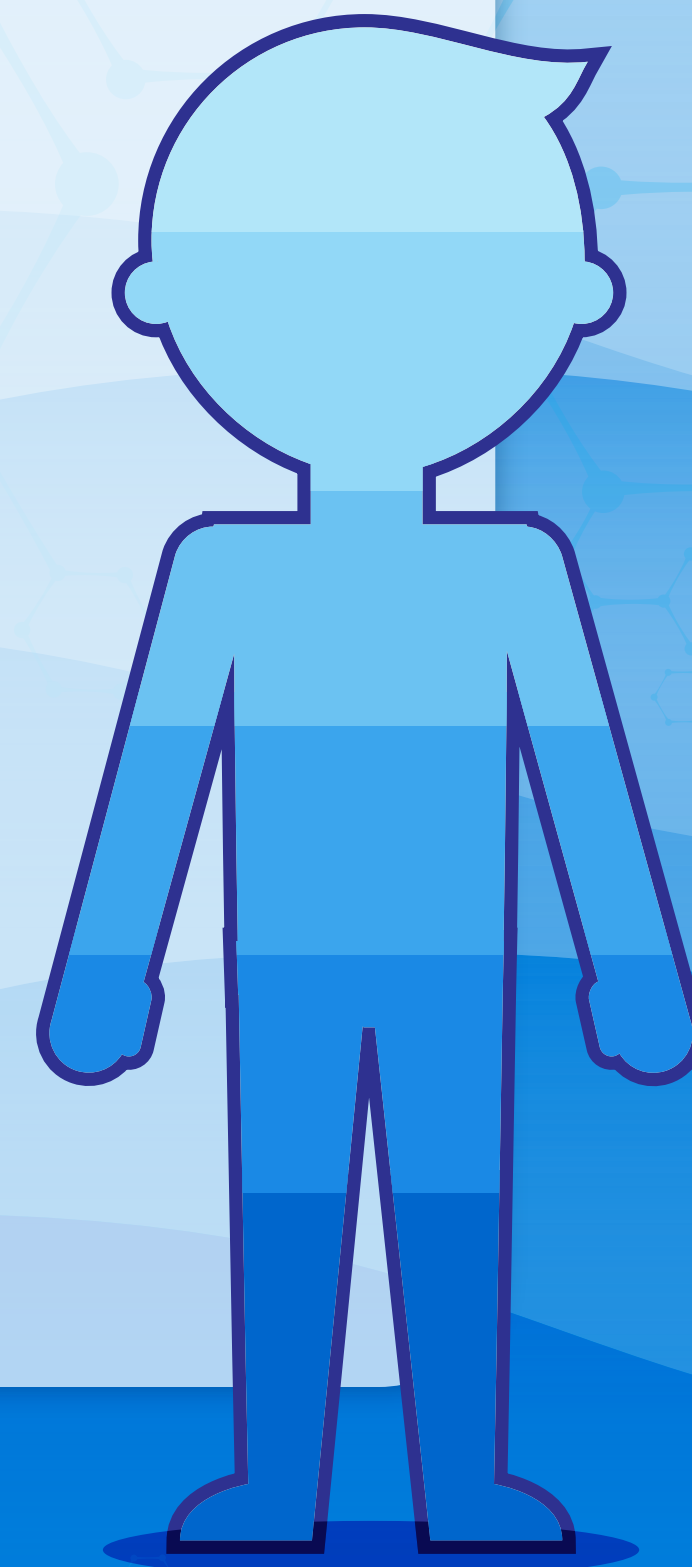
