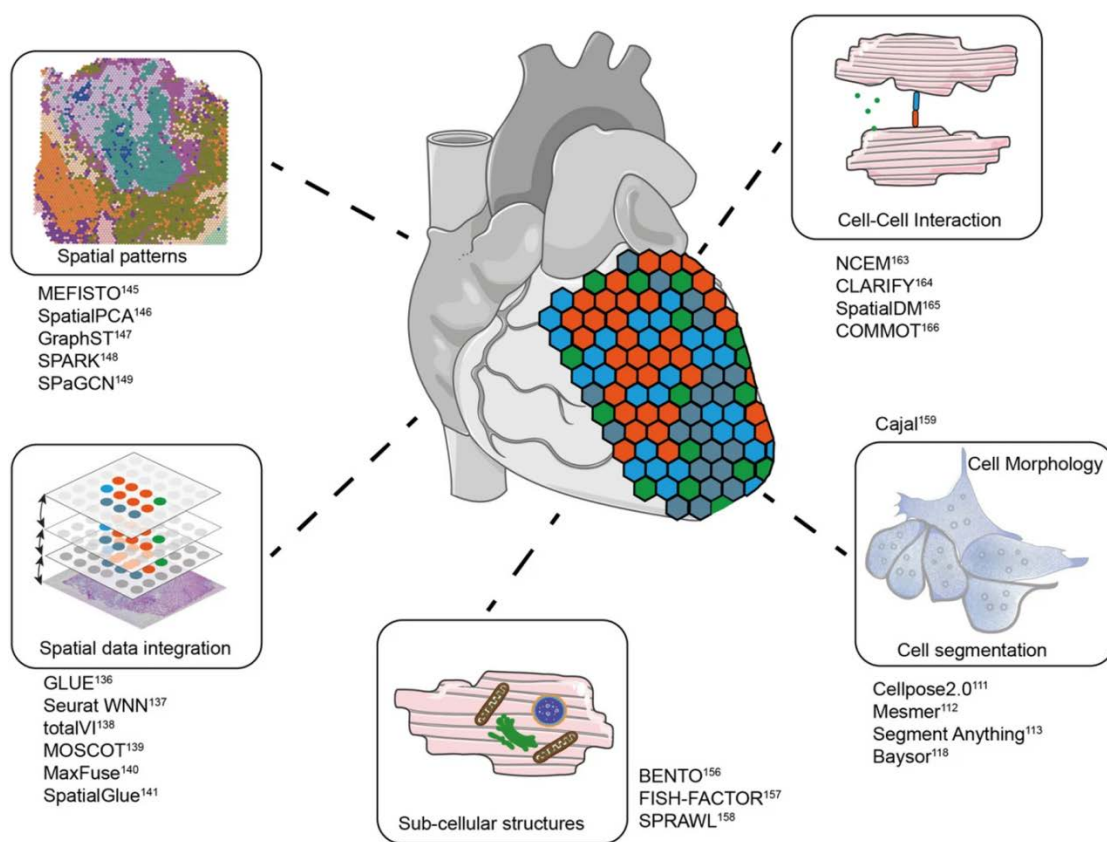


蜂巢

第7期
202403月



Overview of key areas of analysis enabled by spatial multi-omics and example software implementations.
(Genome Med. 2024. Doi: 10.1186/s13073-024-01282-y.)

服务内容与形式

蜂巢

2024/03



委托
检测

仪器
共享

项目
合作

技术
培训

科研
咨询



平台
管理

平台
建设

实验
教学

人才
培养

技术
研发

目录

蜂巢

2024/03



□ 前沿科技

- Dragonfly在空间转录原位测序和多重成像的应用 1

□ 实验技术

- 使用Applied Biosystems™实时定量PCR仪进行绝对定量检测 3
- 贴壁细胞的透射电镜样本制备方法 5
- 中药颗粒成分检测技术及应用 6



应用分享 | Dragonfly在空间转录原位测序和多重成像的应用

牛津仪器科技(上海)有限公司 杨驰宇

研究挑战

对生物发育、脑功能、神经退行性疾病以及癌症的分子机制和行为的了解是一项繁重的工作。直到最近，高通量以及单细胞水平的RNA测序推进了科学家对上述问题的进一步了解，但遗憾的是对于组织环境相关信息了解的比较少。单分子荧光原位杂交(smFISH)技术帮助科学家获得RNA的空间信息，但是也仅仅针对少量的可以区分的基因才能实现。

