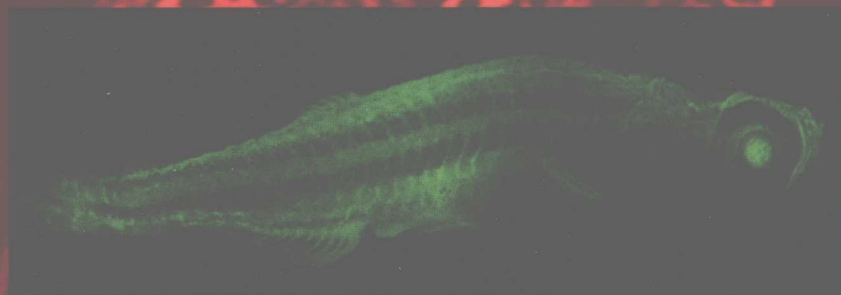


MicroRNA Protocols

miRNA 实验指南

[美] Shao-Yao Ying 主编
郑晓飞 主译

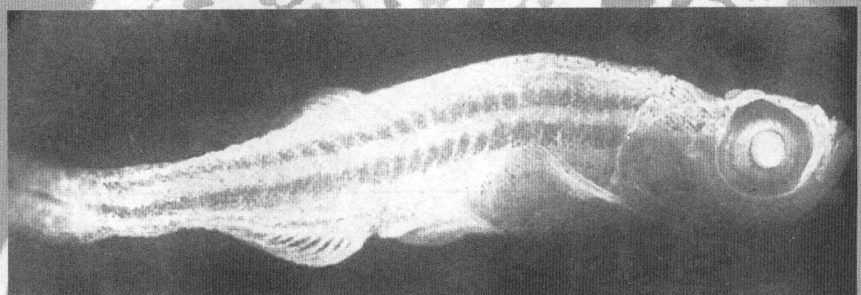


化学工业出版社
生物·医药出版分社

**MicroRNA
Protocols**

miRNA 实验指南

[美] Shao-Yao Ying 主编
郑晓飞 主译



化学工业出版社
生物·医药出版分社
·北京·

图书在版编目 (CIP) 数据

miRNA 实验指南/[美] Ying, S. Y. 主编; 郑晓飞主
译. —北京: 化学工业出版社, 2008. 1
书名原文: MicroRNA Protocols

ISBN 978-7-122-01463-4

I. m… II. ①Y…②郑… III. 核糖核酸-生物技术-
指南 IV. Q522-62

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2007) 第 180202 号

MicroRNA Protocols/by Shao-Yao Ying

ISBN 1-58829-581-8

Copyright©2006 by Humana Press Inc. All rights reserved.

Authorized translation from the English language edition published by Humana Press Inc.

本书中文简体字版由 Humana Press Inc. 授权化学工业出版社独家出版发行。

未经许可, 不得以任何方式复制或抄袭本书的任何部分, 违者必究。

北京市版权局著作权合同登记号: 01-2007-1017

责任编辑: 杨燕玲

装帧设计: 张 辉

责任校对: 宋 玮

出版发行: 化学工业出版社 生物·医药出版分社

(北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)

印 刷: 大厂聚鑫印刷有限责任公司

装 订: 三河市延风装订厂

720mm×1000mm 1/16 印张 22½ 彩插 3 字数 422 千字

2008 年 2 月北京第 1 版第 1 次印刷

购书咨询: 010-64518888 (传真: 010-64519686) 售后服务: 010-64518899

网 址: <http://www.cip.com.cn>

凡购买本书, 如有缺损质量问题, 本社销售中心负责调换。

定 价: 65.00 元

版权所有 违者必究

本书翻译人员

主 译 郑晓飞

副主译 邵宁生 付汉江

翻译人员 (按姓氏拼音为序)

曹国军	陈留存	崔 军	董 洁	冯军军
付汉江	胡 楠	李 洁	李 婧	李丽艳
李少华	李 帅	李伍举	刘 琴	刘舒云
刘 玉	孙 芳	夏 伟	徐 华	张浩明

郑晓飞

审校人员 (按姓氏拼音为序)

