

Nature子刊:科学家利用荧光光镊系统对Cas9脱靶效应进行实时可视化评估

CRISPR-Cas9作为一种有效的基因编辑方法，在疾病预防与治疗中具有巨大的潜能，但是在临床转化中必须要考虑到它的脱靶效应。传统的生物学手段如电泳或测序等，虽然也可以用来研究Cas9的靶向性，但是其结果大多数为静态的、平均的。2019年3月发表在Nature Structural and Molecular Biology期刊上的最新文章，采用最新的荧光光镊技术，利用光镊操纵DNA模板，结合共聚焦荧光显微成像系统，实现了在单分子水平动态的观察Cas9对目的基因的靶向编辑。结果表明，当DNA松弛时，CRISPR的编辑具有特异性，但是当DNA被拉伸时，CRISPR编辑准确性降低，并出现脱靶编辑，其脱靶的概率随着受力的增加而增加。这项研究将有助于设计具有更高准确度的CRISPR系统。

深入了解单分子的相互作用有助于科学家更好地回答最基本的生命科学问题。如何在单分子水平开展生物分子的动态研究也是单分子生物物理领域的一个难题。原子力显微镜、光镊等单分子操纵技术的出现使得这种研究成为了可能。

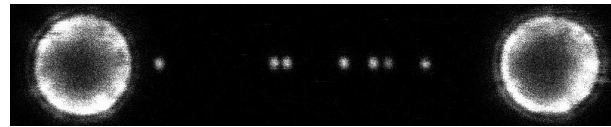


图1：荷兰LUMICKS公司研发的C-Trap荧光光镊系统采用双光镊+荧光共聚焦成像技术，是研究单分子互作的有力工具！

LUMICKS荧光光镊系统最新表面成像解决方案：Surface Assay Toolkit。除了和共聚焦显微成像系统联用，LUMICKS最新推出了IRM、WD&TIRF成像系统的解决方案，将单分子的研究拓展到了细胞学水平！

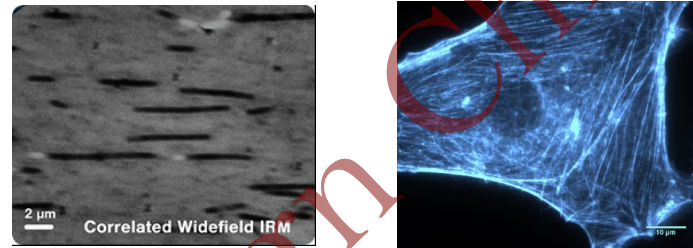


图2：左：利用IRM (interference reflection microscopy) 技术无需标记即可实时观察微管微丝的形态，背景噪声极低，适用于细胞骨架的动态捕获。结合IRM和TIRF可实时观测微丝、马达蛋白以及其他蛋白的动态变化。右：结合表面的荧光成像手段（宽场照明Widefield和全内反射照明TIRF），可以对生物样品进行快速成像，适用于细胞与分子相互作用等研究。

荧光光镊系统的出现使得科学家可以更加简单地进一步一系列单分子的研究，如DNA复制、转录、翻译过程中与蛋白的相互作用；蛋白等小分子的构象变化；细胞骨架与细胞内物质转运；小分子与蛋白互作等。

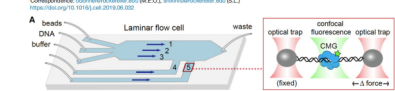
作者：尹晓南工程师

刘诗欣团队揭示真核解旋酶在DNA复制起始和重启中的关键“门控”作用

2019年7月25日，来自洛克菲勒大学的刘诗欣和Michael O'Donnell实验室合作在Cell杂志上发表了长文文章Replication Fork Activation Is Enabled by a Single-Stranded DNA Gate in CMG Helicase，报道了CMG解旋酶在单链和双链DNA之间的结合切换中存在一种类似“门控”的机制。这一重要发现通过重组表达一系列带有荧光标记的真核DNA复制相关蛋白质，并使用最先进的能结合双光镊、多色荧光共聚焦显微镜和自动微流控系统多种先进技术的单分子仪器C-Trap来完成。

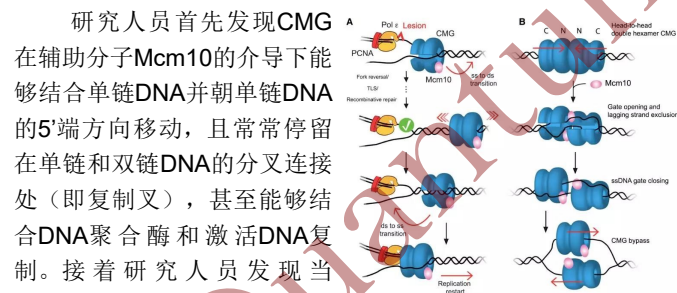
Article 图1：C-Trap 工作示意图

Replication Fork Activation Is Enabled by a Single-Stranded DNA Gate in CMG Helicase



借助C-Trap，研究人员可以在一小块微流池中分别注入含有不同实验材料的溶液，将珠子、DNA及不同蛋白进行体外组装和DNA复制的动态研究。首先研究人员将单个DNA分子锚定在两个由激光束捕获控制（光阱）的珠子之间，并通过光阱控制两个珠子的移动而拉伸DNA以观察荧光标记的复制体沿着DNA的移动过程；然后通过进一步增加两个珠子之间的距离来增强拉力，一部分dsDNA能够被打开形成两股ssDNA，从而在体外形成DNA复制叉结构。同时，研究人员能够使用荧光标记的ssDNA结合蛋白标记融化区域，从而能直观地区分ssDNA和dsDNA区域。这样，不同荧光染料标记的复制体成份如CMG解旋

