

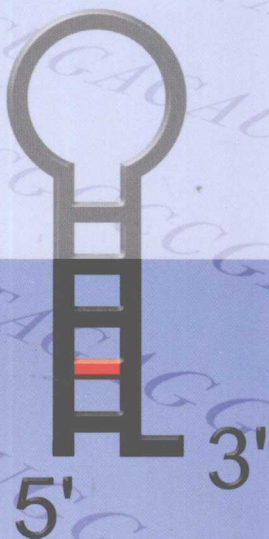


导读版·

MicroRNA Methods

MicroRNA研究方法

John J. Rossi, Gregory J. Hannon



科学出版社
www.sciencep.com

MicroRNA Methods

MicroRNA 研究方法

Edited by

John J. Rossi

Graduate School of Biological Sciences

Division of Molecular Biology

Beckman Research Institute of the City of Hope

Duarte, California

Gregory J. Hannon

Cold Spring Laboratory

Cold Spring Harbor, New York

Howard Hughes Medical Institute

Chevy Chase, Maryland

科学出版社

北京

图字:01-2008-1076 号

This is an annotated version of
MicroRNA Methods edited by John J. Rossi, Gregory J. Hannon.

Copyright © 2007, Elsevier Inc.

ISBN-13: 978-0-12-373917-9

All rights reserved.

No part of this publication may be reproduced or transmitted in any form or by any means, electronic or mechanical, including photocopy, recording, or any information storage and retrieval system, without permission in writing from the publisher.

AUTHORIZED EDITION FOR SALE IN P. R. CHINA ONLY
本版本只限于在中华人民共和国境内销售

图书在版编目(CIP)数据

MicroRNA 研究方法=MicroRNA Methods: 英文/(美)罗西(Rossi, J. J.)
主编. —影印本. —北京:科学出版社,2008
(酶学方法:427)
ISBN 978-7-03-021477-5

I. M… II. 罗… III. 核糖核酸-研究方法-英文 IV. Q522

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2008)第 039948 号

责任编辑:孙红梅 李小汀

责任印制:钱玉芬/封面设计:耕者设计工作室

科学出版社出版

北京东黄城根北街 16 号

邮政编码:100717

<http://www.sciencep.com>

双青印刷厂印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2008 年 4 月第 一 版 开本:787×1092 1/16

2008 年 4 月第一次印刷 印张:18 插页:4

印数:1—1 500 字数:427 000

定价:88.00 元

(如有印装质量问题,我社负责调换〈双青〉)

导 读

MicroRNA(缩写为 miRNA,译为微 RNA)是一类长度在 21 个核苷酸左右的单链小分子 RNA,它主要通过与其他蛋白质形成 RNA 诱导沉默复合体来抑制靶基因 mRNA 的翻译,从而介导转录后基因的表达调控。虽然第一个 microRNA lin-4 是美国科学家于 1993 年在线虫中发现的,但是直到 2001 年人们在线虫、果蝇和人类等动物细胞中鉴定出近百种与 lin-4 类似的小分子非编码 RNA 存在,才正式命名这类小分子为 microRNA。随后,在其他动物、植物甚至病毒中也相继发现了大批 microRNA,揭示出在生物细胞中一个庞大的调控“RNA 世界”。

研究表明,microRNA 在动植物的生长、发育、分化、生殖等生理过程中发挥着重要的作用,特别是 microRNA 的表达异常与人类疾病形成密切相关,如在肿瘤和癌症中某些 microRNA 扮演着“癌基因”(oncogene)或者“抑癌基因”(tumor suppressor)的角色。这些发现引起了全世界的关注,对 microRNA 等小分子非编码 RNA 的搜寻及其功能的探索一度成为生命科学的研究热点和前沿,并连续三年(2001、2002、2003)被 Science 杂志评为年度十大科技突破。