获取2D(最好是3D)组织环境的信息能够帮助建立基因表达网络，从而揭示组织功能和相关疾病的潜在机制。现代细胞与分子生物学的圣杯是通过同一块样品上的多个(Xⁿ)RNA信息的绘制探究整个样品中的基因表达网络。

细胞生物学中的多重检测指的是在2D或者3D的层面对多个(Xⁿ)RNA(或者其他生物分子)进行检测。**多重检测**是目前科研中的研究热点，在神经科学、肿瘤生物学、疾病靶向诊断、发育及行为学分析等科研中都发挥着重要的作用。多重检测能够获取多个基因产物的空间和序列信息，由此新技术发展起来的会产生重大影响的应用数量将会持续快速的增加。

在RNA生物学中，已经有许多发展起来的技术能够实现多重检测。每种技术都有其优点和缺点，但都有相同的目标，即建立基因表达的空间(视觉)图谱，及其与细胞和组织背景的关联性。类似的技术包括：FISSEQ(2)、instaSEQ(3)、osmFISH(4)、STARmap(5)、MERFISH(6)和seqFISH(7)。这些方法在科学界的相关性正在不断增强。其重要性的一个例子是，**空间解析转录组学**被Nature选为2020年度方法。

为了识别细胞(组织)内基因表达量，必须在同一样品上依次进行几轮杂交及检测。这种连续样品处理和图像采集过程一般是在搭载了微流控显微成像系统上完成。工作流程一般为：在杂交RNA分子上标记荧光探针，显微镜获取三维图像数据，然后洗去荧光探针，完成每一个图像数据的采集之后，开始下一个清洗-杂交轮次。经过多次的重复后，获取样品的大量待分析图像数据。

图1为典型的图像数据集，展示了经过6个轮次的STARmap流程后获取的图像数据。图像中的每一个不同颜色荧光点代表着RNA序列中的每一个核苷酸；紧接着多重标记和图像采集之后的是离线的数据分析流程，这个流程将图像数据转化为这一次实验中所有靶向基因的表达图谱。

在这个流程中，为了完成多重检测实验，需要克服几个挑战：比较基础的技术问题包括自动程序、采集速率、灵敏度和分辨率、光漂白、视场均匀性和数据通量；图像数据采集之后，有几个生物信息学的挑战需要考虑。无论是否存在偏移和非线性形状变化，每个视野(三维空间)内的数据必须是空间上匹配的，以保证按照顺序标记的核苷酸的准确测序并且明确分配到某一基因产物或者mRNA分子。

技术方案

基于二维成像相机的多点共聚焦系统非常适用于多重原位成像。此类成像系统要求具有较低的背景噪音，较高的灵敏度及分辨率以获取目标基因产物的精确定位。由于实验程序的复杂及持续时间长等特性，**采集速度**是获取更高产出数据量的重要参数。所以，能够同时获取多个波长的数据也是锦上添花的特征参数。

样品的相同区域需要多次重复成像，因此程序的每一轮次都要求系统具有高度稳定性。系统必须在多个轮次的成像及连续标记期间保持聚焦稳定性，在此期间微流控的温度和条件有可能发生了某些变化。

成像系统必须能够提供温和的成像条件，在尽量低的光漂白的环境下获取数据。为达成此项条件，探测器必须满足**高灵敏度**和**高动态范围**，不仅仅需要能够采集弱光信号，还需要捕捉样品发出的所有信号。当细胞核的DNA信号也作为采集程序的一部分时，信号可能在几个数量级之间变化。因此，高动态范围是探测器必须具备的参数。

对几个平方毫米范围的组织进行的三维成像时，需要在较高的成像深度上获取高分辨成像数据，因此理想的成像系统所有激发光在**成像视野的照明**必须是高度均匀的，保证多视野拼接获得的数据集的成像质量，在整个成像范围内保持高信噪比、有助于靶向产物的精确检测、识别及成像绘制，为下一步的分析提供保证。

单轮次的多重原位成像过程可能会耗费几个小时，6-10个轮次的整个流程花费的时间可能超过24小时。因此，软件、硬件和微流控系统可以整合并同步执行其各种任务是非常重要的。这种集成必须是满足操作灵活并且按照实验需求自主调节实验流程。

