

# Spatially resolved transcriptomics and beyond

---

小组成员：陈永烽，董新宇，陈楚佳

## 小组成员及分工：

陈永锋：文献阅读，PPT制作

董新宇：文献阅读，PPT制作

陈楚佳：文献阅读，PPT制作，PPT演讲

# Part 1

Abstract

# Abstract

测序技术的显著发展，使得研究单个细胞的基因组学和转录组学成为可能。尽管如此，为了更好地理解多细胞生物体的复杂性，我们也必须想法设法在进行高通量测序的同时，保留有关组织环境和被分析的核算的亚细胞定位的空间信息。在这篇创新性文章中，文章总结了一些使得 **spatially resolved transcriptomics** 成为可能的方法，并且探讨这些方法为何拥有扩展到转录组学以外的，包括空间分辨基因组学，蛋白质组学和其他组学的潜力。

# Part 2

Introduction

# Introduction

细胞是多细胞生物的基本单位，现代细胞生物学和分子生物学的知识主要来自应用于细胞群上的批量实验，而单细胞的方法一直落后。但在过去的几年中，几个基于测序的能够查询单个细胞的基因组和转录组的方法已被开发出来。单细胞方法相对于批量检测的基本优点是保持单个细胞的信息，来揭示稀有的细胞特性和生物学上有意义的细胞—细胞变化。但是，不同于循环血细胞，固体的细胞和组织必须进行机械或酶分解以便进行单细胞分析。而这个过程不可避免地会导致位置信息的丢失，使得无法评估单个细胞的基因组和转录组的情况，及它们是怎样的被从空间上组织到整个组织中。

文章总结了关于进行原位RNA测序或者通过一些方法保持空间信息的开创性技术，并讨论这些方法将如何为开启空间解析组学的新领域提供基础，包括整体获得基因组学、转录组学、蛋白组学和其他可能的组学数据的同时保持位置信息。

# 各个方法的系统地比较

	smFISH	Padlock probes and RCA	Branched FISH	LCM	Microtomy sequencing	TIVA	ISS	FISSEQ	Imaging mass cytometry
<b>Sample</b>	Fixed cells and tissues; purified RNA	Fixed cells and tissues; purified DNA or RNA	Fixed cells and tissues; possibly purified DNA or RNA	Fixed tissues	Fixed and fresh tissues	Live cells	Fixed cells and tissues	Fixed cells and tissues	Fixed tissues
<b>Target</b>	RNA	DNA; RNA	RNA	RNA; DNA; proteins	RNA; possibly DNA and proteins	RNA	RNA	RNA	Proteins
<b>Type</b>	Targeted	Targeted	Targeted	Targeted or non-targeted	Non-targeted	Non-targeted	Targeted	Non-targeted	Targeted
<b>Variable measured</b>	Abundance; SNVs; fusion transcripts; splice variants; subcellular localization	Abundance; SNVs; fusion transcripts; splice variants; subcellular localization	Abundance; subcellular localization	Abundance; possibly SNVs, fusion transcripts and splice variants	Abundance; possibly SNVs, fusion transcripts and splice variants	Abundance; possibly SNVs, fusion transcripts and splice variants	Abundance; possibly SNVs, fusion transcripts and splice variants	Abundance; possibly SNVs, fusion transcripts and splice variants	Abundance; protein modifications
<b>Single-cell?</b>	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes
<b>Spatial resolution</b>	Subcellular	Subcellular	Subcellular (except the nucleus)	Anatomical or cellular	Anatomical	Cellular	Cellular	Cellular	Subcellular
<b>Morphology assessment</b>	Yes	Yes	Yes	Yes	No	Yes	Yes	Yes	Yes
<b>Throughput (number of cells)</b>	Low to medium	Low to medium	Low to medium	Medium	High	Low	Low to medium	Low to medium	Very high
<b>Throughput (number of genes or proteins)</b>	Low to medium	Low to medium	Medium	High	High	High	Low	High	Low
<b>Estimated efficiency</b>	~90%	~30%	NA	NA	~5–10%	NA	NA	NA	NA
<b>Readout</b>	Microscopy; flow cytometry	Microscopy; flow cytometry	Microscopy; flow cytometry	Microarray; RNA-seq; MS	RNA-seq; possibly MS	RNA-seq	Microscopy	Microscopy	MS
<b>Technical difficulty</b>	Easy	Easy	Easy	Moderately easy	Moderately easy	Moderately difficult	Difficult	Difficult	Difficult
<b>Refs</b>	23,53–58, 60–63	64–68	70,71	72,74,76–78	79–81	82	83	85	87,88

FISH, fluorescence *in situ* hybridization; FISSEQ, fluorescent *in situ* RNA sequencing; ISS, *in situ* sequencing; LCM, laser capture microdissection; MS, mass spectrometry; NA, not available; RCA, rolling circle amplification; RNA-seq, RNA sequencing; smFISH, single-molecule RNA fluorescence *in situ* hybridization; SNV, single-nucleotide variant; TIVA, transcriptome *in vivo* analysis.

