

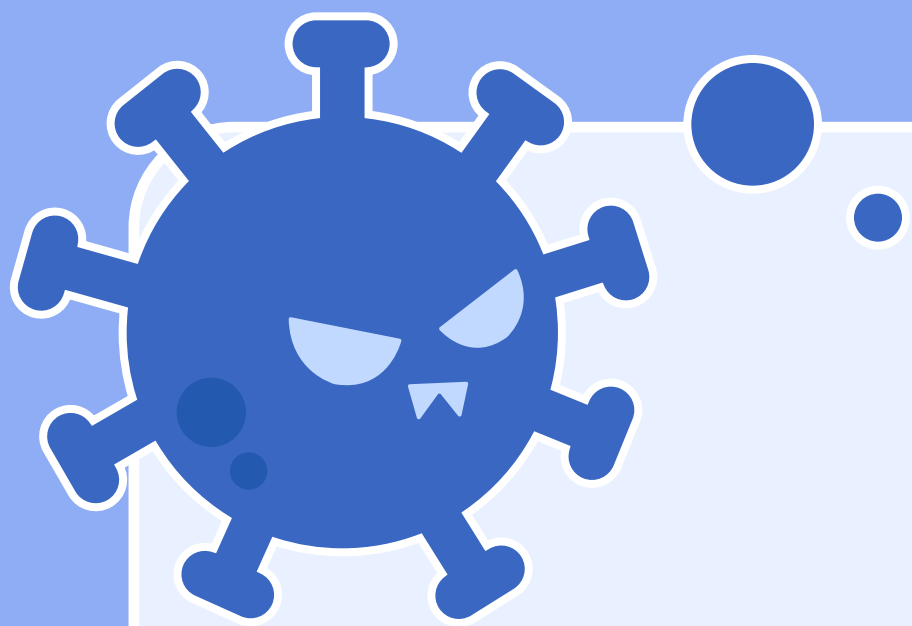


RNAscope

助力癌症機制研究

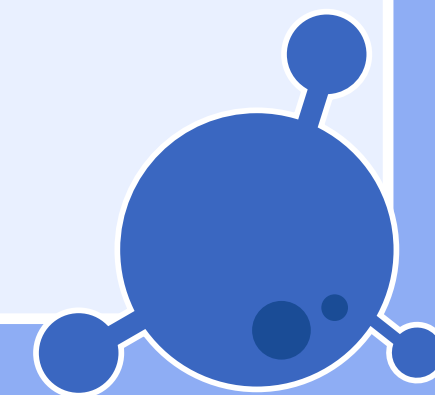


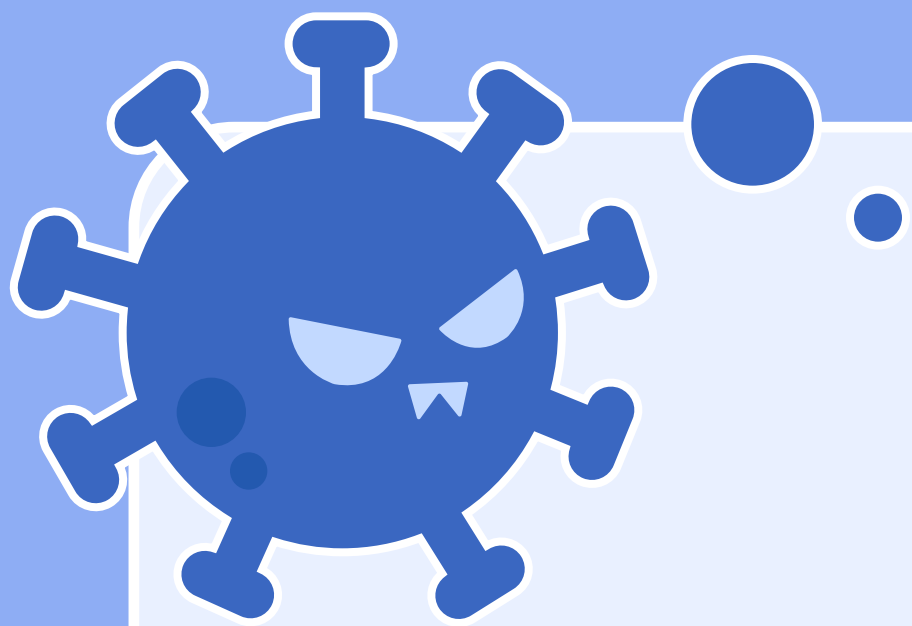
弘晉有限公司
Hong Jing Co., Ltd.



無限複製的能力是癌細胞的標誌之一，能使其向惡性轉變。細胞永生可以通過重新活化端粒酶 (telomerase) 來實現，它是一種在細胞分裂過程中維持端粒長度的酶。在腫瘤中經常發現基因改變導致的端粒酶逆轉錄酶(TERT)亞基的表達活化。

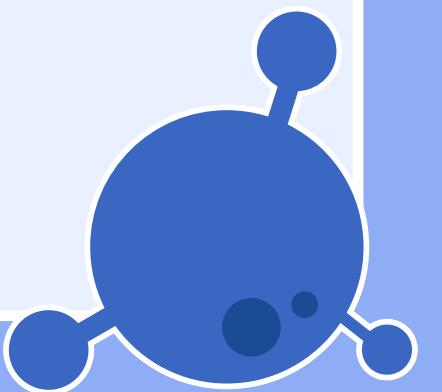
事實上，TERT啟動子(TERTp)突變是人類癌症(包括大多數膠質母細胞瘤)中最常見的非編碼突變。