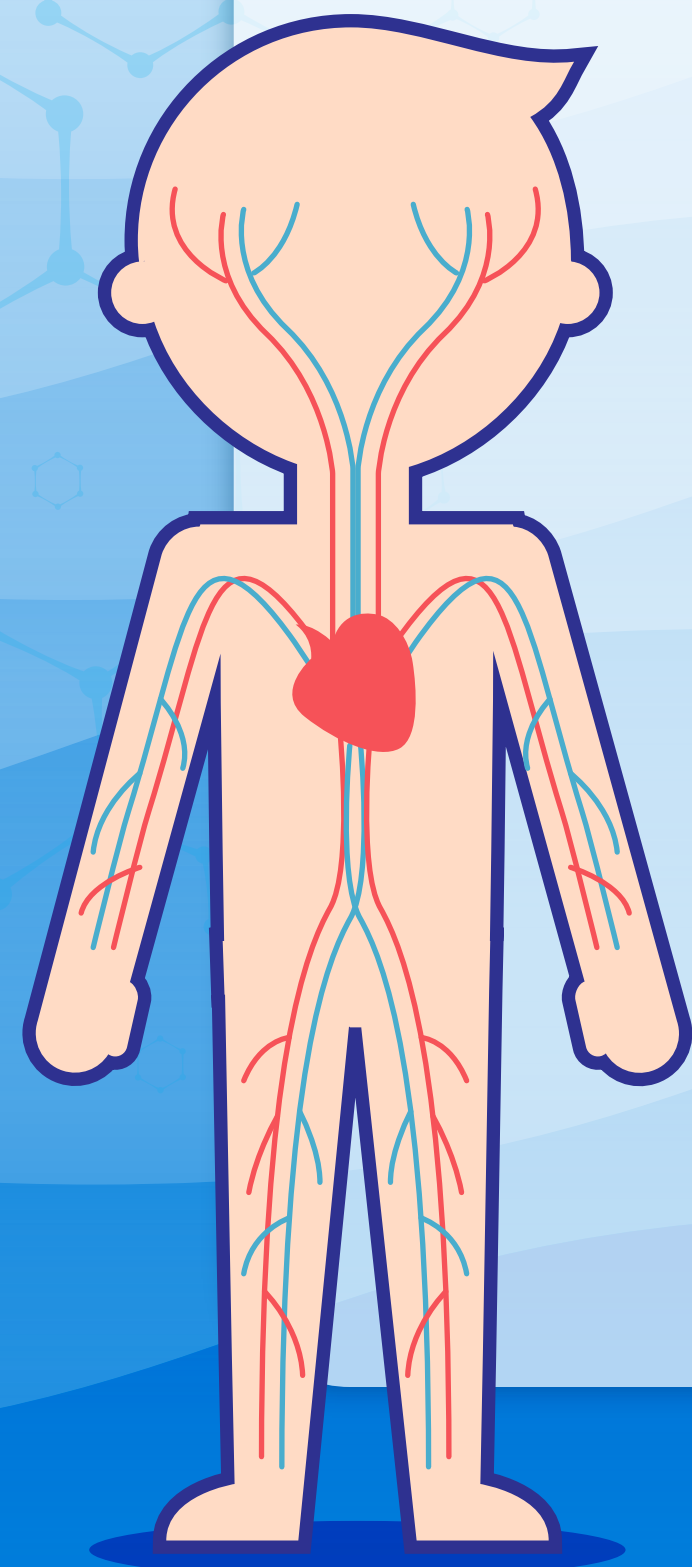