# Part 3

The importance of in situ methods



# The importance of in situ methods

原位方法的发展在推动我们生物学研究中整合功能和空间信息的能力扮演者重要角色。这些方法使得传统的功能导向的领域，如分子遗传学和生物化学，逐步汇聚于更加结构偏向领域。

同时，免疫细胞学和免疫组织学的技术已经极大的扩展了我们对于正常的和病理的组织的组织结构的理解，使得形态学分类达到以往不可能实现的水平，特别是对不同癌症类型的区分。

此外，在原位可视化特定的DNA、RNA和蛋白分子的能力已经明显地扩充了分子如何被组织在亚细胞水平的过程的知识。

同样地，使用免疫荧光、荧光融合蛋白或是邻位连接技术来使蛋白的原位可视化一直有助于研究高度空间上组织化的细胞过程，例如囊泡运输，核的出入信号还有内源性复合物的组装。

最后，MS2标记的组合，ParB-INT系统或是CRISPR-Cas系统的显微观察在近期开启了观察和量化精细的细胞事件的可能性，如单分子分辨率的RNA剪切、DNA断裂修复或是直接在活细胞中的特定DNA位点的运动。

# Part 4

The need for spatially resolved omics

## The need for spatially resolved omics

尽管在生物学和医学的多个领域，原位方法已经有了巨大的影响，但许多原位方法的共同特点是，只有少数标记能够在给定的时间内对生物样品进行同时测定。此外，这些测定通常只测量一个分子类型（DNA，RNA或蛋白），从而限制了细胞和组织中在空间上有组织的复杂调控网络的研究。在过去十年间出现的下一代测序技术，现在可能推动在细胞和组织中基因组、表观基因组和转录组环境的无偏测序，揭示已经不能被用传统的基因导向方法发现的系统水平上的设计原则和监管网络。原则上，在相同的生物样品中进行多个空间解析组学测量，而且可以重复过程使得多个样本被在同个源头的不同时间点收集，接着通过高维数据分析以此揭示全新的时空依赖关系，有助于我们理解生物系统操作有多么复杂。

## The need for spatially resolved omics

这种方法的一个直接应用就是去测量染色质状态、基因表达和蛋白质丰度，还有上千个基因在胚胎不同区域的不同发展情况下的活性。空间分辨组学的另一个令人兴奋的应用是去衡量基因表达谱和后生状态在不同心理活动下是如何在时空上被共同调节在大脑中的。这种来自于在大脑结构区域不同时间点的高维数据的获取，能让我们更接近于理解分子和细胞过程如何共同合作产生高级精神功能，如知觉和意识。最后，空间分辨组学方法将极大的评估分子基础和肿瘤内异质性的临床影响。在肿瘤中测定遗传和表型多样性的强烈预期将会有助于预测分子靶向药物的敏感性，并有助于患者在临床试验中的选择。实际上，有超过10个进行中的试验在评估肿瘤异质性的临床影响，这表明了正在开发捕捉瘤内异质性的多种功能的定量方法这一课题上快速增长的兴趣和需求。

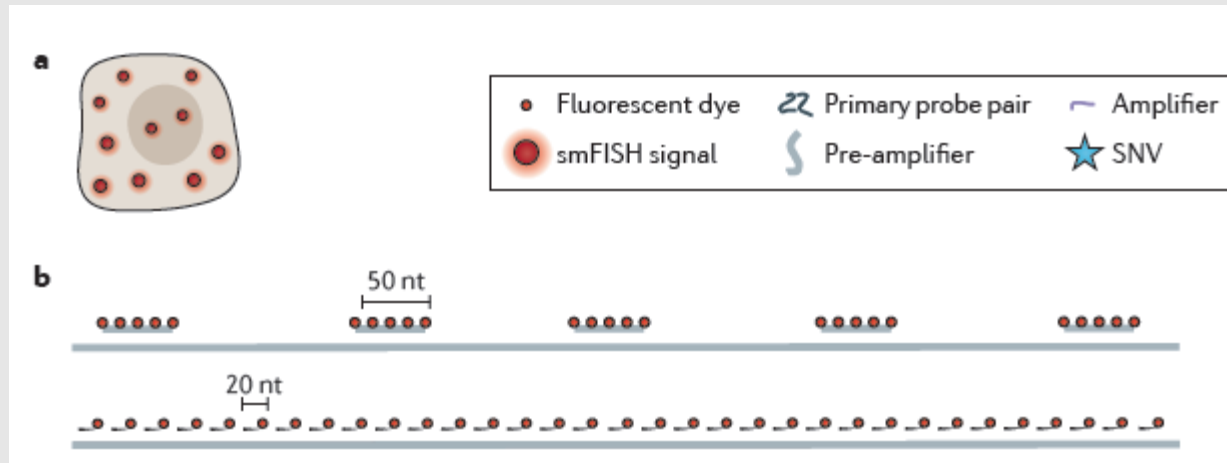
# Part 5

Imaging-based methods

# smFISH单分子荧光原位杂交

在单分子荧光原位杂交中，杂交使用荧光显微镜可以见到单独的mRNA分子，而且在细胞内表现为衍射极限点。使用自动成像处理软件，这些点的数量和位置都可以被准确的测量。

smFISH探针由与特定靶RNA（grey lines）互补和与要求的荧光（red）结合的寡核苷酸组组成。在原来的方法中，使用含有5个荧光的寡核苷酸（长度40-50nt）（upper panel）。另一个供选择的方法使用20-nt长的寡核苷酸（通常它们的30-50），每个用一个单个荧光分子进行标记（lower panel）。



