

翻转课堂第3期：优秀案例



西北农林科技大学
NORTHWEST A&F UNIVERSITY

西北农林科技大学2023级农学院

CRISPR成像技术

组长：梁馨匀

组员：刘天岚 葛采琳 金紫悦 胡涵楚

诚朴勇毅

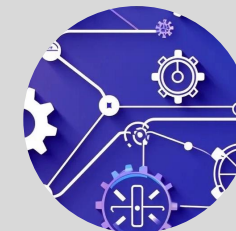
小组分工



西北农林科技大学
NORTHWEST A&F UNIVERSITY



发展历程部分
金紫悦



具体应用部分
刘天岚



原理部分
葛采琳+梁馨匀



不足和前沿发展部分
胡涵楚



目录
CONTENTS

1 发展历程

2 技术原理

3 具体应用

4 现有不足与前沿发展方向

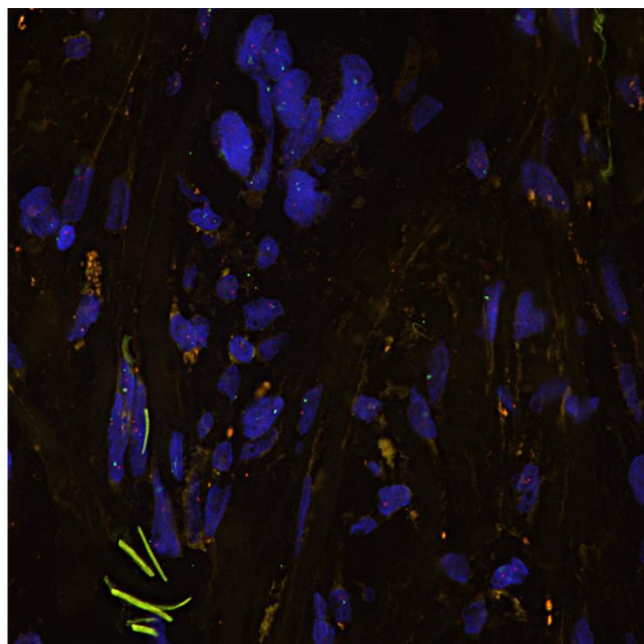


Part 1

发展历程—薪火相传

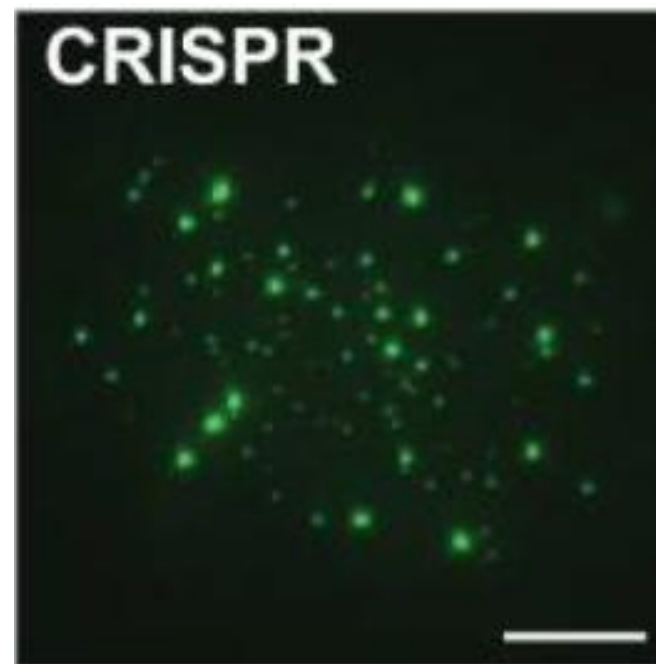
1.1 “解剖” VS “直播”

固定



荧光原位杂交 (FISH)

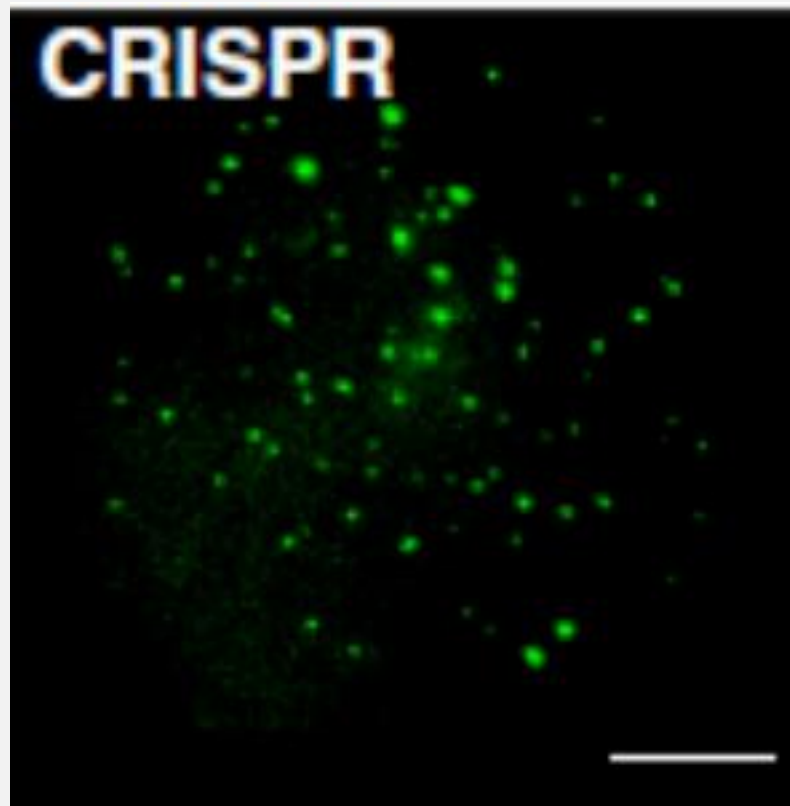
动态



CRISPR成像

1.2 从基因剪刀到荧光信标

CRISPR成像的首次实现



CAS9催化失活 \rightarrow dCAS9

+

荧光蛋白

=

标记基因组位点

+

sgRNA引导

1.2 从基因剪刀到荧光信标

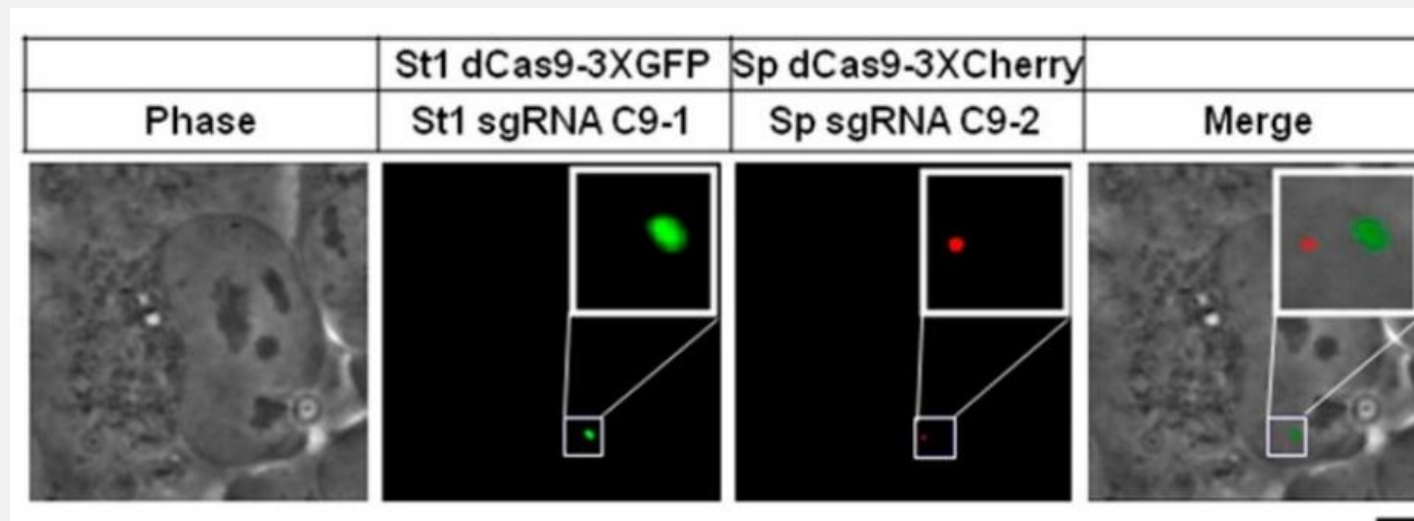
- 端粒 (telomeres)
- 黏蛋白家族基因 (MUC 家族)
- 非重复基因组序列



多个基因?

1.3 绘制基因组多彩地图

实现多色成像



酿脓链球菌 (Sp)

脑膜炎奈瑟菌 (Nm)

嗜热链球菌 (St1)



提取

dCas9



荧光蛋白

GFP

RFP

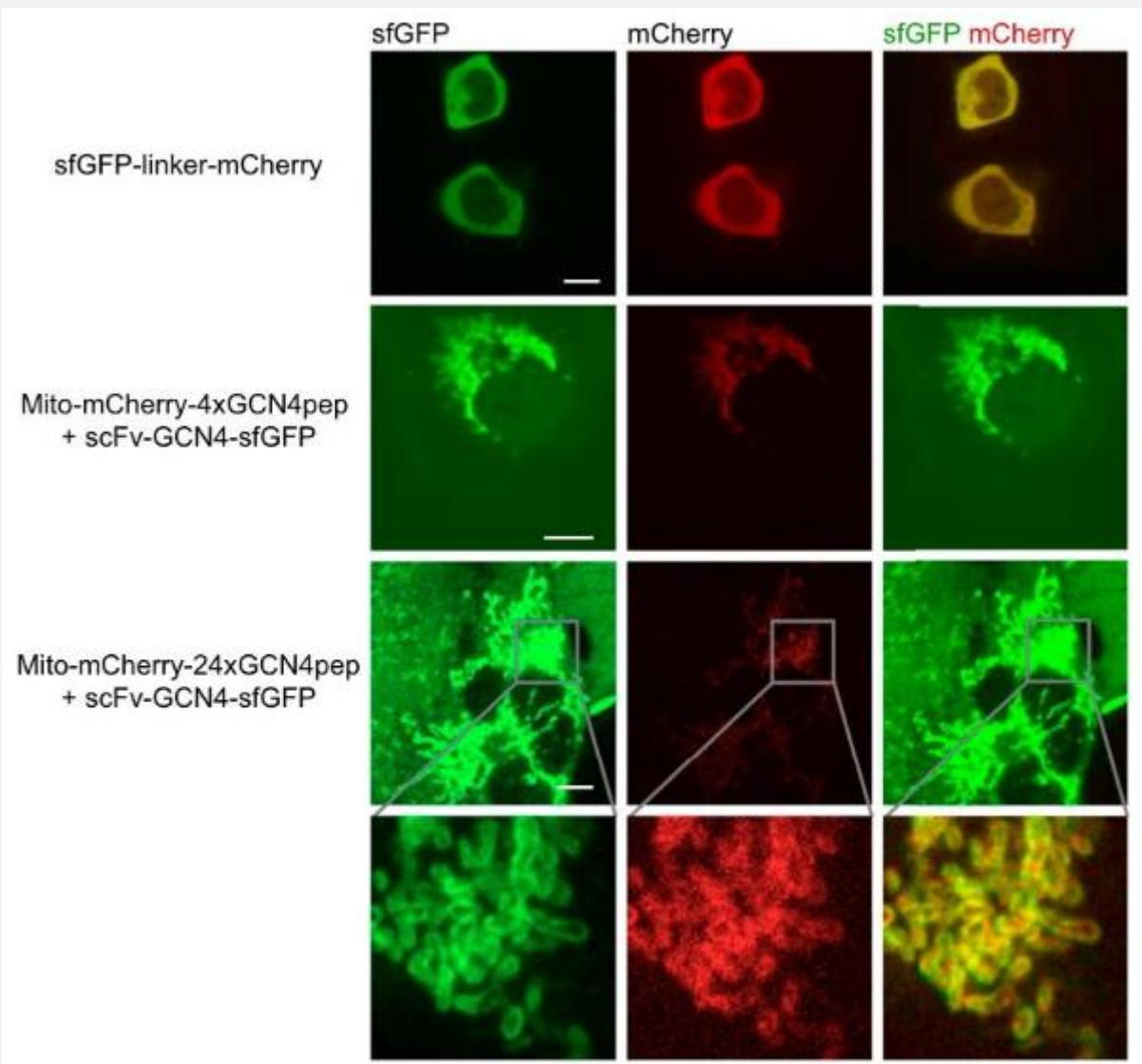
BFP

1.4 聚“微光”成“灯塔”