RNAscope

幫助瞭解神經內分泌 對水平衡的感知和調節



弘晉有限公司
Hong Jing Co., Ltd.

最佳的身體含水量對生存至關重要。當受到威脅時，滲透穩定性會得到積極的保護。調節水平衡的大腦機制是由視上核 (SON) 和下視丘室旁核 (PVN) 的大細胞神經元 (MCNs) 介導的。

MCNs 在其胞體中合成肽類激素，精氨酸血管加壓素 (AVP) 和催產素 (OXT)，並將其軸突投射到垂體後葉的微血管。AVP 和 OXT 沿著這些軸突運輸，並儲存在垂體後葉神經血管界面的末端。在受到刺激時，AVP 和 OXT 被分泌到體循環中，作為激素作用於遠端目標。

在水分平衡方面，例如在高滲透壓壓力下，如慢性脫水，AVP 會釋放到血液中，作用於腎集尿管促進水的再吸收。OXT 在滲透調節中的作用與尿鈉排泄 (natriuresis) 相關，在高滲透壓刺激（包括鹽負荷、高滲 NaCl 灌注和慢性脫水）下，OXT 釋放增加鈉排泄，促進鈉平衡。

慢性滲透刺激導致 AVP 和 OXT 腦垂體儲存的消耗，因此需要在 MCNs 中增加 AVP 和 OXT 的合成以確保充足的供應。因此了解介導 AVP 和 OXT 合成的機制是至關重要的。



2022 年 1 月，來自英國的布里斯托大學 Michael P. Greenwood 實驗團隊的研究人員在 Neuroendocrinology 上發表題為

**“Transcriptional and Post-Transcriptional Regulation of
Oxytocin and Vasopressin Gene Expression
by CREB3L1 and CAPRIN2”**

的文章，對滲透防禦反應的重要成員 CREB3L1 and CAPRIN2 在大鼠脫水和復水中的時空動態表達做了詳盡的解析。

Transcriptional and Post-Transcriptional Regulation of Oxytocin and Vasopressin Gene Expression by CREB3L1 and CAPRIN2

Soledad Báñez-López^a Agnieszka Konopacka^a Stephen J. Cross^b

Mingkwan Greenwood^a Marina Skarveli^a David Murphy^a

Michael P. Greenwood^a

^aMolecular Neuroendocrinology Research Group, Bristol Medical School, Translational Health Sciences, University of Bristol, Dorothy Hodgkin Building, Bristol, UK; ^bWolfson Bioimaging Facility, Biomedical Sciences Building, University of Bristol, Bristol, UK

爲了了解 MCNs 促進 AVP 和 OXT 生物合成的分子機制，作者研究了 CREB3L1 和 CAPRIN2 mRNA 以及 CREB3L1 和 CAPRIN2 蛋白在脫水和復水恢復過程中的時空動態。

使用了 RNAscope 原位雜交 (Fig1-4) 和免疫組織學方法來研究大鼠處於水合、脫水、復水後 4、8、24 小時，視上核 (SON) 和下視丘室旁核 (PVN) 中 mRNA 和蛋白層面的表達情況。



RNAscope 結果發現 Caprin2 和 Creb3l1 在 AVP 和 OXT MCNs 中表達，且脫水反應能夠提高兩者的 mRNA 在 MCNs 中的表達量。通過螢光素酶測定證明 CREB3L1 可能是一種調節 Oxt 基因表達的轉錄因子。

通過對 Oxt mRNA poly (A) 尾部的 RNA 免疫沉澱分析和 Northern 印迹分析，發現 CAPRIN2 與 Oxt mRNA 結合並調節其 poly (A) 尾部長度。

此外，針對脫水反應，Caprin2 mRNA 受到核保留 (Nuclear retention) 作用，可能是為了調節在細胞質中的 Caprin2 mRNA 可用性。