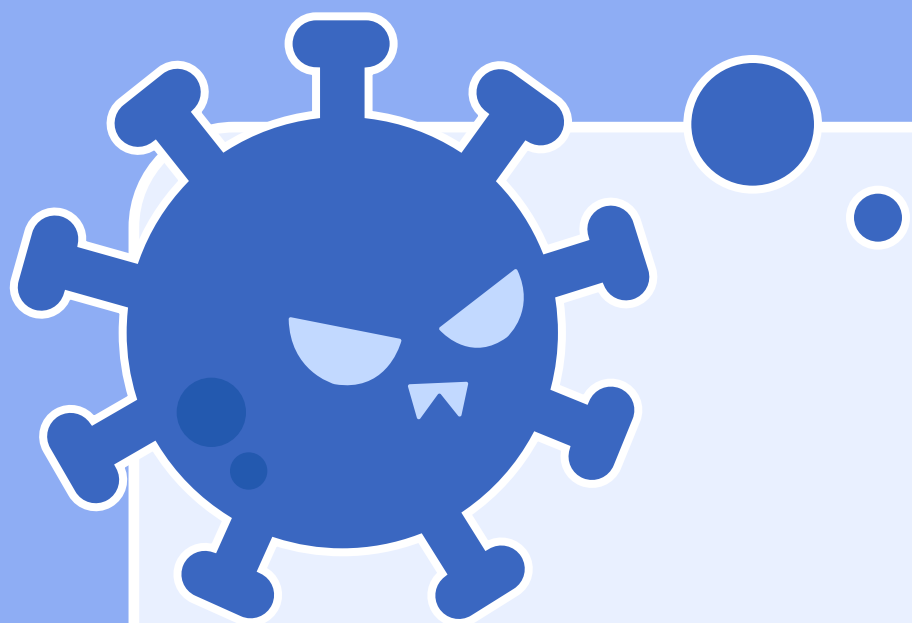




核心啟動子區域的兩個TERT熱點突變**G228A**和**G250A**的基因組坐標分別為 **chr5:1,295,228** 和 **chr5:1,295,250** (human genome build, hg19)。

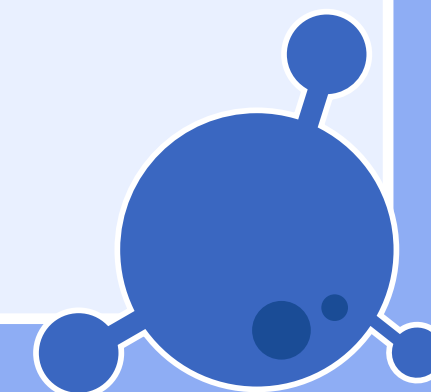
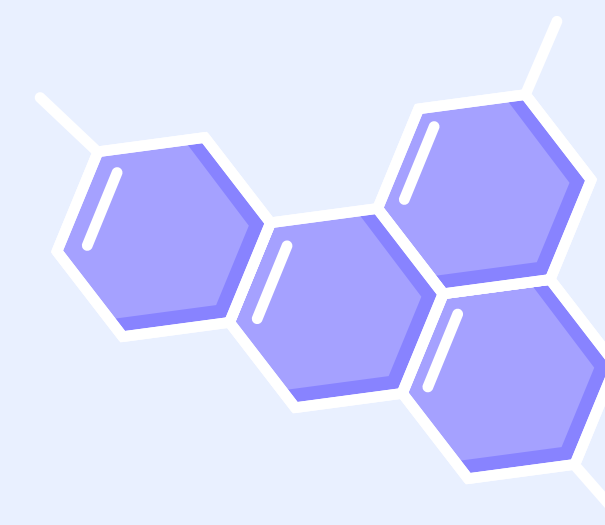
G228A 和 G250A TERT 突變產生新的E26轉化特異性(ETS)結合位點(CCGGAA)，並招募GA結合蛋白(GABP)轉錄因子(TF)複合物來活化TERT1。

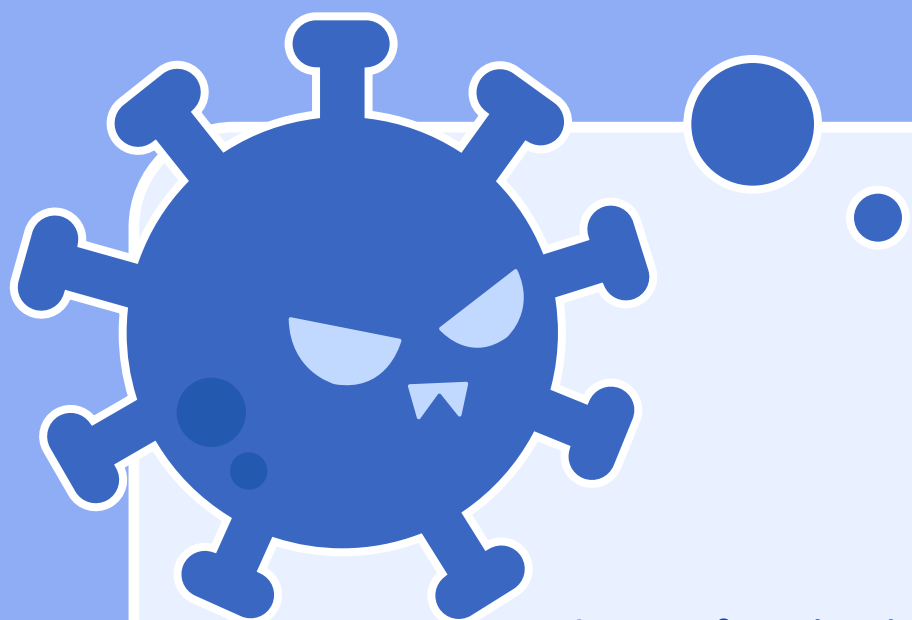




GABP TF 複合物 是一種專性多聚體 (obligate multimer)，由DNA結合亞基GABPA和活化亞基GABPB1組成。

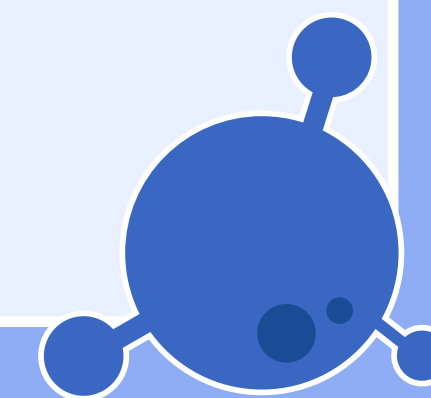
根據 GABPB1 亞基的異構體，該複合物可以形成含有 GABPA-GABPB1L 的異四聚體或由 GABPA-GABPB1S 組成的異二聚體。

