

■ 生物医学研究技术丛书

micro RNA 的 研究方法与应用



主编/方福德



中国协和医科大学出版社

生物医学研究技术丛书

microRNA 的 研究方法与应用

方福德 主 编
余 佳 刘长征 何爱彬 副主编

编者 (以姓氏笔画为序)

王 芳 方福德 刘长征 余 佳
何爱彬 陈松森 张俊武 常永生

中国协和医科大学出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

microRNA 的研究方法与应用 / 方福德主编. —北京: 中国协和医科大学出版社, 2008. 1

ISBN 978 - 7 - 81072 - 972 - 7

(生物医学研究技术丛书)

I. m… II. 方… III. ①核糖核酸 - 生物技术 - 研究方法 ②核糖核酸 - 生物技术 - 应用 IV. Q522

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2007) 第 180383 号

生物医学研究技术丛书 microRNA 的研究方法与应用

主 编: 方福德

责任编辑: 姜淑惠 严 楠

出版发行: 中国协和医科大学出版社

(北京东单三条九号 邮编 100730 电话 65260378)

网 址: www.pumcp.com

经 销: 新华书店总店北京发行所

印 刷: 北京丽源印刷厂

开 本: 700×1000 毫米 1/16 开

印 张: 16

彩 图: 1

字 数: 250千字

版 次: 2008年6月第一版 2008年6月第一次印刷

印 数: 1 — 2000

定 价: 52.00元

ISBN 978 - 7 - 81072 - 972 - 7/R · 965

(凡购本书, 如有缺页、倒页、脱页及其他质量问题, 由本社发行部调换)

主 编 简 介



方福德，教授，毕业于南开大学，从事生物化学与分子生物学。1965.8 至现今，中国医学科学院基础医学研究所，1985.3 ~ 1987.2 美国路易斯安娜州立大学生化系访问学者，1987.2 ~ 1988.1 美国哈佛大学 Dana - Farber 癌症研究所访问学者，2000.9 ~ 2003.4 中国医学科学院实验动物研究所所长（兼）。

主要从事中国人 2 型糖尿病相关基因研究。已将该病易感基因定位于几条染色体的特定区域，并经 SNP 筛查，病例 - 对照分析，初步确定 6 个候选易感基因，并对其功能进行了研究，应用系统生物学方法构建 2 型糖尿病易感基因作用分子网络。

多年来主持和参加多项国家重大项目：“攀登”、“863”、“973”、“自然科学基金重大项目”等，在肿瘤分子生物学、珠蛋白基因多态性与地中海贫血病基因诊断、转肾素基因动物模型的建立和中国汉族人 2 型糖尿病相关基因研究中，成绩卓著，获国际奖 1 项（1991）、国家级奖 1 项（1999）、部级奖 7 项（1999，1998，1997，1996，1994，1991，1986）。在国内外专业刊物发表论文 150 余篇，主编出版专著 7 部。主笔投标成功的“攀登”项目和“973”项目共使国内 10 个单位 30 个研究组受益，促进了强 - 强联合和学科发展。

内 容 简 介

本书综合国内外有关 microRNA 研究的成果，在对 microRNA 的发现和生物起源、鉴别和特征、功能和调控机制等进行全面介绍的基础上，重点介绍了 microRNA 的现代研究方法，主要为生物信息学分析方法和分子生物学研究方法，前者包括 microRNA 分析策略、microRNA 基因组定位，预测、种系发育、序列分析、簇分析和靶基因预测，后者包括 microRNA 表达的研究方法和 microRNA 功能研究方法。最后介绍了 microRNA 应用情况，主要包括 microRNA 与白血病，microRNA 与糖尿病，microRNA 与病毒以及 microRNA 与肿瘤等内容。本书理论结合实际，系统性强，取材新，图文并茂，参考价值大，适合于从事生命科学及相关学科的科技人员和高等院校师生阅读。

