



Basescope 用於ASO治療前後 外顯子跳躍的評估



弘晉有限公司
Hong Jing Co., Ltd.

裘馨氏肌肉失養症 (Duchenne Muscular Dystrophy, DMD)是一種由DMD基因突變引起的x連鎖隱性神經肌肉疾病, DMD基因編碼肌肉和大腦中表達的肌萎縮蛋白(dystrophin) Dp427。Dp427位於海馬迴、大腦皮層、小腦和杏仁核等與認知功能有關的大腦結構錐體神經元的中樞抑制性突觸的突觸後位點, 在 γ -氨基丁酸-a (gamma-amino butyric acid-A, GABAA)受體的聚集中起作用。幾種具有共同末端的短肌萎縮蛋白也由腦依賴啟動子產生, 如Dp140和Dp71。儘管突變的位置可能影響中樞改變的性質和嚴重程度, 但在DMD患者的所有亞組中都觀察到認知、神經精神和行為障礙, 包括學習和記憶缺陷、自閉症譜系障礙 (autism spectrum disorder)、注意力缺陷和焦慮, 這表明全長肌萎縮蛋白Dp427在這些表型中起作用。

Partial Restoration of Brain Dystrophin and Behavioral Deficits by Exon Skipping in the Muscular Dystrophy X-Linked (*mdx*) Mouse

Faouzi Zarrouki, PhD,^{1,2} Karima Relizani, PhD,^{1,3} Flavien Bizot,¹ Thomas Tensorer,³
Luis Garcia, PhD,^{1,4} Cyrille Vaillend, PhD,^{2†} and Aurélie Goyenvallé, PhD ^{1,4†}

缺乏肌萎縮蛋白的mdx小鼠是DMD最常用的動物模型之一，該模型顯示出大腦、認知和行為的改變。mdx小鼠在Dmd基因的23號外顯子上攜帶無義突變，阻止了肌肉和大腦中Dp427的表達。在過去的幾十年裡，人們探索了大量的治療DMD的策略，使用反義寡核苷酸(ASOs)是目前最有前途的治療策略之一，旨在恢復閱讀框(open reading frame)。已有研究表明，tricyclo DNA (tcDNA) ASOs顯示出在許多組織中很强的攝取效果，包括心肌和中樞神經系統(CNS)。



在2022年發表在Annals of neurology的研究“Partial Restoration of Brain Dystrophin and Behavioral Deficits by Exon Skipping in the Muscular Dystrophy X-Linked (mdx) Mouse”中, 作者發現與棕櫚酸結合能進一步增強tcDNA-ASO的效力。爲了評估mdx小鼠腦內Dp427修復的效果, 作者通過腦室內(ICV)直接注射tcDNA-ASO, 靶向小鼠Dmd外顯子23的供體剪接位點, 結果發現在mdx小鼠中單次雙側ICV注射tcDNA-ASO可使不同腦組織中的Dp427部分恢復, 並顯示出劑量依存性。其中400 μ g劑量組外顯子跳躍效率、ASO生物分布、蛋白恢復及對恐懼反應的影響最佳, 海馬迴、杏仁核等腦組織均有類突觸(synaptic-like)表達。

爲了進一步研究發生跳躍和未發生跳躍的Dmd mRNA在大腦中的定位, 作者使用了ACD公司的BaseScope技術, 分別針對外顯子E22-E23連接處(野生型)和E22-E24連接處(突變型)設計探針, 成功地在tcDNA-ASO處理小鼠的大腦中檢測到發生E23跳躍的mRNA(如圖1中的紅點), 而在WT和PBS處理的mdx小鼠中僅檢測到未發生跳躍的野生型mRNA(如圖2中的綠點)。通過量化紅色和綠色訊號所覆蓋的相對區域, 能夠根據大腦中的定位來評估和分析外顯子跳躍的水平。結果顯示, 在背側CA1內, 在下部支持組織(Subiculum)附近檢測到最高表達(>80%的外顯子23跳躍水平), 沿著CA1層向腹側海馬區逐漸減少(圖3)。