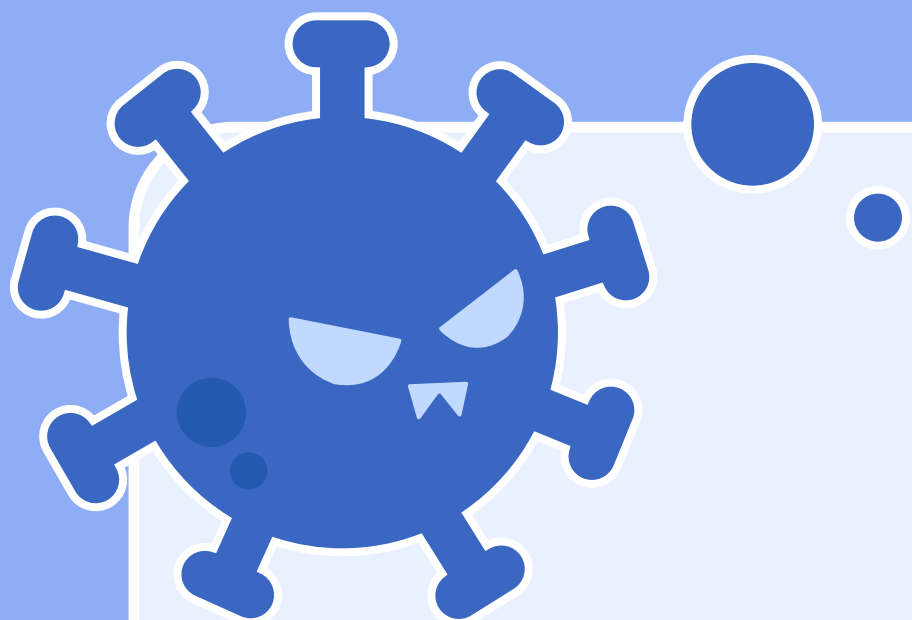




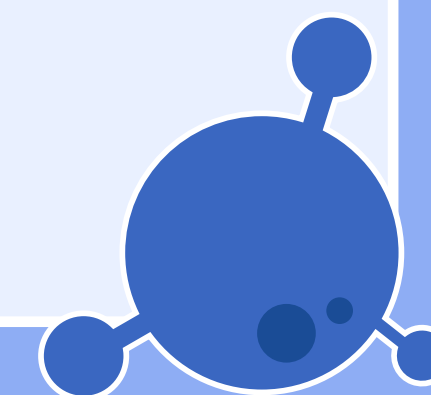
在突變TERTp的情況下，新的ETS基序的生成被定位為與原生ETS基序處於螺旋相，並且兩個基序之間的距離是GABP異四聚體結合的理想位置。

除上述點突變以外，TERTp在癌症中還受其它改變的影響，如插入缺失突變、擴增和表觀遺傳修飾。這些改變的意義和端粒酶活化的潛在機制尚不清楚。這方面，最近的兩個病例報告引起了作者的關注，在兩個膠質母細胞瘤和一個甲狀腺癌中觀察到一個有趣的22bp的TERTp重複，其功能未知。





2022年3月，來自加利福尼亞大學
Joseph F. Costello實驗團隊的研究人員在Nature Communications
上發表題為“Conserved features of TERT promoter duplications
reveal an activation mechanism that mimics hotspot mutations
in cancer”的文章，發現TERT啟動子保守特徵的重複揭示了一種活化
機制，在腫瘤中與熱點突變類似。





nature communications



Article

<https://doi.org/10.1038/s41467-022-33099-x>

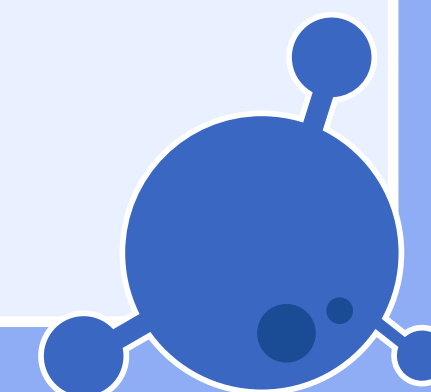
Conserved features of TERT promoter duplications reveal an activation mechanism that mimics hotspot mutations in cancer

