



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113817803 A

(43) 申请公布日 2021.12.21

(21) 申请号 202010558491.7

(22) 申请日 2020.06.18

(71) 申请人 上海科技大学

地址 201210 上海市浦东新区华夏中路393号

(72) 发明人 黄鹏羽 王鹤鸣 黄荣 李玲

(74) 专利代理机构 上海光华专利事务所(普通合伙) 31219

代理人 朱凌娇 许亦琳

(51) Int. Cl.

G12Q 1/6806 (2018.01)

G12Q 1/6869 (2018.01)

C40B 50/06 (2006.01)

权利要求书1页 说明书5页  
序列表1页 附图5页

(54) 发明名称

一种携带修饰的小RNA的建库方法及其应用

(57) 摘要

本发明提供一种携带修饰的小RNA的建库方法,至少包括如下步骤:1)利用去甲基化试剂去除携带修饰的小RNA的甲基化修饰;2)利用第一转化剂使携带修饰的小RNA的5'端的5'-OH转化为5' P,3' P端转化为3'-OH;3)利用第二转化剂使携带修饰的小RNA的5'端的5-cap转化为5' P;4)将携带修饰的小RNA上连接测序接头;5)利用包括逆转录酶在内的逆转录试剂将携带修饰的小RNA反转录成cDNA;6)将cDNA纯化后进行PCR扩增,获得携带修饰的小RNA的测序文库。本发明提供了一种新的小RNA建库方法为携带修饰的小RNA提供了一个强大的灵敏的分析工具进而为生命体内丰富复杂的携带修饰小RNA的功能及其在生理病理等过程中的角色扮演奠定坚实的研究基础。

1. 一种携带修饰的小RNA的建库方法,至少包括如下步骤:
  - 1) 利用去甲基化试剂去除携带修饰的小RNA的甲基化修饰;
  - 2) 利用第一转化剂使携带修饰的小RNA的5'端的5'-OH转化为5' P,3' P端转化为3'-OH;
  - 3) 利用第二转化剂使携带修饰的小RNA的5'端的5-cap转化为5' P;
  - 4) 将携带修饰的小RNA上连接测序接头;
  - 5) 利用包括逆转录酶在内的逆转录试剂将携带修饰的小RNA反转录成cDNA;
  - 6) 将cDNA纯化后进行PCR扩增,获得携带修饰的小RNA的测序文库。
2. 如权利要求1所述的携带修饰的小RNA的建库方法,其特征在于,还包括以下特征中的一项或多项:
  - a. 所述携带修饰的小RNA为末端及内部携带修饰的小RNA;
  - b. 所述携带修饰的小RNA的核苷酸长度为15-40nt。
3. 如权利要求1所述的携带修饰的小RNA的建库方法,其特征在于,步骤1)中,所述甲基化修饰包括N1-甲基腺苷,N3-甲基胞嘧啶和N1-甲基鸟苷甲基化修饰。
4. 如权利要求1所述的携带修饰的小RNA的建库方法,其特征在于,步骤1)中,所述去甲基化试剂选自大肠杆菌衍生的AlkB及其D135S突变株的混合物。
5. 如权利要求1所述的携带修饰的小RNA的建库方法,其特征在于,步骤2)中,所述第一转化剂能够将小RNA3端的3'-P或2',3'-cP去磷酸化基团以转化为3'-OH及5'端的5'-OH转化为5' P。
6. 如权利要求5所述的携带修饰的小RNA的建库方法,其特征在于,步骤2)中,所述第一转化剂选自T4多核苷酸激酶。
7. 如权利要求1所述的携带修饰的小RNA的建库方法,其特征在于,步骤3)中,所述第二转化剂选自RNA5'焦磷酸水解酶。
8. 如权利要求1所述的携带修饰的小RNA的建库方法,其特征在于,步骤4)中,所述测序接头中包含UMI片段。
9. 如权利要求1所述的携带修饰的小RNA的建库方法,其特征在于,步骤5)中,所述逆转录酶选自热稳定的II类内含子逆转录酶。
10. 如权利要求1-9所述的携带修饰的小RNA的建库方法在基因测序领域中的用途。

## 一种携带修饰的小RNA的建库方法及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及基因测序领域,特别是涉及一种携带修饰的小RNA的建库方法及其应用。

### 背景技术

[0002] 非编码RNA中包含多种小RNA如siRNA、miRNA、piRNA等,它们组成了细胞中高度复杂的小RNA调控网络,在调节个体发育、细胞增殖分化、肿瘤的发生发展及抗病毒等整个细胞水平几乎所有事件中起着重要的调控作用。

