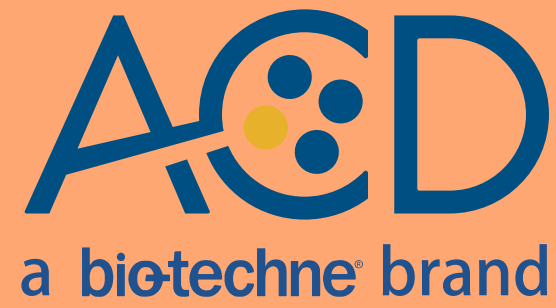




*RNAscope*幫助了解指紋形成



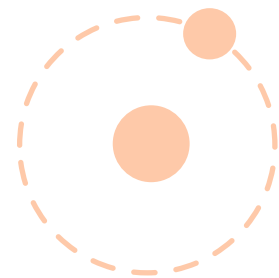


每個人的指紋都是獨一無二的，從19世紀以來就作為一種重要的個體識別特徵，也可以對一些先天性疾病進行輔助診斷。指紋主要是由弓形、環形、螺旋形的紋路組合而成，從胚胎時期就具有最初的雛形並伴隨人的一生存在。人類指紋的圖案是由上皮初級脊(Primary Ridge)決定的。這些初級脊大約在妊娠13週時形成在手指尖端隆起的掌墊上，在接下來的幾週內，初級脊遍布掌側皮膚的其餘部分，到第16週，在脊的最深部分出現汗腺。第17週初級脊的形成完成，然後在它們之間開始出現較小的次級脊。皮膚表面會週期性地升高到初級脊的上方，每個表面的褶皺沿著其頂點帶有一排汗腺毛孔。初級脊定義了整個指紋結構，因此在第15週時，指紋的弓形、環狀或螺旋狀圖案就已被確定。雖然目前對於指紋形成已有一些研究和理論模型，但對於其中初級脊的模式和形態發生機制還不明確。2023年2月，來自愛丁堡大學Denis J Headon實驗室的研究人員在Cell上發表了題為“The developmental basis of fingerprint pattern formation and variation”的文章，利用RNAscope、免疫螢光、單細胞定序等技術，對指紋形成過程中初級脊最初的形成過程進行了探究。

> Cell. 2023 Mar 2;186(5):940-956.e20. doi: 10.1016/j.cell.2023.01.015. Epub 2023 Feb 9.

The developmental basis of fingerprint pattern formation and variation

James D Glover¹, Zoe R Sudderick¹, Barbara Bo-Ju Shih¹, Cameron Batho-Samblas¹,
Laura Charlton², Andrew L Krause³, Calum Anderson², Jon Riddell¹, Adam Balic¹, Jinxi Li⁴,
Václav Klika⁵, Thomas E Woolley⁶, Eamonn A Gaffney⁷, Andrea Corsinotti⁸,
Richard A Anderson⁹, Luke J Johnston¹⁰, Sara J Brown¹⁰, Sijia Wang¹¹, Yuhang Chen²,
Michael L Crichton², Denis J Headon¹²



初級脊通常在遠端指骨(Distal phalanx)的中心和頂點處形成，並在皮膚上擴展。初級脊的間距從第一次出現後開始線性增加，說明初級脊的相對位置是固定的，在現有初級脊中間不會插入新的初級脊，其圖案可隨著手指的伸長而被拉伸。在胚胎的第17週，初級脊帶著汗腺週期性的向下生長，並在兩側形成較小的次級脊，而初級脊上方的基底增厚導致皮膚形成凹凸起伏。在初級脊的形成過程與毛囊類似，會有 β -catenin大量表現，但次級脊中未發現，說明初級脊與次級脊的發生機制有區別。LEF1是Wnt訊息傳遞路徑中關鍵的傳感器(Transducer)和標靶，在初級脊和毛囊發育過程中表現量增加，說明這些結構中上皮的Wnt訊號轉導增強。與手背皮膚相比，掌側皮膚的間質中LEF1的表現大大減少。

研究人員通過RNAscope結合免疫螢光染色的方法，檢測證實EDAR、FGF20、BMP2等毛囊板(HF placodes)早期發育的標記物在初級脊中均有表現(圖1)，但不表現毛囊標記物SHH6(圖2)。毛囊發育過程中，其間質組織中會表現DKK1和SOX2，但初級脊間質中未見表現，在初級脊底部也無類似毛囊間質的細胞簇狀結構。這些結果顯示，初級脊具有毛囊早期發育的特徵，但缺乏繼續向下生長形成成熟毛囊板的後期驅動因子。

