

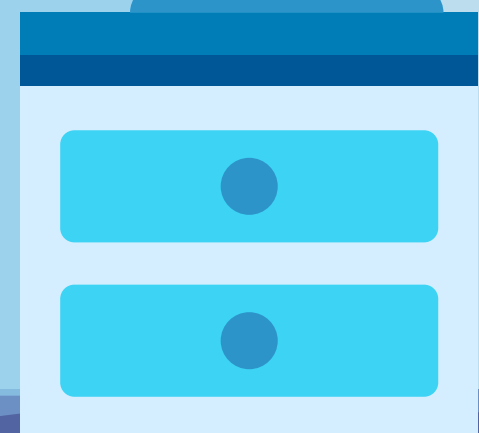
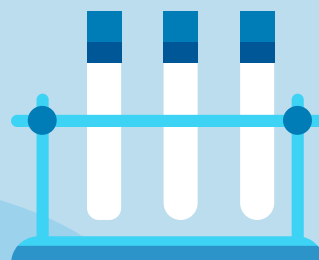
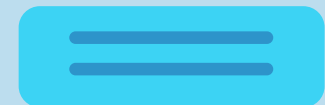
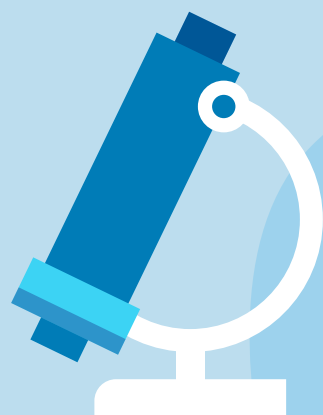


弘晉有限公司
Hong Jing Co., Ltd.



ACD
a biotechne brand

使用DNAscope檢測 細胞外囊泡中的核酸表現



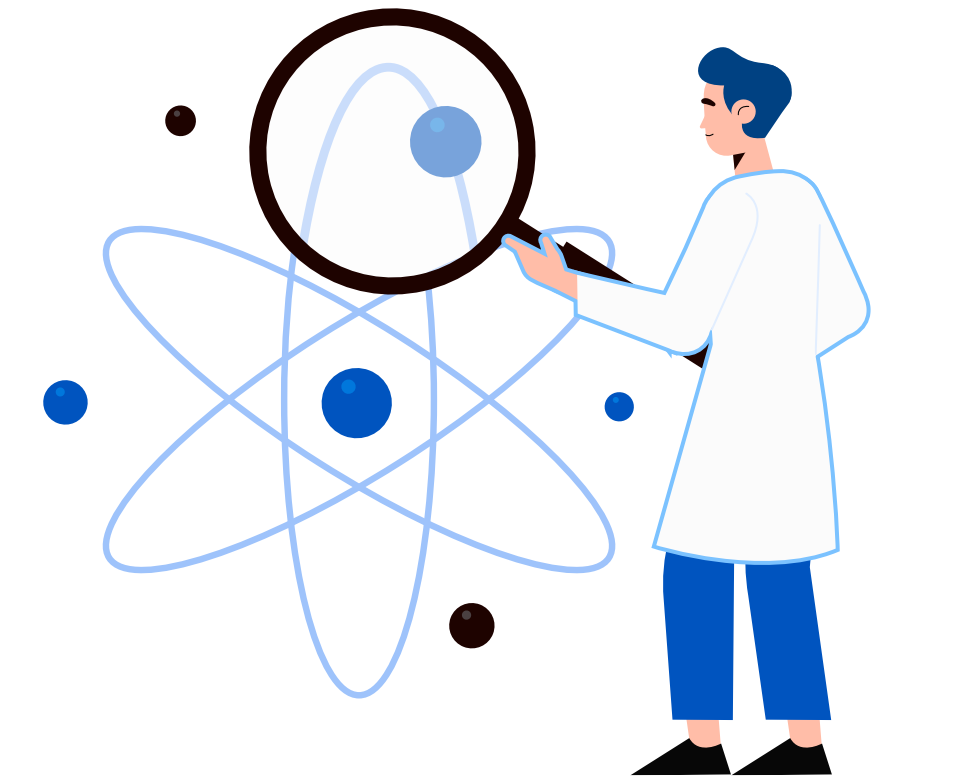
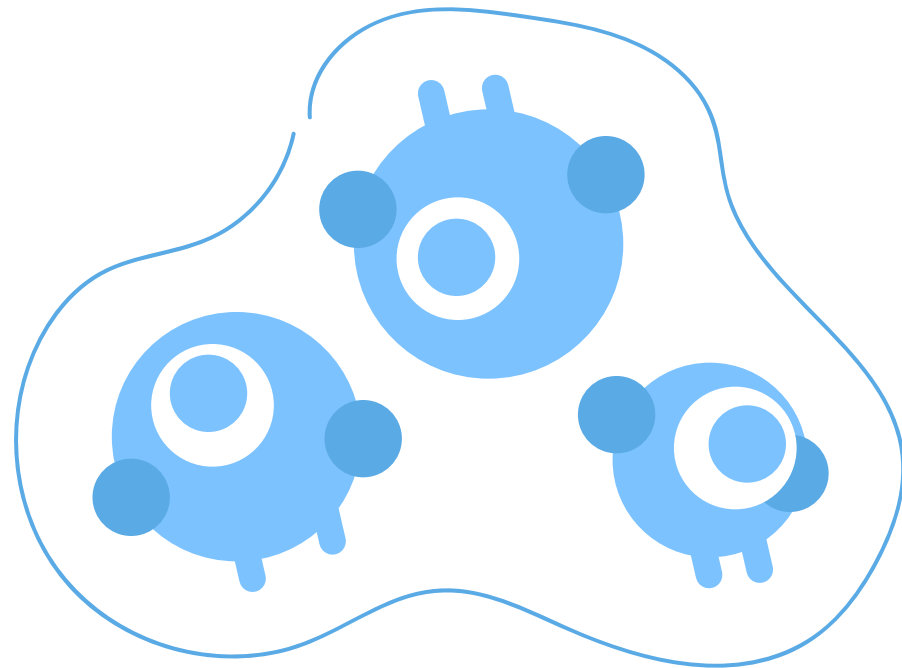
軟組織肉瘤 (Soft Tissue Sarcoma, STS)是一種間質來源的腫瘤,可以發生在身體的任何地方。STS有100多種不同的組織學亞型:脂肪肉瘤(LPS)是最常見的亞型,占STS的40%。