[0003] 近年来随着高通量RNA测序(RNA-seq)技术的发展,我们认识了细胞中丰富的RNA世界。同时大量的新类型的小RNA在不同的物种中被发现和报道,其中有tsRNA(tRNA来源的小RNA),rsRNA(rRNA来源的小RNA),rasiRNA(重复相关的siRNA),hcRNA(异染色质RNA)和PASR/TASR(启动子终止子相关的小RNA)等。传统的RNA-seq是在RNA的末端加上接头,再利用与3'端接头互补的引物进行逆转录。这种方法适用于结构特征为5'-磷酸基团,3'-羟基基团的转录本,绝大多数miRNA符合此类结构,故针对miRNA的测序技术相对成熟。然而,对于末端或内部携带修饰的小RNA,由于其会干扰末端接头的连接或阻碍反转录进程,从而使得大量带修饰的小RNA不能被成功建库,进而被当做垃圾片段而忽略。2015年《Nature Methods》上的两篇文章通过在文库制备前用酶处理去除tRNA的修饰,解决了tRNA测序的技术难题。同时,该方法发掘了大量携带甲基化修饰核苷的tRNA-fragment。很多研究表明tRNA也能被切割成更小的RNA,其丰度甚至比microRNA更丰富。tRNA-fragment的相关研究表明其参与了细胞增殖,肿瘤形成,干细胞发育,跨代遗传等过程。这些研究成果都说明,生命体中存在着丰富的携带修饰的小RNA,它们蕴藏大量的生物学信息与机体发育,肿瘤形成等多种生理病理的发生发展密切相关,亟待进一步被发掘研究。

[0004] 建立能够捕获末端及内部携带修饰的小RNA建库方法是发掘和完善小RNA及深入研究其潜在功能的首要待攻克技术壁垒。

### 发明内容

[0005] 鉴于以上所述现有技术的缺点,本发明的目的在于提供一种携带修饰的小RNA的建库方法及其应用。

[0006] 为实现上述目的及其他相关目的,本发明第一方面提供一种携带修饰的小RNA的建库方法,至少包括如下步骤:

[0007] 1) 利用去甲基化试剂去除携带修饰的小RNA的甲基化修饰;

[0008] 2) 利用第一转化剂使携带修饰的小RNA的5'端的5'-OH转化为5' P,3' P端转化为3'-OH;

[0009] 3) 利用第二转化剂使携带修饰的小RNA的5'端的5-cap转化为5' P;

[0010] 4) 将携带修饰的小RNA上连接测序接头;

[0011] 5) 利用包括逆转录酶在内的逆转录试剂将携带修饰的小RNA反转录成cDNA;

[0012] 6) 将cDNA纯化后进行PCR扩增,获得携带修饰的小RNA的测序文库。

[0013] 本发明第二方面提供前述携带修饰的小RNA的建库方法在基因测序领域中的用途。

[0014] 如上所述,本发明的,具有以下有益效果:本发明提供了一种新的小RNA建库方法,克服了甲基化在反转录过程中的阻碍;利于末端接头的有效连接;具有优越的持续性和保真度;降低了由于PCR扩增而导致的序列丰度的偏好性,数据分析真实可靠;为携带修饰的小RNA提供了一个强大的灵敏的分析工具进而为生命体内丰富复杂的携带修饰小RNA的功能及其在生理病理等过程中的角色扮演奠定坚实的研究基础。

## 附图说明

[0015] 图1a:本发明APR-seq的原理及流程简略图。

[0016] 图1b:HEK293T细胞中不同建库方法对应的小RNA种类注释图,NEBNext-seq被用作标准的小RNA-seq方法作为对照。

[0017] 图2:APR-seq揭示HEK293T细胞中存在携带广泛修饰的tRNA来源的小RNA。a. 各种酶处理的建库法对应的tRNA来源的小RNA的长度分布和对应的丰度图;b. 各种酶处理的建库法对包含m1A、m1G和m3C的tRNA片段的检测分析;c. 不同类型tRNA衍生片段的示意图及其在不同酶处理的建库法中所占比例的饼图。

[0018] 图3a:APR-seq可检测到snRNA来源的5'端具有帽子结构的小RNA;不同酶处理的建库方法中snRNA来源的小RNA的长度分布及其对应丰度的分析。

[0019] 图3b:APR-seq可检测到snRNA来源的5'端具有帽子结构的小RNA;不同酶处理的建库方法中RNU1来源的短片段的长度分布及其丰度的分析;

[0020] 图3c:APR-seq可检测到snRNA来源的5'端具有帽子结构的小RNA;用与RNU1 5'互补的序列作为探针对不同酶处理的小RNA进行Northern杂交,可观察到RppH处理成功将RNU1的5'端帽子去除从而使得其可以被核酸外切酶XRN1所切割。

