

DOI: 10.13376/j.cblls/2021035

文章编号: 1004-0374(2021)03-0312-14



杨弋, 博士, 长江学者特聘教授, 国家杰出青年基金获得者, 万人计划科技创新领军人才计划入选者。研究领域涉及合成生物学、光遗传学、化学生物学。主要研究方向为细胞代谢监控技术、生物大分子标记技术、药物高效筛选与合成技术。研究成果发表在*Nature Biotechnology*、*Nature Methods*、*Nature Communications*、*Nature Protocols*、*Cell Metabolism*、*Developmental Cell*等一流杂志, 受到了国际同行的广泛关注。所发展的多种前沿研究技术已被全球近千研究组使用。

细胞RNA影像解析技术的研究进展

陈显军, 左方婷, 谢鑫, 方梦悦, 杨弋*
(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237)

摘要: RNA具有独特的三维结构和种类繁多的生物学功能, 广泛参与细胞各类生命活动, 与多种疾病的发生与发展密切相关。长期以来, 科学家们一直在追求可以对细胞中RNA的丰度和分布进行解析的技术。该文将对多种细胞RNA影像解析技术的研究进展进行介绍, 并将对最有希望成为活细胞RNA理想标记成像技术的荧光RNA进行重点介绍, 包括它的种类以及在活细胞RNA成像中的应用, 同时还将探讨细胞RNA影像解析技术未来的发展方向以及面临的挑战。

关键词: RNA成像; 荧光原位杂交技术; 生物酶修饰; 分子信标; 荧光蛋白-RNA结合蛋白; 荧光RNA
中图分类号: Q-33 **文献标志码:** A

The advances in cellular RNA imaging technology

CHEN Xian-Jun, ZUO Fang-Ting, XIE Xin, FANG Meng-Yue, YANG Yi*
(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: RNAs exhibit unique three-dimensional structures and a variety of biological functions, and have been widely involved in diverse life activities and closely related to the occurrence and development of many diseases. During these years, scientists have been pursuing technologies that can analyze the abundance and distribution of RNA in cells. In this review, we describe the recent advances in cellular RNA imaging technology, and focus on fluorescent RNA, which is the most promising tool as an ideal technology for RNA imaging in live cells, including its types and applications in RNA imaging, and meanwhile we discuss the direction and challenge of future development of cellular RNA imaging technology.

Key words: RNA imaging; fluorescence *in situ* hybridization; enzymatic modification; molecule beacon; fluorescent protein-RNA binding protein; fluorescent RNA

收稿日期: 2021-02-01

基金项目: 国家重点研发计划(2019YFA0904800, 2017YFA050400); 国家自然科学基金项目(91857202, 21937004, 31971349)

*通信作者: E-mail: yiyang@ecust.edu.cn

生物大分子标记技术是生物分子成像的关键, 它对于理解各种细胞生命过程至关重要。在科学历史上, 科学家们利用荧光蛋白“点亮”细胞内蛋白质, 实现了生命动态过程中蛋白质分子的可视化。荧光蛋白成像技术是当代生物科学研究中最重要的工具之一, 2008年诺贝尔化学奖就授予三位为荧光蛋白做出重要贡献的科学家。在活细胞中, RNA也具有独特的结构、种类繁多的生物学功能以及复杂的时间空间分布。与蛋白质相比, RNA种类更多, 但它们中的大部分功能尚未被鉴定, 也因此被称为基因组中的“暗物质”。不同种类的RNA及其修饰形式的鉴定、功能与调控研究现已经成为了国际前沿。RNA研究也迫切需要一种类似于荧光蛋白这样的颠覆性标记技术, 可以允许人们实时监测RNA在活细胞中各种代谢行为, 如生成、运输、翻译、降解等。如何对活细胞RNA特异标记与成像, 这是深入研究RNA功能机制极为有用的工具和所需要解决的重要技术挑战, 也一直是RNA研究的前沿方向。

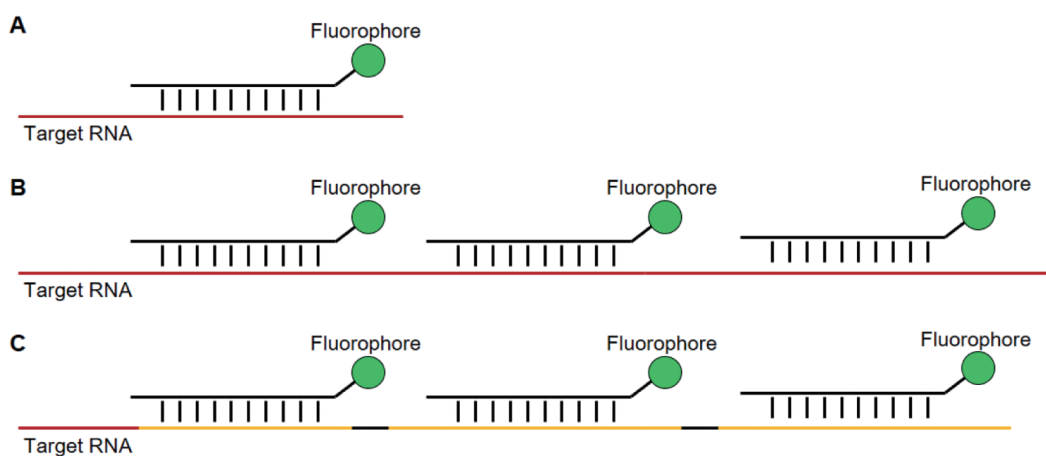
到目前为止, 用于细胞RNA的影像解析技术主要包括荧光原位杂交技术、生物酶修饰的RNA标签技术、分子信标技术、荧光蛋白-RNA结合蛋白技术以及荧光RNA技术, 其中前两种技术只能用于固定细胞即死细胞中RNA的荧光标记, 而后三种技术可以实现活细胞RNA的荧光标记与成像。本文接下来将对这些RNA影像解析技术的研究进展进行介绍, 并将对最有希望成为活细胞RNA理想标记成像技术的荧光RNA进行重点介绍, 包括它的种类以及在活细胞RNA成像中的应用, 同时还将探讨细胞

RNA影像解析技术未来的发展方向以及面临的挑战。

1 荧光原位杂交技术

在RNA成像领域, 荧光原位杂交技术(*fluorescence in situ hybridization*, FISH)是被广泛用来研究RNA在细胞内水平与分布的方法, 它是通过碱基互补配对的原理将含荧光团标记的核酸探针与目的RNA分子进行杂交, 进而进行荧光成像的技术(图1A)^[1-2]。由于未结合的探针也存在荧光, 因此在标记过程中需要进行多次清洗去除未结合的探针, 降低非特异性背景荧光。为了进一步增加成像的信噪比, 科学家们发展了单分子FISH技术(smFISH), 他们设计多个探针对单个RNA分子进行标记(图1B)^[3], 或者在目的RNA的3'端非编码区插入多个拷贝的重复序列, 每个重复序列又可以杂交多个探针(图1C)^[4], 最终使得单个RNA分子上被标记上多个荧光基团, 进而实现单分子RNA成像。

随后, 科学家们在smFISH基础上又陆续发展了多种RNA标记技术, 包括RNAscope^[5]、SABER-FISH^[6]、bDNA-smFISH^[7-8]、MERFISH^[9-10]。其中RNAscope技术已经被商业化, 它利用独特的双Z(ZZ)探针可以有效防止探针的非特异性结合, 同时降低背景干扰。由于结合在非特异性位点的单个Z探针不会产生完整的信号放大分子结合位点, 并且会在杂交过程中被洗掉, 从而防止非特异性信号的放大, 使得探针的信号具有高度的特异性^[5]。SABER-FISH利用交换反应信号扩增法(SABER)实现利用长单链多联体DNA作为FISH探针进行RNA



(A) 荧光原位杂交技术示意图。它通过碱基互补配对的原理将含荧光团标记的核酸探针与目的RNA分子进行杂交, 进而对目的RNA进行荧光成像。(B、C) 基于荧光原位杂交的单分子RNA标记技术。通过针对目的RNA序列设计多个荧光探针(B), 或者在目的RNA序列上融合多个与探针结合的重复序列(C)来实现单分子RNA成像。

图1 荧光原位杂交技术

标记的目的。由于多联体DNA上聚集了一连串短的荧光成像互补序列, 它可以将RNA的信号增强5~450倍^[6]。bDNA-smFISH与RNAscope类似, 包含由preamplifier、amplifier和探针组成的树状结构, 经两步的信号放大实现高信噪比的单分子RNA标记成像。bDNA-smFISH允许使用标准的自动化流程来对数千个细胞中的RNA定位和丰度进行高通量分析^[7-8]。MERFISH是由华人科学家庄小威教授发明, 它是基于组合标签和连续成像的一种高度多重化smFISH成像技术, 通过error-robust编码方案抵消单分子标记和检测错误, 可以鉴定分析单个细胞中数千种RNA的丰度和空间定位^[9-10]。

综上, 荧光原位杂交技术为检测固定样本中RNA的丰度与分布提供极具价值的工具。然而, 尽管近些年在信号的复杂扩增方面取得了较大的进展, 但是如何以更高的效率和更简易的流程来进行RNA的标记成像仍然具有挑战性。此外, 这种方法只能用于固定化细胞即死细胞中RNA的研究, 不能用于实时监测活细胞中RNA的动态变化过程^[11]。