曹国军	付汉江	李伍举	邵宁生	徐 华
杨 光	郑晓飞			

译者序

miRNA 在各种生物体中的广泛发现及其在调控基因表达中所发挥的重要生物学作用的逐步确证,使非编码 RNA 在生命中的作用得到了彻底的认可。miRNA 和 siRNA 研究的重大进展为 RNA 研究带来了新的转折和契机,同时为更全面地认识生物大分子——RNA,而不仅是蛋白质和 DNA——在生命过程中的重要作用起到了巨大的推动作用。

miRNA 是由约 22 个核苷酸组成的单链小 RNA,广泛存在于真核生物细胞中,miRNA 基因约占整个基因组的 1%。miRNA 通过与靶 mRNA 的互补配对在转录后水平对基因表达进行调控,导致 mRNA 的降解或翻译抑制。miRNA 与其靶 mRNA 分子组成了一个复杂的调控网络,参与包括细胞增殖、凋亡、细胞分化、发育和逆境应答等多种生物学过程。miRNA 的发现和功能研究为全面了解生命现象打开了一扇新的窗口,为了解和研究疾病的分子发病机制和设计新的治疗策略提供了全新的视角。RNA 研究的这些突破性进展是生物学近年来最重要的成就之一。miRNA 研究不断取得的重大研究发现层出不穷。miRNA 已经成为分子生物学和分子医学研究的重要热点领域之一。

但是,由于其自身的结构特点,miRNA 的克隆、鉴定和功能分析的研究方法与已有的研究方法既有一致的地方,又有其独特之处。因此,《miRNA protocols》一书的出版为 miRNA 研究,尤其是初涉 RNA 研究领域的科研人员提供了一部及时的和极具参考价值的实验指导用书。本书由 miRNA 不同研究领域的专家撰写,内容包括了目前 miRNA 研究所采用的各种成功的方法,介绍了有关 miRNA 预测、筛选、分离、测定和功能研究的多种先进的技术和方法。每种方法都提供了按步骤的实验指导,概述了该技术的原理,列出了所需的仪器设备和试剂,提示了疑难问题和要避免的已知错误,作为一本专门的实验用书极具可操作性。相信本书中文版的出版将会对国内 miRNA 研究有所裨益。

本书翻译工作主要由国内从事 RNA 相关研究的一线科研人员完成。但由于 miRNA 研究是一个新领域,进展十分迅速,加之翻译人员的知识面和水平有限,译文中可能存在不足,对此尚祈同仁不吝指正。

本书的翻译出版得到了化学工业出版社生物医学出版分社的大力支持,尤其是责任编辑为此付出了辛勤的劳动,在此表示衷心的感谢。

郑晓飞

2007 年 10 月于北京

序

真核细胞中存在约 22 个核苷酸的天然小调节 RNA，根据其与其靶基因的互补程度，这些进化上保守的分子能抑制靶基因翻译或降解靶基因的 RNA 转录物。这些小 RNA 被称作微 RNA (microRNA, miRNA)。因此，miRNA 微调蛋白质合成，作为调节和协调大量基因的结果显示了许多生物学特性。miRNA 是非编码的调节 RNA，包括外显子 miRNA 和内含子 miRNA，对发育和细胞稳态 (cell homeostasis) 十分重要。外显子 miRNA，例如 *lin-4* 和 *let-7*，先作为一个大的寡核苷酸前体由 RNA 聚合酶 II (Pol- II) 或 RNA 聚合酶 III (Pol- III) 转录，然后由 Drosha 核糖核酸酶和 Dicer 核糖核酸酶加工形成成熟的 miRNA。

与外显子 miRNA 表达过程不同，源自内含子的 miRNA (Id-miRNA, intron-derived miRNA) 在信使 RNA (mRNA) 的内含子加工过程中产生。在哺乳动物中，两种 miRNA 都是通过与靶基因部分互补介导其活性的内源单链分子，而短干扰 RNA (short interfering RNA, siRNA) 通常是通过与靶基因完全互补发挥作用的外源双链分子。可以想像，siRNA 是两个完全匹配的 miRNA 组成的合成分子，一条正义链和一条反义链，发挥 miRNA 样活性。

miRNA，这些能够干扰细胞内与其部分互补的 mRNA 的小单链发夹 RNA，可用于设计针对肿瘤多态性 (polymorphism) 和病毒突变的新疗法。这一特性不同于 siRNA，因为后者诱导的 RNAi 基因沉默需要严格的完全互补。miRNA 最初是在线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 中作为在动物发育中广泛调节遗传调控途径的天然 RNA 片段被发现的。最近，内含子 miRNA 在线虫、小鼠和人的发现导致了使用由聚合酶 II (Pol- II) RNA 转录和剪接产生的 miRNA 的新治疗策略。使用 miRNA 与使用 siRNA 相比，优点是：①作用时间长；②在体内稳定；③高 RNA 启动子兼容性；④多靶点；⑤无明显毒性。这种类型的基因治疗是高度靶选择性的，抑制序列特异的基因，包括突变体和多态性。在把 miRNA 与具有序列特异性基因沉默作用的大量小调节 RNA 比较后，很明显，大部分小调节 RNA 都是 miRNA 样分子。尽管 siRNA 在哺乳动物和人细胞中不是天然的，但是它们在低等动物中的天然相似物是通过类似的机制被加工的，例如 Dicer 和 RISC (Science, 2002, 297: 2056~2060)。miRNA 是一个广谱的对抗转基因和病毒基因的细胞自我防御工具，提供了一种独特的基因治疗手段。

