

科学研究

- ▶ 科研进展 — 2023年
- ▶ 科研成果
- ▶ 科研项目
- ▶ 科研季刊

2022年

首页 > 科学研究 > 科研进展 > 2022年

Nature Biotechnology | 胡璐璐与合作者报道m6A定量测序新方法

发表时间: 2022-03-15 | 阅读次数: 7512次 | 字体大小 [小 中 大]

以往认为中心法则中DNA主要发挥模板的作用而使RNA (mRNA) 则扮演着信息传递者的角色。mRNA表观修饰的发现拓展了mRNA的功能。在RNA水平上的转录后修饰可通过顺式或者反式机理调控基因表达, 对细胞功能、细胞命运决定至关重要。尽管科学家们长时间以来了解RNA上存在转录后修饰, 而这些修饰直到近年来才被认为从另一层面增加了基因表达调控的复杂性。迄今为止, RNA上共发现有多于150种化学修饰, 包括m6A、m1A、pseudouridine、m5C等 (图1)。这些修饰在“表观转录组”这一新颖且关键的层面调控基因的表达。

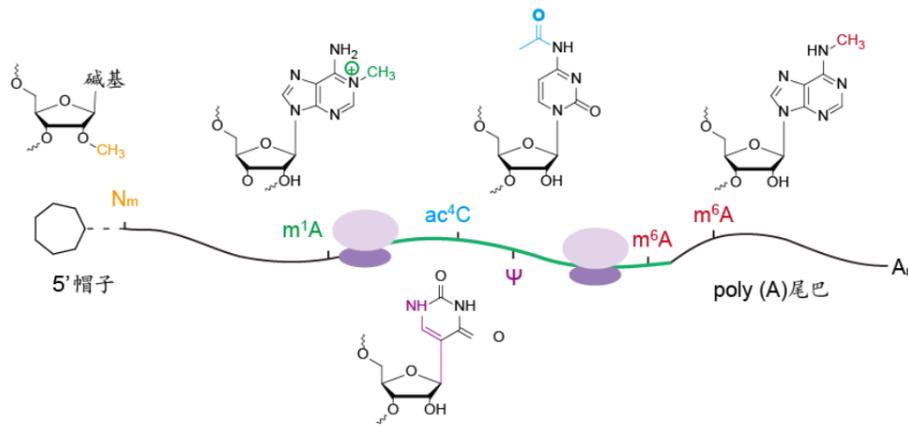


图1: mRNA常见的集中化学修饰, 包括m6A、m1A、pseudo uridine(ψ)、m5C等。

m6A是mRNA内部含量最多, 也是迄今研究最广泛的修饰。m6A修饰最早发现于1974年, 是哺乳动物mRNA内部最主要的修饰形式, 早期的研究工作表明m6A通常出现在(G/A)(m6A)C经典序列中, 其效应蛋白包括加上m6A修饰的“书写者”, 擦掉m6A修饰的“擦除者”, 以及识别m6A修饰的“识别者” (图1)。RNA甲基化转移酶METTL3/14形成稳定的核心复合体作为“书写者”将mRNA上加上N6甲基化修饰。去甲基化酶FTO11和ALKBH5则作为“擦除者”将该修饰去除。“书写者”和“擦除者”动态调控了RNA m6A的修饰水平。m6A的识别蛋白含有YTH结构域, 包括YTHDF1-3, YTHDC1-2, 这些“识别者”识别RNA的m6A修饰并招募该RNA到特殊的蛋白复合体中, 从而通过影响mRNA的代谢过程如剪接、出核、降解和翻译等调控基因表达, 在发育, 生理和病理过程中扮演重要角色。

最早的m6A修饰的全转录组图谱发表于2012年 (m6A-Seq 或者 MeRIP-Seq), 使用m6A抗体富集含有m6A的RNA片段, 产生分辨率100~200 nt的图谱。目前RNA m6A主流的测序方法依然是基于抗体的MeRIP, 但该测序方法存在明显的缺点, 包括分辨率低, 无法定量, 比较不同条件下m6A差异有局限性, 以及建库需要大量的RNA, 不能应用于单细胞水平的研究等。近年来陆续开发的m6A测序方法 (如Mazter-seq, m6A-REF-seq, DART-seq, m6A-SEAL, m6A-label-seq等) 也只是部分解决了上述提及的局限性。