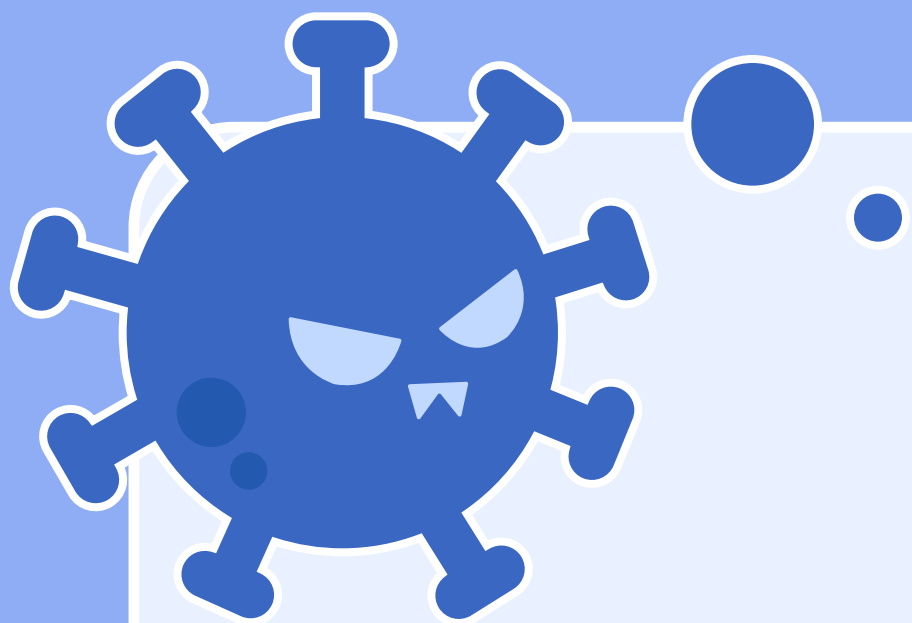
Received: 14 March 2022

Accepted: 1 September 2022

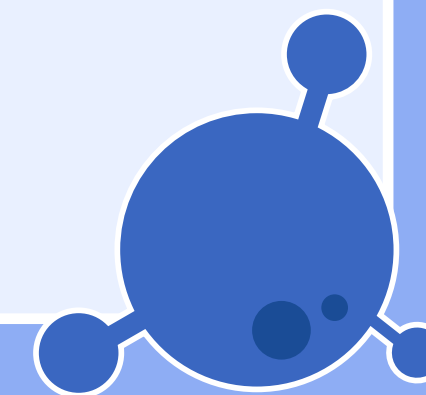
Published online: 16 September 2022

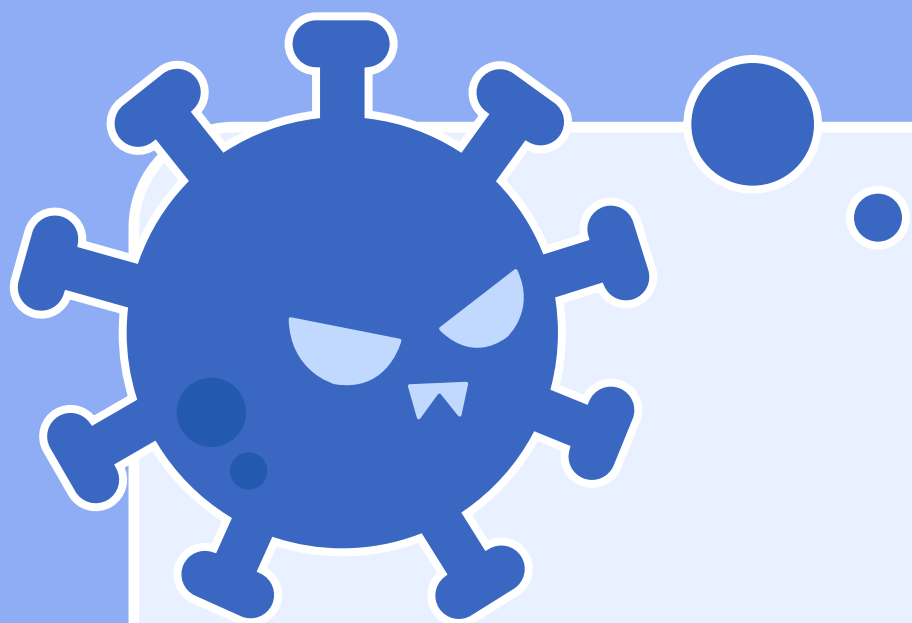
Carter J. Barger ^{1,12}, Abigail K. Suwala^{1,2,3,12}, Katarzyna M. Soczek⁴,
Albert S. Wang ¹, Min Y. Kim¹, Chibo Hong¹, Jennifer A. Doudna^{4,5,6,7,8,9},
Susan M. Chang^{1,10}, Joanna J. Phillips ^{1,10,11}, David A. Solomon ^{10,11} &
Joseph F. Costello ^{1,10} 



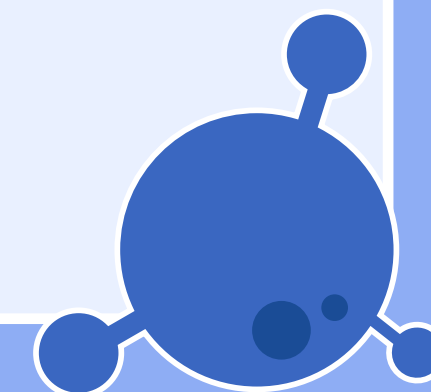
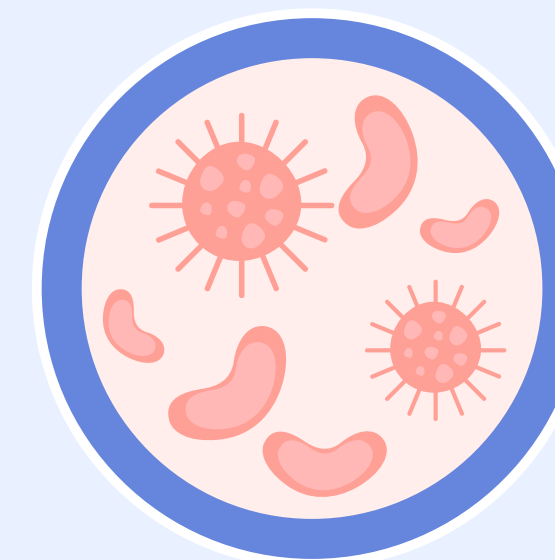


文中研究人員使用RNAscope技術來證明TERTp重複與TERT的轉錄再活化有關。使用了TERTp重複(c.-100_79)膠質母細胞瘤樣本，而TERT的表達僅限於幹細胞和癌細胞，因此，爲了準確鑑定TERT在該TERTp重複膠質母細胞瘤腫瘤細胞中的表達分布及定量，作者選用了RNAscope可見光棕染試劑盒。





TERTp重複膠質母細胞瘤細胞中RNAscope訊號點分布情況展示了TERTmRNA在單個細胞中的核表達水平較低，與熱點G228A突變膠質母細胞瘤組織相當(圖a,b,d)。爲了證明該檢測方法的特異性，作者還檢測了一個具有野生型TERTp的IDH突變星形細胞瘤，未檢測到TERT mRNA的表達(圖c, d)。



