

核糖体谱技术及其应用*

贾志龙^{1, 2)} 屈武斌¹⁾ 卢一鸣¹⁾ 骆志刚^{3)**} 张成岗^{1)**}

¹⁾ 军事医学科学院放射与辐射医学研究所, 蛋白质组学国家重点实验室, 全军军事认知与心理卫生研究中心, 北京 100850;

²⁾ 国防科学技术大学理学院化学与生物学系, 长沙 410073; ³⁾ 国防科学技术大学计算机学院, 长沙 410073)

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2012.00395

当前, 基因组范围内分析细胞内蛋白质翻译事件的研究仍然落后于转录事件的研究. 无论原核生物还是真核生物, 细胞内的核糖体均是蛋白质翻译的工厂, 因此对于核糖体的研究至关重要. 早在 1963 年, Warner 等^[1]发现了细胞内的多聚核糖体结构. Wolin 和 Walter^[2]用 RNase 消化正在翻译中的 mRNA 片段, 由于核糖体覆盖的 mRNA 片段被核糖体蛋白保护, 不能被 RNase 降解而保留下来, 对这些片段进行分析就可以得到在 mRNA 上正在翻译的核糖体的分布情况. 2003 年, Arava 等^[3]利用多聚核糖体芯片技术研究了酵母全基因组范围内的 mRNA 翻译谱. 随着二代测序技术的深入发展, Ingolia 等^[4]基于核糖体保护的 mRNA 不被核糖核酸酶所降解而保留下来, 而裸露的 mRNA 被消化的原理, 获得基因组范围内核糖体覆盖的 mRNA 片段, 并对这些片段进行深度测序, 从而提出了全基因组范围内分析核糖体的分布情况, 同时可以进一步在单核苷酸水平上分析蛋白质翻译事件的核糖体谱技术. 核糖体谱技术可以提供通用的蛋白质组学方法不能检测的基因组范围内大量的蛋白质定量数据^[5]. 其后, 研究人员开始利用核糖体谱技术在多个模式生物中研究翻译事件.

核糖体谱技术的产生和不断发展为蛋白质翻译事件、蛋白质组学、microRNA 的作用原理以及疾病机理研究提供了另一个维度上重要并且精确的手段. 自从 2009 年诞生以来, 核糖体谱技术已经应用于多个方面, 并且产生丰硕的研究结果. 本文主要综述了如何通过实验获得核糖体谱以及核糖体谱数据分析的一般方法, 重点介绍核糖体谱的广泛应用.

1 核糖体谱产生方法

最初, 核糖体谱技术由 Ingolia 等^[4]提出并用于在全基因组范围内分析酵母的翻译事件. 随后, 核糖体谱技术被应用到细菌^[6-7]、斑马鱼胚胎^[8]、小鼠胚胎干细胞^[9]、人前列腺癌细胞^[10]. 可以预见核糖体谱技术还将广泛用于多种生物学的翻译事件研究中.

构建核糖体谱的一般实验方法和数据处理流程如下^[6, 10-11]:

a. 对培养的细胞用翻译延伸抑制剂真核生物一般使用放线菌酮(cycloheximide), 细菌一般使用氯霉素(chloramphenicol)处理, 可以使正在翻译的核糖体停滞在 mRNA 上, 然后获得核糖体滞留在正在翻译中的 mRNA 的细胞提取物.

b. 用核糖核酸酶处理细胞提取物可以酶解未被核糖体保护的 mRNA 片段, 然后回收被核糖体保护的 mRNA 片段, 蔗糖密度梯度离心法分离核糖体和 mRNA 片段. 将核糖体保护的片段定量地转化为可被深度测序的 cDNA 文库. 测序方法与转录本测序类似.

c. 测序读段的定位. 参考序列一般来自于

* 国家自然科学基金资助项目(30900830, 81172770), 国家重点基础研究发展计划(973)(2012CB518200)和蛋白质组学国家重点实验室自主研究课题资助项目(SKLP-K201004).

** 通讯联系人.

张成岗. Tel: 010-66931590, E-mail: zhangcg@bmi.ac.cn

骆志刚. Tel: 13807311725, E-mail: zgluo@nudt.edu.cn

收稿日期: 2012-07-27, 接受日期: 2012-11-02

UCSC Known Genes database 或利用 UCSC Table Browser 生成相应的参考序列. 其他来源的基因组注释文件也是可以接受的. 读段定位可使用 bowtie2^[12]或者 TopHat^[13]等软件完成.

d. 计算平均读段密度和分析翻译效率、翻译差异. 一般排除读段数极少的转录本. 读段密度单位一般为 RPKM (reads per kilobase per million mapped reads). 翻译效率定义为核糖体足迹密度与 mRNA 读段密度的比率. 标准化方法是将所有基因的翻译效率均除以所有基因的翻译效率的中位数. 翻译差异的计算, 为对应的样本组之间的比值. 标准化方法同上, 这样可以排除样本间总读段数差异的干扰.