## 具体实施方式

[0021] 以下通过特定的具体实例说明本发明的实施方式,本领域技术人员可由本说明书所揭露的内容轻易地了解本发明的其他优点与功效。本发明还可以通过另外不同的具体实施方式加以实施或应用,本说明书中的各项细节也可以基于不同观点与应用,在没有背离本发明的精神下进行各种修饰或改变。

[0022] 在进一步描述本发明具体实施方式之前,应理解,本发明的保护范围不局限于下述特定的具体实施方案;还应当理解,本发明实施例中使用的术语是为了描述特定的具体实施方案,而不是为了限制本发明的保护范围;在本发明说明书和权利要求书中,除非文中另外明确指出,单数形式“一个”、“一”和“这个”包括复数形式。

[0023] 当实施例给出数值范围时,应理解,除非本发明另有说明,每个数值范围的两个端点以及两个端点之间任何一个数值均可选用。除非另外定义,本发明中使用的所有技术和科学术语与本技术领域技术人员通常理解的意义相同。除实施例中使用的具体方法、设备、材料外,根据本技术领域的技术人员对现有技术的掌握及本发明的记载,还可以使用与本发明实施例中所述的方法、设备、材料相似或等同的现有技术的任何方法、设备和材料来实

现本发明。

[0024] 本发明所述的所有试剂并不仅限于液体形式,只要能够实现相应功能均可。

[0025] 除非另外说明,本发明中所公开的实验方法、检测方法、制备方法均采用本技术领域常规的分子生物学、生物化学、染色质结构和分析、分析化学、细胞培养、重组DNA技术及相关领域的常规技术。

[0026] 本发明中携带修饰的小RNA的建库方法也称为APR-seq或APR。

[0027] 如图1a所示,本申请一实施例提供的携带修饰的小RNA的建库方法,至少包括如下步骤:

[0028] 1) 利用去甲基化试剂去除携带修饰的小RNA的甲基化修饰;

[0029] 2) 利用第一转化剂使携带修饰的小RNA的5'端的5'-OH转化为5' P,3' P端转化为3'-OH;

[0030] 3) 利用第二转化剂使携带修饰的小RNA的5'端的5-cap转化为5' P;

[0031] 4) 将携带修饰的小RNA上连接测序接头;

[0032] 5) 利用包括逆转录酶在内的逆转录试剂将携带修饰的小RNA反转录成cDNA;

[0033] 6) 将cDNA纯化后进行PCR扩增,获得携带修饰的小RNA的测序文库。

[0034] 进一步的,所述甲基化修饰是指m1A、m1G、m3C的一类甲基化修饰。

[0035] 所述携带修饰的小RNA是指所述小RNA所携带的修饰基因选自m1A、m1G、m3C及5'-OH、3'-P、5'-cap中的一种或多种。携带此类修饰的小RNA用本发明所述方法进行建库测序其检测效率会显著提高。

[0036] 可选的,所述携带修饰的小RNA为末端及内部携带修饰的小RNA。

[0037] 所述携带修饰的小RNA的核苷酸长度为15-40nt。

[0038] 进一步的,步骤1)中,所述甲基化修饰包括N1-甲基腺苷(m1A),N3-甲基胞嘧啶(m3C)和N1-甲基鸟苷(m1G)甲基化修饰。克服了甲基化在反转录过程中的阻碍。

[0039] 在一种实施方式中,步骤1)中,所述去甲基化试剂选自大肠杆菌衍生的AlkB及其D135S突变株的混合物。

[0040] AlkB和AlkB D135S突变株的筛选方法可参考Zheng,G.et al.Efficient and quantitative high-throughput tRNA sequencing.Nat Methods 12,835-837,doi:10.1038/nmeth.3478(2015)。

[0041] 步骤2)和步骤3)有利于末端接头的有效连接。

[0042] 进一步的,步骤2)中,所述第一转化剂能够将小RNA3端的3'-P或2',3'-cP去磷酸化基团以转化为3'-OH及5'端的5'-OH转化为5' P。

[0043] 在一种实施方式中,步骤2)中,所述第一转化剂选自T4多核苷酸激酶(T4PNK)。

[0044] 在一种实施方式中,步骤3)中,所述第二转化剂选自RNA5'焦磷酸水解酶(RppH)。

[0045] 其中,T4PNK能够将5'-OH转化为5'-P,RppH能够将RNA 5'-cap转化为5'-P。

[0046] 进一步的,步骤4)中,所述测序接头中包含UMI片段。UMI的使用很大程度降低了由于PCR扩增而导致的序列丰度的偏好性,进而使得数据分析更加真实可靠。

