

# NaIO<sub>4</sub>氧化-深度测序技术的优化用于检测微量RNA样品中小RNA 3'末端甲基化修饰

薛皖强<sup>1,2</sup> 侯丽<sup>2</sup> 李荣红<sup>2</sup> 吴立刚<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>上海大学生命科学学院, 上海 200444;

<sup>2</sup>中国科学院分子细胞科学卓越创新中心/生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031)

**摘要** 2'-O-甲基化是存在于多种小RNA 3'末端的修饰, 具有重要的生物学功能。目前高通量研究小RNA 3'末端2'-O-甲基化的方法主要是NaIO<sub>4</sub>氧化处理结合小RNA深度测序, 但该方法需要3 μg总RNA, 难以用于研究少量细胞中小RNA的3'末端甲基化修饰。该研究通过调整NaIO<sub>4</sub>氧化处理的条件以及测试有无甘油终止氧化反应对小RNA文库构建的影响, 优化了适用于微量RNA的氧化条件, 实现对10 ng小鼠睾丸样本总RNA中的小RNA 3'末端甲基化修饰的深度测序检测, 建立了用于检测微量RNA样品中小RNA 3'末端甲基化修饰的方法, 为检测少量细胞中小RNA的3'末端甲基化修饰提供了有效方法。

**关键词** 小RNA; piRNA; 3'末端2'-O-甲基化; RNA修饰; 深度测序

## An Improved NaIO<sub>4</sub> Oxidation and Deep-Sequencing Method for Detecting 3' Terminal Methylation of Small RNAs in Low-Input RNA Samples

XUE Wanqiang<sup>1,2</sup>, HOU Li<sup>2</sup>, LI Ronghong<sup>2</sup>, WU Ligang<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>School of Life Science, Shanghai University, Shanghai 200444, China; <sup>2</sup>State Key Laboratory of Cell Biology, CAS Center for Excellence in Molecular Cell Science, Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, Chinese Academy of Sciences, University of Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

**Abstract** The 2'-O-methylation is present at the 3' end of various small RNAs and has important biological functions. At present, NaIO<sub>4</sub> oxidation treatment combined with deep sequencing is one of the most powerful method to study the 2'-O-methylation of small RNAs. However, currently used protocol requires 3 μg of total RNA and is not suitable for studying 3' terminal 2'-O-methylation of small RNAs in limited number of cells. In this study, we optimized the oxidation condition and omitted the glycerol when stops the oxidation reaction. With these improvements, we are able to identify the small RNAs bearing 3' terminal 2'-O-methylation using as little as 10 ng total RNA from mouse testis, providing a robust protocol suitable for investigating 3' terminal 2'-O-methylation of small RNAs in a small number of cells.

**Keywords** small RNAs; piRNA; 3' terminal 2'-O-methylation; RNA modification; deep-sequencing

真核细胞内编码大量不同类型的小RNA, 如 miRNAs(microRNAs)、siRNAs(small interfering

RNAs)和piRNAs(Piwi-interacting RNAs)等, 广泛参与各种生物学过程<sup>[1-5]</sup>。非编码小RNA存在多种修

收稿日期: 2019-03-22 接受日期: 2019-04-25

国家重点研发计划(批准号: 2017YFA0504400)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 021-54921323, E-mail: lgwu@sibcb.ac.cn

Received: March 22, 2019 Accepted: April 25, 2019

This work was supported by the National Key Research and Development Project (Grant No.2017YFA0504400)

\*Corresponding author. Tel: +86-21-54921321, E-mail: lgwu@sibcb.ac.cn

网络出版时间: 2019-09-30 12:11:19 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190930.1133.022.html>

饰, 其中较为常见的是3'末端碱基的甲基化修饰(2'-*O*-甲基化)。3'末端甲基化修饰主要存在于植物中的miRNA、siRNA以及动物中的piRNA<sup>[6-7]</sup>, 由3'末端甲基转移酶Hen1催化, 参与miRNA加工成熟, 同时能保护miRNA和siRNA免受3'末端尿苷化以及3'→5'外切酶的降解<sup>[8]</sup>。在动物中, 非编码小RNA 3'末端的甲基化修饰最早发现于斑马鱼中的piRNA以及小鼠和大鼠睾丸中的piRNA<sup>[9-11]</sup>。Hen1催化的piRNA 3'末端甲基化修饰对于雌性斑马鱼的生殖细胞存活是必需的<sup>[12]</sup>。在成年小鼠中, *Hen1*突变会引起piRNA不稳定和转座子表达上调, 从而导致雄性不育<sup>[13]</sup>。果蝇卵巢的piRNA和siRNA也具有这种修饰<sup>[14-15]</sup>, 但是当编码甲基转移酶的基因*Pimet*突变后, 果蝇仍然可育, 其小RNA 3'末端甲基化修饰的功能尚不明确<sup>[14]</sup>。此外, 研究表明, Hen1还能催化tRNA、rRNA和snRNA来源的小RNA的3'末端甲基化<sup>[16]</sup>。