在临床实验之前，有效、稳定地生成和递送足够量的 miRNA 进入正确的

靶细胞而没有明显的毒性，需要技术上的改进。miRNA 在动物中表达的药动力学、细胞安全性和功能稳定性都需要检测，以确定人工 miRNA 在体内是稳定的、有效的和无毒的。在真核细胞中，基于 RNA 聚合酶 II 的转录过程是被高度调控的，可通过不同的 RNA 启动子和转录因子调整。因此，在基因治疗中，RNA 聚合酶 II 介导的 miRNA 产生系统提供了有效和安全的应用。

提供蓝图的 DNA 转录成 mRNA，mRNA 随后翻译成多肽或蛋白质，产生某一特定的功能，反映一个特定性状，直到 20 世纪 90 年代初，这仍被称作“中心法则”；另一方面，人类基因组计划完成了人类基因组的 30 亿个核苷酸碱基对中大约 3 万个编码蛋白基因的确定、测序和作图。然而，传统的基因仅占人类基因组的 3%。多年来，非编码小 RNA 被视为多余的碎片被遗弃，在 RNA 的分子大小评估过程中被排除。然而，越来越多的证据显示非编码部分（即内含子）的基因转录物在细胞和生物体所有功能的调控途径中发挥着重要作用。各式各样 miRNA 的发现使解释反映个体差异的生理变异成为了可能，包括体重、身高和对不同药物的反应等。miRNA 的功能作用意味着突然地一个 DNA 可以由具有多种功能的复合的基因组成，一些用于翻译，而其他的用于调控时序蛋白合成的数量。人 miRNA 生物信息学分析序列数据的快速积累推动了 miRNA 基因的这一新发现，意味着生物医学研究人员现在可以在他们的研究方案中利用 miRNA 操控特定 mRNA 的表达。

鉴于在基因表达调节中 miRNA 的高度保守性，《miRNA 实验指南》的主要目的是提供在一些物种中多样的、新颖的和有用的 miRNA 研究方法，这些物种包括植物、线虫、果蝇、鱼、鸡、小鼠和人类。这些内容包括对已经熟悉 miRNA 鉴定的研究人员所使用方法的一些改进和应用。例如，书中描述的多种不同的改进可用于研发作为潜在药物设计的 miRNA。

miRNA 为我们了解基因表达开辟了一条新的途径，而且将成为生物医学研究中最广泛应用的技术之一，在疾病发病机理的分子研究中发挥重要作用。在分子水平确定适用的 miRNA 已经开始提供设计新治疗策略的信息。我们期望《miRNA 实验指南》将激励读者探索不同的途径去了解发病机制，通过 miRNA 促进分子层面的生物医学研究。

Shao-Yao Ying

(郑晓飞 译)

原著编写人员

- DMITRY A. BELOSTOTSKY • *Department of Biological Sciences, State University of New York, Albany, NY*
- YAMINA BENNASSER • *Molecular Virology Section, Laboratory of Molecular Microbiology, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institute of Health, Bethesda, MD*
- DONALD C. CHANG • *Department of Cell and Neurobiology, Keck School of Medicine, University of Southern California, Los Angeles, CA*
- SHIN-JU E. CHANG • *Department of Cell and Neurobiology, Keck School of Medicine, University of Southern California, Los Angeles, CA*
- JULIA A. CHEKANOVA • *Department of Biological Sciences, State University of New York, Albany, NY*
- CHANG-ZHENG CHEN • *Department of Microbiology and Immunology, Baxter Laboratory of Genetic Pharmacology, Institute for Stem Cell, Cancer and Medicine, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA*
- CHUN-HONG CHEN • *Division of Biology, California Institute of Technology, Pasadena, CA*
- THIMMAIAH P. CHENDRIMADA • *Gene Expression and Regulation Program, and Molecular and Cellular Oncogenesis Program, The Wistar Institute, Philadelphia, PA*
- BRYAN R. CULLEN • *Center for Virology and Department of Molecular Genetics and Microbiology, Duke University Medical Center, Durham, NC*
- RANHUI DUAN • *Department of Human Genetics, Emory University School of Medicine, Atlanta, Georgia*
- PAZ EINAT • *Paz Einat Consulting and Inventions, Nes Ziona, Israel*
- YOICHI R. FUJII • *Molecular Biology and Retroviral Genetics Group Nagoya City University, Nagoya, Japan*
- RICHARD I. GREGORY • *Gene Expression and Regulation Program, and Molecular and Cellular Oncogenesis Program, The Wistar Institute, Philadelphia, PA*
- SAM GRIFFITHS-JONES • *Wellcome Trust Sanger Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, UK*

