

CRISPR/dCas9 系统在活细胞成像领域的研究进展

林斯雨¹, 钟星², 马立新¹, 乔洁¹, 刘奕¹

1 湖北大学 生命科学学院 省部共建生物催化与酶工程国家重点实验室, 湖北 武汉 430062

2 湖北大学 知行学院, 湖北 武汉 430011

林斯雨, 钟星, 马立新, 等. CRISPR/dCas9 系统在活细胞成像领域的研究进展. 生物工程学报, 2021, 37(9): 3061-3070.

Lin SY, Zhong X, Ma LX, et al. Advances of CRISPR/dCas9 system in live cell imaging. Chin J Biotech, 2021, 37(9): 3061-3070.

摘 要: 研究不同基因、染色体以及基因与染色体之间的时空关系在遗传学、发育生物学和生物医学等领域具有重要意义。CRISPR/Cas9 基因编辑技术具有优异的靶向性, 已经成为应用最广泛的基因编辑工具。近年来, 研究人员基于 Cas9 的核酸酶失活突变体 dCas9 发展了一系列先进的活细胞成像技术, 为染色质、基因组特定位点的高分辨成像提供了快速、方便的研究工具。文中从细胞递送方式、荧光信号优化以及正交多色成像 3 个方面对 CRISPR/dCas9 系统在活细胞成像中的研究进展进行了综述, 并对该领域的发展趋势进行了展望。

关键词: 基因编辑, CRISPR/dCas9, 基因组成像, 染色体成像

Advances of CRISPR/dCas9 system in live cell imaging

Siyu Lin¹, Xing Zhong², Lixin Ma¹, Jie Qiao¹, and Yi Liu¹

1 State Key Laboratory of Biocatalysis and Enzyme Engineering, School of Life Sciences, Hubei University, Wuhan 430062, Hubei, China

2 Zhixing College, Hubei University, Wuhan 430011, Hubei, China

Abstract: The study of distinct genes, chromosomes and the spatio-temporal relationships between them is of great significance in genetics, developmental biology and biomedicine. CRISPR/Cas9 has become the most widely used gene editing tool due to its excellent targeting ability. Recently, researchers have developed a series of advanced live cell imaging techniques based on the nuclease-inactivated mutant of Cas9 (dCas9), providing rapid and convenient tools for high-resolution imaging of specific sites in the chromatin and genome. This review summarizes the advances of CRISPR/dCas9 system in live cell imaging from three aspects, including the strategies of cell delivery, optimization of the fluorescence signals, as well as orthogonal and multicolor imaging. Furthermore, we shed light on the development trends and prospects of this field.

Keywords: gene editing, CRISPR/dCas9, genome imaging, chromosome imaging

Received: October 28, 2020; **Accepted:** February 18, 2021

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 21907027, 22007030), China Postdoctoral Science Foundation (No. 2019M662573), Natural Science Foundation of Hubei Province, China (No. 2020CFB253).

Corresponding authors: Jie Qiao. Tel: +86-27-88661237-6349; E-mail: jieqiao@hubu.edu.cn

Yi Liu. Tel: +86-27-88661237-6349; E-mail: yiliu0825@hubu.edu.cn

国家自然科学基金 (Nos. 21907027, 22007030), 中国博士后科学基金 (No. 2019M662573), 湖北省自然科学基金 (No. 2020CFB253) 资助。

网络出版时间: 2021-03-11

网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20210310.1116.004.html>

CRISPR/Cas (Clustered regulatory interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated system) 系统是细菌和古菌在长期演化过程中形成的一种适应性免疫防御系统, 可用来对抗入侵的病毒及外源 DNA^[1-3]。该系统由 Cas 核酸蛋白酶以及单引导 RNA (Single guide RNA, sgRNA) 结合形成核酸蛋白复合物 (Ribonucleoprotein, RNP), 然后靶向切割原核或真核生物的基因组^[4]。近年来, 以 CRISPR/Cas9 为代表的新一代基因编辑技术已经成功应用于生物学的各个领域。此外, 研究人员还基于 Cas9 的核酸酶失活突变体 dCas9 (Nuclease-deficient Cas9) 发展了一系列生物成像技术, 为研究染色质活性、生理机能以及疾病发生机制之间的关系提供了有效的研究工具^[5-6]。本文对 CRISPR/dCas9 系统和活细胞成像技术进行简介, 并从细胞递送方式、荧光信号优化以及正交多色成像 3 个方面综述了 CRISPR/dCas9 系统在活细胞成像上的最新研究进展, 以期为该领域的发展方向提供参考意见。

1 CRISPR/dCas9 系统

以化脓性链球菌 *Streptococcus pyogenes*

来源的 Cas9 (spCas9) 为代表的 CRISPR 家族蛋白已经广泛应用于遗传育种^[7-8]和生物医学^[9-11]等领域。通过 sgRNA 与基因序列的特异性结合, Cas9 可在特定的基因位点完成切割, 造成 DNA 双链的断裂。Cas9 核酸内切酶的活性依赖于 HNH 与 RuvC 结构域, 其中 HNH 结构域负责切割与 sgRNA 互补的靶标 DNA 单链 (Target DNA strand, tDNA)^[12], 而 RuvC 结构域介导非靶标 DNA 链 (Non-target DNA strand, ntDNA) 的切割^[13]。如图 1 所示, 通过突变 Cas9 第 10 位的天冬氨酸 (Asp) 与第 840 位的组氨酸 (His), 可获得核酸酶失活的突变体 dCas9 (D10A/H840A)^[14-15]。该突变体不具有切割 DNA 的能力, 但保留了结合目标基因序列的功能。研究者基于 CRISPR/dCas9 系统开发了一系列基因组标记和成像工具, 实现了对细胞内基因组特定定位点的高分辨成像^[6,16-18]。