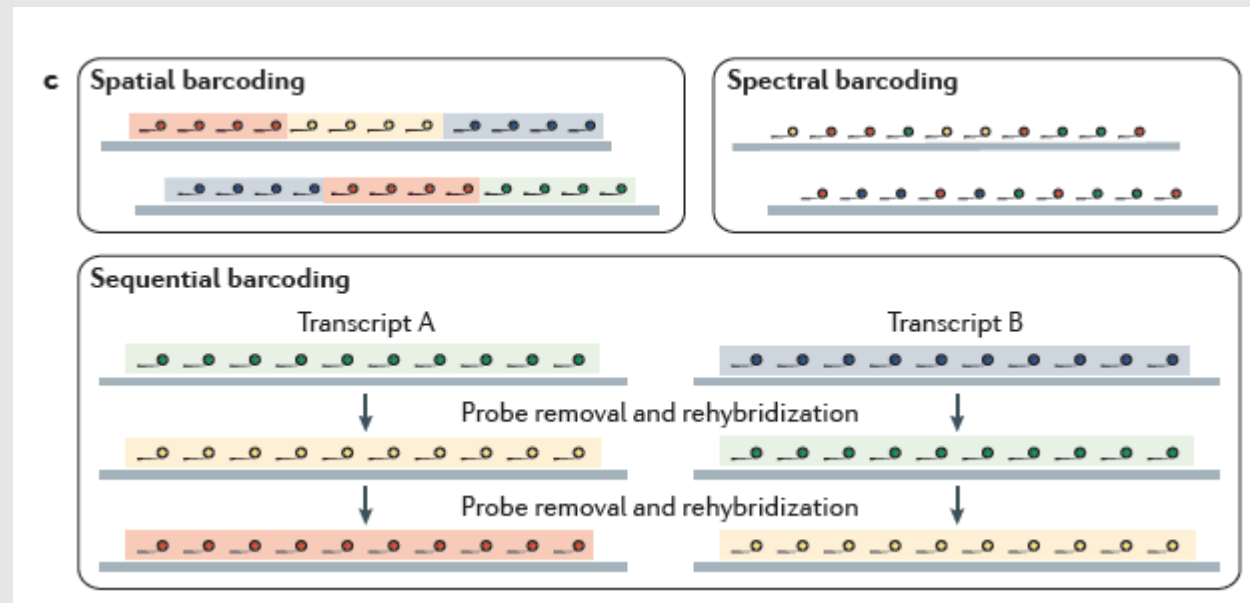
# smFISH单分子荧光原位杂交

使用这个方法，在原位记录15个老鼠肠腺细胞专一性maker转录子的panel，这解决了子胚胎发育中干细胞起源层次结构的得设计原理；smFISH有前景的应用包括剪接变体和融合转录子的探测，尤其在复杂的组织和肿瘤切片去研究空间不均一性；随着单细胞转录组学试验的出现，smFISH也代表一个强大的方法去证实单细胞转录组测量中的RNA表达值，正如目前在老鼠胚胎干细胞中出现的各种转录子。

尽管这个方法在完整的组织中可以定量的测量转录子，但是由于空间非重叠的荧光获得的有限，能够同时可视化的转录子的数目是很小的。

为了增加复用，空间和光谱的mRNA条形码与超分辨率的显微术结合。在空间条形码技术中，在成像后靶转录子的识别是根据不同荧光信号排列在二维空间上的顺序推导的。

这种方法最近的改进中，空间和光谱条形码技术被序列条形码技术的使用所取代。每个转录子的识别通过大量杂交的环，成像和探针移除。在每个环中，使用一个荧光标记的专一性smFISH探针探测一个给定的转录子，而且在成像后使用Dnase移除探针。在下一个环中，用相同的探针但是用不同的荧光标记的探针探测相同的转录子。颜色的时间模式确定为在一个转录子。