2 生物酶修饰的RNA标签技术

在哺乳动物细胞中, 各种tRNA修饰酶可以催化约100种tRNA的转录后修饰^[12]。科学家们基于这样的原理开发了位点特异性的RNA标记技术。例如, 我国王江云教授课题组利用转录后tRNA修饰酶tRNA^{Ile2}-agmatidine合成酶(简称Tias)特异性识别tRNA^{Ile2}序列, 促使含有叠氮化物或炔基官能团的小分子与含有tRNA^{Ile2}标签的目标RNA之间产生位点特异性共价结合, 进而通过荧光基团与官能团的化学反应来实现目标RNA的特异性标记与成像(图2A)^[13]。他们将tRNA^{Ile2}与哺乳动物细胞的5S RNA融合表达, 并成功利用Tias实现对tRNA^{Ile2}-5S的特异性标记与成像。

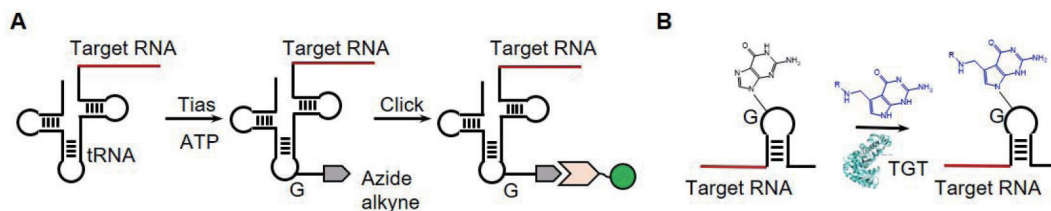
此外, Devaraj研究小组利用tRNA鸟嘌呤转糖

基化酶(TGT)特异性识别一段短茎环结构的RNA序列(transglycosylation at guanosine, TAG), 并在特定的鸟嘌呤核苷酸位点进行交换修饰, 通过连接了荧光基团的PreQ1 (TGT的含氮碱基底物)来实现目标RNA的特异性共价标记(图2B)^[14]。他们将TAG与靶标RNA融合并在CHO细胞中表达, 成功利用TGT和PreQ1-Cy7实现对细胞中目的RNA的特异性标记与成像。随后, 他们又利用两步标记的策略对RNA-TAG系统进行了拓展, 第一步是使用含具有生物正交的四嗪官能团PreQ1对RNA进行标记, 第二步是通过四嗪连接将荧光基团或靶向试剂偶联到RNA上^[15]。这种更加通用的标记方法可以使RNA功能化, 为获得具有各种诊断和治疗功能的编码和非编码RNA提供潜在的可能性。然而, RNA-TAG系统在对RNA标记时需要反复的清洗去除未反应的基团, 降低成像时的背景荧光, 增加信噪比。这个操作过程比较繁琐。为了克服这个缺点, 该课题组发展了免洗的RNA-TAG系统, 他们将噻唑橙(thiazole orange, TO)衍生物与PreQ1连接合成新的探针。该探针与细胞内核酸分子的非特异性结合能力显著降低, 而一旦与靶标RNA共价连接后会显著增加探针的有效摩尔浓度, 促使探针与RNA结合并产生明亮的荧光^[16]。利用这个技术, 他们实现了CHO细胞中目的RNA的免洗标记与成像。

相对于其他的标记方法, 基于生物酶修饰的RNA标签技术可以实现RNA的特异性共价标记, 因此可以实现对细胞中丰度极低的RNA进行标记和纯化^[13]。然而, 该技术需要对细胞进行固定后再进行标记, 尚不能对活细胞中RNA进行动态监测与分析。

3 分子信标技术

分子信标技术是最早发展起来的活细胞RNA成像技术, 是由Tyagi和Kramer^[17]于1996年首次报道。它包含在5'和3'末端自身形成发夹结构的茎环



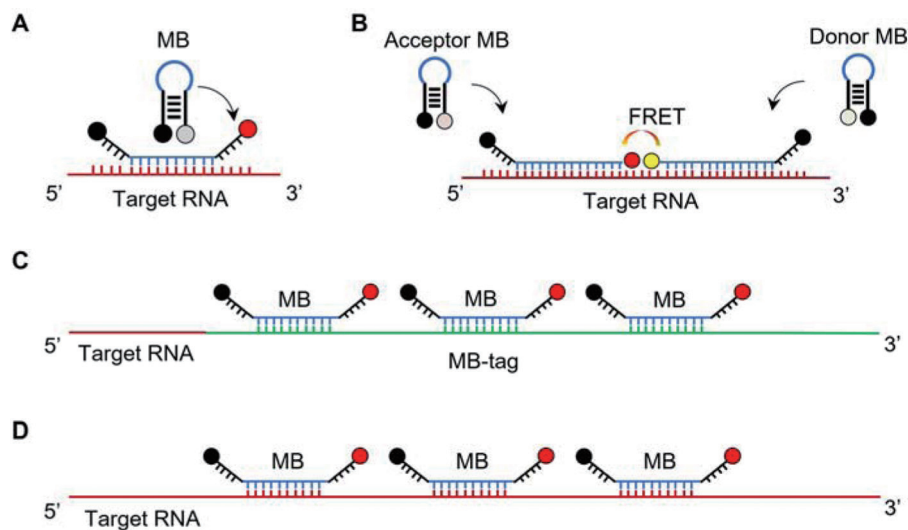
(A) Tias可以特异性识别tRNA^{Ile2}, 促使含有叠氮化物或炔基官能团的小分子与含有tRNA^{Ile2}目标RNA之间产生序列及位点特异性共价结合, 随后通过荧光染料与官能团的化学反应来实现目标RNA的特异性标记与成像。(B) TGT可以特异性识别短茎环结构的RNA序列, 并在特定的鸟嘌呤核苷酸位点进行交换修饰, 通过连接了荧光基团的PreQ1来实现目标RNA的共价标记。

图2 生物酶催化的RNA标签技术

双标记寡核苷酸探针, 标记的基团分别为荧光基团和猝灭基团。当探针与目的RNA结合后, 标记在一端的猝灭基团对荧光基团的猝灭作用消除, 荧光基团的荧光得到恢复(图3A)^[18]。然而直到2003年, 分子信标技术才真正被用于活细胞RNA的动态标记与成像, Bratu等^[19]利用双荧光共振能量转移探针果蝇黑色卵母细胞中的oskar mRNA进行标记(图3B), 他们的结果证实了卵母细胞成熟过程中oskar mRNA可能会暂时积累在卵母细胞中心的观点。随后, 科学家们还通过在目的RNA序列上融合多个与分子信标结合的靶标RNA序列(图3C)^[20], 或者针对目的RNA设计多个分子信标探针(图3D)^[21-22], 来实现单分子RNA成像。例如, Vargas等^[20]将96个拷贝的分子信标探针靶标RNA序列与绿色荧光蛋白的mRNA融合, 利用2Me修饰的探针对新合成的RNA单分子进行标记与成像, 他们发现RNA在核质以类似布朗运动的方式进行自由扩散, 不需要消耗能量, 且它们由细胞核转运进入细胞质, 与转录点是否位于核周边附近无关。我国陈匡时研究员在这一领域也做出了一系列出色的工作, 包括发展了比率型分子信标^[23]、优化分子信标修饰方法^[24-25]、发展单分子RNA成像技术^[21]等。例如, 他们发现8个分子信标探针即可实现活细胞单分子RNA成像, 精确度可达90%^[21]。

分子信标技术需要解决探针进细胞困难与假阳

性信号的问题。由于探针的分子量较大(~10 kDa)且带负电荷, 它不能自由穿越同样带负电荷的细胞质膜。虽然细胞可以通过内吞作用摄入一定数量的探针分子, 但进入细胞的探针大都聚集在晚期内吞体和溶酶体内, 不能对细胞其他区域的RNA进行标记^[26]。针对这一问题, 研究者使用链球菌溶血素(streptolysin-O, SLO)处理细胞, 使得细胞膜上产生30 nm直径的孔, 进而允许分子量小于150 kDa的分子自由穿梭进入细胞。由于SLO存在一定的细胞毒性, 高递送效率会带来细胞活力的降低, 因此需要大量的实验来摸索最佳的标记浓度、孵育时间和细胞铺板密度^[18]等。第二个解决方案是利用电转的方法, 它的效率可以达到近100%, 对细胞的活力影响也比较小, 是目前最常用的递送方法。针对假阳性信号的问题, 目前常用的分子信标探针是利用天然存在的DNA或2'-O-甲基(2Me)修饰的核苷酸合成, 它会被细胞内的核酶消化或者蛋白质非特异性结合后会产生假阳性信号。为此, 科学家们在合成分子信标探针时引入非天然的核苷酸类似物, 如LNA、2Me/PS等^[27], 或将探针与tRNA或siRNA连接^[23, 28], 或利用双荧光共振能量转移探针^[29], 它们通过增加探针的稳定性或降低探针在细胞核内的含量来降低假阳性信号。尽管上述问题得到一定的解决, 分子信标还存在非遗传编码、易受RNA二级结构的影响, 且需要对每条RNA专门定制合成寡核苷



(A)分子信标工作原理示意图。它是利用在5'和3'末端自身形成发夹结构的茎环双标记寡核苷酸探针, 标记的基团分别为荧光基团和猝灭基团。当探针与靶标RNA结合后, 标记在一端的猝灭基团对荧光基团的猝灭作用消除, 荧光基团从而产生强烈荧光。(B)基于双荧光共振能量转移的分子信标工作原理示意图。(C, D)基于分子信标的单分子RNA标记技术。通过在目的RNA序列上融合多个与分子信标结合的重复序列(C), 或者针对目的RNA序列设计多个分子信标探针(D)来实现单分子RNA成像。

