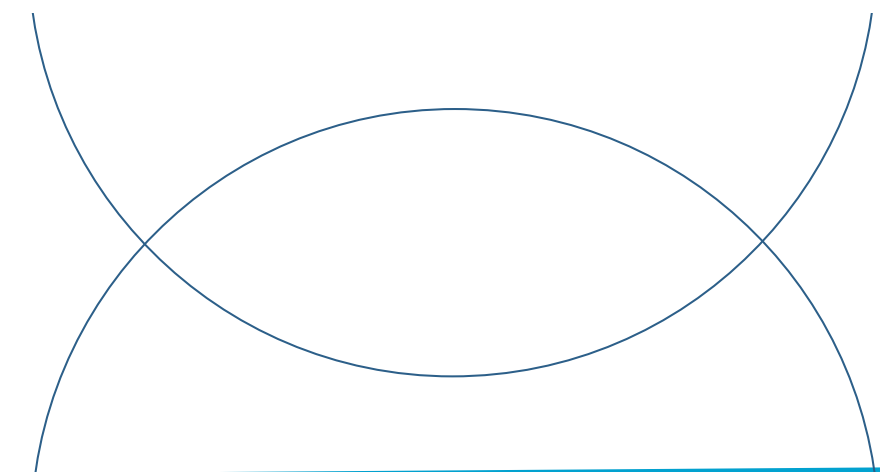




RNA原位可視化CRISPR 激活神經元大麻素受體過度表達的效果



CRISPR-Cas9系統除了可以對基因組進行精確的定位和切割，還衍生出了諸多變體，實現精確識別基因組序列從而對其進行激活、抑制、定位或招募其他相關因子幫助進行下游其他生物活動等。例如，將改造後失去DNA切割活性的dCas9與轉錄激活相關因子結合，結合gRNA對基因進行精確定位，從而實現特定內源基因的增強表現。2020年9月，來自瑞典隆德大學的科學家們使用CRISPR-Cas9的方法，借助AAV雙載體系統，實現了對小鼠腦內內源性大麻素受體1（CB1 receptor）的增強表現。



Development and Validation of CRISPR Activator Systems for Overexpression of CB1 Receptors in Neurons

 Valentina Di Maria¹,  Marine Moindrot¹,  Martin Ryde¹,  Antonino Bono¹,  Luis Quintino² and  Marco Ledri^{1*}

¹Laboratory of Molecular Neurophysiology and Epilepsy, Department of Clinical Sciences, Epilepsy Center, Lund University, Lund, Sweden

²Laboratory of CNS Gene Therapy, Department of Experimental Medical Sciences, Lund University, Lund, Sweden



該研究團隊測試了慢病毒和腺相關病毒兩種不同系統在離體(ex vivo)培養細胞及小鼠在體(in vivo)實驗中，激活大麻素受體（CB1 receptor）的表現。實驗顯示慢病毒系統在小鼠in vivo實驗中無法有效增強內源大麻素受體表現，因此該研究團隊測試了腺相關病毒（AAV）系統。考慮到AAV裝載的限制，該研究採用了AAV雙載體系統，分別在ex vivo原代神經元及小鼠腦內進行了體外和體內的實驗，檢測SadCas9-VPR對於內源性大麻素受體表現的作用。

在小鼠in vivo實驗中，該研究重點檢測海馬區SaCas9和gRNA的報告基因GFP的mRNA表現量及共定位情況。由於缺乏原位檢測SaCas9的有效抗體，因此該科研團隊在小鼠腦切片中選擇使用RNA-scope技術，對SaCas9、GFP mRNA及大麻素受體mRNA進行原位檢測。如圖2顯示小鼠海馬中SaCas9和GFP的mRNA（黃色訊號點為SaCas9的RNA訊號點，而藍色訊號點為GFP的RNA訊號點），分別代表了AAV雙載體系統中2個不同AAV的轉錄情況，即AAV裝載SaCas9，以及AAV裝載gRNA（GFP作為報告基因）。結果顯示，在小鼠的海馬區大部分細胞內，都能看到2個載體的RNA訊號（DG為 $97.5 \pm 2.1\%$ ，CA1為 $98.2 \pm 1.8\%$ ，CA3為 $97.9 \pm 2.1\%$ ），說明AAV雙載體系統能夠達到較高的共感染率，為後續Cas9實現在gRNA引導下的定位等功能打下良好基礎。