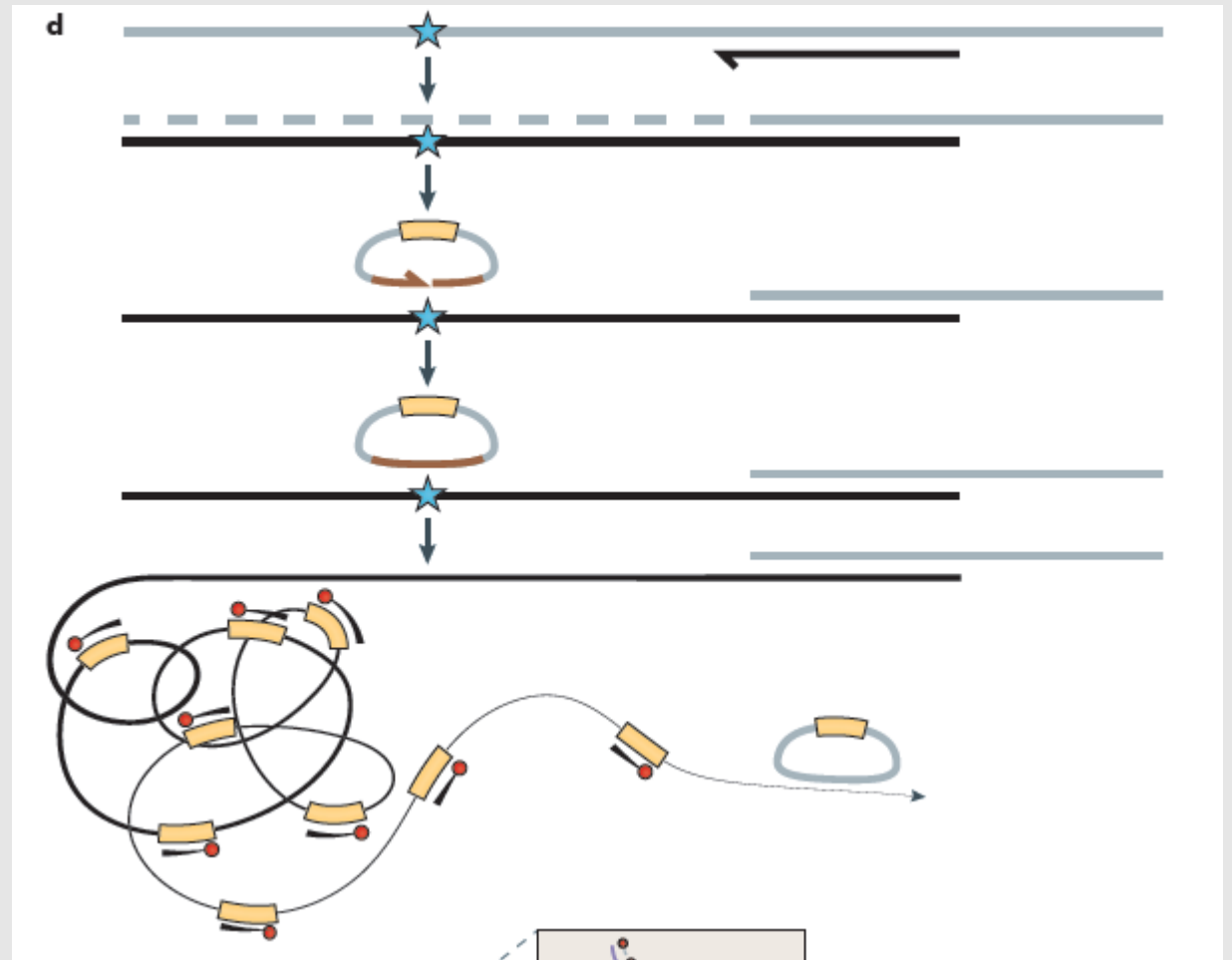
# Padlock probes锁式探针:

每个锁式探针由一个单链的DNA分子组成，长度大约100nt,其5'和3'部分能与与相同的目标进行结合。在杂交时，同源的臂彼此接近，然后形成一个类似环的结构在两个末端之间，同时探针内部部分形成一个环。缺口那时结合在原位，使线性的锁式探针变成一个环。这个过程导致RCP的形成和大量锁式探针序列的copy的积累。

使用互补到linker的荧光标记的探测寡核苷酸，在原位能够看见RCPs是一个明亮的荧光点。由于同源臂的结合依赖5'和3'末端到目标的完美互补，所以点突变的出现将阻止环化和信号的产生。因此，通过设计两种类型锁式探针，其中一个与野生型互补，另一个与突变序列互补，这使得区分两个等位基因成为可能。

由于目标识别需要两个同时结合事件发生和成功的连接，因此这个方法是高度专一的。

使用锁式探针和RCA也能实现RNA探测和基因分型。LNA改造的寡核苷酸（black single-head arrow）填装一个单核苷酸变体（SNV）位点的转录上游。在原位的cDNA制备后，一个锁式探针与靶cDNA杂交，这探针由被一个linker序列（yellow）分离的两个同源臂组成，而且这个探针被环化通过连接在含有相应SNV的分子上。使用一个等温的DNA聚合酶扩充锁式探针，这产生成百上千linker copies局部的积累。最后使用荧光标记的寡核苷酸（red）去可视化RCA产物。

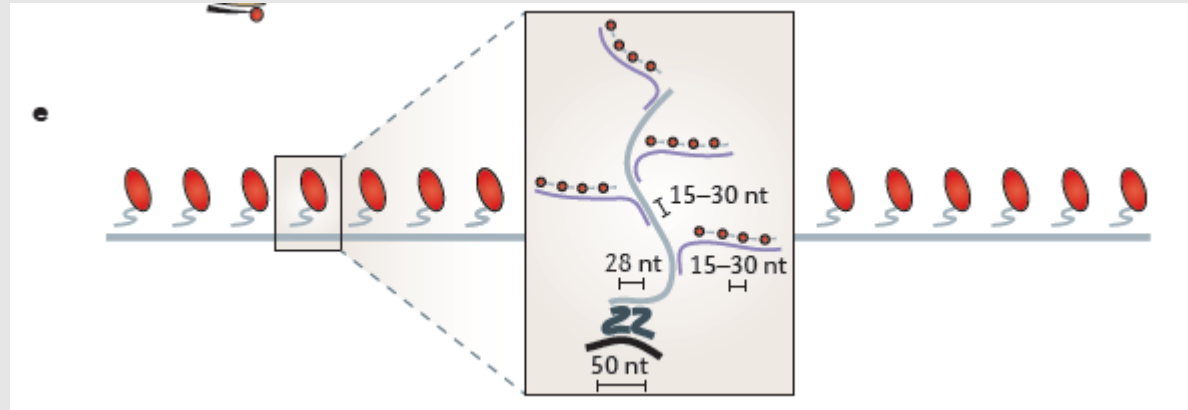


# Branched DNA probes 支链DNA探针

大量基本探针对与目标转录子进行杂交，在杂交的时候，每个基本探针对（**primary probe pairs**）充当一个脚手架位点，通过许多杂交步骤从这些位点建立探针的分枝结构，最后为了放大信号需要补充许多短的荧光标记寡核苷酸。

