

單細胞解析 RNA分子

檢測應用於免疫交互模型結果驗證

人類免疫系統由分佈在全身的細胞網絡組成。這些細胞需要通過細胞表面蛋白質之間的動態相互作用形成物理聯繫和訊息傳遞。隨著對免疫系統的瞭解加深，越來越多的發現證實它們可以作為很多疾病的治療標靶，具有巨大的潛力。但免疫細胞之間相互作用的圖譜還未完全被挖掘發現。

2022年8月3日，來自劍橋大學、蘇黎世聯邦理工學院等多家單位的研究人員發表了文章“A physical wiring diagram for the human immune system”，採用高通量受體篩選、文庫構建、單細胞驗證等多種方法，構建了數學模型，預測細胞連接和相互作用關係，推測全身免疫相互作用。



Article

A physical wiring diagram for the human immune system

<https://doi.org/10.1038/s41586-022-05028-x>

Received: 30 June 2021

Accepted: 28 June 2022

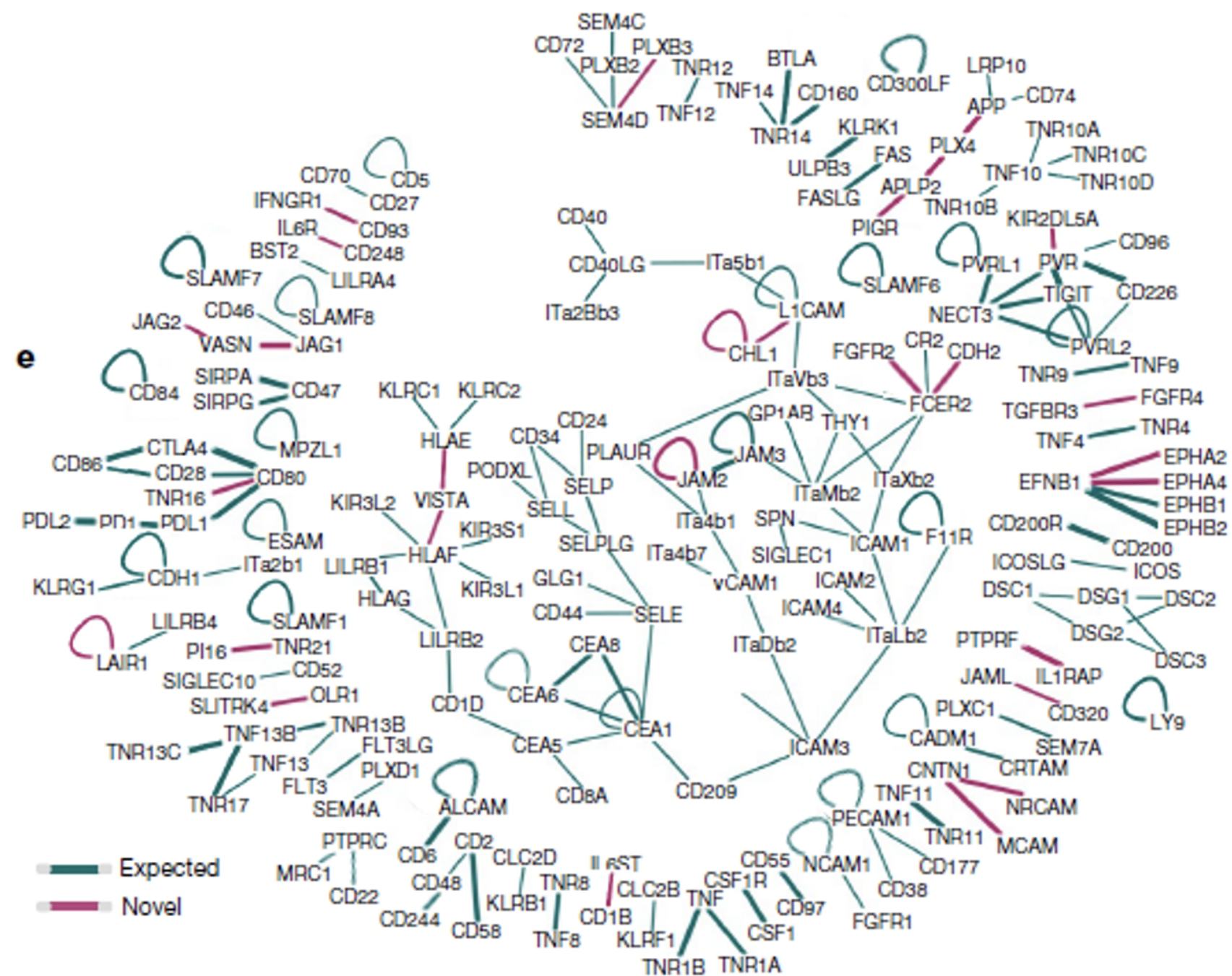