2022年3月15日, 我院胡璐璐研究员与芝加哥大学何川教授、美国希望之城陈建军教授和芝加哥大学陈梦洁教授合作在Nature Biotechnology杂志上发表了题为m6A RNA modifications are measured at single-base resolution across the mammalian transcriptome的文章, 该研究开发的新方法m6A-SAC-Seq (Selective Allyl Chemical labeling and Sequencing)可直接标记m6A, 能够覆盖几乎所有的m6A经典基序, 并对捕获的m6A位点进行单碱基分辨率的定量分析 (图2)。该方法不依赖于抗体, 可以实现对微量RNA样本 (30ng ribo- RNA) 的m6A位点分析, 可在单碱基分辨率水平追踪m6A分布和含量的动态变化。m6A-SAC-Seq技术是目前唯一可以广泛应用于各个生物学背景的方法, 在基础生物学研究和临床应用中均有良好的前景。



m⁶A RNA modifications are measured at single-base resolution across the mammalian transcriptome

Lulu Hu^{1,2,3,4,12,13}, Shun Liu^{1,2,3,5,6,12}, Yong Peng^{1,2,3,5,6,12}, Ruiqi Ge^{1,2,3,12}, Rui Su^{7,12}, Chamara Senevirathne⁸, Bryan T. Harada^{1,2,3}, Qing Dai^{1,2,3}, Jiangbo Wei^{1,2,3}, Lisheng Zhang^{1,2,3}, Ziyang Hao^{1,2,3}, Liangzhi Luo^{1,2,3}, Huanyu Wang^{1,2,3}, Yuru Wang^{1,2,3}, Minkui Luo^{8,9}, Mengjie Chen^{5,6,13}, Jianjun Chen^{7,10,11,13} and Chuan He^{1,2,3,13}

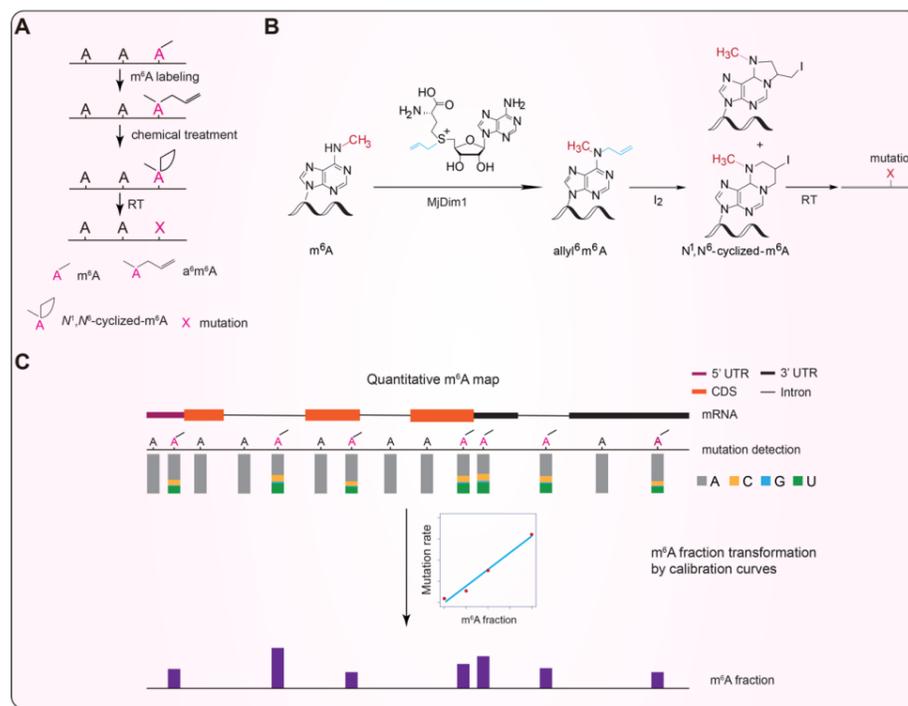


图2: m6A-SAC-Seq策略图。(A和B)使用特定的酶将m6A加上一个烯丙基的化学基团成为allyl-m6A, 经过特殊的化学反应, 发生成环反应, 环化的allyl-m6A在逆转录时会被逆转录酶读成突变, 根据突变的位点检测出m6A在转录组中的位置, 通过突变率经过标准曲线换算获得m6A的准确的含量信息(C)。