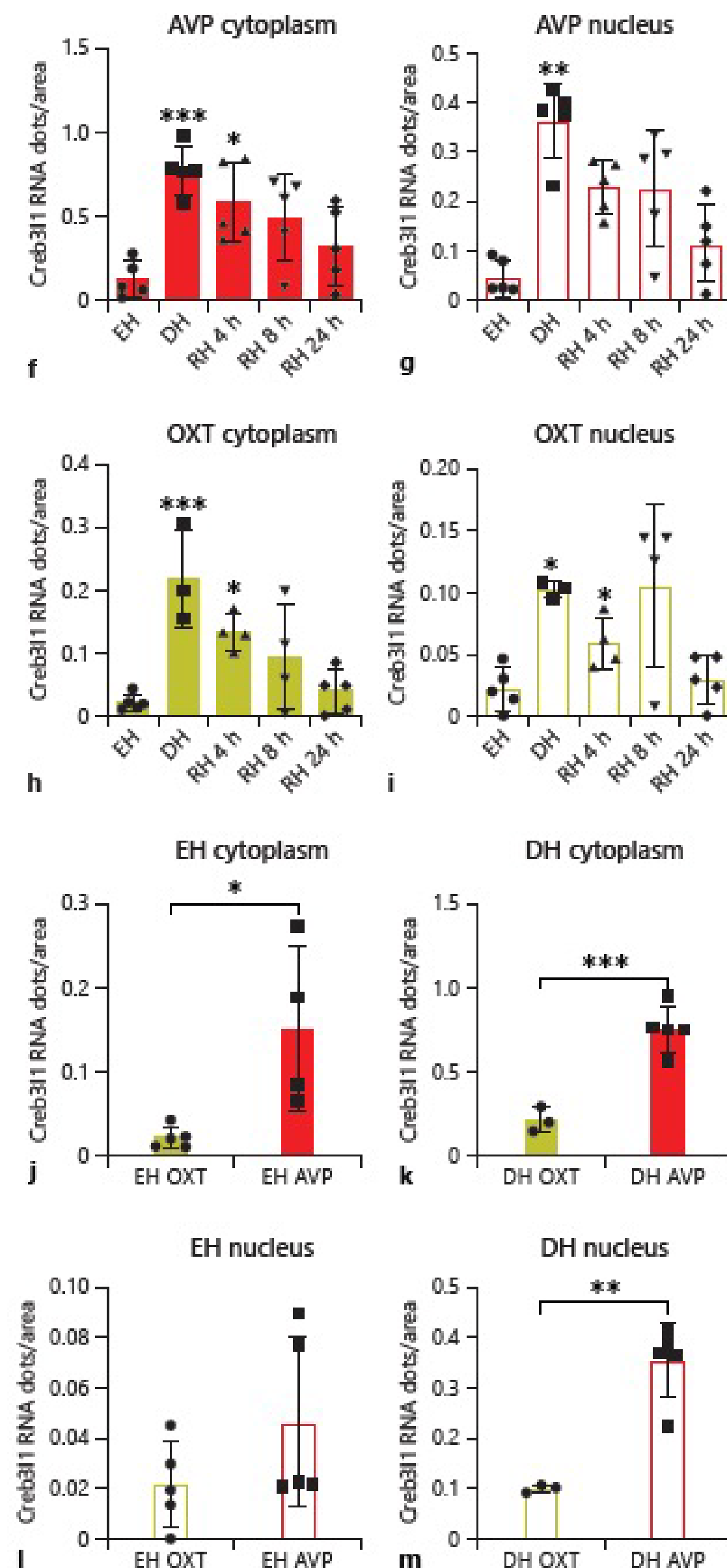
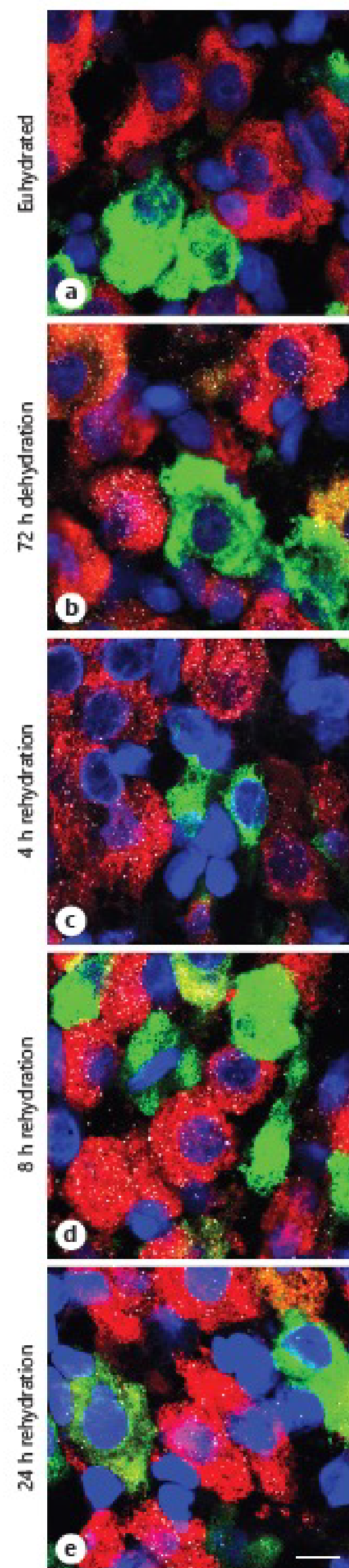


