

目录

6 简介

7 RNA 转录

- 8 RNA-Seq: RNA 测序
- 10 CaptureSeq: RNA 捕获测序
- 11 RASL-Seq: RNA 介导的寡核苷酸退火、选择和连接及新一代测序
- 12 ClickSeq: 利用随机终止的 3'-叠氮阻断 cDNA 片段构建的 RNA 测序文库
- 13 3Seq: 用于表达定量的 3' 末端测序
- 14 cP-RNA-Seq: 2',3'-环磷酸 (cP) RNA 测序
- 15 3P-Seq: 利用测序分析 Poly(A) 位点
- 16 2P-Seq: Poly(A) 尾引物测序
- 17 3'-Seq: 定量 3'UTR 异构体的丰度
- 18 TIF-Seq: 转录异构体测序
- 19 PEAT: 转录起始位点的双端分析
- 20 SMORE-Seq: 在测序的同时进行 RNA 末端定位
- 21 TL-Seq: 转录本前导序列测序
- 22 TATL-Seq: 翻译相关的转录本前导序列测序
- 23 RARseq: 限制性位点相关的 RNA 测序
- 24 TAIL-Seq: Poly(A) 尾测序
- 25 PAL-Seq: 利用测序分析 Poly(A) 尾长度
- 26 FRT-Seq: 流动槽逆转录测序
- 27 ChIRP: 通过 RNA 纯化进行染色质分离
- 28 CHART: RNA 靶标的捕获杂交分析
- 29 RAP: RNA 反义纯化
- 30 GRO-seq: 全局连续测序
- 32 Bru-Seq: 溴尿苷测序
- 33 BruChase-Seq: 溴尿苷脉冲追踪测序
- 34 5'-GRO-Seq: 5' 全局连续测序
- 35 BruDRB-Seq: 溴尿苷 5,6-二氯苯并咪唑 1- β -D-呋喃核糖苷测序
- 36 4sUDRB-Seq: 4-硫尿核苷和 5,6-二氯苯并咪唑 1- β -D-呋喃核糖苷测序
- 38 PRO-Seq: 精确核连续测序
- 39 PRO-Cap: RNA 聚合酶 II 起始位点的精确核连续测序
- 40 CAGE: 帽分析基因表达测序
- 41 3'NT 方法: 新生转录本的 3' 末端
- 42 NET-Seq: 天然延伸转录本测序
- 43 mNET-Seq: 用于哺乳动物染色质分析的天然延伸转录本测序
- 44 PARE-Seq: RNA 末端测序的平行分析
- 45 GMUCT: 未加帽和切割转录本的基因组定位

46 RNA-蛋白质相互作用

- 47 Ribo-Seq 或 ARTSeq: 核糖体分析测序
- 49 RIP-Seq: RNA 免疫沉淀测序
- 50 CLIP-Seq 或 HITS-CLIP: CLIP cDNA 文库的高通量测序
- 52 Pol II CLIP: RNA 聚合酶 II 交联和免疫沉淀
- 53 miR-CLIP: MicroRNA 交联和免疫沉淀
- 54 eCLIP: 增强的交联免疫沉淀
- 55 irCLIP: UV-C 交联和免疫沉淀
- 56 PAR-CLIP: 光激活核糖核苷酸增强的交联和免疫沉淀
- 58 iCLIP: 单核苷酸分辨率 CLIP
- 60 BrdU-CLIP: BrdU 亲和纯化 CLIP
- 61 AGO-CLIP: Argonaute 交联免疫沉淀
- 62 PIP-Seq: 蛋白质相互作用分析测序
- 63 hiCLIP: RNA 杂交及单核苷酸分辨率紫外交联和免疫沉淀
- 64 RBNS: RNA Bind-n-Seq 测序
- 65 TRIBE: 通过编辑识别 RNA 结合蛋白的靶向位点
- 66 HITS-RAP: 高通量测序 -RNA 亲和性分析
- 67 TRAP-Seq: 多核糖体 mRNA 靶向纯化
- 68 DLAF: 将测序接头直接连接到第一条 cDNA 链上
- 69 miTRAP: 通过 RNA 体外亲和纯化捕获 miRNA
- 70 CLASH: 杂交产物的交联、连接和测序

71 RNA 修饰

- 72 MeRIP-Seq: m6A 特异性甲基化的 RNA 免疫沉淀测序
- 73 miCLIP-m6A: N6- 甲基腺苷 (m6A) 单核苷酸分辨率交联和免疫沉淀
- 74 PSI-Seq: 假尿苷位点识别测序
- 75 Pseudo-Seq: 基因组范围内假尿苷化位点的识别方法
- 76 ICE: 肌苷的化学清除法

77 RNA 结构

- 78 SHAPE-Seq: 通过引物延伸测序进行选择性的 2' 羟基乙酰化分析
- 79 icSHAPE: 体内 Click 选择性 2' 羟基乙酰化及分析实验
- 80 CIRS-Seq: RNA 结构的化学干扰
- 81 SHAPE-MaP: 通过引物延伸和突变测序进行选择性的 2' 羟基乙酰化分析
- 83 Structure-Seq/DMS-Seq: 对未保护的腺嘌呤和胞嘧啶进行硫酸二甲酯甲基化
- 84 SPARE: 5'RNA 末端的特异性平行扩增
- 85 PARS-Seq: RNA 结构的平行分析
- 86 Cap-Seq: CXXC 亲和纯化结合深度测序
- 87 CIP-TAP: 碱性磷酸酶、小牛肠一烟草酸焦磷酸酶测序

88 低水平 RNA 检测

- 90 scRNA-Seq: 单细胞 mRNA 测序
- 91 SUPeR-Seq: 单细胞通用的不依赖于 Poly(A) 的 RNA 测序
- 92 UMI: 独特分子标记
- 93 数字 RNA 测序
- 94 MARS-Seq: 大量平行 RNA 单细胞测序框架
- 95 Quartz-Seq: 单细胞全转录本扩增
- 96 DP-Seq: 基于多种引物设计的 RNA 测序
- 97 Smart-Seq 和 Smart-Seq2: RNA 模板 5' 末端切换机制
- 99 FRISCR: 固定和回收完整的单细胞 RNA
- 100 CEL-Seq: 线性扩增测序分析细胞表达
- 102 STRT-Seq: 单细胞标记逆转录测序
- 103 TCR 链配对: 在单细胞中识别 T 细胞受体 (TCR) a-b 链配对
- 104 TCR-LA-MC PCR: TCR 连接锚定磁力捕获 PCR
- 105 CirSeq: 用环状测序识别低表达水平的 RNA 病毒
- 106 TIVA: 转录组体内分析
- 107 PAIR: 肽核酸 (PNA) 辅助识别 RNA 结合蛋白
- 108 CLaP: 光漂白细胞标记法
- 109 CytoSeq: 基因表达细胞术
- 110 Drop-Seq: 分析液滴中单个细胞的 mRNA 转录本
- 112 Hi-SCL: 高通量单细胞标记法
- 113 InDrop: 使用索引滴进行高通量单细胞标记
- 114 snRNA-Seq: 单核 RNA 测序
- 115 Nuc-Seq: 来自冷冻组织的单核 RNA 测序
- 116 Div-Seq: 使用 EdU 介导的标记法对增殖细胞进行核测序
- 117 SCRIB-Seq: 单细胞 RNA 条标签序列添加和测序
- 118 G&T-Seq: 基因组和转录组测序
- 119 scM&T-Seq: 单细胞甲基化组和转录组测序
- 120 scTrio-seq: 单细胞三重组学测序

简介

本出版物是针对 RNA 测序的新一代测序 (NGS) 方法合集，汇编自科学文献。谨以此合集向使用人员的创新及该技术方法的多功能性致敬。我们希望它能够启发研究人员，对这些方法加以利用或开发新方法，以解决新的科研难题。

本合集所称的方法指的是提取核酸（样本制备）与添加测序所需寡核苷酸接头（文库制备）之间的处理步骤。该技术仅需额外增加若干处理步骤，即可解决多种科研问题。

使用本出版物时，请考虑以下几点：

- 新方法仍在不断开发中。要获取最新的方法列表，请访问：www.illumina.com/science/sequencing-method-explorer.html
- 仅提供最新的参考文献，通常是过去 2 年内发表的文献。
- 除了少数例外，方法名称中的大写、标点符号和特殊字符与原参考文献保持一致。这一点很重要，例如 CapSeq¹ 和 CAP-seq² 方法分别指 RNA 和 DNA 方法。
- 方法按相似性排序，因此类似方法的位置相近。若想更直观地比较这些方法，请参考 <http://www.illumina.com/methods-explorer>
- 如果方法基本相同且可用单个图表表示，则会组合到一起，例如 GRO-seq³ 和 BRIC-seq⁴。
- 这些图表对过程进行了格式化的描述，旨在重点描述方法的关键元素。
- 上述方法均由使用者开发，因此如需详细说明和实验方案，读者应参阅原文献。

如有遗漏，欢迎您补充我们的方法列表，请联系 scientificaffairs@illumina.com。

-
1. Gu W., Lee H. C., Chaves D., et al. CapSeq and CIP-TAP identify Pol II start sites and reveal capped small RNAs as *C. elegans* piRNA precursors. *Cell*. 2012;151: 1488-1500
 2. Illingworth R. S., Botting C. H., Grimes G. R., Bickmore W. A. and Eskeland R. PRC1 and PRC2 are not required for targeting of H2A.Z to developmental genes in embryonic stem cells. *PLoS One*. 2012;7: e34848
 3. Core L. J., Waterfall J. J. and Lis J. T. Nascent RNA sequencing reveals widespread pausing and divergent initiation at human promoters. *Science*. 2008;322: 1845-1848
 4. Tani H., Mizutani R., Salam K. A., et al. Genome-wide determination of RNA stability reveals hundreds of short-lived noncoding transcripts in mammals. *Genome Res*. 2012;22: 947-956
-

RNA 转录

RNA 转录和加工的调控直接影响蛋白质合成。而蛋白质通过介导细胞功能来形成细胞的表型。RNA 失调是某些疾病和癌症的病因^{5,6}。RNA 测序可提供 RNA 分子的丰度和序列信息。通过，优化样本制备方案和对结果进行缜密分析，可以为 RNA 加工和转录调控的各个方面提供有价值的见解。这些信息包括：翻译后修饰、RNA 剪接、RNA 与 RNA 结合蛋白 (RBP) 的结合、不同阶段的 RNA 表达情况、独特的 RNA 异构体、RNA 降解和其他种类 RNA 的调控^{7,8}。研究 RNA 转录和翻译，能够更好地了解 RNA 的产生、加工和调控对细胞表型的影响。



科学家们发现了长期记忆和脑中蛋白质合成之间的关系^{9,10}。

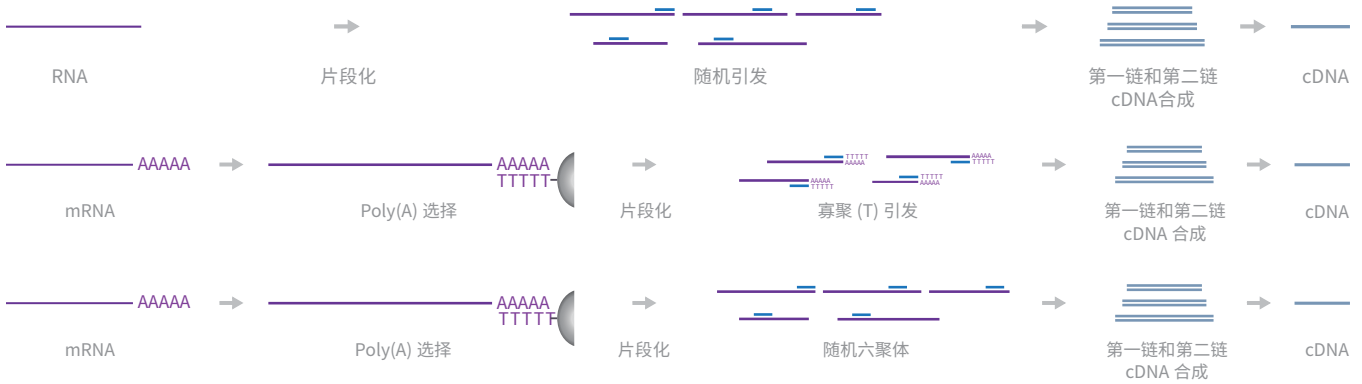
综述

- Conesa A., Madrigal P., Tarazona S., et al. A survey of best practices for RNA-Seq data analysis. *Genome Biol.* 2016;17: 13
- Campbell Z. T. and Wickens M. Probing RNA-protein networks: biochemistry meets genomics. *Trends Biochem Sci.* 2015;40: 157-164
- Flynn R. A., Martin L., Spitale R. C., et al. Dissecting noncoding and pathogen RNA-protein interactomes. *RNA.* 2015;21: 135-143
- Kolodziejczyk A. A., Kim J. K., Svensson V., Marioni J. C. and Teichmann S. A. The Technology and Biology of Single-Cell RNA Sequencing. *Mol Cell.* 2015;58: 610-620
- Nussbacher J. K., Batra R., Lagier-Tourenne C. and Yeo G. W. RNA-binding proteins in neurodegeneration: Seq and you shall receive. *Trends Neurosci.* 2015;38: 226-236
- Reuter J. A., Spacek D. V. and Snyder M. P. High-Throughput Sequencing Technologies. *Mol Cell.* 2015;58: 586-597
- Hausser J. and Zavolan M. Identification and consequences of miRNA-target interactions--beyond repression of gene expression. *Nat Rev Genet.* 2014;15: 599-612

-
5. Kloosterman W. P. and Plasterk R. H. The diverse functions of microRNAs in animal development and disease. *Dev Cell.* 2006;11: 441-450
 6. Castello A., Fischer B., Hentze M. W. and Preiss T. RNA-binding proteins in Mendelian disease. *Trends Genet.* 2013;29: 318-327
 7. McGettigan P. A. Transcriptomics in the RNA-Seq era. *Curr Opin Chem Biol.* 2013;17: 4-11
 8. Feng H., Qin Z. and Zhang X. Opportunities and methods for studying alternative splicing in cancer with RNA-Seq. *Cancer Lett.* 2013;340: 179-191
 9. Davis H. P. and Squire L. R. Protein synthesis and memory: a review. *Psychol Bull.* 1984;96: 518-559
 10. Holt C. E. and Schuman E. M. The central dogma decentralized: new perspectives on RNA function and local translation in neurons. *Neuron.* 2013;80: 648-657
-

RNA-Seq: RNA 测序

通过 RNA-Seq 测序可了解 RNA 转录本的丰度和序列信息。此方法最初由几个研究小组发表于 2008 年¹¹⁻¹⁵，现已是基因表达系列分析 (SAGE)¹⁶ 和大规模平行信号测序 (MPSS)¹⁷ 等老方法的有效替代方法。RNA-Seq 测序的参考文献在 PubMed 中有超过 8000 篇，RNA-Seq 是至今为止引用最多的 NGS 方法¹⁸。所有 RNA-Seq 方法都需要使用逆转录酶将 RNA 逆转录为 cDNA。不同的两种基本方法是使用随机引物还是使用 Oligo(dT) 引物来进行这一反应。Oligo(dT) 引物十分偏向于 3' 端序列，最适于 mRNA 丰度 (表达) 分析。使用随机引物也会发生序列偏向，可对 RNA 进行片段化减小这一偏向¹⁹。



RNA-Seq 示意图。

另外可以改进的方案有，如使用莫洛尼鼠白血病病毒逆转录酶 (MMLV-RT) 和模板切换寡核苷酸获得更高产量的全长转录本，用于进行基因注释和剪接变体检测。这些方法包括基于 RNA 模板 5' 末端切换机制 (Smart) 的方法，例如 Smart-Seq²⁰ 和 Smart-seq2²¹；帽分析基因表达 (CAGE)，例如 NanoCAGE²² 和 CAGEscan²³；单核 RNA-Seq (snRNA-Seq)²⁴；和固定恢复的完整单细胞 RNA 测序 (FRISCR)²⁵。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">非常适用于发现新外显子、新基因和新剪接异构体与基因芯片相比，表达分析的动态范围更宽	<ul style="list-style-type: none">引物偏向²⁶逆转录酶可能引入测序错误

11. Wilhelm B. T., Marguerat S., Watt S., et al. Dynamic repertoire of a eukaryotic transcriptome surveyed at single-nucleotide resolution. *Nature*. 2008;453: 1239-1243
12. Sultan M., Schulz M. H., Richard H., et al. A global view of gene activity and alternative splicing by deep sequencing of the human transcriptome. *Science*. 2008;321: 956-960
13. Marioni J. C., Mason C. E., Mane S. M., Stephens M. and Gilad Y. RNA-seq: an assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. *Genome Res*. 2008;18: 1509-1517
14. Mortazavi A., Williams B. A., McCue K., Schaeffer L. and Wold B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods*. 2008;5: 621-628
15. Nagalakshmi U., Wang Z., Waern K., et al. The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing. *Science*. 2008;320: 1344-1349
16. Velculescu V. E., Zhang L., Vogelstein B. and Kinzler K. W. Serial analysis of gene expression. *Science*. 1995;270: 484-487
17. Harbers M. and Carninci P. Tag-based approaches for transcriptome research and genome annotation. *Nat Methods*. 2005;2: 495-502
18. Based on a PubMed search for RNA-Seq on 11/11/2016
19. Mortazavi A., Williams B. A., McCue K., Schaeffer L. and Wold B. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nat Methods*. 2008;5: 621-628
20. Ramskold D., Luo S., Wang Y. C., et al. Full-length mRNA-Seq from single-cell levels of RNA and individual circulating tumor cells. *Nat Biotechnol*. 2012;30: 777-782
21. Picelli S., Bjorklund A. K., Faridani O. R., Sagasser S., Winberg G. and Sandberg R. Smart-seq2 for sensitive full-length transcriptome profiling in single cells. *Nat Methods*. 2013;10: 1096-1098
22. Plessy C., Bertin N., Takahashi H., et al. Linking promoters to functional transcripts in small samples with nanoCAGE and CAGEscan. *Nat Methods*. 2010;7: 528-534
23. Plessy C., Bertin N., Takahashi H., et al. Linking promoters to functional transcripts in small samples with nanoCAGE and CAGEscan. *Nat Methods*. 2010;7: 528-534
24. Grindberg R. V., Yee-Greenbaum J. L., McConnell M. J., et al. RNA-sequencing from single nuclei. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110: 19802-19807
25. Thomsen E. R., Mich J. K., Yao Z., et al. Fixed single-cell transcriptomic characterization of human radial glial diversity. *Nat Methods*. 2016;13: 87-93
26. Hansen K. D., Brenner S. E. and Dudoit S. Biases in Illumina transcriptome sequencing caused by random hexamer priming. *Nucleic Acids Res*. 2010;38: e131

综述

Conesa A., Madrigal P., Tarazona S., Gomez-Cabrero D., Cervera A., et al. A survey of best practices for RNA-Seq data analysis. *Genome Biol.* 2016;17: 13

参考文献

Pareek C. S., Smoczynski R., Kadarmideen H. N., et al. Single Nucleotide Polymorphism Discovery in Bovine Pituitary Gland Using RNA-Seq Technology. *PLoS One.* 2016;11: e0161370

作者使用链特异的 RNA-Seq 测序方法检测牛脑下垂体转录组中的单核苷酸多态性 (SNP)。本实验将多种 (例如 Polish Holstein-Friesian、Polish Red 和 Hereford 品种) 处于幼年成长期的公牛品种作为实验对象, 对其各个发育期进行研究。研究人员收集大量数据后发现, *KCNIP4*、*CCSER1*、*DPP6*、*MAP3K5* 和 *GHR* 是在三个品种和各个发育期中具有最多 SNP 位点的候选基因。

Illumina 的技术: NextSeq 500 系统, TruSeq DNA Sample Prep Kit

Bennett C. G., Riemondy K., Chapnick D. A., et al. Genome-wide analysis of Musashi-2 targets reveals novel functions in governing epithelial cell migration. *Nucleic Acids Res.* 2016;44: 3788-3800

Musashi-2 (Msi2) 是一种 RNA 结合蛋白 (RBP), 它维持着干细胞的自我更新并通过调控造血组织和胃肠道组织中的细胞增殖促使肿瘤发生。本研究旨在进一步了解 Msi2 及其致癌能力的作用机制。研究人员使用 RNA-Seq 和 HITS-CLIP (紫外交联免疫沉淀结合高通量测序), 能够鉴定出 Msi2 的作用靶点, 并发现 Msi2 主要识别具有多个 UAG 元件的 mRNA 3' 非翻译区 (UTR)。Msi2 还能促使特异性 mRNA 降解, 而不影响翻译效率。作者鉴定了 Msi2 的作用靶点是细胞活性、细胞外基质-受体相互作用、细胞生长和细胞存活的关键调控因子。

Illumina 的技术: HiSeq 2000 系统、ARTseq/TruSeq Ribo Profile Kit、Ribo-Zero Gold rRNA Removal Kit

Suarez-Vega A., Gutierrez-Gil B., Klopp C., Tosser-Klopp G. and Arranz J. J. Comprehensive RNA-Seq profiling to evaluate lactating sheep mammary gland transcriptome. *Sci Data.* 2016;3: 160051

Davila J. I., Fadra N. M., Wang X., et al. Impact of RNA degradation on fusion detection by RNA-seq. *BMC Genomics.* 2016;17: 814

Chen M. J., Chen L. K., Lai Y. S., et al. Integrating RNA-Seq and ChIP-Seq data to characterize long non-coding RNAs in *Drosophila melanogaster*. *BMC Genomics.* 2016;17: 220

Arnold W. K., Savage C. R., Brissette C. A., Seshu J., Livny J. and Stevenson B. RNA-Seq of *Borrelia burgdorferi* in Multiple Phases of Growth Reveals Insights into the Dynamics of Gene Expression, Transcriptome Architecture, and Noncoding RNAs. *PLoS One.* 2016;11: e0164165

Joshi R. K., Megha S., Rahman M. H., Basu U. and Kav N. N. A global study of transcriptome dynamics in canola (*Brassica napus* L.) responsive to *Sclerotinia sclerotiorum* infection using RNA-Seq. *Gene.* 2016;590: 57-67

Seo M., Caetano-Anolles K., Rodriguez-Zas S., et al. Comprehensive identification of sexually dimorphic genes in diverse cattle tissues using RNA-seq. *BMC Genomics.* 2016;17: 81

Lukoszek R., Feist P. and Ignatova Z. Insights into the adaptive response of *Arabidopsis thaliana* to prolonged thermal stress by ribosomal profiling and RNA-Seq. *BMC Plant Biol.* 2016;16: 221

Zhang Q., Lai M. M., Lou Y. Y., Guo B. H., Wang H. Y. and Zheng X. Q. Transcriptome altered by latent human cytomegalovirus infection on THP-1 cells using RNA-seq. *Gene.* 2016;594: 144-150

Choi S. Y., Park B., Choi I. G., et al. Transcriptome landscape of *Synechococcus elongatus* PCC 7942 for nitrogen starvation responses using RNA-seq. *Sci Rep.* 2016;6: 30584

Zhang Z. X., Zhao S. N., Liu G. F., et al. Discovery of putative capsaicin biosynthetic genes by RNA-Seq and digital gene expression analysis of pepper. *Sci Rep.* 2016;6: 34121

Weissbein U., Schachter M., Egli D. and Benvenisty N. Analysis of chromosomal aberrations and recombination by allelic bias in RNA-Seq. *Nat Commun.* 2016;7: 12144

Chakraborty S., Britton M., Martinez-Garcia P. J. and Dandekar A. M. Deep RNA-Seq profile reveals biodiversity, plant-microbe interactions and a large family of NBS-LRR resistance genes in walnut (*Juglans regia*) tissues. *AMB Express.* 2016;6: 12

CaptureSeq: RNA 捕获测序

CaptureSeq 是靶向 RNA 测序方法，能为所选择的基因组区域提供更高的测序覆盖度²⁷。

此方法按照 TruSeq RNA 样本制备方案操作，通过收集带有 Poly(A) 尾的 RNA 从总 RNA 分离出 mRNA，然后再进行片段化。利用逆转录酶生成该片段的双链 cDNA 拷贝，然后连接上 p5 和 p7 接头。接着，通过聚合酶链式反应 (PCR) 扩增这些 cDNA 文库片段。为提高特异性，在 PCR 扩增前，用定制捕获探针与 cDNA 杂交并结合到芯片，同时洗去其他转录本。此过程获得的靶标片段已可用于测序。



CaptureSeq 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">非常适用于发现新外显子、新基因和新剪接异构体	<ul style="list-style-type: none">需要大量总 RNA (5 μg) 以获得用于捕获的 250 ng 扩增 cDNA对有重复序列的转录本的覆盖准确性较低

综述

Marbaniang C. N. and Vogel J. Emerging roles of RNA modifications in bacteria. *Curr Opin Microbiol.* 2016;30: 50-57

Gloss B. S. and Dinger M. E. The specificity of long noncoding RNA expression. *Biochim Biophys Acta.* 2015;

Luciano D. J. and Belasco J. G. NAD in RNA: unconventional headgear. *Trends Biochem Sci.* 2015;40: 245-247

参考文献

Bussotti G., Leonardi T., Clark M. B., et al. Improved definition of the mouse transcriptome via targeted RNA sequencing. *Genome Res.* 2016;26: 705-716

作者对小鼠组织样本实施了 CaptureSeq 测序，以优化对 GRCm38 小鼠参考基因组的转录本注释流程。靶向测序发现了新的编码和长非编码 RNA (lncRNA) 转录本，并改进了对转录本的剪接（衔接）点和选择性剪接位点的注释。

Illumina 的技术：HiSeq 系统、TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit

Clark M. B., Mercer T. R., Bussotti G., et al. Quantitative gene profiling of long noncoding RNAs with targeted RNA sequencing. *Nat Methods.* 2015;

Mercer T. R., Gerhardt D. J., Dinger M. E., et al. Targeted RNA sequencing reveals the deep complexity of the human transcriptome. *Nat Biotechnol.* 2012;30: 99-104

相关试剂盒

TruSeq Exome Library Prep Kit

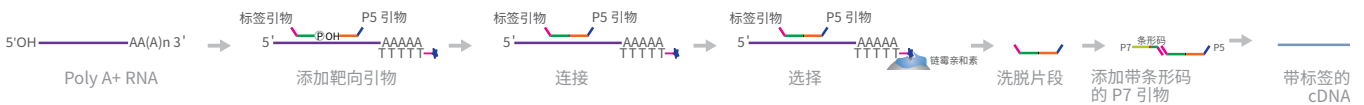
TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit

27. Mercer T. R., Clark M. B., Crawford J., et al. Targeted sequencing for gene discovery and quantification using RNA CaptureSeq. *Nat Protoc.* 2014;9: 989-1009

RASL-Seq: RNA 介导的寡核苷酸退火、选择和连接及新一代测序

RNA 介导的寡核苷酸退火、选择和连接及新一代测序 (RASL-Seq) 是一种二维 RNA 测序方法, 用于定量数千种不同条件下的数百个基因表达谱²⁸。

为每个目的基因定制一对探针。一对探针需要包含: 1) 一个探针在其 3' 末端含有通用的标签引物, 在其 5' 末端含有对应于目标外显子序列的 20 nt 寡核苷酸和一个磷酸基团; 和 2) 另一个探针在其 5' 末端含有 P5 接头, 并含有与另一探针相邻外显子序列互补的 20 nt 寡核苷酸。这些成对的探针会与 mRNA 杂交, 然后用生物素修饰的 Oligo(dT) 微珠从总 RNA 中分离出来。通过一步连接反应将一对探针与单个 PCR 扩增子探针相连。生物素修饰的 mRNA 链随后附着于链霉亲和素磁珠, 以洗脱探针片段。接下来, 将 P7 接头连接到 3' 标签引物, 然后对文库进行 PCR 扩增和测序。测序由文库的 40 nt 连接 P5 引物端开始, 然后测带有 P7 引物寡核苷酸端。



RASL-seq 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">• 在数以千计的不同实验条件下定量大量基因 panel 的遗传表达• 有效用于低总 RNA 量的样本 (约 1000 个细胞 10 ng)• 可以用于分离的 RNA 样本或细胞裂解物• 可以人工或使用定制机器人进行自动化操作	<ul style="list-style-type: none">• 在数以千计的不同实验条件下, 定量大量基因 panel 的遗传表达• 有效用于低总 RNA 量的样本 (约 1000 个细胞 10 ng)• 可以用于分离的 RNA 样本或细胞裂解物• 可以人工或使用定制机器人进行自动化操作

综述

Nussbacher J. K., Batra R., Lagier-Tourenne C. and Yeo G. W. RNA-binding proteins in neurodegeneration: Seq and you shall receive. *Trends Neurosci.* 2015;38: 226-236

参考文献

Qiu J., Zhou B., Thol F., et al. Distinct splicing signatures affect converged pathways in myelodysplastic syndrome patients carrying mutations in different splicing regulators. *RNA.* 2016;

作者通过 RASL-Seq 测序从患有骨髓增生异常综合征 (MDS) 病人的骨髓和血液样本中鉴定出了 mRNA 前体的选择性剪接情况。他们发现, 参与细胞周期调控和 DNA 损伤修复的基因中的某些剪接特征与 MDS 样本的表型相关。选择性剪接模式可用作快速鉴定 MDS 的生物标记。

Illumina 的技术: HiSeq 2500 系统

Kralovicova J., Knut M., Cross N. C. and Vorechovsky I. Identification of U2AF(35)-dependent exons by RNA-Seq reveals a link between 3' splice-site organization and activity of U2AF-related proteins. *Nucleic Acids Res.* 2015;

Shao C., Yang B., Wu T., et al. Mechanisms for U2AF to define 3' splice sites and regulate alternative splicing in the human genome. *Nat Struct Mol Biol.* 2014;21: 997-1005

Zhou Z., Qiu J., Liu W., et al. The Akt-SRPK-SR axis constitutes a major pathway in transducing EGF signaling to regulate alternative splicing in the nucleus. *Mol Cell.* 2012;47: 422-433

相关试剂盒

TruSeq RNA Library Prep Kit v2

TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit

28. Li H., Qiu J. and Fu X. D. RASL-Seq for massively parallel and quantitative analysis of gene expression. *Curr Protoc Mol Biol.* 2012;Chapter 4: Unit 4.13.11-19

ClickSeq: 利用随机终止的 3'-叠氮阻断 cDNA 片段构建的 RNA 测序文库

ClickSeq 是一种 RNA 测序技术，它在文库制备步骤使用生物偶联代替片段化，以产生比标准测序方法更低的错误率²⁹。

首先，通过一个与 Sanger 测序流程类似的步骤使用 3'-叠氮-2',3' 双脱氧核苷酸 (AzNTP) 将 RNA 逆转录为 cDNA。此过程引起链终止，得到半随机引物 (6 个随机核苷酸，后接 Illumina 3' P7 接头)，以对 RNA 模板的随机位置进行测序。单链 cDNA 会被纯化，然后它的 3' 末端会炔基修饰的 (5' 己炔基) P5 接头相连。在 PCR 扩增后，此 cDNA 文库已可用于测序。



ClickSeq 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">• 由于没有片段化步骤，显著降低了人为引入的重组概率• 非常适用于检测罕见重组情况• 无片段化步骤	<ul style="list-style-type: none">• 3' 叠氮基阻断的 cDNA 片段转化为双链 DNA 的效率较低• AzNTP 的读取效率仍很低• 如要用于单细胞或单分子研究的话，还需要进一步优化

综述

尚无

参考文献

Routh A., Head S. R., Ordoukhanian P. and Johnson J. E. ClickSeq: Fragmentation-Free Next-Generation Sequencing via Click Ligation of Adaptors to Stochastically Terminated 3'-Azido cDNAs. *J Mol Biol.* 2015;427: 2610-2616

此研究比较了用 ClickSeq 获得的测序数据和用标准 RNA 测序文库制备试剂盒获得的测序数据。作者使用了羊舍病毒。RNA 生成 cDNA 文库后用于比较。ClickSeq 测序所得的 read 的比对频率和 read 覆盖与标准 RNA-Seq 所得的 read 相似。但是，ClickSeq 中没有 RNA 片段化，使得 RNA 内部重组错误概率显著降低，幅度超过 99%。

Illumina 的技术: HiSeq 系统

相关试剂盒

TruSeq RNA Library Prep Kit v2

TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit

29. Routh A., Head S. R., Ordoukhanian P. and Johnson J. E. ClickSeq: Fragmentation-Free Next-Generation Sequencing via Click Ligation of Adaptors to Stochastically Terminated 3'-Azido cDNAs. *J Mol Biol.* 2015;427: 2610-2616

3Seq：用于表达定量的 3' 末端测序

用于表达定量的 3' 末端测序 (3Seq) 能将来自福尔马林固定、石蜡包埋 (FFPE) 的组织样本中分离的高度降解的 mRNA，用于定量基因组范围表达分析³⁰。

首先，通过 Poly(A) 选择从总 RNA 分离 mRNA。接下来，将 Oligo(dT)-P7 RT 引物退火至 mRNA 片段的 3' 末端，通过逆转录 (RT) 合成第一条 cDNA 链。从第一链生成第二 cDNA 链，并将 P5 接头连接到与 P7 接头相对的末端。通过 PCR 扩增含有接头的片段，用于测序。3Seq 也可用于新鲜冷冻的组织样本。



3Seq 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none"> 可对来自 FFPE 样本的高度降解的 mRNA 或新鲜冷冻组织进行测序 	<ul style="list-style-type: none"> 高内部引发概率 Poly(A) 尾的均聚性常常导致聚合酶脱落

综述

Nussbacher J. K., Batra R., Lagier-Tourenne C. and Yeo G. W. RNA-binding proteins in neurodegeneration: Seq and you shall receive. *Trends Neurosci.* 2015;38: 226-236

参考文献

Riemondy K., Wang X. J., Torchia E. C., Roop D. R. and Yi R. MicroRNA-203 represses selection and expansion of oncogenic Hras transformed tumor initiating cells. *Elife.* 2015;4:

作者研究了 microRNA (miRNA) -203 抑制由 HRASG12V 突变诱导的肿瘤发生的能力。他们使用 3Seq，因为它能定量 mRNA 表达水平并鉴定选择性 3' UTR 异构体。他们对鼠初级角化细胞进行了 3Seq 以研究 HRASG12V 转导和由 miR-203 诱导或敲除引起的转录组的改变。结果表明了 miR-203 在限制克隆选择和 Hras 突变诱导肿瘤发生中的重要性。作者还使用了交联免疫沉淀 (CLIP) cDNA 文库高通量测序 (HITS-CLIP) 和 microRNA 测序 (miRNA-Seq) 以增加对 miR-203 作用靶点的理解。

Illumina 的技术：HiSeq 2000 系统、Ribo-Zero Gold rRNA Removal Kit

Wei G., Luo H., Sun Y., et al. Transcriptome profiling of esophageal squamous cell carcinoma reveals a long noncoding RNA acting as a tumor suppressor. *Oncotarget.* 2015;6: 17065-17080

Guo X., Forgo E. and van de Rijn M. Molecular subtyping of leiomyosarcoma with 3' end RNA sequencing. *Genom Data.* 2015;5: 366-367

相关试剂盒

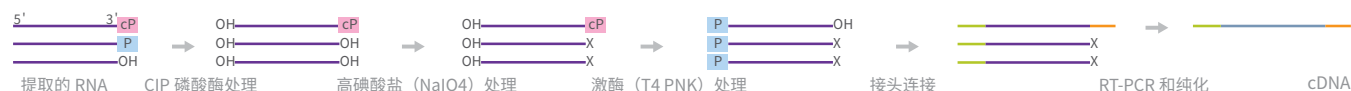
TruSeq RNA Access Library Prep Kit

30. Beck A. H., Weng Z., Witten D. M., et al. 3'-end sequencing for expression quantification (3SEQ) from archival tumor samples. *PLoS One.* 2010;5: e87

cP-RNA-Seq: 2',3'-环磷酸 (cP) RNA 测序

2',3'-环磷酸 (cP) RNA 测序 (cP-RNA-Seq) 是对在 3' 端用 cP 保护的 RNA 分子进行分离和测序的方法, cP 通常阻止接头连接³¹。研究者原创性地开发了这一技术以鉴定在人乳腺癌细胞中产生性激素依赖性 tRNA 源 RNA (SHOT-RNA) 的转运 RNA (tRNA) 分子, 但它也可用于其他在 3' 端被 cP 保护的 RNA 分子³²。

从样本中分离总 RNA, 并用凝胶纯化获得所需长度的 RNA 部分。此混合物中包含具有 3' 羟基、3' 磷酸和 3'cP 的 RNA 分子。磷酸酶处理去除了 5' 和 3' 末端的磷酸基团。然后用高碘酸盐处理 RNA 以将 3' 羟基末端切割为 2'3' 二乙醛, 同时保持 3'cP 末端完整。3' 端含有 2'3' 二乙醛的 RNA 链作为插入部分用于接头连接。含 3'cP 的链用 T4 多核苷酸激酶 (PNK) 处理并与测序接头连接。在两端都加上接头后, 将 RNA 链逆转录、扩增、纯化并测序。



cP-RNA-Seq 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">对通过 cP 保护的 RNA 分子进行选择性地分离、扩增和测序与先前使用重组 tRNA 连接酶和多次凝胶纯化的方法相比效率和特异性获得了大幅提升³³	<ul style="list-style-type: none">在对含有 2'-O-甲基核糖修饰的 RNA 分子 (如植物 miRNA、植物和动物短干扰 RNA (siRNA) 和动物 PIWI-相互作用 RNA (piRNA)) 进行测序时, 由于高碘酸盐切割特异性, 可能产生假阳性³⁴。

综述

尚无

参考文献

Honda S., Loher P., Shigematsu M., Palazzo J. P., Suzuki R., et al. Sex hormone-dependent tRNA halves enhance cell proliferation in breast and prostate cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112: E3816-3825

本研究发现了一种新型的 tRNA, 称为 SHOT-RNA, 它在雌激素受体阳性的乳腺癌细胞系和雄激素受体阳性的前列腺癌细胞系中高度表达。作者使用 cP-RNA-Seq 对 SHOT-RNA 进行分离、扩增和测序。他们发现了多种 5'-SHOT-RNA, 并发现 5'-SHOT-RNA 而非 3'-SHOT-RNA 在细胞增殖中具有重要作用。他们的结果表明, SHOT-RNA 可作为乳腺癌和前列腺癌的潜在生物标记。

Illumina 的技术: HiSeq 2000 系统、TruSeq Small RNA Library Preparation Kit

相关试剂盒

TruSeq Small RNA Library Prep Kit

Ribo-Zero rRNA Removal Kit

31. Honda S., Morichika K. and Kirino Y. Selective amplification and sequencing of cyclic phosphate-containing RNAs by the cP-RNA-Seq method. *Nat Protoc*. 2016;11: 476-489
32. Honda S., Loher P., Shigematsu M., et al. Sex hormone-dependent tRNA halves enhance cell proliferation in breast and prostate cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112: E3816-3825
33. Honda S., Morichika K. and Kirino Y. Selective amplification and sequencing of cyclic phosphate-containing RNAs by the cP-RNA-Seq method. *Nat Protoc*. 2016;11: 476-489
34. Honda S., Morichika K. and Kirino Y. Selective amplification and sequencing of cyclic phosphate-containing RNAs by the cP-RNA-Seq method. *Nat Protoc*. 2016;11: 476-489

3P-Seq: 利用测序分析 Poly(A) 位点

通过测序 (3P-Seq) 分析 Poly(A) 位点用于识别 mRNA 中的 3'-UTR³⁵。

使用 Poly(A) 选择从总 RNA 分离 mRNA，然后将生物素化的夹板引物退火，并夹板连接到 mRNA Poly(A) 尾的末端。RNA-引物复合物用 RNase T1 部分消化，与链霉亲和素结合，并洗涤以纯化 3' 片段。将对应于 Poly(A) 尾 3' 末端的引物退火，并使用双脱氧胸腺嘧啶三磷酸 (dTTP) 作为唯一的 dNTP 进行逆转录，以生成与 Poly(A) 尾互补的 cDNA 链。将带有生物素修饰的 Poly(A) RNA 片段通过 RNase H 消化而释放并进行纯化。然后，将 P7 和 P5 接头连接到 RNA 片段，并逆转录生成 cDNA 片段。



3P-Seq 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">• 可用于发现 UTR 异构体• 在 Poly(A) 捕获中使用夹板连接引物，防止聚合酶掉落• 防止内部引发，特异于 Poly(A) RNA 的 3' 末端	<ul style="list-style-type: none">• 需要大量 RNA• 操作难度大

综述

Nussbacher J. K., Batra R., Lagier-Tourenne C. and Yeo G. W. RNA-binding proteins in neurodegeneration: Seq and you shall receive. *Trends Neurosci.* 2015;38: 226-236

参考文献

Lakshmanan V., Bansal D., Kulkarni J., et al. *Genome-Wide Analysis of Polyadenylation Events in Schmidtea mediterranea. G3 (Bethesda).* 2016;

作者分析了一种淡水真涡虫 *Schmidtea mediterranea* 中由 3'UTR 介导的转录后调控。他们使用 3P-Seq 鉴定了 31,377 个多聚腺苷化位点，并注释了参与编码蛋白质基因中的 3'UTR。该研究还强调了真涡虫基因表达中可变量聚腺苷化的普遍性。

Illumina 的技术: HiSeq 1000 系统、Genome Analyzer 系统、TruSeq Small RNA Library Preparation Kit

Hezroni H., Koppstein D., Schwartz M. G., Avrutin A., Bartel D. P. and Ulitsky I. Principles of long noncoding RNA evolution derived from direct comparison of transcriptomes in 17 species. *Cell Rep.* 2015;11: 1110-1122

Jambor H., Surendranath V., Kalinka A. T., Mejstrik P., Saalfeld S. and Tomancak P. Systematic imaging reveals features and changing localization of mRNAs in *Drosophila* development. *Elife.* 2015;4:

Spies N., Burge C. B. and Bartel D. P. 3' UTR-isoform choice has limited influence on the stability and translational efficiency of most mRNAs in mouse fibroblasts. *Genome Res.* 2013;23: 2078-2090

相关试剂盒

TruSeq RNA Library Prep Kit v2

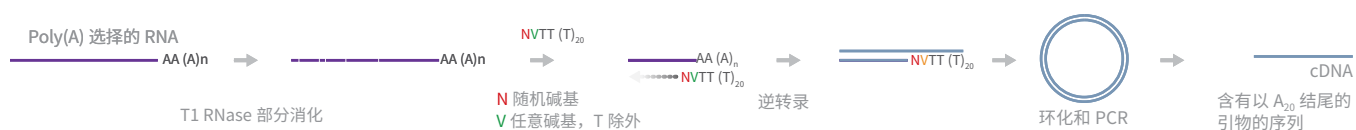
TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit

35. Jan C. H., Friedman R. C., Ruby J. G. and Bartel D. P. Formation, regulation and evolution of *Caenorhabditis elegans* 3'UTRs. *Nature.* 2011;469: 97-101

2P-Seq: Poly(A) 尾引物测序

Poly(A) 尾引导的测序 (2P-Seq) 专用于通过鉴定 3'UTR 异构体量化 mRNA 稳定性和翻译效率³⁶。

首先, 从总 RNA 分离 Poly(A)+ mRNA, 并用 RNase T1 进行部分消化, 以切除非 UTR 区域。用 20T-VN 引物进行 Poly (A)+ mRNA 片段的逆转录反应, 该引物含有 20 个 T 和 VN 锚点 (N 代表完全简并的碱基, V 是除 T 外的任何碱基)。将所得的 cDNA 环化并用带有序列标签的引物进行 PCR 扩增。用以 20 个 T 结束的定制引物对 cDNA 进行测序。为避免从腺嘌呤富集的 2P 标签, 分析应限于与 3P-Seq 注释的 Poly(A) 位点内的 20 个碱基匹配的 2P 标签。



2P-Seq 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">• 定量 mRNA 稳定性和翻译效率• 准确检测每种 UTR 异构体的半衰期和长度	<ul style="list-style-type: none">• 需要 3P-Seq 数据结果以限制只分析 Poly(A) 位点特异的结果• Poly(A) 引物可能与 mRNA 中其他富含 A 的区域错误结合

综述

Kim M., You B.-H. and Nam J.-W. Global estimation of the 3' untranslated region landscape using RNA sequencing. *Methods*. 2015;83: 111-117

参考文献

Spies N., Burge C. B. and Bartel D. P. 3' UTR-isoform choice has limited influence on the stability and translational efficiency of most mRNAs in mouse fibroblasts. *Genome Res*. 2013;23: 2078-2090

作者量化了鼠 3T3 细胞系中可变 3'UTR 区对 mRNA 稳定性和翻译效率的影响。他们使用了 3P-Seq 从总 RNA 分离 Poly(A)+ RNA 链以产生准确的 Poly(A) 位点注释, 然后通过 2P-Seq 确定 mRNA 半衰期和翻译效率。他们的 2P-Seq 数据显示, 3'UTR 异构体对 mRNA 稳定性和翻译速率的影响很小。

illumina 的技术: 非指定 illumina 测序系统

相关试剂盒

TruSeq RNA Library Prep Kit v2

TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit

36. Spies N., Burge C. B. and Bartel D. P. 3' UTR-isoform choice has limited influence on the stability and translational efficiency of most mRNAs in mouse fibroblasts. *Genome Res*. 2013;23: 2078-2090