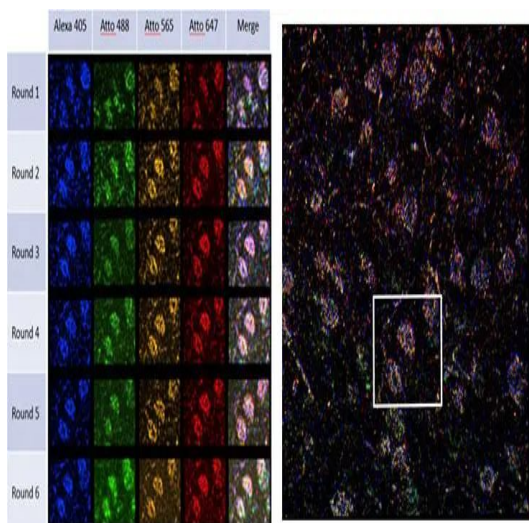


图1-使用STARmap对小鼠海马连续标记，由Dragonfly成像。左图为展示的20微米厚度的单个视野MIP图，拍摄调节为4个通道，71层（0.3um单层）；右图展示的是拼接而成的大视野图像。资料来源于纽约哥伦比亚大学基因组学中心的Abbas Rizvi博士。

成像解决方案 ANDOR多重原位杂交成像

Dragonfly高速共聚焦成像系统非常适合原位杂交成像。从硬件上来说，Dragonfly属于**多点扫描**共聚焦系统，为科研工作提供高质量的共聚焦图像，同时具有非常高的成像速度(最高400fps)；同样重要的是，Dragonfly也具有较大的成像视野(FN22)，这保证了对较大块状样品的快速采集；此外，双微透镜转盘系统与ANDOR高动态范围和高QE相机(如背照式Sona sCMOS和iXon EMCCD系列相机)保证了整个系统能够采集到来自于样品的所有信号(从最弱到最强的信号)。

采集多重原位实验的数据时，对于**视场照明的均匀性和数据通量**有很高要求。ANDOR专利的Borealis照明系统保证了Dragonfly在整个成像视野中具有优良的均匀性，同时对多个视场和多个波长进行成像，有效的提高了数据通量。

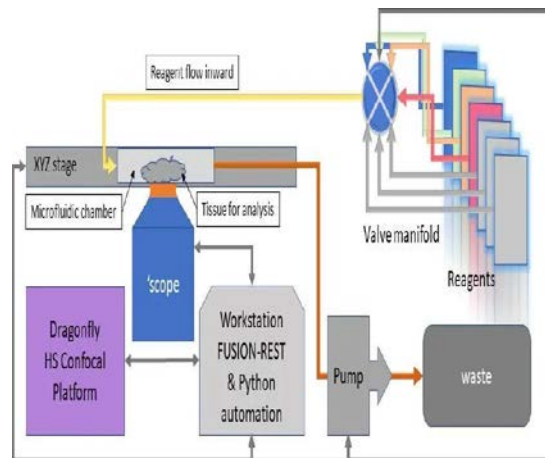


图2-基于Dragonfly的原位测序微流控系统(ISS)

最近ANDOR将REST-API功能耦合进Fusion软件，允许从外部程序(如Python, LabView, MatLab)控制Dragonfly。这样就在Dragonfly与微流控系统间建立了通讯关系，用于杂交、标记、清洗相关试剂的连续流入；Dragonfly控制硬件用于图像采集；此图像采集功能可以按需触发以保证同步获取多通道三维数据。研究人员一旦熟悉编译环境，更容易控制微流控和成像程序的改变，图2展示了整个操作流程。

Dragonfly具有**高速、高分辨成像能力**，与**大视野成像、优良的本底抑制以及专利的Borealis均匀照明系统的能力**使Dragonfly成为研究原位测序（转录组学）的强大工具。这些功能与REST API结合后为科研工作者提供高度灵活的多重成像系统。



使用Applied Biosystems™实时定量PCR仪 进行绝对定量检测

病毒与免疫实验室/王晓宇

1 定义

实时荧光定量PCR (Quantitative Real-time PCR) 是一种在DNA扩增反应中, 以荧光化学物质测每次聚合酶链式反应 (PCR) 循环后产物总量的方法。通过内参或者外参法对待测样品中的特定DNA序列进行定量分析的方法。

