

转录组测序验证方法汇总

一、定性定量验证

1、荧光定量核酸扩增检测（Real-time Quantitative PCR Detecting System, qPCR）

qPCR作为最常见的二代测序验证方法^[1]，广泛应用于二代测序结果进行定性定量研究。转录组测序基于生物信息分析计算出多基因的表达量，会存在一定的误差，而qPCR是检测特定基因表达丰度，特异性更高。

（1）验证关键点：

➤ 基因选择：

按FPKM或reads count排序，优先选择表达量高的mRNA；

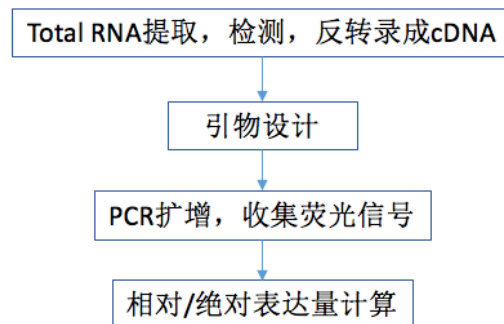
按变化倍数排序，优先选择差异变化明显的mRNA；

➤ 引物设计：Primer 6等在线软件，自己手动设计；

➤ 内参选择：β-actin、GAPDH等；

➤ 试剂盒：Takara, Vazyme, 全式金等。

（2）验证流程

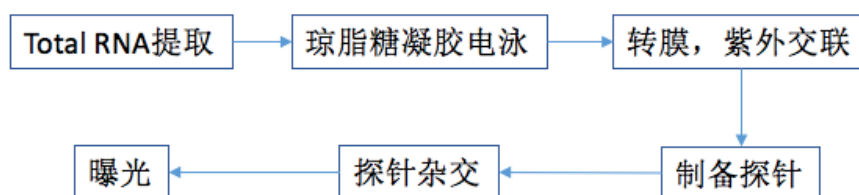


2、Northern-blot

首先通过电泳的方法将不同的RNA分子依据其分子量大小加以区分，然后通过特定基因互补配对的探针杂交来检测目的片段。

应用：通过检测RNA的表达水平，检测基因表达的方法^[2]。

（1）验证流程：



(2) 验证技术优劣

优点：特异性高，假阳性低，既可验证表达丰度又可验证序列信息。

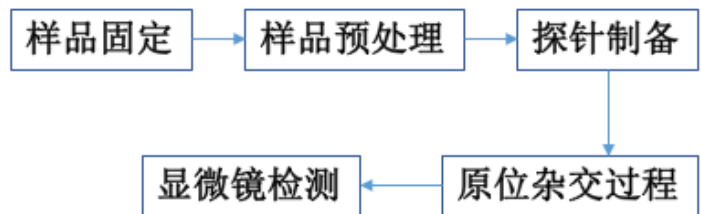
缺点：操作繁琐，灵敏度低于qPCR。

3、荧光原位杂交组织化学法（FISH）

将核酸探针的某一种核苷酸标记上报告分子，可利用该报告分子与荧光素标记的特异亲和素之间的免疫化学反应，经荧光检测体系在镜下对待测DNA进行定性、定量或相对定位分析。

应用：研究基因或RNA亚细胞定位和表达的方法；鉴定融合基因^[3,4]

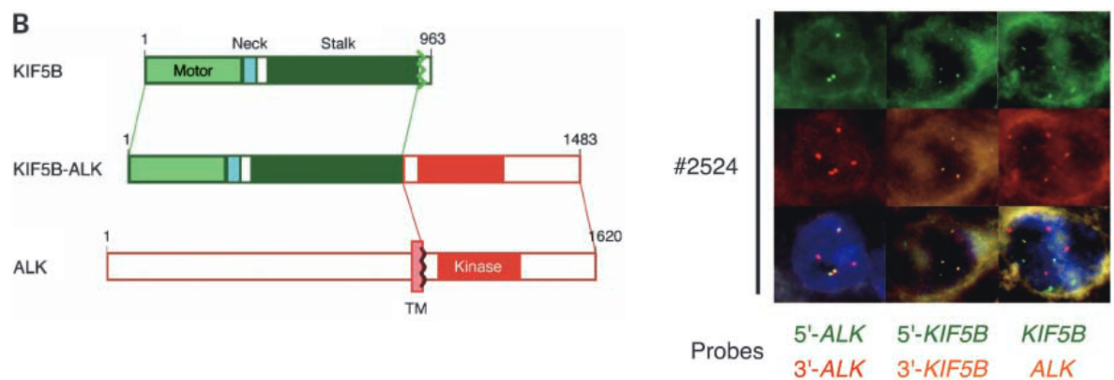
(1) 验证流程：



(2) 优点：安全、快速、灵敏，可同时显示多种颜色

(3) 案例分析：

使用红色荧光探针标记ALK基因的前面，使用绿色荧光探针标记ALK 基因的后面，一般正常的ALK基因，这两种荧光在一块，叠加显示出黄色的荧光信号。而如果ALK与其他基因发生了融合，则在显微镜下可以看到红色荧光和绿色荧光的分离，一般100个细胞数，超过15个就认为是阳性。