Fig1.
RNAscope 原位雜交標記 **SON** 中的 **Creb3l1 mRNA** 分別在水合、脫水、復水後 4h/8h/24h 的表達。
Avp: 紅, Oxt: 綠, Creb3l1: 白。

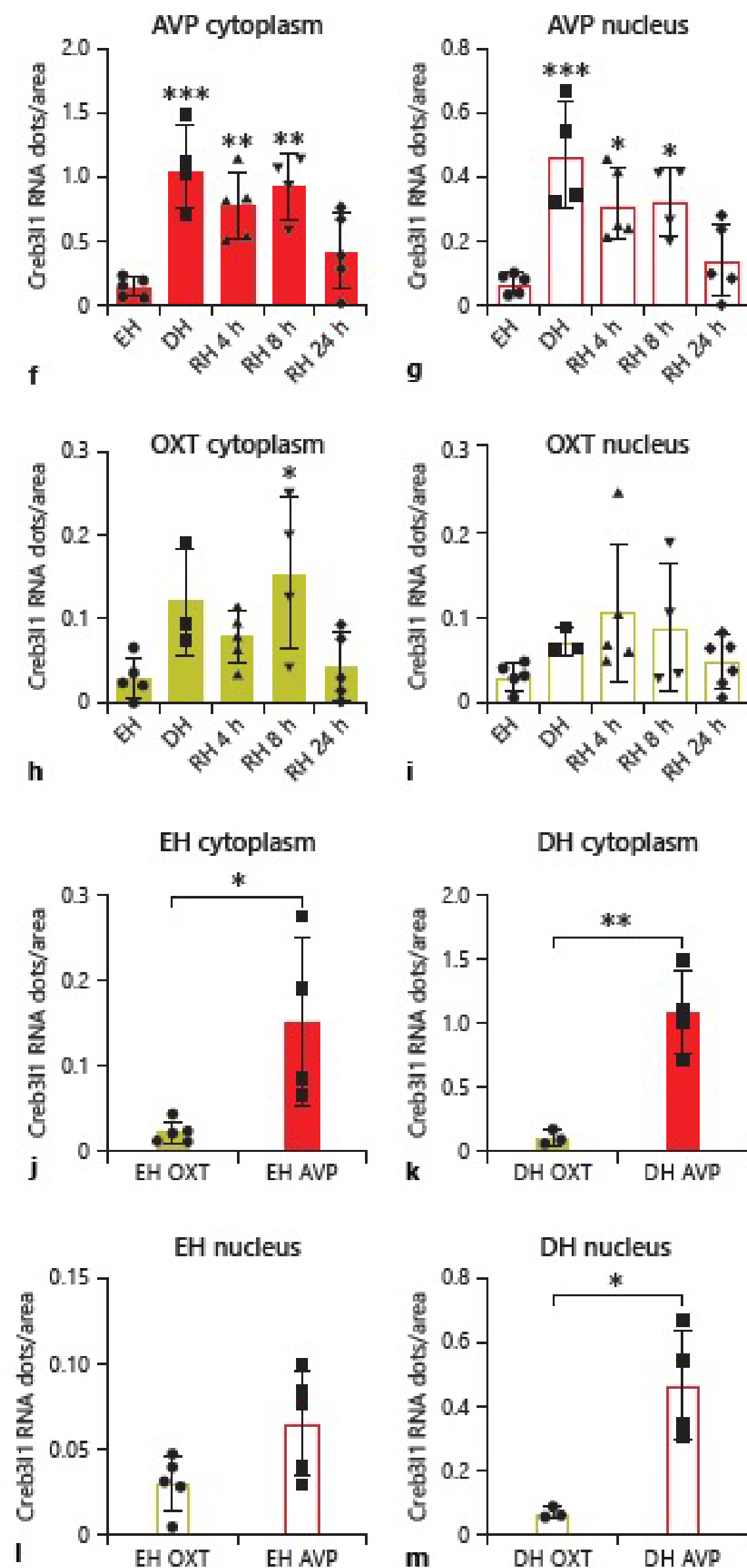
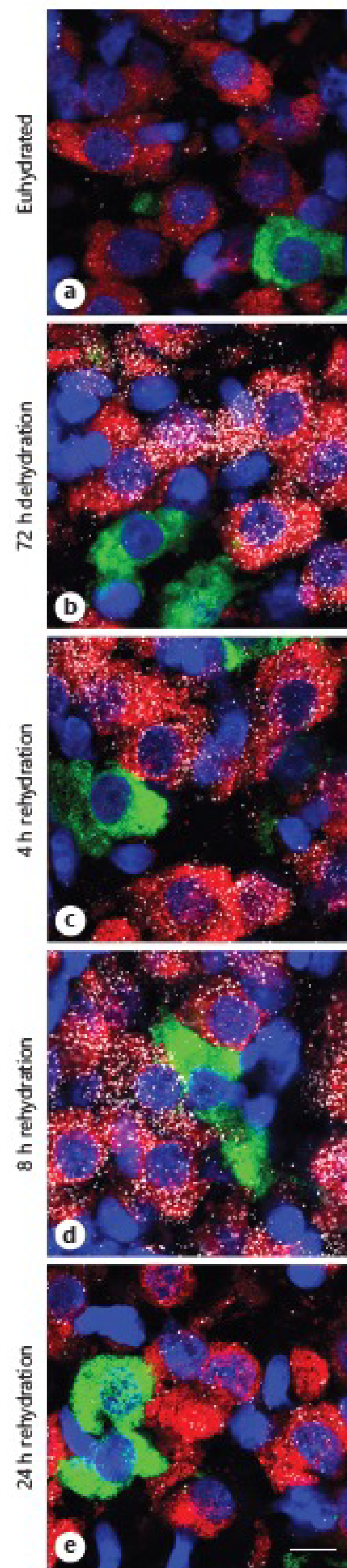