为了实现原位的高通量的RNA测量，分枝DNA探针与 **automated liquid handling and [high-content imaging](#)** 进行结合，使得928个选择的基因表达能够同时在上百个HeLa细胞中被测量；此外，通过对大量位点标记的共同染色，计算出反应亚细胞mRNA分布的几个权值，这将928个基因分成五类。

这个方法是相当敏感的。但是，一个缺陷是为了实现高通量必须通过同时在板单独的孔中进行上百个特异的杂交反应。这意味着仅仅一个基因的位置和mRNA水平能被测量；另一个缺陷是如果大量的目标进行分析，探针合成的价格很快的增长，这是大多数实验室不能承受的



在支链DNA原位荧光杂交（bDNA FISH）中，设计基本的探针对结合到靶 mRNA 的一个短序列（通常 50 nt）上面。通过在基本的探针对上添加一个长的 pre-amplifier DNA filament（the ‘trunk’），那时形成一个树形的结构，大量 amplifier filaments（the ‘branches’）与这个 filament 进行杂交。最后 amplifier filament 与短的寡核苷酸进行杂交，每个都用一个单个荧光进行标记。基本探针保证高专一性，同时支链结构充当信号扩增器。

# Part 6

Sequencing-based methods

# Laser capture microdissection (LCM)激光捕获显微分离

用激光使细胞或者小组织从特定结构分离的技术，来自这些样品的数据集可以根据已知的原始位置注释,从而保持空间信息。核酸可以从LCM-captured中提取，并用于各种下游应用包括gene expression 芯片 和 RNA-seq。各种全基因组核酸扩增方法,可以应用于扩增LCM提取 DNA和RNA,特别是当laser-ablated区域非常小的时候。

在两个具有里程碑意义的论文,数以百计的胎儿和成人脑提取的RNA的芯片分析，显示了基因网络广泛的结构变异,反映了主要细胞类型的发育的过程和分布。现在这些数据是艾伦大脑图集的一部分,一个全面的资源整合人类和老鼠的基因表达和神经结构的信息。将来,类似空间解析蛋白质组学和其他可能使分析不同发展阶段和不同的疾病过程的应用将进一步扩大这个强大的数据集,铸造新的大脑惊人的复杂性。

## Microtomy sequencing切片法测序

基于从连续切片测序得到的离散组织提取的RNA的转录组空间解析。这种方法,单个薄组织切片提取RNA并进行测序。黑腹果蝇连续切片测序, 鉴定已知和新型空间模式的基因表达, 表明该方法用于复杂结构时不需要单细胞解析度获得空间解析的转录图谱。

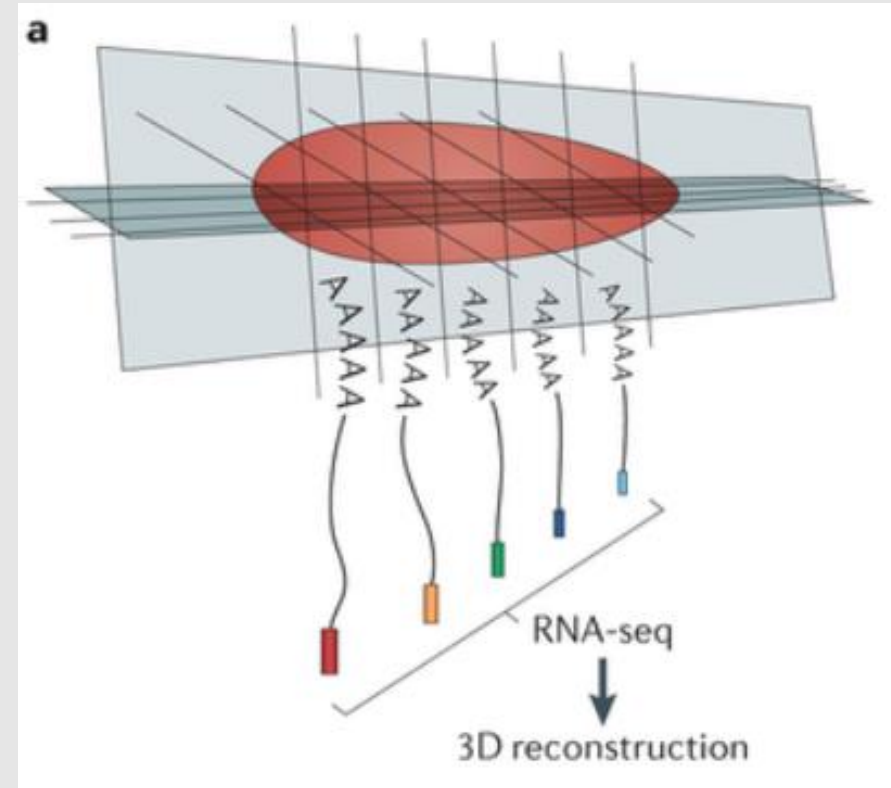
然而需要注意的是,为了制备一个测序文库, 载体RNA必须被添加去检索足够量的来自每个切片RNA, 这限制了从每个部分获得的可用的序列reads数量。此外,单独的文库必须从每个部分, 限制每个部分的数量可以用来测序,因此可实现的空间解析。