图3 分子信标技术

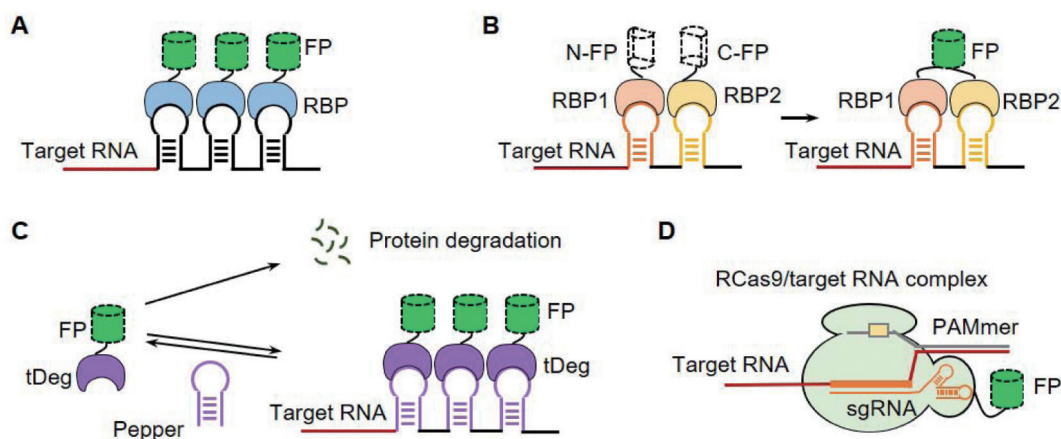
酸探针等缺点^[11, 18, 30], 可能会限制它更广泛的应用。

4 荧光蛋白-RNA结合蛋白技术

荧光蛋白-RNA结合蛋白是目前最常用的活细胞RNA成像技术, 它是通过RNA结合蛋白与特异性RNA序列的相互作用, 将荧光蛋白锚定(tethering)到含相应特异RNA序列的目的RNA分子上, 进而可以通过追踪荧光蛋白的信号对靶标RNA进行示踪(图4A)^[31-33]。目前常用的RNA结合蛋白包括来源于噬菌体的MCP^[34]、PCP^[35]、 λ N₂₂^[36], 它们分别结合MS2、PP7和boxB发夹RNA。由于融合蛋白是遗传编码产生, 因此不存在类似分子信标技术中探针进细胞困难的问题。然而, 没有与目的RNA结合的融合蛋白会扩散到整个细胞中, 进而产生较强的非特异性背景荧光。为此, 科学家们在融合蛋白上添加核定位信号, 让多余的融合蛋白进入细胞核, 进而降低胞浆中的未结合融合蛋白产生的非特异性背景荧光。此外, 人们基于双分子荧光互补原理改造得到的荧光蛋白-RNA结合蛋白技术也可实现降低背景荧光的目的。例如, Wu等^[37]将荧光蛋白拆成两部分, 分别连接到MCP和PCP RNA结合蛋白。当目的RNA含相邻位置融合的MS2和PP7发夹RNA时, MCP和PCP分别与MS2和PP7 RNA结合, 促进荧光蛋白的N端和C端重组形成完整的荧光蛋白, 进而恢复荧光(图4B)。Valencia-Burton等^[38]则是将

eIF4A-GFP融合蛋白拆成两部分, 在没有相应靶标RNA存在时, 这两部分不会结合重组; 当靶标RNA存在时, RNA结合蛋白的两部分会在靶标RNA介导下重组结合, 同样会促进荧光蛋白的两部分重组形成完整的荧光蛋白, 使其恢复荧光。基于双分子荧光互补的方法虽然可以降低背景荧光, 但系统因引入多个组分而稍显复杂。为了解决这个问题, Jaffrey课题组基于非常巧妙的设计发展了新型活细胞RNA成像系统^[39]。在该系统中, tDeg是一个具有双功能的肽段, 它不仅具有降解蛋白质的功能, 还包含精氨酸富集的RNA结合肽段Tat, 可以特异性识别结合称为Pepper的RNA序列。当Pepper RNA不存在时, tDeg-FP会被细胞内的蛋白质降解系统识别并降解; 当Pepper RNA存在时, Pepper RNA会与tDeg-FP结合, 使其不能被识别降解(图4C)。因此, 利用该系统进行RNA标记成像时, 没有结合靶标RNA的tDeg-FP会被降解, 可以大大降低系统的非特异性背景荧光^[39]。

虽然目前科学家们在降低背景荧光方面做出了一系列工作, 但荧光蛋白-RNA结合蛋白技术更多应用在单分子RNA的成像领域。人们在目的RNA上融合多个拷贝的RNA结合蛋白的结合序列, 通过锚定多个融合蛋白分子来增加单分子RNA的荧光信号强度和成像信噪比, 实现活细胞单分子RNA实时动态标记与成像^[40-43]。科学家们也利用具有生物正交



(A) 荧光蛋白-RNA结合蛋白技术示意图。RNA结合蛋白与对应的靶标RNA序列相互作用, 将荧光蛋白锚定(tethering)到含相应靶标RNA序列的目的RNA分子上, 进而可以通过追踪荧光蛋白的信号对靶标RNA进行示踪。(B) 基于双分子荧光互补原理的荧光蛋白-RNA结合蛋白技术示意图。荧光蛋白的N段和C段分别连接两种生物正交的RNA结合蛋白, 当目的RNA含相邻位置融合的RNA结合蛋白识别结合的RNA时, RNA结合蛋白便会与之结合, 促进荧光蛋白的N端和C端重组形成完整的荧光蛋白, 进而恢复荧光。(C) 基于tDeg与Pepper的成像技术示意图。在Pepper RNA存在下, Pepper会与tDeg-FP融合蛋白结合, 阻止tDeg-FP被蛋白质降解系统识别并降解。(D) 基于CRISPR-Cas9系统的成像技术示意图。失去核酶活性的Cas9蛋白在靶向目的RNA的sgRNA存在下可以特异性识别结合目的RNA, 实现RNA的标记成像。

图4 荧光蛋白-RNA结合蛋白技术

的RNA结合蛋白, 如MCP和PCP, 实现同一细胞中两种不同RNA的单分子标记与成像^[44]。此外, 庄小威教授以及其他科学家将该技术与SunTag技术结合起来, 实现活细胞中单个mRNA分子翻译过程的实时动态监测^[45-46]。

近期, 目前最火热的CRISPR基因编辑系统也被用于发展活细胞RNA成像技术。2016年, Yeo课题组利用来源于*Streptococcus pyogenes*的失活Cas9蛋白在靶向目的RNA的sgRNA存在下可以特异性识别结合目的RNA (图4D), 实现哺乳动物细胞中ACTB、CCNA2等胞浆RNA的标记与成像^[47]。我国科学家在这方面也做出了非常出色的工作。中科院陈玲玲研究员课题组对多个物种来源的CRISPR-Cas13蛋白进行酶活突变, 筛选出了具有较好RNA标记能力的dPspCas13b和dPguCas13b蛋白。他们使用优化后的CRISPR-Cas13系统对活细胞中NEAT1、SatIII、MUC4和GCN4等多种非编码RNA和mRNA进行标记成像, 并研究了散斑相关的NEAT1的动力学。此外, 他们还将该系统与MS2-MCP系统结合起来, 实现同一细胞中两种不同RNA的标记与成像^[48]。

在荧光蛋白-RNA结合蛋白技术中, 一直存在的潜在问题是蛋白质与RNA的结合很可能会影响RNA的正常代谢行为, 包括RNA的剪接、转运、翻译、降解等^[49]。此外, 未结合蛋白产生的背景荧光会干扰RNA的真实含量与分布信息, 使得该技术并不适合高通量分析单细胞中RNA的分布和含量。

5 荧光RNA技术

自然界存在天然的荧光蛋白, 但尚未有天然的荧光RNA被报道。荧光RNA的概念最初是由荧光蛋白的诺贝尔化学奖获得者之一钱永健(Roger Tsien)教授于2003年提出, 他认为可以利用RNA适配体特异性识别结合并激活染料分子, 进而实现对RNA的可视化(图5A)^[50]。基于这样的原理, 他的课题组筛选获得了可以结合并激活三苯甲烷染料孔雀石绿(MG)染料分子的RNA适配体, 荧光增强倍数可达2 360倍^[50]。受这一发现的鼓舞和启发, 在过去的10多年里, 科学家们还发展了其他的RNA适配体——荧光团复合物。相比较其他RNA成像技术, 人们只需要将RNA适配体编码序列与靶标RNA编码序列融合表达, 加入染料分子即可对RNA标记成像, 无需引入其他核酸或蛋白质分子, 因此是最直接的一种RNA成像方法, 也最有希望成为理想的活细胞RNA标记与成像技术。

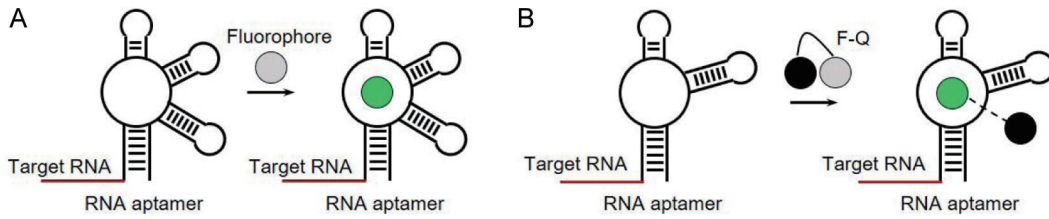
5.1 基于Hoechst衍生物的荧光RNA

Hoechst是一种非常常用的核酸标记染料, 它可以嵌入DNA双螺旋中发出明亮的蓝色荧光。2008年, Sando等^[51]合成了一种Hoechst衍生物Hoechst 1, 它通过引入两个邻位的*t*Bu基团来降低对富含AT双链DNA的结合亲和力(图6)。随后, 他们利用指数富集的配体系统进化技术(systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX)筛选获得了称为I-mini3-4的RNA适配体(图7), 它对Hoechst 1有着很高的亲和力, 复合物的平衡解离常数(K_D)为35 nmol/L, 荧光激活倍数可达近30倍。由于Hoechst 1依然可以非特异性结合细胞核内的基因组DNA, 因此I-mini3-4只能用于体外转录RNA的检测^[51], 而不能用于活细胞RNA的标记与成像。

