
分子细胞卓越中心开发出活细胞DNA成像新工具

作者：writer 来源：中国科学院

本文原地址：<https://www.iikx.com/news/progress/28072.html>

本文仅供学习交流之用，版权归原作者所有，请勿用于商业用途！

分子细胞卓越中心开发出活细胞DNA成像新工具。

7月4日，《自然-方法》(Nature Methods)

在线发表了

中国科学院分子细胞科

学卓越创新中心陈玲玲研究组关于CRISPR-dCas12a应用于DNA活细胞标记的研究成果(CRISPR array-mediated imaging of non-repetitive and multiplex genomic loci in living cells)。

该研究筛选并优化了现有的CRISPR-

dCas12a系统，构建了可用于非重复序列DNA

活细胞成像的CRISPRdelight系统；进而利用CRISPRdelight

系统揭示了基因位点在细胞

核内的定位与其运动能力和转录活性

的相关性；利用RNA适配体修饰的CRISPR串联序列实现了对4种卫星DNA的活细胞多色成像。

前期，陈玲玲研究组构建了基于CRISPR-dCas13的RNA

标记系统，实现了对活细胞和斑马鱼胚胎内RN

A的成像追踪以及活细胞RNA多色成像

。此外，研究发现，经过改造的靶向DNA的CRISPR-Cas9

系统可用于活细胞DNA成像标记。这些CRISPR

系统在标记内源核酸序列方面

具有优势，而对于非重复DNA/RNA序列的活细胞特异性成像却存在较多限制。

CRISPR-Cas12a系统属于类型V的CRISPR-Cas家族，在靶向DNA

的同时具备将CRISPR串联序列加工成多条成熟crRNA的能力

。因此，CRISPR-Cas12a系统理论上可以通过CRISPR

串联序列在同一细胞内表达足够数量的crRNA，从而实现非重复序列DNA的标记。

为了验证这

一假设，该研究选取了

三种已报道的能够提高基因编辑效率的dLbCas12a突变体，并比较了它们在标记微卫星DNA Sat I和Sat

III方面的能力。结果显示，hyperdLbCas12a突变体

可以实现更高的标记效率和信号质量。进一步，研究发现，hyperdLbCas12a可以加工CRISPR串联序列，并维持与直接表达成熟crRNA近似的DNA标记能力。同时，该研究筛选出能够表达长达50次crRNA重复序列的CAG启动子，并基于此构建了用于活细胞DNA成像的CRISPRdelight系统。

该研究针对CCAT1转录起始位点上游10kb的区域设计了48条gRNA，使用CRISPRdelight系统实现了CCAT1基因位点的活细胞标记。以同样的方式，CRISPRdelight系统在其他6个非重复序列基因位点均得到有效验证。同时，该系统在HCT116、U2OS以及小鼠胚胎干细胞中同样有效。研究发现，相较于之前报道的基于CRISPR-dCas9的CARGO活细胞标记系统，CRISPRdelight系统具有质粒构建成本低、周期短、可表达gRNA数量多、标记系统组成更简洁等优点。

进一步，该研究利用CRISPRdelight系统分析了CCAT1在细胞核内的分布特点和运动特征。研究发现，位于细胞核膜处Lamin蛋白层的CCAT1位点运动能力弱于位于细胞核内的CCAT1位点；进而检测CCAT1的内含子表达信号发现，Lamin蛋白层的CCAT1位点转录活性更弱。同时，研究对HSPH1、HSPA1A等热休克基因进行标记，并在向细胞施加42 °C或亚砷酸钠刺激后发现，定位于核斑的HSPH1基因位点会增多，且位于核斑的基因位点转录活性会更强。这表明了基因组DNA的细胞核内空间位置与其运动能力和表达活性的相关性。

该工作通过RNA结构优化，将BoxB、Pepper、PP7和MS2等RNA适配子元件插入到gRNA中，利用CRISPRdelight系统和这些元件对应的融合荧光蛋白，实现了微卫星DNA Sat I、Sat II、Sat III和Sat IV的活细胞四色标记。CRISPRdelight系统为探讨活细胞中DNA位点的空间位置和动力学特征，提供了更简单和便利的新手段。

研究工作得到国家自然科学基金委员会、科学技术部、中国科学院和上海市的资助，并获得分子细胞卓越中心细胞分析技术平台的技术支持。

[论文链接](#)

分子细胞卓越中心开发出CRISPRdelight活细胞DNA成像新工具

研究团队单位：分子细胞科学卓越创新中心

更多 科学进展 请访问 <https://www.iikx.com/news/progress/>

本文版权归原作者所有，请勿用于商业用途，[爱科学iikx.com](https://www.iikx.com)转发