

DNA 编码荧光实现细胞内 RNA 高通量成像

柯国梁, 张晓兵*

湖南大学化学化工学院, 化学生物传感与计量学国家重点实验室, 分子科学与生物医学实验室, 长沙 410082

* 联系人, E-mail: xbzhang@hnu.edu.cn

单细胞RNA分析方法是单细胞生物学发展的基石. 构建能够高通量获取细胞RNA表达水平、序列及空间分布等信息的单细胞RNA分析方法是目前单细胞分析领域面临的巨大挑战. 近日, 清华大学化学系李景虹课题组^[1]在*Chem*上发表了题为“DNA-Sequence-encoded rolling circle amplicon for single-cell RNA imaging”的研究论文, 提出了一种基于核酸序列信息编码的原位扩增标记方法, 实现了细胞内单分子、单碱基分辨及高通量的原位RNA成像, 并利用该技术研究了乳腺癌发生相关基因的表达.

荧光成像技术是目前最有力的单细胞原位分析工具. 受益于核酸探针合成、设计及成像技术的发展, 目前已有多种单分子水平的RNA荧光成像方法见诸报道, 包括单分子荧光原位杂交技术(smFISH)、滚环扩增技术(RCA)和支链DNA技术(bDNA)等^[2]. 这些单分子RNA成像技术能够准确获取细胞RNA表达量、序列及空间分布等信息, 但由于荧光基团的光谱重叠问题, 其检测通量受到限制(一般只能同时成像3~4种目标)^[2]. 目前一般只能采用一种多次批量顺序杂交标记的方法(sequential hybridization)来提高检测通量^[3], 但存在标记错误率难以控制、细胞检测通量低等问题, 且操作繁琐、周期长, 不利于推广^[4].

李景虹课题组^[1]发表的该项研究工作创造性地构建了核酸序列信息编码荧光信号的新技术, 利用荧光光谱编码方法显著提高了细胞内RNA的成像通量. 核酸ATCG碱基是生命信息的载体, 是否能够利用其丰富的分子信息编码荧光信号? 他们利用核酸最基本的性质——Watson-Crick碱基配对, 构建了基于核酸序列的荧光编码方法(sequence-encoded amplicon, SeqEA), 并将其应用于细胞RNA高通量标记. 该方法通过热力学计算, 辅助设计核酸探针的编码序列, 调控RNA识别扩增产物(编码的扩增产物)与荧光标记探针的杂交效率, 从而构建出不同荧光信号强度的扩增产物, 用于不同RNA标记区分. 这种被精确调控的编码荧光信号能够显著提升RNA的标记数量. 借助于原位扩增技术, SeqEA能够实现细胞内单分子、单碱基分辨及高通量的原位RNA成像. SeqEA方法优势在于: 不需要复杂的核酸结构设计, 只需要变动编码序列的几个碱基

就可以构造一个新的荧光编码用于RNA标记. 通过核酸杂交的计算和预测, 可以实现编码信号的精准设计和调控. SeqEA的模块化、可编程及序列编码等特点使其能够编码出稳定的荧光信号并具备较高编码潜力, 从而应用于RNA高通量检测(图1(a)~(c)). SeqEA能够实现目标RNA及目标RNA特征序列(如RNA剪切体)的高特异性区分和成像, 并可以检测到细胞内表达量低至3拷贝的RNA.

该工作首次实现了细胞内原位的荧光光谱编码, 并应用于细胞内单分子检测. 荧光光谱编码方法通过结合不同荧光颜色和荧光强度对目标分子进行组合标记, 能有效提高荧光标记的通量, 并应用于体外高通量检测. 但是目前的荧光编码尺寸太大($>1 \mu\text{mol/L}$), 很难应用于细胞内标记^[5]. SeqEA方法使用小尺寸锁式DNA探针(~20 nm)识别细胞RNA序列, 并利用原位滚环扩增技术放大识别信号, 从而产生可通过荧光成像读取的带编码信号的扩增产物. 原位核酸扩增技术的引入可以实现细胞内的荧光光谱编码, 并实现单分子水平的RNA成像. 同时借助于锁式DNA探针的高特异性, SeqEA方法能够实现单碱基分辨的胞内RNA检测.

高通量的单细胞RNA原位分析方法可以用于细胞基因表达的异质性、相关性及其空间分布特征的研究. 该研究发现, 所选取的9种与乳腺癌发生相关的基因是爆发式表达的(transcriptional burst), 并且*KI67*, *Her2*及*ER*基因的表达具有明显相关性(图1(d), (e)). 在选取分析的基因中, 与骨架组装相关的基因*PFN1*和*CFL1*表达的RNA相对分布于细胞外周, 而细胞外分泌蛋白THBS1对应的mRNA倾向于分布于靠近细胞核位置(图1(f)). 这些结果表明, 单细胞水平RNA表达分析能够用于共调控基因的发现及细胞基因表达通路的研究, 并且亚细胞水平基因表达的空间分布特征可以被应用于基因功能的预测和辅助分析.

因此, 此项工作发展的SeqEA方法实现了细胞内RNA高特异性、高通量及精准定量的原位分析, 可以作为一个有竞争力的单细胞RNA分析平台, 用于基因表达调控通路、mRNA选择性剪切、mRNA单碱基变异及非编码RNA(如miRNA, lncRNA及circRNA等)的同时成像分析, 也为构建高通量RNA成像方法提供了一种新思路.

