

**Approaches to
microRNA**

Identification and Function Research

micro RNA
鉴定与功能分析技术

刘长征 余佳 编著



化学工业出版社



Journal of Experimental Biology

Approaches to
microRNA

Identification and Function Research

micro RNA

鉴定与功能分析技术

陈松海 编著

科学出版社

Approaches to

microRNA

Identification and Function Research

micro RNA 鉴定与功能分析技术

刘长征 余 佳 编著



化学工业出版社

· 北 京 ·

图书在版编目 (CIP) 数据

microRNA 鉴定与功能分析技术/刘长征, 余佳编著.

北京: 化学工业出版社, 2011.9

(生物实验室系列)

ISBN 978-7-122-12146-2

I. m… II. ①刘…②余… III. 核糖核酸-研究

IV. Q522

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2011) 第 171713 号

责任编辑: 傅四周

文字编辑: 张春娥

责任校对: 王素芹

装帧设计: 关 飞

出版发行: 化学工业出版社 (北京市东城区青年湖南街 13 号 邮政编码 100011)

印 刷: 北京永鑫印刷有限责任公司

装 订: 三河市万龙印装有限公司

710mm×1000mm 1/16 印张 15½ 彩插 2 字数 317 千字 2012 年 3 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: 69.00 元

版权所有 违者必究

出版者的话

21 世纪是生命科学的世纪，这已成为人们的共识。

生命科学随着人类对自身和自然的认识、探索而萌芽，随着人类生产和科学实践的进步而发展。现代生命科学包括生物学、医学、农学等传统学科领域，以及生物学、生物技术与环境科学乃至社会科学等其他学科相互渗透、交叉而产生的新型学科体系。20 世纪后叶，现代生物科学尤其是分子生物学取得了一系列突破性成就，使得生命科学在自然科学体系中的位置发生了革命性的变化，成为 21 世纪的带头学科。人们对生命科学也寄予了无限的期望，希望能够解决人类社会所面临的人口膨胀、资源匮乏、疾病危害、环境污染和生态破坏等一系列重大问题。

回顾生命科学的发展历程，实验技术一直起着非常重要的促进作用。如 17 世纪 Leeuwenhoek 等人发明并应用显微镜技术，直接催生了“细胞学说”的建立和发展；1973 年 Cohn 和 Boyer 完成了 DNA 体外重组实验，标志着基因工程的肇始；1988 年 Kary Mullis 发明的 PCR 技术甚至使生命科学产生了飞跃性的发展。可以说，生命科学每时每刻离不开实验，实验是开启神奇的生命王国大门的钥匙。没有实验技术的不断进步，也就没有生命科学今天的巨大发展；同时，生命科学的发展又对实验技术提出了更高的要求，进一步刺激了后者的不断进步。生命科学正是在“实验催生和验证着基础理论，理论指导和促进了实验技术”的不断循环中从必然王国走向自由王国。

工欲善其事，必先利其器。为了有助于生命科学工作者更多地了解相关实验技术和仪器设备，更好地设计实验方案，更有效地开展实验过程，更合理地处理实验结果，化学工业出版社组织出版了《生物实验室系列》图书。系列图书在整体规划的基础上，本着“经典、前沿、实用，理论与技术并重”的原则组织编写，分批出版。

在题材上，系列图书涵盖综合实验技术和单项实验技术两个方面。其中综合实验技术既有以实验目的为题，如“蛋白质化学分析技术”，内容纵向覆盖多项实验技术；也有以某一生命学科领域的综合实验技术为题，如“发酵工程实验技术”、“生物化学实验技术”等。而单项实验技术则以深入介绍某一专项技术及其应用为主，在阐述其基本原理的基础上，横向介绍该项技术在多个领域的应用，如“双向电泳技术”、“流式细胞术”等。

在内容上，系列图书主要有以下两个显著特点。一是强调先进性——除了系统介绍常用和经典实验技术以外，特别突出了当前该领域实验手段的新理论、新技术、新发展，为国内专业人员起到借鉴和引导作用。二是强调可操作性——对于每一项实验技术，系统介绍其原理方法、设备仪器和实验过程，让读者明了实验的目

的、方案设计以及具体步骤和结果处理，以期起到实验指南的作用。

本系列图书坚持质量为先，开拓国内和国际两个出版资源。一方面，邀请国内相关领域兼具理论造诣和丰富实验室工作经验的专家学者编著；另一方面，时刻关注国际生命科学前沿领域和先进技术的进展，及时引进（翻译或影印）国外知名出版社的权威力作。

