

综述

细菌非编码小RNA的筛选及鉴定方法

王梁燕¹ 洪奇华² 华跃进^{1*}

(1浙江大学农业与生物技术学院, 杭州 310029; 2浙江大学动物科学学院, 杭州 310029)

摘要 细菌非编码小RNA(small non-coding RNAs, sRNAs)是一类长度为50~500 nt、不编码蛋白质的功能RNA, 在应对胁迫、毒力产生和新陈代谢等生命过程中起重要的调控作用。其主要通过碱基配对与靶mRNA发生作用, 导致mRNA翻译和稳定性改变, 从而在转录后水平调节基因的表达, 最终影响细菌各种生命活动。近年来, 利用生物信息学和分子生物学技术, 已在细菌中筛选并鉴定得到了几百个sRNA。该文对细菌sRNA的筛选和鉴定方法作一简要综述。

关键词 细菌; 非编码小RNA; 筛选; 鉴定

Screening and Identification of Small Non-coding RNAs in Bacteria

Wang Liangyan¹, Hong Qihua², Hua Yuejin^{1*}^{(1)College of Agriculture & Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China;}^(2)College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract Small non-coding RNAs (sRNAs) in bacteria are 50~500 nt small RNAs that do not encode proteins, but act as important regulators in response to stress, virulence and metabolism. Most small RNAs interact with target mRNAs through base-pairing to change their translation and stability so as to affect the activity of bacteria. Recently, hundreds of sRNAs have been explored in bacteria using bioinformatics combined with molecular biology techniques. This review focuses on the screening and identification of sRNAs in bacteria.

Key words bacteria; non-coding small RNAs; screening; identification

非编码RNA(non-coding RNAs)包括microRNA、siRNA、small RNA、medium RNA和large RNA, 为细胞内不编码蛋白质的一类功能RNA分子, 在各种生命活动中发挥着重要的调控作用。细菌非编码RNA被称为非编码小RNA(small non-coding RNAs, sRNAs), 长度约为50~500 nt, 具有独立的转录单元, 转录通常开始于一段能折叠成稳定茎环结构的序列, 终止于一个Rho不依赖的转录终止子。sRNA基因多

数位于基因间隔区(intergenic region, IGR), 少数位于编码基因的非编码区或编码区的互补链上。体内稳定性研究表明, 大多数sRNA明显比mRNA稳定^[1]。

目前研究表明, 绝大多数细菌sRNA通过与mRNA相互作用发挥其调控功能。至少有三分之一的细菌sRNA通过碱基配对识别靶mRNA, 或使靶mRNA稳定, 或使靶mRNA降解。一个sRNA可以调节多个靶mRNA, 一个靶mRNA也可能受多个sRNA

收稿日期: 2013-10-16 接受日期: 2014-02-06

国家自然科学基金(批准号: 31070080、31210103904)、浙江省自然科学基金(批准号: LY13C010001)和浙江大学实验技术研究项目(批准号: 2012FZA6014)资助的课题

*通讯作者。Tel/Fax: 0571-86971703, E-mail: yjhua@zju.edu.cn

Received: October 16, 2013 Accepted: February 6, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31070080, 31210103904), the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Grant No.LY13C010001), and the Fundamental Research Funds for the Central Universities from Zhejiang University (Grant No.2012FZA6014)

*Corresponding author. Tel/Fax: +86-571-86971703, E-mail: yjhua@zju.edu.cn

网络出版时间: 2014-04-29 15:42 URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.05.0331.html>

调节。大部分sRNA通过与RNA伴侣(如Host factor for Q beta, Hfq)的结合而发挥作用。Hfq是细菌中一种保守的同源六聚体蛋白质, 和真核细胞中参与RNA剪接的Sm及Sm样蛋白质具有同源性^[2]。Hfq与细菌sRNA的富含AU区紧密结合, 大大促进了sRNA的稳定性, 同时Hfq还与sRNA的靶mRNA结合, 促进了两者间相互作用(图1)^[3-5]。

细菌中还有一类sRNA, 不是通过与靶mRNA的碱基配对发挥作用, 而是通过模拟靶蛋白的底物来结合靶蛋白, 从而来调节(如抑制、修饰、活化和黏附)靶蛋白的生物学活性(图2)^[6]。

近年来, 随着生物信息学和实验技术的发展, sRNA已被证实存在于大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、

铜绿假单胞菌、霍乱弧菌等各种细菌中。sRNA作为一种新型的调控因子, 在细菌的物质代谢、环境适应、群体感应、孢子形成和细菌毒力等各种生物学功能中起着重要的调节作用^[7-11]。