目前检测小RNA 3'末端甲基化修饰主要使用的方法是高碘酸钠( $\text{NaIO}_4$ )氧化处理结合 $\beta$ 消除反应<sup>[17]</sup>: 3'末端不带修饰的小RNA的末位核苷酸会在 $\text{NaIO}_4$ 的作用下发生邻位羟基的断裂形成双醛结构<sup>[18]</sup>, 随后经过 $\beta$ 消除反应最后一个核苷酸被去除, 导致小RNA的长度减少1 nt; 3'末端带有甲基化修饰的小RNA不受 $\text{NaIO}_4$ 的影响, 长度不变。处理后的小RNA样品经同位素标记后电泳检测或Northern blot杂交检测, 可以区分小RNA 3'末端是否被甲基化修饰<sup>[6]</sup>。但是这一方法需要10~50  $\mu\text{g}$ 总RNA<sup>[12-13, 19]</sup>, 而且每次只能检测一种或少数几种RNA。Roover等<sup>[20-21]</sup>将 $\text{NaIO}_4$ 氧化处理与深度测序结合, 实现了同时对大量不同种类小RNA的3'末端甲基化修饰进行检测, 但该方法仍然需要最少3  $\mu\text{g}$ 总RNA, 无法应用于检测

少量细胞如卵细胞和特定时期的生精细胞中的小RNA 3'末端的甲基化修饰, 大大限制了该方法的应用。

我们分析认为, 微量RNA氧化-深度测序的技术难点在于: 如何在保留小RNA完整的前提下实现充分氧化; 在乙醇沉淀中如何有效回收微量RNA样品, 从而满足小RNA文库构建所需的样品量。为解决这些问题, 本研究对RNA的 $\text{NaIO}_4$ 氧化-深度测序技术的条件进行优化(图1), 使其能检测低至10 ng总RNA中小RNA的3'末端甲基化修饰, 为研究微量或珍稀细胞中小RNA的3'末端甲基化修饰提供了可行方案。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂和仪器

$\text{NaIO}_4$ 购自Sigma-Aldrich公司; RNA建库试剂购自NEB公司; TRIzol购自Thermo Fisher Scientific公司。Agilent 2200 TapeStation system、High Sensitivity RNA ScreenTape and Sample Buffer购自Agilent公司; 150 mmol/L  $\text{NaIO}_4$ 新鲜配制并避光放置; 5×硼酸盐缓冲液: 150 mmol/L 硼酸钠、150 mmol/L 硼酸, pH 8.6。

### 1.2 实验材料

C57小鼠购自上海斯莱克实验动物有限责任公司。所有动物实验均已通过中科院上海生物化学与细胞生物学研究所伦理委员会审查批准。

将16周的C57BL/6雄鼠断颈处死, 把睾丸平均切成若干块, 分装至1.5 mL EP管, 每管加入1 mL TRIzol, 旋涡振荡30 s, 乙醇沉淀提取总RNA。NanoDrop 2000测RNA浓度, Agilent 2200 TapeStation sys-

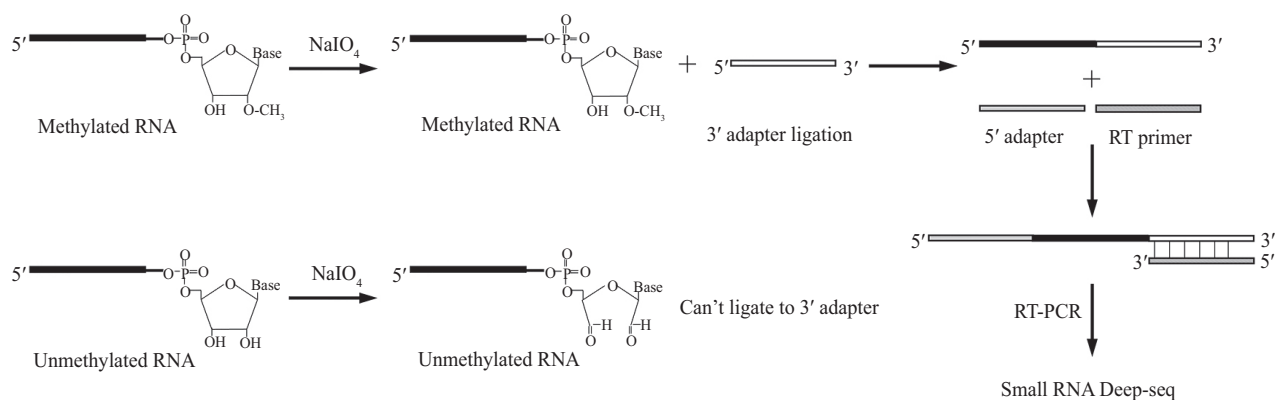


图1 微量RNA氧化技术流程

Fig.1 Low-input of total RNA oxidation technology process

tem和High Sensitivity RNA ScreenTape检测RNA质量。样品于-80 °C保存。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 氧化处理对RNA连接3'接头效率的影响** 在吉玛生物公司合成长度为24 nt的两种RNA, 一种3'末端有甲基化修饰(RNA-O-甲基), 另一种3'末端无甲基化修饰(RNA-OH)。各取两种RNA 100 ng, 加入0~100 mmol/L NaIO<sub>4</sub>后室温避光放置, 氧化处理30 min后乙醇沉淀, 用6 μL DEPC水溶解。另取未经氧化处理的RNA-O-甲基和RNA-OH各100 ng作为对照。加入20 pmol 3'接头, 1 μL 10×T4 RNA连接缓冲液和200 U T4 RNA连接酶2(K227Q), 16 °C反应16 h进行连接反应。8 mol/L尿素变性胶检测结果。

