

揭示非编码RNA的多种功能作用

概述

- 生物体存在许多类型的非编码RNA, 例如核糖体RNA、转运RNA、长链非编码RNA以及各种microRNA
- 非编码RNA在基因调控和疾病发展中发挥重要的生物学功能, 但大多数非编码RNA的作用在很大程度上仍然未知
- 全转录组测序是一种识别和探索非编码RNA的功能的全面分析方法

简介

总RNA样品由多种类型的转录本组成, 包括编码和非编码RNA。信使RNA (mRNA) 是总RNA的编码部分, 仅占总RNA群体的1-4%, 其余通常被认为是非编码RNA。非编码RNA (ncRNA) 指未翻译成蛋白质的RNA, 并且多种类型的ncRNA具有多种生物学功能[1] (图1)。这些类型包括核糖体RNA (rRNA)、转运RNA (tRNA)、长链非编码RNA (lncRNA; 未翻译成蛋白质的长于200个核苷酸的转录本), 以及许多较小的ncRNA, 如microRNA (miRNA)、核小RNA (snRNA)、小干扰RNA (siRNA)、与piwi蛋白相互作用RNA (piRNA)、核仁小分子RNA (snoRNA) 和small Cajal body-specific RNA (scaRNA)。编码ncRNA的DNA序列通常称为“RNA基因”。不同类型的ncRNA的相对量在不同物种和细胞类型之间

的差异很大。其中最普遍的是rRNA, 其通常占总RNA群体的80-95%。剩余的ncRNA的量很小, 因此可能需要更大的样本量或富集过程才能获得足够进行研究的材料。目前, 已确定的ncRNA有数千种, 并且认为还有更多种尚未发现^[1]。

ncRNA可在各种生物学过程中起到关键作用。大多数ncRNA

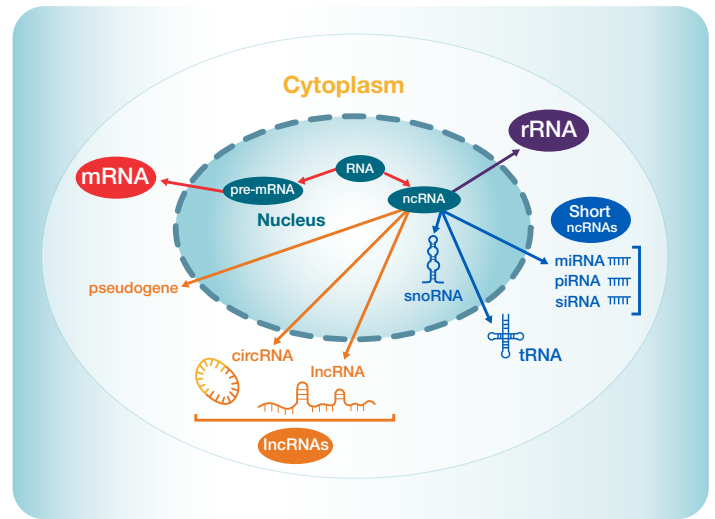


图1.非编码RNA的类型以及它们在典型真核细胞内的相应位置。

似乎都参与转录或翻译过程,并且它们在健康和疾病状态中都非常重要。例如抑制翻译、维持染色体的完整性、调控蛋白质活性、引发mRNA降解、形成多种核糖核蛋白复合物(如剪接体),甚至起转录共激活因子的作用^[2]。自闭症、阿尔茨海默病、某些类型的癌症和Prader-Willi综合征等都被认为是由不同类型ncRNA的功能障碍而引发的疾病。miRNA通过与靶标mRNA结合来调控基因表达,与急性淋巴细胞白血病的发病有关^[3, 4]。Prader-Willi综合征是一种发育障碍,由C/D box snoRNA SNORD116的缺失引起^[5]。

研究ncRNA的功能

现在可使用一些有效的方法来鉴定和研究ncRNA的功能。对ncRNA的检测取决于对转录组的精细分析。基于NGS的方法,例如使用RNA-Seq的全转录组测序,可用于检测ncRNA。RNA-Seq可以表征新的RNA种类并快速且经济地分析基因表达模式^[6]。这一技术可用于定位基因组中ncRNA起源的位置、ncRNA在细胞中发挥功能的位置以及可能和它们相关的情况或过程。