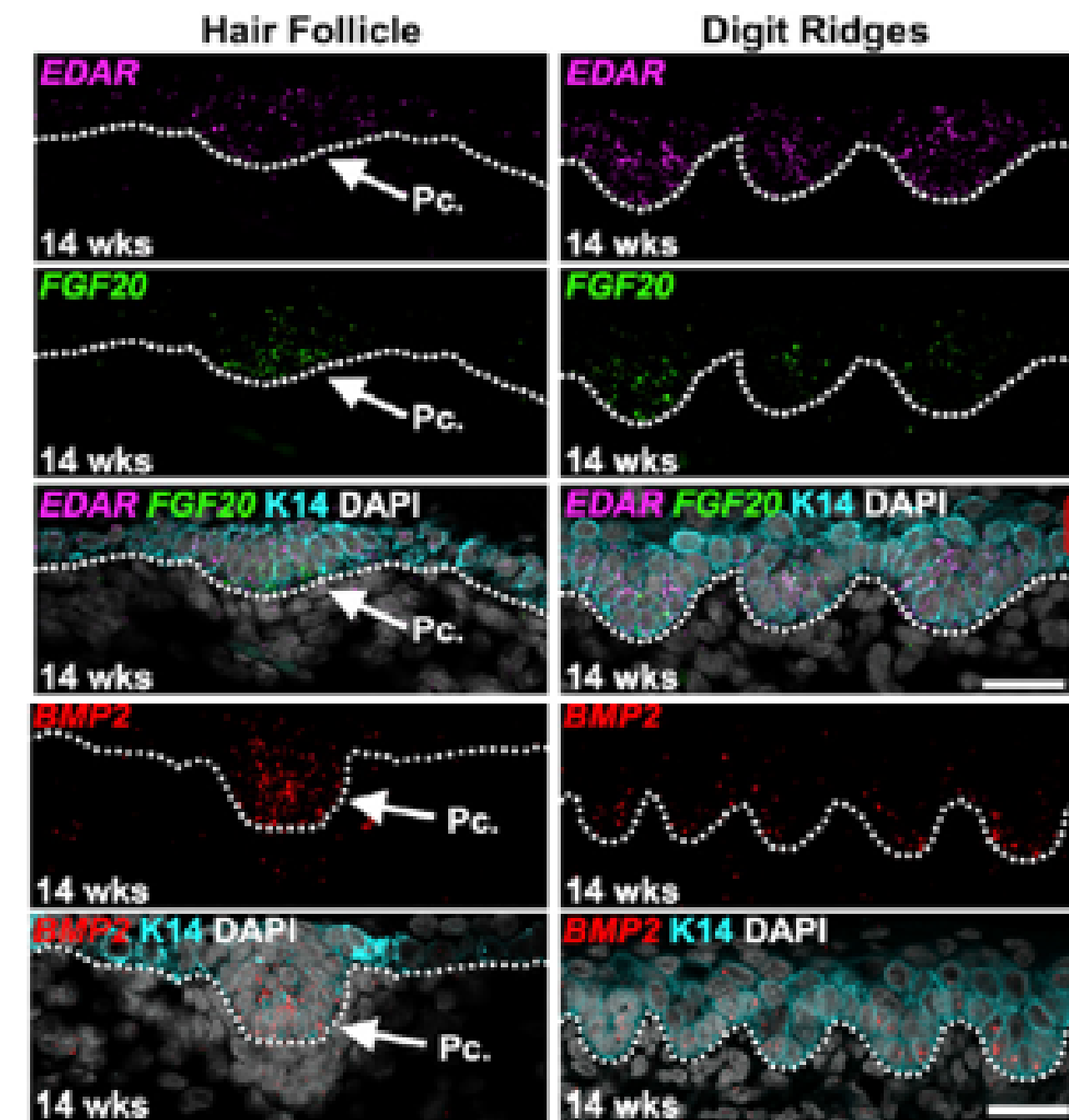


圖1.EDAR、FGF20、BMP2等毛囊板早期發育的標記物在初級脊中均有表現。

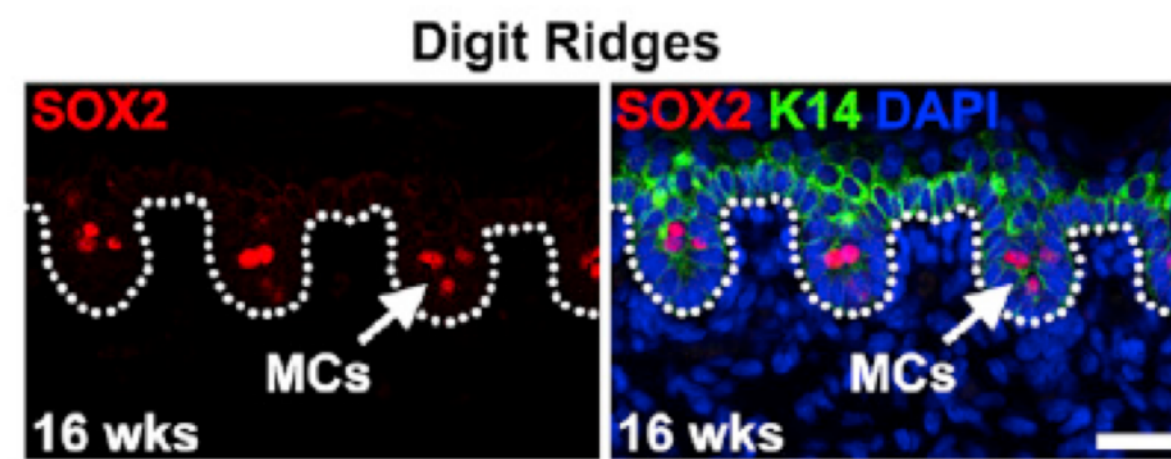
