

DOI: 10.13376/j.cblls/2014033

文章编号: 1004-0374(2014)03-0214-05



王江云 研究员

王江云课题组主要研究方向为合成生物学及化学生物学。主要研究内容包括: (1) 发展蛋白质及 RNA 标记的新方法, 研究蛋白质及 RNA 的动态构象变化、定位、折叠以及相互作用。(2) 发展基因密码子扩展方法, 并在此基础上进行酶的定向进化。这些新的方法揭示了细胞色素 c 氧化酶、光合作用中心及细胞骨架组装的重要机理, 并且在药物蛋白优化、细胞工厂及生物工程上已有重要应用。

活细胞内 RNA 标记和成像技术

李发慧, 王芳, 王江云*

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要: RNA 根据其定位、结构、修饰以及与其他生物分子的动态相互作用, 复杂而精确地执行丰富多彩的功能。RNA-蛋白质相互作用和 RNA 在细胞内定位的异常与多种疾病的发生发展密切相关。活细胞 RNA 标记和成像技术已成为研究 RNA 定位和运动、基因转录调控及 RNA-蛋白质相互作用等生物学过程的有力工具。活细胞 RNA 标记和成像技术的开发已成为国际科学研究领域的热点。将目前存在的活细胞内 RNA 标记和成像技术方面的研究进展进行概述。

关键词: 活细胞; RNA; 成像

中图分类号: Q-33 **文献标志码:** A

The technologies of RNA labeling and imaging in living cells

LI Fa-Hui, WANG Fang, WANG Jiang-Yun*

(Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China)

Abstract: RNA performs a variety of important biological functions. The disorder of RNA-protein interactions and RNA localization is closely related to the occurrence of disease. The technologies of RNA labeling and imaging in living cells have been useful tools for studying RNA location and movement, gene transcription regulation and RNA-protein interactions. The exploitation of the technologies for RNA labeling and imaging has also attracted the attention of many scientists.

Key words: living cells; RNA; imaging

RNA 是生物体内一种重要的生物大分子, 其在蛋白质翻译、基因表达调控等生物学过程中扮演着极其重要的角色。RNA 在活细胞内存在明确的亚细胞定位, RNA 的不同亚细胞定位决定着其执行不同生物学功能。因此, 开发活细胞中 RNA 的特异标记和成像技术对我们精确理解 RNA 的生物学功能具有十分重要的意义。目前, 在活细胞中

RNA 的特异标记和成像技术主要有以下几种: (1) MS2-荧光蛋白成像技术; (2) 双分子荧光互补标记技术; (3) RNA 适配子技术; (4) 荧光杂交探针标记技术。本文拟将以上技术方法的优缺点进行详细的

收稿日期: 2013-10-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(31000364)

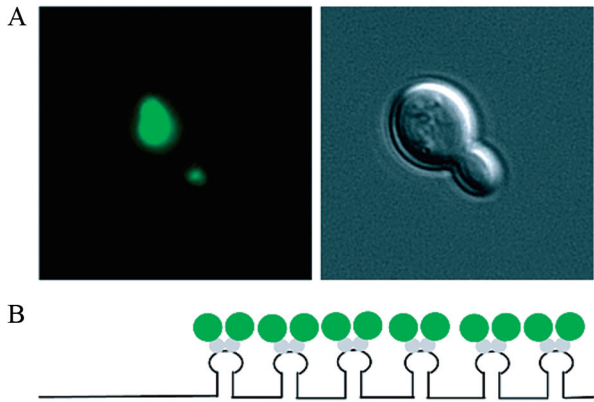
*通信作者: E-mail: jwang@ibp.ac.cn

阐述。

1 MS2-荧光蛋白成像技术

MS2- 荧光蛋白系统是目前应用最为广泛的 RNA 成像技术, 其最初被用于酿酒酵母 *ASH1* 基因 mRNA 的标记^[1]。MS2- 荧光蛋白系统由两部分组成, 一是 MS2- 荧光蛋白融合蛋白的表达。MS2 是噬菌体的外壳蛋白, 它可以与噬菌体 MS2 RNA 长度为 19 nt 的茎环区结合, 两者之间的解离常数为 5 nmol/L。由此可见, MS2 与 RNA 之间的强亲和力决定了它们之间的结合基本上是不可逆的^[2]。二是表达融合多个拷贝 (至少 6 个拷贝) MS2 RNA 茎环区的目标 RNA。由于 MS2 是以二聚体的形式存在, 因此, 6 个拷贝的 MS2 RNA 可以结合 12 个 MS2-GFP 蛋白^[1]。最后, 上述两部分在细胞内的共表达可以实现活细胞内特定 RNA 的可视化标记 (图 1)。

