



活细胞中内源RNA的荧光成像方法研究进展

王琪^{1,3}, 肖峰¹, 周翔^{1,2*}

1. 武汉大学化学与分子科学学院, 武汉 430072

2. 武汉大学高等研究院, 武汉 430072

3. 武汉大学中南医院, 武汉 430071

*通讯作者, E-mail: xzhou@whu.edu.cn

收稿日期: 2022-11-02; 接受日期: 2022-12-05; 网络版发表日期: 2023-02-24

国家自然科学基金(编号: 21721005, 91940000)资助项目

摘要 RNA的活细胞成像可以为我们提供细胞生命活动过程中的基因表达和调控等重要信息. RNA定位和动力学的研究需要开发以高空间和时间分辨率观察RNA的工具. 近年来, 利用RNA结合蛋白、体外RNA进化等方法在活细胞内源RNA可视化方面取得了重大进展. 本文中, 我们回顾了活细胞RNA成像的发展历史, 重点介绍基于荧光RNA适配体和CRISPR/Cas等可基因编码的活细胞内源RNA成像手段的机制、进展和优缺点. 最后讨论和展望了该领域的挑战和未来前景.

关键词 RNA成像, 基因编码, 活细胞成像, 内源RNA, RNA适配体, CRISPR/Cas

1 引言

自1961年信使RNA (messenger RNA, mRNA)发现以来, 人们对核糖核酸(ribonucleic acid, RNA)的种类和功能的研究与认识愈发深入. 传统的生物化学和遗传学工具为我们阐明了RNA在基因表达和调控过程中的一些作用和方式. 在基因表达过程中, mRNA作为蛋白质翻译的模板, 决定基因表达蛋白的氨基酸序列; 核糖体RNA与蛋白质结合成核糖体, 作为蛋白质合成的“工厂”; 转运RNA (transfer RNA, tRNA)将氨基酸转运至核糖体合成中的多肽链上. 长非编码RNA (long noncoding RNA, lncRNA)、小干扰RNA (small interfering RNA, siRNA)、微小核糖核酸(microRNA, miRNA)、短发夹RNA (short hairpin RNA, shRNA)、piwi

相互作用RNA (piwi-interacting RNA, piRNA)等非编码RNA (noncoding RNA, ncRNA)允许以不同的方式参与转录后基因表达调控. 但关于丰度、定位、转运和动力学等对RNA功能的影响有待进一步挖掘完善. 众多数据显示, RNA水平异常、错误加工或定位失调与神经系统变性疾病和癌症等多种疾病相关^[1]. 细胞内RNA可视化有助于我们提高对各种生命过程的理解, 为临床诊断和疾病治疗提供重要参考^[2,3].

尽管可以在固定细胞中通过传统的荧光原位杂交 (fluorescence in situ hybridization, FISH)技术对特定RNA的丰度和定位成像观测^[4-7], 但此类方法仅提供某个时间点捕获细胞活动的“静态快照”. 为了能在活细胞中实时动态地观测RNA参与的生命活动, 深入地研究这些过程发生的机制, 需要高空间和时间分辨率

引用格式: Wang Q, Xiao F, Zhou X. Recent advances in fluorescence imaging methods for endogenous RNA in living cells. *Sci Sin Chim*, 2023, 53: 349–358, doi: 10.1360/SSC-2022-0214

地定位和示踪细胞内的RNA, 开发更加灵敏可靠的活细胞RNA成像方法. 在过去的20多年中, 研究人员开发并改良了多种用于活细胞的RNA成像工具, 实现了包括单分子灵敏度、超分辨率、多路复用和活细胞RNA跟踪等多个里程碑式的成就^[8~14]. 本文简单回顾各类基于荧光和生物发光探针的活细胞RNA成像技术的发展历史, 重点介绍和讨论了近10年来可基因编码的活细胞内源RNA成像系统的重大研究进展, 为进一步开创RNA点亮新技术和发展内源RNA追踪方法提供参考.

为了帮助读者更好地理解这篇综述, 我们首先阐释几个术语. 依据成像主体RNA的不同, 活细胞RNA成像方法可分为外源RNA成像和内源RNA成像. 简单而言, 当成像主体RNA是经过工程化改造或由外源载体转染在细胞中产生的RNA时, 我们称为外源RNA成像. 与之相对, 当成像主体RNA是细胞内原有且自发产生的RNA时, 称为内源RNA成像. 依据成像探针产生方式的不同, 又可分为非基因编码成像系统和可基因编码成像系统. 前者的探针通常由体外合成, 通过显微注射和转染等手段递送入细胞, 因此在合成后序列无法改变. 而可基因编码成像系统的探针序列通常被构建到载体中, 利用细胞自身合成探针的主体部分, 其序列可根据实验需要在载体中进行修改. 此外, 成像探针可以在细胞内持续产生, 有利于长时间的RNA动态观测. 本文主要关注和介绍可基因编码的RNA成像方法.

2 活细胞RNA成像技术的发展历史

1998年, Singer及其同事^[15]于1998年开发的MS2系统是最具代表性的外源RNA成像系统. 该系统利用了MS2噬菌体外壳蛋白(MS2 phage coat protein, MCP)二聚体与21 nt的RNA发卡结构(MS2)的结合序列(MS2 binding site, MBS)的特异性结合, 使得与MCP融合的绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)在工程化RNA的重复MBS区域富集并产生强烈荧光信号. 此后, 通过不断升级和改进, 科研人员还陆续开发出了基于PP7、 λ_{N22} 、U1A和BglG等蛋白质结合基序的成像系统, 实现了更低的荧光背景、更稳定的荧光信号和更好的重现性^[16~20].

2011年, Jaffrey及其同事^[21]报道了一种类GFP的

RNA适配体Spinach, 其与小分子化合物4-羟基苯并咪唑啉酮(HBI)结合后产生强烈荧光. 此类系统通常将荧光RNA适配体序列插入到靶标RNA的非编码区, 可以避免融合蛋白的构建、翻译和招募, 因而在转录后能更快地观察到荧光信号. 近10年来, 通过指数富集的配体系统进化(systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)或流式细胞荧光分选技术(fluorescence activated cell sorting, FACS), 多种性能强大的荧光RNA适配体被开发出来并被用于RNA、蛋白质、细胞代谢物和金属离子等多种细胞内分析物的动态检测, 如Spinach、Broccoli、Corn、Mango、Riboglow、Pepper和o-Coral等^[22~28].