脂肪肉瘤根據組織學和生物學因素進一步分為四種不同的亞型:高分化(WDLPS)、去分化(DDLPS)、黏液性和多形性。其中,WDLPS和DDLPS(WD/DDLPS)最為流行;當位於腹膜後時(腹膜後脂肪肉瘤,RL),在臨床檢測到之前腫瘤可以長到很大。手術切除是治療的主要手段。對於那些不可切除或轉移的患者,系統性非特異性多藥化療是主要方案,但對大多數LPS(Liposarcoma)患者療效有限。



除此之外,RL還可能同步多灶病變或復發,在大約60%的患者中最終致命的原因是多中心復發。在分子水平上,幾乎所有WD/DDPLS/RL都具有12q13 - q22的擴增,這是MDM2的基因座,MDM2是該疾病中最常見的過度表現基因。從機制上看,過度表現的MDM2 DNA導致MDM2蛋白的過量產生,其可以取代wtp53腫瘤抑制功能,是RL進展的關鍵驅動因素。

細胞外囊泡(EV)是一種分泌型脂質雙層囊泡,其在癌症的發生、發展和轉移中可能發揮作用。EV中可包含部分miRNA、RNA甚至DNA序列,可能在腫瘤及腫瘤微環境中對基因表現具有一定調控作用,也可能與腫瘤轉移有關。而其中的核酸或蛋白物質,也是潛在的腫瘤生物標記物。目前在脂肪肉瘤的EV中,證實有MDM2 DNA和一些特定的miRNA。腹膜後脂肪肉瘤中EV來源的MDM2 DNA促進了從RL轉移到RL微環境中的前脂肪細胞金屬蛋白酶(特別是MMP2)的產生,這可能導致RL復發。



2022年9月，來自俄亥俄州立大學的研究人員在J Extracell Vesicles上發表題為“In situ hybridization to detect DNA amplification in extracellular vesicles”的文章，首次使用DNAscope對分離出的EV中包含的MDM2 DNA進行了檢測，證實了其存在，且在腫瘤組織和腫瘤臨近組織分離出的不同EV，其MDM2 DNA的含量有所不同。