SunTag信号放大系统



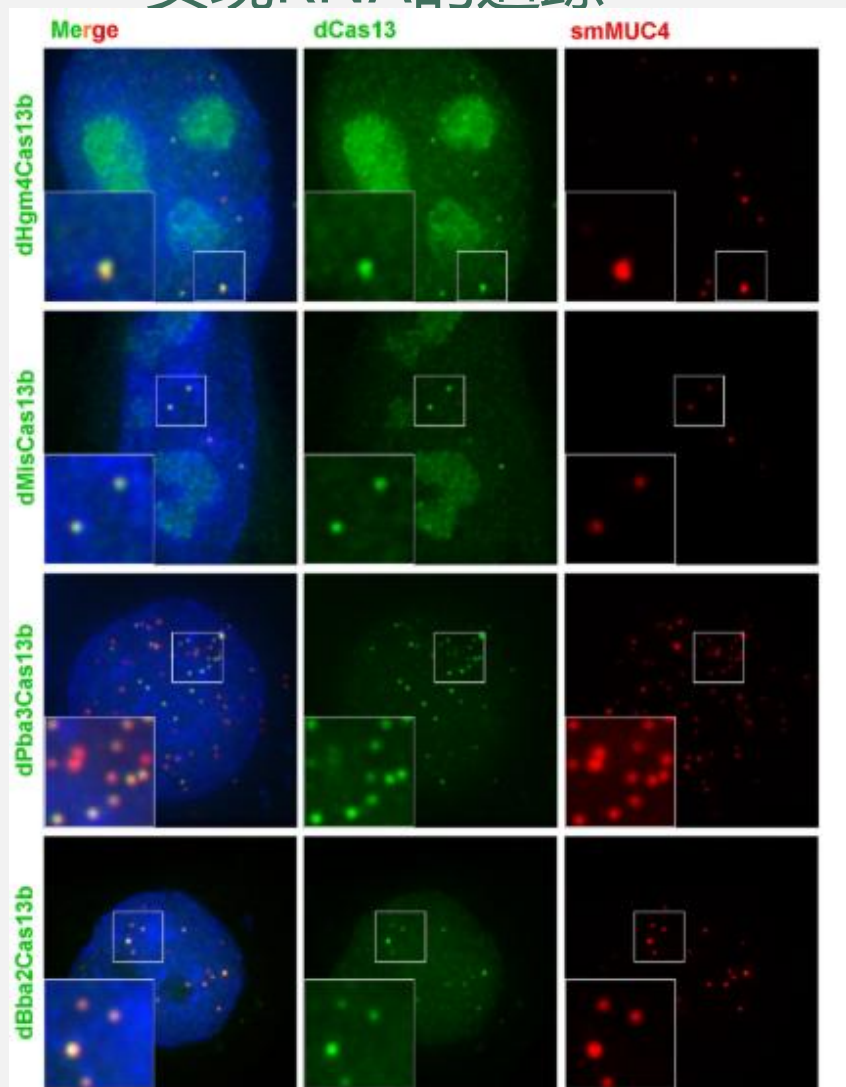
1.4 聚“微光”成“灯塔”



- 提升信号亮度，突破检测下限
- 降低背景干扰，提升信噪比
- 增强光稳定性，支持长时程追踪
- 适配低光毒性成像，保护细胞活性

1.5 从蓝图到信使

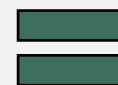
实现RNA的追踪



CAS13催化失活 → dCAS13



荧光蛋白



标记多种RNA

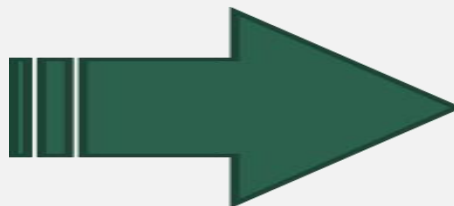
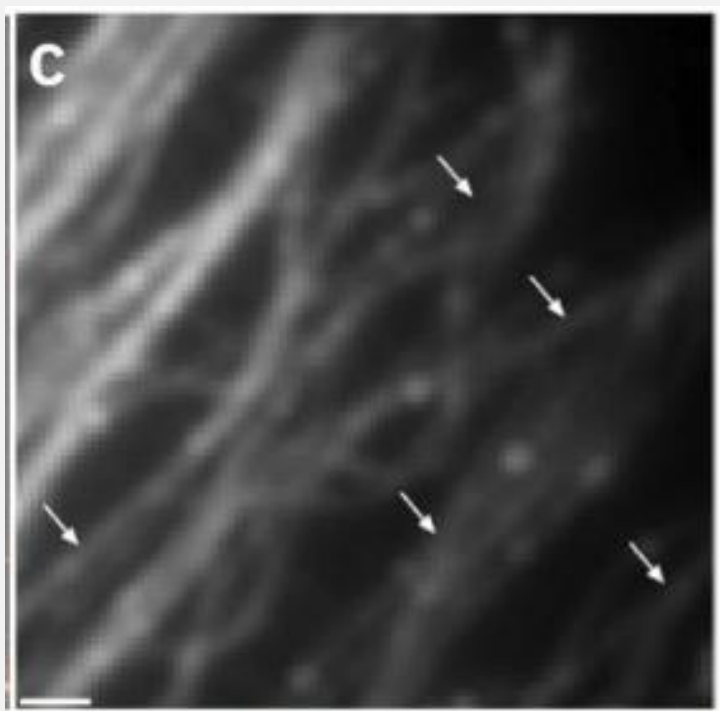


gRNA引导

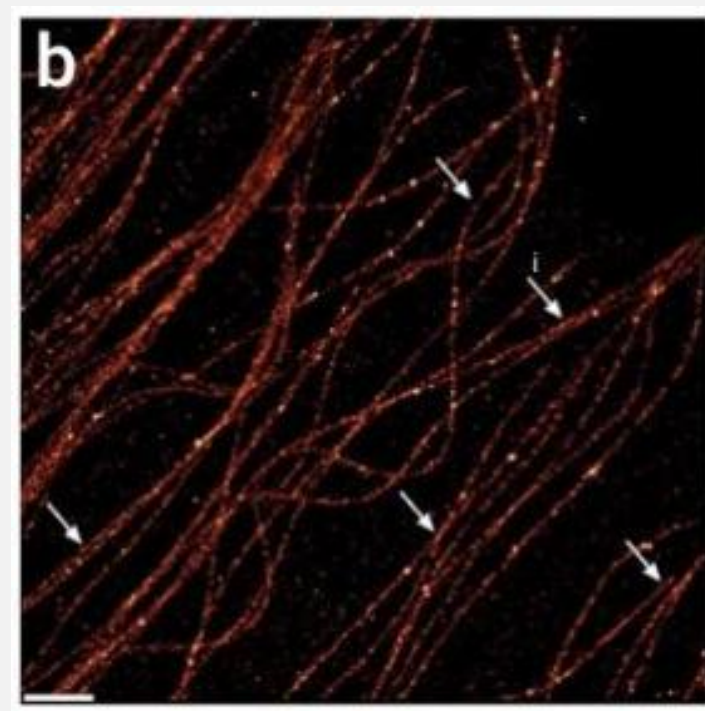
1.6 驶入基因组“深水区”

超分辨技术实现超高精度成像

衍射极限图像



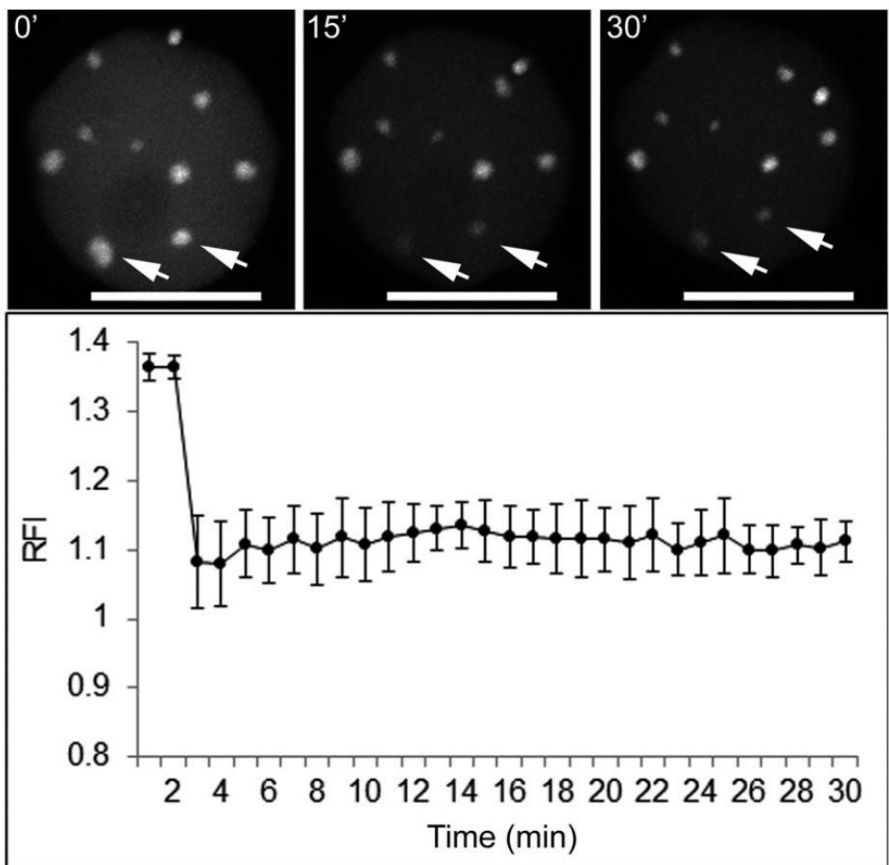
DNA-PAINT 技术成像



细胞内的 β - 微管蛋白 (微管直径 ~ 25 nm)

1.7 窃听细胞的“私语”

动态追踪系统实现低扰动观测



标记端粒的 dCas9 - 荧光蛋白复合物光漂白后30分钟内的荧光恢复情况

- dCas9 与端粒 DNA 结合稳定
- 避免了 dCas9 反复结合 - 解离
- 观测端粒自然动态

1.8 技术进化历程



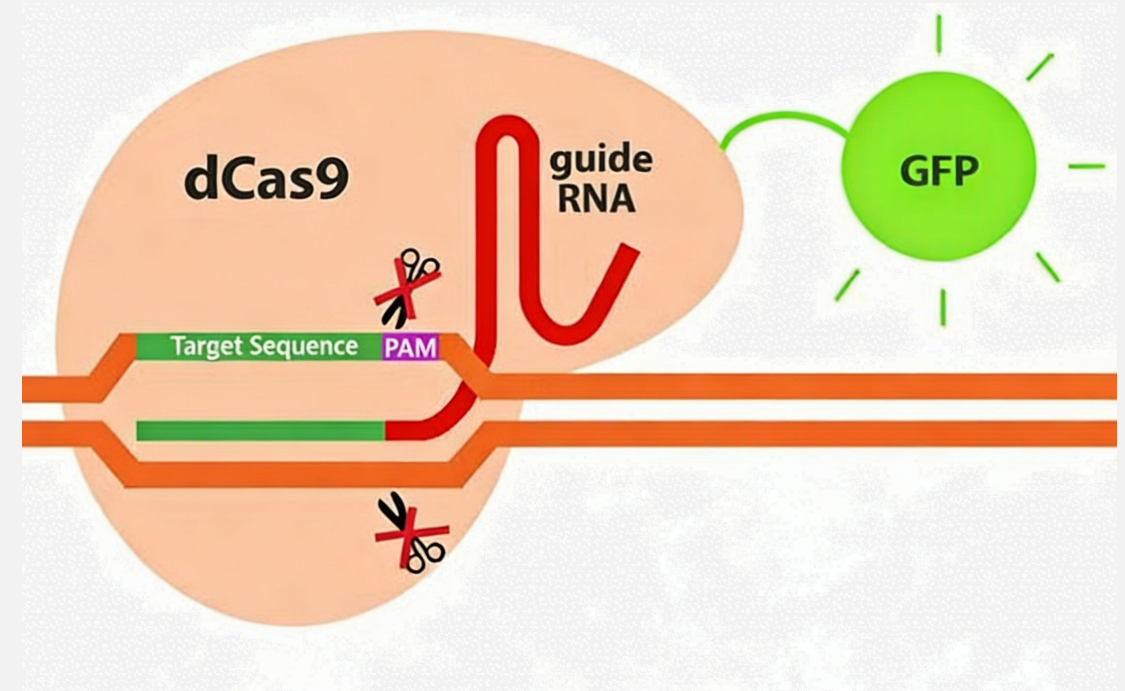


Part 2

技术原理—天眼探微

2.1 核心原理一点石成金

- **失活Cas蛋白 (dCas9)** : 通过突变Cas9的两个催化结构域 (H840A和D10A), 使其失去DNA切割能力, 但仍保留在sgRNA引导下与特定DNA序列结合的能力。
- **sgRNA的设计**: 设计一条单链向导RNA (sgRNA), 其5'端的约20个碱基与目标DNA序列互补, 引导dCas9精准定位到基因组上的特定位置 (如基因启动子、端粒、着丝粒或特定重复序列) 。