前 言

生命科学进入“后基因组时代”后，主要的目标是系统地阐明基因组及其包含的基因的功能及其调控机制。基因调控是一个多渠道、多层次、多方式的时空动态过程。其中在转录后和翻译水平的调控是重要的调控方式之一，在这些调控过程中，现已知道，microRNA 起重要的调控分子作用。MicroRNA 自 1993 年首次被报道以来，现已发现了 2000 种，存在于人类和几乎所有的模式生物中。它们是一类长度在 22nt 左右的非编码 RNA 基因产物，通过与 mRNA 的 3'UTR 结合而介导翻译水平的调控，也可通过与 mRNA 翻译区结合而直接引起 mRNA 的切割。MicroRNA 与 mRNA 结合的互补程度决定 microRNA 将以何种机制发生作用，完全的互补引起与 RNAi (RNA 干扰) 类似的作用，不完全互补则导致翻译抑制作用。microRNA 还可能存在其他作用机制。由上可见 microRNA 起作用的复杂性。基因调控是一切生物学行为和表型发生的核心环节，因此，研究 microRNA 对于深入探讨生命现象的本质，解释细胞行为和疾病发生机制，具有重要的理论意义，对于疾病的诊断、治疗和预防具有潜在的实际应用价值。有鉴于此，国际上该领域的研究工作蓬勃开展，成为生命科学中令人瞩目的前沿领域。为了顺应科学发展的潮流，著者汇集了近年来国际上有关 microRNA 研究的最新成果，结合自己的研究心得，编写了“microRNA 的研究方法与应用”一书，为从事生命科学研究的读者及高等院校师生提供参考，相信能起到良好的作用。

本书包括三个部分，分别为概述、研究方法和应用。在概述部分，主要介绍 microRNA 的发现和生物起源，microRNA 的鉴别和特征，microRNA 的调控机制和 microRNA 的功能等内容。在研究方法部分，分别介绍生物信息学方法（十余种）、分子生物学研究方法（十余种）。应用部分分别介绍了 microRNA 在肿瘤、糖尿病、病毒病和肝病的诊、治、防和发病机制研究中的应用实例。通过上述的安排，读者可从中掌握 microRNA 的研究方法，了解相关的知识背景，并可在此基础上拓展相

关的研究领域。

MicroRNA 研究目前是一个十分活跃的前沿领域，发展迅速，新概念、新方法、新成果不断涌现，随着时间的推移，书中内容必定需要进行不断的修正和更新，以保持其新颖性。

在本书完成过程中，各位参与编写工作的同道在担负繁忙科研任务的情况下，仍抽出时间，认真负责地撰稿，并基本达到预期的要求，我们向这些同道表示衷心的感谢！中国协和医科大学出版社为本书的出版提供了多种方便和帮助，特此表示谢忱！

由于编著者水平所限，书中难免出现不妥甚或错讹之处，希望读者不吝指正，以便修订时更正。

方福德

2008 年 3 月 30 日

目 录

第一篇 概 述

第一章	microRNA 的发现	(2)
第二章	microRNA 的起源与加工	(4)
第三章	microRNA 与 siRNA、piRNA	(11)
第四章	microRNA 的鉴别和特征	(16)
第五章	microRNA 的调控机制	(19)
第六章	microRNA 的功能	(22)

第二篇 microRNA 的研究方法和技术

第七章	生物信息学分析分法	(34)
第一节	microRNA 的生物信息学分析策略	(34)
第二节	microRNA 序列信息的获取	(35)
第三节	microRNA 新基因的预测及注册	(45)
第四节	microRNA 簇分析	(48)
第五节	microRNA 基因的转录调控分析	(52)
第六节	microRNA 的种系发育分析	(64)
第七节	microRNA 的靶基因预测	(68)
第八章	分子生物学研究方法	(78)
第一节	microRNA 的分子生物学研究方法简介	(78)
第二节	microRNA 体外或体内水平的过表达研究	(83)

第三节	microRNA 表达抑制研究	(84)
第四节	体外验证 microRNA 作用的靶基因	(86)
第五节	microRNA 功能研究的策略	(87)
第九章	microRNA 研究的实验技术	(93)
第一节	新 microRNA 基因的克隆	(93)
第二节	PAGE/Northern blotting	(105)
第三节	microRNA 基因芯片技术	(115)
第四节	实时定量 PCR	(121)
第五节	锁定的核苷酸原位杂交 (LNA - ISH)	(126)
第六节	microRNA 过表达实验技术	(131)
第七节	microRNA 表达抑制实验技术	(143)
第八节	靶基因克隆验证 - 荧光素酶报告基因检测 系统的构建及使用方法	(149)