2 步骤

2.1 双击桌面图标开启Design and Analysis Software v2。

2.2 进入主界面以后, 点击“SET UP PLATE”。

2.3 选择合适的模板:

在左侧条框中选择以下过滤条件 (图1)。

Instrument——使用的仪器

Block——加热模块的型号

Run Mode——PCR模式 (快速或者标准)

Analysis——实验类型 (标准曲线实验选择

Standard Curve)

选择好后, 会在右侧显示出对应模板, 点击进入模板。如使用SYBR Green染料法, 可选择“PCR with Melt”作为起始模板。

2.4 进入Run Method界面, 设定PCR条件:

反应体积、退火温度、延伸时间和循环数等 (图2)。如需添加或删除反应阶段 (Stage) 和反应步骤 (Step), 可将鼠标放在对应位置, 点击加减号进行更改。

2.5 进入Plate Setup界面, 进行反应板设置。

输入样本名 (Sample) 和基因名 (Target)。

在右侧样本信息栏 (Samples) 内点击 添加新的样本: 输入样本名称 (Name)、样本扩增曲线的颜色 (Color)、样本类型 (Type) 和生物学分组 (Biological Group), 如果是标准品, 输入标准品浓度 (Quantity)。未使用的样本点击 去除。标准曲线实验常用样本类型: Standard (标准品)、Unknown (待测的未知样本) 和 Negative Control (阴性对照)。在右侧基因信息栏 (Targets) 内点击 添加新的基因: 输入基因名称 (Target)、该基因扩增曲线的颜色 (Color)、该基因探针的报告荧光基团 (Reporter) 和淬灭基团 (Quencher), 如果使用的是SYBR Green染料, 或者淬灭基团是其他形式的非荧光淬灭基团 (如BHQ) 在Quencher处选择None。

添加好后在左侧96孔板中进行样品板的排布。利用鼠标单选或拖拽以选择反应孔, 然后勾选右侧的样本和基因前, 完成所有反应孔的样本和基因信息排布。

2.6 点击96孔板右上角, 在下拉菜单中选择“Standard Curve Setup”, 进入右侧 Standard Curve Wizard界面, 输入或选择如下信息:

①标准品名称; ②基因名; ③标准品梯度稀释浓度个数 (建议做五个梯度) 和重复数 (建议做三重); ④起始标准品浓度 (建议从低到高浓度加入标准品); ⑤梯度稀释倍数 (如, 浓度以5倍递增, 选择5 x); ⑥选择标准品在96孔板上的位置是自动生成 (Automatically) 还是自己手动选择 (Manually, 需要在96孔板上选择标准品所在孔); ⑦选择标准品是按照行 (Rows) 还是列 (Columns) 排布; ⑧ 点击Apply, 完成标准品设定。

2.7 在Run Summary中查看设置:

①PCR程序 (Review Method) 和②96孔板样本和基因排布 (Plate setup)。确认无误后点击③右上角 Actions, 进行保存 (Save或者Save As), 输入名称, 设定好保存路径, 保存模板。当仪器与电脑已经处于连接状态, 软件上显示仪器信息, 点击Send to Run Queue, 完成后点击 Done, 完成模板上传。

2.8 开始实验:

到仪器端, 将96孔板或者八连管按照设定的排布放入仪器。在屏幕上点击“Load Plate File”。在Properties下选择保存路径, 所有实验结果会自动保存在仪器上。设置结束后, 点击Start run, 开始实验。

2.9 监控实验运行状况。

可通过仪器触屏监控实验运行情况, 通过左右滑动, 获取不同信息。可在DA2软件上监控实验运行情况 (暂时只能看到实验剩余时间, 无法看到实时扩增曲线)。

2.10 数据传输和下载: 实验结束后屏幕上显示“Run Completed”和实验结果传输位置, 点击Done。如果需要下载之前实验的数据, 可回到仪器主界面, 点击Settings→Run History, 选择要导出的结果文件, 进行导出。

