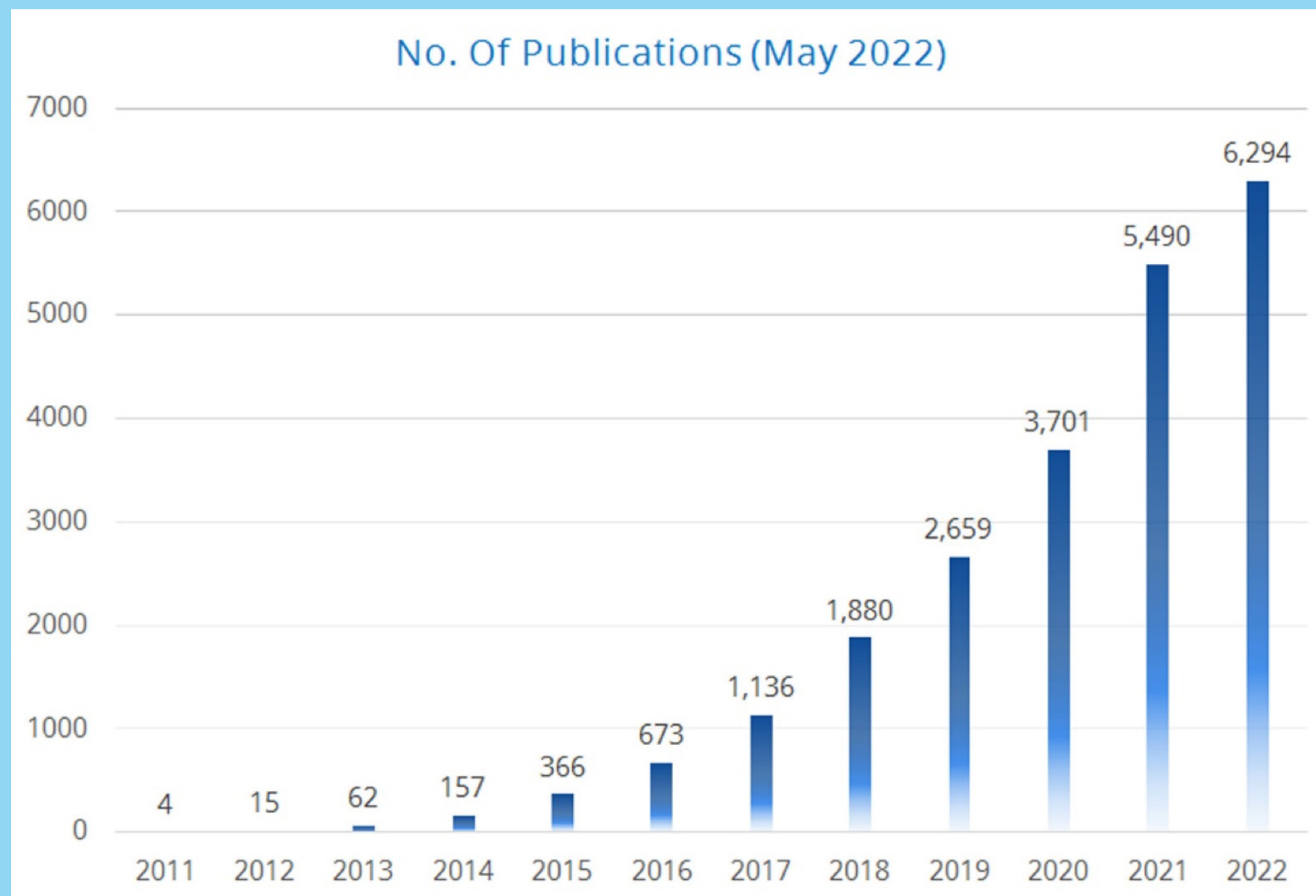


圖1：

歷年使用ACD公司RNAscope
技術發表文獻數量匯總



一.單細胞定序技術簡介

單細胞定序有別於二代定序(NGS)技術，不是將一簇細胞均質後進行定序分析，而是對單一細胞內的轉錄或轉譯產物進行檢測。目前常用的單細胞定序方法包括液滴法和微孔法，二者可以將單個細胞進行分離和後續檢測以及結果分析。由於單細胞定序技術目前已經廣泛發展，在此不對該類技術做過多贅述。



二、空間轉錄組技術簡介

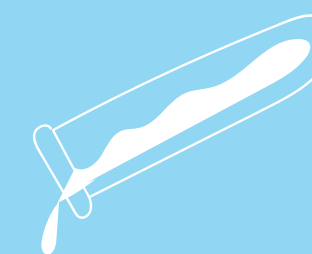
與單細胞定序技術相比，近年來出現的空間轉錄組學技術可以對組織樣本中的單個細胞進行細胞內轉錄RNA以及轉譯蛋白的檢測，並提供該細胞一定程度的空間定位資訊。目前比較廣泛使用的空間轉類技術包括但不限於以下幾類：

第一類是利用電腦計算，根據單細胞轉錄組數據來模擬重構組織的空間形態。例如 Seurat，是一類在單細胞數據分析中廣泛用到的R套件，可以根據scRNA-seq數據重構組織的空間資訊；

第二類，雷射顯微切割+二代定序(LCM+NGS)。顧名思義，這類方法透過儀器切割並結合定序技術來完成空間分析。該類技術對儀器和實驗人員的操作要求較高，如果組織非常珍貴或者研究的內容十分精細，可以考慮該類技術；

第三種策略是“基於空間條形碼 (spatial barcodes) 的空間轉錄組技術。目前常提到的例如Nanostring公司的DSP以及10X的Visium均為此類技術的代表方法。

——本段內容參考自芊鹿撰寫的題為：初識空間轉錄組(上)的文章內容。



基於以上方法，將定序技術與空間資訊相結合，產生了大量針對於空間組的轉錄與轉譯後資訊。這些基因轉錄轉譯資訊結合其位置分佈，有助於對細胞類型進行判斷注釋，回溯到解剖學位置，更加精准的分析判斷特定細胞類型及其生物學功能。

三、使用美國Bio-Techne公司旗下ACD公司的RNAscope技術爲首的新一代RNA原位檢測技術，則主要承擔了以上包括單細胞定序以及空間轉錄組分析後篩選出來的重要目標的驗證，從而確認結果的真實性以及實際組織分佈資訊，確認其生物學意義。下文介紹幾篇近年來發表的此類研究的文章，以闡明RNAscope技術在這個領域的應用意義。



Transcriptome-wide spatial RNA profiling maps the cellular architecture of the developing human neocortex

Kenny Roberts^{1†}, Alexander Aivazidis^{1†}, Vitalii Kleshchevnikov¹, Tong Li¹, Robin Fropf², Michael Rhodes², Joseph M. Beechem², Martin Hemberg^{1,3}, Omer Ali Bayraktar^{1*}

2022年英國劍橋大學Omer Ali Bayraktar團隊發表了一篇針對胎兒新皮層的空間組學研究[1]，文章首先使用ACD公司的RNAscope技術透過在一張石蠟切片中共檢測三個目標RNA，即SOX2用來標記腦室區 (ventricular zone, VZ) 的神經前驅細胞；HOPX用來標記外側腦室區的 (outer sub-ventricular zone, OSVZ) 外側放射狀膠質細胞；以及EOMES用來標記中間前驅細胞，輔助客戶尋找感興趣的區域 (Region of interest, ROI)，在這些區域使用GeoMx-DSP Whole transcriptome atlas (WTA) 技術評估了不同神經前驅細胞和皮層分化中的細胞的 18,190個基因 (圖2所示)。