- MING GUO • *Department of Neurology, Brain Research Institute, The David Geffen School of Medicine at UCLA, Los Angeles, CA*
- BRUCE A. HAY • *Division of Biology, California Institute of Technology, Pasadena, CA*
- SHENG-HE HUANG • *Division of Infectious Diseases, Department of Pediatrics, University of Southern California, Children's Hospital Los Angeles, Los Angeles, CA*
- AKIRA ISHIZUKA • *Institute for Genome Research, University of Tokushima, Tokushima, Japan*
- KUAN-TEH JEANG • *Molecular Virology Section, Laboratory of Molecular Microbiology, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institute of Health, Bethesda, MD*
- PENG JIN • *Department of Human Genetics, Emory University School of Medicine, Atlanta, Georgia*
- BINO JOHN • *Computational Biology Center, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY*
- AMBROSE Y. JONG • *Division of Hematology-Oncology, Department of Pediatrics, University of Southern California, Children's Hospital Los Angeles, Los Angeles, CA*
- CHRYSSA KANELLOPOULOU • *The Dana-Farber Cancer Institute, Department of Cancer Biology, Harvard Medical School, Boston, MA*
- CATHERINE KIDNER • *Institute of Molecular Plant Sciences, Edinburgh University and Royal Botanic Gardens, Edinburgh, Scotland*
- JACEK KROL • *Laboratory of Cancer Genetics, Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Sciences, Noskowskiego, Poznan, Poland*
- WLODZIMIERZ J. KRZYZOSIAK • *Laboratory of Cancer Genetics, Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Sciences, Noskowskiego, Poznan, Poland*
- SHU-YUN LE • *Laboratory of Experimental and Computational Biology, NCI Center for Cancer Research, National Cancer Institute, Frederick, MD*
- SHI-LUNG LIN • *Department of Cell and Neurobiology, Keck School of Medicine, University of Southern California, Los Angeles, CA*
- YI-HSIN LIU • *Center for Craniofacial Molecular Biology and Graduate Pro-*

gram in Craniofacial Biology, School of Dentistry, University of Southern California, Los Angeles, CA

FENG LUO • *Division of Hematology-Oncology, University of Southern California and Children's Hospital Los Angeles, Los Angeles, CA*

DEBORA S. MARKS • *Department of Systems Biology, Harvard Medical School, Boston, MA*

MICHAEL Z. MICHAEL • *Department of Gastroenterology and Hepatology, Flinders Medical Center, Flinders University School of Medicine, Bedford Park, Australia*

JOSEPH D. MILLER • *Department of Cell and Neurobiology, Keck School of Medicine, University of Southern California, Los Angeles, CA*

HYEYOUNG MIN • *Department of Microbiology and Immunology, Baxter Laboratory of Genetic Pharmacology, Institute for Stem Cell, Cancer and Medicine, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA*

STEFAN A. MULJO • *The CBR Institute for Biomedical Research and Department of Pathology, Harvard Medical School, Boston, MA*

SHINYA OMOTO • *Molecular Biology and Retroviral Genetics Group, Nagoya City University, Nagoya, Japan*

MARC REHMSMEIER • *Bielefeld University, CeBiTec, Junior Research Group Bioinformatics of Regulation, Bielefeld, Germany*

KUNIAKI SAITO • *Institute for Genome Research, University of Tokushima, Tokushima, Japan*

CHRIS SANDER • *Computational Biology Center, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York, NY*

RAMIN SHIEKHATTAR • *Gene Expression and Regulation Program, and Molecular and Cellular Oncogenesis Program, The Wistar Institute, Philadelphia, PA*

HARUHIKO SIOMI • *Institute for Genome Research, University of Tokushima, Tokushima, Japan*

MIKIKO C. SIOMI • *Institute for Genome Research, University of Tokushima, Tokushima, Japan*

NEIL R. SMALHEISER • *Department of Psychiatry and UIC Psychiatric Institute, University of Illinois-Chicago, Chicago, IL*