第三篇 MicroRNA 研究方法在医学研究中的应用

第十章	microRNA 与病毒	(171)
第一节	编码 microRNA 的病毒	(171)
第二节	microRNA 在病毒研究中的应用	(177)
第三节	展望	(180)
第十一章	microRNA 与恶性肿瘤	(183)
第一节	microRNA 在肿瘤中的表达研究	(183)
第二节	microRNA 在肿瘤中的功能研究	(187)
第三节	肿瘤 microRNA 研究展望	(189)
第十二章	人 microRNA 簇基因组组织及造血表达谱分析	(194)
第一节	分析方法	(195)
第二节	人 microRNA 簇基因分布分析	(197)
第三节	人 microRNA 基因簇启动子分析	(197)

第四节	人 microRNA 基因簇同源性分析	(198)
第五节	人 microRNA 基因簇造血表达谱	(202)
第六节	人 microRNA 基因簇造血表达的聚类分析	(205)
第七节	人 microRNA 基因簇表达特征	(207)
第八节	人 microRNA 基因簇表达一致性趋势的验证	(210)
第九节	人 microRNA 基因簇杂交灵敏性检测	(212)
第十节	人造血链系特异或丰度表达 microRNA 基因和 microRNA 基因簇鉴别	(213)
第十一节	讨论	(213)
第十三章	microRNA 与 2 型糖尿病	(226)
第一节	2 型糖尿病的动物模型——GK 大鼠	(227)
第二节	GK 大鼠骨骼肌组织中 microRNA 表达谱	(228)
第三节	Northern blotting 验证差异表达 microRNAs	(230)
第四节	过表达 miR-29 的腺病毒载体构建与病毒包装	(237)
第五节	高胰岛素与葡萄糖刺激 miR-29 的表达	(238)
第六节	miR-29 过表达抑制胰岛素刺激的葡萄糖吸收	(239)
第七节	讨论	(241)

第一篇 概 述

自 Ambros 等研究者报道了在线虫中发现首个 microRNA—lin-4 并证明其时序性调控线虫幼虫的发育后,多个研究小组对这一新发现的调控分子进行了初步的研究。经过数年的探索,随着更多 microRNA 的发现及其功能的逐渐为人所知,研究者们普遍认为, microRNA 是一类隶属于非编码 RNA (non-coding RNA) 大家族并可在转录后水平调控基因表达的重要小分子。同时, microRNA 与处于研究热点的另一类小分子 RNA——siRNA (small interfering RNA) 在加工机制和调控方式上亦有着较高的相似性。这些特征吸引了越来越多的研究者投身于这一研究领域,以期深入剖析 microRNA 家族的功能和分子机制。

作为非编码 RNA 家族新成员之一的 microRNA 是一类长度为 21 ~ 23 个核苷酸的调控性小 RNA 分子,它可以通过 mRNA 剪切和抑制蛋白翻译的方式负调控靶基因。迄今为止,研究者们已在拟南芥、线虫、果蝇、小鼠和人等多种生物中发现了数以千计的 microRNA 分子。进一步的研究表明, microRNA 分子参与了包括发育、细胞分化、细胞凋亡、脂类代谢和激素分泌等多种生理过程,以及包括白血病、肺癌、结肠癌、糖尿病和病毒感染等多种病理过程。这些发现提示我们,生物体内可能存在着一种全新的调控模式,对该模式的深入研究将有助于我们进一步了解生物体复杂的调控网络。本书的概述部分将对目前已知的 microRNA 知识作一较详细介绍。