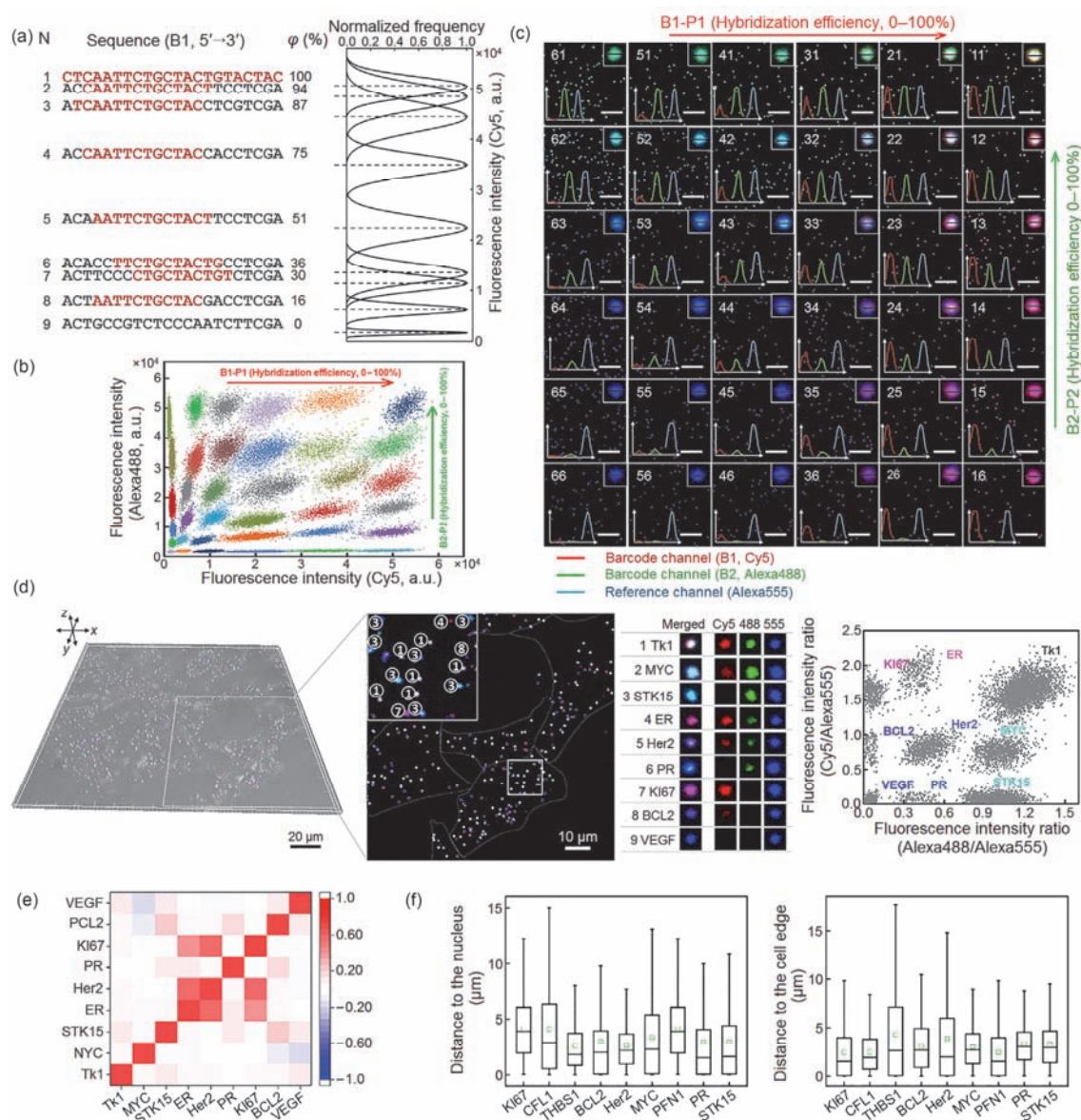


图1 (网络版彩色)(a) DNA序列编码扩增产物的荧光强度; (b, c) 两种通道编码扩增产物的荧光信号; (d) MCF-7 细胞内多种mRNA同时成像; (e) 乳腺癌发生相关基因表达的相关性分析结果; (f) 细胞内mRNA位置与细胞核和细胞外周距离统计

参考文献

- Deng R, Zhang K, Wang L, et al. DNA-sequence-encoded rolling circle amplicon for single-cell RNA imaging. *Chem*, 2018, doi: 10.1016/j.chempr.2018.1003.1003
- Crosetto N, Bienko M, Van Oudenaarden A. Spatially resolved transcriptomics and beyond. *Nat Rev Genet*, 2015, 16: 57–66
- Lubeck E, Coskun A F, Zhiyentayev T, et al. Single-cell *in situ* RNA profiling by sequential hybridization. *Nat Methods*, 2014, 11: 360–361
- Chen K H, Boettiger A N, Moffitt J R, et al. Spatially resolved, highly multiplexed RNA profiling in single cells. *Science*, 2015, 348: aaa6090
- Lin C, Jungmann R, Leifer A M, et al. Submicrometre geometrically encoded fluorescent barcodes self-assembled from DNA. *Nat Chem*, 2012, 4: 832–839