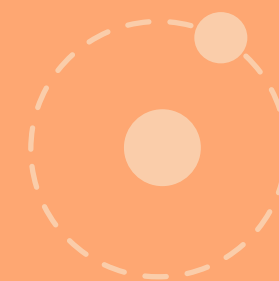
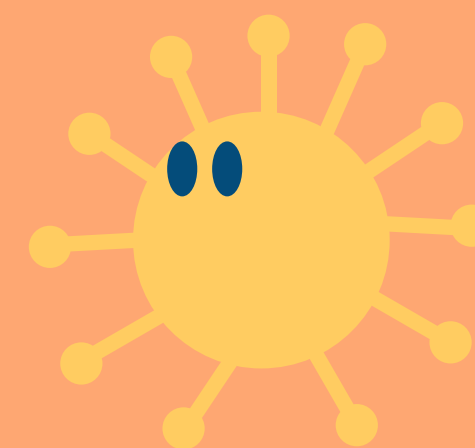
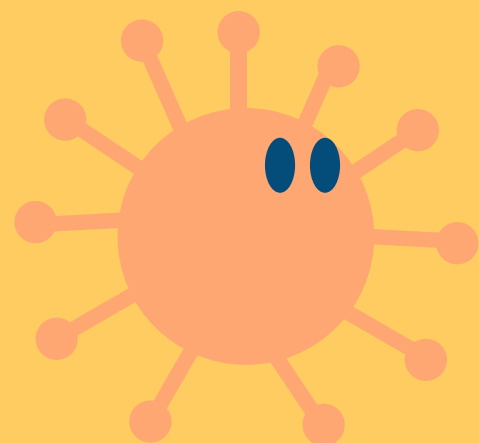




**AACD**  
a biotechne® brand



**RNAscope Hiplex結合免疫組織染色**  
**實現對神經元胞體區域的準確識別和定量分析**



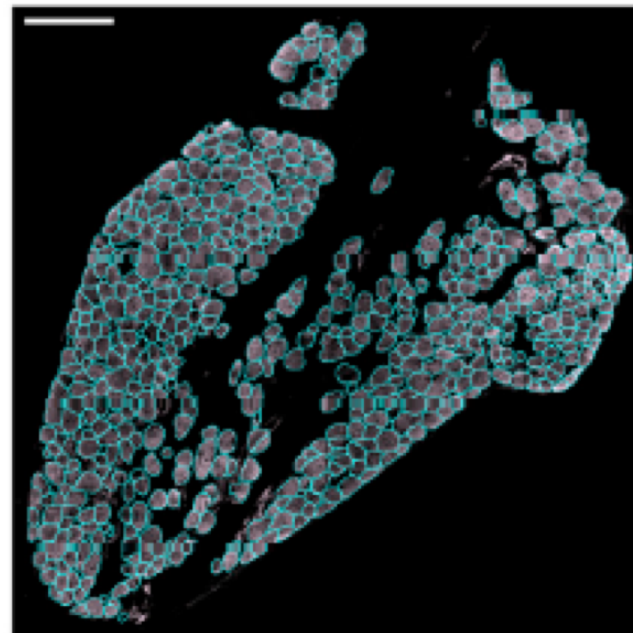
通過RNA原位雜交技術對空間位置上各基因的表現進行觀察偵測是神經科學領域基礎研究手段之一。新的技術可以在單細胞層面上同時標記多個mRNA，很大程度擴展了將基因表現和組織空間結構聯繫起來的能力。但目前對於這些高維度數據庫的有效量化和分析還存在一定挑戰。2022年10月24日，來自美國南加州大學凱克醫學院的研究人員，在Cell Reports Methods上發表題為“SCAMPR, a single-cell automated multiplex pipeline for RNA quantification and spatial mapping”的文章，該文章結合了RNAscope Hiplex、免疫組織染色技術，開發了RNA的單細胞自動多重流水線(SCAMPR)工具，並使用開源圖像處理和自動分割工具對低表現量和高表現量的mRNA訊號進行量化，實現了對小鼠神經元更準確的識別切割，通過確定早期生活壓力對迷走神經神經元亞型基因表現的影響，證明了SCAMPR的分析有效性。

