RNA 表观遗传修饰及其纳米检测探针研究进展

田涸*, 周翔*

武汉大学化学与分子科学学院, 武汉 430072

*通讯作者, E-mail: ttian@whu.edu.cn; xzhou@whu.edu.cn

收稿日期: 2015-12-30; 接受日期: 2016-01-25; 网络版发表日期: 2016-04-19

国家重点基础研究发展计划(编号: 2012CB720600, 2012CB720603)、国家自然科学基金(编号: 21432008, 91413109, 21372182, 21202126)及武汉市东湖高新区第七批 3551 人才计划资助项目

摘要 核酸是生物体内最重要的生物分子之一, 是遗传的重要物质基础. 作为遗传物质, 核酸通过脱氧核糖核苷酸 dA、dT、dG、dC 及相应的核糖核苷酸 A、G、C、U 之间千变万化的排列组合来编码遗传信息. 除了这些常规的核苷酸外, 核酸中还存在很多修饰的核苷酸结构, 这在 RNA 中尤为明显. 在众多的核酸修饰中, 那些可逆的, 并且可遗传的修饰, 即表观遗传学修饰, 在近年来受到更多关注, 这是由于它们与基因表达调控、疾病发生、生长发育等重要的生命过程息息相关. RNA 表观遗传修饰目前主要是指 N6-甲基腺嘌呤, 这是 RNA 中相对含量最高的修饰类型. 最近几年, 其生物功能研究领域涌现出了大量激动人心的成果. 此外, RNA 中存在的假尿嘧啶核苷, 最近也被提出具有表观遗传方面的功能. 本文主要针对这两种 RNA 的表观遗传修饰及其相关生物功能展开讨论, 总结这个热门命题的最新研究进展. 同时, 对于具有重要生物功能的 RNA 表观遗传修饰的检测研究也非常重要, 其与功能研究能够相互辅助, 因此本文也将讨论在检测方面的新方法, 主要考虑纳米材料在该方面的应用.

关键词 RNA, 表观遗传修饰, 生物功能, 纳米材料, 检测

1 引言

核酸的表观遗传修饰在过去主要是指发生在 DNA 上的化学修饰, 如此前研究较多的在真核生物当中, 胞嘧啶 C5 位上甲基化修饰(5mC), 以及细菌当中胞嘧啶 C5、N4 位甲基化、腺嘌呤 N6 位甲基化等^[1]. 随着近年来研究手段的不断进步, 包括测序技术、质谱等分析方法的革新, 以及化学生物学研究思想的引入, 人们对这些 DNA 表观遗传修饰的理解越来越

深入, 包括它们的动态修饰过程以及新的生物功能等^[2]. 在对 DNA 表观遗传修饰的研究取得多个突破性成果的同时, 研究者们也将目光投入到 RNA 的各种化学修饰上^[3]. RNA 作为中心法则中位于 DNA 和蛋白之间的一个纽带, 不仅负责传递遗传信息, 也具备多种转录后调控功能, 但它们在以往的研究中常被忽视. 最近几年, 研究者将此前在 DNA 表观遗传研究方面成功的技术手段和研究思想, 应用到 RNA 的研究中, 这为那些早已被发现, 但并未引起足够关

引用格式: 田涸, 周翔. RNA 表观遗传修饰及其纳米检测探针研究进展. 中国科学: 化学, 2016, 46: 419–428

Tian T, Zhou X. New progress on RNA epigenetic modification study based on nanomaterials. *Sci Sin Chim*, 2016, 46: 419–428, doi: 10.1360/N032015-00270

注的修饰 RNA, 带来了第二次生命^[4].

已发现的 RNA 修饰种类有 100 多种, 既有甲基、乙酰基这类简单的修饰基团, 也有一些带有杂环的复杂修饰. 这些多样化的修饰使得 RNA 具有复杂的调控功能^[5]. RNA 中的化学修饰主要集中在 tRNA 上, 其次是 rRNA, 约有 1/3 的修饰 RNA 发生在它上面, 而约 10% 的修饰发生在 mRNA 上, 此外也有一些修饰被发现在非编码 RNA 上^[6]. 众多的 RNA 修饰中, 目前最引人关注的是在真核生物中含量相对最高、存在非常保守的 N6-甲基腺嘌呤(m⁶A)^[7]. 这不仅是因为它含量较高、分布相对保守, 更重要的是, 它是第一个被发现存在动态可逆修饰过程的 RNA 甲基化修饰^[8]. 此前认为, RNA 中的修饰寿命很短暂, 而且是静态不变的. 但近两年, 何川课题组^[7]通过研究, 找到了腺嘌呤 N6 位甲基化和去甲基化的酶以及 m⁶A 的结合蛋白, 更新了人们对修饰 RNA 的理解, 并且首次提出这种修饰具有表观遗传学的意义. 在此基础上, 其他同样含量相对较丰富的 RNA 修饰, 也引起了人们的关注, 如假尿嘧啶核苷 Ψ 及 2'-OMe, 它们也可能存在可逆的动态修饰过程, 以及新的调控功能^[9].

