



活细胞RNA动态成像技术进展

高万锴^{1,2}, 陈振寅^{1,2}, 荣霄霄¹, 李幸^{1,2*}

1. 中国科学院北京生命科学研究院, 北京 100101;

2. 中国科学院大学, 北京 100049

* 联系人, E-mail: lix@biols.ac.cn

收稿日期: 2024-01-01; 接受日期: 2024-01-17; 网络版发表日期: 2024-04-12

国家重点研发计划(批准号: 2023YFC2604300)和国家自然科学基金(批准号: 32271515, 32311530120)资助

摘要 RNA是生命“中心法则”的主要成员, 广泛参与细胞内各种生命活动. RNA在活细胞内的区室定位和动态过程与RNA功能息息相关. 因此, 需要开发活细胞内RNA成像技术, 追踪RNA时空动态过程, 原位阐明RNA活性和功能, 进一步解析RNA相关生命过程和疾病的关系. 本文系统阐述两大活细胞RNA成像体系: (i) RNA发夹: 荧光蛋白体系; (ii) 荧光响应RNA适配体: 小分子探针体系. 并介绍其他可用于动态示踪RNA的技术, 概述不同技术在追踪活细胞RNA方面的特点和问题, 讨论RNA动态成像技术未来的发展方向.

关键词 活细胞RNA成像, 荧光蛋白, RNA适配体, 小分子探针

RNA是中心法则的关键生物大分子之一, 不仅能够直接参与编码蛋白等关键细胞过程, 也可以调控细胞内各类生命活动. RNA序列、结构或化学修饰的变化, 影响其正常生理功能, 导致一系列疾病的发生与发展, 如神经退行性疾病、恶性肿瘤、心血管疾病等^[1~6]. 因此, 发展RNA成像技术, 原位追踪RNA亚细胞定位和动态变化, 有助于从时空角度解析RNA生物学功能, 理解疾病发生机制.

传统的细胞内RNA示踪方法主要利用荧光原位杂交(fluorescence in situ hybridization, FISH)探针, 原位标记细胞内RNA. 但是FISH主要应用于固定细胞RNA的标记, 无法实时成像活细胞RNA, 从而失去RNA的时空信息, 限制RNA的动态研究.

随着RNA探针和荧光显微技术的不断发展, 研究人员发展多种活细胞RNA动态成像技术. 根据荧光标

签的区别, 这些技术主要可分为两类: (i) 基于RNA发夹和RNA结合蛋白-荧光蛋白(fluorescent protein, FP)的RNA成像技术; (ii) 基于荧光响应RNA适配体和小分子探针的RNA成像技术. 此外, 分子信标、荧光代谢标记、有机小分子探针以及活细胞荧光原位杂交(live-cell fluorescent in situ hybridization, LiveFISH)等技术也可用于活细胞中RNA的动态成像. 本文将主要介绍以上荧光成像方法的成像原理、最新进展和功能研究, 并且讨论不同成像技术的优缺点以及RNA动态成像技术未来的发展方向.

1 基于RNA结合蛋白-荧光蛋白的RNA成像技术

荧光蛋白是目前广泛使用的一类活细胞成像探

引用格式: 高万锴, 陈振寅, 荣霄霄, 等. 活细胞RNA动态成像技术进展. 中国科学: 生命科学, 2024, 54: 651–667

Gao W K, Chen Z Y, Rong X X, et al. Progress in RNA dynamic imaging technology in live cells (in Chinese). Sci Sin Vitae, 2024, 54: 651–667, doi: 10.1360/SSV-2024-0001

针,其中以绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)研究最为深入^[7]。GFP由238个氨基酸组成,其发色团由分子内第65至67位的氨基酸残基(丝氨酸-酪氨酸-甘氨酸)形成。这三种氨基酸的侧链经自催化形成发色团HBI(4-(对羟基苄基)咪唑烷-5-酮),发出绿色荧光^[8]。通过融合荧光蛋白到靶标蛋白,可有效地标记活细胞内靶标蛋白,观测其定位并获得实时动态信息。荧光蛋白由于其基因编码、低毒、高亮、光稳定等优异的性质,相关研究者获得2008年和2014年诺贝尔化学奖^[7,9-12]。

为使用荧光蛋白示踪活细胞RNA,研究人员以RNA结合蛋白(RNA-binding protein, RBP)为桥梁,发展基于RBP的荧光蛋白探针(RBP-FP)。利用RBP-FP探针,研究人员深入研究RNA的转录、翻译、转运等重要生物学过程^[13-15]。下文将介绍几种广泛使用的基于RBP-FP的RNA成像技术。

1.1 MS2: MCP融合荧光蛋白及其类似体系

MS2标记体系包括MS2 RNA发夹(MS2 RNA hairpin)结构及其亲和蛋白MS2衣壳蛋白(MS2 coat protein, MCP)^[16]。MS2 RNA发夹来自MS2噬菌体,长度为19 nt,可以高特异性、高亲和力($K_d=1$ nmol/L)地结合MCP蛋白^[17]。研究者融合表达MCP与荧光蛋白(MCP-FP),同时将MS2 RNA发夹插入目标RNA序列中,即可使目标RNA特异性招募MCP-FP,从而动态示踪目标RNA(图1A)^[18]。

MS2: MCP系统广泛应用于活细胞RNA成像。该系统可应用于酵母、哺乳动物细胞、秀丽隐杆线虫、果蝇胚胎等体系中,示踪信使RNA(messenger RNA, mRNA)的动态过程^[19-22]。2020年,研究者使用MS2: MCP-FP系统成像酵母中TIM50、TIM22、ATP3 mRNA,发现在有氧呼吸条件下,ATP3 mRNA更趋向定位于线粒体,进而影响编码蛋白的翻译过程^[23]。

MS2: MCP系统可进一步成像单分子mRNA。2013年,Robert Singer研究组^[24]在酵母mRNA的3'非翻译区(3' untranslated region, 3' UTR)插入24×MS2发夹,在单个mRNA分子上募集数十个荧光蛋白,以此放大荧光信号。借助该策略,研究者首次在活细胞中观测到单分子mRNA的动态,并监测酵母RNA聚合酶II的转录动力学。

为进一步增强信号放大效果,浙江大学马为锐与

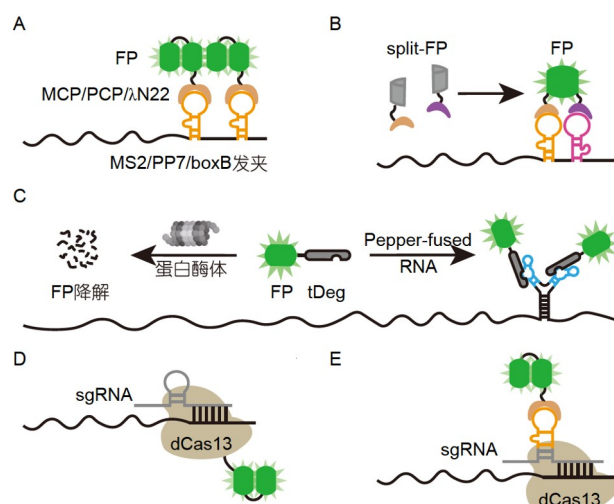


图1 基于荧光蛋白的RNA成像技术示意图。A: RNA发夹: RNA结合蛋白; B: 分裂荧光蛋白; C: Pepper: 荧光响应蛋白; D和E: CRISPR-Cas13系统

Figure 1 Schematic of RNA imaging technologies using fluorescent proteins. A: RNA hairpin: RNA-binding protein; B: split fluorescent protein; C: Pepper: fluorogenic protein; D and E: CRISPR-Cas13

徐素宏研究组^[25]将SunTag与MS2: MCP系统结合,开发基于MS2与SunTag的信号放大系统(MS2-based signal amplification with suntag system, MASS)。SunTag是一段具有多个多肽表位的蛋白序列,可被特定的单链可变区片段(single-chain fragment variable, scFv)识别。研究组构建MCP-SunTag, scFv-FP两种融合蛋白,并将8×MS2插入mRNA的3' UTR区,使单个mRNA分子能募集数百个荧光蛋白,大幅提升荧光信号,高亮度示踪单分子mRNA。利用该系统,研究组在秀丽隐杆线虫中示踪mRNA的动态过程。

与MS2: MCP系统类似,研究人员先后开发PP7: PCP系统^[26]与boxB: λN₂₂系统^[27](图1A)。PCP蛋白和λN₂₂蛋白可以分别以高亲和力结合PP7序列以及boxB序列,并通过融合表达荧光蛋白,构建成像RNA的荧光探针^[13,28]。重要的是,MS2: MCP系统与PP7: PCP系统,boxB: λN₂₂系统完全正交^[28,29],从而可以在活细胞中双色标记目标RNA分子。

Martin研究团队^[30]使用25×boxB和24×MS2分别标记同一条HBB pre-mRNA的两个内含子区域,从而能够成像单个pre-mRNA。研究人员记录细胞核中单个pre-mRNA转录位点的荧光强度变化周期,通过数学拟合,定量测定HBB pre-mRNA内含子的剪接时间。类似地,在原代神经元、酵母等多种细胞和果蝇胚胎中,

同样实现目标RNA的双色标记, 同时示踪多种不同类型的RNA动态行为, 证明这种成像策略的普适性^[31~33].

尽管MS2-MCP及类似体系广泛用于活细胞RNA动态成像, 但这类系统仍存在一些不足. 以MS2-MCP为例, 为标记单分子RNA, 通常需要在靶标RNA上融合多个MS2重复序列, 这种长外源序列的插入有可能干扰目标RNA的表达与转运^[34]. 此外, 未结合RNA的游离荧光蛋白可能造成高背景, 降低成像的信噪比. 因此MCP-FP探针往往需要融合核定位序列(nuclear localization sequence, NLS), 将游离的MCP-FP引导入细胞核, 以降低细胞质中的荧光背景^[20]. 这样一来, 一方面当MCP-FP探针结合RNA时, 探针的NLS也会扰动RNA的生理定位和动力学, 造成信号干扰; 另一方面也造成细胞核中荧光背景极高, 无法观测细胞核内的目标RNA.