第一章 microRNA 的发现

最早被发现的 microRNA 家族成员 *lin-4*，是 Ambros 等在线虫中通过胚胎发育时间控制缺陷性遗传筛选实验所鉴定。线虫幼虫的发育会经历四个不同阶段（L1 ~ L4），每个阶段有着不同特征的细胞链系区分。在幼虫的 L1 发育阶段，如果 *lin-4* 基因突变将会妨碍幼虫发育的时间调控，引起该阶段中的特异性细胞区分过程在后续的发育阶段中重复，导致幼虫发育停顿。有趣的是，在缺乏 *Lin-14* 基因的蠕虫中发现了与 *lin-4* 基因突变相反的发育表型缺陷。而在 *lin-4* 和 *Lin-14* 这两个基因鉴定之前，有人就根据它们相反的缺陷性表型和遗传性相互作用将它们的基因座归于同一调控途径。因此，Ambros 等推测二者之间可能存在某种相互调控。进一步分析发现，虽然突变筛选实验鉴定的基因大多数是蛋白编码基因，但 *lin-4* 基因的编码产物却是一个长度为 22nt 的非编码 RNA，并且可与位于 *Lin-14* 基因 3'UTR 的 7 个保守位点部分互补。而 *lin-14* 基因编码一个在 L1 ~ L2 发育阶段转换过程中表达下调的核蛋白。据此可以推断：*Lin-14* 蛋白表达的负调控可能有赖于该基因 mRNA 的 3'UTR 区和功能性的 *lin-4* 基因的存在。在此推断基础上研究者又经过一系列实验证明了：*Lin-14* mRNA 的 3'UTR 和 *lin-4* 间不完全的碱基配对对于 *lin-4* 通过调控蛋白合成来控制 *Lin-14* 表达是必要的。通过进一步的同源分析，又发现了 *lin-4* 的另一个作用靶基因——*Lin-28*，一个启动 L2 ~ L3 阶段发育转换的冷休克结构域蛋白。与 *Lin-14* 相比较，*lin-28* 基因的 3'UTR 含有更少的 *lin-4* 配对位点，这或许能解释 *lin-28* 的翻译抑制发生在 *Lin-14* 之后。

非编码 RNA *lin-4* 及其对靶基因 *Lin-14* 和 *Lin-28* mRNA 的特异性翻译抑制的发现提示，在线虫发育期间可能存在着一种新的基因表达调控机制。但在此后的 7 年中，该现象一直未引起人们足够的重视，直到 2000 年第二个 microRNA 分子——*let-7* 在线虫中被鉴定出来，众多的研究者才被这一领域所吸引。*let-7* 也是一个时序性调控的 microRNA 分子，它主要控制幼虫的 L4 阶段向成虫阶段的发育转换。与 *lin-4* 的

调控机制相似，let - 7 是通过与靶基因 Lin - 41 和 hbl - 1 3'UTR 上的互补位点配对并抑制它们的翻译来行使其功能的。let - 7 的发现促使人们提出这样的假设：microRNA 所执行的转录后调控是否作为一种普遍的调控模式也广泛存在于线虫以外的其他物种中。后来，研究者通过生物信息学预测及实验验证证实了数以千计的 microRNA 存在于多种动植物中，并发现它们在进化中高度保守，这些现象提示该类分子可能具有更广阔和重要的作用。时至今日，随着多个 microRNA 的功能和分子机制的揭示，大量证据有力地证明了这一假设的成立。

第二章 microRNA 的起源与加工

成熟 microRNA 的形成过程包含若干步骤（图 2-1）。首先，microRNA 基因被转录成命名为 pri-microRNA 的初级转录物。多个研究者在分析了部分动植物的 pri-microRNA 特征后发现，它不但具有较长的序列而且还表现出部分 RNA 聚合酶 II 的转录特征，如序列 5' 端的帽子结构、3' 端 Poly (A) 尾等，同时也发现 pri-microRNA 上游存在着 RNA 聚合酶 II 启动子序列，只有少数几个病毒基因转录生成的 pri-microRNA 具有 RNA 聚合酶 III 的转录特征。随后，多个实验证明，RNA 聚合酶 II 启动子指导 microRNA 基因的转录。而且，一些转录因子也可通过结合到 microRNA 基因上游的特异性位点来调控 RNA 聚合酶 II 启动子活性，从而影响 microRNA 基因的表达，如转录因子 NF1-A 调控 microRNA-223 在人粒细胞分化过程中的表达，MyoD、Mef2 及血清反应因子（serum responsive factor）调控 microRNA-1 在小鼠心脏中的表达。这些证据表明，参与 microRNA 基因转录的 RNA 聚合酶主要为 RNA 聚合酶 II。部分 microRNA 基因位于其宿主基因内含子或非编码区，它们的转录通常是通过宿主基因的 RNA 聚合酶 II 启动子实现的，会随着宿主基因的调控而被一同调控。还有一些 microRNA 基因定位于基因之间，他们拥有自己的启动子和调控元件。此外，部分 microRNA 基因成簇排列，在共同的启动子和调控元件指导下被协同转录成多顺反子初级转录物，之后再被各自加工形成成熟的 microRNA 分子。

