



利用尼康Ti2-E显微镜，使用CARTANA原位测序方法勾勒出大脑细胞类型的分类图谱

CARTANA提供的原位测序（ISS）试剂盒允许科研人员以空前的高通量和单个细胞分辨率直接检测来自组织切片内部数百个基因中的转录情况。尼康Ti2-E倒置显微镜通过其（完美对焦系统4）焦点锁定技术和自动化载物台与大图像拍摄能力的结合使得这一应用成为可能。本应用说明展示了在小鼠脑切片空间背景下，ISS技术在映射转录细胞类型中的应用。

原位测序（ISS）

ISS技术能够在组织切片形态学的原始位置进行数以百计的亚细胞分辨率层面的分析。这是通过直接在这些组织切片中，利用基因特异性探针与样品结合，引入同源扩增条码序列而实现的。ISS相对于其他多元原位杂交或空间测序方法的关键优势在于它有着较高的特异性和通量（每台显微镜每周约15 cm²组织区域）。

CARTANA (www.cartana.se) 已将ISS推向市场，可以提供包含用户定制化基因Panel的样本制备试剂盒（图1a）和具有优化解码化学的ISS试剂盒。在样本制备环节，首先在已检出RNA分子的原有位置上产生0.5-1μm条形编码DNA斑点（图1b-d）。然后使用ISS试剂盒和落射荧光显微镜在组织切片内部直接对这些DNA斑点测序。ISS反应循环期间，带有荧光标记的探针会反复结合、成像，最终被移除，使得能够在DNA斑点上直接读取条形编码序列（图1e-g）。CARTANA ISS化学的核心优势是高荧光强度和高信噪比，使得用低放大倍率物镜成像成为可能。因此，组织大面积的ISS反应成像速度快，与其他原位转录组分析方法相比显著提高了检测通量。

ISS期间的荧光成像

尼康Ti2-E倒置显微镜尤其适合ISS片段的高通量成像。完美对焦系统4（PFS4）对焦锁定系统和电动载物台为无中断高通量分析提供了稳定支持，使您可以放心进行复杂的多维数据采集，包括大图扫描，Z轴成像和多通道荧光成像。Ti2-E允许每次实验同时用多至九个载玻片在多个完整组织切片内执行高质量ISS。

Iván Hernández, Xiaoyan Qian, Jana Laláková,
Toon Verheyen, Markus Hilscher and Malte Kühnemund*

CARTANA AB, Nobels väg 16, 17165 Solna, Sweden.
*e-mail: malte@cartana.se; john.allen@nikon.com

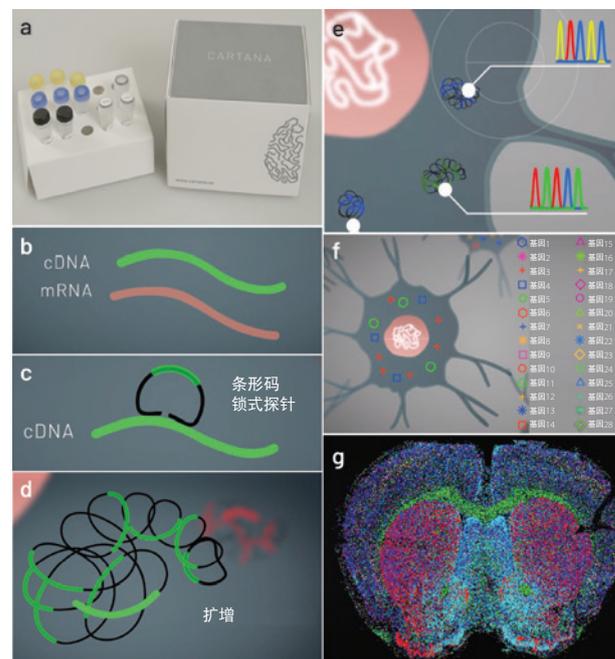


图1. 高通量空间转录组分析的CARTANA ISS技术。 a: CARTANA样本制备试剂盒。b: 实验组织内的mRNA用细胞类型特异性标志物固定，并等待反转录为cDNA。c: 条形编码探针被杂交并结合到目标cDNA上。d: 结合探针被局部扩增，得到含有多个条形码副本的DNA斑点。e: 条形码通过五次ISS化学反应和荧光成像在组织中完成测序。f: 条形码序列解码之后，检出的基因标志特征分配给每个DNA斑点。g: 目标基因在完整组织切片中被可视化。