Received: 20 July 2022 | Revised: 20 July 2022 | Accepted: 20 July 2022

DOI: 10.1002/jev2.12251



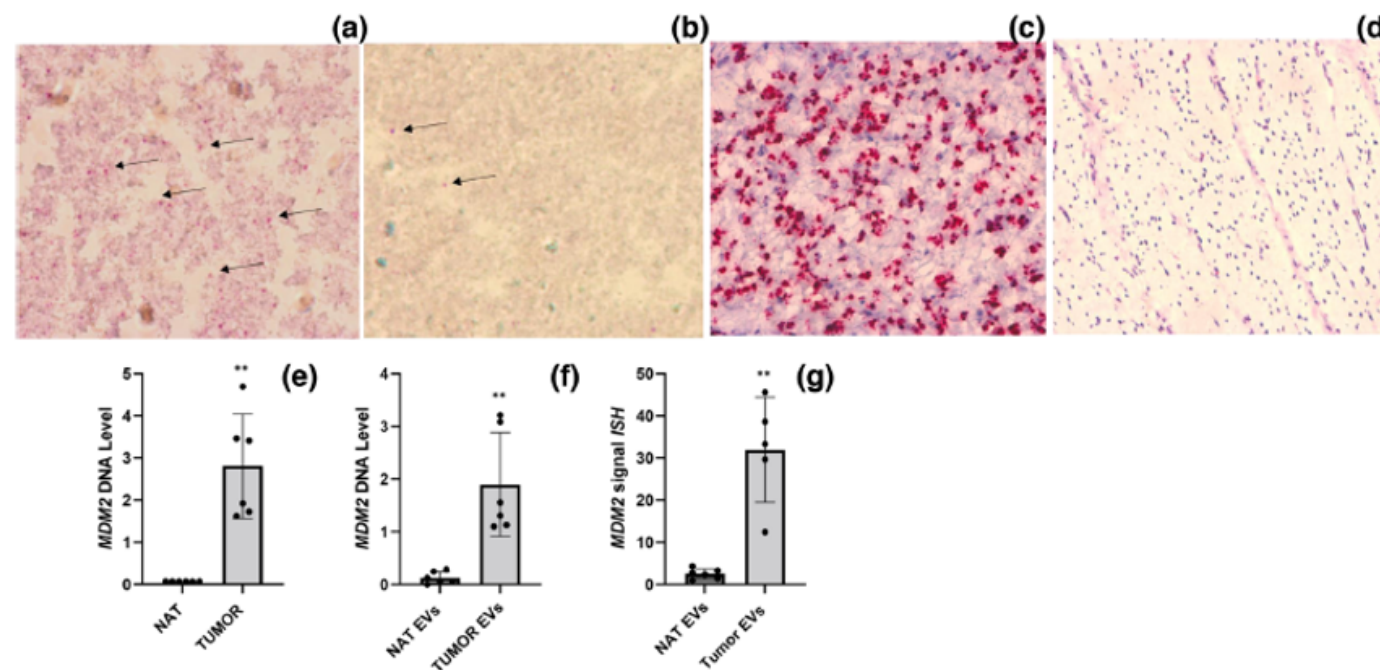
RESEARCH ARTICLE

In situ hybridization to detect DNA amplification in extracellular vesicles

Lucia Casadei¹ | Patricia Sarchet¹ | Fernanda Costas C. de Faria¹ | Federica Calore³ |
Giovanni Nigita³ | Sayumi Tahara¹ | Luciano Cascione² | Martin Wabitsch⁴ |
Francis J. Hornicek⁵ | Valerie Grignol¹ | Carlo M. Croce³ | Raphael E. Pollock¹



在文章中,作者比較了EV的不同分離方法,通過Nanotrack analysis、穿透式電子顯微鏡及Western blot評估了不同分離方法得到的EV純度、顆粒大小、雜質差異等參數。作者還利用瓊脂糖包埋的方式,將分離出的EV進行小樣本包埋,然後製備成石蠟切片,之後使用DNA-scope的方式對EV石蠟切片和RL組織及癌旁組織中的MDM2 DNA和CEP12進行了檢測(圖1)。相比于癌旁正常組織中分離的EV(圖1b),和癌旁正常組織本身(圖1d),從RL腫瘤組織分離出來的EV中(圖1a),及RL組織中(圖1c),MDM2 DNA可見大量擴增。