研究人員將整個SCAMPR分爲兩大部分：(1)進行實驗和圖像預處理步驟，(2)通過開源圖像處理工具對圖像進行自動分割和分析(圖1)。在實驗部分，研究人員先利用RNAscope Hiplex技術，在樣本上進行12個目標RNA的標記，同時完成RNA原位圖像採集工作，隨後又使用蛋白染色的方法，對神經元內HuC/HuD進行染色。HuC和HuD是參與轉錄調節的mRNA結合蛋白，在胚胎發育開始的神經元中選擇性表現，最初出現在前驅細胞中，直到成年後繼續在有絲分裂後神經元中表現。HuC/D的全細胞表現、神經元特異性和廣泛的表現過程使其成爲需要分割神經元的定量研究的優秀細胞邊界標記。隨後對細胞識別算法進行了優化，根據HuC/D的輪廓引導，更準確地識別單個細胞的細胞邊界，實現在同一張切片上對神經元內RNA訊號進行更準確地定量分析。

## Image Processing & Data Analysis Workflow

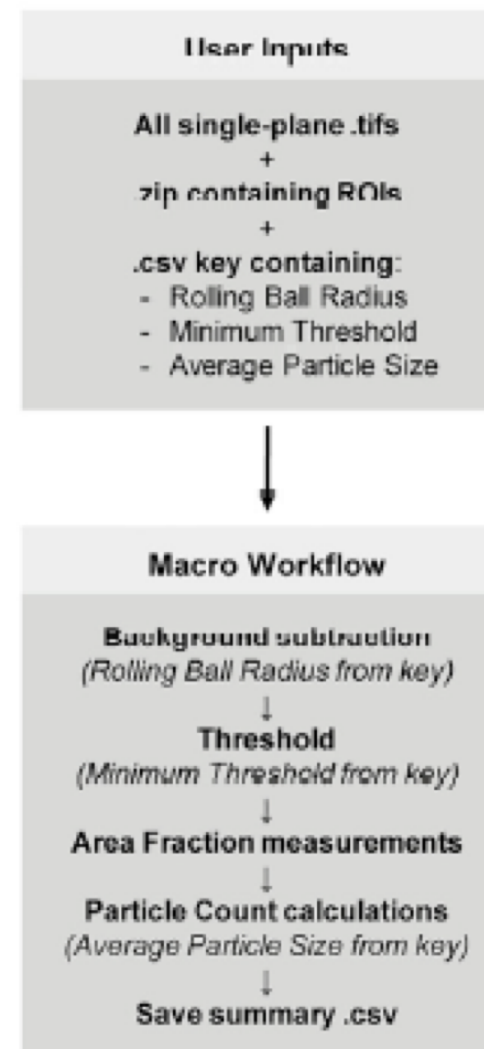
### 1. Cell Segmentation

- Segment cell using automated methods(Cellpose)



### 2. Batch Image Processing

- Create .csv key (User Inputs)
- Remove background and threshold
- Run ImageJ macro to generate Gene x Cell matrix



### 3. Analysis

- Analyze and create spatial visualizations and distribution plots of data (R)

