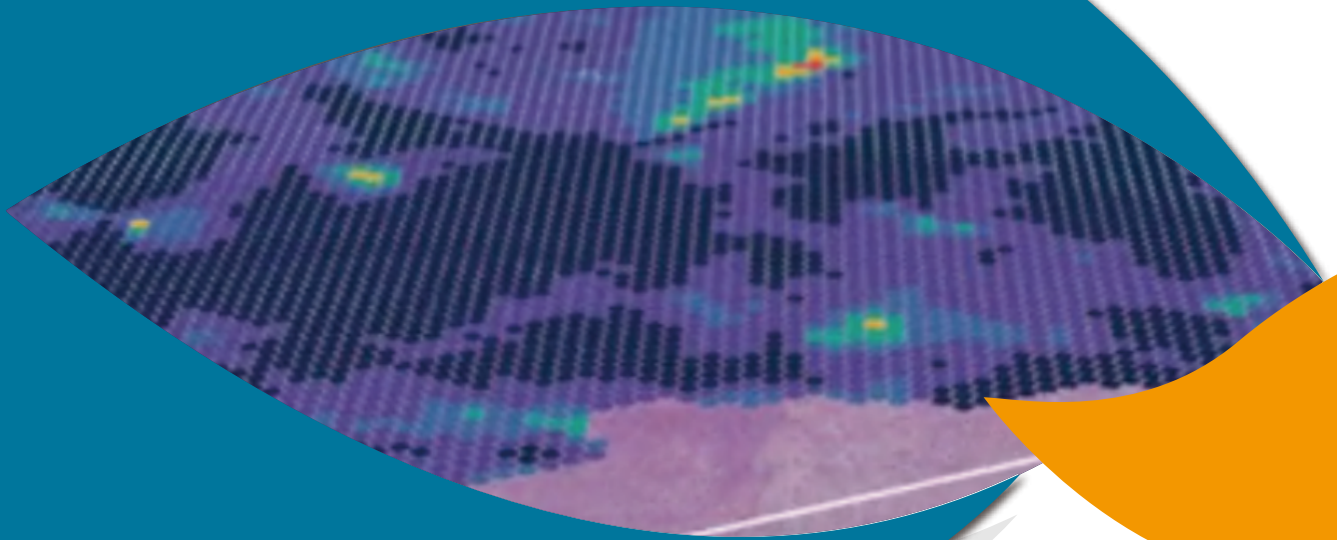




上海伯豪生物技术有限公司
SHANGHAI BIOTECHNOLOGY CORPORATION

空间基因表达解决方案

Spatial Gene Expression Solutions



伯豪生物官网

伯豪生物公众号

服务科技创新 护航人类健康



目录

CONTENTS

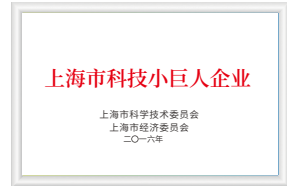
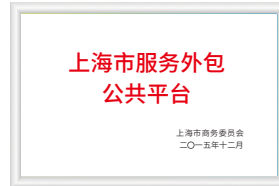
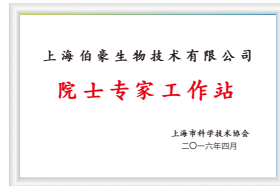
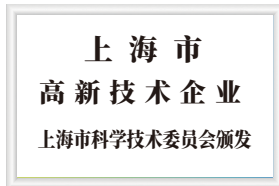
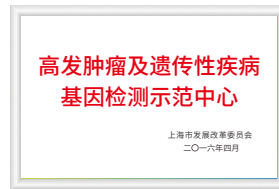
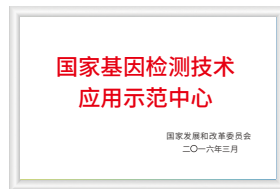
一、空间转录组技术	01
二、新鲜样本空间基因表达解决方案	01
三、石蜡样本空间基因表达解决方案	06
四、空间转录组数据分析	09
五、空间转录组应用方向	13
六、参考文献	22

| 关于伯豪生物

上海伯豪生物技术有限公司 (www.shbio.com) 是生物芯片上海国家工程研究中心的有机组成部分, 专注于提供领先的生物医药和疾病诊断创新技术、产品和优质的服务。

经过十多年的发展, 公司建立了前沿的分子生物技术平台、系统的营销管理体系、客户服务体系、产品研发生产体系以及质量管理体系, 从基因芯片到新一代测序、单细胞测序、空间转录组测序, 紧跟技术的发展, 公司不断引进前沿技术和方法, 并持续进行技术创新和配套产品的研发。为国内外客户提供常规多组学和单细胞多组学的技术服务和技术支撑。

公司先后获得国家基因检测技术应用示范中心、国家工信部专精特新“小巨人”、上海市科技小巨人、院士专家工作站、上海市专业技术服务平台、上海市服务外包公共平台、上海名牌、浦东新区企业研发机构等资质认证。



| 伯豪生物优势

技术服务**18**年

承接项目数超过**50000**个

用户单位**5000**家以上

协助客户发表SCI论文**2900**多篇

平均影响因子大于**7**分

公司拥有**40**多项发明专利和软件著作权

成功研发**20**多种试剂产品



| 伯豪生物产品服务总览

科技服务

单细胞组学

- 单细胞(核) RNA 测序
- Flex 单细胞 RNA 测序
- 单细胞全转录组测序
- SMART单细胞RNA测序
- 单细胞免疫组库测序
- 单细胞ATAC测序
- 单细胞膜蛋白测序
- 单细胞CRISPR筛选

空间组学

- Stereo-seq时空转录组
- Visium HD空间转录组
- Visium空间转录组
- Xenium空间亚细胞原位分析
- 5D原位多组学

基因组学

- 全基因组重测序
- 全外显子组测序
- 甲基化芯片 (935K)
- 甲基化捕获测序 (EM-seq)
- 甲基化捕获测序 (MC-seq)
- CRISPR下一代分子诊断技术整体解决方案

转录组学

- 原核转录组测序
- 真核转录组测序
- Small RNA 测序
- 全转录组测序

蛋白质组学

- Olink蛋白质组学
- 基于全基因组的人细胞表面蛋白互作筛选服务

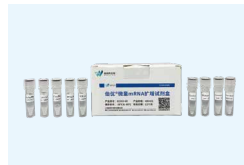
科学试剂



核酸保存系列试剂



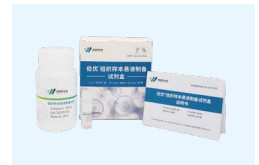
核酸提取系列试剂



核酸扩增系列试剂



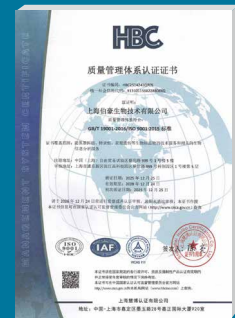
细胞核分离系列试剂



细胞悬液制备系列试剂

| 质量体系

伯豪生物建立了规范化的质量控制体系, 通过了ISO9001:2015质量技术体系的认证, 并参照GLP-L的标准, 通过156个SOP文件对项目、样品、实验过程、生物信息分析过程、数据信息管理、保密等进行严格质控。



一、空间转录组技术

基因表达具有时间和空间的特异性,通过对不同时间点的样本取材,使用单细胞转录组测序技术能够解析时间维度上细胞类型和基因表达的变化过程。然而单细胞测序实验的前提是组织必须通过机械分离或酶解消化成单细胞悬液,此过程不可避免的丢失了组织中细胞所处的原始位置信息,也导致了细胞间的通讯网络被打破,这使我们难以获得组织中不同区域的细胞构成和基因表达状态,以及不同功能区之间的基因差异表达等信息。现有的原位表达图谱主要是通过报告基因或原位杂交等技术来实现,但是这些方法实现比较困难,并且通量低,限制了多样本、高时效的应用。而空间转录组技术则可以高效的检测组织中空间原始位置上的基因表达模式。

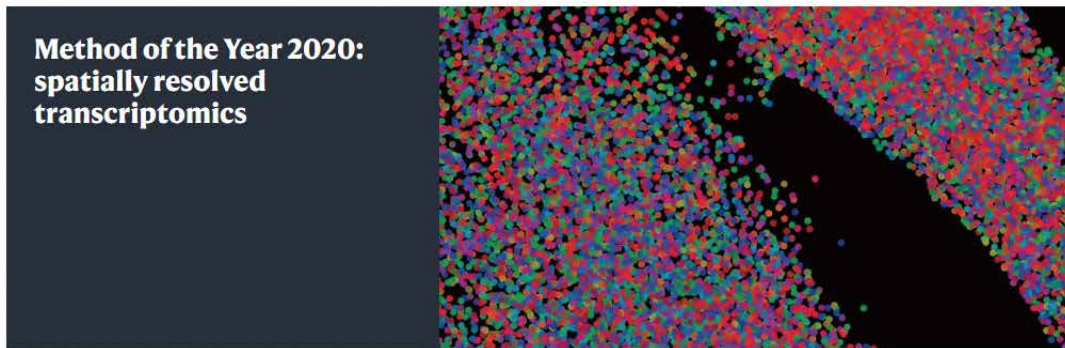


图 空间转录组被评为2020年度技术

空间转录组 (Spatial Transcriptomics) 就是将基因的表达情况与关注的组织切片的免疫化学染色图像进行整合,从而将组织内不同细胞的基因表达信息定位到组织的原始空间位置上去,进而直接观测组织中不同部位功能区基因表达的差异。空间转录组技术利用了常规的原位技术和组学技术两方面的优势。实际上空间转录组已不是新名词,2016年Joakim Lundberg的Spatial Transcriptomics技术在Science上发表^[1],2017年景乃禾老师的GEO-seq技术在Nature Protocols上发表^[2]。目前已发表的关于空间转录组技术主要有Spatial Transcriptomics, Slide-seq, LCM-seq, seqFISH, MERFISH, Liver single cell zonation, Geo-seq和Tomo-seq,涉及物种有人、小鼠、果蝇、秀丽隐杆线虫、斑马鱼、拟南芥、杨树和云杉等。

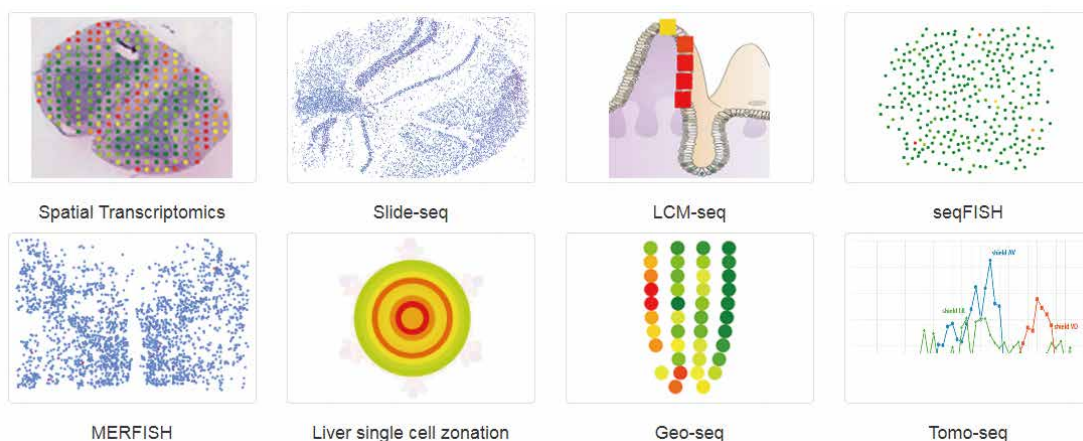


图 常见空间转录组技术

二、新鲜样本空间基因表达解决方案

一、10x Genomics Visium技术原理

将组织切片放置在10x Genomics Visium芯片的捕获区域内,进行HE染色和成像后,对组织切片进行透化处理,使细胞内的mRNA/杂交探针释放,从而被芯片上带有oligo-dT的探针捕获,并且每个探针都带有特异的位置信息 (Spatial barcode),然后以mRNA/探针为模版进行cDNA合成,构建文库后再通过测序,获得基因表达信息的同时,每一条测序reads因带有Spatial barcode,从而能够获得基因表达的位置信息。

