

mRNA 的组成、选择性剪接 和全转录本表达谱芯片(Affymetrix)



众所周知,信使 RNA(Mrna)是一种生命周期很短的分子,它可以将细胞核以 DNA 形式储存的遗传信息转移到细胞质中,然后将这个信息翻译成蛋白质。mRNA 生成涉及两个步骤:转录和 RNA 处理。

转录的过程就是以 DNA 分子的一条单链作为模板,通过 RNA 聚合酶来指导互补 RNA 链合成的过程。加强对可能转录方式的理解,例如 3'末端不确定的转录本、截短转录本、转位、没有多聚一腺苷酸(PolyA tail)的转录本,对于获得涉及到整个基因组转录活动的完整情况至关重要。

在真核生物中,从 DNA 转录这一过程中而得到的超始 RNA 产物(最初转录本)含有内含子和外显子。最初转录本要经历一个 RNA 处理过程来形成具有生理功能的活性的 RNA 种类——功能性 RNA。RNA 处理包括主要的 3 个方面是 5'端加帽、切割和 3'端加多聚腺苷酸尾,以及 RNA 选择性剪接。选择性剪接是高等真核生物蛋白质多样性的主要来源,经常是以发育阶段特异性或者组织特异性方式进行调节。目前估计大约有 40%—60%的人类基因具有不同的异构体形式。同一基因来源剪接异构体可以产生在特征上有明显区别、功能上差异显著(甚至是具相互拮抗的)的蛋白质。此外,涉及到人类疾病的大量遗传突变被定位在可调节剪接的剪接信号或者序列上。因此,对剪接方式改变的理解在深入探讨生物调节和疾病机制方面尤为重要。

传统的 3'端表达谱芯片仅仅能对标准转录本进行有效的分析。全转录本表达谱芯片

(Exon 1.0 ST 和 Gene 1.0 ST)则是强有力的工具去检测转录方式的可能性。而其一的 Exon 1.0 ST 芯片更可以获得与选择性剪接相关信息,进而可以进行(1)选择性剪接调控的分子机理分析。(2)药靶基因的新型选择性剪接异构体的发现,以及获得其组织特异性表达图谱。(3)增进对遗传性变异所导致的下游效应的理解,从而可以将选择性剪接方式同生物表型变化联系起来。

表达谱芯片实验和数据分析流程

与传统性 3'端表达谱芯片相比,全转录本表达谱芯片实验的特点为:1)RNA 的起始用量大幅度的下降(推荐采用 100ng 或 1ug Total RNA)。2)如用 EXON 1.0 芯片,流程要求有 rRNA 消减步骤,用以降低背景信号以及提高特异性(用 Gene 1.0 芯片时省略 rRNA 消减步骤)。3)与 3'端表达谱芯片步骤类似—Cdnal 链、2 链合成及体外转录

(IVT),区别在于全转录本表达谱芯片体外转录合成 cRNA 并不对其进行标记。4)其后部分步骤是全转录本芯片所特有的:通过随机引物来合成掺入了 dUTP 的正义链 DNA,水解 cRNA 模板后对正义链 DNA 进行片断化和标记。5)随后完成同样杂交、洗涤和扫描等一系列流程以获得结果。