**1.3.2 甘油对RNA氧化处理后建库结果的影响** 取20 ng小鼠睾丸总RNA, 加入0~100 mmol/L的NaIO<sub>4</sub>后室温避光放置, 氧化处理30 min, (1)加入1 μL甘油终止反应, 静置10 min, 乙醇沉淀, 用5 μL DEPC水溶解; (2)直接用乙醇沉淀, 用5 μL DEPC水溶解。取回收后的RNA建库: 向RNA样品中加入3'接头的连接反应体系(0.25 pmol 3'接头、10% PEG8000、80 nmol MgCl<sub>2</sub>、1×T4 RNA连接缓冲液、40 U T4 RNA酶2(K227Q)、20 U RNA酶抑制剂), 22 °C反应2 h, 然后加入5 pmol反转录引物, 75 °C退火5 min。然后加入5'接头的连接反应体系(5 pmol 5'接头、10 nmol ATP、10 U T4 RNA连接酶1、20 U RNA酶抑制剂), 22 °C反应1 h, 然后加入RT反应体系(1×反转录缓冲液、250 nmol DTT、12.5 nmol dNTP、40 U RNA酶抑制剂、200 U superscript II反转录酶), 44 °C反应1 h, 取5 μL进行PCR扩增(50 μL KOD体系), 6% PAGE检测建库结果。

**1.3.3 测试微量RNA氧化处理后的回收效率** (1)线性丙烯酰胺(linear acrylamide, LPA)回收不同起始量RNA。取7~80 ng小鼠睾丸总RNA, 加入25 μg LPA, 乙醇沉淀; (2)不同起始量RNA经NaIO<sub>4</sub>氧化处理后回收。取25~1 000 ng小鼠睾丸总RNA, NaIO<sub>4</sub>氧化处理30 min, 直接乙醇沉淀, 用5 μL DEPC水溶解。Qubit测浓度, 计算RNA氧化处理后的回收效率。

**1.3.4 小鼠睾丸微量RNA氧化处理及建库** 设计6条小鼠基因组非同源小RNA作为外参(spike in), 3条不带修饰, 3条3'末端有甲基化修饰, 长度均为22 nt。用T4多核苷酸激酶(TaKaRa, Japan)磷酸化6条外参, 从6条磷酸

化的外参中取相同摩尔量混合。分别取10 ng、50 ng、100 ng小鼠睾丸总RNA, 加入外参混合物, NaIO<sub>4</sub>氧化处理30 min, 直接乙醇沉淀, 取回收后的RNA建库。另取10 ng、50 ng、100 ng小鼠睾丸总RNA直接建库作为氧化前对照。建库步骤同1.3.3, 6% PAGE检测建库结果, 并用6% native PAGE回收PCR产物, 切胶范围为135~160 bp, 将胶破碎后加入400 μL 10 mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 室温旋转过夜, 第二天离心后取上清, 加入1 mL无水乙醇, 40 μL 3 mmol/L醋酸钠(pH5.2), 25 μg LPA, -30 °C静置30 min, 13 000 r/min离心15 min, 80%乙醇洗2次, 用15 μL 10 mmol/L Tris-HCl (pH8.0)溶解沉淀, 得到最终的文库产物, 用Hiseq X10进行测序。

**1.3.5 小鼠睾丸中非编码小RNA深度测序数据分析** 从UCSC数据库<sup>[22]</sup>下载小鼠的基因组文件mm10.fa (<http://genome.ucsc.edu/>)。从miRBase数据库<sup>[23]</sup>下载小鼠miRNA的注释文件(<http://www.mirbase.org/>, 版本21)。从piRNA cluster database<sup>[24]</sup>下载基于已经发表的小鼠睾丸中小RNA深度测序数据预测得到的piRNA簇的bed文件; 并基于小鼠基因组序列使用UCSC提供的twoBitToFa软件提取piRNA簇的序列。计算每个样品中有甲基化修饰和无甲基化修饰的外参的相对比例, 检测NaIO<sub>4</sub>氧化处理是否足够充分(NaIO<sub>4</sub>氧化充分的样品, 有甲基化修饰的外参/无甲基化修饰的外参的比值会显著上升)。使用FASTX-Toolkit对非编码小RNA深度测序得到的原始数据进行质量过滤及去除接头, 然后筛选出长度在17~40 nt的序列, 并用TBr2\_duster.pl (piRNA cluster database提供, <http://www.smallrnagroup.uni-mainz.de/software.html>)从数据集中去除序列复杂度低的reads (其中≥75%的序列由一个核苷酸组成)。将上述筛选后得到的高质量reads使用Bowtie<sup>[25]</sup>比对到小鼠基因组, 不允许碱基错配。所有比对到基因组的reads用于后续小RNA表达的分析。比对到已知miRNA序列的小RNA注释为miRNA; 剩余小RNA中比对到piRNA簇的注释为piRNA; 其他序列标记为other。小RNA长度分布用perl及R等进行计算和展示。最后将这些小RNA表达量标准化为RPM(Reads Per Million genome mapped reads, 每百万个reads中的相对量)。在不能比对到小鼠基因组的reads中, 与外参序列完全相同的小RNA作为外参的表达。测序的原始数据已上传到NCBI的GEO数据库, 数据集的ID为GSE130106。