《酶学方法》是由世界最大的科技和医学信息出版商爱思唯尔(Elsevier)出版的系列丛书,被美国著名的《科学引文索引》(Science Citation Index, SCI)收录,具有很高的学术地位和影响力。《酶学方法》创刊于 1955 年,目前已有 427 卷。本书 *MicroRNA Methods* 是该系列丛书已出版的最新一卷,同时也是最新的关于 microRNA 研究的方法学专著。本书的两位主编,John J. Rossi 博士和 Gregory J. Hannon 博士,分别来自美国加州生物科学研究所和贝克曼研究所(Graduate School of Biological Sciences, and Division of Molecular Biology, Beckman Research Institute of the City of Hope, Duarte, California),以及美国冷泉港实验室(Cold Spring Harbor Laboratory),他们都是 RNA 干扰领域的知名专家。参与编写本卷的 34 位作者分别来自不同国家的 13 个研究小组,他们均在 microRNA 研究的某些方面取得过突破性成果。例如:Sullivan 和 Grundhoff 小组发现 SV40 编码 microRNA,并首次阐明病毒 microRNA 具有的重要功能——抵抗宿主细胞免疫杀伤。Pfeffer 小组首次发现病毒基因组编码 microRNA——EBV 编码的 5 个 microRNA。Kim 小组首次发现并阐明 Drosha 在 microRNA 加工成熟过程中的功能。Hammond 小组用基因芯片揭示了斑马鱼胚胎发育过程中 microRNA 表达变化的全貌;他们还发现一个 microRNA 基因簇在淋巴瘤中起“癌基因”的作用。Xue-Mei Chen 小组发现植物中 Dicer 的同源物 HEN1;并首次揭示 microRNA 在拟南芥的花发育过程中起着重要作用,以及甲基化是植物 microRNA 加工过程的重要步骤。Chang-Zheng Chen 小组首次揭示 microRNA 在哺乳动物造血干细胞分化发育中的作用。Croce 小组是研究 microRNA 异常与人类癌症关系的先锋,他们首次揭示 microRNA 异常与人类慢性白血病(B-CLL)相关,是目前在 microRNA 研究方面发表文章最多的实验室。本书的 13 个章节分别介绍了这 13 个研究小组所做的部分工作及取得的成果,并以他们的研究为主线,

系统地汇集了其他研究小组的重要研究成果和主要研究方法。

本书主要有以下几个方面的特点:

(1)全面性。本书介绍的研究方法涵盖目前 microRNA 研究的各个方面,从 microRNA 的初步预测和鉴定、表达分析,进一步到 microRNA 的生物发生、加工机制、表达调控,再到 microRNA 与发育、分化、疾病的关系等功能研究,读者可全面把握 microRNA 研究的各种方法。本书同时也是一本非常全面的 microRNA 研究综述集。在每一章节的开始,作者通过简炼而精要的概述,引荐了众多 microRNA 研究的经典文献和近两年发表的重要论文,介绍了相关的研究内容与方法、研究者以及主要成果。这些综述可以帮助读者全面了解这个研究方向的研究历史以及目前国际上的研究动向。

(2)逻辑性。本书将目前 microRNA 的研究归纳为逐步深入的三个方面:① MicroRNA 及其靶基因的鉴定。② MicroRNA 的表达、成熟和功能分析。③ MicroRNA 与疾病。这三个方面以 microRNA 发现的历史为逻辑顺序,也是所有 microRNA 研究由浅入深的必经之路。

(3)科学性。本书针对各方向最基础和最主要的问题,展示了不同研究者解决同类问题的不同策略和方法,并以实际研究方案和详细实验数据作为例证,通过类比分析显示出不同方法的侧重点和优缺点,集众家所长。文中所介绍的方法均以发表的文章为鉴,是目前 microRNA 研究中较为经典和可靠的方法。例如:本书在第三章中为了说明改良的小分子 RNA 克隆方法更适合鉴定 microRNA 分子,便列举了经典和改良的小分子 RNA 克隆方法的具体研究数据。

(4)实用性。本书详细介绍了关于 microRNA 分子各种研究方法的原理和实验操作,其中包括操作时使用的试剂配方和具体的实验条件。读者可以参考本书所讲述的实验方法及操作来进行相关的科研工作。