《生物实验室系列》图书的读者对象设定为国内从事生命科学及生物技术和相关领域（如医学、药学、农学）的专业研究人员，企业或公司的生产、研发、管理技术人员，以及高校相关专业的教师、研究生等。

我们殷切希望《生物实验室系列》图书的出版能够服务于我国生命科学的发展需要，同时热忱欢迎从事和关心生命科学的广大科技人员不仅对已出版图书提供宝贵意见和建议，也能对系列图书的后续题目设计贡献良策或推荐作者，以便我们能够集思广益，将这一系列图书沿着可持续发展的方向不断丰富品种，推陈出新。

谨向所有关心和热爱生命科学，为生命科学的发展孜孜以求的科学工作者致以崇高的敬意！

祝愿我国的科技事业如生命之树根深叶茂，欣欣向荣！

化学工业出版社
生物·医药出版分社

前言

基因组测序计划的完成标志着生命科学研究进入了一个新时代，但是基因组测序呈现给世人的是大量繁杂的序列信息，读懂这些信息便是“后基因组时代”的主要任务。基因组内的信息除了蛋白质编码基因之外，还有大量的非编码序列，此类隐藏的基因过去一直被认为是基因组内的“垃圾”。然而，随着研究的深入，科研工作者发现非编码基因同样具有重要的生物功能。microRNA 便是基因组内的隐藏信息，近年来研究发现，此类非编码 RNA 分子具有重要的调控功能。这种调控作用遍及生命体的各种活动中，如生物体生长发育、器官形成、细胞增殖分化及凋亡以及多种疾病的发生等。因此，近年来 microRNA 备受瞩目，并迅速成为生命科学领域中的研究热点。

生命活动非常复杂，即使是最简单的事件也需要大量基因参与，而参与其中的基因则以不同形式的产物发挥作用。既有中心法则所提及的终极产物蛋白质，又有近年来发现的非编码 RNA 分子、基因表观遗传效应等隐藏的信息。microRNA 便是非编码 RNA 分子中的重要成员，以前被认为是基因组中的垃圾，现在看来则是珍宝。它的存在可以解释许多生命活动的奥秘以及许多疑难疾病的发生机制。然而，microRNA 如何发挥其调控功能还不清楚，因此，要阐述其在生理、病理状态中发挥什么作用以及如何发挥作用，则需要深入研究 microRNA 的功能。大多数 microRNA 是由基因间 DNA 序列编码的，转录方向与相邻的基因往往相反，是与基因表达不同的独立单位。另一类 microRNA 则位于蛋白质编码基因的内含子序列中，随 mRNA 一起转录，包含在 mRNA 前体转录物中，此类 microRNA 往往具有组织特异性。

microRNA 基因由 RNA 聚合酶 II 转录，产生原始 microRNA 转录物 (pri-microRNA)，pri-microRNA 在细胞核内经一种称为 Drosha 的 RNA 内切酶 III 加工，得到 microRNA 前体 (pre-microRNA)。该前体被 Exportin-5 蛋白以分解 GTP 能量的方式运输到细胞质中，再经第二种 RNA 内切酶 III Dicer 进一步加工得到约 22 个核苷酸的成熟双链 RNA 分子，其中一条成熟链插入 RNA 诱导沉默复合物 (RISC)，作用于其靶基因的 3' 非翻译区内调控位点，从而影响靶基因的翻译。目前在生物体内已发现 1000 余种 microRNA 分子，这些分子在不同物种之间具有序列保守性，据推测可能有 5000 个以上基因受到 microRNA 调控，这些靶基因参与人类各项生命活动，这说明 microRNA 对人类生命活动的调控是强有力的。因此，研究 microRNA 在人类重大疾病发生中的调控作用，具有重要的理论意义和实际意义。目前 microRNA 研究主要集中于 microRNA 加工成熟机制以及 microRNA 对其靶基因的调控机制。在生物体内，microRNA 主要通过与其靶基因 mRNA 3'