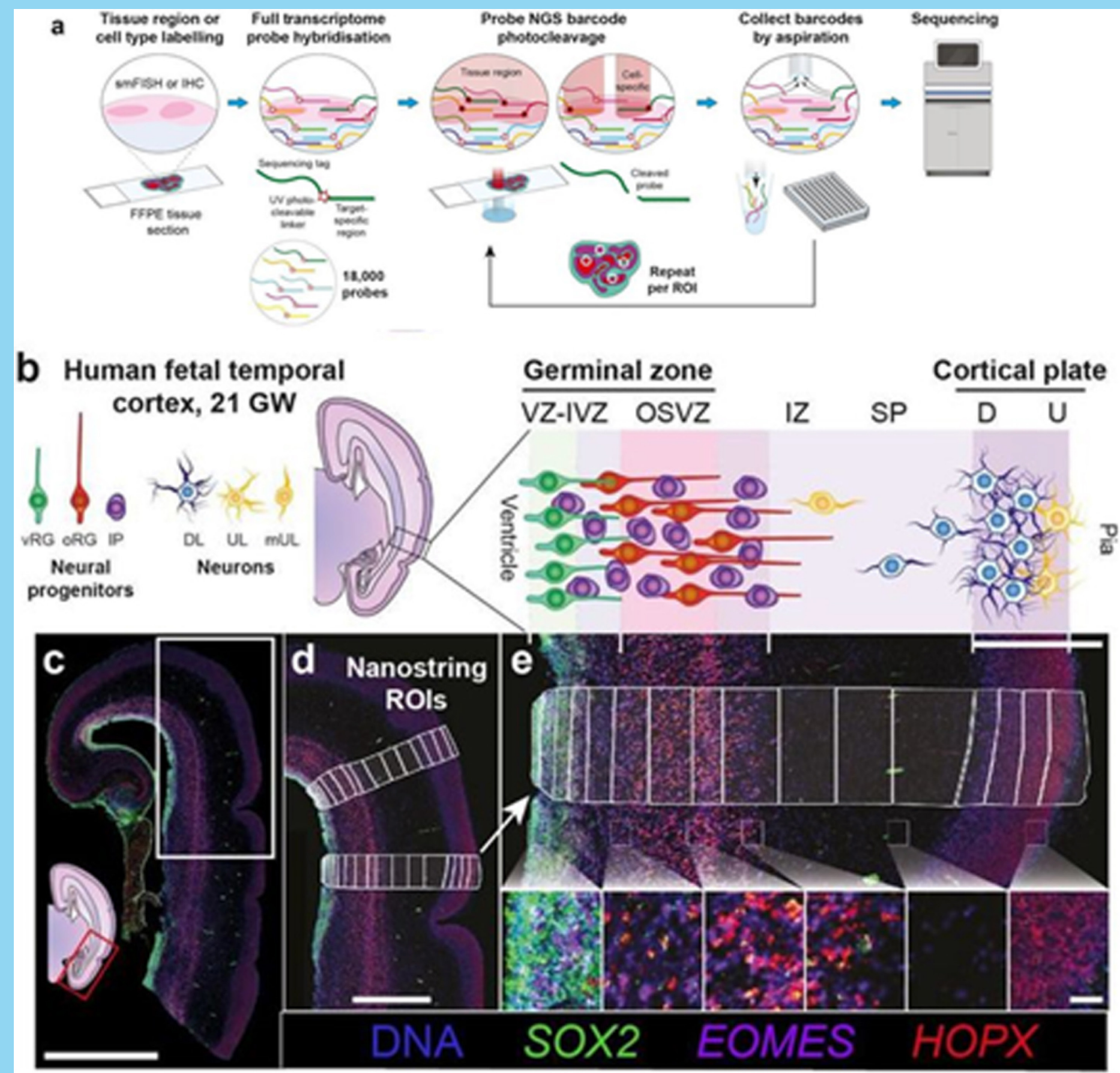
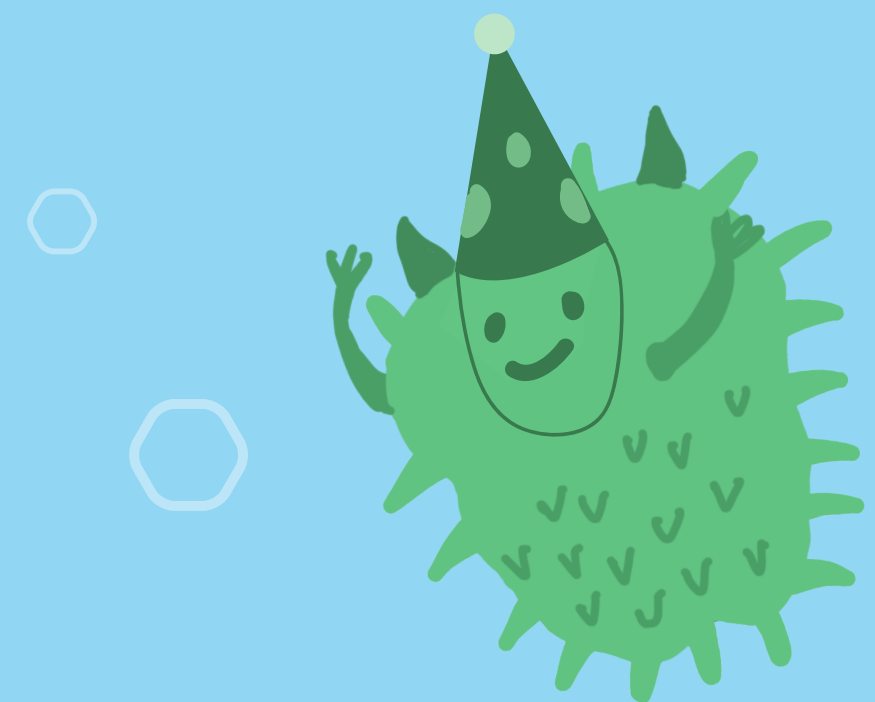


圖2：

GeoMx-DSP Whole transcriptome atlas (WTA) 技術流程以及RNAscope檢測腦切片內的SOX2(下圖綠色)，EOMES(下圖紫色)，HOPX(下圖紅色)的mRNA圖示，以輔助WTA進行ROI區域劃分

在DSP分析結果的驗證環節，該研究團隊繼續使用了RNAscope技術，證實了新發現的細胞亞型，即轉錄HOPX RNA (圖3上藍色訊號點)和VIM RNA (圖3上紅色訊號點)的外側放射狀膠質細胞內，確認轉錄HBEGF mRNA (圖3上綠色訊號點)；而在轉錄DLX1 (圖3下紫色訊號點)的中間神經元中確認轉錄ERBB4 RNA (圖3下綠色訊號點)。這些結果揭示了大腦早期發育的中間神經前驅細胞的作用以及命運。