- PETER F. STADLER • *Institute for Theoretical Chemistry, University of Vienna, Vienna, Austria*
- ANDREA TANZER • *Institute for Theoretical Chemistry, University of Vienna, Vienna, Austria*
- MARJA TIMMERMAN • *Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY*
- VETLE I. TORVIK • *Department of Psychiatry and UIC Psychiatric Institute, University of Illinois-Chicago, Chicago, IL*
- LING-TAO WU • *Department of Pathology, University of Southern California, Children's Hospital Los Angeles, Los Angeles, CA*
- JIING-KUAN YEE • *Department of Pathology, City of Hope, Duarte, CA*
- MAN LUNG YEUNG • *Molecular Virology Section, Laboratory of Molecular Microbiology, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institute of Health, Bethesda, MD*
- SHAO-YAO YING • *Department of Cell and Neurobiology, Keck School of Medicine, University of Southern California, Los Angeles, CA*
- YAN ZENG • *Department of Pharmacology, University of Minnesota, Minneapolis, MN*
- FENGFENG ZHUANG • *Center for Craniofacial Molecular Biology and Graduate Program in Craniofacial Biology, School of Dentistry, University of Southern California, Los Angeles, CA*

目 录

第 1 章 microRNA——调控基因功能的 RNA 基因概述	1
第 2 章 microRNA 前体结构分析	17
第 3 章 microRNA 的生物形成——分离与鉴定微处理体复合物	31
第 4 章 pri-miRNA 转录物的识别与切割	47
第 5 章 以小鼠胚胎干细胞为遗传系统模型探索 RNA 干扰机制	55
第 6 章 microRNA 与信使 RNA 的转归	70
第 7 章 microRNA 靶位点预测	83
第 8 章 人类 microRNA 靶位点预测	98
第 9 章 哺乳动物 microRNA 靶位点预测的复杂性	110
第 10 章 miRBase——microRNA 序列数据库	121
第 11 章 microRNA 表达谱高通量分析方法	131
第 12 章 应用原位杂交技术研究 microRNA 在植物发育中的作用	148
第 13 章 使用荧光素酶报告系统验证 siRNA 有效性	170
第 14 章 克隆哺乳动物组织中的 microRNA	178
第 15 章 分析造血系统分化中 microRNA 表达及功能的方法	200
第 16 章 果蝇细胞死亡过程中 microRNA 调节子的鉴定	219
第 17 章 microRNA 在 HIV 感染中的作用	230
第 18 章 HIV-1 编码的 microRNA 分子的克隆及检测	243
第 19 章 脆性 X 染色体智力迟钝蛋白相关 mRNA 及 microRNA 的鉴定	255
第 20 章 应用果蝇 S2 细胞裂解产物体外分析 microRNA 前体的剪切过程	265
第 21 章 用慢病毒 RNA 干扰表达载体下调人 Cdc6 蛋白	275
第 22 章 利用内含子 microRNA 进行体内或体外基因沉默	282
第 23 章 分离和识别基因特异性 microRNA	300
第 24 章 利用内含子 microRNA 的转基因样动物模型	308
第 25 章 miRNA 的进化	322
第 26 章 展望	338

第 1 章

microRNA

——调控基因功能的 RNA 基因概述

Shao-Yao Ying, Donald C. Chang, Joseph D. Miller 和 Shi-Lung Lin

曹国军 译 徐华 邵宁生 校

摘 要 microRNA (miRNA) 是一类分布十分广泛的小调控 RNA 基因, 它们基于与靶 mRNA 的序列互补, 可以降解靶 mRNA 和抑制蛋白质翻译。不同的命名曾被用于描述各种类型的 miRNA。在进化过程中, RNA 逆转录病毒或者转基因侵入真核生物基因组并插入到 DNA 非编码区域, 成为类转座子的跳跃基因, 在真核生物中起到防止病毒侵入及在基因调控的次级水平上细调基因表达的作用。当一个转座子插入到内含子中, 则成为内含子 miRNA, 它利用蛋白质合成的机制, 即 mRNA 的转录和剪接, 来完成加工和成熟。最近发现 miRNA 在胚胎发育中起着重要作用, 但不危及生命。miRNA 可能在多种生物的不同生物系统都起着关键作用, 促进快速应答与机体生理和结构的精确标绘。基于这些特性, 人工内含子 miRNA 已被研究用于体外基因功能鉴定、体内基因治疗和转基因动物模型的建立。本章主要讨论了 miRNA 的生物发生和鉴定、潜在的应用和未来研究方向, 希望可以为 miRNA 和基因功能的深入研究提供指导。

关键词 小 RNA; 非编码 RNA; 小干扰 RNA; miRNA; 内含子 miRNA; 转座子; 生物发生; 机制; 鉴定; 靶向; 微调; 基因功能; 基因治疗; 抗病毒疫苗; 药物研制; 未来方向