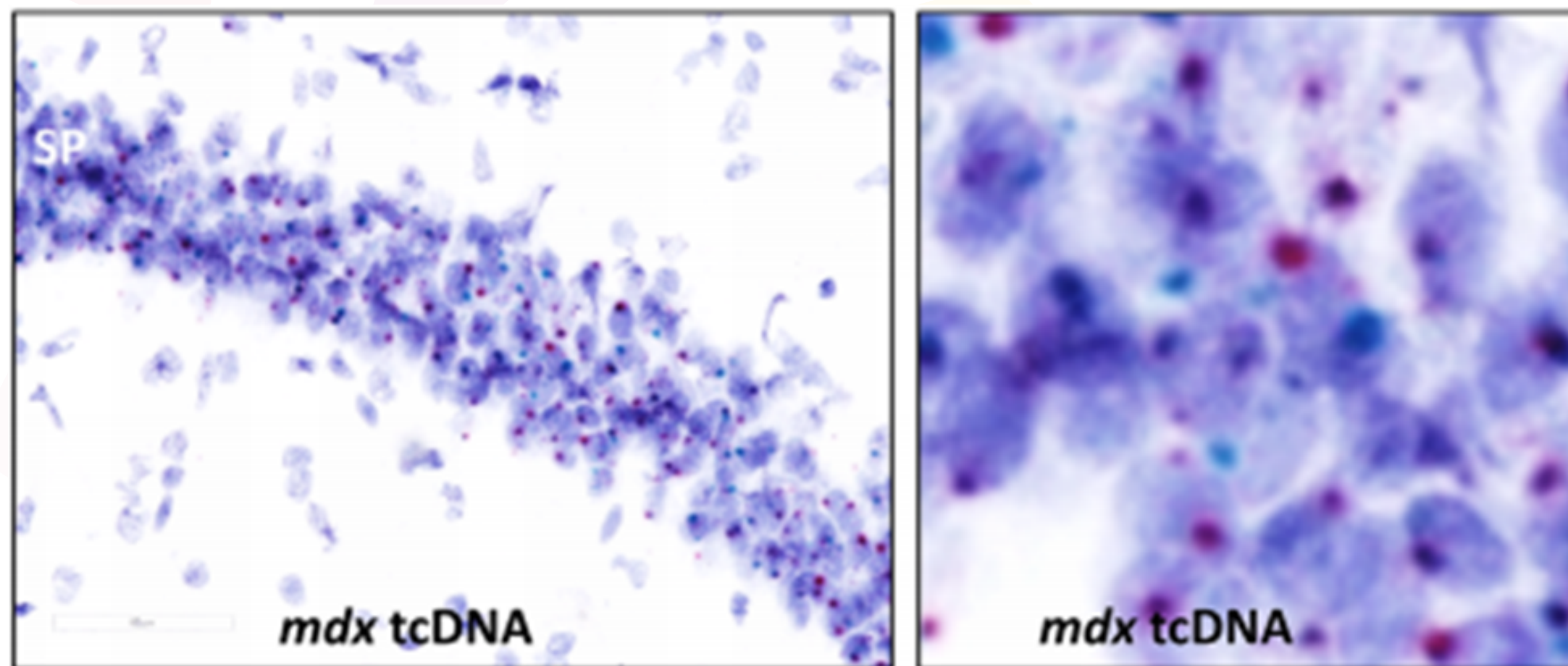


圖1.在tcDNA-ASO處理小鼠的大腦中檢測到發生E23跳躍的

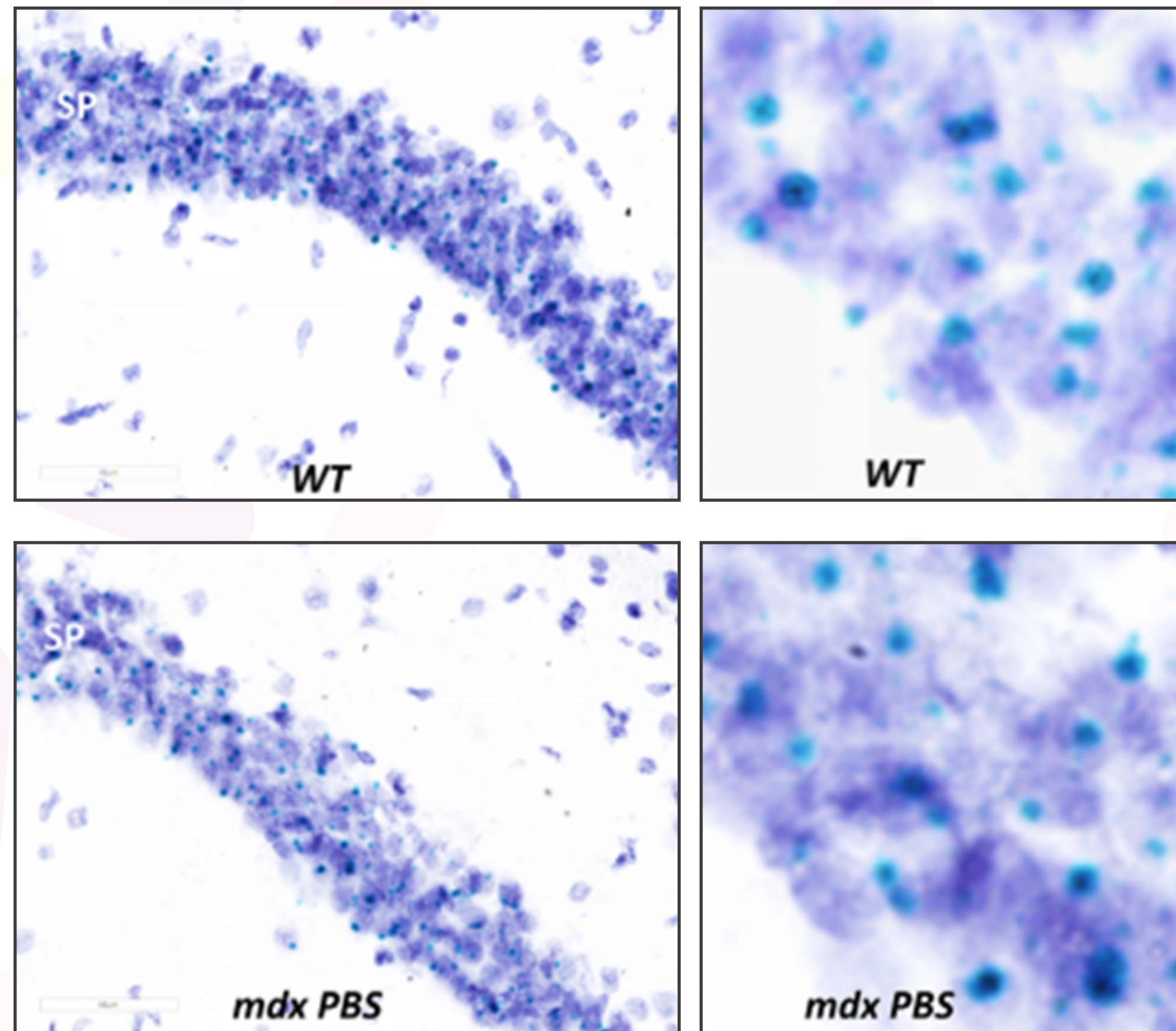


圖2.在WT和PBS處理的mdx小鼠中僅檢測到未發生跳躍的野生型mRNA。