## 2 结果

### 2.1 氧化处理对RNA连接3'接头效率的影响

小RNA文库构建第一步是小RNA与3'接头(adapter)连接。我们在实验中发现,高浓度的NaIO<sub>4</sub>氧化处理会引起长片段RNA如rRNA的断裂,影响RNA样品的质量,但NaIO<sub>4</sub>氧化处理对小RNA质量的影响尚不明确。为了在充分氧化的前提下保留小RNA的完整性,需要选择合适的NaIO<sub>4</sub>浓度,因此我们测试了不同浓度NaIO<sub>4</sub>氧化处理对小RNA完整性及连接3'接头效率的影响。我们合成了3'末端无甲基化修饰和3'末端有甲基化修饰的小RNA,分别模拟体内3'末端无甲基化修饰和有甲基化修饰的小RNA。100 ng 3'末端无甲基化修饰的RNA经过2 mmol/L NaIO<sub>4</sub>处理后,剩下约30%可以和3'接头连接(图2A);当NaIO<sub>4</sub>浓度达到10 mmol/L及以上时,基本完全抑制了RNA和3'接头的连接(图2A),说明3'末端无修饰的RNA对氧化处理非常敏感。100 ng 3'末端有甲基化修饰的RNA经2 mmol/L NaIO<sub>4</sub>氧化处理后,与3'接头的连接效率几乎不受影响(图2B)。进一步提高NaIO<sub>4</sub>浓度,3'末端有甲基化的RNA经过氧化处理后,和3'接头的连接效率没有出现明显变化(图2B, 20 mmol/L NaIO<sub>4</sub>处理样品在回收时意外丢失),说明了NaIO<sub>4</sub>氧化处理能区分3'末端有甲基化修饰和3'末端无甲基化修饰的小RNA。但3'末端的甲基化修饰会在一定程度上降低RNA与3'接头的连接效

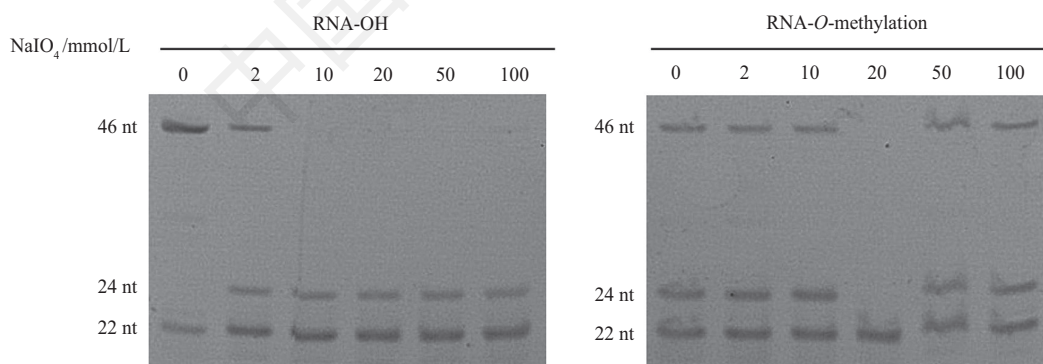
率(图2B),推测可能是甲基基团的空间位阻降低了小RNA与3'接头的连接效率。以上结果表明,浓度在10 mmol/L及以上的NaIO<sub>4</sub>氧化处理能完全抑制3'末端无甲基化的小RNA和3'接头的连接,而3'末端有甲基化修饰的RNA和3'接头的连接效率不受高碘酸钠浓度(0~100 mmol/L)的影响。为了使RNA氧化充分,后续实验中我们选择100 mmol/L甚至更高浓度的NaIO<sub>4</sub>氧化处理RNA。

### 2.2 甘油终止氧化反应对小RNA文库构建的影响

现有的RNA氧化方法通过加入甘油终止氧化反应。但我们在实验中发现,加入甘油终止氧化反应后的建库产物明显减少(图3A)。我们进一步实验发现,未经NaIO<sub>4</sub>处理,仅加了甘油(lane1)的RNA,经过乙醇沉淀回收后建库得到的产物也很少(图3A),以上结果说明,甘油会极大降低小RNA建库的效率。而不加甘油终止氧化反应直接用乙醇沉淀回收后再进行小RNA文库构建,相比于加入甘油终止氧化的样品,使用相同PCR循环数建库得到的文库产物明显增多(图3B)。以上结果表明,不加甘油终止氧化反应的方案更适用于微量RNA的氧化后测序文库构建。

### 2.3 优化微量RNA氧化处理后的回收方法

在乙醇沉淀时添加助沉剂有助于提高回收效率。目前常使用的助沉剂包括糖原(glycogen)和线性丙烯酰胺(linear acrylamide, LPA),由于糖原可能会



A: 3'末端不带修饰的小RNA氧化处理后连接3'接头; B: 3'末端带甲基化修饰的小RNA氧化处理后连接3'接头; 22 nt: 3'接头的长度, 24 nt: 合成的小RNA的长度, 46 nt: 小RNA与3'接头的连接产物长度; RNA-OH: 3'末端不带修饰的小RNA; RNA-O-甲基: 3'末端带甲基修饰的小RNA; 每个反应均使用100 ng RNA; NaIO<sub>4</sub>的浓度分别为0 mmol/L、2 mmol/L、10 mmol/L、20 mmol/L、50 mmol/L和100 mmol/L。

A: ligation of small RNA without modification at the 3' end with 3' adapter after oxidation; B: ligation of small RNA with methylation at the 3' end with 3' adapter after oxidation; 22 nt: the length of 3' adapter; 24 nt: the length of synthetic RNA; 46 nt: the ligated product of RNA and adapter; RNA-OH: small RNA without modification at the 3' end; RNA-O-methylation: small RNA with methylation modification at the 3' end. RNA input for each reaction is 100 ng and the concentration of NaIO<sub>4</sub> is 0 mmol/L, 2 mmol/L, 10 mmol/L, 20 mmol/L, 50 mmol/L and 100 mmol/L respectively.