Fig2.
 RNAscope 原位雜交標記 **PVN** 中的
Creb3l1 mRNA 分別在水合、脫水、
 復水後 4h/8h/24h 的表達。
 Avp: 紅, Oxt: 綠, Creb3l1: 白。

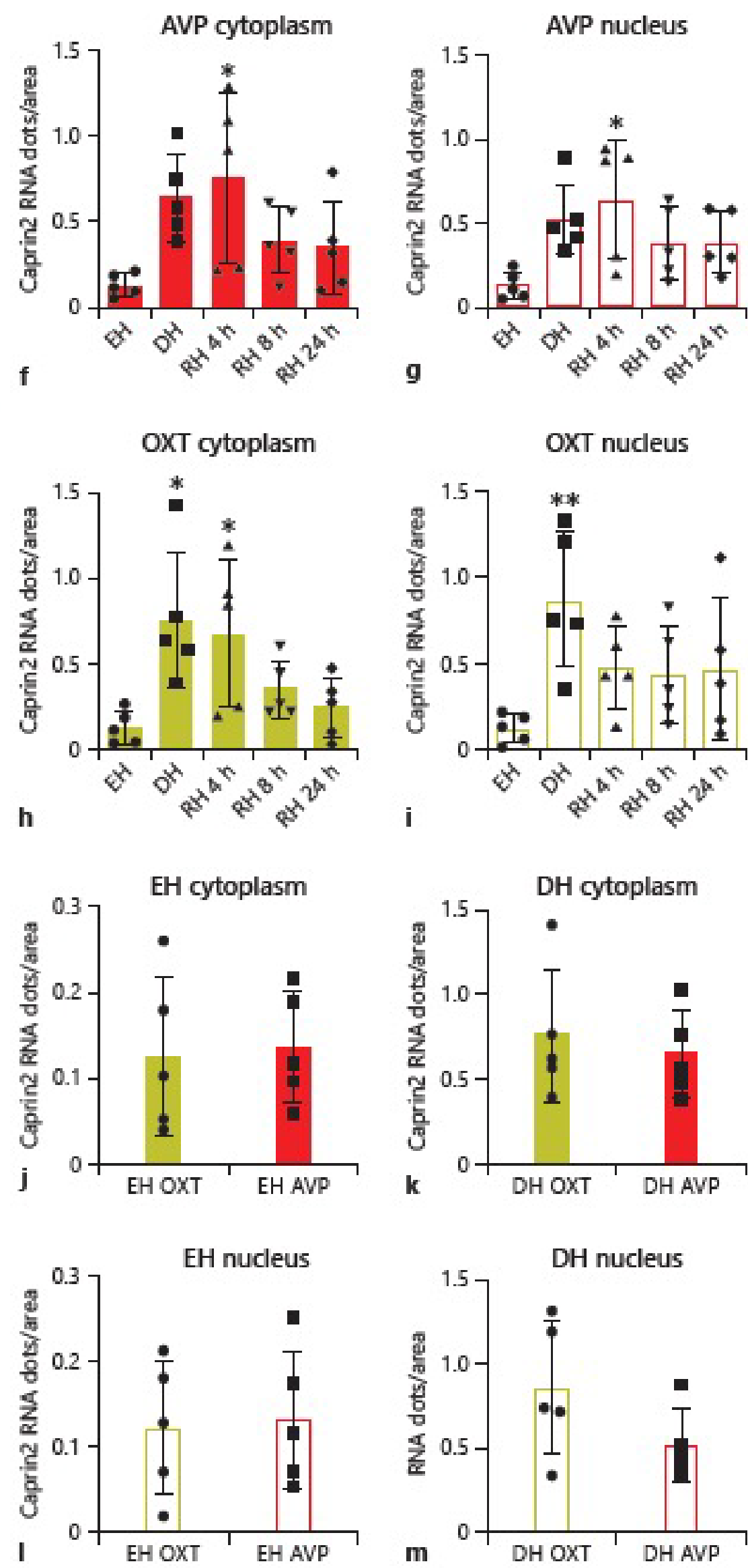