另外,作为方法学著作,它不但重视方法步骤,更强调设计方法的原理和该方法相关的问题,这是本书的一大特色。在某些章节(如第 4、10、11 章),往往只有很小的篇幅记述具体方法步骤,取而代之的则是详细的原理和可能涉及的问题,大量具体的方法步骤被简化并提炼成流程图和原理图,使得读者可以提纲挈领,加深对问题的理解程度,从原理层次上把握针对某一问题的解决方法。众所周知,在科学研究中,原理的重要性要远远高于具体方法,这也是本书始终贯彻的思想。

本书在内容选材方面着重突出了生物信息学在 microRNA 研究中的重要作用。生物信息学是计算机技术延伸到生物学研究而诞生的一门新兴学科,近几年来,计算机 RNA 组学已成为生物信息学的一个重要组成部分。本书第一部分(如第 1、2、4 章)详细介绍了生物信息学在 microRNA 候选基因识别和靶基因预测等方向应用的原理以及所涉及的问题,并就如何利用计算机预测方法结合各种实验用于 microRNA 研究这一问题,提供了详细的方案。这也是目前关于计算机方法在 microRNA 研究中的应用的最基础最全面的研究指南。

目前,microRNA 研究的发展十分迅速,研究方法和技术日新月异。值得一提的是,HUMANA 出版社于 2006 年出版过一本 *MicroRNA Protocols*,由南加利福尼亚大学的 Shao-Yao Ying 教授主编。该书侧重于各种具体研究体系、研究方法和研究步骤,对于 microRNA 研究也具有较大的参考价值。

总之,《酶学方法——MicroRNA 研究方法》是一本针对性极强的生物学工具书,具有科学性、系统性和实用性,是 microRNA 研究工作者的良师益友。近年来,随着国内 microRNA研究的逐步兴起,从事该方向研究的人员与日俱增,引进本书显得尤为及时和重要。本书的引进必将推动国内 RNA 科学研究的发展,由此对整个生命科学领域起到带动作用并产生深远的影响。

屈良鹄

中山大学生命科学学院

二零零八年一月

目 录

作者	xi
----------	----

第一部分 MicroRNA 及其靶标的鉴定	1
-----------------------------	---

1. 病毒 microRNA 的鉴定	3
--------------------------	---

Christopher S. Sullivan and Adam Grundhoff

1. 引言	3
-------------	---

2. 病毒 microRNA 候选分子的计算机预测	7
---------------------------------	---

2.1 计算机鉴定 microRNA 的原理	7
------------------------------	---

2.2 运用 VMir 预测病毒 microRNA 候选分子	9
--------------------------------------	---

3. 病毒 microRNA 候选分子的芯片验证	11
--------------------------------	----

3.1 芯片的设计	13
-----------------	----

3.2 芯片的杂交	15
-----------------	----

3.2.1 小 RNA 的胶纯化	16
------------------------	----

3.2.2 标记和芯片的杂交	18
----------------------	----

3.3 数据分析	19
----------------	----

4. 结束语	21
--------------	----

参考文献	22
------------	----

摘要

鉴于 microRNA 在基因表达调控方面的重要功能,一些病毒能编码其自身的 microRNA 并不奇怪。虽然绝大多数的 microRNA 的功能仍未知,但我们至少可以推测一部分 microRNA 在病毒的生命周期中发挥着关键的作用,因此,鉴定新的病毒 microRNA 极其重要也极为有趣。目前已知的病毒(及宿主)microRNA,大部分是通过克隆小 RNA 的方法鉴定的。由于病毒基因组较小,因而特别适合利用基于计算机的各种预测方法对 microRNA 候选基因进行研究。本章就如何利用计算机预测方法结合高通量的基因芯片分析检测病毒基因组中的 microRNA 这一问题,提供了详细的方案。

2. 应用鲁棒性机器学习算法预测 microRNA 基因及其靶标	25
--	----

Pål Sætrom and Ola Snøve, Jr.