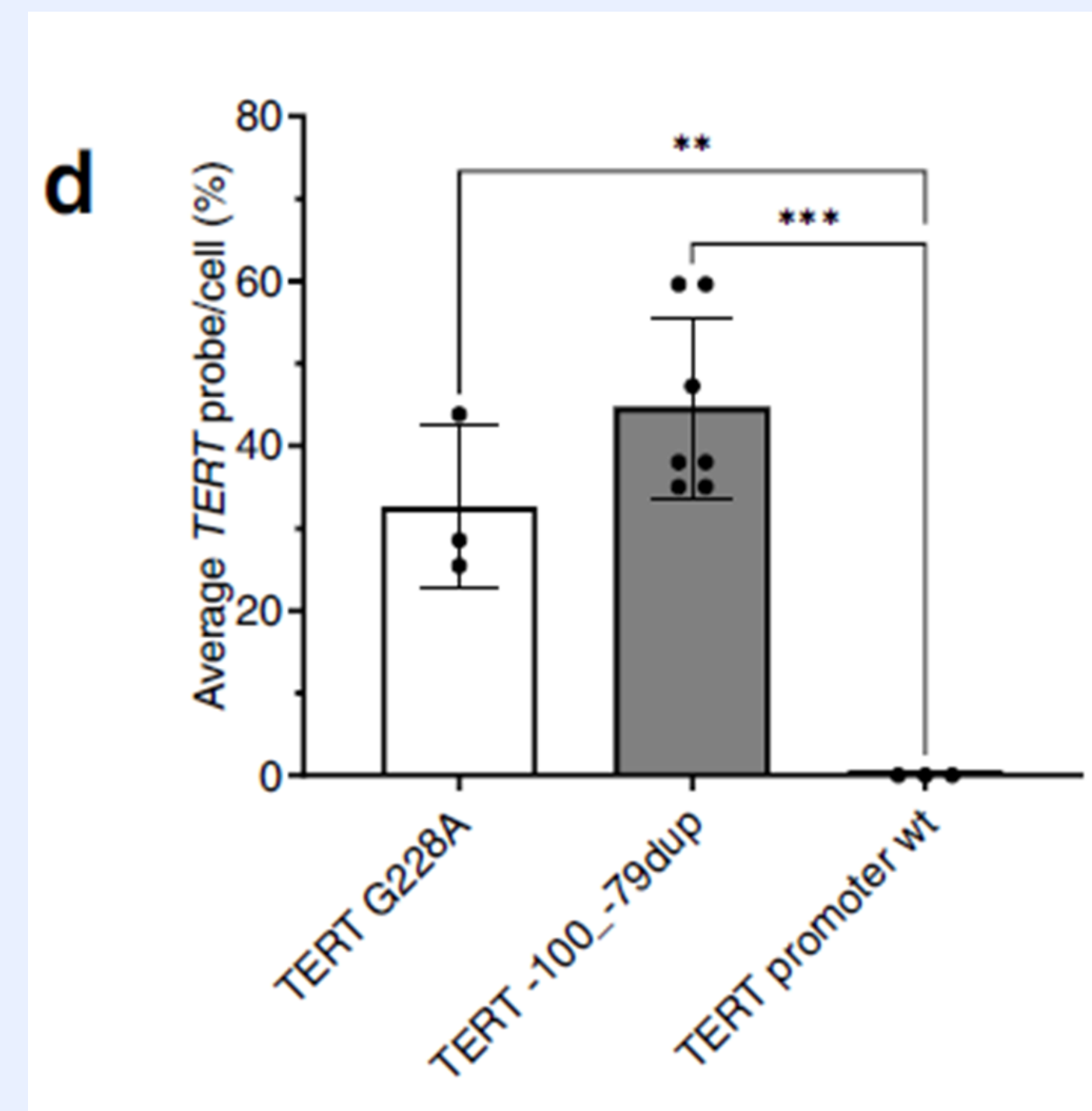
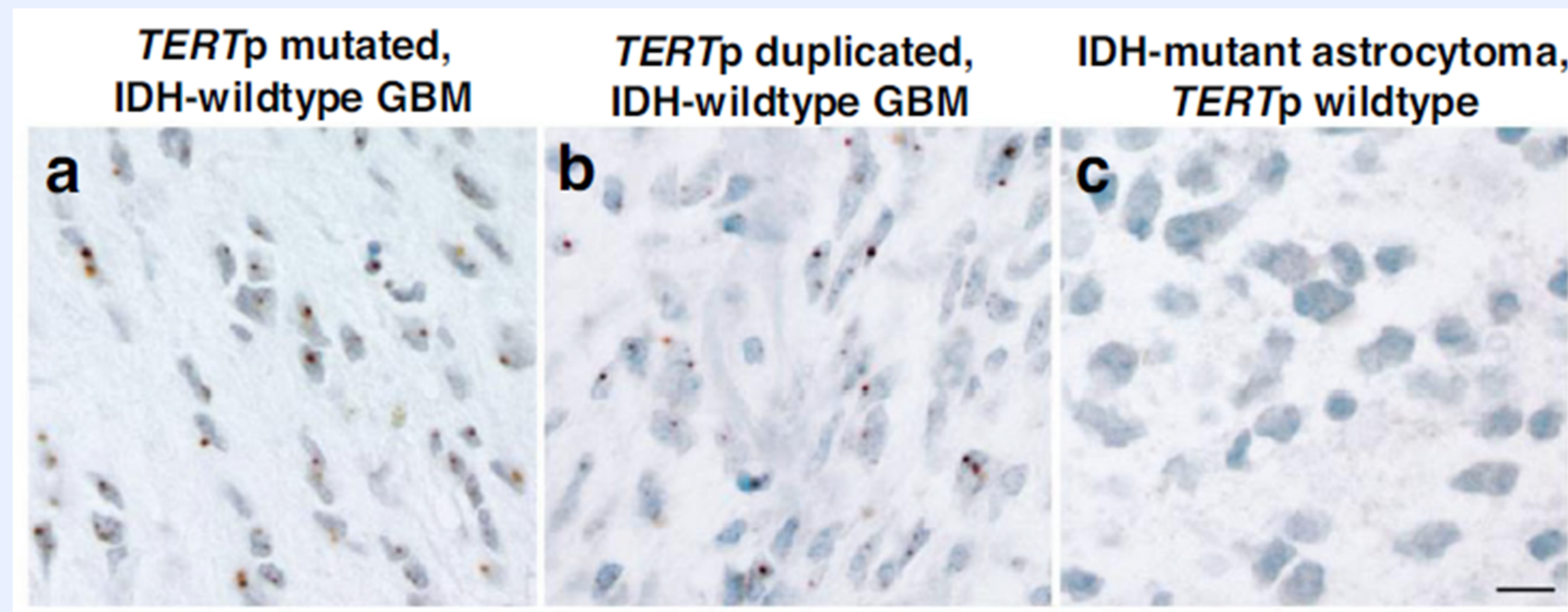
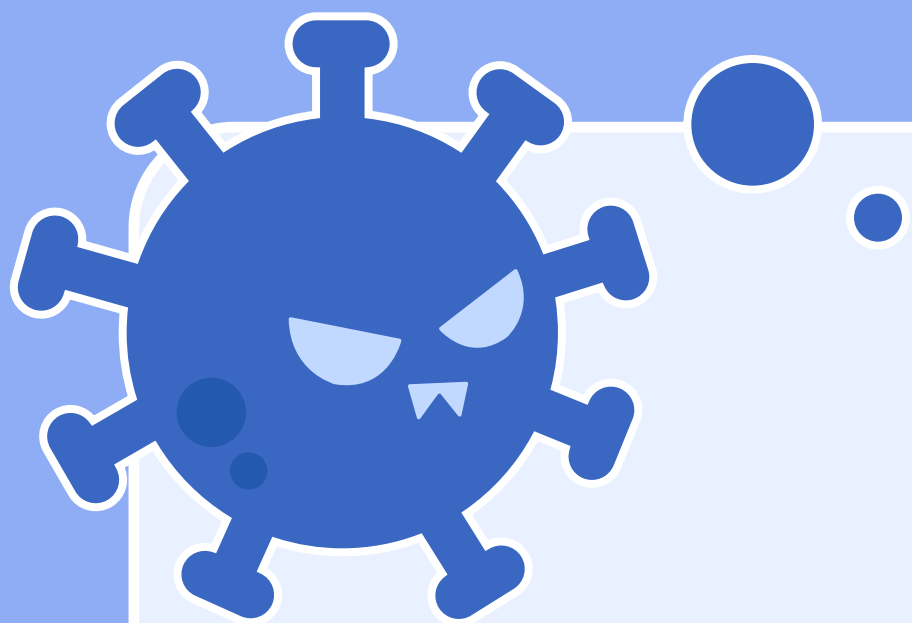