1 细菌sRNA的筛选方法

据估算, 细菌基因组中编码sRNA基因的数量可能占编码蛋白质基因的5%左右。因sRNA没有统一的标准, 如大小、基因组成或结构基序, 故难以将它们按现有分类方法进行归类^[4-5]。常规的计算算法和传统的生化检测方法, 均不能检测到sRNA。因此, 在很长一段时间内仅有一小部分sRNA因高丰度被偶然检测到。近十年, 随着生物信息学和规模化

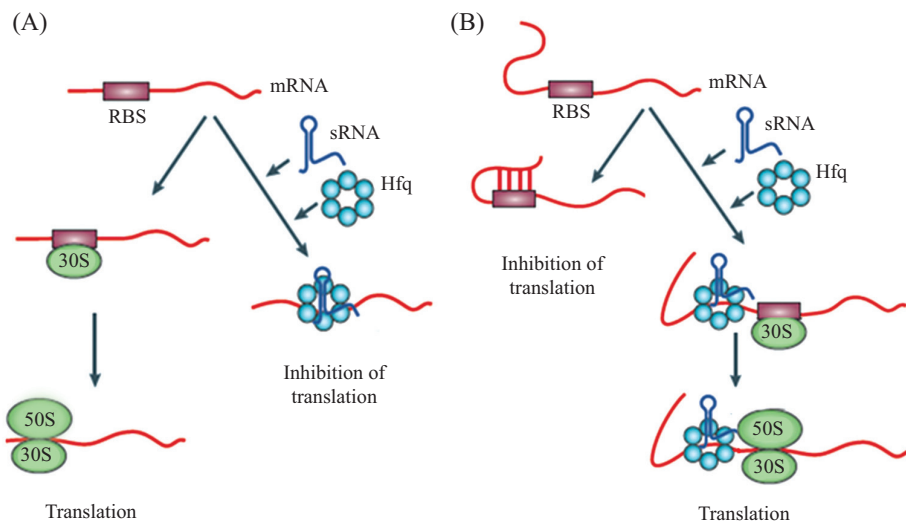


图1 Hfq与sRNA和靶mRNA结合后, 抑制(A)或促进(B)蛋白质的合成(根据参考文献[5]修改)

Fig.1 Hfq in association with a cognate sRNA may repress (A) or activate (B) the translation of a target mRNA (modified from reference [5])

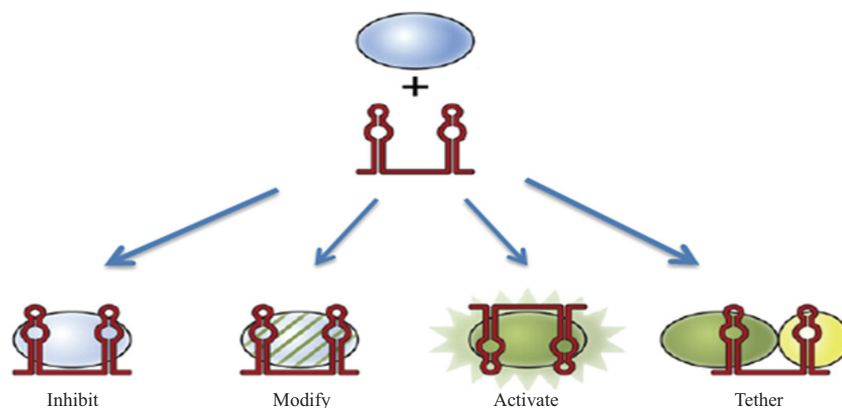


图2 细菌sRNA对靶蛋白活性的调节作用(根据参考文献[6]修改)

Fig.2 Binding of sRNAs to target proteins may regulate their activities (modified from reference [6])

筛选技术的发展, 大批的细菌sRNA被不断发现。目前, 用来筛选细菌sRNA的方法主要有生物信息学预测和实验分析法。

1.1 生物信息学预测

近十年来, 计算机筛选方法的迅速发展使

sRNA预测发生了革命性变化, 并已成为一种重要的研究手段。目前, 公共数据库约有2 200个原核生物基因组序列, 可有效进行生物信息学预测。利用生物信息学方法, 能在短时间内快速得到大量sRNA信息, 且能对多种细菌的sRNA进行同源性比较。

表1 用于预测细菌sRNA的生物信息学方法(根据参考文献[14]修改)

Table 1 Summary of the various computational methods applied for sRNA prediction in bacteria (modified from reference [14])