非翻译区相互作用，在转录后水平调控基因表达，进而参与生物体内某些生理及病理过程。并且针对传统基因的研究方法发展迅速，且已较为完善成熟，为基因功能的进一步研究奠定了基础。以此类技术为参考，可以发展针对 microRNA 研究的特殊方法，进而系统阐述 microRNA 的调控功能。microRNA 的研究方法包括新 microRNA 基因的克隆鉴定、特异 microRNA 基因的表达检测及其功能研究等，辅以强有力的工具——生物信息学软件分析，使全面研究 microRNA 的功能成为可能。这为获悉生命活动的真谛以及探求某些疾病发生的机理奠定了坚实的基础。本书将详细探讨 microRNA 研究相关技术的原理、适用条件、优缺点以及具体操作步骤等，以期给读者的实验工作提供帮助。

本书包括四部分，分为 microRNA 基本知识概述、生物信息学研究方法、分子生物学研究方法以及相应方法的实际应用等。在概述部分，主要介绍 microRNA 的发现历程及生物起源，microRNA 的特征及鉴别分析，microRNA 的调控机理与生物功能以及几种常见非编码 RNA 的异同等。在生物信息学研究方法部分，主要介绍了目前 microRNA 研究常用的几种在线生物信息学分析软件，而在分子生物学研究方法部分则介绍了十余种有关 microRNA 克隆、表达分析、表达干预及分子机制研究等方法，并将 microRNA 预测的生物信息学方法、靶基因预测的分子生物学方法与相应的分子生物学方法综合介绍，使之更为系统。最后，编者根据自己的研究经历，通过阐述 microRNA-21 在肝细胞癌发生过程中的功能，系统介绍了 microRNA 相关方法的实际应用。通过上述安排，读者在了解 microRNA 基本概念的同时，可以系统学习 microRNA 的研究方法并将其应用于自己的研究工作中。

microRNA 作为生命科学研究领域内的热点，发展迅速，新概念、新方法、新成果不断涌现。随着时间推移，书中内容必须与时俱进，不断进行修正与更新，以保持其新颖性和实用性。

化学工业出版社的编辑为本书的出版提供了很大的方便和诸多帮助，特此表示感谢！

本书编著者是科研第一线的工作人员，在承担繁重科研任务的情况下，仍抽出时间，认真负责地撰稿，并基本达到预期的要求。囿于编著者水平，书中难免出现不妥甚至错讹之处，希望广大读者不吝指正，以便修订时及时更正。

刘长征 余 佳

2011 年 11 月

《生物实验室系列》图书

- | | |
|------------------------------|-------------|
| ● 细胞生物学实验技术 (第二版) | 2011 年 8 月 |
| ● PCR 最新技术原理、方法及应用 (第二版) | 2011 年 1 月 |
| ● 蛋白质组学实验技术精编 | 2010 年 6 月 |
| ● 蛋白质纯化实验方案与应用 | 2010 年 4 月 |
| ● 发酵工程实验技术 (第二版) | 2009 年 5 月 |
| ● 蛋白质相互作用实验指南 | 2009 年 4 月 |
| ● 蛋白质结构预测实验指南 | 2009 年 3 月 |
| ● 分子生物学实验参考手册 (第 2 卷)【译】 | 2009 年 3 月 |
| ● 酶学实验手册【译】 | 2009 年 2 月 |
| ● 蛋白质组学中的蛋白质纯化手册【译】 | 2009 年 2 月 |
| ● 基因表达分析手册【译】 | 2008 年 10 月 |
| ● 生物遗传标记与应用 | 2008 年 6 月 |
| ● 环境微生物实验技术 | 2008 年 6 月 |
| ● 分子免疫学实验技术指南 | 2008 年 6 月 |
| ● 生物实验室数学【译】 | 2008 年 2 月 |
| ● 分子克隆实验指南精编版【译】 | 2008 年 1 月 |
| ● 分子生物学实验技术 | 2008 年 1 月 |
| ● RNA 分离与鉴定实验指南——RNA 研究方法【译】 | 2007 年 11 月 |
| ● 核酸分子杂交 | 2007 年 7 月 |
| ● 现代实验动物学技术 | 2007 年 1 月 |
| ● 蛋白质与蛋白质组学实验指南【译】 | 2006 年 10 月 |
| ● 生物芯片技术应用详解 | 2006 年 9 月 |
| ● 免疫组织化学实验技术及应用 | 2006 年 6 月 |
| ● 组织工程方法【译】 | 2006 年 6 月 |
| ● 人肿瘤细胞培养【译】 | 2006 年 5 月 |
| ● 生物安全实验室建设 | 2006 年 4 月 |
| ● 植物细胞工程实验技术 | 2006 年 4 月 |
| ● PCR 技术实验指南 (原著第二版)【译】 | 2006 年 3 月 |
| ● 分子生物学与蛋白质化学试验方法【译】 | 2006 年 2 月 |
| ● 植物分子生物技术应用手册 | 2006 年 2 月 |
| ● 小鼠胚胎操作实验手册 (原著第三版)【译】 | 2006 年 1 月 |
| ● 医学微生物学实验技术 | 2006 年 1 月 |