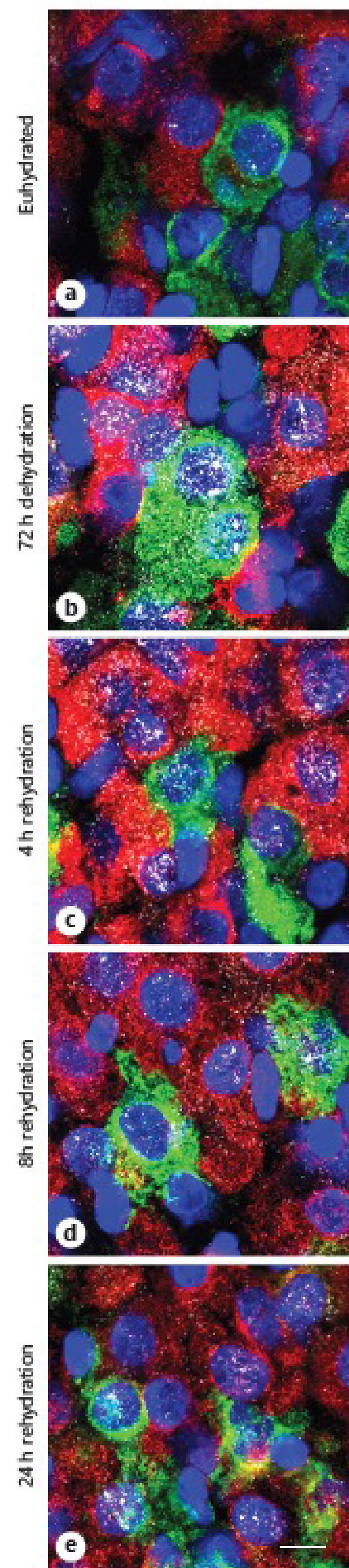


Fig3.
 RNAscope 原位雜交標記 **SON** 中的
Caprin2 mRNA 分別在水合、脫水、
 復水後 4h/8h/24h 的表達。
 Avp: 紅, Oxt: 綠, Caprin2: 白。