预测方法 Type of methods	预测工具 Tool	获取地址 Availability	主要特点 Main characteristic
Comparative genomics-based methods	<i>QRNA</i>	http://selab.janelia.org/software.html	First systematic method for ncRNA detection among closely related organisms. It applies SCFG to test and differentiate pairwise alignments.
	<i>ERPIN</i>	http://tagc.univ-mrs.fr/erpin/	It read multiple sequence alignments and secondary structures to infer secondary structure profile. Dynamic programming was applied to search helix and hairpin structures.
	<i>MSARI</i>	http://groups.csail.mit.edu/cb/MSARi/	It applies RNAFOLD to generate secondary structure from sequence alignments, and detects RNA specific common stems from multiple sequence alignments using distribution-mixture.
	<i>INFERNAL</i>	http://infernal.janelia.org/	HMM-based covariance model (CM) was used and computationally efficient. However, novel predictions were not possible.
Secondary structures and thermodynamic stability-based method	<i>ISI</i>	http://www.biochpharma.univ-rennes1.fr/	Search sRNAs based on intergenic conservation (IGR), RNA structural features and terminators. However, conserved IGRs without flanking promoters and terminators are missed.
	<i>RNAZ</i>	http://www.tbi.univie.ac.at/~wash/RNAz/	The method applies Support Vector Machine-based structural regression analysis to compute z-score. It can be applied for large scale genomic screens, and has been a part of sRNA annotation pipeline used in Rfam database.
'Orphan' transcriptional signal-based methods	<i>CARNAC</i>	http://bioinfo.lifl.fr/carnac	It uses three distinct parameters, namely energy minimization, phylogenetic comparison, and sequence conservation. The set of single stranded RNA sequences that need not to be aligned is accepted as input.
	<i>sRNAscanner</i>	http://cluster.physics.iisc.ernet.in/sRNAscanner/	sRNA specific promoters, terminator signals were applied to identify IGR sRNAs. However, current dataset had sensitivity with medium and low %GC genomes
Ab-initio-based methods	<i>sRNAPredict3/SIPHT</i>	http://newbio.cs.wisc.edu/sRNA/	A simple method to predict the sRNA locations with existing information from other databases. It integrates the locations of promoters/transcription factor binding site, terminators along with sequence conservation.
	<i>RNAGENiE</i>	http://rnagene.lbl.gov/	Known RNA structural elements were trained with neural networks and applied to differentiate RNA and non-RNA genes. It could be high accuracy if motifs added with free energy of folding in spite of little experimental validation.
	<i>smRNA</i>	http://compbio.cs.sfu.ca/nwp-content/software/taverna/	It utilizes differential distributions of sequence motifs between ncRNAs and background genome. However, family specific RNA identification is not possible.
	<i>Atypical GC</i>	http://www.rnaspace.org/	It computes G and C content of a particular position using sliding window and predicts RNA regions.
	<i>NAPP</i>	http://rna.igmors.u-psud.fr/NAPP/	IGR's of reference genome are tiled into 50 nt segments and classified based on their occurrence profile in 1000 genomes. However, tracking of 'novel' sRNA is not possible.
	<i>PsRNA</i>	http://bioserver1.physics.iisc.ernet.in/psrna/	First orthology based method successfully applied to predict sRNA specific gene clusters. It used KEGG orthology numbers of the flanking genes to locate the sRNA specific intergenic regions.

最早在基因组中预测sRNA基因的方法, 基于相关细菌基因间隔区(IGR)的序列保守性^[12]。后相继开发出了多种计算机方法来检测细菌中共有非编码sRNA, 如碱基构成统计和结构保守性等^[13]。Sridhar等^[14]对预测细菌基因组中sRNA位置的计算机工具进行了汇总, 分成四大类: 比较基因组学方法、二级结构和热动力学稳定性、独特的转录信号、不考虑序列和结构相似性的从头计算方法(表1)。

每种预测方法都有其特异性和优缺点。许多sRNA是通过基于比较方法的工具被鉴别的, 并已在体内得到验证。通过保守结构或基因间“铺瓦”式比较法, 还预测获得了一些非同源sRNA。然而, 基于序列和结构保守性的方法可能会错过一些非同源sRNA和反义链上的sRNA基因。基于转录信号的工具被认为是检测基因间新sRNA的颇有前景的一种方法。 $\sigma 70$ 常用于鉴定基因间“孤儿”启动子信号, $\sigma 54$ 、 $\sigma 27$ 和 $\sigma 38$ 可用来预测胁迫反应sRNA。然而, 尽管基于转录信号的方法对基因间sRNA检测很有效, 但对非翻译区(UTR)编码的sRNA或核开关检测有难度, 且会错过一些较长的sRNA或由较长转录子加工而来的sRNA。利用RNA个体特征的从头计算方法保留了大多数已知sRNA的特征, 但可能会带来许多假阳性。