3'-Seq: 定量 3'UTR 异构体的丰度

3'-Seq 专用于在多种人组织类型中定量 3'UTR 异构体的丰度³⁷。

通过用含有 VN 锚点（其中 V 是 dA、dC 或 dG）、P5 接头序列、腺嘌呤和与包被链霉亲和素的磁珠结合的生物素的 Oligo（dT）引物逆转录总 RNA，生成第一 cDNA 链。用 DNA 聚合酶 I 合成第二 cDNA 链。使用 RNase HII 在腺嘌呤处引入缺口，来为用 DNA 聚合酶 I 引发缺口翻译。这样在离 3' 末端 50-75 碱基处产生了另一个缺口。在新的缺口位置产生一个平末端，并且在这个位置加上双链 P7 接头。通过 PCR 扩增双链 cDNA 并进行纯化，以便进行测序。



3'-Seq 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">在多种组织类型中检测 3'UTR 异构体的丰度，以检测蛋白表达差异	<ul style="list-style-type: none">技术上有难度；缺口翻译需要准确的条件

综述

Bangru S. and Kalsotra A. Advances in analyzing RNA diversity in eukaryotic transcriptomes: peering through the Omics lens. *F1000Research*. 2016;5: 2668

Miura P., Sanfilippo P., Shenker S. and Lai E. C. Alternative polyadenylation in the nervous system: To what lengths will 3' UTR extensions take us? *BioEssays*. 2014;36: 766-777

参考文献

Berkovits B. D. and Mayr C. Alternative 3' UTRs act as scaffolds to regulate membrane protein localization. *Nature*. 2015;522: 363-367

该研究探索了人细胞系中可变多聚腺苷化在调控膜蛋白定位中的作用。作者使用 3'-Seq 检测了在天然 B 细胞、B- 类淋巴瘤细胞和 HEK293 细胞中的 CD47、CD44 和 TNFRSF13C 这三个基因 3'UTR mRNA 异构体的丰度。他们证明，3'UTR 异构体的长度改变了表面膜蛋白的蛋白质功能。

Illumina 的技术：HiSeq 系统、TruSeq RNA Library Prep Kit

相关试剂盒

TruSeq RNA Library Prep Kit v2

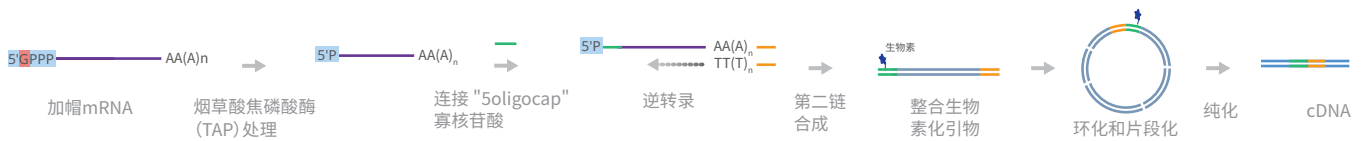
TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit

37. Lianoglou S., Garg V., Yang J. L., Leslie C. S. and Mayr C. Ubiquitously transcribed genes use alternative polyadenylation to achieve tissue-specific expression. *Genes Dev*. 2013;27: 2380-2396

TIF-Seq: 转录异构体测序

转录异构体测序 (TIF 测序) 通过对具有 5' 帽和 Poly(A) 尾的全长 mRNA 分子进行有选择的测序而识别转录异构体³⁸。

通过用寡聚核苷酸替换 5' 帽来筛选带有帽子的 mRNA 分子。为实现这一结果, 未加帽的 RNA 上 5' 磷酸基团被去除来与带有帽子的 RNA 分子区分开来。通过烟草酸焦磷酸酶 (TAP) 处理去除这些帽, 使 5' 露出磷酸基团, 以便与寡聚核苷酸连接。这些 mRNA 被分入两个试管中, 分别进行逆转录, 生成全长 cDNA (flcDNA)。每管中的 flcDNA 退火至带标签序列的 5' 生物素修饰的引物和 3' 引物。每个试管的引物都具有唯一的标签序列, 作为对嵌合片段和分子间连接的一个限制作用。将 2 个试管里的 RNA 进行混合, 用 NotI 酶酶切来产生粘性末端, 并连接形成环状双链 cDNA, 然后进行片段化。用链霉亲和素分离含有生物素化 3' 和 5' 末端的片段。向纯化好的 cDNA 片段 3' 和 5' 两端加上多个序列标签, 产生用于测序的 cDNA 文库。



TIF-Seq 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">通过对同一 RNA 链的 5' 和 3' 末端进行测序, 识别转录异构体用嵌合控制的序列标签去掉了 cDNA 片段的分子间连接	<ul style="list-style-type: none">需要样本中有大量全长 RNA使用 NotI 酶引入粘性末端这种操作只适用于像酵母这样富含 AT 的基因组对短 RNA 链具有高偏向性³⁹

综述

Anamika K., Verma S., Jere A. and Desai A. Transcriptomic Profiling Using Next Generation Sequencing - Advances, Advantages, and Challenges. 2016;

Bagchi D. N. and Iyer V. R. The Determinants of Directionality in Transcriptional Initiation. *Trends Genet.* 2016;32:322-333

Solé C., Nadal-Ribelles M., de Nadal E. and Posas F. A novel role for lncRNAs in cell cycle control during stress adaptation. *Current Genetics.* 2015;61:299-308

参考文献

Pelechano V., Wei W. and Steinmetz L. M. Extensive transcriptional heterogeneity revealed by isoform profiling. *Nature.* 2013;497:127-131

作者用 TIF-Seq 展示了酵母 (酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)) 中转录异构体异质性的深度。数据比较显示, TIF-Seq 在识别短的重叠 3' 末端转录本和区分单顺反子与双顺反子转录本方面比 3' 结束位点和 5' 末端起始位点捕获测序技术更有优势。

Illumina 的技术: HiSeq 2000 系统

Pelechano V., Wei W., Jakob P. and Steinmetz L. M. Genome-wide identification of transcript start and end sites by transcript isoform sequencing. *Nat Protoc.* 2014;9:1740-1759

相关试剂盒

TruSeq RNA Library Prep Kit v2

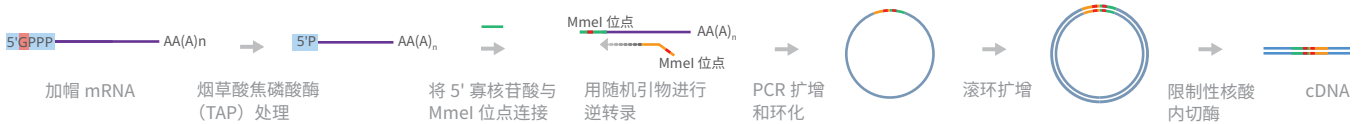
38. Pelechano V., Wei W. and Steinmetz L. M. Extensive transcriptional heterogeneity revealed by isoform profiling. *Nature.* 2013;497:127-131

39. Pelechano V., Wei W., Jakob P. and Steinmetz L. M. Genome-wide identification of transcript start and end sites by transcript isoform sequencing. *Nat Protoc.* 2014;9:1740-1759

PEAT: 转录起始位点的双端分析

PEAT 用类似于 TIF-Seq 的技术来识别 mRNA 中的转录起始位点 (TSS)⁴⁰。

首先, 从总 RNA 富集 Poly(A)⁺ RNA, 并用 TAP 去除帽。去帽的 mRNA 的 5' 端与含有 MmeI 限制性内切酶位点的嵌合接头连接, 然后进行逆转录。逆转录引物也含有 MmeI 限制性内切酶位点, 从而得到两端都有 MmeI 限制性内切酶位点的单链 cDNA。通过 PCR 扩增片段并环化成环状单链 cDNA, 并通过滚环扩增来进行进一步扩增。使用 MmeI 酶在 2 个 MmeI 限制性内切酶位点对环状 cDNA 进行酶切, 最终产生 93-95bp 长的线性双链 cDNA 片段。将这些片段与双端接头连接, 然后扩增并测序。



PEAT 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">• 用双端测序定位转录起始模式• 与较旧的单端 TSS 定位策略相比, 准确性和比对率都有提高	<ul style="list-style-type: none">• 与 TIF-Seq 一样, 不能区分有帽和无帽的 RNA• 与 TIF-Seq 一样, 并非专用于对 3'UTR 进行测序。• 可能产生嵌合片段

综述

Megraw M., Cumbie J. S., Ivanchenko M. G. and Filichkin S. A. Small Genetic Circuits and MicroRNAs: Big Players in Polymerase II Transcriptional Control in Plants. *The Plant Cell*. 2016;28:286-303

Murakawa Y., Yoshihara M., Kawaji H., et al. Enhanced Identification of Transcriptional Enhancers Provides Mechanistic Insights into Diseases. *Trends Genet*. 2016;32:76-88

参考文献

Morton T., Petricka J., Corcoran D. L., et al. Paired-end analysis of transcription start sites in *Arabidopsis* reveals plant-specific promoter signatures. *Plant Cell*. 2014;26:2746-2760

此研究聚焦于建立一个完整可靠的植物 TSS 数据集。作者使用 PEAT 在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 根样本中定位 TSS 位点, 因为此技术具有高分辨率、准确性和双端定位能力。PEAT TSS 数据集与拟南芥信息资源版本 10 (TAIR10) 的注释数据相比, 其分辨率有了显著提高。作者还开发了定制 TSS 峰 - 预测模型, 称为 3PEAT, 用于直接根据序列预测 TSS。

Illumina 的技术: HiSeq 2000 系统

相关试剂盒

TruSeq RNA Library Prep Kit v2

TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit

40. Ni T., Corcoran D. L., Rach E. A., et al. A paired-end sequencing strategy to map the complex landscape of transcription initiation. *Nat Methods*. 2010;7:521-527

SMORE-Seq: 在测序的同时进行 RNA 末端定位

SMORE-Seq 是一种 RNA-Seq 方法，通过同时对 5' 和 3' 末端进行测序，识别 TSS 和多聚腺苷化位点 (PAS)⁴¹。

首先，从总 RNA 富集 Poly(A)+ RNA，并用 TAP 去除 5' 帽。将 mRNA 的去帽 5' 末端与 P5 接头连接。接下来，将 mRNA 片段化，然后将片段的 3' 末端与 P7 接头连接。将 mRNA 片段逆转录、PCR 扩增并选择约 250bp 大小的片段。将所选片段进行 PCR 扩增，以便测序。



SMORE-seq 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">• 从同一 RNA 文库数据集合里识别 TSS 和 PAS• 由于用 TAP 进行了 5' 去帽，比 RNA-Seq 在识别 TSS 区域方面更准确• 因为省略了 TAP 之前的磷酸酶处理，可以用降解的中间产物进行 PAS 定位	<ul style="list-style-type: none">• 最好用全长 mRNA 样本，但是在高度降解的样本中，全长 mRNA 的比例非常小

综述

Bagchi D. N. and Iyer V. R. The Determinants of Directionality in Transcriptional Initiation. *Trends in Genetics*. 2016;32:322-333

参考文献

Park D., Morris A. R., Battenhouse A. and Iyer V. R. Simultaneous mapping of transcript ends at single-nucleotide resolution and identification of widespread promoter-associated non-coding RNA governed by TATA elements. *Nucleic Acids Res.* 2014;42:3736-3749

本研究聚焦于理解 TSS 和 PAS 对基因调控因子的作用。作者在酵母 RNA 中使用 SMORE-Seq，从同一 RNA 文库以单核苷酸分辨率同时识别 TSS 和 PAS。所得数据表明，酵母基因组数据库里有至少 150 个基因的 TSS 的注释有误。与在同一 mRNA 链定位 TSS 和 PAS 的 TIF-Seq 不同，SMORE-Seq 是在同一 RNA 群体里去分别识别 TSS 和 PAS。此方法可以对每个基因中作用最显著的 TSS 和 PAS 进行注释。

Illumina 的技术: HiSeq 2000 系统

相关试剂盒

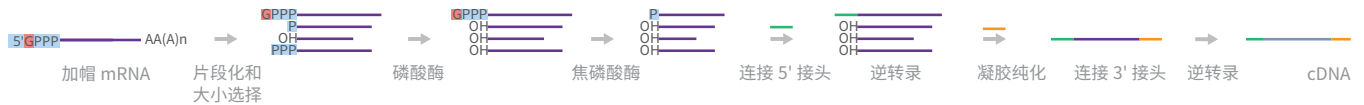
TruSeq Small RNA Library Prep Kit

41. Park D., Morris A. R., Battenhouse A. and Iyer V. R. Simultaneous mapping of transcript ends at single-nucleotide resolution and identification of widespread promoter-associated non-coding RNA governed by TATA elements. *Nucleic Acids Res.* 2014;42:3736-3749

TL-Seq: 转录本前导序列测序

TL-Seq 在测序前，以带有 5' 帽的 mRNA 分子的 5'UTR 周围的序列为目标区域进行了富集⁴²。

将 Poly(A)⁺ RNA 片段化并选择了其中长度为 50-80nt 的片段。用小牛肠碱性磷酸酶 (CIP) 将具有磷酸化 5' 末端的 RNA 片段去磷酸化，以便与带有帽子的 mRNA 片段区分。接下来，TAP 将带有帽子的 mRNA 去帽并使 5' 末端露出磷酸基团，用于 P5 接头连接。连上接头的片段根据分子量进行凝胶纯化，然后与 P7 接头连接。3' 末端接头可通过 Poly(A) 加尾和连接加上，或者直接加上预先腺苷化的接头。在逆转录和 PCR 扩增后，对该 RNA 文库进行测序。



TL-seq 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">• 测序 5'UTR 并识别变异• 与翻译相关 TL-Seq (TATL-Seq) 结合，能分析转录本引导序列在翻译中的功能	<ul style="list-style-type: none">• 选择短核苷酸片段 (50-80 nt)• 工作量大；需要大量起始材料

综述

Bangru S. and Kalsotra A. Advances in analyzing RNA diversity in eukaryotic transcriptomes: peering through the Omics lens. *F1000Research*. 2016;5:2668

Smith J. E. and Baker K. E. Nonsense-mediated RNA decay – a switch and dial for regulating gene expression. *BioEssays*. 2015;37:612-623

参考文献

Arribere J. A. and Gilbert W. V. Roles for transcript leaders in translation and mRNA decay revealed by transcript leader sequencing. *Genome Res*. 2013;23:977-987

此研究探索了 5'UTR 在调控转录后基因表达中的作用。作者对酵母细胞使用 TL-Seq，定位了大部分酵母基因的 TSS。他们的测序数据还强调了短的 5'UTR 区 (少于 12 nt) 有激活无义介导的 mRNA 降解通路的作用。作者还开发了 TATL-Seq 来研究 5'UTR 对翻译效率的影响。他们发现，CRZ1 基因中短的 5'UTR 异构体与较长异构体相比，有着显著更高的翻译效率。

Illumina 的技术: Genome Analyzer 系统、HiSeq 系统

相关试剂盒

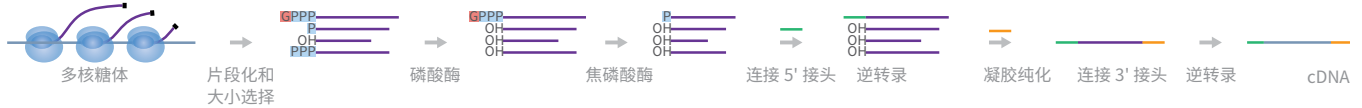
TruSeq RNA Library Prep Kit v2

TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit

42. Arribere J. A. and Gilbert W. V. Roles for transcript leaders in translation and mRNA decay revealed by transcript leader sequencing. *Genome Res*. 2013;23:977-987

TATL-Seq: 翻译相关的转录本前导序列测序

TATL-Seq 与 TL-Seq 相结合, 可靶向与多核糖体连接的 mRNA 的 5'UTR 两边的序列。⁴³ 多核糖体梯度部分的 RNA 被抽提, 进行 Poly(A) 筛选并片段化。然后, TL-Seq 操作后, 分离并测序 5'UTR 区。



TATL-seq 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">• 测序 5'UTR 并识别变异• TATL-Seq 允许从头对转录本引导序列进行注释, 同时在单次实验中测试其翻译效率	<ul style="list-style-type: none">• 选择短核苷酸片段 (50–80 nt)• 工作量大; 需要大量起始材料

综述

Bangru S. and Kalsotra A. Advances in analyzing RNA diversity in eukaryotic transcriptomes: peering through the Omics lens. *F1000Research*. 2016;5:2668

Smith J. E. and Baker K. E. Nonsense-mediated RNA decay – a switch and dial for regulating gene expression. *BioEssays*. 2015;37:612-623

参考文献

Arribere J. A. and Gilbert W. V. Roles for transcript leaders in translation and mRNA decay revealed by transcript leader sequencing. *Genome Res*. 2013;23:977-987

此研究探索了 5'UTR 在调控转录后基因表达中的作用。作者对酵母细胞使用 TL-Seq, 定位了大部分酵母基因的 TSS。他们的测序数据还强调了短的 5'UTR (少于 12 nt) 有激活无义介导的 mRNA 降解通路的作用。作者还开发了 TATL-Seq 来研究 5'UTR 对翻译效率的影响。他们发现, CRZ1 基因中短的 5'UTR 异构体与比较长异构体相比, 有显著更高的翻译效率。

illumina 的技术: Genome Analyzer 系统、HiSeq 系统

相关试剂盒

TruSeq RNA Library Prep Kit v2

TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit

43. Arribere J. A. and Gilbert W. V. Roles for transcript leaders in translation and mRNA decay revealed by transcript leader sequencing. *Genome Res*. 2013;23:977-987

RARseq: 限制性位点相关的 RNA 测序

RARseq 是基于 cDNA 测序进行基因分型的方法，可用于识别 RNA SNP 和多态位点等群体基因组学研究。⁴⁴ 此方法使用单个限制性酶和两个限制性酶酶切产生的文库测序所得的数据，用从头组装和基于参考基因组序列的基因组组装两种方法进行了序列比对。

在 RARseq 中，采用从样本中分离所得的总 RNA。然后，通过逆转录生成第一 cDNA 链和第二 cDNA 链。选择用限制性酶（MseI 和 MseI-Styl-HF）酶切所得的双链 cDNA。将双链 cDNA 片段与测序接头连接，然后进行纯化并选择 200 bp 大小的片段。将样本进行 PCR 扩增、纯化并测序。使用单酶切文库和双酶切文库测序所得的 read，进行从头组装和基于参考基因组序列进行基因组组装。



RARseq 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">• 识别 RNA SNP 和多态位点供群体基因组学研究• 减少来自高度甲基化基因组非基因区域的 read• 使用从头组装和基于参考基因组序列的基因组组装来进行 read 比对• 比测序基因分型方法能更准确低寻找 SNP 和等位基因• 限制性酶选择灵活，可以根据基因组定制	<ul style="list-style-type: none">• 学术界尚未广泛采用• 只在植物基因组中进行过

综述

尚无

参考文献

Alabady M. S., Rogers W. L. and Malmberg R. L. Development of Transcriptomic Markers for Population Analysis Using Restriction Site Associated RNA Sequencing (RARseq). *PLoS One*. 2015;10:e0134855

作者开发了 RARseq 方法，与测序基因分型 (GBS) 和标准 RNA-Seq 方法相比，在识别 SNP 和位点多态性上进行了改进。与标准 GBS 方法相比，RARseq 的优点是基于 CDNA 进行基因分型，提高了发现 SNP 和等位基因的概率。作者用 MseI 和 MseI-Styl-HF 限制性酶进行了 RARseq，组装了猪笼草 F2 基因组。利用从头组装和参考基因组组装两种方法，两种方法分别发现了超过 500 和 1800 个 SNP。

Illumina 的技术：MiSeq 系统

相关试剂盒

TruSeq RNA Library Prep Kit v2

44. Alabady M. S., Rogers W. L. and Malmberg R. L. Development of Transcriptomic Markers for Population Analysis Using Restriction Site Associated RNA Sequencing (RARseq). *PLoS One*. 2015;10:e0134855

TAIL-Seq: Poly(A) 尾测序

TAIL-Seq 专注于对 mRNA 分子最末端 (3'UTR 和 Poly(A) 尾区域) 的测序, 以探索它们在 mRNA 半衰期、稳定性中的作用以及对翻译效率的影响, 并发现与 3' 末端组学功能相关的其他方面。⁴⁵

首先通过基于亲和去除法从总 RNA 中去掉核糖体 RNA (rRNA)。在纯化后, 将 mRNA 与生物素修饰的 3' 接头连接, 然后进行 RNase T1 片段化, 并通过结合链霉亲和素磁珠进一步纯化。将 5' 末端磷酸化并选择 500–1000 nt 的片段以防止短的非编码 RNA (ncRNA) 片段污染测序数据。将磷酸化的 5' 末端与 5' 接头连接, 然后进行逆转录、PCR 扩增并测序。TAIL-Seq 使用独特的双端测序模式, 来关联 3' 末端序列与相关基因序列。通过分离双端 read, read 1 测片段的 5' 末端的 52 个 nt, 以定位到基因组并识别转录本, 而 read 2 测 3' 末端的 251 个 nt, 特异性地确定序列。



TAIL-seq 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">使用特殊荧光分析方法, 以高准确度定量 mRNA 样本上的 Poly(A) 尾长度没有用 Oligo(dT) 进行富集, 消除了对长 Poly(A) 的偏向性不同于通过测序分析 Poly(A) 尾的长度 (PAL-Seq), 此方法能检测经修饰的 3' 末端⁴⁶	<ul style="list-style-type: none">PCR 扩增不利于多个连续相同序列

综述

Nussbacher J. K., Batra R., Lagier-Tourenne C. and Yeo G. W. RNA-binding proteins in neurodegeneration: Seq and you shall receive. *Trends Neurosci.* 2015;38:226-236

Hrdlickova R., Toloue M. and Tian B. RNA-Seq methods for transcriptome analysis. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA.* 2016;n/a-n/a

Bangru S. and Kalsotra A. Advances in analyzing RNA diversity in eukaryotic transcriptomes: peering through the Omics lens. *F1000Research.* 2016;5:2668

Viegas S. C., Silva I. J., Apura P., Matos R. G. and Arraiano C. M. Surprises in the 3' end: 'U' can decide too! *FEBS Journal.* 2015;282:3489-3499

参考文献

Zuber H., Scheer H., Ferrier E., et al. Uridylation and PABP Cooperate to Repair mRNA Deadened Ends in Arabidopsis. *Cell Rep.* 2016;14:2707-2717

此研究试图提高对真核细胞中腺苷化复杂过程的理解。研究人员对野生型和突变体拟南芥幼苗进行了 TAIL-Seq, 以获得关于腺苷转移酶 1 (URT1) 介导的腺苷化的高质量测序 read。TAIL-Seq 能够有效地分离和测序含最多 30 个腺嘌呤的寡聚腺嘌呤链, 并且能检测经修饰的 3' 末端。作者发现, URT1 介导的腺苷化不仅能促进 mRNA 降解, 也能通过招募 Poly(A) 结合蛋白促进 Poly(A) 尾修复。

illumina 的技术: HiSeq 2500 系统、TruSeq Small RNA Library Preparation Kit

Park J. E., Yi H., Kim Y., Chang H. and Kim V. N. Regulation of Poly(A) Tail and Translation during the Somatic Cell Cycle. *Mol Cell.* 2016;62:462-471

Lapointe C. P., Wilinski D., Saunders H. A. J. and Wickens M. Protein-RNA networks revealed through covalent RNA marks. *Nature Methods.* 2015;

相关试剂盒

TruSeq RNA Library Prep Kit v2

TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit

Ribo-Zero Gold rRNA Removal Kits

PhiX 测序对照品 v3

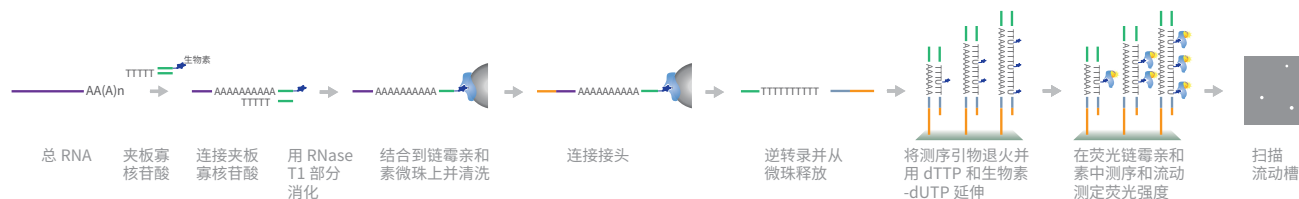
45. Chang H., Lim J., Ha M. and Kim V. N. TAIL-seq: genome-wide determination of poly(A) tail length and 3' end modifications. *Mol Cell.* 2014;53:1044-1052

46. Nussbacher J. K., Batra R., Lagier-Tourenne C. and Yeo G. W. RNA-binding proteins in neurodegeneration: Seq and you shall receive. *Trends Neurosci.* 2015;38:226-236

PAL-Seq: 利用测序分析 Poly(A) 尾长度

PAL-Seq 通过整合生物素修饰的脱氧尿嘧啶三磷酸 (dUTP) 上的荧光标签测量 Poly(A) 尾长度, 并通过信号强度分析 Poly(A) 尾长度。⁴⁷ 与 3P-Seq RNA 文库制备类似, 将含有 3' 接头序列的夹板寡核苷酸连接到多聚腺苷化 RNA 的 3' 末端并用 RNase T1 进行部分酶切。

为了从总 RNA 分离 mRNA, 将样本通过凝胶纯化按大小选择, 并结合到链霉亲和素微珠, 然后将 5' 末端磷酸化, 以进行接头连接。簇生成前, mRNA 片段被逆转录为 cDNA, 与微珠分开, 并通过凝胶进行片段大小选择和纯化。将测序引物连接到 Poly(A) 序列的 3' 末端, 并用脱氧胸腺嘧啶三磷酸 (dTTP) 和生物素修饰的 dUTP 进行延伸。为定位片段的序列, 对 Poly(A) 尾 5' 末端附近的区域进行测序。荧光标记的链霉亲和素分子与生物素 -dUTP 结合, 测量其信号强度以定量每个簇中腺嘌呤同聚物的长度。



PAL-seq 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">准确测量 Poly(A) 尾长度, 而无论长度如何避免直接测序 Poly(A) 尾	<ul style="list-style-type: none">技术上操作复杂在生物素 -dUTP 延伸步骤中可能产生效率相关问题只捕获仅由腺嘌呤组成的 3' 末端

综述

Bangru S. and Kalsotra A. Advances in analyzing RNA diversity in eukaryotic transcriptomes: peering through the Omics lens. *F1000Research*. 2016;5:2668

Nussbacher J. K., Batra R., Lagier-Tourenne C. and Yeo G. W. RNA-binding proteins in neurodegeneration: Seq and you shall receive. *Trends Neurosci*. 2015;38:226-236

参考文献

Eichhorn S. W., Subtelny A. O., Kronja I., Kwasnieski J. C., Orr-Weaver T. L. and Bartel D. P. mRNA poly(A)-tail changes specified by deadenylation broadly reshape translation in *Drosophila* oocytes and early embryos. *Elife*. 2016;5:

作者研究了果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 中从卵子成熟到胚胎形成的整个过程中, Poly(A) 尾长度与翻译效率 (TE) 之间的关系。他们使用 PAL-Seq 确定 Poly(A) 尾长度, 并用 RNA-Seq 结合核糖体足迹分析确定 TE。PAL-Seq 的优势在于能识别短和长 3'UTR 异构体, 以及切割和 Poly(A) 位点定位。结果表明, 直到原肠形成阶段, Poly(A) 尾长度在确定 TE 中起到主要作用。

illumina 的技术: HiSeq 系统、Genome Analyzer 系统

Harrison P. F., Powell D. R., Clancy J. L., et al. PAT-seq: a method to study the integration of 3'-UTR dynamics with gene expression in the eukaryotic transcriptome. *RNA*. 2015;21:1502-1510

Kappel C., Trost G., Czesnick H., et al. Genome-Wide Analysis of PAPS1-Dependent Polyadenylation Identifies Novel Roles for Functionally Specialized Poly(A) Polymerases in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet*. 2015;11:e1005474

相关试剂盒

TruSeq RNA Library Prep Kit v2

TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit

47. Subtelny A. O., Eichhorn S. W., Chen G. R., Sive H. and Bartel D. P. Poly(A)-tail profiling reveals an embryonic switch in translational control. *Nature*. 2014;508:66-71

FRT-Seq: 流动槽逆转录测序

流动槽表面逆转录测序 (FRT-Seq) 是一种转录组测序技术, 由 Mamanova 等人于 2010 年开发。⁴⁸ 用此方法构建的文库是链特异性的, 不需要扩增, 与双端测序兼容。

首先, 用金属离子将 Poly(A) RNA 样本进行水解片段化并去磷酸化。然后, 将 P7 引物 / 接头连接到片段的 3' 末端。3' 接头序列在其 5' 末端以 20 nt RNA 开始, 后接 DNA 核苷酸。接头也被 5' 磷酸化并用双脱氧胞嘧啶 (ddC) 在 3' 末端阻断。在连接上 3' 接头后, 对片段进行大小选择, 筛选出比接头长的核苷酸片段。片段的 5' 末端被磷酸化并与 P5 接头连接。这些接头的 5' 末端连有氨基 -C6 基团进行阻断。现在片段两侧有接头, 将其与流动槽杂交并逆转录, 然后进行簇生成和测序。



FRT-seq 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">链特异性 Poly(A) mRNA 测序, 用于转录组分析无扩增步骤——提供对总 mRNA 群体的更准确表示, 避免扩增偏向性	<ul style="list-style-type: none">需要大量 Poly(A) RNA 材料 (250 ng)仅选择 Poly(A) mRNA 样本

综述

van Dijk E. L., Jaszczyszyn Y. and Thermes C. Library preparation methods for next-generation sequencing: Tone down the bias. *Experimental Cell Research*. 2014;322:12-20
McGittigan P. A. Transcriptomics in the RNA-seq era. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2013;17:4-11

参考文献

Vergara-Irigaray M., Fookes M. C., Thomson N. R. and Tang C. M. RNA-seq analysis of the influence of anaerobiosis and FNR on *Shigella flexneri*. *BMC Genomics*. 2014;15:438:

此研究分析了无氧环境对福氏志贺氏菌转录组的影响, 福氏志贺氏菌是革兰氏阴性菌, 导致急性人直肠结肠炎。作者使用 RNA-Seq 和 FRT-Seq 定量由无氧条件引起的基因表达改变并识别由无氧延胡索酸和硝酸还原调节剂 (FNR) 调控的基因。结果表明, 在无氧条件下, 参与碳代谢、DNA 调控、宿主相互作用和存活相关通路的一些基因的表达水平存在上调现象。最值得注意的是, 许多 T3SS 相关基因的表达水平呈现出取决于 FNR 一致的下调。

Illumina 的技术: HiSeq 2000 系统

Mills J. D., Kawahara Y. and Janitz M. Strand-Specific RNA-Seq Provides Greater Resolution of Transcriptome Profiling. *Curr Genomics*. 2013;14:173-181

Kroger C., Dillon S. C., Cameron A. D., et al. The transcriptional landscape and small RNAs of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109:E1277-1286

相关试剂盒

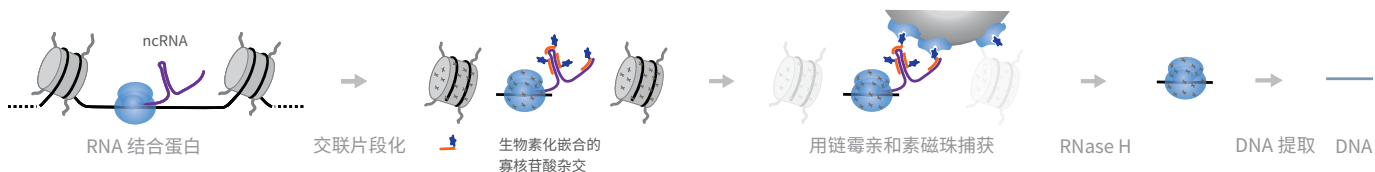
TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit

48. Mamanova L., Andrews R. M., James K. D., et al. FRT-seq: amplification-free, strand-specific transcriptome sequencing. *Nat Methods*. 2010;7:130-132

ChIRP: 通过 RNA 纯化进行染色质分离

ChIRP 通常也称为 ChIRP-seq，是检测基因组中 ncRNA（如 lncRNA）在基因组上的位置，和它与蛋白结合的具体位点信息的实验方案。⁴⁹

在此方法中，首先交联样本并超声处理。用生物素化的连续序列分布的寡核苷酸与目标 RNA 杂交，并用链霉亲和素磁珠捕获复合物。在用 RNase H 处理后，提取 DNA 并测序。深度测序可以在单碱基分辨率水平上确定 lncRNA/ 蛋白相互作用位点。



ChIRP 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">• 识别基因组上任何位置的结合位点• 允许发现新结合位点• 允许选择特定目标 RNA	<ul style="list-style-type: none">• 非特异性寡核苷酸相互作用可能导致结合位点的错误解读• 染色质可能在制备阶段被破坏• 目标 RNA 的序列必须已知

综述

Tomita S., Abdalla M. O. A., Fujiwara S., et al. Roles of long noncoding RNAs in chromosome domains. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*. 2016;n/a-n/a

Schmitt Adam M. and Chang Howard Y. Long Noncoding RNAs in Cancer Pathways. *Cancer Cell*. 2016;29:452-463

Simon M. D. Insight into lncRNA biology using hybridization capture analyses. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*. 2016;1859:121-127

Yang Y., Wen L. and Zhu H. Unveiling the hidden function of long non-coding RNA by identifying its major partner-protein. *Cell & Bioscience*. 2015;5:59

Chu C., Spitale R. C. and Chang H. Y. Technologies to probe functions and mechanisms of long noncoding RNAs. *Nat Struct Mol Biol*. 2015;22:29-35

参考文献

Flynn R. A., Do B. T., Rubin A. J., et al. 7SK-BAF axis controls pervasive transcription at enhancers. *Nat Struct Mol Biol*. 2016;23:231-238

研究人员组合使用 ChIRP-seq、全局连续测序 (GRO-Seq) 和转座酶分离染色质检测 (ATAC-Seq)，证明 7SK 小核 RNA (snRNA) 调控核小体位置以抑制增强子转录。他们能够以 RNA 依赖性方式选择性回收 7SK 结合区域并证明 7SK 利用多种机制抑制超级增强子、增强子和启动子的作用。

illumina 的技术: HiSeq 2500 系统

Huang W., Thomas B., Flynn R. A., et al. DDX5 and its associated lncRNA Rmrp modulate TH17 cell effector functions. *Nature*. 2015;528:517-522

Luo M., Jeong M., Sun D., et al. Long Non-Coding RNAs Control Hematopoietic Stem Cell Function. *Cell Stem Cell*. 2015;16:426-438

Wongtrakongate P., Riddick G., Fucharoen S. and Felsenfeld G. Association of the Long Non-coding RNA Steroid Receptor RNA Activator (SRA) with TrxG and PRC2 Complexes. *PLoS Genet*. 2015;11:e1005615

Li Z., Chao T. C., Chang K. Y., et al. The long noncoding RNA THRIL regulates TNFalpha expression through its interaction with hnRNPL. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111:1002-1007

相关试剂盒

ScriptSeq Complete Kit

TruSeq RNA Library Prep Kit v2

TruSeq Small RNA Library Prep Kit

49. Chu C., Qu K., Zhong F. L., Artandi S. E. and Chang H. Y. Genomic maps of long noncoding RNA occupancy reveal principles of RNA-chromatin interactions. *Mol Cell*. 2011;44:667-678

CHART: RNA 靶标的捕获杂交分析

CHART 通过对交联的 RNA-DNA- 蛋白复合物结合的位点处的 DNA 区域进行分离并测序，定位 ncRNA 在基因组上的结合位点。⁵⁰ 由于 CHART 使用对于目标 ncRNA 高度敏感且唯一的生物素化 24 nt 寡核苷酸 (C-oligos)，它不同于其他交联复合物纯化技术，例如 ChIRP。⁵¹

使用 RNase H 定位检测设计 C-oligo 的 24 nt 序列。首先，交联核样本并片段化。接着，C-oligo 与复合物杂交，并与链霉亲和素微珠结合。洗涤混合物并将复合物洗脱。分离 DNA 并测序，分离复合物中的蛋白并通过蛋白质印迹分析。



ChIRP 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">定位 lncRNA 在基因组上的结合位点同时识别与 lncRNA 复合物结合的蛋白	<ul style="list-style-type: none">需要大量的细胞核 (1×10^9 个细胞)

综述

Hassan M. Q., Tye C. E., Stein G. S. and Lian J. B. Non-coding RNAs: Epigenetic regulators of bone development and homeostasis. *Bone*. 2015;81:746-756

参考文献

Lee N., Moss W. N., Yario T. A. and Steitz J. A. EBV noncoding RNA binds nascent RNA to drive host PAX5 to viral DNA. *Cell*. 2015;160:607-618

此研究专注于扩展对 EBER2 (在 Epstein-Barr 病毒 (EBV) 中高度表达且具有高致癌性的核 ncRNA) 与其宿主系统的复杂相互作用的理解。作者在 CHART 中使用反义寡核苷酸以分离 EBER2 并对其靶标 DNA 进行测序。他们发现 EBER2 需在宿主的 PAX5 蛋白的参与下，与新生 EBV 基因组在其末端串联重复区域进行共定位。敲除 EBER2 基因降低了 EBV 的裂解性增殖。

Illumina 的技术: HiSeq 2000 系统

Torres M., Becquet D., Blanchard M. P., et al. Circadian RNA expression elicited by 3'-UTR IRAlu-paraspeckle associated elements. *Elife*. 2016;5:

Vance K. W., Sansom S. N., Lee S., et al. The long non-coding RNA Paupar regulates the expression of both local and distal genes. *EMBO J*. 2014;33:296-311

相关试剂盒

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Kit

50. Simon M. D., Wang C. I., Kharchenko P. V., et al. The genomic binding sites of a noncoding RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108:20497-20502

51. Kashi K., Henderson L., Bonetti A. and Carninci P. Discovery and functional analysis of lncRNAs: Methodologies to investigate an uncharacterized transcriptome. *Biochim Biophys Acta*. 2015;

RAP: RNA 反义纯化

RAP 分离 lncRNA 并通过探针-捕获机制定位其靶标 DNA 的序列。⁵²

首先, 将细胞交联并裂解, 然后用 DNA 酶 I 对染色质进行酶切, 产生 100–300 bp 的 DNA 片段。将其与带有 lncRNA 反义序列的生物素 RNA 探针杂交, 并用链霉亲和素进行捕获。生物素-RNA 探针长 120 nt, 两个探针之间的距离为在 lncRNA 的范围中每隔 15 nt 排列。洗脱捕获的复合物并制备以进行测序。RNA 文库是基于 RAP-RNA 的产物来制备的, DNA 文库是基于标准染色质免疫沉淀 (ChIP) 的产物来制备的。



RAP 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">• lncRNA 靶标的基因组定位• 可以对纯化产物进行 RNA 和 DNA 测序• 长的 RNA 探针具有更高的靶标 lncRNA 的结合亲和力⁵³• 在纯化 lncRNA 复合物后的 RNA 测序中, 大大减少了扩增步骤	<ul style="list-style-type: none">• 需要已知 RNA 序列

综述

Kashi K., Henderson L., Bonetti A. and Carninci P. Discovery and functional analysis of lncRNAs: Methodologies to investigate an uncharacterized transcriptome. *Biochim Biophys Acta*. 2015;

Simon M. D. Insight into lncRNA biology using hybridization capture analyses. *Biochim Biophys Acta*. 2016;1859:121-127

参考文献

Chen C. K., Blanco M., Jackson C., et al. Xist recruits the X chromosome to the nuclear lamina to enable chromosome-wide silencing. *Science*. 2016;

此研究揭示了在介导 X 染色体失活过程中 Xist lncRNA 与 lamina B 受体之间如何进行直接相互作用。作者使用 RAP 和 DNA 测序分离了 ΔLBS-Xist 和野生型小鼠胚胎干细胞 (ESC) 中的 Xist lncRNA。他们发现位于 ΔLBS-Xist ESC 中的 Xist 的丰度显著降低。

illumina 的技术: HiSeq 系统、MiSeq 系统

Boque-Sastre R., Soler M., Oliveira-Mateos C., et al. Head-to-head antisense transcription and R-loop formation promotes transcriptional activation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;

McHugh C. A., Chen C.-K., Chow A., et al. The Xist lncRNA interacts directly with SHARP to silence transcription through HDAC3. *Nature*. 2015;521:232-236

Engreitz J. M., Sirokman K., McDonel P., et al. RNA-RNA interactions enable specific targeting of noncoding RNAs to nascent Pre-mRNAs and chromatin sites. *Cell*. 2014;159:188-199

相关试剂盒

TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Kit

TruSeq ChIP Library Prep Kit

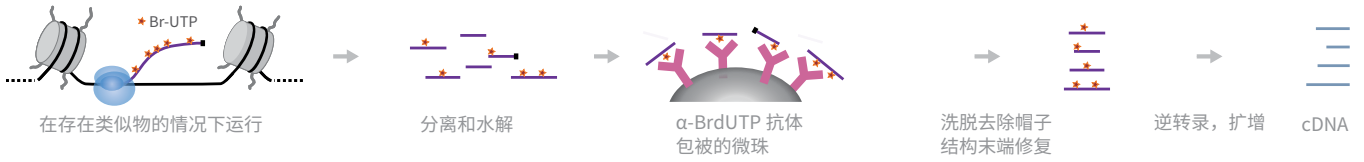
52. Engreitz J. M., Pandya-Jones A., McDonel P., et al. The Xist lncRNA exploits three-dimensional genome architecture to spread across the X chromosome. *Science*. 2013;341:1237-973

53. Kashi K., Henderson L., Bonetti A. and Carninci P. Discovery and functional analysis of lncRNAs: Methodologies to investigate an uncharacterized transcriptome. *Biochim Biophys Acta*. 2015;

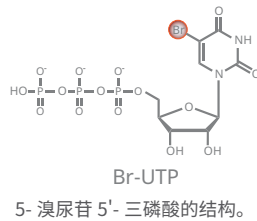
GRO-seq: 全局连续测序

GRO-Seq 定位具有转录活性的 RNA 聚合酶 II (RNAPII) 的结合位点。⁵⁴

在此方法中, 允许活性 RNAPII 在 5- 溴尿苷 5' 三磷酸 (Br-UTP) 存在下工作。将 RNA 水解并用抗 5- 溴 -2- 脱氧尿嘧啶 (BrdU) 抗体包被的微珠纯化。在去除帽和末端修复后, 将洗脱的 RNA 逆转录为 cDNA。通过 cDNA 的深度测序, 识别了正在被 RNAPII 转录的 RNA。



GRO-seq 示意图。



优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">• 确定参与转录的 RNA 聚合酶的位置• 确定转录位点的相对活性• 检测有义和反义转录• 检测基因组上任何位置的转录• 不需要预先了解转录位点的信息• 提供对增强子和启动子相关 RNA 的可靠覆盖信息⁵⁵	<ul style="list-style-type: none">• 受限于细胞培养系统及其他人工系统 (原因是当带标记核苷酸的存在会对孵育有所要求)。• 在处理细胞核的过程中可能会引入人为影响⁵⁶• 在连续步骤中可能产生新的起始事件• 干扰物质的存在可能阻碍聚合酶的活性• 分辨率仅为 30-100 nt⁵⁷• 新生 RNA 至少需要 18 nt⁵⁸

综述

Murakawa Y., Yoshihara M., Kawaji H., Nishikawa M., Zayed H., et al. Enhanced Identification of Transcriptional Enhancers Provides Mechanistic Insights into Diseases. *Trends Genet.* 2016;32:76-88

Li Y., Chen C. Y., Kaye A. M. and Wasserman W. W. The identification of cis-regulatory elements: A review from a machine learning perspective. *Biosystems.* 2015;138:6-17

Jonkers I. and Lis J. T. Getting up to speed with transcription elongation by RNA polymerase II. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015;16:167-177

54. Core L. J., Waterfall J. J. and Lis J. T. Nascent RNA sequencing reveals widespread pausing and divergent initiation at human promoters. *Science.* 2008;322:1845-1848

55. Melnik S., Caudron-Herger M., Brant L., et al. Isolation of the protein and RNA content of active sites of transcription from mammalian cells. *Nat Protoc.* 2016;11:553-565

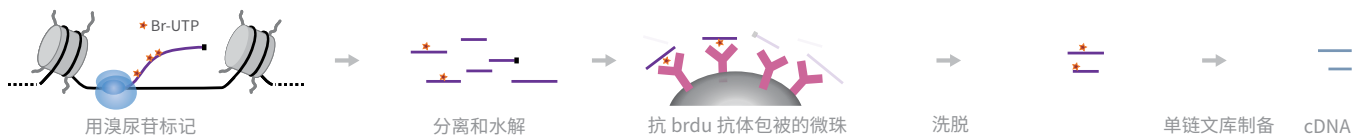
56. Adelman K. and Lis J. T. Promoter-proximal pausing of RNA polymerase II: emerging roles in metazoans. *Nat Rev Genet.* 2012;13:720-731

57. Nojima T., Gomes T., Carmo-Fonseca M. and Proudfoot N. J. Mammalian NET-seq analysis defines nascent RNA profiles and associated RNA processing genome-wide. *Nat Protoc.* 2016;11:413-428

58. Mayer A. and Churchman L. S. Genome-wide profiling of RNA polymerase transcription at nucleotide resolution in human cells with native elongating transcript sequencing. *Nat Protoc.* 2016;11:813-833