2 染色体成像技术

染色质是基因组的基本调节单元。在细胞核的三维空间范围内, 染色质的进一步包装可以直接影响基因的活性。因此, 研究染色质在时空上的动态变化对理解基因组功能非常重要^[19]。标记

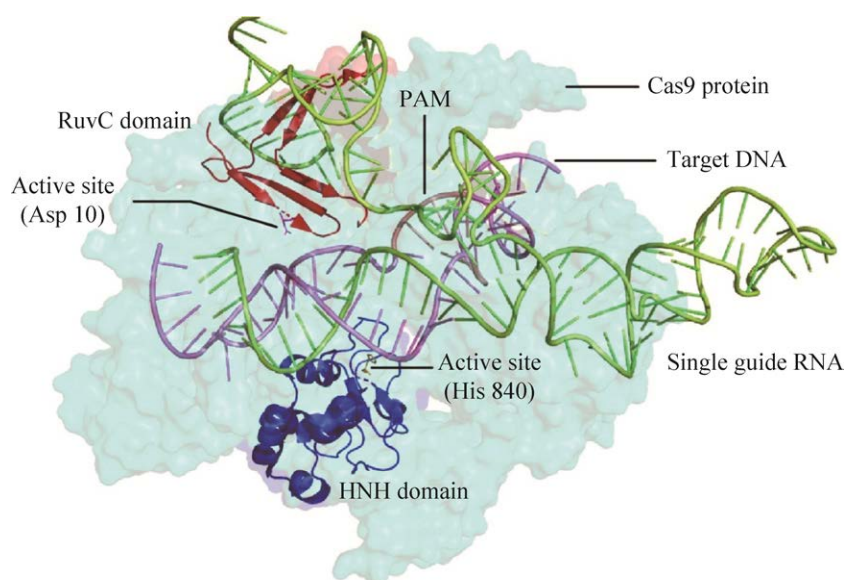


图 1 Cas9/sgRNA 蛋白复合物与靶 DNA 结合的三维结构示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the three-dimensional structure of Cas9/sgRNA protein complex binding to the target DNA.

基因组的特定序列,然后用显微镜直接观察细胞核内基因组的结构和动态变化是一种经典的染色体成像方法,例如荧光原位杂交 (Fluorescent in situ hybridization, FISH) 技术是目前绘制基因图谱^[20-23]和医学遗传诊断^[24]的常用手段。FISH 要求将 dsDNA 部分解链,然后解链的 DNA 与外源荧光探针通过碱基互补配对形成杂交链。因此,用于 FISH 的生物材料往往需要经过筛选、固定化等苛刻的处理步骤,极大地限制了该技术在活细胞成像上的应用^[25-26]。利用 DNA 操纵子/结合蛋白标记系统,如 Lac O/阻遏蛋白标记系统,可直接观察活细胞染色质的结构和动力学变化^[27],但该方法依赖于人工插入外源的重复基因序列,无法用于基因组内源性序列的标记。因此,开发更有效的活细胞染色体成像工具十分必要。

3 CRISPR/dCas9 活细胞成像技术

2013 年,Chen 等首次将 CRISPR/dCas9 系统应用于活细胞成像^[28]。研究者首先将 dCas9 和荧光蛋白的编码基因整合入人源细胞的基因组,构建了 dCas9-荧光蛋白融合表达的细胞系;然后将 sgRNA 的转录质粒转染至上述细胞,实现了对染色体基因组序列的定位成像。最近,基于 CRISPR/dCas9 系统的活细胞成像技术的不断发展,如利用相关成像工具对染色体端粒和等位基因的动态变化机制进行了深入研究^[17]。

活细胞成像技术通常需要提供适合细胞生长与动力学研究的环境,维持较高的荧光信号信噪比。CRISPR/dCas9 活细胞成像技术的基本原理是将 dCas9 与荧光基团偶联,在细胞核定位序列 (Nuclear localization sequence, NLS) 的引导下穿过细胞器膜,特异性地标记染色体基因序列。本文将从递送方式、信号优化以及多色成像 3 个方面综述 CRISPR/dCas9 系统在活细胞成像领域的研究进展。

3.1 CRISPR/dCas9 的递送方式

用于生物成像所用的细胞材料一般不具备编码 CRISPR/dCas9 系统的功能。因此,如何将 dCas9 蛋白与 sgRNA 成功地递送入细胞或在细胞中表达成为影响成像效果的关键因素。如图 2 所示,主要有 3 种方式在细胞内产生用于活细胞成像的 dCas9/sgRNA 复合物,即胞内稳定表达、胞内瞬时表达和体外组装 RNP。

3.1.1 基于胞内稳定表达的递送方式

首先,研究者通过慢病毒感染的方式将 dCas9 和荧光蛋白的编码序列整合入细胞的基因组。然后,利用选择性标记筛选获得稳定表达 dCas9 融合荧光蛋白的细胞系。接着,将 sgRNA 转录质粒导入上述细胞系,实现对染色体基因组特定序列的定位成像^[29]。Duan 等利用胞内稳定表达的 dCas9-EGFP 标记小鼠染色体端粒等内源性高度重复序列,用于观察多种组织细胞中的基因组动态变化^[30]。该方法的优势在于细胞系中的每一个细胞均表达融合蛋白,可提供均一的荧光强度。此外,通过外源导入质粒的方式可同时转录多条针对内源性非重复基因序列的 sgRNA^[30-31],适用于长期追踪基因组上的目标序列,以及研究固定模型下基因序列空间位置的动态变化。但是,该方法的成像效果会受到病毒质粒转染水平和 sgRNA 转录水平的限制。例如,sgRNA 的不足会造成 dCas9-融合荧光蛋白在细胞内呈现弥散分布状态,造成强荧光背景或聚集成荧光灶,阻碍目标位置荧光信号的分辨^[32]。