1. 引言	26
-------------	----

2. 正确的使用机器语言	27
--------------------	----

2.1 数据集	28
2.2 性能估算	28
2.3 性能测量	30
2.4 机器学习步骤	31
3. 一种确定性和一种随机性的算法	33
3.1 支持向量机	33
3.2 Boosted 遗传规划	35
4. 使用支持向量机预测 microRNA 基因	37
4.1 决定输入	38
4.2 收集训练集	39
4.3 MicroRNA 基因预测软件的训练及其性能估计	39
4.4 评估 microRNA 基因预测软件的性能	42
5. 使用强化遗传算法预测 microRNA 靶标	43
5.1 决定输入	43
5.2 装配训练集	44
5.3 训练和评估 microRNA 靶基因预测软件	44
5.4 评估 microRNA 靶基因预测软件	45
6. 小结	46
致谢	46
参考文献	46

摘要

MicroRNA 是非编码 RNA, 却有可能调控数以千计编码蛋白质的基因的表达。目前预测 microRNA 基因的数目可能是已知的两倍, 但决定 microRNA 作用靶标的机制尚未明确。机器学习算法可用于创建捕捉已验证实例特征的分类器, 以确定基因组中的发夹是否与已证实的 microRNA 基因类似, 或者 mRNA 的 3' 非翻译区是否具备已知的靶标特征。算法虽无法取代生物学的验证, 但应始终用来指导实验设计。本章的重点涉及利用机器学习时必须处理的潜在问题, 并通过实例的方法展示支持向量机和遗传规划如何对 microRNA 基因及其靶标进行预测。

3. 病毒编码 microRNA 的鉴定 51

Sébastien Pfeffer

1. 引言	52
2. Rnl2 (1-249) 和腺苷酸化的 3' 接头寡核苷酸的纯化	55
3. 小 RNA 片段的分离	55
4. 纯化小 RNA 与腺苷酸化 3' 接头的连接	56
5. 小 RNA-3' 接头与 5' 接头的连接	56
6. 连接产物的逆转录反应	57

7. cDNA 的首次 PCR 扩增	57
8. Pme I 酶切 PCR 产物	58
9. 二次 PCR 扩增	58
10. Ban I 酶切二次 PCR 产物	59
11. Ban I 酶切 DNA 的串联连接	59
12. 串联体的末端加尾与克隆入 T/A 载体	59
13. 文库的测序及注释	60
14. 结束语	60
参考文献	61

摘要

RNA 干扰是一种在生物体中普遍存在的机制,它从不同水平对基因的表达进行调控。小 RNA 是 RNA 干扰通路中的核心,根据其化学特性和作用模式可以划分成不同家族。在这些小 RNA 中,microRNA 是在动物中研究得最多的一类。这些小的内源性 RNA 通过剪切靶标转录产物或干扰其翻译来实现基因的转录后调控。在植物和动物中已经发现了 microRNA,在哺乳动物病毒中也已发现其存在。这就暗示了哺乳动物病毒依靠宿主的 RNA 干扰机器合成 microRNA,这些 microRNA 对被感染的宿主基因组和病毒自身基因组均有作用。用于鉴定病毒 microRNA 的技术基本上与鉴定细胞 microRNA 的技术相同。通过计算机算法预测继而进行验证的方法是有效可行的。但鉴定病毒 microRNA 更直接和无偏向性的方法则为对病毒感染的细胞和组织建立的小 RNA 文库进行克隆和测序。

4. MicroRNA 靶标预测的计算机方法

Yuka Watanabe, Masaru Tomita, and Akio Kanai

1. 引言	66
2. microRNA 靶标识别的原理	69
3. microRNA 靶标基因分析的数据源	73
4. microRNA 靶标预测的计算机软件	74
5. microRNA 靶标基因预测的原始策略	79
6. 计算机预测的验证	81
7. 结束语	82
致谢	83
参考文献	83

摘要

MicroRNA 的发现引入了基因调控系统的一个新范式。大量的 microRNA 已在广泛的物种中被鉴定,其中大部分 microRNA 是通过非完全匹配结合到 mRNA 3' 非翻译区的一个或多个位点上,从而下调 mRNA 的翻译。鉴定 microRNA 的靶基因被认为是理