上述两类方法通常被用于外源RNA的成像, 通过将RNA元件缀连到靶标末端, 可以对靶标RNA进行基因修饰与点亮. 然而, 这种方式并不能准确地反映RNA的生命活动. 已有研究表明, MS2系统的引入可能会对RNA的转录、加工、定位和降解产生影响^[29~32]. 例如, 在载体过表达的系统中, 引入MBS的mRNA的3'端片段在酵母细胞中显著富集进而干扰对全长mRNA的细胞定位^[29,30]. 另外, 实际运用过程中插入成像标签对不同RNA的普适性有待考量. 尽管可以通过基因克隆和基因编辑等工具在基因组层面插入MS2或RNA适配体等成像标签, 产生稳定表达的细胞系或转基因生物, 实现内源RNA成像. 但是进行基因组层面的基因编辑操作复杂耗时、成本较高, 并且其成像的RNA是非天然的^[33]. 因此开发更加通用有效的内源RNA成像手段具有重要意义.

为实现活细胞内源RNA成像, 多种类型的成像手段被开发出来. 这些方法的成像可以大致分类为: 分子信标(molecular beacon, MB)类^[34~41]、RNA结合蛋白质类^[42~50]和荧光适配体类^[51~61]. MB类成像系统是非基因编码成像方法的代表, 也是发展较早的内源RNA标记手段, 其原理是一条或多条两端带有荧光基团和淬灭基团标记的寡核苷酸链在与靶标RNA结合后发夹结构破坏导致荧光恢复. MB类成像方法在RNA成像领域取得了快速进展, 此类化学标记的探针结构简单小巧、易于合成且灵敏度高, 可以在单个细胞中同时检测多种内源mRNA. 尽管如此, 细胞递送的低效率和破坏性, 以及探针进入细胞后的位置特异性和降解诱导的非特异性激活等问题极大地限制了此类探针的体内应用. 相反, 后两种可基因编码成像系统

则巧妙地绕开了上述问题。RNA结合蛋白质类系统主要基于PUM-HD系统(pumilio homology domain)或改造的CRISPR/Cas系统(clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR associated)对RNA序列的识别和定位, 通过与之缀连的荧光蛋白或信号放大标签产生或募集荧光信号, 进行内源RNA成像。荧光适配体类方法则是利用两端带有互补序列的荧光RNA适配体对内源RNA进行成像。适配体通过碱基互补配对的方式与靶标RNA杂交后发生构象改变, 产生正确折叠的三维结构, 对应小分子配体与之结合后产生荧光信号。与MB类成像系统相比, 后两类成像系统具备更好的生物相容性和更小的细胞功能扰动。同时, 其在成像特异性和RNA追踪方面表现优异而受到广泛关注。这两类方法通过设计并构建表达载体, 可在细胞内连续转录预先设计的探针, 利用荧光蛋白或荧光RNA适配体实现对内源RNA的定位和动态可视化。

3 蛋白质类内源RNA成像工具

3.1 CRISPR/dCas系统

CRISPR/Cas是一种微生物适应性免疫系统, 其广泛存在于细菌和古细菌中^[62]。近年来, CRISPR/Cas技术蓬勃发展, 而且已经成为一种强大的基因编辑技术。其基本工作原理是crRNA (CRISPR-derived RNA)与tracrRNA (trans-activating RNA)通过碱基配对结合形成tracrRNA/crRNA复合物, 该复合物与Cas9蛋白结合并引导Cas9蛋白剪切双链DNA与crRNA配对的序列靶位点处, 从而实现基因组DNA的编辑^[62]。此外, crRNA和tracrRNA可以简化合并为一条单引导RNA (sgRNA)^[63]。2014年, O'Connell等^[48]发现可利用原间隔相邻基序呈递寡核苷酸(PAMmer)的Cas9系统识别和切割靶标RNA。得益于缺失核酸酶活性的dCas/sgRNA复合物对特定RNA序列的识别结合能力, 融合了GFP的dCas9蛋白于可以在活细胞中成像内源天然mRNA^[47], 如图1a所示。通过亚硫酸盐处理, Nelles等^[47]成功观测到了细胞中mRNA应激颗粒的形成。然而, 由于细胞中游离的或可能存在的脱靶的dCas9-GFP的荧光背景, 该系统的信噪比不足以实现低丰度mRNA成像。2020年, 基于SunTag信号放大的dCas9系统被开发出来, 结合6个串联的sgRNA, 成功实现了低丰度的内源RNA的成像^[64]。

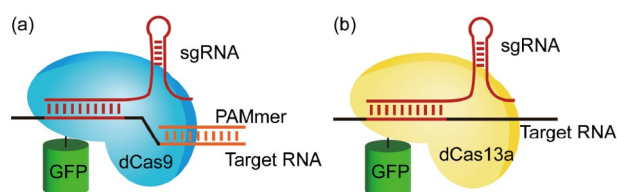


图1 CRISPR-dCas9 (a)和CRISPR-dCas13a (b)成像系统的作用机制示意图(网络版彩图)

Figure 1 Schematic diagram of the mechanism of action of CRISPR/dCas9 (a) and CRISPR/dCas13a (b) imaging systems (color online).

