【学术快报 / Letters】

莱茵衣藻响应缺硫的环状 RNA 的预测与鉴定

侯恺玥¹, 娄素琳¹, 曾志勇¹, 胡章立^{1,2}, 李 辉^{1,2}

1) 广东省植物表观遗传学重点实验室, 广东省海洋藻类生物工程技术研究中心, 深圳大学生命与海洋科学学院, 广东深圳 518060; 2) 深圳市海洋藻类生物工程技术研究中心, 深圳大学龙华生物产业创新研究院, 广东深圳 518060

摘 要: 环状核糖核酸(circular ribonucleic acid, circular RNA 或 circRNA)是一类无 5' 帽子结构及 3' poly A 尾, 以共价键连接形成闭合环形结构的非编码 RNA 分子, 通过转录后调控的方式参与动植物细胞的众多代谢途径. 莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*, *C. reinhardtii*)是一种重要的真核单细胞模式微藻, 为探究其是否存在环状 RNA, 本研究通过 RNA-Seq 高通量测序分析正常与缺硫培养的 *C. reinhardtii* RNA 组学数据, 首次预测获得 218 条环状 RNA 序列, 通过对比缺硫处理前后莱茵衣藻环状 RNA 序列, 获得 8 条差异表达的环状 RNA 序列(其中, 5 条为表达上调、3 条为表达下调). 本研究首次对单细胞真核微藻莱茵衣藻进行环状 RNA 的生物信息学预测, 确认莱茵衣藻环状 RNA 响应缺硫胁迫, 为下一步揭示莱茵衣藻环状 RNA 参与响应莱茵衣藻缺硫的作用机制奠定基础.

关键词: 分子生物学; 真核微藻; 莱茵衣藻; 非编码核糖核酸; 环状核糖核酸; 缺硫

中图分类号: Q173 **文献标志码:** A **doi:** 10.3724/SP.J.1249.2020.03221

Prediction and identification of sulfur-responding circular RNA in *Chlamydomonas reinhardtii*

HOU Kaiyue¹, LOU Sulin¹, ZENG Zhiyong¹, HU Zhangli^{1,2}, and LI Hui^{1,2}

1) Guangdong Key Laboratory of Plant Epigenetics, Guangdong Technology Research Center for Marine Algal Bioengineering, College of Life Sciences and Oceanography, Shenzhen University, Shenzhen 518060, Guangdong Province, P. R. China

2) Shenzhen Engineering Laboratory for Marine Algal Biotechnology, Longhua Innovation Institute for Biotechnology, Shenzhen University, Shenzhen 518060, Guangdong Province, P. R. China

Abstract: Circular ribonucleic acid (circular RNA or circRNA) is a class of non-coding RNA without 5' cap-structure and 3' poly A tail, connected by covalent bonds to form a closed circular structure, and involved in numerous metabolic pathways in animal and plant cells through post-transcriptional regulations. *Chlamydomonas reinhardtii* (*C. reinhardtii*) is an important eukaryotic single-cell microalga. In this study, 218 sequences associated with circRNA were predicted for the first time in *C. reinhardtii*. By comparing the sequences of circRNA from sulfur-replete and sulfur-deprived *C. reinhardtii*, 8 differentially expressed circRNA sequences were obtained (5 of them were up-regulated and 3 were down-regulated). This is the first report on a circRNA bioinformatics prediction of *C. reinhardtii*, confirming that the circRNA of *C. reinhardtii* responds to sulfur deprived stress.

Key words: molecular biology; eukaryotic microalga; *Chlamydomonas reinhardtii* (*C. reinhardtii*); non-coding RNA; circular RNA (circRNA); sulfur deprivation

Received: 2020-01-02; **Accepted:** 2020-01-08

Foundation: National Key R & D Project for Synthetic Biology of China (2018YFA0902500); National Natural Science Foundation of China (31800300, 31970366, 31870343); Natural Science Foundation of Guangdong Province (2018A030310445, 2018A030313507)

Corresponding author: Professor LI Hui. E-mail: lihui80@szu.edu.cn; Professor HU Zhangli. E-mail: huzl@szu.edu.cn