目前 MS2- 荧光蛋白已经被广泛应用于果蝇、



A: MS2-GFP标记酿酒酵母*ASH1*基因mRNA; B: MS2-GFP RNA成像系统的描述

图1 利用MS2-GFP系统进行活细胞RNA可视化成像

神经元、哺乳动物及植物细胞中 RNA 的成像^[3-9]。在果蝇的卵母细胞中, MS2-GFP 系统揭示了 *nanos* 基因 mRNA 向细胞后极的转运需要细胞骨架蛋白 actin 的辅助^[3]。由于 MS2-GFP 系统具有高灵敏度, 其已被用于单分子检测^[10]。在哺乳动物细胞中, 通过单分子检测, 融合 24 个拷贝的 MS2 RNA 茎环区的 *lacZ* RNA 展示了其快速直接向微管移动的能力^[11]。MS2- 荧光蛋白系统能否正确反应 mRNA 在细胞内的定位取决于 MS2 茎环区在目标 mRNA 的位置。在实际操作中, MS2 茎环区通常置于 mRNA 的 3'-UTR。然而, mRNA 的 3'-UTR 通常包含影响 mRNA 稳定和定位的功能元件。因此, 在对特定 RNA 进行标记前需要对其 3'-UTR 的功能元件有着清晰的了解^[12]。目前 MS2- 荧光蛋白成像技术存在游离 MS2- 荧光蛋白引起高背景值的问题, 因此, 在进行 RNA 标记的时候需要掌握 MS2- 荧光蛋白和目标 RNA 表达的比例。对于胞质定位的 RNA, 通常在 MS2- 荧光蛋白上加上核定位序列以降低其背景值^[1]。

2 双分子荧光互补标记技术

针对游离的 MS2- 荧光蛋白所引起的高背景值, 双分子荧光互补 (bimolecular fluorescence complementation, BiFC) 被开发用于活细胞 RNA 的标记。这种方法基于 GFP 或其他荧光蛋白能被拆分为两个结构域, 然后荧光蛋白结构域分别与 RNA 结合蛋白融合表达^[13-14]。当它们与目标 RNA 结合时, 荧光蛋白两个结构域之间的距离足够近时, 将导致荧光发射团的重组而发荧光, 进而实现活细胞 RNA 的可视化成像。BiFC 技术已被用于活细胞中多种 RNA 的成像。在 COS-7 细胞中, β -actin 存在顺式