Bru-Seq: 溴尿苷测序

Bru-Seq 使用溴化脲嘧啶标记定位新生 RNA 转录本。⁵⁹ RNAPII 在加有 Br-UTP 的体系中去合成 RNA。利用由抗 BrdU 抗体包被的磁珠从总 RNA 免疫沉淀标记的 RNA 转录本。将捕获的 RNA 转录本洗脱并片段化，然后通过逆转录和 PCR 扩增合成 cDNA 链。将所得的 cDNA 制备用于 Illumina TruSeq RNA Library Prep Kit 测序。



Bru-Seq 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">• 定位新生 RNA 转录本的序列并确定相对转录速率• 检测 lncRNA⁶⁰• 检测基因组上任何位置的转录	<ul style="list-style-type: none">• 受限于细胞培养系统及其他人工系统（原因是当带标记核苷酸存在时会对孵育条件有所要求）。

综述

Andrade-Lima L., Veloso A. and Ljungman M. Transcription Blockage Leads to New Beginnings. *Biomolecules*. 2015;5:1600

参考文献

Lefkofsky H. B., Veloso A. and Ljungman M. Transcriptional and post-transcriptional regulation of nucleotide excision repair genes in human cells. *Mutat Res*. 2015;776:9-15

该研究研究了参与核苷酸切除修复 (NER) 过程的 29 个基因在转录水平和转录后水平上的调控，核苷酸切除修复是修复紫外 (UV) 诱导的 DNA 损伤的重要机制。作者使用 Bru-Seq 和溴尿苷脉冲驱逐测序 (BruChase-Seq)，在 13 个人细胞系中，分别定量了基因表达水平和 RNA 稳定性以及修复速率。在这 29 个基因中，ERCC6 由于其较大的大小和高 RNA 修复速率，有很大潜力成为 DNA 损伤的标志物。

Illumina 的技术：HiSeq 2000 系统、TruSeq RNA Library Prep Kit

Kocab A. J., Veloso A., Paulsen M. T., Ljungman M. and Duckett C. S. Effects of physiological and synthetic IAP antagonism on c-IAP-dependent signaling. *Oncogene*. 2015;

相关试剂盒

TruSeq RNA Library Prep Kit v2

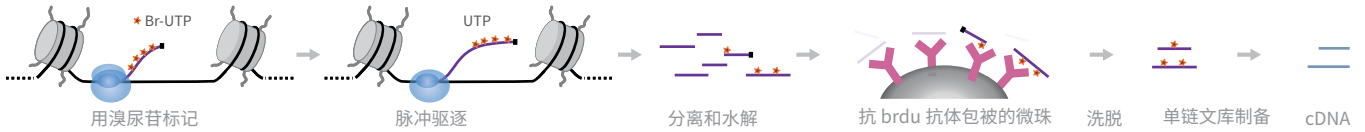
59. Paulsen M. T., Veloso A., Prasad J., et al. Coordinated regulation of synthesis and stability of RNA during the acute TNF-induced proinflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:2240-2245

60. Paulsen M. T., Veloso A., Prasad J., et al. Use of Bru-Seq and BruChase-Seq for genome-wide assessment of the synthesis and stability of RNA. *Methods*. 2014;67:45-54

BruChase-Seq: 溴尿苷脉冲追踪测序

BruChase-Seq 使用溴尿苷标记定位并定量新生 RNA 转录本的相对稳定性。⁶¹ RNAPII 在加有 Br-UTP 的体系中去合成 RNA。加入未标记的尿嘧啶，以从具有高修复速率的 RNA 中去除溴尿苷。长寿命的 RNA 转录本将保持标记状态。

利用由抗 BrdU 抗体包被的磁珠从总 RNA 中免疫沉淀出带标记的 RNA 转录本。将捕获的 RNA 转录本洗脱并片段化，然后通过逆转录和 PCR 扩增合成 cDNA 链。将所得的 cDNA，采用 Illumina TruSeq RNA Library Prep Kit 进行文库制备并进行测序。



BruChase-Seq 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">• 通过脉冲去除溴尿苷来确定 RNA 稳定性• 预测无义和移码突变⁶²• 检测基因组上任何位置的转录• 不需要预先了解转录位点的信息	<ul style="list-style-type: none">• 受限于细胞培养系统及其他人工系统（原因是当有带标记核苷酸存在时会对孵育条件有所要求）。

综述

Andrade-Lima L., Veloso A. and Ljungman M. Transcription Blockage Leads to New Beginnings. *Biomolecules*. 2015;5:1600

参考文献

Lefkofsky H. B., Veloso A. and Ljungman M. Transcriptional and post-transcriptional regulation of nucleotide excision repair genes in human cells. *Mutat Res*. 2015;776:9-15

该研究研究了参与 NER 的 29 个基因的转录和转录后调控，NER 是修复 UV 诱导的 DNA 损伤的重要机制。作者使用 Bru-Seq 和 BruChase-Seq，在 13 个人细胞系中，分别定量了基因表达水平和 RNA 稳定性以及修复速率。在这 29 个基因中，ERCC6 由于其较大的大小和高 RNA 修复速率，有很大潜力成为 DNA 损伤的标志物。

Illumina 的技术：HiSeq 2000 系统、TruSeq RNA Library Prep Kit

Kocob A. J., Veloso A., Paulsen M. T., Ljungman M. and Duckett C. S. Effects of physiological and synthetic IAP antagonism on c-IAP-dependent signaling. *Oncogene*. 2015;

相关试剂盒

TruSeq RNA Library Prep Kit v2

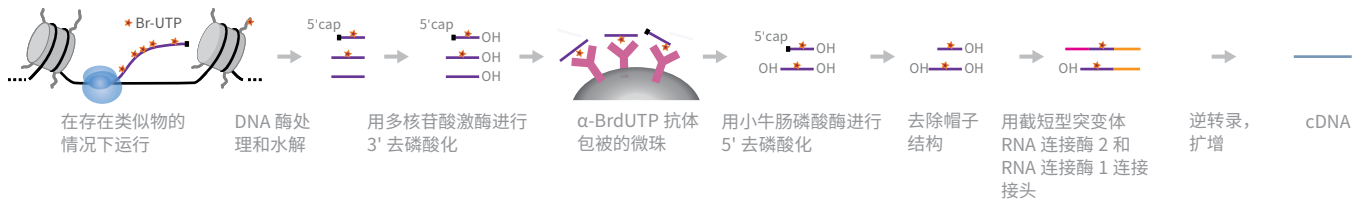
61. Paulsen M. T., Veloso A., Prasad J., et al. Coordinated regulation of synthesis and stability of RNA during the acute TNF-induced proinflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110:2240-2245

62. Paulsen M. T., Veloso A., Prasad J., et al. Use of Bru-Seq and BruChase-Seq for genome-wide assessment of the synthesis and stability of RNA. *Methods*. 2014;67:45-54

5'-GRO-Seq: 5' 全局连续测序

5'-GRO-Seq 使用标记的核苷酸可以在任何给定时间，确定具有 7- 甲基鸟苷酸 (m7G) 帽的新生 RNA 序列的位置。⁶³ 此方法最初开发的时候是用来定位和检测由于增强子 RNA 的存在而导致的 TSS 不稳定。

与 GRO-seq 十分类似，5'-GRO-Seq 首先在裂解好的细胞核样本中加入 Br-UTP 和肌氨酰。Br-UTP 作为分离 RNA 的标记，而肌氨酰抑制额外的 RNAPII 与 DNA 结合。在反应停止后，加入 DNA 酶 I 将 RNA 产物片段化。用 T4 PNK 将 RNA 的 3' 末端去磷酸化，用抗 BrdU 抗体捕获含溴尿苷的片段。分离的 RNA 用 CIP 去磷酸化，并用 TAP 去除 5' 帽。接着，分别用 RNA 连接酶 2 和 RNA 连接酶连接 3' 和 5' 接头。将片段逆转录，分离并扩增所得的 cDNA，并选择大小在 60–110 bp 的片段。用凝胶方法分离片段并测序。



5'-GRO-Seq 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none"> 在任何给定的时间定位带有帽子的 5' RNA 序列 确定转录位点的活性 不需要预先了解转录位点的信息 	<ul style="list-style-type: none"> 受限於细胞培养系统及其他人工系统（原因是当带标记核苷酸存在时会对其条件有所要求）。

综述

Lam M. T. Y., Li W., Rosenfeld M. G. and Glass C. K. Enhancer RNAs and regulated transcriptional programs. *Trends in Biochemical Sciences*. 2014;39:170-182

参考文献

Duttke S. H., Lacadie S. A., Ibrahim M. M., et al. Human promoters are intrinsically directional. *Mol Cell*. 2015;57:674-684

此研究使用 5'-GRO-Seq，通过定位 HeLa 细胞中的新生 RNA 5' 末端来研究人启动子序列中的方向性。作者发现自然情况下基础转录机制是单向的，不同的转录位点具有其自身的启动子，邻近无核小体区域的边缘。令人惊讶的是，这些区域的序列与相应的正向序列相似。

Illumina 的技术：TruSeq RNA Library Prep Kit

相关试剂盒

TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Kit2

63. Lam M. T., Cho H., Lesch H. P., et al. Rev-Erbs repress macrophage gene expression by inhibiting enhancer-directed transcription. *Nature*. 2013;498:511-515

BruDRB-Seq: 溴尿苷 5,6-二氯苯并咪唑 1-β-D-呋喃核糖苷测序

BruDRB-Seq 可给出 RNAPII 的延伸速率。⁶⁴

在延伸前, 将 5,6-二氯苯并咪唑 1-β-D-呋喃核糖苷 (DRB) 加入到细胞中, 以瞬时抑制 RNAPII, 允许整个基因组同时开始进行转录。在去除 DRB 后, 加入 Br-UTP 取代 UTP, 加入其他核苷酸。在细胞裂解后, 分离 RNA 并片段化。接下来, 用由抗 BrdU 抗体包被的磁珠从总 RNA 免疫沉淀溴尿苷标记的 RNA。使用 TruSeq RNA 文库制备试剂盒制备 cDNA 文库并测序。



BruDRB-seq 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">在整个基因组水平上定量 RNA 延伸速率新转录的 RNA 分子在其整个长度被标记	<ul style="list-style-type: none">受限于细胞培养系统及其他人工系统 (原因是当带标记核苷酸存在时会对孵育条件有所要求)。Bru-Seq 必须与 Bru-DRB-Seq 联合进行, 以实现准确的数据分析

综述

Jonkers I. and Lis J. T. Getting up to speed with transcription elongation by RNA polymerase II. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2015;16:167-177

参考文献

Veloso A., Kirkconnell K. S., Magnuson B., Biewen B., Paulsen M. T., et al. Rate of elongation by RNA polymerase II is associated with specific gene features and epigenetic modifications. *Genome Res.* 2014;24:896-905

这是描述如何进行 BruDRB-seq 的最原始的出版物。作者研究了转录控制的固有机理, 并使用 BruDRB-seq 计算人成纤维细胞系中超过 2000 个不同的基因的延伸速率。结果显示, 具有 H3K79me2 和 H4K20me1 组蛋白甲基化标记的基因具有较高的转录延伸速率。

Illumina 的技术: HiSeq 2000 系统、TruSeq RNA Library Prep Kit

相关试剂盒

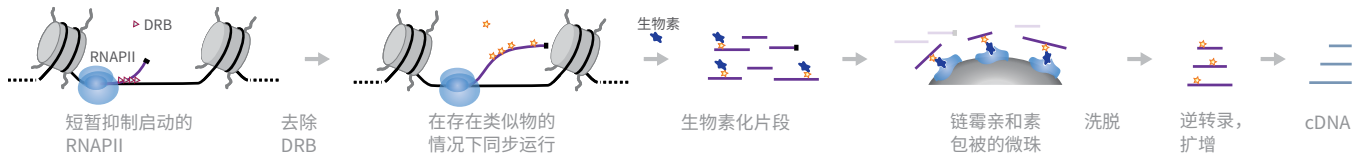
TruSeq RNA Library Prep Kit v2

64. Veloso A., Kirkconnell K. S., Magnuson B., et al. Rate of elongation by RNA polymerase II is associated with specific gene features and epigenetic modifications. *Genome Res.* 2014;24:896-905

4sUDRB-Seq: 4- 硫尿核苷和 5,6- 二氯苯并咪唑 1-β-D- 呋喃核糖苷测序

4sUDRB-Seq 使用 4- 硫基脲嘧啶 (4-SU) 和 DRB 研究整个基因组水平上的转录起始频率和 RNA 延伸速率。⁶⁵

首先用 DRB 处理细胞以抑制 RNA 延伸, 在 TSS 处抑制 RNAPII 的活性。将细胞裂解, 清除 DRB, 并立即用 4-SU 孵育以标记新转录的 RNA 分子。加入生物素与 4-SU 结合, 然后用链霉亲和素微珠捕获标记的 RNA。洗脱生物素化的 RNA 片段, 并使用 TruSeq RNA Library Prep Kit 进行文库制备以用于测序。



4sUDRB-seq 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">同时测量 RNA 延伸速率和转录起始速率测序 read 在整个转录过程中表现为动态——可用于准确确定转录起始速率⁶⁶不需要预先了解序列信息	<ul style="list-style-type: none">4-SU 的高毒性可能会使实验的延伸速率变慢⁶⁷在整个基因组水平上去测量 RNAPII 到有效延伸的转变, 可能成本效益不高, 因为需要高的测序深度⁶⁸动态序列 read 使得识别转录本末端具有挑战性⁶⁹受限于细胞培养系统及其他人工系统 (原因是当带标记核苷酸存在时会对孵育条件有所要求)。

综述

Rabani M., Raychowdhury R., Jovanovic M., et al. High-Resolution Sequencing and Modeling Identifies Distinct Dynamic RNA Regulatory Strategies. *Cell*. 159:1698-1710

Duffy E. E., Rutenberg-Schoenberg M., Stark C. D., Kitchen R. R., Gerstein M. B. and Simon M. D. Tracking Distinct RNA Populations Using Efficient and Reversible Covalent Chemistry. *Mol Cell*. 2015;59:858-866

Jonkers I. and Lis J. T. Getting up to speed with transcription elongation by RNA polymerase II. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2015;16:167-177

参考文献

Zhang Y., Xue W., Li X., et al. The Biogenesis of Nascent Circular RNAs. *Cell Rep*. 2016;15:611-624

前体 mRNA 反向剪接产生的环状 RNA (circRNA), 它被定位到哺乳动物中数以千计的基因组位点, 在基因调控方面起着十分重要的作用。但是, 对 circRNA 的具体产生机制了解有限。在本研究中, 作者在人细胞系中使用了 4sUDRB-Seq。他们发现, circRNA 在大部分情况下是在转录后加工的, 并且很稳定。

Illumina 的技术: HiSeq 2000 系统

Jaenicke L. A., von Eyss B., Carstensen A., et al. Ubiquitin-Dependent Turnover of MYC Antagonizes MYC/PAF1C Complex Accumulation to Drive Transcriptional Elongation. *Mol Cell*. 2016;61:54-67

Fuchs G., Rosenthal E., Bublik D.-R., Kaplan T. and Oren M. Gene body H2B monoubiquitylation regulates gene-selective RNA Polymerase II pause release and is not rate limiting for transcription elongation. *bioRxiv*. 2015;

65. Fuchs G., Voickek Y., Benjamin S., Gilad S., Amit I. and Oren M. 4sUDRB-seq: measuring genomewide transcriptional elongation rates and initiation frequencies within cells. *Genome Biol*. 2014;15:R69

66. Fuchs G., Voickek Y., Rabani M., et al. Simultaneous measurement of genome-wide transcription elongation speeds and rates of RNA polymerase II transition into active elongation with 4sUDRB-seq. *Nat Protoc*. 2015;10:605-618

67. Fuchs G., Voickek Y., Rabani M., et al. Simultaneous measurement of genome-wide transcription elongation speeds and rates of RNA polymerase II transition into active elongation with 4sUDRB-seq. *Nat Protoc*. 2015;10:605-618

68. Fuchs G., Voickek Y., Rabani M., et al. Simultaneous measurement of genome-wide transcription elongation speeds and rates of RNA polymerase II transition into active elongation with 4sUDRB-seq. *Nat Protoc*. 2015;10:605-618

69. Fuchs G., Voickek Y., Rabani M., et al. Simultaneous measurement of genome-wide transcription elongation speeds and rates of RNA polymerase II transition into active elongation with 4sUDRB-seq. *Nat Protoc*. 2015;10:605-618

PRO-Seq: 精确核连续测序

精确核连续测序 (PRO-Seq) 在碱基对分辨率上来定位 RNA 转录中的 RNAPII 暂停位点。^{70, 71} 此方法与 GRO-Seq 类似, 增加了可分辨单碱基的额外好处。RNAPII 起始位点可以用称为 PRO-cap 的改良实验方案定位。

在 PRO-seq 中, 对细胞核裂解物进行 4 个单独连续反应, 每个实验只有 1 种生物素 -NTP 和肌氨酰。单个生物素 -NTP 的结合来终止 RNAPII 对新生 RNA 链的进一步延伸。提取 RNA 链, 然后片段化并通过链霉亲和素结合纯化。接着将 3' 接头直接与纯化的样本连接, 然后进行另一个链霉亲和素纯化步骤。在连接 5' 接头前, 用 TAP 和 PNK 修复 5' 末端。通过另一链霉亲和素纯化过程, 富集两侧有接头的 RNA 片段, 然后进行逆转录和 PCR 扩增。对所得的 cDNA 链从 3' 末端开始测序。



PRO-seq 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">在碱基对分辨率上去定位 RNAPII 暂停位点单独连续反应限制了添加生物素 -NTP 以外的核苷酸在 PCR 之前有多个生物素富集步骤可使用 PRO-cap 定位起始位点	<ul style="list-style-type: none">不能检测终止反应或反向起作用的 RNAPII 复合物⁷²限于体外反应

综述

Brent M. R. Past Roadblocks and New Opportunities in Transcription Factor Network Mapping. *Trends Genet.* 2016;32:736-750

Engreitz J. M., Haines J. E., Perez E. M., et al. Local regulation of gene expression by lncRNA promoters, transcription and splicing. *Nature.* 2016;539:452-455

参考文献

Wang I. X., Core L. J., Kwak H., et al. RNA-DNA differences are generated in human cells within seconds after RNA exits polymerase II. *Cell Rep.* 2014;6:906-915

作者使用 GRO-Seq 和 PRO-Seq 的组合研究了新生 RNA 链中的 RNA-DNA 序列差异 (RDD)。他们发现, 在离 RNAPII 活性位点约 55 nt 的位置开始出现 RDD。这种近端发生 RDD 与已知的脱氨酶介导的 RNA 编辑机制不一致。进一步的分析发现, 55 nt 延迟未在 RNAPII 引导的合成中出现, 并且不是因为结合了修饰的碱基。

illumina 的技术: HiSeq 2500 系统、TruSeq RNA Library Prep Kit

Danko C. G., Hyland S. L., Core L. J., et al. Identification of active transcriptional regulatory elements from GRO-seq data. *Nat Methods.* 2015;

Core L. J., Martins A. L., Danko C. G., Waters C. T., Siepel A. and Lis J. T. Analysis of nascent RNA identifies a unified architecture of initiation regions at mammalian promoters and enhancers. *Nat Genet.* 2014;

Pagano J. M., Kwak H., Waters C. T., et al. Defining NELF-E RNA binding in HIV-1 and promoter-proximal pause regions. *PLoS Genet.* 2014;10:e1004090

相关试剂盒

TruSeq RNA Library Prep Kit v2

70. Kwak H., Fuda N. J., Core L. J. and Lis J. T. Precise maps of RNA polymerase reveal how promoters direct initiation and pausing. *Science.* 2013;339:950-953

71. Mahat D. B., Kwak H., Booth G. T., et al. Base-pair-resolution genome-wide mapping of active RNA polymerases using precision nuclear run-on (PRO-seq). *Nat Protoc.* 2016;11:1455-1476

72. Weber C. M., Ramachandran S. and Henikoff S. Nucleosomes are context-specific, H2A.Z-modulated barriers to RNA polymerase. *Mol Cell.* 2014;53:819-830

PRO-Cap: RNA 聚合酶 II 起始位点的精确核连续测序

PRO-cap 在碱基对分辨率水平上去定位 RNA 转录中 RNAPII 的起始位点。此方法由 PRO-Seq 方法改变而来，是在定位 RNAPII 的暂停位点。⁷³

对细胞核裂解物用生物素 -NTP 和肌氨酰进行核连续反应。第一个生物素 -NTP 结合后就终止了 RNAPII 对新生 RNA 链的进一步延伸。提取 RNA 链并通过链霉亲和素纯化。接着将 3' 接头直接与纯化后的样本连接，然后进行另一个链霉亲和素纯化步骤。在连接 5' 接头前，用热敏磷酸酶和 TAP 修复 5' 末端。通过另一链霉亲和素纯化过程富集两侧有接头的 RNA 片段，然后进行逆转录和 PCR 扩增。对所得的 cDNA 链从 5' 末端进行测序，确认了 RNAPII 的暂停位点。



PRO-cap 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">在碱基对的分辨率水平上去定位 RNAPII 起始位点在 PCR 之前有多个生物素富集步骤用 PRO-seq 定位暂停位点	<ul style="list-style-type: none">限于体外反应

综述

Brent M. R. Past Roadblocks and New Opportunities in Transcription Factor Network Mapping. *Trends Genet.* 2016;32:736-750

Engreitz J. M., Haines J. E., Perez E. M., Munson G., Chen J., et al. Local regulation of gene expression by lncRNA promoters, transcription and splicing. *Nature.* 2016;539:452-455

参考文献

Wang I. X., Core L. J., Kwak H., Brady L., Bruzel A., et al. RNA-DNA differences are generated in human cells within seconds after RNA exits polymerase II. *Cell Rep.* 2014;6:906-915

作者使用 GRO-Seq 和 PRO-Seq 的组合研究新生 RNA 链中的 RDD。他们发现，在离 RNAPII 活性位点约 55 nt 的位置开始出现 RDD。这种近端发生 RDD 与已知的脱氨酶介导的 RNA 编辑机制不一致。进一步的分析发现，55 nt 延迟未在 RNAPII 引导的合成中出现，并且不是因为结合了修饰的碱基。

illumina 的技术: HiSeq 2500 系统、TruSeq RNA Library Prep Kit

Danko C. G., Hyland S. L., Core L. J., Martins A. L., Waters C. T., et al. Identification of active transcriptional regulatory elements from GRO-seq data. *Nat Methods.* 2015;

Core L. J., Martins A. L., Danko C. G., Waters C. T., Siepel A., et al. Analysis of nascent RNA identifies a unified architecture of initiation regions at mammalian promoters and enhancers. *Nat Genet.* 2014;

相关试剂盒

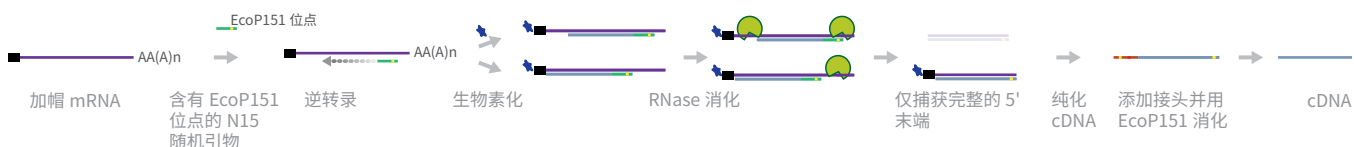
TruSeq RNA Library Prep Kit v2

73. Kwak H., Fuda N. J., Core L. J. and Lis J. T. Precise maps of RNA polymerase reveal how promoters direct initiation and pausing. *Science.* 2013;339:950-953

CAGE：帽分析基因表达测序

CAGE 测量 RNA 表达并定位启动子中的 TSS。⁷⁴

在此方法中，首先用随机引物逆转录 RNA。将 RNA 帽和 3' 末端生物素化。未杂交的单链 RNA 用 RNase 消化，留下 5' 完整的 cDNA，用链霉亲和素微珠捕获。cDNA 通过制备用于测序。



CAGE 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">• 测量 RNA 表达水平并定位启动子区域中的 TSS• 在单核苷酸分辨率上提供 TSS 的精确定位	<ul style="list-style-type: none">• 只能用于成熟的总 RNA⁷⁵• 检测结果偏向长寿命转录本的 TSS⁷⁶

综述

Haberle V. and Lenhard B. Promoter architectures and developmental gene regulation. *Semin Cell Dev Biol.* 2016;57:11-23

参考文献

Horie M., Yamaguchi Y., Saito A., et al. Transcriptome analysis of periodontitis-associated fibroblasts by CAGE sequencing identified DLX5 and RUNX2 long variant as novel regulators involved in periodontitis. *Sci Rep.* 2016;6:33666

此研究用检测来自受感染的人细胞的牙周炎相关成纤维细胞 (PAF) 来检测牙周炎。作者使用 CAGE 分析转录起始谱。来自受感染细胞的 PAF 显示了与来自其他器官不同模式的 CAGE 谱。作者还鉴定了作为牙周炎发展标志物的重要转录因子，例如 BARX1、PAX9、LHX8 和 DLX5。

Illumina 的技术: HiSeq 2500 系统、TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Kit、Ribo-Zero Gold rRNA Removal Kit

Poletti V., Delli Carri A., Malagoli Tagliacucchi G., et al. Genome-Wide Definition of Promoter and Enhancer Usage during Neural Induction of Human Embryonic Stem Cells. *PLoS One.* 2015;10:e0126590

Andersson R., Gebhard C., Miguel-Escalada I., et al. An atlas of active enhancers across human cell types and tissues. *Nature.* 2014;507:455-461

Brown J. B., Boley N., Eisman R., et al. Diversity and dynamics of the Drosophila transcriptome. *Nature.* 2014;512:393-399

Chen Z. X., Sturgill D., Qu J., et al. Comparative validation of the *D. melanogaster* modENCODE transcriptome annotation. *Genome Res.* 2014;24:1209-1223

Fort A., Hashimoto K., Yamada D., et al. Deep transcriptome profiling of mammalian stem cells supports a regulatory role for retrotransposons in pluripotency maintenance. *Nat Genet.* 2014;46:558-566

相关试剂盒

TruSeq RNA Library Prep Kit v2

TruSeq Small RNA Library Prep Kit

TruSeq Nano DNA Library Prep Kit

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

74. Takahashi H., Lassmann T., Murata M. and Carninci P. 5' end-centered expression profiling using cap-analysis gene expression and next-generation sequencing. *Nat Protoc.* 2012;7:542-561

75. Haberle V. and Lenhard B. Promoter architectures and developmental gene regulation. *Semin Cell Dev Biol.* 2016;57:11-23

76. Haberle V. and Lenhard B. Promoter architectures and developmental gene regulation. *Semin Cell Dev Biol.* 2016;57:11-23

3'NT 方法：新生转录本的 3' 末端

3'NT 方法对新生 RNA 转录本测序，在核苷酸分辨水平上定位 RNAPII 复合物延伸和终止后的位置。⁷⁷ 此方法通过利用其在含有高盐、尿素、洗涤剂和非离子洗涤剂条件下所有的与 DNA 链结合的能力，有效地分离 RNAPII-染色质复合物。

细胞和细胞核都被裂解，同时样本中的转录被终止。从纯化的 RNAPII-染色质复合物中分离新生的 RNA 链，然后通过选择具有 5' 7-甲基腺苷帽的链，富集 mRNA。根据稍作修改的天然延伸转录本测序（NET-Seq）的实验方案，以新生的 mRNA 链来制备 cDNA 文库。将所得的 cDNA 文库测序，以确定在每种实验条件下 RNAPII 的精确位置。



3'NT 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">追踪整个基因组范围内 RNAPII 延伸时和终止后的位置不需要转基因、增溶或免疫纯化	<ul style="list-style-type: none">不能研究 RNAPII C 端结构域上的修饰与新生 RNA 链之间的关系⁷⁸

综述

Zentner G. E. and Henikoff S. High-resolution digital profiling of the epigenome. *Nat Rev Genet.* 2014;

Teves S. S., Weber C. M. and Henikoff S. Transcribing through the nucleosome. *Trends Biochem Sci.* 2014;39:577-586

参考文献

Weber C. M., Ramachandran S. and Henikoff S. Nucleosomes are context-specific, H2A.Z-modulated barriers to RNA polymerase. *Mol Cell.* 2014;53:819-830

为研究核小体阻碍转录组的效果，作者开发了 3'NT 测序，从 RNAPII 转录分离 5' 帽保护的新生 RNA 链。他们使用 3'NT 方法、微球菌核酸酶测序（MNase-Seq）和染色质免疫沉淀测序（ChIP-Seq）研究果蝇基因组中，RNAPII 在延伸和终止时的位置。测序结果显示，+1 核小体是 RNAPII 的抑制物，而基因体核小体是较弱的抑制物，仅导致 RNAPII 暂停反应。作者还发现，从核小体位置耗尽组蛋白变体 H2A.Z 会对 RNAPII 造成更大抑制效果。

Illumina 的技术：HiSeq 2000 系统、TruSeq ChIP Library Prep Kit

相关试剂盒

TruSeq ChIP Library Prep Kit

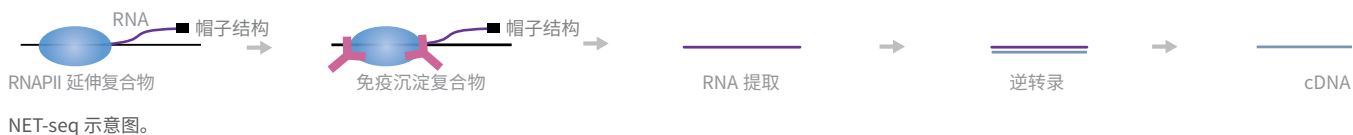
77. Weber C. M., Ramachandran S. and Henikoff S. Nucleosomes are context-specific, H2A.Z-modulated barriers to RNA polymerase. *Mol Cell.* 2014;53:819-830

78. Nojima T., Gomes T., Grosso A. R., et al. Mammalian NET-Seq Reveals Genome-wide Nascent Transcription Coupled to RNA Processing. *Cell.* 2015;161:526-540

NET-Seq: 天然延伸转录本测序

NET-Seq 通过捕获 3' RNA 检测正在由 RNAPII 转录的 RNA。⁷⁹

在此方法中, 将 RNAPII 延伸复合物进行免疫沉淀, 然后提取 RNA 并逆转录为 cDNA。对 cDNA 的深度测序允许对新生 RNA 的 3' 末端测序, 提供在核苷酸分辨水平上的转录本定位。



优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">• 新生 RNA 结合蛋白定位• 在核苷酸分辨水平上去定位转录	<ul style="list-style-type: none">• 对靶标不特异性的抗体会使非特异性复合物沉淀• 需要至少 18 nt 的新生 RNA⁸⁰

综述

Hrdlickova R., Toloue M. and Tian B. RNA-Seq methods for transcriptome analysis. Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA. 2016;n/a-n/a

Murakawa Y., Yoshihara M., Kawaji H., Nishikawa M., Zayed H., et al. Enhanced Identification of Transcriptional Enhancers Provides Mechanistic Insights into Diseases. Trends Genet. 2016;32:76-88

Zhang J. and Landick R. A Two-Way Street: Regulatory Interplay between RNA Polymerase and Nascent RNA Structure. Trends Biochem Sci. 2016;41:293-310

Liu X., Kraus W. L. and Bai X. Ready, pause, go: regulation of RNA polymerase II pausing and release by cellular signaling pathways. Trends Biochem Sci. 2015;40:516-525

Lemay J. F. and Bachand F. Fail-safe transcription termination: Because one is never enough. RNA Biol. 2015;12:927-932

参考文献

Harlen K. M., Trotta K. L., Smith E. E., Mosaheb M. M., Fuchs S. M. and Churchman L. S. Comprehensive RNA Polymerase II Interactomes Reveal Distinct and Varied Roles for Each Phospho-CTD Residue. *Cell Rep.* 2016;15:2147-2158

此研究旨在增强对 RNAPII C 端结构域及其调控因子之间相互作用动态机制的理解。作者使用 NET-Seq 识别与有转录活性的 RNAPII 相关的转录因子。他们还用 NET-Seq 分析了野生型和突变型样本中 RNAPII 丰度的变化。结果表明, 数百种不同蛋白因子具有不同程度的富集, 说明存在比预期更复杂的相互作用。

illumina 的技术: NextSeq 500 系统、MiSeq 系统、Ribo-Zero Gold rRNA Removal Kit

Mayer A. and Churchman L. S. Genome-wide profiling of RNA polymerase transcription at nucleotide resolution in human cells with native elongating transcript sequencing. *Nat Protoc.* 2016;11:813-833

Imashimizu M., Takahashi H., Oshima T., et al. Visualizing translocation dynamics and nascent transcript errors in paused RNA polymerases *in vivo*. *Genome Biol.* 2015;16:98

相关试剂盒

TruSeq ChIP Library Prep Kit TruSeq Ribo Profile Kit

Ribo-Zero rRNA Removal Kits

TruSeq RNA Library Prep Kit v2

TruSeq Small RNA Library Prep Kit

TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit

TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Kit

TruSeq Targeted RNA Expression Library Prep Kit

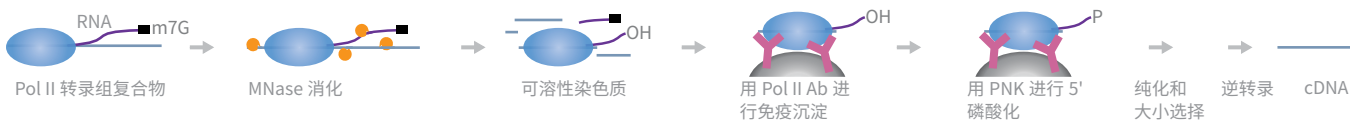
79. Churchman L. S. and Weissman J. S. Nascent transcript sequencing visualizes transcription at nucleotide resolution. *Nature.* 2011;469:368-373

80. Mayer A. and Churchman L. S. Genome-wide profiling of RNA polymerase transcription at nucleotide resolution in human cells with native elongating transcript sequencing. *Nat Protoc.* 2016;11:813-833

mNET-Seq: 用于哺乳动物染色质分析的天然延伸转录本测序

mNET-Seq 给出了整个基因组范围内, 与不同的 C 端结构域 (CTD) 磷酸化状态相关的新生 RNA 和生成的共转录 RNA 的表达谱。⁸¹ mNET-Seq 能提供转录延伸期间 RNAPII 作用位点以及 RNA 加工中间产物的精确序列测序结果。

首先, 通过染色质分离来分离延伸中的 RNAPII 复合物。然后用 MNase 酶切降解所有分离所得的 DNA, 而被 RNAPII 或剪接体保护的 RNA 链保持完整。用 RNAPII 抗体将 RNAPII 复合物免疫沉淀并用 T4 PNK 进行 5' 磷酸化。接下来, 将 3' 接头连接到仍包埋在 RNAPII 内的 RNA 链的 3' 羟基末端。还将其与放射性 ATP 孵育以便进行大小选择。按大小选择 35–100 nt 的新生 RNA 链, 制备 cDNA 测序文库并测序。在纯化过程中使用了多种 RNAPII 抗体, 因此提高了此技术在确定 RNAPII 所作用的 CTD 时的通用性和特异性。



mNET-seq 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">• 定位具有磷酸化 CTD 的 RNAPII 延伸过程中所得的新生 RNA 链和共转录加工所得的 RNA• 可检测 TSS 处的有义转录本和反义转录本⁸²• 无交联——避免引入人为相互作用• MNase 消化是特异性且高效的• 可使用多种 RNAPII 特异性抗体以提高靶向准确性	<ul style="list-style-type: none">• 短于 35 nt 的新生 RNA 不能可靠检测• 在 RNAPII 免疫沉淀期间, RNA 可能降解• mNET-Seq 峰可能被共转录 RNA 切割产生的峰重叠而分辨不清• PCR 扩增可能导致产生扩增偏向性带来的峰。

综述

Mellor J., Woloszczuk R. and Howe F. S. The Interleaved Genome. *Trends Genet.* 2016;32:57-71

Zaborowska J., Egloff S. and Murphy S. The pol II CTD: new twists in the tail. *Nat Struct Mol Biol.* 2016;23:771-777

参考文献

Nojima T., Gomes T., Grosso A. R., Kimura H., Dye M. J., et al. Mammalian NET-Seq Reveals Genome-wide Nascent Transcription Coupled to RNA Processing. *Cell.* 2015;161:526-540

作者开发了 mNET-Seq 这个方法, 来产生 RNAPII 转录的新生 RNA 及其加工中间产物的转录谱。通过对哺乳动物染色质使用 mNET-Seq, 他们发现剪接体对 5' 剪接位点的切割与 RNAPII CTD 在 5 号丝氨酸上的磷酸化相关。此外, 该磷酸化通过限制没有合成能力的 RNA 的合成过程来影响转录终止。

Illumina 的技术: HiSeq 2000/2500 系统、TruSeq Small RNA Library Preparation Kit

相关试剂盒

TruSeq Small RNA Library Prep Kit

81. Nojima T., Gomes T., Grosso A. R., et al. Mammalian NET-Seq Reveals Genome-wide Nascent Transcription Coupled to RNA Processing. *Cell.* 2015;161:526-540

82. Nojima T., Gomes T., Carmo-Fonseca M. and Proudfoot N. J. Mammalian NET-seq analysis defines nascent RNA profiles and associated RNA processing genome-wide. *Nat Protoc.* 2016;11:413-428

PARE-Seq: RNA 末端测序的平行分析

多种 RNA 降解过程对产生特征性序列末端的影响。通过分析切割位点信息，可以推断降解过程。⁸³

在 PARE-Seq 中，将降解的无帽 mRNA 连接到含 MmeI 限制性位点的 5' 接头并进行逆转录。将 cDNA 片段用 MmeI 消化，纯化，连接上 3' 接头并进行 PCR 扩增。cDNA 的深度测序提供发生降解的无帽转录本的信息。



PARE-Seq 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">• 定位 RNA 降解• 识别 miRNA 切割位点• 不需要预先了解靶标 RNA 序列的信息	<ul style="list-style-type: none">• 非线性 PCR 扩增会导致结果出现偏差，影响实验结果的重复性• 由聚合酶导致的扩增错误将被错误引入并测序

综述

Reuter J. A., Spacek D. V. and Snyder M. P. High-Throughput Sequencing Technologies. *Mol Cell*. 2015;58:586-597

参考文献

Yi F., Chen J. and Yu J. Global analysis of uncapped mRNA changes under drought stress and microRNA-dependent endonucleolytic cleavages in foxtail millet. *BMC Plant Biol*. 2015;15:241

对于植物中无帽 mRNA 在干旱条件下的功能知之甚少。此研究使用 PARE-Seq 分析了小米 (*Setaria italica*) 中的无帽转录本，识别 RNA 诱导的沉默复合体 (RISC) 中 miRNA 的程序性切割位点。作者发现了 4 种类型的 mRNA 降解模式，并识别了 385 个不同的 miRNA- 靶标相互作用机制。此外，他们发现了 11 个与光合作用酶相关的 C4 酶是由具有干旱响应的基因编码。

Illumina 的技术: HiSeq 2000 系统

相关试剂盒

TruSeq RNA Library Prep Kit v2

TruSeq Small RNA Library Prep Kit

TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit

TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Kit

TruSeq Targeted RNA Expression Library Prep Kit

83. German M. A., Pillay M., Jeong D. H., et al. Global identification of microRNA-target RNA pairs by parallel analysis of RNA ends. *Nat Biotechnol*. 2008;26:941-946

GMUCT: 未加帽和切割转录本的基因组定位

GMUCT 是一种用于构建由脱帽或切割后的 mRNA 构成的测序文库的方法。⁸⁴ 有两个版本的 GMUCT: 1.0 版本于 2008 年开发, 而更简便高效的 2.0 版本设计于 2013 年。GMUCT 2.0 显著地减少了 3 天的文库制备时间 (只需要 2-3 天, 而非 5-6 天), 需要的起始总 RNA 也只有原来的十分之一 (5 μg 而非 50 μg)。⁸⁵

GMUCT 1.0: 从总 RNA 开始, 通过 Poly(A) 选择分离 mRNA。然后, 连接 5' RNA 接头并将 RNA 逆转录。将所得的第一链 cDNA 用寡聚 (dT) 和 5' 接头引物扩增。将双链 cDNA 片段化, 连接 3' 和 5' 测序接头, PCR 扩增并测序。



GMUCT 1.0 示意图。

GMUCT 2.0: 此版本初始步骤与 GMUCT 1.0 类似, 但在将 Poly(A) RNA 连接到 5' RNA 接头后不同。进行另一轮 Poly(A) 选择以进一步纯化所需的 mRNA, 去除未连接的 RNA。使用一种 5' 末端具有 3' 接头, 3' 末端具有随机六聚物的引物进行逆转录。这一改进是在逆转录期间通过加入 3' 接头, 使所得的 cDNA 链两端都有接头。将 cDNA 进行 PCR 扩增以加入测序标签序列, 并测序。



GMUCT 2.0 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">对 RNA 降解中间产物和无帽 RNA 进行测序GMUCT 2.0 只需要 2-3 天和仅 5 μg 总 RNA可以对其进行修改来研究 miRNA 或 siRNA 靶标的切割信息	<ul style="list-style-type: none">大小最小为 135bp

综述

Ma X., Tang Z., Qin J. and Meng Y. The use of high-throughput sequencing methods for plant microRNA research. *RNA Biol.* 2015;12:709-719

参考文献

Vandivier L. E., Campos R., Kuksa P. P., Silverman I. M., Wang L. S. and Gregory B. D. Chemical Modifications Mark Alternatively Spliced and Uncapped Messenger RNAs in Arabidopsis. *Plant Cell.* 2015;27:3024-3037

作者旨在研究转录后 RNA 修饰对 RNA 成熟、稳定性和在植物中的功能的影响。他们使用 GMUCT、小 RNA 测序 (smRNA-Seq) 和 RNA-seq 获得测序结果, 并将其用于高通量修饰核苷酸注释 (HAMR) 分析流程。使用 GMUCT 高效捕获没有 5' 帽的 mRNA 转录本。结果显示, 影响 Watson-Crick 碱基配对的修饰大多发生在多聚腺苷化的, 小的和降解的 RNA 中。结果还透露了碱基修饰在调控选择性剪接和胁迫响应中的其它功能。

Illumina 的技术: HiSeq 2000 系统、TruSeq Small RNA Library Preparation Kit

相关试剂盒

TruSeq Small RNA Library Prep Kit

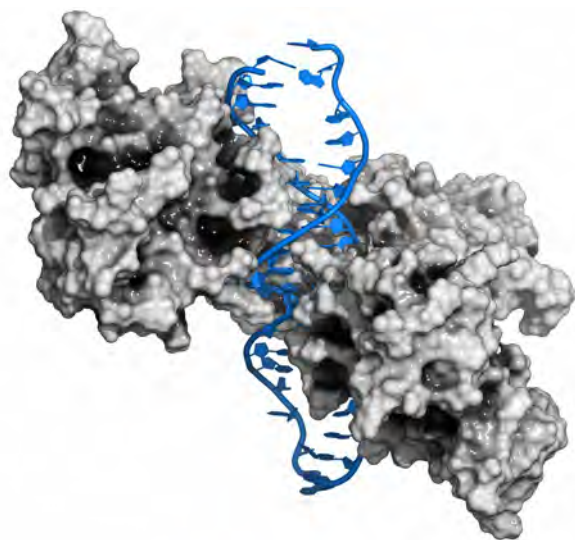
84. Gregory B. D., O'Malley R. C., Lister R., et al. A link between RNA metabolism and silencing affecting Arabidopsis development. *Dev Cell.* 2008;14:854-866

85. Willmann M. R., Berkowitz N. D. and Gregory B. D. Improved genome-wide mapping of uncapped and cleaved transcripts in eukaryotes--GMUCT 2.0. *Methods.* 2014;67:64-73

RNA-蛋白质相互作用

RNA-蛋白质相互作用涉及读取在多种转录后过程（包括基因表达、选择性剪接、RNA 输出和定位、RNA 稳定性和翻译）中被 RBP 占据的 RNA 序列。RBP 参与多种疾病，例如神经障碍或癌症。^{86, 87} RNA 结合能力的失调可能导致细胞水平甚至有机体水平上的致命后果。本节强调是使用 NGS 技术来读取被 RBP 靶向的 RNA 序列而开发的方法。

本节介绍的分离 RNA-RBP 复合物的方法工作流程遵循普遍使用的方案：1) 分离完整的 RNA-蛋白质复合物；2) 交联复合物；3) 逆转 RNA-蛋白质交联；4) 从分离的 RNA 制备 cDNA 文库；以及 5) 读取与 RBP 结合的 RNA 的序列。



转录中与 DNA 相互作用的 NF-κB 蛋白的三维结构。

综述

Haque N. and Hogg J. R. Easier, Better, Faster, Stronger: Improved Methods for RNA-Protein Interaction Studies. *Mol Cell*. 2016;62:650-651

Nussbacher J. K., Batra R., Lagier-Tourenne C. and Yeo G. W. RNA-binding proteins in neurodegeneration: Seq and you shall receive. *Trends Neurosci*. 2015;38:226-236

Lu Z. and Chang H. Y. Decoding the RNA structurome. *Curr Opin Struct Biol*. 2016;36:142-148

Marchese D., de Groot N. S., Lorenzo Gotor N., Livi C. M. and Tartaglia G. G. Advances in the characterization of RNA-binding proteins. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2016;