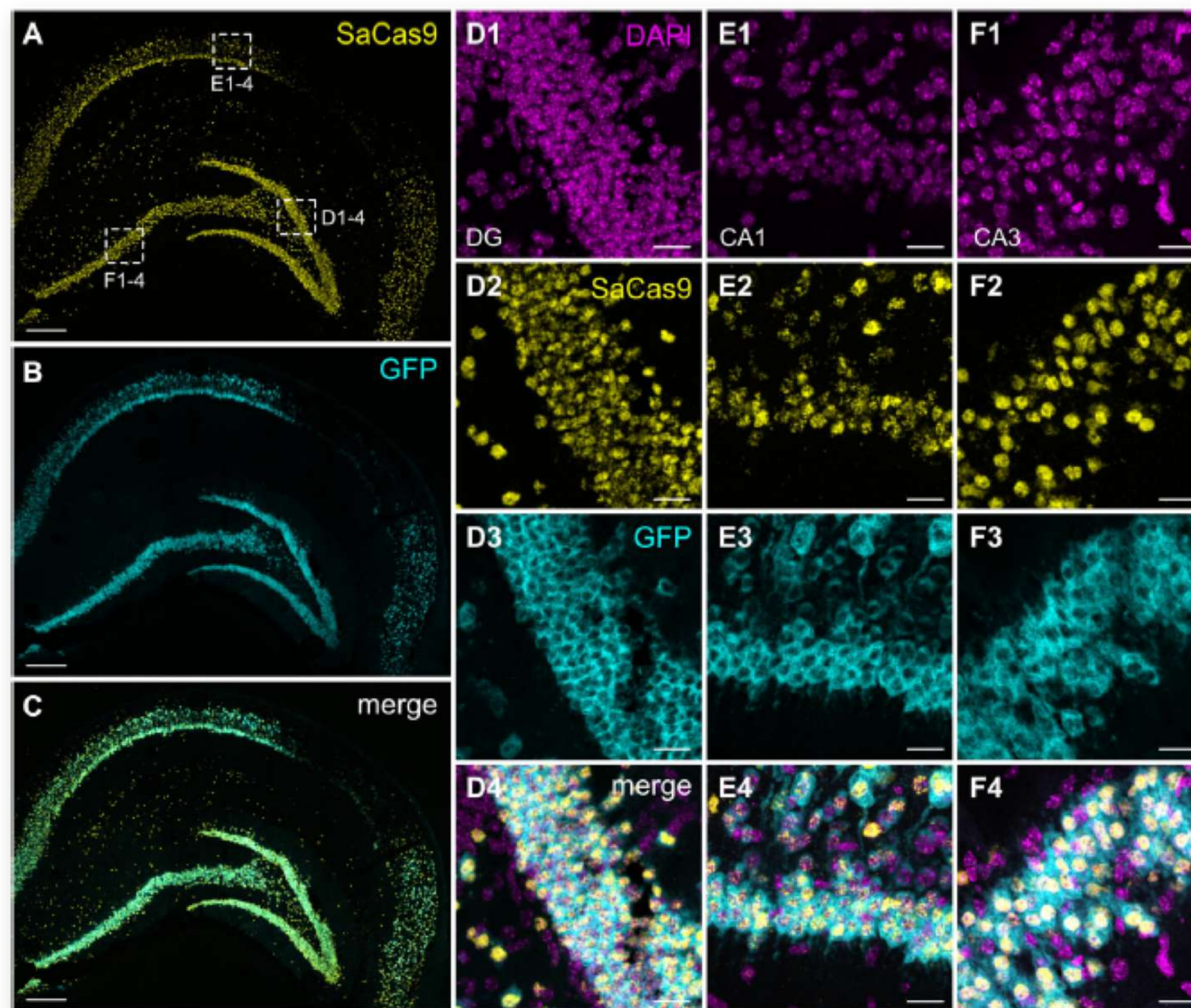


圖 2.
SaCas9和GFP mRNA在
小鼠海馬中的表達。

隨後，該研究團隊對小鼠大腦內海馬區的大麻素受體的RNA表現進行了RNAscope原位檢測，檢測結果顯示，在海馬DG區的顆粒細胞中，大麻素受體的mRNA表現量很低（圖3中的黃色訊號點）。但使用AAV雙載體系統對其轉錄進行激活後，大麻素受體的mRNA表現量增多。而在CA1和CA3區域，Cnr1mRNA表現量較高，CA3區域內，激活後，mRNA的表現量僅有小幅度增多（圖3）。