现有RNA预测算法大多采用参考基因组中被保留的已知sRNA数来进行评价^[15-16]。这些计算机方法的预测准确性可变量度很大, 在缺乏完美的基准数据时无法进行比较。也许在不久的将来, 软件复杂度将会降低, 更易于使用。一种综合转录信号、二级结构和热动态稳定性分析、以及非编码RNA特点的“杂合”方法可能会给出更为精确的sRNA注释。

1.2 实验分析法

1.2.1 直接标记法 第一个sRNA是用同位素直接标记法筛选而获得的。该方法首先利用同位素对细胞总提取物进行标记, 然后通过凝胶分离总RNA, 切胶回收目的片段后, 用核酸酶消化以进行深入分析。利用此方法发现了一些细胞内含量丰富的sRNA, 如4.5S RNA、6S RNA和tmRNA等, 但这些实验需要进行放射性标记操作。对于细胞内丰度很高的一些sRNA, 有时可用EB等化学染料来标记总RNA, 再进行筛选检测, 如枯草芽孢杆菌中的BS190和BS203、金黄色葡萄球菌中的三个高表达sRNA就是通过直接的化学染色得到的^[17-19]。

1.2.2 DNA微阵列技术 DNA微阵列技术是在基因组水平检测一个物种、组织或细胞内所有基因即时表达情况的重要工具, 近年来被开发用于研究sRNA的表达, 甚至可用于搜寻新的sRNA产物。通常基因芯片是针对开放阅读框表达的mRNA而设计的, 而大多数sRNA位于基因间非编码区, 因此需要针对这些区域特异性设计DNA微阵列。然而, 在基因的非编码区或编码区的互补链上的序列不能被检测到。有研究者开发了一种高密度寡聚核苷酸探针, 涵盖了mRNA、tRNA和rRNA区域, 也覆盖了一定范围的IGR^[20]。由于DNA微阵列技术能够同时获得不同环境条件或应激引起的多种sRNA的转录水平改变情况, 对同源sRNA的研究颇为方便。随着微阵列分析技术的发展, 它已成为发现细菌sRNA的有力工具之一。

Hu等^[21]利用RNA-DNA杂交原理设计了针对RNA的微阵列, 使未经修饰的RNA直接与DNA微阵列杂交, 并用高亲和、非核苷酸序列依赖性的抗体和荧光标记的链霉素基因产生的信号进行扫描检测。此方法能检测到较低丰度的sRNA, 捕捉到短小或有高级结构的sRNA。Perez等^[22]用微阵列方法在人类病原体A族链球菌中筛选到了40个候选sRNA; Shioya等^[23]利用该方法在革兰氏阳性的条件致病菌粪肠球菌V583中筛选了11个sRNA, 其中6个在指数生长期特异性表达, 2个在稳定生长期观察到, 3个在两个时期均可检测到。

1.2.3 RNA组学和高通量测序技术 RNA组学技术是首先建立细菌cDNA文库, 然后通过文库筛选和序列测定方法来获得sRNA。利用该方法, 已经筛选得到了许多细菌sRNA。Vogel等^[24]利用RNA组学技术, 在大肠杆菌中不同生长期选取50~500 nt的RNA构建cDNA文库, 筛选出11个sRNA。Kawano等^[25]在大肠杆菌中克隆了30~65 nt的RNA, 筛选到了来自5'-UTR、3'-UTR的sRNA以及蛋白编码基因互补链上的20个sRNA。Straub等^[26]利用该方法建立了嗜盐古菌cDNA文库, 筛选出了39个130~460 nt大小的新sRNA, 其中21个位于基因间区域, 18个位于反义链上。此方法的主要缺点是不能针对特异性非编码RNA基因进行筛选, 高丰度RNA和结构不复杂RNA往往在文库中占优势, 从而可能会掩盖低表达量的sRNA。另外, 如果研究的非编码RNA基因过量表达有一定的毒性时也不适合用这种方法。