3.1.2 基于胞内瞬时表达的递送方式

通过电转或化学试剂转染等方式,可将 dCas9 融合荧光蛋白的表达质粒和 sgRNA 的转录质粒导入细胞中,实现细胞内 dCas9/sgRNA 复合物的高水平瞬时表达。Anton 等通过共转染融合了 GFP 标签的 dCas9 表达质粒与 sgRNA 转录质粒,成功实现了对小鼠胚胎干细胞的端粒 (Telomeres, Tel) 重复序列、主要卫星 (Major

satellite, MaS) 和次要卫星 (Minor Satellite, Mis) 重复序列等内源基因的标记^[33]。采用胞内瞬时表达方式产生的蛋白表达水平依赖于质粒转染量、启动子强度与表达时间等因素,不同细胞之间的表达水平差异较大。通过优化实验条件可获得合适的融合蛋白表达量,减少因融合蛋白过度表达或 sgRNA 转录水平不足造成的荧光背景。

3.1.3 基于体外组装 RNP 复合物的递送方式

研究表明,未与 Cas9 蛋白和目标 DNA 形成三元复合物的 sgRNA 在胞内非常容易降解^[34]。在体外,孵育重组表达的 dCas9、合成或体外转录制备的 sgRNA,可制备完整组装的 dCas9/sgRNA 复合物。Zhang 等将 RNP 复合物递送入细胞,发现可显著缩短形成三元复合物所需的时间^[35],具有开发快速成像工具的潜力。该方法的另一大优势是能够对 sgRNA 方便地进行化学修饰。Wang 等在 sgRNA 的 5'端标记荧光素,并与等量的 dCas9 蛋白孵育以制备荧光核糖核蛋白复

合物 (Fluorescent ribonucleoproteins, fRNPs),发展了名为 CRISPR LiveFISH 的成像技术^[36]。此时,没有和 dCas9 结合的 sgRNA 会被降解,从而极大地降低了背景荧光,实现了对活细胞内源性基因时空变化的动态监测。

由于 dCas9 体积较大,将大量的 RNP 复合物递送入细胞仍极具挑战^[32]。除了常规的电穿孔(电转)方式以外,研究人员相继报道了膜变形^[37]、金纳米组装体^[38]及壳聚糖纳米粒子包裹^[39]等递送方法,未来有望更好地用于 RNP 的活细胞成像。采用直接递送 RNP 进行活细胞成像的关键在于获得高纯度、高活性的核酸蛋白复合物。近期,笔者课题组建立了“一步法”制备 Cas9 RNP 的方法,将含有 Cas9 蛋白表达元件和 sgRNA 转录元件的质粒转入大肠杆菌中自组装形成 RNP 复合物,利用 IM7/CL7 强相互作用系统进行蛋白纯化,可快速获取具有超高稳定性的 RNP 复合物,有望实现 RNP 活细胞成像工具的大规模、低成本制备^[40]。