2015年, Shmakov等^[65]报道了一种新的CRISPR-Cas系统及其效应物C2c2 (Cas13)。2017年, Abudayyeh等^[49]从韦德纤毛菌(*Leptotrichia wadei*)中分离得到的Cas13a可以特异性靶向敲除内源RNA, 敲除水平与RNA干扰相当。同样的, 如图1b所示, 缺失核酸酶活性的dCas13a-GFP融合蛋白可以在细胞内特异性识别与结合靶标RNA而不产生切割, 以此实现细胞内源RNA的可视化与示踪^[49]。另外, 将可以招募抗体融合蛋白的SunTag引入dCas13a成像系统, 并对裂分荧光蛋白^[66]进行招募, 可准确跟踪细胞质和细胞核中的内源RNA^[67]。

2019年, Yang等^[50]分别将8种同源dCas13蛋白与增强绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein, EGFP)融合, 比较其信噪比以评估标记效率。结果显示, dPspCas13b是其中标记RNA最有效的dCas13蛋白。利用dCas13b蛋白, 研究者标记了活细胞中的LncRNA NEAT1及mRNA SatIII、MUC4和GCN4, 并对核体paraspeckle结构中的NEAT1动力学进行了成像。应用正交dCas13蛋白, 或是结合dCas13和MS2两种成像手段, 可实现单细胞中RNA的双色成像。

CRISPR/dCas系统是目前应用最广泛的内源RNA成像系统之一, 可以对多种类型及不同亚细胞定位的RNA进行可视化。然而, 该系统存在几个潜在的限制。CRISPR/dCas系统通常背景荧光较高, 主要依靠聚集的荧光信号来区分背景荧光, 因此多用于成像具有重复区域的RNA或聚集的RNA, 在低拷贝数空间分布的RNA的可视化应用上具有挑战。为了降低游离荧光蛋白在细胞质中的背景荧光, 研究者常在融合蛋白中引入数个核定位元件, 然而这种做法可能造成假阳性信号^[68]。尽管可以将多个荧光蛋白结合到单个dCas13蛋白上来提高信噪比, 但单分子分辨率仍有待实现。此外dCas13a-GFP尺寸较大, 与RNA结合后可能会与内

源RNA结合蛋白竞争影响其正常功能。

3.2 PUM-HD/裂分荧光蛋白系统

RNA结合蛋白PUMILIO 1可以特异性地结合某些mRNA的3'端非编码区(3' UTR), 调节靶标mRNA的翻译和稳定性^[44]。在人类PUMILIO 1的同源结构域(PUM-HD)中, 存在八个重复基序, 每个重复基序与一个特定的RNA碱基相互作用^[69]。在此基础上, 引入氨基酸定点突变后, PUM-HD可以识别任意指定的8 nt RNA序列^[69]。

通过与裂分荧光蛋白^[66]融合, 基于PUM-HD的RNA标记技术已被应用于活细胞中多种RNA的可视化。如图2所示, 这种策略包含两个识别相邻8 nt RNA的PUM-HD突变体。在与RNA结合时, 两个PUM-HD融合片段相互接近, 使荧光蛋白的N-端和C-端片段重建以产生激活的荧光信号。基于这一原理, Ozawa等^[43]设计了两个与分裂EGFP片段融合的PUM-HD突变体, 成功定位和追踪了单个活细胞中的MT-ND6线粒体RNA。该系统之后也被用于特异性成像内源 β -actin mRNA^[70]和lncRNA TERRA^[71]。

然而, 由于必须为每个靶标RNA设计特定的PUM-HD突变体, 并且一个PUM-HD只能结合8 nt的RNA。因此, 该系统用于RNA成像的特异性和效率受到限制, 可能产生非特异性靶向^[72]。虽然裂分荧光蛋白的开发提高了RNA标记和检测的灵敏度, 但是裂分片段在高浓度下会自发结合, 仍然可能导致较高的荧光背景^[73]。

3.3 csiFP传感器

2019年, 为了解决蛋白质类RNA成像系统的高背景荧光问题, 根据HIV-1 Tat肽段和反式激活响应元件(TAR)之间的相互作用, Jaffrey课题组^[74]开发了Pepper-tDeg系统用于荧光蛋白的条件型表达。其核心是大小为19个氨基酸的双功能肽段tDeg。它包含两部分: 由4个氨基酸组成的降解子和17个氨基酸组成的RNA结合肽Tat, 其中存在两个共用的氨基酸。当tDeg与荧光蛋白融合后, 降解子可促进荧光蛋白的高效降解, 而TAR RNA可以与Tat肽段特异性相互作用, 阻断降解子的功能, 保护荧光蛋白免于降解。TAR RNA经过优化得到的变体被称为“Pepper”, 需要注意的是, 本章节的Pepper不同于荧光RNA适配体Pepper。这种策略使

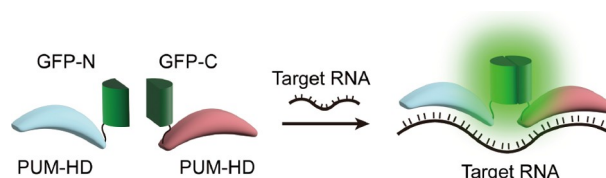


图2 PUM-HD/裂分荧光蛋白系统的成像原理(网络版彩图)

Figure 2 Imaging principle of PUM-HD/cleavage fluorescent protein system (color online).

荧光蛋白在活细胞中的稳定性受到Pepper RNA的控制, 极大程度上解决了高背景荧光的问题。通过在感兴趣RNA的3' UTR区插入Pepper序列, 在细胞中共表达与tDeg融合的荧光蛋白, 可以对活细胞中的外源mRNA进行高信噪比成像。tDeg的降解作用适用于多种荧光蛋白, 涵盖了广泛的波长范围, 在细胞成像的应用上具有很大的灵活性。

最近, Zhou等^[75]将Pepper-tDeg系统进行改造, 设计了一种新的基因编码传感器csiFP, 将该系统的成像对象扩展到了内源RNA。如图3所示, 该传感器包含有RNA传感元件和tDeg-荧光蛋白报告元件。研究者通过对Pepper RNA的3'端进行延伸并添加靶标RNA的反向互补序列, 使Pepper RNA错误折叠, 只有靶标RNA可诱导传感元件的构象切换, 进而稳定tDeg融合的荧光蛋白用于荧光成像。这种策略将荧光蛋白的稳定性转变为由靶标RNA介导, 使内源RNA成像成为可能。csiFP传感器已被证明用于活细胞中survivin mRNA的定量和动态的高对比度成像。之后, 研究者使用裂分荧光蛋白系统开发了csiFP的信号放大器, 能够在单分子水平上对低丰度的MUC4 mRNA进行成像。该传感器进一步被应用于活细胞中lncRNA MALAT-1的成像和跟踪, 揭示了其在有丝分裂过程中的易位动力学, 为活细胞中内源RNA的高灵敏度成像和多色成像提供了新的范例。