解 microRNA 在基因调控网络中所起作用的一个重要步骤。基于已观察到的一些特征(如两个核糖核酸分子的杂交程度)的规则,现已开发了专门的计算机算法,用于研究 miRNA 与其靶标的相互作用。这些电脑模拟方法为 microRNA 靶标检测提供了重要的工具,并连同实验验证,有助于揭示 microRNA 的调节靶标。本章总结了关于 microRNA 识别靶标原理的知识和目前可用的预测 microRNA 靶基因的计算方法。

第二部 MicroRNA 的表达、成熟与功能分析 87

5. Dorsha 复合体活性的体外和体内检测 89

Yoontae Lee and V. Narry Kim

1. 引言 89

2. 实验方法 94

2.1 体外分析 pri-miRNA 的加工 94

2.1.1 制备放射性标记的 pri-miRNA 转录本 94

2.1.2 制备 microprocessor 96

2.1.3 Pri-microRNA 加工的体外实验分析 97

2.2 体内分析 pri-miRNA 的加工 99

2.2.1 果蝇的 Drosha 或 DGCR8 的缺失 100

2.2.2 Pri-miRNA 的 RT-PCR 分析 100

2.2.3 Northern 杂交分析 microRNA 101

致谢..... 105

参考文献..... 105

摘要

MicroRNA 基因转录成为长的初级转录产物(pri-miRNA),并通过两种不同的核糖核酸酶 III (RNase III),Drosha 和 Dicer 加工成大约 22 个核苷酸的成熟 microRNA。对 microRNA 发生过程进行遗传和生化分析的各种实验方法已经发展和完善起来。本章介绍了一种实验方法,用于分析被 Drosha 和其共同作用因子 DGCR8 调节的 pri-miRNA 生成过程。

6. MicroRNA 基因表达的基因芯片分析 107

J. Michael Thomson, Joel S. Parker, and Scott M. Hammond

1. 引言 107

2. microRNA 生物合成与作用方式的概述 109

3. microRNA 表达的分析策略 110

4. microRNA 基因芯片分析的注意事项 111

5. 数据分析与说明	112
6. 验证策略	113
7. microRNA 基因芯片实验方案	113
7.1 芯片点阵	113
7.2 RNA 提取	114
7.3 标记和清洗	114
7.4 杂交	115
8. 数据分析	118
致谢	119
参考文献	119

摘要

MicroRNA 是一类调控靶标 mRNA 表达的小分子非编码 RNA。虽然已有上千种 microRNA 已被鉴定,但是很少有在功能上与特定的生物学途径相联系的。基因芯片分析是一种用于鉴定与生物过程相关和作为疾病分子标记的候选 microRNA 的理想策略。本章将介绍一种简单、低成本的基因芯片平台,可以优化 microRNA 的表达分析。

7. 哺乳动物细胞 microRNA 的克隆与表达检测	123
Guihua Sun, Haitang Li, and John J. Rossi	
1. 引言	124
2. microRNA 的克隆	126
2.1 总 RNA 提取	126
2.2 运用 flashPAGE™ 分离体系分离小 RNA	128
2.3 小 RNA 的多聚腺苷酸化	129
2.4 多聚腺苷化小 RNA 的 5' 末端接头连接	130
2.5 反转录	130
2.6 PCR 扩增第一条 cDNA 链	131
2.7 聚丙烯酰胺凝胶纯化扩增的 cDNA	131
2.8 PCR 产物克隆到 TOPO-TA 载体	133
3. microRNA 的鉴定	133
4. Northern 杂交验证 microRNA 的体内表达	134
致谢	136
参考文献	136

摘要

MicroRNA 是一类 19~24 个核苷酸的非编码调控性小 RNA,通过与靶基因 mRNA 3' 非翻译区(3'UTR)的互补序列相配对,对靶基因的表达起抑制作用。这类 RNA 在进化上保守,在胚胎发生、细胞分化和增殖方面有重要的调控功能。同时,它们还与某些人