[0047] 在一种优选的实施方式中,所述UMI片段的核苷酸序列如SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2所示,具体的:

[0048] 5'-GUUCAGAGUUCUACAGUCCGACGAUC(N:25:25:25:25:25:25)(N)(N)(N)(N)(N)(N)-

3'; (SEQ ID NO:1)

[0049] 此序列为5端接头,其中(N)(N)(N)(N)(N)(N)代表UMI(N=A U C G等比例)。

[0050] 5'-P-(N:25:25:25:25:25:25:25:25:25)(N)(N)(N)(N)(N)(N)(N)(N) AGATCGGAAGAGCACACGTC-3ddC-3'; (SEQ ID NO:2)

[0051] 此序列为3端接头,其中(N)(N)(N)(N)(N)(N)(N)(N)代表UMI(N=A T C G等比例)。

[0052] 进一步的,步骤5)中,所述逆转录酶选自热稳定的II类内含子逆转录酶(TGIRT)。用热稳定的II类内含子逆转录酶(TGIRT)来替代传统的反转录酶(AMV或MMLV来源的反转录酶),在结构复杂和重修饰RNA的逆转录过程中具有优越的持续性和保真度。

[0053] 前述的携带修饰的小RNA的建库方法可以用于基因测序领域。

[0054] 实施例1

[0055] 以在人胚胎肾细胞系HEK293T细胞中的分析为例:

[0056] APR组:

[0057] 步骤1)用mirVana miRNA Isolation(Life Technologies)试剂盒将小RNA进行分离纯化,

[0058] 步骤2)取2ug小RNA与去甲基化酶A1kB和A1kB(D135S)混合物在去甲基化酶反应缓冲液(300mM KCl,2mM MgCl<sub>2</sub>,50μM of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Fe(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O,300μM 2-ketoglutarate(2-KG),2mM l-ascorbic acid,50/ml BSA,50mM MES buffer,pH 5.0@37°C)及RNase抑制剂条件下37°C孵育2小时充分去除相应甲基化修饰;

[0059] 步骤3)往反应体系中加入5mM EDTA终止该酶促反应并用酚氯仿和乙醇对RNA进行纯化;

[0060] 步骤4)纯化后的RNA用20U T4PNK(NEB)在其反应缓冲液及1mM ATP(NEB牌)条件下37°C孵育90分钟对小RNA末端进行修复并用酚氯仿和乙醇对RNA进行纯化;反应缓冲液的成分如下:(70mM Tris-HCl,10mM MgCl<sub>2</sub>,5mM DTT,pH 7.6@25°C)

[0061] 步骤5)用RppH(NEB)在Thermopol Buffer(NEB)反应缓冲液中37°C孵育2小时将RNA 5'-cap的焦磷酸键水解产生末端为5'-P的RNA;

[0062] 步骤6)用酚氯仿和乙醇对RNA进行纯化。

[0063] 步骤7)以上三步酶促反应后纯化的RNA,用T4 RNA ligase 2 truncated KQ(NEB)和T4 RNA Ligase 1(NEB)分别连接包含UMI的3'接头和5'接头;

[0064] 步骤8)用200units TGIRT-III在NaCl、dNTPs、二硫苏糖醇、RNase抑制剂混合条件下57°C孵育2h进行反转录;

[0065] 步骤9)RNA在含8M尿素15%的聚丙烯酰胺变性胶中进行跑胶分离并对相应RNA 15至50nt区间进行切胶纯化;

[0066] 步骤10)配制NEBNext Ultra II Q5Master Mix、SR Primer、Index(13-24)Primer及补充nuclease-free水至终体积50μL的反应体系在98°C 10s、61°C 30s及72°C延伸15s的条件下进行15轮PCR扩增。PCR产物在6%的聚丙烯酰胺胶中进行电泳并将140bp至200bp区间大小的片段进行切胶纯化;

[0067] 步骤11)进行Illumina HiSeq X10paired-end 2x 150bp测序。

[0068] 步骤12)Illumina测序后用Bowtie(1.0.0)对小RNA种类进行注释、不同酶处理差

异性分析等相关生物信息学分析。

[0069] AlkB mix RppH组:与APR组的区别在于,不包括步骤4),其余皆相同;

[0070] AlkB mix T4PNK组:与APR组的区别在于,不包括步骤5)和步骤6),其余皆相同;

[0071] AlkB mix组:与APR组的区别在于,不包括步骤4)、步骤5)和步骤6),其余皆相同;

[0072] Untreated组:与APR组的区别在于,不包括步骤2)-步骤6),其余皆相同;

[0073] NEBNext组:根据根据NEB公司生产的NEBNext Multiplex Small RNA Library Prep Set for Illumina试剂盒中的说明书进行建库。