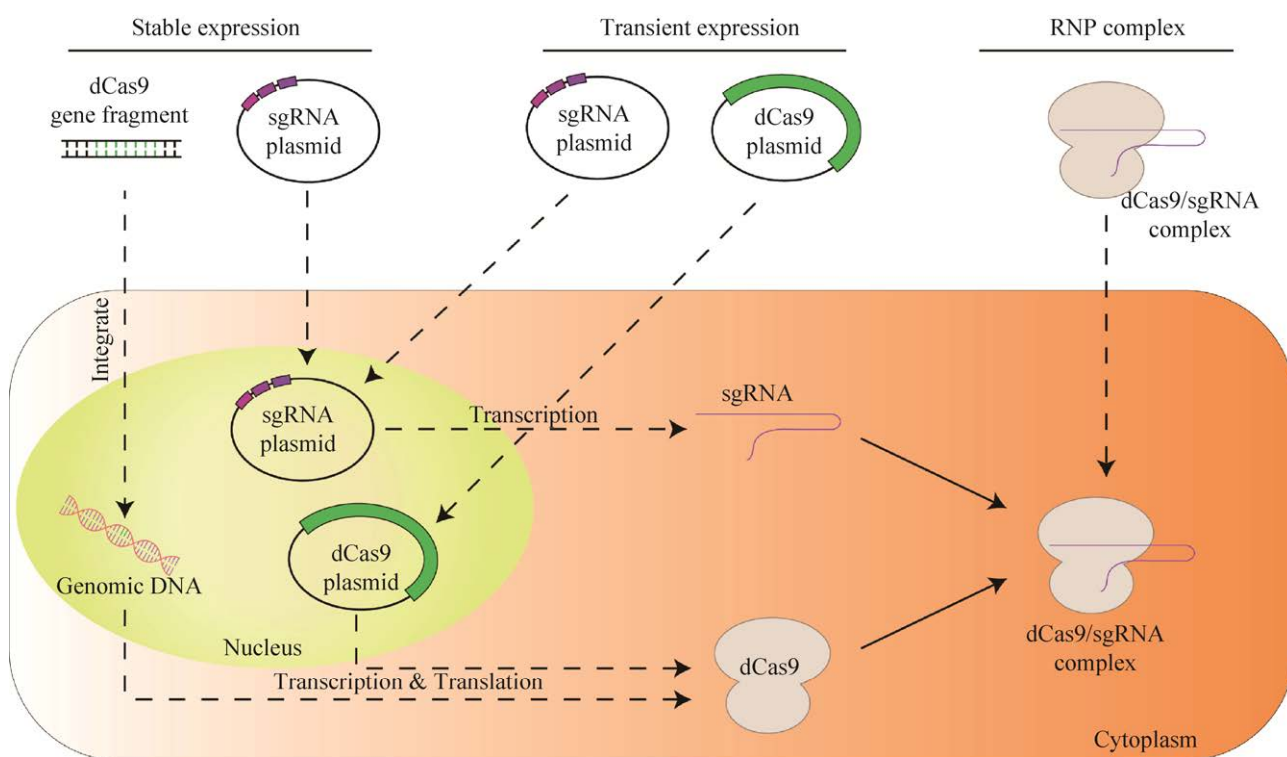


图 2 三种 CRISPR/dCas9 系统的递送方式

Fig. 2 Three strategies for delivering CRISPR/dCas9 system.

3.2 荧光信号优化

用于活细胞成像的荧光信号通常来自荧光素或荧光蛋白,需要在适宜的细胞环境下具有可被检测的荧光亮度与荧光稳定性。一般而言,单个荧光标签能提供的荧光信号有限。为了能清晰地分辨目标基因,研究人员陆续开发出多种基于 RNA 或蛋白支架的方法来富集荧光信号和提高信噪比。

3.2.1 RNA 支架

2016 年,多篇以 CRISPR/dCas9 系统为基础的活细胞成像工作采用了 RNA 支架偶联荧光蛋白的优化方法^[32,41-43],即利用 RNA 茎环重复序列与对应蛋白特异性结合的特性,将荧光蛋白与 RNA 关联,例如,MS2-MCP、PP7-PCP 等系统的应用。图 3A 展示了 MS2-MCP 系统的设计思路:在 sgRNA 的 3'端加入 MS2 茎环重复序列以构建 RNA 支架,可招募多个与荧光蛋白融合的 MCP 蛋白 (MS2 coat protein),实现荧光信号的富集。Shao 等对 RNA 茎环重复序列的插入位置以及茎环序列进行了研究,避免茎环支架的插入影响 dCas9/sgRNA 复合物与目标位点结合^[42]。后来, Qin 等^[44]设计了整合 16 个 MS2 的 sgRNA,减少针对内源性非重复基因组成像时 sgRNA 的设计和使用数量。此外, Cheng 等则开发了可串

联多达 25 拷贝的直链 RNA 支架的 Casilio 系统^[45]。

如图 3B 所示,融合荧光蛋白的 PUF 蛋白与 PBS (PUF-binding site) 序列结合,能够对端粒和着丝粒等基因组位点进行选择性标记。与环状的茎环支架相比,一单位 dCas9/sgRNA 直链支架复合物可招募更多的荧光蛋白。此外,直链 RNA 更容易被转录,并与 dCas9 形成 RNP 复合物。通过更改仅有 8-mer 大小的 PBS 碱基序列,可形成 4 种正交的 PUF 蛋白-PBS 结合对,为后续多色成像工具的开发奠定了基础。

3.2.2 蛋白支架

提高荧光信号的信噪比的常见方式包括增强目标位点的荧光信号,或者降低体系的荧光背景。前者一般通过富集更多的荧光蛋白得以实现。例如,一单位 dCas9 蛋白可被多个荧光蛋白标记,在提高荧光强度的同时还可减少 sgRNA 的使用种类,增加了 CRISPR/dCas9 系统标记的灵活性^[46]。但是,受重组蛋白在细胞内表达量的影响,融合表达多拷贝荧光蛋白标签具有一定的难度,因此串联标签一般选择小分子多肽^[47-48]。如图 4 所示, Tanenbaum 等^[47]开发了 Suntag 系统:在 dCas9 蛋白的 C 端融合了 24 拷贝的抗原决定簇 (短肽),然后共表达与抗原决定簇特异性结合的抗体-GFP 融合蛋白,利用抗原-抗体的特异性结合间接

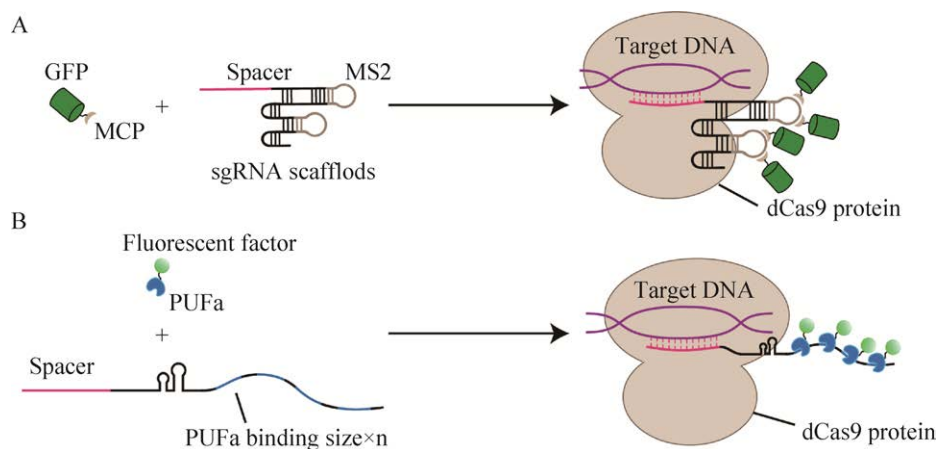


图 3 构建 sgRNA 茎环支架^[42] (A) 或直链支架^[45] (B) 用于增强荧光信号

Fig. 3 Construction of sgRNA stem-loop scaffold (A)^[42] or linear scaffold (B)^[45] to enhance the fluorescence signal.