为降低游离MCP-FP产生的高背景荧光, 研究人员将分裂荧光蛋白技术(split fluorescent protein, split FP)与MS2-MCP系统结合, 开发背景更低的RNA成像技术^[35]. 2014年, Singer团队^[35]将GFP分裂为两个无荧光的片段, 分别融合到MCP与PCP, 同时在目标RNA中间隔插入MS2与PP7发夹. 当MCP与PCP分别与相邻的相应基序结合时, 两个无荧光的GFP片段相互靠近, 重新组装成GFP, 发射荧光(图1B). 这种方法大大降低背景信号. Singer研究组^[35]将12×MS2-PP7重复序列插入mRNA的3' UTR区, 低背景、高信噪比示踪单分子mRNA动态. 需要注意的是, 当细胞内荧光蛋白浓度较高时, 分裂荧光蛋白会在未结合RNA的情况下自聚合, 从而产生背景信号^[35].

1.2 Pepper: 荧光响应蛋白

为降低荧光蛋白在RNA成像时造成的高背景、NLS动力学干扰等问题, 美国康奈尔大学的Samie R. Jaffrey研究团队^[36,37]于2019年提出一种Pepper RNA响应的“荧光响应蛋白”探针, 应用于活细胞RNA成像(图1C).

Jaffrey团队^[36]首先开发一种Pepper RNA结合的tDeg短肽. tDeg短肽包含19个氨基酸, 可以招募蛋白酶体, 降解自身或tDeg融合的荧光蛋白(tDeg-FP), 无荧光信号. 此外, 进一步发展Pepper RNA, 可特异性结合tDeg-FP, 阻止tDeg招募蛋白酶体, 从而避免tDeg-FP降解, 可检测到荧光信号. 利用这种机制, tDeg-FP可构

建为Pepper RNA响应的“荧光响应蛋白”.

基于Pepper: 荧光响应蛋白体系, 研究者可低背景、高亮度地检测到Pepper融合的任何RNA. 当细胞内无Pepper融合RNA, 荧光响应蛋白快速降解无荧光. 当细胞内表达Pepper融合RNA时, 可以结合荧光响应蛋白, 保持高亮的荧光蛋白信号. 基于此技术, Pepper: 荧光响应蛋白体系将“持续荧光”转变为“响应荧光”, 可以低背景、高灵敏、高特异性、高信噪比、无NLS干扰地实时成像活细胞RNA(图1C).

随后, Jaffrey团队^[36]在目标mRNA的3' UTR区插入20×Pepper序列, 以单分子分辨率成像活细胞中目标mRNA的动态, 并实时监测亚砷酸钠诱导mRNA形成应激颗粒的动态过程. 由于无NLS干扰, Jaffrey团队^[36]在细胞核中也观测到Pepper标记的目标RNA, 并监测该目标RNA极有可能是出核前的mRNA.

2021年, 湖南大学蒋健晖团队^[38]设计基于Pepper的RNA传感器来标记内源RNA. 研究者在Pepper的3'端插入一段目标RNA的互补序列, 破坏Pepper的正确折叠. 未结合目标RNA时, 错误折叠的Pepper无法招募荧光响应蛋白, 不发射荧光. 当传感器上的互补序列与目标RNA杂交, RNA传感器发生构象转换, Pepper重新折叠, 从而稳定荧光响应蛋白发光. 利用这种构象转变策略, 研究人员成像活细胞中的survivin mRNA. 随后, 研究人员通过分裂荧光蛋白技术放大RNA传感器的成像信号, 单分子水平示踪survivin和MUC4 mRNA. 进一步地, 该系统还研究有丝分裂过程中MALAT-1 lncRNA的动态行为^[38].

由此可见, Pepper: 荧光响应蛋白系统具有显著优势. 该技术既保留荧光蛋白探针的高亮荧光性能, 又系统性解决未结合RNA荧光蛋白造成的高背景问题, 避免NLS序列的干扰, 成像细胞核内的目标RNA. 但是, 该系统需要哺乳动物细胞内蛋白酶体的参与, 因而尚未应用于细菌或真菌内的RNA标记.

1.3 CRISPR-Cas13成像系统

CRISPR-Cas13系统由Cas13蛋白和单链向导RNA(single guide RNA, sgRNA)组成, 可以特异性结合并编辑目标RNA^[39~41]. 利用其易编程、特异性高等特点, CRISPR-Cas13系统也可以应用于RNA成像(图1D).

2017年, Zhang团队^[42]开发基于CRISPR-Cas13体系的RNA成像技术. Zhang团队改造Cas13家族中的

LwaCas13a蛋白, 获得无酶切活性的dLwaCas13a(dead LwaCas13a), 并将其与GFP融合表达. 通过调整sgRNA的间隔区/锚定区, 即可靶向并成像目标RNA. 利用该体系, Zhang团队在HEK293FT细胞内成像 β -actin mRNA, 并观测应激条件下 β -actin mRNA形成应激颗粒的动态过程.

尽管基于dLwaCas13a-FP的成像体系能够成像高丰度的 β -actin mRNA, 但在成像低丰度RNA时, 该体系面临信噪比低、标记效率不足的挑战. 为克服这些局限, 2019年陈玲玲团队^[34]测试多种Cas13蛋白应用于成像体系的效果, 其中dPspCas13b表现出最高的标记效率和信噪比. 利用这一新型dCas13b-FP成像体系, 研究人员在活细胞内成像中丰度至低丰度表达的*NEAT1*, *SatIII* lncRNA以及*MUC4* mRNA.

2023年, 陈玲玲团队^[43]使用优化的dPspCas13b-EGFP: sgRNA体系, 将dPspCas13b-EGFP: sgRNA复合物注射进斑马鱼胚胎, 成像胚胎内源*Eppk1* mRNA和*100537515* mRNA, 并追踪*Eppk1* mRNA和*100537515* mRNA的从头转录与有丝分裂后的转录再激活过程. 此外, 研究者还在活体内示踪单个mRNA-蛋白复合物的出核过程.

此外, 陈玲玲团队^[44]还将CRISPR-Cas13与MS2: MCP及类似系统结合, 开发CRISPRpalette多色成像系统. 为实现多色RNA成像, 研究人员筛选得到dMis-Cas13b蛋白, 并通过点突变消除dMisCas13b 剪切sgRNA的活性, 提高sgRNA的稳定性, 得到ddMis-Cas13b(pre-crRNA processing null dMisCas13b). 随后, 研究人员将MS2, PP7, Pepper等RNA发夹分别插入sgRNA中, 同时表达对应的RBP-FP, 在活细胞中同时标记成像*NEAT1*, *SatIII* lncRNA以及 *MUC4*等mRNA (图1E)^[44].

表 1 基于RNA发夹: 荧光蛋白的RNA成像工具

Table 1 RNA imaging tools with RNA hairpins: fluorescent proteins

标记系统	K_d (nmol/L)	单分子成像标记 序列个数	RNA序列	成像RNA	参考文献
MS2: MCP	1	24×MS2	ACAUGAGGAUUACCCAUGU	mRNA, ncRNA	[45-48]
PP7: PCP	1.6	24×PP7	UAAGGAGUUUAUUGGAAACCCUUA	mRNA, ncRNA	[13,46,49]
boxB: λ N ₂₂	22	25×boxB	GCCCCGAAAAAGGGC	mRNA	[28,30,50,51]
Pepper: tDeg	—	20×Pepper	GGCUCGUUGAGCUCAUUAAGCUCCGAGCC	mRNA	[36,38]
dCas13-sgRNA	—	dPspCas13b-3×EGFP	—	mRNA, ncRNA	[43]

总而言之, CRISPR-Cas13系统在标记成像RNA方面具有诸多优点. 首先, CRISPR-Cas13系统无需对目标RNA进行遗传修饰, 操作简便. 其次, 不同种属的CRISPR-Cas13系统可能相互正交, 可以同时示踪两种不同的RNA. 但是, CRISPR-Cas13系统存在潜在的脱靶效应, 需要对sgRNA的设计进行多轮优化, 提高标记效率与成像信噪比^[34](表1).

2 基于荧光响应RNA适配体: 小分子探针的RNA成像技术

荧光响应RNA适配体是一种具有特定结构的单链RNA, 能够结合并“点亮”原本不发光的小分子探针^[52]. 研究人员以荧光响应性小分子探针为底物, 通过指数富集的配体系统进化技术(systematic evolution of ligands by exponential enrichment, SELEX), 对RNA文库重复进行结合-洗脱-扩增-再结合的过程, 最终可从含有 10^{16-18} 条随机合成的RNA文库中筛选出特异性结合小分子探针的RNA适配体^[53].

RNA靶向的小分子荧光探针单独存在于水溶液中时, 通常没有荧光, 只有结合对应的RNA适配体后, 才能激活探针, 实现RNA荧光成像. 因此, 开发和鉴定合理的RNA适配体结合小分子探针是关键的第一步. 小分子探针需要满足以下条件: (i) 低荧光背景和细胞毒性. 虽然可以通过降低探针浓度来消减细胞荧光背景和细胞毒性, 但低剂量的探针会限制RNA成像的灵敏度. 由于哺乳动物和人细胞表达的RNA适配体浓度可超过 $10\ \mu\text{mol/L}$ ^[54], 为确保细胞中RNA适配体结合到小分子探针, 探针最优浓度应在 $10\ \mu\text{mol/L}$ 以上. 因此, 理想的荧光探针在 $10\ \mu\text{mol/L}$ 以上浓度需要没有明显的细胞背景荧光和细胞毒性. (ii) 细胞透膜性. 小分子

探针需要进入细胞, 因此需要小分子探针需要较好跨膜性能. (iii) 高消光系数. 探针的亮度与探针本身的消光系数和量子产率有关. 因此高的消光系数可以提高RNA成像探针的亮度和灵敏度.