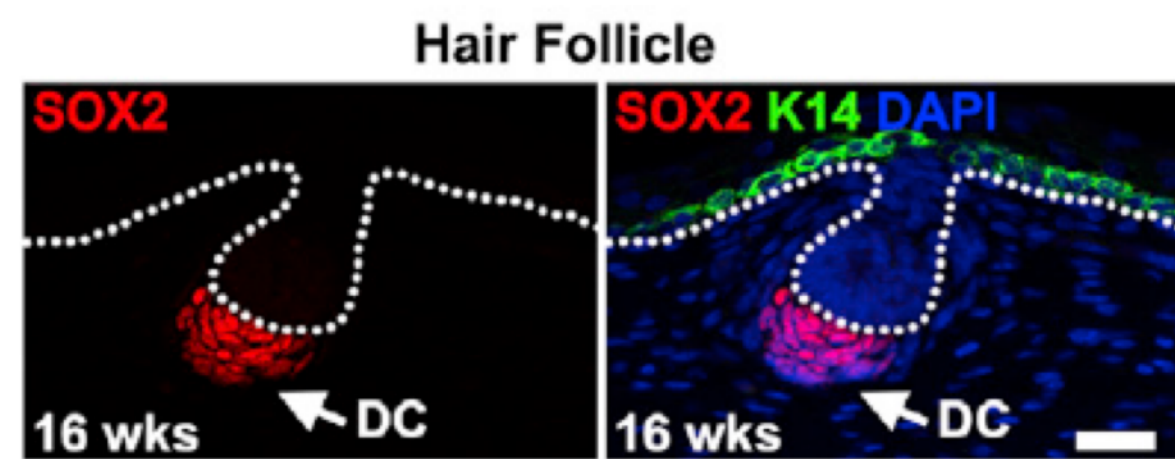
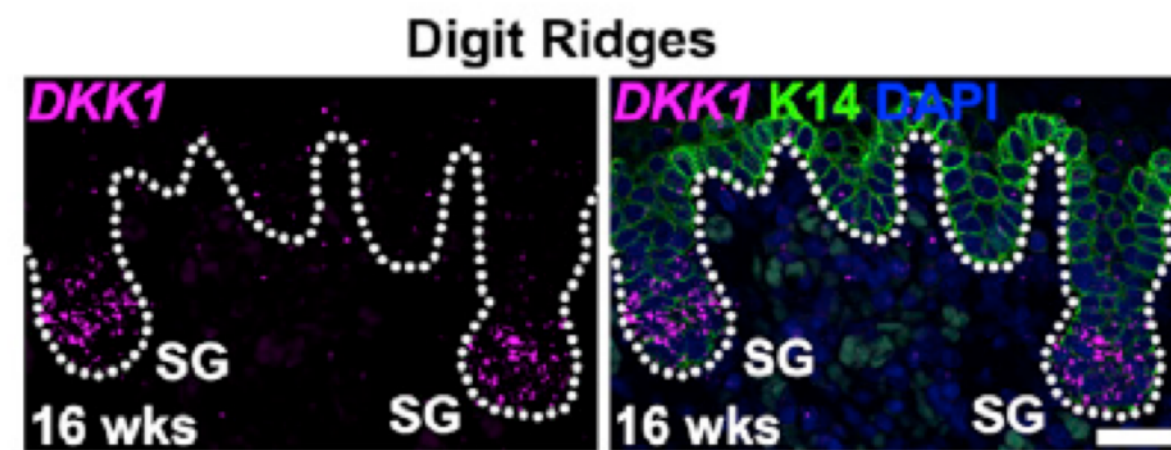