Cook K. B., Hughes T. R. and Morris Q. D. High-throughput characterization of protein-RNA interactions. *Brief Funct Genomics*. 2015;14:74-89

Popova V. V., Kurshakova M. M. and Kopytova D. V. Methods to study the RNA-protein interactions. *Molecular Biology*. 2015;49:418-426

Campbell Z. T. and Wickens M. Probing RNA-protein networks: biochemistry meets genomics. *Trends Biochem Sci*. 2015;40:157-164

Qu S., Yang X., Li X., et al. Circular RNA: A new star of noncoding RNAs. *Cancer Lett*. 2015;365:141-148

Burgess D. J. RNA. Detailed probing of RNA structure in vivo. *Nat Rev Genet*. 2015;16:255

86. Haque N. and Hogg J. R. Easier, Better, Faster, Stronger: Improved Methods for RNA-Protein Interaction Studies. *Mol Cell*. 2016;62:650-651

87. Nussbacher J. K., Batra R., Lagier-Tourenne C. and Yeo G. W. RNA-binding proteins in neurodegeneration: Seq and you shall receive. *Trends Neurosci*. 2015;38:226-236

Ribo-Seq 或 ARTSeq：核糖体分析测序

核糖体分析 (Ribo-Seq) 也称为活性 mRNA 翻译测序 (ARTseq)，分离被核糖体加工过的 RNA，以监测翻译过程。⁸⁸

在此方法中，首先消化核糖体结合的 RNA。提取 RNA，并去除 rRNA。将提取的 RNA 逆转录成 cDNA。cDNA 的深度测序提供翻译期间与核糖体结合的 RNA 的序列。此方法经改进可提高结果的定性和定量水平。应注意：1) 制备细胞提取物，将核糖体在体内稳定地保留在它们所翻译的 mRNA 上；2) 用核酸酶消化未被核糖体保护的 RNA，然后回收被核糖体保护的 mRNA 片段；以及 3) 将被保护的 RNA 片段定量转变为可通过深度测序分析的 DNA 文库。⁸⁹ 添加三尖杉酯碱（一种抑制蛋白生物合成的生物碱）使得核糖体准确地积累在起始密码子处，并有助于其检测。



Ribo-Seq/ARTseq 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">揭示了核糖体在 RNA 上的精确位置在 mRNA 水平上研究相比，更接近地反映了蛋白合成速率不需要预先了解 RNA 或开放阅读框 (ORF) 的信息检测整个基因组范围可以识别蛋白编码区	<ul style="list-style-type: none">单个转录本内多个位点都有可能成为起始使得要确定所有 ORF 具有挑战性不提供翻译延伸的动力学特征

参考文献

Zur H., Aviner R. and Tuller T. Complementary Post Transcriptional Regulatory Information is Detected by PUNCH-P and Ribosome Profiling. *Sci Rep.* 2016;6:21635

作者使用了 Ribo-Seq 和 PUNCH-P 的组合，后者基于仅对新合成的蛋白的质谱分析。他们发现用两种方法获得的结果存在显著的一致性；但是，组合使用这两种方法可以更好地提供对蛋白丰度固有变化的预测。

illumina 的技术：没有给出具体 illumina 测序系统的型号

Arribere J. A., Cenik E. S., Jain N., et al. Translation readthrough mitigation. *Nature.* 2016;534:719-723

作者在秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 中使用了 RNA-Seq、Ribo-Seq 和采用 CRISPR(clustered regularly interspaced short palindromic repeats)-Cas9 基因编辑的组合，展示了细胞如何阻断源自未能在终止密码子停止的 C 端延伸蛋白的积累。他们发现，3'UTR 可编码肽序列，能降低附着蛋白的稳定性，从而减少翻译错误的影响。

illumina 的技术：MiSeq 系统

Jeong Y., Kim J. N., Kim M. W., et al. The dynamic transcriptional and translational landscape of the model antibiotic producer *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nat Commun.* 2016;7:11605

链霉菌被大量用于生产抗生素和其他具有生物活性的化合物。但是，这些产物在实验室培养条件下往往检测不到，产生这些化合物的基因关系网络仍未可知。作者使用单链 RNA-Seq (ssRNA-Seq) 和 Ribo-Seq 两种方法的组合来研究不同生长阶段的转录水平上的和翻译水平上的调控网络。他们鉴定了 230 个小 RNA 和显著比例 (约 21%) 的无引导序列 mRNA。根据核糖体分析，次生代谢基因的翻译效率似乎与转录负相关。此外，在翻译期间，有多个重要的抗生素调控基因被诱导。

illumina 的技术：MiSeq 系统

88. Ingolia N. T., Ghaemmghami S., Newman J. R. and Weissman J. S. Genome-wide analysis in vivo of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science.* 2009;324:218-223

89. Ingolia N. T., Lareau L. F. and Weissman J. S. (2011) Ribosome Profiling of Mouse Embryonic Stem Cells Reveals the Complexity and Dynamics of Mammalian Proteomes. *Cell* 147: 789-802

RIP-Seq: RNA 免疫沉淀测序

RIP-Seq 定位 RNA-蛋白质复合物中蛋白与 RNA 结合的位点。⁹⁰

在此方法中，用靶向目标蛋白的抗体免疫沉淀 RNA-蛋白质复合物。在用 RNase 消化后，提取被蛋白结合保护的 RNA 并逆转录为 cDNA。随后可以将位点定位回基因组。cDNA 的深度测序提供单碱基分辨率的蛋白结合的 RNA。



RIP-seq 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">• 定位特异性蛋白质-RNA 复合物，例如多梳蛋白 (polycomb) 相关 RNA• 由于 RNase 消化，因此背景低并且结合位点分辨率更高• 不需要预先了解 RNA 的信息• 基因组范围 RNA 筛选	<ul style="list-style-type: none">• 需要靶标蛋白的抗体• 非特异性抗体会沉淀非特异性复合物• 缺少复合物的交联或稳定可能导致假阴性• RNase 消化必须小心控制

综述

McFadden E. J. and Hargrove A. E. Biochemical Methods To Investigate lncRNA and the Influence of lncRNA:Protein Complexes on Chromatin. *Biochemistry*. 2016;55:1615-1630

Fang Y. and Fullwood M. J. Roles, Functions, and Mechanisms of Long Non-coding RNAs in Cancer. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2016;14:42-54

Kim T. K. and Shiekhattar R. Diverse regulatory interactions of long noncoding RNAs. *Curr Opin Genet Dev*. 2016;36:73-82

Goeman F. and Fanciulli M. Application of RNA-Seq Technology in Cancer Chemoprevention. *Cancer Chemoprevention: Methods and Protocols*. 2016;31-43

Carrier M.-C., Lalaouna D. and Massé E. A game of tag: MAPS catches up on RNA interactomes. *RNA Biology*. 2016;13:473-476

参考文献

Cloonan S. M., Glass K., Laucho-Contreras M. E., et al. Mitochondrial iron chelation ameliorates cigarette smoke-induced bronchitis and emphysema in mice. *Nat Med*. 2016;22:163-174

研究人员结合了 RIP-seq、RNA-Seq 和功能富集成簇分析，鉴定出 Irf2 是小鼠肺中线粒体功能的调控因子。

Illumina 的技术: HiSeq 2000 系统

Yabe-Wada T., Matsuba S., Takeda K., et al. TLR signals posttranscriptionally regulate the cytokine trafficking mediator sortilin. *Sci Rep*. 2016;6:26566

研究人员使用 RIP-Seq 鉴定被 Poly(rC) 结合蛋白 1 (PCBP1) 识别的 mRNA 并确定与 PCBP1 结合的元件。基序分析揭示了 CCCNCCCC 基序在 RIP 样本中有显著富集，这说明 PCBP1 通过此序列基序与 mRNA 结合。

Illumina 的技术: HiSeq 1500 系统

Dugar G., Svensson S. L., Bischler T., et al. The CsrA-FlhW network controls polar localization of the dual-function flagellin mRNA in *Campylobacter jejuni*. *Nat Commun*. 2016;7:11667

Ennajdaoui H., Howard J. M., Sterne-Weiler T., et al. IGF2BP3 Modulates the Interaction of Invasion-Associated Transcripts with RISC. *Cell Rep*. 2016;15:1876-1883

Faraji F., Hu Y., Yang H. H., et al. Post-transcriptional Control of Tumor Cell Autonomous Metastatic Potential by CCR4-NOT Deadenylase CNOT7. *PLoS Genet*. 2016;12:e1005820

相关试剂盒

TruSeq Ribo Profile Kit	TruSeq Small RNA Library Prep Kit	TruSeq Targeted RNA Expression Library Prep Kit
Ribo-Zero rRNA Removal Kit	TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit	
TruSeq RNA Library Prep Kit v2	TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Kit	

90. Zhao J., Ohsumi T. K., Kung J. T., et al. Genome-wide identification of polycomb-associated RNAs by RIP-seq. *Mol Cell*. 2010;40:939-953

CLIP-Seq 或 HITS-CLIP: CLIP cDNA 文库的高通量测序

使用 RNase T1 剪切的交联免疫沉淀 (CLIP) 由 Ule 等人首先报道⁹¹, 随后应用于高通量测序以在体内定位蛋白质-RNA 的结合位点⁹²⁻⁹³。此方法与 RIP-Seq 类似, 但其利用交联反应稳定了蛋白质-RNA 复合物。

在 HITS-CLIP 中, 对 RNA-蛋白质复合物进行 UV 交联和免疫沉淀。用 RNase T1 处理蛋白质-RNA 复合物, 然后用蛋白酶 K 处理。提取 RNA 并逆转录为 cDNA。cDNA 的深度测序提供单碱基分辨率的 RNA 上蛋白结合位点定位。

Gillen 等人发表了对 HITS-CLIP 实验方案的改进, 降低了错误引发 (mispriming) 造成的假产物。⁹⁴

其他版本: iCLIP、irCLIP、eCLIP、miCLIP



HITS-CLIP 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">• 交联使蛋白-靶标结合稳定• UV 交联可在体内进行• 由于用了 RNase 进行消化, 因此背景低并且结合位点分辨率更高• 不需要预先了解 RNA 的信息• 基因组范围 RNA 筛选	<ul style="list-style-type: none">• 由于错误引发 (mispriming), RT 的互补链被过度表达⁹⁵• 对靶标不具特异性的抗体可能会使非特异性复合物沉淀• UV 交联效率低, 需要紧密的蛋白质-RNA 相互作用• 交联过程中可能引入假产物

综述

Cook K. B., Hughes T. R. and Morris Q. D. High-throughput characterization of protein-RNA interactions. *Brief Funct Genomics*. 2015;14:74-89

参考文献

Van Haute L., Dietmann S., Kremer L., et al. Deficient methylation and formylation of mt-tRNA(Met) wobble cytosine in a patient carrying mutations in NSUN3. *Nat Commun*. 2016;7:12039

转录本的表现遗传修饰与人类疾病相关。此研究鉴定了患有线粒体呼吸链复合缺陷症的样本中, 5-甲基胞嘧啶 (m5C) 甲基转移酶 NSun3 的 RNA 靶标, 以及 m5C 修饰对能量代谢的影响。作者使用甲基化单核苷酸分辨率 CLIP (miCLIP) 筛选转录组中 NSun3 甲基化的核苷酸。此外, 他们使用 HITS-CLIP 研究 HEK293T 的线粒体裂解物, 给有关 NSun3 线粒体 RNA 靶标研究提供了更多信息。

Illumina 的技术: HiSeq 2500 系统、HiSeq 2000 系统、MiSeq 系统、Ribo-Zero Gold rRNA Removal Kit

Vourekas A., Alexiou P., Vrettos N., Maragkakis M. and Mourelatos Z. Sequence-dependent but not sequence-specific piRNA adhesion traps mRNAs to the germ plasm. *Nature*. 2016;531:390-394

研究人员使用 Argonaute (AGO) HITS-CLIP 确定果蝇中参与通过中期卵子发生将 mRNA 向卵子转运的过程。他们发现, 在果蝇中, 携带 Aubergine (Aub) 的 piRNA 利用 AGO RNP 的部分碱基配对特性与 mRNA 随机结合, 作为在胚质中捕获 mRNA 的粘性陷阱。

Illumina 的技术: HiSeq 系统

91. Ule J., Jensen K., Mele A. and Darnell R. B. CLIP: a method for identifying protein-RNA interaction sites in living cells. *Methods*. 2005;37:376-386

92. Licatalosi D. D., Mele A., Fak J. J., et al. HITS-CLIP yields genome-wide insights into brain alternative RNA processing. *Nature*. 2008;456:464-469

93. Chi SW, Zang JB, Mele A, Darnell RB; (2009) Argonaute HITS-CLIP decodes microRNA-mRNA interaction maps. *Nature* 460: 479-86

94. Gillen A. E., Yamamoto T. M., Kline E., Hesselberth J. R. and Kabos P. Improvements to the HITS-CLIP protocol eliminate widespread mispriming artifacts. *BMC Genomics*. 2016;17:338

95. Gillen A. E., Yamamoto T. M., Kline E., Hesselberth J. R. and Kabos P. Improvements to the HITS-CLIP protocol eliminate widespread mispriming artifacts. *BMC Genomics*. 2016;17:338

Ji Z., Song R., Huang H., Regev A. and Struhl K. Transcriptome-scale RNase-footprinting of RNA-protein complexes. *Nat Biotechnol.* 2016;34:410-413

此出版物报道了使用 HITS-CLIP 和计算流程 Rfoot 准确定位人类细胞中小核 RNA、剪接体 RNA、miRNA、tRNA、lncRNA 和 mRNA 的 3'UTR 内 RNase 保护的区域。作者发现，lncRNA 具有多个 RNase 保护的足迹，其在进化上是保守的。

illumina 的技术：HiSeq 2500 系统

Gosline S. J., Gurtan A. M., JnBaptiste C. K., et al. Elucidating MicroRNA Regulatory Networks Using Transcriptional, Post-transcriptional, and Histone Modification Measurements. *Cell Rep.* 2016;14:310-319

研究人员使用 RNA-Seq 和 CLIP-Seq 系统鉴定了一对有或没有 Dicer 表达的鼠成纤维细胞系中 miRNA 调控网络的系统性转录后和表观遗传活性。他们发现，大部分由全局 miRNA 缺失引起的改变发生在转录过程中。此研究提供了一个通过组合多数据集分析复杂网络的示例。

illumina 的技术：HiSeq 2000 系统

Nutter C. A., Jaworski E. A., Verma S. K., et al. Dysregulation of RBFOX2 Is an Early Event in Cardiac Pathogenesis of Diabetes. *Cell Rep.* 2016;15:2200-2213

人 ESC 的基因组范围的 CLIP-Seq 提供了 RBP RBFOX2 在整个基因组范围结合位点的位置信息，RBP RBFOX2 是神经系统和其他细胞类型中选择性外显子剪接的重要调控因子。作者证明，RBFOX2 控制与糖尿病性心肌病相关的选择性剪接和转录组上的改变。

illumina 的技术：HiSeq 1000 系统

Spengler R. M., Zhang X., Cheng C., et al. Elucidation of transcriptome-wide microRNA binding sites in human cardiac tissues by Ago2 HITS-CLIP. *Nucleic Acids Res.* 2016;

Gillen A. E., Yamamoto T. M., Kline E., Hesselberth J. R. and Kabos P. Improvements to the HITS-CLIP protocol eliminate widespread mispriming artifacts. *BMC Genomics.* 2016;17:338

Moore M. J., Zhang C., Gantman E. C., Mele A., Darnell J. C. and Darnell R. B. Erratum: Mapping Argonaute and conventional RNA-binding protein interactions with RNA at single-nucleotide resolution using HITS-CLIP and CIMS analysis. *Nat Protoc.* 2016;11:616

Bennett C. G., Riemondy K., Chapnick D. A., Bunker E., Liu X., et al. Genome-wide analysis of Musashi-2 targets reveals novel functions in governing epithelial cell migration. *Nucleic Acids Res.* 2016;44:3788-3800

Vourekas A., Alexiou P., Vrettos N., Maragkakis M. and Mourelatos Z. Sequence-dependent but not sequence-specific piRNA adhesion traps mRNAs to the germ plasm. *Nature.* 2016;531:390-394

Zheng Q., Bao C., Guo W., et al. Circular RNA profiling reveals an abundant circHIPK3 that regulates cell growth by sponging multiple miRNAs. *Nat Commun.* 2016;7:11215

Preusse M., Theis F. J. and Mueller N. S. miTALOS v2: Analyzing Tissue Specific microRNA Function. *PLoS One.* 2016;11:e0151771

Kapeli K., Pratt G. A., Vu A. Q., et al. Distinct and shared functions of ALS-associated proteins TDP-43, FUS and TAF15 revealed by multisystem analyses. *Nat Commun.* 2016;7:12143

Valentin-Vega Y. A., Wang Y. D., Parker M., et al. Cancer-associated DDX3X mutations drive stress granule assembly and impair global translation. *Sci Rep.* 2016;6:25996

Chen S., Blank M. F., Iyer A., et al. SIRT7-dependent deacetylation of the U3-55k protein controls pre-rRNA processing. *Nat Commun.* 2016;7:10734

Zhao H., Chen M., Lind S. B. and Pettersson U. Distinct temporal changes in host cell lncRNA expression during the course of an adenovirus infection. *Virology.* 2016;492:242-250

Taliaferro J. M., Vidaki M., Oliveira R., et al. Distal Alternative Last Exons Localize mRNAs to Neural Projections. *Mol Cell.* 2016;61:821-833

Gaudreau M. C., Grapton D., Helness A., et al. Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein L is required for the survival and functional integrity of murine hematopoietic stem cells. *Sci Rep.* 2016;6:27379

Dugar G., Svensson S. L., Bischler T., Waldchen S., Reinhardt R., et al. The CsrA-FlhW network controls polar localization of the dual-function flagellin mRNA in *Campylobacter jejuni*. *Nat Commun.* 2016;7:11667

相关试剂盒

TruSeq Ribo Profile Kit

Ribo-Zero rRNA Removal Kit

TruSeq RNA Library Prep Kit v2

TruSeq Small RNA Library Prep Kit

TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit

TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Kit

TruSeq Targeted RNA Expression Library Prep Kit

Pol II CLIP: RNA 聚合酶 II 交联和免疫沉淀

开发了 Pol II CLIP 以分离并测序参与转录调控，特别是 RNAPII 介导转录的非编码 RNA。

简言之，用 254nm 的 UV 交联细胞并裂解。使用抗 RNAPII 抗体对 RNAPII 复合物进行免疫沉淀。接下来，通过蛋白酶 K 逆交联分离 RNAPII 复合物。将释放的 RNA 分离，逆转录并制备为测序文库。CLIP RNA 样本可用于测序



Pol II CLIP 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">• 识别参与转录调控的 ncRNA 序列• 简单的程序	<ul style="list-style-type: none">• 尚未报道

综述

Qu S., Yang X., Li X., Wang J., Gao Y., et al. Circular RNA: A new star of noncoding RNAs. *Cancer Lett.* 2015;365:141-148

参考文献

Li Z., Huang C., Bao C., Chen L., Lin M., et al. Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus. *Nat Struct Mol Biol.* 2015;

作者开发了 Pol II CLIP 以识别称为外显子-内含子 circRNA (ElciRNA) 的新型 circRNA 的功能。他们发现，ElciRNA 主要定位于核内，与 U1 snRNP 相互作用，促进其亲本基因的转录。ElciRNA 还反式提高了其亲本基因的表达。

Illumina 的技术: Genome Analyzer 系统

相关试剂盒

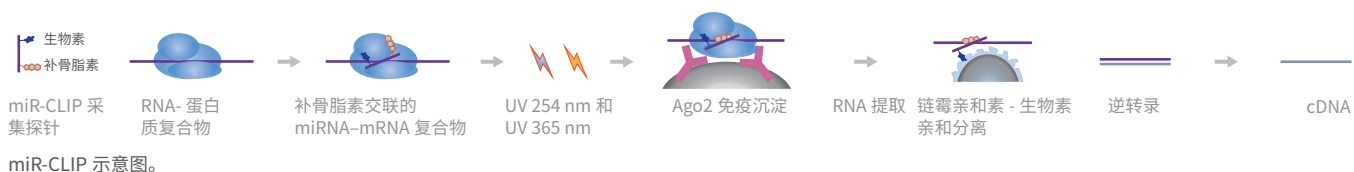
TruSeq RNA Library Prep Kit v2

96. Li Z., Huang C., Bao C., et al. Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus. *Nat Struct Mol Biol.* 2015;

miR-CLIP: MicroRNA 交联和免疫沉淀

开发了 miR-CLIP 以使用合成 miRNA 识别 miRNA 的 mRNA 靶标。⁹⁷ miR-CLIP 中的捕获探针是与补骨脂素和生物素偶联的前体 miRNA，可与 mRNA 交联，以从总 RNA 中分离其靶标。

首先，需要设计 miR-CLIP 捕获探针并测试其功能性和强结合亲和性。接下来，将其转染到细胞中，用 254 nm 和 365 nm 的 UV 交联，然后将交联的复合物免疫沉淀。提取 RNA 链并通过链霉亲和素结合并进一步纯化。将分离的 RNA 靶标逆转录并加工为 cDNA 文库用于测序。



优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">在基因组范围识别 miRNA 靶标以 miRNA 序列为捕获探针可以很容易进行修改，以研究不同种类的 miRNA	<ul style="list-style-type: none">学术界尚未广泛采用需严谨设计 miRNA 捕获探针

综述

Sandhu G. K., Milevskiy M. J. G., Wilson W., Shewan A. M. and Brown M. A. Non-coding RNAs in Mammary Gland Development and Disease. *Non-coding RNA and the Reproductive System*. 2016;121-153

Yu B. and Shan G. Functions of long noncoding RNAs in the nucleus. *Nucleus*. 2016;7:155-166

Jeker L. T. and Marone R. Targeting microRNAs for immunomodulation. *Curr Opin Pharmacol*. 2015;23:25-31

Tycowski K. T., Guo Y. E., Lee N., et al. Viral noncoding RNAs: more surprises. *Genes Dev*. 2015;29:567-584

参考文献

Imig J., Brunschweiler A., Brummer A., Guennewig B., Mittal N., et al. miR-CLIP capture of a miRNA targetome uncovers a lincRNA H19-miR-106a interaction. *Nat Chem Biol*. 2014;advance online publication:

作者研究了人细胞系中 miRNA 对转录后基因调控的影响。他们开发了 miR-CLIP 以识别 miR-106a 的预期靶标并评估了其超表达对其功能靶标的影响。结果表明，miR-106a 和其 miRNA 家族的其他成员可结合 H19 lincRNA。此外，H19 lincRNA 在调控 H19、miR-17-5p 家族及其 mRNA 靶标的基因表达中起到缓冲的作用。

illumina 的技术：没有给出具体的 illumina 测序系统型号

相关试剂盒

TruSeq RNA Library Prep Kit

TruSeq Small RNA Library Prep Kit

Ribo-Zero Gold rRNA Removal Kits

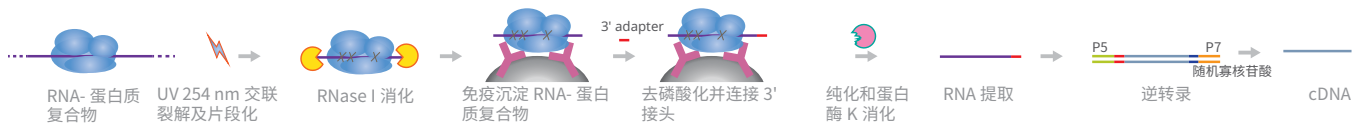
97. Imig J., Brunschweiler A., Brummer A., et al. miR-CLIP capture of a miRNA targetome uncovers a lincRNA H19-miR-106a interaction. *Nat Chem Biol*. 2014;advance online publication:

eCLIP: 增强的交联免疫沉淀

eCLIP利用改进的单核苷酸分辨率CLIP (iCLIP) 实验方案来确定RBP在其靶标RNA上的位点信息,提高了效率,降低了操作复杂度。⁹⁸ 此方法的特征是连接有条形码的单链DNA接头,这显著降低了扩增的偏向性。

首先,将RNA和目标蛋白UV交联,然后进行细胞裂解和RNase I消化。接下来,使蛋白质-RNA复合物免疫沉淀并在靶RNA的3'末端连接RNA接头。通过蛋白酶K消化去除结合的蛋白,并将RNA逆转录。在所得的cDNA 3'末端连接单链DNA接头,该接头含有N5或N10序列,作为PCR复制的独特识别标记。最后,将双端cDNA片段扩增并测序。

类似方法: iCLIP、irCLIP、HITS-CLIP



eCLIP 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none"> 高通量定位蛋白质-RNA 结合位点 带条形码的接头显著降低了 PCR 重复 read 并提高了通量 连接效率提高了约 1000 倍 避免使用放射性标记物 	<ul style="list-style-type: none"> 对靶标不具特异性的抗体会使非特异性复合物沉淀 交联不能覆盖所有 RNA 结合结构域⁹⁹

综述

Marchese D., de Groot N. S., Lorenzo Gotor N., Livi C. M. and Tartaglia G. G. Advances in the characterization of RNA-binding proteins. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*. 2016;7:793-810

Bangru S. and Kalsotra A. Advances in analyzing RNA diversity in eukaryotic transcriptomes: peering through the Omics lens. *F1000Research*. 2016;5:2668

Manning K. S. and Cooper T. A. The roles of RNA processing in translating genotype to phenotype. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016;advance online publication:

Sundaraman B., Zhan L., Blue S. M., et al. Resources for the Comprehensive Discovery of Functional RNA Elements. *Mol Cell*. 2016;61:903-913

参考文献

Conway Anne E., Van Nostrand Eric L., Pratt Gabriel A., et al. Enhanced CLIP Uncovers IMP Protein-RNA Targets in Human Pluripotent Stem Cells Important for Cell Adhesion and Survival. *Cell Reports*. 2016;

作者研究了人多能干细胞 (hPSC) 中维持增殖和存活的转录后 RNA 网络的复杂机制。他们使用 eCLIP 鉴定 IMP/IGF2BP RBP 家族的 RNA 靶标, 发现 IMP1 和 IMP2 结合大量 3'UTR 富集的靶标。他们还使用 RNA Bind-N-Seq, 利用重组全长 IMP1 和 IMP2 鉴定在 eCLIP 发现的结合位点中富集的富含 CA 的基序。

illumina 的技术: 没有给出具体的 illumina 测序系统型号

相关试剂盒

TruSeq Ribo Profile Kit

TruSeq Small RNA Library Prep Kit

TruSeq Targeted RNA Expression Library Prep Kit

Ribo-Zero Gold rRNA Removal Kits

TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit

TruSeq RNA Library Prep Kit v2

TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Kit

98. Van Nostrand E. L., Pratt G. A., Shishkin A. A., et al. Robust transcriptome-wide discovery of RNA-binding protein binding sites with enhanced CLIP (eCLIP). *Nat Methods*. 2016;

99. Martin G. and Zavolan M. Redesigning CLIP for efficiency, accuracy and speed. *Nat Methods*. 2016;13:482-483

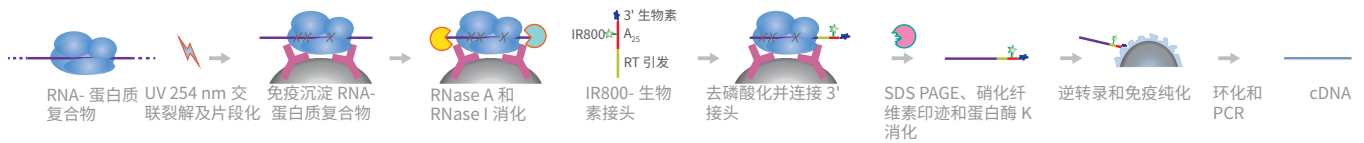
irCLIP: UV-C 交联和免疫沉淀

与先前的CLIP方法相比, irCLIP使用更少的样本材料、时间和产生更高质量的cDNA文库来确定蛋白质-RNA相互作用的位点信息。¹⁰⁰ irCLIP是通过使用微珠上的核酸酶进行消化, 解决了iCLIP和HITS-CLIP中存在的例如逆转录酶停止和短片段的cDNA文库等问题。

首先, 对RNA-蛋白质复合物进行UV交联和免疫沉淀。然后, 用RNase A和RNase I消化, 以切除蛋白结合RNA链的两端。在RNA片段的3'末端连接IR800-生物素接头。在大小选择、硝化纤维印迹和蛋白酶K消化后, 纯化目标RNA链。然后再次逆转录和免疫纯化。将cDNA链环化并进行PCR扩增, 产生用于测序的cDNA文库。

其他版本: iCLIP、HITS-CLIP、eCLIP

irCLIP示意图。



综述

Martin G. and Zavolan M. Redesigning CLIP for efficiency, accuracy and speed. *Nat Meth.* 2016;13:482-483

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">使用最少起始材料进行蛋白质-RNA相互作用的非同位素检测在微珠上的核酸酶消化提高了用于cDNA文库制备的RNA的长度可用于小细胞样本, 发现新的RBP结合位点使用在60°C热稳定的逆转录酶, 减少了融解RNA二级结构产生的偏向性¹⁰¹	<ul style="list-style-type: none">学术界尚未广泛采用环化步骤可能引入假产物

Haque N. and Hogg J. R. Easier, Better, Faster, Stronger: Improved Methods for RNA-Protein Interaction Studies. *Mol Cell.* 2016;62:650-651

参考文献

Zarnegar B. J., Flynn R. A., Shen Y., Do B. T., Chang H. Y., et al. irCLIP platform for efficient characterization of protein-RNA interactions. *Nat Methods.* 2016;13:489-492

作者开发了irCLIP作为已有CLIP方法的改进。他们通过使用微珠上核酸酶消化和在60°C热稳定的逆转录酶, 解决了逆转录酶停止和由于RNA的二级结构造成的偏向性问题。他们在HeLa细胞中使用irCLIP, 用极少的细胞产生了与iCLIP结果(每次免疫沉淀5,000,000个细胞)相似或更高的独特read(每次免疫沉淀20,000和100,000个细胞)。

Illumina的技术: NextSeq 500系统、TruSeq RNA Library Prep Kit

相关试剂盒

TruSeq RNA Library Prep Kit

100. Zarnegar B. J., Flynn R. A., Shen Y., Do B. T., Chang H. Y. and Khavari P. A. irCLIP platform for efficient characterization of protein-RNA interactions. *Nat Methods.* 2016;13:489-492

101. Martin G. and Zavolan M. Redesigning CLIP for efficiency, accuracy and speed. *Nat Meth.* 2016;13:482-483

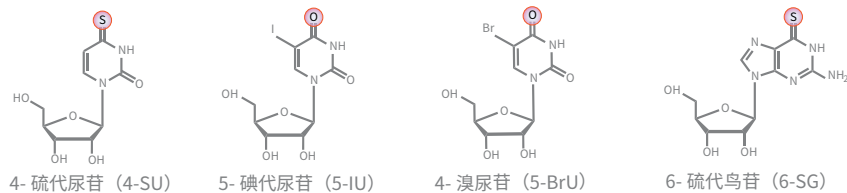
PAR-CLIP：光激活核糖核苷增强的交联和免疫沉淀

PAR-CLIP 定位靶 RNA 上的 RBP 位点。¹⁰² 这种方法与交联免疫沉淀结合高通量测序 (HITS-CLIP) 和交联免疫沉淀测序 (CLIP-Seq) 类似，但其采用更有效的交联来稳定蛋白质-RNA 复合物。因为反应需要引入光激活的核糖核苷，因而限制了这种方法在细胞培养物和体外系统中的使用。

在这一方法中，4-SU 和 6- 硫代鸟苷 (6-SG) 被掺入培养细胞的转录本中。紫外照射让 4-SU/6-SG 标记的转录本与相互作用的 RBP 交联。对靶向复合物进行免疫沉淀，利用 RNase T1 消化，接着进行蛋白酶 K 处理，以及 RNA 提取。将 RNA 逆转录成 cDNA 并测序。对 cDNA 的深度测序准确定位了与标记转录本相互作用的 RBP。



PAR-CLIP 示意图。



可被光激活的核糖核苷

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none"> 高度准确确定 RNA-蛋白质之间的相互作用 用 4-SU/6-SG 标记提高了交联效率 正常交联的序列可以根据突变碱基的存在识别，而错误引发可以用生物信息学方法进行过滤¹⁰³ 	<ul style="list-style-type: none"> 对靶标不特异性的抗体可能会造成非特异性复合物沉淀 限于细胞培养和体外系统 光激活的核苷可能是有细胞毒性的¹⁰⁴ 高浓度的 4-SU 可能抑制 rRNA 合成，诱导核仁胁迫应答¹⁰⁵

综述

Cook K. B., Hughes T. R. and Morris Q. D. High-throughput characterization of protein-RNA interactions. *Brief Funct Genomics*. 2015;14:74-89

Nussbacher J. K., Batra R., Lagier-Tourenne C. and Yeo G. W. RNA-binding proteins in neurodegeneration: Seq and you shall receive. *Trends Neurosci*. 2015;38:226-236

102. Hafner M., Landgraf P., Ludwig J., et al. Identification of microRNAs and other small regulatory RNAs using cDNA library sequencing. *Methods*. 2008;44:3-12

103. Gillen A. E., Yamamoto T. M., Kline E., Hesselberth J. R. and Kabos P. Improvements to the HITS-CLIP protocol eliminate widespread mispriming artifacts. *BMC Genomics*. 2016;17:338

104. Klotgen A., Munch P. C., Borkhardt A., Hoell J. I. and McHardy A. C. Biochemical and bioinformatic methods for elucidating the role of RNA-protein interactions in posttranscriptional regulation. *Brief Funct Genomics*. 2015;14:102-114

105. Burger K., Muhl B., Kellner M., et al. 4-thiouridine inhibits rRNA synthesis and causes a nucleolar stress response. *RNA Biol*. 2013;10:1623-1630

参考文献

Liu N., Dai Q., Zheng G., He C., Parisien M. and Pan T. N(6)-methyladenosine-dependent RNA structural switches regulate RNA-protein interactions. *Nature*. 2015;518:560-564

异质核糖核蛋白 C (HNRNPC) 是丰富的核 RBP, 参与前体 mRNA 加工。为定位 HNRNPC 结合位点周围的 N^6 -甲基腺嘌呤 (m^6A) 位点, 研究人员进行了 PAR-CLIP 以分离所有 HNRNPC 结合的 RNA 区域。然后, 他们使用抗 m^6A 免疫沉淀 (MeRIP) 鉴定了 HNRNPC 结合位点中的 39,060 个 m^6A 开关。

Illumina 的技术: HiSeq 2000 系统

Murakawa Y., Hinz M., Mothes J., et al. RC3H1 post-transcriptionally regulates A20 mRNA and modulates the activity of the IKK/NF-kappaB pathway. *Nat Commun*. 2015;6:7367

研究人员使用 PAR-CLIP 鉴定了人 RBP RC3H1 的约 3800 个 mRNA 靶标, 具有 416,000 个结合位点。RC3H1 (也称为 ROQUIN) 通过一个 3'UTR 组成型降解元件 (CDE) 促进 TNF- α mRNA 降解。发现的大量位点不同于保守 CDE, 揭示了结构-序列基序, 在发夹中嵌入了富 U 序列。

Illumina 的技术: HiSeq 2000 系统

Matveeva E., Maiorano J., Zhang Q., et al. Involvement of PARP1 in the regulation of alternative splicing. *Cell Discovery*. 2016;2:15046

作者证明, PAR-CLIP 产物被 PARP1 抗体沉淀。这提供了额外的证据, 证明 PARP1 可能具有将 RNA 定位到染色质上特定区域的接头功能。

Illumina 的技术: HiSeq 2500 系统

Tichon A., Gil N., Lubelsky Y., Havkin Solomon T., Lemze D., et al. A conserved abundant cytoplasmic long noncoding RNA modulates repression by Pumilio proteins in human cells. *Nat Commun*. 2016;7:12209

Vongrad V., Imig J., Mohammadi P., et al. HIV-1 RNAs are Not Part of the Argonaute 2 Associated RNA Interference Pathway in Macrophages. *PLoS One*. 2015;10:e0132127

Kang D., Skalsky R. L. and Cullen B. R. EBV BART MicroRNAs Target Multiple Pro-apoptotic Cellular Genes to Promote Epithelial Cell Survival. *PLoS Pathog*. 2015;11:e1004979

Porter D. F., Koh Y. Y., VanVeller B., Raines R. T. and Wickens M. Target selection by natural and redesigned PUF proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112:15868-15873

Wang Q., Taliaferro J. M., Klibaite U., Hilgers V., Shaevitz J. W. and Rio D. C. The PSI-U1 snRNP interaction regulates male mating behavior in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113:5269-5274

Lee A. S., Kranzusch P. J. and Cate J. H. eIF3 targets cell-proliferation messenger RNAs for translational activation or repression. *Nature*. 2015;522:111-114

Chu Y., Wang T., Dodd D., Xie Y., Janowski B. A. and Corey D. R. Intramolecular circularization increases efficiency of RNA sequencing and enables CLIP-Seq of nuclear RNA from human cells. *Nucleic Acids Res*. 2015;43:e75

Xie H., Lee L., Scicluna P., et al. Novel functions and targets of miR-944 in human cervical cancer cells. *Int J Cancer*. 2015;136:E230-241

Xiong X. P., Vogler G., Kurthkoti K., Samsonova A. and Zhou R. SmD1 Modulates the miRNA Pathway Independently of Its Pre-mRNA Splicing Function. *PLoS Genet*. 2015;11:e1005475

Chen T., Hao Y. J., Zhang Y., et al. m(6)A RNA Methylation Is Regulated by MicroRNAs and Promotes Reprogramming to Pluripotency. *Cell Stem Cell*. 2015;16:289-301

相关试剂盒

TruSeq Ribo Profile Kit

Ribo-Zero rRNA Removal Kit

TruSeq RNA Library Prep Kit v2

TruSeq Small RNA Library Prep Kit

TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit

TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Kit

TruSeq Targeted RNA Expression Library Prep Kit

iCLIP: 单核苷酸分辨率 CLIP

iCLIP 用类似于 HITS-CLIP 和 PAR-CLIP 的过程定位蛋白质-RNA 相互作用。¹⁰⁶ 此方法包含额外的步骤, 在交联后消化蛋白质, 并用逆转录酶定位交联位点。

在 iCLIP 中, 免疫沉淀特异性交联的 RNA-蛋白质复合物。用蛋白酶 K 处理复合物, 在结合位点交联的蛋白质不被消化。在逆转录时, cDNA 在结合位点断裂并被环化。这些环化的片段被线性化并 PCR 扩增。对这些扩增片段的深度测序提供了在核苷酸水平上分辨了蛋白结合位点 eCLIP 是对 iCLIP 的改进, 避免了 cDNA 环化, 减少了假产物。¹⁰⁷

其他版本: HITS-CLIP、PAR-CLIP、eCLIP、irCLIP



iCLIP 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">核苷酸分辨率的蛋白结合位点避免使用核酸酶扩增允许检测较少发生的事件	<ul style="list-style-type: none">对靶标不具特异性的抗体会使非特异性复合物沉淀非线性 PCR 扩增会导致出现影响实验重复性的偏向性环化步骤可能引入假产物需要放射性同位素可视化仅标记 5' 末端的 UV 交联的蛋白质-RNA 复合物¹⁰⁸环化连接效率可能不够¹⁰⁹

综述

Cook K. B., Hughes T. R. and Morris Q. D. High-throughput characterization of protein-RNA interactions. *Brief Funct Genomics*. 2015;14:74-89

参考文献

Ennajdaoui H., Howard J. M., Sterne-Weiler T., Jahanbani F., Coyne D. J., et al. IGF2BP3 Modulates the Interaction of Invasion-Associated Transcripts with RISC. *Cell Rep*. 2016;15:1876-1883

作者研究了胰岛素样生长因子 2 mRNA 结合蛋白 3 (IGF2BP3), 它是一个 RBP, 促进 RISC 与特定转录本的结合。他们使用 iCLIP 证明, IGF2BP3 和 miRNA 的结合位点中存在显著重叠。结果表明, IGF2BP3 通过调节 miRNA-mRNA 相互作用影响一个恶性肿瘤相关的 RNA 调节子。

Illumina 的技术: HiSeq 2500 系统

Sutandy F. X., Hildebrandt A. and Konig J. Profiling the Binding Sites of RNA-Binding Proteins with Nucleotide Resolution Using iCLIP. *Methods Mol Biol*. 2016;1358:175-195

Misra A., Ou J., Zhu L. J. and Green M. R. Global analysis of CPSF2-mediated alternative splicing: Integration of global iCLIP and transcriptome profiling data. *Genom Data*. 2015;6:217-221

Wang Q., Taliaferro J. M., Klibaite U., Hilgers V., Shaevitz J. W., et al. The PSI-U1 snRNP interaction regulates male mating behavior in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016;113:5269-5274

Gosline S. J., Gurtan A. M., JnBaptiste C. K., Bosson A., Milani P., et al. Elucidating MicroRNA Regulatory Networks Using Transcriptional, Post-transcriptional, and Histone Modification Measurements. *Cell Rep*. 2016;14:310-319

106. Konig J., Zarnack K., Rot G., et al. iCLIP reveals the function of hnRNP particles in splicing at individual nucleotide resolution. *Nat Struct Mol Biol*. 2010;17:909-915

107. Van Nostrand E. L., Pratt G. A., Shishkin A. A., et al. Robust transcriptome-wide discovery of RNA-binding protein binding sites with enhanced CLIP (eCLIP). *Nat Methods*. 2016;13:508-514

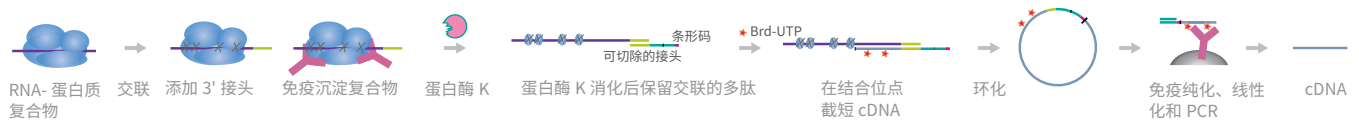
108. Zarnegar B. J., Flynn R. A., Shen Y., Do B. T., Chang H. Y. and Khavari P. A. irCLIP platform for efficient characterization of protein-RNA interactions. *Nat Methods*. 2016;13:489-492

109. Van Nostrand E. L., Pratt G. A., Shishkin A. A., et al. Robust transcriptome-wide discovery of RNA-binding protein binding sites with enhanced CLIP (eCLIP). *Nat Methods*. 2016;13:508-514

BrdU-CLIP: BrdU 亲和纯化 CLIP

BrdU-CLIP 以单核苷酸分辨率测序 RBP 的结合位点。BrdU-CLIP 解决了 HITS-CLIP 中的一个重大问题，即由于逆转录提前终止，5' 接头未连接到 cDNA。BrdU-CLIP 在逆转录中使用 BrdUTP 和具有 3' 和 5' 接头的引物。¹¹⁰ 此方法允许更高的 cDNA 产量并在单个步骤同时添加 5' 和 3' 接头。

首先，RNA-蛋白质复合物经 UV 交联，RNase 消化后免疫沉淀。将 3' 接头连接到 RNA，并用蛋白酶 K 消化逆交联。某些来自交联的肽维持与 RNA 链结合，即使在逆交联之后。用 BrdUTP 和含有 3' 和 5' 接头，由无嘌呤 / 无嘧啶内切核酸酶 (APE) 切割位点分开的引物进行逆转录。将所得的 cDNA 纯化、环化并用 BrdU 沉淀进一步纯化。接下来，通过切割 APE 位点将 cDNA 线性化，PCR 扩增并测序。



BrdU-CLIP 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">• 以单核苷酸分辨率测序 RBP 的 RNA 结合位点• 不同于 HITS-CLIP，捕获截短和未截短的 cDNA• 由于 BrdUTP，提供更高的 cDNA 产量• 在一个逆转录步骤中添加 3' 和 5' 接头	<ul style="list-style-type: none">• 管到柱的转移可能导致材料大量损失¹¹¹• 学术界尚未广泛采用

综述

Scotti M. M. and Swanson M. S. RNA mis-splicing in disease. *Nat Rev Genet.* 2016;17:19-32

Vuong C. K., Black D. L. and Zheng S. The neurogenetics of alternative splicing. *Nat Rev Neurosci.* 2016;17:265-281

Hsiao Y.-H. E., Cass A. A., Bahn J. H., Lin X. and Xiao X. Global Approaches to Alternative Splicing and Its Regulation—Recent Advances and Open Questions. *Transcriptomics and Gene Regulation.* 2016;37-71

Bangru S. and Kalsotra A. Advances in analyzing RNA diversity in eukaryotic transcriptomes: peering through the Omics lens. *F1000Research.* 2016;5:2668

Flynn R. A., Martin L., Spitale R. C., Do B. T., Sagan S. M., et al. Dissecting noncoding and pathogen RNA-protein interactomes. *RNA.* 2015;21:135-143

参考文献

Weyn-Vanhenryck S. M., Mele A., Yan Q., Sun S., Farny N., et al. HITS-CLIP and integrative modeling define the Rbfox splicing-regulatory network linked to brain development and autism. *Cell Rep.* 2014;6:1139-1152

研究人员开发了 BrdU-CLIP 并配合 HITS-CLIP 使用，以了解 RBP RBFOX1/2/3 如何调控神经系统中的选择性剪接以及对自闭症的影响。他们发现 RBFOX 的 UGCAUG 结合继续中的两个鸟嘌呤对蛋白与 RNA 的相互作用以及交联至关重要。研究还揭示了自闭症大脑中 RBFOX 靶标的改变以及所有 3 个 RBFOX 蛋白的下调。