2 N6-甲基腺嘌呤在真核生物 RNA 中的生物功能研究进展

于 20 世纪 70 年代, N6-甲基腺嘌呤(m⁶A)在真核生物 RNA 中被发现, 在 mRNA 和 lncRNA 中均有存在, 相对于普通腺嘌呤(A)的比例为 0.1%~0.4%, 这相比 DNA 胞嘧啶 C5-甲基化的相对含量低很多, 因此之前对其关注较 5mC 少^[10]. 同时, m⁶A 上的甲基由于不是直接修饰在碱基芳环上, 对碱基参与配对, 以及发生化学反应的影响更小一些, 这也导致选择性对 m⁶A 进行靶向探测更困难. 这些因素使得无论是对 m⁶A 的含量测定, 还是分布图谱绘制, 以及更进一步的功能研究都需要更高的要求. 在近几年对 m⁶A 的研究中, 研究者主要关注它在真核生物基因组中的分布, 以及它在细胞分化增殖过程中的动态变化过程^[11]. 也就是说, 研究工作一方面集中在单碱基分辨率的 m⁶A 检测方法的发展; 另一方面则集中在与其命运相关的所有酶和蛋白, 包括甲基化酶、去甲基化酶、结合蛋白等的新发现, 以及在此基础上开发小分子探针, 对这些酶进行活性调节和可视化实时标记.

2.1 m⁶A 在真核生物中的分布测定新进展

m⁶A 在真核生物中的分布图谱描绘直到最近几年才实现, 早期人们只能通过质谱、高效液相(HPLC)等仪器分析方法测定其总含量. 2012 年, Dominissini 等及 Meyer 等^[12], 分别利用 m⁶A 的抗体作为特异性捕获和富集的工具, 发展了 m⁶A-seq, 即基于 m⁶A 抗体的免疫共沉淀结合高通量测序, 得到了较为精确的人和小鼠基因组中 m⁶A 的分布图谱, 并由此揭示了 m⁶A 规律性分布于终止子附近和长内外显子中. 这两个课题组发展方法大体一致, 差别主要在富集含有 m⁶A 的 RNA 片段后, 洗脱的方法不同, 一个选择用蛋白酶 K 来降解抗体, 释放 RNA; 而另一个则选择用游离的 m⁶A 将 RNA 片段从抗体上竞争下来, 如图 1 所示. 图 1 是 Dominissini 等^[13]报道的一个详细实验流程, 总的来讲分为 RNA 的分离、片段化、免疫沉淀、洗脱、建库测序这 5 个大的步骤. 它不仅限于 m⁶A 在基因组中的测序分析, 如果其他一些修饰 RNA 有相应的抗体或结合蛋白等高亲和力的结合

图1 基于 m⁶A 抗体的 m⁶A 全基因组图谱测定^[13](网络版彩图)

物质,也可以用这个方法进行富集测序分析.这个方法最主要的局限性在于没有达到单碱基分辨率,此外,它依赖于富集的效率,这导致此方法对待测样本中 m^6A 的含量和个数的测定也有局限性.在这个流程中,免疫共沉淀之前的样品准备过程很重要, RNA 的完整性、DNA 的干扰、片段化的效率均会对后续实验产生影响.其中尤其需要注意的是 DNA 的干扰,特别是今年关于果蝇、线虫、蓝藻等真核生物中 m^6A 在 DNA 中存在的报道,这使得在发现 RNA 中的 m^6A 时, DNA 的影响更加不能忽视.

由于上述 m^6A 的分析方法没有达到单碱基分辨率的精确度,研究者们始终在坚持发展新方法,来满足精确分析 m^6A 在 RNA 中分布的需要.2015 年, Linder 等^[14]发展了一个基于 RNA-抗体交联和免疫沉淀相结合的方法,达到了对 m^6A 单碱基分辨率的测定,并用该方法鉴定了 m^6A 在核仁小 RNA 中的存在.这个方法利用与抗体交联后的 m^6A 在逆转录成 cDNA 时,由于蛋白的干扰,会发生碱基配对的变化或逆转录停止,而导致 cDNA 中碱基突变或被截短.这样,结合测序, cDNA 中突变信号可以被精确地读出.这就将 m^6A 转化成了碱基突变的信息,因此可以达到单碱基分辨率的精确度.在这个方法实施过程中,抗体的选择很重要,同样是识别 m^6A 的抗体,来自不同品牌的产品,有些与 m^6A 结合并交联后,在逆转录过程中带来的碱基突变是不一致的,这无法应用在测序分析中.他们筛选出 Abcam 和 Synaptic Systems (SySy)这两个品牌的 m^6A 抗体,前者致使交联后产物转化成 cDNA 时, m^6A 处以及与该 m^6A 相邻的 C 处均发生 C→T 碱基转换,而后者致使逆转录在 m^6A+1 的位置被截断(如图 2 所示).这两个抗体,前者可以满足 m^6A 及成簇分布的 m^6A 的检测,后者可以同时测出 m^6A 及 m^6Am .