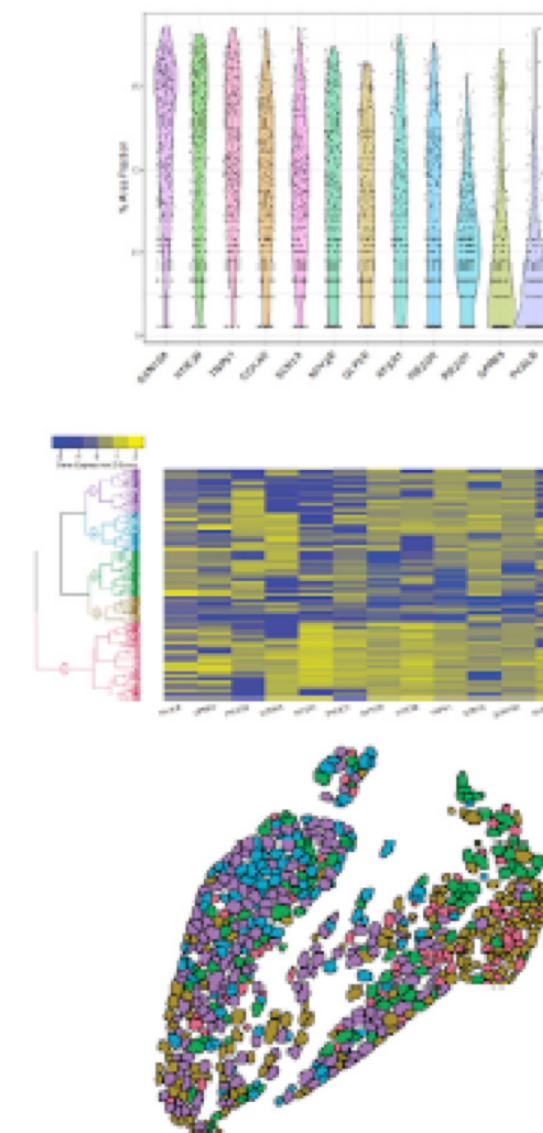
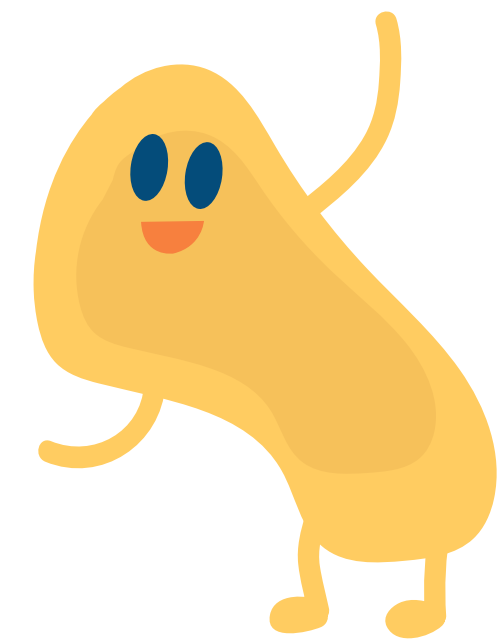
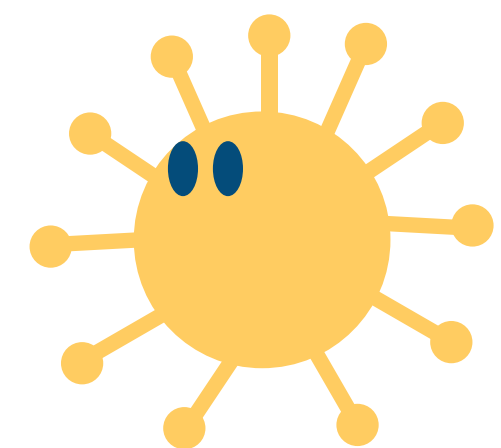


圖1.SCAMP R實驗流程。



研究人員先測試了在RNAscope HiPlex後蛋白染色的可行性。實驗結果證實，多輪RNAscope HiPlex可成功應用於出生後第9天(P9)周邊神經系統的結狀神經節(NG)以及成年中樞神經系統的V1區域(圖2A、2B、2E和2F)。隨後的HuC/D免疫染色與這些相同組織中的RNAscope HiPlex兼容，並在多輪RNAscope HiPlex後準確標記神經元細胞體(圖2C和G)。HuC/D標記與細胞核DAPI標記的比較顯示，HuC/D比核DAPI訊號更精確地捕獲完整的單個細胞輪廓，從而可以對兩種組織中單細胞RNAscope訊號進行更精確的定位(圖2C、2D、2G和2H)。