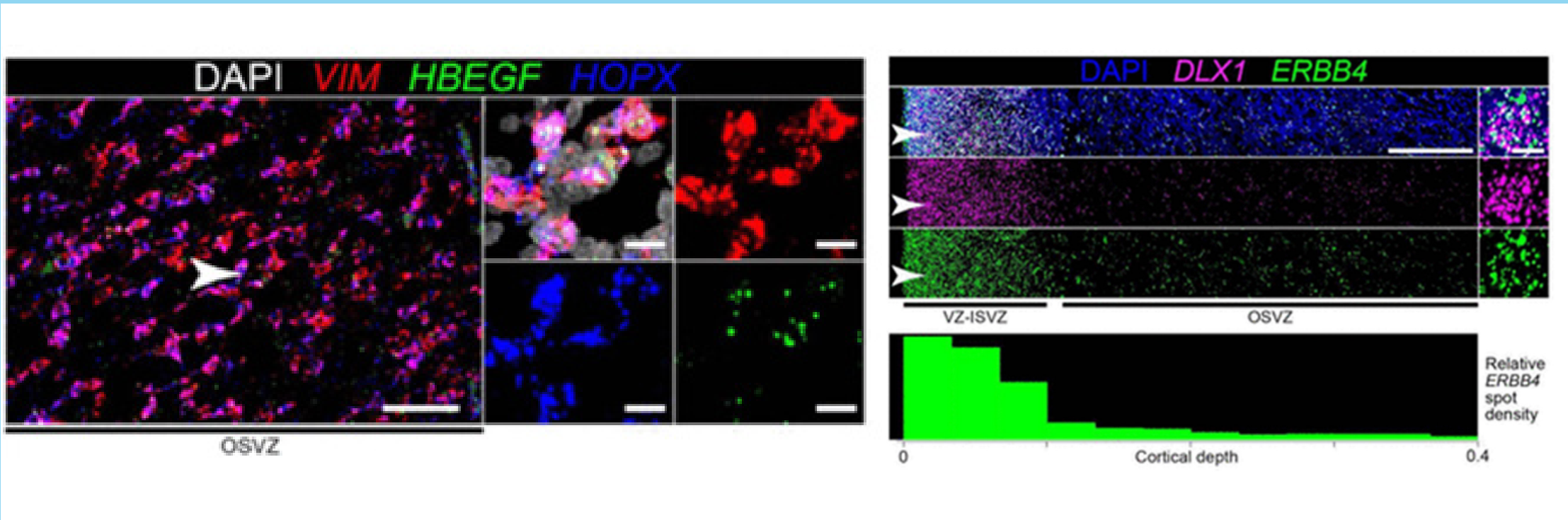


圖3：

GeoMx-DSP Whole transcriptome atlas (WTA) 技術流程以及RNAscope檢測腦切片內的HBEGF (上圖綠色)，HOPX (上圖藍色)，VIM (上圖紅色)，DLX1 (下圖紫色)，ERBB4 (下圖綠色)的mRNA分佈情形。

Resource

Spatial proteogenomics reveals distinct and evolutionarily conserved hepatic macrophage niches

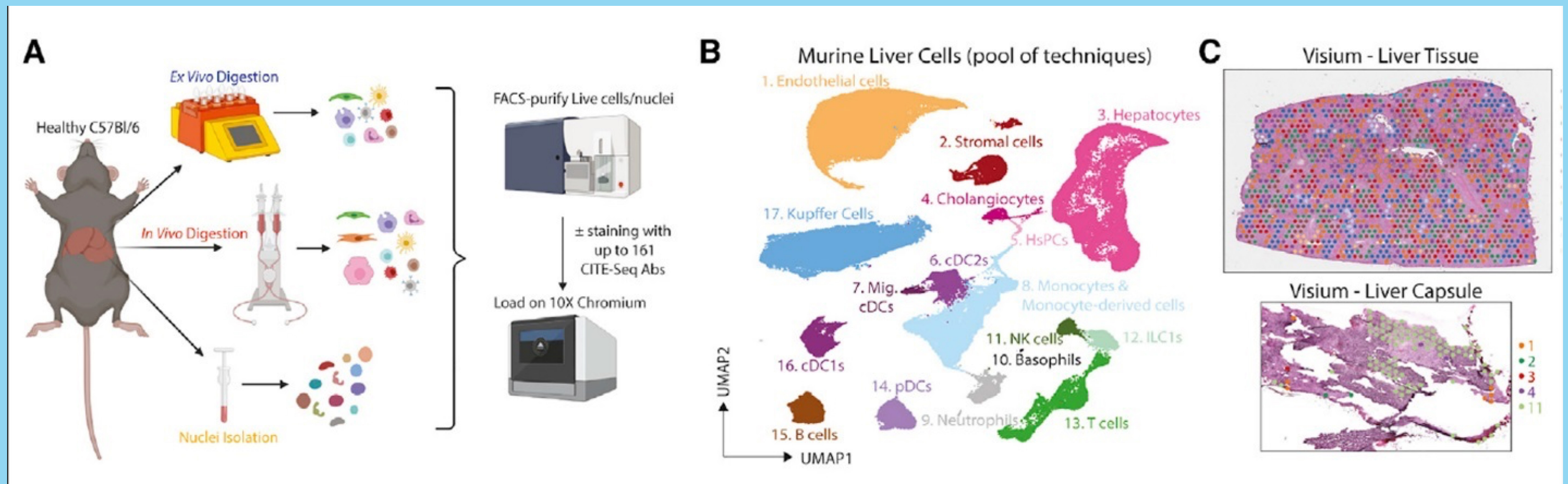
Martin Guilliams,^{1,2,23,25,*} Johnny Bonnardel,^{1,2,23} Birthe Haest,^{1,2,23} Bart Vanderborght,^{3,4,23} Camille Wagner,^{1,2} Anneleen Remmerie,^{2,5} Anna Bujko,^{2,5} Liesbet Martens,^{1,2,5} Tinne Thoné,^{1,2,5} Robin Browaeys,^{6,7} Federico F. De Ponti,^{2,5} Bavo Vanneste,^{1,2,5} Christian Zwicker,^{2,5} Freya R. Svedberg,^{1,2} Tineke Vanhalewyn,^{1,2,5} Amanda Gonçalves,^{2,8} Saskia Lippens,^{2,8} Bert Devriendt,⁹ Eric Cox,⁹ Giuliano Ferrero,¹⁰ Valerie Wittamer,^{10,11,12} Andy Willaert,¹³

(Author list continued on next page)

¹Laboratory of Myeloid Cell Biology in Tissue Homeostasis and Regeneration, VIB-UGent Center for Inflammation Research, Technologiepark-Zwijnaarde 71, Ghent 9052, Belgium

2022年1月發表在Cell的另外一篇空間組學研究中，來自比利時VIB-UGent Center for Inflammation Research以Martin Guilliams爲首的研究團隊，透過結合單細胞定序技術，單核定序技術以及空間轉錄組分析，空間蛋白質組學分析技術，對肝臟所有細胞進行研究，並對結果進行綜合分析[2]。該項研究鑒別出膽管內的一群與脂肪相關的巨噬細胞(LAM)。在七種種屬動物中均觀察到Kupffer細胞與LAMs存在穩定的相關性。此項研究同時揭示LAM在局部脂肪暴露後誘導產生，導致小鼠以及人肝臟局部區域出現脂肪堆積，而Kupffer細胞的發展依賴其與肝臟星狀細胞相互接觸並透過ALK1-BMP9/10路徑實現。