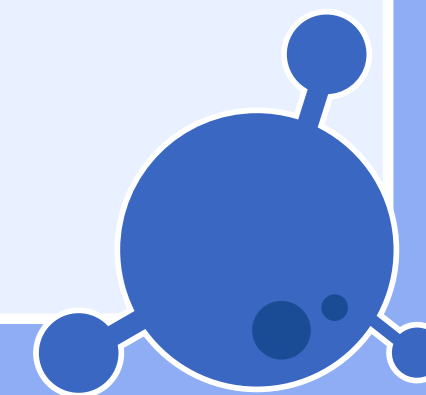
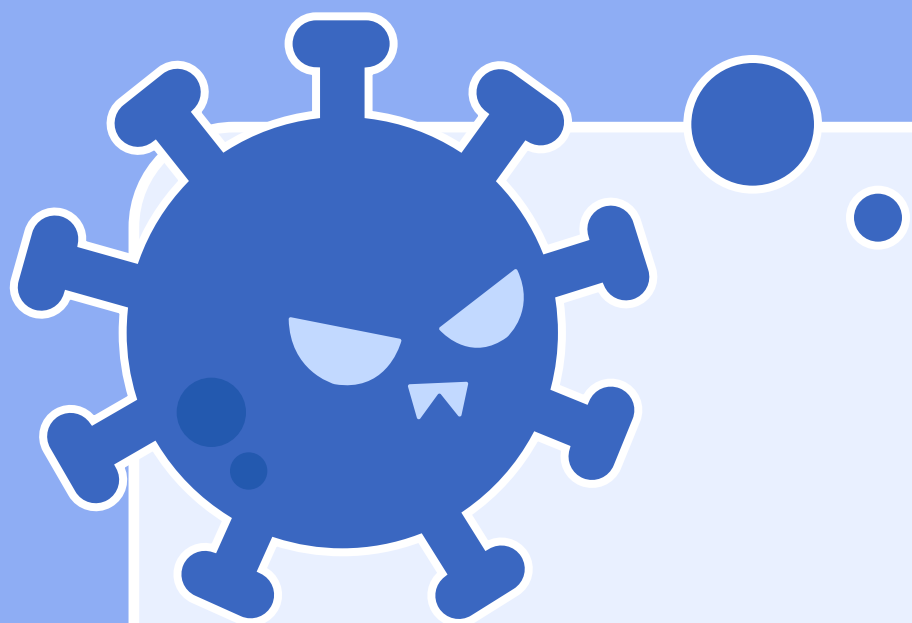