蛋白质类内源RNA成像工具均以荧光蛋白作为发光元件, 因此具有荧光强度高的优势。在CRISPR/dCas系统中, 通过对sgRNA进行合理的设计与优化, 可以最大程度地提高识别特异性。裂分荧光蛋白和Pepper-tDeg系统的开发也为进一步降低游离荧光蛋白的背景荧光提供了良好的范例。然而, 由于多个RNA单元和荧光蛋白的叠加, RNA的定位、运输与功能等是否产生影响仍然需要进一步考量。蛋白质类内

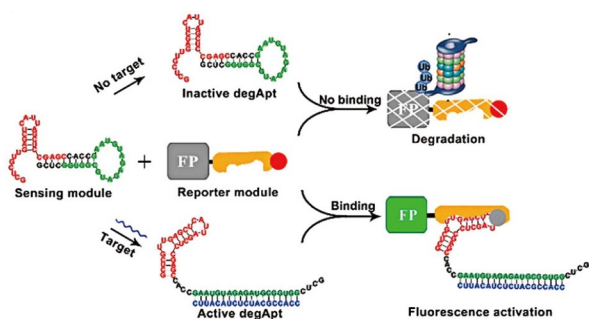


图 3 csiFP传感器的原理示意图^[75](网络版彩图)

Figure 3 Schematic drawing of the principle of the csiFP sensor. Reprinted with permission from [75]. Copyright 2021 American Chemical Society (color online).

源RNA成像工具的另一限制在于荧光蛋白的成熟需要较长时间,因此,此类方法最适合用于研究长寿的mRNA和发展较缓慢的生命进程,对于转录、可变剪切等动态变化的实时监测存在局限性。

4 适配体类内源RNA成像工具

RNA适配体为RNA的活细胞成像提供了一种简单有效的工具。与荧光蛋白相比, RNA适配体尺寸更小且不需要较长的时间使发色团成熟, 因此更适合用于RNA的实时成像。RNA适配体的筛选最初是为体外研究而服务的。在十几年的发展历程中, 具有不同发射波长的小分子配体及其RNA适配体相继问世, 不断完善着适配体工具库。其性能也逐渐向着结合亲和力更强、荧光强度更高和信噪比更高等方向迈进。在细胞成像的相关应用中, RNA适配体通常通过基因编码的方式缀连至RNA末端, 以此实现对外源RNA的成像。近年来, 已发表的数项研究例证了如何将RNA适配体用作内源RNA (mRNA和miRNA)的荧光传感器。

小分子配体与适配体的结合基序是关键组成部分, 其二级结构通常包含一个或多个环(loop)以及与之相连的维持环完整性的茎(stem). 杂交诱导的结构恢复与结构转换是利用适配体成像内源RNA的主要策略之一. 通过引入一段与靶标RNA互补的序列, 缩短或延长小分子配体结合所必需的茎结构, 使RNA适配体上的结合位点被破坏. 当改造后的适配体与靶标RNA杂交后结合位点得以恢复.

4.1 用于成像mRNA的荧光传感器

4.1.1 BHQ1-Cy3共轭发光适配体

Sato等^[53]在2015年报告了一种用于内源RNA成像的基因编码荧光传感器。其荧光开启基于猝灭剂BHQ1的RNA适配体的结构恢复。研究者开发了与BHQ1结合的RNA适配体,并将Cy3探针与BHQ1相连得到一个接触猝灭的复合物探针。如图4所示, BHQ1-Cy3与适配体的结合可以阻断猝灭效应从而开启荧光。BHQ1适配体的茎对于识别至关重要,在该传感器中,茎被两个与靶标RNA互补的短序列所取代,生成的RNA靶向适配体只有在与靶标RNA反式杂交后,重新折叠产生BHQ1结合位点,从而恢复复合物的荧光。利用该传感器,研究者在活细胞中对多种内源mRNA进行了成像。之后,他们又开发了与另一猝灭剂二硝基苯相互作用的适配体,以相同的方法实现荧光开启,并与BHQ1及其适配体联用,成功实现了两种mRNA的同时标记^[58]。

4.1.2 双分子荧光互补RNA标记技术(AiFC)

裂分的RNA适配体提供了另一种可基因编码的内源RNA成像的策略。这类设计通过将荧光RNA适配

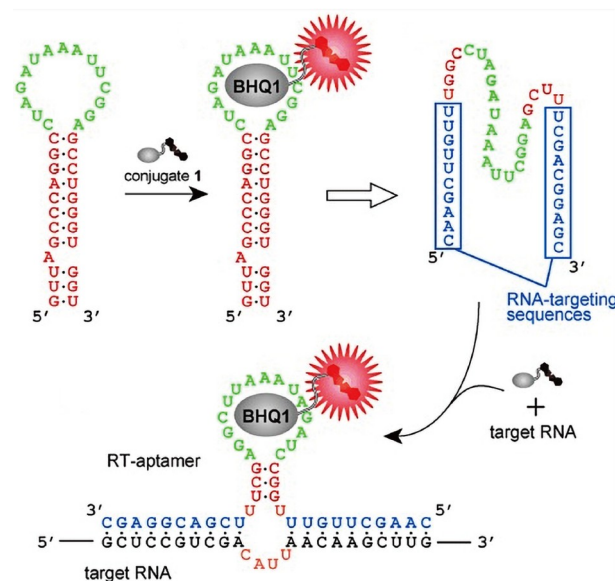


图 4 使用BHQ1-Cy3及其适配体检测靶标RNA的示意图^[53] (网络版彩图)

Figure 4 Schematic diagram of the detection of a target RNA using a combination of a BHQ1-Cy3 conjugate with an RNA aptamer. Reprinted with permission from [53]. Copyright 2014 John Wiley and Sons (color online).