在此項研究中，該研究團隊使用了ScRNAseq以及CITE-seq的方法獲得數據，揭示了肝臟所有細胞亞型，接著透過RNAscope技術結合IF的方法，定位新發現的髓系巨噬細胞的存在與分佈，並證實肝臟特有巨噬細胞在正常和病理性肝臟內的區別。圖4為使用RNAscope以及IF的方法鑒別肝臟特有的巨噬細胞。



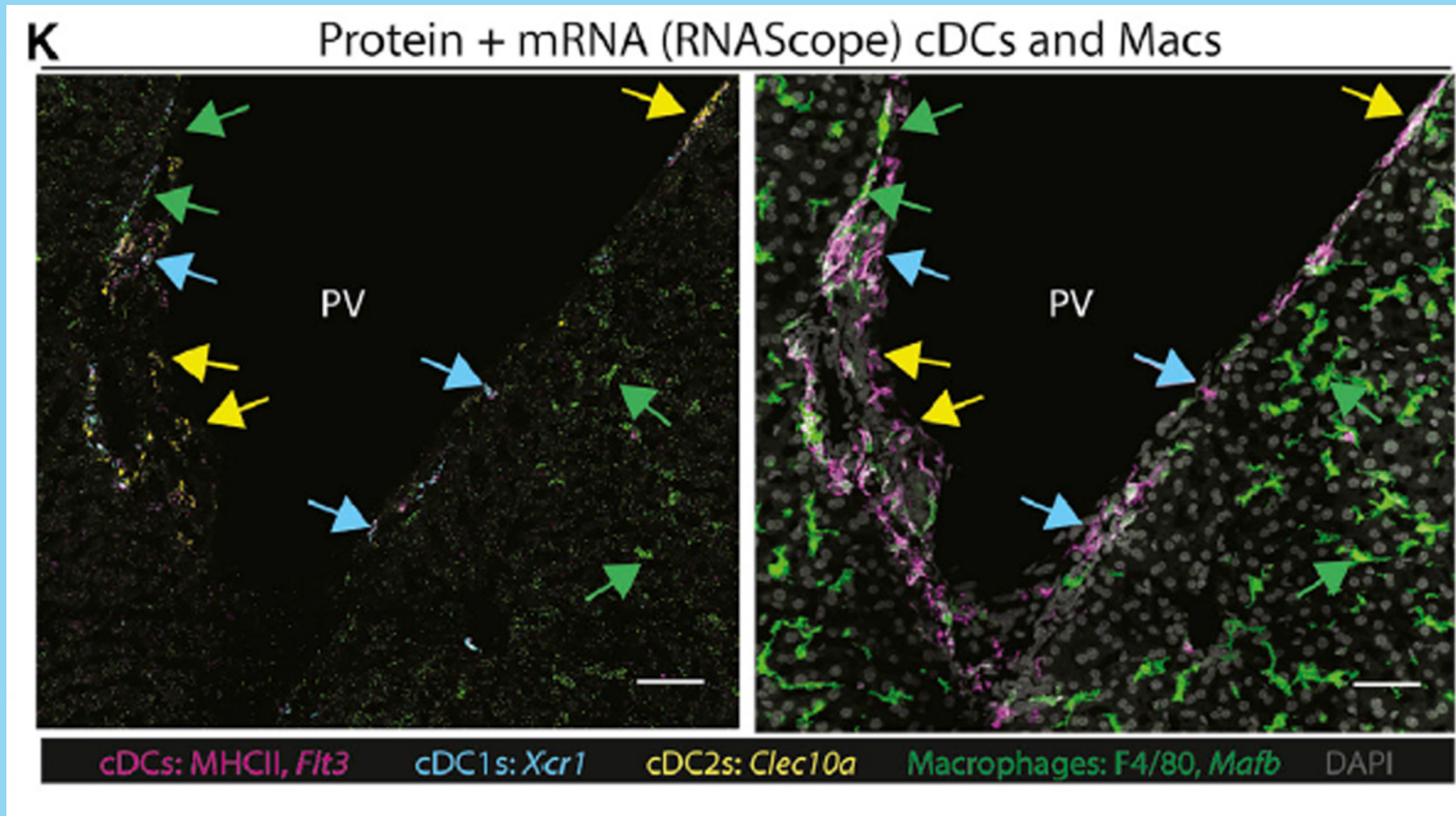


圖4：

RNAscope法檢測mRNA (Xcr1, Flt3l, Mafk, and Clec10a)，IF法檢測蛋白(MHCII and F4/80)的分佈情況。Scale bars, 50 mm. PV, portal vein，DC為樹突狀細胞，Macrophage為巨噬細胞。

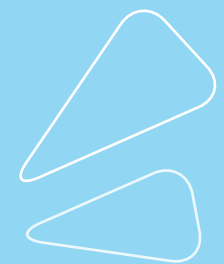
ARTICLES

<https://doi.org/10.1038/s41588-021-00818-x>

nature
genetics



Single-cell transcriptomics of human embryos identifies multiple sympathoblast lineages with potential implications for neuroblastoma origin



2021年，來自美國哈佛幹細胞研究中心等多家單位的研究團隊通過10X Genomics Chromium單細胞定序的方法鑒別人胚胎發育階段神經短期發育特點，並採用ACD公司的RNA-scope多重螢光檢測試劑盒驗證單細胞定序研究中鑒別出的腎上腺內和腎上腺外交感神經亞型，以判斷交感腎上腺分化與兒童期神經母細胞瘤發生中的作用[3]。



研究結果發現在交感腎上腺系統發育階段，從許旺細胞前體 (Schwann cell precursors, SCP) 產生內部腎交感神經母細胞瘤。

這些不成熟的母細胞瘤可以轉分化成為神經皮質局部的嗜鉻細胞。圖5為定序後使用原位檢測法捕捉到的兩個發育短暫時期，第一期為免疫螢光法檢測SCP細胞標記物SOX10 (綠色) 以及RNAscope法檢測交感神經母細胞瘤以及嗜鉻細胞標記物RNA HAND2和TH在胚胎12.5天，在小鼠腎上腺中的分佈情況；而第二期為免疫螢光法檢測CHGB嗜鉻細胞標記物以及RNAscope法檢測交感母細胞瘤標記物，Elavl2 RNA在胚胎13.5天腎上腺的分佈情況。

