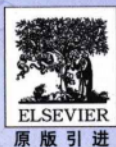
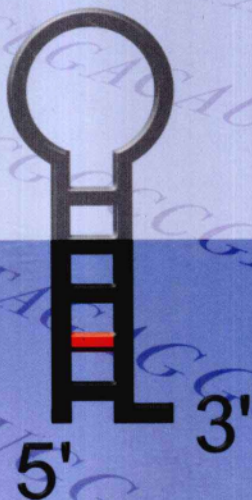




# MicroRNA Methods

# MicroRNA研究方法

John J. Rossi, Gregory J. Hannon



科学出版社  
www.sciencep.com

本书的目录、摘要和图表注释均已译成中文，正文部分保留英文原版。另附中山大学生命科学院屈良铨教授为本书所作的中文导读一篇。

# MicroRNA Methods

# MicroRNA研究方法

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，本书是最新的关于microRNA研究的方法学专著。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&贝克曼研究所和美国冷泉港实验室，他们都是RNA干扰领域的知名专家。参与编写的34位作者分别来自不同国家的13个研究小组，在microRNA研究的各个领域取得过突破性成果。

## 本书目录

### 第一部分 MicroRNA及其靶标的鉴定

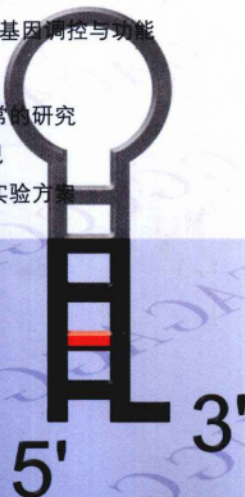
1. 病毒microRNA的鉴定
2. 应用鲁棒性机器学习算法预测microRNA基因及其靶标
3. 病毒编码microRNA的鉴定
4. MicroRNA靶标预测的计算机方法

### 第二部分 MicroRNA的表达、成熟与功能分析

5. Dorsha复合体活性的体外和体内检测
6. MicroRNA基因表达的基因芯片分析
7. 哺乳动物细胞microRNA的克隆与表达检测
8. 体外与体内研究microRNA和小干扰RNA甲基化的方法
9. 发育过程中小RNA表达谱的分析
10. T细胞发育过程中microRNA介导的基因调控与功能

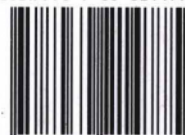
### 第三部分 MicroRNA与疾病

11. 白血病与淋巴瘤microRNA表达异常的研究
12. 植物中受病原调控的小RNA的发现
13. 病毒microRNA表达与功能分析的实验方案



电话: 010-64006871  
网址: [www.kbooks.cn](http://www.kbooks.cn)

ISBN 978-7-03-021477-5



9 787030 214775 >

销售分类建议: 生物学/生物化学, 分子生物学  
本版本只限于在中华人民共和国境内销售

定价: 88.00 元

# 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*

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——抵抗寄主细胞免疫杀伤。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。Crocce 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,

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。

屈良鹤

中山大学生命科学学院

二零零八年一月

## CONTRIBUTORS

### **George Adrian Calin**

Department of Molecular Virology, Immunology and Medical Genetics and Comprehensive Cancer Center, The Ohio State University, Columbus, Ohio

### **Chang-Zheng Chen**

Department of Microbiology and Immunology, Baxter Laboratory of Genetic Pharmacology, Stanford University School of Medicine, Stanford, California

### **Xuemei Chen**

Department of Botany and Plant Sciences and Institute of Integrative Genome Biology, University of California—Riverside, Riverside, California

### **Carlo Maria Croce**

Department of Molecular Virology, Immunology and Medical Genetics and Comprehensive Cancer Center, The Ohio State University, Columbus, Ohio

### **Bryan R. Cullen**

Center for Virology and Department of Molecular Genetics and Microbiology, Duke University Medical Center, Durham, North Carolina

### **Eva Gottwein**

Center for Virology and Department of Molecular Genetics and Microbiology, Duke University Medical Center, Durham, North Carolina

### **Adam Grundhoff**

Heinrich-Pette-Institute for Experimental Virology and Immunology, Hamburg, Germany

### **Scott M. Hammond**

Department of Cell and Developmental Biology, University of North Carolina, Chapel Hill, North Carolina

### **Hiroshi Imai**

Laboratory of Reproductive Biology, Department of Agriculture, Kyoto University, Kyoto, Japan

### **Hailing Jin**

Department of Plant Pathology, Center for Plant Cell Biology and Institute for Integrative Genome Biology, University of California—Riverside, Riverside, California

### **Akio Kanai**

Institute for Advanced Biosciences, Keio University, Tsuruoka, and Systems Biology Program, Graduate School of Media and Governance, and Faculty of Environment and Information Studies, Keio University, Fujisawa, Japan