Published online: 3 August 2022

Jarrod Shilts¹✉, Yannik Severin², Francis Galaway¹, Nicole Müller-Sienerth¹, Zheng-Shan Chong¹, Sophie Pritchard³, Sarah Teichmann³, Roser Vento-Tormo³, Berend Snijder² & Gavin J. Wright^{1,4}✉

The human immune system is composed of a distributed network of cells circulating

作者根據不同受體的結構，構建了表現載體和重組蛋白結構，建立SAVEXIS方法篩選不同結構類型的細胞表面蛋白。

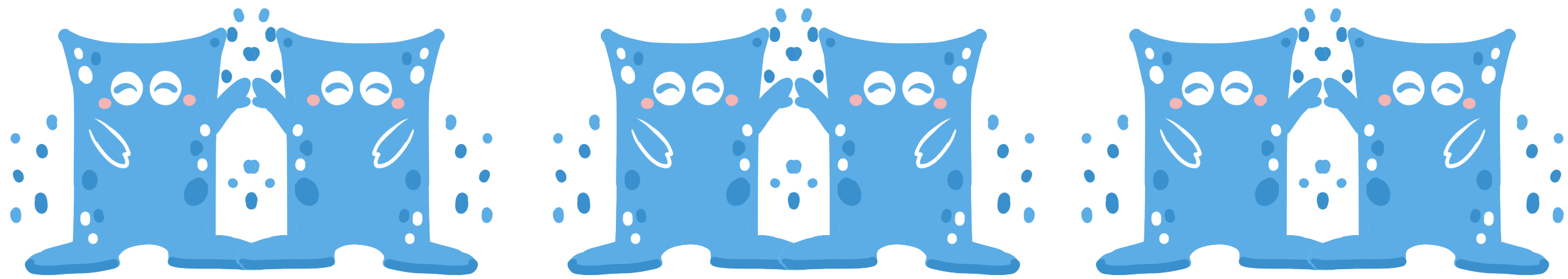
根據篩選的結果，作者構建了一個詳細的包含週邊血免疫細胞表面蛋白和重組表達蛋白的文庫，通過對文庫的生物資訊分析及純化、篩選、重複測試，作者確定了28種新的免疫相關分子相互作用（圖1）。這其中值得注意的是，新發現的分子相互作用包括孤兒免疫檢查點受體VISTA的內源性非腫瘤配體。