2.2 m^6A 在真核生物中的动态过程

m^6A 在近年来逐渐引起人们的关注,主要是源于其去甲基化酶及去甲基化信号通路的发现,这开启了人们对于它在生物体内动态修饰过程的新认识^[15].因此,腺嘌呤 A 从甲基化到经过一些中间体,再到去甲基化回到腺嘌呤 A 的路径上,每一个步骤的相关酶和蛋白都成为研究的重点.

首先是关于催化 m^6A 形成甲基转移酶的研究.对于腺嘌呤 A 甲基化产生 m^6A 的过程,与胞嘧啶甲基化一样,甲基来源于 S-腺苷甲硫氨酸(SAM),而对于 m^6A 的甲基转移酶人们却认识有限,长期以来都停留在唯一已知亚基 70-kDa METTL3 (methyltransferase like 3)的认识上.将其敲除后发现,会诱导人 HeLa 细胞凋亡,同时在其他一些种属中,它的一些同源蛋白缺失也会导致发育停止或配子发育缺陷.但关于它如何调节 m^6A 的水平以及在 mRNA 中规律性分布的,人们并不清楚,这很大程度上是由于甲基转移酶复合物中其他组分未知.2014 年,杨运桂课题组^[16]发现了 m^6A 甲基转移酶复合物另外两个重要蛋白 METTL14 和 WTAP,它们与 METTL3 在体内形成功能复合物,催化 m^6A 形成(图 3). WTPA 与 METTL3 和 METTL14 作用,它是 METTL3 和 METTL14 定位到核散斑体上,参与行使催化功能所必须的.如果 WTAP 缺失, METTL3 结合 RNA 的能力将大大减弱,这说明它的主要功能是调节 m^6A 甲基转移酶复合物被招募到目标 mRNA 上.此外,它也与 METTL3 一起,调节基因在转录和一系列 RNA 过程中的表达或者剪接.他们在斑马鱼胚胎模型中,将 WTAP 和 METTL3 敲除,导致组织分化缺陷和凋亡的增加.这些均表明, WTAP 作为调控亚基调节 m^6A 甲基转移酶催化亚基 METTL3/METTL14 的细胞内活性以及

图 2 基于光交联的单碱基分辨率的 m^6A 测定^[14] (网络版彩图)

图3 METTL14 和 WTAP 共同参与的腺嘌呤 N6-甲基化过程^[16] (网络版彩图)

RNA 的整个代谢过程.

同一时期, 何川课题组^[8]也报道了 METTL3/METTL14 复合物参与催化腺嘌呤 N⁶-甲基化过程(图4), 结论与上述报道一致, 同样发现 METTL14 和 WTAP 是 m⁶A 形成不可缺少的组分, 并且 METTL14 比 METTL3 的催化活性还要强很多, 只有 METTL3 而没有 METTL14 的情况下, 并不能有效催化 m⁶A 的产生. 此外, 他们还通过光交联结合免疫沉淀的方法, 进行了 METTL3/METTL14 和 WTAP 的作用位点分析, 发现 METTL3/METTL14 均倾向于结合在 GGAC 这种片段区域, 而 WTAP 倾向于结合在 GACU, 这解释了此前发现的 m⁶A 通常有 Pu(G>A)m⁶AC(A/C/U) 序列倾向性现象.

Zhao 课题组^[17]也有对于 METTL3/METTL14 以及 m⁶A 功能的深入研究. 他们发现, 这两个蛋白有协同作用的效果, 它们的靶标很大程度上重合, 在蛋白水平上能够相互稳定, 但都没有同源二聚体. METTL3/METTL14 之间有很强的相互作用, 如果要对它们进行体外表达纯化, 则共表达和共纯化比单独表达纯化其中一个更容易.

在 m⁶A 生物功能的研究中, 去甲基化途径的揭示无疑是最重要的一个成果. 2011 年, 何川课题组^[7]报道了肥胖相关蛋白 FTO, 如图 5 所示, 将 m⁶A 氧化成 hm⁶A 及 f⁶A 后, 脱醛基或脱羧之后回到普通腺嘌呤. 在这个过程中, hm⁶A 及 f⁶A 这两个新的中间物在人和小鼠的 mRNA 中被证实存在. FTO 催化的 m⁶A 氧化去甲基化途径与 Tet 家族催化 5mC 氧化去甲基化途径类似, 均经历羟甲基化和醛基化的中间体. 它们虽然在单独存在的情况下较不稳定, 但细胞内其他一些蛋白因子可能增强其稳定性, 并辅助它们水解, 这些尚不完全明确的机制引起了研究者深入探

图4 不同蛋白复合物的结合位点^[8] (网络版彩图)

图5 FTO 介导的 m⁶A 去甲基化过程^[7]

究的兴趣. 2013 年, 他们又报道了与 FTO 同为 Fe(II) 和 α -KG 依赖的双加氧酶的 ALKBH5 作为去甲基化酶, 它们都起着生物体中消除 m⁶A 标记的作用^[18].