要构建荧光响应性的小分子探针, 一般有以下三种策略: (i) 设计荧光蛋白的发色团结构类似物(图2左). 这种小分子探针的分子内运动易导致非辐射跃迁, 从而降低荧光. 而当RNA适配体与小分子探针结合后, 限制探针的分子内运动和非辐射跃迁, 从而增强荧光^[55-62]. (ii) 设计自淬灭探针(图2中). 这类小分子探针将荧光团与淬灭基团连接, 具有自淬灭性质. 当与RNA适配体结合时, 荧光团与淬灭基团之间的距离增加, 荧光团的荧光得以恢复^[63-67]. (iii) 设计具有分子内螺环结构的小分子探针(图2右). 这种小分子探针的分子内螺环结构不发荧光, RNA适配体结合后, 探针结构转变, 由不发光的螺环结构变为发光的两性离子结构, 进而产生荧光^[68,69].

2.1 结合荧光蛋白发色团的荧光响应RNA适配体

2011年, Jaffrey团队^[55]在*Science*上报道首个活细胞成像的RNA适配体Spinach, 并应用于哺乳动物细胞内RNA成像. 为避免早期荧光RNA适配体靶向的孔雀石绿探针^[52]的高细胞毒性、高细胞背景等缺陷, 该团队创新性地利用GFP中的生色团HBI(4-(对羟基亚苄基)咪唑烷-5-酮)为结构基础, 设计出小分子探针DFHBI(3,5-二氟-4-羟基亚苄基咪唑啉酮). DFHBI在高浓度(20 $\mu\text{mol/L}$)下显示出低细胞背景、低细胞毒性. 进一步, Jaffrey团队^[55]通过DFHBI探针, 筛选出Spinach适配体. Spinach可以点亮DFHBI, 使其荧光增强2000倍以上, 在试管中达到GFP的荧光亮度. 此外, 研究人员使用Spinach标记5S rRNA, 成功在活细胞内示踪5S rRNA. 2012年, Jaffrey团队^[70]把Spinach设计成基于RNA的荧光生物传感器, 在细菌里检测到一系列小分子代谢物.

作为早期筛选出的荧光适配体, Spinach: DFHBI系统虽已初步具备活细胞示踪RNA的能力, 然而其在活细胞内较低的荧光强度阻碍该系统的进一步应用. 这是由于Spinach在细胞中折叠性差, 无法形成稳定的空间结构. 因此, 2014年, Jaffrey团队^[56]优化SELEX过程, 将SELEX与流式细胞荧光分选技术(flow cytometry activated cell sorting, FACS)结合, 开发SELEX-FACS,

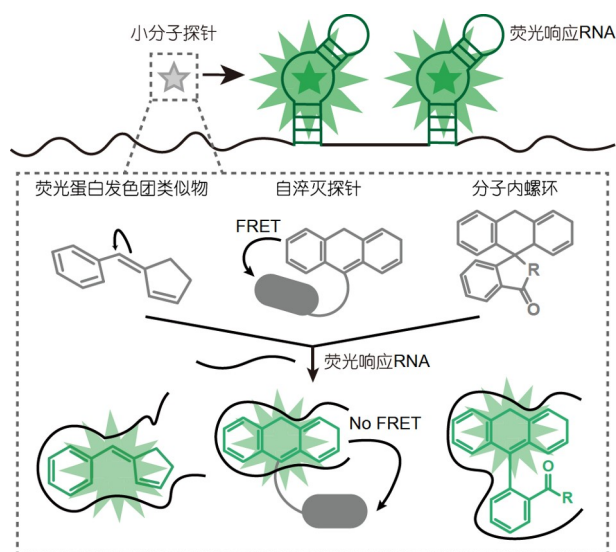


图2 RNA靶向小分子探针的主要设计策略. 荧光蛋白发色团类似物荧光原理(左). 自淬灭探针荧光原理(中). 分子内螺环小分子探针荧光原理(右)

Figure 2 Design strategies of fluorogenic RNA-binding small molecule probes. These probes contain fluorescent protein-like chromophores (left), self-quenching probes (middle) and intramolecular spirocyclization probes (right)

以DFHBI为底物, 筛选得到Broccoli荧光响应RNA适配体.

Broccoli已经广泛应用分子生物学、合成生物学、细胞生物学、遗传学等领域. 2023年, 刘书琳团队^[71]使用Broccoli适配体, 开发一种RNA纳米拉链(nanozipper)技术, 在活细胞内原位标记和实时成像单分子mRNA. 研究人员将Broccoli适配体通过结构末端的茎相互连接, 构建串联的3×Broccoli纳米拉链. 该纳米拉链可从中分裂为两个互补的片段, 每个互补片段末端均连有一段靶RNA的识别片段. 在活细胞中, 靶RNA可募集分裂的互补片段, 并使两个片段相互靠近, 从而重新形成探针的结合位点, 产生荧光. 研究者使用该技术, 实现对活细胞内SARS-CoV-2包膜蛋白mRNA的实时动态成像.

为提高Broccoli成像能力, Jaffrey团队和李幸团队^[72-74]也设计合成一系列Broccoli结合的小分子探针. 新一代探针结合细胞内Broccoli时, 可以指数地增强Broccoli亮度和光稳定性. 如2014年, Jaffrey团队^[72]在DFHBI的咪唑啉酮的N1位置修饰三氟乙基基团, 得到DFHBI-1T探针. DFHBI-1T不仅细胞背景更低, 并使得细胞内Spinach/Broccoli亮度增强50%以上.

2020年, Jaffrey和李幸团队^[73]通过Spinach: DFHBI晶体结构筛选出新一代小分子探针BI. 和DFHBI-1T一样, BI在高浓度(10 $\mu\text{mol/L}$)下显示出低细胞背景. 此外, BI高亲和力地结合Broccoli, 可以作为“RNA伴侣”来促进Broccoli的折叠, 使得细胞内Broccoli亮度提高10倍以上. 并且, BI使得Broccoli光稳定性提高到5倍以上. 由于BI明显提升Broccoli的亮度和光稳定性, 因此成功标记到活细胞内单个mRNA. 这也是首次利用荧光RNA适配体和小分子探针标记到单个mRNA.

随后Jaffrey团队和李幸团队^[74]合作开发TBI(3,5-二氟-4-羟基亚苄基咪唑啉酮-2-硫代咪唑啉-1-苯并咪唑)小分子探针. 相较于此前开发的小分子探针, TBI与Broccoli适配体之间的“结合-解离”速率更快, 进一步提升光稳定性. 但是TBI探针在高浓度(10 $\mu\text{mol/L}$)下具有一定的细胞背景. 因而Broccoli: BI体系在RNA成像亮度和信噪比方面具有最佳成像能力, 是当前RNA成像技术的金标准之一^[73].

以上RNA适配体靶向的小分子探针的设计开发均基于绿色荧光蛋白发色团. 为拓展荧光响应RNA适配体: 小分子探针系统的应用, Jaffrey团队^[57,62,75]基于红色荧光蛋白发色类似物, 设计开发出一系列小分子荧光探针. 2017年, Jaffrey研究团队^[57]以红色荧光蛋白DsRed的发色团模拟物DFHO(3,5-二氟-4-羟基亚苄基咪唑啉酮-2-肟)为探针, 筛选得到荧光RNA适配体Corn. DFHO显示出较低荧光背景, 结合Corn发射黄色荧光($E_x=505\text{ nm}$, $E_m=545\text{ nm}$). 与大多数RNA适配体以单体形式结合探针不同, Corn以二聚体的形式与DFHO结合. 此外, Corn: DFHO系统相比于Spinach/Broccoli: DFHBI系统, 光稳定性显著提高, 适用于长时程地动态示踪目标RNA. 因此, 研究人员使用Corn: DFHO系统定量研究活细胞内RNA聚合酶III的转录活性. RNA聚合酶III结合的启动子可分为三类, 研究者在这三类启动子的下游插入Corn适配体, 并将其导入细胞. 通过观察荧光强度的变化, 研究人员得以实时研究RNA聚合酶III的转录动力学过程^[57].

为进一步发展具有红色荧光的荧光响应RNA适配体: 小分子探针系统, Jaffrey团队和李幸团队^[75]利用Broccoli定向进化得到Red Broccoli适配体. Red Broccoli可结合DFHO产生红色荧光, 但在活细胞中亮度较低. 研究人员依据晶体结构, 进一步优化探针结构得到

DFHO的衍生物OBI(3,5-二氟-4-羟基亚苄基咪唑啉酮-2-肟-1-苯并咪唑). Red Broccoli: OBI的试管亮度是Red Broccoli: DFHO的2.7倍, 此外OBI可以有效地提高细胞内Red Broccoli亮度. 基于Red Broccoli: OBI在细胞中显示出较高的荧光强度, 研究人员籍此开发具有红色荧光响应的生物传感器, 用于研究细胞内的小分子代谢物水平^[75].

2022年, Jaffrey团队^[62]在优化DFHO的结构, 得到荧光发射谱红移的DFAME(3,5-二氟-4-羟基亚苄基咪唑啉酮-2-丙烯酸甲酯). 而后, 研究人员以DFAME为底物, 筛选得到Beetroot适配体. Beetroot与Corn类似, 均以二聚体形式结合小分子荧光探针. 尽管Beetroot与Corn序列高度相似, 但两种适配体高度正交. Jaffrey团队将Beetroot和Corn分别与MS2发夹, boxB发夹融合, 构建5 $\times$ Beetroot-boxB和5 $\times$ Corn-MS2. 研究人员将5 $\times$ Beetroot-boxB, 5 $\times$ Corn-MS2与GFP- λ N, mCherry-MCP同时导入细胞, 借助RNA发夹与RNA结合蛋白之间的相互作用, 成功在活细胞内监测到核糖核蛋白复合物(ribonucleoprotein complex, RNP)自组装形成聚集体的过程.