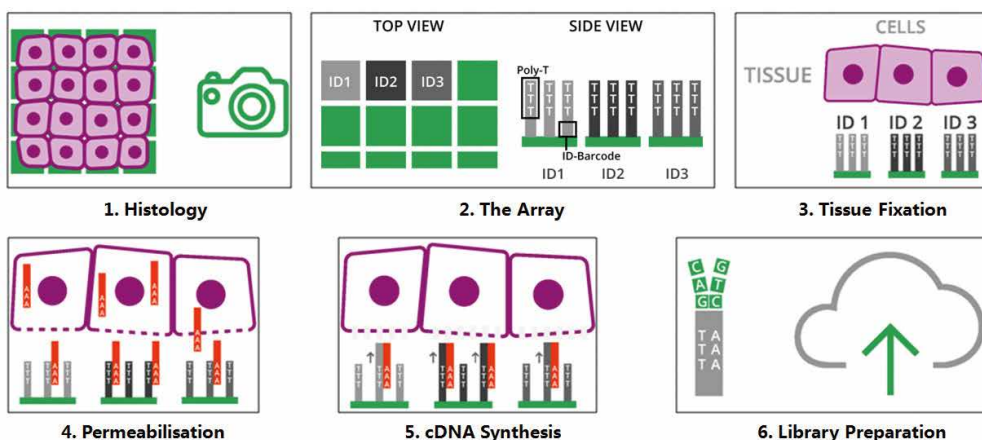


图 10x Genomics Visium空间转录组技术的原理

二、10x Genomics Visium新鲜样本可选实验方案

1、Fresh frozen tissue Visium Spatial Gene Expression solution (Version 1.0)

新鲜样本V1试剂盒包含两种芯片，分别为组织优化芯片 (Tissue Optimization) 和基因表达芯片 (Library Preparation)。组织优化芯片用来摸索组织透化的最佳时间，基因表达芯片用来进行正式样本的空间转录组实验。其中基因表达芯片上有4个捕获区域，每个区域大小为6.5*6.5mm，每个捕获区域中有5000个带有特异地址序列的探针簇，称为barcoded spots，每个spot直径为55um，包含数百万个用于捕获的oligo探针序列，相邻两个spot的中心距离为100um。探针序列的结构为：测序引物结合序列，16nt的位置序列，12nt的UMI序列以及30nt的oligo-dT序列。

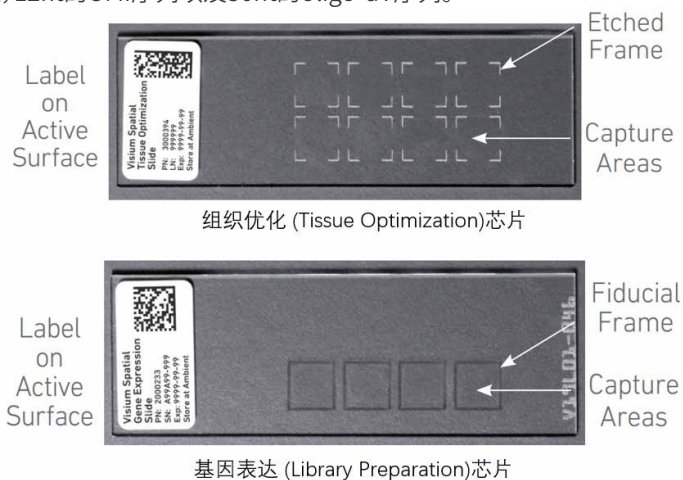


图 10x Genomics Visium两种芯片 (Version 1.0)

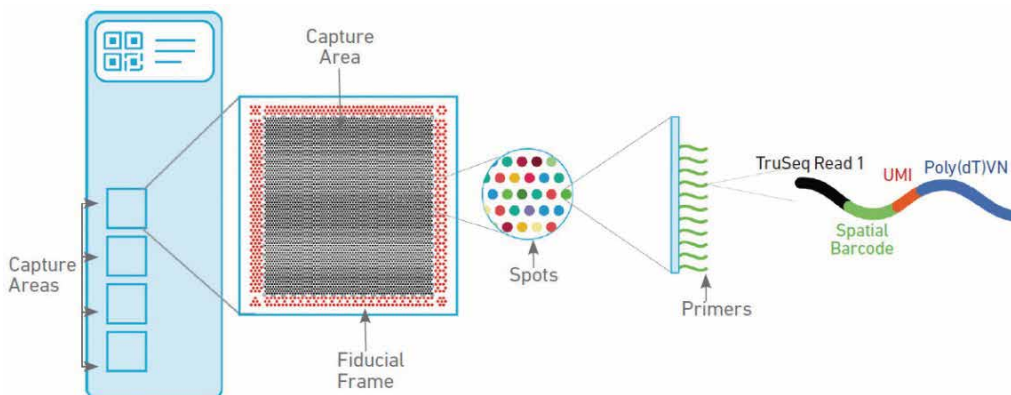


图 10x Genomics Visium基因表达芯片工作原理

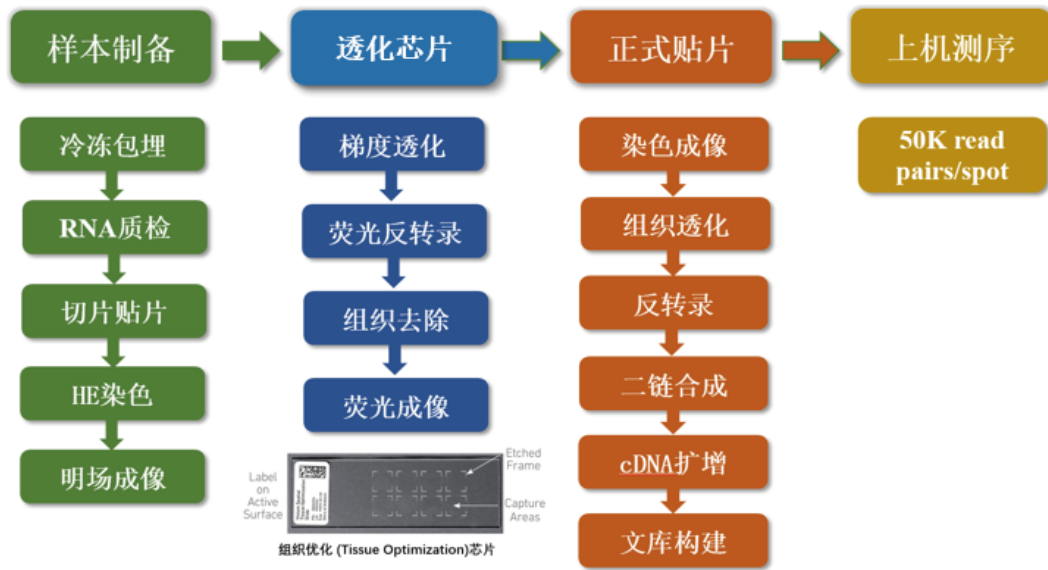


图 10x Genomics Visium (Version 1.0) 实验流程

2. Fresh frozen tissue Visium Spatial Gene Expression solution (Version 2.0)

2022年末, 10x Genomics推出新鲜样本空间转录组解决方案V2 版本, 同时也推出相关实验仪器CytAssist与之配套。V2版本设计了RNA模板连接(RTL)探针集, 具有高敏感性和特异性, 且探针集覆盖了人和小鼠超过18000个基因, 实验利用探针杂交方式, 获取组织中基因信息。将组织中mRNA酶解后进行组织透化从而释放探针与基因表达芯片上的探针杂交, 然后以探针为模版进行cDNA合成, 构建文库后再通过测序, 获得基因表达信息。

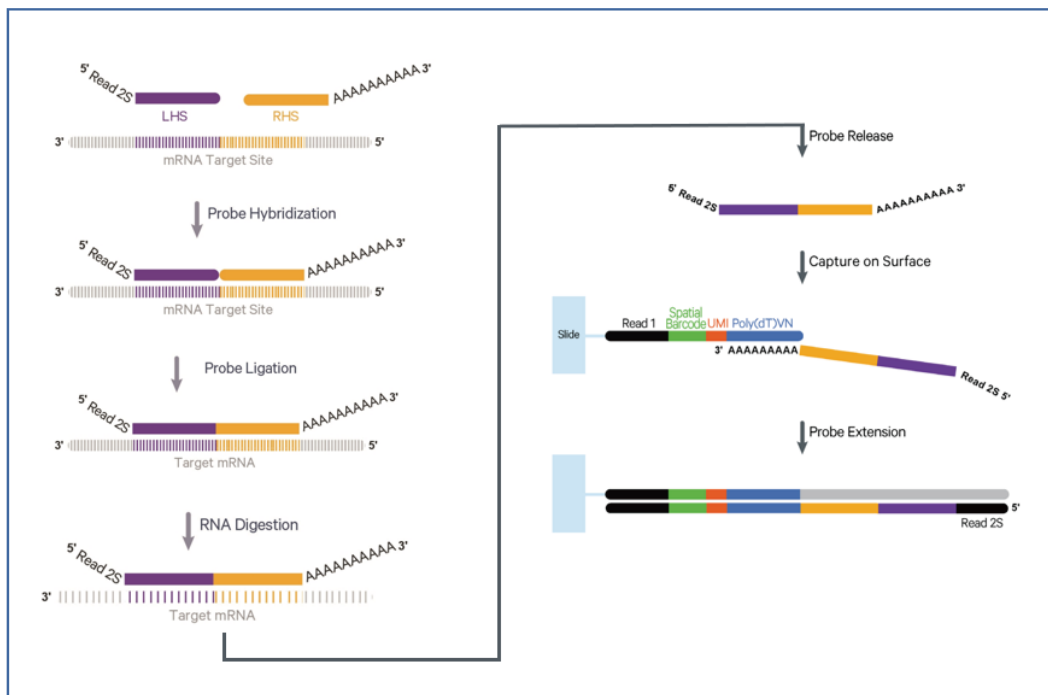


图 10x Genomics Visium探针杂交工作原理

V2版本由于使用的是探针杂交技术, 因此取消了透化预实验, 试剂盒内仅包含基因表达芯片 (Library Preparation)。每张基因表达芯片上有2个捕获区域, 区域目前设计为大小2种规格: 一种为6.5*6.5mm, 另一种为11*11mm。Visium CytAssist对新鲜样本的RIN值要求仅为4以上, 并且除少部分高表达基因外, 90%以上基因设计了3个探针对, 基因检出率及特异性更高。

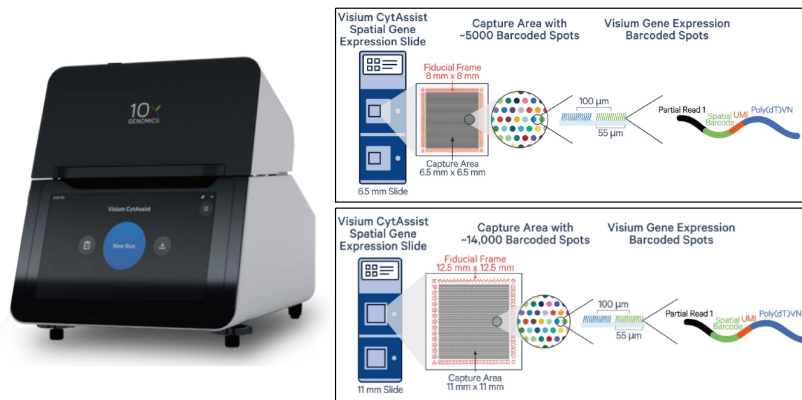


图 10x Genomics CytAssist Visium两种芯片 (Version2.0)

