亚硫酸钠介导的 s⁴U 转化检测转录组新生 RNA 中 m⁶A

危琦[†] 韩少卿[†] 陈玉琪[†] 周翔^{*}

(武汉大学 化学与分子科学学院 武汉 430072)

摘要 发展了亚硫酸钠介导的 4-硫代尿苷(s⁴U)转化为胞苷(C)的方法, 用 s⁴U 标记新生 RNA, 通过反应将 s⁴U 转化为 C 可成功检测新生 RNA. 将新生 RNA 使用 s⁴U 标记后进行反应, 再使用 m⁶A 抗体对 m⁶A 片段进行富集, 从 m⁶A 中分析 T 到 C 突变位点便成功区分出含 m⁶A 的新生 RNA. 该方法有望应用于单个基因上 m⁶A 的动态变化检测, 有助于人们进一步了解 m⁶A 的修饰机制, 为 m⁶A 功能研究提供新的方法.

关键词 亚硫酸钠; 新生 RNA; 4-硫代尿苷; N6-甲基腺嘌呤

Sodium Sulfite-Mediated s⁴U Conversion for m⁶A Profiling of Nascent Transcriptome-Wide RNA

Qi Wei[†] Shaoqing Han[†] Yuqi Chen[†] Xiang Zhou^{*}

(College of Chemistry and Molecular Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract RNA sequencing can profile gene expression at steady-state level but is weak in studying temporal RNA dynamics. A common method for nascent RNA analysis is metabolic labeling with nucleoside analog. We developed a method for nascent RNA sequencing based on sodium sulfite-mediated 4-thiouridine-to-cytidine (s⁴U-to-C) conversion. The RNA contained s⁴U is reacted in the buffer (10 mmol/L Na₂SO₃, 200 mmol/L NH₄Cl and 200 mmol/L Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, pH 7.4) at 70 °C for 4 h, the yield can reach more than 90%. This method can efficiently distinguish nascent RNA information from total RNAs. SUC-seq is used to investigate the m⁶A, which is the most prevalent modification in mammalian mRNA and has been shown to have an essential regulatory role in the control of gene expression. Here, we provide a time resolved high-resolution profiling of m⁶A on nascent RNA transcripts. 3 × 10⁶ HEK293T cells were seeded per 10-cm cell dish and grown for 24 h. Then, s⁴U was added to the medium at a final concentration of 500 μmol/L chased for 0, 10, 15, 30, 60, 120 and 240 min. Total RNA was extracted using TRIzol reagent. 10 μg total RNA was fragmented using RNA fragmentation reagents at 70 °C for 10 min after gDNA was removed. Fragmented RNA was then subjected to s⁴U reaction to realize the conversion of s⁴U to C. Subsequently, 5 μg treated RNA were taken to perform m⁶A immunoprecipitation. After removing rRNA, library was constructed and perform next-generation sequencing. A large number of T to C mutations were observed in the mapping reads. The T to C mutation rate of the control RNA was kept at a low background level. The results show that our method can successfully distinguish nascent RNA from total RNA. Via analyzing the nascent RNA in m⁶A, the nascent m⁶A can be distinguished from the total m⁶A. This method can be a promising strategy to study the mechanism and function of m⁶A.

Keywords sodium sulfite; nascent RNA; 4-thiouridine; N6-methyladenosine

1 引言

在 RNA 中除了四种天然存在的碱基之外, 还存在着大量的修饰碱基, 它们对生命体正常的生长发育过程有着重要的影响. 在真核生物 mRNA 和长链非编码 RNA 中, m⁶A 是一种含量最丰富的转录后修饰^[1]. 其在调控 RNA 转录、加工、剪接、翻译及 RNA 稳定性方面都起着重要作用^[2]. mRNA 中的动态修饰对于基因表达的转录后调控起着至关重要的作用^[3-4]. 从发现 FTO (fat mass and obesity-associated) 蛋白可以与 m⁶A 相互作用, 产生去甲基化作用之后^[5], 对 m⁶A 相关蛋白的研究以及

m⁶A 检测技术的发展取得了很多重大的突破, 对 m⁶A 相关功能研究获得了长足的发展.