1.1 引言

miRNA 是一类小单链 RNA, 长度为 18~25 个核苷酸 (nt)。它由 DNA 转录产生, 但并不翻译成蛋白质, 而是在蛋白质合成中调节其他基因的功能。因此 miRNA 是调控其他蛋白质编码基因的基因。

即使算上成千上万个根据人类基因组序列预测的新基因, 以及诸如编码转移 RNA (tRNA)、核糖体 RNA (rRNA)、核仁小 RNA (snoRNA) 等的基因,

基因组中也几乎有 95% 是非编码 DNA，虽然该比例在不同的种属中有所差异。这些非编码序列的改变通常与临床的及偶然的机能障碍有关。其中部分非编码序列负责通过类似 RNA 干扰机制的 RNA 介导的基因沉默。一类具有潜在重要性的基因是 miRNA 基因，它们缺乏典型的开放读码框，RNA 似乎是其编码的最终产物。这些 miRNA 在发育、蛋白质分泌和基因调控上发挥着关键作用。它们中有些是天然产生的反义 RNA，其余的则具有更加复杂的结构。要了解由这些 miRNA 失调引发的疾病，需要建立一种组织特异的表达系统，在体外和体内研究每个 miRNA 的功能和机制。

本章简单而概括地介绍了 RNA 可直接调控基因功能的概念，重点在于 miRNA 研究的逐个步骤。希望这些知识有助于该领域的初学者解决 miRNA 功能分析时遇到的问题。

1.1.1 小 RNA 或非编码 RNA

非编码 RNA 是不翻译成蛋白质即可发挥功能的任意 RNA 分子。非编码 RNA 也被称为小 RNA (sRNA)，有时还被称为非信使 RNA、小非信使 RNA、微小非编码 RNA、小修饰 RNA 或小调控 RNA。从广义上讲，转录出非编码 RNA 的 DNA 序列可被认为是 RNA 基因。

本章我们仅讨论 sRNA，即直接参与 RNA 的加工和降解，但间接参与蛋白质合成与基因调控的小于 300nt 的转录物。因为 RNA 聚合酶 II (Pol-II) 不足以产生这种大小的 sRNA，因此 sRNA 或是直接由 RNA 聚合酶 III 转录而成，或是间接由 RNA 聚合酶 II 转录的较大转录物加工而来。

1.1.1.1 转移 RNA

非编码 RNA 最突出的例子是 tRNA。tRNA 参与翻译过程，是第一类被鉴定和确定特征的 sRNA^[1]。tRNA 在翻译中将特异的氨基酸转运到蛋白质合成核糖体位点的生长肽链上。tRNA 是小 RNA，长度 74~93nt，包括氨基酸附着位点和密码子识别位点，从而允许将特定的氨基酸翻译成多肽链。tRNA 的二级结构与三级结构分别是有 4~5 个结构域的三叶草结构和 L 型三维结构。

1.1.1.2 核仁 RNA

非编码 RNA 的另一个例子是 rRNA。rRNA 是核糖体的主要组成成分，转录自 DNA。真核生物的 rRNA 在被转运出核膜前已在核仁中被加工。rRNA 可生成核仁小 RNA (snoRNA)，这是第二类 sRNA。许多新发现的 snoRNA 是通过内含子加工的途径产生。现在已知一些 snoRNA 和 snoRNA 蛋白复合体对于 rRNA 的加工是必需的，但是其确切的功能还有待确定。大体上，snoRNA 在核糖体合成中可能具有的作用包括 rRNA 前体的折叠、rRNP 底物的形成、催化

RNA 的剪切、碱基的修饰、前核糖体亚基的装配以及将 rRNP 颗粒从细胞核转运到细胞质中。

snoRNA 作为引导者指导核仁中 rRNA 的假尿嘧啶化和 2'-O-核糖甲基化,因而 snoRNA 通过序列杂交引导 snoRNP 复合体至靶 rRNA 的修饰位点,然后由蛋白质来催化 rRNA 碱基的修饰。所以该类型 RNA 又被称为指导 RNA (guided RNA)。

snoRNA 还与形成哺乳动物的端粒酶和参与父系染色体印记的蛋白质相关。即使当某些宿主基因并不编码蛋白质时, snoRNA 仍可由 Pol-Ⅱ 转录的内含子基因所编码,结果使得这些基因的内含子而非外显子在脊椎动物中呈现出保守性。也因此,植物或无脊椎动物的一些内含子基因在脊椎动物中仍能发挥作用。

snoRNA 的结构包括与靶 RNA 碱基配对的保守序列。几乎所有脊椎动物的引导 snoRNA 都产生自编码蛋白质基因或 Pol-Ⅱ 转录的非编码 RNA 的内含子,而仅有少数酵母引导 snoRNA 来自内含子,提示进化过程中内含子的蓄积反映了如上所述的整合入内含子的转基因的保守性^[2~4]。这些内含子的加工途径涉及 RNaseⅢ 相关酶的核酸内切的切割 (endonucleolytic cleavage)、核酸外切的修整 (exonucleolytic trimming),以及可能的 RNA 介导的剪切,该过程发生在一个称为外切酶体 (exosome) 的大复合体中^[5,6]。