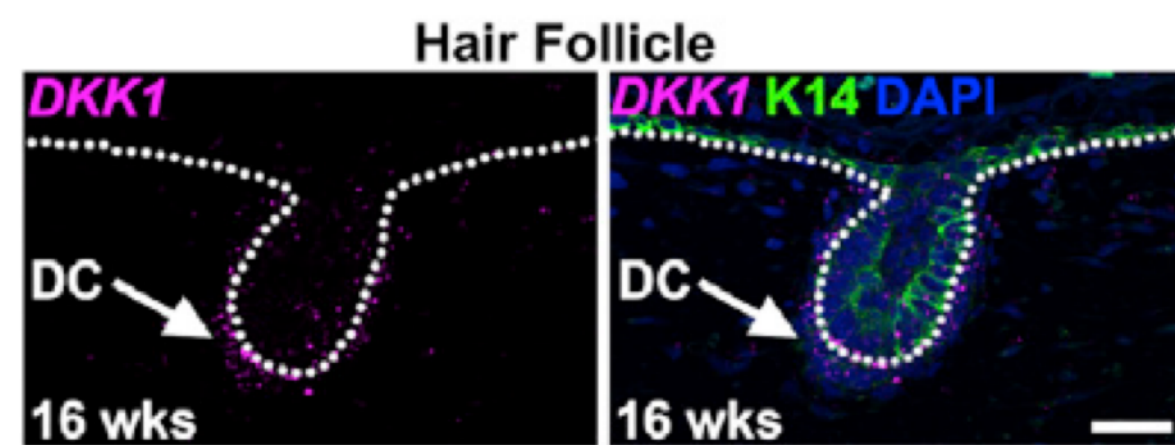
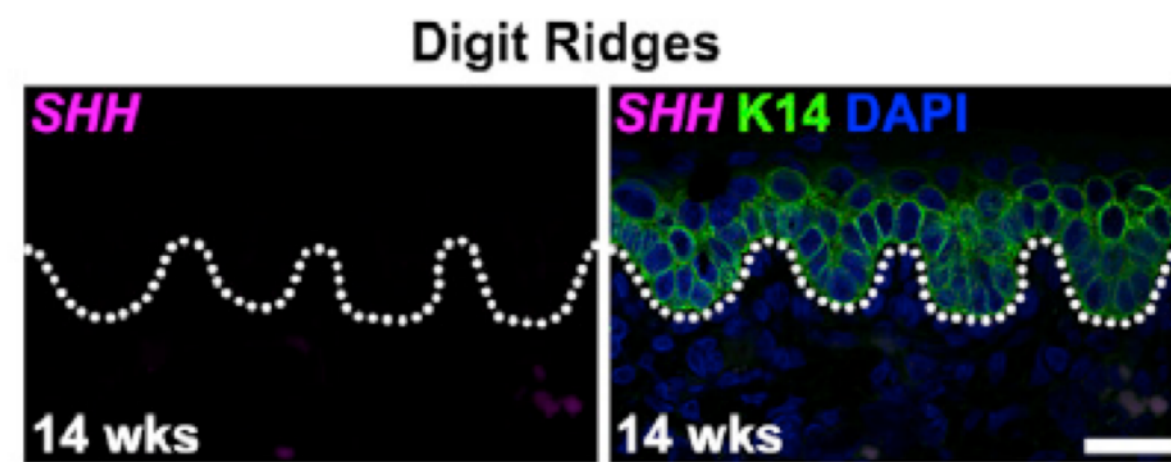
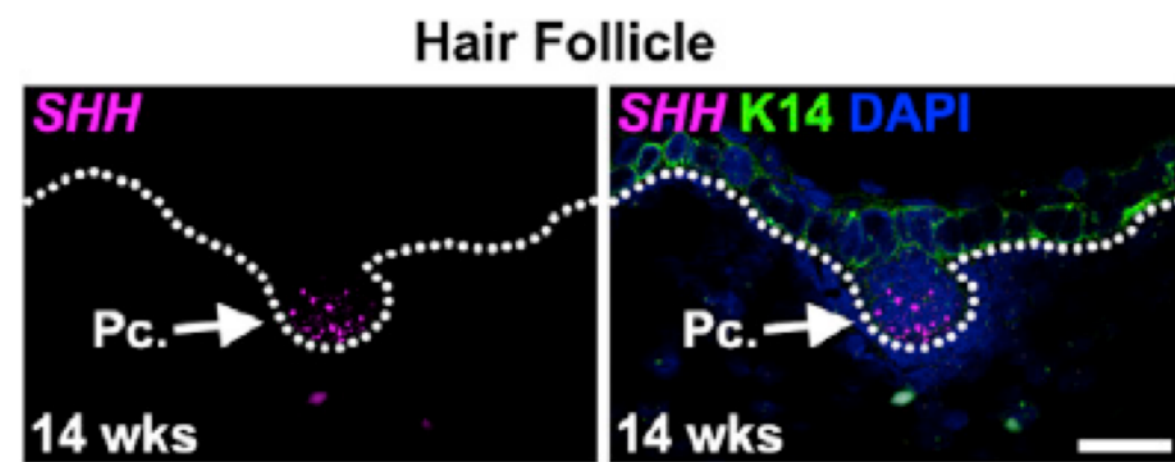