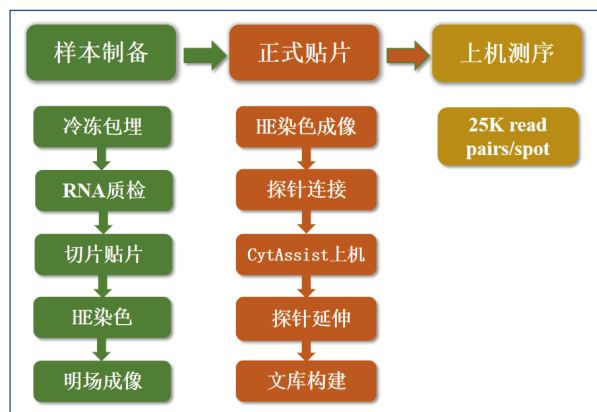


图 10x Genomics Visium (Version 2.0) 实验流程

3、Fresh frozen tissue Visium Spatial Gene Expression solution (Version HD)

24年初, 10x Genomics 推出新鲜样本空间转录组解决方案Visium HD版本, 依旧搭载CytAssist转片仪, 探针版本及实验流程沿用Version 2.0。相较于空间转录组初代产品Visium的不同, 此次发布的Visium HD芯片摒弃了以大直径55um spot的设计, 而是采用2*2um的正方形当做基础分析单位, 捕获框内无间隙, 真正的能够做到无偏好性的单细胞分辨率水平的空间转录组。目前HD芯片发布捕获框大小是6.5*6.5mm的规格, 可检测物种为人和小鼠。

4、Fresh frozen tissue Visium Spatial Gene Expression solution (Version HD 3')

25年, 10x Genomics 推出新鲜样本空间转录组解决方案Visium HD 3' 版本, 依旧搭载CytAssist转片仪, 目前HD 3' 芯片发布捕获框大小是6.5*6.5mm的规格, 告别仅限人/鼠的局限, HD 3' 芯片兼容所有物种, 昆虫、模式生物通通拿下!

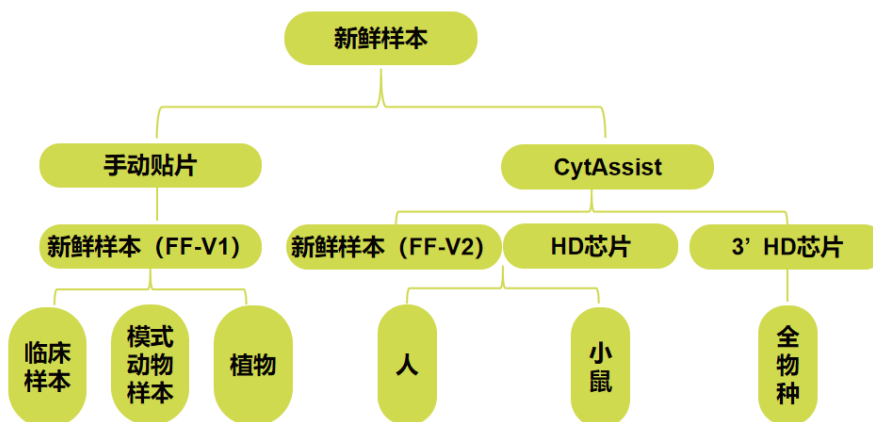


图 10x Genomics Visium新鲜样本可上机的样本类型



三、华大时空转录组FF V1.3

华大时空转录组FF产品方案是同时以纳米级分辨率和厘米级全景视场实现“组织到数据”的整体解决方案,适用于新鲜冷冻(Fresh Frozen, FF)样本。比较前期V1.2版本,升级后的时空转录组FF V1.3的整体性能更优异,在保持原分辨率500 nm基础上,捕获基因数显著提升,工作流程更快速简便,可以轻松完成CellBin分析,实现真正意义上的空间单细胞分析。目前,时空转录组FF V1.3兼容1*1 cm和0.5*0.5 cm的芯片,两种尺寸都兼容同片ssDNA染色/H&E染色以及单细胞分割。在样本方面,华大突破了新鲜冰冻样本RIN ≥ 7 的限制,兼容RIN ≥ 4 的样本,这对于低质量的珍贵组织非常友好。

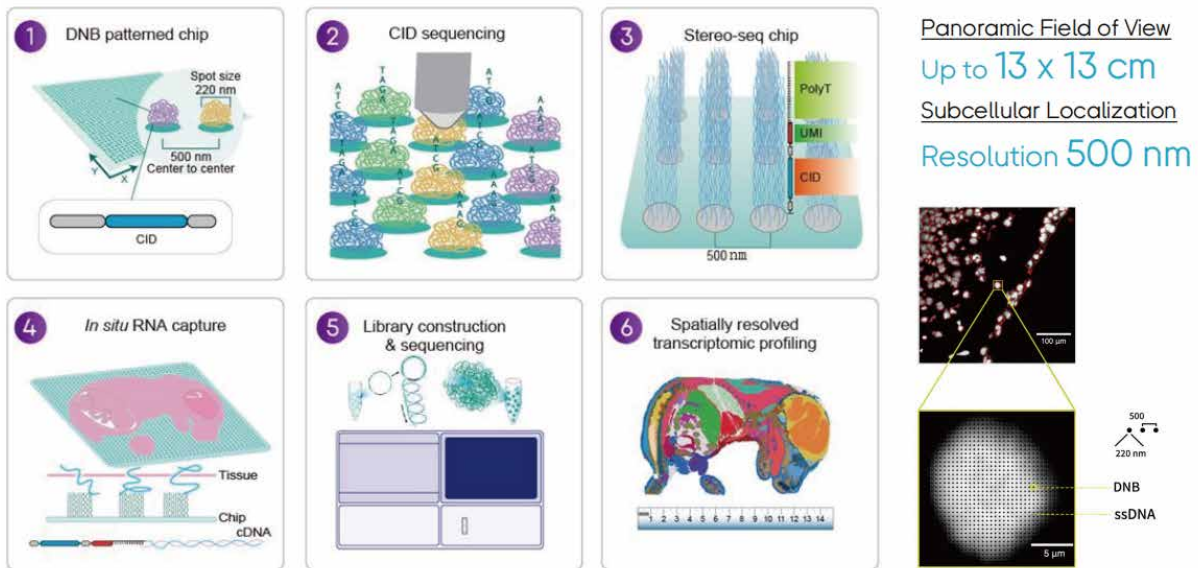


图 Stereo-seq技术原理

四、实验注意事项

(1) 新鲜组织样本包埋

目前新鲜组织的包埋方法有两种,一种是液氮+异戊烷法;另一种的干冰法。对于临床手术切下来的组织样本一般使用干冰的包埋方法。对于穿刺样本等一些较小,较轻的样本,一般推荐用液氮+异戊烷的方法进行冷冻。OCT包埋组织块可以在 -80°C 的密封容器中长期保存,或立即进行冷冻切片。

有些样本比较特殊:肺组织,脑(人+小鼠+大鼠)这种样本取下后,不要放入在任何液体里,如果表面有血液,只需要用PBS冲洗擦干后,进行包埋。

(2) 冷冻切片、组织样本质控及贴片

由于空间转录组检测的是组织中的RNA,因此要对切片中的RNA质量进行检测。我们一般取10片组织切片进行RNA抽提并质检,确定组织中RNA完整性(V1:RIN > 6 ;V2及HD:RIN > 4 ;华大V1.3:RIN > 4)。所以要求我们的组织样本至少有1mm的厚度,以便完成所有的实验。

(3) 组织优化

在做Visium V1版本或华大V1.3版本时,进行组织优化芯片探索的目的是摸索样本的最佳透化条件,保证组织切片中的mRNA能够充分释放。该步骤是获取真实实验结果的必要条件。否则,我们无法判断是基因表达高低到底是否是因为透化不充分导致。因此:每个样本建议都要做透化,尤其是临床样本。

五、新鲜样本各平台异同点

	10x Visium	10x Visium HD	10x Visium HD 3'	华大Stereo-seq FF V1.3
样本类型	新鲜组织			
样本包埋	异戊烷/干冰速冻新鲜组织OCT包埋			
物种类型	全物种	人、小鼠	全物种	全物种
质控要求	FF-V1:RIN≥6 FF-V2:RIN≥4	RIN≥4	RIN≥6	RIN≥4
测序平台	Illumina:80G	Illumina:200G	Illumina:150G	MGI (150-300G芯片尺寸不同)
分辨率	spot直径: 55um spot间距: 100um	2*2um, 无间隙, 全组织覆盖	2*2um, 无间隙, 全组织覆盖	spot直径: 220nm spot间距: 500nm
视场/芯片大小	0.65cm*0.65cm/11cm*11cm	0.65cm*0.65cm	0.65cm*0.65cm	标准芯片: 1cm*1cm、 0.5cm*0.5cm (可定制芯片规格: 1cm*2cm、 2cm*2cm、2cm*3cm等)
spot数	5000 spot	11000000个2*2um的方格	11000000个2*2um的方格	4*10^8 spot
灵活性	一次实验需凑够2/4个样本	一次实验需凑够2个样本	一次实验需凑够2个样本	单张芯片独立实验, 无需凑样
数据分析分辨率	以单个spot为分析单元	2*2um的方格为最小单元, 以8*8um为最小分析单元(单细胞水平), 可进行cell bin分析	2*2um的方格为最小单元, 以8*8um为最小分析单元(单细胞水平), 可进行cell bin分析	多spot构建bin单元矩阵; 单细胞分辨率cell bin (ssDNA/HE都可进行细胞分割)

图 新鲜样本空间转录组技术比对

三、石蜡样本空间基因表达解决方案

一、10x Genomics Visium技术原理-FFPE

FFPE处理是目前长期保存病理样本的标准化方法, 保存了大量的临床上患病和正常组织的样本资源, 该样本代表了珍贵且来源广泛的生物医学研究材料, 据统计世界上大约有数十亿份组织样品保存在医院或者组织样品库中, 其中绝大多数是FFPE样品。但是由于FFPE样本通常珍贵且保存时间长, 存在RNA/DNA量少和高度降解的问题, 因此如何获得FFPE样本所蕴藏的生物信息, 如何利用分子生物学方法对FFPE样本进行检测, 进而针对FFPE样本进行高通量组学分析就变得越来越大重要。

伯豪生物FFPE样本空间转录组测序解决方案基于Visium CytAssist—空间多组学组织分析物转移系统, 可以直接将FFPE组织切片上的探针捕获的转录组信息从普通载玻片转移到Visium 建库芯片上, 实现组织切片的空间组学分析。该方案解决了原有手动操作步骤较多带来的效率低下的问题, 简化样本管理, 高效实现对于FFPE样本的基因表达检测, 在形态学背景下进行分子信息的抓取。