欢迎订阅生物专业图书

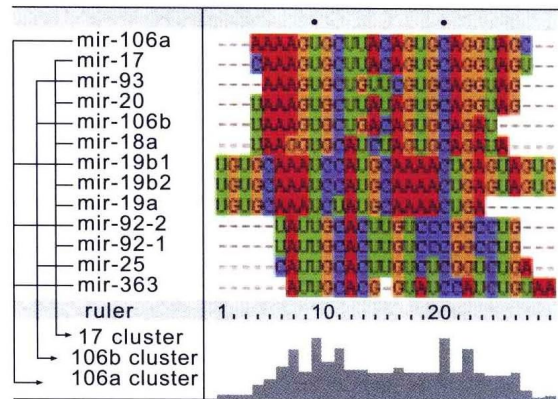
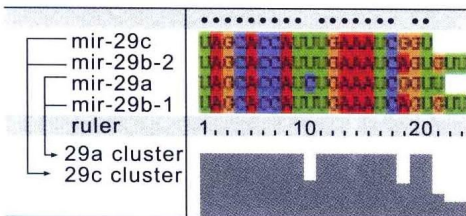
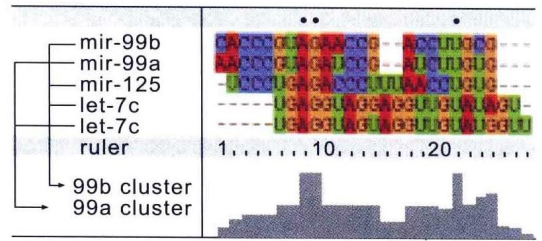
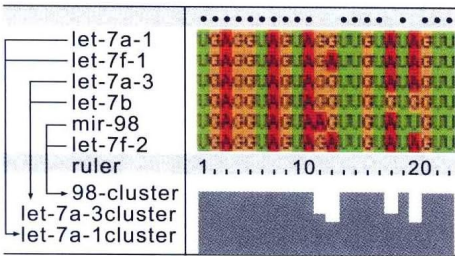
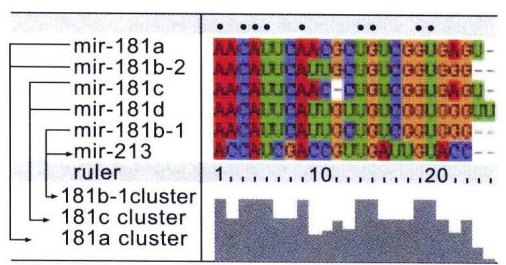
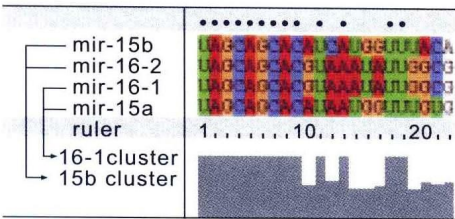
书名	作者	出版时间	单价
现代微生物遗传学(第二版)	陈三凤	2011 年 7 月	39
中国生物产业发展报告 2010	国家发展和改革委员会 高技术产业司	2011 年 5 月	98
生物实验室系列——PCR 最新技术原理、方法 及应用(第二版)	黄留玉	2011 年 1 月	99
生物大分子的 X 射线晶体学	柯衡明	2010 年 1 月	39
双螺旋——发现 DNA 结构的故事	[美]J. D. 沃森	2009 年 9 月	29
蛋白质科学与技术丛书——蛋白质微阵列	[加拿大]M. 谢纳	2008 年 4 月	55
生物实验系列——分子生物学实验参考手册 (第 2 卷)	[美]A. S. 梅利克	2009 年 3 月	32
结构生物信息学	[美]P. E. 波恩	2009 年 3 月	79
质粒生物学	[加]B. E. 芬内尔	2009 年 2 月	149
酶学实验手册	[德]H. 比斯瓦根	2009 年 2 月	45
比较基因组学手册——原理与方法	[意]C. 萨科内	2008 年 7 月	65
英汉微生物学与分子生物学词典	[英]P. 辛格尔顿	2008 年 6 月	120
生物软件选择和使用指南	李军	2008 年 4 月	29.8
转基因之争	沈孝宙	2008 年 3 月	15
生物实验室系列——RNA 分离与鉴定实验 指南	[美]R. E. 法雷尔	2008 年 1 月	63
酶的凝胶电泳检测手册	[俄]G. P. 曼琴科	2008 年 1 月	99
生物实验室系列——分子克隆实验指南(精编 版)	[美]J. 萨姆布鲁克	2008 年 1 月	97
蛋白质科学与技术丛书——蛋白质物理学 概论	[俄]A. V. 芬克尔斯泰因	2008 年 1 月	33