在人们关注 m⁶A 的产生和消去, 揭示甲基转移酶与去甲基化酶的同时, 在甲基化-去甲基化这个过程当中, 与 m⁶A 相互结合识别的蛋白因子毫无疑问也是人们研究的焦点, 它们对 m⁶A 的命运过程起着重要的调控功能. 目前被报道的特异性识别和结合 m⁶A 的蛋白, 主要是 YTH-结构域家族成员, 包括 YTHDF1-3. YTH-结构域家族成员在 2010 年被发现具有单链 RNA 结合蛋白的性质, 它们都具有保守的 YTH 结构域. 2012 年 Dominissini 等^[12a]在用 m⁶A-seq 分析基因组中 m⁶A 分布时发现了与 m⁶A 特异性结合的蛋白 YTHDF2 及 YTHDF3. 2014 年, 何川等^[19]进一步证实了 YTHDF2 对 m⁶A 的选择性结合, 以及由它负责的含有 m⁶A 的 mRNA 选择性降解. 通过 PAR-CLIP 和 RIP-seq 方法, 他们发现 YTHDF2 在终止子和 3'-UTR 以及编码区倾向性的结合, 这暗示其与

mRNA 的稳定性及翻译有关. 同时, 用 siRNA 敲除 YTHDF2, 发现其靶标 mRNA 翻译水平降低, 而不被翻译的 mRNA 增加. 此外, 敲除 YTHDF2 也发现其靶标 mRNA 的寿命延长, 并且结合位点越多, 敲除导致的 mRNA 稳定性增加越明显. 这些现象进一步说明 YTHDF2 导致含有 m⁶A 的 mRNA 稳定性降低.

对于 YTHDF2 与 mRNA 相互作用的机制, 何川等^[19]也进一步进行了研究(图 6). YTHDF2 包含一个碳端 RNA 结合区域, 倾向于结合在含有 G(m⁶A)C 的区域, 以及一个富含 Pro/Gln/Asn 的氮端. 研究结果显示, 单独高表达其氮端或碳端并不导致 m⁶A/A 比例的降低, 相反会使这个比例升高, 只有高表达整个 YTHDF2 才会导致 m⁶A/A 降低. 这说明 YTHDF2 的氮端和碳端均为 YTHDF2 介导的 mRNA 降解所必须的. 另外, 晶体结构进一步显示, YTHDF2 碳端 K416、R527 参与和 RNA 骨架的结合, 而在疏水口袋中的 W432 及 W486 负责识别 m⁶A. 换言之, 在 YTHDF2 与 mRNA 相互作用的过程中, 碳端负责识别含有 m⁶A 的 mRNA, 氮端负责将 YTHDF2-m⁶A-mRNA 复合物定位到专门进行 mRNA 降解的地方进行加速降解, 而整个过程与 mRNA 正常的脱腺嘌呤化过程平行, 并不影响 mRNA 脱腺苷化.

2.3 m⁶A 对 mRNA 的功能影响研究新进展

在 m⁶A 的整个代谢过程被揭示出来以后, 人们对其功能的认识也越来越深入, 这主要是其在调节 mRNA 稳定性/降解, 剪切、拼接等一系列 mRNA 成熟过程, 以及细胞分化发育等方面的重要功能. 但研究者对它的关注并未停止, 相反, 对它在调控 mRNA 稳定性和降解过程中的机制、信号转导通路, 在其他类型 RNA 中的存在和功能, 它分布的组织特异性以及与疾病的相关性, 相关酶的选择性抑制剂或标记探针的开发等问题更加感兴趣.

图6 YTH-结构域家族成员参与的 m⁶A 循环过程^[19]

2015 年, Pan 等^[20]报道了 m⁶A 通过改变其所在 RNA 区域的结构, 来调节相关结合蛋白与之相互作用的强弱, 进而达到调控 mRNA 的稳定性、剪接等过程(图 7). 此处的 m⁶A 是处于 hairpin 结构中的位点, 这个片段截取自人 lncRNA 转移相关肺腺癌的转录组, 它有与之结合的异质核糖核蛋白 C (HNRNPC), 该结合蛋白结合位置如图 7 所示, 部分位于 loop 区的 U₅-tract 区域. 当它对面的腺嘌呤 A 变成 m⁶A 时, hairpin 茎干区的稳定性下降, U₅-tract 整个都处于 loop 区, 这使得 HNRNPC 与 U₅-tract 的结合更强, 因此含有 m⁶A 的 hairpin 整体上与 HNRNPC 结合, 比相应普通 A 的情况强. 他们将这种由于 m⁶A 存在, 改变该区域 RNA 结构, 进而增强邻近位置与蛋白相互作用的调节方式命名为“m⁶A-switch”, 并证实了这种调控方式存在的广泛性. 高保守性的“m⁶A-switch”富集在编码及非编码 RNA 的内含子上, 外显子上的“m⁶A-switch”倾向于在中间, 内含子上的倾向于在 5'-端. 对于中编码 RNA 的“m⁶A-switch”, 通常在长外显子上, 以及终止子附近和 3'-UTR.