体拆分为两个非荧光片段, 并添加靶标RNA的反向互补序列, 形成由RNA杂交介导发光的分裂型RNA适配体。最早, 该策略被用于拆分Spinach进行体外RNA分析^[76]。后来, Wang等^[57]将该策略用于Broccoli的裂分, 开发了双分子荧光互补的RNA标记技术(AiFC)。如图5所示, 该方法的核心是一个基因编码的RNA荧光传感器, 当两个分裂的Broccoli片段在细胞中表达后, 可被靶标RNA招募而重组, 恢复荧光活性。通过转染两个分裂Broccoli的表达载体, 实现了活细胞中高拷贝数内源mRNA的成像。

然而, 受限于Broccoli的荧光强度, 该方法的灵敏度相对较低, 低丰度mRNA的直接标记与成像仍然具有挑战性。除此之外, 为了保证足够的灵敏度和信噪比, 荧光RNA适配体的分裂可能需要反复试验优化。尽管如此, 一旦完成对某种荧光RNA适配体的裂分优化, 靶标RNA的结合区域可以很容易地替换为其他序列。因此, 进一步开发其他RNA适配体的裂分系统将会扩展实际应用的灵活性。

4.2 用于miRNA直接检测与成像的荧光传感器

21~24 nt的非编码RNA通常被称为小RNA, 包括miRNA和siRNA, 它们在动植物生命体中发挥着多种重要的调节作用, 包括生长发育的调节、机体防御的激活和表观遗传调控等^[77-80]。miRNA作为转录后基因调控的主要参与者, 其异常表达与癌症等许多疾病密切相关^[80], 并显示出作为临床生物标志物的前景。然而, 小RNA的小尺寸和低丰度给直接检测和标记带来了挑战。

4.2.1 FASTmiR传感器

Aw等^[81]通过在荧光RNA适配体Spinach2中引入额外的茎, 设计了一种双分子miRNA传感器, 用于体外检测复杂RNA混合物中的靶标miRNA。经过对Spinach2的重新设计, 使得DFHBI结合位点的产生依赖于miRNA和适配体末端序列的互补作用, 并且在靶标miRNA存在的情况下显示出中位数为50倍的荧光增强, 其荧光亮度可达等摩尔量Spinach2的75%。

之后, Huang等^[82]又对Spinach进行了更精细的改造, 将其与miRNA的反向互补序列相连, 产生了FASTmiR传感器。该传感器与其靶标miRNA的特异性结合导致适配体重组, 通过构象变化诱导DFHBI荧光的增

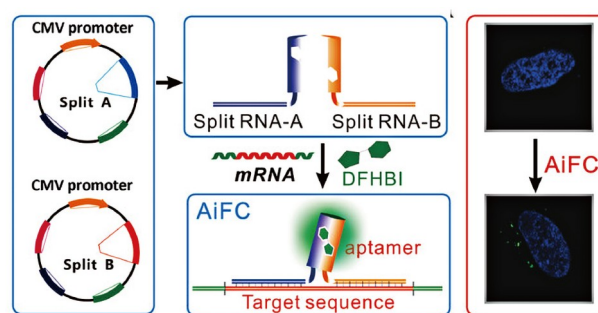


图5 基于Broccoli的AiFC探针的设计原理示意图及基因编码后对活细胞中内源RNA的成像^[57] (网络版彩图)

Figure 5 Schematic design principle of the Broccoli-based AiFC probe and live-cell imaging of unmodified RNA transcripts after cellular expression. Reprinted with permission from [57]. Copyright 2017 John Wiley and Sons (color online).

加而起作用。FASTmiR传感器在体外检测和体内成像中都表现出了广泛的应用性: 两个示例传感器FASTmiR171和FASTmiR122可以在体外快速检测和定量miR171和miR122的水平; 确定了total RNA提取物中miRNA的相对水平, 其灵敏度类似于小RNA测序和northern印迹; FASTmiR可以直接检测小RNA, 而不是使用扩增等方法间接检测, 从而可以在总RNA提取物中确定miRNA的拷贝数范围, 几乎实现了绝对定量。由于Spinach荧光强度较低, 以及DFHBI在激发时的快速解离, 因此在活细胞成像中具有挑战性^[83], 研究表明Spinach2是更加适合于活细胞的成像工具^[84,85]。基于此, 为了在细胞中获得可检出的荧光信号, 研究人员使用Spinach2进行了改进, 并通过对6个FASTmiR重复序列串联的方式增加了荧光强度。经过基因编码, 改进后的传感器可用于体内直接检测和定位特定的miRNA, 并实现了Huh7和HEK293T细胞中miR122水平差异的定量检测。

4.2.2 SRB-2适配体传感器

除此之外, 接触猝灭类RNA适配体也同样被改造为miRNA的荧光传感器。1998年, Holeman等^[86]开发了第一个特异性结合荧光团的RNA适配体SRB-2, 它可以高亲和力($K_D=310$ nM)地结合碘基罗丹明B (SR), 识别平面芳香环和带负电荷的磷酸盐, 这是RNA识别阴离子的罕见例子。为了将SRB-2用于细胞成像, Sunbul与Jäschke^[87]将通用的猝灭基团二硝基苯胺(DN)与SR连接, 通过接触猝灭将其转化为高效的荧光开启探针。当该探针与SRB-2体外结合时, 荧光强度增加了

100倍以上, 但是结合亲和力比较弱($K_D=1.4\ \mu\text{M}$). 该适配体被成功应用于大肠杆菌成像, 据估计其亮度是Spinach的三倍.

Ying等^[59]利用上述适配体及荧光开启探针, 通过将SRB-2与茎环结构的miRNA响应基序相融合, 设计了另一种miRNA驱动荧光开启的荧光传感器, 如图6所示. 同样地, SRB-2与miRNA的结合引发适配体的重新折叠, 释放出被屏蔽的茎序列, 产生SR的结合位点, 而在没有靶标miRNA的情况下, SRB-2不能与SR-DN结合. 当两者结合之后, 接触猝灭效应被阻断, 荧光信号得以释放. 将该传感器插入保护性的tRNA支架后, 可用于特异性地成像哺乳动物活细胞中的miRNA, 且具有较好的灵敏度. 通过与GFP的共表达, 将其作为参考评估传感器在细胞中的表达水平, 实现了不同肿瘤细胞中miR21的定量检测^[88]. 2021年的一项研究同样将SRB-2改造为传感器模块, 并使用RNA适配体Mango作为内参, 对miR224做出比例成像的特异性响应^[51].