2.11 在DA2软件上查看和分析结果。

注: 部分资料来源: Applied Biosystems™说明书

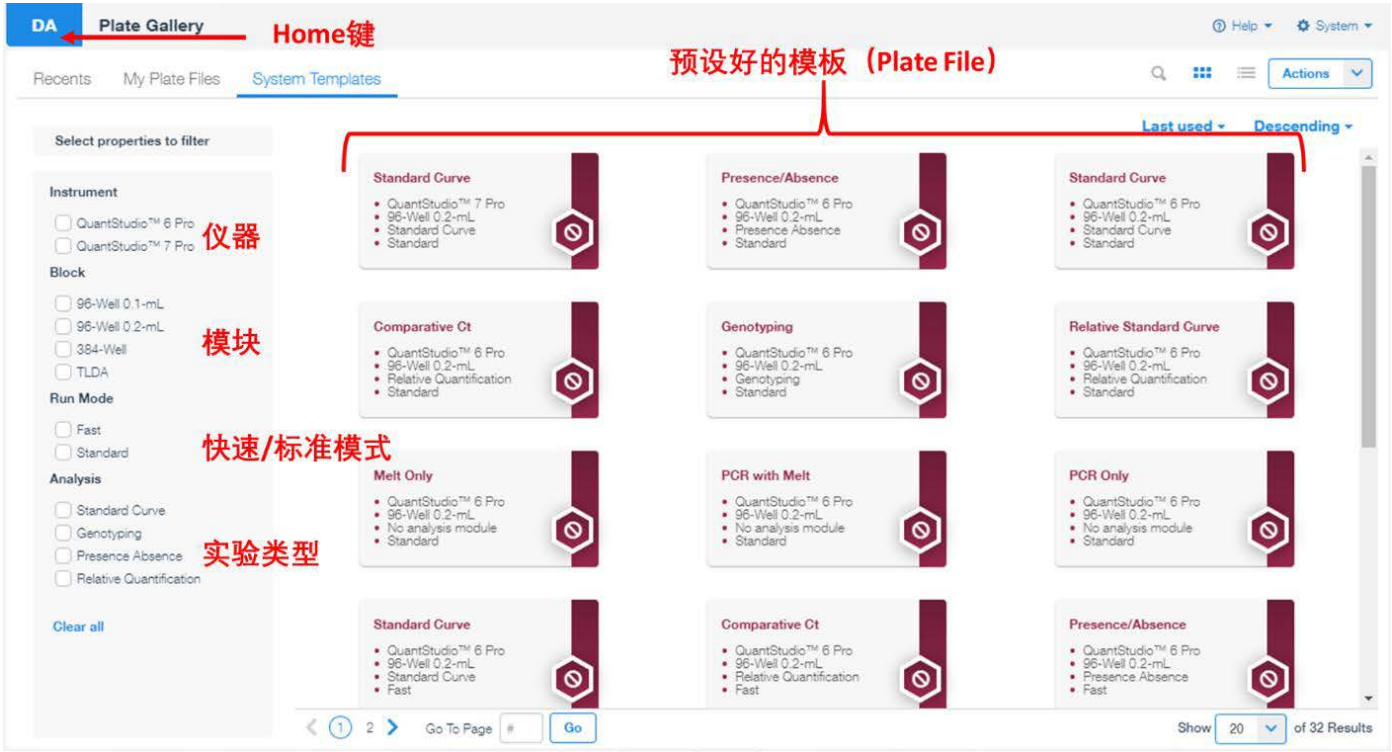


图1

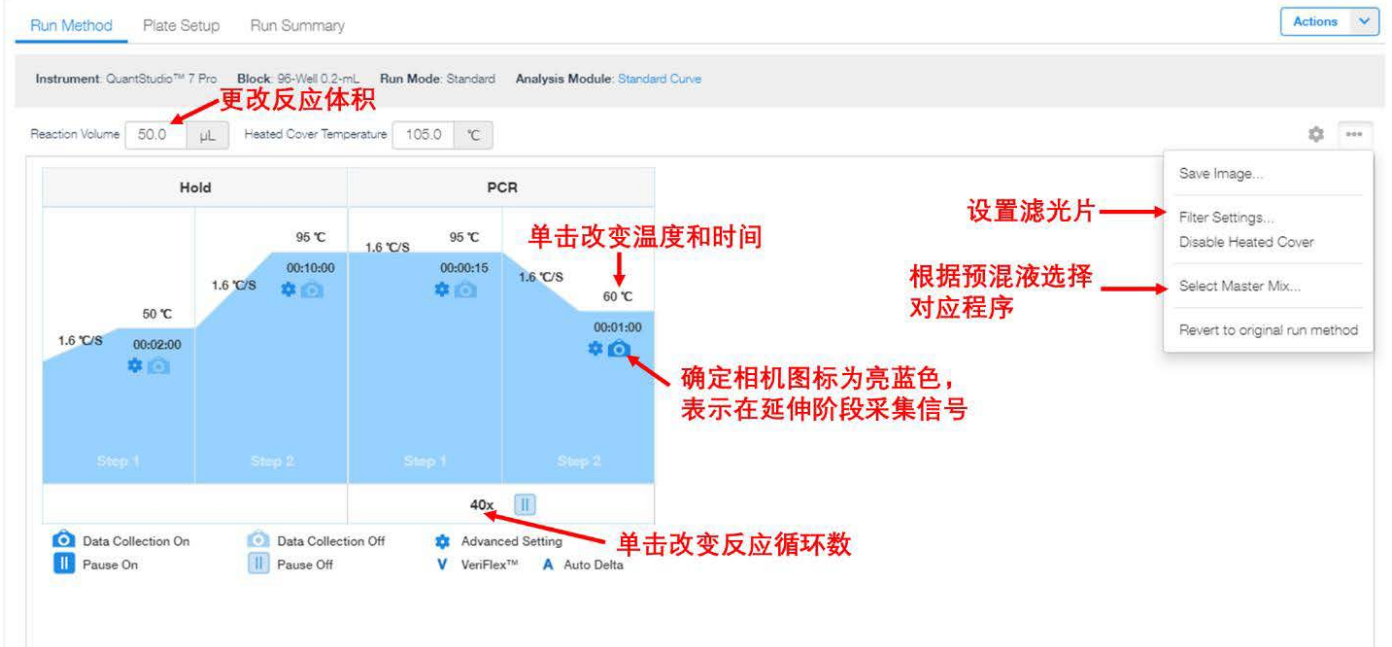


图2

贴壁细胞的透射电镜样本制备方法