Visium CytAssist Spatial Gene Expression for FFPE

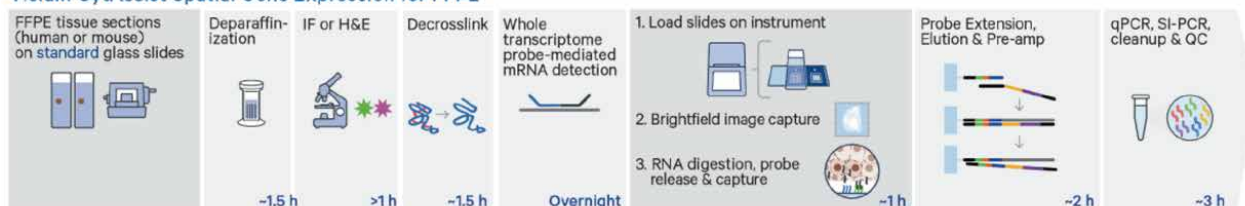


图 10x Genomics Visium空间转录组技术的原理

二、10x Genomics Visium FFPE样本可选实验方案

1. Visium Spatial Gene Expression solution for FFPE (Version 2.0)

2022年末, 10x Genomics 推出FFPE样本空间转录组解决方案V2 版本, 同时也推出相关实验仪器CytAssist与之配套。V2版本更新了RNA模板连接(RTL)探针集, 除少部分高表达基因外, 90%以上基因设计了3个探针, 使得基因检出率及特异性更高。

因V2版本最初HE染色是在常规白片上, 而非正式芯片上, 因此取消了测试片预实验。试剂盒内仅包含基因表达芯片(Library Preparation)。每张基因表达芯片上有2个捕获区域, 区域目前设计为大小2种规格: 一种为6.5* 6.5mm, 另一种为11* 11mm。Visium CytAssist对FFPE样本的DV200要求仅为30%, 允许检测更多长期保存的高度降解样本。

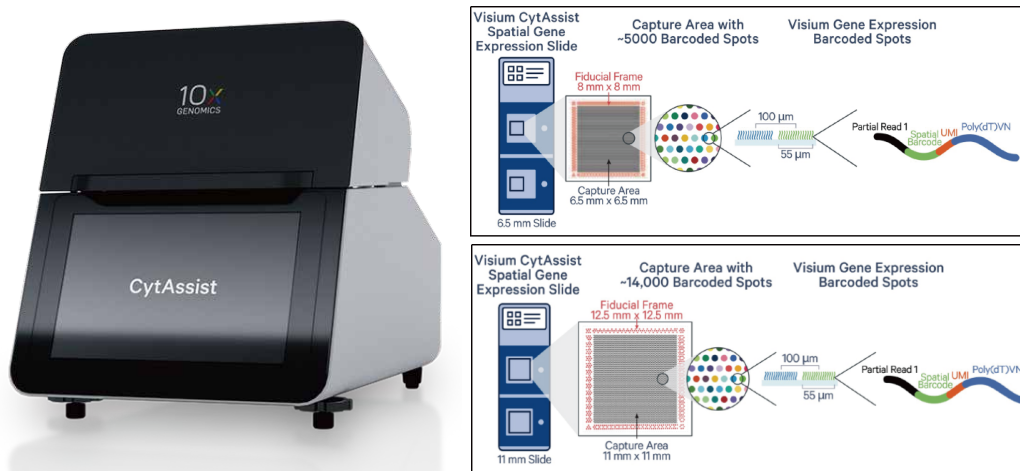


图 10x Genomics CytAssist Visium两种芯片 (Version2.0)

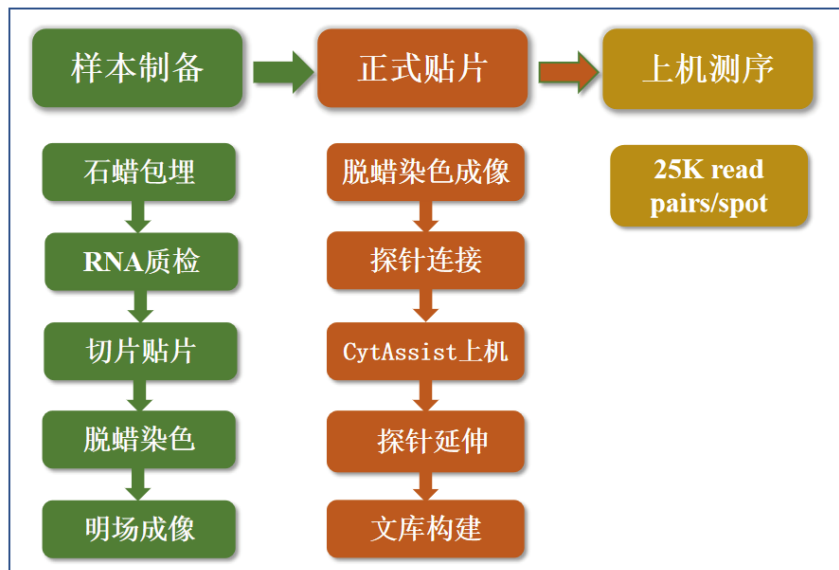


图 10x Genomics Visium (Version 2.0) 实验流程

2. Fresh frozen tissue Visium Spatial Gene Expression solution (Version HD)

24年初, 10x Genomics 推出新鲜样本空间转录组解决方案Visium HD版本, 依旧搭载CytAssist转片仪, 探针版本及实验流程沿用Version 2.0。相较于空间转录组初代产品Visium的不同, 此次发布的Visium HD芯片摒弃了以大直径55µm spot的设计, 而是采用2*2µm的正方形当做基础分析单位, 捕获框内无间隙, 真正的能够做到无偏好性的单细胞分辨率水平的空间转录组。目前HD芯片发布捕获框大小是6.5*6.5mm的规格, 可检测物种为人和小鼠。

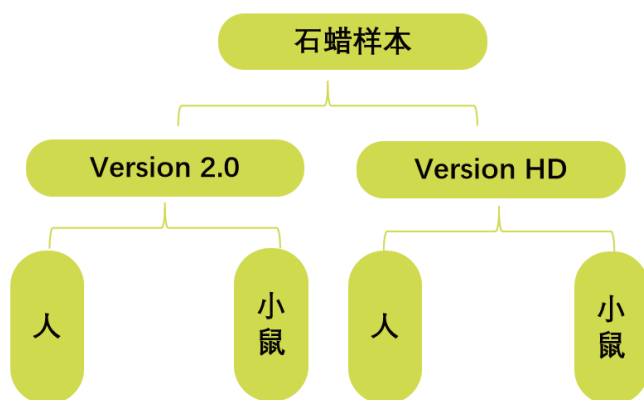


图 10x Genomics Visium FFPE样本可上机的样本类型

三、FFPE样本空转 (V2.0) 与空转 (HD) 的异同点

石蜡样本	V2版本	HD版本
质检标准	DV200>30%(FFPE)	DV200>30%
探针数量	每个基因3-5对	每个基因3-5对
捕获框大小	6.5*6.5 mm/ 11*11 mm	6.5*6.5 mm
每张芯片上捕获框数量	2个	2个
样本要求	蜡块/白片	蜡块/白片
是否需要做前期预实验	不需要	不需要
每张切片上spot数量	~5000(6.5*6.5 mm)、~14000(11*11mm)	2*2um超高分辨率, 无间隙, 全组织区域覆盖
测序量	80G(6.5*6.5 mm)、150G(11*11 mm)	100G(6.5*6.5 mm)
RNA质检样本用量	4片5 μm蜡卷	4片5 μm蜡卷
HE染色样本用量	1-2片5 μm白片	1-2片5 μm白片
预实验样本用量	-	-
正式实验样本用量	4片5 μm切片(必须贴于玻片合适位置上)	4片5 μm切片(必须贴于玻片合适位置上)
实验样本总用量	10片5 μm切片	10片5 μm切片
样本切片厚度	5 μm	5 μm
运输环境	石蜡/白片:4°C	石蜡/白片:4°C

注意:样本实验总量虽然不多,但是在切片过程中一定会出现损耗,所以样本厚度不能过于薄,无论是FF还是FFPE样本厚度最少为**1 mm**。

四、华大时空转录组FFPE样本解决方案

福尔马林固定的石蜡包埋 (Formalin-Fixed Paraffin Embedded, FFPE) 样本因其易于保存且能较好地保存样本组织形态的特点,在全球医学与科研领域被广泛应用。然而FFPE样本制备过程中, RNA可能存在降解,这导致Poly T探针无法捕获,且靶向探针的应用场景受限,因此亟需新的技术方法探究FFPE样本的组学奥秘。

24年6月发布的时空转录组FFPE产品方案,利用“随机探针”对FFPE样本中组织细胞内的Total RNA分子进行原位捕获,并通过空间条形码 (Coordinate ID, CID) 还原回空间位置,可实现全物种全转录组空间表达图谱的构建。该产品可在同一张切片上实现H&E染色/细胞核染色和基因表达分析。结合纳米级捕获分辨率的优势,利用StereoMap可视化分析工具,用户可进行真正的空间单细胞水平分析。同时,全新的StereoMap还支持第三方细胞分割工具,以满足复杂且多样化的科学研究需求。

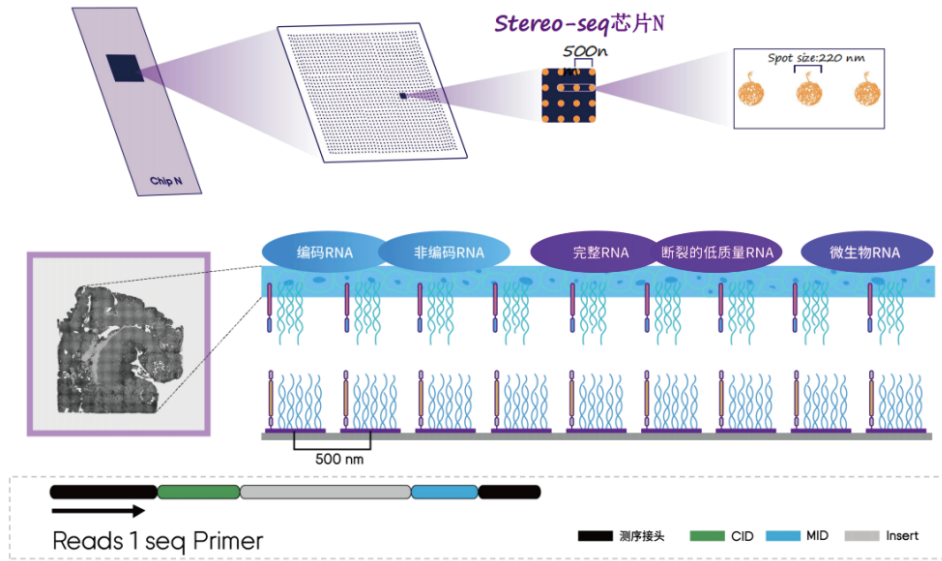


图 华大时空转录组FFPE产品技术原理

	10x Visium HD	华大Stereo-seq FFPE
样本类型	石蜡组织	石蜡组织
样本包埋	石蜡包埋组织	石蜡包埋组织
技术种类	空间转录组 (HE+空转、IF+空转)	空间转录组【HE和ssDNA (cell bin) 二选一】
测序平台	Illumina/T7	MGI T7
技术原理	人1.8w基因探针, 小鼠1.9w基因探针	随机探针捕获
分辨率	bin直径:2um bin间距:无	spot直径:220nm spot间距:500nm
视场/芯片大小	0.65*0.65cm	标准芯片:0.5*0.5cm、1*1cm 预上市芯片规格:1*2cm、2*2cm、2*3cm
spot数	11000000 bin(一千一百万)	4×10^8 spot
灵活性	一次实验需凑够2个样本	单张芯片独立实验, 无需凑样
数据分析分辨率	以 $8 \times 8 \mu\text{m}$ 为最小分析单元	多spot构建bin单元矩阵; 单细胞分辨率cell bin

图 Visium HD与华大FFPE技术比对

四、空间转录组数据分析

空间转录组数据分析的核心是根据每个芯片上每个spot (bin) 的基因表达信息进行聚类, 然后将spot (bin) 根据坐标位置序列放回到组织的图像上, 同时可以对每个gene在组织上表达的空间位置进行定位。