图2 不同氧化剂浓度对小RNA连接3'接头效率的影响

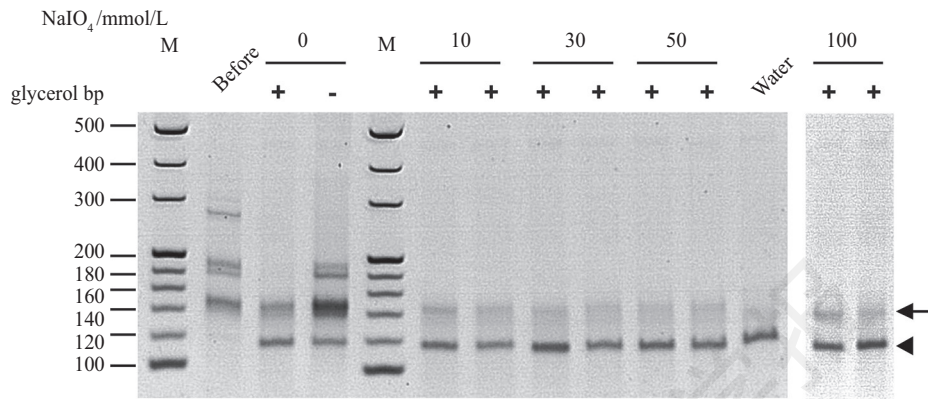
Fig.2 Effect of different oxidant concentrations on ligation efficiency of small RNA with 3' adapter

引入外源RNA<sup>[26]</sup>, 我们选择LPA作为实验中RNA乙醇沉淀的助沉剂。我们用25 μg LPA对7 ng、14 ng、28 ng、56 ng和80 ng小鼠睾丸总RNA进行乙醇沉淀。回收的RNA用Qubit测浓度, 计算回收效率。LPA作

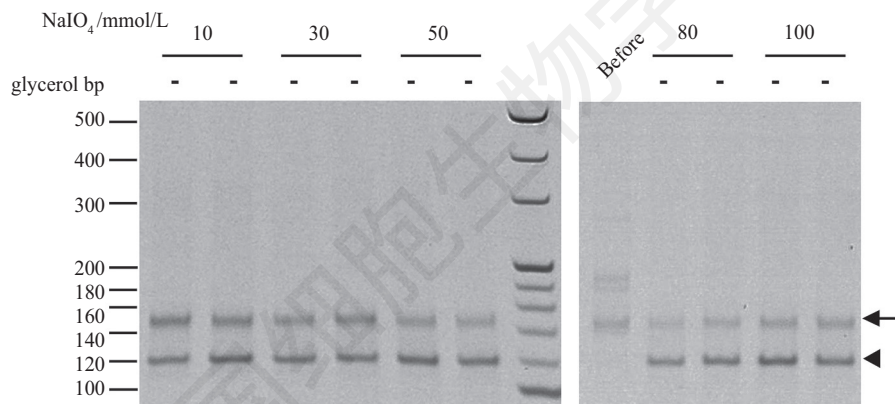
为助沉剂对28 ng及以上的微量RNA回收效率高达到90%, 当RNA起始量减少至14 ng及以下时, 由于Qubit检测灵敏度所限, 无法检测到RNA浓度(表1)。

RNA氧化处理后用LPA进行乙醇沉淀, 当总

(A)



(B)



A: 加甘油终止氧化反应, NaIO<sub>4</sub>浓度分别为0 mmol/L、10 mmol/L、30 mmol/L、50 mmol/L、100 mmol/L; B: 不加甘油终止反应, NaIO<sub>4</sub>浓度分别为10 mmol/L、30 mmol/L、50 mmol/L、80 mmol/L、100 mmol/L。每个实验条件进行了2个重复, 每个反应20 ng RNA; +: 加甘油终止氧化反应; -: 不加甘油作为对照; M: marker; Before: 氧化前对照; 三角号: 接头自连产物; 箭头: RNA和接头连接产物。

A: add glycerol to stop the oxidation reaction. Concentration of oxidant is 0 mmol/L, 10 mmol/L, 30 mmol/L, 50 mmol/L, 100 mmol/L; B: glycerol is not used to stop the oxidation reaction. Concentration of oxidant is 10 mmol/L, 30 mmol/L, 50 mmol/L, 80 mmol/L, 100 mmol/L. 2 replicates per experimental condition, 20 ng RNA per reaction; +: glycerol is added to stop the oxidation reaction; -: no glycerol; M: marker; Before: before oxidation; Triangle: adapter self-ligation product; Arrow: RNA and adapter ligation product.