传统的 m⁶A-seq 技术通常是在细胞 RNA 的稳态水平上进行的, 无法轻易区分 m⁶A 在 RNA 上修饰的变化. 另外, 它不能很好地分辨 m⁶A 修饰的动态变化信息. 了解 m⁶A 在生长发育过程中何时进行修饰有利于理解 m⁶A 修饰所发挥的生物学功能. 研究新生 RNA 上的 m⁶A 修饰的变化对理解 m⁶A 的功能具有重要意义.

新生 RNA 分析可以揭示基因表达变化的时间信息. 新生 RNA 通过代谢标记然后经过下游纯化处理, 再进行 RNA 测序, 已成为研究新生 RNA 行为的经典手段.

* E-mail: xzhou@whu.edu.cn

[†] These authors contributed equally to this work.

Received October 15, 2020; published November 27, 2020.

Project supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 91753201, 21721005, 21907079).

项目受国家自然科学基金(Nos. 91753201, 21721005, 21907079)资助.

对新生 RNA 研究以 4-硫脲(s^4U)对 RNA 的代谢标记应用最广泛^[6], s^4U 可以在转录时被掺杂进入 RNA, 通过对 s^4U 标记的检测, 能够以单碱基分辨率将新生 RNA 与总 RNA 直接区分开从而达到检测新生 RNA 的目的.

近年来, 基于检测 s^4U 研究新生 RNA 开发了许多的方法. SLAM-seq 使用碘代乙酰胺(IAA)对 s^4U 进行亲核取代反应使 s^4U 烷基化, 在逆转录的过程中会产生 s^4U 到 C 的突变^[7]. TimeLapse-seq 将 s^4U 转化为胞嘧啶衍生物, 该策略使用过氧化物将 s^4U 中的硫(S)为磺酸基(SO_3^-)再使用氨基衍生物进行取代反应^[8]. TUC-seq 同样也是采用氧化的策略, 通过四氧化锇(OsO_4)将 s^4U 氧化后使用氨水取代反应将 s^4U 直接转化为 C^[9]. AMUC-seq 使用丙烯腈对 s^4U 的加成反应实现了 s^4U 到 C 的突变^[10]. 在本文中, 我们采用了一种基于亚硫酸钠的新方法实现 s^4U 到 C 的转化, 该方法选择性高, 对其他碱基影响很小. 可以成功用于转录组新生 RNA 的检测. 使用 s^4U 以时间脉冲的方式对新生 RNA 进行标记. 然后利用 m^6A -seq 对 HEK293T 细胞中 m^6A 进行富集, 能够成功地分析出含有 m^6A 的新生 RNA.

2 结果与讨论

2.1 亚硫酸钠介导的 s^4U 到 C 的转化

s^4U 可被氧化生成 SO_3^- 产物, 而后很容易发生取代反应. 我们使用亚硫酸钠与 s^4U 发生加成反应生成 SO_3^- 取代产物, 然后与氯化铵(NH_4Cl)反应可将 s^4U 转化为 C(图 1a). 通过优化实验条件发现, 在 pH 为 7.4 的 10 mmol/L 亚硫酸钠(Na_2SO_3)以及 200 mmol/L 氯化铵(NH_4Cl)反应液中 s^4U 于 37 °C 下 1 h 内可快速转化为 C.

图 1 s^4U 转化为 C. (a) s^4U 在亚硫酸钠介导下与氯化铵反应生成 C. (b) HPLC 检测 1 mmol/L s^4U 在 37 °C 反应体系中反应 1 h 生成 C. (c) LC-MS 检测含 s^4U 转录本转化反应效率. (d) TA 克隆测序验证 s^4U 位点成功突变为 C, X= s^4U .

Figure 1 s^4U conversion to C. (a) The reaction of s^4U with NH_4Cl form C mediated by sodium sulfite. (b) Detect s^4U reaction efficiency by HPLC. 1 mmol/L s^4U was incubated in the buffer at 37 °C for 1 h. (c) Detection of s^4U conversion reaction efficiency of by LC-MS. (Residues ratio of s^4U is the s^4U content after the reaction/the initial s^4U). (d) TA-cloning study to test the feasibility of the strategy for RNA. The s^4U is mutated to C after reaction, X= s^4U .

我们使用 1 mmol/L A、U、C、G、 s^4U 五种核苷在反应液中反应, 反应经过 HPLC 监测, A、U、C、G 四种碱基无反应而 s^4U 可完全反应, 通过质谱与核磁鉴定生成产物为 C(图 1b). 但使用此条件用于 RNA 反应时发现在此条件下 RNA 链降解严重. 我们尝试使用了不同的缓冲溶液体系进行反应, 当使用 200 mmol/L 磷酸钠缓冲溶液时可防止 RNA 降解.