在哺乳动物细胞中应用适配体类荧光传感器具有几个显著障碍. 其一, 受制于适配体有限的荧光强度, 其检测的灵敏度不足以实现高要求的RNA成像, 如单分子RNA成像和超分辨成像等. 其二, 目前适配体在哺乳动物细胞中普遍适用的表达启动子是U6启动子, 有限的稳定性和较低的局部浓度进一步削弱了其荧光强度. 为了提高RNA元件的稳定性和表达水平, 研究人员通常会引入tRNA、F30支架和最新的Tornado表达系统^[89]. 然而, 这使适配体传感器的设计愈加复杂化. 其三, 尽管目前已有多种适配体荧光传感器被开发, 但是各自的性能并没有经过全面的比较, 应用范围也较为单一, 其是否具备多种类RNA成像的普适性, 还有待进一步探索. 最后, 部分荧光RNA适配体正交性较差, 不同RNA适配体及其小分子配体间可以交叉结合, 使得同一细胞中的多路检测具有挑战性. 因此, 开发具有高度正交性的适配体及其荧光传感器对于RNA的同时成像至关重要.

5 总结与展望

在这篇综述中, 我们总结了当前高性能的活细胞内源RNA成像探针, 介绍了它们的结构、成像原理及相关应用. 基于RNA结合蛋白的成像系统优点在于特异性好、灵敏度高, 成像前不需要额外添加小分子配

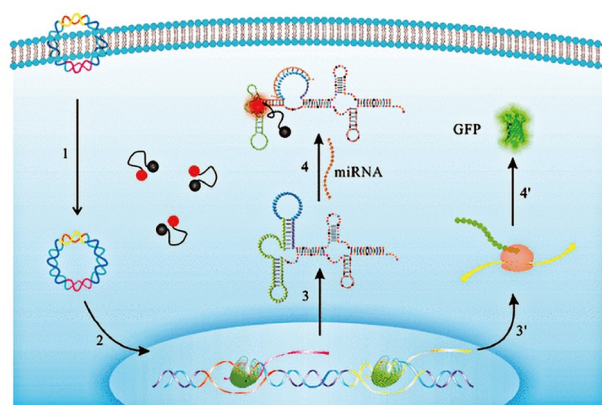


图6 基于SRB-2的荧光传感器对活细胞中miRNA的成像与检测机制^[59] (网络版彩图)

Figure 6 Mechanism of imaging and detection of miRNA in living cells by SRB-2-based fluorescent sensor. Reprinted with permission from ^[59]. Copyright 2017 American Chemical Society (color online).

体进入细胞. 而细胞中非特异性结合和游离荧光蛋白造成的荧光背景的是其面临的主要挑战之一. 对此, 研究者已经尝试通过荧光蛋白裂分、插入结合基序阵列、添加信号放大标签、降解未靶向的荧光蛋白等多手段来实现更高的荧光成像信噪比. 基于荧光适配体的成像系统具有尺寸小、体系简单、荧光背景低、对细胞干扰较小等优势. 利用与靶标RNA结合后的结构恢复, 通过合理的序列设计, 可以实现靶向后荧光开启的内源RNA成像. 但相较蛋白类成像方法, 其检测特异性和荧光强度有待提升.

活细胞中RNA可视化的动态为RNA生物学提供了广阔的视野. 受益于成像技术的不断发展, 更明亮、更耐光漂白的荧光蛋白和荧光团以及灵敏度更高的成像系统将被不断开发出来. 这将是开发用于以单分子分辨率、超分辨率和多路复用的非工程化内源RNA成像的重要突破口.

尽管现有的成像工具可以在活细胞层面上可视化内源RNA, 但罕见其被应用于动物实验中. 一方面现有的成像方法的荧光团发射波长通常位于可见光区域, 这阻碍了其在体内深部组织RNA检测的运用. 因此, 开发具有较长发射波长如近红外发射的荧光团可以更好地满足临床诊断需求. 另一方面, 荧光适配体类成像手段仍需足量添加对应配体分子进入细胞或组织成像. 这在一定程度上阻碍了其临床应用. 对此, 开发如基于CRISPR/dCas和csiFP的成像系统等完全基因编码的成像手段可能具有更广阔的临床应用前景.