除了关于 m⁶A 对 mRNA 功能调控的研究, 最近研究者的关注也延伸到非编码 RNA 上, 如 miRNA. 2015 年, Claudio 等^[15]报道了 m⁶A 在 pri-miRNA 成熟过程中的功能. 首先通过 m⁶A-seq 证实了 m⁶A 在 pri-miRNA 中的存在, 并发现 METTL3 的缺失导致成熟的 miRNA 水平下降, 并且与细胞种类、组织特异性无关, 整体上的 miRNA 表达下调, 与此同时, pri-miRNA 的水平却明显上升. 相应地, 如果 METTL3 过表达, 成熟 miRNA 的表达量就会明显升高. 这些现象说明, pri-miRNA 是被 METTL3 依赖的 m⁶A 所标记的, 它转变为成熟的 miRNA 的过程依赖于 METTL3. 而 METTL3 及 m⁶A 与 pri-miRNA 成熟过

图7 m⁶A 介导结构变化调控 mRNA^[20]

程中起重要作用的 RNA 结合蛋白 DGCR8 及 type III RNase DROSHA 的相互关系也进行了进一步研究. DGCR8 与 METTL3 的相互关联是通过 RNA 联系在一起的, 它们并不直接形成复合体. 而 DGCR8 对 m^6A 也有相互作用, METTL3 的缺失或表达水平降低, 会导致 DGCR8 对含有 m^6A 的 RNA 结合减弱, 但 DGCR8 不是直接结合在 m^6A 上, 如图 8 所示. 通过免疫共沉淀进一步分析 DGCR8 与 METTL3 及 m^6A 的关联, 发现 METTL3 的缺失导致总 RNA 被 DGCR8 的识别和结合减弱. 这说明 m^6A 在 pri-miRNA 中的作用是使它能更好地被 DGCR8 蛋白识别, 以便后续经历 pre-miRNA 等一系列过程, 变成成熟的 miRNA.

此外, 关于 m^6A 去甲基化的过程, 除了 FTO/ALKBH5 酶催化下的途径外, 一些非酶催化的去甲基化过程及新的中间产物也被发现. 2015 年, 周翔课题组^[21]报道了双氧水/碳酸氢铵体系作用下的 m^6A 去甲基化途径, 在这个过程中除了产生已知的两个中间产物——N6-羟甲基腺苷(hm^6A)、N6-醛基腺苷(f^6A)外, 还发现了一种新的中间体——N6-过氧甲基腺苷(oxm^6A) (图 9). 这是首次发现非酶体系下 m^6A 的脱甲基化过程, 并揭示了一种新的脱甲基机理. 进一步研究发现, 体外合成带 m^6A 短 RNA 链及从 HeLa 细胞中提取的 RNA 样品, 经 H_2O_2/NH_4HCO_3 反应体系处理后利用基质辅助激光解析串联飞行时间质谱(MALDI-TOF)和气质联用(LC-MS)检测, 可以观察到脱甲基氧化现和脱甲基化中间体. 由于双氧水作为活性氧物质可以在正常的新陈代谢和免疫反应中产生, 血清和细胞中也存在高浓度的碳酸氢铵, 因此细胞中可能存在由于活性氧物质引起的脱甲基化现象, 并发挥着一定的作用.

3 其他表观遗传修饰 RNA 功能研究的最新进展

在其他众多的 RNA 修饰中, 假尿嘧啶核苷 Ψ 是最近又一个被提出可能具有表观遗传学意义的修饰 RNA. 它在修饰 RNA 中的总体含量相对丰富, 以前人们对它的认识主要是: 在 rRNA 中存在, 影响其与核糖体结合以及翻译的忠实度; 在核内小 RNA 中存在, 参与 mRNA 的剪接等加工过程. 最近, 伊成器课题组^[22]报道, 在 mRNA 中相对其他修饰, Ψ 含量较为丰富, 且其具有表观遗传调控的功能(图 10). 首先通

图 8 m^6A 对 pri-miRNA 成熟过程的功能研究^[15] (网络版彩图)

图 9 非酶体系双氧水作用下的 m^6A 去甲基化过程^[21]

过质谱检测发现 Ψ 在 mRNA 中相对 U 的含量达到 0.2%~0.6%, 比以前人们认识的含量要高. 随后, 他们发展了一个选择性化学修饰的方法, 利用叠氮修饰的一个碳二亚胺衍生物(N_3 -CMC), 对 Ψ 进行了选择性标记和富集测序. 经该小分子处理后的 RNA, 在逆转录反应时, 会在 N_3 -CMC 标记处停止, 而在测序结果中反映出来. 通过测序分析, 他们在 HEK293T 细胞转录组中测到 2084 个 Ψ 位点, 并得到了 Ψ 在 mRNA 中的分布规律, 发现其在编码区和 3'-UTR 有特征性分布. 同时还发现, Ψ 在 lncRNA 中存在, 非编码 RNA 中的 Ψ 主要是存在于 lncRNA 中. 对于 mRNA 和 lncRNA 中负责合成 Ψ 的酶, 他们在已报道的 13 种 Ψ 合成酶中进行筛查, 发现 hPUS1 可作用于 mRNA. 此外, PUS4 及 PUS7 分别具有识别“GUUC”和“UGUA”序列的性质, 它们也可作用于 mRNA. 也就是说, 对于不同序列或结构的 mRNA, 其中的 Ψ 修饰是多种合成酶综合作用的结果. 此外还提出, Ψ 在 mRNA 中的动态修饰过程可以被一些环境刺激信号, 如过氧化氢、热激等调节.