研究人员使用m6A-SAC-seq技术在HeLa、HEK293和HepG2细胞系中各鉴定了大约一万个带有m6A含量信息的位点(图3A), 并且这些位点在转录本上的分布集中在终止密码子附近、CDS和3' UTR(图3B和3C), 符合之前的报道。通过结合分析RNA降解(decay)测序数据, 研究人员还发现m6A含量和RNA半衰期呈现明显的负相关性, 即m6A含量高的转录本更倾向于拥有短的更新周期(lifetime)(图3D和3E), 这个结论进一步阐明了m6A修饰在调控mRNA更新过程(turnover)的规律。

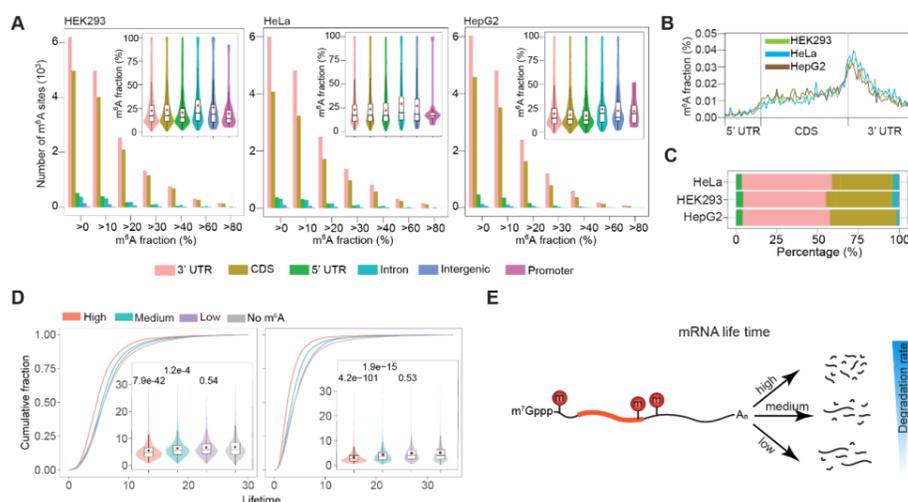


图3: 利用m6A-SAC-seq技术鉴定的m6A位点的含量和在转录本上的分布特征(A、B和C); 高、中、低m6A含量的转录本的更新周期的累积分布曲线图(D)和m6A调控转录本更新过程的机制图(E)。

此外, 研究人员还使用m6A-SAC-Seq技术成功绘制了人脐带血来源的造血干细胞(HSPC)分化为单核细胞(monocyte)的m6A含量动态图谱(图4)。在分化过程中, mRNA不同区域的m6A位点在分化过程中显示出其在mRNA不同区域之间的大量重新分布和动态变化(图4A)。为进一步揭示m6A含量在该分化过程中的变化规律, 研究人员根据mRNA在5' UTR、CDS、3' UTR和intron区域中的m6A含量变化进行了两类分组, 即动态(dynamic)修饰和稳定(stable)修饰。随后的功能富集分析表明, 维持基本细胞存活功能, 即与DNA修复、损伤、完整性和细胞周期的通路相关的基因往往会发生动态的m6A含量变化, 而参与骨髓细胞活化、免疫反应、RNA剪接和分解代谢过程的基因的m6A含量更趋于稳定(图4B)。作者们经过分析确定了在连续两个时间点之间具有显著差异基因表达和m6A含量的候选转录本, 并发现了这些转录本部分编码了对单核细胞发育调节至关重要的转录因子(TF)。例如, 在第6天到第9天分化过程中, KLF4的CDS中m6A甲基化的含量随着转录本丰度提高而增加; 在第0天到第3天分化过程中, ERG1、SPI1和CEBPA中3' UTR m6A甲基化的m6A含量减少, 转录本丰度增加(图4C)。有趣的是, 这些候选转录本还显著富集于主要转录因子(master TF, 即对HSPC的发育过程至关重要的TF)的靶标集(图4D)。这些主要转录因子包括SP1、SPI1、NFKB1、RELA、STAT3和TP53等。