实现多拷贝 GFP 蛋白的标记。相比于 dCas9 融合单拷贝 GFP, Suntag 系统的信噪比有 5.5 倍的提高。降低成像体系的荧光背景要求荧光来源物在非成像位置显现出较低的荧光信号。例如,将完整的荧光蛋白一分为二,当两个基团独立存在时不发荧光,只有互补重组后才能恢复荧光,称为自补体分裂荧光蛋白 (Split fluorescence protein, FP)^[49]。如图 5A、B 所示,将 GFP 在第 10 和第 11 个 β -折叠片处进行分割,可得到分裂的荧光蛋白元件 FP1-10 以及 FP11。dCas9 蛋白融合多个 FP11 标签,可招募多个 FP1-10 片段,在

靶位点处产生高荧光信号^[50]。基于上述原理, Hong 等将分裂荧光蛋白与 Suntag 系统和 sgRNA 支架关联,开发了一种名为双分子荧光互补的技术 (Bimolecular fluorescent complimentary, BiFC)^[51]。如图 5C 所示, dCas9 融合 Suntag 系统招募分裂黄色荧光蛋白 Venus 的 N 端区域, sgRNA 支架招募 C 端区域。近距离的富集使分裂荧光蛋白自发组装成具有完整功能的荧光蛋白。使用该方法,游离的分裂荧光蛋白没有荧光信号,从而极大地降低了背景荧光,并提高了信噪比,实现了对端粒和 *MUC4e* 基因座的高分辨活细胞成像。

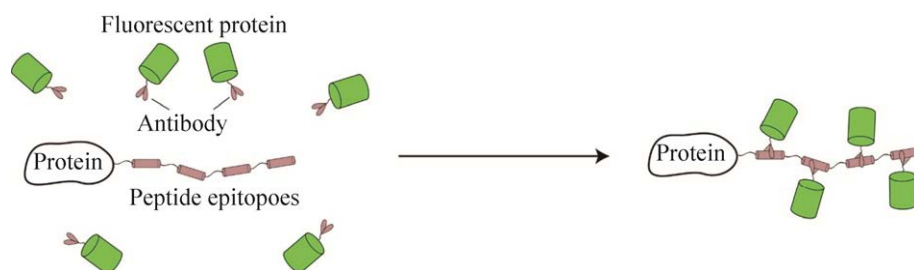


图 4 Suntag 蛋白支架示意图^[47]

Fig. 4 Schematic diagram of Suntag protein scaffold^[47].

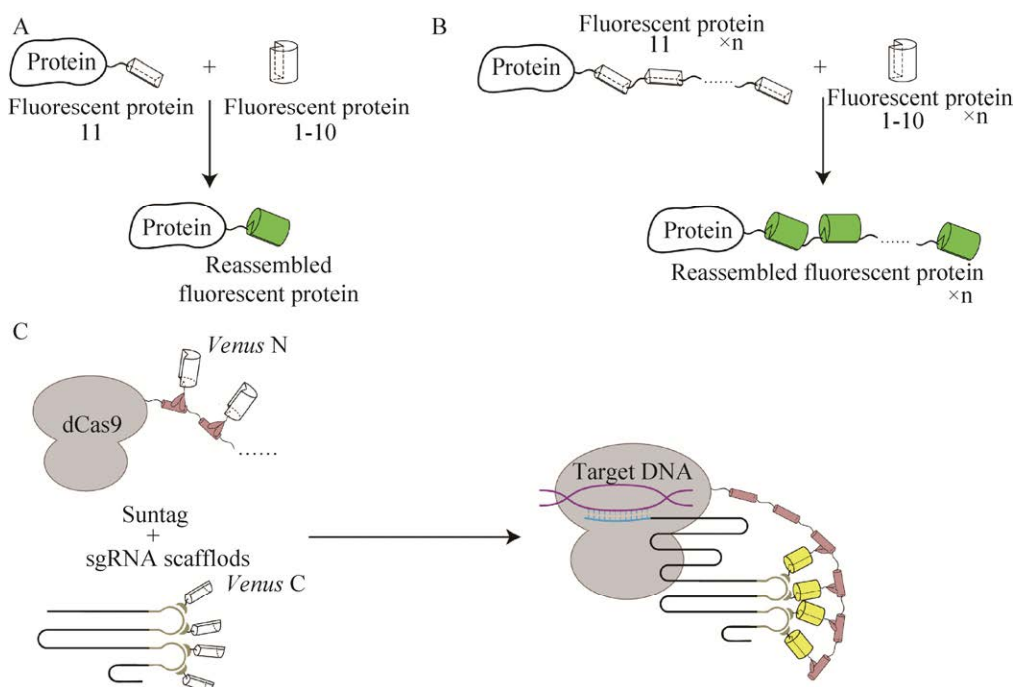


图 5 自补体分裂荧光蛋白 (A、B)^[50]与双分子荧光互补技术 (C)^[51] 示意图

Fig. 5 Schematic of the split fluorescence protein (A, B)^[50] and BiFC (C)^[51].