Illumina 的技术: HiSeq 2000 系统、Genome Analyzer 系统、TruSeq Small RNA Library Preparation Kit

相关试剂盒

TruSeq Small RNA Library Prep Kit

110. Weyn-Vanhenryck S. M., Mele A., Yan Q., et al. HITS-CLIP and integrative modeling define the Rbfox splicing-regulatory network linked to brain development and autism. *Cell Rep.* 2014;6:1139-1152

111. Zarnegar B. J., Flynn R. A., Shen Y., Do B. T., Chang H. Y. and Khavari P. A. irCLIP platform for efficient characterization of protein-RNA interactions. *Nat Methods.* 2016;13:489-492

AGO-CLIP: Argonaute 交联免疫沉淀

Argonaute 交联免疫沉淀 (AGO-CLIP) 是在线虫 (*C. elegans*) 中定位 miRNA 与 AGO 结合的位点的实验方案。¹¹² 在此方法中, 首先在体内将光激活性核苷 4-SU 整合到线虫 RNA 中。4-SU 标记的 RNA 与结合蛋白交联, 并用 RNase T1 处理提取的裂解物, RNase T1 会截短某些 miRNA。在免疫沉淀和洗涤之后, 交联的 RNA 依次用 PNK、T4 RNA 连接酶和蛋白酶 K 处理。提取 RNA 并逆转录成 cDNA 并测序。深度测序提供碱基对分辨率的 miRNA 和 AGO 结合位点。



AGO-CLIP 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">• 用 CLIP 定位 miRNA 与 AGO 的结合位点• 提供单碱基分辨率的结合位点	<ul style="list-style-type: none">• 杂交捕获效率低• 不能提供 miRNA-靶标相互作用强度的定量分析¹¹³

综述

Schirle N. T., Sheu-Gruttadauria J. and MacRae I. J. Structural basis for microRNA targeting. *Science*. 2014;346:608-613

参考文献

Hamilton M. P., Rajapakshe K. I., Bader D. A., et al. The Landscape of microRNA Targeting in Prostate Cancer Defined by AGO-PAR-CLIP. *Neoplasia*. 2016;18:356-370

miRNA 的降解与前列腺癌发生和进展直接相关。作者在经男性激素受体拮抗剂恩杂鲁胺处理的 LNCaP 细胞中, 使用 AGO-CLIP 以鉴定 miRNA 与其靶标在人前列腺癌疾病进展中的相互作用。他们还在不同疾病进展阶段的前列腺癌细胞系中, 使用了 AGO-PAR-CLIP。结果鉴定了前列腺癌进展中主要的和新的驱动因子。

illumina 的技术: HiSeq 2000 系统、TruSeq RNA Library Prep Kit

Imig J., Brunschweiler A., Brummer A., et al. miR-CLIP capture of a miRNA targetome uncovers a lincRNA H19-miR-106a interaction. *Nat Chem Biol*. 2015;11:107-114

Luna J. M., Scheel T. K., Danino T., et al. Hepatitis C Virus RNA Functionally Sequesters miR-122. *Cell*. 2015;160:1099-1110

Wang P., Ning S., Zhang Y., et al. Identification of lincRNA-associated competing triplets reveals global patterns and prognostic markers for cancer. *Nucleic Acids Res*. 2015;

Grosswendt S., Filipchuk A., Manzano M., Klironomos F., Schilling M., et al. Unambiguous identification of miRNA:target site interactions by different types of ligation reactions. *Mol Cell*. 2014;54:1042-1054

Newie I., Sokilde R., Persson H., et al. The HER2-encoded miR-4728-3p regulates ESR1 through a non-canonical internal seed interaction. *PLoS One*. 2014;9:e97200

相关试剂盒

TruSeq Small RNA Library Prep Kit

TruSeq RNA Library Prep Kit v2

TruSeq Nano DNA Library Prep Kit

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

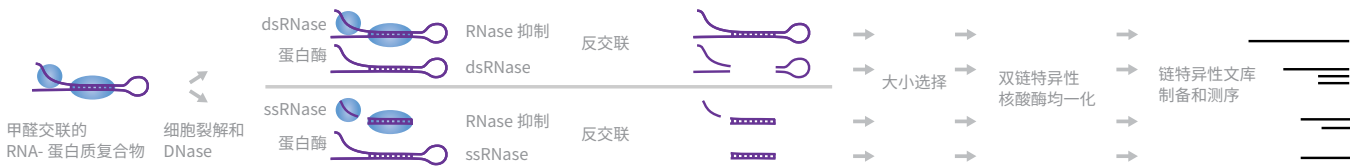
112. Grosswendt S., Filipchuk A., Manzano M., et al. Unambiguous identification of miRNA:target site interactions by different types of ligation reactions. *Mol Cell*. 2014;54:1042-1054

113. Imig J., Brunschweiler A., Brummer A., et al. miR-CLIP capture of a miRNA targetome uncovers a lincRNA H19-miR-106a interaction. *Nat Chem Biol*. 2014; advance online publication:

PIP-Seq: 蛋白质相互作用分析测序

PIP-Seq 在交联或未交联的细胞中测序未加工和成熟 RNA 中的 RBP 结合位点。^{114,115} 在 PIP-seq 中, RNase 敏感和 RNase 不敏感片段都被分离, 并单独处理以区分哪些序列与 RBP 实际结合, 哪些只是对 RNase 不敏感。

首先, 将交联 (通过 UV 或甲醛) 或未交联的细胞裂解。将裂解物分为 2 批: 实验组和 RNase 不敏感对照。将实验 / 足迹样本用双链 RNase (dsRNase) 或单链 RNase (ssRNase) 消化, 然后用蛋白酶 K 处理以去除 RBP。但是, 为筛选对 RNase 不敏感的区域, 将对照首先用蛋白酶 K 处理, 然后用 ssRNase 或 dsRNase 处理。将两组片段都逆交联并用于制备链特异性文库。每个文库用重杂交和热稳定性双链特异性核酸酶归一化, 然后测序。



PIP-seq 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">• 测序未加工或成熟 RNA 中与 RBP 结合的 RNA 区域• 鉴定对 RNase 不敏感的区域• 可用于组织和全生物体• 链特异性	<ul style="list-style-type: none">• 小核苷酸凸起和环分辨率有限¹¹⁶• 除蛋白质-RNA 连接之外, 甲醛交联代表了蛋白-蛋白连接的风险¹¹⁷• 核酸酶扩散到植物细胞的能力有限; 化学探针, 例如二甲磺酸 (DMS) 的优点¹¹⁸

综述

Anderson S. J., Willmann M. R. and Gregory B. D. Protein Interaction Profile Sequencing (PIP-seq) in Plants. *Current Protocols in Plant Biology*. 2016;

Nussbacher J. K., Batra R., Lagier-Tourenne C. and Yeo G. W. RNA-binding proteins in neurodegeneration: Seq and you shall receive. *Trends Neurosci*. 2015;38:226-236

Foley S. W., Vandivier L. E., Kuksa P. P. and Gregory B. D. Transcriptome-wide measurement of plant RNA secondary structure. *Curr Opin Plant Biol*. 2015;27:36-43

Popova V. V., Kurshakova M. M. and Kopytova D. V. Methods to study the RNA-protein interactions. *Molecular Biology*. 2015;49:418-426

参考文献

Gosai S. J., Foley S. W., Wang D., et al. Global analysis of the RNA-protein interaction and RNA secondary structure landscapes of the Arabidopsis nucleus. *Mol Cell*. 2015;57:376-388

作者研究了拟南芥幼苗中核 RNA 复杂的相互作用。他们使用 PIP-Seq 定位了幼苗核中 RBP 结合位点。本研究表明, 选择性剪接位点具有不同的 RBP 结合位点, 也有其自身的二级结构。此外, 使用 PIP-Seq 数据, 作者发现叶绿体 RBP CP29A 与核 mRNA 相互作用。

illumina 的技术: HiSeq 2000 系统、TruSeq Small RNA Sample Prep Kit

相关试剂盒

TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Kit

Ribo-Zero Gold rRNA Removal Kits

114. Silverman I. M., Li F., Alexander A., et al. RNase-mediated protein footprint sequencing reveals protein-binding sites throughout the human transcriptome. *Genome Biology*. 2014;15:R3

115. Silverman I. M. and Gregory B. D. Transcriptome-wide ribonuclease-mediated protein footprinting to identify RNA-protein interaction sites. *Methods*. 2014;

116. Foley S. W., Vandivier L. E., Kuksa P. P. and Gregory B. D. Transcriptome-wide measurement of plant RNA secondary structure. *Curr Opin Plant Biol*. 2015;27:36-43

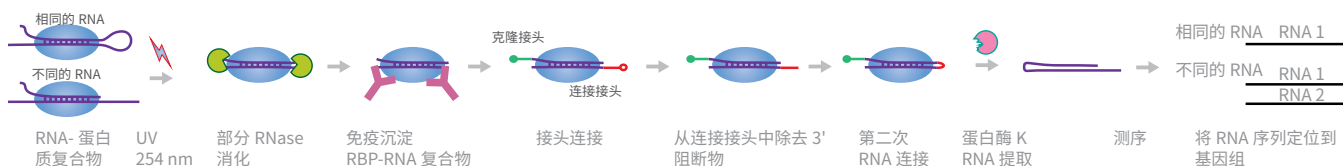
117. Foley S. W., Vandivier L. E., Kuksa P. P. and Gregory B. D. Transcriptome-wide measurement of plant RNA secondary structure. *Curr Opin Plant Biol*. 2015;27:36-43

118. Foley S. W., Vandivier L. E., Kuksa P. P. and Gregory B. D. Transcriptome-wide measurement of plant RNA secondary structure. *Curr Opin Plant Biol*. 2015;27:36-43

hiCLIP: RNA 杂交及单核苷酸分辨率紫外交联和免疫沉淀

hiCLIP 在体内测序与 RBP 结合的 RNA 双链分子。¹¹⁹ hiCLIP 中独特的克隆和接头 - 转接头系统鉴定 RBP 结合的双链是来自同一 RNA 还是不同的 RNA。

与 CLIP 文库制备技术类似, 将 RNA 和 RBP UV 交联, 部分消化, 并免疫沉淀。将特征性的 hiCLIP 克隆并将接头 - 转接头连接到双链的两条链上。接头 - 转接头的 3' 末端被去磷酸化, 并连接到另一条链的 5' 末端。结合的蛋白用蛋白酶 K 去除。制备 cDNA 文库, 其与用于高通量测序的 iCLIP 文库类似。克隆和接头 - 转接头允许将杂合的 read 定位到转录组上, 并区分该双链分子是由相同 RNA 还是不同 RNA 形成的。



hiCLIP 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">在体内定位 RBP 结合的 RNA 双链分子接头 - 转接头修正了交联、连接和测序杂交产物 (CLASH) 中物理解位置上和计算上的困难。检测长 RNA 双链分子间的相互作用¹²⁰	<ul style="list-style-type: none">不识别非 RBP 结合的 RNA 双链分子复杂的技术操作流程使用放射性标记环化步骤可能引入假产物

综述

Lu Z. and Chang H. Y. Decoding the RNA structurome. *Curr Opin Struct Biol.* 2016;36:142-148

Weidmann C. A., Mustoe A. M. and Weeks K. M. Direct Duplex Detection: An Emerging Tool in the RNA Structure Analysis Toolbox. *Trends Biochem Sci.* 2016;41:734-736

Nawy T. Structural biology: RNA structure served *in vivo*. *Nature Methods.* 2015;12:383-383

Burgess D. J. RNA. Detailed probing of RNA structure *in vivo*. *Nat Rev Genet.* 2015;16:255

参考文献

Sugimoto Y., Vigilante A., Darbo E., Zirra A., Militti C., et al. hiCLIP reveals the *in vivo* atlas of mRNA secondary structures recognized by Staufen 1. *Nature.* 2015;519:491-494

作者开发了 hiCLIP 方法, 更深入地理解细胞中 Staufen 1 RBP 结合的 RNA 结构之间的相互作用。他们发现了大量分子内的 RNA 双链, 去除已翻译完全的 mRNA 编码区内的双链后, 在 3' UTR 内, 形成长的双链的发生率增加而和形成双链区域内的 SNP 发生率变低。

Illumina 的技术: HiSeq 系统、MiSeq 系统

相关试剂盒

TruSeq Ribo Profile Kit

TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Kit

Ribo-Zero Gold rRNA Removal Kits

TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit

TruSeq RNA Library Prep Kit v2

TruSeq Targeted RNA Expression Library Prep Kit

TruSeq Small RNA Library Prep Kit

119. Sugimoto Y., Vigilante A., Darbo E., et al. hiCLIP reveals the *in vivo* atlas of mRNA secondary structures recognized by Staufen 1. *Nature.* 2015;519:491-494

120. Lu Z. and Chang H. Y. Decoding the RNA structurome. *Curr Opin Struct Biol.* 2016;36:142-148

RBNS: RNA Bind-n-Seq 测序

RBNS 通过高通量定量结合亲和力、解离常数及其对二级 RNA 结构结合的影响鉴定 RBP。¹²¹ RBNS 是对与不同浓度的带有荧光标记的 RBP 池结合的随机短 RNA 寡核苷酸进行深度测序。

首先，将具有链霉亲和素标记的 RBP 分配到不同浓度的池中。然后，加入随机 RNA 片段池中。每种 RNA 寡核苷酸由高亲和力结合位点和低亲和力结合位点构成，它们的两端都加有测序接头。在 RBP 与其靶向 RNA 结合后，通过链霉亲和素结合纯化复合物，并将所结合的 RNA 洗脱下来。进行标准的 cDNA 文库制备，以产生供测序文库。

类似方法：HiTS-RAP



RBNS 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">鉴定 RBP 的序列和结合特异性作为基于交联方法的补充	<ul style="list-style-type: none">只使用一轮选择，导致较短的核心 RBP 位点¹²²

综述

Campbell Z. T. and Wickens M. Probing RNA-protein networks: biochemistry meets genomics. *Trends Biochem Sci.* 2015;40:157-164

参考文献

Taliaferro J. M., Lambert N. J., Sudmant P. H., et al. RNA Sequence Context Effects Measured *In Vitro* Predict *In Vivo* Protein Binding and Regulation. *Mol Cell.* 2016;64:294-306

作者研究了决定 RBP 与其 RNA 序列基序的相互作用中，结合的和未结合的基序之间差异的背景特性。他们利用天然存在的内含子 RNA 序列，使用 RBNS 研究了 12,000 个小鼠 RNA 序列和 MBNL1 及 RFX2 两种 RBP，鉴定了不同转录本中相同基序的结合情况。结果表明，体外检出基序存在与体内存在结合之间的关系显著正相关。RNA 二级结构也在这些相互作用中起到重要作用。作者还利用引物延伸测序分析了选择性 2' 羟基乙酰化 (SHAPE-Seq)，以鉴定用于 RBNS 实验的 588 个寡核苷酸的结构特征。

illumina 的技术：HiSeq 系统

Kapeli K., Pratt G. A., Vu A. Q., Hutt K. R., Martinez F. J., et al. Distinct and shared functions of ALS-associated proteins TDP-43, FUS and TAF15 revealed by multisystem analyses. *Nat Commun.* 2016;7:12143

Conway Anne E., Van Nostrand Eric L., Pratt Gabriel A., Aigner S., Wilbert Melissa L., et al. Enhanced CLIP Uncovers IMP Protein-RNA Targets in Human Pluripotent Stem Cells Important for Cell Adhesion and Survival. *Cell Reports.* 2016;

相关试剂盒

TruSeq RNA Library Prep Kit v2

121. Lambert N., Robertson A., Jangi M., McGeary S., Sharp P. A. and Burge C. B. RNA Bind-n-Seq: quantitative assessment of the sequence and structural binding specificity of RNA binding proteins. *Mol Cell.* 2014;54:887-900

122. Campbell Z. T. and Wickens M. Probing RNA-protein networks: biochemistry meets genomics. *Trends Biochem Sci.* 2015;40:157-164

TRIBE: 通过编辑识别 RNA 结合蛋白的靶向位点

TRIBE 通过用融合蛋白改变 RNA 序列，从而在体内鉴定 RBP 的靶 RNA 序列。¹²³ 融合蛋白包含所研究的与靶 RNA 结合的 RBP 和作用于 RNA 的腺嘌呤脱氨酶的催化结构域（ADAR）。这个 ADAR 能不可逆地将邻近的腺嘌呤修饰为次黄嘌呤，可作为测序分析中的标记。

首先，将含有目的 RBP 的融合蛋白克隆到动物模型并与荧光标志蛋白一起表达。在激活融合蛋白表达后，用 Oligo(dT) 微珠分离目标细胞的 mRNA。用 Poly(dT)-T7 引物和随机 -T7 引物逆转录 mRNA，以降低 3' 偏向性。新生的 cDNA 链使用 TruSeq RNA Library Prep Kit 制备，获得用于测序的 cDNA 文库。



TRIBE 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">在体内鉴定特定细胞类型中，RBP 的 RNA 靶标不受抗体特异性的限制可在少量特定细胞中进行	<ul style="list-style-type: none">需要构建融合蛋白RBP 结合位点附近需有一个腺嘌呤ADAR 的催化结构域对双链 RNA 具有强的偏向性

综述

尚无

参考文献

McMahon A. C., Rahman R., Jin H., Shen J. L., Fieldsend A., et al. TRIBE: Hijacking an RNA-Editing Enzyme to Identify Cell-Specific Targets of RNA-Binding Proteins. *Cell*. 2016;165:742-753

作者开发了 TRIBE 以鉴定果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 中 Hrp48、dFMR1 和 NonA 这三个 RBP 的体内靶标。TRIBE 可在少量特定细胞中进行，少至 150 个不同的果蝇神经元细胞。

Illumina 的技术: HiSeq 系统、MiSeq 系统、TruSeq RNA Library Prep Kit

相关试剂盒

TruSeq RNA Library Prep Kit v2

Ribo-Zero rRNA Removal Kit

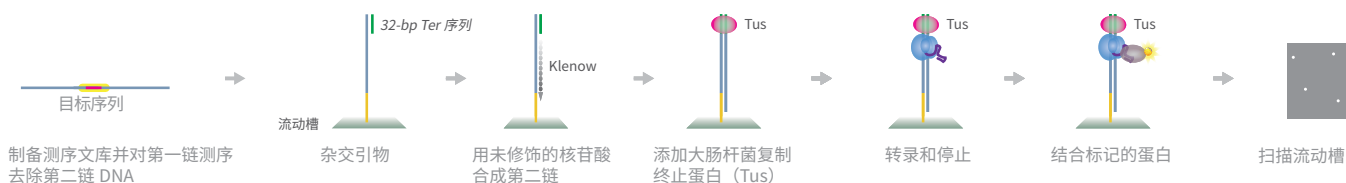
123. McMahon A. C., Rahman R., Jin H., et al. TRIBE: Hijacking an RNA-Editing Enzyme to Identify Cell-Specific Targets of RNA-Binding Proteins. *Cell*. 2016;165:742-753

HiTS-RAP: 高通量测序 -RNA 亲和性分析

HiTS-RAP 是大规模评估 RNA 适配子与其蛋白的结合相互作用的定量方法。^{124,125} HiTS-RAP 直接在流动槽中转录 DNA 并测量 RNA 适配子与荧光标记的蛋白的结合亲和力。

首先, 制备测序文库并在 Illumina 流动槽上测序。接下来, 去除 DNA 的第二链, 将附着到流动槽的单链 DNA 退火至含 32 bp *Ter* 序列的引物。将大肠杆菌复制终止子蛋白 (Tus) 引入系统并与 *Ter* 序列结合。用 T7 RNA 聚合酶开始 RNA 的转录, 并在结合有 Tus*Ter* 序列的上游停止。由于 RNA 聚合酶活性由于 Tus 结合到 DNA 而突然停止, RNA 链仍连接于 RNA 聚合酶复合物上。引入荧光标记的蛋白并结合到游离的 RNA 适配子, 产生可被测序仪读取的荧光信号。

类似方法: RBNS、RNA-MaP



HiTS-RAP 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">通过大规模平行试验定量评估 RNA 适配子的结合亲和力可方便地用于非蛋白分子能确定 RBP 的从头结合的特异性	<ul style="list-style-type: none">限于分析 150 nt 或更短的 RNA 片段, 如果使用双端测序实验方案, 则片段长度的上限可增加至 500 nt不能测量结合动力学, 例如结合与解离的速率易受通常在大蛋白中存在的空间阻碍效应的影响

综述

Marchese D., de Groot N. S., Lorenzo Gotor N., Livi C. M. and Tartaglia G. G. Advances in the characterization of RNA-binding proteins. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2016;
Campbell Z. T. and Wickens M. Probing RNA-protein networks: biochemistry meets genomics. *Trends Biochem Sci*. 2015;40:157-164

参考文献

Tome J. M., Ozer A., Pagano J. M., Gheba D., Schroth G. P., et al. Comprehensive analysis of RNA-protein interactions by high-throughput sequencing-RNA affinity profiling. *Nat Methods*. 2014;11:683-688

作者开发了 HiTS-RAP 以测量 NELF-E 和 GFP 蛋白与其 RNA 适配子的结合亲和力。结果表明, NELF-E 与适配子的结合能力受到突变的严重影响, 因为它依赖于单链 RNA 基序进行结合。但是, GFP 的结合主要依赖于 RNA 的二级结构, 不受突变影响。

Illumina 的技术: Genome Analyzer 系统

相关试剂盒

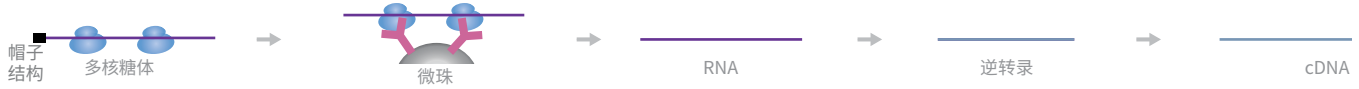
TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

124. Tome J. M., Ozer A., Pagano J. M., Gheba D., Schroth G. P. and Lis J. T. Comprehensive analysis of RNA-protein interactions by high-throughput sequencing-RNA affinity profiling. *Nat Methods*. 2014;11:683-688

125. Ozer A., Tome J. M., Friedman R. C., Gheba D., Schroth G. P. and Lis J. T. Quantitative assessment of RNA-protein interactions with high-throughput sequencing-RNA affinity profiling. *Nat Protoc*. 2015;10:1212-1233

TRAP-Seq: 多核糖体 mRNA 靶向纯化

多核糖体 mRNA 靶向纯化 (TRAP-Seq) 确定多种条件下, 翻译中的 mRNA 的位置信息。¹²⁶ 在此方法中, 标记了在细胞中表达的核糖体蛋白。纯化被标记的核糖体蛋白并分离其 RNA。将 RNA 逆转录成 cDNA。对 cDNA 的深度测序提供了在单碱基分辨水平上, 翻译过程中的 RNA。



TRAP-seq 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">• 允许检测翻译中的 RNA• 可评估由特异标记的核糖体翻译的 RNA• 不需要预先了解 RNA 的信息• 提供基因组范围的 RNA 筛选	<ul style="list-style-type: none">• 特异性不如新开发的方法, 例如 Ribo-Seq

综述

Nussbacher J. K., Batra R., Lagier-Tourenne C. and Yeo G. W. RNA-binding proteins in neurodegeneration: Seq and you shall receive. *Trends Neurosci.* 2015;38:226-236

Maze I., Shen L., Zhang B., et al. Analytical tools and current challenges in the modern era of neuroepigenomics. *Nat Neurosci.* 2014;17:1476-1490

参考文献

Reynoso M. A., Juntawong P., Lancia M., Blanco F. A., Bailey-Serres J. and Zanetti M. E. Translating Ribosome Affinity Purification (TRAP) followed by RNA sequencing technology (TRAP-SEQ) for quantitative assessment of plant translomes. *Methods Mol Biol.* 2015;1284:185-207

此出版物提供了深入介绍如何使用 TRAP-Seq 研究植物翻译组 (至少与一个 80S 核糖体结合的 mRNA) 的实验方案。

Illumina 的技术: HiSeq 2000/2500 系统、NextSeq 500 系统、ScriptSeq RNA-Seq Library Prep Kit、TruSeq RNA Library Prep Kit、TruSeq Small RNA Library Preparation Kit

相关试剂盒

TruSeq Ribo Profile Kit

Ribo-Zero rRNA Removal Kit

TruSeq RNA Library Prep Kit v2

TruSeq Small RNA Library Prep Kit

TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit

TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Kit

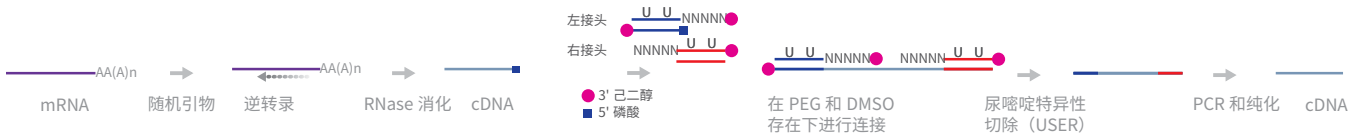
TruSeq Targeted RNA Expression Library Prep Kit

126. Jiao Y. and Meyerowitz E. M. Cell-type specific analysis of translating RNAs in developing flowers reveals new levels of control. *Mol Syst Biol.* 2010;6:419

DLAF: 将测序接头直接连接到第一条 cDNA 链上

DLAF 是链特异性 RNA 测序方法, 通过将独特的双链接头直接连接到第一链 cDNA, 避免了第二链 cDNA 的合成。¹²⁷

首先分离 mRNA 并去除 rRNA。然后, 将 RNA 片段部分水解并退火结合随机引物, 然后进行逆转录。纯化所得的第一链 cDNA 并连接双链接头。每个接头的一条链 (即退火链) 含有腺嘌呤, 并具有退火至 cDNA 后, 带有 5 或 6 个随机核苷酸突出。另一条链, 即连接链, 直接与 cDNA 链的最后一个核苷酸连接。将 3'-己二醇连接到每个接头的 3' 末端以降低其他链造成的污染。纯化连接了接头的 cDNA, 用腺嘌呤特异性切除酶处理这些 cDNA, 以从该 cDNA 上去掉退火链。此过程形成了两侧连接了接头的单链 cDNA 链。将 cDNA 用 PCR 进行扩增、然后纯化并测序。



DLAF 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">• 仅从第一链 cDNA 读取 mRNA 序列• 检测 mRNA 的 5' 和 3' 末端的序列• 采用较少的步骤以确保 cDNA 文库产物的高产量	<ul style="list-style-type: none">• 不能区分 mRNA 的 5' 是否有加帽

综述

Nussbacher J. K., Batra R., Lagier-Tourenne C. and Yeo G. W. RNA-binding proteins in neurodegeneration: Seq and you shall receive. *Trends Neurosci.* 2015;38:226-236

参考文献

Iwase S., Brookes E., Agarwal S., et al. A Mouse Model of X-linked Intellectual Disability Associated with Impaired Removal of Histone Methylation. *Cell Rep.* 2016;

作者研究了突变的染色质修饰因子与一种人类神经障碍, X 染色体连锁的智力障碍 (XLID) 之间的关系。他们专注于鉴定 KDM5C 的重要性, KDM5C 是一个特异于组蛋白 H3 双或三甲基化赖氨酸 4 (H3K4me2/3) 的去甲基化酶, XLID 患者所携带的这个基因常常存在突变。他们采用了 DLAF 的方法, 将测序接头连接到来自成年和培养的小鼠神经元的前皮层和杏仁体的 RNA-Seq 文库的第一链 cDNA。结果表明, KDM5C 显著地抑制参与调控神经回路发育和功能关键通路的基因表达。该研究认为, KDM5C 对 XLID 具有强诱导效应。

Illumina 的技术: HiSeq 2000 系统、TruSeq ChIP Library Prep Kit

相关试剂盒

ScriptSeq v2 RNA-Seq Library Prep Kit

Ribo-Zero rRNA Removal Kit

127. Agarwal S., Macfarlan T. S., Sartor M. A. and Iwase S. Sequencing of first-strand cDNA library reveals full-length transcriptomes. *Nat Commun.* 2015;6:6002

miTRAP: 通过 RNA 体外亲和纯化捕获 miRNA

miTRAP 利用连接到靶 RNA 序列的 MS2 茎环作为 miRNA 的诱饵，在体外鉴定 miRNA 的靶 RNA 序列。¹²⁸ MS2 是一条 19 nt 长的噬菌体 RNA 序列，存在于 MS2 复制酶 mRNA 的核糖体结合位点上，它通过折叠形成茎环结构。

首先，在体外转录形成作为 MS2 诱饵转录本。通过在糖淀粉树脂上固定并捕获 miRNA-蛋白质-RNA 复合物。RNA-蛋白质复合物用细胞提取物孵育，提取的 RNA-蛋白质复合物用麦芽糖溶液洗脱。通过酚-氯仿法从麦芽糖溶液中提取并纯化 miRNA，而对于蛋白质的分析是在将树脂放入含 10% β-巯基乙醇的 SDS-样本缓冲液里孵育后进行的。将 miRNA 洗脱物用标准 small-RNA Library Prep Kit 制备为 cDNA 文库，并测序。

类似方法：CLASH



miTRAP 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">• 允许体外鉴定 miRNA 的靶标• 还鉴定参与基因调控的新的和非典型的 miRNA 靶标序列	<ul style="list-style-type: none">• 尚未验证用于分析影响 miRNA 靶标的反式作用 RBP 或 lncRNA• 在细胞裂解前，不能进行基于 UV 或化学处理方法的蛋白质-RNA 交联

综述

Seliger B. Role of microRNAs on HLA-G expression in human tumors. *Hum Immunol.* 2016;77:760-763

Elton T. S. and Yalowich J. C. Experimental procedures to identify and validate specific mRNA targets of miRNAs. *EXCLI J.* 2015;14:758-790

参考文献

Jasinski-Bergner S., Reches A., Stoehr C., et al. Identification of novel microRNAs regulating HLA-G expression and investigating their clinical relevance in renal cell carcinoma. *Oncotarget.* 2016;7:26866-26878

此研究聚焦于鉴定肾细胞癌 (RCC) 的新治疗靶标。研究人员使用 miTRAP 结合生物信息学方法分析了在 HEK293T 和 JEG-3 细胞系中调控人白细胞抗原 G (HLA-G) 表达的 miRNA。他们发现了 2 个新的调控 HLA-G 的 miRNA，即 miR-548q 和 miR-628-5p。此外，通过超表达这些 miRNA 下调了 HLA-G mRNA 和蛋白的表达水平。

illumina 的技术：TruSeq Small RNA Library Prep Kit

Jasinski-Bergner S., Stehle F., Gonschorek E., et al. Identification of 14-3-3beta gene as a novel miR-152 target using a proteome-based approach. *J Biol Chem.* 2014;289:31121-31135

相关试剂盒

TruSeq Small RNA Library Prep Kit

128. Braun J., Misiak D., Busch B., Krohn K. and Hüttelmaier S. Rapid identification of regulatory microRNAs by miTRAP (miRNA trapping by RNA *in vitro* affinity purification). *Nucleic Acids Research.* 2014;

CLASH: 杂交产物的交联、连接和测序

CLASH 定位 RNA-RNA 之间的相互作用^{129,130}。

在此方法中，对 RNA-蛋白质复合物进行 UV 交联及亲和纯化。将 RNA-RNA 杂交物连接、分离并逆转录为 cDNA。cDNA 的深度测序可以提供高分辨率的 RNA-RNA 相互作用的嵌合 read。

类似方法：miTRAP、SPLASH、hiCLIP、RAP、RPL



CLASH 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">在体内确定 RNA-RNA 相互作用的位置信息提供可分辨结合位点的分辨率¹³¹	<ul style="list-style-type: none">短 RNA 片段间的杂交连接可能存在困难效率相对较低¹³²需要已知诱饵蛋白¹³³

综述

Chou C. H., Chang N. W., Shrestha S., et al. miRTarBase 2016: updates to the experimentally validated miRNA-target interactions database. *Nucleic Acids Res.* 2016;44:D239-247

Hausser J. and Zavolan M. Identification and consequences of miRNA-target interactions—beyond repression of gene expression. *Nat Rev Genet.* 2014;15:599-612

参考文献

Imig J., Brunschweiler A., Brummer A., Guennewig B., Mittal N., et al. miR-CLIP capture of a miRNA targetome uncovers a lincRNA H19-miR-106a interaction. *Nat Chem Biol.* 2014;advance online publication:

作者研究了人细胞系中 miRNA 对转录后基因调控的影响。他们开发了 miR-CLIP 方法来识别 miR-106a miRNA 的预期靶标，并评估了超表达此 miRNA 对其功能靶标的影响。通过比较 miR-CLIP 和 CLASH 的结果，他们发现 miR-106a 和其家族的其他成员会结合 H19 lincRNA。此外还发现，H19 lincRNA 在调控 H19、miR-17-5p 家族及其 mRNA 靶标的基因表达中起到缓冲的作用。

illumina 的技术：没有给出具体的 illumina 测序系统型号

相关试剂盒

TruSeq RNA Library Prep Kit v2

TruSeq Small RNA Library Prep Kit

TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit

TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Kit

TruSeq Targeted RNA Expression Library Prep Kit

129. Kudla G., Granneman S., Hahn D., Beggs J. D. and Tollervey D. Cross-linking, ligation, and sequencing of hybrids reveals RNA-RNA interactions in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108:10010-10015

130. Helwak A., Kudla G., Dudnakova T. and Tollervey D. Mapping the Human miRNA Interactome by CLASH Reveals Frequent Noncanonical Binding. *Cell.* 2013;153:654-665

131. Imig J., Brunschweiler A., Brummer A., et al. miR-CLIP capture of a miRNA targetome uncovers a lincRNA H19-miR-106a interaction. *Nat Chem Biol.* 2015;11:107-114

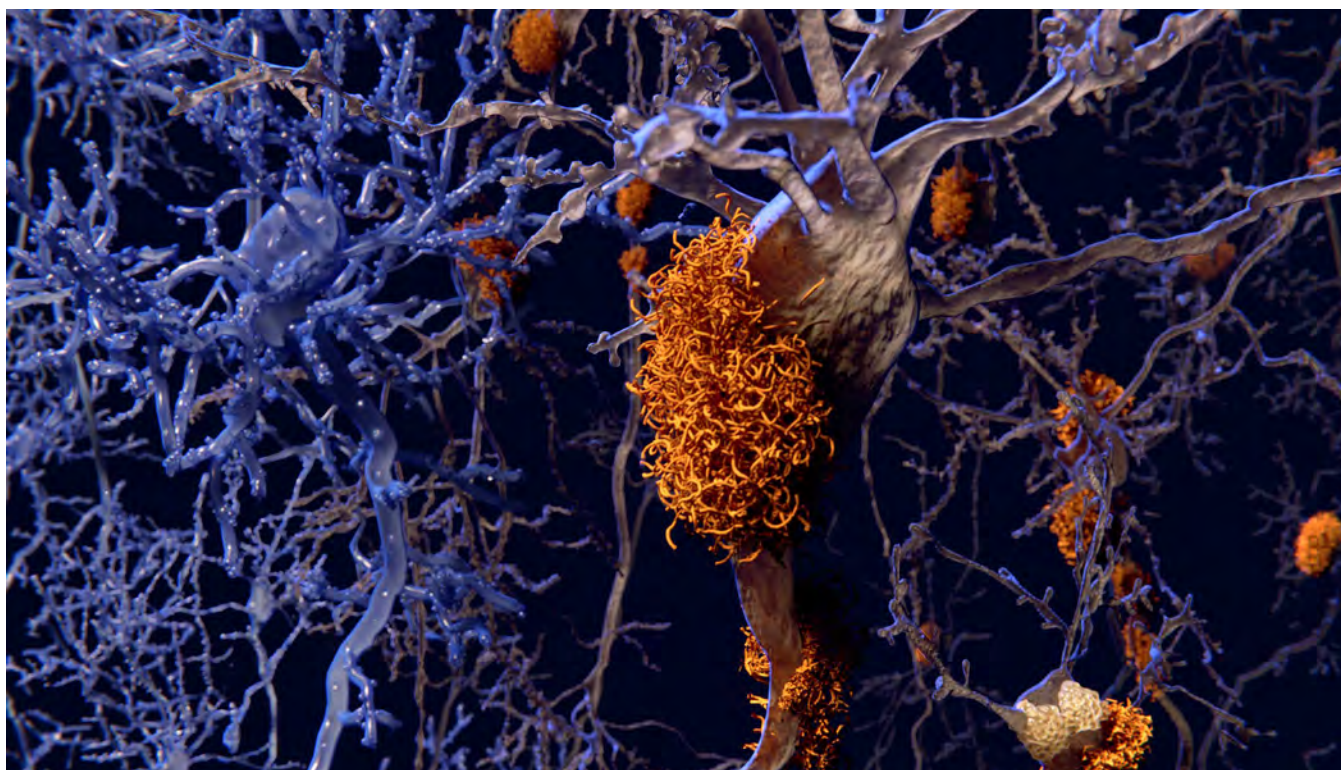
132. Hausser J. and Zavolan M. Identification and consequences of miRNA-target interactions—beyond repression of gene expression. *Nat Rev Genet.* 2014;15:599-612

133. Lu Z., Zhang Q. C., Lee B., et al. RNA Duplex Map in Living Cells Reveals Higher-Order Transcriptome Structure. *Cell.* 2016;165:1267-1279

RNA 修饰

RNA 修饰提供转录组的另一个水平的调控。这些修饰发生在翻译后作用于 RNA 链上。这些改变可能发生在 mRNA、lncRNA 或 ncRNA 之中。修饰包括 m⁵A 和 m⁶A 的甲基化以及假尿苷改变。¹³⁴⁻¹³⁶ 多种人类疾病涉及 m⁶A 的修饰，例如阿茨海默病、帕金森病和肥胖症。但是，不同于可逆的 m⁶A 修饰，假尿苷修饰是不可逆的，有可能具备翻译中无义密码子至有义密码子转换的调控因子的功能。

本节的方法具有不同的工作流程，具体取决于目标的修饰。



翻译后的改变影响阿茨海默病的发病。

综述

Frye M., Jaffrey S. R., Pan T., Rechavi G. and Suzuki T. RNA modifications: what have we learned and where are we headed? *Nat Rev Genet.* 2016;17:365-372

Maity A. and Das B. N6-methyladenosine modification in mRNA: machinery, function and implications for health and diseases. *FEBS J.* 2016;283:1607-1630

Zaringhalam M. and Papavasiliou F. N. Pseudouridylation meets next-generation sequencing. *Methods.* 2016;107:63-72

Ramaswami G. and Li J. B. Identification of human RNA editing sites: A historical perspective. *Methods.* 2016;107:42-47

134. Frye M., Jaffrey S. R., Pan T., Rechavi G. and Suzuki T. RNA modifications: what have we learned and where are we headed? *Nat Rev Genet.* 2016;17:365-372

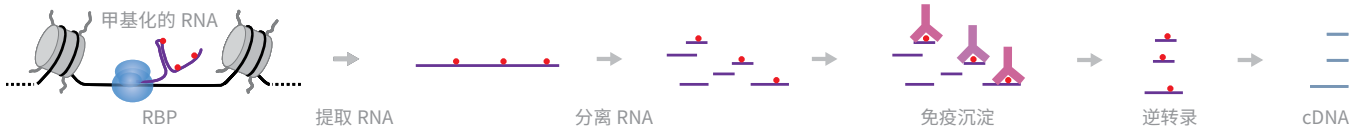
135. Maity A. and Das B. N6-methyladenosine modification in mRNA: machinery, function and implications for health and diseases. *FEBS J.* 2016;283:1607-1630

136. Zaringhalam M. and Papavasiliou F. N. Pseudouridylation meets next-generation sequencing. *Methods.* 2016;107:63-72

MeRIP-Seq: m6A 特异性甲基化的 RNA 免疫沉淀测序

MeRIP-Seq¹³⁷ 可以确定 m6A 甲基化的 RNA 的位置信息。在此方法中，使用 m6A 特异性抗体来免疫沉淀 RNA。将 RNA 逆转录成 cDNA，并测序。深度测序提供高分辨率的 m6A 甲基化 RNA 的 read。

类似方法：miCLIP、m6A-LAIC-Seq



MeRIP-Seq 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">• 定位 m⁶A 甲基化的 RNA	<ul style="list-style-type: none">• 对靶标不具特异性的抗体会使非特异性 RNA 修饰沉淀

综述

Bian Q. and Cahan P. Computational Tools for Stem Cell Biology. *Trends Biotechnol.* 2016;

参考文献

Gokhale N. S., McIntyre A. B., McFadden M. J., et al. N6-Methyladenosine in Flaviviridae Viral RNA Genomes Regulates Infection. *Cell Host Microbe.* 2016;

此研究探索了 m6A 修饰在黄病毒科成员丙肝病毒 (HCV) 中的影响。作者利用 MeRIP-Seq 鉴定了 HCV RNA 基因组中的 m6A 峰。抑制 m6A 甲基转移酶会增加感染性 HCV 颗粒的产生，而抑制 m6A 去甲基酶会降低产生。他们还发现，在特定病毒基因组区域中，m6A 的失活增加了病毒滴度而不影响 RNA 复制。此研究的结果可用于鉴定黄病毒科病毒例如登革病毒、寨卡病毒、黄热病毒和西尼罗河病毒中的保守调控区域。

Illumina 的技术：HiSeq 2500 系统、TruSeq RNA Sample Prep Kit

Lin S., Choe J., Du P., Triboulet R. and Gregory R. I. The m(6)A Methyltransferase METTL3 Promotes Translation in Human Cancer Cells. *Mol Cell.* 2016;62:335-345

Meng J., Lu Z., Liu H., et al. A protocol for RNA methylation differential analysis with MeRIP-Seq data and exomePeak R/Bioconductor package. *Methods.* 2014;69:274-281

相关试剂盒

TruSeq DNA Methylation Kit

TruSeq RNA Library Prep Kit v2

TruSeq Small RNA Library Prep Kit

TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit

TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Kit

TruSeq Targeted RNA Expression Library Prep Kit

137. Meyer K. D., Saletore Y., Zumbo P., Elemento O., Mason C. E. and Jaffrey S. R. Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3' UTRs and near stop codons. *Cell.* 2012;149:1635-1646

miCLIP-m6A: N6- 甲基腺苷 (m6A) 单核苷酸分辨率交联和免疫沉淀

miCLIP-m6A 在单核苷酸分辨率水平上确定转录组中的 m6A 位点。¹³⁸ 在此方法中, 将抗 m6A 抗体与 mRNA 序列交联, 然后制备 cDNA 文库并测序。miCLIP 中的 cDNA 文库制备流程与 iCLIP 实验方案描述的极为相似。

从总 RNA 开始, 分离 mRNA 链并片段化。引入抗 m6A 抗体并用 UV 交联。将 RNA-抗体复合物免疫沉淀并纯化。按照 iCLIP cDNA 文库制备的实验方案, 将 RNA 的 3' 末端去磷酸化并连接 3' 接头。再次纯化 RNA 复合物, 然后用蛋白酶 K 消化结合的抗 m6A 抗体。将游离 RNA 链逆转录, 将所得的 cDNA 链环化、重新线性化、PCR 扩增并测序。通过分析 cDNA 的截短形式和 RNA 上残留肽基上的胞嘧啶 - 胸腺嘧啶置换模式, 准确识别 m6A 残基。



miCLIP-m6A 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">以单核苷酸分辨率水平在转录组范围确定 m⁶A 的位点信息鉴定小 RNA 中的 m6A除了 m⁶A, 还能鉴定 m6Am不需要像 PAR-CLIP 那样用 4-SU 预处理细胞	<ul style="list-style-type: none">依赖于用于产生 C 到 T 置换模式的抗体的一致性cDNA 文库制备使用放射性标记

综述

Maity A. and Das B. N6-methyladenosine modification in mRNA: machinery, function and implications for health and diseases. *FEBS J.* 2016;283:1607-1630

参考文献

Meyer K. D., Patil D. P., Zhou J., et al. 5' UTR m(6)A Promotes Cap-Independent Translation. *Cell.* 2015;163:999-1010

对转录本以依赖帽的方式翻译为蛋白的机制所知甚少。此研究发现, 5'UTR 中有 m6A 的 mRNA 可以以不依赖帽的方式翻译。作者使用 miCLIP-m6A 在单核苷酸分辨率水平上观察了热激对 m6A 分布的影响。他们发现, 可以通过抑制选择区域中的腺苷的甲基化来降低具有 5'UTR m6A 的 mRNA 的翻译。此外研究结果还展示了, Hsp70 mRNA 在热激后其 m6A 的丰度增加了。此研究的结果表明, 在胁迫条件下, 5'UTR 的 m6A 修饰可绕过 5' 加帽过程, 加速翻译。

Illumina 的技术: HiSeq 2500 系统

相关试剂盒

- TruSeq Ribo Profile Kit
- Ribo-Zero Gold rRNA Removal Kits
- TruSeq RNA Library Prep Kit v2
- TruSeq Small RNA Library Prep Kit
- TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Kit
- TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit
- TruSeq Targeted RNA Expression Library Prep Kit