假基因

假基因是一类独特的DNA序列,可能具有生物学意义。它们是含有提前终止密码子或移码突变的亲本基因的拷贝。通常,假基因的预测是基于与已知功能基因的相似性,并且它们偶尔可以产生ncRNA。例如,假基因Lethe产生的lncRNA可以抑制RelA与NF-κB基因启动子结合的能力^[7]。此外,某些假基因还可被翻译,而它们的表达倾向局限于某种组织或细胞,而不是普遍表达——以凸显可能的功能作用。对人类蛋白质组的详细分析发现,由140个假基因编码的200多种多肽被翻译,但所得到的蛋白质产物的功能在很大程度上仍然未知^[8]。

转录起始位点

转录起始位点(TSS)的鉴定非常重要,因为蛋白质产物比基因要多得多,这是由于选择性TSS生成蛋白亚型的结果。对选择性TSS的基因作图变得非常必要,以便了解亚型多样性以及基因调控。基因间TSS的鉴定涉及到对转录组的详细分析,其可以帮助鉴定新的ncRNA并检测它们的生物相关性。选择性TSS可发生在不同的细胞条件——存在疾病时或在不同的发育阶段——并且它们可以表现出组织或细胞特异性。RNA-Seq可以提供快速的全基因组方法来确定TSS,从而能够在不同细胞类型之间,多种条件之间,甚至在不同疾病状态期间进行比较。

ncRNA数据库和相关资源

目前已经存在许多高质量的ncRNA数据库,显示出了它们的重要性以及这一领域知识的快速增长(表1)。大多数资源均提供开放权限,并且包括来自许多不同生物的多种ncRNA的数据。技术的快速发展使得能够对数千种新的ncRNA进行鉴定和功能评价,并且预计在不久的将来需要更多的数据库和资源来整理和存储这些信息。

表1.ncRNA数据库示例

数据库	关注领域	版本
NONCODE	关注ncRNA的综合数据库(不包括tRNA和rRNA)	v5.0(2018年8月)
RNAcentral	一系列lncRNA数据库的中央数据库	各种各样
lncRNome	人类lncRNA的生物学知识库	GENCODE v12(2018年8月)
Lnc2Cancer	lncRNA与人类癌症关联的实验支持数据库	v2.0(2018年8月)
Nervous System Disease NcRNAome Atlas	ncRNA与神经系统疾病(NSD)关联的实验支持数据库	2017年5月

结果

为了确定一系列RNA文库制备方法中不同种类非编码RNA的表征, 根据制造商的说明从1000ng人脑参考RNA中制备RNA文库, 然后在Illumina™ HiSeq™ 4000系统上进行测序。使用QoRTs软件进行分析以检测不同种类RNA的表征[9] (图2)。Invitrogen™ Collibri™ 链特异性RNA文库制备试剂盒 (用于Illumina平台) 和NEBNext™ Ultra™ II RNA文库制备试剂盒构建的文库显示了最好的lncRNA覆盖率。使用Collibri试剂盒得到的文库中表现最丰富的lncRNA类型是反义RNA和lncRNA。对于较短的ncRNA, 使用Collibri试剂盒制备的文库中包含snRNA、snoRNA和miRNA (图2); 尤其是, snoRNA的测序reads比所测试的其它文库制备试剂盒的结果更好。

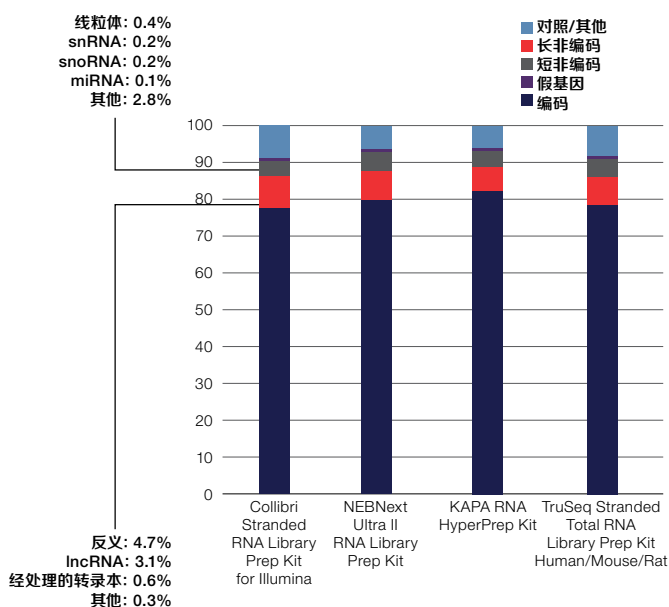


图2. 四种不同的文库制备方法中ncRNA的结果表现。根据制造商提供的说明, 从1000ng人脑RNA中制备RNA文库。通过使用QoRTs软件分析测定不同RNA种类的结果表现。