2.2 染色质/DNA位点成像—明灯指路

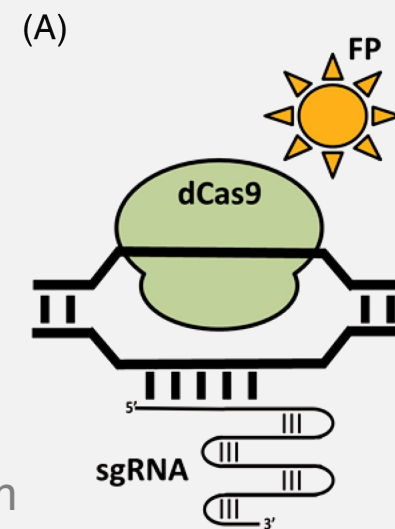
1. 荧光蛋白标记系统

- **dCas9-FP系统**

将荧光蛋白直接融合dCas9，用于成像基因组位点。适用重复序列成像，但信号较弱（图A）。

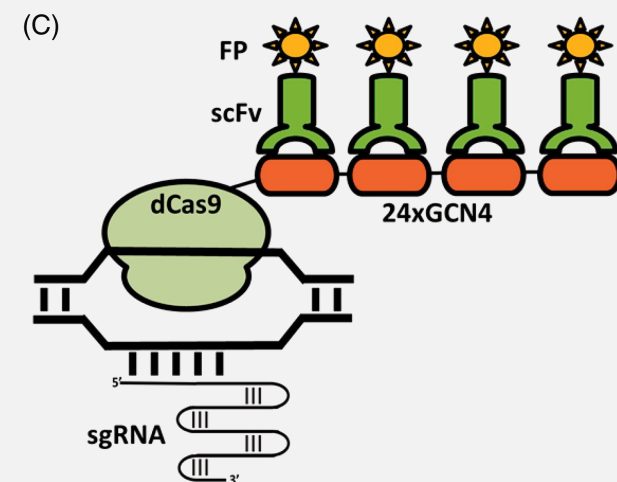


Marvin E. Tanenbaum



- **SunTag/SuperNova系统**

一个由24个串联排列的重复短肽表位（GCN4）组成的肽连接到dCas9的C端。多种单链可变片段（scFv）与FP融合，结合GCN4以实现可视化。将多个FP结合到单一位点可提升荧光信号发射（图C）。



2.2 染色质/DNA位点成像—明灯指路

1. 荧光蛋白标记系统

● MS2/PP7等RNA适配体系统

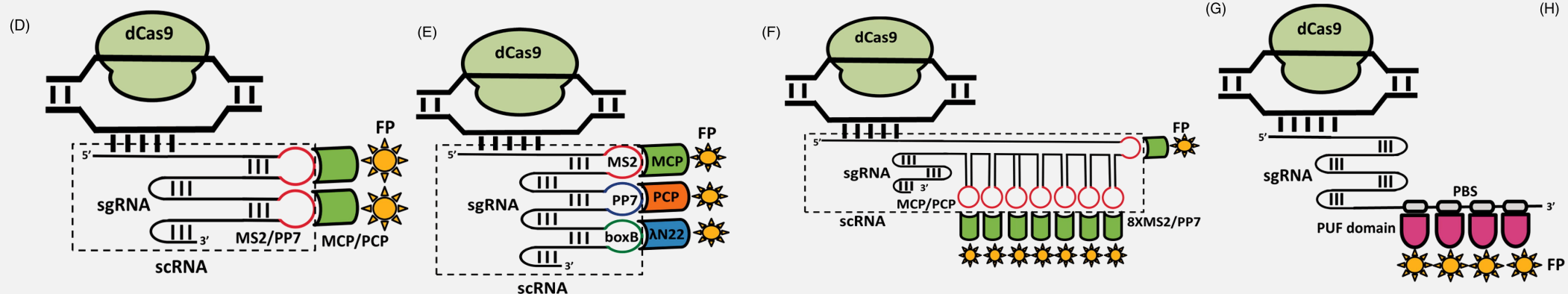
在sgRNA中嵌入特定RNA适配体（如MS2、PP7或PBS序列），进而联合对应的荧光蛋白融合体（如MCP/PCP或PUF结构域），实现对基因组位点的多色标记与高信号成像，具体技术包括CRISPRainbow、CRISPR-Sirius、及Casilio系统（图D-G）。



Hanhui Ma



Cheng Albert W



[Multiplexed labeling of genomic loci with dCas9 and engineered sgRNAs using CRISPRainbow | Nature Biotechnology](#)

[CRISPR-Sirius: RNA scaffolds for signal amplification in genome imaging | Nature Methods](#)

[Casilio: a versatile CRISPR-Cas9-Pumilio hybrid for gene regulation and genomic labeling](#)

2.2 染色质/DNA位点成像—明灯指路

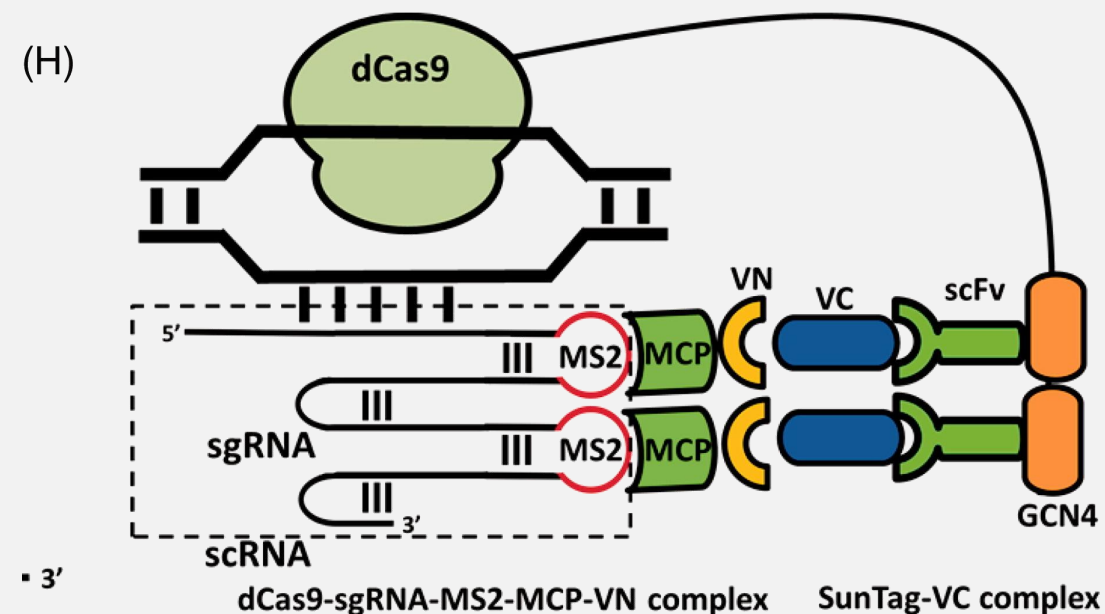
1. 荧光蛋白标记系统

● BIFC双分子荧光互补系统



Hong Yu

Venus蛋白分为两个非荧光片段，N' (VN) 和C' (VC)。C'片段与SunTag融合形成SunTag-VC复合物，而N'片段则与dCas9-sgRNA-MS2-MCP连接，形成dCas9-sgRNA-MS2-MCP-VN复合物。这两个复合物之间的相互作用产生功能性Venus蛋白，并在激发时发出荧光信号（图H）。





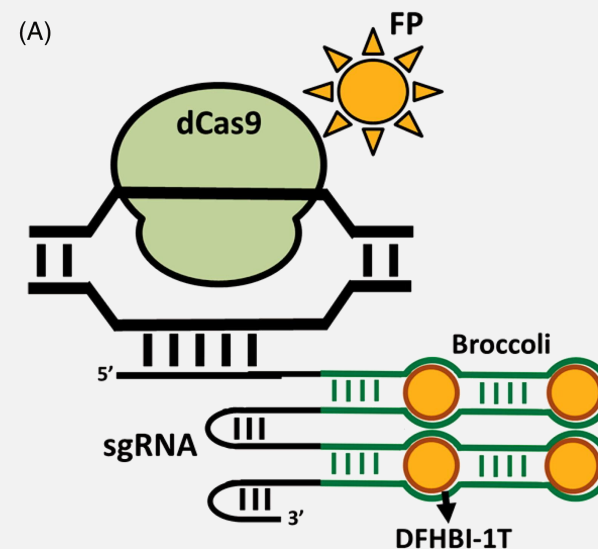
Mao Shiqi

2.2 染色质/DNA位点成像—明灯指路

2. 有机染料系统

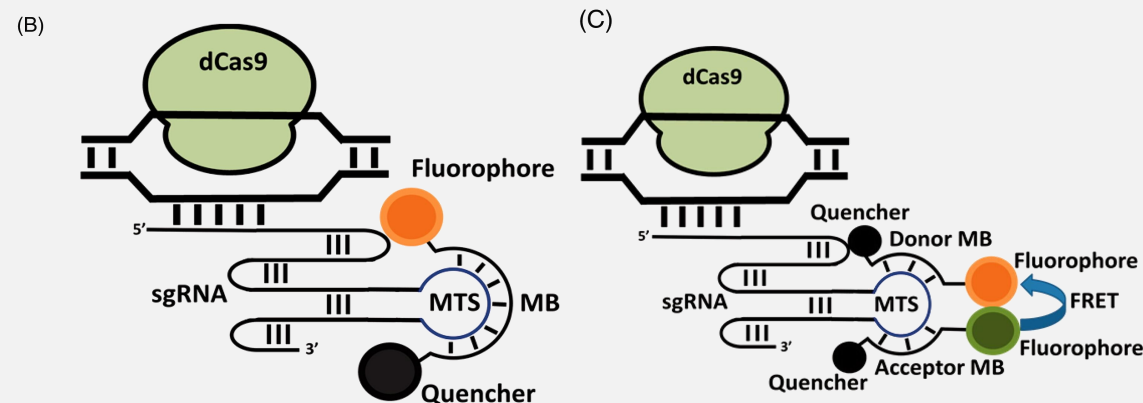
● Broccoli系统

该双色成像系统将BroccoliRNA适配体嵌入sgRNA，结合DFHBI-1T后发出荧光，与dCas9-FP共同实现位点标记（图A）。



● 分子信标 (MB)

通过分子信标或双FRET系统与sgRNA/dCas9结合，利用杂交诱导荧光信号变化，实现特定基因组位点的可视化检测（图B-C）。



2.2 染色质/DNA位点成像—明灯指路

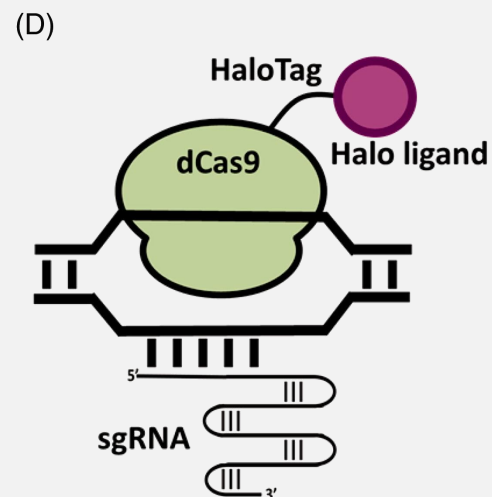
2.有机染料系统

● HaloTag系统

基于HaloTag的CRISPR成像通过dCas9-HaloTag融合蛋白与有机荧光染料的共价结合，使靶向位点的特异荧光标记与可视化（图D-E）。

● RGEN-ISL系统

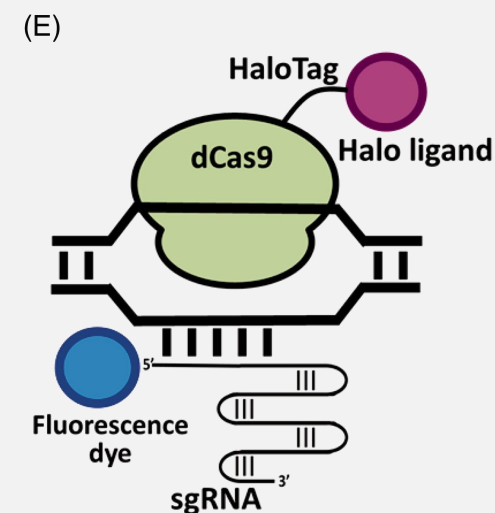
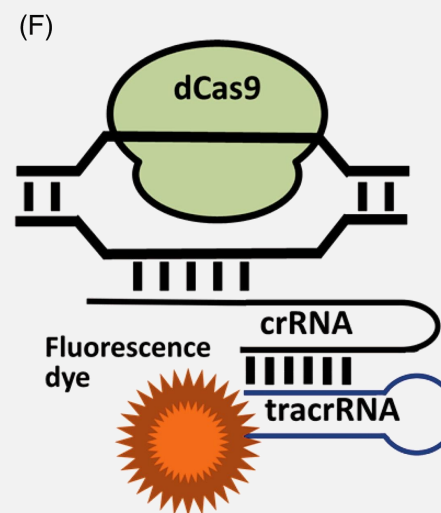
基于CRISPR的RGEN-ISL技术利用crRNA与荧光标记的tracrRNA杂交指导dCas9-RNP复合物，实现植物基因组重复序列的特异荧光成像（图F）。



Wulan Deng



Takayoshi Ishii



[CASFISH: CRISPR/Cas9-mediated in situ labeling of genomic loci in fixed cells | PNAS](#)