5.2 基于花菁类染料的荧光RNA

噻唑橙(TO)是一种不对称的花菁类染料, 它包含一个通过单次甲基桥与噻啉环共价连接的苯并噻啉环(图6)。TO1在水溶液中的荧光很弱, 但当其非特异性插入到核酸的双螺旋结构中后, 分子中连接两个杂环的单次甲基桥的刚性增强, 进而显著增加TO1的荧光^[52-53]。基于TO1的这种性质, Dolgosheina等^[53]在2014年利用SELEX技术筛选获得了可以特异性识别结合TO1的RNA适配体Mango。Mango以很高的亲和力($K_D = 3$ nmol/L)结合TO1-biotin, 发出黄色荧光, 量子产率为0.14。此外, Mango RNA适配体还可以结合TO1的衍生物TO3-Biotin产生红色荧光。在2018年, 同一课题组利用竞争性配体结合微流控技术筛选获得了可以特异性结合TO1-Biotin荧光团的Mango II、Mango III和Mango IV RNA适配体。其中, Mango II与TO1-Biotin的亲和力极高, K_D 可达以亚纳摩尔的0.7 nmol/L, 而Mango III和Mango IV的亲和力则相对弱一些, K_D 分别为5.6 nmol/L和11.1 nmol/L。然而, 由于TO1-Biotin染料存在分子量大、进细胞困难的缺点, Mango系列荧光RNA只能对固定细胞中的RNA (如5S、U6、scaRNA)进行成像, 或者将体外转录的RNA与染料预孵育后导入细胞, 因此不能对活细胞RNA进行实时监测与成像。

除了TO1和TO3外, 另一种花菁类染料二甲苯吡啶红(dimethylindole Red, DIR)也被用于发展新型荧光RNA (图6)。2008年, Constantin等^[54]筛选获得了称为DIR-Apt1的RNA适配体(图7), 它与DIR结合的 K_D 为86 nmol/L, 复合物发出明亮的红色荧光。2017年, Tan等^[55]筛选获得了另一种可以特异性结合DIR染料的RNA适配体DIR2s-Apt。进一步的研



(A) 荧光RNA的原理示意图。RNA适配体特异性识别并结合并激活荧光团分子，使其发出明亮的荧光，进而实现对RNA的可
视化。(B) 基于荧光团-猝灭基团的荧光RNA的原理示意图。RNA适配体特异性识别结合荧光团-猝灭基团(F-Q)
中的荧光团分子，阻止能量从荧光团转移到猝灭基团，进而恢复荧光团的荧光。

图5 荧光RNA技术

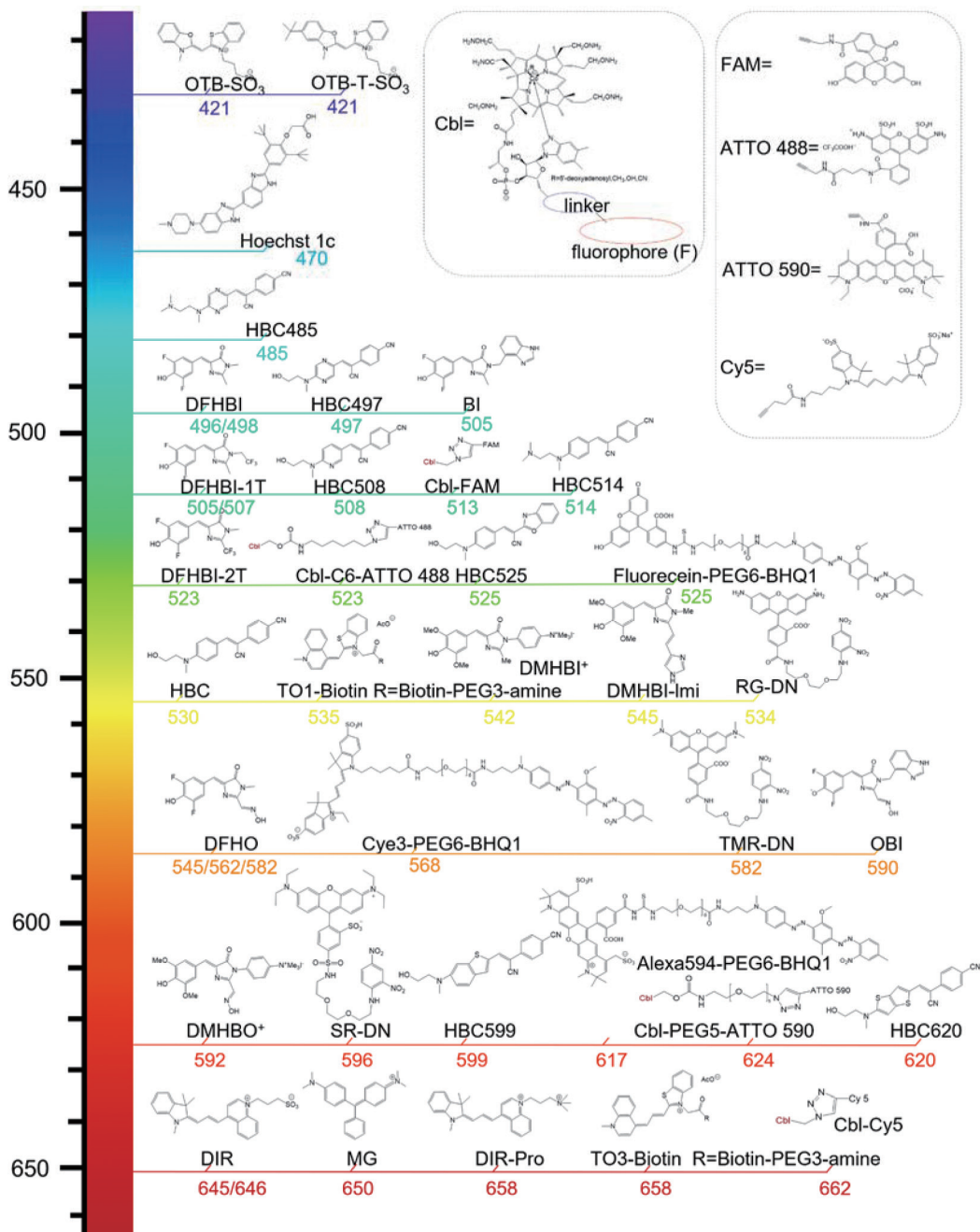


图6 不同荧光RNA中的荧光团结构

究结果还发现, DIR2s-Apt同样可以激活DIR的类似物, 包括DIR-Pro、OTB-SO3和OTB-T-SO3(图6), 其中OTB-SO3和OTB-T-SO3的光谱产生明显的蓝移, 它们的最大激发波长和发射波长均为380 nm和421 nm。然而, 同样受限于染料分子的高背景荧光, 无论是DIR-Apt1还是DIR2s-Apt均未实现对活细胞RNA进行实时监测与成像。

5.3 基于荧光团-猝灭基团的荧光RNA

2011年, Murata等^[56]提出了一种全新的设计理念, 他们利用RNA适配体特异性识别结合荧光团-猝灭基团中的荧光团分子, 阻止能量从荧光团转移到猝灭基团, 进而恢复荧光团的荧光(图5B)。具体地, 他们通过偶联荧光团和猝灭基团(black hole quencher 1, BHQ1)合成了一系列荧光团-猝灭基团(图6), 并利用SELEX技术筛选获得了称为A1的

RNA适配体。A1 RNA适配体与三种荧光团-猝灭基团有着微摩尔级的亲和力, 可以显著提高它们的荧光强度。1998年, Wilson课题组开发了一种称为SRB-2的适配体(图7), 它可以识别并结合荧光团磺基罗丹明B(SR)^[57]。直到2013年, Jäschke课题组利用SRB-2 RNA适配体结合SR来恢复SR在SR-猝灭基团中的荧光(图6), 发展新型RNA实现活细胞RNA标记与成像^[58]。我国蒋健晖教授课题组就基于SRB-2开发了可以对哺乳动物细胞microRNA进行标记成像的探针^[59]。2015年, 同样是Jäschke课题组针对猝灭基团DN筛选了特异性识别结合的RNA适配体DNB(图7), DNB与DN的结合会阻止荧光团-猝灭基团中能量由荧光团向猝灭基团的转移, 进而恢复荧光团的荧光。他们随后通过更换不同的荧光团获得了从绿色到红色不同光谱的荧光RNA^[60]。随