圖2.初級脊中無毛囊標記物SHH表達。



在指紋初級脊出現之前，掌側上皮相較於背側皮膚經歷了加速成熟，其細胞角蛋白的表現量及順序異於其他部位上皮，但掌側表皮中基底細胞的增殖率未明顯高於其他上皮，而是在12週後出現密集排列的柱狀基底細胞，導致上皮機械變形，它被認為可通過屈曲機制作為週期性脊形成的驅動因素。儘管腹側指的基底細胞密度高於背側指和身體皮膚，但並未發現掌側上皮中有定向應變的跡象。研究人員還將YAP活性作為細胞機械感受的指標進行了評估，也未觀察到伴隨初級脊形成的YAP活性的異質性。這些結論顯示，脊的模式是在上皮內自主產生的，而不是通過簡單的細胞過度擁擠和變形產生的。當脊向下生長時，其最深部分保持最大的增殖，脊的最深部分顯示出最高的WNT/ β -catenin活性，並在其增殖性向下生長期間保持EDAR和LEF1表現。EDAR和WNT訊號驅動一系列上皮細胞的增殖，其表現的異質性可能導致上皮細胞分裂為脊和脊間。研究人員在即將形成脊的區域，檢測到週期性的EDAR表現先於上皮皺褶生成(圖3)。



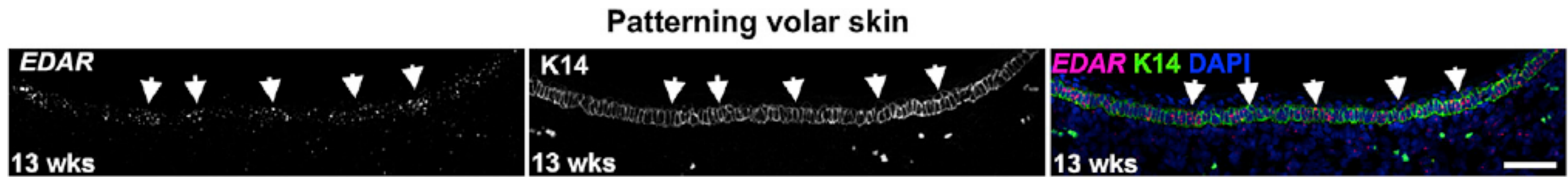


圖3.EDAR先於脊發生之前呈現圖案化週期性表現。

作者還類比研究人胚胎和小鼠胚胎中EDAR、BMP在毛囊和指紋脊發育中的作用，證實在二者中，EDAR都能夠與WNT/ β -catenin協同，驅使脊的形成。而BMP可拮抗EDAR訊號，抑制Wnt訊息傳遞路徑活化引起的細胞增殖，使指紋在形成後能夠停留在合適的時期。