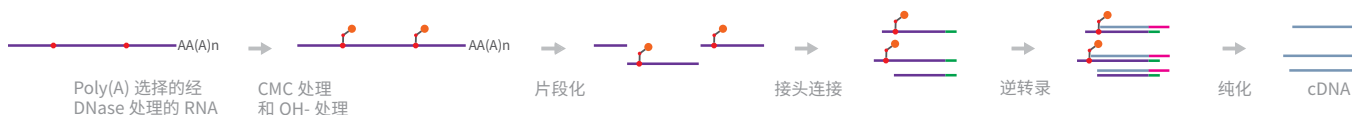
138. Linder B., Grozhik A. V., Olarerin-George A. O., Meydan C., Mason C. E. and Jaffrey S. R. Single-nucleotide-resolution mapping of m6A and m6Am throughout the transcriptome. *Nat Methods.* 2015;

PSI-Seq: 假尿苷位点识别测序

PSI-Seq 使用高通量测序鉴定含有假尿苷位点的 RNA 序列。¹³⁹ PSI-Seq 利用 *N*-环己基-*N'*-(2-吗啉乙基) 碳二亚胺 (CMC) 选择性修饰假尿苷, 从而有效终止逆转录。用 ARTseq 方法制备 cDNA 文库。

简言之, 将样本进行 Poly(A) 选择, 用 DNA 酶处理并片段化。加入 CMC 以修饰已有的假尿苷, 并在 RNA 的 3' 末端添加连接接头。接下来, 将 RNA 片段逆转录为 cDNA; 但是, 在遇到 CMC 修饰的假尿苷时, 逆转录停止。分离 20-80 nt 的 cDNA 链, 用 Ribo-Seq/ARTseq 方法制备 cDNA 文库, 然后进行高通量测序。

类似方法: Pseudo-seq、 Ψ -Seq、CeU-Seq



PSI-seq 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">• 识别 ncRNA 中的假尿苷化位点• 单碱基分辨率• 使用回归分析比较处理文库和对照文库中特定位置的 read¹⁴⁰	<ul style="list-style-type: none">• 尚未报道

综述

Zaringhalam M. and Papavasiliou F. N. Pseudouridylation meets next-generation sequencing. *Methods*. 2016;107:63-72

参考文献

Lovejoy A. F., Riordan D. P. and Brown P. O. Transcriptome-Wide Mapping of Pseudouridines: Pseudouridine Synthases Modify Specific mRNAs in *S. cerevisiae*. *PLoS One*. 2014;9:e110799

作者开发了 PSI-Seq, 以确定整个转录组中细胞内 RNA 假尿苷化的位点信息。他们通过检测酵母 18S 和 25S 核糖体 RNA 中的全部 43 个已知假尿苷位点, 验证了此技术的效力。通过遗传删除选择假尿苷合成酶 (Pus1), 他们发现 Pus1 对于 RPL11a mRNA 的假尿苷化是必要和充分的。此外还研究了 Pus4 与 TEF1 mRNA 相互作用, Pus6 参与 KAR2 mRNA 的假尿苷化。作者还发现, 在酵母各家系的进化过程中, 某些假尿苷化位点是保守的。

Illumina 的技术: Genome Analyzer II 系统

相关试剂盒

TruSeq Ribo Profile Kit

139. Lovejoy A. F., Riordan D. P. and Brown P. O. Transcriptome-Wide Mapping of Pseudouridines: Pseudouridine Synthases Modify Specific mRNAs in *S. cerevisiae*. *PLoS One*. 2014;9:e110799

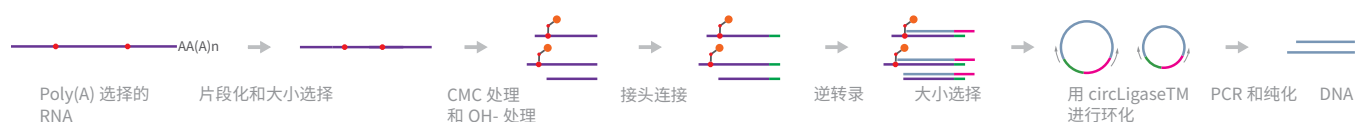
140. Zaringhalam M. and Papavasiliou F. N. Pseudouridylation meets next-generation sequencing. *Methods*. 2016;107:63-72

Pseudo-Seq: 基因组范围内假尿苷化位点的识别方法

Pseudo-Seq 利用高通量测序在单核苷酸分辨率水平上检测 ncRNA 中的假尿苷化位点。¹⁴¹ Pseudo-Seq 与 PSI-seq 极为类似，两种方法都使用 CMC 选择性修饰假尿苷并停止逆转录。但是，Pseudo-Seq 环化 cDNA 链，然后进行 PCR 扩增和纯化，而不是使用 ARTseq。

简言之，将 Poly(A) 选择的 RNA 片段化并用 CMC 处理。用 CIP 和 PNK 将 RNA 去磷酸化并进行片段大小的选择。接下来，将 3' 接头连接到 RNA 链并开始逆转录。将由 CMC 修饰的假尿苷得到的截短的 cDNA 纯化、环化并 PCR 扩增。纯化的 cDNA 文库用 NGS 方法进行测序。

类似方法：PSI-seq、Ψ-Seq、CeU-Seq



Pseudo-seq 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">• 识别 ncRNA 中的假尿苷化位点• 有单核苷酸分辨率• 通过计算初始定位位点上的 read 与覆盖该位点总 read 数的比例来获取峰值。¹⁴²	<ul style="list-style-type: none">• 环化步骤可能引入额外偏向性• 学术界尚未广泛采用

综述

Zaringhalam M. and Papavasiliou F. N. Pseudouridylation meets next-generation sequencing. *Methods*. 2016;107:63-72

参考文献

Carlile T. M., Rojas-Duran M. F., Zinshteyn B., Shin H., Bartoli K. M., et al. Pseudouridine profiling reveals regulated mRNA pseudouridylation in yeast and human cells. *Nature*. 2014;

作者开发了 Pseudo-Seq 方法来研究酵母和人转录组中的假尿苷化。他们在 ncRNA 和 mRNA 中鉴定了现有的修饰位点并发现了新的位点。他们将新位点归因于 7 个保守的假尿苷合成酶 Pus1-4、6、7 和 9。mRNA 中检测到的大部分假尿苷参与了跟环境信号（例如营养不足）响应上相关的基因调控。

Illumina 的技术：HiSeq 2000 系统

相关试剂盒

TruSeq Small RNA Library Prep Kit

141. Carlile T. M., Rojas-Duran M. F., Zinshteyn B., Shin H., Bartoli K. M. and Gilbert W. V. Pseudouridine profiling reveals regulated mRNA pseudouridylation in yeast and human cells. *Nature*. 2014;

142. Zaringhalam M. and Papavasiliou F. N. (2016) Pseudouridylation meets next-generation sequencing. *Methods* 107: 63-72

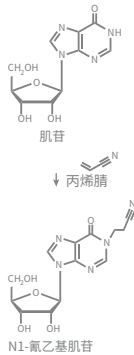
ICE：肌苷的化学清除法

ICE¹⁴³⁻¹⁴⁵ 之后进行 NGS，研究腺苷如何被编辑成次黄苷。

在此方法中，用丙烯腈处理 RNA，而对照 RNA 未处理。将对照和处理过的 RNA 进行逆转录并 PCR 扩增。用丙烯腈处理的 RNA 中的次黄苷不能被逆转录。对照和处理过的 RNA 制备而得的 cDNA 进行深度测序，提供了高分辨率 RNA 片段中含次黄苷的 read。



ICE 示意图。



ICE 过程中的 RNA 修饰。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none"> 可提供腺苷被编辑为次黄苷的位点信息 可以用较少的材料完成 	<ul style="list-style-type: none"> 非线性 PCR 扩增会导致出现影响实验重复性的偏向性 由聚合酶导致的扩增错误将被错误地被保留并被测序

综述

Ramaswami G. and Li J. B. Identification of human RNA editing sites: A historical perspective. *Methods*. 2016;107:42-47

Frye M., Jaffrey S. R., Pan T., Rechavi G. and Suzuki T. RNA modifications: what have we learned and where are we headed? *Nat Rev Genet*. 2016;17:365-372

参考文献

Ishida K., Miyauchi K., Kimura Y., et al. Regulation of gene expression via retrotransposon insertions and the noncoding RNA 4.5S RNA. *Genes Cells*. 2015; 作者利用 HeLa 细胞研究了短间隔元件 (SINE) 在基因表达调控方面的功能。他们发现一个有丰富的核 ncRNA MyoDonta 分枝特异性的 4.5S RNAH (4.5SH)，其与逆转座子 SINE B1 同源，调控包含 SINE B1 的反义插入报告基因表达上起着至关重要的作用。他们使用了 ICE-Seq 实验方案中说明的氰乙基化作用，研究了去除内源 4.5SH 后的核保留情况。此外，他们还发现在敲落胞质中的 4.5SH 后细胞生长变缓。

Illumina 的技术：MiSeq 系统、Nextera XT DNA Library Prep Kit

相关试剂盒

TruSeq RNA Library Prep Kit v2

TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Kit

TruSeq Small RNA Library Prep Kit

TruSeq Targeted RNA Expression Library Prep Kit

TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit

143. Sakurai M., Yano T., Kawabata H., Ueda H. and Suzuki T. Inosine cyanoethylation identifies A-to-I RNA editing sites in the human transcriptome. *Nat Chem Biol*. 2010;6:733-740

144. Sakurai M., Ueda H., Yano T., et al. A biochemical landscape of A-to-I RNA editing in the human brain transcriptome. *Genome Res*. 2014;24:522-534

145. Suzuki T., Ueda H., Okada S. and Sakurai M. Transcriptome-wide identification of adenosine-to-inosine editing using the ICE-seq method. *Nat Protoc*. 2015;10:715-732

RNA 结构

IRNA 具有形成促进或抑制 RNA-蛋白质或蛋白质-蛋白质相互作用的二级结构的能力。^{146,147} 最多变的二级和三级结构存在于 tRNA 中, 被认为在调控蛋白翻译过程中起着主要作用。RNA 结构首先是在嗜热四膜虫 (*Tetrahymena thermophila*) 中用 X 射线晶体学研究的, 但这些传统研究方法繁琐且受限。¹⁴⁸ 测序不仅能提供二级结构方面的信息, 还能在大量的样本中去确定点突变对 RNA 结构的影响。最近的研究表明, 测序是鉴定 RNA 结构及确定其重要性的强大工具。



草履虫是最早用于研究 RNA 结构的模式生物之一。

综述

Fang Y. and Fullwood M. J. Roles, Functions, and Mechanisms of Long Non-coding RNAs in Cancer. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2016;14:42-54

Nussbacher J. K., Batra R., Lagier-Tourenne C. and Yeo G. W. RNA-binding proteins in neurodegeneration: Seq and you shall receive. *Trends Neurosci*. 2015;38:226-236

Ma X., Tang Z., Qin J. and Meng Y. The use of high-throughput sequencing methods for plant microRNA research. *RNA Biology*. 2015;12:709-719

Reuter J. A., Spacek D. V. and Snyder M. P. High-Throughput Sequencing Technologies. *Mol Cell*. 2015;58:586-597

146. Osborne R. J. and Thornton C. A. RNA-dominant diseases. *Hum Mol Genet*. 2006;15 Spec No 2:R162-169

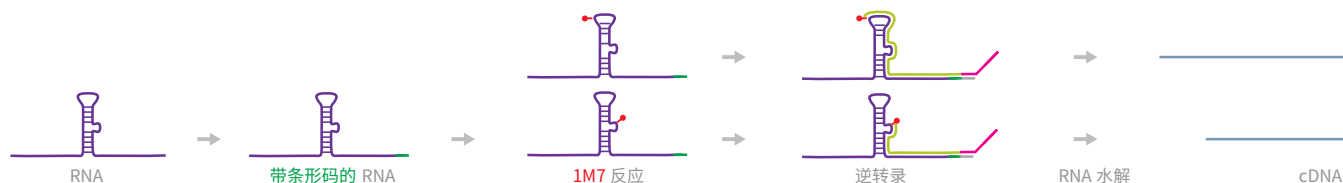
147. Thapar R., Denmon A. P. and Nikonowicz E. P. Recognition modes of RNA tetraloops and tetraloop-like motifs by RNA-binding proteins. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2014;5:49-67

148. Rich A. and RajBhandary U. L. Transfer RNA: molecular structure, sequence, and properties. *Annu Rev Biochem*. 1976;45:805-860

SHAPE-Seq: 通过引物延伸测序进行选择性 2' 羟基乙酰化分析

SHAPE-Seq^{149,150} 提供了 RNA 的结构信息。

在此方法中, 首先向 RNA 的 3' 末端加入独特的标签序列, 然后让 RNA 在体外预先创造的合适条件下进行折叠。用 SHAPE 试剂 1-甲基-7-硝基靛红酸酐 (1M7) 处理带标签序列的折叠后的 RNA, 阻断其进行逆转录。将 RNA 逆转录成 cDNA。对这些 cDNA 进行深度测序, 提供了被 1M7 占据位点的单核苷酸序列信息。然后可以推导出 RNA 的结构信息。



SHAPE-Seq 示意图。



1M7 的结构。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">• 提供 RNA 结构信息• 带标签序列的 RNA 可进行多重分析提供多个 RNA 的信息• 可以评估点突变对 RNA 结构的影响• 代替质谱、核磁共振 (NMR) 和晶体学	<ul style="list-style-type: none">• 需要阳性和阴性对照以排除转录酶脱落所造成的影响• 需要预先确定的 RNA 折叠条件• 体外折叠可能不能很好地反映体内实际的折叠情况

综述

Fang Y. and Fullwood M. J. Roles, Functions, and Mechanisms of Long Non-coding RNAs in Cancer. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2016;14:42-54

参考文献

Taliaferro J. M., Lambert N. J., Sudmant P. H., Dominguez D., Merkin J. J., et al. RNA Sequence Context Effects Measured *In Vitro* Predict *In Vivo* Protein Binding and Regulation. *Mol Cell*. 2016;64:294-306

作者研究了决定 RBP 及其 RNA 序列基序的相互作用中结合的和未结合的基序之间差异的背景特性。他们使用了 12,000 条小鼠 RNA 序列以及 MBNL1 和 RBFOX2 这两个 RBP。利用 SHAPE-Seq, 他们鉴定了 588 个寡核苷酸的结构特征。结果表明, 体外基序与体内结合呈显著相关关系。RNA 二级结构也在这些相互作用中起着首要作用。作者在天然存在的内含子 RNA 序列中, 使用 RBNS 鉴定了不同转录本相同基序的结合情况。

Illumina 的技术: HiSeq 系统

Watters K. E., Abbott T. R. and Lucks J. B. Simultaneous characterization of cellular RNA structure and function with in-cell SHAPE-Seq. *Nucleic Acids Res*. 2015;

相关试剂盒

TruSeq Small RNA Library Prep Kit

149. Lucks J. B., Mortimer S. A., Trapnell C., et al. Multiplexed RNA structure characterization with selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension sequencing (SHAPE-Seq). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108:11063-11068

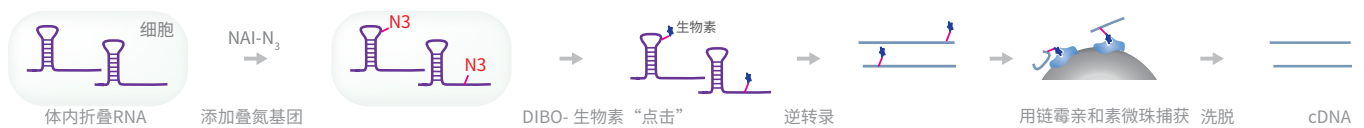
150. Watters K. E., Yu A. M., Strobel E. J., Settle A. H. and Lucks J. B. Characterizing RNA structures *in vitro* and *in vivo* with selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension sequencing (SHAPE-Seq). *Methods*. 2016;

icSHAPE: 体内 Click 选择性 2' 羟基乙酰化及分析实验

icSHAPE 通过 SHAPE-Seq 和 click 化学两种方法的结合使用获得了更彻底的分离效果, 更为准确地预测了 RNA- 蛋白质之间的相互作用和体内存在的 m⁶A 修饰。^{151,152} RNA 的二级结构通过加入定制的 2- 甲基烟酰胺 (NAI) 探针 (称为 NAI-N₃) 进行修饰。修饰后的 RNA 用无铜 click 化学选择性标记法标记上二苯并环辛炔 (DIBO) - 生物素, 从而可以使用链霉亲和素进行结合纯化。

简言之, 在体内, 给 RNA 加上 NAI-N₃ 探针, 以便可以通过 DIBO-生物素标记选择性地标记 RNA。细胞经过裂解, 用 Poly(A) 选择 RNA, 用 DIBO-生物素标记并进行片段化。用 T4 PNK 对 RNA 链进行 3' 末端修复并连接 3' 接头。在选择合适的片段后, 将 RNA 链逆转录, 并用链霉亲和素微珠捕获 RNA 和第一链 cDNA。再对 cDNA 的片段大小进行选择, 然后进行环化和 PCR 扩增。这样样本就可以进行 NGS。

类似方法: SHAPE-Seq



icSHAPE 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">可准确预测 RNA- 蛋白质相互作用和体内存在的 m⁶A 修饰经过轻微改动, 可用于体外研究应用。化学修饰可用于所有核苷酸, 不像 DMS 只修饰腺嘌呤和胞嘧啶	<ul style="list-style-type: none">环化可能引入额外的偏向性

综述

No reviews yet

参考文献

Flynn R. A., Do B. T., Rubin A. J., et al. 7SK-BAF axis controls pervasive transcription at enhancers. *Nat Struct Mol Biol.* 2016;

研究分析了 RNA, 特别是 7SK snRNA 在增强子区所有的功能。作者发现, 7SK snRNA 通过调控核小体的位置抑制增强子转录。他们对 Hexim1 或 BAF 结合的 7SK snRNA 进行 icSHAPE, 发现 7SK 与 BAF 染色质重构体复合物之间有着直接的相互作用。它将 BAF 招募到增强子, 通过调控染色质结构来抑制增强子转录。除了 icSHAPE, 作者还结合使用了与起始位点相关的 RNA 测序方法 (Start-Seq)、GRO-seq、ChIRP-seq、ATAC-Seq 和 ChIP-Seq。

illumina 的技术: HiSeq 2500 系统、NextSeq 500 系统、NEBNext DNA Library Prep Master Mix Set for Illumina

Lu Z., Zhang Q. C., Lee B., Flynn R. A., Smith M. A., et al. RNA Duplex Map in Living Cells Reveals Higher-Order Transcriptome Structure. *Cell.* 2016;165:1267-1279

相关试剂盒

TruSeq Small RNA Library Prep Kit

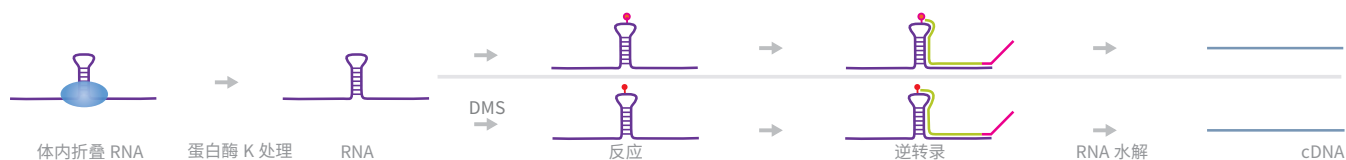
151. Spitale R. C., Flynn R. A., Zhang Q. C., et al. Structural imprints *in vivo* decode RNA regulatory mechanisms. *Nature.* 2015;519:486-490

152. Flynn R. A., Zhang Q. C., Spitale R. C., Lee B., Mumbach M. R. and Chang H. Y. Transcriptome-wide interrogation of RNA secondary structure in living cells with icSHAPE. *Nat Protoc.* 2016;11:273-290

CIRS-Seq: RNA 结构的化学干扰

开发了 CIRS-Seq 用于研究哺乳动物转录组中二级 RNA 结构的复杂性。¹⁵³ 在 CIRS-Seq 中, 使用了 DMS 对腺嘌呤残基的 N1 和胞嘧啶残基的 N3 进行了甲基化处理, 使用 CMC 选择性修饰假尿苷, 但这种处理只能在其在单链结构时进行。对这些核苷酸残基的修饰阻断了逆转录的过程, 有效地产生了截短的 cDNA, 作为二级 RNA 结构位置的标志。

简言之, 将细胞裂解并用蛋白酶 K 处理以解离蛋白结合的 RNA, 与此同时仍维持 RNA 完整的二级结构。将裂解物分为 3 个不同的处理组——DMS 处理组、CMC 处理组和无处理组。在所有 3 个处理组中, 提取总 RNA 并用随机引物进行逆转录。分离所得的 cDNA, 连接上测序接头并进行高通量测序。通过 DMS 和 CMC 处理的 read 用于鉴定二级 RNA 结构, 而无处理组用于降低背景噪音。



CIRS-seq 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">• 准确预测 RNA 的二级结构, 揭示 mRNA 和 ncRNA 的结构特性• 有单碱基分辨率• 可鉴定 RBP 的结构要求	<ul style="list-style-type: none">• CMC 和 DMS 可能也会作用于没有二级结构的 RNA

综述

Zucchelli S., Patrucco L., Persichetti F., Gustincich S. and Cotella D. Engineering Translation in Mammalian Cell Factories to Increase Protein Yield: The Unexpected Use of Long Non-Coding SINEUP RNAs. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. 2016;

Kwok C. K., Tang Y., Assmann S. M. and Bevilacqua P. C. The RNA structurome: transcriptome-wide structure probing with next-generation sequencing. *Trends Biochem Sci*. 2015;40:221-232

Strobel E. J., Watters K. E., Loughrey D. and Lucks J. B. RNA systems biology: uniting functional discoveries and structural tools to understand global roles of RNAs. *Curr Opin Biotechnol*. 2016;39:182-191

参考文献

Incarnato D., Anselmi F., Morandi E., et al. High-throughput single-base resolution mapping of RNA 2'-O-methylated residues. *Nucleic Acids Res*. 2016;

作者开发了鉴定核糖 2'-O-甲基化 (2'-OMe) 的新方法, 2'-OMe 是最常见的转录后 RNA 修饰方式之一。2'-OMe 测序使用了在文库制备步骤上有所优化的 CIRS-Seq 方法。他们在 18S 和 28S rRNA 中发现了 12 个新的 2'-OMe 位点, 其中的 11 个在人和小鼠细胞中保守。

illumina 的技术: NextSeq 500 系统、TruSeq Small RNA Library Preparation Kit

相关试剂盒

TruSeq Small RNA Library Prep Kit

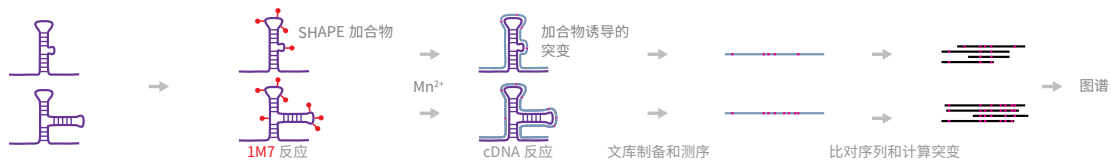
153. Incarnato D., Neri F., Anselmi F. and Oliviero S. Genome-wide profiling of mouse RNA secondary structures reveals key features of the mammalian transcriptome. *Genome Biology*. 2014;15:491

SHAPE-MaP: 通过引物延伸和突变测序进行选择性的 2' 羟基乙酰化分析

SHAPE-MaP 以大规模平行测序在各种水平上确定 RNA 的二级结构。此方法可根据需要进行更改,使其于 RNA 混合物中,针对小 RNA、扩增子或罕见 RNA 进行研究。^{154,155} 如名称所暗示, SHAPE-Map 利用 SHAPE-Seq 1M7 反应标记 RNA 的核糖 2'-OH 基团,来识别 RNA 的二级结构。在此反应之后,形成突变图谱 (MaP), 将非互补核苷酸突变在逆转录期间,加到 SHAPE 结合物上。在测序后,用专门为此开发的强大信息学工具分析所引入的 MaP 突变。

简言之,向含折叠的 RNA 样本中加入 SHAPE 亲电子试剂。将样本分为 3 个不同的反应组: + 试剂组、- 试剂组以及用于修正逆转录中的本身有的背景突变率的变性过的对照组。在引入 SHAPE 突变后,根据目标 RNA 类型 (扩增子、小 RNA 或特异性 RNA 分析) 选择用于逆转录的引物。向反应液里加入引物并逆转录 RNA。根据所要研究的目标 RNA 选择后续相应的文库制备步骤。其中,小 RNA 的文库制备流程涉及用适当的引物进行标准的 PCR 扩增。扩增子和特异性 RNA 的文库制备流程遵循 Nextera XT DNA Library Preparation Kit 实验方案。这些带标签序列的样本可用于测序。

类似方法: SHAPE-Seq、icSHAPE



SHAPE-MaP 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">使用 SHAPE-Seq 和 MaP 技术的组合,以单核苷酸分辨率识别 RNA 结构文库制备步骤可针对不同应用进行改变: 扩增子、小 RNA 或罕见 RNA 分析避免了采用接头连接的方法经常遇到的问题	<ul style="list-style-type: none">随机和原始的操作流程中, RNA 链的长度需要至少约 150 nt, 小 RNA 的操作流程中, RNA 链的长度需要至少约 40 nt对于低表达水平的 RNA, 难以区分 MaP 突变和背景噪音

综述

Schmitz S. U., Grote P. and Herrmann B. G. Mechanisms of long noncoding RNA function in development and disease. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2016;73:2491-2509

Kwok C. K. Dawn of the *in vivo* RNA structurome and interactome. *Biochemical Society Transactions*. 2016;44:1395-1410

Smola M. J., Calabrese J. M. and Weeks K. M. Detection of RNA-Protein Interactions in Living Cells with SHAPE. *Biochemistry*. 2015;54:6867-6875

154. Siegfried N. A., Busan S., Rice G. M., Nelson J. A. and Weeks K. M. RNA motif discovery by SHAPE and mutational profiling (SHAPE-MaP). *Nat Methods*. 2014;11:959-965

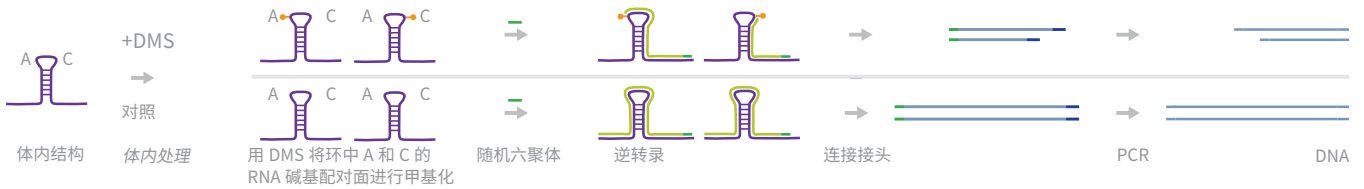
155. Smola M. J., Rice G. M., Busan S., Siegfried N. A. and Weeks K. M. Selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension and mutational profiling (SHAPE-MaP) for direct, versatile and accurate RNA structure analysis. *Nature Protocols*. 2015;10:1643-1669

Structure-Seq/DMS-Seq: 对未保护的腺嘌呤和胞嘧啶进行硫酸二甲酯甲基化

Structure-Seq 可在体内或体外应用，以单核苷酸分辨率来分析 RNA 结构。^{156,157} 此方法通过使用 DMS 诱导的对未配对腺嘌呤和胞嘧啶所添加的化学修饰来鉴定二级 RNA 结构。

简言之，用 DMS 处理样本以在体内标记 RNA 的二级结构。提取 RNA，进行 Poly(A) 选择，并用 DNA 酶处理。使用随机六聚体引物进行逆转录。将所得的单链 DNA 连接上单链 DNA 接头，并用 CircLigase 酶进行自环化。接下来，将 DNA 进行 PCR 扩增、片段大小选择和测序。

类似方法：icSHAPE、Mod-Seq、DMS-seq、PARS、Frag-seq、dsRNA-Seq



Structure-seq 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none"> • 提供单核苷酸分辨率的基因组范围的 RNA 结构分析。 • 可用于体内和体外应用 • DMS 可透过细胞，可用于体内应用 • 合成一种逆转录引物就可获得成千上万的 RNA 结构方面的信息 • 随机六聚体引物可减少 3' 末端偏向性 	<ul style="list-style-type: none"> • RBP 会阻断体内 DMS 修饰 • 环化可能引入额外偏向性

综述

Fang Y. and Fullwood M. J. Roles, Functions, and Mechanisms of Long Non-coding RNAs in Cancer. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2016;14:42-54

Reuter J. A., Spacek D. V. and Snyder M. P. High-Throughput Sequencing Technologies. *Mol Cell*. 2015;58:586-597

参考文献

Fang R., Moss W. N., Rutenberg-Schoenberg M. and Simon M. D. Probing Xist RNA Structure in Cells Using Targeted Structure-Seq. *PLoS Genet*. 2015;11:e1005668

作者开发了改进版本的 Structure-seq，称为 Targeted Structure-Seq，用于研究 lncRNA Xist 的功能。他们坚定了 C 重复区域附近的新元件，对 Xist 的功能研究极为重要。Targeted Structure-Seq 能实现测极少的 read，而获得靶 RNA 区域的高覆盖。

illumina 的技术：HiSeq 2500 系统、TruSeq RNA Library Prep Kit

相关试剂盒

TruSeq RNA Library Prep Kit

156. Ding Y., Tang Y., Kwok C. K., Zhang Y., Bevilacqua P. C. and Assmann S. M. *In vivo* genome-wide profiling of RNA secondary structure reveals novel regulatory features. *Nature*. 2014;505:696-700

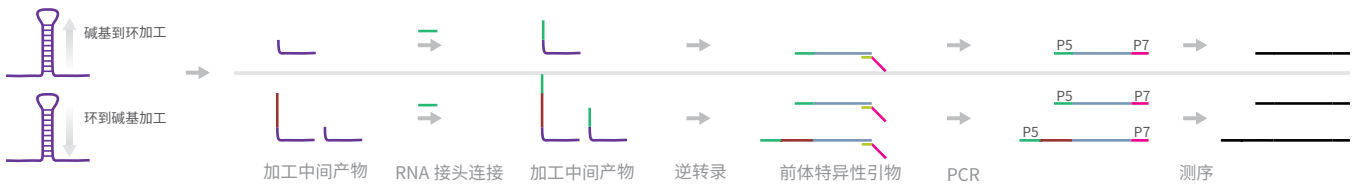
157. Ding Y., Kwok C. K., Tang Y., Bevilacqua P. C. and Assmann S. M. Genome-wide profiling of *in vivo* RNA structure at single-nucleotide resolution using structure-seq. *Nat Protoc*. 2015;10:1050-1066

SPARE: 5'RNA 末端的特异性平行扩增

SPARE 鉴定植物基因组范围的 miRNA 加工的中间产物。¹⁵⁸ SPARE 通过分析所产生的 cDNA 序列来推断 miRNA 加工的方向（基部到环或环到基部）。如果只检测到第一切割位点，miRNA 是以从基部到环的方式加工的；但是，如果检测到所有切割中间产物，它是以从环到基部的方式加工的。

简言之，总 RNA 通过 rRNA 的去除，然后在未加帽的 RNA 5' 末端连接上 RNA 接头。连接后的 RNA 用作逆转录的模板，使用带通用接头尾的 miRNA 前体特异性引物作为逆转录的引物。将所得的 cDNA 进行 PCR 扩增、片段大小选择和测序。

类似方法：PARE、5'RACE



SPARE 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">• 允许基因组范围鉴定 miRNA 中间产物• 可以通过序列分析推测加工方向• 比已有方法耗时更少• 为植物基因组优化	<ul style="list-style-type: none">• 学术界尚未广泛采用

综述

Ma X., Tang Z., Qin J. and Meng Y. The use of high-throughput sequencing methods for plant microRNA research. *RNA Biology*. 2015;12:709-719

参考文献

Schmidt S. A., Foley P. L., Jeong D. H., et al. Identification of SMG6 cleavage sites and a preferred RNA cleavage motif by global analysis of endogenous NMD targets in human cells. *Nucleic Acids Res*. 2015;43:309-323

此研究专注于鉴定内切核酸酶 SMG6 的切割位点，这个切割位点通常是后生动物中无义介导 mRNA 降解（NMD）的第一个靶点。作者使用 SPARE 鉴定了依赖于 SMG6 和通用 NMD 因子 UPF1 的 5' 末端降解的中间产物。对于多种 SMG6 底物，去除 SMG6 会增加脱帽转录本的积累。

Illumina 的技术：HiSeq 系统、TruSeq RNA Library Prep Kit

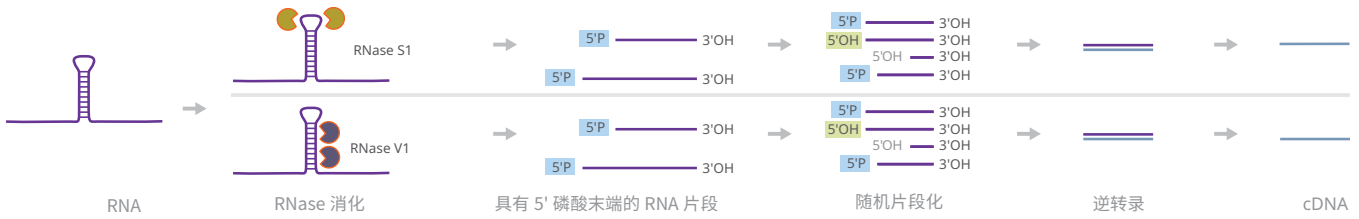
相关试剂盒

TruSeq Small RNA Library Prep Kit

158. Schapire A. L., Bologna N. G., Moro B., Zhai J., Meyers B. C. and Palatnik J. F. Construction of Specific Parallel Amplification of RNA Ends (SPARE) libraries for the systematic identification of plant microRNA processing intermediates. *Methods*. 2013;64:283-291

PARS-Seq: RNA 结构的平行分析

PARS-Seq¹⁵⁹ 定位分析可提供关于 RNA 的二级和三级结构的信息。在此方法中，分别用特异作用于双链和单链 RNA 的 RNase 消化 RNA。将所得的片段逆转录成 cDNA。对 cDNA 的深度测序提供这些 RNA 的高分辨率序列。可通过比较各种 RNase 的消化模式推断 RNA 结构。



PARS-Seq 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none"> • 提供 RNA 结构信息 • 区分配对和未配对碱基 • 代替质谱、NMR 和晶体学 	<ul style="list-style-type: none"> • 酶消化可能不特异 • 消化条件必须严格控制 • RNA 可能过度消化 • 限于体外应用

综述

Nussbacher J. K., Batra R., Lagier-Tourenne C. and Yeo G. W. RNA-binding proteins in neurodegeneration: Seq and you shall receive. *Trends Neurosci.* 2015;38:226-236

参考文献

Righetti F., Nuss A. M., Twittenhoff C., et al. Temperature-responsive *in vitro* RNA structurome of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113:7237-7242

作者利用 PARS-Seq 确定了一个温度梯度范围内，假结核耶尔森菌 (*Yersinia pseudotuberculosis*) 中单链和双链 RNA 存在的区域。他们发现了 3 个温度下，有超过 1750 个 RNA 的结构，还发现平均而言，核糖体结合位点附近的 mRNA 趋向于无折叠结构。PARS-Seq 结果还显示 5'UTR 在低温下折叠，并鉴定了多个基因类型中的新的热响应 RNA 结构。

Illumina 的技术: HiSeq 2500 系统、TruSeq RNA Library Prep Kit

相关试剂盒

TruSeq Small RNA Library Prep Kit

TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit

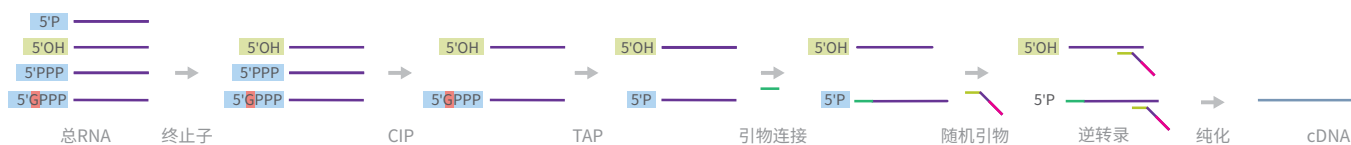
TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Kit

159. Wan Y., Qu K., Ouyang Z. and Chang H. Y. Genome-wide mapping of RNA structure using nuclease digestion and high-throughput sequencing. *Nat Protoc.* 2013;8:849-869

Cap-Seq: CXXC 亲和纯化结合深度测序

CAP-seq¹⁶⁰ 方法可确定锚定于 RNAPII 的 RNA 的 5' 末端的位置信息。

在此方法中，依次用 Terminator 外切核酸酶、CIP 和 TAP 处理 RNA 转录本，然后连接上接头，并逆转录为 cDNA。对这些 cDNA 的深度测序可提供高分辨率的 RNAPII 转录本的序列结果。



CAP-seq 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">• 定位锚定于 RNAPII 的 RNA	<ul style="list-style-type: none">• 经过多个步骤和不同的处理可能导致材料的损失

综述

No reviews yet

参考文献

Illingworth R. S., Gruenewald-Schneider U., Webb S., Kerr A. R., James K. D., et al. (2010) Orphan CpG islands identify numerous conserved promoters in the mammalian genome. *PLoS Genet* 6: e1001134

作者开发了 CAP-Seq 以研究人和小鼠细胞中的 CpG 岛 (CGI) 所起的功能。结果显示，两个物种中 CGI 的丰度十分接近。他们还发现，CpG 岛的密度与 H3K4 三甲基化呈正相关。

Illumina 的技术：Genome Analyzer 系统

相关试剂盒

TruSeq RNA Library Prep Kit v2

TruSeq Small RNA Library Prep Kit

TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit

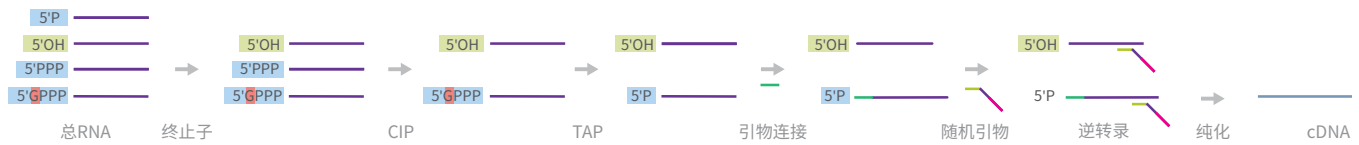
TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Kit

160. Illingworth R. S., Gruenewald-Schneider U., Webb S., et al. Orphan CpG islands identify numerous conserved promoters in the mammalian genome. *PLoS Genet*. 2010;6:e1001134

CIP-TAP：碱性磷酸酶、小牛肠一烟草酸焦磷酸酶测序

CIP-TAP 定位带有帽子的小 RNA。¹⁶¹

在此方法中，用 CIP 处理 RNA，然后在 3' 末端上连接上接头。接下来，用 TAP 处理 RNA，然后在 5' 末端上连接上接头。将片段逆转录成 cDNA，通过 PCR 扩增并测序。深度测序所得的 read 可在单核苷酸水平上分辨带帽小 RNA。



CIP-TAP 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">• 鉴定 CapSeq 方法无法检测到的带帽小 RNA• 高通量	<ul style="list-style-type: none">• 非线性 PCR 扩增会导致出现影响实验重复性的偏向性• 聚合酶造成的扩增错误

参考文献

Gu W., Lee H. C., Chaves D., Youngman E. M., Pazour G. J., et al. CapSeq and CIP-TAP identify Pol II start sites and reveal capped small RNAs as *C. elegans* piRNA precursors. *Cell*. 2012;151:1488-1500

作者使用 CIP-TAP 结合 CapSeq 鉴定了 piRNA 的 TSS。CapSeq 虽然不能鉴定大部分已知 piRNA 位点。但是，结果显示 piRNA 前体很可能是长约 26 nt 的带有帽的小 RNA，起始于成熟 RNA 上游的 2 nt 处。

Illumina 的技术：Genome Analyzer 系统、HiSeq 2000 系统

相关试剂盒

TruSeq RNA Library Prep Kit v2

TruSeq Small RNA Library Prep Kit

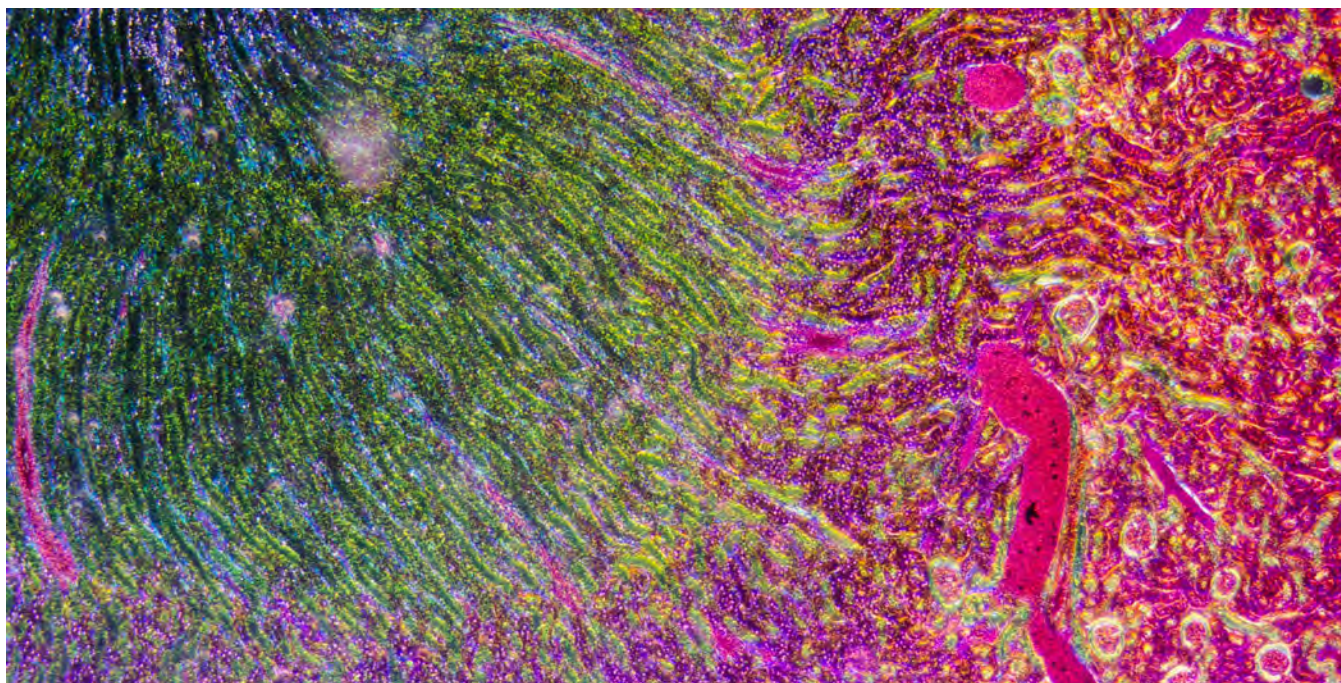
TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit

TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Kit

161. Gu W., Lee H. C., Chaves D., et al. CapSeq and CIP-TAP identify Pol II start sites and reveal capped small RNAs as *C. elegans* piRNA precursors. *Cell*. 2012;151:1488-1500

低水平 RNA 检测

低水平 RNA 检测指在游离细胞环境中检测罕见的 RNA 分子（如循环肿瘤 RNA）或单细胞中 RNA 表达谱。组织由多种不同类型的细胞构成，每种类型的细胞各具有差异巨大的一组功能。即使在单个细胞类型内，转录组也是呈现高度动态变化，反映了其在时间、空间和依赖于细胞周期的改变。细胞的收集、处理和涉及灵敏度方面的技术问题和扩增偏向性等引入了其它层次的复杂性。要解决这一多层次的复杂性，我们需要分析成千上万个细胞。使用独特标签序列可极大地增加可多标签并混合测序的样本数量，而每个样本所得的 read 没有或几乎没有减少。最近在细胞捕获和样本制备方法上的改进可更快地以更低成本来获得更多信息。¹⁶² 这些改进有望扩展我们对细胞功能最基本的理解，对于基础研究和人类健康相关研究都具有重要意义。¹⁶³



器官，例如肾的横切图中展示了其由多种形态各异的细胞组成。单细胞转录组学研究可以鉴定每个细胞类型的功能。

综述

Liu S. and Trapnell C. Single-cell transcriptome sequencing: recent advances and remaining challenges. *F1000Res*. 2016;5:

Faridani O. R. and Sandberg R. Putting cells in their place. *Nat Biotechnol*. 2015;33:490-491

Kanter I. and Kalisky T. Single cell transcriptomics: methods and applications. *Front Oncol*. 2015;5:53

Kolodziejczyk A. A., Kim J. K., Svensson V., Marioni J. C. and Teichmann S. A. The Technology and Biology of Single-Cell RNA Sequencing. *Mol Cell*. 2015;58:610-620

Trapnell C. Defining cell types and states with single-cell genomics. *Genome Res*. 2015;25:1491-1498

Wang Y. and Navin N. E. Advances and Applications of Single-Cell Sequencing Technologies. *Mol Cell*. 2015;58:598-609

162. Shapiro E., Biezuner T. and Linnarsson S. Single-cell sequencing-based technologies will revolutionize whole-organism science. *Nat Rev Genet*. 2013;14:618-630

163. Spaethling J. M. and Eberwine J. H. Single-cell transcriptomics for drug target discovery. *Curr Opin Pharmacol*. 2013;13:786-790