3.3 正交多色成像

活细胞内同时追踪两个或以上基因的动态变化, 需要将不同基因的“定位”与“颜色”一一对应。在不改动目标基因拷贝数的情况下, 对细胞内基因多色、多点同时追踪的关键在于使用正交系统, 即利用正交对互不干扰的特性, 分别标记不同颜色的荧光因子, 以达到在细胞内同步成像多基因位点的目的。如利用化脓性链球菌 *Streptococcus pyogenes* (Sp)、脑膜炎双球菌 *Neisseria meningitidis* (Nm)、嗜热链球菌 *Streptococcus thermophilus* (St1) 和金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus* (Sa) 等不同种属来源的 Cas9 蛋白具有不同 PAM 识别位点和互不干扰的特性, 相互间作为正交对蛋白, 实现对活细胞内多条染色体重复序列的多色成像^[46,52]。除 SpCas9 蛋白外, 其他来源的 dCas9 蛋白对 PAM 位点的要求较为严苛, 目标基因序列的选择有限。因此, 更多的研究将目光投向荧光信号分子与 sgRNA 的关联。如前文所述的 CRISPR LiveFISH 技术, Wang 等分别采用绿色荧光素 Atto488 和红色荧光素 Atto565 修饰多条 sgRNA, 形成正交系统, 实现了对等位基因易位与活细胞转录的同时监测^[36]。此外, Ma 等开发的 CRISPRainbow 技术 (图 6) 在 MS2-MCP 和 PP7-PCP 的 RNA 支架基础上引入了第 3 种 boxB 茎环基序和 N22 蛋白作为第 3 种支架体系, 然后通过 MCP、PCP 或 N22 分别融合蓝色、绿色和红色荧光蛋白用来标记 sgRNA, 在细

胞内形成正交标记^[41]。同时, 利用多色叠加效应可以产生青、黄、紫、白等颜色, 充分发挥了 sgRNA 支架在多色成像上的优势。

4 总结与展望

CRISPR/Cas9 系统因其独特的 sgRNA 靶向性、使用的简便性以及可融合不同蛋白因子的多样性, 已经被广泛应用于基因编辑、转录调控和染色体成像等领域。由 Cas9 的核酸内切酶失活突变体 dCas9 与 FISH 的共定位证明了 CRISPR/dCas9 系统能够精确地定位和成像目标基因。近年来, 从单色到多色、从单位点到多位点、从定位染色体基因组到追踪染色体基因间易位事件, CRISPR/dCas9 系统逐渐展示了在活细胞成像上的巨大应用潜力。当然, 目前该领域仍然存在很多亟待解决的问题。例如, 针对基因组内源性非重复序列进行高分辨成像仍极具挑战。开发具有更高荧光强度的新型荧光标记多肽, 用于与 dCas9 蛋白偶联荧光标记是解决上述问题的有效途径之一。

CRISPR/dCas9 成像技术不可避免地会受到 CRISPR/Cas9 基因编辑系统本身缺陷的制约。例如, Cas9 的脱靶效应有可能造成假阳性的结果。因此, 发展新方法, 设计和筛选更有效的 sgRNA 用于目标基因的精准定位成像十分必要。此外, 由于受 PAM 位点的限制, 采用 CRISPR/dCas9 成像系统会有一定的序列局限性。通过基因挖掘、

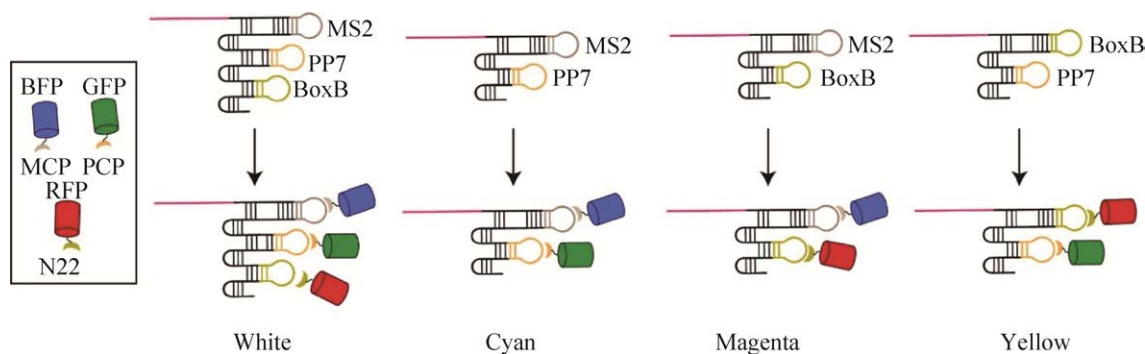


图 6 CRISPRainbow 多色成像技术^[41]

Fig. 6 CRISPRainbow multicolor imaging technology^[41].