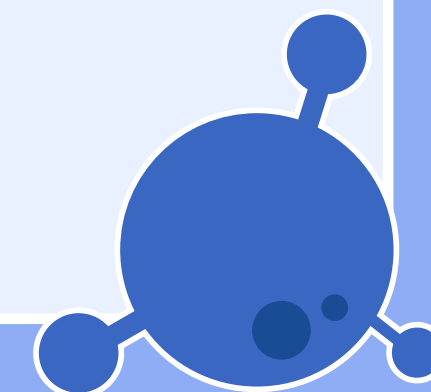
圖 1

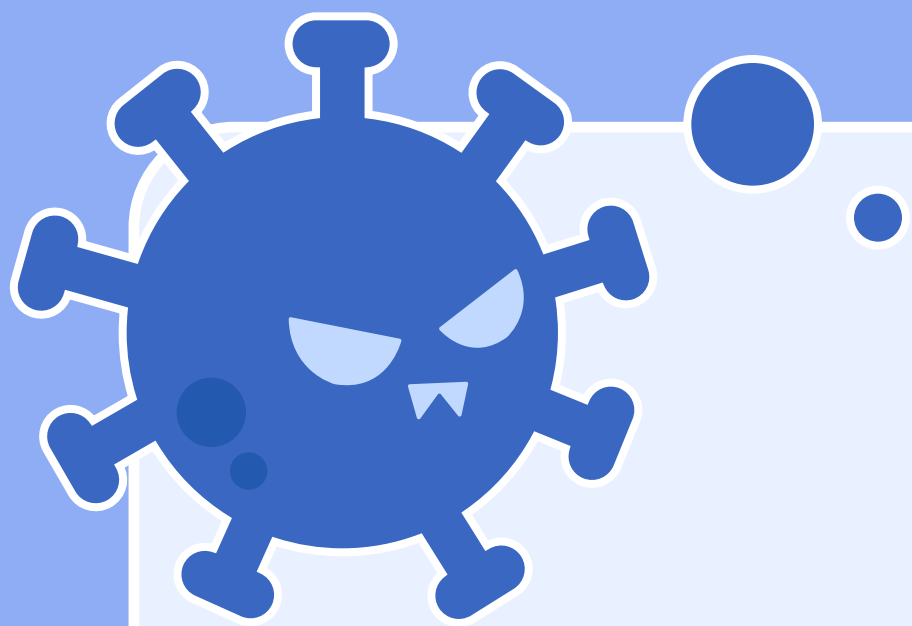
使用RNAscope檢測人膠質母細胞瘤中TERT活化相關的複製突變





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。

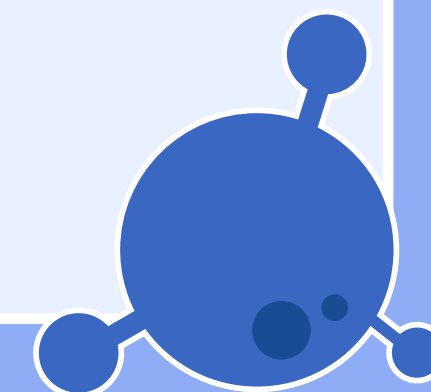


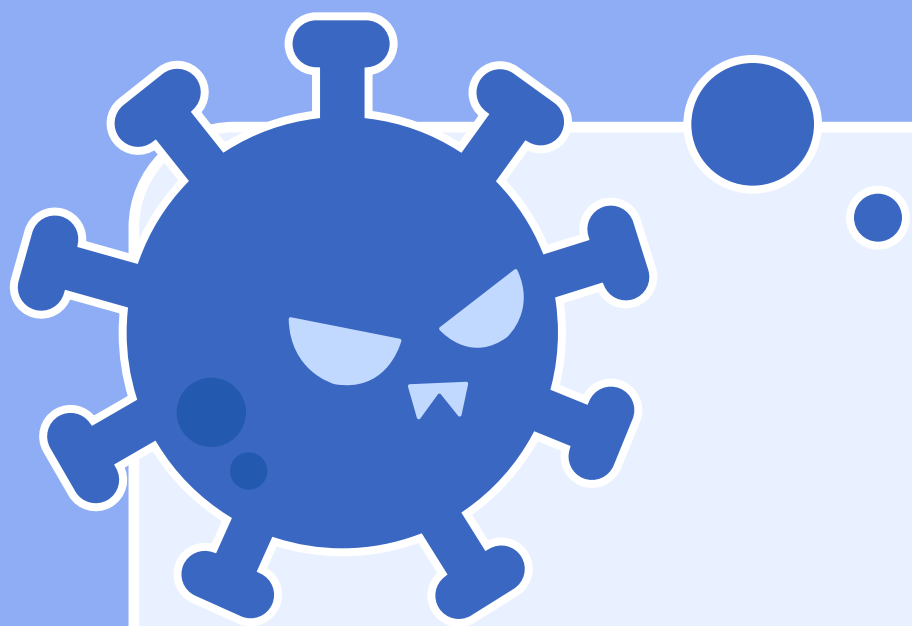


該方法的具體優勢如下：

1 應用廣泛

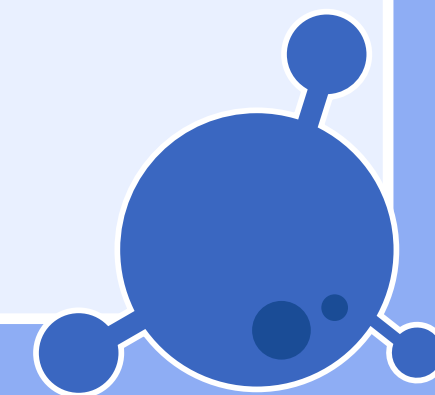
使用RNAscope技術，目標RNA為大於等於300個鹼基的特異序列，即可進行探針設計。因而RNAscope技術可以應用於幾乎所有物種，所有組織以及所有基因的檢測。

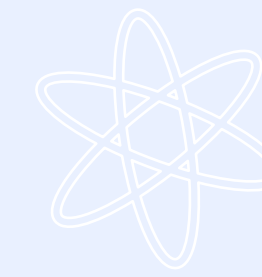
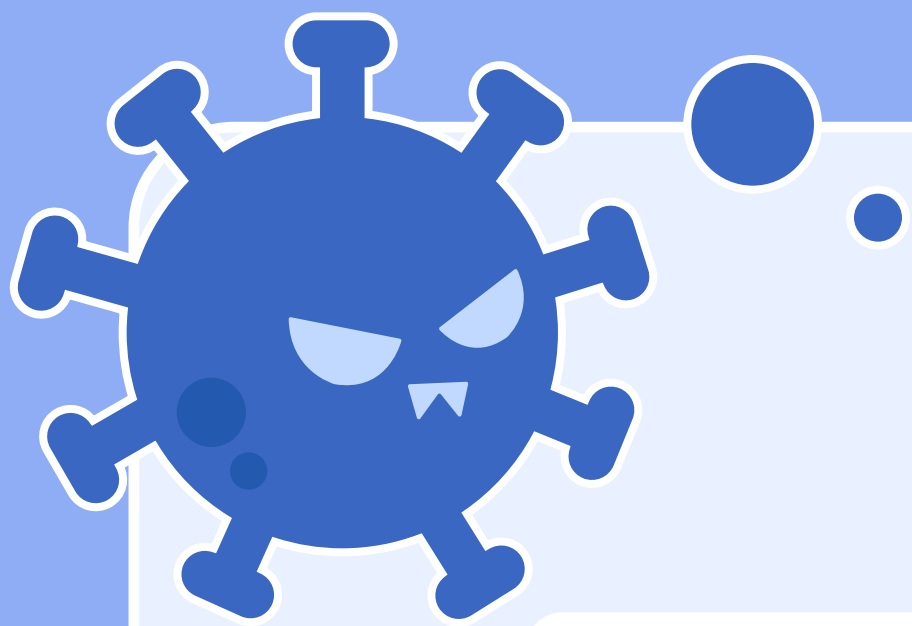