酶在不同DNA区域移动时就能被实时动态跟踪，并能结合多维测量数据以分析单分子水平的分子相互作用。



研究人员首先发现CMG在辅助分子Mcm10的介导下能够结合单链DNA并朝单链DNA的5'端方向移动，且常常停留在单链和双链DNA的分叉连接处（即复制叉），甚至能够结合DNA聚合酶和激活DNA复制。接着研究人员发现当CMG-Mcm10不能结合到DNA聚合酶时，CMG也不再锚定在复制叉位置，而是可以沿着复制叉附近dsDNA快速扩散移动；同样在dsDNA上移动的CMG也可以重新回到复制叉位置，结合ssDNA并能重新形成有功能的复制体合成新的DNA。研究人员把CMG这种在结合双链DNA和复制叉处单链DNA时表现出不同功能状态的内在转变调节为“门控（gating）”机制。这一发现可以解释CMG在Mcm10的介导下，在复制起始过程中如何从dsDNA弥散移动的状态转变为锚定在单链复制叉的状态。此外，CMG中新发现的“门控”机制也为DNA复制重启提供了一种可能机制，CMG的来回移动寻找邻近的复制叉可以介导复制体在DNA损伤修复后重新形成。

作者：尹晓南工程师

DSMMC| 第一届动态单分子领域盛会在津圆满完成

“2019 第一届动态单分子研讨会 Dynamic Single-molecule Meeting”于 2019 年 6 月 22 日 - 23 日在天津融侨套房假日酒店召开。会议围绕 DNA-蛋白相互作用、蛋白核酸构象变化、细胞骨架及物质转运等主题开展学术交流活动，共吸引了来自国内外 40 余所相关科研机构的科研人员参加。中国科学院物理所李明教授、中科院化学所方晓红教授、新加坡国立大学严洁教授、Yale University 张永利教授、University of British Columbia 李宏斌教授、吉林大学张文科教授、中科院生物物理所姜继忠教授、清华大学欧光朔教授等进行了大会主题报告。



图1：2019第一届动态单分子研讨会合影

本次会议由荷兰 Lumicks 公司以及 Quantum Design 中国子公司共同举办。Lumicks 专注于单分子领域技术研发数十年，其主打产品荧光光镊系统推出至今，以其稳定的性能，超高的分辨率，以及在单分子水平荧光成像等优势，得到了用户的广泛好评。

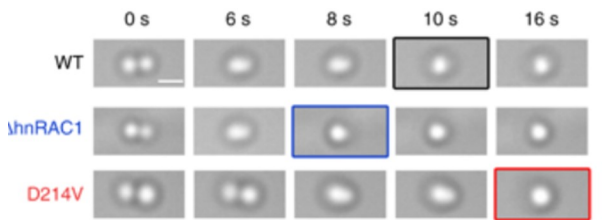


图2：利用光镊研究蛋白相分离

2019 年以来国内外陆续有很多高水平文章见刊：Cong Liu et al. Structural basis for reversible amyloids of hnRNP1 elucidates their role in stress granule assembly. Nature Communications, 2019. 该工作发现了一类新的可逆淀粉样纤维核心结构，阐释了可逆淀粉样纤维对于蛋白相分离的重要调控作用，并探究了可逆纤维在病理条件下由于突变导致不可逆淀粉样纤维形成的结构基础，为理解蛋白相分离紊乱引起的相应疾病的发病机理提供分子理论依据。

作者：尹晓南工程师

老品牌·新王者| Nanoanalytics跨膜电阻检测仪家族再添一员

德国 Nanoanalytics 是一家专业从事表面、界面和微观分析领域材料表征的公司，他们拥有自己的研发团队和实验室，研发的产品极具稳定性和创新性，并且在生命科学的微观检测领域也有着很多核心产品。其中，实时无标记检测细胞跨膜电阻仪（cellZscope）自发明以来，便广受细胞屏障（消化道、呼吸道、血脑屏障）、药物转运、纳米药物研发、中枢神经系统疾病、肿瘤等领域研究者的认可，并助力用户在顶级期刊中发表多篇学术论文（PNAS、Cell Rep.等），写信至 info@gd-china.com 获取学术论文清单。



图1：Nanoanalytics 实时无标记细胞动态分析仪

cellZscope E 型号仪器做为 Nanoanalytics 家族的一员，具有全自动实时动态检测跨膜电阻的功能、6 通道实时无标记测量，可兼容不同大小的 transwell 培养皿等特点。一经推出即获得国内外客户的一致好评。对于通量要求不高的用户，它无疑是最佳利器。

2020 年也是 Nanoanalytics 成立 20 周年之际，该公司又将重磅推出一款“王者级产品”：cellZscope 3 型号仪器。



图3：cellZscope 3

cellZscope 3 具有超高速测量（24 孔的时间分辨率小于 30 秒），可将最多四个细胞模块连接到一个控制器，可完成平行测量 96 孔细胞样本等优势。

在屏障研究中，将大大提高研究样本的通量，尤其是在药物研发中，96 孔通量可以进行一定程度的药物筛选，这也将进一步拓展 cellZscope 型号仪器的应用，包括：细胞屏障（血脑屏障、鼻黏膜及消化道屏障等）的特性、紧密连接动力学、新型药物研发、药物或毒物对细胞屏障功能的影响、肿瘤侵袭转移、免疫细胞在中枢神经系统疾病中的作用。

作者：王世强工程师