为提高RNA适配体的正确折叠率, 2022年Jaffrey团队^[58]在天然存在的腺嘌呤核糖开关的序列基础上, 筛选得到类似腺嘌呤核糖开关结构的Squash适配体. Squash和腺嘌呤核糖开关具有类似的三维结构, 不同的是腺嘌呤核糖开关结合腺嘌呤小分子代谢物, Squash结合并点亮DFHBI小分子探针. 由于以天然存在的核糖开关为序列基础, Squash表现出显著增高的正确折叠率(80%), 高于Corn(52%)和Broccoli(55%), 可在活细胞内成像5S rRNA与U6 snRNA^[58]. 凭借其优秀的折叠能力, Jaffrey团队设计出基于Squash的生物传感器, 用以标记细胞内的小分子代谢物水平.

借助荧光响应RNA适配体, 研究人员可在活细胞内成像RNA. 成像RNA需要标记目标RNA, 最简单的标记方式为直接将荧光响应RNA适配体插入至目标RNA序列, 以示踪RNA的动态. 但这种标记方式需要改变目标RNA的序列, 可能会影响其正常的生命活动. 因此, 研究人员借鉴分裂荧光蛋白技术, 开发分裂荧光响应RNA适配体技术, 可直接成像无遗传修饰的目标RNA. 2017年, 陈楠团队和樊春海团队^[76]联合开发适配体诱导的荧光互补(apptamer-initiated fluorescence complementation, AiFC)技术, 可在活细胞内原位成像

β -actin mRNA. 研究人员将Broccoli适配体从中分裂为Split-A, Split-B两个片段, 单独的Split-A, Split-B均不能结合小分子探针发出荧光. 研究者在Split-A和Split-B末端分别连接一段靶向目标RNA的序列, 并同时导入细胞中. 当两片段与目标RNA结合后, Split-A和Split-B空间距离靠近, 重新组装成小分子探针的结合口袋, 从而可在活细胞内示踪RNA的动态行为(图3A).

2019年, 华东理工大学杨弋研究团队^[59]以HBC(4-(((2-羟乙基)(甲基)氨基)-亚苄基)-氰基苯乙腈)为底物, 筛选得到Pepper适配体. 与上文1.2中Jaffrey组研发的结合荧光响应蛋白的Pepper系统不同的是, 杨弋组研发的Pepper结合HBC小分子探针. HBC探针发光机理和荧光蛋白生色团一致, 即通过RNA限制小分子探针的分子内旋转, 降低小分子探针的非辐射跃迁, 从而增强荧光. 通过改造HBC的分子结构, 研究人员得到一系列HBC衍生物探针. 这些探针与Pepper结合后, 发射波长基本覆盖可见光谱青色至红色的区域. 研究人员将4×Pepper插入目标mRNA的3' UTR区, 即可示踪活细胞中的BFP, GADPH, β -actin mRNA.

武汉大学周翔研究团队^[77]通过改造Pepper适配体序列, 设计iPepper(inert Pepper)RNA分子, 可在不改变目标RNA序列的情况下成像其动态. 研究人员首先研究Pepper的二级结构, 将Pepper的茎缩短至恰好无法稳定折叠, 仅保留其核心序列. 随后, 在核心序列两翼插入一段与目标RNA互补的探针, 当未结合目标RNA时, Pepper的核心序列不能稳定折叠, 无法结合HBC发射荧光. 只有当互补序列与目标RNA结合后, Pepper才能恢复稳定的结构, 结合HBC发出荧光(图3B). 使用这

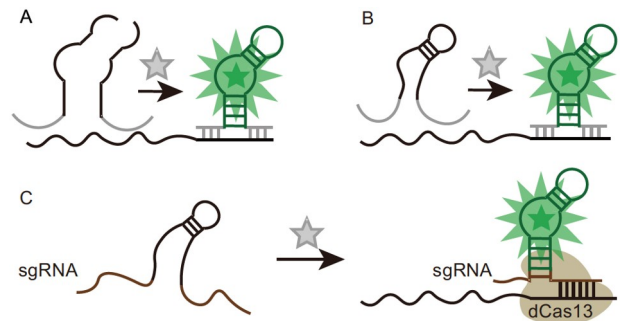


图3 基于荧光响应RNA适配体的RNA成像设计方法, 可用于标记细胞内源RNA. A: 适配体变构; B: 分裂RNA适配体; C: 适配体结合CRISPR

Figure 3 Schematic of endogenous RNA imaging with various fluorogenic RNA approach. A: Allosteric fluorogenic RNA; B: split fluorogenic RNA; C: CRISPR combined fluorogenic RNA

种策略, 研究人员得以在活细胞中示踪多种内源mRNA. 此外, 周翔研究团队^[78]将荧光响应RNA适配体与CRISPR-dCas13b系统结合, 开发CasFAS (CRISPR-dCas13 system with fluorescent RNA aptamers in sgRNA)技术. 研究人员将Pepper或Broccoli适配体插入sgRNA的茎环区域, 即可随Cas13体系成像目标RNA. 利用该成像体系, 研究人员靶向病毒RNA序列, 监测病毒感染活细胞的过程(图3C). 此外, 李幸团队^[79]和杨弋团队^[80]分别利用Pepper构建生物传感器, 标记活细胞的蛋白、金属离子和代谢物, 并且监测出药物的抑制效果, 有望开发出药物筛选平台.

2023年, 杨弋研究团队^[61]以NBSI(4-(N-(2-羟乙基)(甲基)亚苄基-3-甲基-2-苯乙炔基-3,5-二氢-4H-咪唑-4-酮)为底物, 筛选得到Clivia适配体. Clivia适配体仅

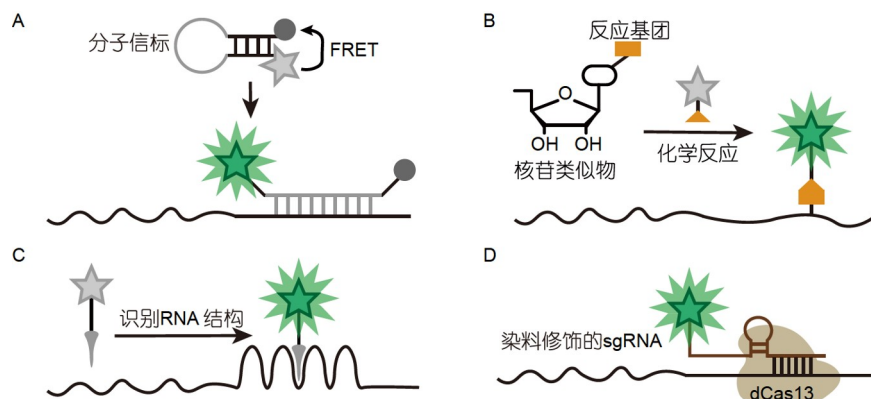


图4 其他RNA成像技术. A: 分子信标; B: 代谢标记; C: 小分子探针嵌合; D: LiveFISH

Figure 4 Other RNA imaging technologies. A: Molecular beacon; B: metabolic labeling; C: small molecule fluorophores; D: CRISPR LiveFISH

由30个核苷酸构成, 以高亲和力结合NBSI分子. 研究团队通过对NBSI分子结构进行改造, 获得发射光谱涵盖黄色到红色的系列小分子探针. Clivia: NBSI系统表现出大斯托克斯位移, 并且与Pepper: HBC系统正交. 基于各自的光谱性质, 研究人员使用Clivia和Pepper实现单激发双发射的活细胞RNA实时成像. 此外, 研究人员结合Clivia与Nanoluc萤光素酶(nanoluciferase, Nluc)开发实时检测RNA-蛋白质相互作用的新技术. Nluc能够催化底物氧化, 从而产生生物发光^[81]. 由于Nluc的发射光谱与Clivia的激发光谱存在重叠, 当二者距离靠近时, 可能产生生物发光共振能量转移(bioluminescence resonance energy transfer, BRET). 研究者首先将Clivia序列与MS2融合, 萤光素酶与MCP融合, 借助MS2: MCP之间的相互作用来诱导Clivia与Nluc靠近, 发生BRET, 通过监测BRET信号强度来表征RNA-蛋白质的相互作用. 借助该技术, 研究人员在活细胞和小鼠体内原位监测RNA-蛋白相互作用. 进一步地, 研究者应用该技术探究锌指蛋白ZNRANB2与其结合基序、U1 snRNA与U1-70K蛋白等蛋白与RNA之间的相互作用^[61].

此外, 其他报道的荧光响应RNA适配体也可通过限制分子内运动, 结合并“点亮”非荧光蛋白发色团类似物的小分子探针. 2014年, Unrau研究团队^[60]以噻唑橙(thiazole orange, TO)衍生物TO1-Biotin为底物, 筛选得到Mango-I适配体. TO1是一种具有不对称结构的花菁类染料, 可结合核酸分子产生非特异性荧光, 导致较高的背景信号. 研究人员通过对TO1进行基团修饰以及生物素化, 削弱其结合核酸分子的能力, 降低背景信号. 只有当TO1-Biotin与Mango-I结合后, 才能激活TO1-Biotin的荧光.

为优化Mango-I的光物理性质, 2018年, Unrau团队^[82]使用微流控辅助的体外区室化(microfluidic-assisted in vitro compartmentalization, μ IVC)技术, 重新筛选Mango-I的文库, 得到Mango-II, Mango-III, Mango-IV三个适配体. 它们相对于Mango-I在荧光强度和对小分子探针的亲合力上有明显提升, 并在高浓度盐溶液中能发出更明亮的荧光. 其中, Mango-II适配体表现出更高的荧光强度与光稳定性. 研究人员将24×Mango-II重复序列插入*mCherry* mRNA的3' UTR区, 在固定细胞和活细胞中实现单分子mRNA成像^[83].

2.2 结合自淬灭探针的荧光响应RNA适配体

自淬灭探针是由一个荧光团与一个淬灭基团连接组成的小分子探针. 未结合RNA适配体时, 荧光团的荧光被淬灭基团淬灭; 而当荧光团或淬灭基团结合其RNA适配体后, 淬灭效应被解除, 荧光团得以恢复荧光. 这种设计策略下, 可以采用更高亮度、更强光稳定性的荧光团, 如花菁类或罗丹明类荧光团, 从而提高RNA动态成像的准确性.