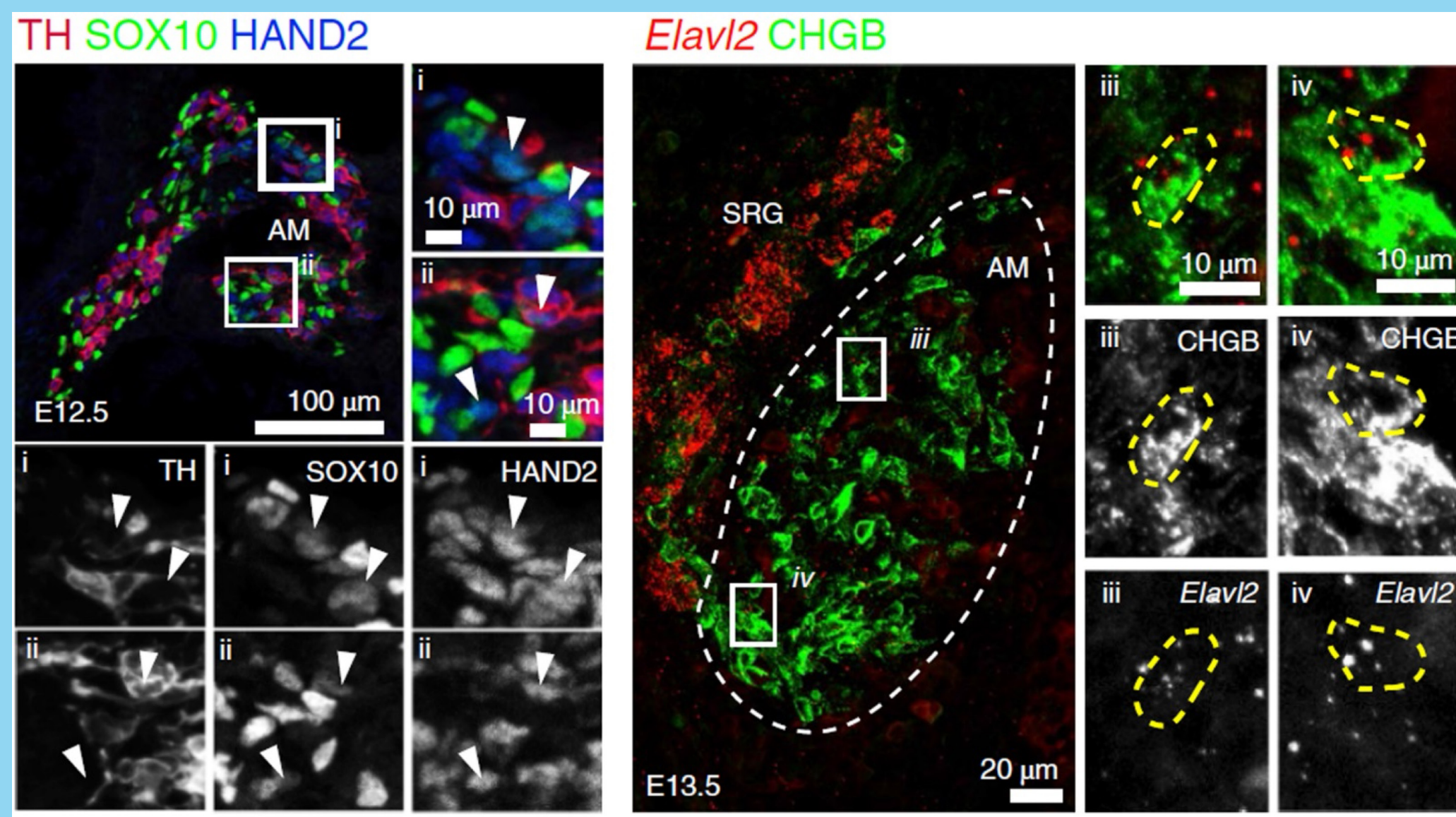


圖5：

左，胚胎12.5天，RNAscope法檢測神經母細胞瘤標記物HAND2 mRNA (藍色訊號點) 和嗜鉻細胞標記物TH (紅色訊號點) 與免疫螢光法 (IF) 檢測SCP細胞標記物SOX10 (綠色) 的共定位情況；右，胚胎13.5天，RNAscope法檢測免疫螢光法檢測CHGB嗜鉻細胞標記物 (綠色染色) 以及RNAscope法檢測交感母細胞瘤標記物，*Elavl2* RNA (紅色訊號點) 在腎上腺的分佈情況

A case report of clonal EBV-like memory CD4⁺ T cell activation in fatal checkpoint inhibitor-induced encephalitis



2019年發表在Nature Medicine上，來自美國Vanderbilt University醫學中心爲首的研究團隊對於PD-L1免疫治療引發的致死性腦炎展開定序及後續驗證，以分析PD-L1抗體藥物免疫治療嚴重副作用的發生機制[4]。在文章中透過對黑色素瘤轉移癌病人進行抗PD-L1治療引發的致死性腦炎病人的樣本研究，同時調取了209例全球同類免疫治療相關腦炎報道的藥物警戒數據庫（多種腫瘤類型），透過空間組學和multi-omic分析鑒別出一種激活的記憶性CD4陽性T細胞在這類發炎區域的大量聚集。



透過使用RNAscope技術驗證和定位了這種特殊的CD4細胞為CD45RO，GZMB和KI67陽性。該研究中還在相關區域鑒別出一種EB病毒特異性T細胞受體，以及EBV陽性淋巴細胞，推測與神經發炎有相關性。在研究過程中，爲了鑒別腦炎區域浸潤細胞的特性，研究者使用了immunoSEQ和ArcherDX platforms定序分析腦炎區域浸潤的CR β CDR3，發現一種CASSFPSGSYEQYF陽性 cells。通過使用ACD公司針對該段序列進行的探針設計以及Basescope技術檢測（ACD公司對於短RNA片段的原位檢測技術），定位了這類浸潤發炎細胞與CD4共同標記於同一個細胞內（圖6，圖中紅色訊號點），同時這類腦炎特異性浸潤發炎細胞內表現CD45RO和GZMB。



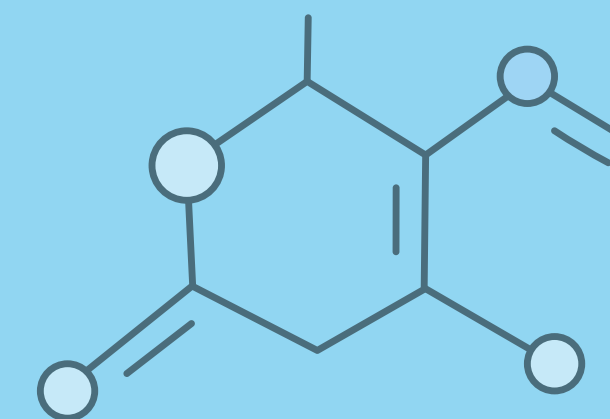
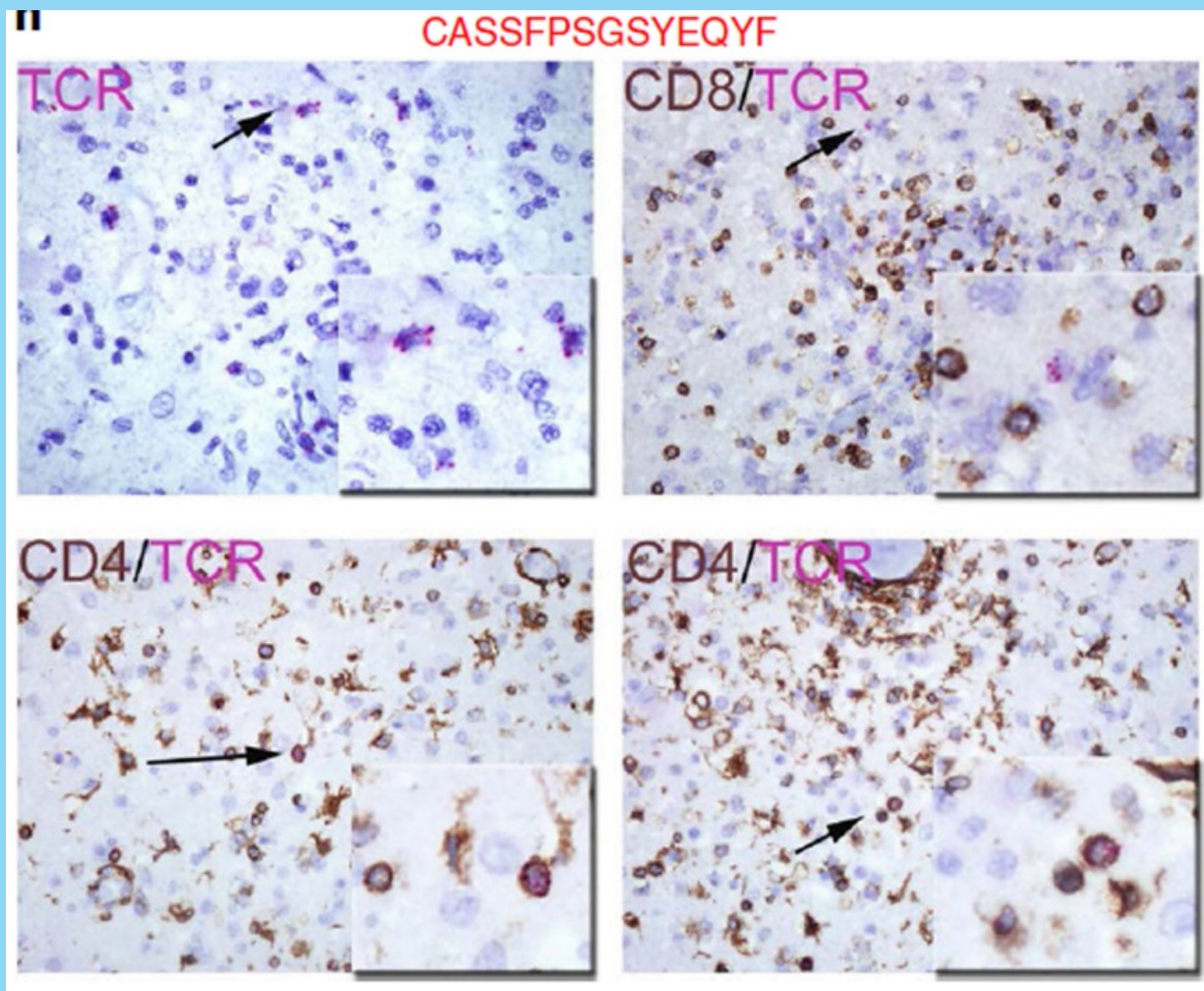