如需以上图书的内容简介、详细目录以及更多的科技图书信息,请登录 www.cip.com.cn。

邮购地址:(100011)北京市东城区青年湖南街 13 号 化学工业出版社。

服务电话:010-64518888, 64518800 (销售中心)。

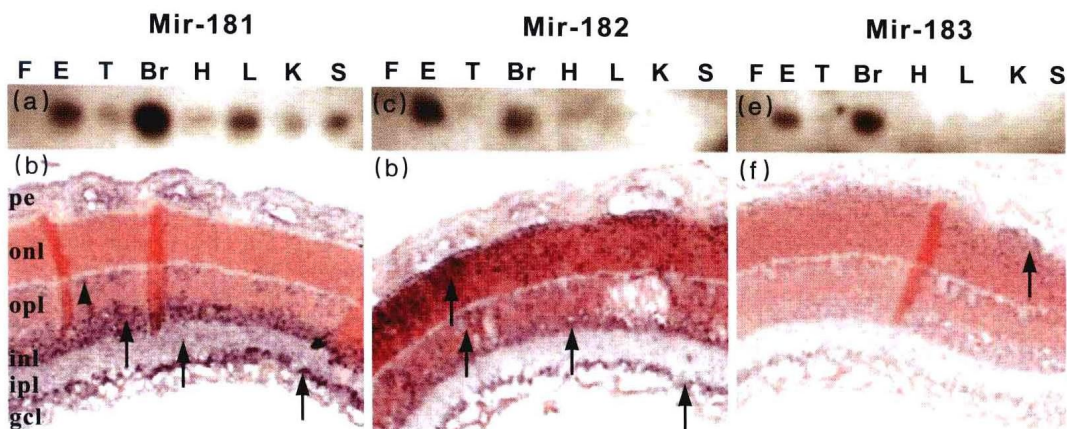
如要出版新著,请与编辑联系。联系电话:010-64519350。E-mail: fszh2008@163.com。



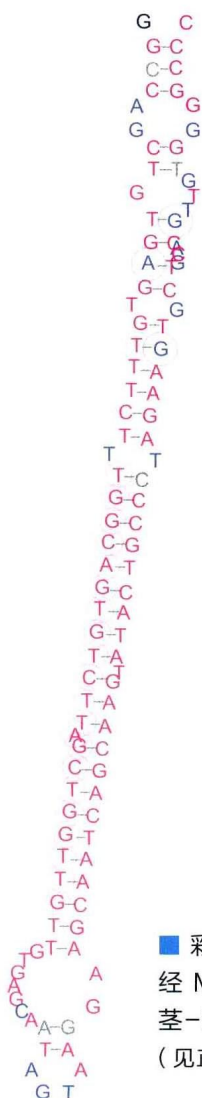
(a)

(b)

■ 彩图 2-16 同源保守的 microRNA 基因簇 (见正文第44页)