2018年, 科罗拉多大学博德分校Palmer研究团队^[67]以天然存在的钴胺素(cobalamin, Cbl)核糖开关作为RNA适配体, 以荧光染料-Cbl为荧光探针, 开发Riboglow RNA成像平台. 由于Cbl可以淬灭荧光, Palmer团队将Cbl连接Cy5, FAM等不同的荧光探针, 构建一系列具有不同发射波长的自淬灭探针. 随后, 作者将12×Riboglow插入目标mRNA的3' UTR区, 即可成像单分子mRNA^[84]. 然而, 由于这些小分子探针的溶解性较差, 需要依赖微珠负载才能进入细胞, 操作繁琐, 不利于活细胞成像.

2021年, Jaschke研究团队^[65]以TMR-DN(四甲基罗丹明-二硝基苯胺)为自淬灭探针, 开发RNA适配体RhoBAST. RhoBAST结合并点亮TMR-DN探针, 并且在结合TMR-DN探针时表现出快速的结合-解离动力学. 这种动力学特征使得RhoBAST: TMR-DN系统具有闪烁的荧光特性, 满足单分子定位显微成像技术(single-molecule localization microscopy, SMLM)的成像要求. 研究人员在HEK293细胞中表达RhoBAST适配体, 通过SMLM成像技术观察到细胞核内RhoBAST组成的精细结构.

2023年, Jaschke研究团队^[85]为获得具有更高亲和力以及更高荧光强度的RNA适配体: 小分子探针系统, 开发二聚的biRhoBAST: TMR₂系统. 研究人员使用一段RNA支架序列将两个RhoBAST适配体连接在一起, 构建二聚的biRhoBAST适配体; 将两个TMR分子使用聚乙二醇链连接, 构建具有自淬灭效应的小分子探针TMR₂^[85]. TMR₂分子内两个TMR分子之间距离接近, 形成分子内H-二聚体, 使TMR₂几乎不发出荧光^[86]. TMR₂可结合biRhoBAST, 与RhoBAST: TMR-DN相比, biRhoBAST: TMR₂的结合亲和力得到极大提升($K_d=40$ pmol/L), 荧光强度几乎增强至RhoBAST: TMR-DN的三倍, 并具有更低的荧光背景. 这种系统

仅需要8×biRhoBAST标记,即可在活细胞内示踪单分子*mAzurite* mRNA的动态.这种构建方法还可以应用于其他类型的RNA适配体:小分子探针系统,例如下文所述的SiRA: SiR系统.SiRA: SiR系统是一种利用分子内螺环实现荧光响应的RNA适配体系统,研究人员结合分子内螺环与接触淬灭机制,开发biSiRA: SiR₂系统.与SiRA: SiR相比,biSiRA: SiR₂表现出更高的荧光强度.但是TMR₂很容易受到细胞环境的扰动,导致探针在细胞环境中产生背景荧光.

2.3 结合具有分子内螺环的荧光响应RNA适配体

2019年,德国海德堡大学的Jaschke研究团队^[87]以硅基罗丹明(silicon rhodamine, SiR)为探针,开发RNA适配体SiRA. SiR具有分子内螺环结构,未结合适配体时表现为无荧光的螺内酯形式,与SiRA适配体结合后转变为具有荧光的两性离子形式.通过这种结构转变, SiR在SiRA结合后产生7倍的荧光响应.值得一提的是, SiR结合SiRA后发射的荧光波长位于近红外波段,荧光穿透深度更深,自体荧光产生的背景更低.

2023年,为满足受激辐射损耗(stimulated emission depletion, STED)超分辨率成像技术的需要, Jaschke研究团队^[68]对四甲基罗丹明(5-carboxytetramethylrhodamine, TMR)进行结构优化,将其改造为具有分子内螺环的荧光探针SpyRho(spirocyclic rhodamine). SpyRho可以与RhoBAST 适配体结合,表现出高荧光亮度、极强的光稳定性以及快速的配体交换动力学.这些特点使RhoBAST: SpyRho系统具有较强的抗光漂白性质,能够使用STED技术在活细胞内成像RNA. 研究人员将16×RhoBAST重复序列标记在含CGG重复序列的mRNA 3' UTR区,首次实现活细胞内标记RNA的STED成像^[68].

荧光响应RNA适配体具有许多优势.与荧光蛋白不同,荧光响应RNA适配体不需要成熟时间,只需外源加入对应的小分子探针即可进行动态示踪.此外,荧光响应RNA适配体:小分子探针系统在分子量上远小于荧光蛋白,对标记的RNA分子干扰更小.更重要的是,只有当小分子探针特异性结合RNA适配体后,才能发出荧光.这种响应性荧光显著提高成像的信噪比.

然而,荧光响应RNA适配体:小分子探针系统仍具有一些缺陷.首先,荧光响应RNA适配体:小分子探

针系统在活细胞内的荧光强度与荧光蛋白相比普遍较低.其次,细胞内RNA的浓度与蛋白相比更低,且半衰期较短^[88],难以长时间稳定地示踪RNA动态.目前已开发出提高活细胞内荧光响应RNA浓度的技术,但该技术会改变RNA的结构^[54],可能影响目标RNA的正常生命活动(表2).

3 其他RNA成像技术

3.1 分子信标

分子信标(molecular beacons, MB)是一种可用于成像RNA的寡核苷酸单链探针^[89].这种单链探针的序列两端分别修饰荧光基团与淬灭基团,序列中包含一段目标RNA的互补序列以特异性结合目标RNA.未结合目标RNA时,MB会自发折叠形成两端靠近的茎环结构,此时荧光基团与淬灭基团距离靠近,荧光被淬灭.只有互补序列与目标RNA杂交后,荧光基团和淬灭基团分开,才能产生荧光^[89](图4A).

MB具有高特异性、高灵敏度、低背景的特点,已广泛用于成像RNA^[90,91].2017年,北京大学陈匡时研究团队^[92]在目标RNA上插入8×MB互补序列,构建稳定表达的细胞系.随后,研究者将靶向目标RNA的MB分子导入稳转细胞,成功在活细胞内实现多种lncRNA的单分子成像.类似的,该团队在mRNA编码区上游插入32×MB互补序列,在活细胞内实现单分子EGFP mRNA成像^[93].

分子信标技术仍存在许多不足.首先,MB分子通常由带负电荷的寡核苷酸组成,难以通过细胞膜,需要利用载体递送或显微注射的方式进入细胞.此外,递送的不均匀性以及核糖核酸酶的降解导致的假阳性信号限制MB技术的应用^[94].

3.2 代谢标记技术

代谢标记(metabolic labeling)技术是一种通过细胞代谢途径标记RNA分子中核苷的技术.这种技术需预先在核苷分子上修饰叠氮基、环辛炔基等反应活性基团,形成核苷类似物.随后,将核苷类似物加入细胞培养基,通过补救合成途径(salvage pathway),将类似物掺入新生的RNA分子中.最后,在培养基中加入预先修饰活性基团的荧光团分子,通过点击化学反应,将荧光团与核苷类似物共价连接,从而标记活细胞中

表 2 RNA适配体: 小分子探针复合物的光物理和生物化学性质

Table 2 Photophysical and biochemical properties of RNA aptamer: small-molecule fluorophores complexes

小分子探针 (适配体)	结构式	激发 (nm)	发射 (nm)	消光系数 [M ⁻¹ , cm ⁻¹]	量子产率	亲和力常数 (nmol/L)
DFHBI (Spinach)[55,72]		469 ^{a)}	501 ^{a)}	24271 ^{a)}	0.72 ^{a)}	537 ^{a)}
DFHBI-1T (Spinach/Broccoli) [56,72,73]		472 ^{a)} 470 ^{b)}	507 ^{a)} 505 ^{b)}	29600 ^{a)} 28900 ^{b)}	0.94 ^{a)} 0.41 ^{b)}	360 ^{a)} 305 ^{b)}
BI (Broccoli)[73]		470 ^{b)}	505 ^{b)}	33600 ^{b)}	0.67 ^{b)}	51 ^{b)}
TBI (Broccoli)[74]		485	527	35100	0.64	71
DFHO (Corn)[57]		505	545	29000	0.25	70
DFAME (Beetroot)[62]		514	619	22500	0.17	460
OBI (Red Broccoli)[75]		541	590	47300	0.67	23
TMR-DN (RhoBAST)[65]		564	590	96000	0.57	15
SpyRho (RhoBAST)[68]		562	581	65000	0.95	34
TMR ₂ (biRhoBAST)[85]		564	590	164700	0.93	0.04

(表2续1)

小分子探针 (适配体)	结构式	激发 (nm)	发射 (nm)	消光系数 [M ⁻¹ , cm ⁻¹]	量子产率	亲和力常数 (nmol/L)
SiR (SiRA)[87]		649	662	86000	0.98	430
SiR ₂ (biSiRA)[85]		649	663	200000	0.78	0.291
HBC530(Pepper)[59]		485	530	65300	0.66	3.5
HBC620 (Pepper)[59]		577	620	100000	0.58	6.1
NBSI574 (Clivia)[61]		490	574	23000	0.37	18
TO1-B (Mango II)[82,83]		510	535	—	0.21	0.7

a) 数据来自参考文献[56,72]. b) 数据来自参考文献[73]

的RNA分子, 实时动态示踪新生的RNA分子^[95](图4B).