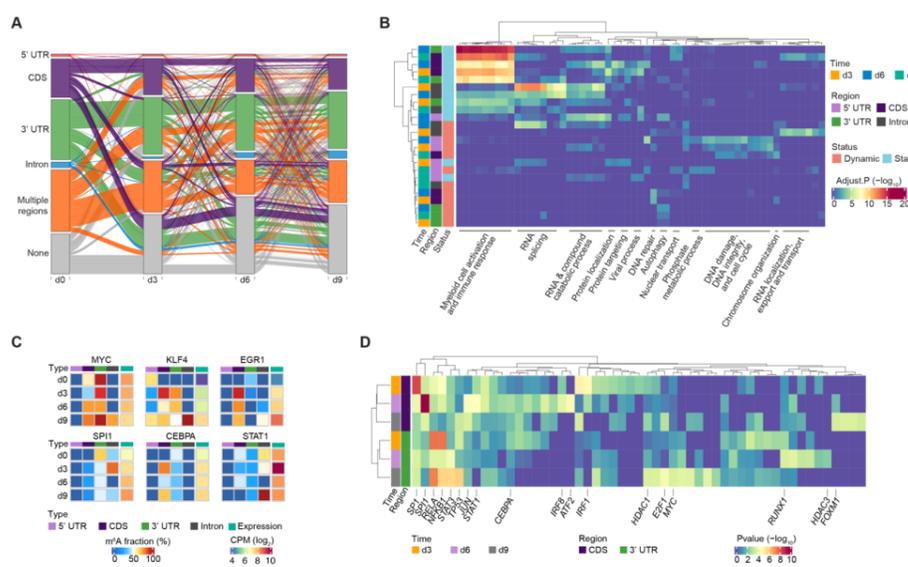


图4: A, 人脐带血来源的造血干细胞分化为单核细胞生成过程中mRNA特征区域的整体m6A动态变化。B, 造血干细胞分化过程中不同转录本区域中具有动态或稳定m6A修饰基因的功能富集分析热图。C, 关键转录因子转录本m6A含量变化和表达水平变化的示例图。D, m6A含量在CDS和3' UTR变化显著以及基因表达变化显著的转录本在转录因子调控的靶标集中的富集热图。

该研究展示了m6A-SAC-Seq技术在细胞分化(图5)、早期发育、神经元信号传导和临床样本中获得全转录组m6A含量变化的潜力。值得注意的是, 虽然本研究中, m6A-SAC-Seq技术需要30ng的mRNA, 研究人员后续对该方法进行了优化, 目前的实验流程仅仅需要2ng的mRNA。m6A-SAC-Seq技术有望

成为攻克当前定量 m6A 测序技术瓶颈并引领新生物学发现的“金标准”。

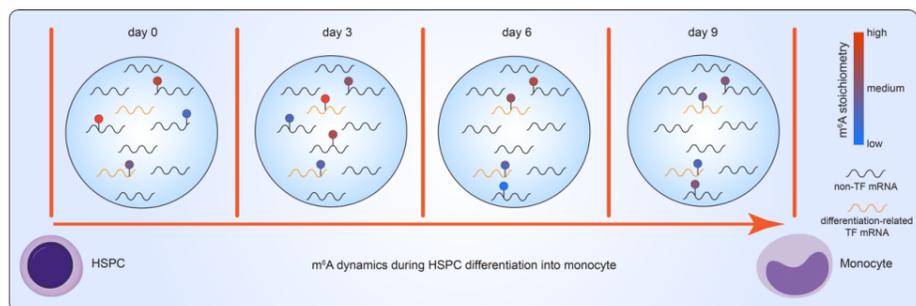


图5：利用m6A-SAC-seq技术研究造血干细胞分化过程中m6A的动态变化

我院胡璐璐研究员、芝加哥大学何川课题组的刘顺博士、彭勇博士、葛睿琦博士研究生以及美国希望之城苏瑞研究员为本论文的共同第一作者，何川教授、陈建军教授、陈梦洁教授和胡璐璐研究员为共同通讯作者。

原文链接：

<https://www.nature.com/articles/s41587-022-01243-z>

友情链接

复旦常用站点

复旦院系链接

其他高校链接

Copyright©2022复旦大学生物医学研究院版权所有
地址：上海市徐汇区医学院路138号科研二号楼

邮编：200032
电话：021-54237325

邮箱：biomed-nl@fudan.edu.cn