2 特異性強

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。



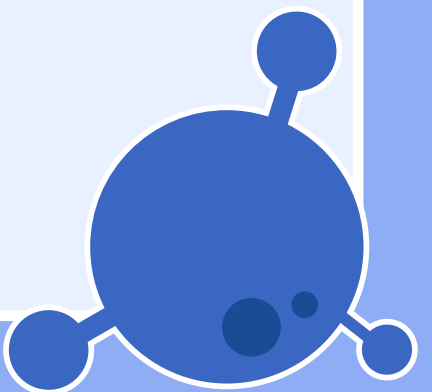


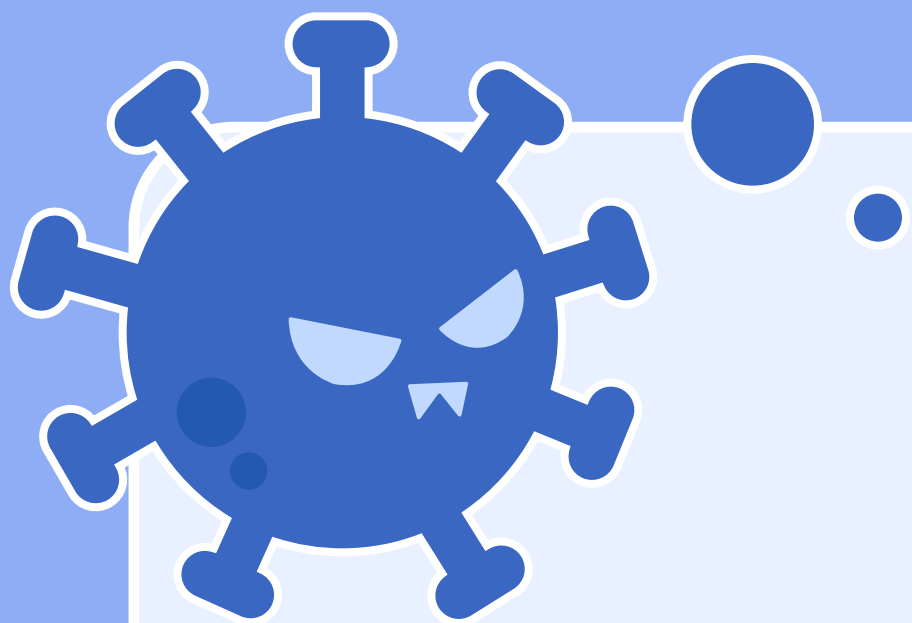
3 靈敏度高

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

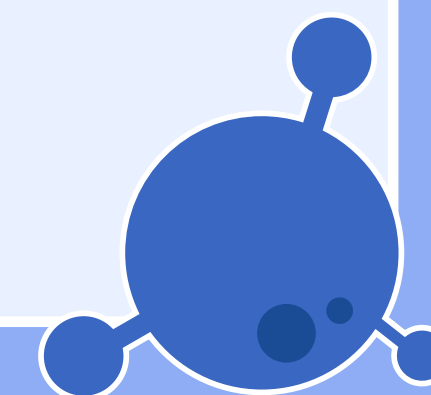
使用RNAscope技術雜交接上三對及以上雙Z探針即可在標準的顯微鏡下呈現可觀察到的點狀訊號。ACD公司建議的分析軟體更可以定量每一個單細胞內RNA的表現量。

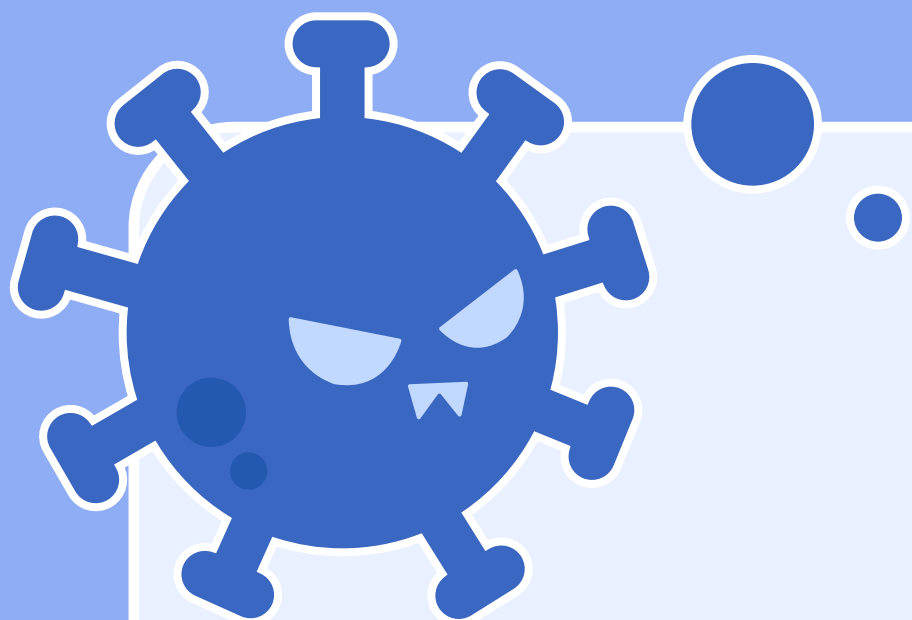




5 相容降解的RNA

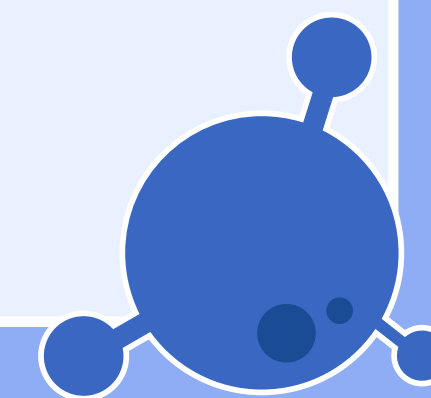
由於RNAscope三對雙Z探針即可檢測到目標RNA，而通常針對目標RNA設計的探針為20對雙Z探針，因而即使目標RNA發生部分降解，仍可以穩定有效地檢測到目標RNA。

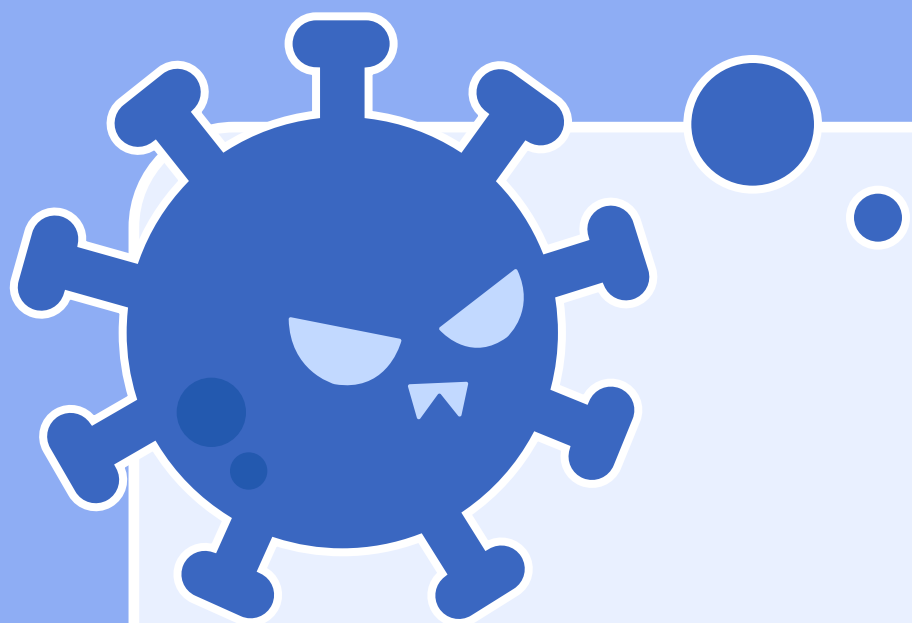




6 檢測結果穩定一致性

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 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。