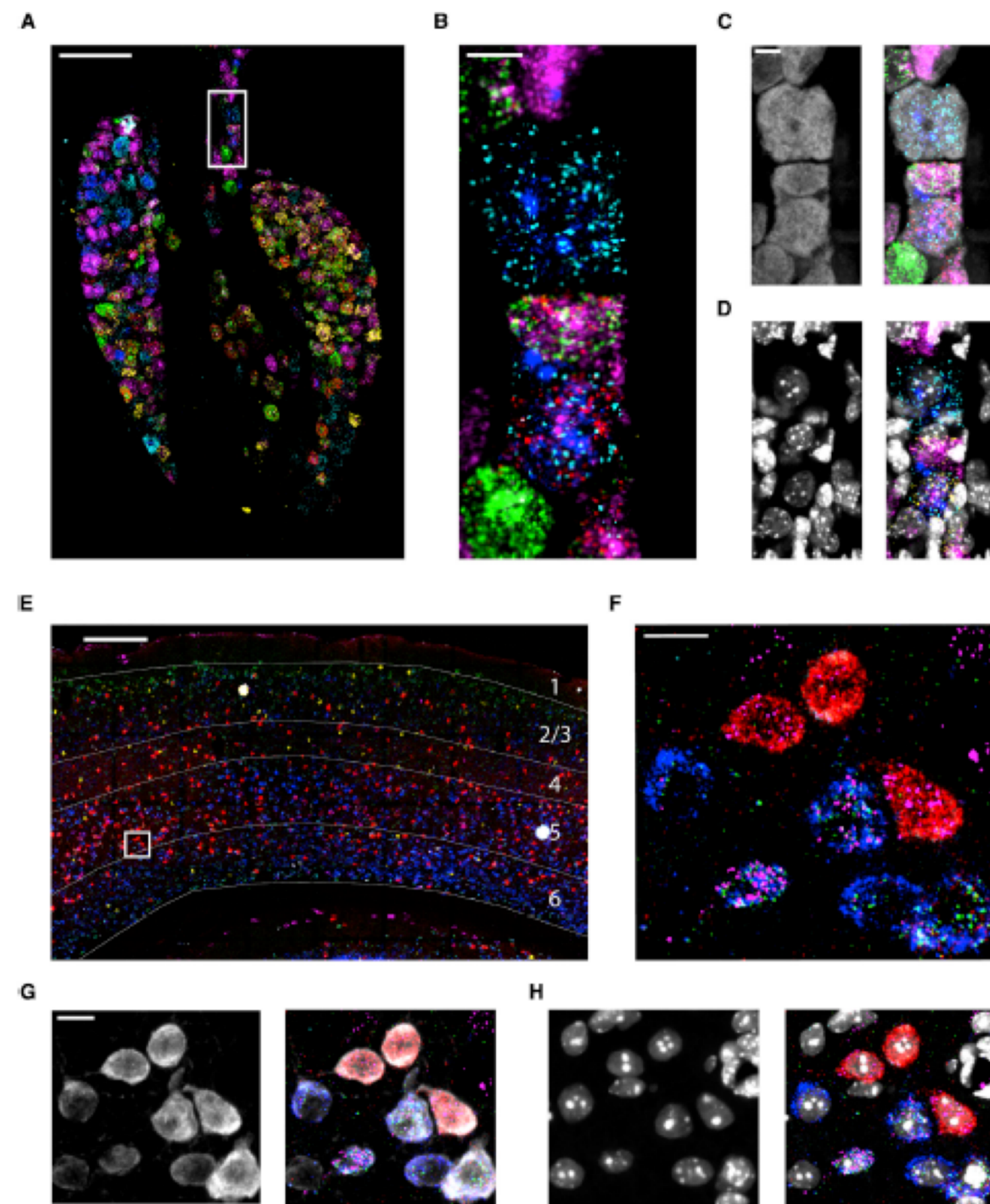
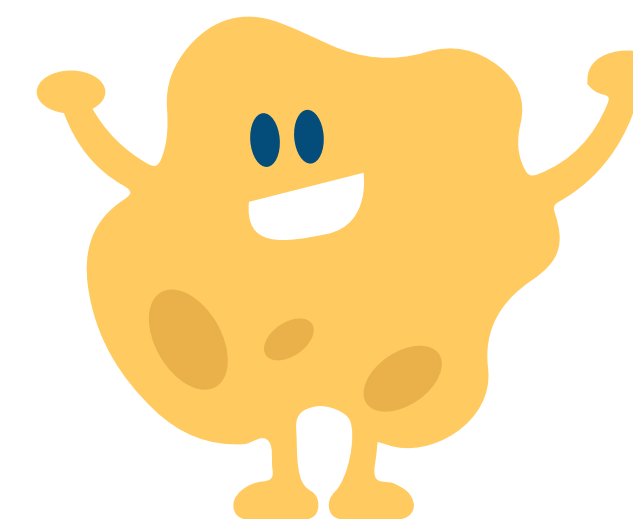
