
研究开发出活细胞DNA成像新工具

作者：writer 来源：科学网

本文原地址：<https://www.iikx.com/news/progress/28098.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！

研究开发出活细胞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RNA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,从而实现对非重复序列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DN

A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 α 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。（来源：中国科学院分子细胞科学卓越创新中心）

相关论文信息：<https://www.nature.com/articles/s41592-024-02333-3>

分子细胞卓越中心开发出CRISPRdelight活细胞DNA成像新工具

特别声明：本文转载仅仅是出于传播信息的需要，并不意味着代表本网站观点或证实其内容的真实性；如其他媒体、网站或个人从本网站转载使用，须保留本网站注明的“来源”，并自负版权等法律责任；作者如果不希望被转载或者联系转载稿费等事宜，请与我们联系。

作者：陈玲玲等 来源：《自然—方法学》

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