代谢标记的主要限速步骤在于, 补救合成途径中的激酶很难识别核苷类似物, 无法高效率地将核苷类似物磷酸化, 形成核苷酸. 因此, 研究人员尝试改造激酶的底物识别位点, 使其能够高效地磷酸化核苷类似物. 2019年, Kleiner研究团队^[96]成功改造尿苷-胞苷激酶2(uridine-cytidine kinase 2, UCK2), 得到Y65A UCK2, 其可以识别核苷类似物5-叠氮甲基尿苷(5-azidomethyl uridine, 5-AmU), 从而实现对RNA的荧光标记. 研究人员借助Y65A UCK2, 在活细胞内荧光标记RNA, 研究氧化应激过程中RNA定位的动态变化. 类似地, 2022年, Kleiner研究团队^[97]以pyrroloC(pyrrolo-cytidine)或tC(1,3-diaza-2-oxophenothiazine)为核苷类

似物, 借助Y65A UCK2催化磷酸化, 通过点击化学反应标记RNA, 研究活细胞内的RNA代谢和转运过程.

3.3 小分子荧光团嵌合技术

化学合成的有机小分子荧光团也可作为直接成像RNA的探针工具. 这些小分子荧光团可以特异结合RNA分子的特殊结构, 激活荧光并标记RNA. 这些小分子荧光团大多数在生理条件下带正电荷, 可通过电荷相互作用与带负电的RNA分子结合, 激活荧光. 此外, 氢键、 π - π 堆积效应等也可以在探针与RNA的特异性结合中发挥作用(图4C).

有机小分子荧光团可特异成像不同细胞器中的RNA. 生物分子对不同化学基团表现出迥异的亲和力,

某些基团可以高特异性地结合特定细胞器或特殊结构的RNA, 如含三苯基磷(triphenylphosphonium, TPP)分子更易透过线粒体膜^[98], 具有芳香性平面结构的分子更易结合G-四链体(G-quadruplex)^[99]等。研究人员将这些基团修饰在探针结构中, 进而成像活细胞中不同定位的RNA^[100,101]。2019年, 林伟英研究团队^[100]开发MR-IDE荧光团。MR-IDE具有良好的细胞渗透性, 可特异性靶向活细胞线粒体, 并在线粒体内结合RNA分子中的小沟结构, 激活荧光。使用MR-IDE, 研究人员在肿瘤细胞与巨噬细胞中成像线粒体RNA动态。同年, 周虹屏研究团队^[102]开发ADAP荧光团。可以特异性结合RNA分子, 激活荧光。研究人员使用ADAP结合双光子显微成像技术, 在活细胞内示踪核仁与线粒体内的RNA。

基于小分子嵌合的RNA成像技术优势在于, 无需复杂的操作和适配体修饰, 即可成像内源RNA分子。但是, 由于绝大部分有机小分子荧光团的荧光激活依赖于结合特定的RNA结构, 如RNA螺旋结构的小沟或是G-四链体结构。这导致这些荧光团很难区别序列不同的RNA, 不能成像特定的目标RNA, 具有脱靶效应^[101]。

3.4 LiveFISH

2019年, 斯坦福大学Stanley Qi研究团队^[103]开发LiveFISH活细胞RNA成像技术。Stanley Qi团队基于CRISPR-dCas13d体系, 在体外将Atto647荧光团修饰的sgRNA与dCas13d组装成RNP复合物, 并通过电穿孔导入活细胞, 成像特定的RNA(图4D)。利用LiveFISH技术, 研究者追踪活细胞中RNA转录的实时动态, 观测到转录产物在转录位置的累积。同时, LiveFISH技术也可以在原代细胞中使用。

4 总结与展望

细胞中的RNA种类繁多, 功能复杂。RNA广泛分布于活细胞内, 可在诸多生命活动过程中产生, 表现出复杂的时空动态。而RNA时空动态的异常改变与疾病的发生发展密切相关。因此, 发展活细胞RNA成像技术, 实时监测RNA在活细胞中各种行为, 如生成、运输、降解等, 有望进一步解析RNA的生物功能, 发现疾病治疗的新靶点。本文总结过去几年中活细胞

RNA动态成像的发展现状, 综述基于RNA结合蛋白-荧光蛋白与基于荧光响应RNA适配体的成像技术, 并讨论其它活细胞RNA成像体系。

基于RNA结合蛋白-荧光蛋白的活细胞RNA成像技术有如下优点。首先, 成像体系完全基因编码, 无需外源添加荧光探针; 其次, 以荧光蛋白作为探针示踪RNA, 亮度普遍高于荧光响应RNA适配体成像体系。然而, 其缺点也十分明显: (i) 荧光蛋白背景高。作为稳定发光的荧光探针, 荧光蛋白在未结合RNA时也稳定产生高亮荧光, 造成背景干扰, 严重影响RNA成像效果。(ii) 荧光蛋白干扰大。荧光蛋白尺寸是小分子探针的50~200倍左右, 并且融合核定位序列, 对目标RNA的空间定位和动力学干扰很大。(iii) 细胞中需要编码荧光蛋白的机制。这要求细胞长时间编码荧光蛋白, 消耗细胞编码蛋白的能量, 增加细胞负担。(iv) 荧光蛋白的成熟过程需要氧气, 不适合应用于厌氧生物内成像。

基于荧光响应RNA适配体的成像技术有如下优点。首先, 相对于荧光蛋白, 小分子探针分子量小, 对目标RNA干扰小; 其次, 小分子探针具备荧光响应能力, 背景噪音相对较低, 信噪比高; 最后, 可以通过添加不同的小分子探针灵活地切换光谱。但是, 仍有许多问题制约着该技术的发展: (i) 亮度较低。虽然很多小分子探针的体外亮度比荧光蛋白高5~10倍, 但是荧光响应RNA适配体: 小分子探针体系在活细胞中亮度相对于荧光蛋白亮度较低。这可能是RNA适配体在活细胞中无法有效激活小分子探针。(ii) RNA结构稳定性需要提升。大多数RNA适配体是在常温 and 试管中筛选得到, 其三维结构在活细胞内复杂的生理环境中可能无法完全复现。同时, 部分RNA适配体热稳定性较弱, 在37℃时无法完全折叠。此外, 部分荧光响应RNA适配体中含有G-四链体等结构, 这可能会募集RNA解旋酶, 降低RNA的稳定性^[104,105]。(iii) 丰度较低。细胞中的RNA半衰期较短, 易被核酸水解酶催化降解, 导致丰度相对较低^[88]。为解决此问题, 研究人员开发Tornado(twister-optimized RNA for durable overexpression)技术以提高RNA在细胞内的丰度^[54]。此外, 由于DNA在细胞内较稳定, 不易被降解, 因此发展基于荧光响应DNA适配体的成像技术, 可能避免核酸水解酶的降解, 提高适配体的丰度^[106]。

在筛选得到RNA适配体的过程中, 大部分筛选过

程在体外进行, 筛选所得的候选序列极少能够应用于活细胞成像. 因此, 需要开发新型SELEX技术, 优化筛选方式, 提高筛选成功率. 目前研究人员已开发在活细胞内进行筛选的CRISmers(CRISPR based aptamers screening system, CRISmers)技术^[107]、利用水凝胶一步法筛选得到适配体的HAS(hydrogel for aptamer selection, HAS)技术^[106,108], 这可能会为新型SELEX技术的开发带来突破.

基于荧光响应RNA适配体: 小分子探针体系中, 小分子探针可通过化学修饰改变自身的光学性质, 拓宽应用范围. 已有研究报道, 具有光切换、光转换性质的荧光蛋白或小分子荧光团可应用于超分辨成像, 在纳米尺度实时高分辨成像, 解析细胞内的显微结构^[11,109]. 然而, 目前基于荧光响应RNA适配体的成像技术缺乏此类小分子探针, 这限制对活细胞内RNA分子精细空间结构的解析.

尽管目前已经发展多种活细胞RNA动态成像技术, 但由于RNA分子本身需要经历复杂的剪接、加工

和转运, 并在细胞内的不同亚细胞定位发挥功能, 因此需要精确的成像技术来研究RNA的动态. 单分子RNA成像技术满足这一需求. 该技术可在活细胞内高信噪比地成像单个RNA分子, 进而研究单个RNA分子的代谢过程, 更深层次理解单分子RNA的活性与功能. 与RNA结合蛋白-荧光蛋白相比, 荧光响应RNA标签的分子量更小, 可以减轻对目标RNA的干扰, 更适用于单分子RNA成像. 目前已开发多种基于荧光响应RNA适配体的单分子mRNA成像技术^[61,110], 能够应用于活细胞内的mRNA成像. 但是, 这些技术尚未应用于实时成像单分子mRNA, 并且, 针对低丰度RNA的单分子成像技术仍然缺乏.

目前, 研究者已开发多种多样的活细胞RNA动态成像技术. 借助这些技术, 人们对RNA生物学有更加深入的了解. 未来, 多种学科的交叉融合, 尤其是RNA生物学、化学生物学、结构生物学、物理科学、信息科学之间的跨学科研究, 将会推动RNA成像技术的发展, 助力RNA复杂功能与调控机制的解析^[111,112].