[RNA-guided endonuclease – in situ labelling \(RGEN-ISL\): a fast CRISPR/Cas9-based method to](#)

[label genomic sequences in various species - Ishii - 2019 - New Phytologist - Wiley Online Library](#) 第 21 页

2.2 染色质/DNA位点成像—明灯指路

3.量子点 (QD)

●LP1A酶介导标记

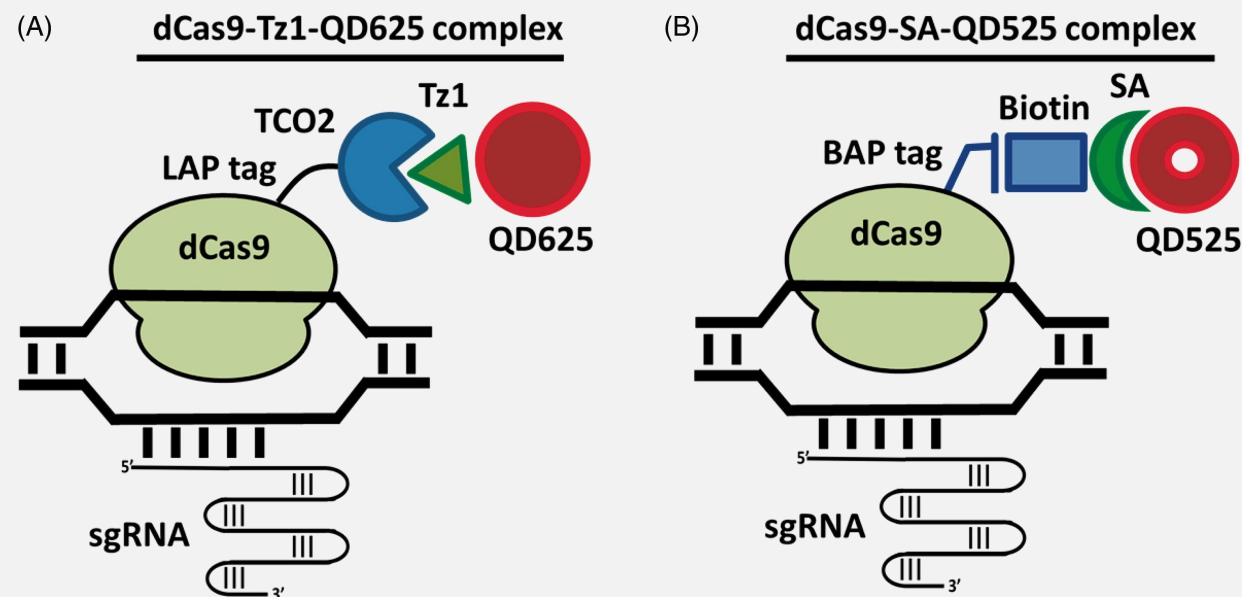
通过脂酸连接酶LpIA介导的特异性点击化学反应，将量子点 (QD) 高效标记到融合有LAP肽的dCas9蛋白上 (图A)。

● 生物素-链霉亲和素标记

dCas9与生物素受体肽 (BAP-tag) 融合，BAP被生物素连接酶 (BirA) 生物素化，链霉亲和素QD (SA-QD) 与生物素结合从而实现可视化 (图B)。



Yingxin Ma



2.3 RNA成像—探骊得珠

1. 荧光RNA成像

● RCas9系统

CRISPR/RCas9系统利用sgRNA与PAMmer引导RCas9-荧光蛋白复合物，实现对细胞核内特定RNA的定位成像，并追踪其向细胞质应激颗粒（SG）的运输过程（图A）。

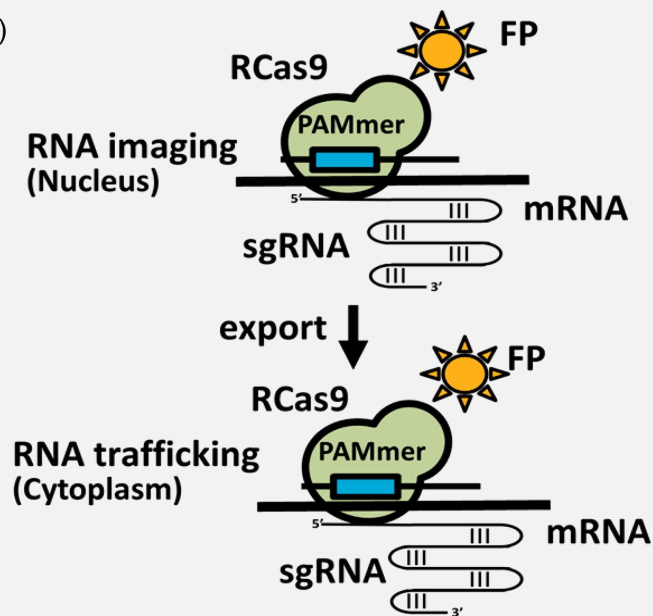
● dCas13系统

dCas13-NF系统通过自靶向ZF与KRAB结构域构建负反馈回路，在增强核内RNA向应激颗粒运输信号的同时抑制背景荧光（图B）。

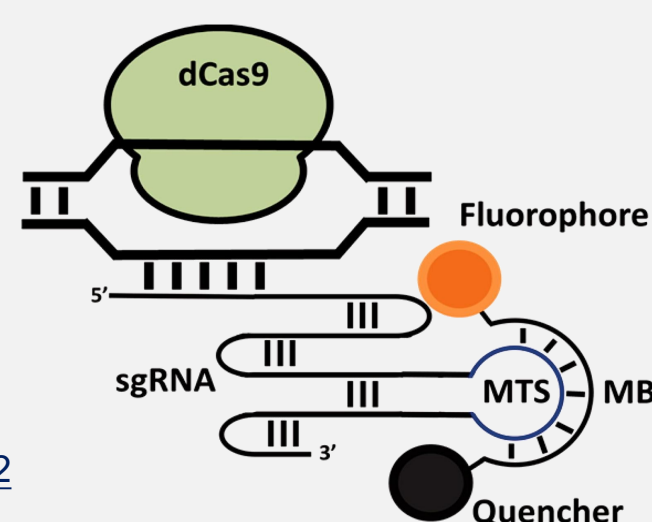
[https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(16\)30204-5?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867416302045%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(16)30204-5?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867416302045%3Fshowall%3Dtrue)



David A. Nelles



Abudayyeh Omar O



2.3 RNA成像—探骊得珠



Meng Wang

1. 荧光RNA成像

- **CRISPR-Sunspot系统**

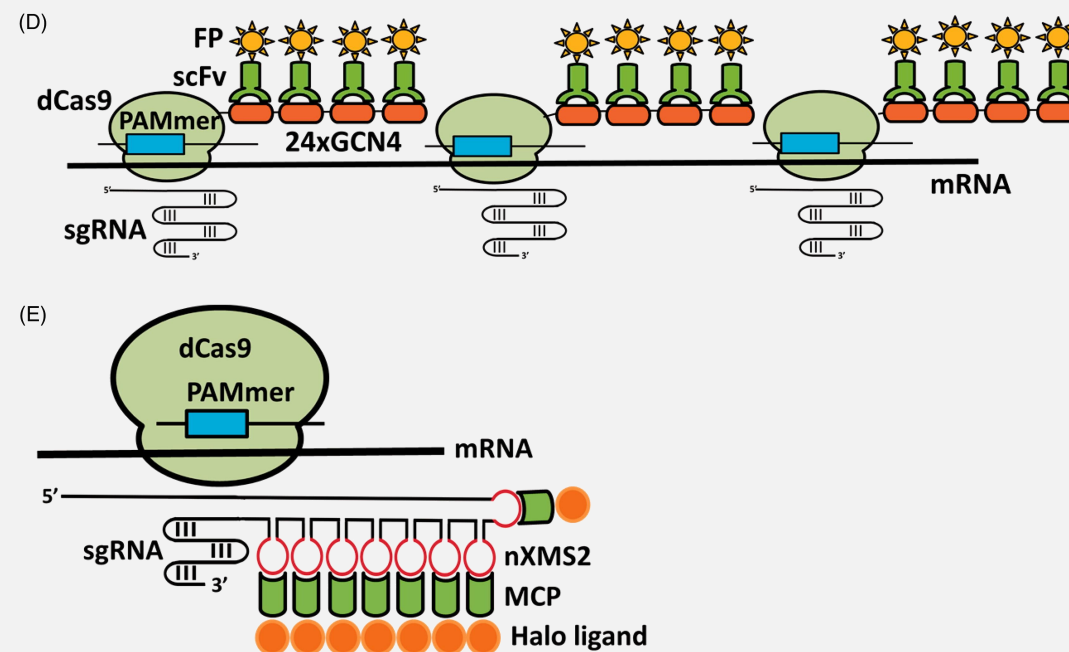
CRISPR和SunTag介导的单分子RNA快照
(CRISPR-Sunspot) 成像工具 (图D)。

- **RCasFISH**

RCasFISH基于将多RNA适体 (nXMS2)
整合到sgRNA, 从而能够结合MCP-
Halotag蛋白并招募卤素配体以供可视化
(图E)。

<https://www.thno.org/v10p10993.htm>

https://kns.cnki.net/kcms2/article/abstract?v=zWoS8hcsIzDKNB-szrL25PviaEuRhYN8Jpcv4L2qJFMJlawvPQB80RI_qdJ4DW8IfQa4akq2WaX7kNs7VIwlhoZ9oo2EBAdOMgdaL8MC898cLvDIIhqK9BQysnvVscdu8gYOIVX8VqfkBbfMku5jhYHLKQ8T0X1bRPYQfBpU_4y-MIRFqC9IoMAk_I9SdZbHVySA-XD9V-Y-c6YyeAVH-Q==&uniplatform=NZKPT&language=CHS



2.3 RNA成像—探骊得珠

2.非编码RNA荧光成像

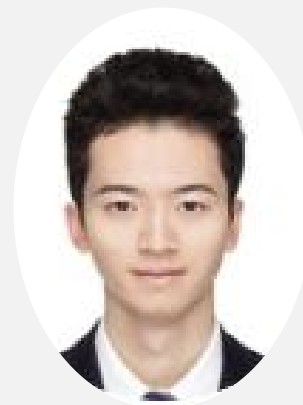
- CERTIS系统**

CERTIS通过CRISPR将MS2序列敲入IncRNA基因位点，利用MCP融合蛋白实现对其成像（图A）。

- 催化杂交链式反应（CHA）**

将催化杂交链式反应（CHA）与CRISPR-Cas9系统结合，用于miRNA成像。通过CHA的链置换反应循环放大信号，并由Cas9切割探针分离荧光团与淬灭剂，从而实现高灵敏度的miRNA检测（图B）。

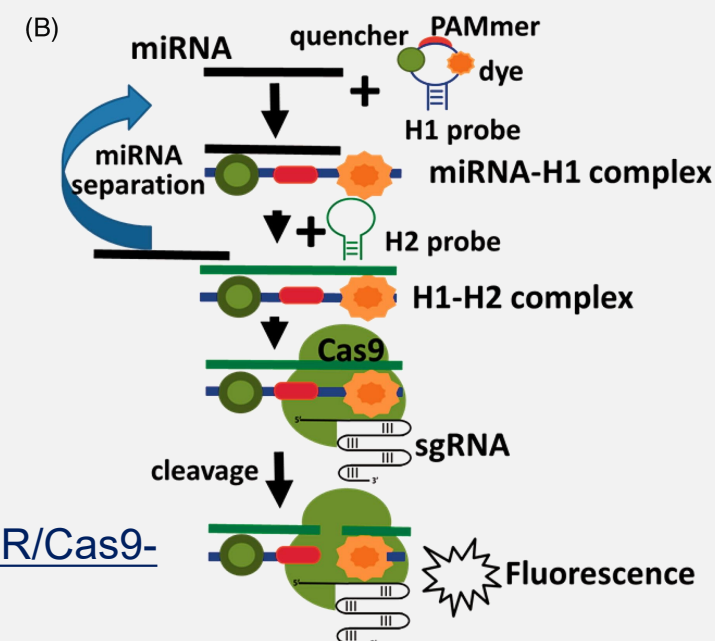
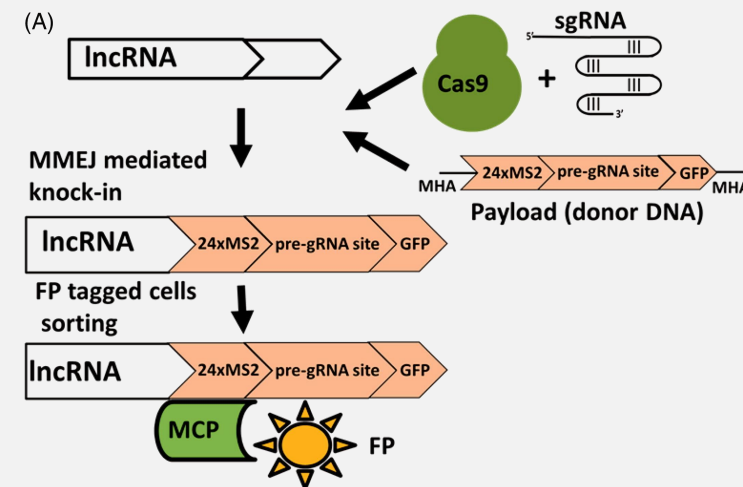
[Live cell imaging and proteomic profiling of endogenous NEAT1 lncRNA by CRISPR/Cas9-mediated knock-in | Protein & Cell | Oxford Academic](#)