注意事项: a. 一般对样本进行核糖体谱分析时需要并行做转录组分析, 便于比较分析. 重复实验也是必要的. b. 将核糖体保护的片段转化为测序用 cDNA 文库时, 尽量保持定量转化并最小化偏差. c. 根据最终目的的不同, 读段定位选择的参考序列可以是全基因组、所有转录本、所有基因编码区等.

2 核糖体谱的应用

2.1 利用核糖体谱发现新的开放阅读框

分析全基因组范围内的核糖体谱有利于我们更加精确和灵敏地定义蛋白质组. 利用核糖体谱可以发现一些序列较短的可翻译的开放阅读框, 称为上游开放阅读框 (upstream open reading frame, uORF), 指在编码区上游存在的短的翻译片段, 在翻译调控中可能具有重要作用. 利用核糖体谱技术, 已在很多转录本的 5'-UTR 发现大量核糖体, 意味着该区域具有较高的翻译活性并且是可翻译的. 在多个物种中均已发现大量典型的 AUG 起始的 uORF 和非 AUG 起始 uORF^[4-5, 9, 14]. 进一步分析还发现 uORF 的翻译活性在减数分裂期比营养期 (vegetative) 更高, 并且上述两类短的 ORF 对下游 ORF 的翻译效率具有相反的影响^[4]. 短开放阅读框 (short open reading frame, sORF) 是在未注释的转录本上短的开放阅读框 (少于 80~100 个氨基酸). 对酵母减数分裂的研究也发现一些 sORF 的翻译, 并且它们是高度可调控的^[4], 但是目前这些 sORF 的功能还有待于进一步的研究. 另外, 利用核糖体谱分析翻译过程中的程序性框移, 还可以发现双编码区 (dually decoded regions) 以及终止密码子通读等现象^[15].

2.2 利用核糖体谱研究 microRNA 的作用机理

在哺乳动物体内, microRNA 的主要作用是降低翻译效率和 / 或降低 mRNA 的水平. 利用核糖体谱技术可以度量 miRNA 对翻译蛋白质的抑制效应, 同时测量其对 mRNA 水平的抑制效应, 从而可分辨出两类效应的主次关系. Guo 等^[6]的研究表明, 在哺乳动物体内 miRNA 的作用相对于降低翻译效率来说更多的是降低 mRNA 的水平. 对斑马鱼胚胎发育的研究发现, miR-430 在导致靶 mRNA 丰度降低之前先使翻译的起始速率降低^[6]. 因此, 核糖体谱技术为我们深入理解 miRNA 调控机理提供了分辨率更高和效率更好的工具.

2.3 利用核糖体谱表征翻译效率、差异翻译及预测蛋白质丰度

结合核糖体谱和相应的转录本丰度, 可以用来表征蛋白质翻译效率, 即蛋白质合成速率. Ingolia 等^[4]研究发现酵母的不同蛋白质翻译效率差别在 100 倍以上. 另一方面, 核糖体谱可以用来分析蛋白质翻译调控和翻译差异. 相比于正常生理情况, 在培养基中氨基酸相对缺少的条件下, 酵母在全局范围内减少翻译起始的同时, 在非 AUG 起始的 uORF 翻译事件比在典型的编码区和 AUG 起始的 uORF 显著增多^[4]. 对小鼠胚胎干细胞分化成拟胚体的过程中蛋白质翻译的变化进行分析, 发现大量的翻译暂停位点和未注释的翻译产物以及在分化过程中具有较大的 uORF 的翻译差异^[4]. 另外, 由于翻译调控的存在及其复杂性, 我们很难依据 mRNA 的表达水平精确地预测蛋白质表达水平. 因此, 利用翻译效率可能会更加精确地预测蛋白质丰度^[16].

2.4 利用核糖体谱研究蛋白质翻译机理

利用核糖体谱可以对蛋白质翻译机理进行深入研究. Li 等^[7]对细菌的研究发现, 由于正在翻译中的核糖体的 rRNA 上反 SD 序列与转录本上类 SD 序列的配对结合导致翻译暂停, 因此 mRNA 编码区内部的 SD 序列在进化中是受抑制的, 从而导致了密码子与密码子对的使用偏性. 换言之, 细菌的翻译暂停和密码子选择的主要因素是核糖体上 16S rRNA 中存在反 SD 序列^[7]. 这一现象可对异源蛋白在细菌中的表达提供指导作用. Oh 等^[8]在大肠杆菌细胞内借助核糖体谱技术和选择性核糖体谱技术研究了分子伴侣触发因子 (trigger factor, TF) 的功能. 对 HEK293 细胞系利用核糖体谱和同位素标记分析

发现, 相比于胞质中的核糖体, mRNA 的翻译更偏好于结合在内质网上的核糖体^[7]. 因此, 利用核糖体谱可以迅速而精确地发现基因组哪些序列被翻译成蛋白质, 翻译的转录本在哪一区间活性高以及一些与翻译相关事件的发生时间顺序.