使用含 s^4U 的转录本探究转化反应效率, 为了减少对复杂的 RNA 二级结构造成的 s^4U 转化反应的影响, 在反应之前, 将 mRNA 打断为约 150 nt 的 RNA 片段. 反应后对 RNA 酶解, 通过 LC-MS 分析 mRNA 中 s^4U 转化的反应效率. LC-MS 分析鉴定出 70 °C 反应 4 h 总 mRNA 中近 90% 的 s^4U 转化为 C(图 1c).

为进一步验证反应效率和反应生成物, 使用含 s^4U 的模式链反应并进行一代测序分析, s^4U 位点成功转变成 C(图 1d), 进一步说明了反应效率以及用于检测新生 RNA 的可行性.

2.2 二代测序分析新生 RNA

把细胞在含 500 μ mol/L s^4U 的培养基孵育不同时间 (10 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, 4 h) 提取得到的总 RNA 经过转化反应后进行 m^6A 免疫共沉淀, 去除 rRNA 后进行文库构建和高通量测序.

我们选取孵育时间为 2 h 的样品与对照组相比进行分析, 经转化反应处理的 RNA 中观察到大量的 T 到 C 突变, 其他类型突变不受影响, T 到 C 突变的频率经计算为 2.74%. 对照 RNA 的 T 到 C 突变率保持在较低的背景水平(图 2). 结果表明我们的方法能成功地从总 RNA 中区分出新生 RNA.

图2 s^4U 标记 2 h 的 RNA 反应后在转录组进行测序检测。测序文库中所有可能突变类型的比率。

Figure 2 RNA labeled with s^4U for 2 h after the reaction and then sequencing at transcriptome-wide scale. Mutation rates of all possible mutation types in the sequencing libraries.

2.3 m^6A 免疫共沉淀分析

在 s^4U 孵育不同时间点的样品进行 m^6A 免疫共沉淀, 对不同时间点样品表达量分析, 各样品之间的表达量无明显差异, 表明加入 s^4U 对 m^6A 表达没有影响(图 3a), 我们分析了总 RNA 中新生 RNA 和 m^6A 新生 RNA 的半衰期。在转录本上, 总新生 RNA 的半衰期和 m^6A 新生 RNA 半衰期没有显著差异(图 3b), 说明新生 m^6A 位点的基因与新生总 RNA 基因在组成上没有差异, 具有一致性。这些结果表明 s^4U 的加入对转录组 RNA 的表达以及 m^6A 的修饰无明显影响。

对 m^6A 富集后根据 T 到 C 的突变从 m^6A 片段中挑出 s^4U 标记的 m^6A 并对其进行分析, 随着 s^4U 孵育时间增加, m^6A 中片段中突变比例随之变高(图 4a)。热图显示了不同时间点被 s^4U 标记的 m^6A 位点基因组成上的变化差异。从中我们可以得知 m^6A 在基因表达过程中的修饰具有偏向性。

高通量测序分析 RNA 转录组区总 m^6A 位点的分布, 我们鉴定出有 1716 个 peaks 在 3'非编码区, 1874 个 peaks 在 CDS 区, 463 个 peaks 在 5'非编码区(图 5a)以及 m^6A 在基因区段上的比例(图 5c)。我们选取 s^4U 标记时间为

30 min 突变比例大于 20% 的位点判定为新生 m^6A 位点进行分析, 我们发现这些位点均在 mRNA 上, 在 CDS 区有 166 个, 在 3'非编码区有 211 个, 在 5'非编码区有 36 个(图 5b)以及新生 m^6A 在基因区段上的比例(图 5d)。从总 m^6A 与新生 m^6A 分布比较我们可以观察到新生 m^6A 上 3'非编码区所占比例有所上升。新生 m^6A 和总 m^6A 在 motif 上没有差异(图 5e)且与经典的 motif 序列一致。

m^6A 位点主要分布于终止密码子附近(图 5f)。我们能够发现新生 m^6A 位点与总体 m^6A 位点的差异性, 这些差异可能与早期 m^6A 对基因的转录调控有关。