圖6：

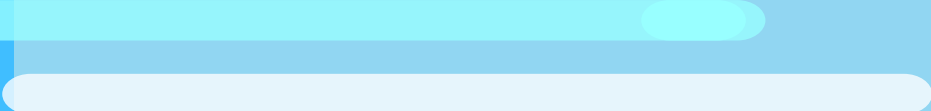
Basescope法檢測到的CASSFPSGSYEQYF細胞與CD4免疫組織染色陽性細胞存在共定位。

Article

Visualizing in deceased COVID-19 patients how SARS-CoV-2 attacks the respiratory and olfactory mucosae but spares the olfactory bulb



2021年發表在Cell上一篇研究COVID-19的文章中，來自德國和比利時的多國研究人員通過單細胞定序技術對新冠去世病人的感染細胞進行研究，發現COVID-19在呼吸黏膜主要的感染細胞為纖毛細胞，而在嗅黏膜上感染的主要細胞為柱狀細胞，未發現有證據顯示該病毒會對嗅黏膜的神經細胞發生感染[5]。由此推斷新冠病毒並非嗜神經病毒，而有病人由於感染新冠病毒出現的嗅覺喪失有可能是神經細胞受到周邊感染細胞影響導致，而非病毒直接侵襲所致。



在本研究中，研究人員透過使用RNAscope檢測新冠病毒sense序列（標記病毒複製）結合免疫螢光技術定位了屍檢八號病人的黏膜上感興趣區域（Areas of interest，AOI），之後通過Nanostring公司的DSP技術對這些區域進行了轉錄層面的分析，提示在病毒複製以及非複製感染區未出現氣味基因轉錄差異（圖7）。該研究發現了兩個不同變種的SARS-COV-2病毒，爲了分辨這兩種病毒在鼻黏膜以及呼吸黏膜上的分佈差異，研究團隊使用了ACD公司的針對少量差異RNA的另一種原位檢測方法—Basescope法進行了原位分析，觀察到了兩種病毒的分佈特點（圖8）。新冠病毒出現的嗅覺喪失有可能是神經細胞受到周邊感染細胞影響導致，而非病毒直接侵襲所致。