1.1.1.3 核 RNA

小核 RNA (snRNA) 是一类在真核细胞的细胞核中发现的小 RNA 分子。它们参与许多重要过程,例如 RNA 的剪接 (从异核 RNA 中移除内含子) 和端粒的维持。snRNA 通常与特异的蛋白质相互作用,该复合体称为 snRNP。snRNA 的例子有 U2 snRNA、pre-5S rRNA 和 U6 snRNA。胚胎干细胞中的 U2 snRNA 和爪蟾卵中的 pre-5S rRNA 通过与保守的蛋白 R₀ 结合,利于细胞在紫外照射后的存活。真核细胞中的 U6 snRNA 是参与 mRNA 剪接的 5 类剪接体 RNA (U1~U6)。此类 snRNA 具有一个由一个茎环、一个内环、一个茎旁内环和保守的蛋白结合位点所组成的二级结构^[7]。

1.1.1.4 噬菌体和病毒 RNA

另一种形式的小 RNA 长度为 30nt,功能为噬菌体 F1 DNA 复制的起始物^[8,9]。其仅能起始噬菌体 DNA 上给定位点,提示这可能是一种原始的防御病原体侵袭的机制。噬菌体 T4 起源的内含子则参与 RNA-RNA 相互作用而抑制蛋白质合成^[10]。

1.1.1.5 小干扰 RNA

小干扰 RNA 是小双链 RNA 分子,长度 20~25nt,通过 Dicer 酶参与的 RNAi 作用干扰基因表达。siRNA 研究最早可追溯到牵牛花中色素表达的观察。van der Krol 等^[11]试图通过导入额外的基因来增强花的色素表达,却意外地观

测到某些植物花中色素表达减弱,这就提示基因沉默可能涉及自然发生的基因功能调控。这种在牵牛花中增加基因拷贝数而导致基因沉默的现象不仅仅发生在转基因,也可如其他研究者所观察到的发生于内源基因^[12]。这就提示涉及了同源基因(转基因和内源基因)的共抑制以及可能发生了甲基化^[12,13]。这种现象被命名为 RNAi。必须注意到导入牵牛花的转基因是双链 RNA,并与靶基因是完全互补的。

当将 dsRNA 注入秀丽隐杆线虫时,Fire 与其合作者也注意到了基因沉默和 RNAi^[14]。RNAi 是一种机制,具有与靶基因部分序列互补的小调控 RNA 通过这种机制可以干扰靶基因的表达。现在认为一旦 dsRNA 进入细胞,即被 RNase III 家族的内切酶 Dicer 切开。Dicer 由一个氨基末端的螺旋酶结构域、一个 PAZ 结构域、两个 RNase III 基序以及一个 dsRNA 结合基序所组成。因此,Dicer 与 dsRNA 结合并将其切割成 siRNA。这些 siRNA 定位到与 siRNA 任意一条链完全互补的其他单链 RNA 上,然后 RNA 酶将这些与之互补的 RNA 降解。这种现象又称为转录后基因沉默(PTGS)或转基因共抑制。也就是说,基因沉默可以被导入的转基因、RNA 病毒或与靶基因转录物完全互补的 dsRNA 序列激活。

在哺乳动物中,大于 30nt 的 dsRNA 可以激活抗病毒应答,导致 RNA 转录物的非特异降解、干扰素的合成和全面抑制宿主细胞蛋白质合成^[15]。结果是长 dsRNA 不能在哺乳动物细胞中产生基因特异的 RNAi 活性^[16]。

在不同种属的不同生物系统中曾有多多个术语被用来描述这种相同或相似的现象,包括 siRNA^[17]、小短暂 RNA (stRNA)^[18]、异染色质 siRNA^[19] 以及小调控 dsRNA^[20]。