# Microtomy sequencing切片法测序

为了提高空间解析率并量化,一种叫tomo-seq的基于早期单细胞转录组的改良方法最近被开发了。

在tomo-seq中,被固定胚胎(或器官或组织)被连续切割成沿笛卡尔轴的小部分,并从每个部分提取RNA。彩色矩形使在RNA-seq之前, RNA从多个部分汇集的。就像用于计算机断层扫描产生的3D转录地图的算法。

使用TRIzol试剂从单个薄切片提取RNA, 脱氧胸苷引物携带特定的条码用于反转录, 在建库前富集样本。除了条码,引物也包含T7噬菌体转录启动子序列,使线性互补cDNA在体外转录,从而相比其他RNA扩增的方法减少放大偏差。





# Microtomy sequencing切片法测序

当相同的样品可用时(如基因完全相同的生物模型),他们可以沿着每一个笛卡尔坐标单独切片来获得在一维,二维或三个维的转录映射。生成二维和三维图需要两到三个相同的样品。

通过应用tomo-seq基因完全相同的斑马鱼(鲑鱼类)胚胎收集在不同的发展阶段, 鲑鱼类)胚胎收集在不同的发展阶段,并使用聚类分析识别相似的基因表达的空间模式,二维和三维的发育转录图动态就生成了,这揭示了以前未知的许多基因的空间格局。

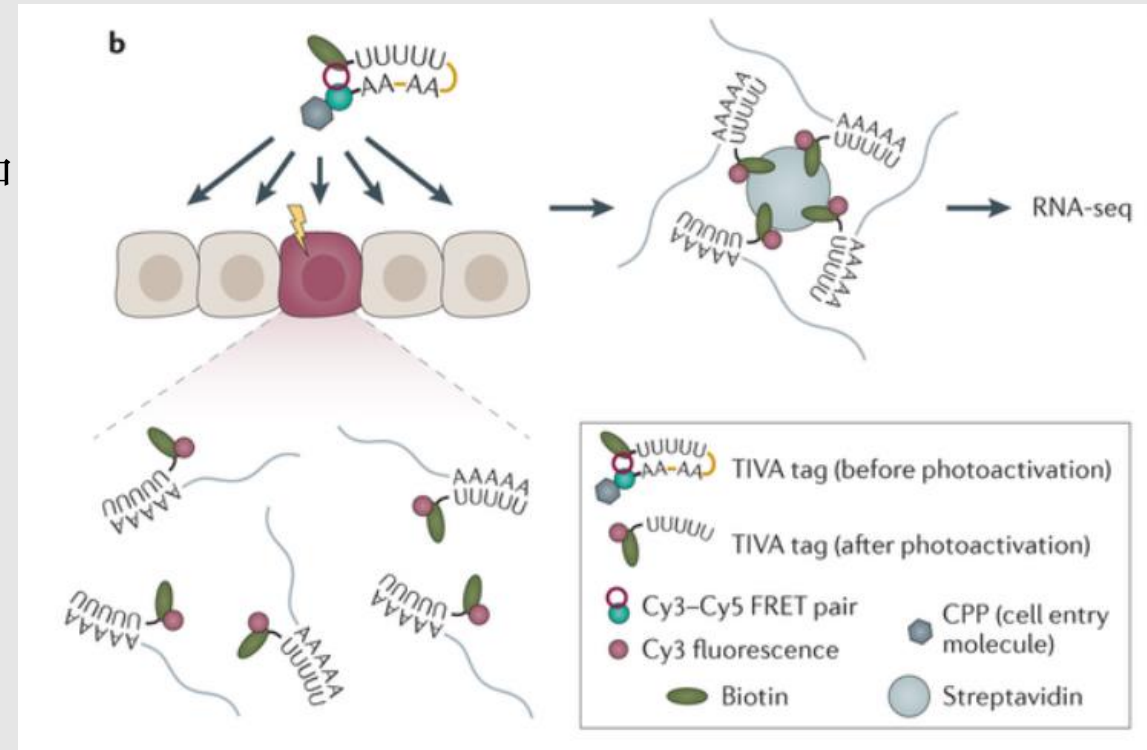
尽管缺乏单细胞决议,这种方法非常简单,可以方便地应用于其他发展系统,以及成人器官或大的解剖结构,提供一个前所未有的基因表达的空间的图。