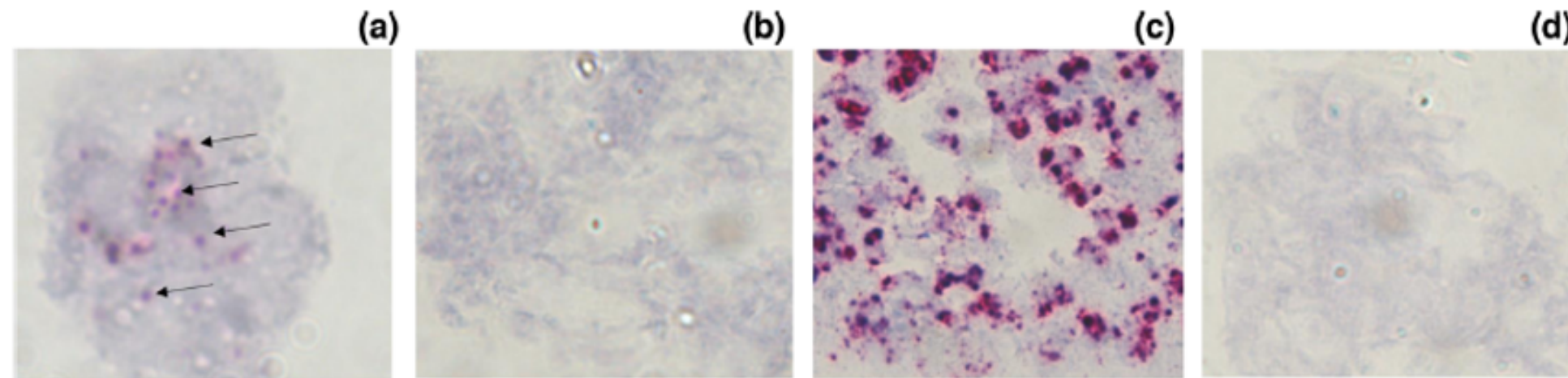


(圖1)

RL腫瘤及癌旁正常組織分離出的EV及組織本身中,MDM2 DNA分佈量的差異。



作者對從培養的不同細胞系中分離的EV也進行了分離和包埋，並對MDM2 DNA進行了原位檢測(圖2)。從Lipo246分離的EV中存在MDM2(圖2a)，而對照P-a細胞系(SGBS)中分離的EV則沒有MDM2訊號(圖2b)。對於細胞系本身的切片檢測也得到類似的結果，同時在細胞系切片中看到更大量的MDM2訊號(圖2c、d)。



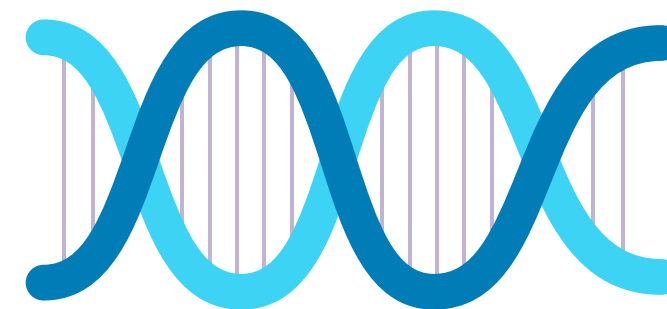
(圖2)細胞系中分離的EV及細胞系中MDM2 DNA的表達。

作者通過多種驗證方法，對不同方法分離的EV進行多個維度的測試，並將部分分離的EV包埋成石蠟塊，製備成石蠟切片，進行DNAscope檢測，旨在對EV中可能包含的核酸和蛋白進行檢測和驗證，同時證明其在此類樣本上實施的可行性。

DNAscope是ACD在2021年5月推出的新產品，使用DNAscope Duplex試劑盒旨在對染色體上基因的拷貝數變異(CNV)、基因的斷裂-融合(BA)進行檢測。在對染色體上基因的拷貝數變異進行檢測時，可參考待測基因所在的染色體，將此染色體的著絲粒探針作為待測指標的對照探針，利用不同顏色進行顯色，二者並行進行檢測。

DNAscope的探針設計原則與RNAscope類似，也是通過級聯訊號放大進行訊號檢測，最後使用光學顯微鏡進行觀察及計數工作。目前DNAscope只可在石蠟切片上進行。

有關DNAscope詳情，可見 [DNAscope介紹](#)



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RNA-scope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。