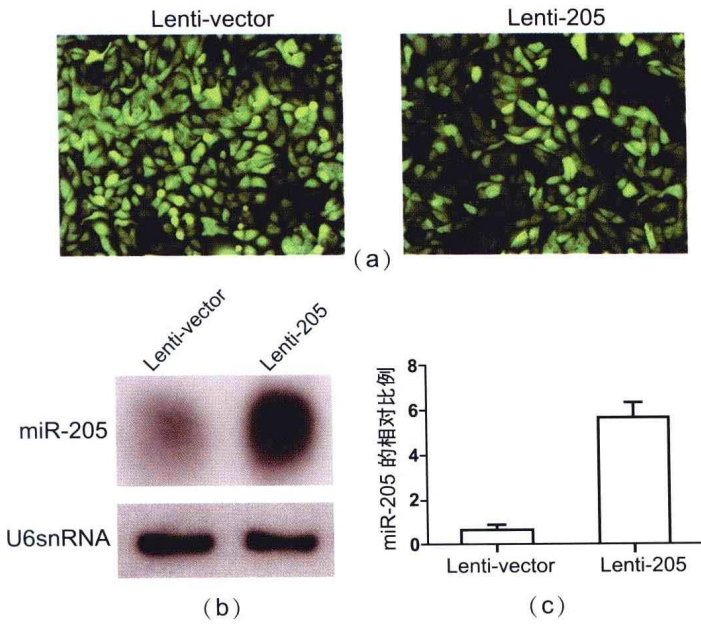
■ 彩图 5-14 小鼠 microRNA-181、microRNA-182、microRNA-183 的多组织及视网膜各层表达检测（见正文第131页）



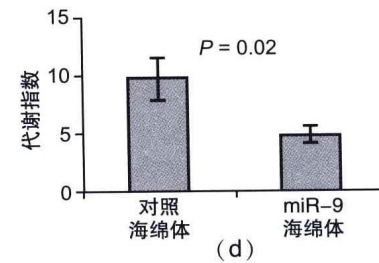
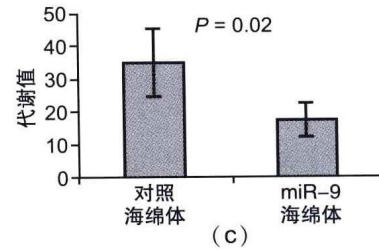
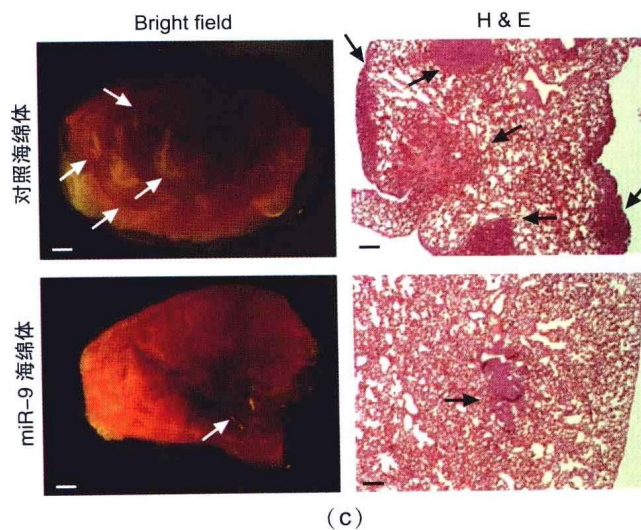
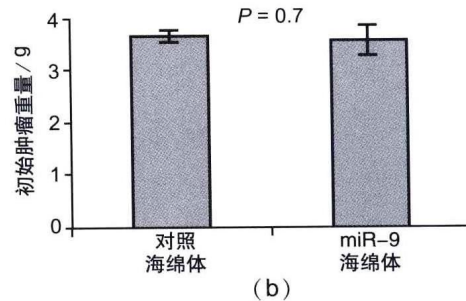
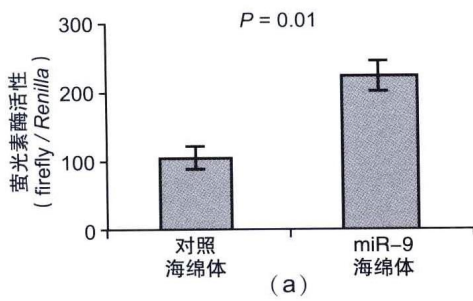
■ 彩图 4-2
经 MiRscan 分析的人 microRNA-34 的
茎-环二级结构
（见正文第85页）