对于 Ψ 的测序研究, 在上述工作之前也有报道, 也是利用类似的吗啡林衍生化的碳二亚胺化合物

(CMC)对 RNA 样品进行处理,但由于之前并未有富集的功能,因此测序结果只测到 100~400 个 Ψ 位点,比伊成器课题组测到的 Ψ 位点少很多.同时,伊成器课题组的富集测序方法也揭示了 4 个新的 Ψ 位点.由此可见,通过化学探针对待测靶标进行富集,对于提高大数据的准确度十分有利.

4 纳米材料在 RNA 表观遗传学研究中的应用

在核酸表观遗传修饰研究的过程中,纳米材料的应用也被积极地引入进来,这主要体现在表观遗传修饰的检测方面.此前,在 DNA 甲基化检测方法的发展中,纳米孔、纳米簇、量子点等纳米材料的应用就是典型的例子.对于 RNA 的重要表观遗传修饰 m^6A ,由于其参与碱基配对的性质及化学反应活性等方面,与普通 A 差别不大,目前并没有发现能有效区分 A 与 m^6A 的化学反应.因此, m^6A 的定性、定量分析主要依赖于抗体和测序,而化学方法和技术的应用不多见.为了发展更为多元化的、简单易行、性价比高的方法,来进行 m^6A 的检测分析,各种新型材料,特别是纳米材料,被尝试应用.

2015 年, Yeh 等^[23]发展了一个基于银纳米簇的

图 10 化学法用于转录组中假尿嘧啶核苷 Ψ 的测定及功能研究^[22] (网络版彩图)

m^6A 检测体系——maNCB (methyladenine-specific NanoCluster Beacon), 该体系基于杂交, 简单快捷, 不需要酶, 可以达到单碱基分辨率, 并能用于复杂混合体系中 m^6A 的定量分析. 之前, 银纳米簇就被用于核酸的检测和分析, 主要是基于其与核酸相互作用后, 荧光发射可以显著增强, 而且, 其发出荧光的发射波长会随与之作用的核酸序列不同而变化. 换言之, 银纳米簇邻近的核酸会影响银纳米簇的荧光发射, 这为其用于 m^6A 的检测提供了前提. 以往用于 SNP 检测的通用纳米簇信标(NC)体系的探针, 通常包括一个富含 C 的序列与银纳米簇相连(NC 探针), 另一个探针为富含 G 的增强探针. 这个用于 m^6A 检测的 maNCB 体系是一个“三向 junction”的体系(图 11), 由 NC 探针、增强探针序列和一个含有待测 A 或 m^6A 的靶标序列构成, 之间通过彼此的杂交形成. 通过对两个探针序列的筛选, 发现 NC 探针序列中需要引入一个 G, 而另一个增强探针需要引入一个 AP 位点, 它们与待测 A 或 m^6A 被设计处于空间邻近的位置. 在 RNA 中, A 与 G 之间可以形成 Hoogsteen 配对, 当它们处于空间上拥挤的环境时, m^6A 中的 N-甲基会影响 Hoogsteen 与糖环的作用, 而减弱 m^6A -G 之间的 Hoogsteen 配对, 使得银纳米簇在 645、670 nm 处的荧光发生变化. 具体来讲, 当待测序列中含有 m^6A 时, 645 nm 处的荧光发射相对 670 nm 处减弱.

除了银纳米簇在 RNA 表观遗传修饰 m^6A 中有上述创新应用外, 纳米孔是作为纳米材料应用在这方面更为主要的方向. 前期纳米孔已经被成功开发用于胞嘧啶表观遗传修饰的测序分析研究. 纳米孔主要有固相纳米孔和蛋白纳米孔, 如 heptameric 和

图 11 基于银纳米簇的 m^6A 检测体系^[23] (网络版彩图)