参考文献

- 1 Wolin SL, Maquat LE. *Science*, 2019, 366: 822–827
- 2 Das S, Vera M, Gandin V, Singer RH, Tutucci E. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22: 483–504
- 3 Luo X, Xue B, Feng G, Zhang J, Lin B, Zeng P, Li H, Yi H, Zhang XL, Zhu H, Nie Z. *J Am Chem Soc*, 2019, 141: 5182–5191
- 4 Femino AM, Fay FS, Fogarty K, Singer RH. *Science*, 1998, 280: 585–590
- 5 Kishi JY, Lapan SW, Beliveau BJ, West ER, Zhu A, Sasaki HM, Saka SK, Wang Y, Cepko CL, Yin P. *Nat Methods*, 2019, 16: 533–544
- 6 Raj A, van den Bogaard P, Rifkin SA, van Oudenaarden A, Tyagi S. *Nat Methods*, 2008, 5: 877–879
- 7 Rouhanifard SH, Mellis IA, Dunagin M, Bayatpour S, Jiang CL, Dardani I, Symmons O, Emert B, Torre E, Cote A, Sullivan A, Stamatoyannopoulos JA, Raj A. *Nat Biotechnol*, 2019, 37: 84–89
- 8 Feng H, Wang X, Xu Z, et al. Super-resolution fluorescence microscopy for single cell imaging. In: Gu J, Wang X. Eds. *Single Cell Biomedicine*. Singapore: Springer Singapore, 2018. 59–71
- 9 Shao S, Xue B, Sun Y. *Biophys J*, 2018, 115: 181–189
- 10 Liu Z, Lavis LD, Betzig E. *Mol Cell*, 2015, 58: 644–659
- 11 Tingey M, Schnell SJ, Yu W, Saredy J, Junod S, Patel D, Alkurdi AA, Yang W. *Cells*, 2022, 11: 3079
- 12 Sunbul M, Lackner J, Martin A, Englert D, Hacene B, Grün F, Nienhaus K, Nienhaus GU, Jäschke A. *Nat Biotechnol*, 2021, 39: 686–690
- 13 Arora A, Sunbul M, Jäschke A. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43: e144
- 14 Shao S, Zhang W, Hu H, Xue B, Qin J, Sun C, Sun Y, Wei W, Sun Y. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44: e86
- 15 Bertrand E, Chartrand P, Schaefer M, Shenoy SM, Singer RH, Long RM. *Mol Cell*, 1998, 2: 437–445
- 16 Brodsky AS, Silver PA. *RNA*, 2000, 6: 1737–1749
- 17 Chen J, Nikolaichik O, Singh J, Wright A, Bencsics CE, Coffin JM, Ni N, Lockett S, Pathak VK, Hu WS. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 13535–13540
- 18 Daigle N, Ellenberg J. *Nat Methods*, 2007, 4: 633–636
- 19 Takizawa PA, Vale RD. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97: 5273–5278
- 20 Wu B, Buxbaum AR, Katz ZB, Yoon YJ, Singer RH. *Cell*, 2015, 162: 211–220
- 21 Paige JS, Wu KY, Jaffrey SR. *Science*, 2011, 333: 642–646
- 22 Bouhedda F, Fam KT, Collet M, Autour A, Marzi S, Klymchenko A, Ryckelynck M. *Nat Chem Biol*, 2020, 16: 69–76
- 23 Braselmann E, Wierzbaj AJ, Polaski JT, Chromiński M, Holmes ZE, Hung ST, Batan D, Wheeler JR, Parker R, Jimenez R, Gryko D, Batey RT, Palmer AE. *Nat Chem Biol*, 2018, 14: 964–971
- 24 Chen X, Zhang D, Su N, Bao B, Xie X, Zuo F, Yang L, Wang H, Jiang L, Lin Q, Fang M, Li N, Hua X, Chen Z, Bao C, Xu J, Du W, Zhang L, Zhao Y, Zhu L, Loscalzo J, Yang Y. *Nat Biotechnol*, 2019, 37: 1287–1293
- 25 Filonov GS, Moon JD, Svensen N, Jaffrey SR. *J Am Chem Soc*, 2014, 136: 16299–16308
- 26 Song W, Filonov GS, Kim H, Hirsch M, Li X, Moon JD, Jaffrey SR. *Nat Chem Biol*, 2017, 13: 1187–1194
- 27 Trachman III RJ, Demeshkina NA, Lau MWL, Panchapakesan SSS, Jeng SCY, Unrau PJ, Ferré-D’Amaré AR. *Nat Chem Biol*, 2017, 13: 807–813
- 28 Truong L, Kooshapur H, Dey SK, Li X, Tjandra N, Jaffrey SR, Ferré-D’Amaré AR. *Nat Chem Biol*, 2022, 18: 191–198
- 29 Garcia JF, Parker R. *RNA*, 2015, 21: 1393–1395
- 30 Haimovich G, Zabezhinsky D, Haas B, Slobodin B, Purushothaman P, Fan L, Levin JZ, Nusbaum C, Gerst JE. *RNA*, 2016, 22: 660–666
- 31 Garcia JF, Parker R. *RNA*, 2016, 22: 657–659
- 32 Heinrich S, Sidler CL, Azzalin CM, Weis K. *RNA*, 2017, 23: 134–141
- 33 Park HY, Lim H, Yoon YJ, Follenzi A, Nwokafor C, Lopez-Jones M, Meng X, Singer RH. *Science*, 2014, 343: 422–424
- 34 Bratu DP, Cha BJ, Mhlanga MM, Kramer FR, Tyagi S. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 13308–13313
- 35 Chen AK, Davydenko O, Behlke MA, Tsourkas A. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38: e148
- 36 Cui ZQ. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33: 3245–3252
- 37 Jayagopal A, Halfpenny KC, Perez JW, Wright DW. *J Am Chem Soc*, 2010, 132: 9789–9796
- 38 Mhlanga MM. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33: 1902–1912