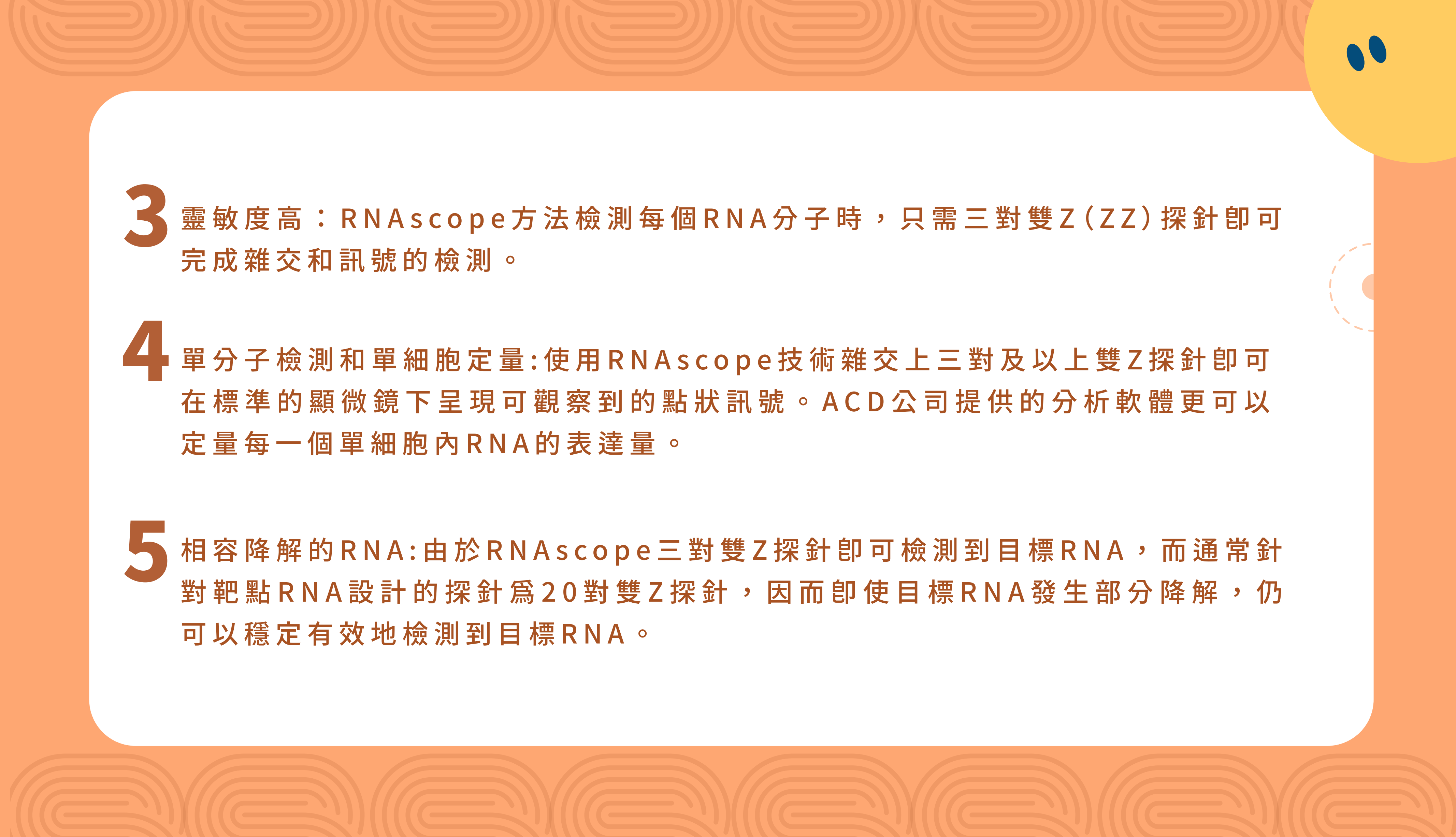
在本篇研究中，作者利用RNAscope結合免疫螢光共染的方式，對指紋形成過程中的EDAR、LEF1、BMP等目標進行了原位標記，清晰地觀察各發育相關因子在不同時期在上皮中如何分布，為理解與類比指紋形成的過程提供關鍵證據。