# transcriptome in vivo analysis (TIVA)体内转录组分析

另一个最近开发的解析转录组学方法是基于RNA提取和测序的体内转录组分析 (TIVA)。

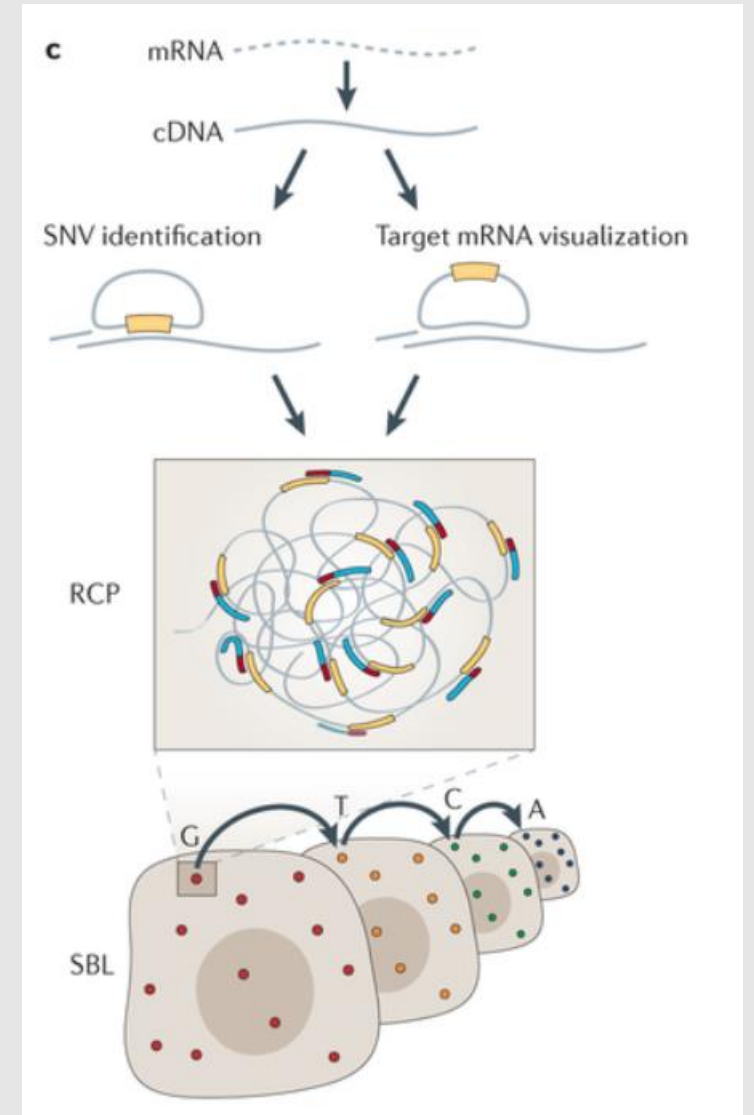
在体内转录组学分析(TIVA), 通过细胞穿透肽(CPP)引进一个光激活的生化素标签到活细胞中。标签包含一个多聚(U)序列,两个通过linkers(brown)连接的多聚(A)片段mask了序列

在选定的细胞或组织的光活化过程中(紫红色), 多聚(A)片段被释放使mRNA分子可以被释放的多聚(U)TIVA标签固定,Cy3-Cy5 pair被用于的吸收信号和基于荧光共振能量转移(FRET)的信号标签脱落。最后, 多聚(A)片段尾巴mRNA分子被释放的TIVA标签识别, 利用链霉亲和素捕获并被用于RNA-seq过程。