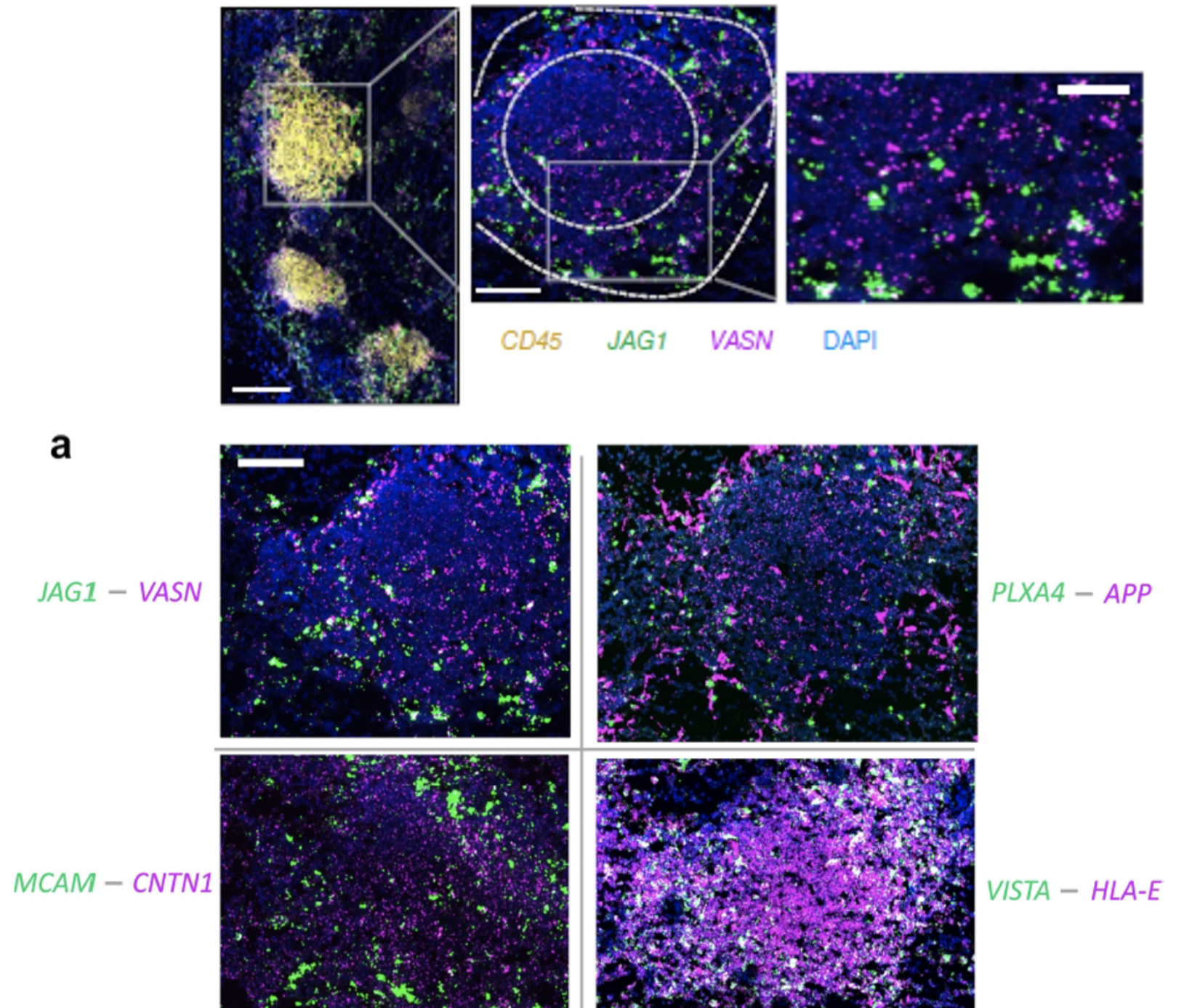
(圖1) 免疫受體相互作用網絡示意圖。

紅色代表新發現的相互作用。

隨後，作者又對受體蛋白之間相互作用的參與度進行量化與評估。由於初始分析均是基於循環免疫細胞，而免疫系統在各個器官中廣泛存在且會根據生物體狀況發生動態變化，因此作者之後也對部分組織器官內免疫細胞與組織細胞可能的交互作用進行了分析。根據單細胞數據和基因表現細胞本身的物理連接性質，作者繪製了不同器官內大量免疫細胞之間的交互關係。