参考文献

Hou Y., Guo H., Cao C., et al. Single-cell triple omics sequencing reveals genetic, epigenetic, and transcriptomic heterogeneity in hepatocellular carcinomas. *Cell Res.* 2016;26:304-319

为透彻获取在单细胞水平上，基因组、转录组和 DNA 甲基化组之间的相互作用机制，理想的做法是在同一个细胞上用这 3 种独立的方法。在此研究中，作者报道了单细胞三组学测序（scTrio-Seq），此方法可同时分析单个哺乳动物细胞的基因组拷贝数变异（CNV）、DNA 甲基化组和转录组。他们使用 scTrio-Seq 方法在 25 个干细胞癌原细胞中鉴定出了 2 个细胞亚群。他们还发现，大规模的 CNV 可导致基因组中 RNA 的表达成相应比例的改变，但 CNV 的存在并不影响相关基因组区域的 DNA 甲基化。

Illumina 的技术：HiSeq 2000/2500 系统

Habib N., Li Y., Heidenreich M., Swiech L., Trombetta J. J., et al. (2016) Div-Seq: A single nucleus RNA-Seq method reveals dynamics of rare adult newborn neurons in the CNS. *bioRxiv*

Krishnaswami S. R., Grindberg R. V., Novotny M., et al. Using single nuclei for RNA-seq to capture the transcriptome of postmortem neurons. *Nat Protoc.* 2016;11:499-524

Mora-Castilla S., To C., Vaezeslami S., et al. Miniaturization Technologies for Efficient Single-Cell Library Preparation for Next-Generation Sequencing. *J Lab Autom.* 2016;21:557-567

Achim K., Pettit J. B., Saraiva L. R., et al. High-throughput spatial mapping of single-cell RNA-seq data to tissue of origin. *Nat Biotechnol.* 2015;33:503-509

Dueck H., Khaladkar M., Kim T. K., et al. Deep sequencing reveals cell-type-specific patterns of single-cell transcriptome variation. *Genome Biol.* 2015;16:122

Kim J. K., Kolodziejczyk A. A., Illicic T., Teichmann S. A. and Marioni J. C. Characterizing noise structure in single-cell RNA-seq distinguishes genuine from technical stochastic allelic expression. *Nat Commun.* 2015;6:8687Fan

Scialdone A., Natarajan K. N., Saraiva L. R., et al. Computational assignment of cell-cycle stage from single-cell transcriptome data. *Methods.* 2015;85:54-61

scRNA-Seq: 单细胞 mRNA 测序

scRNA-Seq 能对同一组织类型中不同细胞的多层次复杂性有更深入理解。优化后的 scRNA-Seq 现在被广泛应用于单细胞 RNA 测序领域的其他方法。

在此方法中，在显微镜下人工分离单个细胞并裂解。接下来，纯化 mRNA 并用 Poly(T) 引物纯化和进行逆转录。利用外切核酸酶 I 消化去除未反应的引物。在第一条 cDNA 链的 3' 末端加上 Poly(A) 尾，并退火结合 Poly(T) 引物，用于产生第二条 cDNA 链。最后，将 cDNA 进行 PCR 扩增、片段化并制备为测序文库。



scRNA-seq 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">• 单细胞分辨率的转录组分析• 可检测未知的选择性剪接连接方式	<ul style="list-style-type: none">• 非常低的通量• 未使用分子标签• 放大规模的话，可能比较昂贵

综述

Moignard V. and Gottgens B. Dissecting stem cell differentiation using single cell expression profiling. *Curr Opin Cell Biol.* 2016;43:78-86

Woodhouse S., Moignard V., Gottgens B. and Fisher J. Processing, visualising and reconstructing network models from single-cell data. *Immunol Cell Biol.* 2016;94:256-265

Wagner A., Regev A. and Yosef N. Revealing the vectors of cellular identity with single-cell genomics. *Nat Biotechnol.* 2016;34:1145-1160

Stegle O., Teichmann S. A. and Marioni J. C. Computational and analytical challenges in single-cell transcriptomics. *Nat Rev Genet.* 2015;16:133-145

Kolodziejczyk A. A., Kim J. K., Svensson V., Marioni J. C. and Teichmann S. A. The Technology and Biology of Single-Cell RNA Sequencing. *Mol Cell.* 2015;58:610-620

参考文献

Lee J. H., Daugharthy E. R., Scheiman J., et al. Fluorescent *in situ* sequencing (FISSEQ) of RNA for gene expression profiling in intact cells and tissues. *Nat Protoc.* 2015;10:442-458

单细胞 mRNA 测序 (scRNA-Seq) 可分析整个细胞转录组范围的基因表达情况，但细胞分离通常导致损失空间上的信息。原位杂交是一种非常完美的鉴定基因表达位置的方法，但它局限于研究一定数量的基因。在本研究中，作者展示了用原位研究细胞和组织中的基因表达谱的实验方案。此方法中，在共聚焦显微镜下，将 RNA 人工转化为交联的 cDNA 扩增子并测序。此方法具有富集背景特异性转录本而非看家基因 / 结构基因的优点，同时保持了组织上的结构，可用于转录本定位。

illumina 的技术: MiSeq 系统、Nextera XT DNA Sample Prep Kit

Padovan-Merhar O., Nair G. P., Biaisch A. G., et al. Single Mammalian Cells Compensate for Differences in Cellular Volume and DNA Copy Number through Independent Global Transcriptional Mechanisms. *Mol Cell.* 2015;58:339-352

单个哺乳动物细胞具有变化多端的细胞大小和体积，但它们都保有绝对相同的 DNA 量。因此，可能存在不受 DNA 浓度差异影响的，维持基因表达产物恒定浓度的补偿机制。在此研究中，作者利用单分子计数和单细胞成像分析方法证明了单个人的原代包皮成纤维细胞全局控制转录以补偿 DNA 量与细胞量在比例上的变化。他们用 NextSeq 500 系统进行了 scRNA-Seq，发现普遍表达的看家基因具有比其他基因低的表达噪音水平。

illumina 的技术: NextSeq 500 系统、Nextera XT DNA Sample Prep Kit

相关试剂盒

TruSeq RNA Library Prep Kit v2

164. Tang F., Barbacioru C., Wang Y., et al. mRNA-Seq whole-transcriptome analysis of a single cell. *Nat Methods.* 2009;6:377-382

SUPeR-Seq: 单细胞通用的不依赖于 Poly(A) 的 RNA 测序

SUPeR-Seq 方法可用于单细胞的非 Poly(A) 和 Poly(A) RNA 测序。专门设计了这个方法以用于定位环状 RNA (circRNA)。¹⁶⁵

将来自单细胞裂解所得的 RNA 样本，退火至具有通用锚定序列 (AnchorX-T15N6) 的随机引物，并逆转录产生第一条 cDNA 链。消化未反应的引物以避免引物二聚体。接下来，通过分别引入 100:1 的 dATP 和 ddATP，在 cDNA 的 3' 末端加入一个 Poly(A) 尾。将第二种具有通用锚定序列 (AnchorY-T24) 的随机引物退火至新合成的 Poly(A) 尾。通过逆转录产生第二条 cDNA 链，通过凝胶电泳纯化 cDNA。纯化的 cDNA 用 5'-氨基终止的引物进行 PCR 扩增，用 TruSeq DNA 文库制备试剂盒进行文库制备并测序。通过找到 2 个在参考基因组上距离远，但在数据结果中邻近，且其中一个 read 是序列颠倒的外显子序列，这是 RNA 环化的标志，从而识别出 circRNA。



SUPeR-seq 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">• 从单细胞中识别 circRNA• 通过使用具有锚定序列的随机引物从而避免了 3' 偏向性• 由于使用随机引物，可识别新的 circRNA	<ul style="list-style-type: none">• 依赖于数据分析来识别鉴定 circRNA

参考文献

Dang Y., Yan L., Hu B., et al. Tracing the expression of circular RNAs in human pre-implantation embryos. *Genome Biol.* 2016;17:130

本研究集中于增强对人和小鼠胚胎中新型的 Poly(A) RNA, circRNA 的理解。作者利用 SUPeR-seq 通过从头测序从 2974 个宿主基因中识别出了 10,032 个 circRNA。此外，他们比较了人和小鼠胚胎，发现人与小鼠相比，细胞中存在有更多类型的 circRNA。

Illumina 的技术: HiSeq 2500 系统、TruSeq DNA Library Prep Kit

相关试剂盒

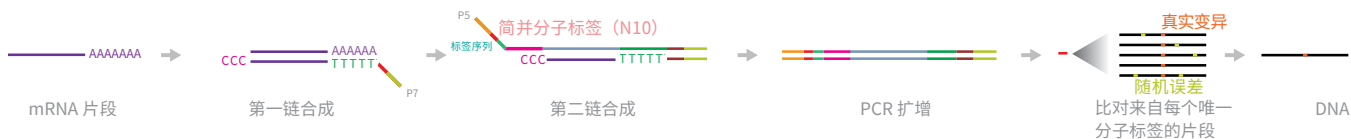
TruSeq Nano DNA Library Prep Kit

165. Fan X., Zhang X., Wu X., et al. Single-cell RNA-seq transcriptome analysis of linear and circular RNAs in mouse preimplantation embryos. *Genome Biol.* 2015;16:148

UMI: 独特分子标记

独特分子标记 (UMI) 是用于检测和定量单个独特 mRNA 转录本的分子标记。¹⁶⁶

在此方法中, 通过片段化制备 mRNA 文库并逆转录为 cDNA。将具有特异性测序接头的寡聚 (dT) 引物与 cDNA 结合。在模板的 5' 末端加上另一个具有 10 bp 随机标签和一个标签序列的测序接头, 然后进行扩增和测序。测序产生高分辨率 read, 允许准确检测真实变异。



UMI 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">• 可测序单个 mRNA 转录本• 可检测低表达的转录本• 可根据特异于每个标签序列的测序 read 来定量转录本• 可用于多个平台进行染色体核型分析	<ul style="list-style-type: none">• PCR 过程中聚合酶会优先扩增长度小于 500 bp 的靶标

参考文献

由于其高通用性, 此方法被广泛整合到多种测序技术中。

相关试剂盒

TruSeq RNA Library Prep Kit v2

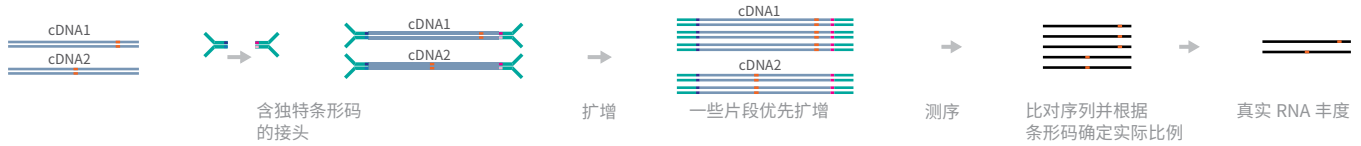
TruSeq Small RNA Library Prep Kit

TruSeq Targeted RNA Expression Library Prep Kit

166. Kivioja T., Vaharautio A., Karlsson K., et al. Counting absolute numbers of molecules using unique molecular identifiers. *Nat Methods*. 2012;9:72-74

数字 RNA 测序

数字 RNA 测序是一种 RNA-Seq 方法，通过在扩增前对 RNA 分子加标签序列以去除序列依赖性的 PCR 扩增偏向性。¹⁶⁷ 将 RNA 逆转录为 cDNA，加过量各自具有独特标签序列的接头。将加有标签序列的 cDNA 扩增并测序。比较深度测序所得的 read，使用标签序列来确定 RNA 实际表达水平情况。



数字 RNA 测序示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">• PCR 中低扩增偏向性• 可提供 RNA 表达量的信息• 检测低拷贝数的 RNA• 单拷贝分辨率	<ul style="list-style-type: none">• 某些扩增偏向性仍存在• 可能在连接中存在 RNA 没有加上标签序列的情况

参考文献

由于其高通用性，此方法广泛整合到多种测序技术中。

相关试剂盒

TruSeq RNA Library Prep Kit v2

TruSeq Small RNA Library Prep Kit

TruSeq Stranded mRNA Library Prep Kit

TruSeq Stranded Total RNA Library Prep Kit

TruSeq Targeted RNA Expression Library Prep Kit

167. Shiroguchi K., Jia T. Z., Sims P. A. and Xie X. S. Digital RNA sequencing minimizes sequence-dependent bias and amplification noise with optimized single-molecule barcodes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109:1347-1352

MARS-Seq: 大量平行 RNA 单细胞测序框架

MARS-Seq 使用自动化的大规模平行工作流程以高分辨率分析单细胞的转录本动力学特征。¹⁶⁸ MARS-Seq 可用于含多种不同细胞亚群的体内样本。

首先用 FACS 将单个细胞分离到单独的孔中。将每个细胞裂解，并将 mRNA 的 3' 末端退火结合含 T7 启动子的独特分子标记。逆转录 mRNA 产生第一条 cDNA 链，并用外切核酸酶 I 处理，去除多余的逆转录引物。接下来，混合细胞裂解物并转化为双链 cDNA。将 DNA 链转录为 RNA 并用 DNA 酶处理，除去混合物中残余的 DNA 模板。将 RNA 链片段化并退火结合测序接头，然后进行逆转录，产生带标签序列的 cDNA 文库以用于测序。

类似方法：CEL-Seq、Quartz-Seq、Drop-seq、CytoSeq、inDrop



MARS-Seq 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">• 单细胞的高通量转录分析• 数千个细胞的体内采样• 三个水平上加序列标签（分子、细胞和板水平的标记）促进了可靠的多样本测序能力• 处理 100 至 1000 个单细胞• 将所有单细胞汇集到 1 个流动槽将成本降低到每个细胞的费用少于 50 美分¹⁶⁹	<ul style="list-style-type: none">• 纯化步骤可能发生 3' 偏向性• 片段化步骤消除了链特异性信息¹⁷⁰

Reviews

Hrdlickova R., Toloue M. and Tian B. RNA-Seq methods for transcriptome analysis. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2016;

Wen L. and Tang F. Single-cell sequencing in stem cell biology. *Genome Biol*. 2016;17:71

Jaitin D. A., Keren-Shaul H., Elefant N. and Amit I. Each cell counts: Hematopoiesis and immunity research in the era of single cell genomics. *Semin Immunol*. 2015; 27:67-71

参考文献

Paul F., Arkin Y., Giladi A., et al. Transcriptional Heterogeneity and Lineage Commitment in Myeloid Progenitors. *Cell*. 2015;163:1663-1677

作者使用 MARS-Seq 研究了骨髓祖细胞的单细胞转录组谱。结果揭示了转录造成的 7 种不同结果的意外机制。他们还观察到调控被破坏时，并没有出现混合存在的状态。此研究为单细胞造血细胞研究提供了新的参考模型。

illumina 的技术：HiSeq 1500 系统、NextSeq 500 系统

Baruch K., Deczkowska A., Rosenzweig N., et al. PD-1 immune checkpoint blockade reduces pathology and improves memory in mouse models of Alzheimer's disease. *Nat Med*. 2016;22:135-137

相关试剂盒

TruSeq RNA Library Prep Kit v2

168. Jaitin D. A., Kenigsberg E., Keren-Shaul H., et al. Massively parallel single-cell RNA-seq for marker-free decomposition of tissues into cell types. *Science*. 2014;343:776-779

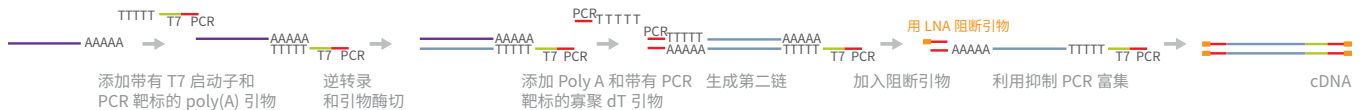
169. Jaitin D. A., Keren-Shaul H., Elefant N. and Amit I. Each cell counts: Hematopoiesis and immunity research in the era of single cell genomics. *Semin Immunol*. 2015;27:67-71

170. Hrdlickova R., Toloue M. and Tian B. RNA-Seq methods for transcriptome analysis. *Wiley Interdiscip Rev RNA*. 2016;

Quartz-Seq: 单细胞全转录本扩增

Quartz-Seq 方法优化了单细胞的全转录本扩增 (WTA)。¹⁷¹ 在此方法中, 首先在提取的 mRNA 中加入含 T7 启动子和 PCR 靶标序列的逆转录引物。逆转录合成第一条 cDNA 链, 然后用外切核酸酶 I 消化逆转录引物。接下来, 在第一条 cDNA 链的 3' 末端添加 Poly(A) 尾, 并加入含 PCR 靶标序列的 Poly(dT) 引物。在产生第二条 cDNA 链后, 加入一种阻断引物来确保 PCR 富集足够的量用于测序。深度测序能准确并以高分辨率的结果来展示单细胞的全转录组。

类似方法: CEL-Seq、Drop-seq、MARS-Seq、CytoSeq、inDrop、Hi-SCL



Quartz-Seq 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">• 单试管反应, 适于自动化• 外切核酸酶 I 酶切逆转录引物可消除副产物的扩增• 富集过程中抑制了短片段和副产物的生成	<ul style="list-style-type: none">• PCR 偏向会导致 GC 含量丰富的模板富集不足。• 由聚合酶导致的扩增错误将被错误地保留和测序• PCR 过程中, 聚合酶会优先扩增长度小于 500 bp 的靶标

Reviews

Zhang X., Marjani S. L., Hu Z., Weissman S. M., Pan X. and Wu S. Single-Cell Sequencing for Precise Cancer Research: Progress and Prospects. *Cancer Research*. 2016;

Poulin J. F., Tasic B., Hjerling-Leffler J., Trimarchi J. M. and Awatramani R. Disentangling neural cell diversity using single-cell transcriptomics. *Nat Neurosci*. 2016;19:1131-1141

Sun H. J., Chen J., Ni B., Yang X. and Wu Y. Z. Recent advances and current issues in single-cell sequencing of tumors. *Cancer Lett*. 2015;365:1-10

Grun D. and van Oudenaarden A. Design and Analysis of Single-Cell Sequencing Experiments. *Cell*. 2015;163:799-810

Navin N. E. Cancer genomics: one cell at a time. *Genome Biol*. 2014;15:452

Liang J., Cai W. and Sun Z. Single-Cell Sequencing Technologies: Current and Future. *J Genet Genomics*. 2014;41:513-528

参考文献

Takeuchi M., Yamaguchi S., Sakakibara Y., Hayashi T., Matsuda K., et al. (2016) Gene expression profiling of granule cells and Purkinje cells in the zebrafish cerebellum. *J Comp Neurol*

作者研究了转基因斑马鱼幼鱼小脑中的神经回路。他们使用改进的 Quartz-Seq 方法进行了基于细胞团而不是单细胞的 WTA。结果显示, 更多发育基因在颗粒细胞中有表达, 而神经功能基因在浦肯野细胞中有更高的表达。

illumina 的技术: HiSeq 1500 系统

Archer N., Walsh M. D., Shahrezaei V. and Hebenstreit D. Modeling Enzyme Processivity Reveals that RNA-Seq Libraries Are Biased in Characteristic and Correctable Ways. *Cell Syst*. 2016;

Scialdone A., Natarajan K. N., Saraiva L. R., et al. Computational assignment of cell-cycle stage from single-cell transcriptome data. *Methods*. 2015;

相关试剂盒

TruSeq RNA Library Prep Kit v2

TruSeq Small RNA Library Prep Kit

TruSeq Targeted RNA Expression Library Prep Kit

171. Sasagawa Y., Nikaido I., Hayashi T., Danno H., Uno K. D., et al. (2013) Quartz-Seq: a highly reproducible and sensitive single-cell RNA sequencing method, reveals non-genetic gene-expression heterogeneity. *Genome Biol* 14: R31

DP-Seq: 基于多种引物设计的 RNA 测序

DP-Seq 采用低至 50 pg 的有限样本为起始材料来扩增 mRNA。¹⁷² 在此方法中, 设计了一组特殊的七聚体引物。Poly(A) 选择富集 mRNA, 然后进行第一条 cDNA 链的合成。接下来, 所设计的引物与第一条 cDNA 链进行杂交, 然后合成第二条 cDNA 链和 PCR。用扩增以后的 DNA 进行深度测序, 可允许在单细胞水平准确检测特定 mRNA 的表达。



DP-seq 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">• 可使用少至 50 pg 的起始材料• 几乎没有转录本长度上的偏向性	<ul style="list-style-type: none">• 靶区域的序列必须已知, 才能设计七聚体引物• PCR 中的指数扩增可导致引物二聚物和假的 PCR 产物¹⁷³• 有读长上的偏向性

Reviews

Friedmann-Morvinski D., Bhargava V., Gupta S., Verma I. M. and Subramaniam S. Identification of therapeutic targets for glioblastoma by network analysis. *Oncogene*. 2015;

Kolodziejczyk A. A., Kim J. K., Svensson V., Marioni J. C. and Teichmann S. A. The Technology and Biology of Single-Cell RNA Sequencing. *Mol Cell*. 2015;58:610-620

Head S. R., Komori H. K., LaMere S. A., et al. Library construction for next-generation sequencing: overviews and challenges. *Biotechniques*. 2014;56:61-64, 66, 68, passim

参考文献

Bhargava V., Head S. R., Ordoukhanian P., Mercola M. and Subramaniam S. Technical variations in low-input RNA-seq methodologies. *Sci Rep*. 2014;4:3678

此研究比较了用 3 种不同基于扩增检测低表达水平的 RNA-Seq 方法所获得的测序文库和产生的 read 的质量上的差异: Smart-Seq、DP-seq 和线性扩增和测序分析细胞中基因表达 (CEL-Seq)。与 Smart-Seq 相比, DP-Seq 具有较少的 PCR 偏向性, 产生更一致的相对转录本丰度, 而且是 3 种方法中最经济的方法。尽管得到较多部分测序结果是来自短转录本的, Smart-Seq 还是给不同量的 mRNA 提供高的转录组覆盖和在转录本长度上的均匀覆盖。在这三种方法中, CEL-Seq 恐怕是最容易有高比例的技术上的变量和失真的结果。

Illumina 的技术: HiSeq 2000 系统、TruSeq RNA Library Prep Kit

相关试剂盒

TruSeq RNA Library Prep Kit v2

TruSeq Small RNA Library Prep Kit

TruSeq Targeted RNA Expression Library Prep Kit

172. Bhargava V., Ko P., Willems E., Mercola M. and Subramaniam S. (2013) Quantitative transcriptomics using designed primer-based amplification. *Sci Rep* 3: 1740

173. Bhargava V., Head S. R., Ordoukhanian P., Mercola M. and Subramaniam S. Technical variations in low-input RNA-seq methodologies. *Sci Rep*. 2014;4:3678

Smart-Seq 和 Smart-Seq2: RNA 模板 5' 末端切换机制

Smart-Seq 是为单细胞测序所开发的一种实验方案, 它提高了转录本的 read 覆盖度。¹⁷⁴ 完全覆盖基因组可以对可变剪切后的转录异构体和 SNP 进行检测。

有两个版本的 Smart-Seq: Smart-Seq 和 Smart-seq2。Smart-seq2 是对原 Smart-Seq 实验方案的若干改进。^{175,176} 新实验方案包含锁定的核酸 (LNA)、提高的 MgCl₂ 浓度、甜菜碱, 并减少了纯化步骤, 从而显著提高了文库产量。

Smart-Seq: 裂解细胞, 将 RNA 与一种含 Oligo(dT) 的引物杂交。在加有一些非模板的 C 核苷酸序列下, 产生第一条 cDNA 链。这一 Poly(C) 的突出仅加到全长转录本上。寡核苷酸引物与 Poly(C) 凸出杂交, 合成第二条 cDNA 链。全长 cDNA 经过 PCR 扩增, 来获得纳克水平的 DNA 量。PCR 产物经过纯化, 用于测序。



Smart-Seq 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none"> 不需要已知 mRNA 序列 可使用少至 50 pg 起始材料 改进了对转录本的覆盖度 可定位 read 数量很多 	<ul style="list-style-type: none"> 不具有链特异性 没有早期的多重分析 仅适用于 Poly(A)+ RNA

Smart-seq2: 用含有游离 dNTP 和有 Oligo(dT) 尾和通用 5' 锚定序列的寡核苷酸的缓冲液来裂解单细胞。通过逆转录在 cDNA 链的 3' 末端加入 2-5 个非模板核苷酸。加入一种模板切换引物探针 (TSO), 这种探针带有两个核糖鸟苷和一个在 3' 末端最后一天碱基是 LNA 修饰的鸟苷。在合成第一条 cDNA 链后, 用有限次的循环来扩增 cDNA。接下来, 使用 tagmentation 将扩增的 cDNA 快速高效地片段化并加上标签, 构建测序文库。



Smart-seq2 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none"> 可使用少至 50 pg 起始材料 不需要已知 mRNA 序列 改进了对转录本的覆盖度 可定位 read 数量很多 	<ul style="list-style-type: none"> 不具有链特异性 没有早期的多重分析¹⁷⁷ 有转录本长度偏向性, 对于大于 4 kb 的转录本, 转录效率不足, 相关 read 少¹⁷⁸ 优先扩增高表达丰度的转录本 纯化步骤可能导致材料损失 可能会有链入侵的偏向性¹⁷⁹

174. Ramskold D., Luo S., Wang Y. C., et al. Full-length mRNA-Seq from single-cell levels of RNA and individual circulating tumor cells. *Nat Biotechnol.* 2012;30:777-782
 175. Picelli S., Björklund A. K., Faridani O. R., Sagasser S., Winberg G., et al. (2013) Smart-seq2 for sensitive full-length transcriptome profiling in single cells. *Nat Methods* 10: 1096-1098
 176. Picelli S., Faridani O. R., Björklund Å. K., Winberg G., Sagasser S., et al. (2014) Full-length RNA-Seq from single cells using Smart-seq2. *Nat. Protocols* 9: 171-181
 177. Shapiro E., Biezuner T. and Linnarsson S. Single-cell sequencing-based technologies will revolutionize whole-organism science. *Nat Rev Genet.* 2013;14:618-630
 178. Bhargava V., Head S. R., Ordoukhanian P., Mercola M. and Subramaniam S. Technical variations in low-input RNA-seq methodologies. *Sci Rep.* 2014;4:3678
 179. Tang D. T., Plessey C., Salimullah M., et al. Suppression of artifacts and barcode bias in high-throughput transcriptome analyses utilizing template switching. *Nucleic Acids Res.* 2013;41:e44

参考文献

由于其高通用性，此方法已被广泛整合到多种测序技术中。

相关试剂盒

Nextera DNA Library Prep Kit

TruSeq RNA Library Prep Kit v2

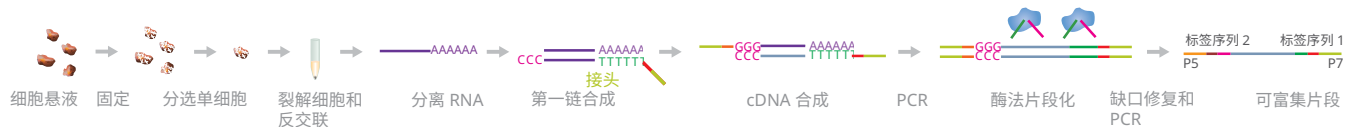
TruSeq Small RNA Library Prep Kit

TruSeq Targeted RNA Expression Library Prep Kit

FRISCR: 固定和回收完整的单细胞 RNA

FRISCR 从固定和染色后的单细胞中去绘制转录组表达谱。¹⁸⁰ 此方法组合使用了分子标签序列和 Tn5 tagmentation 去鉴定了每个孔中每个独特 cDNA 片段序列。

细胞的悬浮液用多聚甲醛固定，通透化并进行免疫染色。单个细胞用 FACS 方法分选到各个试管中。将细胞裂解并在 56°C 逆交联 1 小时。细胞中的 mRNA 由 dT₂₅ 磁珠沉淀。mRNA 测序文库根据 Smart-seq2 的操作流程进行：1) 使用莫洛尼鼠白血病病毒逆转录酶进行模板转换的逆转录；2) 将所得的 cDNA 进行 PCR 扩增；3) 用 Nextera XT Library Preparation Kit 构建 cDNA 文库。cDNA 片段两侧有接头，可以测序。



FRISCR 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">• 用固定后并染色的单细胞进行全长 mRNA 的转录组分析• 免疫染色可以用于识别罕见的细胞群体• 产生全长 mRNA 的 read• 与 Triton-X100 裂解固定细胞相比，用这种方法可以从固定细胞回收显著更多的 mRNA	<ul style="list-style-type: none">• 可能存在 3' 至 5' 偏向性

Reviews

Wen L. and Tang F. Single-cell sequencing in stem cell biology. *Genome Biol.* 2016;17:71

参考文献

Thomsen E. R., Mich J. K., Yao Z., Hodge R. D., Doyle A. M., et al. (2016) Fixed single-cell transcriptomic characterization of human radial glial diversity. *Nat Methods* 13: 87-93

作者开发了 FRISCR 用于准确鉴定放射状胶质细胞 (RG)。这些细胞极罕见，只能通过组合其细胞内标记、细胞内的位置和其形态上的特征来确定。他们对孕中期皮质中只有 1% 的初级人 RG 进行了 FRISCR。利用 FRISCR，研究人员鉴定了室管膜区富集的 RG (vRG) 和外室管膜下区定位的 RG (oRG) 的标记和分子谱。

illumina 的技术: MiSeq 系统、Nextera XT DNA Library Prep Kit

相关试剂盒

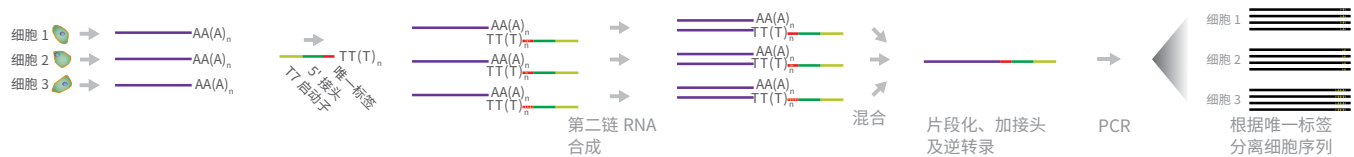
Nextera XT DNA Library Prep Kit

180. Thomsen E. R., Mich J. K., Yao Z., et al. Fixed single-cell transcriptomic characterization of human radial glial diversity. *Nat Methods.* 2016;13:87-93

CEL-Seq: 线性扩增测序分析细胞表达

CEL-Seq 利用引入标签序列可混合多个 RNA，从而解决了低起始量的问题。¹⁸¹ 在此方法中，每个细胞在单独的试管中用具有独特标签序列的引物进行逆转录。在第二条 cDNA 链合成后，收集所有试管中的 cDNA 并进行 PCR 扩增。PCR 产物的双端深度测序可以准确地检测来自两条链的序列信息。

类似方法：CEL-Seq2、Quartz-Seq、Drop-seq、MARS-Seq、CytoSeq、inDrop、Hi-SCL



CEL-Seq 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">添加标签序列和多样本混合可进行多重分析，并一次性研究多个不同的单细胞。由于每个细胞使用一个试管，极大地减少了交叉污染。比单细胞标记逆转录测序（STRT-Seq）步骤要少。读长偏向性非常少¹⁸²链特异性	<ul style="list-style-type: none">3' 偏向性很明显¹⁸³高表达的转录本优先被扩增需要至少 400 pg 总 RNA

Reviews

Zhang X., Marjani S. L., Hu Z., Weissman S. M., Pan X., et al. Single-Cell Sequencing for Precise Cancer Research: Progress and Prospects. *Cancer Research*. 2016;

Grun D. and van Oudenaarden A. Design and Analysis of Single-Cell Sequencing Experiments. *Cell*. 2015;163:799-810

Kolodziejczyk A. A., Kim J. K., Svensson V., Marioni J. C. and Teichmann S. A. The Technology and Biology of Single-Cell RNA Sequencing. *Mol Cell*. 2015;58:610-620

Liang J., Cai W. and Sun Z. Single-Cell Sequencing Technologies: Current and Future. *J Genet Genomics*. 2014;41:513-528

参考文献

Levin M., Anavy L., Cole A. G., et al. The mid-developmental transition and the evolution of animal body plans. *Nature*. 2016;

作者的研究目的在于增加对保守存在于不同门的许多物种的种系特征性发育阶段的了解，这个阶段广泛用于形态学分类和分子生物学分类中。他们使用 CEL-Seq 分析了动物界（从海绵动物到节肢动物）10 个远缘物种单个胚胎的转录组表达谱。转录组之间的比较揭示了在物种种系特征性发育阶段中，每个物种特有的各种信号通路和转录因子。

illumina 的技术：HiSeq 2000 系统、TruSeq RNA Library Prep Kit

Bose S., Wan Z., Carr A., Rizvi A. H., Vieira G., et al. (2015) Scalable microfluidics for single-cell RNA printing and sequencing. *Genome Biol* 16: 120

在此研究中，作者报道了一个新的可调节的高密度微流体平台，可用于在玻璃盖玻片或多聚物微珠上，固相捕获 RNA。在密封的微量滴定微孔中的单细胞裂解物能将 RNA 转印到玻璃上或者在微珠上捕获 RNA。他们将此样本制备方法与基于 CEL-Seq 的可调整的 scRNA-Seq 技术组合应用。此技术相对经济，耗材费用为每个细胞 0.10-0.20 美元，能平行处理成百上千的单个细胞。

illumina 的技术：NextSeq 500 系统、HiSeq 2500 系统、TruSeq RNA Library Prep Kit

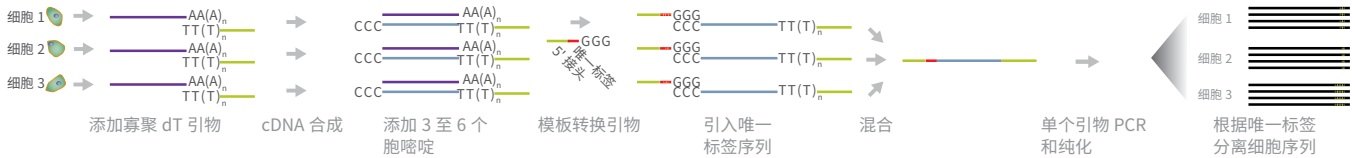
181. Hashimshony T., Wagner F., Sher N. and Yanai I. (2012) CEL-Seq: single-cell RNA-Seq by multiplexed linear amplification. *Cell Rep* 2: 666-673

182. Bhargava V., Head S. R., Ordoukhanian P., Mercola M. and Subramaniam S. Technical variations in low-input RNA-seq methodologies. *Sci Rep*. 2014;4:3678

183. Shapiro E., Biezuner T. and Linnarsson S. Single-cell sequencing-based technologies will revolutionize whole-organism science. *Nat Rev Genet*. 2013;14:618-630

STRT-Seq: 单细胞标记逆转录测序

STRT-Seq 是一种与 CEL-Seq 类似的方法, 使用独特标签序列和进行多样本混合, 也能应对起始材料有限的样本所带来的挑战。^{184,185} 在此方法中, 首先将单细胞收集到单独的试管中, 利用加有 3-6 个胞嘧啶的 Oligo(dT) 引物合成第一条 cDNA 链。辅助寡聚核苷酸促进模板切换, 将标签序列插入到 cDNA 链上。用单引物 PCR 扩增带标签序列的 cDNA。深度测序可以准确地分析单个细胞的转录组。



STRT-Seq 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">添加标签序列和多样本混合, 可以用来多重分析, 并一次性研究多个不同的单细胞。由于每个细胞使用单个试管样本处理, 使交叉污染的可能性大大降低	<ul style="list-style-type: none">PCR 偏向会导致 GC 含量丰富的模板扩增不足。非线性 PCR 扩增会导致出现影响实验重复性的偏向性由聚合酶导致的扩增错误将被错误地保留和测序由于 PCR 偏向性会导致准确性下降PCR 过程中聚合酶会优先扩增长度小于 500 bp 的目标模板

Reviews

Macaulay I. C. and Voet T. Single cell genomics: advances and future perspectives. *PLoS Genet.* 2014;10:e1004126

Kolodziejczyk A. A., Kim J. K., Svensson V., Marioni J. C. and Teichmann S. A. The Technology and Biology of Single-Cell RNA Sequencing. *Mol Cell.* 2015;58:610-620

Sun H. J., Chen J., Ni B., Yang X. and Wu Y. Z. Recent advances and current issues in single-cell sequencing of tumors. *Cancer Lett.* 2015;365:1-10

Grun D. and van Oudenaarden A. Design and Analysis of Single-Cell Sequencing Experiments. *Cell.* 2015;163:799-810

Zhang X., Marjani S. L., Hu Z., Weissman S. M., Pan X., et al. Single-Cell Sequencing for Precise Cancer Research: Progress and Prospects. *Cancer Research.* 2016;

Navin N. E. Cancer genomics: one cell at a time. *Genome Biol.* 2014;15:452

参考文献

Korber I., Katayama S., Einarsdottir E., et al. Gene-Expression Profiling Suggests Impaired Signaling via the Interferon Pathway in *Cstb*^{-/-} Microglia. *PLoS One.* 2016;11:e0158195

此研究探索了半胱氨酸蛋白酶抑制剂肽抑素 B (CSTB) 中的功能丧失突变对 Unverricht-Lundborg 型的进行性肌阵挛癫痫 (EPM1) 的影响。作者采用的是优化过的 STRT-Seq 和芯片杂交技术, 获得了对小神经胶质细胞 RNA 样本的转录组分析。他们在 *CSTB*^{-/-} 小神经胶质细胞中发现了 184 个差异表达的基因。对 *CSTB* 缺陷的深入研究揭示了: *CSTB* 在调控趋化现象、抗原呈递和通过 JAK-STAT 通路进行免疫和防御应答中的潜在功能。

illumina 的技术: HiSeq 2000 系统、TruSeq Targeted RNA Expression Library Prep Kit

Töhönen V., Katayama S., Vesterlund L., et al. Novel PRD-like homeodomain transcription factors and retrotransposon elements in early human development. *Nature Communications.* 2015;6:8207

Katayama S., Skoog T., Jouhilahti E. M., et al. Gene expression analysis of skin grafts and cultured keratinocytes using synthetic RNA normalization reveals insights into differentiation and growth control. *BMC Genomics.* 2015;16:476

相关试剂盒

TruSeq Targeted RNA Expression Library Prep Kit

184. Islam S., Kjallquist U., Moliner A., Zajac P., Fan J. B., et al. (2011) Characterization of the single-cell transcriptional landscape by highly multiplex RNA-seq. *Genome Res* 21: 1160-1167

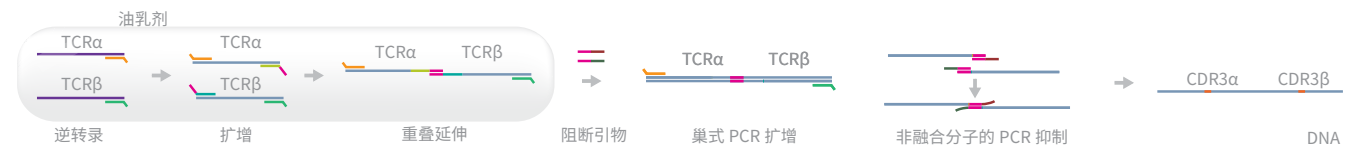
185. Islam S., Kjallquist U., Moliner A., et al. Highly multiplexed and strand-specific single-cell RNA 5' end sequencing. *Nat Protoc.* 2012;7:813-828

TCR 链配对：在单细胞中识别 T 细胞受体 (TCR) a-b 链配对

此方法利用细胞乳剂技术分离细胞来识别单个细胞中 TCR-a 和 -b 链配对，然后进行 NGS¹⁸⁶ TCR 链配对的方法解决了如何鉴定共表达的两个基因研究中的最大困难——未融合分子的随机的和非特异性的相互重叠的延伸。是通过在乳剂扩增后的反应中引入独特的 PCR 抑制技术来实现的。

首先，将单个 T 细胞分离到含有 a 和 b 链 mRNA 链的逆转录引物的油乳剂液滴中。将所得的 cDNA 进行扩增，逆转录引物延伸产生重叠，以连接 TCR-a 和 TCR-b 链，所得产物称为融合分子。从乳剂提取 cDNA 产物并引入用于阻断的引物。将这些引物退火至未融合的 cDNA 链的 3' 末端，防止它们被扩增；作者称此技术为“PCR 抑制”。最后，融合分子进行 PCR 扩增并测序。

类似方法：TCR-LA-MC PCR



TCR 链配对示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">• 用 NGS 识别 TCR-a-b 链之间的配对情况• 未融合分子的 PCR 抑制显著减少了乳化后扩增反应过程中随机且非特异性相互重叠的延伸现象• 简单明了的实验方案	<ul style="list-style-type: none">• 细胞裂解期间的热激处理可能影响逆转录期间的酶活性¹⁸⁷• 扩增产物不适于克隆¹⁸⁸

Reviews

Friedensohn S., Khan T. A. and Reddy S. T. Advanced Methodologies in High-Throughput Sequencing of Immune Repertoires. *Trends in Biotechnology*. 2016;

参考文献

Munson D. J., Egelston C. A., Chiotti K. E., et al. Identification of shared TCR sequences from T cells in human breast cancer using emulsion RT-PCR. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2016;113:8272-8277

作者希望确定能否通过提高 T 细胞的靶向特异性来优化乳腺癌免疫疗法策略。他们使用 TCR 链配对连接并扩增 TCR 的一对 a 链和 b 链，观察到保证约为 85% 的准确配对。他们还发现对于任何 TCR 对，主要的 a- 或 b 结合抗原占总抗原结合的 90%。

Illumina 的技术：MiSeq 系统

相关试剂盒

TruSeq RNA Library Prep Kit v2

186. Turchaninova M. A., Britanova O. V., Bolotin D. A., et al. Pairing of T-cell receptor chains via emulsion PCR. *Eur J Immunol*. 2013;43:2507-2515

187. Friedensohn S., Khan T. A. and Reddy S. T. Advanced Methodologies in High-Throughput Sequencing of Immune Repertoires. *Trends in Biotechnology*. 2016;

188. Sprouse M. L., Blahnik G., Lee T., et al. Rapid identification and expression of human TCRs in retrogenic mice. *J Immunol Methods*. 2016;

TCR-LA-MC PCR: TCR 连接锚定磁力捕获 PCR

TCR-LA-MC PCR 可以识别来自 T 细胞的 TCR-a 链和 -b 链，并使用测序手段分析来自血液或组织样本的体内或体外克隆 TCR 种类¹⁸⁹。这项技术仅需要 10ng cDNA 就可以实现，同时为分析影响 TCR 克隆能力多样性和其中的机制提供了极高的灵敏度和准确性。

第一条 cDNA 链是利用生物素标记的引物合成的，它是与有 TCR 链固有有序列的基因进行退火后合成的。通过 RNA 消化去除 RNA 链，使用链霉亲和素磁珠的磁性来捕获单链 cDNA。将含有引物序列的单链接头结构 (ssLC) 与 cDNA 连接，然后将样本进行 PCR 扩增。双链 cDNAs 的两端被连接上测序接头，即可开始测序。

类似方法：TCR 链配对



TCR-LA-MC PCR 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">可以在没有序列相关或数量限制的情况下，鉴定 TCR 的序列多样性可以用来研究 TCR 影响克隆能力的多样性和其中的机制只需加入 10ng cDNA以 1:10,000 的分辨能力识别 T- 细胞，或甚至可以分辨单细胞	<ul style="list-style-type: none">尚未报道

Reviews

Hou D., Chen C., Seely E. J., Chen S. and Song Y. High-Throughput Sequencing-Based Immune Repertoire Study during Infectious Disease. *Front Immunol.* 2016;7:336

参考文献

Oliveira G., Ruggiero E., Stanghellini M. T. L., et al. Tracking genetically engineered lymphocytes long-term reveals the dynamics of T cell immunological memory. *Science Translational Medicine.* 2015;7:317ra198-317ra198

本研究使用 TCR-LA-MC PCR 来分析经过遗传修饰的人 T 淋巴细胞中 TCR-a 和 TCR-b 链的序列信息。结果显示，主要的长期克隆型来源于融合的 TSCM 和 TCM 克隆。作者表明融合细胞的原始表型和结合抗原后会影基因修饰过的记忆 T 细胞的在较长过程中的基因稳定性。

Illumina 的技术：MiSeq 系统

相关试剂盒

TruSeq RNA Library Prep Kit v2

189. Ruggiero E., Nicolay J. P., Fronza R., et al. High-resolution analysis of the human T-cell receptor repertoire. *Nat Commun.* 2015;6:8081

CirSeq: 用环状测序识别低表达水平的 RNA 病毒

CirSeq 准确鉴定 RNA 病毒中的超罕见及低频的遗传变异情况。该方法使用一个独特的步骤将片段化后的病毒 RNA 进行环化, 之后进行滚环逆转录^{190,191}。CirSeq 通过串联重复序列之间的相互比对, 并使用信息学工具来排除这些串联重复序列的 read 来校正其扩增步骤中引入的假突变。

首先, 利用 Zn^{2+} 将单链 RNA 进行片段化, 并选择大小不超过序列读长三分之一的片段。下一步, 将它们环化, 并使用随机引物进行逆转录。滚环逆转录用来产生串联重复 cDNA 链。将第一条 cDNA 链进行扩增, 产生双链 cDNA, 之后进行末端修复, 加 Poly(A) 尾, 并进行接头连接。cDNA 文库可用于测序。