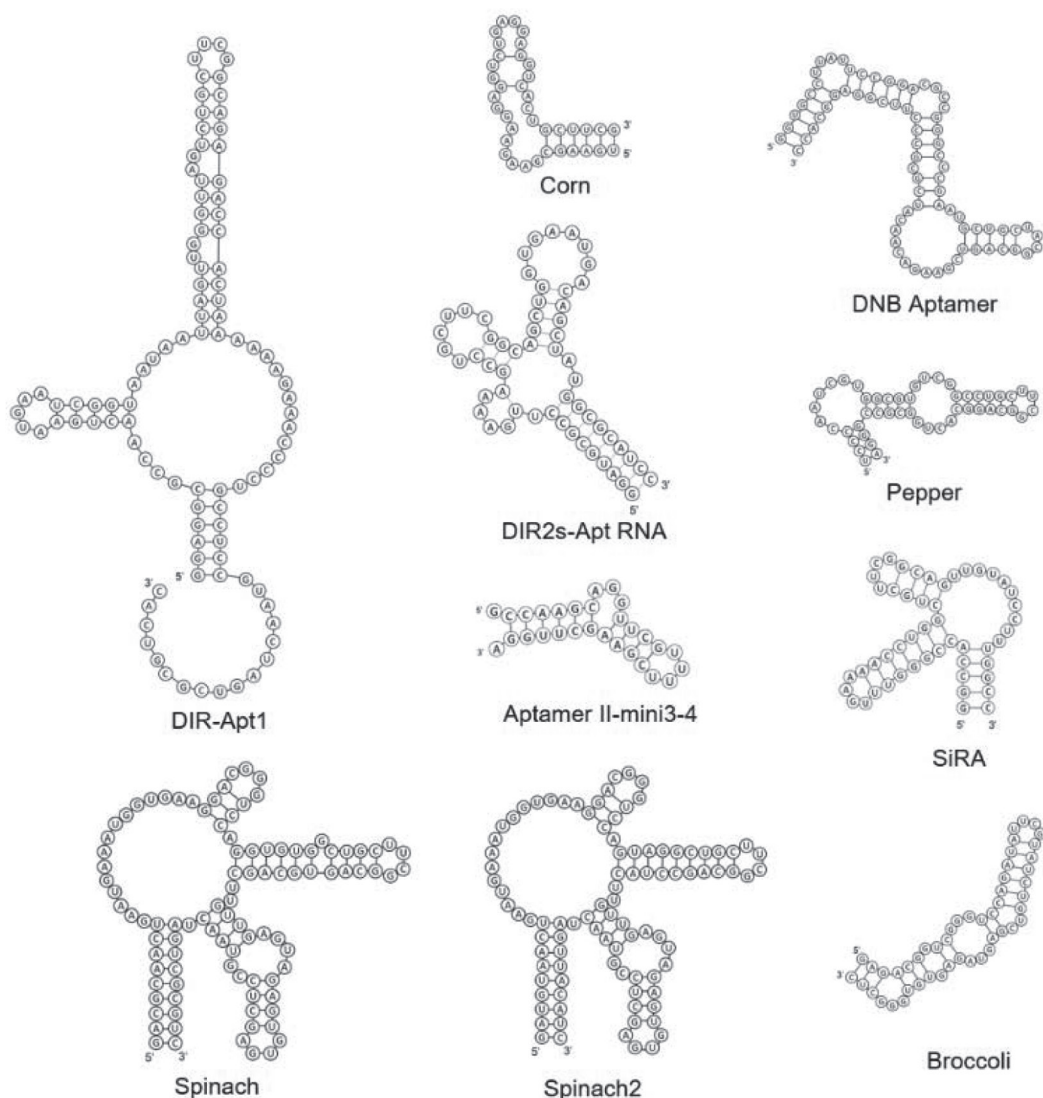


图7 不同荧光RNA中RNA适配体预测的二级结构

后,同一课题组又合成了一种新的荧光团-猝灭基团,称为5-羧四甲基罗丹明-二硝基苯胺(TMR-DN)(图6),它与SRB-2 RNA适配体的结合可以发出明亮的橙色荧光^[61]。SRB-2-TMR-DN复合物首次实现将这一类荧光RNA用于哺乳动物细胞RNA的标记成像。随后,他们又针对硅罗丹明(SiR)筛选优化获得了称为SiRA的RNA适配体(图7),SiRA-SiR复合物具有非常优良的光稳定性,甚至可以实现大肠杆菌中RNA的受激发射损耗(STED)荧光成像^[62]。

在另一项研究中,Brasemann等^[63]开发了一种以钴胺素(Cbl)核糖开关作为RNA标签的荧光RNA,它可以特异性识别结合以钴胺素作为猝灭基团的荧光团-猝灭基团(图6),进而显著激活荧光团的荧光。研究者通过优化荧光团和连接头获得了光谱涵盖绿光到远红光的一系列荧光RNA,复合物的 K_D 从3.0 nmol/L到1.3 μ mol/L不等。这些荧光RNA允许对哺乳动物细胞中的mRNA应激颗粒和小非编码RNA U1进行成像。但是,由于这些荧光团-猝灭基团的荧光激活倍数偏低(< 10倍),使得它们在活细胞中有着明显的背景荧光。此外,Cbl-荧光团的分子量较大(MW > 2000),这使它们难以穿过细胞膜。虽然可以利用微珠装载方法来促进这些探针进入细胞,但微珠对细胞会产生不可逆的损伤且操作过程复杂,因此并不实用。

5.4 基于荧光蛋白生色团的荧光RNA

荧光蛋白桶状结构中三个氨基酸构成的生色团是其荧光产生的关键,这些生色团属于分子转子,具有小分子量、电中性、膜穿透性、背景荧光弱的特性。科学家们期望基于类似的原理用一个RNA适配体去结合、包裹并激活生色团的荧光,进而获得类似荧光蛋白性能的“拟荧光蛋白RNA”。直到2011年,Jaffrey课题组基于绿色荧光蛋白的生色团衍生物DFHBI(图6)筛选获得了称为Spinach的RNA适配体^[64](图7)。在没有Spinach RNA适配体存在下,DFHBI的荧光极低,当其与Spinach结合后会产生很强的绿色荧光。由于DFHBI进细胞容易且背景荧光极低,Spinach-DFHBI复合物可用于细菌^[65]、酿酒酵母^[66-67]、哺乳动物细胞^[60],甚至是衣藻的叶绿体^[68]中RNA的标记与成像。然而,Spinach存在热不稳定性 and 折叠效率差的缺点,使得其在活细胞中的亮度很低。Jaffrey课题组通过突变获得了“超折叠”的Spinach2 RNA适配体(图7),相比较Spinach,Spinach2的熔融温度(T_m)提高了4 $^{\circ}$ C,在37 $^{\circ}$ C条件下的折叠效率也更高(37%对13%),因此可以对哺

乳动物细胞中的多种RNA进行成像,包括7SK小核RNA和CGG三核苷酸重复序列^[69]。为了进一步优化Spinach在活细胞RNA成像中的应用,他们将SELEX技术与流式细胞术结合,筛选优化获得了称为Broccoli的RNA适配体(图7)。Broccoli有着比Spinach2更高的亲和力和熔融温度,以及更低的镁离子依赖性^[70]。与此同时,Autour等^[71]利用微流控技术也对Spinach进行了优化,获得了称为iSpinach的RNA适配体,它可以在无 K^+ 的环境中工作,这非常有利于很多的体外应用,如生物传感或高通量筛选。

此外,研究者们对DFHBI荧光团结构进行修饰,获得了具有不同光谱性质的RNA适配体-荧光团复合物^[64, 72]。例如,Song等^[72]在DFHBI的甲基或C2上引入三氟乙基取代基,分别获得了DFHBI-1T和DFHBI-2T(图6),它们与Spinach2或Broccoli结合产生波长略微红移的荧光RNA。Li等^[73]基于RNA适配体的结合口袋对DFHBI进行优化,获得了称为BI的衍生物(图6),它对Broccoli有着显著提高的亲和力,结合 K_D 可达51 nmol/L。此外,他们还合成了另一种衍生物OBI(图6),它与Broccoli结合后可以发射590 nm的橙光^[74]。

尽管经过一系列优化,Spinach和Broccoli仍然存在一些缺点而限制了它们的应用,包括细胞亮度低、光稳定性差、不具备生物正交性等。Spinach和Broccoli的上述部分缺点被一种称为Corn的新型荧光RNA弥补^[75]。Corn是一个含28个碱基的RNA适配体(图7),它可以选择性识别结合红色荧光蛋白生色团衍生物DFHO(图6),并发出545 nm的黄色荧光。Corn与DFHO结合的 K_D 为70 nmol/L,远大于Spinach和Broccoli与DFHBI的结合能力,且对 Mg^{2+} 的依赖性更低。更重要的是,与Spinach和Broccoli相比,Corn-DFHO有着显著改善的光稳定性,即使在长时间连续的光照条件下依然保留较高的荧光信号。由于Corn-DFHO复合物有着良好的光稳定性,Corn-DFHO可被用于实时监测不同mTOR信号通路抑制剂对III型启动子活性的影响。然而,研究结果表明Corn是以二聚体的形式存在,不适合作为RNA标签用于RNA的成像,因为这种二聚体性质可能会改变靶标RNA的代谢行为。

在另一项研究中,Steinmetzger等^[76]对HBI的咪唑啉酮杂环进行芳香族或阳离子取代合成了一系列HBI类似物。有趣的是,他们发现其中的三个荧光团DMHBI-Imi、DMHBI⁺和DMHBO⁺(图6)可以被13-2 RNA适配体(由Jaffrey课题针对DFHBI荧光团

筛选优化获得)结合并激活, 分别发出绿色、黄色和红色的荧光。此外, 这些新型的荧光RNA有着130 nm的大斯托克斯位移, 类似LSSmOrange和LSSmKate荧光蛋白^[77-78], 这种独特的性质可应用于基于荧光共振能量转移(FRET)或生物发光共振能量转移(BRET)的RNA-RNA或RNA-蛋白质相互作用检测。但是, 这些荧光RNA能否用于活细胞中的RNA成像仍有待进一步探究。