[0074] 如图1b所示,结果表明不同的建库方法对各种小RNA的捕获能力不同。miRNA的比例从20.7% (NEBNext标准小RNA-seq)显著下降到0.15% (APR-seq)。这是由于从其他小RNAs (如tRNAs和snRNAs等衍生的小RNAs)的检测显著增加所导致的。这表明本发明的APR-seq方法能够检测到更加丰富的之前未被捕获的小RNAs。

[0075] 由于tRNA及其来源的小RNA具有丰富的甲基化修饰,为了评估APR-seq对携带甲基化修饰的小RNA的检测性能,本发明在此集中分析tRNA来源的小RNA。如图1所示,得益于TGIRT优越的持续性和保真度,与传统的NEBNext-seq方法相比,TGIRT处理组读取到的tRNA来源的小RNA比例从4.52%上升至15.19%,AlkB及其D135S突变体的混合物处理进一步将比例增加到48.73%。如图2中的a图所示,AlkB及其D135S突变体的混合物处理显著增加了tRNA 3'-fragment的检测。T4PNK处理则进一步促进了tRNA 5'-fragment的检测。RppH处理对tRNAs的测序没有明显的影响,这与tRNAs缺乏5-cap结构有关;从图2中的b图中,我们可以看到APR-seq方法可以对携带m1A,m1G和m3C的tRNA片段进行有效的检测;图2中的c图中,可以观察到T4-PNK处理对由ANG加工产生的3'-P或5'-OH的tRNA halves的检测也显著增加。

[0076] 本发明发现用NEBNext标准方法无法检测到snRNAs来源的小RNAs (图3a)。当使用更为高效的逆转录酶TGIRT时,TGIRT处理组读取到的snRNAs来源的小RNAs显著增加,但是如图3a中所示,snRNAs来源的5'端小RNA仍然基本无法检测到。在APR-seq中,本发明使用RppH介导小RNA的去帽反应后可以显著检测到来自snRNAs 5'端的小RNA (图3a,b)。该分析结果进一步被Northern blot所验证 (图3c)。

[0077] 以上所述,仅为本发明的较佳实施例,并非对本发明任何形式上和实质上的限制,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员,在不脱离本发明方法的前提下,还将可以做出若干改进和补充,这些改进和补充也应视为本发明的保护范围。凡熟悉本专业的技术人员,在不脱离本发明的精神和范围的情况下,当可利用以上所揭示的技术内容而做出的些许更动、修饰与演变的等同变化,均为本发明的等效实施例;同时,凡依据本发明的实质技术对上述实施例所作的任何等同变化的更动、修饰与演变,均仍属于本发明的技术方案范围内。