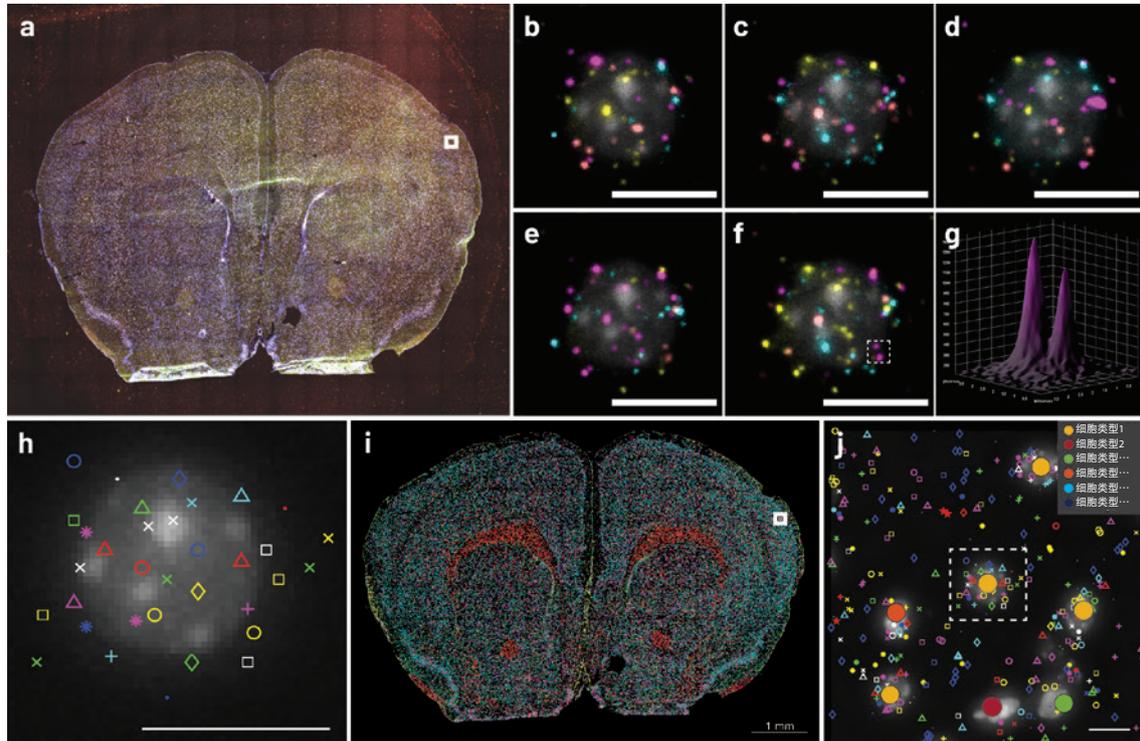


图2. 用CARTANA ISS进行脑细胞分类。 a: 样本制备和一个ISS循环后用尼康Ti2-E显微镜成像的完整组织切片的原始多色图像。b-f: a中白色方块区域的特写，表示正在经历五个ISS循环的单个细胞。g: 表示f中虚线框内两个测序DNA斑点荧光强度 (a.u.) 的表面图。h: 条形码被解码，以便将基因标志 (伪彩标记) 分配给每个DNA斑点。i: 产生的完整组织切片的细胞类型图谱。每个细胞根据相近的基因标志和无监督聚类而被赋予一种细胞类型。j: i中白框的放大视图，虚框与h中的细胞对应。标尺，10 μm (b-f、h、j)。

运用ISS量化小鼠脑切片单个细胞中的RNA分子

固定新鲜冷冻的10 μm 小鼠脑切片，并使用包含定制探针板、以150个中枢神经系统标志基因为靶向的CARTANA样本制备试剂盒制样，为ISS作准备 (图2a)。然后用高信噪比CARTANA ISS试剂盒化学法对产生的条形编码DNA斑点进行测序 (图2b-g)。接着，解码所有DNA斑点的特征并以亚细胞分辨率层面完成150个靶向基因的空间映射 (图2h-j)。

使用具有20倍物镜和sCMOS相机的Ti2-E显微镜对脑组织切片 (8.3 mm x 6.2 mm x 10 μm) 的每个ISS循环成像。在预扫描中定义显微镜载玻片上的组织区域，使用尼康NIS-Elements软件优化相机曝光和调整其他设置。

之后，对五个荧光通道：用于细胞核可视化的DAPI通道和四个ISS化学通道——完成由165个视场 (单个视场之间10%重叠) 和15个z平面 (步长0.8 μm) 组成的自动图像采集。该组织尺寸的一个ISS成像循环在不到1小时内完成。解码150个靶向基因的条形码时，需要五个ISS循环。可增加一个针对抗体染色的可选循环。图像采集后，用NIS-Elements软件完成最大强度荧光投影、大图像拼接和图像导出。

用ISS完成原位细胞类型分类

每个解码DNA斑点的合并分析会产生完整组织区域上的高密度基因表达图谱 (图2i)。可利用DAPI细胞核染色分割单个细胞并通过空间接近性分配ISS基因片段 (图2j)。得益于其高通量的特点，ISS非常适合通过单个细胞RNA测序定义组织切片中细胞类型的映射。产生大空间细胞图集可以分析独特的基因表达谱和不同细胞类型之间的关系，包括组织及其结构。

展望

CARTANA开发的样本制备方法和ISS试剂盒连同尼康Ti2-E显微镜系统和NIS-Elements软件构成了以单个细胞层面为分辨率、高通量和高特异性对数百个基因进行定量空间分析的强大实验解决方案。这一技术可能在很多研究领域带来科学突破，包括神经科学、肿瘤学、免疫学和胚胎发育领域，能够产生关于细胞和分子生物学的新见解，并支持诊断和治疗的发展。