图3 甘油对小RNA建库效率的影响

Fig.3 Effect of glycerol on the efficiency of small RNA library construction

表1 使用LPA进行微量RNA乙醇沉淀的效率

Table 1 Ethanol precipitation recovery rate of low-input total RNA with LPA

助沉剂 Precipitation helper	RNA起始量/ng RNA input /ng	RNA回收量ng RNA output /ng	回收率 Recovery rate
LPA	80	71.5	0.89
LPA	56	51.0	0.91
LPA	28	25.7	0.92
LPA	14	-	-
LPA	7	-	-

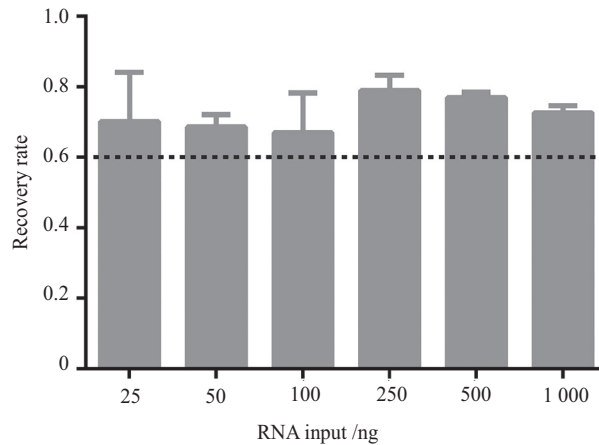


图4 不同RNA起始量氧化处理后的乙醇沉淀回收率

Fig.4 Ethanol precipitation recovery rate after oxidation with different amount of RNA

RNA在250~1 000 ng时,氧化处理后乙醇沉淀回收率在60%以上;当总RNA减少至25~100 ng时,回收率开始下降,但依然可以进行有效回收(图4)。所以微量RNA氧化处理后,使用LPA作为助沉剂进行RNA的乙醇沉淀是可行的。

#### 2.4 小鼠睾丸微量RNA的氧化和测序分析

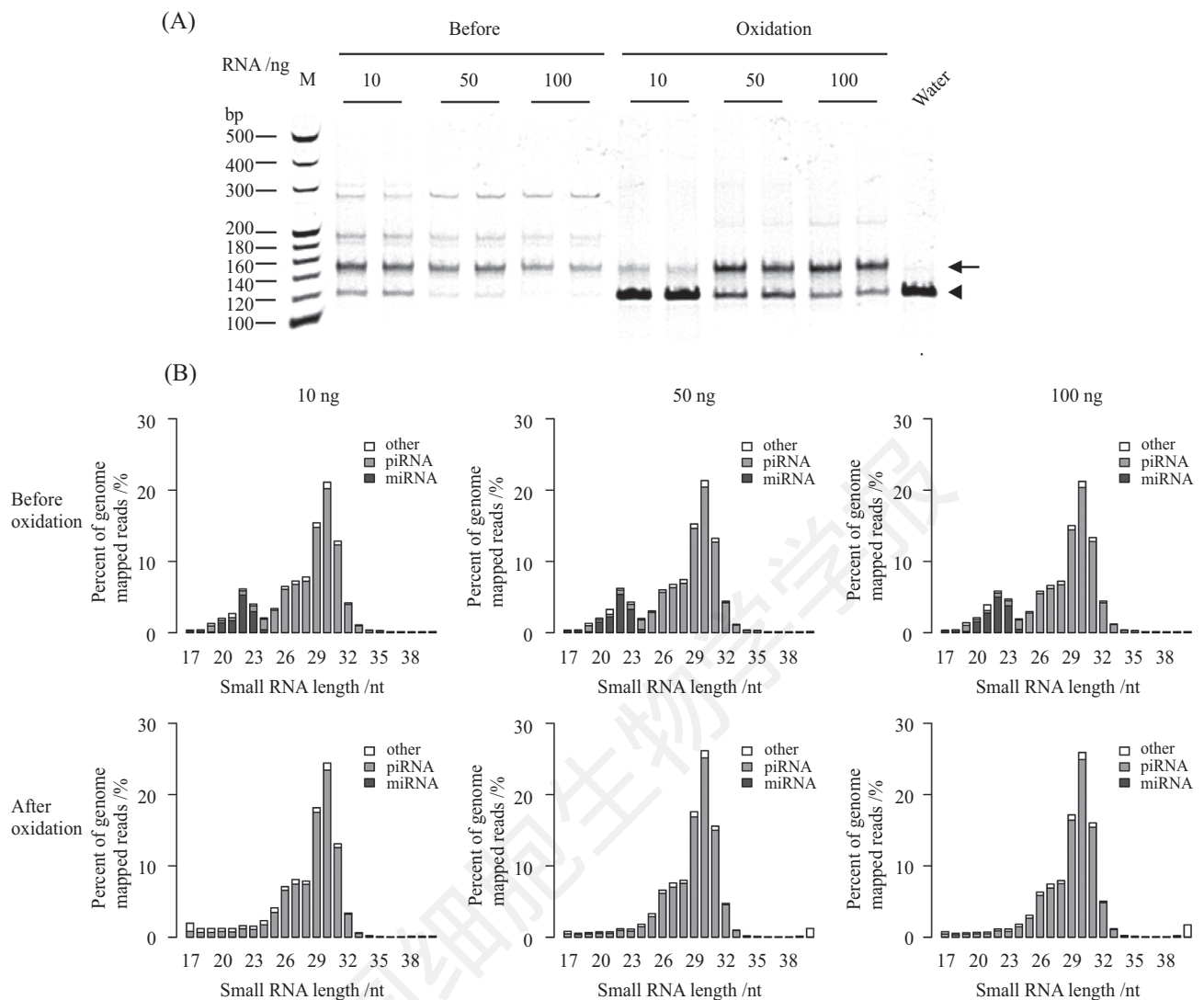
小鼠睾丸RNA中包含大量piRNA(带3'末端甲基化)和miRNA(不带3'末端甲基化),是测试我们优化后的NaIO<sub>4</sub>氧化方法效果的理想对象。我们分别用10 ng、50 ng和100 ng小鼠睾丸总RNA测试优化后的微量RNA氧化建库的效果,并在样品中加入外参(Spike in: 6条合成的RNA,3条带有3'末端的甲基化修饰,另外3条不带修饰)。NaIO<sub>4</sub>氧化处理后直接乙醇沉淀回收,然后进行文库构建。10~100 ng总RNA在用优化后的氧化方法处理后建库,均得到了清晰的目的条带,其中10 ng的条带最弱(图5A),推测已接近现有方法的检测极限。深度测序结果表明,氧化前的小鼠睾丸小RNA主要由miRNA(长度为20~24 nt)和piRNA(长度为25~32 nt)组成,NaIO<sub>4</sub>氧化处理后,不带有3'末端2'-O-甲基修饰的RNA(miRNA)消失,带有3'末端2'-O-甲基修饰的RNA(piRNA)不受影响(图5B)。根据外参氧化前后的比例,不同RNA起始量的氧化样本对带3'末端2'-O-甲基修饰的外参的富集倍数均超过千倍(表2),说明10~100 ng总RNA的氧化都是充分的。