接着我们选择 KIF1B 基因分析在新生 RNA 中 m^6A 位点 1 (peak1) 和 m^6A 位点 2 (peak2) 修饰水平的变化(图 6a, 6b), 并与总体 m^6A 修饰水平变化比较(图 6c), 发现在总新生 RNA 上 m^6A 修饰水平随着 s^4U 标记时间增长而稳定增加, 而 KIF1B 上的修饰变化趋势不同于总体 m^6A 修饰变化趋势。这暗示单个基因上的 m^6A 修饰变化不同于整体修饰变化, 并可以通过该方法捕捉到单个基因上 m^6A 的修饰变化信息。

图3 RNA 表达量差异性评估。(a) 箱线图显示对 s^4U 孵育不同时间的 m^6A 各组之间无显著差异。(b) 箱线图显示 m^6A 峰上的基因与总体基因半衰期无显著差异。

Figure 3 Evaluation of the difference in expression level of markers at different times. (a) Box plot shows that there is no significant difference between the groups of m^6A incubated at different times for s^4U . (b) Box plot shows that the gene on the m^6A peak is not significantly different from the overall gene.

图4 新生 m⁶A 表达量. (a) 小提琴图显示随着标记时间增加, m⁶A peak 中 s⁴U 含量增加. (b) 热图显示被 s⁴U 标记的 m⁶A 种类变化趋势.

Figure 4 Nascent m⁶A expression. (a) Violin chart shows that the s⁴U content in the m⁶A peak increases as the marking time increases. (b) Heat map shows the change trend of m⁶A species marked by s⁴U.

图5 高通量测序分析新生 m⁶A 和总 m⁶A. (a) 饼图显示了非重叠 RNA 片段中 m⁶A 位点的比例. (b) 饼图显示了非重叠新生 RNA 片段中 m⁶A 位点的比例. (c) m⁶A 在基因上的占比. (d) 新生 m⁶A 在基因上的占比. (e) 高通量测序验证 m⁶A motif. (f) 新生 m⁶A 和总 m⁶A 在不同区段上的比较.

Figure 5 High-throughput sequencing analysis of nascent m⁶A and total m⁶A. (a) Pie chart presenting the fraction of m⁶A sites in each nonoverlapping RNA segment. (b) Pie chart presenting the fraction of nascent m⁶A sites in each nonoverlapping RNA segment. (c) The proportion of m⁶A in different segments of the gene. (d) The proportion of nascent m⁶A in different segments of the gene. (e) High-throughput sequencing to verify m⁶A motif. (f) Comparison of nascent m⁶A and total m⁶A in different sections.

图6 高通量测序分析 KIF1B 和总体修饰水平变化差异. (a, b) KIF1B 上的修饰水平变化. (c) 总 m⁶A 修饰水平变化.

Figure 6 High-throughput sequencing analysis of KIF1B and overall modification level changes. (a, b) Modification level change on KIF1B. (c) Modification level change of total m⁶A.

3 结论

采用亚硫酸钠介导 s⁴U 到 C 的反应, 并通过优化条件确定了适用于核酸样本的反应条件, 反应效率可以达到 90% 以上, 并能顺利检测新生 RNA, 该方法将亚硫酸钠与 s⁴U 发生加成反应生成 SO³⁻取代产物从而避免了使用氧化剂, 与 TimeLapse-seq 中使用过氧化物和 TUC-seq 中使用 OsO₄ 相比使用的试剂环保安全无毒性作用, 不会对其他碱基造成损伤而产生背景信号. 将其与 m⁶A-seq 结合成功将其应用于检测新生 m⁶A, 并找到新生 m⁶A 与总体修饰水平的异同, 通过进一步分析发现了单个基因修饰水平上的变化, 为 m⁶A 功能分析提供了新方法.

4 实验部分

4.1 HPLC-MS 分析

每 10 cm 细胞培养皿中接种 3 × 10⁶ 个 HEK293T 细胞, 并生长 24 h. 然后将 s⁴U 添加至培养基中, 最终浓度为 50 μmol/L, 培养 24 h. 使用 TRIzol 试剂(Invitrogen)提取总 RNA. 使用 Dynabeads Oligo(dT)₂₅ (NEB)提取 mRNA, 然后去除 gDNA. 纯化后的 RNA 使用 RNA 打断试剂盒 RNA Fragmentation Reagents (Invitrogen)打断后反应. 纯化酶解后进行 HPLC-MS 分析.