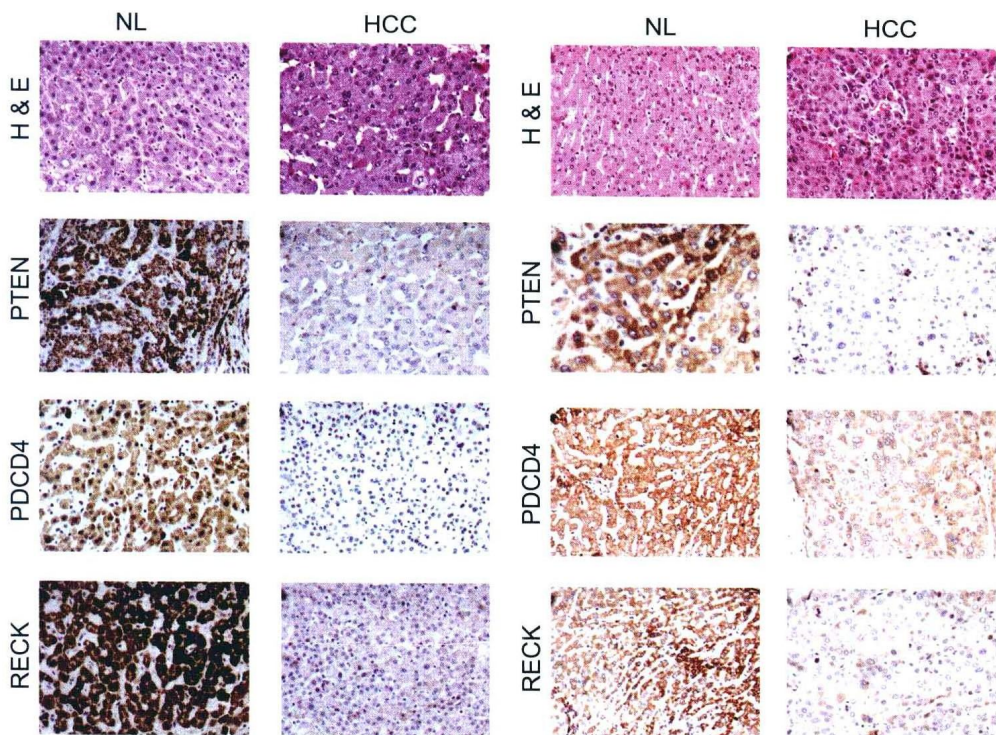
■ 彩图 5-15 microRNA-206 在鸡胚中的原位表达检测
（见正文第131页）



■ 图 6-9
慢病毒 Lenti-205 感染
人皮肤上皮细胞后荧光
照片 (见正文第154页)

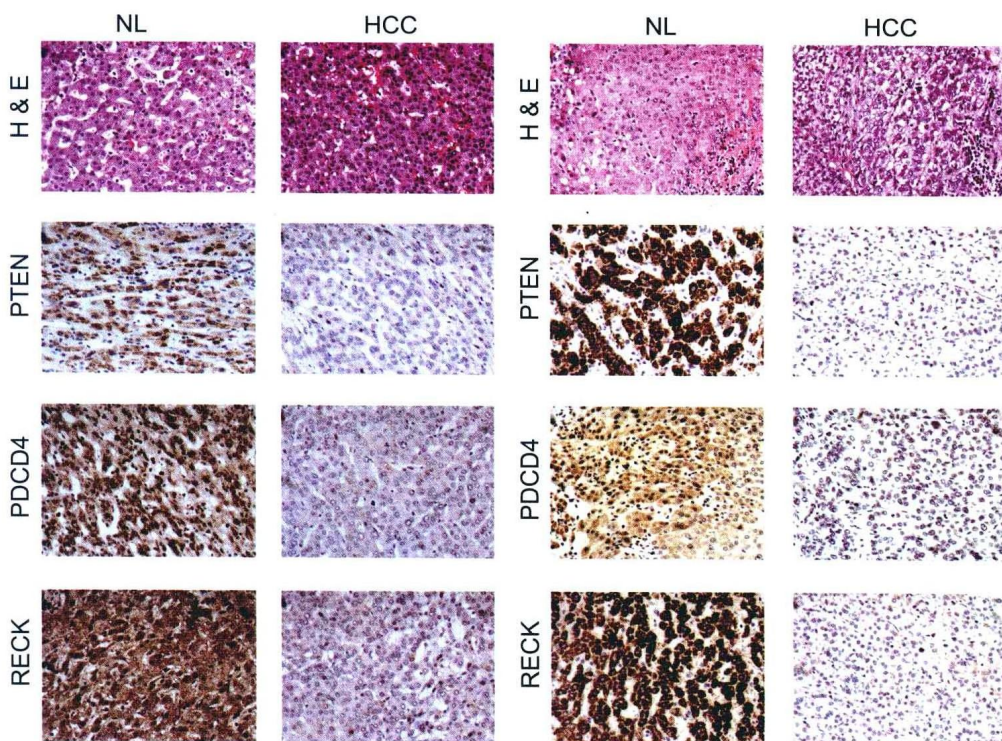


■ 彩图 7-5 microRNA-9 sponge (海绵体) 的应用 (见正文第163页)