结论

- 目前已确定了数以千计的ncRNA; 其中一些具有生物学意义, 但仍有大多数ncRNA有待表征
- ncRNA的表征依赖于对转录组的详细分析, 这可以通过基于NGS的方法来有效实现
- RNA-Seq可以提供转录组的全面分析, 从而能够发现新的ncRNA及其在健康和疾病状态中的生物学作用

参考文献

1. Palazzo AF, Lee ES (2015) Non-coding RNA: what is functional and what is junk? *Front Genet* 6:2.
2. Fu X-D (2014) Non-coding RNA: a new frontier in regulatory biology. *Nat Sci Rev* 1:190-204.
3. Ultimo S, Martelli AM, Zauli G et al. (2017) Roles and clinical implications of microRNAs in acute lymphoblastic leukemia. *J Cell Physiol* 233:5642-5654.
4. Luan C, Yang Z, Chen B (2015) The functional role of microRNA in acute lymphoblastic leukemia: relevance for diagnosis, differential diagnosis, prognosis, and therapy. *Onco Targets Therapy* 8:2903-2914.
5. Sahoo T, del Gaudio D, German JR et al. (2008) Prader-Willi phenotype caused by paternal deficiency for the HBII-85 C/D box small nucleolar RNA cluster. *Nat Genet* 40:719-721.
6. Hrdlickova R, Toloue M, Tian B (2017) RNA-Seq methods for transcriptome analysis. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 8(1).
7. Rapicavoli NA, Qu K, Zhang J et al. (2013) A mammalian pseudogene lncRNA at the interface of inflammation and anti-inflammatory therapeutics. *eLife* 2:e00762.
8. Kim M-S, Pinto SM, Getnet D et al. (2014) A draft map of the human proteome. *Nature* 509:575-581.
9. Hartley SW, Mullikin JC (2015) QoRTs: a comprehensive toolset for quality control and data processing of RNA-Seq experiments. *BMC Bioinformatics* 16:224.

订购信息

产品	数量	货号
RNA测序		
Collibri链特异性RNA文库制备试剂盒 (用于Illumina平台)*	24次制备	A38994024
	96次制备	A38994096
Collibri链特异性RNA文库制备试剂盒 (用于Illumina平台, 包含H/M/R rRNA去除试剂盒)*	24次制备	A39003024
	96次制备	A39003096
ERCC RNA Spike-In Mix	1个试剂盒	4456740
ERCC ExFold RNA Spike-In Mix	1个试剂盒	4456739
文库定量		
Collibri文库定量试剂盒*	100次反应	A38524100
	500次反应	A38524500
Qubit 4 荧光计	1个荧光计	Q33226
Qubit 1X dsDNA HS检测试剂盒	100次检测	Q33230
Qubit 4 NGS Starter Kit	1盒	Q33228
文库扩增		
Platinum SuperFi文库扩增预混液	50次反应	A38539050
	250次反应	A38539250
Platinum SuperFi文库扩增预混液, 包含引物混合物*	50次反应	A38540050
	250次反应	A38540250
Applied Biosystems™ 配套仪器和耗材		
Veriti 96孔热循环仪	1台仪器	4375786
ProFlex 96孔PCR系统	1台仪器	4484075
MicroAmp EnduraPlate光学96孔透明反应板, 带条形码	20块板	4483354
MicroAmp光学96孔反应板	10块板	N8010560
MicroAmp透明粘性封板膜	100张	4306311
MicroAmp 8联管, 带圆顶管盖, 0.2 mL	125条	A30589

*并非所有国家均提供所有试剂盒。

Find out more at thermofisher.com/collibri



赛默飞
官方微信



赛默飞
生命科学官方微信

免费服务电话: 800 820 8982/400 820 8982
信息咨询邮箱: cnbidmarketing@thermofisher.com

Thermo Fisher
SCIENTIFIC