Citation: HOU Kaiyue, LOU Sulin, ZENG Zhiyong, et al. Prediction and identification of sulfur-responding circular RNA in *Chlamydomonas Reinhardtii* [J]. Journal of Shenzhen University Science and Engineering, 2020, 37(3): 221-223. (in Chinese)

环状核糖核酸(circular ribonucleic acid, circular RNA 或 circRNA)是一类无 5' 帽子结构和 3' poly A 尾,以共价键连接形成闭合环形结构的非编码 RNA 分子.环状 RNA 广泛存在于包括人类在内的真核生物界,在生命过程中扮演着重要的调控角色^[1-2].在植物体内,环状 RNA 参与花发育、果实成熟和逆境响应等过程^[3-4].在动物研究中,有相关报道指出环状 RNA 与肿瘤发生的分子生物学过程密切相关,能够直接或间接调节肿瘤的发生^[5].此外,环状 RNA 能够竞争性结合 microRNA,发挥分子海绵的吸附作用,从而实现对 mRNA 的调控^[6].然而,作为一种崭新的转录后调控因子,目前仅对动物与植物细胞中的环状 RNA 进行了有限研究,单细胞真核生物是否具有该类型的调控仍属未知.本研究通过组学测序分析,探究单细胞模式真核生物——莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*, *C. reinhardtii*)是否存在环状 RNA.硫元素作为莱茵衣藻正常生长的必需元素,参与衣藻包括光合产氢在内的众多代谢调控途径.课题组前期研究发现,缺硫培养后的衣藻 microRNA 表达谱发生明显的差异性表达^[7-8],本研究拟对正常与缺硫培养的莱茵衣藻组学数据进行对比,以期探究单细胞真核微藻中是否存在环状 RNA,并对营养胁迫进行应答.

1 实验材料与方法

1.1 藻株和培养条件

莱茵衣藻藻株 CC849 购自莱茵衣藻资源中心(<https://www.chlamycollection.org/>).将莱茵衣藻 CC849 在 TAP (Tris-acetate-phosphate) 培养基中培养,培养温度为 22 ℃,光照强度为 50 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$.将培养的莱茵衣藻置于恒温光照培养箱培养至对数生长期后,离心收集藻细胞于 TAP-S (缺硫 TAP) 培养基中重悬,TAP-S 培养基按照文献[9]报道的进行配制,所有的硫元素用等物质的量的氯元素代替.缺硫处理 24 h,培养条件不变,对照组用 TAP 培养基在同等条件下同时处理,用于缺硫前后莱茵衣藻总 RNA 的提取^[7-8].

1.2 cDNA 文库的构建与环状 RNA 的鉴定

用 TRIzol 法提取莱茵衣藻总 RNA,通过核糖核酸酶(ribonuclease, RNase)R 消除线性 RNA 后,使用 SuperScript III 试剂盒进行反转录得到 cDNA.加入特异性引物(根据环状 RNA 连接位点设计的背靠背引物),通过聚合酶链式反应(polymerase chain

reaction, PCR) 扩增得到约 100 碱基对(base pair, bp)的条带,回收并纯化后测序,所得序列与预测环状 RNA 序列相匹配即为成功分离得到的环状 RNA.

2 结果与分析

2.1 测序结果分析

对莱茵衣藻缺硫处理前后基因组测序得到原始测序序列,为了保证信息分析质量,对 raw reads 进行以下过滤后获得 clean reads:① 去除带接头(adapter)的 reads;② 去除无法确定碱基信息的比例大于 10% 的 reads;③ 去除低质量(质量值(sound quality, SQ) ≤ 5 的碱基数占整个 read 的 50% 以上)的 reads.后续分析都基于 clean reads 预测到的 218 条环状 RNA 序列.

2.2 环状 RNA 表达水平分析

统计各样本中环状 RNA 的表达量,并运用每千个碱基的转录每百万映射读取的转录本数(transcripts per kilobase of exon model per million mapped reads, TPM)进行表达量归一化处理,结果如图 1.从图 1 可见,莱茵衣藻在缺硫处理后,环状 RNA 表达量提高.采用微阵列显著性分析(significance analysis of microarrays, SAM)算法对不同组间差异表

图 1 缺硫前后莱茵衣藻中环状 RNA 表达量密度分布
Fig. 1 Distribution of circRNA expression density in TAP and TAP-S cultured *C. reinhardtii*

达结果进行统计学分析, 当 $P < 0.05$ 时, 认为差异具有显著性. 图 2 为不同组间存在显著性差异表达的上调转录本(5 个)和下调转录本(3 个), N 为差异倍数. 每个比较组合都会得到一个差异环状 RNA 集, 将所有差异环状 RNA 集取并集后得到 8 条有显著差异的环状 RNA. 莱茵衣藻在缺硫处理后, 环状 RNA 表达量有显著差异. 因此推测, 莱茵衣藻部分环状 RNA 是响应缺硫胁迫的.