α -hemolysin (α HL) 两种类型, 其中蛋白纳米孔容易进行化学修饰, 因此更容易用在核酸测序中. 胞嘧啶表观遗传修饰用纳米孔测序分析, 是指将一条 DNA 链固定在 α HL 纳米孔中, 利用不同修饰胞嘧啶碱基通过孔道引起的电信号变化, 来进行各自的区分. 随后, m^6A 的表观遗传功能被大量报道, 因此, 用纳米孔进行 m^6A 的测序分析也随之而来^[24]. 如图 12 所示, 在 5 nm 长的 β 桶型 α HL 纳米孔道中, 利用生物素-链酶亲和素相互作用, 将单链 RNA 抓住并固定其中, 这样当单链被抓到时, 产生的电信号强度显著下降. 当单链 RNA 中存在不同修饰 RNA 碱基时, 电信号的改变彼此不同, 借以区分各种修饰 RNA 碱基. 这篇报道中, α HL 蛋白是经过特定位点氨基酸修饰的, 用来增加其区分各种修饰碱基的能力. 该研究试验了各种不同的含有修饰 RNA 碱基的寡核苷酸链, 均显示出较好的区分效果. 这种纳米孔的方法用于快速测序分析, 还需要结合一个移位酶, 如外切酶或逆转录酶等, 这样也可以同时消除 RNA 二级结构对测序

产生的影响, 因为当单链 RNA 分子通过纳米孔道时, 必须打开折叠才能通过. 这也是相对于有些基于酶反应检测修饰核酸碱基的一个优势.

5 总结与展望

最近几年, 围绕 m^6A 的研究向人们揭示了发生在 RNA 上的化学修饰所具有的表观遗传学意义. 它在体内的命运过程, 随着一些关键酶和蛋白新功能的发现, 被逐步揭示出来. 这些新发现暗示着 RNA 的表观遗传修饰对于转录后调控和蛋白表达有着重要的意义. 但 RNA 的表观遗传修饰目前仍存在许多问题, 如它与一些重大疾病的关系; 它的产生与消灭过程中, 已知酶和蛋白以外的其他调节因子, 以及是否存在其他的去甲基化途径; 它在细胞分化中的变化规律; 其他含量较丰富的修饰 RNA 的新功能等, 需要进一步研究, 直至它真正能为人类疾病诊断治疗提供依据和帮助.

关于先进功能材料在 RNA 表观遗传修饰检测中的应用, 目前报道并不多, 以上是两个典型的例子^[23,24]. 可以看出, 这两个例子一个基于银纳米簇, 一个基于纳米孔, 其他功能材料的应用还有较大的设计空间. 相对而言, DNA 的胞嘧啶表观遗传修饰相应的检测方法则非常丰富多元化, 量子点、纳米金、碳纳米管这些纳米材料都有应用, 并结合电化学、毛细管电泳等方法被进一步衍生化应用^[25]. 这一方面是由于 m^6A 的生物功能近两年才有较多报道, 另一方面是由 m^6A 碱基修饰的特性导致的. 有文献报道 m^6A 上 N6 位甲基化对其碱基互补配对影响较小^[26], 因此基于探针杂交或一些酶催化的反应并不能很好地区分 m^6A 与普通 A, 这使得一些基于纳米材料和探针杂交的体系可能不能高效用于 m^6A 检测. 但关于 m^6A 的结构、化学性质研究越来越深入, 目前已有许多新的性质和相关机制被报道^[11]. 可以设想, 结合人们对 m^6A 的新认识, 以及各自纳米材料体系, 将会为 RNA m^6A 的检测提供广阔的空间.

图 12 基于纳米孔的 m^6A 检测体系^[24] (网络版彩图)

参考文献

- Lister R, Pelizzola M, Dowen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J, Nery JR, Lee L, Ye Z, Ngo QM, Edsall L, Antosiewicz-Bourget J, Stewart R, Ruotti V, Millar AH, Thomson JA, Ren B, Ecker JR. *Nature*, 2009, 462: 315-322
- Fernandez AF, Rosales C, Lopez-Nieva P, Grana O, Ballestar E, Ropero S, Espada J, Melo SA, Lujambio A, Fraga MF, Pino I, Javierre B,