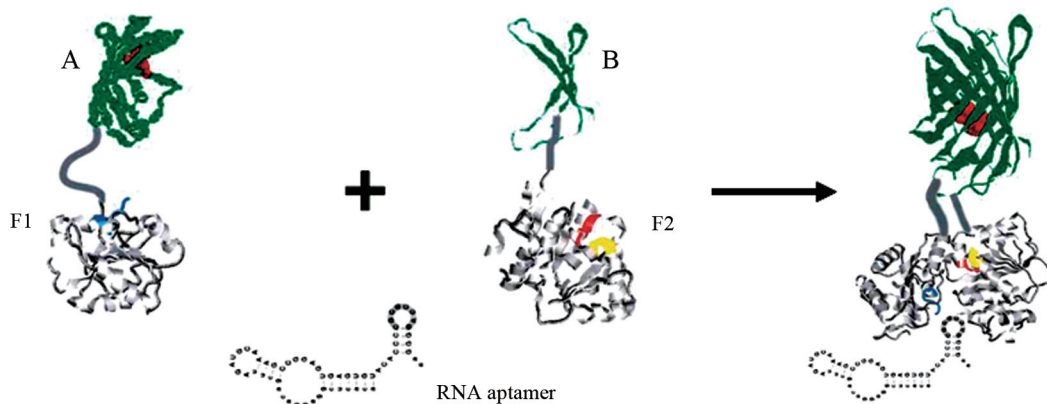


图2 基于RNA适配子的双分子荧光互补RNA标记技术

作用定位元件,同时荧光素酶 mRNA 包含 β -actin 顺式作用定位序列。通过 MS2 蛋白分别与 Venus 荧光蛋白结构域和 IMP1 (insulin-like growth factor II mRNA-binding protein 1) 融合表达,荧光素酶 mRNA 将被标记且观察到其在 β -actin 蛋白上的定位^[15]。BiFC 技术也被用于在 HeLa 细胞中标记线粒体 RNA 以及大肠杆菌中 *lacZ* mRNA 和 5S rRNA 的成像^[16-17]。为了在大肠杆菌中标记 RNA,真核翻译起始因子 eIF4a 被用于与 GFP 融合表达。eIF4a 由两个球状结构域组成,其与理性化设计的 RNA 适配子 (aptamer) 具有高亲和力^[18]。eIF4a 的两个球状结构域可以通过与 RNA 适配子结合而重新组装为 eIF4a (图 2)。当 eIF4a 的两个球状结构域分别对应于 GFP 的两个结构域融合,同时与 RNA 适配子融合的 *lacZ* mRNA 或 5S rRNA 在大肠杆菌中共表达时,*lacZ* mRNA 和 5S rRNA 将被荧光标记且可以观察到它们在活细胞中的动态变化。虽然相对于 MS2-荧光蛋白系统,双分子荧光互补标记技术极大地降低了 RNA 成像的荧光背景,但是当拆分的荧光蛋白表达量过高时,它们之间也会结合重组而发出荧光。

3 RNA适配子技术

2011 年,康乃尔大学 Jaffrey 研究小组^[19]的科研人员利用 RNA 能够折叠形成复杂三维形状的特性,通过筛选的方法得到一段形成特定结构的 RNA 序列——RNA 适配子,同时得到一个小分子化合物 DFHBI (3,5-difluoro-4-hydroxybenzylidene imidazolinone)。DFHBI 本身没有荧光,但当 RNA 适配子与它结合时发出类似于绿色荧光蛋白的绿色荧光,其亮度可与荧光蛋白相媲美。他们将“RNA 适配子-DFHBI”复合物命名为“Spinach”。Spinach 具有显著的抗光漂白作用,Spinach 融合的 RNA 可以用于活细胞内定位。他们将 Spinach 与 5S RNA 的 3' 端融合,并将该融合基因转染进入人类胚胎肾 HEK293T 细胞中,通过荧光检测发现 5S RNA-Spinach 复合物与正常 5S RNA 具有相同的细胞定位,并观察到在细胞压力应激反应中 5S RNA 发生了快速的积聚;但是这种方法由于 RNA 适配子与 DFHBI 是一种非共价作用,故 DFHBI 的使用浓度很高 (20 $\mu\text{mol/L}$),这将会对细胞产生一定的毒性^[19]。

4 荧光杂交探针标记技术

上述活细胞 RNA 标记的方法都是针对外源的

RNA 进行标记。荧光杂交探针标记是通过合成带荧光染料的 RNA 互补序列以实现内源 RNA 的特异性标记。目前荧光杂交探针主要有两种:线性寡核苷酸探针和分子信标。现就这两种探针的使用进行简单的介绍。

4.1 线性寡核苷酸探针

线性寡核苷酸探针为长度 12~25 nt 的单链 RNA 互补序列,在其 3' 或 5' 端共价连接荧光染料。当将线性寡核苷酸探针导入细胞内,它将与目标 RNA 互补配对进而实现内源特定 RNA 的标记。在摇蚊中,巴尔比尼氏环 2 (BR2) 信使核糖核蛋白 (mRNP) 通过线性荧光探针的杂交实现了可视化成像,发现 BR2 mRNP 在细胞内的运动是一种随机且不连续的行为^[20];但是这种方法同样存在游离探针所引起的高背景值的问题。已有研究通过用多色的寡核苷酸探针对目标 RNA 进行杂交或单个寡核苷酸探针对目标 RNA 的重复序列进行杂交以提高 RNA 成像的分辨率。