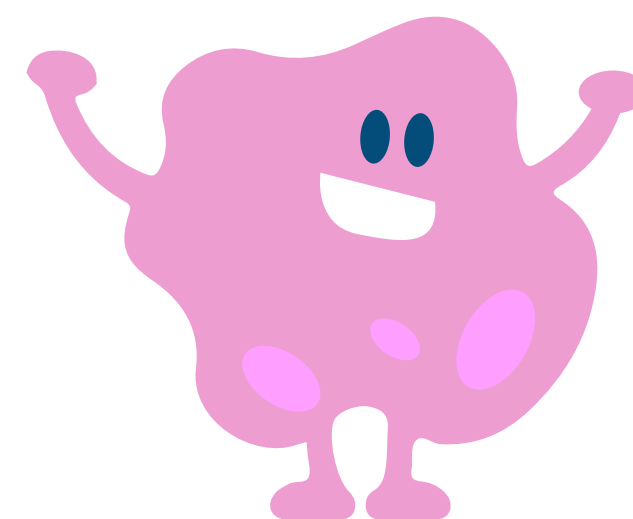
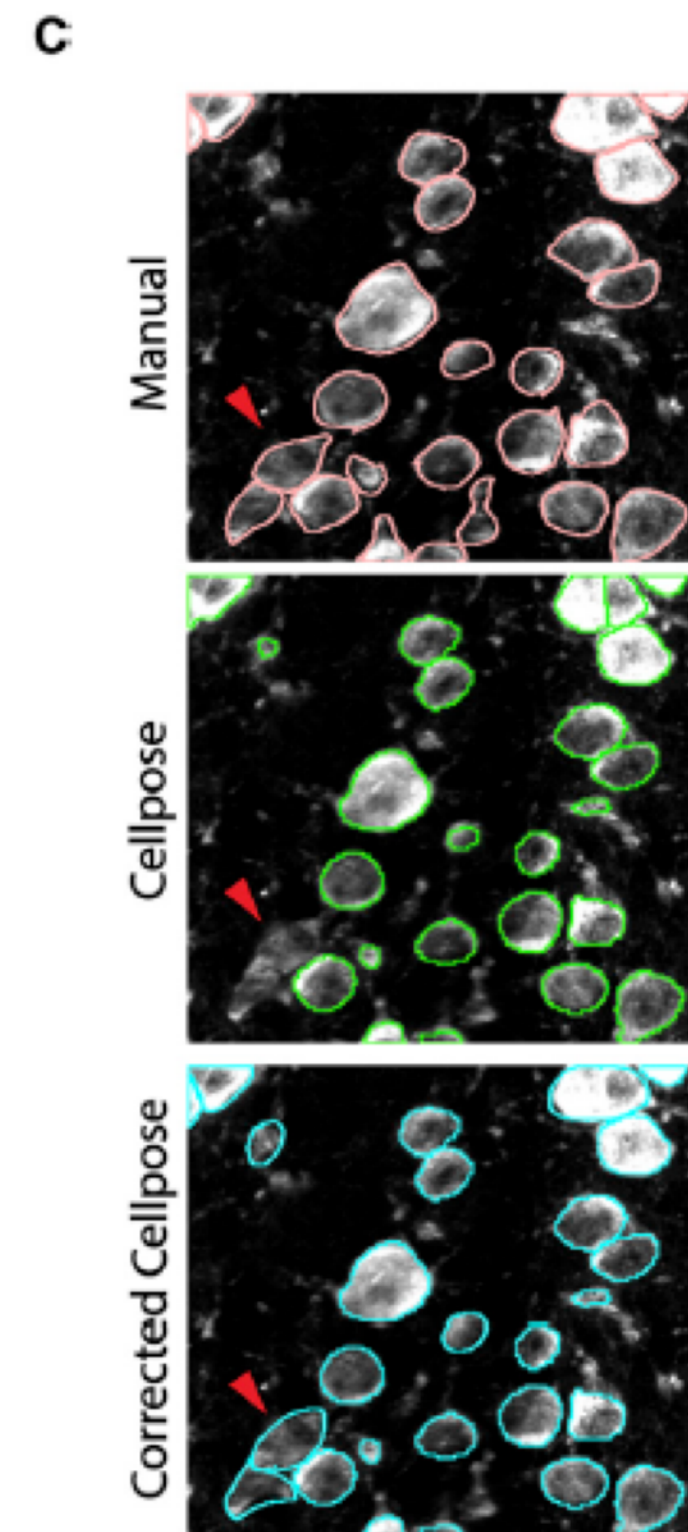
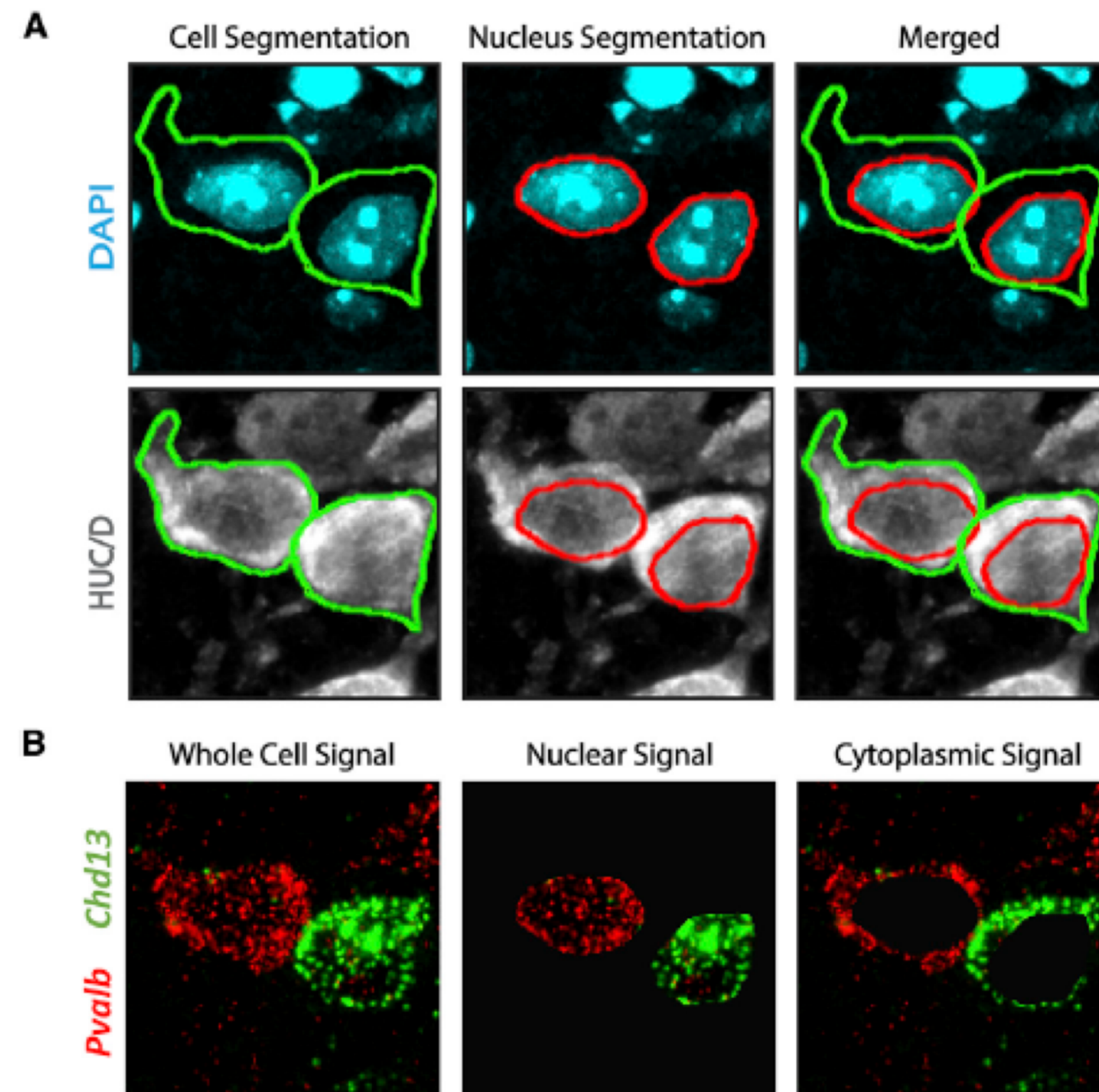