### 3 讨论

目前还没有关于NaIO<sub>4</sub>氧化处理研究少量细胞

中小RNA 3'末端甲基化修饰的报道,我们在实验中发现用现有的NaIO<sub>4</sub>氧化-深度测序技术进行少量细胞的研究,得到的建库产物很少。对于微量RNA样品可能需要进一步测试和优化NaIO<sub>4</sub>氧化-深度测序技术的条件。本研究通过测试3'末端带甲基化修饰和不带修饰的RNA经过不同NaIO<sub>4</sub>浓度氧化处理后连接3'接头,结果表明,3'末端不带修饰的RNA对氧化处理十分敏感,3'末端带甲基化修饰的RNA基本不受氧化处理的影响,经过较高浓度NaIO<sub>4</sub>氧化处理后仍可连接3'接头。未经氧化处理的样品中,3'末端不带修饰的RNA具有更高的连接3'接头的效率,推测3'末端的甲基基团会影响小RNA与3'接头的连接效率,但增加RNA连接酶的用量可能会提高3'末端带甲基修饰的RNA的连接效率。此外,当NaIO<sub>4</sub>浓度增加至100 mmol/L时,3'末端不带修饰的RNA无明显降解条带,3'末端带甲基化修饰的RNA与接头的连接效率基本保持不变,推测小RNA长度较短,对氧化损伤的敏感度低于rRNA。

我们在优化微量RNA氧化技术的过程中,意外发现甘油终止氧化反应对最终文库产量的影响很大。甘油终止对建库的影响在此前的3 μg总RNA起始量的氧化方法中没有显现出来,可能是由于回收的RNA量较多,最终的文库产量丰富;但对于微量RNA氧化处理,回收的RNA量较少,上游处理对文库产量的影响更加显著。甘油终止氧化反应的原理是通过甘油邻位的羟基消耗反应体系中的NaIO<sub>4</sub>,从而终止反应。虽然本研究的结果显示沉淀回收RNA前加入甘油极大地降低了文库产量,但原因尚不清



A: 小鼠睾丸总RNA氧化前后建库。三角号: 接头自连产物; 箭头: 小RNA与接头的连接产物。B: 小鼠睾丸总RNA氧化前后深度测序结果。每个实验条件进行了2个重复。

A: small RNA library construction of total RNA from mouse testis before and after oxidation. Triangle: adapter self-ligation product; Arrow: RNA and adapter ligation product. B: small RNA deep sequencing of low-input total RNA from mouse testis before and after oxidation. 2 replicates per experimental condition.

图5 微量小鼠睾丸总RNA氧化前后小RNA文库构建和深度测序

Fig.5 Small RNA library construction and deep sequencing of low-input total RNA from mouse testis before and after oxidation

表2 微量小鼠睾丸总RNA氧化前后miRNA以及外参的比例变化

Table 2 Changes in the ratio of miRNA and Spike in of low-input total RNA from mouse testis before and after oxidation

样品 Sample	miRNA占比(%) miRNA ratio /%	外参甲基化/未甲基化比值 Spike in methyl/no Methyl ratio
10 ng before Oxidation	11.82	6.7
50 ng before Oxidation	12.94	3.5
100 ng before Oxidation	13.71	2.7
10 ng after Oxidation	0.04	42 323.0
50 ng after Oxidation	0.03	16 236.7
100 ng after Oxidation	0.03	11 614.2



楚,有待进一步深入研究。

我们目前优化的方法中,  $\text{NaIO}_4$ 氧化处理造成的损失已经降到了较低水平,可以用于检测10 ng(500个体细胞或10个小鼠卵细胞的RNA总量)及以上总RNA中的小RNA 3'末端甲基化修饰。如果能进一步提高微量总RNA的回收效率,检测所需的RNA用量的下限还可以进一步减低,使单个卵细胞等少量珍贵样本的研究成为可能。由于乙醇沉淀对于长度小于20 nt的核酸的回收率相对较低,可能会造成总RNA样品中小于20 nt的小RNA的回收量减少,影响小RNA的准确定量。目前对于如何提高20 nt以下小RNA的回收效率还没有成熟的解决方案, QIAGEN公司的miR-Neasy Mini Kit可用于回收动物组织和细胞中长度在18 nt以上的RNA,也有研究显示,加入 $\text{MgCl}_2$ 可以提高小RNA的回收率<sup>[27]</sup>,但是这些方法否适用于 $\text{NaIO}_4$ 氧化后RNA的回收还有待进一步研究测试。