1.1.1.6 microRNA

miRNA 是一种与其他蛋白质编码基因的 mRNA 转录本反向互补的小单链 RNA 基因。这些 miRNA 能够抑制蛋白质编码基因的表达。miRNA 最先是在线虫中观察到的与靶转录物的 3'UTR 互补的长 18~23nt 的 RNA 分子,包括 *lin-4*^[21] 和 *let-7* 基因^[22],线虫的发育由这些 RNA 基因所调控。随后 miRNA 被发现在包括从线虫到果蝇以及人的多种组织中存在^[23],提示这些分子可能代表一个从古老的 sRNA 祖先进化而来的基因家族。

miRNA 被认为是从 DNA 转录,不被翻译但能调控其他基因表达的分子。miRNA 的初始转录物 (pri-miRNA) 是含有至少一个发夹样结构 miRNA 前体的长 RNA 转录本。pri-miRNA 在细胞核内被由微处理体协助的核酸酶 Drosha 加工成 miRNA 前体^[24],然后经 Exportin-5 转运出细胞核^[25]。60~90nt 的 miRNA 前体形成茎和环的结构,细胞质中的 RNase III, Dicer 酶将成熟的 miRNA 从发夹状的 miRNA 前体的茎区域中剪切出来。miRNA 与 siRNA 似乎具有密切的关系,尤其是考虑到其均具有 dsRNA 与发夹结构时。siRNA 可被认为是

miRNA 的双链形式, 该 RNA 分子具有 miRNA 及其反向互补 RNA。因此, 有人认为 siRNA 是 miRNA 前体的一种形式。

miRNA 基于与一个或多个 mRNA 的部分互补抑制基因表达, 通常是在 3'-UTR 的位置。miRNA 退火到靶 mRNA 上抑制蛋白质的翻译。在某些情况下, miRNA 结合形成的 dsRNA 可以触发类似 RNAi 的机制降解靶 mRNA; 或者在另一些情况下, 有人认为 miRNA 复合体阻断蛋白质翻译但不引起 mRNA 的降解。

考虑到大多数 miRNA 基于部分互补抑制基因表达, 一个 miRNA 能靶向多个 mRNA, 而多个 miRNA 也可作用于同一个 mRNA, 在多种组织和细胞中协同调控基因表达。因此, miRNA 在精细调控蛋白质编码基因上可能有着重要作用。实际上, miRNA 的发现已经革新了我们关于后基因组时代对基因表达调控的理解。

1.1.1.7 内含子 miRNA

一些小调控 RNA 从内含子 RNA 片段加工而来。例如, snoRNA 从编码核糖体蛋白和核蛋白的基因的内含子部分加工而来。另外一些 sRNA 则从外显子不再具有编码蛋白质能力的基因中加工而来。这种类型的内含子加工涉及 RNase III 相关酶、核酸外切的修饰以及可能的 RNA 介导的剪切。因此, 内含子 miRNA 是一种从蛋白质编码基因的内含子中加工而来的新类型 miRNA。

内含子 miRNA 与之前描述的基因间 miRNA (如 *lin-4* 和 *let-7*) 最大的不同是内含子 miRNA 的生成需要 Pol- II 和剪接体^[26]。内含子 miRNA 与基因间 miRNA 有着相同的装配过程, 称为 RNA 诱导的沉默复合体 (RISC), 它是 RNAi 相关的基因沉默的效应者。尽管 siRNA 相关的 RISC 装配曾被用来预测 miRISC 装配, miRNA 成熟和 RISC 装配之间的关系仍有待进一步证明。RISC 与 Dicer 的特征在 siRNA 和 miRNA 机制中有明显的不同^[27,28]。

内含子 miRNA 需要满足下列要求。第一, 它们与其编码基因转录物有着相同的启动子。第二, 它们定位在初始基因转录物 (pre-mRNA) 的非蛋白编码区域。第三, 它们与编码基因转录物共表达。最后, 它们从编码基因转录物中被细胞核内的 RNA 剪接加工处理从而产生成熟的 miRNA。

虽然目前鉴定的 miRNA 已确认是由基因的内含子区域编码的, 但是其与蛋白质编码基因的转录物方向相反。因此, 这些 miRNA 并不被认为是内含子 miRNA, 因为它们并没有与编码基因相同的启动子, 也不是通过 RNA 剪切从蛋白质编码基因转录物中释放出来。这些 miRNA 的启动子定位在编码基因的反义方向, 可能将该基因转录物作为反义 miRNA 的潜在靶。这种类型的 miRNA 的一个典型例子是 *let-7c*, 这是一个基因间 miRNA, 但定位在一个基因内含子的反义区域。

转座子和内含子 miRNA 真核生物中内含子和其他 ncRNA 可能发展出一种第二级水平的基因表达, 并可微调基因活性的复杂网络。在细菌和细胞器基因