(1) 10x Genomics Visium空间转录组数据分析

获得测序数据后, 首先利用Space Ranger软件可以自动化的对图像进行处理、数据比对和Barcode处理。另外一个软件Loupe Cell Browser是一个适用于Windows和MacOS的桌面应用程序, 它可以快速、轻松地可视化和分析10x Visium数据。伯豪生物除了提供spot (bin) 基因数和UMI数统计、切片spot (bin) 聚类和聚类亚群marker基因分析等基础和高级分析, 同时还提供个性化分析, 如特定pathway功能富集分析等。

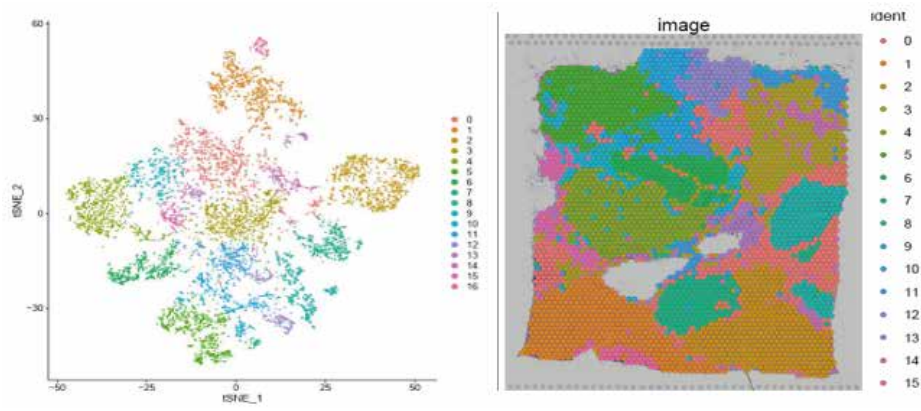


图 每个spot特异表达的基因数统计

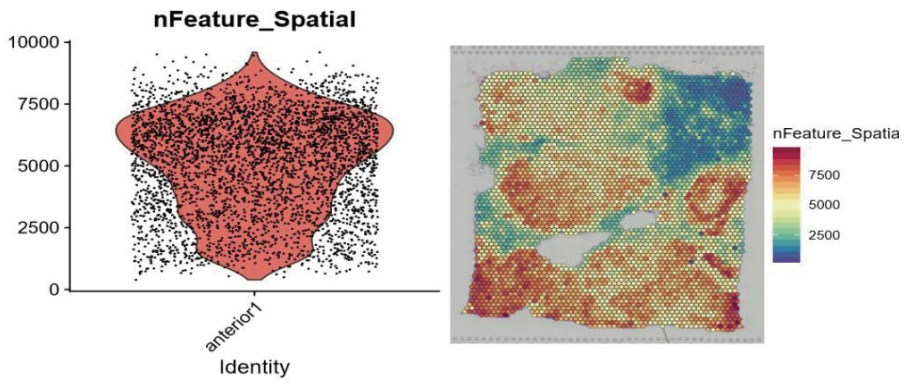


图 聚类结果及切片spot位置分布展示

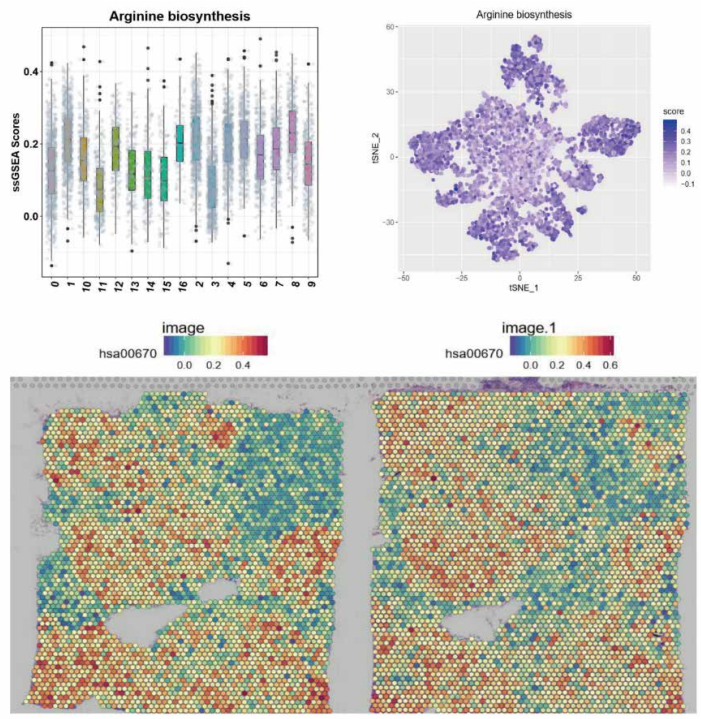


图 特定pathway功能富集分析

(2) 华大时空转录组数据分析

Stereo-seq分析软件包括Stereo-seq分析流程软件包(Stereo-seq Analysis Workflow, SAW)和StereoMap(ImageStudio已合并入StereoMap)。SAW主要用于分析空间基因表达数据, StereoMap是一款桌面端可视化软件, 可以实现图像处理和交互式可视化探索。全新的分析软件功能更加强大, 操作更加简单、易用, 以单细胞级分辨率(CellBin) 轻松解析基因表达空间特征、探索全转录组空间奥秘。伯豪生物也可以提供与10X Genomics Visium空间转录一致的基础和高级分析。



结合组织区域分布对数据进行挖掘

大部分组织其实是有其特定的区域划分的, 比如说大脑里有皮层、丘脑、海马、脉络丛等多个区域。将组织的区域划分和亚群(或细胞类型)的分布结合起来还是能发现很多有价值的信息的。

可以根据不同区域特异表达的marker基因的分布来判断每个区域在组织切片上的位置。例如皮层marker基因STX1A的表达分布, 海马marker基因HPCA的表达分布等

结合病理学特征对数据进行挖掘

空间转录组技术真正的精髓不是研究细胞亚群的分布, 而在于将它在空间位置上体现的异质性跟组织病理学特征的分布进行结合, 挖掘在不同病理学特征下转录组学的差异。这对于研究疾病病变的机制、帮助临床实现更好的患者分子分型、以及空间位置Biomarker的挖掘方面都是非常宝贵的。通过手动把这些区域圈出来进行转录组层面的比较, 找出不同病灶区的特异性marker, 分析疾病在一步步发展进程中生物学功能的变化, 甚至可以思考一下是否能找出一些关键性因子来阻断疾病的进展。

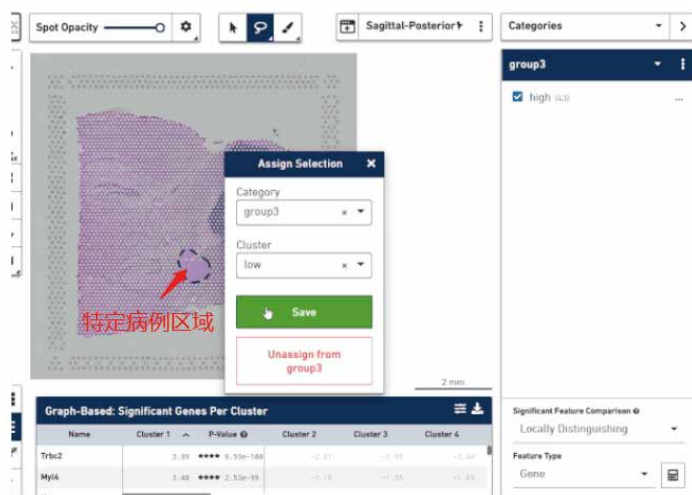


图 根据病理信息选取特定区域分析

空间转录组联合单细胞RNA测序解析细胞类型的空间位置信息(Multimodal intersection analysis,MIA)

空间转录组测序可以获得不同基因在组织切片上的空间位置信息,但不能获得详细的细胞类群信息(空间转录组不是单细胞分辨率,只能粗略的分析切片上不同位置的细胞类型)。因此,需要借助单细胞测序数据来分析细胞类型,然后通过生物信息学的分析方法将单细胞类群映射到空间转录组数据上。

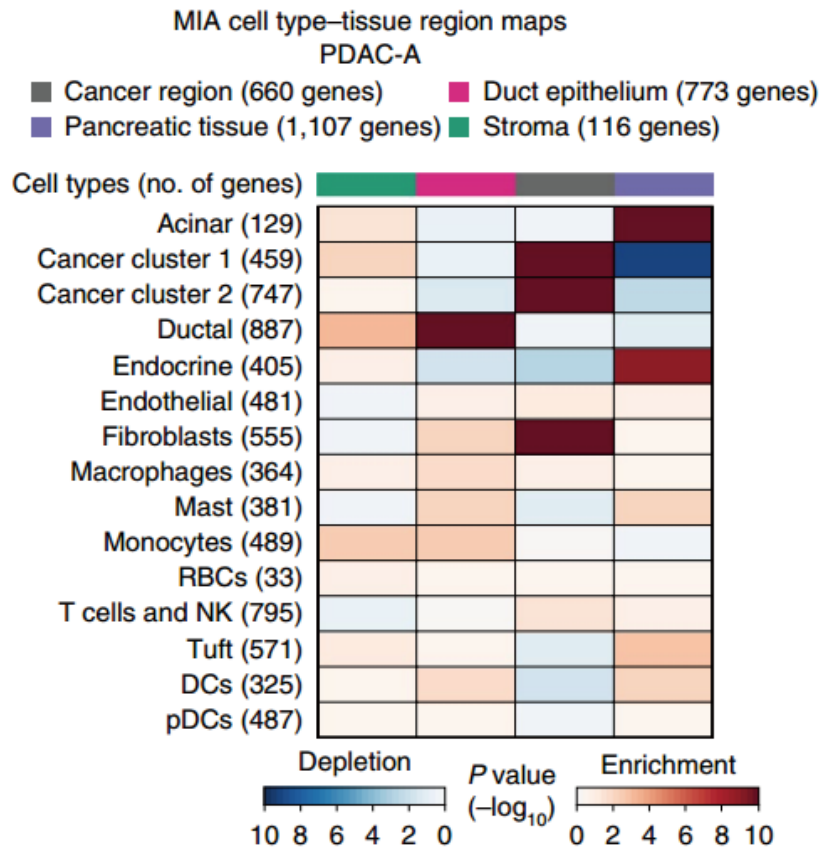


图 MIA热图

备注: MIA热图,上方的颜色条反映了ST区域的子聚类(cancer region, Pancreatic tissue, Duct epithelium和stroma)。左侧代表不同的细胞类群。色块代表enrichment或者depletion。Enrichment代表该细胞类群富集到了该区域。Depletion代表该细胞类群在该区域缺失。



五、空间转录组应用方向

1、应用方向

空间位置信息, 或者细胞在组织中天然的状态在研究过程中其实具有十分重要的价值, 特别针对某些研究领域, 如发育生物学(不同位置的细胞接受不同的信号浓度梯度、响应不同的外界刺激, 具有不同的发育命运)、肿瘤生物学(肿瘤组织与癌旁组织的区别, 肿瘤细胞浸润过程中肿瘤细胞的变化与对正常细胞的影响, 肿瘤转移的不同过程阶段等)、脑神经科学(不同脑区位置的神经元结构、神经连结, 中间神经元投射, 突触前后, 神经胶质相互影响等等), 细胞来源的位置信息是极为关键的决定因素。