### 参考文献 (References)

- Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 2008; 9 (2): 102-14.
- Ozata DM, Gainetdinov I, Zoch A, O'Carroll D, Zamore PD. PIWI-interacting RNAs: small RNAs with big functions. *Nat Rev Genet* 2019; 20 (2): 89-108.
- Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 2009; 136 (4): 642-55.
- Ambros V, Chen X. The regulation of genes and genomes by small RNAs. *Development* 2007; 134 (9): 1635-41.
- Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Bio* 2009; 10 (2): 126-39.
- Yu B, Yang ZY, Li JJ, Minakhina S, Yang MC, Padgett RW, *et al.* Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science* 2005; 307 (5711): 932-35.
- Yang Z, Ebright YW, Yu B, Chen X. HEN1 recognizes 21-24 nt small RNA duplexes and deposits a methyl group onto the 2' OH of the 3' terminal nucleotide. *Nucleic Acids Res* 2006; 34(2): 667-75.
- Li JJ, Yang ZY, Yu B, Liu J, Chen XM. Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 2005; 15 (16): 1501-7.
- Houwing S, Kamminga LM, Berezikov E, Cronembold D, Girard A, van den Elst H, *et al.* A role for Piwi and piRNAs in germ cell maintenance and transposon silencing in Zebrafish. *Cell* 2007; 129 (1): 69-82.
- Kirino Y, Mourelatos Z. Mouse Piwi-interacting RNAs are 2'-O-methylated at their 3' termini. *Nat Struct Mol Biol* 2007; 14 (4): 347-8.
- Ohara T, Sakaguchi Y, Suzuki T, Ueda H, Miyauchi K, Suzuki T. The 3' termini of mouse Piwi-interacting RNAs are 2'-O-methylated. *Nat Struct Mol Biol* 2007; 14 (4): 349-50.
- Kamminga LM, Luteijn MJ, den Broeder MJ, Redl S, Kaaij LJ, Roovers EF, *et al.* Hen1 is required for oocyte development and piRNA stability in zebrafish. *EMBO J* 2010; 29 (21): 3688-700.
- Lim SL, Qu ZP, Kortschak RD, Lawrence DM, Geoghegan J, Hempfling AL, *et al.* HENMT1 and piRNA Stability are required for adult male germ cell transposon repression and to define the spermatogenic program in the mouse. *PLoS Genet* 2015; 11(10): e1005620.
- Saito K, Sakaguchi Y, Suzuki T, Suzuki T, Siomi H, Siomi MC. Pimet, the *Drosophila* homolog of HEN1, mediates 2'-O-methylation of Piwi-interacting RNAs at their 3' ends. *Genes Dev* 2007; 21 (13): 1603-8.
- Horwich MD, Li C, Matranga C, Vagin V, Farley G, Wang P, *et al.* The *Drosophila* RNA methyltransferase, DmHen1, modifies germline piRNAs and single-stranded siRNAs in RISC. *Curr Biol* 2007; 17(14): 1265-72.
- Peng L, Zhang F, Shang R, Wang X, Chen J, Chou JJ, *et al.* Identification of substrates of the small RNA methyltransferase Hen1 in mouse spermatogonial stem cells and analysis of its methyl-transfer domain. *J Biol Chem* 2018; 293 (26): 9981-94.
- Chen X, Liu J, Cheng Y, Jia D. HEN1 functions pleiotropically in *Arabidopsis* development and acts in C function in the flower. *Development* 2002; 129 (5): 1085-94.
- Alefelder S, Patel BK, Eckstein F. Incorporation of terminal phosphorothioates into oligonucleotides. *Nucleic Acids Res* 1998; 26 (21): 4983-8.
- Vagin VV, Sigova A, Li C, Seitz H, Gvozdev V, Zamore PD. A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline. *Science* 2006; 313 (5785): 320-4.
- Roovers EF, Rosenkranz D, Mahdipour M, Han CT, He N, Chuva de Sousa Lopes SM, *et al.* Piwi proteins and piRNAs in mammalian oocytes and early embryos. *Cell Rep* 2015; 10 (12): 2069-82.
- Kabayama Y, Toh H, Katanaya A, Sakurai T, Chuma S, Kuramochi-Miyagawa S, *et al.* Roles of MIWI, MILI and PLD6 in small RNA regulation in mouse growing oocytes. *Nucleic Acids Res* 2017; 45 (9): 5387-98.
- Casper J, Zweig AS, Villarreal C, Tyner C, Speir ML, Rosenbloom KR, *et al.* The UCSC Genome Browser database: 2018 update. *Nucleic Acids Res* 2018; 46 (D1): D762-9.
- Kozomara A, Birgaoanu M, Griffiths-Jones S. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res* 2019; 47 (D1): D155-62.
- Rosenkranz D. piRNA cluster database: a web resource for piRNA producing loci. *Nucleic Acids Res* 2016; 44 (D1): D223-30.
- Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol* 2009; 10 (3): R25.
- Bartram A, Poon C, Neufeld J. Nucleic acid contamination of glycogen used in nucleic acid precipitation and assessment of linear polyacrylamide as an alternative co-precipitant. *BioTechniques* 2009; 47 (6): 1019-22.
- Kim YK, Yeo J, Kim B, Ha M, Kim VN. Short structured RNAs with low GC content are selectively lost during extraction from a small number of cells. *Mol Cell* 2012; 46 (6): 893-5.