人工改造等方法获得 PAM 自由度更高的 Cas9 蛋白变体, 是解决上述问题的有效途径。总之, CRISPR/Cas 是一个非常庞大的蛋白超家族, Cas9 只是其中最为人熟知的一类蛋白。近年来, Cas 12、Cas 13 以及 Cas14 等家族蛋白被相继报道^[53-55]。其中, Cas13 类蛋白能够特异性地编辑 RNA 而非 DNA。基于 CRISPR/dCas13 系统, 可开发出针对活细胞内 RNA 进行实时成像的工具。未来, 结合 CRISPR/dCas9 与 CRISPR/dCas13 成像技术, 可同时追踪活细胞甚至活体内 DNA 与 RNA 在时空上的动态变化, 为理解更复杂的生物调控网络以及遗传疾病的发生机制提供可靠的研究工具。

REFERENCES

- [1] Jiang FG, Doudna JA. CRISPR-Cas9 structures and mechanisms. *Annu Rev Biophys*, 2017, 46: 505-529.
- [2] Zhang F, Wen Y, Guo X. CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges. *Hum Mol Genet*, 2014, 23(R1): R40-R46.
- [3] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337(6096): 816-821.
- [4] Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science*, 2014, 346(6213): 1258096.
- [5] Ma YX, Wang MX, Li W, et al. Live visualization of HIV-1 proviral DNA using a dual-color-labeled CRISPR system. *Anal Chem*, 2017, 89(23): 12896-12901.
- [6] Knight SC, Xie LQ, Deng WL, et al. Dynamics of CRISPR-Cas9 genome interrogation in living cells. *Science*, 2015, 350(6262): 823-826.
- [7] Chen KL, Wang YP, Zhang R, et al. CRISPR/Cas genome editing and precision plant breeding in agriculture. *Annu Rev Plant Biol*, 2019, 70: 667-697.
- [8] Belhaj K, Chaparro-Garcia A, Kamoun S, et al. Editing plant genomes with CRISPR/Cas9. *Curr Opin Biotechnol*, 2015, 32: 76-84.
- [9] Liu C, Zhang L, Liu H, et al. Delivery strategies of the CRISPR-Cas9 gene-editing system for therapeutic applications. *J Control Release*, 2017, 266: 17-26.
- [10] Lu XJ, Xue HY, Ke ZP, et al. CRISPR-Cas9: a new and promising player in gene therapy. *J Med Genet*, 2015, 52(5): 289-296.
- [11] Saayman S, Ali SA, Morris KV, et al. The therapeutic application of CRISPR/Cas9 technologies for HIV. *Exp Opin Biol Ther*, 2015, 15(6): 819-830.
- [12] Zuo Z, Liu J. Structure and dynamics of Cas9 HNH domain catalytic state. *Sci Rep*, 2017, 7: 17271.
- [13] Zuo Z, Liu J. Cas9-catalyzed DNA cleavage generates staggered ends: evidence from molecular dynamics simulations. *Sci Rep*, 2016, 5: 37584.
- [14] Nishimasu H, Ran FA, Hsu PD, et al. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*, 2014, 156(5): 935-949.
- [15] Anders C, Niewoehner O, Duerst A, et al. Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature*, 2014, 513(7519): 569-573.
- [16] Dreissig S, Schiml S, Schindele P, et al. Live-cell CRISPR imaging in plants reveals dynamic telomere movements. *Plant J*, 2017, 91(4): 565-573.
- [17] Guo DG, Wang DB, Liu C, et al. CRISPR-based genomic loci labeling revealed ordered spatial organization of chromatin in living diploid human cells. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2019, 1866(12): 118518.
- [18] Maass PG, Barutcu AR, Shechner DM, et al. Spatiotemporal allele organization by allele-specific CRISPR live-cell imaging (SNP-CLING). *Nat Struct Mol Biol*, 2018, 25(2): 176-184.
- [19] Fraser J, Williamson I, Bickmore WA, et al. An overview of genome organization and how we got there: from FISH to Hi-C. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2015, 79(3): 347-372.
- [20] Amarillo FIE, Bass HW. A transgenomic cytogenetic sorghum (*Sorghum propinquum*) bacterial artificial chromosome fluorescence *in situ* hybridization map of maize (*Zea mays* L.) pachytene chromosome 9, evidence for regions of genome hyperexpansion. *Genetics*, 2007, 177(3): 1509-1526.