CirSeq 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">• 检测 RNA 病毒中的超罕见和低频遗传变异• 滚环逆转录产生的串联重复 cDNA 可用于纠正人为产生的突变• 报错率远低于使用标准 RNA 病毒测序的方法。	<ul style="list-style-type: none">• 整个过程需要 5 天左右• 不适用于临床分离病毒测序, 因为需要大量纯化的病毒 RNA• 不适用于病毒 RNA 从头测序

Reviews

Posada-Céspedes S., Seifert D. and Beerenwinkel N. Recent advances in inferring viral diversity from high-throughput sequencing data. *Virus Res.* 2016;

Andino R. and Domingo E. Viral quasispecies. *Virology.* 2015;479-480C:46-51

Gordon A. J., Satory D., Halliday J. A. and Herman C. Lost in transcription: transient errors in information transfer. *Curr Opin Microbiol.* 2015;24C:80-87

参考文献

Acevedo A., Brodsky L. and Andino R. Mutational and fitness landscapes of an RNA virus revealed through population sequencing. *Nature.* 2014;505:686-690

作者开发了 CirSeq, 用以审视病毒遗传结构中的低频变异。他们用 CirSeq 鉴定脊髓灰质炎病毒的突变率并揭示其突变情况。分析突变频率的改变幅度, 可以为基因组中数千个突变分配适应度值。此外, 他们能将不同的适应度值对应不同的病毒蛋白的三维结构, 能够有效地将蛋白结构和功能相关联。

Illumina 的技术: HiSeq 系统、MiSeq 系统

Wang K., Ma Q., Jiang L., et al. Ultra-precise detection of mutations by droplet-based amplification of circularized DNA. *BMC Genomics.* 2016;17:214

相关试剂盒

TruSeq RNA Library Prep Kit v2

190. Acevedo A., Brodsky L. and Andino R. Mutational and fitness landscapes of an RNA virus revealed through population sequencing. *Nature.* 2014;505:686-690

191. Acevedo A. and Andino R. Library preparation for highly accurate population sequencing of RNA viruses. *Nat Protoc.* 2014;9:1760-1769

TIVA: 转录组体内分析

TIVA 是一种从活细胞中捕获 mRNA 的实验方案¹⁹²。

在本方法中，将可被光激活的 TIVA 标签导入细胞中。选择性光激活游离出标签上用于捕获 mRNA 的部分序列，使其与 mRNA 的 poly(A) 尾杂交。使用链霉亲和素包被磁珠捕获生物素修饰的 mRNA，并转录成 cDNA。对这些 cDNA 进行测序可提供复杂组织中单细胞 RNA 的转录组分析。



TIVA 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">神经元细胞中使用可被光激活的 转录组分析在自然微环境中，非侵入性捕获 mRNA 的方法	<ul style="list-style-type: none">仅限于少量细胞

Reviews

Zhang X., Marjani S. L., Hu Z., Weissman S. M., Pan X., et al. Single-Cell Sequencing for Precise Cancer Research: Progress and Prospects. *Cancer Research*. 2016;

Binan L., Mazzaferri J., Choquet K., et al. Live single-cell laser tag. *Nat Commun*. 2016;7:11636

Bian Q. and Cahan P. Computational Tools for Stem Cell Biology. *Trends Biotechnol*. 2016;

Liu S. and Trapnell C. Single-cell transcriptome sequencing: recent advances and remaining challenges. *F1000Res*. 2016;5:

Achim K., Pettit J. B., Saraiva L. R., et al. High-throughput spatial mapping of single-cell RNA-seq data to tissue of origin. *Nat Biotechnol*. 2015;

Kolodziejczyk A. A., Kim J. K., Svensson V., Marioni J. C. and Teichmann S. A. The Technology and Biology of Single-Cell RNA Sequencing. *Mol Cell*. 2015;58:610-620

Baslan T. and Hicks J. Single cell sequencing approaches for complex biological systems. *Curr Opin Genet Dev*. 2014;26C:59-65

参考文献

Lovatt D., Ruble B. K., Lee J., Dueck H., Kim T. K., et al. Transcriptome *in vivo* analysis (TIVA) of spatially defined single cells in live tissue. *Nat Methods*. 2014;11:190-196

作者开发了 TIVA，用以分析体外培养的单个神经元以及小鼠和人类体内的神经元转录组的变化。结果表明，组织中的微环境，深入到单个细胞的水平上控制着转录组表达情况。

Illumina 的技术：HiSeq 系统、TruSeq RNA Library Prep Kit

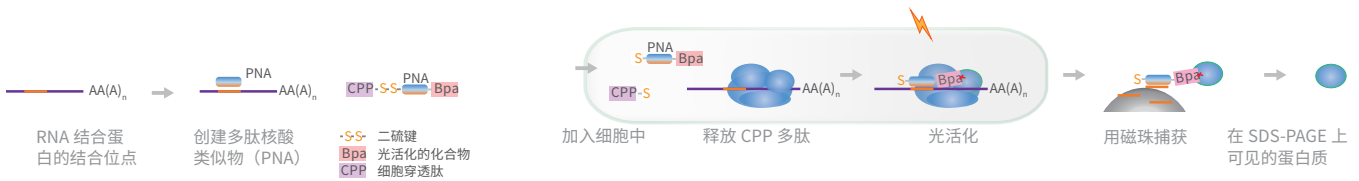
相关试剂盒

- TruSeq RNA Library Prep Kit v2
- TruSeq Nano DNA Library Prep Kit
- TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

192. Lovatt D., Ruble B. K., Lee J., et al. Transcriptome *in vivo* analysis (TIVA) of spatially defined single cells in live tissue. *Nat Methods*. 2014;11:190-196

PAIR: 肽核酸 (PNA) 辅助识别 RNA 结合蛋白

PAIR 使用 PNA 捕获体内的 RBP^{193,194}。PNA 与细胞膜穿透肽 (CPP) 偶联, 将 PNA 以及一种可被光激活的化合物对苯甲酰苯丙氨酸 (Bpa) 高效地导入活细胞中。用紫外光照射细胞, 激活 PNA 上的 Bpa, 与 RBP 通过共价键进行结合。下一步, 将细胞裂解, 用磁珠捕获 RNA 复合物。对 RNA 链测序时, 可将蛋白反交联, 用变性凝胶电泳显示。



PAIR 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">• 鉴定体内的 RNA-蛋白质之间的相互作用• 可以购买商品化的 PNA, 不需要进行 PNA 设计	<ul style="list-style-type: none">• 定制 PNA 设计会导致蛋白产量低的问题• 学术界尚未广泛采用

Reviews

Jazurek M., Ciesiolka A., Starega-Roslan J., Bilinska K. and Krzyzosiak W. J. Identifying proteins that bind to specific RNAs - focus on simple repeat expansion diseases. *Nucleic Acids Res.* 2016;44:9050-9070

McHugh C. A., Russell P. and Guttman M. Methods for comprehensive experimental identification of RNA-protein interactions. *Genome Biology.* 2014;15:203

参考文献

Zielinski J., Kilk K., Peritz T., Kannanayakal T., Miyashiro K. Y., et al. In vivo identification of ribonucleoprotein-RNA interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:1557-1562

作者开发 PAIR, 以便更深入地了解基因表达调控中起作用的 RBP。他们对交联的 mRNA 进行 PAIR, 并观察 PNA 所靶向的 3'-UTR 和 5'-UTR 的特定区域。此外, 他们通过 PAIR 中的交联步骤发现了多种与 PNA 相关的蛋白。

illumina 的技术: 没有给出具体 illumina 测序系统型号

相关试剂盒

TruSeq RNA Library Prep Kit v2

193. Zielinski J., Kilk K., Peritz T., et al. In vivo identification of ribonucleoprotein-RNA interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:1557-1562

194. Zeng F., Peritz T., Kannanayakal T. J., et al. A protocol for PAIR: PNA-assisted identification of RNA binding proteins in living cells. *Nat Protoc.* 2006;1:920-927

CLaP: 光漂白细胞标记法

CLaP 是一种非侵入性的基于激光标记的单细胞标记技术¹⁹⁵。该方法使用激光将特定细胞与荧光标签交联，然后分离单个细胞以进行测序。

在 CLaP 中，利用激光照射将生物素 -4- 荧光素 (B4F) 交联到细胞膜上，标记感兴趣的细胞。下一步，将链霉亲和素微珠偶联的荧光标签结合到生物素修饰的细胞上。这些步骤可以重复使用各种荧光标签来标记多种细胞类型。随后标记过的细胞经过分离和制备获得 cDNA 文库，以用于测序。



PAIR 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">• 非侵入性的、靶向的、基于激光的单细胞标签• 可以自动根据图像进行细胞选择• 基于荧光的标签可以被其他标签代替，例如高电子密度的分子• 可使用多色荧光染色剂	<ul style="list-style-type: none">• 利用胞外基质和连续激光照射来扩散试剂会限制三维环境 / 组织的行成过程• 细胞特异性可能会在原代细胞培养过程中稍有降低。• 基于图像的选择限制了高通量应用的可能性

Reviews

Gurwitz D. Human iPSC-derived neurons and lymphoblastoid cells for personalized medicine research in neuropsychiatric disorders. *Dialogues Clin Neurosci.* 2016;18:267-276

参考文献

Binan L., Mazzaferri J., Choquet K., Lorenzo L. E., Wang Y. C., et al. Live single-cell laser tag. *Nat Commun.* 2016;7:11636

作者开发了 CLaP，可根据形状、行为或位置信息即时标记单个细胞。他们发现该标签稳定、无毒，能在细胞中保存数天，在细胞分裂过程中转移，但不在同一培养环境中的相邻细胞间转移。他们还将 CLaP 与基于微流体的单细胞捕获技术相结合，以提高通量。此外，他们发现 CLaP 可以在微工程培养环境中，用空间模式化细胞类型来诱导细胞瞬时结合到不同底物上。

Illumina 的技术：HiSeq 2500 系统、Nextera XT DNA Library Prep Kit

相关试剂盒

Nextera XT DNA Library Prep Kit

195. Binan L., Mazzaferri J., Choquet K., et al. Live single-cell laser tag. *Nat Commun.* 2016;7:11636

CytoSeq: 基因表达细胞术

CytoSeq 能够对成千上万个单细胞进行基因表达谱分析¹⁹⁶。在这种方法中，单细胞随机沉积在孔中。将具有特定捕获探针微珠的混合文库加入到每个孔里。细胞裂解后，mRNA 与微珠杂交，随后混合以用于逆转录、扩增和测序。深度测序可以为数个单细胞提供准确、高覆盖度的基因表达谱。

类似方法：CEL-Seq、Quartz-Seq、MARS-Seq、inDrop、Hi-SCL



CytoSeq 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">可以轻松扩展到数万或数十万个细胞。可对基于荧光或质谱的细胞计数能力进行补充和扩展在没有抗体可用性限制的情况下检测所有转录 mRNA可用不足以通过传统流式细胞方法进行分离的细胞数量来鉴定罕见细胞允许直接分析具有不同细胞大小和形状的复杂样本	<ul style="list-style-type: none">测序深度需要大量 read (如，每个细胞 200,000 条转录本，实现 10 倍覆盖度需要 2 百万条 read：1000 个细胞需要 20 亿条 read)单次运行相对较为昂贵和耗时在测序深度和差异基因表达之间进行权衡

Reviews

Friedensohn S., Khan T. A. and Reddy S. T. Advanced Methodologies in High-Throughput Sequencing of Immune Repertoires. *Trends in Biotechnology*. 2016;

Kolodziejczyk A. A., Kim J. K., Svensson V., Marioni J. C. and Teichmann S. A. The Technology and Biology of Single-Cell RNA Sequencing. *Mol Cell*. 2015;58:610-620

Saadatpour A., Lai S., Guo G. and Yuan G. C. Single-Cell Analysis in Cancer Genomics. *Trends Genet*. 2015;31:576-586

参考文献

Fan H. C., Fu G. K. and Fodor S. P. Expression profiling. Combinatorial labeling of single cells for gene expression cytometry. *Science*. 2015;347:1258367

作者开发了 CytoSeq，将分子标签与高通量单细胞测序相结合。他们对人类造血母细胞进行 CytoSeq，以研究其对体外刺激反应的特征。事实证明，该方法在检测低表达量的转录本和罕见细胞群体方面的结果很可靠。CytoSeq 能够同时分析成千上万个细胞，并可以轻松扩展到数万或数十万个细胞。

Illumina 的技术：MiSeq System, TruSeq Nano DNA Library Prep Kit

相关试剂盒

TruSeq Nano DNA Library Prep Kit

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

196. Fan H. C., Fu G. K. and Fodor S. P. Expression profiling. Combinatorial labeling of single cells for gene expression cytometry. *Science*. 2015;347:1258367

Drop-Seq: 分析液滴中单个细胞的 mRNA 转录本

Drop-Seq 以高度平行的方式来分析来自单个细胞液滴的 mRNA 转录本¹⁹⁷。

这种单细胞测序方法使用了一种微流体元件来分离含有单细胞、裂解缓冲液和标签序列引物包被微珠的液滴。每个引物包含：1) 用于结合 mRNA 的 30 bp 长的 Oligo(dT) 序列；2) 用于唯一识别每条 mRNA 链的 8 bp 分子标签序列；3) 用于唯一识别每个细胞的 12 bp 标签序列；4) 所有微珠上都包被了相同的通用序列。分离了液滴以后，液滴中的细胞被裂解，然后释放出 mRNA 与引物微珠上的 Oligo(dT) 链杂交。下一步，将所有液滴混合并破碎，释放出里面的微珠。在分离出微珠后，通过模板切换进行逆转录。这一步产生带有 PCR 引物序列而不是通用引物序列的第一条 cDNA 链。将 cDNA 进行 PCR 扩增，再使用 Nextera XT Library Preparation Kit 添加测序接头。带有标签序列的 mRNA 样本可用于测序。

类似方法：CEL-Seq、Quartz-Seq、MARS-Seq、CytoSeq、inDrop、Hi-SCL



Drop-seq 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">• 以高度平行的方式分析单细胞的序列• 独特的分子标签和细胞标签能够用来识别细胞特异的 mRNA 链和基因特异的 mRNA 链• 使用模板切换 PCR 进行逆转录可产生高产量的单细胞 read• 低成本：每个细胞 0.07 美元（每 10,000 个细胞 653 美元），快速的文库制备（每天 10,000 个细胞）	<ul style="list-style-type: none">• 需要定制用于液滴分离的微流体元件• 与其他 scRNA-Seq 方法相比，检测每个细胞里的基因表达灵敏度偏低¹⁹⁸• 仅限于 mRNA 转录本

Reviews

Bowen J. R., Ferris M. T. and Suthar M. S. Systems biology: A tool for charting the antiviral landscape. *Virus Res.* 2016;

Chaitankar V., Karakulah G., Ratnapriya R., Giuste F. O., Brooks M. J. and Swaroop A. Next generation sequencing technology and genomewide data analysis: Perspectives for retinal research. *Prog Retin Eye Res.* 2016;

Zhao Q.-Y., Gratten J., Restuadi R. and Li X. Mapping and differential expression analysis from short-read RNA-Seq data in model organisms. *Quantitative Biology.* 2016;4:22-35

Conesa A., Madrigal P., Tarazona S., Gomez-Cabrero D., Cervera A., et al. A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome Biol.* 2016;17:13

Friedensohn S., Khan T. A. and Reddy S. T. Advanced Methodologies in High-Throughput Sequencing of Immune Repertoires. *Trends in Biotechnology.* 2016;

Poulin J. F., Tasic B., Hjerling-Leffler J., Trimarchi J. M. and Awatramani R. Disentangling neural cell diversity using single-cell transcriptomics. *Nat Neurosci.* 2016;19:1131-1141

Grun D. and van Oudenaarden A. Design and Analysis of Single-Cell Sequencing Experiments. *Cell.* 2015;163:799-810

Saadatpour A., Lai S., Guo G. and Yuan G. C. Single-Cell Analysis in Cancer Genomics. *Trends Genet.* 2015;31:576-586

Alizadeh A. A., Aranda V., Bardelli A., et al. Toward understanding and exploiting tumor heterogeneity. *Nat Med.* 2015;21:846-853

197. Macosko E. Z., Basu A., Satija R., et al. Highly Parallel Genome-wide Expression Profiling of Individual Cells Using Nanoliter Droplets. *Cell.* 2015;161:1202-1214

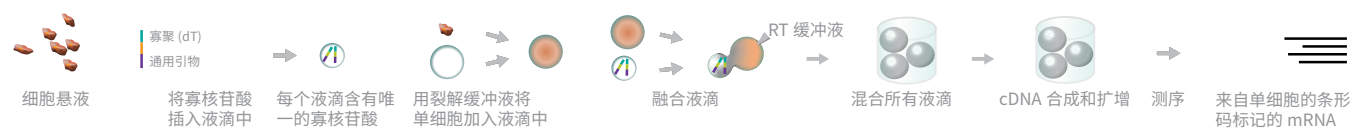
198. Ziegenhain C., Parekh S., Vieth B., et al. Comparative analysis of single-cell RNA-sequencing methods. *bioRxiv.* 2016;

Hi-SCL: 高通量单细胞标记法

Hi-SCL 使用类似于 Drop-Seq 和 inDrop 的定制微流体系统为数千个单细胞生成转录组表达图谱¹⁹⁹。

来自细胞悬液的单细胞，被分离到含有裂解缓冲液的液滴中。细胞经裂解后，细胞液滴与含有细胞特异性标签序列的液滴以及其他含有逆转录酶的液滴进行融合。将所有孔中的液滴混合，进行等温的逆转录反应。标签序列退火至有 Poly(A)⁺ 的 mRNA，作为逆转录酶的引物。现在每条 mRNA 链都具有细胞特异性标签，破碎液滴，纯化所得的 cDNA。将 cDNA 链 3' 端加上接头，进行扩增、退火结合带有标签的引物，并进一步扩增，然后进行测序。

类似方法：CEL-Seq、Drop-seq、MARS-Seq、CytoSeq、inDrop、Quartz-Seq



Hi-SCL 示意图。

Reviews

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">使用微流体系统的高通量、单细胞转录组图谱分析低成本：每个细胞 0.1 美元（对于使用 100 个细胞的实验）可高度扩展应用于更多细胞数量的实验无片段化步骤	<ul style="list-style-type: none">寡核苷酸中缺少 UMI 可能造成噪声放大液滴中可能含有 2 个细胞或 2 个不同序列的标签

Mato Prado M., Frampton A. E., Stebbing J. and Krell J. Single-cell sequencing in cancer research. *Expert Rev Mol Diagn.* 2016;16:1-5

参考文献

Rotem A., Ram O., Shores N., Sperling R. A., Schnall-Levin M., et al. (2015) High-Throughput Single-Cell Labeling (Hi-SCL) for RNA-Seq Using Drop-Based Microfluidics. *PLoS One* 10: e0116328

作者开发了 Hi-SCL，用以解决与单细胞测序相关的高成本问题。利用基于液滴的微流体、标签序列标记的寡核苷酸文库和液滴内 cDNA 合成的方法，可将使用 100 个细胞的实验中，每个细胞的成本降低至 0.1 美元。这项研究的发表验证了由 Hi-SCL 技术生成数据的可靠性，并证明其应用于一些需要对大量细胞进行实验的潜力。

Illumina 的技术：MiSeq 系统、HiSeq 系统

相关试剂盒

TruSeq RNA Library Prep Kit v2

199. Rotem A., Ram O., Shores N., et al. High-Throughput Single-Cell Labeling (Hi-SCL) for RNA-Seq Using Drop-Based Microfluidics. *PLoS One.* 2015;10:e0116328

InDrop: 使用索引滴进行高通量单细胞标记

InDrop 被应用于高通量的单细胞标记²⁰⁰。这种方法与 Drop-seq 相似，但它使用水凝胶微球来引入寡核苷酸。

来自细胞悬液的单细胞被分离到含有裂解缓冲液的液滴中。细胞裂解后，细胞液滴与含有特异性标签序列的水凝胶微球以及其他含有逆转录酶的液滴进行融合。将所有孔中的液滴混合，进行等温的逆转录反应。标签序列退火至有 Poly(A)⁺ 的 mRNA，作为逆转录酶的引物。现在每条 mRNA 链都具有细胞特异性标签序列，破碎液滴并混合，纯化所得的 cDNA。将 cDNA 链 3' 端加上接头，扩增、退火结合带有标签的引物，并进一步扩增，然后进行测序。

类似方法：CEL-Seq、Drop-seq、MARS-Seq、CytoSeq、Quartz-Seq、Hi-SCL



inDrop 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">使用微流体系统的高通量、单细胞转录组图谱分析可高度扩展应用于更多细胞数量的实验无片段化步骤	<ul style="list-style-type: none">比较低 mRNA 捕获效率，大概为 7%液滴中可能含有 2 个细胞或 2 个不同序列的标签

Reviews

Bian Q. and Cahan P. Computational Tools for Stem Cell Biology. *Trends Biotechnol.* 2016;

Zhao Q.-Y., Gratten J., Restuadi R. and Li X. Mapping and differential expression analysis from short-read RNA-Seq data in model organisms. *Quantitative Biology.* 2016;4:22-35

Grun D. and van Oudenaarden A. Design and Analysis of Single-Cell Sequencing Experiments. *Cell.* 2015;163:799-810

Saadatpour A., Lai S., Guo G. and Yuan G. C. Single-Cell Analysis in Cancer Genomics. *Trends Genet.* 2015;31:576-586

参考文献

Derr A., Yang C., Zilionis R., et al. End Sequence Analysis Toolkit (ESAT) expands the extractable information from single-cell RNA-seq data. *Genome Res.* 2016;26:1397-1410

作者开发了 End Sequence Analysis Toolkit (ESAT) 来纠正全局 RNA-seq 中的计算杂峰。他们对 1000 个单独胰岛细胞进行了 inDrop 测序，鉴定出 9 种不同细胞类型、3 种不同 - 细胞类型，也展示了激素分泌与血管形成之间复杂的相互作用。

illumina 的技术：HiSeq 系统

Klein A. M., Mazutis L., Akartuna I., Tallapragada N., Veres A., et al. Droplet barcoding for single-cell transcriptomics applied to embryonic stem cells. *Cell.* 2015;161:1187-1201

相关试剂盒

Nextera XT DNA Library Prep Kit

200. Klein A. M., Mazutis L., Akartuna I., et al. Droplet barcoding for single-cell transcriptomics applied to embryonic stem cells. *Cell.* 2015;161:1187-1201

snRNA-Seq: 单核 RNA 测序

snRNA-Seq 用一种温和且快速的核分离实验方案,对核内 RNA 进行分离和测序。该方法最大程度地减少了常见核分离实验方案可能引起的技术问题,特别是有关立早基因(Immediate early gene, IEG)行为方面的研究²⁰¹。

在这种方法中,细胞悬液被温和裂解,并通过离心将细胞核从细胞质裂解物中分离出来。使用 FACS 将单细胞/细胞核分选到单独的孔中。使用一种进行细胞捕获和反应测序化学的微流体辅助装置,扩增单个细胞核。使用 Nextera XT DNA Library Prep Kit 将细胞核 RNA 处理成 cDNA。收集 40 个样本的样本池,并用磁珠纯化。cDNA 文库可用于测序。

类似方法: Div-Seq、Nuc-seq



snRNA-seq 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">快速裂解实验方案防止了由蛋白酶消化、加热和细胞质核糖体导致的假基因表达等所造成的技术问题防止蛋白酶裂解步骤中通常发生的树突损失	<ul style="list-style-type: none">尚未报道

Reviews

Poulin J.-F., Tasic B., Hjerling-Leffler J., Trimarchi J. M. and Awatramani R. Disentangling neural cell diversity using single-cell transcriptomics. *Nat Neurosci.* 2016;19:1131-1141

Gagliano S. A. It's All in the Brain: A Review of Available Functional Genomic Annotations. *Biol Psychiatry.* 2016;

Goncalves J. T., Schafer S. T. and Gage F. H. Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior. *Cell.* 2016;167:897-914

参考文献

Lacar B., Linker S. B., Jaeger B. N., et al. Nuclear RNA-seq of single neurons reveals molecular signatures of activation. *Nat Commun.* 2016;7:11022

作者研究了激活神经元处于不同作用和环境下的转录组表达情况。为了减少传统核分离实验方案中的实验误差和噪声,他们开发了一种更温和和更快捷的实验方案。snRNA-Seq 不仅能够产生 IEG 激活的表达图谱,还能够产生 IEG 之外其他激活状态的表达图谱。

Illumina 的技术: HiSeq 2500 系统、Nextera XT DNA Library Prep Kit

相关试剂盒

Nextera XT DNA Library Prep Kit

201. Lacar B., Linker S. B., Jaeger B. N., Krishnaswami S., Barron J., et al. (2016) Nuclear RNA-Seq of single neurons reveals molecular signatures of activation. *Nat Commun* 7: 11022

Nuc-Seq: 来自冷冻组织的单核 RNA 测序

Nuc-Seq 是一种 RNA 测序技术，它为冷冻组织样本分离细胞核 RNA 的过程进行了优化²⁰²。Nuc-Seq 避免了从细胞中分离细胞核时，存在的蛋白水解作用，最大程度减少了常见的蛋白酶裂解过程中引起的基因表达变化；这一步与在 snRNA-seq 中使用的步骤相似。然后，使用 Smart-seq2 合成 cDNA，通过其模板切换机制增加全长 cDNA 的产量。最后，使用 Tn5 转座酶酶法片段化并制备测序文库。

类似的方法：snRNA-seq、Div-Seq



Nuc-seq 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">非依赖于蛋白水解的细胞核分离方式最大程度减少了在细胞核分离过程中造成基因表达上的变化。cDNA 合成过程中，利用 Smart-seq2 的模板切换机制，提升了全长 cDNA 链的产量。FACS 分离增加了通量来自冰冻细胞核的 RNA 比细胞质 RNA 产生的 cDNA 质量更好可用于冷冻组织	<ul style="list-style-type: none">排除了来自细胞质 RNA 的所有信息很难检测到从少量分离出的细胞核 RNA 中的低拷贝的转录本很难检测到 ncRNA 和其他短的非 Poly(A) RNA

Reviews

Jennings C. G., Landman R., Zhou Y., et al. Opportunities and challenges in modeling human brain disorders in transgenic primates. *Nat Neurosci.* 2016;19:1123-1130

参考文献

Krishnaswami S. R., Grindberg R. V., Novotny M., Venepally P., Lacar B., et al. Using single nuclei for RNA-seq to capture the transcriptome of postmortem neurons. *Nat Protoc.* 2016;11:499-524

这项研究为 Nuc-seq 提供了一个深入的实验方案，这是一种可灵敏地从冷冻组织样本中分离细胞核并深度测序的方法。

Illumina 的技术：MiSeq 系统、Nextera XT DNA Library Prep Kit

相关试剂盒

Nextera XT DNA Library Prep Kit

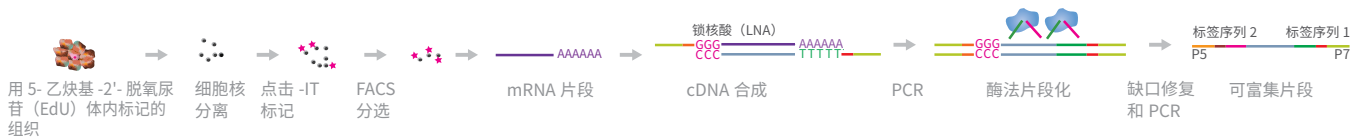
202. Krishnaswami S. R., Grindberg R. V., Novotny M., et al. Using single nuclei for RNA-seq to capture the transcriptome of postmortem neurons. *Nat Protoc.* 2016;11:499-524

Div-Seq: 使用 EdU 介导的标记法对增殖细胞进行核测序

Div-Seq 是一种单细胞核 RNA 测序技术，通过加入 5- 乙炔基 -2'- 脱氧尿苷 (EdU) 标签以识别不同细胞分裂阶段的细胞，在 Nuc-Seq 基础上得到了改进²⁰³。EdU 标签还可用以识别复杂组织样本和 FACS 中罕见细胞群中的不同细胞类型。

简而言之，将样本在体内用 EdU 标记，切割、固定，之后分离成单个细胞核。将单个细胞核用荧光标记并通过 FACS 分选。从这一步开始的过程遵循 Nuc-Seq 方法：使用 Smart-seq2 实验方案合成 cDNA，通过 Tn5 转座酶介导的酶法片段化来制备 cDNA 文库。

类似方法：Nuc-seq、snRNA-seq



Div-Seq 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">追踪单细胞核中的转录组动态变化检测罕见细胞群体对新鲜、冷冻或石蜡包埋的样本类型均可用EdU 标签在识别不同类型的分裂细胞及其在细胞周期中的所处的阶段不存在偏向性。温和的核分离技术最大程度地降低了蛋白酶裂解过程中常见的改变了的基因表达	<ul style="list-style-type: none">排除了来自细胞质 RNA 的所有信息

Reviews

Wagner A., Regev A. and Yosef N. Revealing the vectors of cellular identity with single-cell genomics. *Nat Biotech.* 2016;34:1145-1160

Goncalves J. T., Schafer S. T. and Gage F. H. Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior. *Cell.* 2016;167:897-914

参考文献

Habib N., Li Y., Heidenreich M., Swiech L., Avraham-Davidi I., et al. Div-Seq: Single-nucleus RNA-Seq reveals dynamics of rare adult newborn neurons. *Science.* 2016;

作者开发了 Div-Seq，将增殖细胞的脉冲标记与 EdU 结合，作为对 Nuc-seq 的改良。他们能够追踪成年海马神经原的环境中，新生神经元的转录组特征。他们还用 Div-Seq 鉴定了成年人脊髓中罕见的新生的 GABAergic 神经元。

Illumina 的技术：NextSeq 500 System、Nextera XT DNA Library Prep Kit

相关试剂盒

Nextera XT DNA Library Prep Kit

203. Habib N., Li Y., Heidenreich M., et al. Div-Seq: Single-nucleus RNA-Seq reveals dynamics of rare adult newborn neurons. *Science.* 2016;

SCRB-Seq: 单细胞 RNA 条标签序列添加和测序

SCRB-Seq 是一种经济高效的多重单细胞 mRNA 测序技术²⁰⁴。

SCRB-Seq 使用 FACS 将单细胞分离到孔中。细胞裂解后, 将有 Poly(A)⁺ 的 mRNA 退火至含有 poly(T) 链、UMI、标签序列并有生物素修饰的定制引物。在 mRNA 上进行模板切换逆转录和 PCR 扩增反应, 产生带有标签序列的全长 cDNA。将所有孔的 cDNA 链混合在一起以进行纯化。进一步 PCR 扩增和纯化。使用 Nextera XT 文库制备实验方案和修饰过的 i5 引物制备 cDNA 文库。将所得的 cDNA 片段进行筛选, 选取 300–800 bp 的片段测序。



SCRB-Seq 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">经济高效, 高通量, 单细胞转录图谱分析与普遍的 scRNA-Seq 技术相比, 可以获得高灵敏度的基因检测结果²⁰⁵。	<ul style="list-style-type: none">模板切换逆转录对全长 mRNA 有很强的偏向性²⁰⁶。

Reviews

Ziegenhain C., Parekh S., Vieth B., Smets M., Leonhardt H., et al. Comparative analysis of single-cell RNA-sequencing methods. *bioRxiv*. 2016;

Shapiro E., Biezuner T. and Linnarsson S. Single-cell sequencing-based technologies will revolutionize whole-organism science. *Nat Rev Genet*. 2013;14:618-630

参考文献

Cacchiarelli D., Trapnell C., Ziller M. J., et al. Integrative Analyses of Human Reprogramming Reveal Dynamic Nature of Induced Pluripotency. *Cell*. 2015;162:412-424

为了研究人类细胞中诱导的多功能性, 作者开发了修饰 SCRb-Seq, 以获取单细胞基因组和表观基因组图谱。结果揭示了基因激活网络的独特模式和发育调控因子有序再激活过程。此外, 分析了重新编辑的过程中, 该系统未涉及的新调控因子的补充功能。

Illumina 的技术: HiSeq 2000 System、HiSeq 2500 System、MiSeq System、TruSeq RNA Library Prep Kit、TruSeq Small RNA Library Prep Kit

Anahtar M. N., Byrne E. H., Doherty K. E., et al. Cervicovaginal bacteria are a major modulator of host inflammatory responses in the female genital tract. *Immunity*. 2015;42:965-976

相关试剂盒

Nextera XT DNA Library Prep Kit

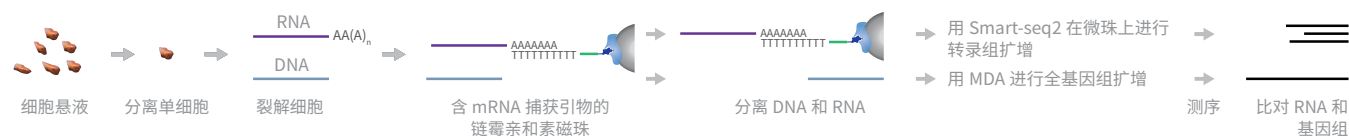
204. Soumillon M., Cacchiarelli D., Semrau S., van Oudenaarden A. and Mikkelsen T. S. Characterization of directed differentiation by high-throughput single-cell RNA-Seq. 2014;

205. Ziegenhain C., Parekh S., Vieth B., et al. Comparative analysis of single-cell RNA-sequencing methods. *bioRxiv*. 2016;

206. Shapiro E., Biezuner T. and Linnarsson S. Single-cell sequencing-based technologies will revolutionize whole-organism science. *Nat Rev Genet*. 2013;14:618-630

G&T-Seq: 基因组和转录组测序

G&T-Seq 可以从单细胞中分离基因组 DNA 和全长 mRNA 并测序。²⁰⁷ 在这种方法中, 单细胞会被分离并裂解。先使用生物素化的 Oligo (dT) 作为捕获引物来捕获 RNA, 然后用链霉亲和素包被磁珠将其与 DNA 分离。用 Smart-seq2 方法扩增微珠所捕获的 RNA, 用多重置换扩增 (MDA) 法来扩增 DNA。测序完成后, 整合 DNA 和 RNA 序列, 以深入了解单细胞的基因表达图谱。



G&T-seq 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">• 可兼容于所有全基因组扩增方法• 由于捕获的是全长转录本, 因此序列 read 无 3'-端偏向性• 由于 DNA 和 RNA 经过物理分离并单独扩增, 因此分析时无需标记编码序列	<ul style="list-style-type: none">• DNA 和 RNA 的物理分离会增加样本损失或污染的风险• DNA 和 RNA 的物理分离会增加处理时间

Reviews

Bock C., Farlik M. and Sheffield N. C. Multi-Omics of Single Cells: Strategies and Applications. *Trends in Biotechnology*. 2016;34:605-608

Clark S. J., Lee H. J., Smallwood S. A., Kelsey G. and Reik W. Single-cell epigenomics: powerful new methods for understanding gene regulation and cell identity. *Genome Biology*. 2016;17:72

Zhang X., Marjani S. L., Hu Z., Weissman S. M., Pan X. and Wu S. Single-Cell Sequencing for Precise Cancer Research: Progress and Prospects. *Cancer Research*. 2016;76:1305-1312

Vieira Braga F. A., Teichmann S. A. and Chen X. Genetics and immunity in the era of single-cell genomics. *Human Molecular Genetics*. 2016;25:R141-R148

Lu L., Lv B., Huang K., Xue Z., Zhu X. and Fan G. Recent advances in preimplantation genetic diagnosis and screening. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 2016;33:1129-1134

参考文献

Angermueller C., Clark S. J., Lee H. J., et al. Parallel single-cell sequencing links transcriptional and epigenetic heterogeneity. *Nat Methods*. 2016;13:229-232

多参数单细胞测序是一种发现基因组、转录组和表观遗传的异质性之间关系的有力工具。在这项研究中, 作者开发了单细胞甲基化组和转录组测序 (scM&T-Seq), 这是一种可以在同一个细胞中进行甲基化组和转录组图谱分析的多参数测序方法。他们采用 G&T-Seq 实验方法, 纯化了经过单细胞亚硫酸氢盐转化 (scBS-Seq) 的单细胞 DNA。作者在 61 只小鼠胚胎干细胞上进行了 scM & T-Seq。他们发现, 许多多功能因子的基因表达水平与 DNA 甲基化呈负相关。上述数据证明, 表观遗传异质性是 ESC 多功能波动的重要机制。他们还证明了 scM&T-Seq 可以阐明单细胞中转录异质性与 DNA 甲基化异质性之间知之甚少的关系。

illumina 的技术: HiSeq 2000 系统、Nextera XT DNA Library Prep Kit

相关试剂盒

Nextera XT DNA Library Prep Kit

TruSeq RNA Library Prep Kit v2

TruSeq Small RNA Library Prep Kit

TruSeq Nano DNA Library Prep Kit

TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit

207. Macaulay I. C., Haerty W., Kumar P., et al. G&T-seq: parallel sequencing of single-cell genomes and transcriptomes. *Nat Methods*. 2015;

scM&T-Seq: 单细胞甲基化组和转录组测序

scM&T-Seq 可以通过 Smart-seq2 和 scBS-seq 对单细胞的表现遗传和基因表达谱并行分析。²⁰⁸ scM&T-Seq 以 G&T-seq 为基础, 但它没有采用 MDA 技术进行 DNA 测序, 而是利用 scBS-Seq 确定 DNA 甲基化谱。

分离单细胞并各自进行细胞裂解。用偶联有链霉亲和素的 mRNA 作为捕获引物来捕获 mRNA, 使其与 DNA 链物理分离。Smart-seq2 采用了模板切换和酶法片段化联用的逆转录方法, 从 mRNA 开始制备成 cDNA 文库。通过 scBS-seq 制备 DNA 文库, 其中包括了用于甲基化胞嘧啶鉴定的 DNA 链亚硫酸氢盐处理。这两个文库均可用于测序。



scM&T-seq 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none">可在单细胞内研究表现遗传上与转录表达上存在不同表现之间的相关关系由于 DNA 和 RNA 经过物理分离并单独扩增, 因此分析时无需标记编码序列	<ul style="list-style-type: none">Smart-seq2 不具有链特异性, 因此仅适用于有 Poly(A)⁺ 的 RNA无法区分 5mC 和 5hmC

Reviews

Clark S. J., Lee H. J., Smallwood S. A., Kelsey G. and Reik W. Single-cell epigenomics: powerful new methods for understanding gene regulation and cell identity. *Genome Biol.* 2016;17:72

Wen L. and Tang F. Single-cell sequencing in stem cell biology. *Genome Biol.* 2016;17:71

参考文献

Hu Y., Huang K., An Q., et al. Simultaneous profiling of transcriptome and DNA methylome from a single cell. *Genome Biol.* 2016;17:88

在这项研究中, 作者开发了在同一单个细胞中同时进行甲基化和转录组谱图分析 (scM&T-Seq) 的方法。该方法与 scM&T-seq 非常相似, 不同的是 scM&T-Seq 使用单细胞简化重亚硫酸氢盐测序 (scRRBS) 进行甲基化组分析。作者对背根神经节 (DRG) 的单个感觉神经元同时进行转录组和 DNA 甲基化组图谱分析, 从而验证了这种方法。他们的数据指出了背根神经节神经元中转录组和 DNA 甲基化组存在不同的表现。他们还发现只有那些含有 CpG 岛启动子基因的基因甲基化和基因表达水平存在正相关关系。

Illumina 的技术: HiSeq 2500 系统、MiSeq 系统

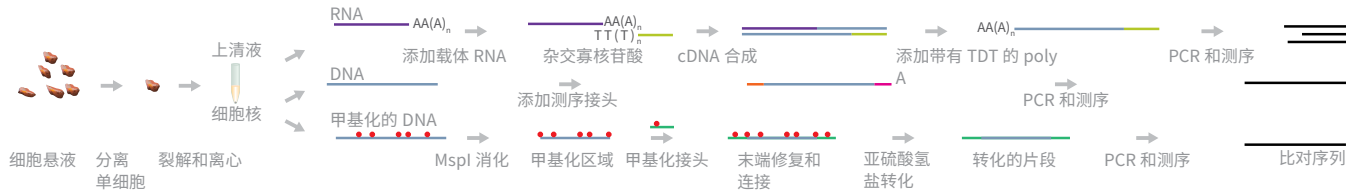
相关试剂盒

Nextera XT DNA Library Prep Kit

208. Angermueller C., Clark S. J., Lee H. J., et al. Parallel single-cell sequencing links transcriptional and epigenetic heterogeneity. *Nat Methods.* 2016;13:229-232

scTrio-seq: 单细胞三重组学测序

scTrio-Seq 可同时分析单个哺乳动物细胞的基因组拷贝数变异、DNA 甲基化组和转录组。²⁰⁹ 该方法是对 scMT-seq 等老方法的扩展。²¹⁰



scTrio-seq 示意图。

优点	缺点
<ul style="list-style-type: none"> 准确分析了转录组、基因组和 DNA 甲基化组之间相互调控的机制 用 scRRBS 数据能够可靠识别 CNV 	<ul style="list-style-type: none"> 在转录组水平上的覆盖度比 scMT-seq 的要低²¹³ 导致转录组具有 3'- 偏向性

Reviews

Bock C., Farlik M. and Sheffield N. C. Multi-Omics of Single Cells: Strategies and Applications. *Trends in Biotechnology*. 2016;34:605-608

Poirion O. B., Zhu X., Ching T. and Garmire L. Single-Cell Transcriptomics Bioinformatics and Computational Challenges. *Frontiers in Genetics*. 2016;7:163

Cheow L. F., Courtois E. T., Tan Y., et al. Single-cell multimodal profiling reveals cellular epigenetic heterogeneity. *Nat Meth*. 2016;13:833-836

Picelli S. Single-cell RNA-sequencing: The future of genome biology is now. *RNA Biology*. 2016;1-14

Qian M., Wang D. C., Chen H. and Cheng Y. Detection of single cell heterogeneity in cancer. *Seminars in Cell & Developmental Biology*.

参考文献

Hou Y., Guo H., Cao C., Li X., Hu B., et al. Single-cell triple omics sequencing reveals genetic, epigenetic, and transcriptomic heterogeneity in hepatocellular carcinomas. *Cell Res*. 2016;26:304-319

作者利用 scTrio-Seq 分析了 25 个取自人类肝细胞癌 (HCC) 组织样本的单细胞。他们发现了 DNA 拷贝数、DNA 甲基化和 RNA 表达水平上存在了 2 个特异亚群。通过比较这 2 个 HCC 亚群间的差异，研究人员发现含有更多拷贝获得的 CNV 的较小亚群 I 表达的入侵细胞标记数量更多，因此其避免免疫监视的可能性更大。

illumina 的技术: HiSeq 2000 系统、HiSeq 2500 系统

相关试剂盒

- TruSeq Nano DNA Sample Prep Kit
- TruSeq DNA PCR-Free Sample Prep Kit
- Nextera DNA Sample Prep Kit
- Nextera XT DNA Sample Prep Kit
- Nextera Rapid Capture Exome/Custom Enrichment Kit

209. Hou Y., Guo H., Cao C., et al. Single-cell triple omics sequencing reveals genetic, epigenetic, and transcriptomic heterogeneity in hepatocellular carcinomas. *Cell Res*. 2016;26:304-319

210. Hu Y., Huang K., An Q., et al. Simultaneous profiling of transcriptome and DNA methylome from a single cell. *Genome Biol*. 2016;17:88

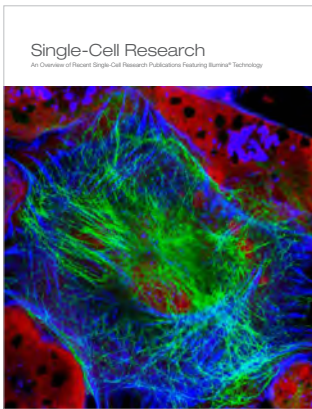
更多科学文献综述，请访问 www.illumina.com/pubreviews



DNA 测序方法合集

本出版物是针对 DNA 测序的新一代测序（NGS）方法合集，汇编自科学文献。谨以此合集向使用人员的创新及该技术方法的多功能性致敬。我们希望它能够启发研究人员对这些方法加以利用或开发新方法，以解决新的科研难题。

本合集所称的方法指的是提取核酸（样本制备）与添加测序所需寡核苷酸接头（文库制备）之间的处理步骤。该技术仅需额外增加若干处理步骤，即可解决多种科研问题。



单细胞研究综述

单细胞组织测序的主要动力来自癌症研究，其中细胞谱系和残留疾病的检测是我们最关心的问题。我们正利用相同的方法，来改善我们对高度复杂的生物学系统的了解，比如神经发育和免疫学。

这篇文档着重突出了最近发表的一些文献，它们证明了 Illumina 技术在单细胞测序以及极低起始量的应用和技术中的使用。



基因编辑研究综述

CRISPR-Cas9 是最新开发的基因组编辑技术，研究人员可以通过该技术方便快捷地执行准确的基因操作。该技术应用范围很广。与其他分子生物学技术一样，研究的关键是获得高度特异性的结果。这篇综述重点展示了最近发表的一些文献，介绍了将基因组技术和高通量测序用于 CRISPR-Cas9 实验，以检验特异性和全基因组的脱靶效应相关研究。

本科学文献综述由 Illumina 公司出品。

Illumina 中国

上海办公室 · 电话 (021) 6032-1066 · 传真 (021) 6090-6279
北京办公室 · 电话 (010) 8455-4866 · 传真 (010) 8455-4855
技术支持热线 400-066-5835 · techsupport@illumina.com · www.illumina.com.cn
仅供研究使用。不得用于诊断。

© 2017 Illumina, Inc. 保留所有权利。Pub. No. 470-2017-001



@illumina_china



@illumina

illumina[®]