Chen Bohong



Yang Liu



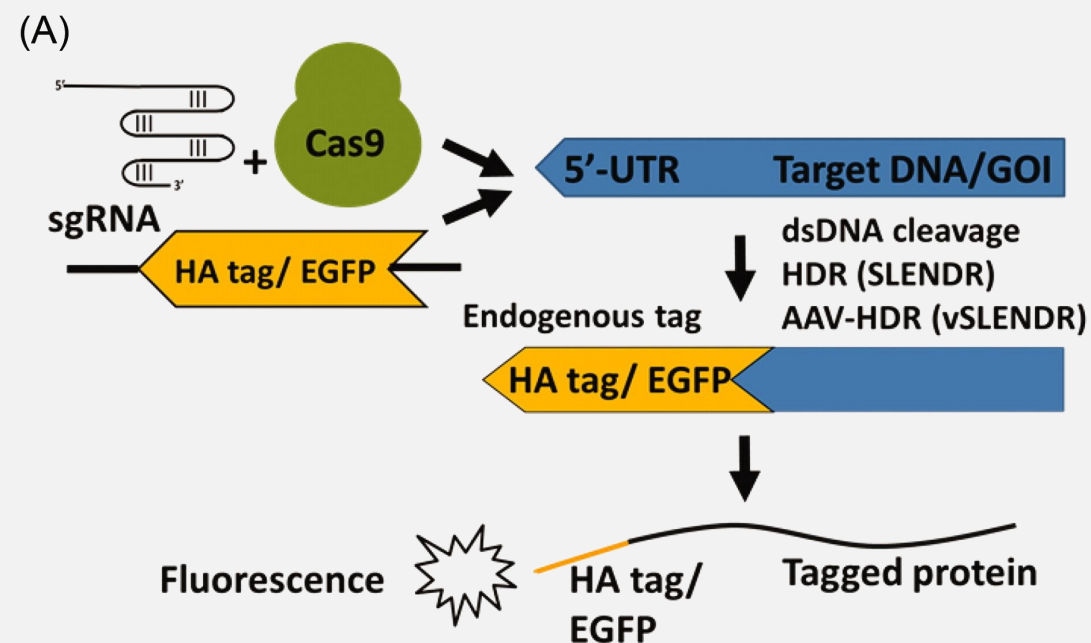
2.3 蛋白质成像—披光显形



Takayasu Mikuni

● SLENDR/vSLENDR

基于CRISPR/Cas9与同源修复 (HDR) 的技术，通过在基因特定位置定点插入表位标签 (如HA或EGFP)，实现内源蛋白质的标记与可视化。其中vSLENDR利用腺相关病毒 (AAV) 递送修复模板 (图A)。



[https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674\(16\)30489-5?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867416304895%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell/fulltext/S0092-8674(16)30489-5?returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0092867416304895%3Fshowall%3Dtrue)

2.3 蛋白质成像—披光显形

● HITI系统

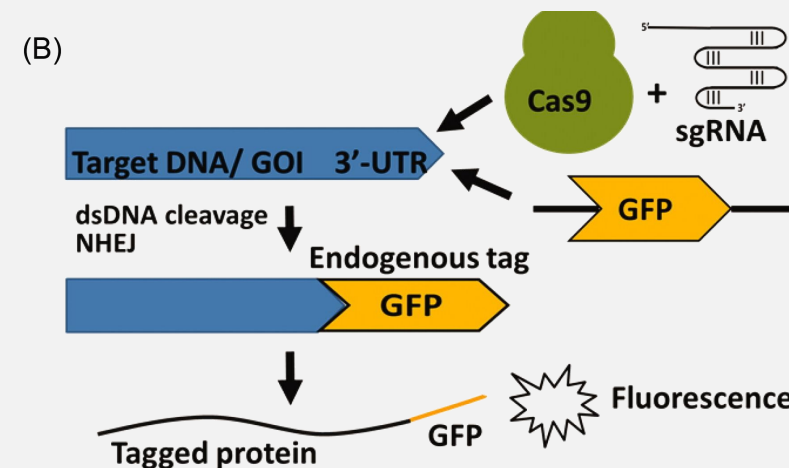
同源无关靶向整合 (HITI) 方法允许利用NHEJ机制整合靶DNA或直向离子 (GOI) 的3'-UTR荧光蛋白 (GFP) (图B)。

● HiUGE系统

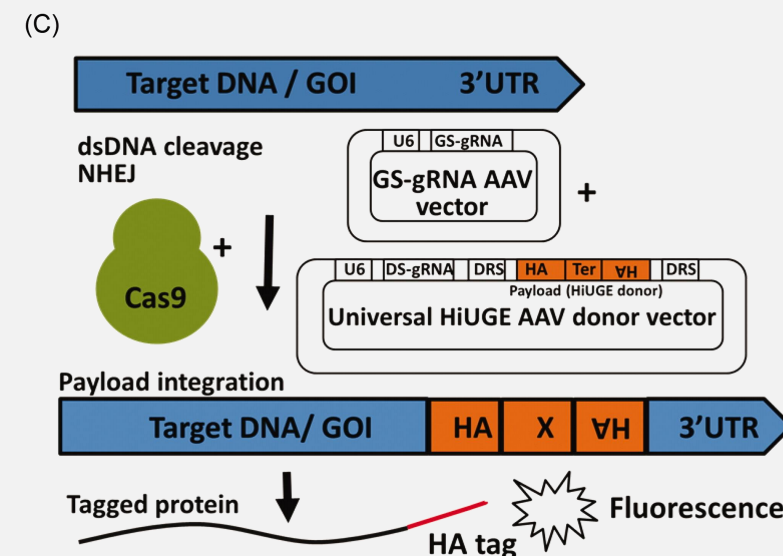
HiUGE是一种模块化蛋白标记平台, 通过AAV递送双载体与NHEJ机制, 将通用供体高效整合至基因3'UTR, 实现C端标签与蛋白质可视化 (图C)。



Suzuki Keiichiro



Yudong Gao



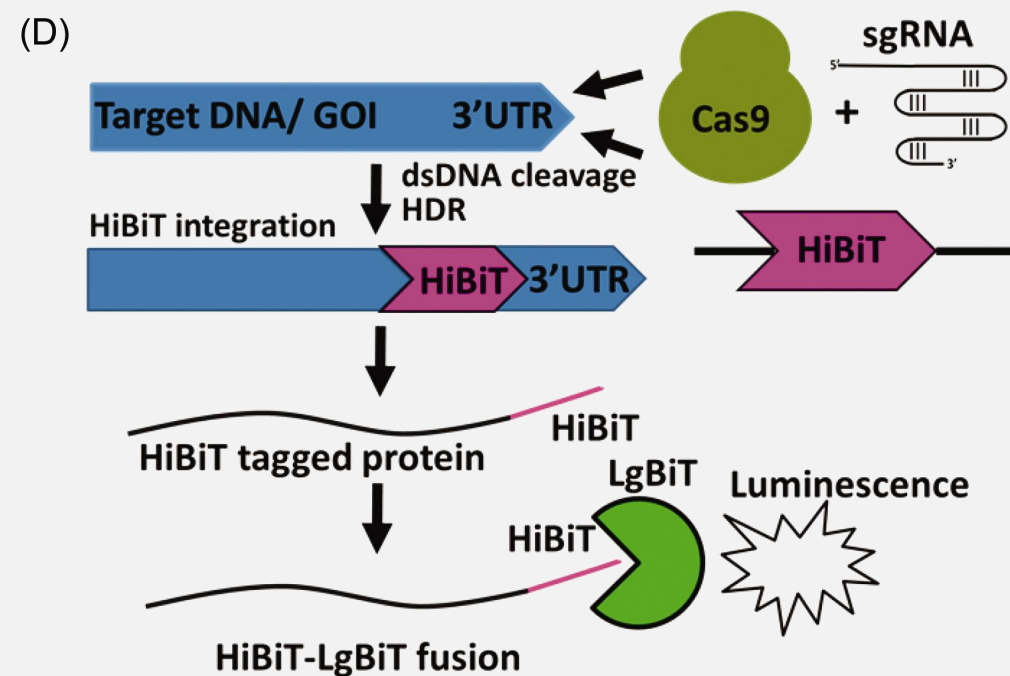
[In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration | Nature](#)

2.3 蛋白质成像—披光显形

● HiBiT系统

利用CRISPR介导的同源重组修复

(HDR)，在目标基因的特定位点精确插入小分子发光肽标签HiBiT。HiBiT可与外源添加的互补肽LgBiT高亲和力结合，形成有活性的NanoLuc荧光素酶，通过发光信号实现对内源蛋白质的高灵敏度检测与定量（图D）。



[CRISPR-Mediated Tagging of Endogenous Proteins with a Luminescent Peptide | ACS Chemical Biology](#)



Part 3

具体应用—高瞻远瞩

3.1 主要应用领域

实时追踪**染色质构象**变化
观察**染色质**环化和拓扑结构域形成
研究**基因座**的三维空间组织

观察**组蛋白修饰**的动态变化
追踪**DNA甲基化**状态
研究染色质可及性变化

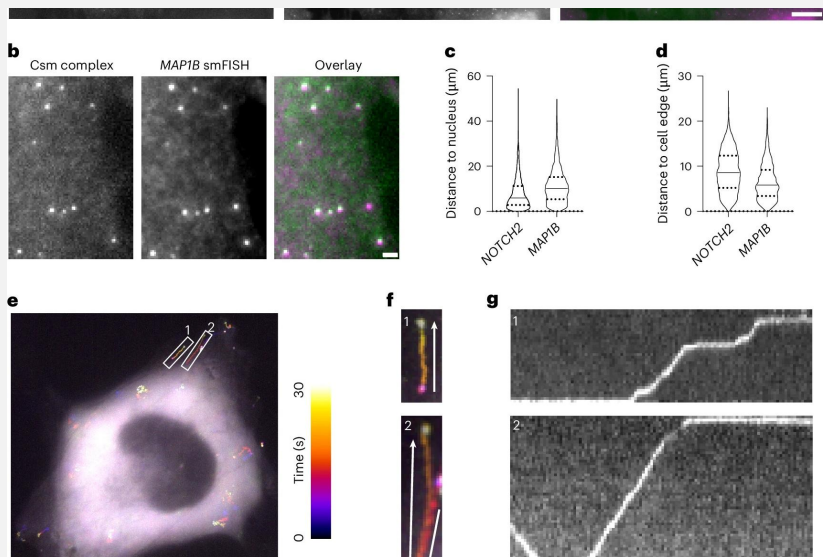
癌症中癌基因和抑癌基因的异常表达
神经退行性疾病中的基因表达失调
病毒感染过程中的宿主-病原体相互作用



监测**转录因子**结合和转录起始
可视化**增强子-启动子**相互作用
追踪**非编码RNA**的定位和功能

追踪细胞命运决定过程中的基因表达
观察**胚胎发育**中的基因调控网络
研究干细胞分化机制

3.2 基因组动态成像



使用CRISPR-CSM进行单分子活细胞RNA成像



Thierry Voet



Charlotte Van Tricht

基于CRISPR-Cas的基因组动态成像技术通过巧妙改造CRISPR系统，实现了对活细胞中特定基因位点的**实时可视化追踪**。该技术的核心是将失活的Cas9蛋白 (dCas9) 与荧光标记系统结合，使其能够结合目标DNA序列而不进行切割，从而在显微镜下观察基因组的三维空间组织和动态变化。

例如，利用CRISPR-Csm系统实现对内源性、未修饰RNA分子在活细胞中的单分子、实时、动态追踪。使用失活的Csm复合物 (含多个GFP标记的Csm3亚基) 作为**“RNA定位器”**。

- 通过多路引导RNA阵列 (如24个crRNA) 沿目标RNA的3' UTR “平铺” 结合，显著提高信号强度与信噪比。
- 在多种细胞类型 (包括U2OS、HEK293T、HeLa、原代人成纤维细胞等) 中实现单分子分辨率成像。

3.3 基因表达调控研究

CRISPR成像技术在基因表达调控研究中的应用，主要通过将失活的Cas蛋白与荧光标记系统结合，实现对活细胞中特定基因位点的实时可视化追踪。

1

染色质动态与表观修饰关联研究

利用CRISPR成像技术，研究人员发现染色质运动状态与其**表观修饰水平**密切相关。通过对不同细胞类型中同一位点的动态追踪，发现具有不同表观修饰水平的细胞也显示出类似的动态变化趋势，表明在分化过程中表观修饰水平的变化可能影响特定基因位点的时空动态。