与荧光蛋白类似, 理想的荧光RNA应该是单体、稳定性好、亮度高且光谱范围广, 这也一直是荧光RNA的发展方向^[79]。2019年, 我国杨弋教授课题组与朱麟勇教授课题组构成的联合攻关团队在荧光RNA领域取得了突破性进展, 他们基于全新的分子设计理念设计合成了全新的荧光团分子HBC (图6)^[80]。HBC在水溶液中几乎没有荧光, 一旦分子转动被限制便会发出强烈的荧光。此外, HBC有着极低的细胞毒性且容易进入细胞。他们利用SELEX技术筛选优化获得了可以特异性结合并激活HBC的RNA适配体, 称为Pepper (图7)。Pepper对HBC有着很强的结合力, K_D 为3.5 nmol/L, 结合后的荧光增强倍数超过3 000倍。相对于Broccoli和Corn, Pepper在大肠杆菌细胞和哺乳动物细胞中的荧光亮度要高一个数量级以上。Pepper可以插入到不同的天然非编码RNA与编码RNA分子序列中, 进而在活细胞内对各种RNA进行荧光标记和实时成像, 而不影响它们的转录、定位、翻译、降解等正常代谢。值得注意的是, Pepper甚至可以用于哺乳动物细胞中II型RNA聚合酶介导转录的信使RNA (mRNA)的成像, 相比较rRNA和tRNA, 这些mRNA的丰度要低几个数量级, 这对于其他的荧光RNA很难实现。研究者还将多个Pepper串联起来, 获得的Pepper串联体的荧光随着串联数目的增加而增加, 从而提高了单分子RNA适配体的荧光亮度。

HBC具有典型的分子转子结构, 由电子给体、 π 共轭结构和电子受体构成。研究者通过调节芳香族 π 共轭结构或电子给体和受体的能力实现了Pepper光谱从青色到红色的大范围拓展。这些荧光RNA都表现出很好的热稳定性, T_m 最高可达66 °C, 这比Spinach和Broccoli要高出近20 °C。此外, Pepper599和Pepper620有着非常优良的光稳定性, 甚至优于mCherry荧光蛋白, 其中Pepper620可被用于哺乳动物细胞中RNA的结构光照明超分辨率成像 (SIM), 这是其他荧光RNA无法实现的。由于Pepper与HBC的结合是非共价的, 因此可以通过加

入不同荧光团的方法, 随意改变细胞内荧光RNA的颜色, 这种灵活性对于荧光标记稳定细胞株和转基因动物的构建十分有利, 因为不需要针对每一种颜色都构建一种细胞株或转基因动物。

与基于荧光蛋白-RNA结合蛋白的RNA成像方法相比, Pepper具有更高的信噪比和类似, 甚至更高的荧光亮度, 这使得Pepper可用于高通量分析单细胞中mRNA含量和蛋白质含量间的相关性。与此前的其他荧光RNA相比, Pepper在亲和力、稳定性、信噪比、活细胞荧光亮度等方面提升了一到三个数量级, 体现了荧光RNA从概念到实用的进步, 为活细胞中RNA的功能研究提供极具价值的工具。

表1总结了各种荧光RNA的性质。

6 总结与展望

RNA作为DNA与蛋白质间遗传信息传递的中间载体为人们所熟知。随着测序技术的快速发展, 人们发现mRNA只占哺乳动物细胞总RNA很小的一部分, 绝大多数的RNA是不编码蛋白质的非编码RNA。即使不编码蛋白质, 这些非编码RNA仍发挥着至关重要的生物学功能, 广泛参与RNA剪接、DNA复制、蛋白质表达、分子感应和应答催化等多种细胞生命过程, 与多种疾病的发生与发展密切相关。为了揭示RNA的功能和作用机制, 有必要发展高性能RNA成像技术对细胞内RNA分子的丰度和分布进行解析。目前常用的细胞RNA影像解析技术主要包括FISH技术、生物酶修饰的RNA标签技术、分子信标技术、荧光蛋白-RNA结合蛋白技术以及荧光RNA技术, 这些技术都有自己的特点和特定的应用场景, 例如FISH技术可以实现单细胞中上千种RNA的高通量分析, 生物酶修饰的RNA标签技术可以对RNA进行共价标记, 然而这两种技术只能用于固定细胞中RNA的分析; 分子信标技术可以允许对活细胞内源RNA进行标记与成像, 但它是非遗传编码且存在探针进细胞困难、较高的非特异性背景荧光等问题; 荧光蛋白-RNA结合蛋白技术可以实现对活细胞单分子RNA进行长时间动态监测与成像, 但也存在背景荧光偏高以及蛋白质与RNA的结合会影响RNA的代谢行为的缺点。

与细胞中的蛋白质和代谢物类似, 活细胞中的RNA是高度时空动态变化的, 它们具有特定的时间、空间分布及不同的转录后修饰状态, 因此需要发展类似荧光蛋白的标记技术, 可以对活细胞中的RNA进行实时动态标记与成像, 而不影响它们的生

表1 荧光RNA的性质

Fluorophore	Aptamer	Ex max (nm)	E _m max (nm)	ϵ (M ⁻¹ · cm ⁻¹)	QY (-)	Fold activation	K _D (nmol/L)	Reference
MG	N.A	630	650 z	150 000	0.187	2 360	117	[50]
Hoechst 1	II-mini3-4	345	470	N.D	0.26	56	35	[51]
TO1-Biotin	Mango-I	510	535	77 500	0.14	1 100	3.2	[53]
TO3-Biotin	Mango-I	637	658	9 300	N.D	N.D	6~8	[53]
TO1-Biotin	Mango-II	510	535	N.D	0.21	N.D	0.7	[81]
TO1-Biotin	Mango-III	510	535	43 000	0.56	N.D	5.6	[81]
TO1-Biotin	Mango-IV	510	535	32 000	0.42	N.D	11.1	[81]
TO3-Biotin	Mango-II	637	658	N.D	N.D	N.D	1.8	[81]
TO3-Biotin	Mango-III	637	658	N.D	N.D	N.D	15.0	[81]
TO3-Biotin	Mango-IV	637	658	N.D	N.D	N.D	10.4	[81]
DIR	DIR-Apt1	602	645	N.D	N.D	60	86	[54]
DIR	DIR2s-Apt	600	646	150 000	0.26	20	966	[55]
DIR-pro	DIR2s-Apt	600	658	164 000	0.33	45	252	[55]
OTB-SO3	DIR2s-Apt	380	421	73 000	0.51	76	662	[55]
OTB-T-SO3	DIR2s-Apt	380	421	71 000	0.17	N.D	1 071	[55]
Alexa594-PEG-BHQ1	A1	594	617	N.D	N.D	4.5	4 700	[56]
Cy3-PEG6-BHQ1	A1	554	568	N.D	N.D	7.4	N.D	[56]
Fluorescein-PEG6-BHQ1	A1	490	525	N.D	N.D	1.9	N.D	[56]
SR-DN	SRB-2	579	596	N.D	0.65	25	1 400	[58]
RG-DN	DNB	507	534	37 350	0.32	4	4 480	[60]
TMR-DN	DNB	555	582	47 150	0.9	11	350	[60]
SR-DN	DNB	572	591	50 250	0.98	36	800	[60]
Cbl-FAM	AT	490	513	N.D	N.D	2.5	N.D	[63]
Cbl-C6-ATTO 488	AT	501	523	N.D	N.D	1.3	N.D	[63]
Cbl-5xPEG-ATTO 590	A	594	624	N.D	0.31	4.9	34	[63]
Cbl-5xPEG-ATTO 590	AT	594	624	N.D	N.D	4.0	1 300	[63]
Cbl-5xPEG-ATTO 590	D	594	624	N.D	0.31	2.9	3.0	[63]
Cbl-C6-ATTO 633	AT	629	657	N.D	N.D	1.9	N.D	[63]
Cbl-Cy5	A	646	662	N.D	0.26	2.7	N.D	[63]
DFHBI	Spinach	452	496	24 271	0.72	1 029	537	[64]
DFHBI	Spinach2	454	498	26 100	0.70	1 000	430	[69]
DFHBI-1T	Spinach2	482	505	31 000	0.94	959	560	[72]
DFHBI-2T	Spinach2	500	523	29 000	0.12	100	1 300	[72]
DFHBI-1T	Broccoli	472	507	29 600	0.94	959	360	[70]
BI	Broccoli	470	505	33 600	0.669	1 390	51	[73]
OBI	Broccoli	541	590	47 300	0.67	16 750	23	[74]
DFHO	Corn	505	545	29 000	0.25	417	70	[75]
DFHO	Orange Broccoli	513	562	34 000	0.28	311	230	[75]
DFHO	Red Broccoli	518	582	35 000	0.34	567	206	[75]
DMHBI-Imi	13-2 min	463	545	N.D	0.08	N.D	71	[76]
DMHBI ⁺	13-2 min	413	542	N.D	0.40	N.D	63	[76]
DMHBO ⁺	13-2 min	456	592	N.D	0.10	N.D	12	[76]
HBC485	Pepper	443	485	49 100	0.42	691	8.0	[80]
HBC497	Pepper	435	497	54 700	0.57	16 601	6.7	[80]
HBC508	Pepper	458	508	42 500	0.30	9 091	27.0	[80]
HBC514	Pepper	458	514	44 100	0.45	4 748	12.0	[80]
HBC525	Pepper	491	525	74 100	0.70	585	3.8	[80]
HBC530	Pepper	485	530	65 300	0.66	3 595	3.5	[80]
HBC599	Pepper	515	599	54 400	0.43	708	18.0	[80]
HBC620	Pepper	577	619	100 000	0.58	12 600	6.1	[80]