近年来,涌现了一些新的sRNA测序方法,最引人注目的是基于焦磷酸盐的序列测定方法。该方法避免了对细菌克隆的复杂度问题,可对成千上万个cDNA进行高通量平行测序。高通量测序技术和RNA组学技术的结合,使大批量sRNA的筛选成为可能。现用于细菌sRNA筛选的新一代测序技术主要有: Illumina公司推出的Solexa测序平台、ABI公司推出的SOLID测序平台以及Roche公司推出的454测序系统。Sittka等^[27]用高通量焦磷酸测序技术在沙门氏菌中筛选了64个与Hfq结合的sRNA,其中38个为其新发现。Raghavan等^[28]用深测序方法筛选并鉴定了大肠杆菌中10个新sRNA,其中有一半在RNA结合蛋白Hfq存在时变得更稳定;而Shinhara等^[29]用Solexa Genome Analyzer对大肠杆菌K12低分子量cDNA文库进行测序,筛选到了229个大于50 nt的候选sRNA,其中部分得到了验证。

1.2.4 其他sRNA筛选方法 (1)免疫共沉淀方法: 现有研究发现, sRNA往往与一些蛋白质相互作用,共同来实现其生物学功能。由此,可以利用感兴趣蛋白质的抗体来免疫共沉淀功能相互作用的活性sRNA。此方法的缺点在于仅限用于已知互作蛋白质的sRNA,对于未知互作蛋白质的sRNA的筛选具有盲目性。在大肠杆菌和沙门氏菌等一些细菌中含Hfq蛋白,可稳定胞内sRNA并靶向目标mRNA进行配对,因此被用作sRNA筛选的通用诱饵蛋白^[30]。Zhang等^[31]首先用Hfq抗体和大肠杆菌细胞提取液进行孵育,用来富集RNA,然后与定向诱导基因组局部突变阵列(tilling array)杂交,筛选到了大肠杆菌中三分之一的sRNA。Rieder等^[32]在幽门螺旋杆菌基因组中特异性基因后原位添加FLAG标签,用免疫共沉淀方法筛选与其相结合的sRNA,利用该方法获得了一批与目标蛋白互作的sRNA。

(2)SELEX技术: 指数富集配基的系统进化(systematic evolution of ligands by exponential technique and method enrichment, SELEX)技术利用大容量随机寡核苷酸文库与靶分子相互作用,从而筛选出与靶分子特异性结合的寡核苷酸,后在体外进行PCR扩增富集,循环数轮最终获得具有高亲和力和高特异性的寡核苷酸配体。Lorenz等^[33-34]用该方法在大肠杆菌中筛选与Hfq蛋白结合的sRNA。他们首先建立了一个50~500 bp的随机序列基因组文库,然后将文库片段进行体外转录,并与Hfq蛋白进行孵育,

除去未结合的sRNA后,被结合sRNA通过RT-PCR进行扩增,体外转录后进行第二轮筛选。经过多轮筛选,最后获得与Hfq蛋白特异性结合的sRNA。

2 细菌sRNA的鉴定方法

2.1 Northern印迹

Northern印迹(Northern blot)是利用单链DNA与RNA进行分子间杂交,从而用来检测特异性RNA分子的技术。目前该方法仍然是用来检测和定量基因表达变化的传统的可靠金标准方法,不仅能检测到转录子,而且能显示其片段大小和表达丰度。但由于其为非扩增型检测方法,灵敏度相对较低,对总RNA的要求比较高,一般需要几至几十微克的总RNA量才能检测到较明显的杂交信号,因此难度和成本相对较高。

现有用Northern来检测sRNA的方法有多种,这些方法主要区别在于探针的标记和设计有所不同。最普通的方法是掺入³²P,然而同位素标记不是很方便,具有潜在的危害性,使用上有所限制。除了传统的同位素标记这外,目前已逐步开发出一些安全且灵敏的非同位素标记Northern印迹法,如地高辛(DIG)标记的探针来检测sRNA。DIG标记方法在灵敏度上与同位素标记法相当,但相对安全。近年来,探针设计策略得到了极大改善。传统的DNA寡聚核苷酸探针正逐渐被提高灵敏度的锁核酸(locked nucleic acid, LNA)^[35]寡聚核苷酸探针所替代。Kim等^[36]用DIG标记的LNA寡聚核苷酸探针和一种特异的RNA-尼龙膜交联物质,使RNA的检测灵敏度达到 5×10^{-14} mol,从而大大缩短曝光时间,且探针时间可保存半年之久。

近来,Maroney等^[37]和Nilsen^[38]建立了一种新的夹板连接(splinted ligation)法,用于总RNA中直接标记和检测sRNA(图3)。该方法利用了一个桥寡聚核苷酸(bridge oligonucleotide),其一端与sRNA特异性配对,另一端与同位素标记的寡聚核苷酸(ligation oligonucleotide)特异性配对。俘获的sRNA分子的3'端羟基通过与同位素标记的寡聚核苷酸5'端磷酸基进行共连接而被标记。标记上同位素的sRNA可通过变性凝胶电泳和放射自显影或磷屏扫描进行检测。该方法能检测到纳克至微克级总RNA,无需进行扩增,因此特异性好、速度快,且大大提高了灵敏度。