图 2 莱茵衣藻缺硫前后环状 RNA 的表达差异
Fig. 2 Differential expression of circRNA volcanoes
in TAP and TAP-S cultured *C. reinhardtii*

3 讨 论

目前, 已在哺乳动物和植物中发现环状 RNA, 诸多报道证明环状 RNA 在肿瘤发生中发挥着重要的调控作用, 所以一般将环状 RNA 作为肿瘤诊断标志物, 在疾病预防和诊治领域发挥重要作用. 本研究在莱茵衣藻中首次发现环状 RNA 的存在, 不仅丰富了人们对环状 RNA 的认识, 也为揭示环状 RNA 存在于低等单细胞微藻提供了依据. 此外, 本研究确认莱茵衣藻环状 RNA 对缺硫胁迫进行响应, 下一步将探讨衣藻环状 RNA、microRNA 以及靶基因之间的相互作用与调控关系, 以期深入理解衣藻环状 RNA 响应缺硫的机制.

基金项目: 国家重点研发计划资助项目 (2018YFA0902500); 国家自然科学基金资助项目 (31800300, 31970366, 31870343); 广东省自然科学基金资助项目 (2018A030310445, 2018A030313507)

作者简介: 候恺玥 (1994—), 深圳大学硕士研究生. 研究方向: 微藻分子生物学. E-mail: 841011374@qq.com

引 文: 候恺玥, 娄素琳, 曾志勇, 等. 莱茵衣藻响应缺硫的环状 RNA 的预测与鉴定[J]. 深圳大学学报理工版, 2020, 37(3): 221-223.

参考文献 / References:

- [1] SALZMAN J, GAWAD C, WANG P L, et al. Circular RNAs are the predominant transcript isoform from hundreds of human genes in diverse cell types [J]. PLoS One, 2012, 7(2): e30733.
- [2] SALZMAN J, CHEN R E, OLSEN M N, et al. Cell-type specific features of circular RNA expression [J]. PLoS Genetics, 2013, 9(9): e1003777.
- [3] DOU Yongchao, LI Shengjun, YANG Weilong, et al. Genome-wide discovery of circular RNAs in the leaf and seedling tissues of *Arabidopsis Thaliana* [J]. Current Genomics, 2017, 18(4): 360-365.
- [4] DARBANI B, NOEPARVAR S, BORG S. Identification of circular RNAs from the parental genes involved in multiple aspects of cellular metabolism in barley [J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7: 776.
- [5] HANSEN T B, JENSEN T I, CLAUSEN B H, et al. Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges [J]. Nature, 2013, 495(7441): 384-388.
- [6] JECK W R, SHARPLESS N E. Detecting and characterizing circular RNAs [J]. Nature Biotechnology, 2014, 32(5): 453-461.
- [7] SHU Longfei, HU Zhangli. Characterization and differential expression of microRNAs elicited by sulfur deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. BMC Genomics, 2012, 13(1): 108.
- [8] 胡章立, 舒龙飞, 苟德明. 莱茵衣藻硫胁迫相关 microRNA 检测及其靶基因分析[J]. 深圳大学学报理工版, 2011, 28(3): 237-242.
HU Zhangli, SHU Longfei, GOU Deming. MicroRNAs quantification and related target genes for response to sulfur deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. Journal of Shenzhen University Science and Engineering, 2011, 28(3): 237-242. (in Chinese)
- [9] WU Shuangxiu, YAN Guangyu, XU Lili, et al. Improvement of hydrogen production with expression of *lba* gene in chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii* [J]. International Journal of Hydrogen Energy, 2010, 35, 13419-13426.

【中文责编: 晨 兮; 英文责编: 艾 琳】

<http://journal.szu.edu.cn>