## 序列表

<110> 上海科技大学

<120> 一种携带修饰的小RNA的建库方法及其应用

<160> 2

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 33

<212> DNA/RNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 1

guucagaguu cuacaguccg acgauennnn nnn 33

<210> 2

<211> 33

<212> DNA/RNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<400> 2

nnnnnnnnnn agatcggaag agcacacgtc ddc 33

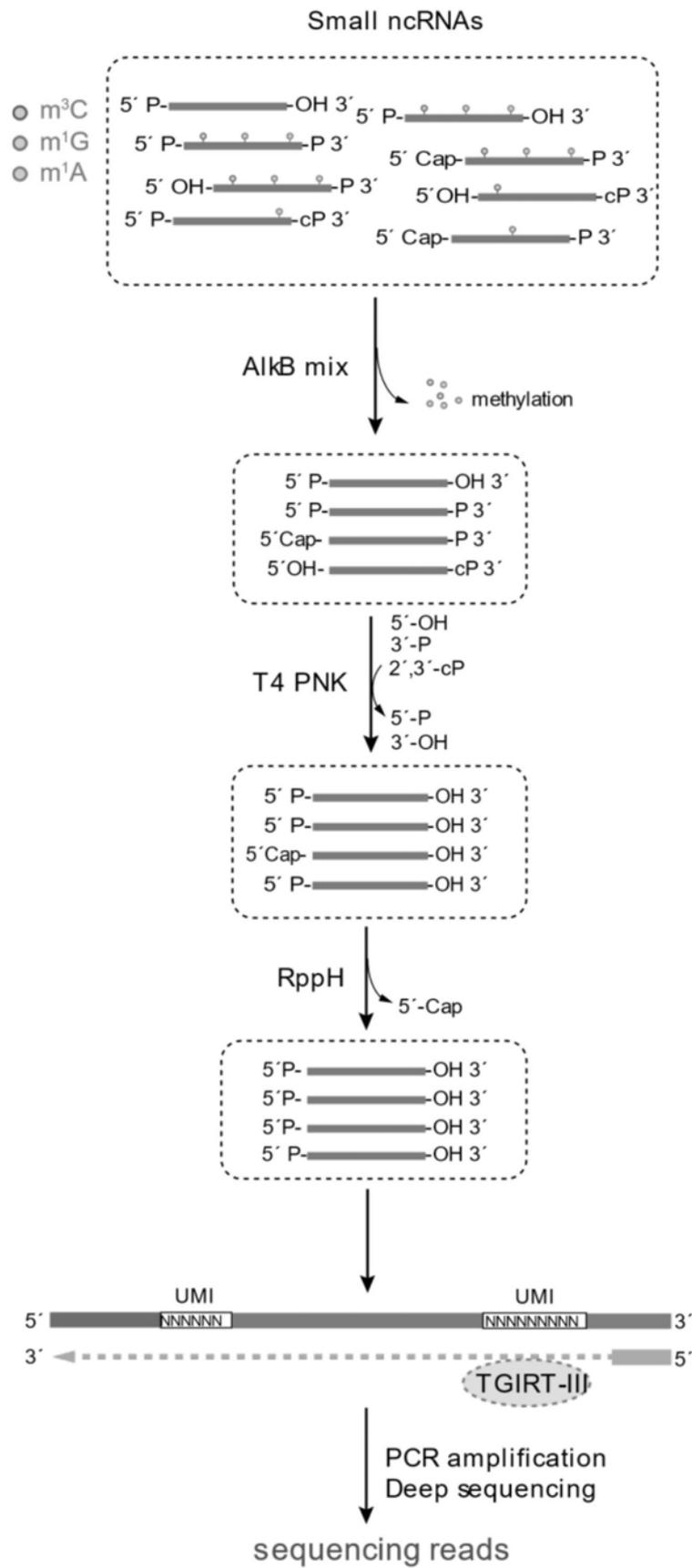


图1a

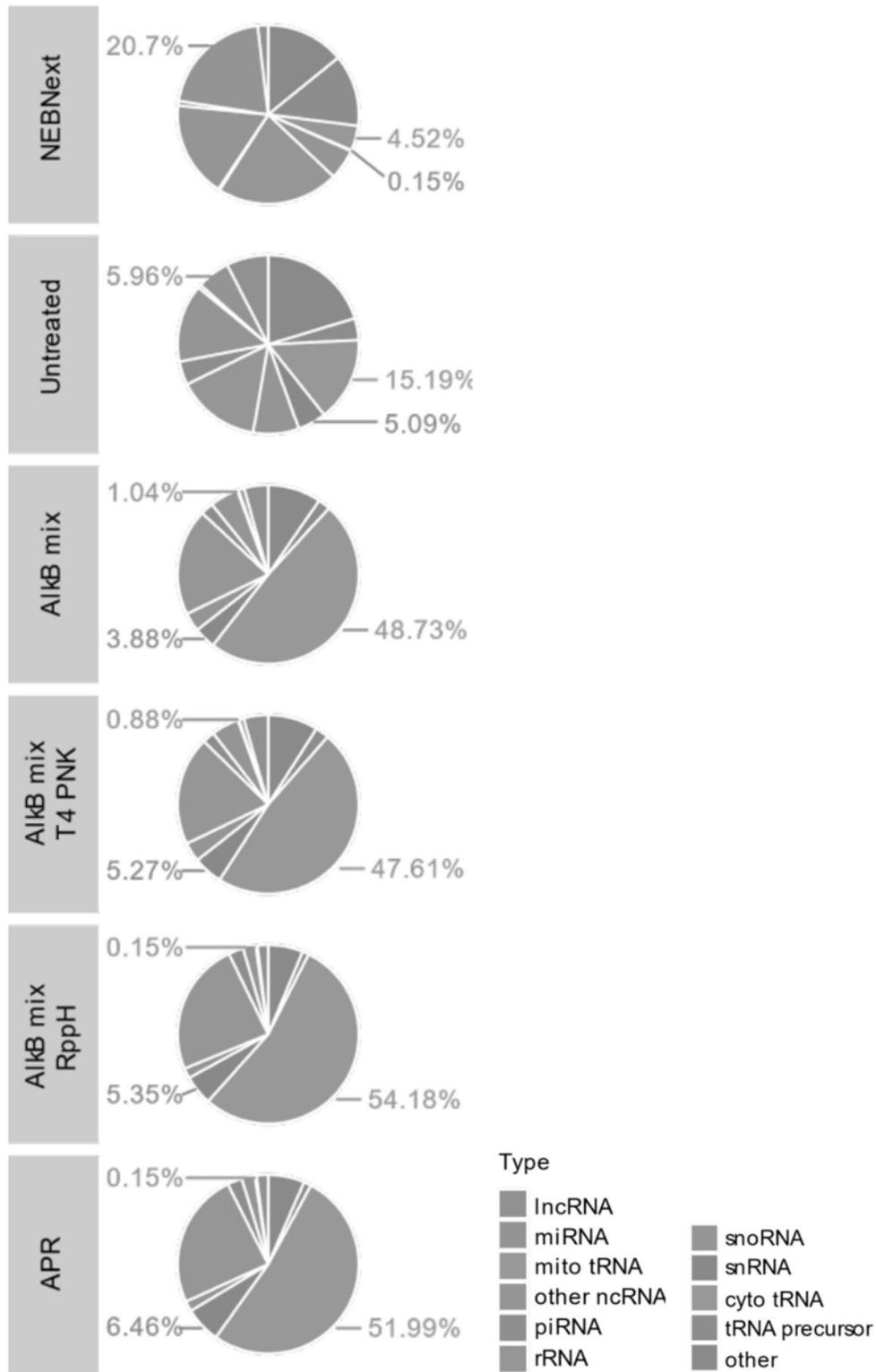