类疾病的发生和发展有关。目前预测人类基因组中约有 1000 个 microRNA, 它们可能对 30% 的人类基因转录本起调控作用。由于不同细胞株系中 microRNA 表达种类的特异性以及表达水平的差异, microRNA 表达谱的建立显得十分重要。小 RNA 克隆是有效鉴定 microRNA 组织或细胞表达特异性的可靠方法。本章将介绍一种多聚腺苷酰化介导的 cDNA 克隆方法。该方法能有效鉴定细胞中大多数的小 RNA。它既能用于鉴定新的 microRNA 或 siRNA, 同时也能用于验证生物信息学所预测的 microRNA 或 siRNA。

8. 体外与体内研究 microRNA 和小干扰 RNA 甲基化的方法	139
Zhiyong Yang, Giedrius Vilkaitis, Bin Yu, Saulius Klimašauskas, and Xuemei Chen	
1. 引言	140
2. 重组 HEN1 蛋白的表达与纯化	141
2.1 构建表达载体	141
2.2 带 GST 标签的 hen1 蛋白的表达和纯化	142
2.3 带 His 标签的 hen1 蛋白的表达和制备	143
3. 利用重组 HEN1 蛋白对小 RNA 甲基转移酶的检测	144
3.1 通过监测掺入的 ^[14C] -甲基基团进行甲基转移酶分析	144
3.2 通过监测掺入的 ^[3H] -甲基基团进行甲基转移酶分析	145
3.3 通过监测 β-消除进行甲基转移酶分析	147
4. 应用逆相 HPLC 确定 HEN1-催化反应产物中甲基基团的位置	148
5. 免疫沉淀与 HEN1 活力检测	149
5.1 35S::HA-HEN1 的构建和植物转化	149
5.2 HA-HEN1 免疫沉淀和酶活性分析	149
6. microRNA 和 siRNA 体内甲基化状态的分析	151
7. 结束语	152
致谢	152
参考文献	153

摘要

MicroRNA 在植物和动物中有着相似的生物合成过程, 然而植物中 microRNA 的加工还存在 3' 末端碱基的甲基化步骤。催化拟南芥中 microRNA 甲基化的酶由 HEN1 基因编码, 并为 microRNA 的体内合成过程所必须。siRNA 的体内甲基化过程也依赖于 HEN1 基因。生物化学研究证明 HEN1 是在体外对 microRNA 和 siRNA 起作用的甲基化酶(甲基转移酶)。HEN1 通过识别 21~24 个核苷酸长的小 RNA 双链, 将 S-腺苷甲硫氨酸(SAM)的甲基基团转移到小 RNA 双链最后一个碱基的 2' 羟基上, 而双链结构正是类 Dicer 酶加工产物的特征。本章将介绍在体内和体外条件下测定 HEN1 蛋白生化活性以及分析体内小 RNA 甲基化状态的方法。

9. 发育过程中小 RNA 表达谱的分析	155
Toshiaki Watanabe, Yasushi Totoki, Hiroyuki Sasaki, Naojiro Minami, and Hiroshi Imai	
1. 引言	156
2. 低分子量 RNA 的制备与尿素-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Urea-PAGE)	158
2.1 原理	158
2.2 方法	158
2.3 材料	159
2.4 备注	160
3. 小 RNA 的克隆	161
3.1 原理	161
3.2 方法	161
3.3 材料	162
3.4 备注	163
4. 小 RNA 的分类	163
4.1 方法	163
5. Northern 杂交分析	165
5.1 原理	165
5.2 方法	166
5.3 材料	167
5.4 备注	167
参考文献	167

摘要

大小在 20~30 个核苷酸之间的小 RNA 能通过染色质修饰、mRNA 降解或者翻译抑制来调控基因的表达。目前已经鉴定了三大类小 RNA, 即 microRNA、小干扰 RNA (siRNA) 和 Piwi 相互作用 RNA (piRNA)。MicroRNA 涉及发育和细胞分化过程, 其表达具有受发育过程调节以及组织特异性表达等特征。siRNA 主要参与转座子活性的抑制以及病毒感染的防御。piRNA 在生殖细胞和干细胞中表达, 其作用被认为与抑制反转录转座子的转座有关。本章将介绍小 RNA 的克隆、注释、分类以及在发育过程中表达谱分析的方法。