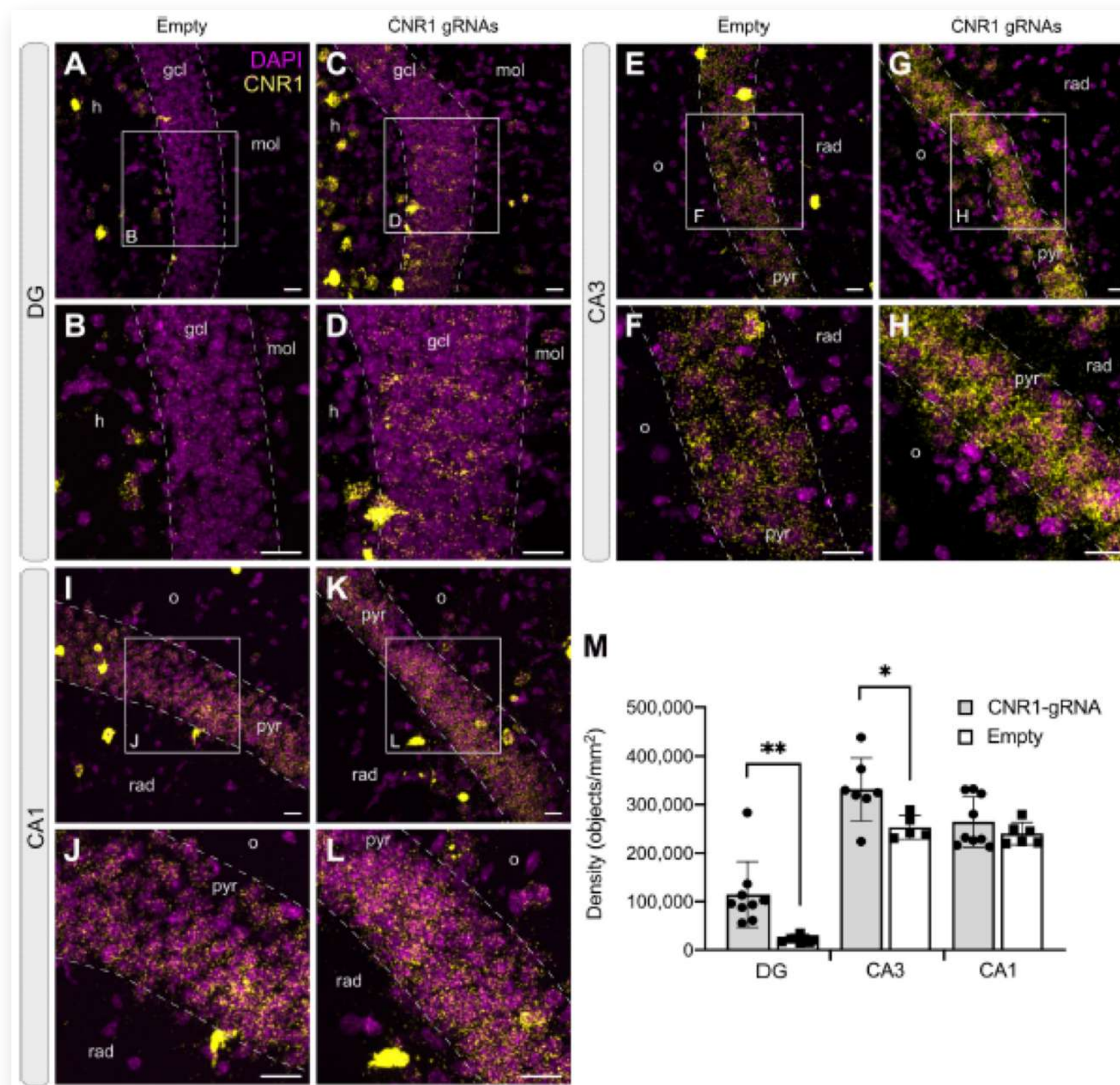
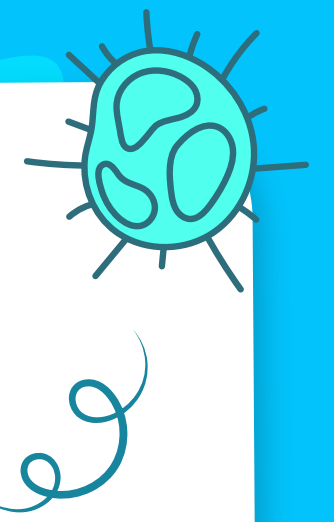