图1b

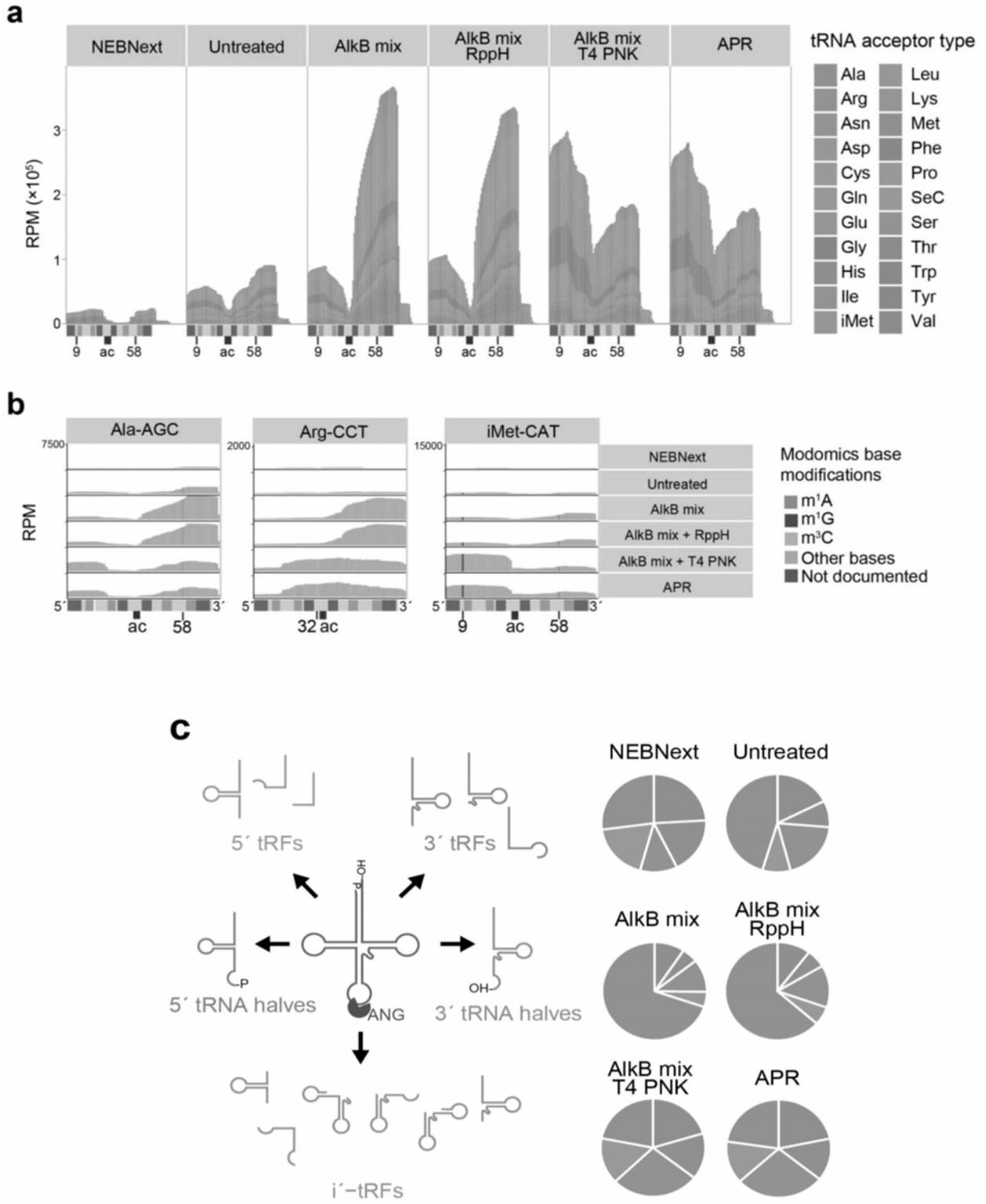


图2

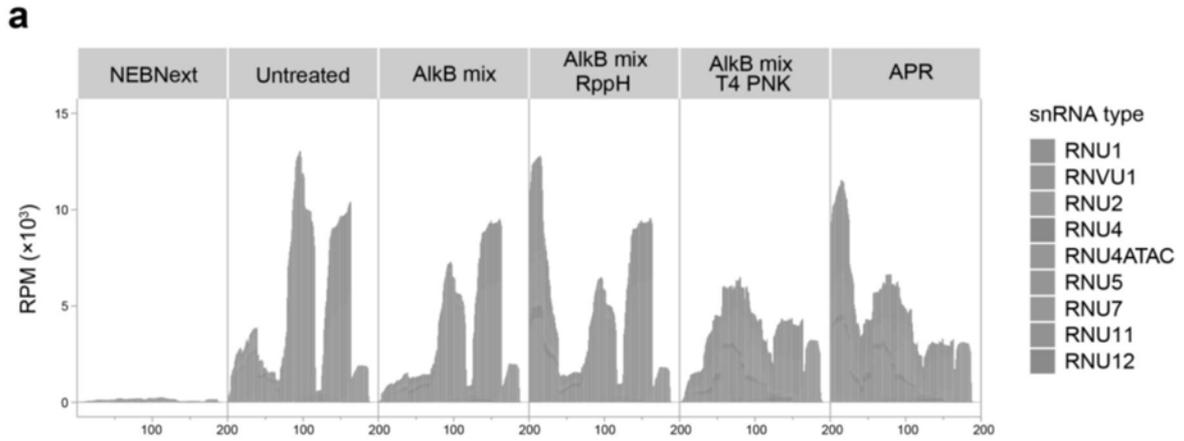


图3a

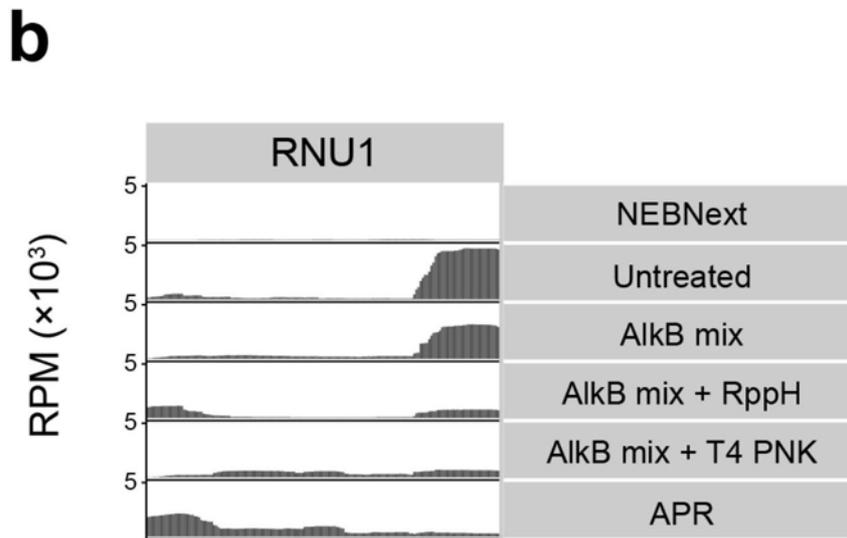


图3b

**C**

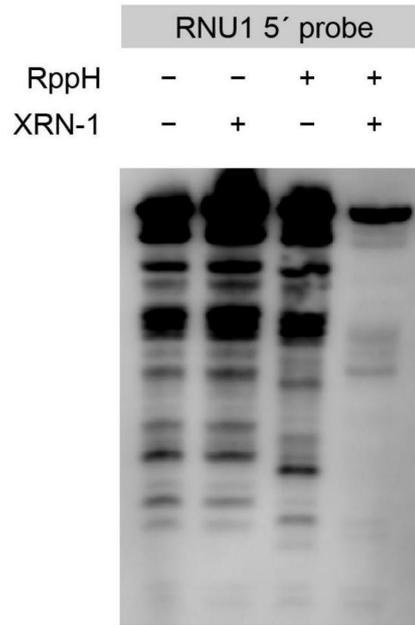


图3c