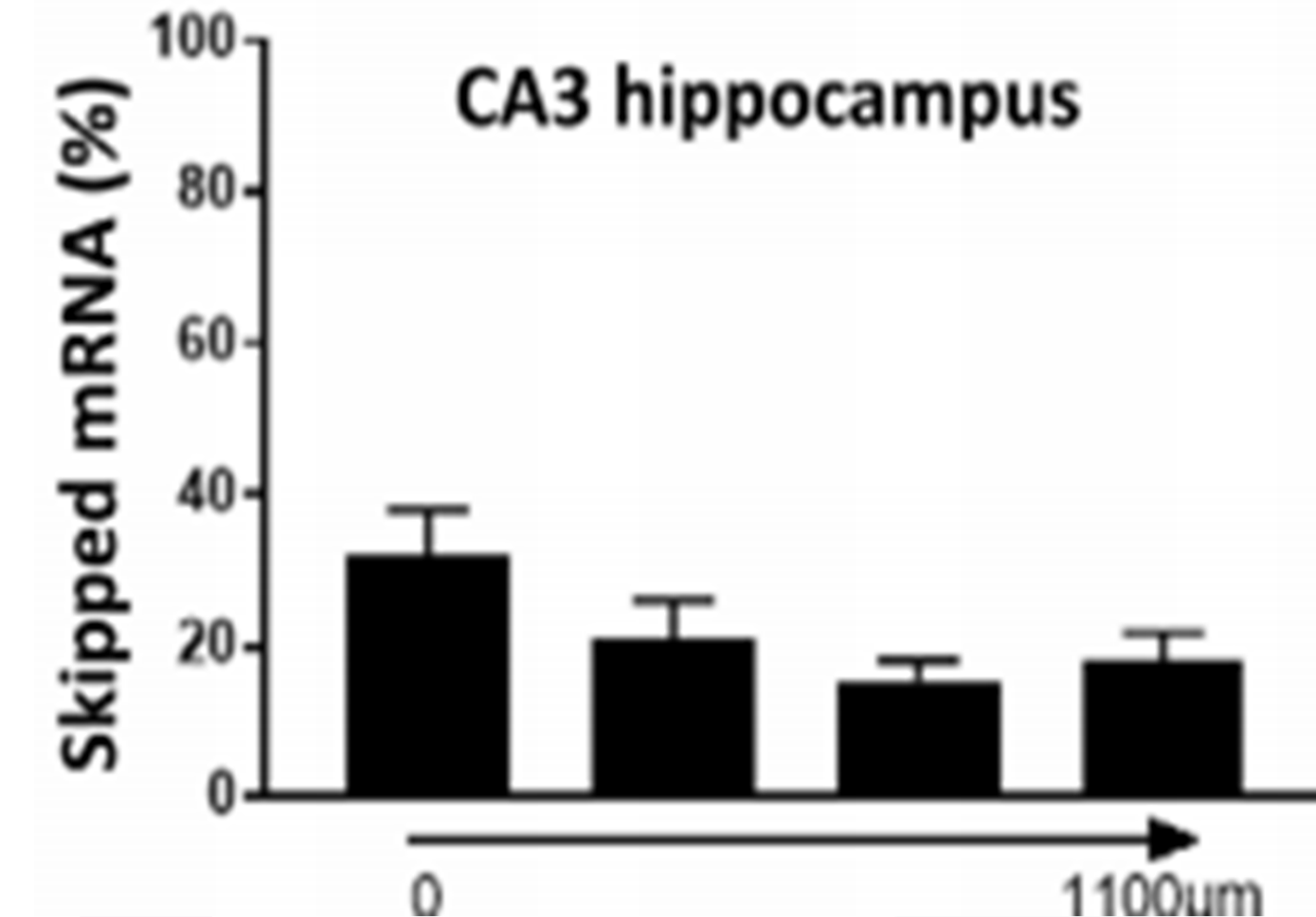
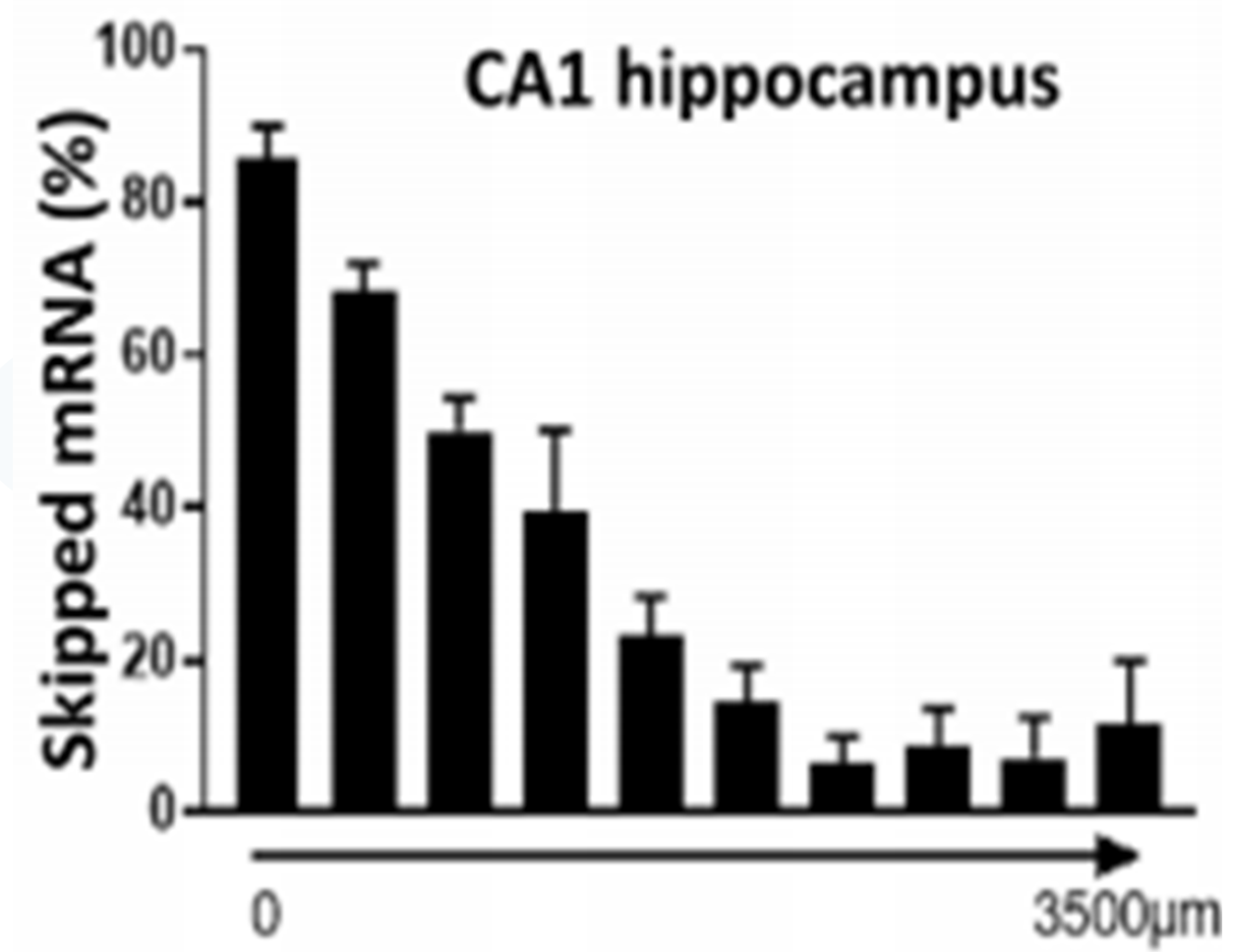
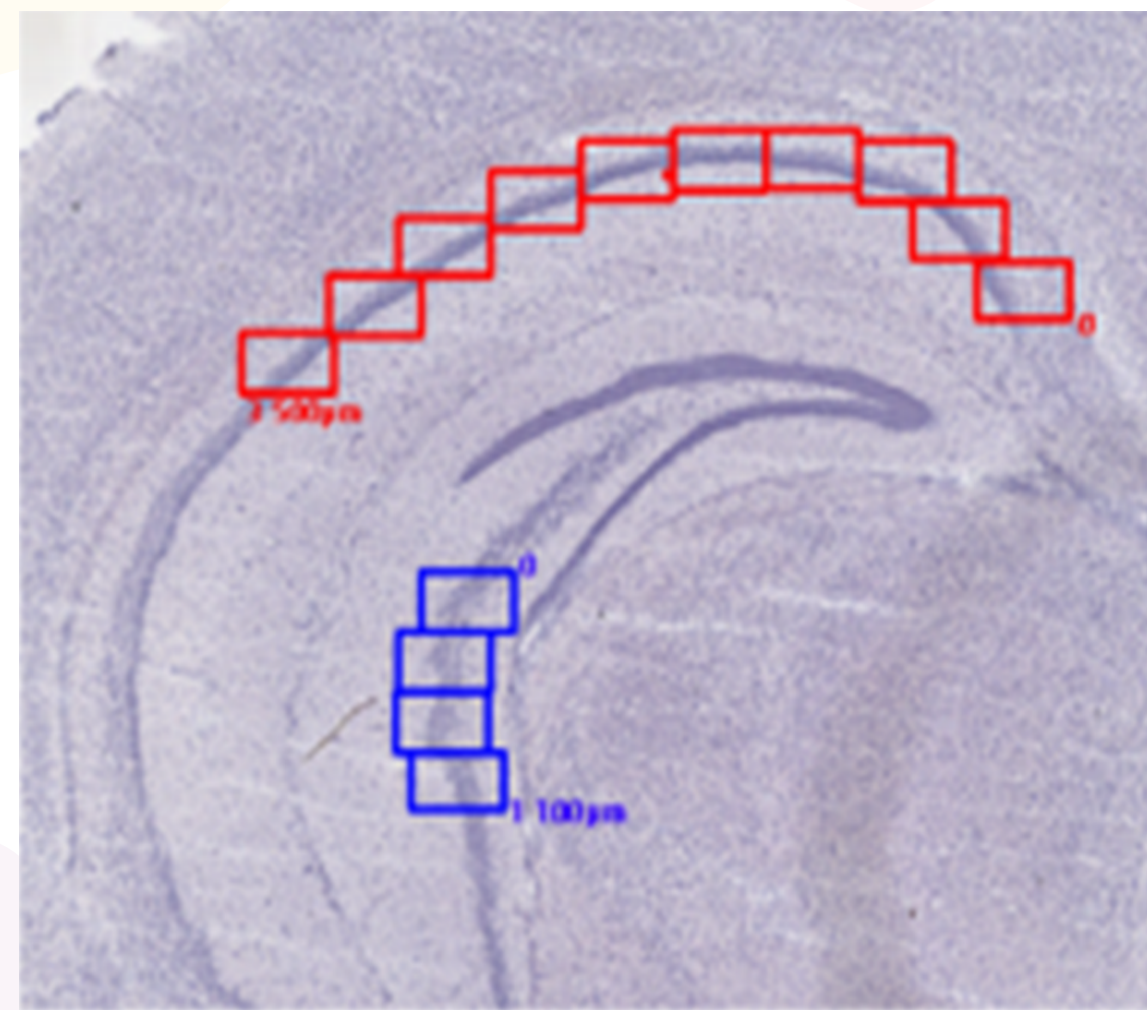


圖3.對大腦中Dmd基因外顯子跳躍的量化分析。

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視覺化。

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(冰凍切片, 石蠟切片, 懸浮細胞, 貼壁細胞等)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。

7.多通道多靶點同時檢測：

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靶點；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靶點RNA。



在RNAscope技術的基礎上，ACD公司旗下的Basescope技術可以檢測RNA水平的外顯子跳躍，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個目標RNA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。





弘晉有限公司
Hong Jing Co., Ltd.

X

A&D
a biotechne brand

Basescope 用於ASO治療前後 外顯子跳躍的評估