圖3.
小鼠大腦海馬各個區域中
Cnr1（大麻素受體）
mRNA的表達（圖中黃色
訊號點）。
Empty為無gRNA對照組，
CNR1 gRNA為有gRNA的
實驗組。





在本研究中，RNAscope技術幫助該研究團隊在小鼠腦片中對SaCas9及其他報告基因、靶標基因等進行單細胞層面的原位標記，從而對所開發的AAV雙載體系統的生物學效果進行高分辨率的評估，證實了AAV雙載體系統在小鼠活體實驗中的可行性，為日後其他生物學工具的開發及藥物靶點的操控提供了有效的工具。

RNAscope®技術是由Bio-Techne旗下Advanced Cell Diagnostics (ACD)公司研發的RNA原位雜交產品，在近年來的生物檢測領域發展迅速。與傳統的RNA原位雜交相比，RNAscope技術屬於新一代RNA原位雜交技術，其特異性的雙Z探針設計避免了傳統長鏈RNA探針的弊端，配以自身級聯放大檢測原理，可以高效敏感地檢測到目標RNA。該方法的具體優勢如下：



- 1/ 應用廣泛:使用RNAscope®技術，目標RNA為大於等於300個鹼基的特異序列，即可進行探針設計。因而RNAscope®技術可以應用於幾乎所有物種，所有組織以及所有基因的檢測。
- 2/ 特異性強：RNAscope®獨特的雙Z（ZZ）探針設計有效的防止了探針的非特異性結合，同時降低了背景干擾。由於結合在非特異性位點的單個的Z 探針不會產生完整的訊號放大分子結合位點，並會在雜交過程中被洗脫洗掉，從而防止非特異性訊號的放大，使得探針的訊號具有高度特異性。探針設計合成需要4週時間即可完成。
所有物種，所有組織以及所有基因的檢測。

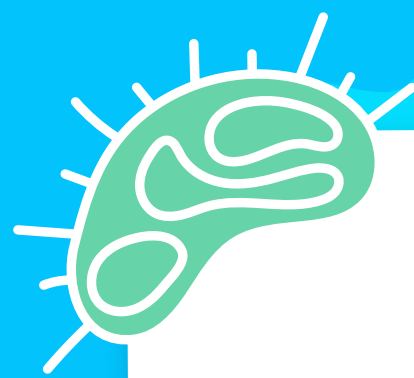




3/ 靈敏度高：RNAscope®方法檢測每個RNA分子時，只需三對雙Z（ZZ）探針即可完成雜交和訊號的可視化。所有物種，所有組織以及所有基因的檢測。

4/ 單分子檢測和單細胞定量：使用RNAscope®技術雜交上三對及以上雙Z 探針即可在標準的顯微鏡下呈現可觀察到的點狀訊號。ACD公司提供的分析軟件更可以定量每一個單細胞內RNA的表達量。所有物種，所有組織以及所有基因的檢測。





5/ 兼容降解的RNA:由於RNAscope®三對雙Z探針即可檢測到目標RNA，而通常針對目標RNA設計的探針為20對雙Z探針，因而即使目標RNA發生部分降解，仍可以穩定有效地檢測到目標RNA。

6/ 檢測結果穩定一致性：RNAscope®技術用到的探針以及所有檢測試劑全部由工業化合成，且該技術針對不同樣本類型（冰凍切片，石蠟切片，懸浮細胞，貼壁細胞等）已經有成熟的實驗操作流程，故使得RNAscope®技術檢測結果具有穩定性和一致性。

多通道多靶點同時檢測：由於RNAscope技術可以同時進行多通道探針雜交以及訊號放大，故在可見光檢測中可以在同一張切片上同時檢測兩個靶點；而在熒光檢測過程中，可以在同一張切片上檢測三個或三個以上靶點RNA。



References :

Front Mol Neurosci. 2020 Sep 8;13:168. doi: 10.3389/fn-mol.2020.00168. eCollection 2020. Development and Validation of CRISPR Activator Systems for Overexpression of CB1 Receptors in Neurons