增强子-启动子互作的时空特性解析

2

CRISPR成像技术首次在活细胞中直接观察到**增强子-启动子互作**的动态特性。通过对特定基因位点与增强子的同步动态标记，研究发现尽管存在动态运动，增强子与启动子之间仍能保持持续的空间邻近。

3

RNA动态追踪与定位调控

基于dCas13的CRISPR成像系统能够实现内源性RNA的**实时追踪**。例如，通过CRISPR-TO系统，研究人员可以将特定的mRNA主动运输到神经元的轴突末端，直接证明了局部mRNA定位对于神经突生长和神经元形态塑造的因果关系。

3.4 表观遗传学成像

Molecules and Cells
Volume 44, Issue 9, September 2021, Pages 627-636

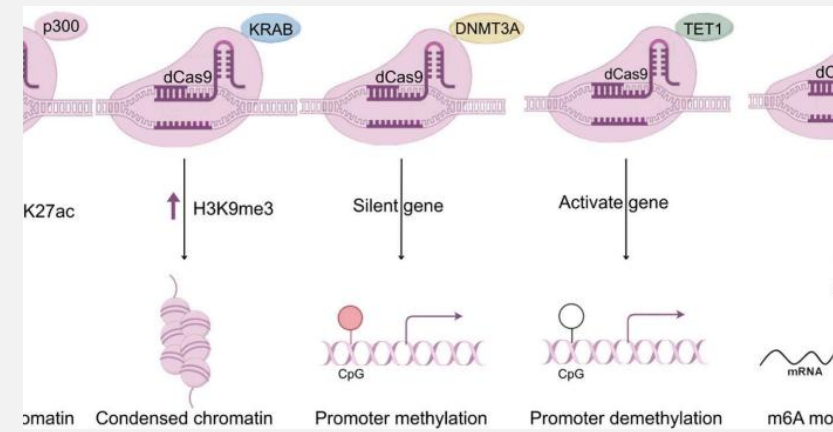
Minireview
Visualizing Live Chromatin Dynamics through CRISPR-Based Imaging Techniques
Narendra Chaudhary¹, Jae-Kyeong Im¹, Si-Hyeong Nho¹, Hajin Kim¹ ✉

Show more ▾

+ Add to Mendeley Share Cite

<https://doi.org/10.14348/molcells.2021.2254> [Get rights and content](#)

Under a Creative Commons license [Open access](#)



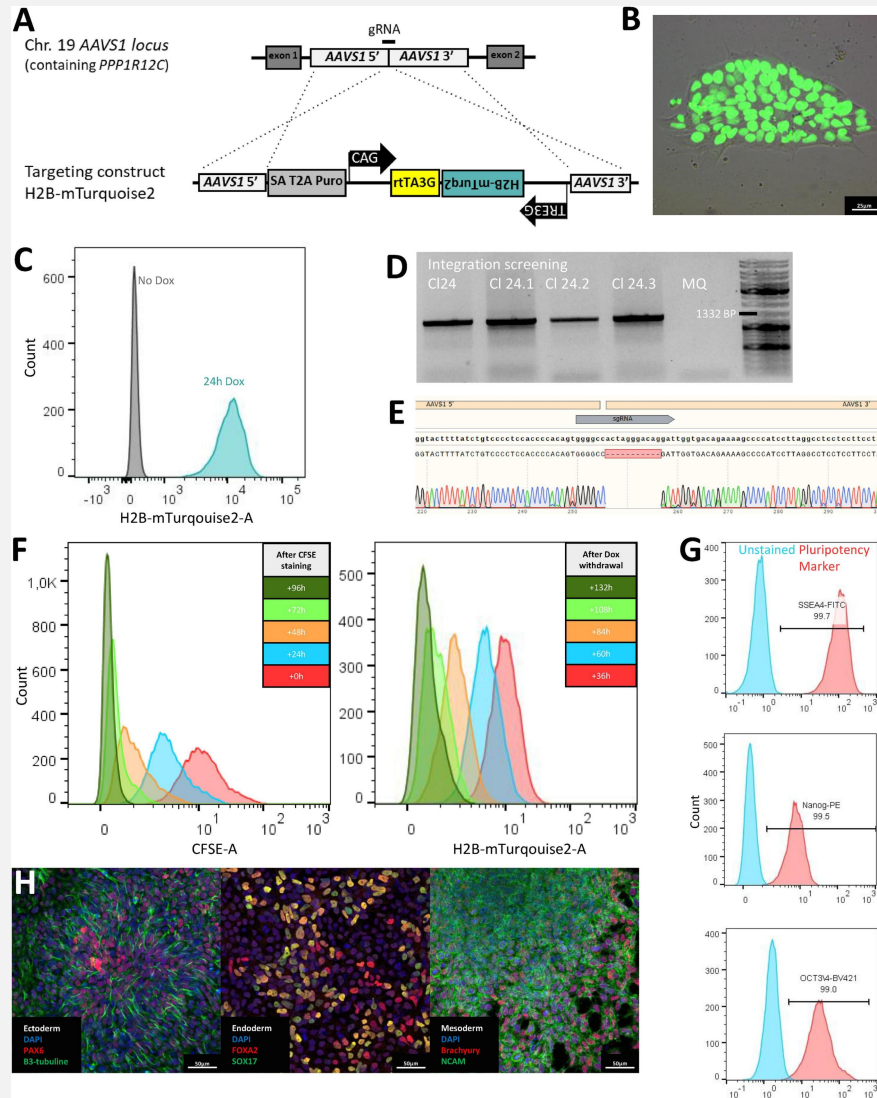
CRISPR成像技术与**表观遗传学**的结合，标志着我们能够在活细胞中实时、原位地可视化基因组的三维结构和动态变化，从而将静态的表观遗传标记与动态的基因调控功能直接联系起来

技术原理：传统的CRISPR-Cas9系统通过Cas9核酸酶切割目标DNA进行基因编辑。而用于成像的技术关键一步是使**Cas9 “失活”**。

在表观遗传学成像中的核心应用：**CRISPR成像技术**使研究人员能够直接观察**表观遗传状态**如何影响基因组的三维结构和功能。

CRISPR成像技术为表观遗传学研究提供了一副**“活细胞显微镜”**，使我们能够以前所未有的时空分辨率直接观察基因组的结构、动态及其调控机制。

3.5 细胞分化与发育



1

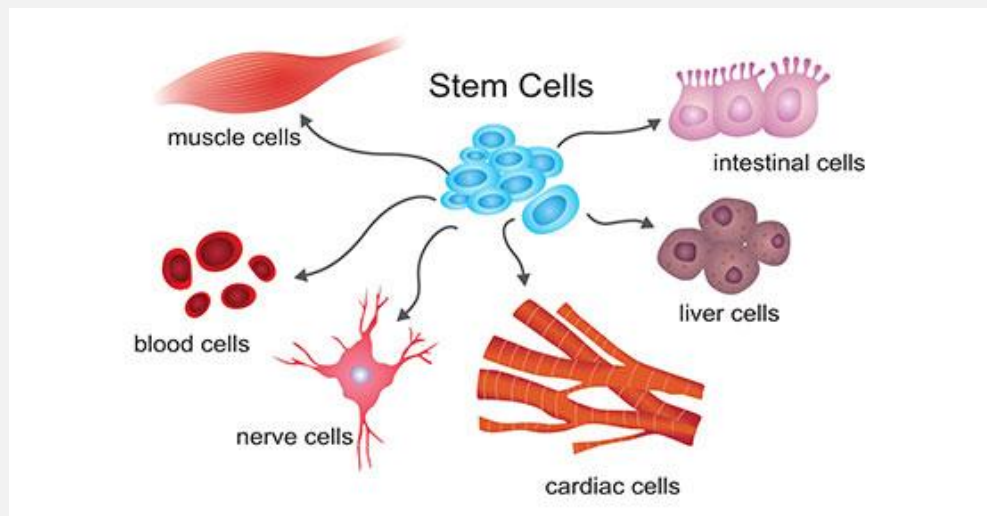
CRISPR成像技术通过**荧光标记**活细胞中的特定基因位点，实现对细胞分化与发育过程的实时、动态观测。该技术核心在于利用失活的Cas9蛋白（dCas9）作为可编程的**“DNA定位器”**，从而在不损伤DNA的前提下可**可视化**基因组的三维空间组织与动态变化。

2

eg. PAX3阳性发育阶段的细胞追踪与分裂分析：利用CRISPR/Cas9技术构建一个多能干细胞报告系统，用于**实时追踪**细胞在分化过程中的分裂行为与命运决定。

Therapeutic efficacy of CRISPR RNA nanoparticles on cervical cancer disease using ultrasound elastography imaging - ScienceDirect

3.5 细胞分化与发育



Contents lists available at [ScienceDirect](https://www.sciencedirect.com)

ELSEVIER

Stem Cell Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/scr

Lab Resource: Genetically-Modified Single Cell Line

Generation of LUMCi041-A-2: Equipping a PAX3 reporter iPSC line with doxycycline inducible H2B-mTurquoise2 for live cell imaging

C.H. Arendzen^{a,b,*}, U. Chaudhari^{a,b}, S.J. Cramer^c, C.M.A.H. Freund^{a,b}, C.L. Mummery^{a,b}, A. Ranga^d, O. Pourquie^e, H.M.M. Mikkers^{a,c}

^a LUMC hiPSC Core Facility, Leiden University Medical Center, Netherlands
^b Dept of Anatomy and Embryology, Leiden University Medical Center, Netherlands
^c Dept of Cell and Chemical Biology, Leiden University Medical Center, Netherlands
^d Dept of Biomechanics, KU Leuven, Belgium
^e Harvard Stem Cell Institute, Harvard Medical School, USA

Check for updates

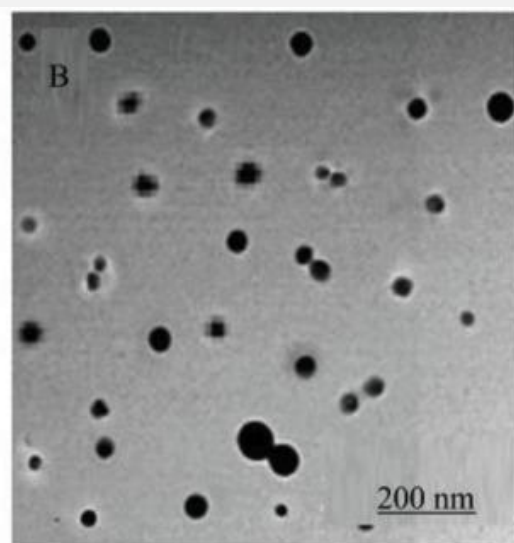
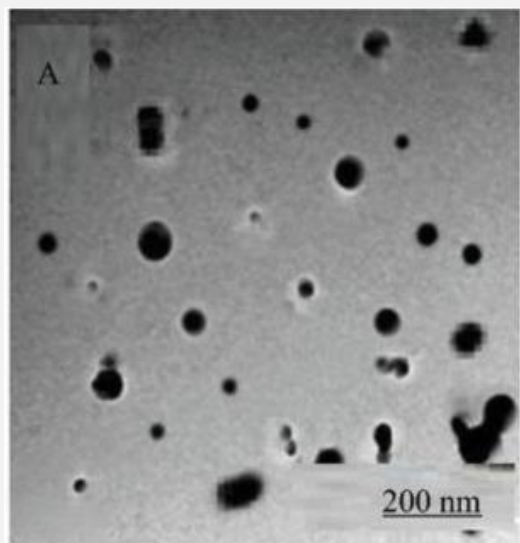
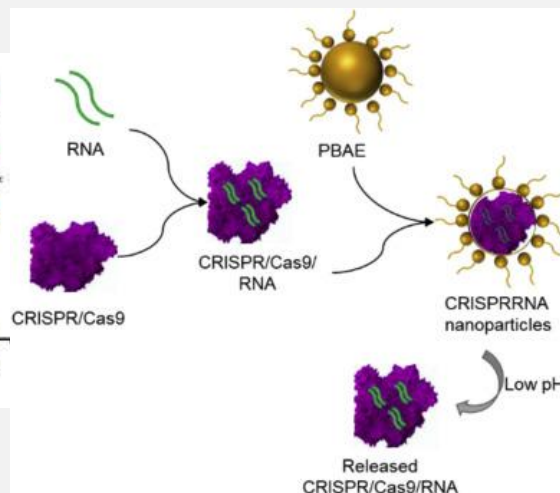
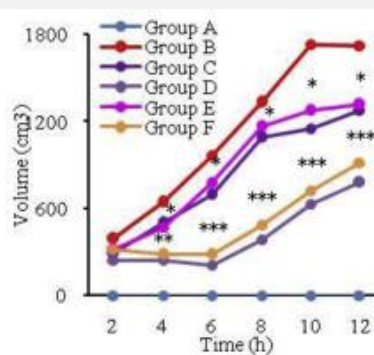
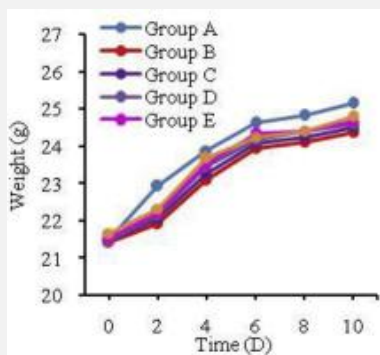
3