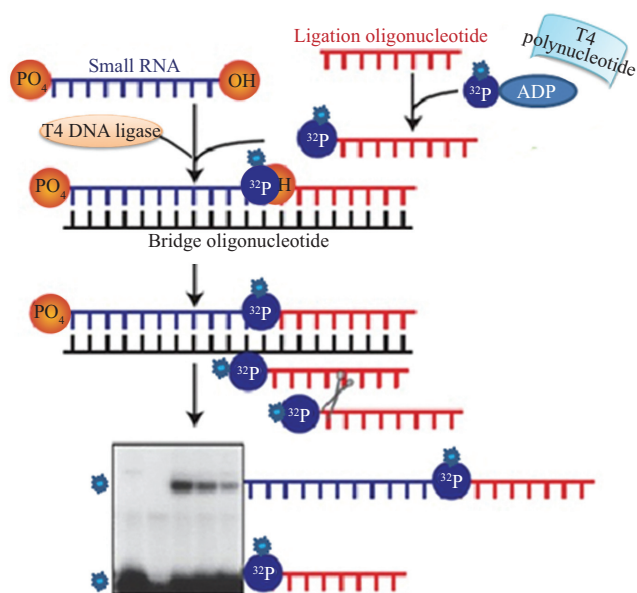


图3 用于检测sRNA的夹板连接法(根据参考文献[38]修改)

Fig.3 Splinted ligation method to detect sRNA (modified from reference [38])

2.2 荧光定量PCR

与Northern印迹技术相比, 荧光定量PCR方法具有更高的灵敏度, 能检测出低丰度表达的sRNA分子。目前, 被应用较多的方法主要有快速扩增cDNA 3'-末端的荧光定量逆转录PCR和茎环引物荧光定量逆转录PCR。

2.2.1 快速扩增cDNA 3'-末端的荧光定量逆转录PCR 该方法是将细菌sRNA的3'-端加带接头的多聚poly(A)尾, 然后以此接头作为引物将RNA逆转录成cDNA, 再进行荧光定量PCR, 分析反转录所对应的sRNA。其上游引物为sRNA特异性, 下游引物与接头互补。

2.2.2 茎环引物荧光定量逆转录PCR 此方法需要合成sRNA特异的上游引物(正向引物)、sRNA特异的Taqman探针和带茎环结构的引物。带茎环结构的引物可特异地结合sRNA分子并且具有更好的稳定性, 且不易受DNA污染, 提高了特异性和有效性。利用该方法还可以不经过核酸纯化, 直接对单个细胞核酸进行分析。

3 展望

近年来, 随着生物信息学的快速发展和越来越多细菌全基因组测序的完成, sRNA的研究获得了良好的发展机遇。研究细菌sRNA的典型策略是生物信息学预测结合分子生物学实验^[39-41]。首先, 利用

已知sRNA序列的一些特点(如分布区域、特殊的茎环结构、Rho不依赖型转录终止等)分析相关物种的一级和高级序列同源性, 在已知基因组序列物种中预测sRNA, 然后通过分子生物学实验验证其存在, 并进一步研究其功能。

目前, 已建立了多种筛选和鉴定方法, 各种方法均有其优点和局限性。利用生物信息学方法可以在相对较短时间内筛选到大批量同源sRNA, 但往往集中于非编码区, 且对于同源性低或非同源的特异性sRNA则容易被遗漏, 同时参数设置的改变会影响到筛选结果; 通过实验分析法筛选所得的sRNA更为真实, 对序列、长度和转录子信号等特异性无偏见, 且能够筛选到非保守sRNA, 然而耗资较多, 实验条件要求比较高, 且技术难度较大。在sRNA的鉴定中, 多利用同位素末端标记探针的Northern印迹方法, 但必须先进行同位素操作培训以避免人体遭受辐射损伤; 也可用其他非同位素方法如生物素和地高辛进行探针标记, 其特异性相对较低, 且成本较高; 近年来发展起来的荧光定量PCR灵敏度较高, 能检测到低丰度表达的sRNA, 但假阳性较高。

综上, 在筛选和鉴定不同细菌的sRNA时, 研究者应该根据所研究的sRNA特点选取合适方法, 可以采用以某种方法为主, 多种方法联合应用的筛选和鉴定策略。新方法的创建也许会发现和鉴定出越来越多的有用sRNA, 增加我们对细菌生理和生化机制的认识, 并对微生物的应用起到积极作用。