参考文献

- 1 Yang F, Chen Q, He S, et al. miR-22 is a novel mediator of vascular smooth muscle cell phenotypic modulation and neointima formation. *Circ*, 2018, 137: 1824–1841
- 2 Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet*, 2011, 12: 861–874
- 3 Wang Y, He L, Du Y, et al. The long noncoding RNA lncTCF7 promotes self-renewal of human liver cancer stem cells through activation of wnt signaling. *Cell Stem Cell*, 2015, 16: 413–425
- 4 Zhou Z D, Jankovic J, Ashizawa T, et al. Neurodegenerative diseases associated with non-coding CGG tandem repeat expansions. *Nat Rev Neurol*, 2022, 18: 145–157
- 5 Wang W T, Chen Y Q. Noncoding RNAs regulate protein translation and disease occurrence (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2023, 53: 1527–1545 [王文涛, 陈月琴. 非编码RNA调控蛋白翻译与疾病发生. 中国科学: 生命科学, 2023, 53: 1527–1545]
- 6 Gao C C, Guan M X, He X, et al. Research progress of RNA modification and its association with human diseases (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2023, 53: 1502–1526 [高纯纯, 管敏鑫, 何晓. RNA修饰与人类疾病研究进展. 中国科学: 生命科学, 2023, 53: 1502–1526]
- 7 Shimomura O, Johnson F H, Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol*, 1962, 59: 223–239
- 8 Heim R, Prasher D C, Tsien R Y. Wavelength mutations and posttranslational autooxidation of green fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 12501–12504
- 9 Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 1994, 263: 802–805
- 10 Campbell R E, Tour O, Palmer A E, et al. A monomeric red fluorescent protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 7877–7882
- 11 Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science*, 2006, 313: 1642–1645
- 12 Dickson R M, Cubitt A B, Tsien R Y, et al. On/off blinking and switching behaviour of single molecules of green fluorescent protein. *Nature*, 1997, 388: 355–358
- 13 Larson D R, Zenklusen D, Wu B, et al. Real-time observation of transcription initiation and elongation on an endogenous yeast gene. *Science*, 2011, 332: 475–478

- 14 Schmidt U, Basyuk E, Robert M C, et al. Real-time imaging of cotranscriptional splicing reveals a kinetic model that reduces noise: implications for alternative splicing regulation. *J Cell Biol*, 2011, 193: 819–829
- 15 Halstead J M, Lionnet T, Wilbertz J H, et al. An RNA biosensor for imaging the first round of translation from single cells to living animals. *Science*, 2015, 347: 1367–1671
- 16 Peabody D S. The RNA binding site of bacteriophage MS2 coat protein. *EMBO J*, 1993, 12: 595–600
- 17 Carey J, Cameron V, De Haseth P L, et al. Sequence-specific interaction of R17 coat protein with its ribonucleic acid binding site. *Biochemistry*, 1983, 22: 2601–2610
- 18 Querido E, Chartrand P. Using fluorescent proteins to study mRNA trafficking in living cells. *Methods Cell Biol* 2008, 85: 273–292
- 19 Bertrand E, Chartrand P, Schaefer M, et al. Localization of ASH1 mRNA particles in living yeast. *Mol Cell*, 1998, 2: 437–445
- 20 Fusco D, Accornero N, Lavoie B, et al. Single mRNA molecules demonstrate probabilistic movement in living mammalian cells. *Curr Biol*, 2003, 13: 161–167
- 21 Lee C H, Shin H, Kimble J. Dynamics of Notch-dependent transcriptional bursting in its native context. *Dev Cell*, 2019, 50: 426–435.e4
- 22 Lucas T, Ferraro T, Roelens B, et al. Live imaging of bicoid-dependent transcription in *Drosophila* embryos. *Curr Biol*, 2013, 23: 2135–2139
- 23 Tsuboi T, Viana M P, Xu F, et al. Mitochondrial volume fraction and translation duration impact mitochondrial mRNA localization and protein synthesis. *eLife*, 2020, 9: e57814
- 24 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: 119–121
- 25 Hu Y, Xu J, Gao E, et al. Enhanced single RNA imaging reveals dynamic gene expression in live animals. *eLife*, 2023, 12: e82178
- 26 Olsthoorn R C L, Garde G, Dayhuff T, et al. Nucleotide sequence of a single-stranded RNA phage from *Pseudomonas aeruginosa*: kinship to coliphages and conservation of regulatory RNA structures. *Virology*, 1995, 206: 611–625
- 27 Chattopadhyay S, Garcia-Mena J, Devito J, et al. Bipartite function of a small RNA hairpin in transcription antitermination in bacteriophage lambda. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 4061–4065
- 28 Daigle N, Ellenberg J. λ N-GFP: an RNA reporter system for live-cell imaging. *Nat Methods*, 2007, 4: 633–636
- 29 Chao J A, Patskovsky Y, Almo S C, et al. Structural basis for the coevolution of a viral RNA-protein complex. *Nat Struct Mol Biol*, 2008, 15: 103–105
- 30 Martin R M, Rino J, Carvalho C, et al. Live-cell visualization of pre-mRNA splicing with single-molecule sensitivity. *Cell Rep*, 2013, 4: 1144–1155
- 31 Lenstra T L, Larson D R. Single-molecule mRNA detection in live yeast. *CP Mol Biol*, 2016, 113: 14.24.1
- 32 Abbaszadeh E K, Gavis E R. Fixed and live visualization of RNAs in *Drosophila* oocytes and embryos. *Methods*, 2016, 98: 34–41
- 33 Hees J T, Harbauer A B. Live-cell imaging of RNA transport in axons of cultured primary neurons. *Methods Mol Biol*, 2022, 2431: 225–237
- 34 Yang L Z, Wang Y, Li S Q, et al. Dynamic imaging of RNA in living cells by CRISPR-Cas13 systems. *Mol Cell*, 2019, 76: 981–997
- 35 Wu B, Chen J, Singer R H. Background free imaging of single mRNAs in live cells using split fluorescent proteins. *Sci Rep*, 2014, 4: 3615
- 36 Wu J, Zaccara S, Khuperkar D, et al. Live imaging of mRNA using RNA-stabilized fluorogenic proteins. *Nat Methods*, 2019, 16: 862–865
- 37 Zhang Z, Rong X, Xie T, et al. Fluorogenic CRISPR for genomic DNA imaging. *Nat Commun*, 2024, 15: 934
- 38 Zhou W J, Li H, Zhang K K, et al. Genetically encoded sensor enables endogenous RNA imaging with conformation-switching induced fluorogenic proteins. *J Am Chem Soc*, 2021, 143: 14394–14401
- 39 East-Seletsky A, O'Connell M R, Knight S C, et al. Two distinct RNase activities of CRISPR-C2c2 enable guide-RNA processing and RNA detection. *Nature*, 2016, 538: 270–273
- 40 Abudayyeh O O, Gootenberg J S, Konermann S, et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science*, 2016, 353: aaf5573
- 41 East-Seletsky A, O'Connell M R, Burstein D, et al. RNA targeting by functionally orthogonal type VI-A CRISPR-Cas enzymes. *Mol Cell*, 2017, 66: 373–383
- 42 Abudayyeh O O, Gootenberg J S, Essletzbichler P, et al. RNA targeting with CRISPR-Cas13. *Nature*, 2017, 550: 280–284
- 43 Huang Y, Gao B Q, Meng Q, et al. CRISPR-dCas13-tracing reveals transcriptional memory and limited mRNA export in developing zebrafish embryos. *Genome Biol*, 2023, 24: 15
- 44 Yang L Z, Gao B Q, Huang Y, et al. Multi-color RNA imaging with CRISPR-Cas13b systems in living cells. *Cell Insight*, 2022, 1: 100044

- 45 Romaniuk P J, Lowary P, Wu H N, et al. RNA binding site of R17 coat protein. *Biochemistry*, 1987, 26: 1563–1568
- 46 Wu B, Chao J A, Singer R H. Fluorescence fluctuation spectroscopy enables quantitative imaging of single mRNAs in living cells. *Biophys J*, 2012, 102: 2936–2944
- 47 Park H Y, Lim H, Yoon Y J, et al. Visualization of dynamics of single endogenous mRNA labeled in live mouse. *Science*, 2014, 343: 422–424
- 48 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–E9706
- 49 Coulon A, Ferguson M L, de Turris V, et al. Kinetic competition during the transcription cycle results in stochastic RNA processing. *eLife*, 2014, 3: e03939
- 50 Van Gilst M R, Rees W A, Das A, et al. Complexes of N antitermination protein of phage λ with specific and nonspecific RNA target sites on the nascent transcript. *Biochemistry*, 1997, 36: 1514–1524
- 51 Lange S, Katayama Y, Schmid M, et al. Simultaneous transport of different localized mRNA species revealed by live-cell imaging. *Traffic*, 2008, 9: 1256–1267
- 52 Babendure J R, Adams S R, Tsien R Y. Aptamers switch on fluorescence of triphenylmethane dyes. *J Am Chem Soc*, 2003, 125: 14716–14717
- 53 Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, 1990, 249: 505–510
- 54 Litke J L, Jaffrey S R. Highly efficient expression of circular RNA aptamers in cells using autocatalytic transcripts. *Nat Biotechnol*, 2019, 37: 667–675
- 55 Paige J S, Wu K Y, Jaffrey S R. RNA mimics of green fluorescent protein. *Science*, 2011, 333: 642–646
- 56 Filonov G S, Moon J D, 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: 16299–16308
- 57 Song W, Filonov G S, Kim H, et al. Imaging RNA polymerase III transcription using a photostable RNA-fluorophore complex. *Nat Chem Biol*, 2017, 13: 1187–1194
- 58 Dey S K, Filonov G S, Olarerin-George A O, et al. Repurposing an adenine riboswitch into a fluorogenic imaging and sensing tag. *Nat Chem Biol*, 2022, 18: 180–190
- 59 Chen X, Zhang D, Su N, et al. Visualizing RNA dynamics in live cells with bright and stable fluorescent RNAs. *Nat Biotechnol*, 2019, 37: 1287–1293
- 60 Dolgosheina E V, Jeng S C Y, Panchapakesan S S S, et al. RNA mango aptamer-fluorophore: a bright, high-affinity complex for RNA labeling and tracking. *ACS Chem Biol*, 2014, 9: 2412–2420
- 61 Jiang L, Xie X, Su N, et al. Large Stokes shift fluorescent RNAs for dual-emission fluorescence and bioluminescence imaging in live cells. *Nat Methods*, 2023, 20: 1563–1572
- 62 Wu J, Svensen N, Song W, et al. Self-assembly of intracellular multivalent RNA complexes using dimeric corn and beetroot aptamers. *J Am Chem Soc*, 2022, 144: 5471–5477
- 63 Sunbul M, Jäschke A. Contact-mediated quenching for RNA imaging in bacteria with a fluorophore-binding aptamer. *Angew Chem Int Ed*, 2013, 52: 13401–13404
- 64 Sunbul M, Jäschke A. SRB-2: a promiscuous rainbow aptamer for live-cell RNA imaging. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46: e110
- 65 Sunbul M, Lackner J, Martin A, et al. Super-resolution RNA imaging using a rhodamine-binding aptamer with fast exchange kinetics. *Nat Biotechnol*, 2021, 39: 686–690
- 66 Murata A, Sato S, Kawazoe Y, et al. Small-molecule fluorescent probes for specific RNA targets. *Chem Commun*, 2011, 47: 4712
- 67 Braselmann E, Wierzb A J, Polaski J T, et al. A multicolor riboswitch-based platform for imaging of RNA in live mammalian cells. *Nat Chem Biol*, 2018, 14: 964–971
- 68 Englert D, Burger E M, Grün F, et al. Fast-exchanging spirocyclic rhodamine probes for aptamer-based super-resolution RNA imaging. *Nat Commun*, 2023, 14: 3879
- 69 Zhang J, Wang L, Jäschke A, et al. A color-shifting near-infrared fluorescent aptamer-fluorophore module for live-cell RNA imaging. *Angew Chem Int Ed*, 2021, 60: 21441–21448
- 70 Paige J S, Nguyen-Duc T, Song W, et al. Fluorescence imaging of cellular metabolites with RNA. *Science*, 2012, 335: 1194
- 71 Zhang Y P, Wang Z G, Tian Y F, et al. *In situ* self-assembly of fluorogenic RNA nan zipper enables real-time imaging of single viral mRNA