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。

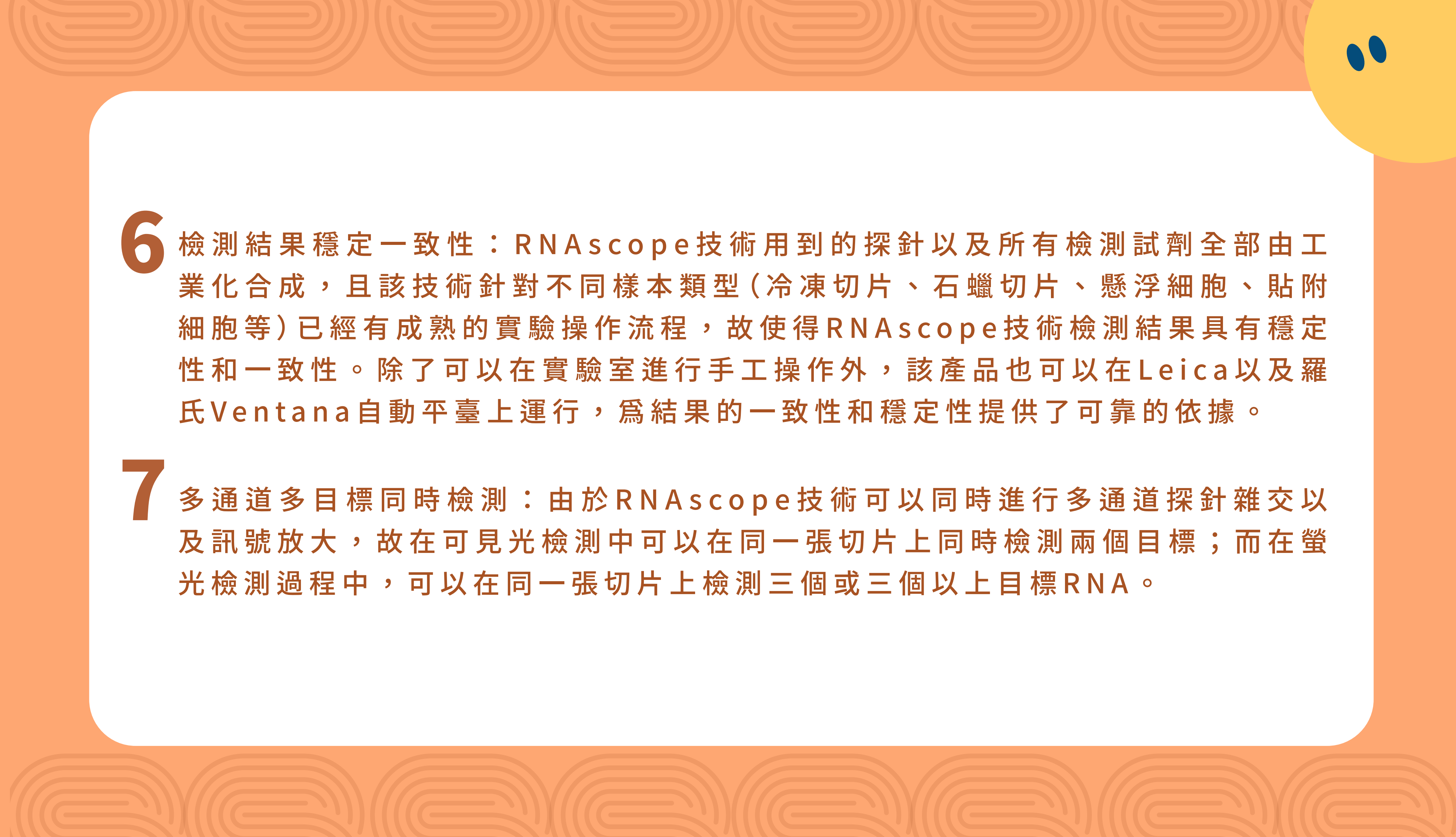
2 特異性強：RNAscope獨特的雙Z(ZZ)探針設計有效的防止了探針的非特異性結合，同時降低了背景干擾。由於結合在非特異性位點的單個的Z探針不會產生完整的訊號放大分子結合位點，並會在雜交過程中被洗脫掉，從而防止非特異性訊號的放大，使得探針的訊號具有高度特異性。探針設計合成需要2~4週時間即可完成。



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：RNA scope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RNA scope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。