空间转录组测序技术除了在人和动物上得到了广泛的应用之外, 在植物领域也有所突破。2017年发表在nature plant上的一篇文章就阐释了空间转录组在拟南芥中的应用, 利用空间数据作者分析了141个基因的表达水平差异, 8个花序组织域中189条通路。伯豪生物作为最早的空间转录组测序技术服务商, 也在植物的空间转录组领域有所突破。23年初浙江大学生命科学学院杜娟课题组在Molecular Plant 在线发表题为High-resolution anatomical and spatial transcriptome analyses reveal two types of meristematic cell pools within the secondary vascular tissue of poplar stem的研究论文。本篇文章中植物空转实验由我司协助杜老师完成。

常见空间转录组的应用方向主要在肿瘤学, 免疫学, 发育生物学, 神经科学及病理学等方向。

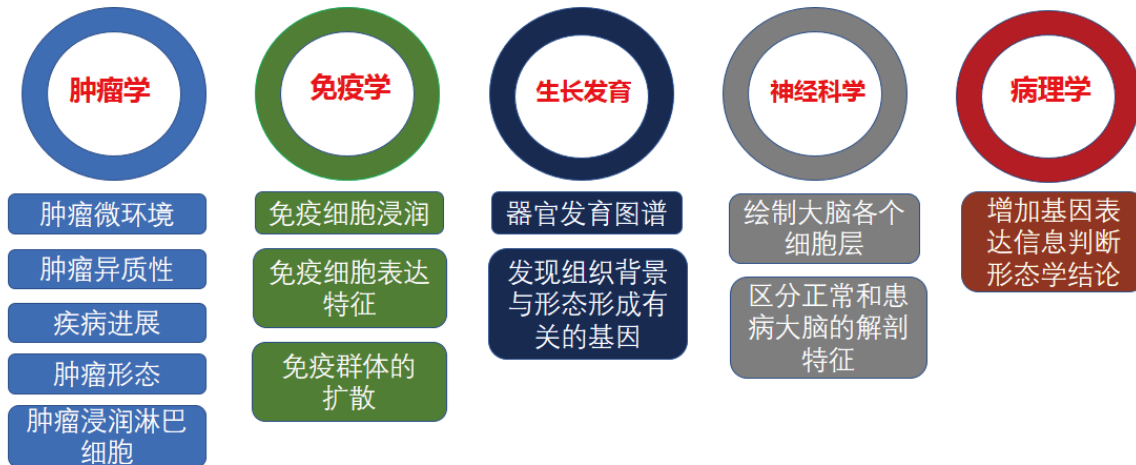


图 空间转录组的应用方向

新鲜样本 (FF) 已上机样本类型及中位基因数 (平均)			
肝脏	3478	杨树茎	4585
前列腺	2718	梨-幼果	517
肠道	3141	小鼠脑	3839
肺脏	2233	小鼠心脏	6049
血管	790	小鼠性腺	6555
脑胶质瘤	4255	小鼠皮下瘤	5237
卵巢癌	3350	果蝇幼虫	3848
皮肤组织	1113	乳腺癌 (V2)	7275
骨肿瘤	2021	子宫内膜 (V2)	8989
胃癌	903	脑 (V2)	7875
宫颈癌	3516	胃癌 (V2)	5088
食管癌	3516	淋巴结 (V2)	5898
甲状腺癌	2959	鼻息肉 (V2)	1154
囊胚	7212	皮肤 (V2)	2908
子宫内膜	3134	血管 (V2)	830
胆囊	1804	心脏 (V2)	6549
口腔	2146	胎盘 (V2)	6898
乳腺癌	568	小鼠肝脏 (V2)	2211
肾脏	5963		
听神经瘤	2924		

表 FF空间转录组已完成实验的样本类型

石蜡样本已上机样本类型及中位 (平均) 基因数			
组织类型 (FFPE)	中位基因数	组织类型 (FFPE)	中位基因数
肝脏 (V1)	4264	肝癌组织 (V2)	5047
肺脏 (V1)	5209	胆囊癌 (V2)	3414
胃 (V1)	4012	脑胶质瘤 (V2)	7284
肠 (V1)	7084	黑色素瘤 (V2)	4627
胆囊 (V1)	2760	食管癌 (V2)	3020
口腔肿瘤 (V1)	6285	肺脏 (V2)	7271
淋巴瘤 (V1)	4224	胰腺癌 (V2)	4264
胰腺癌 (V1)	4492	组织类型 (FFPE HD)	8um 平均基因数
胎盘 (V2)	6238	毛囊 (HD)	195
小鼠肌肉组织 (V2)	2243	脉络丛 (HD)	121
小鼠脑 (V2)	7465	皮肤 (HD)	227
组织矩阵 (V2)	3948	肺 (HD)	169
乳腺癌组织 (V2)	7515	胃 (HD)	190
卵巢癌 (V2)	9737	乳腺癌 (HD)	151
结直肠癌 (V2)	2946	小鼠子宫 (HD)	253
皮肤 (V2)	3507	小鼠脉络丛 (HD)	277
血管 (V2)	2982	小鼠肝 (HD)	207

表 FFPE空间转录组已完成实验的样本类型

2、案例解析

研究思路一:空间转录组测序联合单细胞RNA测序揭示疾病机制

案例一:客户文章

上海免疫所苏冰/叶幼琼团队揭示结直肠癌肿瘤边界间质细胞与巨噬细胞互动模式

Single-cell and spatial analysis reveal interaction of FAP+ fibroblasts and SPP1+ macrophages in colorectal cancer^[3]

发表杂志:Nature Communications

影响因子:17.694

发表时间:2022年4月

摘要:单细胞RNA测序(single RNA sequence, scRNA-seq)能够系统地识别组织中的细胞类群,但它不能获取各个细胞类型在组织中的空间位置信息。空间转录组测序(spatial transcriptomics, ST) ,可以获得不同基因在组织切片上的空间位置信息,但不能获得详细的细胞类群信息。本研究作者通过单细胞测序技术联合空间转录组学技术,发现,肿瘤特异性FAP+成纤维细胞和SPP1+巨噬细胞在14个独立CRC队列中呈正相关。此外,通过空间转录组学进一步验证了它们的密切共定位。这种相互作用可能受到趋化素、TGF- β 和白细胞介素-1的调控,而且可以刺激免疫排斥的结缔组织结构的形成,限制T细胞浸润。此外,作者还发现FAP或SPP1高表达的患者在抗PD-L1治疗队列中获得的治疗效益较少。该结果为CRC的治疗提供了一种潜在的新的策略。

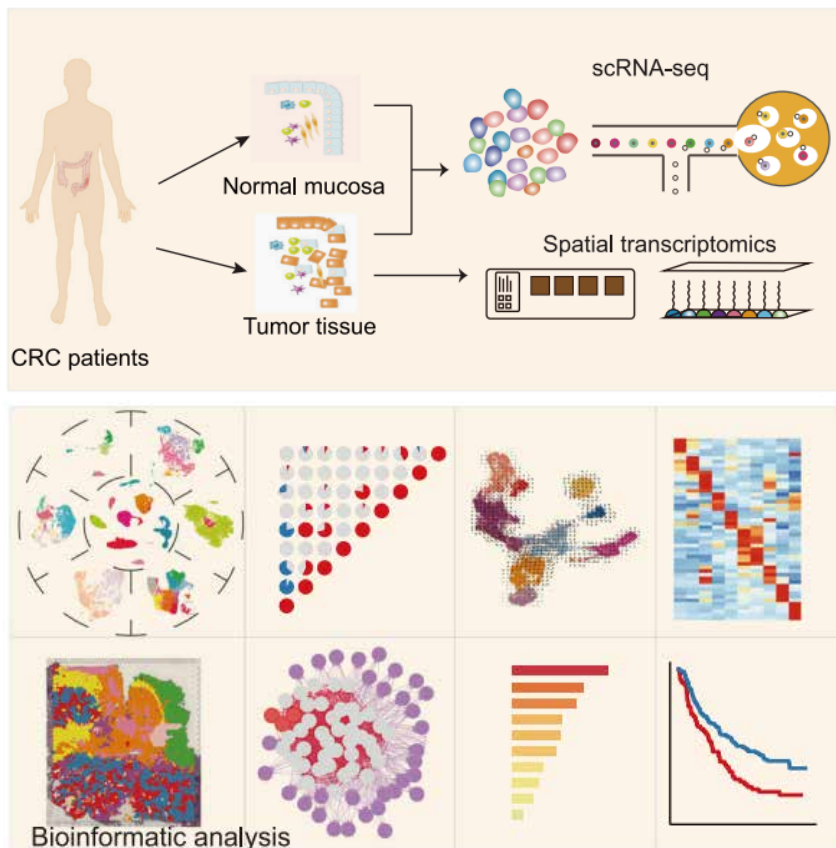


图 ST联合scRNA揭示结直肠癌肿瘤边界间质细胞与巨噬细胞互动模式

案例二:客户文章

中国科学技术大学附属第一医院刘连新团队揭示肝癌微环境中影响免疫治疗好坏的肿瘤免疫屏障
Identification of a tumour immune barrier in the HCC microenvironment that determines the efficacy of immunotherapy^[4]

发表杂志: Journal of Hepatology

影响因子: 30.083

发表时间: 2023年1月

摘要: 在肝癌患者中, 只有少数HCC患者受益于ICB, 这严重阻碍了免疫治疗在HCC患者中的应用。在这里, 作者使用多组学方法鉴定了肿瘤免疫屏障(TIB)的空间结构, TIB是由肝癌微环境中的SPP1+巨噬细胞和CAFs相互作用形成的, 这种结构限制了免疫细胞向肿瘤核心的浸润。体外实验中, 低氧条件下巨噬细胞SPP1表达上调。此外, 在SPP1+巨噬细胞特异性敲除小鼠肝癌移植模型、自发性肝癌小鼠和野生型小鼠肝癌移植模型中, 阻断或敲除SPP1均能显著增强PD-1阻断效果, 同时减少CAF浸润, 增加T细胞的细胞毒性。总的来说, 这些结果揭示了肿瘤微环境(TME)中TIB结构在免疫治疗疗效中的作用, 并表明阻断SPP1+巨噬细胞与恶性肝细胞和CAFs的相互作用, 联合抗PD-1治疗可以提高治疗疗效。

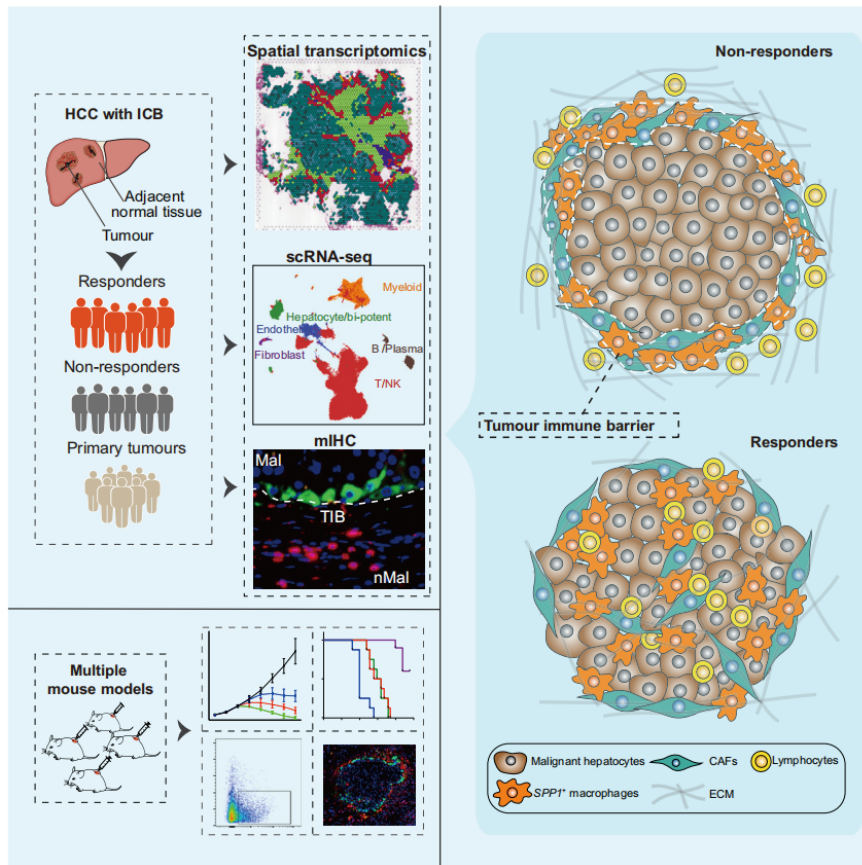


图 ST联合scRNA揭示肝癌微环境中影响免疫治疗好坏的肿瘤免疫屏障

案例三: 华大时空转录组文章

空间转录组学联合单细胞RNA-seq揭示TLSs在CRLM中的分布和临床意义

CCL19-producing fibroblasts promote tertiary lymphoid structure formation enhancing anti-tumor IgG response in colorectal cancer liver metastasis^[5]