- translation. [Angew Chem Int Ed](#), 2023, 62: e202217230
- 72 Song W, Strack R L, Svensen N, et al. Plug-and-play fluorophores extend the spectral properties of Spinach. [J Am Chem Soc](#), 2014, 136: 1198–1201
- 73 Li X, Kim H, Litke J L, et al. Fluorophore-promoted RNA folding and photostability enables imaging of single broccoli-tagged mRNAs in live mammalian cells. [Angew Chem Int Ed](#), 2020, 59: 4511–4518
- 74 Li X, Wu J, Jaffrey S R. Engineering fluorophore recycling in a fluorogenic RNA aptamer. [Angew Chem Int Ed](#), 2021, 60: 24153–24161
- 75 Li X, Mo L, Litke J L, 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: 14117–14124
- 76 Wang Z, Luo Y, Xie X, et al. *In situ* spatial complementation of aptamer-mediated recognition enables live-cell imaging of native RNA transcripts in real time. [Angew Chem Int Ed](#), 2018, 57: 972–976
- 77 Wang Q, Xiao F, Su H, et al. Inert Pepper aptamer-mediated endogenous mRNA recognition and imaging in living cells. [Nucleic Acids Res](#), 2022, 50: e84
- 78 Tang H, Peng J, Peng S, et al. Live-cell RNA imaging using the CRISPR-dCas13 system with modified sgRNAs appended with fluorescent RNA aptamers. [Chem Sci](#), 2022, 13: 14032–14040
- 79 Chen Z, Chen W, Reheman Z, et al. Genetically encoded RNA-based sensors with Pepper fluorogenic aptamer. [Nucleic Acids Res](#), 2023, 51: 8322–8336
- 80 Fang M, Li H, Xie X, et al. Imaging intracellular metabolite and protein changes in live mammalian cells with bright fluorescent RNA-based genetically encoded sensors. [Biosens Bioelectron](#), 2023, 235: 115411
- 81 Hall M P, Unch J, Binkowski B F, et al. Engineered luciferase reporter from a deep sea shrimp utilizing a novel imidazopyrazinone substrate. [ACS Chem Biol](#), 2012, 7: 1848–1857
- 82 Autour A, Jeng S, Cawte A D, et al. Fluorogenic RNA Mango aptamers for imaging small non-coding RNAs in mammalian cells. [Nat Commun](#), 2018, 9: 656
- 83 Cawte A D, Unrau P J, Rueda D S. Live cell imaging of single RNA molecules with fluorogenic Mango II arrays. [Nat Commun](#), 2020, 11: 1283
- 84 Esther B, Timothy J S, Kenneth L, et al. Detection and quantification of single mRNA dynamics with the Riboglow fluorescent RNA tag. [bioRxiv](#), 2019, 2019: 701649
- 85 Buler B, Schokolowski J, Benderoth A, et al. Avidity-based bright and photostable light-up aptamers for single-molecule mRNA imaging. [Nat Chem Biol](#), 2023, 19: 478–487
- 86 Terdale S, Tantray A. Spectroscopic study of the dimerization of rhodamine 6G in water and different organic solvents. [J Mol Liquids](#), 2017, 225: 662–671
- 87 Wirth R, Gao P, Nienhaus G U, et al. SiRA: a silicon rhodamine-binding aptamer for live-cell super-resolution RNA imaging. [J Am Chem Soc](#), 2019, 141: 7562–7571
- 88 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: 1863–1872
- 89 Tyagi S, Kramer F R. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. [Nat Biotechnol](#), 1996, 14: 303–308
- 90 Lu S, Hou Y, Zhang X E, et al. Live cell imaging of DNA and RNA with fluorescent signal amplification and background reduction techniques. [Front Cell Dev Biol](#), 2023, 11: 1216232
- 91 Tutucci E, Livingston N M, Singer R H, et al. Imaging mRNA *in vivo*, from birth to death. [Annu Rev Biophys](#), 2018, 47: 85–106
- 92 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
- 93 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: 172–183
- 94 Du J, Dartawan R, Rice W, et al. Fluorescent platforms for RNA chemical biology research. [Genes](#), 2022, 13: 1348
- 95 Klöcker N, Weissenboeck F P, Rentmeister A. Covalent labeling of nucleic acids. [Chem Soc Rev](#), 2020, 49: 8749–8773
- 96 Zhang Y, Kleiner R E. A metabolic engineering approach to incorporate modified pyrimidine nucleosides into cellular RNA. [J Am Chem Soc](#), 2019, 141: 3347–3351
- 97 Wang D, Shalamberidze A, Arguello A E, et al. Live-cell RNA imaging with metabolically incorporated fluorescent nucleosides. [J Am Chem](#)

- Soc, 2022, 144: 14647–14656
- 98 Wang H, Fang B, Peng B, et al. Recent advances in chemical biology of mitochondria targeting. *Front Chem*, 2021, 9: 683220
- 99 Asamitsu S, Bando T, Sugiyama H. Ligand design to acquire specificity to intended G-quadruplex structures. *Chem Eur J*, 2019, 25: 417–430
- 100 Liu Y, Niu J, Wang W, et al. Tracking of mitochondrial endogenous ribonucleic acid in the cancer cells and macrophages using a novel small-molecular fluorescent probe. *Anal Chem*, 2019, 91: 1715–1718
- 101 Qi Y L, Wang H R, Cao Y Y, et al. Progress in small-molecule fluorescent probes for nucleic acids (in Chinese). *Sci Sin Vitae*, 2022, 52: 432–448
- 102 Zhang H, Zhu X, Li H, et al. A RNA-targeted two-photon bioprobe with high selective permeability into nuclear pore complexes for dynamically tracking the autophagy process among multi-organelles. *Anal Chem*, 2019, 91: 14911–14919
- 103 Wang H, Nakamura M, Abbott T R, et al. CRISPR-mediated live imaging of genome editing and transcription. *Science*, 2019, 365: 1301–1305
- 104 Guo J U, Bartel D P. RNA G-quadruplexes are globally unfolded in eukaryotic cells and depleted in bacteria. *Science*, 2016, 353: aaf5371
- 105 Rink M R, Baptista M A P, Flomm F J, et al. Concatemeric Broccoli reduces mRNA stability and induces aggregates. *PLoS One*, 2021, 16: e0244166
- 106 VarnBuhler B S, Moon J, Dey S K, et al. Detection of SARS-CoV-2 RNA using a DNA aptamer mimic of green fluorescent protein. *ACS Chem Biol*, 2022, 17: 840–853
- 107 Zhang J, Zhu A, Mei M, et al. Repurposing CRISPR/Cas to discover SARS-CoV-2 detecting and neutralizing aptamers. *Adv Sci*, 2023, 10: 2300656
- 108 Singh N K, Wang Y, Wen C, et al. High-affinity one-step aptamer selection using a non-fouling porous hydrogel. *Nat Biotechnol*, 2023, doi: 10.1038/s41587-023-01973-8
- 109 Bates M, Huang B, Dempsey G T, et al. Multicolor super-resolution imaging with photo-switchable fluorescent probes. *Science*, 2007, 317: 1749–1753
- 110 Chen W, Zhao X, Yang N, et al. Single mRNA imaging with fluorogenic RNA aptamers and small-molecule fluorophores. *Angew Chem Int Ed*, 2023, 62: e202209813
- 111 Chen Z, Duan H, Li X. *In vivo* single-molecule RNA structural profiling. *Trends Biochem Sci*, 2023, 48: 211–212
- 112 Xu B, Zhu Y, Cao C, et al. Recent advances in RNA structure. *Sci China Life Sci*, 2022, 65: 1285–1324

Progress in RNA dynamic imaging technology in live cells

GAO WanKai^{1,2}, CHEN ZhenYin^{1,2}, RONG XiaoXiao¹ & LI Xing^{1,2}

¹ Beijing Institutes of Life Science, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

² University of Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100049 China

As the party of “central dogma”, RNA plays a crucial role in various cellular activities. The subcellular RNA localization and dynamic processes in living cells are closely related to RNA function. Therefore, it is desirable to develop RNA imaging biotechnology to track spatiotemporally RNA in live cells, enable us to understand RNA activity and function in situ, and further reveal the relationship between RNA-related life course and diseases. This review mainly focuses on two major live cell RNA imaging tools, (i) RNA hairpin: fluorescent protein system, and (ii) fluorogenic RNA aptamer: small molecule fluorophore system. In addition, we briefly introduce other RNA imaging tools. Furthermore, this review outlines the characteristics and issues of different systems in tracking RNA, discusses the future directions for the development of RNA dynamic imaging tools.

live-cellular RNA imaging, fluorescent proteins, RNA aptamers, small molecule fluorogenic probes

doi: [10.1360/SSV-2024-0001](https://doi.org/10.1360/SSV-2024-0001)