关键技术：使用CRISPR/Cas9在PAX3-Venus报告iPSC系的AAVS1安全位点精准插入一个多西环素诱导的H2B-mTurquoise2表达盒。H2B（组蛋白2B）与荧光蛋白融合后，可在细胞分裂过程中均匀分配至子细胞，从而实现细胞分裂的长期追踪。

4

该研究展示了CRISPR成像技术如何通过基因编辑构建荧光报告系统**，在干细胞分化与胚胎发育研究中实现细胞分裂追踪、空间定位与命运解析的动态观测。**

3.6 疾病机制研究



在**宫颈癌治疗**中CRISPR纳米颗粒的疗效与机制动态监测中，利用CRISPR RNA纳米颗粒靶向敲除HPV16 E7癌基因，并通过超声弹性成像动态评估治疗效果与肿瘤组织力学特性变化。

关键技术

- 构建PBAE/CRISPR16E7-GFP纳米颗粒，实现靶向递送与基因编辑。
- 使用**超声弹性成像**（测量应变比SR与剪切波速度SWv）实时、无创监测肿瘤组织硬度与结构变化。

CRISPR成像技术通过纳米颗粒递送系统与多模态影像学相结合，在疾病机制研究与治疗评估中实现基因编辑效果可视化、肿瘤力学特性动态监测与疗效机制关联分析，为**精准肿瘤治疗**提供新范式。

https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1687850724003832?pes=vor&utm_source=clarivate&getft_integrator=clarivate

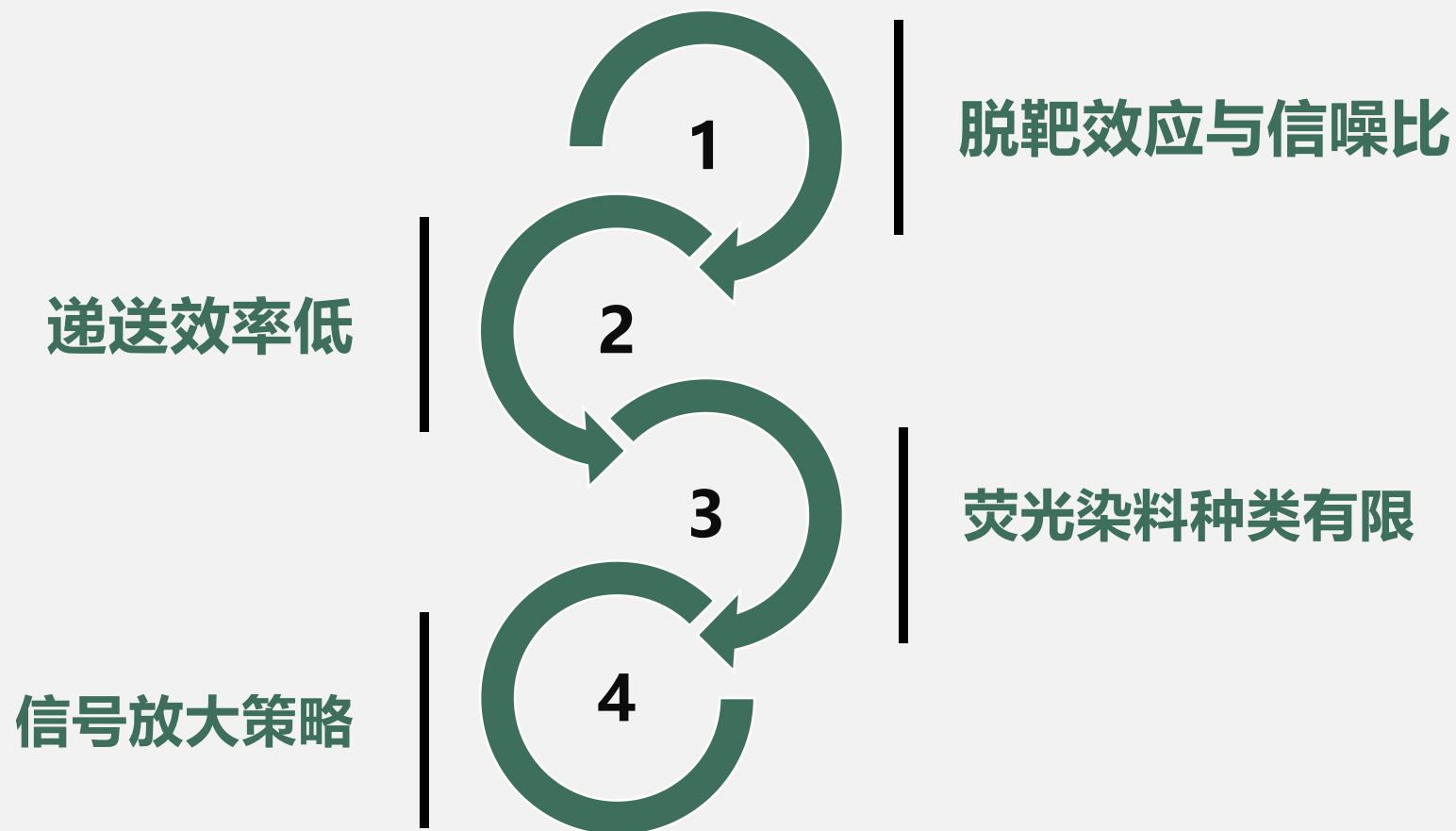


Part 4

挑战与前沿应用

挑战与前沿应用

CRISPR/Cas9 系统介导的原位成像在生物成像领域潜力巨大，在活细胞和固定细胞成像中优势独特。但仍面临一些技术上的挑战。





4.1 脱靶效应与信噪比

由于 CRISPR/Cas9 系统潜在的脱靶效应会导致细胞突变并产生不良影响。该脱靶效应在成像时会增加假阳性位点，而降低成像的信噪比。

此前，A-U碱基对翻转和扩展发夹结构策略已在改善信噪比和减少脱靶效应方面取得一定进展，但仍需进一步优化设计，以提高特异性和标记效率。

4.2 质粒和病毒载体递送效率低

由于 CRISPR/Cas9 系统最主要的递送形式为质粒和病毒载体，较低的递送效率以及外源DNA给机体带来潜在危害都限制了该技术的应用，开发递送效率更高、生物相容性更强、低毒性更低的 CRISPR/Cas9 活细胞成像系统势在必行。



4.3 荧光染料种类有限

首先，荧光分子可能会影响生物的正常功能，其次，激发荧光产生的高光子通量会带来光毒性损害细胞，以及长时程采集荧光图像不可避免地使光漂白性能影响成像质量。仍需在荧光分子生物相容性、抗光漂白、荧光量子产率等方面做出突破。

4.4 信号放大策略

现有的成像信号放大策略主要针对高重复和低重复序列，能够实现单拷贝非重复序列成像的方法仍较少。

4.5未来展望

优化sgRNA结构以提高成像系统的特异性和信号背景比

探索高效递送策略

开发高透膜性、光稳定性强、荧光亮度高的荧光分子

设计新型信号放大策略及推动临床应用展开

与超分辨显微技术、人工智能辅助图像分析等前沿技术深度融合

4.6前沿递送



斯坦福大学彦磊

CRISPR LiveFISH—如鱼得水

CRISPR LiveFISH (奠基性工作, 2019)

首次提出概念, 验证了该方法可广泛应用于活细胞追踪DNA断裂、染色体异位, 并同时成像DNA与RNA。

Oligo-LiveFISH (2025)

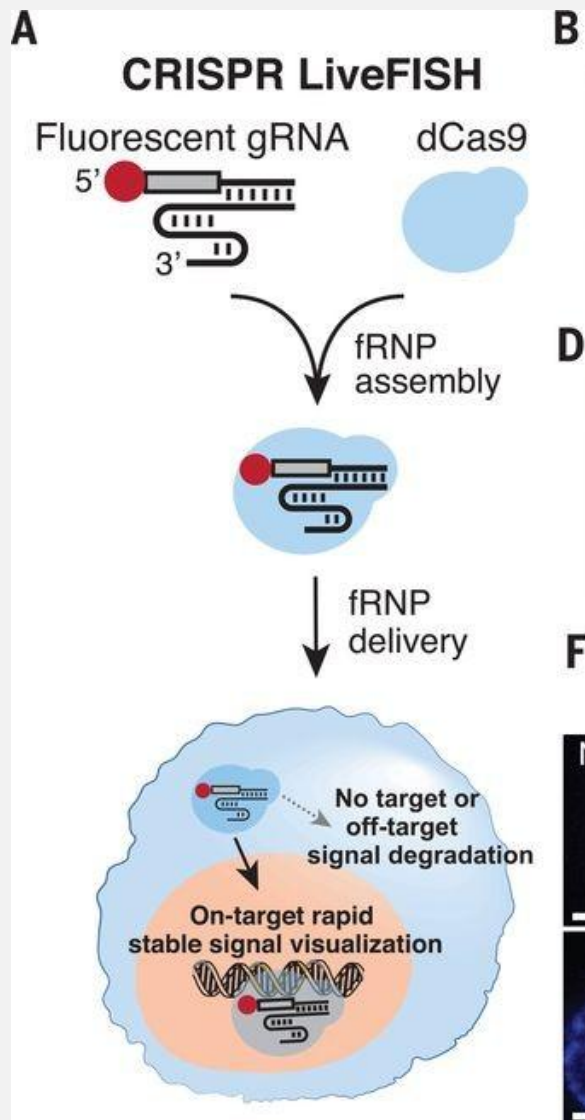
结合高通量设计的寡核苷酸库和超分辨率显微镜, 实现对非重复序列高时空分辨率 (纳米级) 的实时追踪。

CRISPR PRO-LiveFISH (2025)

在sgRNA中引入人工合成碱基进行特异标记, 实现了更灵敏的多通道 (可达6色) 成像, 且仅需约10条sgRNA即可标记非重复序列。

SiCLAT (2025)

在活细胞中同时、实时地观察染色质三维结构 (特别是增强子-启动子环) 和基因的转录活动。





4.6前沿递送



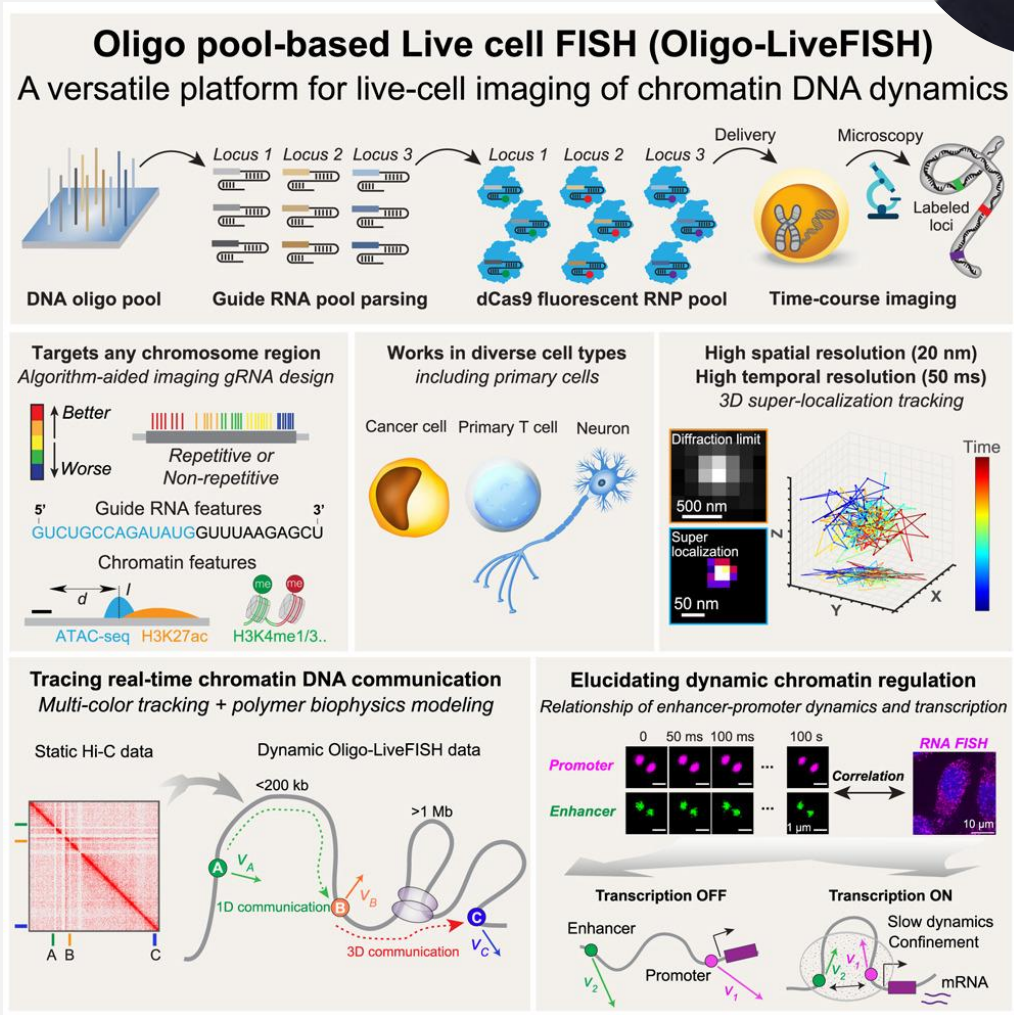
CRISPR LiveFISH—如鱼得水

CRISPR LiveFISH (奠基性工作, 2019)
首次提出概念, 验证了该方法可广泛应用于活细胞追踪DNA断裂、染色体异位, 并同时成像DNA与RNA。

