

# 选择总RNA测序还是mRNA测序

## 概述

- 实验目的决定RNA测序方法的选择: 全转录组vs.基因表达
- 总RNA测序提供最全面的全转录组分析
- 如果研究真核生物且仅关注编码区域, 并且可获得的起始材料有限, 则mRNA测序是理想的方案

## 简介

RNA测序 (RNA-Seq) 是分析细胞转录组的强大而全面的方法。使用这一技术能够在特定时间点对生物样本中的多种RNA进行定性和定量检测。RNA-Seq的应用范围很广, 从细胞结构和功能的基础研究到临床样本中各种疾病状态的检测分析。例如, 可以比较治疗干预前后的基因表达变化以确定疾病是否存在。也可以使用RNA-Seq检测选择性剪接模式、转录后修饰以及外显子-内含子边界。所获得的数据可以为基本的细胞机制、基因组结构、疾病诱导效应等提供有价值的信息<sup>[1]</sup>。

RNA-Seq过程围绕着用于测序的互补DNA (cDNA) 文库的构建。文库构建始于细胞RNA的分离, 然后通过质控检测以确定RNA的完整性。随后, 可以利用去除法或筛选法富集文库中的目标RNA。然后在测序前将RNA逆转录成cDNA。虽然近年来

的研究进展使得RNA的直接测序在商业上变得可行, 但是通常情况下, 实际被测序的分子是DNA而不是RNA, 尽管“RNA-Seq”这一名称可能暗含直接对RNA测序之意<sup>[2]</sup>。

该使用总RNA-Seq或还是mRNA-Seq取决于实验的目的, 两种方法之间存在一些重要差异。总RNA-Seq (也称为全转录组测序) 是最全面的方法, 通常涉及对编码和非编码的所有RNA分子进行测序。此篇技术指南中, 总RNA-Seq是指对已去除核糖体RNA (rRNA) 的RNA进行测序, 其中包含多种RNA分子 (表1)。总RNA在最初分离后是由多种RNA组成, 包括rRNA、前体信使RNA (pre-mRNA)、信使RNA (mRNA) 以及多种类型的非编码RNA (ncRNA), 如转运RNA (tRNA)、microRNA (miRNA) 和长片段非编码RNA (lncRNA; 未翻译成蛋白质的长于200个核苷酸的转录本) [1]。在总RNA-Seq过程中去除rRNA可获得高质量的测序数据, 可对其它各种不同的非rRNA种类进行表征鉴定。

如果研究目标是真核生物并且主要关注编码区域, 则mRNA-Seq是更好的选择。mRNA-Seq方案使用筛选方法来富集多聚腺苷酸化 (poly (A)) RNA。mRNA仅占总RNA分子中的一

小部分(表1), 因此如果仅对mRNA测序即可满足总体实验目标, 则mRNA-Seq是最有效且最划算的方法。表1中比较了不同的RNA类型, 并提供了选择总RNA-Seq还是mRNA-Seq的建议指南。

### 样本富集法或去除法

在总RNA-Seq和mRNA-Seq方案中, 通过核糖体去除或者mRNA富集均可提高测序数据质量<sup>[3]</sup>。两种方法能够使得仅对目标RNA分子进行测序, 并最大限度地减少测序reads的浪费。rRNA占总RNA的80-90%, 一般通过去除法将rRNA除去(表1)。去除rRNA转录本使得更多的测序reads集中在所需的转

录本上, 从而提高测序灵敏度。如果所需的转录本的表达水平较低, 则rRNA去除步骤尤其重要。与总RNA-Seq中的rRNA去除步骤相反, mRNA-Seq通常利用Poly(A)亲和筛选方法来富集mRNA, 两种方案都可有效去除样本中的rRNA。选择rRNA去除法还是Poly(A)富集法取决于多种因素, 样本量和样本类型——比如, 原核生物、动物和植物RNA样本各自需要不同的方法<sup>[4]</sup>。图1显示了不同供应商文库制备试剂盒中rRNA去除效果的比较。使用Invitrogen™ Human Brain Reference RNA作为起始样本制备RNA-Seq文库, 然后在Illumina™ HiSeq™ 4000系统上进行测序。从结果可以看出, 使用NEBNext™ Ultra™ II RNA Library Prep Kit可检测到的rRNA reads比例最低, 紧接着是Invitrogen™ Colibri™ Stranded RNA Library Prep Kit。