Pri-microRNA 通过两次剪切产生成熟的 microRNA。动物 Pri-microRNA 的第一次剪切位于细胞核内，产生大小为 70 个核苷酸左右并能形成茎-环结构的 microRNA 前体，称为 pre-microRNA；第二次剪切位于细胞质中，pre-microRNA 被剪切成 21~23 个核苷酸的成熟 microRNA。有两种 RNase-III，Drosha 和 Dicer 分别催化 microRNA 成熟过程中的序列剪切。这两种酶都是 RNA 双链特异性的内切酶，会将靶序列剪切成具有长度为 2nt 的 3' 端突出臂的产物。Drosha 主要位于细胞核内，含有两个 RNase-III 结构域，一个双链 RNA 结合结构域和一个未知功能的 N 末端片

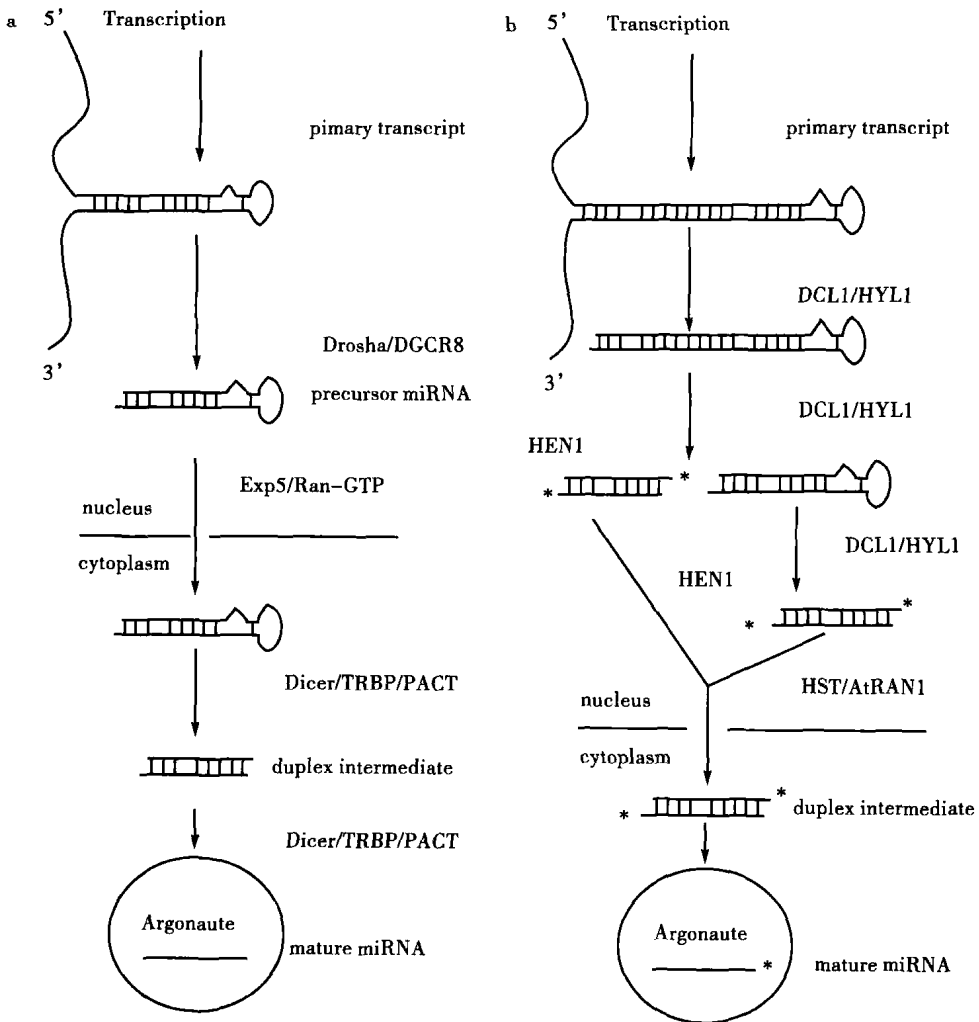


图 2-1 microRNA 在动物 (a) 和植物 (b) 中的加工过程

(引自 Y Zeng. Principles of micro-RNA production and maturation.

Oncogene. 2006, 25:6156~6162)

段。Dorsha 自身并不具有或只具有较低的酶活性，需要在另外一种称为 DGCR8 蛋白的配合下才能催化其 RNA 底物。DGCR8 含有两个双链 RNA 结合结构域，其与 Dorsha 结合并增强 Dorsha 的催化活性后与 pri-microRNA 作用的具体机制仍不明确。尽管 Dorsha 可以忽略各种 pri-microRNA 的序列和结构差别而将其剪切为具有不完全配对茎-环结构的 pre-mi-

croRNA, 但仍有几项体内外研究发现了几种能被 Dorsha 剪切的 pri - microRNA 的共同特征, 如茎 - 环底物应含有超过其产物长度的配对碱基、足够长的单链 RNA 尾及大的末端环等。Dorsha 加工的效率取决于 pri - microRNA 茎的结构、环的大小和在其剪切位点前后的序列, 因为如果减小 pri - microRNA 环的尺寸、破坏茎内部的碱基配对或使 Dorsha 剪切位点前后序列的碱基删除或突变都会严重降低 Dorsha 的剪切效率。