4.2 分子信标

分子信标 (molecular beacon) 是另一种杂交探针标记 RNA 的方法^[21-22]。分子信标为分子内互补形成发卡结构的核苷酸序列,其一端连接荧光染料,而另一端连接荧光染料淬灭剂。分子信标本身没有荧光,其只有与内源的目标 RNA 杂交时才会产生荧光。因此,我们可以利用连接不同荧光染料的分子信标以实现在活细胞内同时对多个目标 RNA 的标记。分子信标已被用于鸡胚成纤维细胞的 β -actin mRNA、非洲爪蟾卵母细胞的 VegT 和 Xlsirts RNA 以及果蝇卵母细胞的 oskar mRNA 的标记^[23-25]。由于分子信标具有高灵敏度,其也被用于单分子 RNA 的检测;但是线性寡核苷酸探针和分子信标技术对 RNA 的标记效率均受限于 RNA 与蛋白质的结合及内源 RNA 的二级结构。

5 展望

随着科学研究的深入, RNA 所扮演的丰富多彩的生物学角色逐渐被认识, RNA 所执行的生物学功能不亚于蛋白质。目前已开发的活细胞内 RNA 标记和成像技术极大地促进了 RNA 的功能研究,加深了我们对 RNA 功能的认识。但是已有的活细胞内 RNA 标记和成像技术都存在某种程度上的不足,这阻碍了 RNA 功能的广泛研究。因此,发展新的活细胞内 RNA 标记和成像技术将会极大提高 RNA 功能研究的水平,这对广大科研工作者来说

也是任重而道远的。

[参 考 文 献]

- [1] Bertrand E, Chartrand P, Schaefer MS, et al. Localization of *ASH1* mRNA particles in living yeast. *Mol Cell*, 1998, 2(4): 437-45
- [2] LeCuyer KA, Behlen LS, Uhlenbeck OC. Mutagenesis of a stacking contact in the MS2 coat protein-RNA complex. *EMBO J*, 1996, 15(24): 6847-53
- [3] Forrest KM, Gavis ER. Live imaging of endogenous RNA reveals a diffusion and entrapment mechanism for *nanos* mRNA localization in *Drosophila*. *Curr Biol*, 2003, 13(14): 1159-68
- [4] Fusco D, Accornero N, Lavoie B, et al. Single mRNA molecules demonstrate probabilistic movement in living mammalian cells. *Curr Biol*, 2003, 13(2): 161-7
- [5] Hamada S, Ishiyama K, Choi SB, et al. The transport of prolamine RNAs to prolamine protein bodies in living rice endosperm cells. *Plant Cell*, 2003, 15(10): 2253-64
- [6] Rook MS, Lu M, Kosik KS. CaMKII α 3' untranslated region-directed mRNA translocation in living neurons: visualization by GFP linkage. *J Neurosci*, 2000, 20(17): 6385-93
- [7] Grunwald D, Singer RH. *In vivo* imaging of labelled endogenous β -actin mRNA during nucleocytoplasmic transport. *Nature*, 2010, 467(7315): 604-7
- [8] Larson DR, Fritzsche C, Sun L, et al. Direct observation of frequency modulated transcription in single cells using light activation. *Elife*, 2013, 2: e00750
- [9] Lionnet T, Czaplinski K, Darzacq X, et al. A transgenic mouse for *in vivo* detection of endogenous labeled mRNA. *Nat Methods*, 2011, 8(2): 165-70
- [10] Hocine S, Raymond P, Zenklusen D, et al. Single-molecule analysis of gene expression using two-color RNA labeling in live yeast. *Nat Methods*, 2013, 10(2): 119-21
- [11] Shav-Tal Y, Darzacq X, Shenoy SM, et al. Dynamics of single mRNPs in nuclei of living cells. *Science*, 2004, 304(5678): 1797-800
- [12] Lange S, Katayama Y, Schmid M, et al. Simultaneous transport of different localized mRNA species revealed by live-cell imaging. *Traffic*, 2008, 9(8): 1256-67
- [13] Hu CD, Chinenov Y, Kerppola TK. Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol Cell*, 2002, 9(4): 789-98
- [14] Magliery TJ, Wilson CG, Pan W, et al. Detecting protein-protein interactions with a green fluorescent protein fragment reassembly trap: scope and mechanism. *J Am Chem Soc*, 2005, 127(1): 146-57
- [15] Rackham O, Brown CM. Visualization of RNA-protein interactions in living cells: FMRP and IMP1 interact on mRNAs. *EMBO J*, 2004, 23(16): 3346-55
- [16] Ozawa T, Natori Y, Sato M, et al. Imaging dynamics of endogenous mitochondrial RNA in single living cells. *Nat Methods*, 2007, 4(5): 413-9
- [17] Valencia-Burton M, McCullough RM, Cantor CR, et al. RNA visualization in live bacterial cells using fluorescent protein complementation. *Nat Methods*, 2007, 4(5): 421-7
- [18] Oguro A, Ohtsu T, Svitkin YV, et al. RNA aptamers to initiation factor 4A helicase hinder cap-dependent translation by blocking ATP hydrolysis. *RNA*, 2003, 9(4): 394-407
- [19] Paige JS, Wu KY, Jaffrey SR. RNA mimics of green fluorescent protein. *Science*, 2011, 333(6042): 642-6
- [20] Siebrasse JP, Veith R, Dobay A, et al. Discontinuous movement of mRNP particles in nucleoplasmic regions devoid of chromatin. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(51): 20291-6
- [21] Bratu DP. Molecular beacons: fluorescent probes for detection of endogenous mRNAs in living cells. *Methods Mol Biol*, 2006, 319: 1-14
- [22] Tyagi S, Kramer FR. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol*, 1996, 14(3): 303-8
- [23] Bratu DP, Cha BJ, Mhlanga MM, et al. Visualizing the distribution and transport of mRNAs in living cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(23): 13308-13
- [24] Kloc M, Wilk K, Vargas D, et al. Potential structural role of non-coding and coding RNAs in the organization of the cytoskeleton at the vegetal cortex of *Xenopus* oocytes. *Development*, 2005, 132(15): 3445-57
- [25] Tyagi S, Alsmadi O. Imaging native β -actin mRNA in motile fibroblasts. *Biophys J*, 2004, 87(6): 4153-62