10. T 细胞发育过程中 microRNA 介导的基因调控与功能

Tin Ky Mao and Chang-Zheng Chen

1. 引言	172
2. T 细胞发育过程中 microRNA 表达特征的分析	172
2.1 MicroRNA 克隆分析	174

2.2 MicroRNA 定量 PCR 分析	175
3. 构建表达 microRNA 的逆转录病毒载体	178
4. T 细胞发育过程中 microRNA 的功能研究	180
5. 功能相关 microRNA 靶标基因的鉴定和验证	183
6. 材料与试剂	187
致谢	188
参考文献	188

摘要

MicroRNA 是动物基因组编码的长度约为 22 个核苷酸的高丰度调控性 RNA。在动物体中, microRNA 通过介导 mRNA 的降解或翻译抑制来行使其多样的生物学功能。本章以 T 细胞发育为模型, 阐明用于解析 microRNA 控制的转录后基因调控网络的方法和策略, 以及它们在 T 祖细胞分化过程中的作用。此过程包括: 在稀少的 T 祖细胞中鉴定 microRNA 基因; 检测 T 细胞发育过程中 microRNA 的表达水平; 利用体外试验研究 microRNA 在 T 细胞发育过程中的功能; 鉴定受 microRNA 调控的具有相关功能的基因等。

第三部分 MicroRNA 与疾病 191

11. 白血病与淋巴瘤 microRNA 表达异常的研究 193

George Adrian Calin and Carlo Maria Croce

1. 各种人类癌症的起始和发展都涉及 microRNA 表达的改变	194
2. 基因组范围 microRNA 表达谱的基因芯片检测	195
2.1 样品收集	200
2.2 总 RNA 分离	200
2.3 MicroRNA 芯片的生产和描述	201
2.4 靶标准备	202
2.5 芯片杂交	202
2.6 原始数据分析	203
2.7 验证 microRNA 的结果	204
3. 差异表达 microRNA 靶标的鉴定和验证	205
3.1 构建有重要生物学意义的可能性靶标的数据库	206
3.2 序列互补性研究	207
3.3 荧光素酶活性报告分析	208
3.4 相关病例中 microRNA 与 mRNA 靶标表达的相关性	208
3.5 在体内鉴定差异表达 microRNA 的作用	209
致谢	210

摘要

MicroRNA 基因编码小的非编码 RNA, 参与基因表达调控。microRNA 基因的改变可能在多种甚至所有人类癌症的病理生理学中都扮演着重要的角色, 癌的起始和发展都涉及 microRNA 基因的改变。癌细胞中 microRNA 组(一个基因组中所有的 microRNA)改变的主要机制似乎是导致 microRNA 基因的异常表达, 表现为成熟和(或)前体 microRNA 的表达水平异于正常组织。有报道表明多种癌症中存在 microRNA 基因的丢失或扩增, microRNA 基因表达模式的改变可能影响细胞周期和细胞生存的程序。microRNA 基因在恶性细胞和正常细胞中的表达存在巨大的差异, 原因可能是 microRNA 基因在基因组中处于癌相关基因区, 表观遗传学机制的改变以及参与其加工过程的成员的改变, 都会导致 microRNA 基因的表达发生改变。生殖细胞和体细胞 microRNA 基因的突变或靶 mRNA 的多态性也可能是癌的易患性和发展的原因。microRNA 表达谱已经用于揭示人类癌症发病机理中 microRNA 的潜在作用, 并且使我们能够鉴定与人类肿瘤的诊断、分期、发展、预后和治疗效果相关的标记物。本章提供了一个流程图, 包含 microRNA 芯片制备、数据分析和生物学意义推断的主要步骤。

12. 植物中受病原调控的小 RNA 的发现	215
Surekha Katiyar-Agarwal and Hailing Jin	
1. 引言	216
2. 基于测序方法发现受病原调控的小 RNA	217
3. 基于杂交方法鉴定和验证受病原诱导的小 RNA	219
3.1 病原体感染组织的小 RNA 提取	219
3.1.1 GITC 法提取总 RNA	220
3.2 小分子 RNA 的电泳和凝胶转移	221
3.3 小 RNA 的杂交和检测	222
3.3.1 使用末端标记的寡核苷酸探针检测小 RNA	222
3.3.2 使用一种核糖核酸探针检测小 RNA	224
4. 结束语	225
参考文献.....	226