参考文献 (References)

- Gottesman S. Micros for microbes: Non-coding regulatory RNAs in bacteria. *Trends Genet* 2005; 21(7): 399-404.
- Sauter C, Basquin J, Suck D. Sm-like proteins in eubacteria: The crystal structure of the Hfq protein from *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 2003; 31(14): 4091-8.
- Valentin-Hansen P, Eriksen M, Udesen C. The bacterial Sm-like protein Hfq: A key player in RNA transactions. *Mol Microbiol* 2004; 51(6): 1525-33.
- Lease RA, Woodson SA. Cycling of the Sm-like protein Hfq on the DsrA small regulatory RNA. *J Mol Biol* 2004; 344(5): 1211-23.
- Vogel J, Luisi BF. Hfq and its constellation of RNA. *Nat Rev Microbiol* 2011; 9(8): 578-89.
- Storz G, Vogel J, Wassarman KM. Regulation by small RNAs in bacteria: Expanding frontiers. *Mol Cell* 2011; 43(6): 880-91.
- de Lay N, Gottesman S. A complex network of small non-coding RNAs regulate motility in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 2012; 86(3): 524-38.
- Moreno R, Fonseca P, Rojo F. Two small RNAs, CrcY and CrcZ,

- act in concert to sequester the Crc global regulator in *Pseudomonas putida*, modulating catabolite repression. *Mol Microbiol* 2012; 83(1): 24-40.
- 9 Shao Y, Bassler BL. Quorum-sensing non-coding small RNAs use unique pairing regions to differentially control mRNA targets. *Mol Microbiol* 2012; 83(3): 599-611.
- 10 Smaldone GT, Antelmann H, Gaballa A, Helmann JD. The FsrA sRNA and FbpB protein mediate the iron-dependent induction of the *Bacillus subtilis* lutABC iron-sulfur-containing oxidases. *J Bacteriol* 2012; 194(10): 2586-93.
- 11 Hoe CH, Raabe CA, Rozhdestvensky TS, Tang TH. Bacterial sRNAs: Regulation in stress. *Int J Med Microbiol* 2013; 303(5): 217-29.
- 12 Argaman L, Hershberg R, Vogel J, Bejerano G, Wagner EG, Margalit H, *et al.* Novel small RNA-encoding genes in the intergenic regions of *Escherichia coli*. *Curr Biol* 2001; 11(12): 941-50.
- 13 Pichon C, Felden B. Small RNA gene identification and mRNA target predictions in bacteria. *Bioinformatics* 2008; 24(24): 2807-13.
- 14 Sridhar J, Gunasekaran P. Computational small RNA prediction in bacteria. *Bioinform Biol Insights* 2013; 7: 83-95.
- 15 Sridhar J, Sambaturu N, Sabarinathan R, Ou HY, Deng Z, Sekar K, *et al.* sRNAscanner: A computational tool for intergenic small RNA detection in bacterial genomes. *PLoS One* 2010; 5(8): e11970.
- 16 Livny J, Teonadi H, Livny M, Waldor MK. High-throughput, kingdom-wide prediction and annotation of bacterial non-coding RNAs. *PLoS One* 2008; 3(9): e3197.
- 17 Pichon C, Felden B. Small RNA genes expressed from *Staphylococcus aureus* genomic and pathogenicity islands with specific expression among pathogenic strains. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(40): 14249-54.
- 18 Ando Y, Asari S, Suzuma S, Yamane K, Nakamura K. Expression of a small RNA, BS203 RNA, from the yocI-yocJ intergenic region of *Bacillus subtilis* genome. *FEMS Microbiol Lett* 2002; 207(1): 29-33.
- 19 Suzuma S, Asari S, Bunai K, Yoshino K, Ando Y, Kakeshita H, *et al.* Identification and characterization of novel small RNAs in the aspS-yrvM intergenic region of the *Bacillus subtilis* genome. *Microbiology* 2002; 148(Pt 8): 2591-8.
- 20 Selinger DW, Cheung KJ, Mei R, Johansson EM, Richmond CS, Blattner FR, *et al.* RNA expression analysis using a 30 base pair resolution *Escherichia coli* genome array. *Nat Biotechnol* 2000; 18(12): 1262-8.
- 21 Hu Z, Zhang A, Storz G, Gottesman S, Leppla SH. An antibody-based microarray assay for small RNA detection. *Nucleic Acids Res* 2006; 34(7): e52.