1—高分化

2—中分化



3—中分化

4—低分化

■ 彩图 9-11 免疫组化方法分析 PTEN、PDCD4 以及 RECK 在肝癌癌旁及癌组织中的表达 (见正文第222页)

目 录

第一章 概述	1
第一节 microRNA 的发现历程	1
第二节 microRNA 的起源与加工成熟	2
第三节 microRNA 的特征和鉴别	9
第四节 microRNA 的调控机理	11
第五节 microRNA 的功能	14
第六节 microRNA、siRNA、piRNA 及其他非编码 RNA	19
参考文献	25
第二章 microRNA 的生物信息学研究方法	31
第一节 microRNA 的生物信息学分析策略概述	31
第二节 microRNA 序列信息的获取及相关数据库的建立	32
第三节 microRNA 簇的分析策略	41
第四节 microRNA 的种系发育分析	47
第五节 microRNA 基因的转录调控分析	49
参考文献	69
第三章 microRNA 的分子生物学研究方法	71
第一节 microRNA 表达分析方法	71
第二节 microRNA 体外或体内水平的过表达研究	75
第三节 microRNA 表达抑制研究	76
第四节 体外验证 microRNA 作用的靶基因	77
第五节 microRNA 功能研究的策略	78
参考文献	79
第四章 microRNA 新基因的预测、克隆鉴定及注册	84
第一节 microRNA 新基因的预测及注册程序	84
第二节 microRNA 新基因的克隆及鉴定方法	87
参考文献	100
第五章 microRNA 表达分析方法	103
第一节 microRNA 基因芯片分析	103
第二节 microRNA PAGE/Northern Blot 分析	113

第三节	microRNA 的实时定量 PCR 检测	120
第四节	microRNA LNA-ISH 原位杂交	130
参考文献		134
第六章	microRNA 表达的干预方法——过表达	139
第一节	化学合成的 microRNA mimics	139
第二节	真核系统过表达——非病毒载体瞬时表达载体的构建	140
第三节	microRNA 腺病毒过表达系统	142
第四节	microRNA 的慢病毒过表达系统	148
参考文献		155
第七章	microRNA 表达的干预方法——表达抑制	157
第一节	反义核酸分子的抑制策略——化学合成的 microRNA 抑制剂	157
第二节	基因水平的抑制策略	161
第三节	基于病毒表达系统的 microRNA 抑制策略	162
参考文献		167
第八章	靶基因预测分析及萤光素酶双报告基因系统验证	170
第一节	生物信息学预测——microRNA 靶基因分析软件的设计及使用	170
第二节	萤光素酶双报告基因系统的应用	184
参考文献		194
第九章	microRNA 研究方法在肝细胞癌研究中的应用	197
第一节	microRNA-21 在肝细胞癌中的功能研究简介	197
第二节	microRNA-21 在肝细胞癌中的功能研究所用实验材料与方法	198
第三节	<i>miR-21</i> 在肝细胞癌发生过程中的表达分析及功能研究	211
第四节	<i>miR-21</i> 在肝细胞癌发生及发展过程中的作用机制研究	216
第五节	<i>miR-21</i> 通过调控不同的靶基因在肝细胞癌发生过程中所发挥的功能研究	223
第六节	<i>miR-21</i> 对重要信号通路及功能基因的影响	229
第七节	microRNA 在肿瘤研究中的分析与展望	231
参考文献		234

第一章 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^[1,2]。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 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^[5,23,25]。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 (non-coding RNA) 家族新成员之一的 microRNA 是一类长度约为 21~23 个核苷酸的调控性小 RNA 分子, 它可以通过 mRNA 剪切和抑制蛋白质翻译的方式负调控靶基因^[10,11]。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万计的 microRNA 分子。进一步的研究表明, microRNA 可以调节约 50% 的蛋白编码基因, 并且 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在内的多种生理过程, 以及包括白血病、肺癌、结肠癌、糖尿病和病毒感染等在内的多种病理过程^[16,18,21,22,38,83,90,96,99]。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 知识作一详细介绍。

第一节 microRNA 的发现历程

最早被发现的 microRNA 家族成员 *lin-4*, 由 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^[1,54]。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* 这两个基因被鉴定之前, 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基因座归于同一调控途径^[62,70]。因此, Ambros 等推测两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