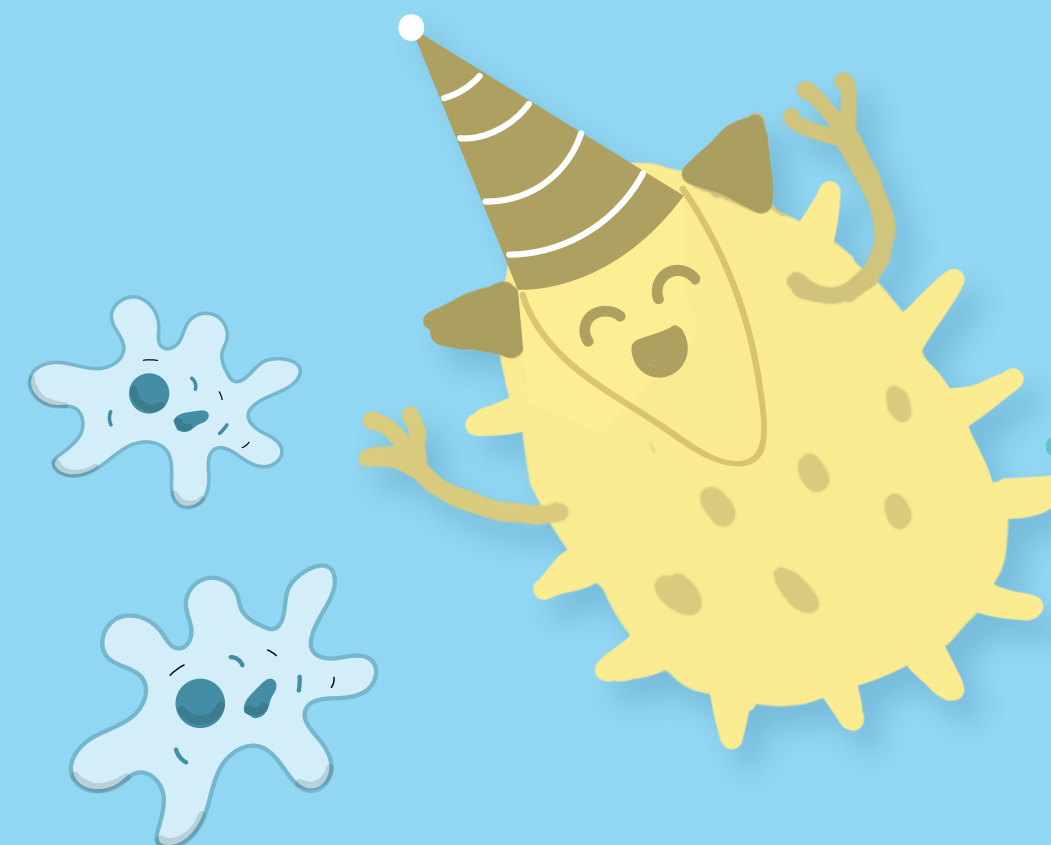
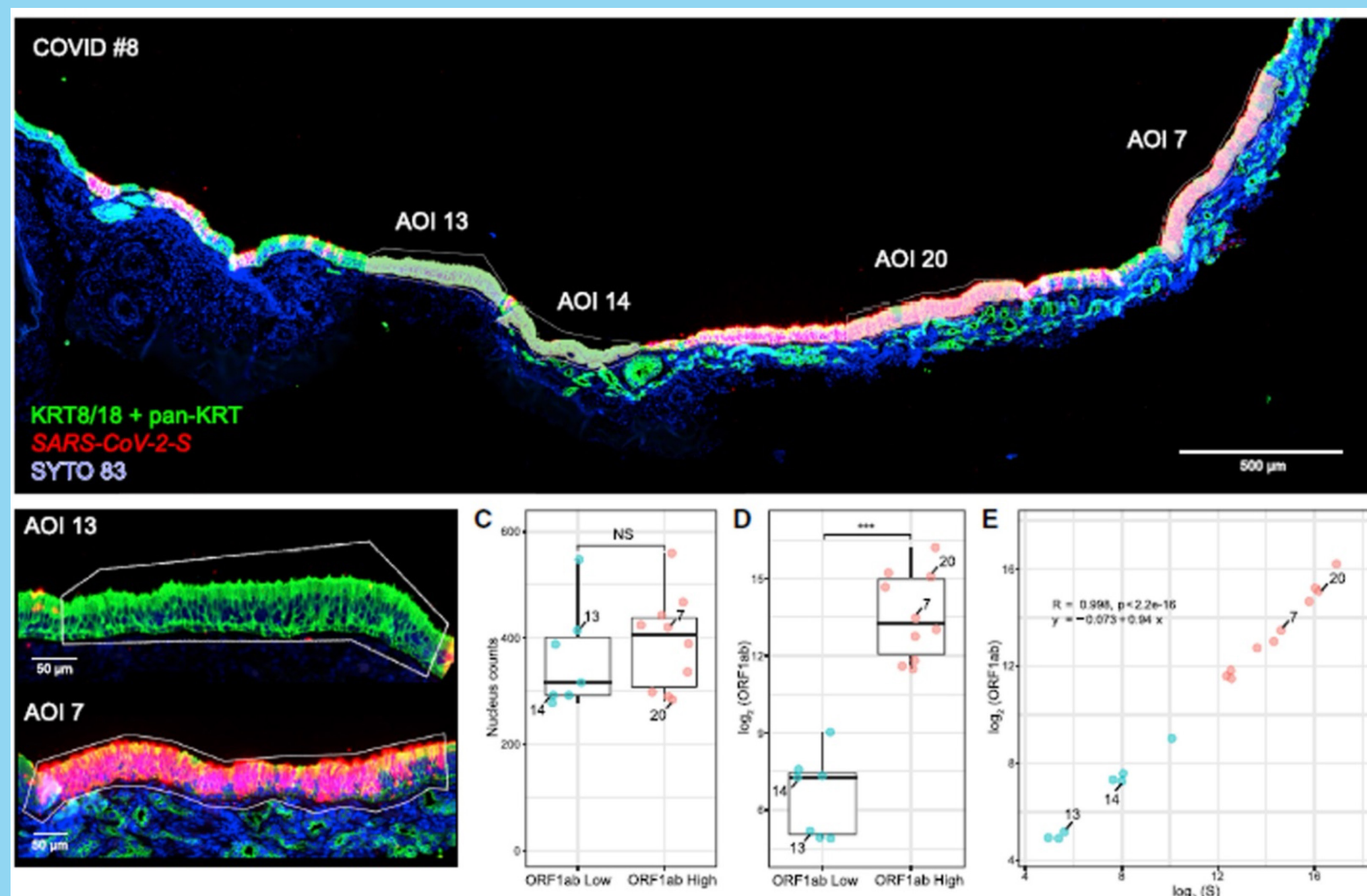