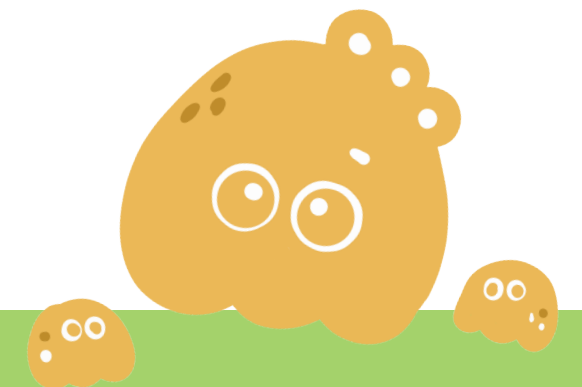
爲了對前述的分析結果進行進一步驗證，作者選擇人類淋巴結的空間轉錄組數據和單細胞RNA原位檢測的方式。空間轉錄組證實受體和配體的空間共同定位情況，而爲了更精確地看到單一細胞中受體和配體的表現情況，作者使用了RNAscope的方法，對部分標靶進行了單細胞解析度層面的標記和驗證。作者選取了分析鑑別出的新型相互作用對，如JAG1-VASN，確認它們分佈在富含人類淋巴結免疫細胞的隔間邊緣區域，這說明其相互作用在體內免疫細胞之間確有可能發生（圖3）。



(圖3) 使用RNAscope，在人類淋巴結樣本中
鑑定新型免疫細胞配體-受體交互作用。

免疫系統是比較獨特的生理系統，它並不是固定於體內某個局部器官內，而是隨著生物體的狀態發生動態變化。細胞之間需要適應相互作用和連接，以應對病原體和其他威脅。作者希望能夠借助此工作建立的方法，在日後的研究中能夠更深入的分析瞭解不同個體、不同狀態下免疫細胞的作用，幫助疾病治療尋找潛在合適的標靶。

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：



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。

特異性強

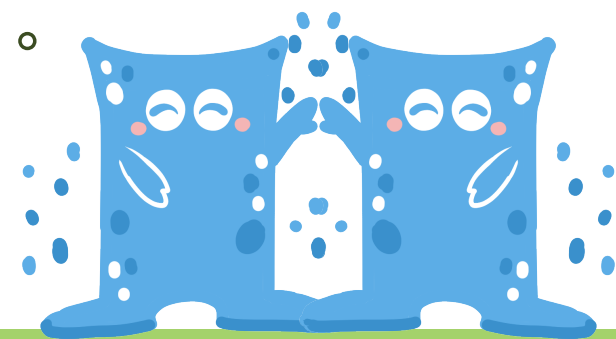
RNAscope獨特的雙Z(ZZ)探針設計有效的防止了探針的非特異性結合，同時降低了背景干擾。由於結合在非特異性位點的單個的Z探針不會產生完整的訊號放大分子結合位點，並會在雜交過程中被洗脫掉，從而防止非特異性訊號的放大，使得探針的訊號具有高度特異性。探針設計合成需要2~4週時間即可完成。

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。

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的表達量。



相容降解 的RNA

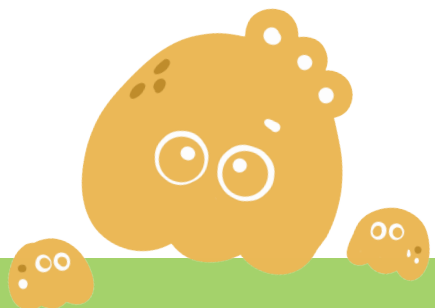
由於RNAscope三對雙Z探針即可檢測到目標RNA，而通常針對靶點RNA設計的探針為20對雙Z探針，因而即使目標RNA發生部分降解，仍可以穩定有效地檢測到目標RNA。

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。

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。



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:

J. Shilts, Y. Severin, F. Galaway, et al. (2022) A physical wiring diagram for the human immune system. Nature. DOI: 10.1038/s41586-022-05028-x