摘要

小 RNA 已成为真核生物基因表达最重要的调控因子之一。研究表明小 RNA 介导的基因沉默在动植物的病毒防御体系中发挥重要作用(Li and Ding, 2005; Voinnet, 2005; Wang *et al.*, 2006)。这些病毒 RNA 产生的小干扰 RNA(siRNA)起源于宿主基因组外, 而我们和其他实验室的研究表明, 宿主细胞内源的小 RNA 对于植物抵御病毒以外的病原体同样发挥重要的作用(Katiyar-Agarwal *et al.*, 2006; Navarro *et al.*, 2006)。本章介绍的方法为在植物中鉴定更多新的病原体调控的小 RNA 提供了一个机

会,这将有助于我们对植物免疫机制的理解。本章介绍的这种强大的高通量方法,基于平行测序和杂交技术,应用于发现和探测病原体调控的小 RNA,这里主要比较和讨论提取病原体感染的组织中低分子量 RNA 的方法和利用 Northern 杂交检测内源小 RNA 的策略。

13. 病毒 microRNA 表达与功能分析的实验方案	229
Eva Gottwein and Bryan R. Cullen	
1. 引言	230
2. microRNA 的表达框	232
3. 稳定导入的载体系统	233
4. 实验步骤:利用 pNL-SIN-CMV-BLR microRNA 表达载体构建表达 microRNA 的细胞系	235
5. 根据报告基因确定 microRNA 的活性	237
6. 实验步骤:病毒混合物制备与报告基因检测	237
7. 结束语	240
致谢	240
参考文献	240

摘要

MicroRNA 是一类长度在 21~23 个核苷酸的小 RNA,它们在转录后水平下调靶基因的表达。虽然所有的动植物都有内源 microRNA 表达,但众多的 DNA 病毒也编码 microRNA 是新近才发现的,推测它们有可能下调病毒或者宿主蛋白基因的表达。尽管我们已经了解一部分病毒 microRNA 的功能,但大多数病毒 microRNA 的功能还是未知的。疱疹病毒在可编码 microRNA 的病毒中显得较为独特,这是由于在长期的潜伏期或裂解性复制中,疱疹病毒可以广泛地利用所表达的 microRNA。病毒 microRNA 只在病毒感染细胞中表达,因而被认为是外源的,所以在没有感染病毒的特定细胞中表达病毒 microRNA 是一个研究其功能的有效手段。本章将对实现和证实病毒 microRNA 表达的技术进行介绍。

作者索引	245
主题索引	257

(翻译:屈良鹤,徐辉,肖振东,邓永金,黄绵波,翁桁游)

CONTENTS

Contributors

xi

Section I. Identifying MicroRNAs and Their Targets

1

1. Identification of Viral MicroRNAs

3

Christopher S. Sullivan and Adam Grundhoff

1. Introduction

3

2. Computational Prediction of Viral miRNA Candidates

7

3. Array Confirmation of Viral miRNA Candidates

11

4. Concluding Remarks

21

References

22

2. Robust Machine Learning Algorithms Predict MicroRNA Genes and Targets

25

Pål Sætrom and Ola Snøve, Jr.

1. Introduction

26

2. Appropriate Use of Machine Learning

27

3. One Deterministic and One Stochastic Algorithm

33

4. miRNA Gene Prediction with Support Vector Machines

37

5. miRNA Target Prediction with Boosted Genetic Programming

43

6. Summary

46

Acknowledgments

46

References

46

3. Identification of Virally Encoded MicroRNAs

51

Sébastien Pfeffer

1. Introduction

52

2. Purification of Rnl2 (1–249) and Adenylation of 3' Adapter Oligonucleotide

55

3. Isolation of the Small RNA Fraction

55

4. Ligation of the Purified Small RNA to Adenylated 3' Adapter

56

5. Ligation of the Small RNA-3' Adapter to the 5' Adapter

56

6. Reverse Transcription of the Final Ligation Product

57

v