成、剪接、转运、翻译、降解等代谢行为与功能。目前看来, 荧光RNA是最接近类似荧光蛋白对蛋白标记成像的技术, 它可以避免上述其他四种技术的缺点, 允许对活细胞中各种RNA进行实时动态标记与成像, 而不影响它们的代谢与功能。自2003年钱永健教授提出荧光RNA的概念后, 过去十几年的快速发展已经使得荧光RNA从概念逐渐走向实用, 展现出它们应用于活细胞RNA标记与成像以及其他生命科学研究领域的巨大潜力。然而, 荧光RNA未来的发展仍旧存在很多挑战。首先, 目前仍缺少具有优良性质(高亮度、低背景、高稳定性、多光谱等)且生物正交的荧光RNA。基于花菁类染料和荧光团-猝灭基团的荧光RNA存在染料进细胞困难、背景荧光偏高、激活倍数低的缺点。基于荧光团衍生生物的荧光RNA, 如Spinach、Spinach2、Broccoli和Corn, 存在亲和力弱、细胞亮度低、稳定性差和/或多聚体的缺点, 且它们之间并不具备生物正交性^[74]。目前只有Pepper荧光RNA有着非常优良的成像特性, 但仍缺少其他具有优良性质且生物正交的荧光RNA, 与Pepper一起联用实现哺乳动物细胞RNA的多色成像, 特别是近红外波段的荧光RNA, 可以用于活体动物中RNA的标记成像。其次, 目前仍需要发展更加快速有效获得具有优良荧光特性的荧光RNA的方法。此前荧光RNA的获得大都通过SELEX技术筛选获得, 由于体外筛选条件与细胞环境的巨大差异, 使得真正可以用于活细胞RNA标记成像的荧光RNA非常少。因此, 需要发展更加有效的筛选方法, 例如结合SELEX和流式细胞术, 来快速获得可以对哺乳动物细胞RNA进行标记成像的荧光RNA。再次, 目前仍缺少可以显著提高细胞内RNA浓度的方法。细胞内RNA的半衰期都很短(细菌中mRNA的平均半衰期只有2.5~8 min^[82-84], 哺乳动物细胞的mRNA的平均半衰期也只有2~10 h^[85]), 使得它们在细胞中的含量远低于蛋白质。科学家们试图利用脚手架RNA, 如tRNA或F30, 提高RNA的稳定性^[86], 但这些脚手架RNA可能会影响靶标RNA的定位与功能。此外, Litke和Jaffrey^[87]基于tRNA加工成熟的过程开发了环RNA表达策略, 可以显著增加RNA的稳定性。但这个策略目前只适合表达基于荧光RNA的遗传编码荧光探针, 并不能用于常规目的RNA的标记成像。因此, 寻找其他可以稳定RNA的策略依然十分必要且紧迫。最后, 需要发展基于荧光RNA的单分子RNA成像技术, 它可以避免荧光蛋白-RNA结合蛋白技术中多个融合蛋白分子与

RNA结合对RNA的代谢与功能产生的潜在干扰, 有望成为理想的单分子RNA成像技术, 这将会极大地帮助人们研究RNA的代谢和功能。

综上所述, 各种RNA影像解析技术已经让人们了对多种RNA的生物学功能和动态变化规律有了更加深入的了解。随着这些技术的不断发展, 未来它们将继续为探究RNA更加复杂的功能与调控机制提供极具价值且不可或缺的工具。

[参 考 文 献]

- [1] Gall JG, Pardue ML. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1969, 63: 378-83
- [2] Levsky JM, Singer RH. Fluorescence *in situ* hybridization: past, present and future. *J Cell Sci*, 2003, 116: 2833-8
- [3] Femino AM, Fay FS, Fogarty K, et al. Visualization of single RNA transcripts *in situ*. *Science*, 1998, 280: 585-90
- [4] Raj A, van den Bogaard P, Rifkin SA, et al. Imaging individual mRNA molecules using multiple singly labeled probes. *Nat Methods*, 2008, 5: 877-9
- [5] Wang F, Flanagan J, Su N, et al. RNAscope: a novel *in situ* RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Mol Diagn*, 2012, 14: 22-9
- [6] Kishi JY, Lapan SW, Believeau BJ, et al. SABER amplifies FISH: enhanced multiplexed imaging of RNA and DNA in cells and tissues. *Nat Methods*, 2019, 16: 533-44
- [7] Battich N, Stoeger T, Pelkmans L. Image-based transcriptomics in thousands of single human cells at single-molecule resolution. *Nat Methods*, 2013, 10: 1127-33
- [8] Battich N, Stoeger T, Pelkmans L. Control of transcript variability in single mammalian cells. *Cell*, 2015, 163: 1596-610
- [9] Chen KH, Boettiger AN, Moffitt JR, et al. RNA imaging. Spatially resolved, highly multiplexed RNA profiling in single cells. *Science*, 2015, 348: aaa090
- [10] Moffitt JR, Hao J, Bambah-Mukku D, et al. High-performance multiplexed fluorescence *in situ* hybridization in culture and tissue with matrix imprinting and clearing. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2016, 113: 14456-61
- [11] Tyagi S. Imaging intracellular RNA distribution and dynamics in living cells. *Nat Methods*, 2009, 6: 331-8
- [12] Machnicka MA, Milanowska K, Osman Oglou O, et al. MODOMICS: a database of RNA modification pathways--2013 update. *Nucleic Acids Res*, 2013, 41: D262-7
- [13] Li F, Dong J, Hu X, et al. A covalent approach for site-specific RNA labeling in mammalian cells. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2015, 54: 4597-602
- [14] Alexander SC, Busby KN, Cole CM, et al. Site-specific covalent labeling of RNA by enzymatic transglycosylation. *J Am Chem Soc*, 2015, 137: 12756-9
- [15] Ehret F, Zhou CY, Alexander SC, et al. Site-specific covalent conjugation of modified mRNA by tRNA guanine transglycosylase. *Mol Pharm*, 2018, 15: 737-42
- [16] Zhou CY, Alexander SC, Devaraj NK. Fluorescent turn-on probes for wash-free mRNA imaging via covalent site-

- specific enzymatic labeling. *Chem Sci*, 2017, 8: 7169-73
- [17] Tyagi S, Kramer FR. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol*, 1996, 14: 303-8
- [18] Mao S, Ying Y, Wu R, et al. Recent advances in the molecular beacon technology for live-cell single-molecule imaging. *iScience*, 2020, 23: 101801
- [19] 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: 13308-13
- [20] Vargas DY, Raj A, Marras SA, et al. Mechanism of mRNA transport in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 17008-13
- [21] Chen M, Ma Z, Wu X, et al. A molecular beacon-based approach for live-cell imaging of RNA transcripts with minimal target engineering at the single-molecule level. *Sci Rep*, 2017, 7: 1550
- [22] Turner-Bridger B, Jakobs M, Muresan L, et al. Single-molecule analysis of endogenous β -actin mRNA trafficking reveals a mechanism for compartmentalized mRNA localization in axons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2018, 115: E9697-706
- [23] Chen AK, Davydenko O, Behlke MA, et al. Ratiometric bimolecular beacons for the sensitive detection of RNA in single living cells. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38: e148
- [24] Zhao D, Yang Y, Qu N, et al. Single-molecule detection and tracking of RNA transcripts in living cells using phosphorothioate-optimized 2'-O-methyl RNA molecular beacons. *Biomaterials*, 2016, 100: 172-83
- [25] Chen AK, Behlke MA, Tsourkas A. Sub-cellular trafficking and functionality of 2'-O-methyl and 2'-O-methyl-phosphorothioate molecular beacons. *Nucleic Acids Res*, 2009, 37: e149
- [26] Chen AK, Behlke MA, Tsourkas A. Efficient cytosolic delivery of molecular beacon conjugates and flow cytometric analysis of target RNA. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36: e69
- [27] Yang CJ, Wang L, Wu Y, et al. Synthesis and investigation of deoxyribonucleic acid/locked nucleic acid chimeric molecular beacons. *Nucleic Acids Res*, 2007, 35: 4030-41
- [28] Mhlanga MM, Vargas DY, Fung CW, et al. tRNA-linked molecular beacons for imaging mRNAs in the cytoplasm of living cells. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33: 1902-12
- [29] Santangelo PJ, Nix B, Tsourkas A, et al. Dual FRET molecular beacons for mRNA detection in living cells. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32: e57
- [30] You M, Jaffrey SR. Structure and mechanism of RNA mimics of green fluorescent protein. *Annu Rev Biophys*, 2015, 44: 187-206
- [31] 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: 119-21
- [32] Bertrand E, Chartrand P, Schaefer M, et al. Localization of ASH1 mRNA particles in living yeast. *Mol Cell*, 1998, 2: 437-45
- [33] Daigle N, Ellenberg J. LambdaN-GFP: an RNA reporter system for live-cell imaging. *Nat Methods*, 2007, 4: 633-6
- [34] Bernardi A, Spahr PF. Nucleotide sequence at the binding site for coat protein on RNA of bacteriophage R17. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1972, 69: 3033-7
- [35] Chao JA, Patskovsky Y, Almo SC, et al. Structural basis for the coevolution of a viral RNA-protein complex. *Nat Struct Mol Biol*, 2008, 15: 103-5
- [36] Franklin NC. "N" transcription antitermination proteins of bacteriophages lambda, phi 21 and P22. *J Mol Biol*, 1985, 181: 85-91
- [37] Wu B, Chen J, Singer RH. Background free imaging of single mRNAs in live cells using split fluorescent proteins. *Sci Rep*, 2014, 4: 3615
- [38] Valencia-Burton M, McCullough RM, Cantor CR, et al. RNA visualization in live bacterial cells using fluorescent protein complementation. *Nat Methods*, 2007, 4: 421-7
- [39] Wu J, Zaccara S, Khuperkar D, et al. Live imaging of mRNA using RNA-stabilized fluorogenic proteins. *Nat Methods*, 2019, 16: 862-5
- [40] Pena E, Heinlein M, Sambade A. *In vivo* RNA labeling using MS2. *Methods Mol Biol*, 2015, 1217: 329-41
- [41] Grunwald D, Singer RH. *In vivo* imaging of labelled endogenous β -actin mRNA during nucleocytoplasmic transport. *Nature*, 2010, 467: 604-7
- [42] Larson DR, Zenklusen D, Wu B, et al. Real-time observation of transcription initiation and elongation on an endogenous yeast gene. *Science*, 2011, 332: 475-8
- [43] Wu B, Eliscovich C, Yoon YJ, et al. Translation dynamics of single mRNAs in live cells and neurons. *Science*, 2016, 352: 1430-5
- [44] Coulon A, Ferguson ML, de Turris V, et al. Kinetic competition during the transcription cycle results in stochastic RNA processing. *Elife*, 2014, 3: e03939
- [45] Wang C, Han B, Zhou R, et al. Real-time imaging of translation on single mRNA transcripts in live cells. *Cell*, 2016, 165: 990-1001
- [46] Yan X, Hoek TA, Vale RD, et al. Dynamics of translation of single mRNA molecules *in vivo*. *Cell*, 2016, 165: 976-89
- [47] Nelles DA, Fang MY, O'Connell MR, et al. Programmable RNA tracking in live cells with CRISPR/Cas9. *Cell*, 2016, 165: 488-96
- [48] Yang LZ, Wang Y, Li SQ, et al. Dynamic imaging of RNA in living cells by CRISPR-Cas13 systems. *Mol Cell*, 2019, 76: 981-97.e7
- [49] Tutucci E, Vera M, Biswas J, et al. An improved MS2 system for accurate reporting of the mRNA life cycle. *Nat Methods*, 2018, 15: 81-9
- [50] Babendure JR, Adams SR, Tsien RY. Aptamers switch on fluorescence of triphenylmethane dyes. *J Am Chem Soc*, 2003, 125: 14716-7
- [51] Sando S, Narita A, Hayami M, et al. Transcription monitoring using fused RNA with a dye-binding light-up aptamer as a tag: a blue fluorescent RNA. *Chem Commun (Camb)*, 2008, 33: 3858-60
- [52] Nygren J, Svanvik N, Kubista M. The interactions between the fluorescent dye thiazole orange and DNA. *Biopolymers*, 1998, 46: 39-51
- [53] Dolgosheina EV, Jeng SC, Panchapakesan SS, et al. RNA mango aptamer-fluorophore: a bright, high-affinity