细胞生物与组织病理学实验室/姜逸

1 引言

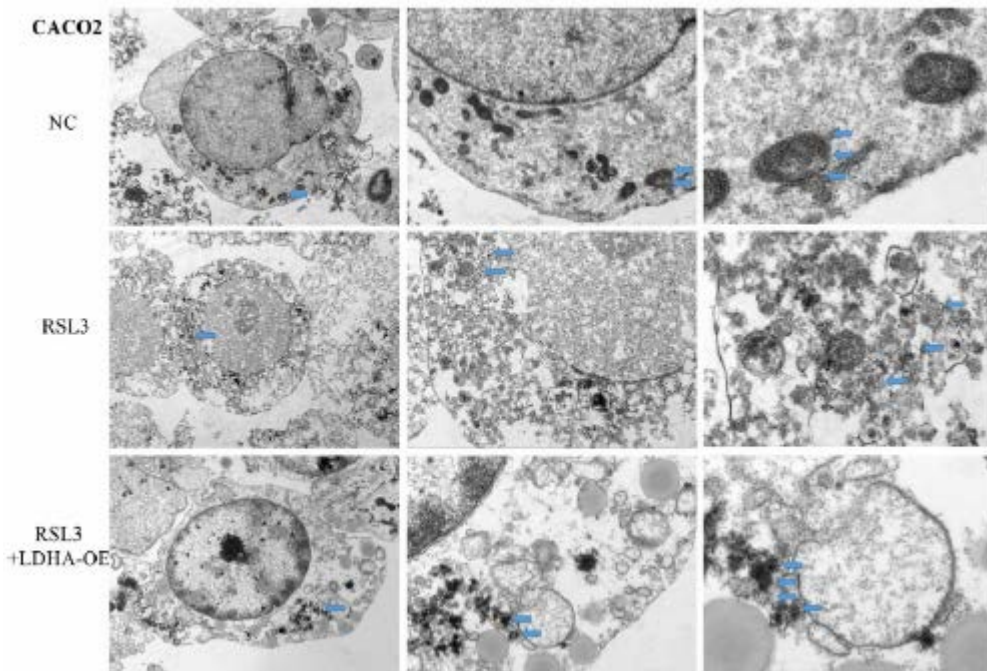
贴壁细胞是体外实验研究的重要载体。透射电镜作为一种常用的形态学工具，可以直观地展示贴壁细胞的超微结构，广泛应用于细胞生物学、生物医学等领域的科学研究。下面介绍我科贴壁细胞的透射电镜样本制备方法。