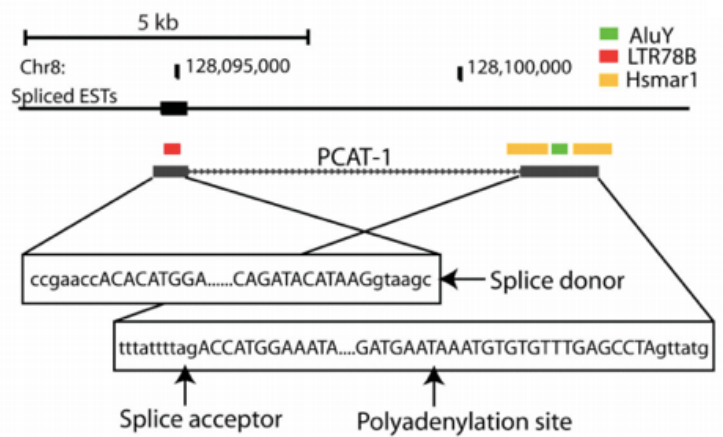
4、cDNA末端快速扩增技术(rapid amplification of cDNA ends,RACE)

基于mRNA反转录和PCR技术建立起来的、以部分已知的区域序列为起点，扩增基因转录本的未知区域，从而获得mRNA(cDNA)完整序列的方法。

应用：从低丰度转录本中快速扩增cDNA 5'和3'末端序列，进而获得目的cDNA全长的方法^[5]。

优点：快速、便捷、高效，可同时获得多个转录本。近年来RACE技术已成为克隆全长cDNA序列的常用手段。

常用的试剂盒：SMARTTM RACE (clontech)



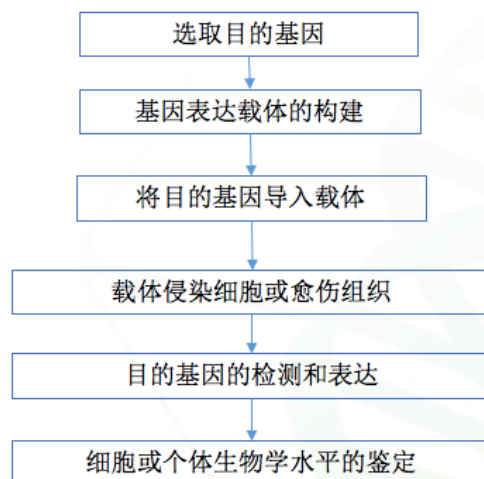
二、功能验证

1、过表达

DNA片段被转入特定生物中，与其本身的基因组进行重组，再从重组体中进行数代的人工选育，从而获得具有稳定表现特定的遗传性状的个体。

应用：mRNA，lncRNA，miRNA等功能验证^[2]。

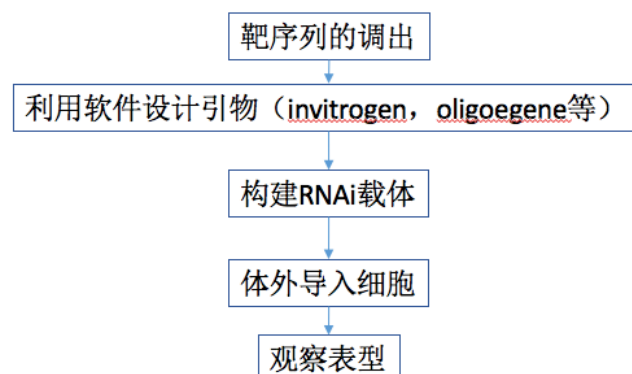
验证流程：



2、RNA干扰（RNAi）

RNAi可经由多种不同转染（transfection）技术导入细胞内，并对特定基因产生具专一性的敲降（knockdown）效果^[6]。

（1）验证流程：



（2）其它基因沉默技术：T-DNA插入，CRISPR/Cas9等。

参考文献

- [1] Fu C, Wang F, Liu W, et al. Transcriptomic Analysis Reveals New Insights into High-Temperature-Dependent Glume-Unclosing in an Elite Rice Male Sterile Line[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2017, 8:112.
- [2] Chao, Zhang, Zuomei, et al. Suppression of Jasmonic Acid-Mediated Defense by Viral-Inducible MicroRNA319 Facilitates Virus Infection in Rice[J]. *molecular plant*, 2016, 9(9):1302.
- [3] Jiang W, Zhou S, Zhang Q, et al. Transcriptional regulatory network of WOX11 is involved in the control of crown root development, cytokinin signals, and redox in rice.[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2017, 68(11):2787.
- [4] Takeuchi K; Choi YL; Togashi Y; Soda M; Hatano S; Inamura K; Takada S; Ueno T; Yamashita Y; Satoh Y; Okumura S; Nakagawa K; Ishikawa Y; Mano H. KIF5B-ALK, a novel fusion oncokinase identified by an immunohistochemistry-based diagnostic system for ALK-positive lung cancer.[J]. *Clinical Cancer Research*, 2009, 15(9):3143.
- [5] Prensner J R, Iyer M K, Balbin O A, et al. Transcriptome Sequencing Identifies PCAT-1, a Novel lincRNA Implicated in Prostate Cancer Progression[J]. *Nature Biotechnology*, 2011, 29(8):742.
- [6] Rathe S K, Moriarity B S, Stoltenberg C B, et al. Using RNA-seq and targeted nucleases to identify mechanisms of drug resistance in acute myeloid leukemia[J]. *Scientific Reports*, 2014, 4:6048.