- 39 Santangelo PJ, Bao G. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35: 3602–3611
- 40 Turner-Bridger B, Jakobs M, Muresan L, Wong HHW, Franze K, Harris WA, Holt CE. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115: E9697–E9706
- 41 Wang W, Cui ZQ, Han H, Zhang ZP, Wei HP, Zhou YF, Chen Z, Zhang XE. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36: 4913–4928
- 42 Edwards TA, Pyle SE, Wharton RP, Aggarwal AK. *Cell*, 2001, 105: 281–289
- 43 Ozawa T, Natori Y, Sato M, Umezawa Y. *Nat Methods*, 2007, 4: 413–419
- 44 Quenault T, Lithgow T, Traven A. *Trends Cell Biol*, 2011, 21: 104–112
- 45 Yoshimura H, Inaguma A, Yamada T, Ozawa T. *ACS Chem Biol*, 2012, 7: 999–1005
- 46 Chen B, Gilbert LA, Cimini BA, Schnitzbauer J, Zhang W, Li GW, Park J, Blackburn EH, Weissman JS, Qi LS, Huang B. *Cell*, 2013, 155: 1479–1491
- 47 Nelles DA, Fang MY, O’Connell MR, Xu JL, Markmiller SJ, Doudna JA, Yeo GW. *Cell*, 2016, 165: 488–496
- 48 O’Connell MR, Oakes BL, Sternberg SH, East-Seletsky A, Kaplan M, Doudna JA. *Nature*, 2014, 516: 263–266
- 49 Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Essletzbichler P, Han S, Joung J, Belanto JJ, Verdine V, Cox DBT, Kellner MJ, Regev A, Lander ES, Voytas DF, Ting AY, Zhang F. *Nature*, 2017, 550: 280–284
- 50 Yang LZ, Wang Y, Li SQ, Yao RW, Luan PF, Wu H, Carmichael GG, Chen LL. *Mol Cell*, 2019, 76: 981–997.e7
- 51 Dou CX, Liu C, Ying ZM, Dong W, Wang F, Jiang JH. *Anal Chem*, 2021, 93: 2534–2540
- 52 Ong WQ, Citron YR, Sekine S, Huang B. *ACS Chem Biol*, 2017, 12: 200–205
- 53 Sato S, Watanabe M, Katsuda Y, Murata A, Wang DO, Uesugi M. *Angew Chem Int Ed*, 2015, 54: 1855–1858
- 54 Sato SI, Yatsuzuka K, Katsuda Y, Uesugi M. *Methods Mol Biol*, 2018, 1649: 305–318
- 55 Shin I, Ray J, Gupta V, Ilgu M, Beasley J, Bendickson L, Mehanovic S, Kraus GA, Nilsen-Hamilton M. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42: e90
- 56 Wang Q, Xiao F, Su H, Liu H, Xu J, Tang H, Qin S, Fang Z, Lu Z, Wu J, Weng X, Zhou X. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50: e84
- 57 Wang Z, Luo Y, Xie X, Hu X, Song H, Zhao Y, Shi J, Wang L, Glinsky G, Chen N, Lal R, Fan C. *Angew Chem Int Ed*, 2018, 57: 972–976
- 58 Yatsuzuka K, Sato S, Pe KB, Katsuda Y, Takashima I, Watanabe M, Uesugi M. *Chem Commun*, 2018, 54: 7151–7154
- 59 Ying ZM, Wu Z, Tu B, Tan W, Jiang JH. *J Am Chem Soc*, 2017, 139: 9779–9782
- 60 Zhong W, Szczepanski JT. *ACS Sens*, 2019, 4: 566–570
- 61 Smolina I, Broude N. *Methods Mol Biol*, 2015, 1316: 75–85
- 62 Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. *Nat Protoc*, 2013, 8: 2281–2308
- 63 Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. *Science*, 2012, 337: 816–821
- 64 Sun NH, Chen DY, Ye LP, Sheng G, Gong JJ, Chen BH, Lu YM, Han F. *Theranostics*, 2020, 10: 10993–11012
- 65 Shmakov S, Abudayyeh OO, Makarova KS, Wolf YI, Gootenberg JS, Semenova E, Minakhin L, Joung J, Konermann S, Severinov K, Zhang F, Koonin EV. *Mol Cell*, 2015, 60: 385–397
- 66 Kodama Y, Hu CD. *Biotechniques*, 2012, 53: 285–298
- 67 Chen M, Sui T, Yang L, Qian Y, Liu Z, Liu Y, Wang G, Lai L, Li Z. *Biosens Bioelectron*, 2022, 204: 114074
- 68 Tyagi S. *Nat Methods*, 2009, 6: 331–338
- 69 Cheong CG, Hall TMT. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 13635–13639
- 70 Yamada T, Yoshimura H, Inaguma A, Ozawa T. *Anal Chem*, 2011, 83: 5708–5714
- 71 Yamada T, Yoshimura H, Shimada R, Hattori M, Eguchi M, Fujiwara TK, Kusumi A, Ozawa T. *Sci Rep*, 2016, 6: 38910
- 72 Dong S, Wang Y, Cassidy-Amstutz C, Lu G, Bigler R, Jezyk MR, Li C, Hall TMT, Wang Z. *J Biol Chem*, 2011, 286: 26732–26742
- 73 Wu B, Chen J, Singer RH. *Sci Rep*, 2014, 4: 3615
- 74 Wu J, Zaccara S, Khuperkar D, Kim H, Tanenbaum ME, Jaffrey SR. *Nat Methods*, 2019, 16: 862–865
- 75 Zhou WJ, Li H, Zhang KK, Wang F, Chu X, Jiang JH. *J Am Chem Soc*, 2021, 143: 14394–14401
- 76 Rogers TA, Andrews GE, Jaeger L, Grabow WW. *ACS Synth Biol*, 2015, 4: 162–166
- 77 Chen X. *FEBS Lett*, 2005, 579: 5923–5931
- 78 Simon SA, Meyers BC. *Curr Opin Plant Biol*, 2011, 14: 148–155
- 79 Krol J, Loedige I, Filipowicz W. *Nat Rev Genet*, 2010, 11: 597–610
- 80 Dong H, Lei J, Ding L, Wen Y, Ju H, Zhang X. *Chem Rev*, 2013, 113: 6207–6233
- 81 Aw SS, Tang MX, Teo YN, Cohen SM. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44: e92

- 82 Huang K, Doyle F, Wurz ZE, Tenenbaum SA, Hammond RK, Caplan JL, Meyers BC. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45: e130
- 83 Han KY, Leslie BJ, Fei J, Zhang J, Ha T. *J Am Chem Soc*, 2013, 135: 19033–19038
- 84 Strack RL, Disney MD, Jaffrey SR. *Nat Methods*, 2013, 10: 1219–1224
- 85 Shechner DM, Hacisuleyman E, Younger ST, Rinn JL. *Nat Methods*, 2015, 12: 664–670
- 86 Holeman LA, Robinson SL, Szostak JW, Wilson C. *Folding Des*, 1998, 3: 423–431
- 87 Sunbul M, Jäschke A. *Angew Chem Int Ed*, 2013, 52: 13401–13404
- 88 Ying ZM, Yuan YY, Tu B, Tang LJ, Yu RQ, Jiang JH. *Chem Sci*, 2019, 10: 4828–4833
- 89 Litke JL, Jaffrey SR. *Nat Biotechnol*, 2019, 37: 667–675

Recent advances in fluorescence imaging methods for endogenous RNA in living cells

Qi Wang^{1,3}, Feng Xiao¹, Xiang Zhou^{1,2*}

¹ College of Chemistry and Molecular Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China

² The Institute of Advanced Studies, Wuhan University, Wuhan 430072, China

³ Zhongnan Hospital, Wuhan University, Wuhan 430071, China

*Corresponding author (email: xzhou@whu.edu.cn)

Abstract: Live-cell imaging of RNA can provide us with important information on gene expression and regulation during cellular life activities. Studies of RNA localization and dynamics require the development of tools to visualize RNA with high spatial and temporal resolution. In recent years, significant progress has been made in visualizing endogenous RNA in living cells using RNA-binding proteins, *in vitro* RNA evolution, and other methods. Here, we review the history of RNA imaging in living cells, which highlights on the mechanisms, advances, and advantages and disadvantages of genetically encodable means of imaging endogenous RNA in living cells based on fluorescent RNA aptamers and CRISPR/Cas. Finally, the challenges and future prospect of the field are discussed.

Keywords: RNA imaging, genetic coding, live cell imaging, endogenous RNA, RNA aptamer, CRISPR/Cas

doi: [10.1360/SSC-2022-0214](https://doi.org/10.1360/SSC-2022-0214)