圖7：

RNAscope結合免疫螢光法在AOI區域進行目標檢測，RNA針對病毒複製期間出現的互補序列進行特異性檢測。

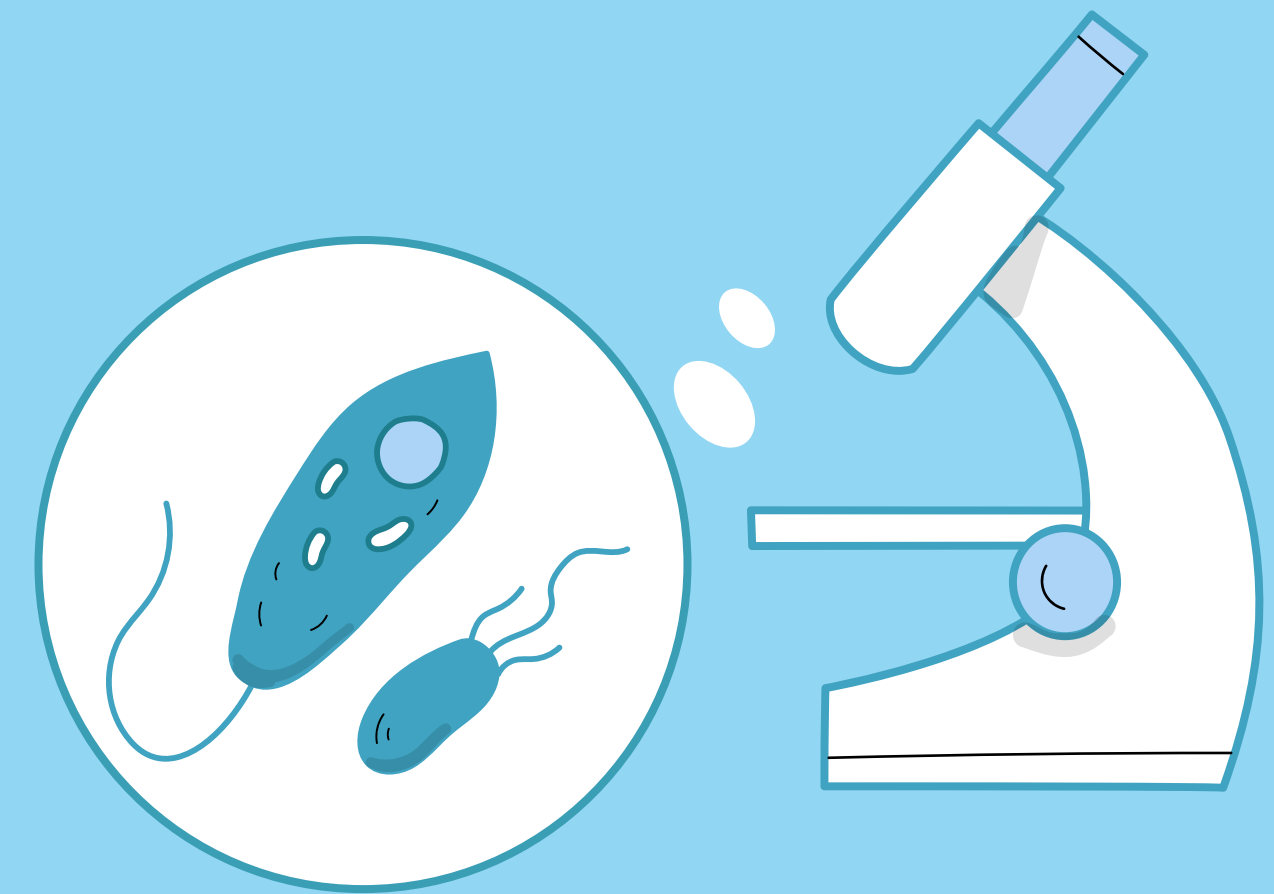
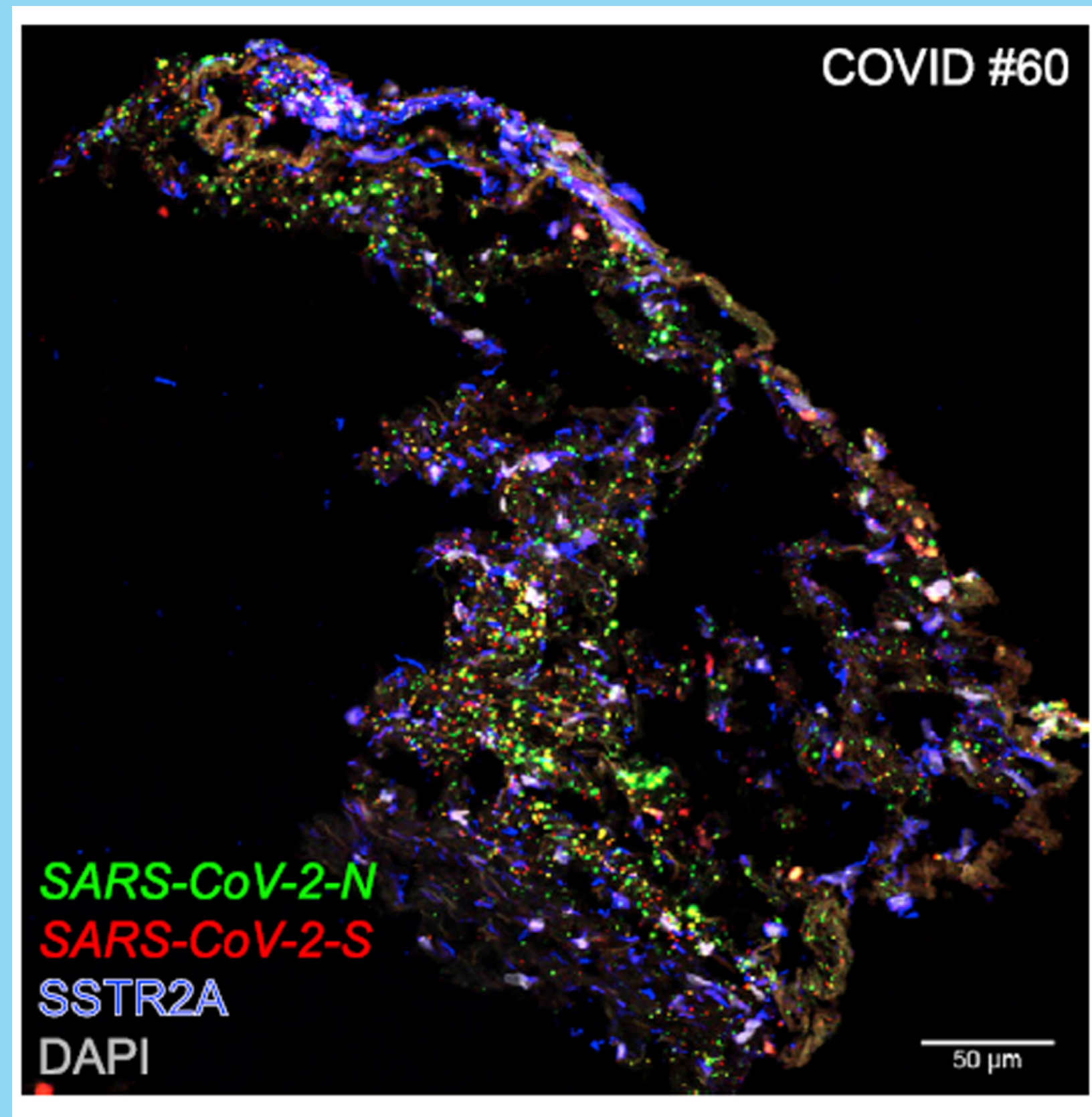
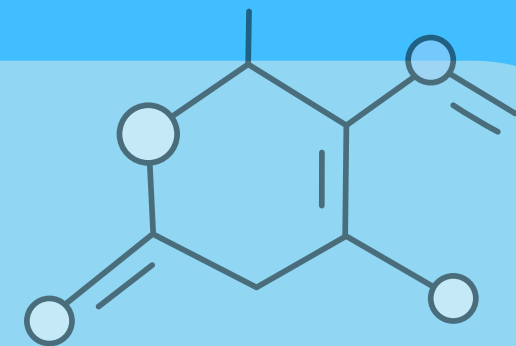


圖8：

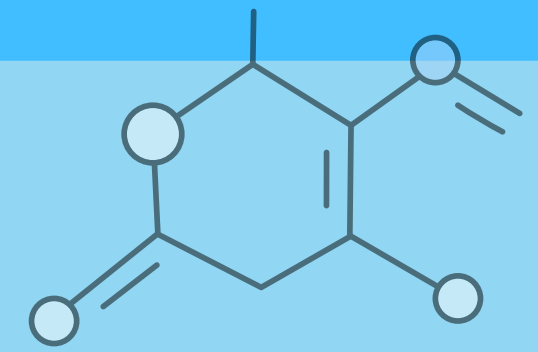
RNAscope對不同亞型新冠病毒進行檢測。

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，RNA-scope技術屬新一代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2~4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檢測。
- 4** 單分子檢測和單細胞定量：使用RNAscope技術雜交接上三對及以上雙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（冷凍切片，石蠟切片，懸浮細胞，貼附細胞等）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 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。

在RNAscope技術的基礎上，ACD公司旗下的Basescope技術可以檢測RNA層面的外顯子跳躍，點突變，環狀RNA等；miRNAscope可以原位對小分子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目標的分佈定位，成為神經科學，腫瘤微環境研究以及單細胞定序後驗證等領域的常用檢測方法。

References:

- 1 Mapping Intimacies. 2021. doi: 10.1101/2021.03.20.436265. Transcriptome-wide spatial RNA profiling maps the cellular architecture of the developing human neocortex.
- 2 Cell. 2022 Jan 20;185(2):379-396.e38. doi: 10.1016/j.cell.2021.12.018. Epub 2022 Jan 11. Spatial proteogenomics reveals distinct and evolutionarily conserved hepatic macrophage niches.
- 3 Nat Genet. 2021 May;53(5):694-706. doi: 10.1038/s41588-021-00818-x. Epub 2021 Apr 8. Single-cell transcriptomics of human embryos identifies multiple sympathoblast lineages with potential implications for neuroblastoma origin.
- 4 Nat Med . 2019 Aug;25(8):1243-1250. doi: 10.1038/s41591-019-0523-2. Epub 2019 Jul 22. A case report of clonal EBV-like memory CD4 + T cell activation in fatal checkpoint inhibitor-induced encephalitis.
- 5 Cell. 2021 Nov 24;184(24):5932-5949.e15. doi: 10.1016/j.cell.2021.10.027. Epub 2021 Nov 3. Visualizing in deceased COVID-19 patients how SARS-CoV-2 attacks the respiratory and olfactory mucosae but spares the olfactory bulb.