2 取材

细胞造模或给药结束后，弃掉培养液，加入0.1M PBS简单清洗表面，用细胞刮铲将细胞轻轻刮下来收集于1.5ml尖头离心管中，5min，2000r/min，离心后弃上清液，加入2.5%戊二醛固定液，用移液枪轻轻吹打或手工上下摇动，使细胞均匀悬浮于固定液中，4℃避光固定2h后送至我科。由于手工制备细胞电镜样本需要反复离心弃上清不可避免地会损失掉一部分，因此细胞必须达到一定数量。一般离心后可见绿豆大小粒状沉淀即可，对细胞计数不做具体要求。

3 实验步骤

1%四氧化锇后固定0.5-2h，具体时间依据细胞量的差异进行调整。随后使用30%、50%、70%、90、100%乙醇梯度浓度脱水。为了使后续的包埋剂更好的浸透细胞，乙醇脱水后再用丙酮将细胞内的乙醇置换出来。细胞样本脱水完成，需尽快用环氧树脂包埋剂浸透，依然采用梯度浓度逐级置换前一步的脱水剂。从丙酮：树脂2：1浸入2h过渡到丙酮：树脂1：2过夜，随后转移致纯树脂包埋剂，37℃烘箱12h，60℃烘箱48h聚合成块。最后超薄切片70nm，醋酸铀-柠檬酸铅联合染色晾干后透射电镜下观察。



贴壁细胞样本透射电镜应用示例：人克隆结肠腺癌细胞系CACO-2与铁死亡

(引用：Lv Y, et al. Apolipoprotein L3 enhances CD8+ T cell antitumor immunity of colorectal cancer by promoting LDHA-mediated ferroptosis. *Int J Biol Sci.* 2023 Feb 13;19(4):1284-1298.)

中药颗粒成分检测技术及应用

分析测试平台/陈龙

1 前言

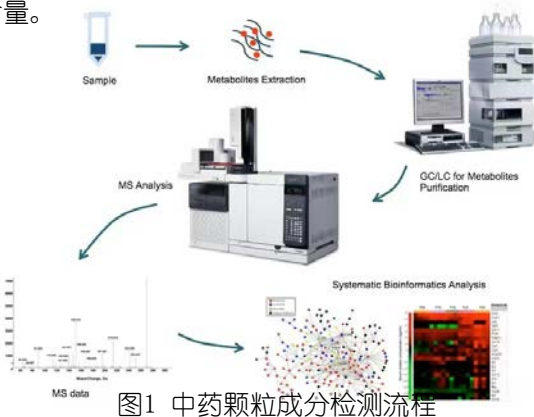
中药配方颗粒是以单味传统中药饮片为原料，经过提取、分离、浓缩、干燥、制粒、包装等现代化生产工艺，加工制成的一种统一规格、统一剂量、统一质量标准的新颖纯中药配方产品。

中药配方颗粒立项研发至今，已经过二十多年的发展，在临床应用中与传统饮片的化学成分、药理作用、功效主治基本无显著性差别，甚至拥有优于传统饮片的免煎煮等使用特点。配方颗粒产品品种繁多，预计可覆盖600-700种传统中药，临床使用规模逐年扩大。2021年2月，国家药监局等三部委联合发布公告，结束长达20多年的中药配方颗粒试点工作，配方颗粒生产企业即由之前的6家试点迅速发展到现在60多家。试点工作结束后，中药配方颗粒的渠道限制被放开，由原本的二级以上中医院扩增到符合中医执业资质的各级医疗机构，销售渠道的扩增带来了产业扩容趋势。

液相色谱质谱技术作为药物分析中定性、定量最常用的技术手段，在中药配方颗粒领域同样得到广泛应用，统一标准的逐步落地推广，将对液相色谱方法的提升、转移等提出更高要求。

2 实验流程

中药颗粒样本用合适的有机溶剂进行溶解提取，所得溶液用液相联用高分辨有机质谱仪进行检测，检测获得的源文件通过数据库检测进行成分鉴定，最终确定中药颗粒中的成分以及相对的含量。



3 应用实例

取中药颗粒样品50mg，置于1.5mL离心管内，加入1ml 50%甲醇水溶液（v: v, 水: 甲醇=50: 50），超声30min，置于离心管中，14000rpm离心15min，取上清过0.22um微孔滤膜后，置入进样瓶中，待UHPLC-MS/MS分析。空白样品采用相同条件处理。