表1. 典型哺乳动物细胞中的常见RNA类型以及对其进行研究适合的RNA-Seq方法。

| RNA种类              | 生物功能         | 总RNA中所占百分比* | 总RNA测序     | mRNA测序     |
|--------------------|--------------|-------------|------------|------------|
| 核糖体RNA (rRNA)      | 蛋白质合成        | 80-90       | -核糖体RNA被去除 | -核糖体RNA被去除 |
| 转运RNA (tRNA)       | 蛋白质合成        | 10-15       | -          | -          |
| 信使RNA (mRNA)       | 翻译           | 3-7         | 是          | 是          |
| 长链非编码RNA (lincRNA) | 多种(细胞识别和分化)  | <0.2        | 是          | 否          |
| 核仁小分子RNA (snoRNA)  | RNA的转录后修饰    | 0.04-0.2    | 是          | 否          |
| 假基因                | 多种(转录调控)     | 可变**        | 是          | 否          |
| MicroRNA (miRNA)   | RNA沉默, 转录后调控 | 0.02        | 是          | 否          |

\*质量百分比[7]。

\*\*假基因转录物在编码和非编码RNA中均可计入。

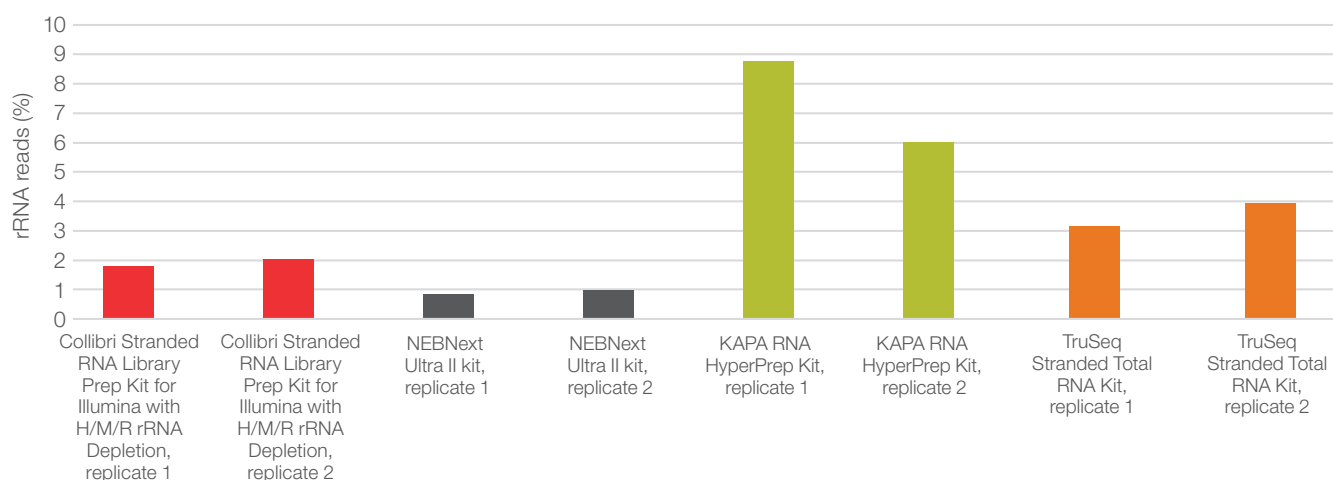


图1. RNA-Seq文库制备中rRNA去除效果的比较。Colibri Stranded RNA Library Prep Kit for Illumina with H/M/R rRNA Depletion Kit可高效地去除rRNA。根据每个制造商提供的标准方案, 从100ng Human Brain Reference RNA中制备文库, 并在HiSeq 4000系统上对文库进行测序, 每个样品的均值归一化测序reads数为3000万。残留rRNA经检测并以占总测序reads的百分比表示。

## 在总RNA-Seq和mRNA-Seq之间进行选择时要考虑的因素

总RNA-Seq可进行最全面的转录组分析,因为它可提供关于编码RNA以及非编码RNA(例如lncRNA和miRNA)的信息(表1)。这一方法可用于检测调控区域、转录本的整体表达水平、剪接模式、鉴定外显子和内含子及其它们的边界。