圖2.結合IHC和RNAscope HiPlex，可以在中樞和外周神經系統中高解析度的偵測單細胞mRNA表現。



空間轉錄組學數據的定量分析需要將細胞分割成單個離散單元。組織切片中最精確的細胞分割將透過更精確的細胞邊界標記來獲得。DAPI可以標記細胞核，但由於mRNA在細胞核和細胞質中均有可能存在，那麼基於細胞核的分割可能導致mRNA螢光訊號未計算完全，因此只能做大致估計和定量。而如果結合免疫組織染色對胞漿或胞質的蛋白進行標記，則能夠幫助較好的識別出單個細胞的輪廓。研究人員使用兩個基因的定位，隨後手動分割，證明在V1的樣本中，使用DAPI訊號的核分割和使用HiPlex RNAscope後HuC/D染色的全細胞分割之間，mRNA訊號檢測存在差異(圖3A)。與DAPI訊號相比，HuC/D訊號允許分割細胞體，並更準確地包圍分割細胞中的全部mRNA訊號(此處為Pvalb和Chd13)(圖3B)。此外，研究人員還對開源圖像分割程序進行了優化，使其能夠更完整、更準確地識別出細胞，相比於對細胞進行手動分割，優化後的自動分割可以自動識別的又快又好(圖3C、D)。



**D**

|                        | Counting Method     |                       |                                 |
|------------------------|---------------------|-----------------------|---------------------------------|
|                        | Manual <sup>†</sup> | Cellpose <sup>†</sup> | Corrected Cellpose <sup>†</sup> |
| Count                  | 38 (11)             | 37 (13)               | 38 (13)                         |
| Sec per Cell           | 4.77 (0.44)         | 0.25 (0.00)           | 1.47 (0.65)                     |
| F1 Score               | 0.00 (0.00)         | 0.76 (0.10)           | 0.79 (0.09)                     |
| <sup>†</sup> Mean (SD) |                     |                       |                                 |

圖3. 使用優化的Cellpose根據免疫組織染色結果對細胞進行自動化分割。

根據SCAMPR方法，可以實現在單細胞層面上對多個mRNA的螢光定量分析，同時根據圖像提供的空間信息，也可進一步研究感興趣基因和細胞之間潛在的相互關係。研究人員根據Hiplex提供的單細胞RNA原位訊息，可以看到不同基因在V1不同層結構中的表達強度與偏好（圖4左）。再對訊號數量進行標準化與局部加權回歸，可得到在拓撲結構內不同基因之間的相對表達強度（圖4右）。在發育及很多疾病過程中，基因之間表達的相對變化都有其特殊的意義，在某些情況下，對於發育或疾病發展過程甚至是十分重要的。