Pri - microRNA 经 Dorsha 酶的初始剪切后产生的 pre - microRNA 主要通过 Ran - GTP 依赖性核浆转运子 Exportin5 (Exp5) 从核内转移至胞质。Exp5 能识别并紧密结合于含有 3' 端突出臂的 pre - microRNA, 不但承担运输载体的角色, 而且在 pre - microRNA 从核内产生、运输至胞质及其胞质内的第二次剪切前这一期间保护 pre - microRNA 的完整性。Pre - microRNA 被运输至胞质后, GTP 去磷酸转换为 GDP, 然后 Exp5/GDP 释放出 pre - microRNA。

随后, 胞质中的另一种 RNase - III 酶 Dicer 将 pre - microRNA 剪切成不完全配对的双链 RNA 双体 (microRNA; microRNA*), 即成熟 microRNA 和其互补序列所组成的二聚体。Dicer 主要由一个螺旋酶结构域——DUF283、一个 PAZ 结构域、两个 RNase III 结构域和一个双链 RNA 结合结构域组成 (图 2-2)。PAZ 结构域可以同单链 RNA (ssRNA) 发生低亲和性相互作用, 帮助 Dicer 识别具有长度为 2nt 的 3' 端突出臂的双链 RNA (dsRNA), 然后由两个 RNase III 结构域形成的单催化中心剪切双链 RNA 成终末产物。同时, 与 Dorsha 酶需要因子 DGCR8 协同才能完全行使其催化功能相似, Dicer 酶也需要在因子 TRBP 和 PACT 的协同下识别与剪切 pre - microRNA (2-2), 这两个协同因子能增强 Dicer 酶对 dsRNA 的亲合性并参与成熟 microRNA 链选择。Dicer 酶剪切产物的长度从 21 到 25 个核苷酸不等, 这种不同可能来源于 pre - microRNA 茎部的囊泡结构和碱基错配。