- [21] Wang CJR, Harper L, Cande WZ. High-resolution single-copy gene fluorescence *in situ* hybridization and its use in the construction of a cytogenetic map of maize chromosome 9. *Plant Cell*, 2006, 18(3): 529-544.
- [22] Brenna-Hansen S, Li JY, Kent MP, et al. Chromosomal differences between European and North American Atlantic salmon discovered by linkage mapping and supported by fluorescence *in situ* hybridization analysis. *BMC Genomics*, 2012, 13: 432.
- [23] Lowenstein MG, Goddard TD, Sedat JW. Long-range interphase chromosome organization in *Drosophila*: a study using color barcoded fluorescence *in situ* hybridization and structural clustering analysis. *Mol Biol Cell*, 2004, 15(12): 5678-5692.
- [24] Ratan ZA, Bin Zaman S, Mehta V, et al. Application of fluorescence *in situ* hybridization (FISH) technique for the detection of genetic aberration in medical science. *Cureus*, 2017, 9(6): e1325.
- [25] Heng HHQ, Tsui LC. High resolution free chromatin/DNA fiber fluorescent *in situ* hybridization. *J Chromatogr A*, 1998, 806(1): 219-229.
- [26] Vaandrager JW, Schuurin E, Zwikstra E, et al. Direct visualization of dispersed 11q13 chromosomal translocations in mantle cell lymphoma by multicolor DNA fiber fluorescence *in situ* hybridization. *Blood*, 1996, 88(4): 1177-1182.
- [27] Roukos V, Voss TC, Schmidt CK, et al. Spatial dynamics of chromosome translocations in living cells. *Science*, 2013, 341(6146): 660-664.
- [28] Chen BH, Gilbert LA, Cimini BA, et al. Dynamic imaging of genomic loci in living human cells by an optimized CRISPR/Cas system. *Cell*, 2013, 155(7): 1479-1491.
- [29] Chen BH, Huang B. Imaging genomic elements in living cells using CRISPR/Cas9. *Methods Enzymol*, 2014, 546: 337-354.
- [30] Duan JZ, Lu GQ, Hong Y, et al. Live imaging and tracking of genome regions in CRISPR/dCas9 knock-in mice. *Genome Biol*, 2018, 19: 192.
- [31] Xue Y, Acar MJ. Live-cell imaging of chromatin condensation dynamics by CRISPR. *iScience*, 2018, 4: 216-235.
- [32] Fu Y, Rocha PP, Luo VM, et al. CRISPR-dCas9 and sgRNA scaffolds enable dual-colour live imaging of satellite sequences and repeat-enriched individual loci. *Nat Commun*, 2016, 7: 11707.
- [33] Anton T, Bultmann S, Leonhardt H, et al. Visualization of specific DNA sequences in living mouse embryonic stem cells with a programmable fluorescent CRISPR/Cas system. *Nucleus*, 2014, 5(2): 163-172.
- [34] Ma HH, Tu LC, Naseri A, et al. CRISPR-Cas9 nuclear dynamics and target recognition in living cells. *J Cell Biol*, 2016, 214(5): 529-537.
- [35] Zhang KX, Deng RJ, Teng XC, et al. Direct visualization of single-nucleotide variation in mtDNA Using a CRISPR/Cas9-mediated proximity ligation assay. *J Am Chem Soc*, 2018, 140(36): 11293-11301.
- [36] Wang HF, Nakamura M, Abbott TR, et al. CRISPR-mediated live imaging of genome editing and transcription. *Science*, 2019, 365(6459): 1301-1305.
- [37] Han X, Liu ZB, Jo MC, et al. CRISPR-Cas9 delivery to hard-to-transfect cells via membrane deformation. *Sci Adv*, 2015, 1(7): e1500454.
- [38] Mout R, Ray M, Tonga GY, et al. Direct cytosolic delivery of CRISPR/Cas9-ribonucleoprotein for efficient gene editing. *ACS Nano*, 2017, 11(3): 2452-2458.
- [39] Qiao J, Sun WL, Lin SY, et al. Cytosolic delivery of CRISPR/Cas9 ribonucleoproteins for genome editing using chitosan-coated red fluorescent protein. *Chem Commun*, 2019, 55(32): 4707-4710.
- [40] Qiao J, Li WQ, Lin SY, et al. Co-expression of Cas9 and single-guided RNAs in *Escherichia coli* streamlines production of Cas9 ribonucleoproteins. *Commun Biol*, 2019, 2: 161.
- [41] Ma HH, Tu LC, Naseri A, et al. Multiplexed labeling of genomic loci with dCas9 and engineered sgRNAs using CRISPRainbow. *Nat Biotechnol*, 2016, 34(5): 529-537.

- 528-530.
- [42] Shao SP, Zhang WW, Hu H, et al. Long-term dual-color tracking of genomic loci by modified sgRNAs of the CRISPR/Cas9 system. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(9): e86.
- [43] Wang SY, Su JH, Zhang F, et al. An RNA-aptamer-based two-color CRISPR labeling system. *Sci Rep*, 2016, 6: 26857.
- [44] Qin PW, Parlak M, Kuscu C, et al. Live cell imaging of low- and non-repetitive chromosome loci using CRISPR-Cas9. *Nat Commun*, 2017, 8: 14725.
- [45] Cheng AW, Jillette N, Lee P, et al. Casilio: a versatile CRISPR-Cas9-Pumilio hybrid for gene regulation and genomic labeling. *Cell Res*, 2016, 26(2): 254-257.
- [46] Ma HH, Naseri A, Reyes-Gutierrez P, et al. Multicolor CRISPR labeling of chromosomal loci in human cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(10): 3002-3007.
- [47] Tanenbaum ME, Gilbert LA, Qi LS, et al. A protein-tagging system for signal amplification in gene expression and fluorescence imaging. *Cell*, 2014, 159(3): 635-646.
- [48] Neguembor MV, Sebastian-Perez R, Aulicino F, et al. (Po)STAC (Polycistronic SunTA modified CRISPR) enables live-cell and fixed-cell super-resolution imaging of multiple genes. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(5): 30-40.
- [49] Romei MG, Boxer SG. Split green fluorescent proteins: scope, limitations, and outlook. *Annu Rev Biophys*, 2019, 48: 19-44.
- [50] Kamiyama D, Sekine S, Barsi-Rhyné B, et al. Versatile protein tagging in cells with split fluorescent protein. *Nat Commun*, 2016, 7: 11046.
- [51] Hong Y, Lu GQ, Duan JZ, et al. Comparison and optimization of CRISPR/dCas9/gRNA genome-labeling systems for live cell imaging. *Genome Biol*, 2018, 19: 39.
- [52] Chen BH, Hu J, Almeida R, et al. Expanding the CRISPR imaging toolset with *Staphylococcus aureus* Cas9 for simultaneous imaging of multiple genomic loci. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(8): e75-87.
- [53] Li TW, Zhu LW, Xiao BX, et al. CRISPR-Cpf1-mediated genome editing and gene regulation in human cells. *Biotechnol Adv*, 2019, 37(1): 21-27.
- [54] Ali Z, Mahas A, Mahfouz M. CRISPR/Cas13 as a tool for RNA interference. *Trends Plant Sci*, 2018, 23(5): 374-378.
- [55] Harrington LB, Burstein D, Chen JS, et al. Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes. *Science*, 2018, 362(6416): 839-842.

(本文责编 郝丽芳)