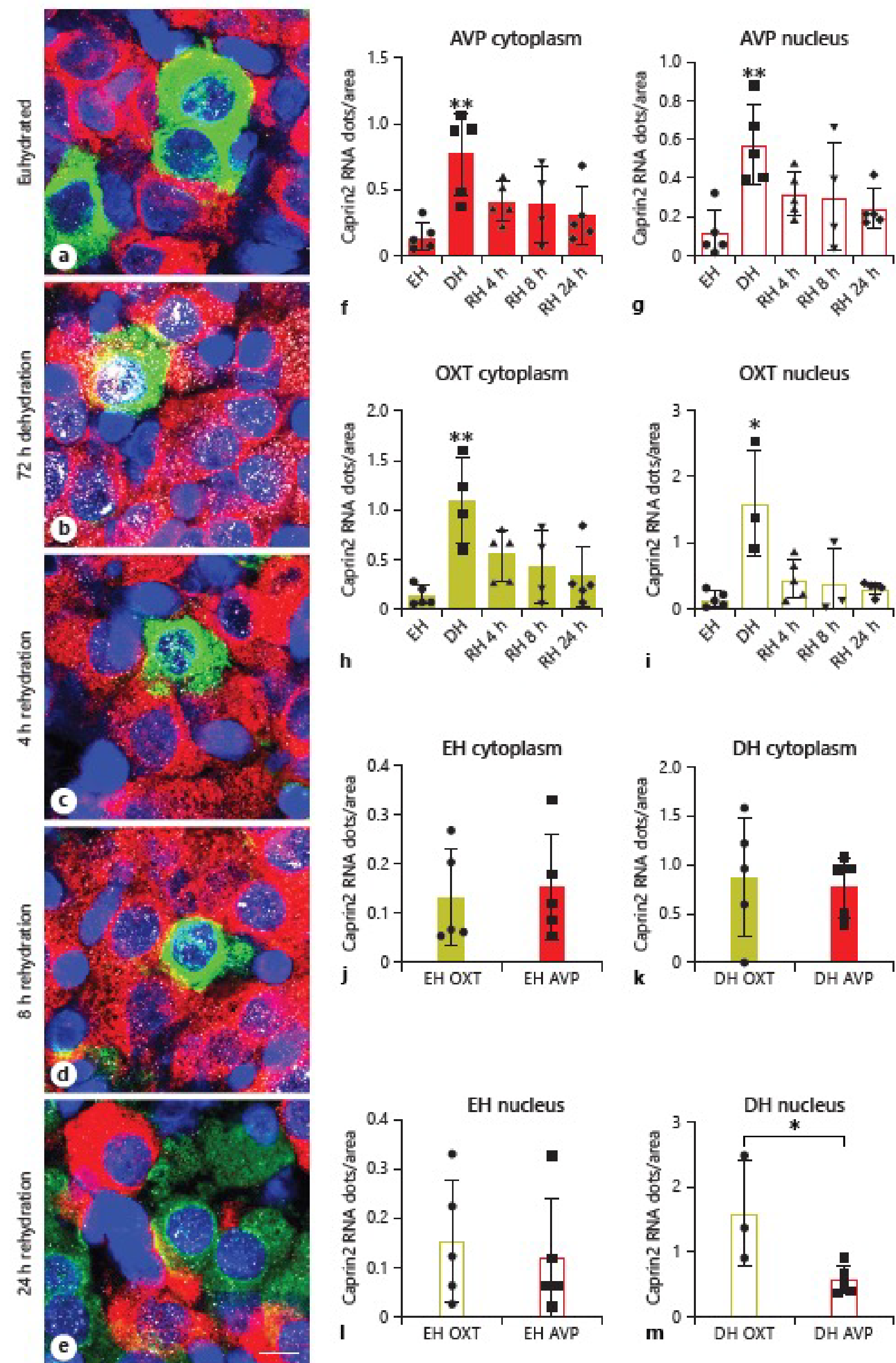


Fig4.
 RNAscope 原位雜交標記 **PVN** 中的
Caprin2 mRNA 分別在水合、脫水、
 復水後 4h/8h/24h 的表達。
 Avp: 紅, Oxt: 綠, Caprin2: 白。

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。