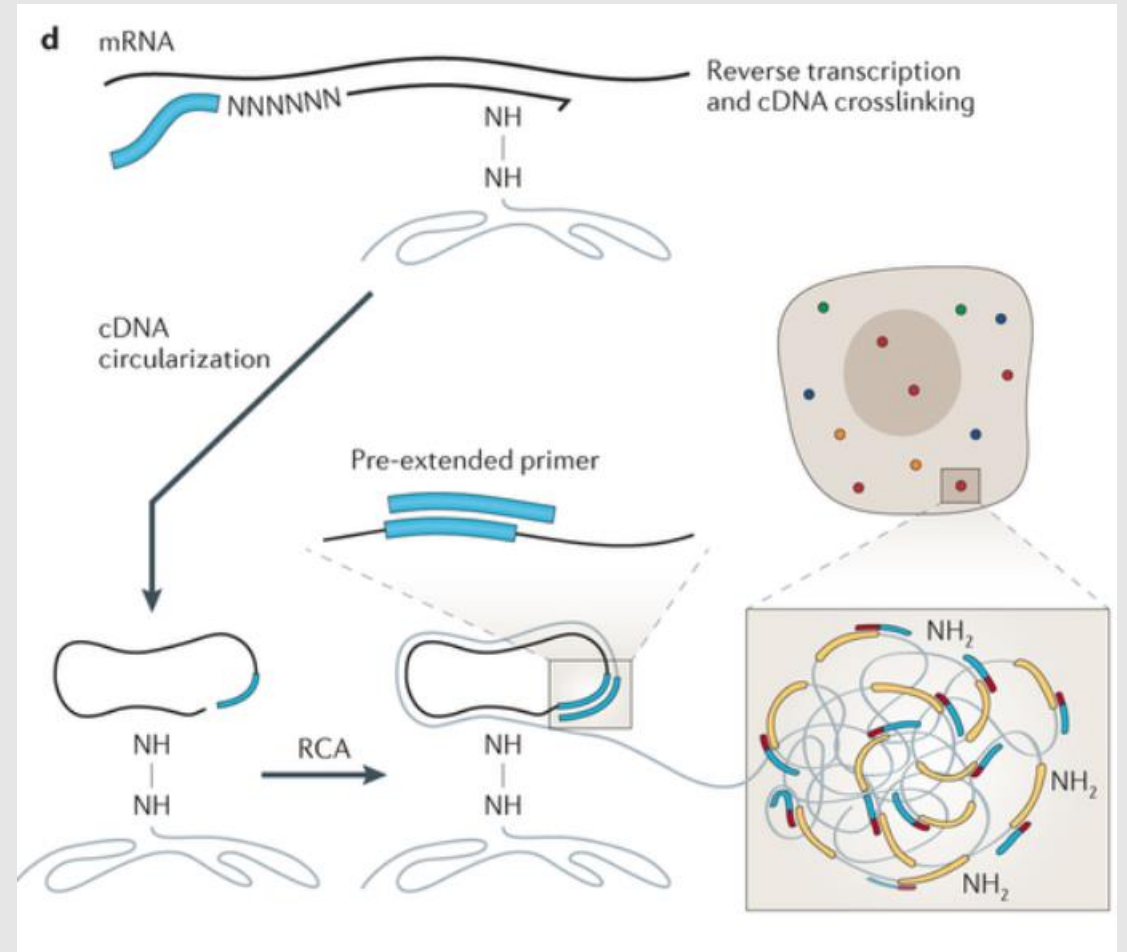
# In situ sequencing 原位测序

在原位RNA-seq中，RNA被转换到cDNA，接下来通过特定目标锁式探针的，探针环化，滚环扩增和RCP的形成。捆绑测序(SBL)引物(青色)被用于去解码序列(yellow),序列要么是包含SNV(left)四个碱基的片段或者是包含在锁式探针(right)的一个特定目标四个碱基的序列条码。在每个测序步骤中，RCPs在细胞中是明亮的荧光点，根据当时每个点颜色的顺序推断出碱基的排列顺序。



# fluorescent in situ RNA sequencing (FISSEQ)原位RNA荧光测序

在原位RNA荧光测序中，使用带有5'标签(青色)的随机六聚体在固定细胞中反转录RNA，而且cDNA被环化和交叉结合到细胞蛋白矩阵。环化cDNA的互补到标签的向前的寡核苷酸引物RCA和因而发生的RCP交叉联合到细胞蛋白质矩阵上,使用SOLiD SBL去测序标签下游的30个碱基。



# Part 7

Emerging spatially resolved omics

## Emerging spatially resolved omics

除了使RNA测序在空间定义上的方法以外，基于质谱流式细胞技术的两个标志性方法已经被开发出来，用以支持空间分辨测序的多种蛋白质和组织切片中的翻译后修饰。

为了保留空间信息，扫描激光被用来切除质谱标记的组织切片沿着锯齿形路径铺设到固体载体上。在激光切除时，这个组织材料被通过高温等离子体送出，接着用质谱分析法进行分析。通过同步激光切除需要样本被送到质谱仪，<sup>100</sup>S和<sup>32</sup>S蛋白质和蛋白修饰同时被高空间分辨率测定在福尔马林固定、石蜡包埋的乳腺癌组织切片。

这些技术为空间分辨蛋白质组测序铺平了道路，并且它们也有潜力去引发下一代免疫组化方法，将会彻底改变我们对疾病过程的理解。

# Part 8

Conclusions and perspectives

# Conclusions and perspectives

我们预计这些空间分辨转录方法的系统应用在未来的几年会在许多领域产生深远的影响，如揭示在正常和病变组织器官的复杂转录网络的空间结构，及发现细胞内RNA的局部化模式和调查其功能影响。

同时，空间分辨蛋白质组学的技术也不断出现，我们预计这将很快扩展到其他组学学科，如基因组学和表观基因组学。

所有努力的最终目标是制造出成千上万种不同的分子状态的全面的系统水平的图像，使我们更接近于在系统水平上地理解复杂的多细胞有机体的功能是如何在数百万个分子同时的协调行动下完成的。



## Conclusions and perspectives

空间解析组学的道路依旧漫长，并还在等待大胆的新技术呈现。

我们设想的在空间分辨转录组学的方法和技术的发展，以及其他更普遍的空间分辨组学将遵循两个互补的途径。

在第一个途径是，新方法将会被开发在可直接在原位检测大量的DNA和RNA分子，无论是用成像还是测序设备。支持自动化和快速周期的smFISH杂交、成像、探针剥离的设备的发展，将会使从大的组织区域的单细胞的上百个基因的表达在短时间被测定出来，并且费用是可以承受的。强烈的smFISH信号在特殊的杂交条件下只需5分钟就可被测定出来。同时单个细胞的DNA和RNA的定量也成为可能。此外，能够在低倍镜下就可进行大的组织区域的DNA和RNA的多路原位测量。同样的，它也很有可能用大量努力来尽力适应现有的DNA和RNA测序方法，使得它们能够直接被应用到细胞和组织切片上。

## Conclusions and perspectives

第二个途径对空间分辨组学的新方法和技术的发展会将核酸编码和全基因组扩增方法整合在测序技术中。

核酸或完整的染色质可以从整个组织切片中分离出，如切片测序，或是用LCM从小的组织区域得到。从每个部分或区域得到编码和核酸的扩增，接下来是样品池和构建测序文库，将使来自多个组织切片或区域的DNA和RNA的可测序同时开始。空间分辨的表观分析也可能适用于基于使用核酸扩增方法。

今后一个主要任务是开发方法，同时进行全基因组和全转录组编码并提高空间分辨率，同时为了后续针对性的分析使细胞和组织完整。

这些努力将极大得益于提高组织透明度和渗透性的方法，使得组织标记并深成像在完整器官周围。

我们相信，空间分辨组学会快成为一个成熟的领域，并将大大推进我们对复杂的多细胞生物的了解。

谢谢观看