- 22 Perez N, Trevino J, Liu Z, Ho SC, Babitzke P, Sumby P. A genome-wide analysis of small regulatory RNAs in the human pathogen group A *Streptococcus*. *PLoS One* 2009; 4(11): e7668.
- 23 Shioya K, Michaux C, Kuenne C, Hain T, Verneuil N, Budin-Verneuil A, *et al.* Genome-wide identification of small RNAs in the opportunistic pathogen *Enterococcus faecalis* V583. *PLoS One* 2011; 6(9): e23948.
- 24 Vogel J, Bartels V, Tang TH, Churakov G, Slagter-Jager JG, Huttenhofer A, *et al.* RNomics in *Escherichia coli* detects new sRNA species and indicates parallel transcriptional output in bacteria. *Nucleic Acids Res* 2003; 31(22): 6435-43.
- 25 Kawano M, Reynolds AA, Miranda-Rios J, Storz G. Detection of 5'- and 3'-UTR-derived small RNAs and cis-encoded antisense RNAs in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 2005; 33(3): 1040-50.
- 26 Straub J, Brenneis M, Jellen-Ritter A, Heyer R, Soppa J, Marchfelder A. Small RNAs in haloarchaea: Identification, differential expression and biological function. *RNA Biol* 2009; 6(3): 281-92.
- 27 Sittka A, Lucchini S, Papenfort K, Sharma CM, Rolle K, Binnewies TT, *et al.* Deep sequencing analysis of small noncoding RNA and mRNA targets of the global post-transcriptional regulator, Hfq. *PLoS Genet* 2008; 4(8): e1000163.
- 28 Raghavan R, Groisman EA, Ochman H. Genome-wide detection of novel regulatory RNAs in *E. coli*. *Genome Res* 2011; 21(9): 1487-97.
- 29 Shinohara A, Matsui M, Hiraoka K, Nomura W, Hirano R, Nakahigashi K, *et al.* Deep sequencing reveals as-yet-undiscovered small RNAs in *Escherichia coli*. *BMC Genomics* 2011; 12: 428.
- 30 Brennan RG, Link TM. Hfq structure, function and ligand binding. *Curr Opin Microbiol* 2007; 10(2): 125-33.
- 31 Zhang A, Wassarman KM, Rosenow C, Tjaden BC, Storz G, Gottesman S. Global analysis of small RNA and mRNA targets of Hfq. *Mol Microbiol* 2003; 50(4): 1111-24.
- 32 Rieder R, Reinhardt R, Sharma C, Vogel J. Experimental tools to identify RNA-protein interactions in *Helicobacter pylori*. *RNA Biol* 2012; 9(4): 520-31.
- 33 Lorenz C, Gesell T, Zimmermann B, Schoeberl U, Bilusic I, Rajkowitsch L, *et al.* Genomic SELEX for Hfq-binding RNAs identifies genomic aptamers predominantly in antisense transcripts. *Nucleic Acids Res* 2010; 38(11): 3794-808.
- 34 Lorenz C, von Pelchrzim F, Schroeder R. Genomic systematic evolution of ligands by exponential enrichment (Genomic SELEX) for the identification of protein-binding RNAs independent of their expression levels. *Nat Protoc* 2006; 1(5): 2204-12.
- 35 Varallyay E, Burgyan J, Havelda Z. Detection of microRNAs by Northern blot analyses using LNA probes. *Methods* 2007; 43(2): 140-5.
- 36 Kim SW, Li Z, Moore PS, Monaghan AP, Chang Y, Nichols M, *et al.* A sensitive non-radioactive northern blot method to detect small RNAs. *Nucleic Acids Res* 2010; 38(7): e98.
- 37 Maroney PA, Chamnongpol S, Souret F, Nilsen TW. Direct detection of small RNAs using splinted ligation. *Nat Protoc* 2008; 3(2): 279-87.
- 38 Nilsen TW. Splinted ligation method to detect small RNAs. *Cold Spring Harb Protoc* 2013; 1: 54-58.
- 39 Tesorero RA, Yu N, Wright JO, Svencionis JP, Cheng Q, Kim JH, *et al.* Novel regulatory small RNAs in *Streptococcus pyogenes*. *PLoS One* 2013; 8(6): e64021.
- 40 Miotto P, Forti F, Ambrosi A, Pellin D, Veiga DF, Balazsi G, *et al.* Genome-wide discovery of small RNAs in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS One* 2012; 7(12): e51950.
- 41 Vanderpool CK. Combined experimental and computational strategies define an expansive regulon for GcvB small RNA. *Mol Microbiol* 2011; 81(5): 1129-32.