发表杂志: Cancer Cell

影响因子: 48.8

发表时间: 2024年8月

摘要: 三级淋巴结构 (TLS) 与肿瘤免疫力增强有关。然而, 它们在结直肠癌肝转移 (CRLM) 中的形成和功能仍不清楚。本篇文章揭示了肿瘤内和肿瘤周围成熟的TLS (TLS+) 与TLS肿瘤相比与临床预后的改善有关。利用单细胞-RNA 测序和空间转录组学测序 (Stereo-seq) 发现TLS+肿瘤富含IgG+浆细胞 (PCs), 而TLS肿瘤则以IgA+ PCs为特征。通过在体外生成TLS相关PC衍生的单克隆抗体, 发现TLS-PCs会分泌肿瘤靶向抗体。作为概念验证, 在人源化小鼠结直肠癌模型中证明了TLS-PC-mAb6抗体的抗肿瘤活性。发现成纤维细胞系分泌的CCL19可促进淋巴细胞向TLS转移。CCL19治疗可促进小鼠TLS的新生并阻止肿瘤生长。我们的数据揭示了CCL19+成纤维细胞在TLS形成中的核心作用, 这反过来又产生了限制CRLM的治疗性抗体。

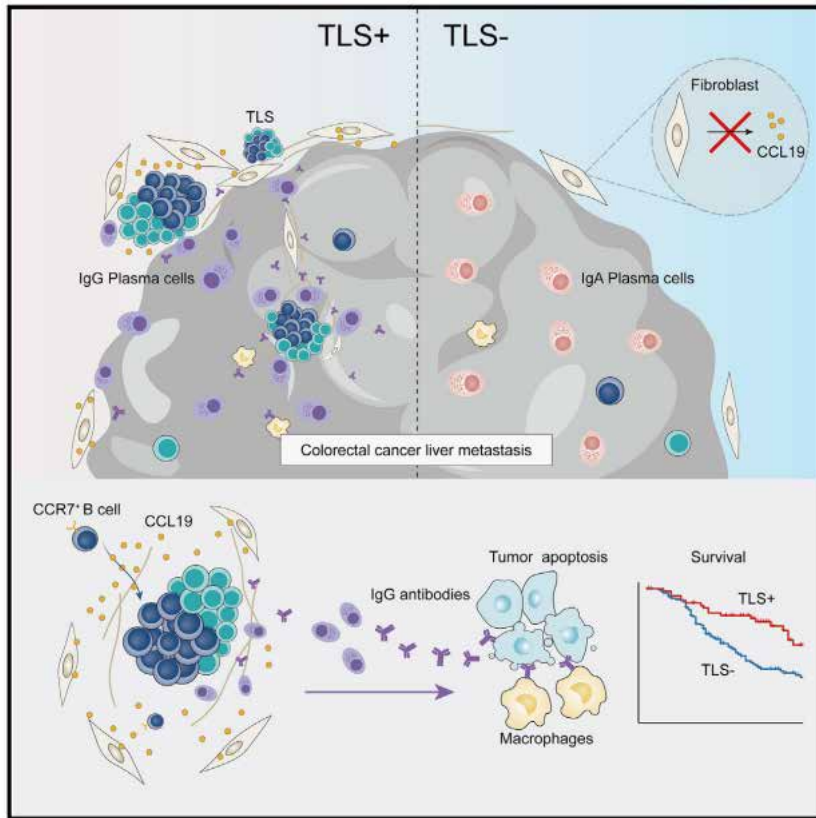


图 ST联合scRNA揭示TLSs在CRLM中的分布和临床意义

研究思路二:空间转录组测序在植物方向的应用

案例四:

空间转录组解析植物维管组织结构与发育研究领域新进展

High-resolution anatomical and spatial transcriptome analyses reveal two types of meristematic cell pools within the secondary vascular tissue of poplar stem^[6]

发表期刊:Molecular Plant

影响因子:21.949

发表时间:2023年3月

摘要:本研究中,作者通过电子显微镜观察与10x Genomics Visium空间转录组测序相结合的方法,追踪研究了木本模式植物-杨树茎从顶端原形成层干细胞逐步发育形成次生维管组织干细胞的连续过程。首次发现木本模式植物-杨树茎次生维管组织中存在形态结构与特征表达基因不同的两类干细胞,分别位于韧皮部和形成层区域内,负责形成韧皮部与木质部细胞。本研究首次系统解析了植物次生维管组织干细胞的起源发生与发育过程,提供了维管组织干细胞及其衍生细胞在各个分化阶段的形态结构与特征表达基因图谱,为进一步研究陆生植物维管组织系统演化提供了非常重要的资源。同时也为筛选维管组织发育与木材形成的关键调控因子进行分子育种,改良植物株型,调控植物生长发育与抗逆提供新的研究视角。

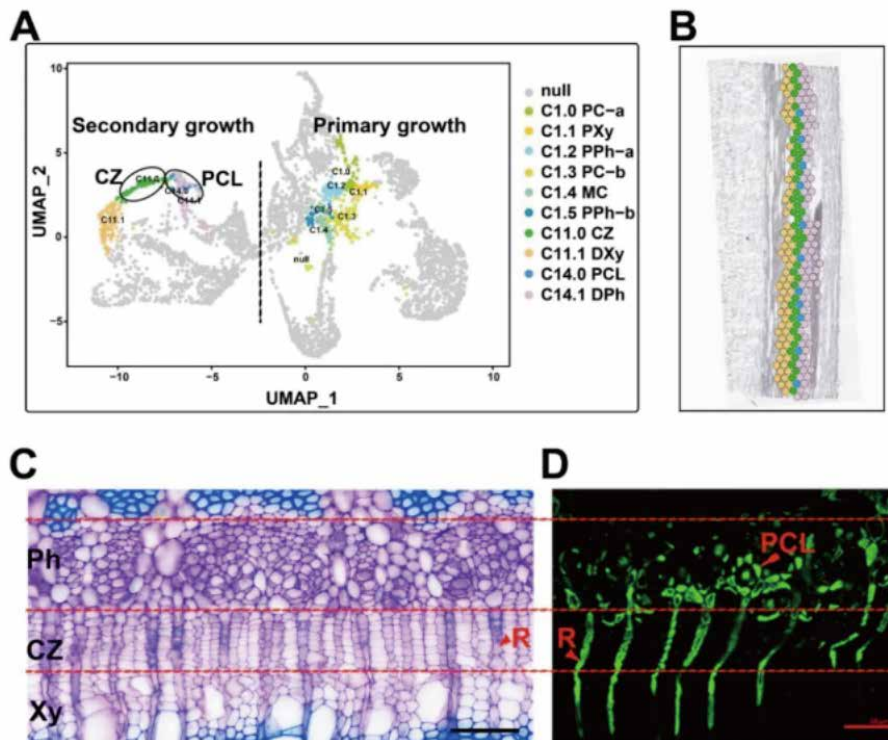


图 空间转录组分析与原位杂交验证次生维管组织中存在两个干细胞中心

案例五：

空间转录组解析模式植物组织基因表达的空间信息
 Spatially resolved transcriptome profiling in model plant species^[7]

发表期刊: Nature plant

影响因子: 13.256

发表时间: 2017年5月

摘要: 要理解复杂的生物系统, 需要对特定组织域进行功能研究。然而, 现有的空间转录组测序技术仅适用于有限范围的生物, 主要是哺乳动物。在这里, 作者提出了第一个可用与植物组织的方法, 在空间分辨率的状态下来广泛的解析模式植物系统。该过程包括高通量的空间转录组分析, 然后是空间基因和通路分析。作者首先从模型被子植物和裸子植物的显微切片中生成空间转录组谱, 证明了该技术的可行性。在拟南芥中, 利用空间数据分析了8个花序组织结构域中141个基因和189条通路的表达水平差异。作者通过将空间转录组学技术和功能谱分析技术相结合这一新策略, 应用于广泛的植物物种, 该技术将是一种解决发育和进化生物学基本问题的关键方法。

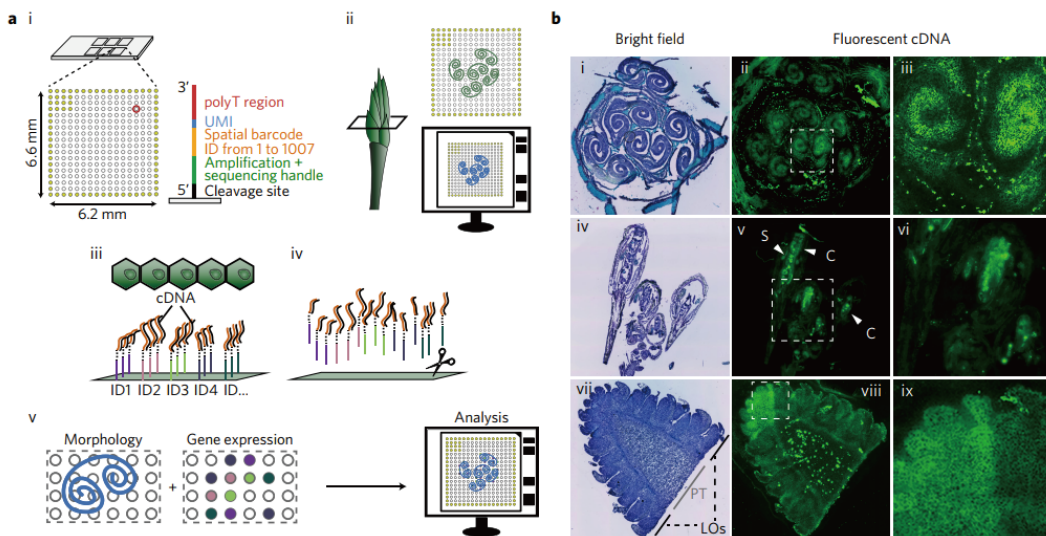


图 植物的空间解析转录组分析

FFPE样本空间转录组文章

案例六:全球首篇Visium FFPE空间转录组文章

法国巴黎科德利埃研究中心从空间上解析肾脏肿瘤的三级淋巴结构中B细胞表型
Tertiary lymphoid structures generate and propagate anti-tumor antibody-producing plasma cells in renal cell cancer^[8]