4.2 一代测序

使用 oligo RNA(含 s⁴U)进行转化反应, 纯化后进行逆转录, 取 50 ng 逆转录产物, 使用擎科试剂盒 1 μL pEASY-T5 Zero Cloning Vector 进行载体构建.

4.3 RNA 文库构建

每 10 cm 细胞培养皿中接种 3 × 10⁶ 个 HEK293T 细胞, 并生长 24 h. 然后将 s⁴U 添加至培养基中, 最终浓度为 500 μmol/L, 并分别培养 10 min, 15 min, 30 min, 1 h, 2 h 和 4 h. 使用 TRIzol 试剂(Invitrogen)提取总 RNA, 取 10 μg 总 RNA 打断后进行 s⁴U 转化反应后去除 gDNA. 对照组取 100 ng, 实验组取 5 μg 上述 RNA 样品进行 m⁶A 免疫共沉淀(可得约 100 ng RNA). 去除 rRNA 后,

进行文库构建.

4.4 测序数据过滤与基因组比对

使用 cutadapt 去除原始双端测序数据的接头序列, 使用 fastuniq 软件去除测序过程中产生的 PCR 重复. 通过比对人类 rRNA 数据库去除 rRNA 序列, 之后通过 hisat2 软件将过滤 rRNA 后的 reads 比对人类基因组数据库(hg38, www.encodegenes.org; 软件比对参数为: -mp 4,2 -rna-strandness RF -no-mixed -no-discordant), 比对完成后仅保留唯一比对的 fragments 进行下一步的分析.

4.5 突变位点鉴定与半衰期计算

通过本实验室内自行编写的脚本找出与参考基因组序列不同的位点, 并通过对照组数据排除出假阳性位点.

4.6 基因表达量的计算

通过 HTSeq2 软件统计了每个基因上的 counts 数, 之后通过 FPKM 公式计算得到每个基因的 FPKM 值.

References

- [1] Ping, X.-L.; Sun, B.-F.; Wang, L.; Xiao, W.; Yang, X.; Wang, W.-J.; Adhikari, S.; Shi, Y.; Lv, Y.; Chen, Y.-S.; Zhao, X.; Li, A.; Yang, Y.; Dahal, U.; Lou, X.-M.; Liu, X.; Huang, J.; Yuan, W.-P.; Zhu, X.-F.; Cheng, T.; Zhao, Y.-L.; Wang, X.; Danielsen, J. M. R.; Liu, F.; Yang, Y.-G. *Cell Res.* **2014**, *24*, 177.
- [2] Frye, M.; Harada, B. T.; Behm, M.; He, C. *Science* **2018**, *361*, 1346.
- [3] Roundtree, I. A.; He, C. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2016**, *30*, 46.
- [4] Fu, Y.; Dominissini, D.; Rechavi, G.; He, C. *Nat. Rev. Genet.* **2014**, *15*, 293.
- [5] Jia, G.; Fu, Y.; Zhao, X.; Dai, Q.; Zheng, G.; Yang, Y.; Yi, C.; Lindahl, T.; Pan, T.; Yang, Y.-G. *Nat. Chem. Biol.* **2011**, *7*, 885.
- [6] Gasser, C.; Delazer, I.; Neuner, E.; Pascher, K.; Brillet, K.; Klotz, S.; Trixl, L.; Himmelstoss, M.; Ennifar, E.; Rieder, D.; Lusser, A.; Micura, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2020**, *59*, 6881.
- [7] Herzog, V. A.; Reichholf, B.; Neumann, T.; Rescheneder, P.; Bhat, P.; Burkard, T. R.; Wlotzka, W.; von Haeseler, A.; Zuber, J.; Ameres, S. L. *Nat. Methods* **2017**, *14*, 1198.
- [8] Schofield, J. A.; Duffy, E. E.; Kiefer, L.; Sullivan, M. C.; Simon, M. D. *Nat. Methods* **2018**, *15*, 221.
- [9] Riml, C.; Amort, T.; Rieder, D.; Gasser, C.; Lusser, A.; Micura, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2017**, *56*, 13479.
- [10] Chen, Y.; Wu, F.; Chen, Z.; He, Z.; Wei, Q.; Zeng, W.; Chen, K.; Xiao, F.; Yuan, Y.; Weng, X.; Zhou, Y.; Zhou, X. *Adv. Sci.* **2020**, *7*, 1900997.

(Cheng, B.)