2.5 应用核糖体谱研究癌变细胞的特征

在疾病研究领域, 核糖体谱技术可以在翻译水平上研究发生癌变细胞的特征. Hsieh 等^[10]对人前列腺癌细胞 PC3 进行核糖体谱分析, 发现用 mTOR 的 ATP 位点抑制剂 PP242 处理的 PC3 相对于用别构 mTOR 抑制剂雷帕霉素(rapamycin)处理后, 有 144 个依赖于 mTOR 的靶 mRNA 选择性地降低了翻译水平, 然而其在转录水平上的变化很小, 同时可以观察到主要的变化是在翻译的起始阶段而非延伸阶段. 因此可以利用核糖体谱分析出癌变细胞与正常细胞在转录水平上差异并不显著而在翻译水平上显著差异的基因, 进而可以分析癌症的发生及代谢规律. 因此, 核糖体谱技术为疾病的研究提供了一种更深层次的方法.

3 总结与展望

核糖体谱技术可以用于监测 mRNA 的翻译事件, 已经广泛应用到多个生物学研究领域. 核糖体谱的研究为我们深入理解细胞内翻译及其调控过程提供了一个精确而高效的手段. 结合表位标记核糖体的限制性表达, 可以获得组织特异性的翻译谱^[4]. 核糖体谱可以精确地确定基因组内的可翻译序列, 从而有利于鉴定复杂生物体的蛋白质组^[4]. 由于核糖体谱反映了其他水平上不可测量的调控方式, 因此可以用来鉴定顺式和反式翻译调控因子(*cis-* and *trans-* translational regulators)^[14]并且分析相应的调控通路. 利用核糖体谱研究干细胞, 可以为我们深入理解细胞分化事件的发生过程成为可能. 应用核糖体谱研究癌细胞, 有利于我们了解癌症的分子特征和翻译调控^[10], 进而更加有目的地寻找治疗癌症的药物. 同时, 将染色质免疫沉淀测序(ChIP-seq)、RNA 测序和核糖体谱技术结合分析, 将显著促进人们对复杂的基因转录和翻译调控网络系统的认识. 综上所述, 核糖体谱技术是研究细胞内翻译事件的一个重要手段, 可以广泛应用于多种模式生物中, 能够同时获得关于翻译和翻译调控事件具体过程的信息, 对于深入探索细胞翻译事件具有重要的意义.

参 考 文 献

- [1] Warner J R, Knopf P M, Rich A. A multiple ribosomal structure in protein synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1963, **49**(1): 122-129
- [2] Wolin S L, Walter P. Ribosome pausing and stacking during translation of a eukaryotic mRNA. *The EMBO J*, 1988, **7**(11): 3559-3569
- [3] Arava Y, Wang Y, Storey J D, *et al.* Genome-wide analysis of mRNA translation profiles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100**(7): 3889-3894
- [4] Ingolia N, Ghaemmaghani S, Newman J, *et al.* Genome-wide analysis *in vivo* of translation with nucleotide resolution using ribosome profiling. *Science*, 2009, **324**(5924): 218-223
- [5] Guo H, Ingolia N, Weissman J, *et al.* Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*, 2010, **466**(7308): 835-840
- [6] Oh E, Becker A, Sandikci A, *et al.* Selective ribosome profiling reveals the cotranslational chaperone action of trigger factor *in vivo*. *Cell*, 2011, **147**(6): 1295-1308
- [7] Li G W, Oh E, Weissman J. The anti-Shine-Dalgarno sequence drives translational pausing and codon choice in bacteria. *Nature*, 2012, **484**(7395): 538-541
- [8] Bazzini A, Lee M, Giraldez A. Ribosome profiling shows that miR-430 reduces translation before causing mRNA decay in zebrafish. *Science*, 2012, **336**(6078): 233-237
- [9] Ingolia N, Lareau L, Weissman J. Ribosome profiling of mouse embryonic stem cells reveals the complexity and dynamics of mammalian proteomes. *Cell*, 2011, **147**(4): 789-802
- [10] Hsieh A, Liu Y, Edlind M, *et al.* The translational landscape of mTOR signalling steers cancer initiation and metastasis. *Nature*, 2012, **485**(7396): 55-61
- [11] Ingolia N, Brar G, Rouskin S, *et al.* The ribosome profiling strategy for monitoring translation *in vivo* by deep sequencing of ribosome-protected mRNA fragments. *Nature Protocols*, 2012, **7**(8):1534-1550
- [12] Langmead B, Salzberg S L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods*, 2012, **9**(4): 357-359
- [13] Trapnell C, Pachter L, Salzberg S L. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics*, 2009, **25**(9): 1105-1111
- [14] Brar G, Yassour M, Friedman N, *et al.* High-resolution view of the yeast meiotic program revealed by ribosome profiling. *Science*, 2012, **335**(6068): 552-557
- [15] Michel A M, Roy Choudhury K, Firth A E, *et al.* Observation of dually decoded regions of the human genome using ribosome profiling data. *Genome Res*, 2012, **22** (11): 2219-2227 (DOI: 10.1101/gr.133249.111)
- [16] Siwiak M, Zielenkiewicz P. A comprehensive, quantitative, and genome-wide model of translation. *PLoS Computational Biology*, 2010, **6**(7):e1000865
- [17] Reid D, Nicchitta C. Primary role for endoplasmic reticulum-bound ribosomes in cellular translation identified by ribosome profiling. *J Biol Chem*, 2012, **287**(8): 5518-5527