最近, 在线虫中进行的一系列遗传学和生化学研究证明了不同 Dicer 酶同源物的功能特异性。在果蝇中也鉴定了两个 Dicer 同源物: Dicer1 和 Dicer2, 缺乏 Dicer1 影响 pre - microRNA 的加工, 而缺乏 Dicer2 会影响 siRNA 的产生, 但却不影响 microRNA 的成熟。这些发现与这样的事实一致: PAZ 结构域只存在于 Dicer1, 而 PAZ 结构域识别 pre - microRNA 茎 - 环结构中茎的粘末端并介导其剪切。这样看来, Dicer1 和 Dicer2 是在 microRNA 和 siRNA 成熟的后期发挥功能作用并帮助 RISC 介导的基因沉默。

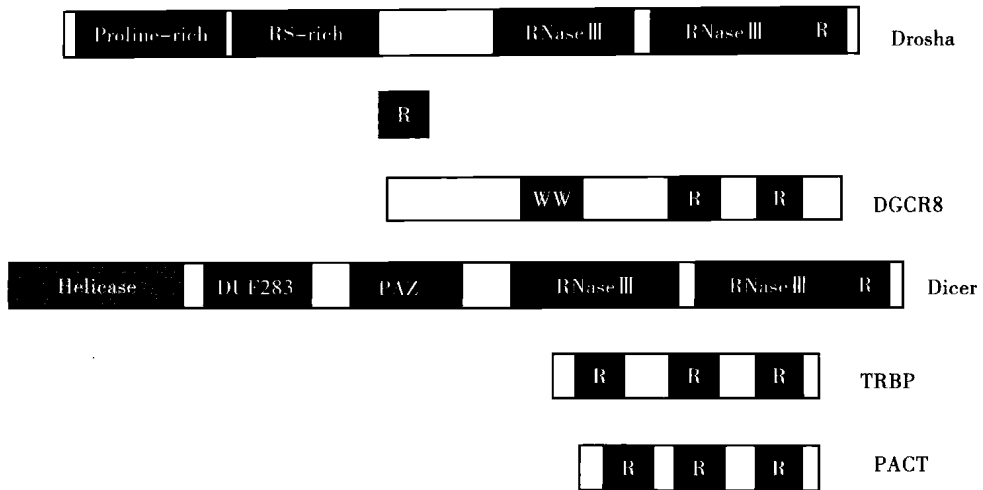


图 2-2 五种 microRNA 加工相关酶结构域图示

(引自 Y Zeng. Principles of micro-RNA production and maturation. Oncogene. 2006, 25: 6156 ~ 6162)

这个推断最先被黑素瘤中 Dicer 和 RISC 的相互作用所证实, Dicer2 与一个 dsRNA 连接蛋白 R2D2 形成一个复合物, 并与 siRNA 混合作用促进 RISC 介导的序列特异性 mRNA 降解。此外, 缺乏 Dicer1 也会影响 siRNA 介导的基因沉默, 表明其可能具有增强 RNA 干扰效应的作用。因此, Dicer 酶可能具有超出我们先前推测的更多的功能, 在 microRNA/siRNA 所介导基因沉默的初始和效应阶段发挥功能作用。

Dicer 酶对双链 RNA 的高效剪切需要二聚化的 RNase - III 结构域, 这是因为根据已知的 RNase - III 结构, 只有在 RNase - III 二聚体的表面才能形成活化的催化位点。Dicer 酶在 microRNA 加工期间可能只催化一个剪切事件, 或许它以含内在 RNase - III 二聚体的单体形式形成 dsRNA 剪切的活性催化中心。与之相似, Drosha 酶也内含两个 RNase - III 结构域并执行一次剪切事件。此外, 另外两个含有双链 RNA 结合结构域的蛋白 TRBP 和 PACT 可以结合到 Dicer 酶上, 增强 Dicer 酶对 RNA 的亲性和参与成熟 microRNA 的选择过程。目前, 我们对 Drosha 和 Dicer 执行剪切的精确结构元件了解甚少, 故推测它们的准确生物学机制仍有很多困难, 但是二者可能通过相似的机制对 microRNA 进行加工。

microRNA: microRNA * 双体中成熟 microRNA 链会选择性整合入