采用ACQUITY UPLC HSS T3 (2.1 × 100mm, 1.8μm)，柱温40 °C，流动相为乙腈-0.1%甲酸水溶液，梯度洗脱，流速0.3 mL·min⁻¹。离子源为电喷雾离子源，扫描模式为正离子模式，分析时间为35 min，DDA扫描模式。

根据检测到的化合物种类，推断样品可能组成中药成分，本地自建的mzVault天然产物数据库中包括1200余种化合物，均根据中国药典2015版总结和标注了天然产物的药材来源。在线数据库中则包含6000余种理论天然产物物质谱数据，同样标注了基于中国药典2015版的药材来源，根据二者整合进行中药组方分析。

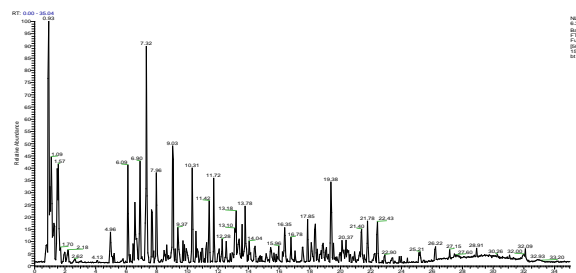
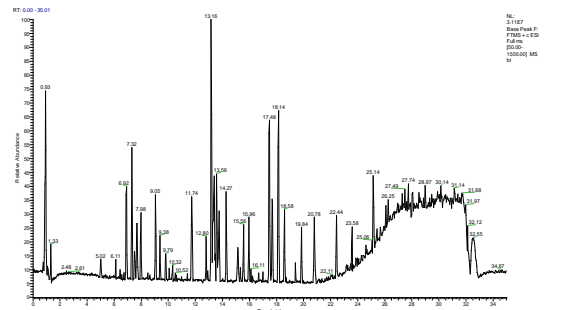


图2 中药颗粒的TIC色谱图

表2 鉴定化合物信息

模式	名称	分子式	质量偏差 [ppm]	精确质量	m/z	保留时间 [min]	峰面积
ESI+	18 β-Glycyrrhetic Acid 甘草次酸	C30 H46 O4	-0.24	470.3	471.3	13.789	186110
ESI+	3-Butylideneephthalide 丁烯基苯酞	C12 H12 O2	0.88	188.0	189.0	17.555	127580
ESI+	4-Methylumbelliferone 7-羟基-4-甲基香豆素	C10 H8 O3	0.65	176.0	177.0	7.316	348564
ESI-	7-Demethylsuberosin 7-去甲基软木花椒素	C14 H14 O3	0.48	230.0	229.0	15.523	109190
ESI+	7-Hydroxycoumarin 7-羟基香豆素	C9 H6 O3	0.38	162.0	163.0	11.731	122576

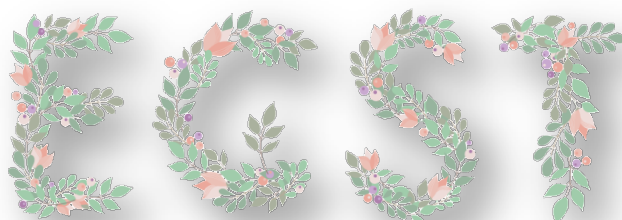
服务优质
共享开放
管理先进
运行高效





工匠精神

精益求精 追求卓越
传承弘扬 专心专注



服务理念

团结敬业 协作奉献
奋进探索 求实创新



声明：《蜂巢》为内部学术参考资料汇编，每月汇编一期，由上海中医药大学科技实验中心编写并仅在上海中医药大学系统内部科研人员中推送、传播，仅供内部科研人员参考使用，不得用于商业宣传。
欢迎投稿。



《蜂巢》编辑工作组：

主编：王宇

主审：可燕

编委：任艳、陆雄、杨扬、张超超

编辑排版：周莉、张文超

组稿：刘聪颖

宣传：张文超

仪器预约网址：<https://kjsyzx.shutcm.edu.cn>

投稿信箱：kjsyzx_shutcm@163.com

地址：蔡伦路1200号，上海中医药大学创新楼6楼

邮编：201203

电话：021-51322387