- Carmona FJ, Acquadro F, Steenbergen RD, Snijders PJ, Meijer CJ, Pineau P, Dejean A, Lloveras B, Capella G, Quer J, Buti M, Esteban JI, Allende H, Rodriguez-Frias F, Castellsague X, Minarovits J, Ponce J, Capello D, Gaidano G, Cigudosa JC, Gomez-Lopez G, Pisano DG, Valencia A, Piris MA, Bosch FX, Cahir-McFarland E, Kieff E, Esteller M. *Genome Res*, 2009, 19: 438–451
- 3 Fu Y, Dominissini D, Rechavi G, He C. *Nat Rev Genet*, 2014, 15: 293–306
 - 4 Yue Y, Liu J, He C. *Genes Dev*, 2015, 29: 1343–1355
 - 5 Shen L, Song CX, He C, Zhang Y. *Annu Rev Biochem*, 2014, 83: 585–614
 - 6 Wang X, He C. *RNA Biol*, 2014, 11: 669–672
 - 7 Jia G, Fu Y, Zhao X, Dai Q, Zheng G, Yang Y, Yi C, Lindahl T, Pan T, Yang YG, He C. *Nat Chem Biol*, 2011, 7: 885–887
 - 8 Liu J, Yue Y, Han D, Wang X, Fu Y, Zhang L, Jia G, Yu M, Lu Z, Deng X, Dai Q, Chen W, He C. *Nat Chem Biol*, 2014, 10: 93–95
 - 9 Parisien M, Yi C, Pan T. *RNA*, 2012, 18: 355–367
 - 10 Lee M, Kim B, Kim VN. *Cell*, 2014, 158: 980–987
 - 11 Wang X, Lu Z, Gomez A, Hon GC, Yue Y, Han D, Fu Y, Parisien M, Dai Q, Jia G, Ren B, Pan T, He C. *Nature*, 2014, 505: 117–120
 - 12 a) Dominissini D, Moshitch-Moshkovitz S, Schwartz S, Salmon-Divon M, Ungar L, Osenberg S, Cesarkas K, Jacob-Hirsch J, Amariglio N, Kupiec M, Sorek R, Rechavi G. *Nature*, 2012, 485: 201–206; b) Meyer KD, Saletore Y, Zumbo P, Elemento O, Mason CE, Jaffrey SR. *Cell*, 2012, 149: 1635–1646
 - 13 Dominissini D, Moshitch-Moshkovitz S, Salmon-Divon M, Amariglio N, Rechavi G. *Nat Protoc*, 2013, 8: 176–189
 - 14 Linder B, Grozhik AV, Olarerin-George AO, Meydan C, Mason CE, Jaffrey SR. *Nat Method*, 2015, 12: 767–772
 - 15 Claudio R, Hyeseung L, Hani G, Nils H, Sohail F. *Nature*, 2015, 519: 482–485
 - 16 Ping XL, Sun BF, Wang L, Xiao W, Yang X, Wang WJ, Adhikari S, Shi Y, Lv Y, Chen YS, Zhao X, Li A, Yang Y, Dahal U, Lou XM, Liu X, Huang J, Yuan WP, Zhu XF, Cheng T, Zhao YL, Wang X, Rendtlew Danielsen JM, Liu F, Yang YG. *Cell Res*, 2014, 24: 177–189
 - 17 Wang Y, Li Y, Toth JJ, Petroski MD, Zhang Z, Zhao JC. *Nat Cell Biol*, 2014, 16: 191–198
 - 18 Zheng G, Dahl JA, Niu Y, Fedorcsak P, Huang CM, Li CJ, Vagbo CB, Shi Y, Wang WL, Song SH, Lu Z, Bosmans RP, Dai Q, Hao YJ, Yang X, Zhao WM, Tong WM, Wang XJ, Bogdan F, Furu K, Fu Y, Jia G, Zhao X, Liu J, Krokan HE, Klungland A, Yang YG, He C. *Mol Cell*, 2013, 49: 18–29
 - 19 Zhu T, Roundtree IA, Wang P, Wang X, Wang L, Sun C, Tian Y, Li J, He C, Xu Y. *Cell Res*, 2014, 24: 1493–1496
 - 20 Liu N, Dai Q, Zheng G, He C, Parisien M, Pan T. *Nature*, 2015, 518: 560–564
 - 21 Wu J, Xiao H, Wang T, Hong T, Fu B, Bai D, He Z, Peng S, Xing X, Hu J, Guo P, Zhou X. *Chem Sci*, 2015, 6: 3013–3017
 - 22 Li X, Zhu P, Ma S, Song J, Bai J, Sun F, Yi C. *Nat Chem Biol*, 2015, 11: 592–597
 - 23 Chen YA, Obljosca JM, Liu YL, Liu C, Gwozdz ML, Yeh HC. *J Am Chem Soc*, 2015, 137: 10476–10479
 - 24 Ayub M, Bayley H. *Nano Lett*, 2012, 12: 5637–5643
 - 25 a) Bailey VJ, Easwaran H, Zhang Y, Griffiths E, Belinsky SA, Herman JG, Baylin SB, Carraway HE, Wang TH. *Genome Res*, 2009, 19: 1455–1461; b) Wang GL, Luo HQ, Li NB. *Analyst*, 2014, 139: 4572–4577
 - 26 Liu N, Parisien M, Dai Q, Zheng G, He C, Pan T. *RNA*, 2013, 19: 1848–1856

New progress on RNA epigenetic modification study based on nanomaterials

Tian Tian^{*}, Xiang Zhou^{*}

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

^{*}Corresponding authors (email: ttian@whu.edu.cn; xzhou@whu.edu.cn)

Abstract: Nucleic acids are one of the most important biomacromolecules in living systems. As genetic materials, they control the whole process of transmission of hereditary information through the different permutation and combination of the four bases A, G, T, C. Meanwhile, with the deepening of nucleic acid research, the changes beyond the base sequence, are found to significant biological function, during gene expression and the transmission of hereditary information. These mainly refer to the epigenetic modifications, the modifications that are heritable and reversible *in vivo*. RNA epigenetic modification mainly refers N6-methyl adenine, which is the most abundant modification in RNA. Herein, we mainly talk about the epigenetic modification in RNA, which was raised just in recent years. We would focus on its biological function and using nano materials as new tools for its study, discussing the latest progress and looking to the future of this field.

Keywords: RNA, epigenetic modification, biological function, nano material, detection

doi: 10.1360/N032015-00270