许多lncRNA测序reads会与mRNA重叠<sup>[6]</sup>。据估计,在人类基因组中,近20%的基因是重叠的并从相反的链中转录<sup>[6]</sup>。因此,需要使用链特异性总RNA测序方法对其进行区分。链特异性测序方法可以识别生成RNA转录本的特异性DNA链(编码链或模板链)。此外,其可通过改进测序reads的注释和增加可匹配测序reads来提供更准确的基因表达数据。

首先有必要先确定需要从RNA-Seq数据中获得什么样的信息,以便可以不对其他类型的RNA进行测序。如果编码区是重点关注区域,则应选择mRNA-Seq。仅关注mRNA可获得更好的基因表达数据,因为mRNA仅占哺乳动物转录组的3-7%。与总RNA-Seq相比,mRNA-Seq可使用更小的样本量进行文库制备,并且测序深度可得到增加。

在选择哪种方法之前,还应对总预算进行额外考虑。总RNA-Seq需要更多的测序数据(通常每个样本100-200 million 测序reads),成本相比mRNA-Seq更高。如果仅需要mRNA信息,那么mRNA-Seq可以比总RNA-Seq提供更大的测序深度,并且花费更少的成本。这是因为测序reads(通常每个样本25-50 million 测序reads)集中在Poly(A)富集的RNA分子上。

对于起始材料有限的样本,mRNA-Seq是最适合的方法。mRNA的富集可获得更好的测序reads数据,成本更低,并且需要的起始材料更少。表1中列出了与mRNA-Seq相比,使用总RNA-Seq可测序的不同RNA种类。

## 结论

总RNA-Seq和mRNA-Seq方法均有技术上的优势和劣势,所以在选择的时候需要仔细考虑总体实验目标、潜在的生物学问题以及每种方法的技术局限。

使用总RNA-Seq可以实现最全面的转录组分析,而使用mRNA-Seq可以获得更优的编码区数据。但是,还需要考虑其他因素,例如样本类型、样本起始量以及项目预算。

## 订购信息

| 产品  | 数量     | 货号        |
|---|--------|-----------|
| <b>RNA测序</b>  |        |           |
| 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   |
| <b>文库定量</b>   |        |           |
| Collibri文库定量试剂盒*  | 100次反应 | A38524100 |
|   | 500次反应 | A38524500 |
| Qubit 4 荧光计   | 1台仪器   | Q33226    |
| Qubit 1X dsDNA HS检测试剂盒                                    | 100次检测 | Q33230    |
| Qubit 4 NGS Starter Kit                                   | 1盒     | Q33228    |
| <b>文库扩增</b>   |        |           |
| 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 |
| <b>Applied Biosystems™配套试剂及仪器</b>                         |        |           |
| 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    |

H=人, M=小鼠, R=大鼠。

\*并非所有国家均提供所有试剂盒。

## 参考文献

- Hrdlickova R, Toloue M, Tian B (2017) RNA-Seq methods for transcriptome analysis. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 8(1).
- Garalde DR, Snell EA, Jachimowicz D et al. (2018) Highly parallel direct RNA sequencing on an array of nanopores. *Nat Methods* 15(3):201–206.
- Conesa A, Madrigal P, Tarazona S et al. (2016) A survey of best practices for RNA-Seq data analysis. *Genome Biol* 17:13.
- Guo Y, Zhao S, Sheng Q et al. (2015) RNA-Seq by total RNA library identifies additional RNAs compared to poly(A) RNA library. *Biomed Res Int* 2015:862130.
- Ning Q, Li Y, Wang Z et al. (2017) The evolution and expression pattern of human overlapping lncRNA and protein-coding gene pairs. *Sci Rep* 7:42775.
- Zhao S, Zhang Y, Gordon W et al. (2015) Comparison of stranded and non-stranded RNA-Seq transcriptome profiling and investigation of gene overlap. *BMC Genomics* 16(1):675.
- Palazzo AF, Lee ES (2015) Non-coding RNA: what is functional and what is junk? *Front Genet* 6(2).

Find out more at [thermofisher.com/collibri](http://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](mailto:cnbidmarketing@thermofisher.com)

**Thermo Fisher**  
SCIENTIFIC