- complex for RNA labeling and tracking. *ACS Chem Biol*, 2014, 9: 2412-20
- [54] Constantin TP, Silva GL, Robertson KL, et al. Synthesis of new fluorogenic cyanine dyes and incorporation into RNA fluoromodules. *Org Lett*, 2008, 10: 1561-4
- [55] Tan X, Constantin TP, Sloane KL, et al. Fluoromodules consisting of a promiscuous RNA aptamer and red or blue fluorogenic cyanine dyes: selection, characterization, and bioimaging. *J Am Chem Soc*, 2017, 139: 9001-9
- [56] Murata A, Sato S, Kawazoe Y, et al. Small-molecule fluorescent probes for specific RNA targets. *Chem Commun (Camb)*, 2011, 47: 4712-4
- [57] Holeman LA, Robinson SL, Szostak JW, et al. Isolation and characterization of fluorophore-binding RNA aptamers. *Fold Des*, 1998, 3: 423-31
- [58] Sunbul M, Jaschke A. Contact-mediated quenching for RNA imaging in bacteria with a fluorophore-binding aptamer. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2013, 52: 13401-4
- [59] Ying ZM, Wu Z, Tu B, et al. Genetically encoded fluorescent RNA sensor for ratiometric imaging of microRNA in living tumor cells. *J Am Chem Soc*, 2017, 139: 9779-82
- [60] Arora A, Sunbul M, Jaschke A. Dual-colour imaging of RNAs using quencher- and fluorophore-binding aptamers. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43: e144
- [61] Sunbul M, Jaschke A. SRB-2: a promiscuous rainbow aptamer for live-cell RNA imaging. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46: e110
- [62] Wirth R, Gao P, Nienhaus GU, et al. SiRA: a silicon rhodamine-binding aptamer for live-cell super-resolution RNA imaging. *J Am Chem Soc*, 2019, 141: 7562-71
- [63] Braselmann E, Wierzbka AJ, Polaski JT, et al. A multicolor riboswitch-based platform for imaging of RNA in live mammalian cells. *Nat Chem Biol*, 2018, 14: 964-71
- [64] Paige JS, Wu KY, Jaffrey SR. RNA mimics of green fluorescent protein. *Science*, 2011, 333: 642-6
- [65] Masuda I, Igarashi T, Sakaguchi R, et al. A genetically encoded fluorescent tRNA is active in live-cell protein synthesis. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45: 4081-93
- [66] Igu M, Ray J, Bendickson L, et al. Light-up and FRET aptamer reporters; evaluating their applications for imaging transcription in eukaryotic cells. *Methods*, 2016, 98: 26-33
- [67] Guet D, Burns LT, Maji S, et al. Combining spinach-tagged RNA and gene localization to image gene expression in live yeast. *Nat Commun*, 2015, 6: 8882
- [68] Guzman-Zapata D, Dominguez-Anaya Y, Macedo-Osorio KS, et al. mRNA imaging in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii* using the light-up aptamer Spinach. *J Biotechnol*, 2017, 251: 186-8
- [69] Strack RL, Disney MD, Jaffrey SR. A superfolder Spinach2 reveals the dynamic nature of trinucleotide repeat-containing RNA. *Nat Methods*, 2013, 10: 1219-24
- [70] Filonov GS, Moon JD, Svensen N, et al. Broccoli: rapid selection of an RNA mimic of green fluorescent protein by fluorescence-based selection and directed evolution. *J Am Chem Soc*, 2014, 136: 16299-308
- [71] Autour A, Westhof E, Ryckelynck M. iSpinach: a fluorogenic RNA aptamer optimized for *in vitro* applications. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44: 2491-500
- [72] Song W, Strack RL, Svensen N, et al. Plug-and-play fluorophores extend the spectral properties of Spinach. *J Am Chem Soc*, 2014, 136: 1198-201
- [73] Li X, Kim H, Litke JL, et al. Fluorophore-promoted RNA folding and photostability enables imaging of single broccoli-tagged mrnas in live mammalian cells. *Angew Chem Int Ed Engl*, 2020, 59: 4511-8
- [74] Li X, Mo L, Litke JL, et al. Imaging intracellular S-adenosyl methionine dynamics in live mammalian cells with a genetically encoded red fluorescent RNA-based sensor. *J Am Chem Soc*, 2020, 142: 14117-24
- [75] Song W, Filonov GS, Kim H, et al. Imaging RNA polymerase III transcription using a photostable RNA-fluorophore complex. *Nat Chem Biol*, 2017, 13: 1187-94
- [76] Steinmetzger C, Palanisamy N, Gore KR, et al. A multicolor large stokes shift fluorogen-activating RNA aptamer with cationic chromophores. *Chemistry*, 2019, 25: 1931-5
- [77] Piatkevich KD, Hult J, Subach OM, et al. Monomeric red fluorescent proteins with a large stokes shift. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 5369-74
- [78] Shcherbakova DM, Hink MA, Joosen L, et al. An orange fluorescent protein with a large stokes shift for single-excitation multicolor FCCS and FRET imaging. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 7913-23
- [79] Ouellet J. RNA fluorescence with light-up aptamers. *Front Chem*, 2016, 4: 29
- [80] Chen X, Zhang D, Su N, et al. Visualizing RNA dynamics in live cells with bright and stable fluorescent RNAs. *Nat Biotechnol*, 2019, 37: 1287-93
- [81] Autour A, CYJeng S, D Cawte A, et al. Fluorogenic RNA Mango aptamers for imaging small non-coding RNAs in mammalian cells. *Nat Commun*, 2018, 9: 656
- [82] Chen H, Shiroguchi K, Ge H, et al. Genome-wide study of mRNA degradation and transcript elongation in *Escherichia coli*. *Mol Syst Biol*, 2015, 11: 808
- [83] Bernstein JA, Khodursky AB, Lin PH, et al. Global analysis of mRNA decay and abundance in *Escherichia coli* at single-gene resolution using two-color fluorescent DNA microarrays. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 9697-702
- [84] Selinger DW, Saxena RM, Cheung KJ, et al. Global RNA half-life analysis in *Escherichia coli* reveals positional patterns of transcript degradation. *Genome Res*, 2003, 13: 216-23
- [85] Yang E, van Nimwegen E, Zavolan M, et al. Decay rates of human mRNAs: correlation with functional characteristics and sequence attributes. *Genome Res*, 2003, 13: 1863-72
- [86] Filonov GS, Kam CW, Song W, et al. In-gel imaging of RNA processing using broccoli reveals optimal aptamer expression strategies. *Chem Biol*, 2015, 22: 649-60
- [87] Litke JL, Jaffrey SR. Highly efficient expression of circular RNA aptamers in cells using autocatalytic transcripts. *Nat Biotechnol*, 2019, 37: 667-75