发表杂志:Immunity

影响因子:25.5

发表时间:2022年3月

摘要: 10x Genomics在其现有的Visium空间基因表达(Visium)平台的基础上推出了Visium FFPE空间基因表达(Visium FFPE)。转化研究人员能够更轻松地研究存档样本以便发现生物标志物,开展回顾性和纵向研究来追踪一段时间内的生物过程,并充分利用珍贵的组织样本,与H&E相结合来了解形态学背景。在本文中,作者使用10xGenomics的空间分析技术来表征肾脏肿瘤FFPE样本,研究结果表明三级淋巴结构(TLS)在产生浆细胞(产生抗体的细胞)的过程中发挥作用,并可能有助于对免疫检查点抑制剂(ICI)等癌症免疫疗法产生积极应答。尽管抗体如何与肿瘤结合并引发肿瘤细胞凋亡的机制仍未完全阐明,但这项工作揭示了血浆B细胞在肿瘤微环境中的产生机制和位置,以及B细胞克隆型如何沿着成纤维细胞轨道分散,这两者似乎都对免疫治疗应答产生了积极的作用。

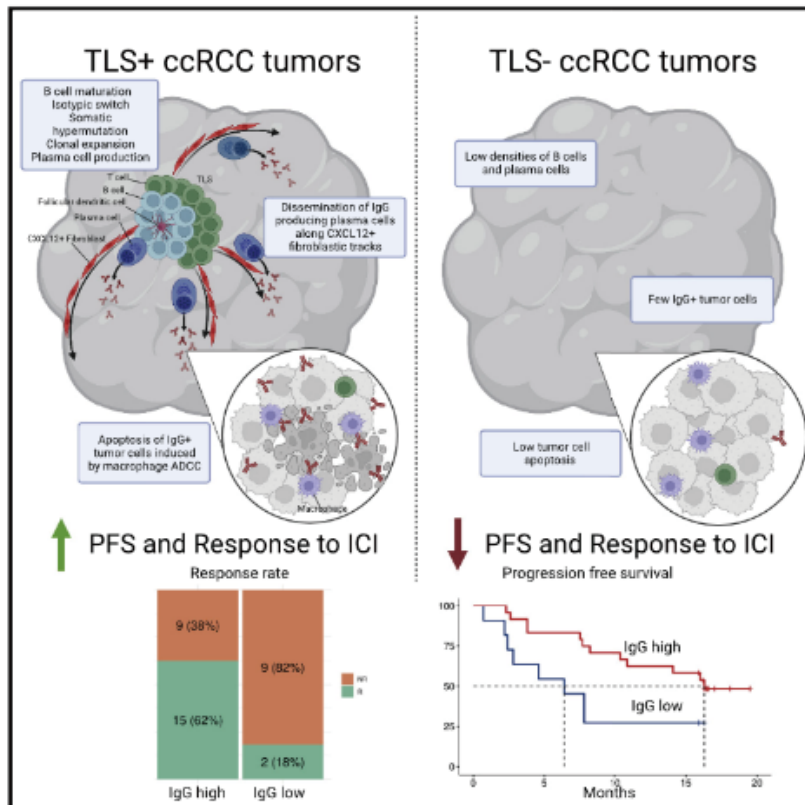


图 FFPE空间转录组解析肾细胞癌(RCC) TLS中B细胞应答的机制

案例七：

空间转录组学联合单细胞RNA-seq寻找癌症新靶向-1
 Pharmacological targeting netrin-1 inhibits EMT in cancer^[9]

发表杂志: Nature

影响因子: 50.5

发表时间: 2024年2月

摘要:近年来, 上皮-间质转化 (EMT) 在肿瘤发生、进展、转移及耐药性中的调控作用及机制已取得重大进展, 但靶向EMT的治疗方法仍十分匮乏。研究人员发现, 在自发性EMT皮肤鳞状细胞癌 (SCC) 小鼠模型中, netrin-1显著上调。抗netrin-1单克隆抗体NP137可以显著抑制SCC细胞EMT, 并减少转移, 增强化疗敏感性。此外, NP137还可以阻止肿瘤细胞进展至晚期EMT状态, 并维持上皮样特征。体外试验中, 敲除netrin-1及其受体UNC5B后, EPCAM+肿瘤细胞的EMT过程被显著抑制, 并调控促进肿瘤上皮状态和抑制EMT相关的基因特征。人肺癌细胞A549移植小鼠中, 通过TGFβ1给药模拟EMT过程, NP137单抗治疗可显著降低肿瘤细胞EMT。总之, 抑制netrin-1是一种靶向肿瘤EMT的新型治疗策略, 为药物研发提供新思路。

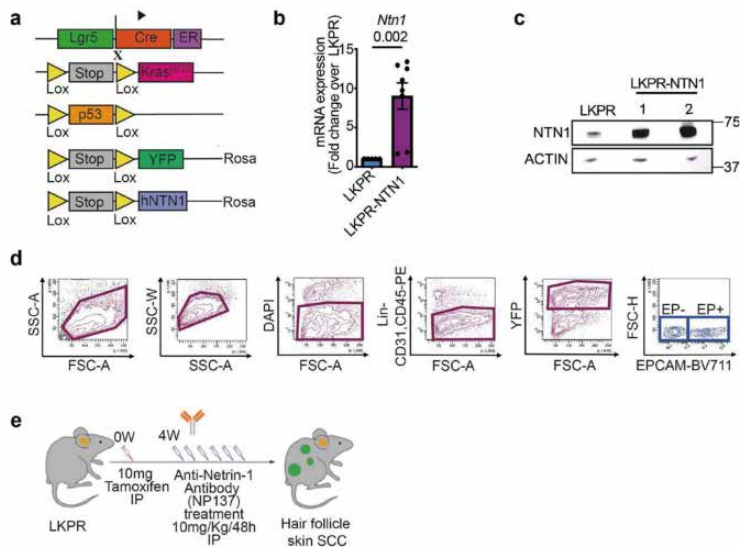


图 ST联合scRNA寻找癌症新靶向

案例八：

空间转录组学联合单细胞RNA-seq寻找癌症新靶向-2
 Netrin-1 blockade inhibits tumour growth and EMT features in endometrial cancer^[10]

发表杂志: Nature

影响因子: 50.5

发表时间: 2023年8月

摘要:本研究探索了netrin-1在子宫内膜癌 (EC) 中的抗肿瘤作用。在EC小鼠模型中, Netrin-1表达显著升高, 抗netrin-1单克隆抗体NP137可以显著抑制肿瘤进展。小鼠肿瘤基因谱分析结果显示, NP137除了诱导肿瘤细胞死亡, 还可以抑制上皮-间质转化 (EMT)。一项I期临床研究评估了NP137用于14例晚期子宫内膜癌患者的疗效, 结果显示, 1例 (7.1%) 患者达到RECIST v.1.1评估的部分缓解 (PR, 治疗6周时靶病灶缩小51.16%), 8例 (57.1%) 疾病稳定 (SD)。对患者治疗前后的活检组织进行Bulk和单细胞RNA测序 (RNA-seq)、空间转录组学评估, 发现NP137治疗后患者的肿瘤EMT显著降低, 并与肿瘤免疫浸润、肿瘤微环境相互作用增加等相关。鉴于EMT在抗肿瘤药物耐药性中的关键作用, 研究人员还提出了抗netrin-1单抗和标准疗法 (如化疗) 的联用策略, 并在EC小鼠模型中进行了验证, 结果显示NP137联合卡铂和紫杉醇的抗肿瘤疗效显著优于单纯化疗治疗。总之, 抗netrin-1单抗是一种新型的抗肿瘤疗法, 可以显著缩小肿瘤, 抑制EMT, 潜在减少标准疗法的耐药性。

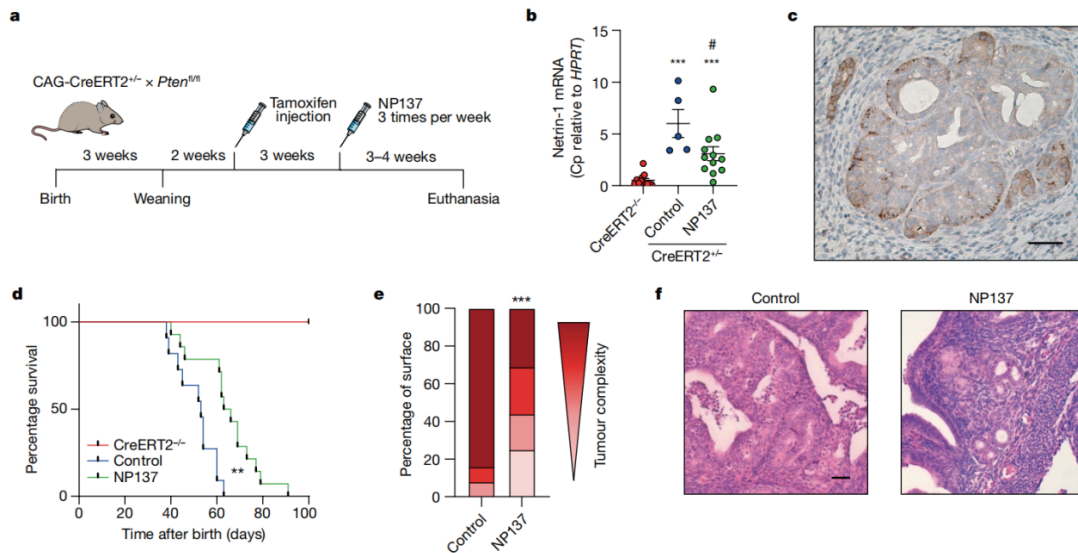


图 ST联合scRNA寻找癌症新靶向

六、参考文献

- [1]. Ståhl PL, Salmén F, Vickovic S, et al. Visualization and analysis of gene expression in tissue sections by spatial transcriptomics. *Science* 2016, 353(6294):78-82.
- [2]. Peng G, Suo S, Chen J, et al. Spatial Transcriptome for the Molecular Annotation of Lineage Fates and Cell Identity in Mid-gastrula Mouse Embryo. *Dev Cell* 2016, 36(6):681-697.
- [3]. Qi, J, Sun, H., Zhang, Y. et al. Single-cell and spatial analysis reveal interaction of FAP+ fibroblasts and SPP1+ macrophages in colorectal cancer[J]. *Nat Commun*, 2022, 3 (1)
- [4]. Liu Y, Xun Z, Ma K, et al. Identification of a tumour immune barrier in the HCC microenvironment that determines the efficacy of immunotherapy. *J Hepatol*. 2023 Apr;78(4):770-782
- [5]. Zhang Y, Liu G, Zeng Q, et al. CCL19-producing fibroblasts promote tertiary lymphoid structure formation enhancing anti-tumor IgG response in colorectal cancer liver metastasis. *Cancer Cell*. 2024 Aug 12;42(8):1370-1385.
- [6]. Juan Du, Yichen Wang, Wenfan Chen, Mingling Xu, Ruhong Zhou, Huixia Shou, Jun Chen, et al. High-resolution anatomical and spatial transcriptome analyses reveal two types of meristematic cell pools within the secondary vascular tissue of poplar stem[J]. *Molecular Plant*, 2023.
- [7]. Giacomelli S, Fredrik Salmén, Terebieniec B K, et al. Spatially resolved transcriptome profiling in model plant species[J]. *Nature Plants*, 2017.
- [8]. Meylan M, Petitprez F, Becht E, et al. Tertiary lymphoid structures generate and propagate anti-tumor antibody-producing plasma cells in renal cell cancer. *Immunity*. 2022 Mar 8;55(3):527-541.
- [9]. Lengrand J, Pastushenko I, Vanuytven S, et al. Pharmacological targeting of netrin-1 inhibits EMT in cancer. *Nature*. 2023 Aug;620(7973):402-408.
- [10]. Cassier PA, Navaridas R, Bellina M, et al. Netrin-1 blockade inhibits tumour growth and EMT features in endometrial cancer. *Nature*. 2023 Aug;620(7973):409-416.



上海伯豪生物技术有限公司

上海微矩阵生物科技有限公司

地址:上海市浦东新区张江高科技园区蔡伦路999号1号楼

电话:400-820-3699

邮箱:market@shbio.com

官网:www.shbio.com