Oligo-LiveFISH (2025)
结合高通量设计的寡核苷酸库和超分辨率显微镜, 实现对非重复序列高时空分辨率 (纳米级) 的实时追踪。

CRISPR PRO-LiveFISH (2025)
在sgRNA中引入人工合成碱基进行特异标记, 实现了更灵敏的多通道 (可达6色) 成像, 且仅需约10条sgRNA即可标记非重复序列。

SiCLAT (2025)
在活细胞中同时、实时地观察染色质三维结构 (特别是增强子-启动子环) 和基因的转录活动。



4.6 前沿递送

清华大学王海峰



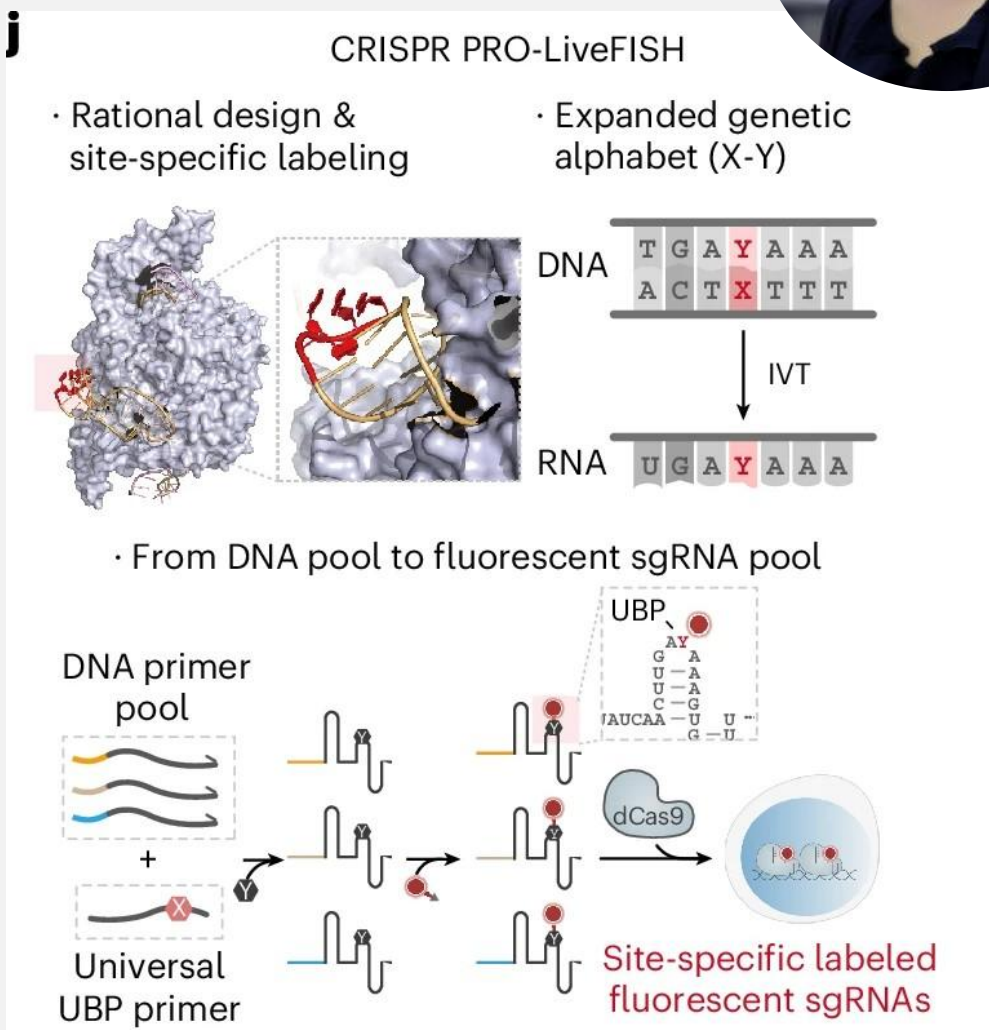
CRISPR LiveFISH—如鱼得水

CRISPR LiveFISH (奠基性工作, 2019)
首次提出概念, 验证了该方法可广泛应用于活细胞追踪DNA断裂、染色体异位, 并同时成像DNA与RNA。

Oligo-LiveFISH (2025)
结合高通量设计的寡核苷酸库和超分辨率显微镜, 实现对非重复序列高时空分辨率 (纳米级) 的实时追踪。

CRISPR PRO-LiveFISH (2025)
在sgRNA中引入人工合成碱基进行特异标记, 实现了更灵敏的多通道 (可达6色) 成像, 且仅需约10条sgRNA即可标记非重复序列。

SiCLAT (2025)
在活细胞中同时、实时地观察染色质三维结构 (特别是增强子-启动子环) 和基因的转录活动。



4.6前沿递送



生物岛朱大海

CRISPR LiveFISH—如鱼得水

CRISPR LiveFISH (奠基性工作, 2019) 首次提出概念, 验证了该方法可广泛应用于活细胞追踪DNA断裂、染色体异位, 并同时成像DNA与RNA。

Oligo-LiveFISH (2025)

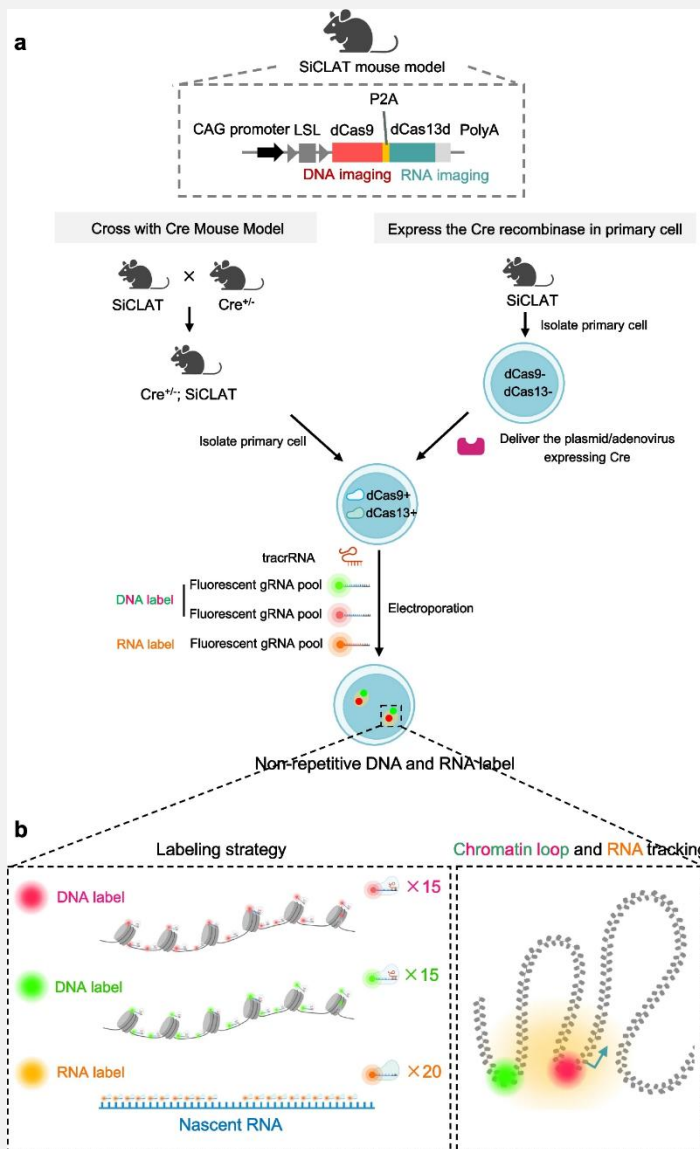
结合高通量设计的寡核苷酸库和超分辨率显微镜, 实现对非重复序列高时空分辨率 (纳米级) 的实时追踪。

CRISPR PRO-LiveFISH (2025)

在sgRNA中引入人工合成碱基进行特异标记, 实现了更灵敏的多通道 (可达6色) 成像, 且仅需约10条sgRNA即可标记非重复序列。

SiCLAT (2025)

在活细胞中同时、实时地观察染色质三维结构 (特别是增强子-启动子环) 和基因的转录活动。



LiveFISH-如鱼得水



见“鱼”之形：技术突破，将基因组观测从固定的“标本切片”升级为活细胞中的“动态直播”，首次能实时追踪DNA/RNA运动。

得“水”之境：在细胞生命活动的“原生环境”中成像，揭示最真实的染色质动态与基因调控，避免人工假象。

驭“水”之力：成为强大工具，赋能前沿研究，如解码增强子-启动子互作机制、追踪染色体异常动态，直接验证关键生物学假说。

附录：参考文献

- [1]Chen B, 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.
- [2]Qi LS, Larson MH, Gilbert LA, et al. Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression. *Cell*. 2013,152(5):1173–1183.
- [3]Ma H, 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.
- [4]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.
- [5]Ma H, Tu LC, Naseri A, et al. Multiplexed labeling of genomic loci with dCas9 and engineered sgRNAs using CRISPRainbow. *Nat Biotechnol*. 2016,34(5):528–530
- [6]Yang LZ, Wang W, Li SQ, et al. Dynamic imaging of RNA in living cells by CRISPR-Cas13 systems. *Mol Cell*. 2019, 76(6):981–997.e7.
- [7]Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Essletzbichler P, et al. RNA targeting with CRISPR-Cas13. *Nature*. 2017, 550(7675):280–284.
- [8]Los GV, Encell LP, McDougall MG, et al. HaloTag: a novel protein labeling technology for cell imaging and protein analysis. *ACS Chem Biol*. 2008,3(6):373–382

附录：参考文献

- [9]康玥, 廖雪瑶, 谭向宇, 等. CRISPR/Cas9系统活细胞成像技术进展(特邀). 《红外与激光工程》, 2022, 51(11): 141-148.
- [10]Wang, H., Nakamura, M., Abbott, T. R., et al. CRISPR-mediated live imaging of genome editing and transcription. *Science*. 2019, 365(6459): 1301–1305.
- [11]Gu, B., Swigut, T., Spencley, A., et al. High-resolution dynamic imaging of chromatin DNA communication using Oligo-LiveFISH. *Cell*, 2018, 173(7): 1818–1832.e21.
- [12]Liu, M., Huang, K., Zhang, J., et al. CRISPR live-cell imaging reveals chromatin dynamics and enhancer interactions at multiple non-repetitive loci. *Nature Biotechnology*, 2025.
- [13]Liao, Z., Li, S., Wang, Y., et al. “SiCLAT: simultaneous imaging of chromatin loops and active transcription in living cells.” *Genome Biology*, 2024, 25: 225.
- [14]Xia, C., Colognori, D., Jiang, X. S., Xu, K., & Doudna, J. A. “Single-molecule live-cell RNA imaging with CRISPR–Csm.” *Nature Biotechnology*, 2025, 43: 2023–2030.
- [15]Arendzen, C. H., Chaudhari, U., Cramer, S. J., Freund, C. M. A. H., Mummery, C. L., Ranga, A., Pourquie, O., & Mikkers, H. M. M. “Generation of LUMCi041-A-2: Equipping a PAX3 reporter iPSC line with doxycycline inducible H2B-mTurquoise2 for live cell imaging.” *Stem Cell Research*, 2021, 57: 102592.

附录：参考文献

- [16]Wu X, Mao S, Ying Y, et al. Progress and challenges for live-cell imaging of genomic loci using CRISPR-based platforms. *Gen Prot Bioinfo*. 2019.,7(2):119–128.
- [17]Deng W, Shi X, Tjian R, et al. CASFISH: CRISPR/Cas9-mediated in situ labeling of genomic loci in fixed cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015, 112(38):11870–11875.
- [18]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.
- [19]Ma Y, Wang M, 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.
- [20]Wang M, Chen K, Wu Q, et al. RCasFISH: CRISPR/dCas9-mediated in situ imaging of mRNA transcripts in fixed cells and tissues. *Anal Chem*. 2020, 92(3):2468–2475.
- [21]Mikuni T, Nishiyama J, Sun Y, et al. High-throughput, high-resolution mapping of protein localization in mammalian brain by in vivo genome editing. *Cell*. 2016, 165(7):1803–1817.
- [22]Suzuki K, Tsunekawa Y, Hernandez-Benitez R, et al. In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration. *Nature*. 2016. 540(7631):144–149



西北农林科技大学
NORTHWEST A&F UNIVERSITY

西北农林科技大学2023级农学院

演示完毕 感谢垂听!

CRISPR成像

组长：梁馨匀 组员：刘天岚 葛采琳 金紫悦 胡涵楚