王江云报告讨论

沈晓骅 (清华大学生命科学学院)

Q: 你所报告的酶能识别特异性的 RNA 序列, 然后将叠氮加入上去, 请问你的 RNA 有多大? 特异性如何? 如何识别? 效率如何? 你的这个方法能检测到体内多少拷贝数的 RNA?

A: 100 nt, 同时能够提供较高的特异性, 是结构和序列共同识别的。实验效率目前如果在体内高表达特异的 RNA, 则跑胶可见, 具体反应效率还有待检测。目前尚不知道能够检测到多少拷贝的 RNA。此方法具有潜在高特异性, 与 RNA 适体方法不同, 是利用亲和力及共价连接的方法, 经过改造, 希望能够得到类似荧光蛋白的效果。

付向东 (加州大学圣地亚哥分校)

Q: 接上面问题, 你所谓的共价连接是指什么? 方法需要特异性去表达某段 RNA 吗? 能否直接定位到某段 RNA 上?

A: 共价连接是指先将叠氮连接到 tRNA 上, 再通过光点击将荧光基团连接上去。是的, 必需要表达目的 RNA。目前正在改善, 希望能够通过环丙烯和四氮唑的反应去优化体系。

沈晓骅 (清华大学生命科学学院)

Q: 能否将 Biotin 连接上去?

A: 可以, 目前我们连接的是更难合成的分子。

王阳明 (北京大学生命科学学院)

Q: 100 nt 的 RNA 序列加到靶 RNA 上, 如 mRNA 上, polyA 会否影响标记吗? 你提到的 Jeremy 所报导的 RNA 荧光标记是否会对蛋白质之类的也有标记作用? 其 Kd 是 4.5 $\mu\text{mol/L}$, 目前已知的最高效率的标记物有多少?

A: 目前我们还没有试过是否有影响, 我们的目标是将环丙烯带到 RNA 上。Jeremy 所报导的 RNA 荧光标记对蛋白质是否有影响还不知道。效率最高的标记物我们还不知道, 我们希望通过共价连接的方法, 突破结合效率的限制问题。

张钠 (合肥强磁场研究中心)

Q: 你所用的三元环环丙烯是否稳定? 有无细胞毒性?

A: 我们做过检测, 很稳定。目前实际生活中所用的水果保鲜剂就是 1- 甲基环丙烯, 它是无毒性的, 但是我们光交联的诱发过程可能有一定毒性。