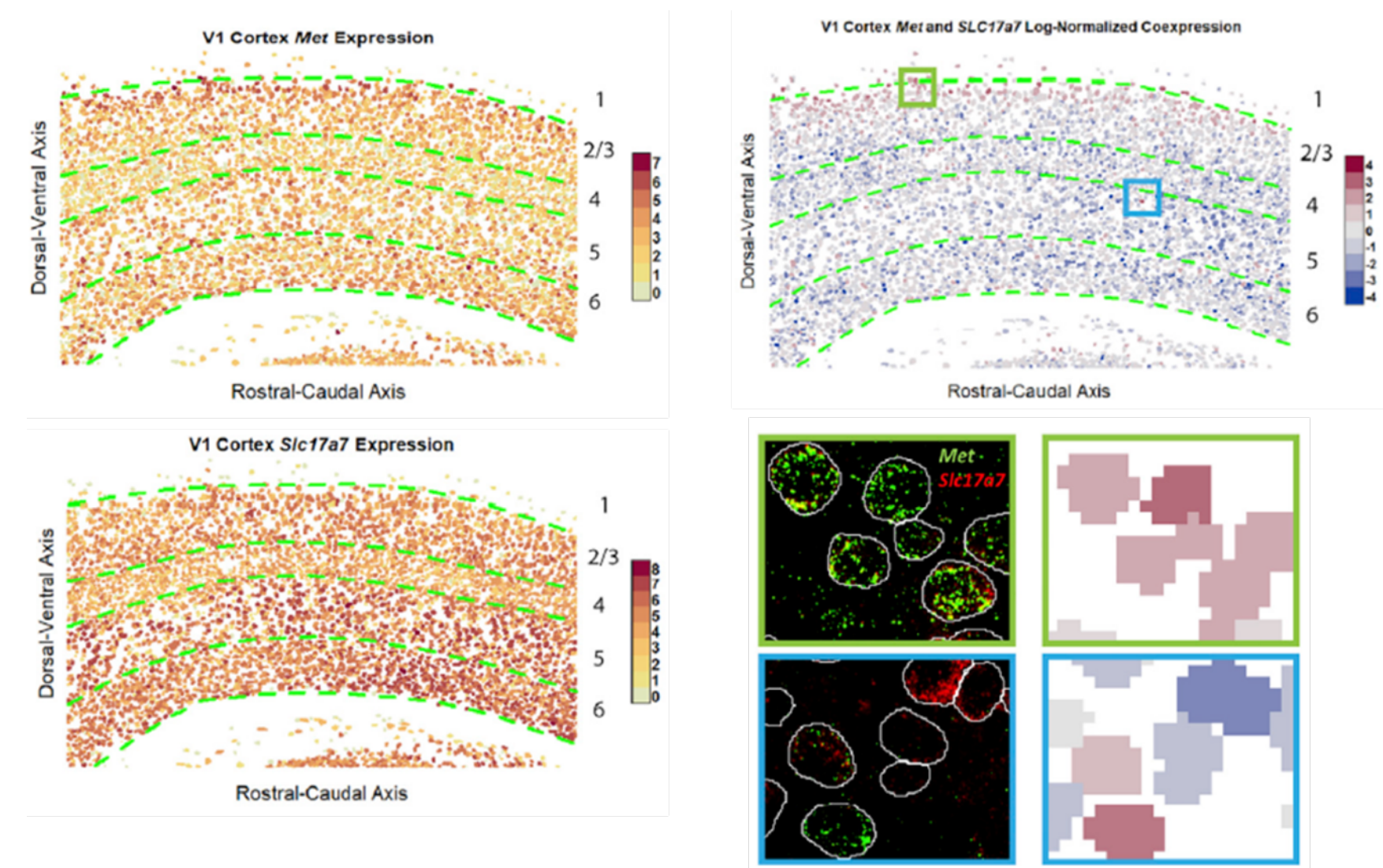
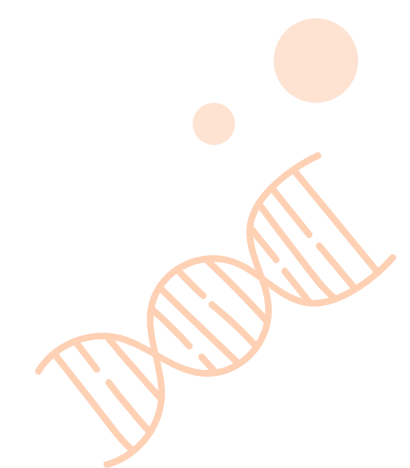


圖4. Met與Slc17a7在小鼠V1區域神經元中的表達強度，以及二者之間的相對表達量。

在本篇研究工作中，研究人員結合了RNAscope Hiplex與免疫組織染色的方法，對於感興趣的細胞進行了更準確的標記，為後續的分析工作奠定了較好的基礎，同時RNAscope可達到的單細胞解析度，為部分低表現量目標、特異性表現的目標的原位檢測提供了一個良好的平臺。

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。

---

**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。

---

**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 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。