**Surekha Katiyar-Agarwal**

Department of Plant Pathology, Center for Plant Cell Biology and Institute for Integrative Genome Biology, University of California—Riverside, Riverside, California

**V. Narry Kim**

School of Biological Sciences, Seoul National University, Seoul, Korea

**Saulius Klimašauskas**

Laboratory of Biological DNA Modification, Institute of Biotechnology, Vilnius, Lithuania

**Yoon-tae Lee**

School of Biological Sciences, Seoul National University, Seoul, Korea

**Haitang Li**

Division of Molecular Biology, Beckman Research Institute of the City of Hope, Duarte, California

**Tin Ky Mao**

Department of Microbiology and Immunology, Baxter Laboratory of Genetic Pharmacology, Stanford University School of Medicine, Stanford, California

**Naojiro Minami**

Laboratory of Reproductive Biology, Department of Agriculture, Kyoto University, Kyoto, Japan

**Joel S. Parker**

Constella Group, Durham, North California

**Sébastien Pfeffer**

Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, CNRS, Strasbourg cedex, France

**John J. Rossi**

Graduate School of Biological Sciences, and Division of Molecular Biology, Beckman Research Institute of the City of Hope, Duarte, California

**Pål Sætrom**

Interagon AS, Laboratorienesenteret, and Department of Computer and Information Science, Norwegian University of Science and Technology, Trondheim, Norway, and Division of Molecular Biology, Beckman Research Institute of the City of Hope, Duarte, California

**Hiroyuki Sasaki**

Division of Human Genetics, Department of Integrated Genetics, National Institute of Genetics, Research Organization of Information and Systems, and Department of Genetics, School of Life Science, The Graduate University for Advanced Studies (SOKENDAI), Mishima, Japan

**Ola Snøve, Jr.**

Interagon AS, Laboratorienesenteret, and Department of Cancer Research and Molecular Medicine, Norwegian University of Science and Technology, Trondheim,

Norway, and Division of Molecular Biology, Beckman Research Institute of the City of Hope, Duarte, California

**Christopher S. Sullivan**

Department of Molecular Genetics and Microbiology, University of Texas at Austin, Austin, Texas

**Guihua Sun**

Graduate School of Biological Sciences, and Division of Molecular Biology, Beckman Research Institute of the City of Hope, Duarte, California

**J. Michael Thomson**

Department of Cell and Developmental Biology, University of North Carolina, Chapel Hill, North Carolina

**Masaru Tomita**

Institute for Advanced Biosciences, Keio University, Tsuruoka, and Systems Biology Program, Graduate School of Media and Governance, and Faculty of Environment and Information Studies, Keio University, Fujisawa, Japan

**Yasushi Totoki**

Genome Annotation and Comparative Analysis Team, Computational and Experimental Systems Biology Group, RIKEN Genomic Sciences Center, Tsurumi-ku, Yokohama, Kanagawa, Japan

**Giedrius Vilkaitis**

Laboratory of Biological DNA Modification, Institute of Biotechnology, Vilnius, Lithuania

**Toshiaki Watanabe**

Division of Human Genetics, Department of Integrated Genetics, National Institute of Genetics, Research Organization of Information and Systems, and Department of Genetics, School of Life Science, The Graduate University for Advanced Studies (SOKENDAI), Mishima, Japan

**Yuka Watanabe**

Institute for Advanced Biosciences, Keio University, Tsuruoka, and Systems Biology Program, Graduate School of Media and Governance, Keio University, Fujisawa, Japan

**Zhiyong Yang**

Department of Botany and Plant Sciences and Institute of Integrative Genome Biology, University of California—Riverside, Riverside, California

**Bin Yu**

Department of Botany and Plant Sciences and Institute of Integrative Genome Biology, University of California—Riverside, Riverside, California

# 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 |
|--------------------------|---|

Chirstopher 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 .....                 | 65 |
| 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 microRNA 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。

|                                           |            |
|-------------------------------------------|------------|
| <b>7. 哺乳动物细胞 microRNA 的克隆与表达检测 .....</b>  | <b>123</b> |
| 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,<br>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 [ <sup>14</sup> 碳]-甲基基团进行甲基转移酶分析 .....                                 | 144 |
| 3.2 通过监测掺入的 [ <sup>3</sup> 氢]-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。

|                                                                                         |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| <b>9. 发育过程中小 RNA 表达谱的分析</b> .....                                                       | 155 |
| Toshiaki Watanabe, Yasushi Totoki, Hiroyuki Sasaki, Naojiro Minami,<br>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。

|                                                |     |
|------------------------------------------------|-----|
| <b>10. T 细胞发育过程中 microRNA 介导的基因调控与功能</b> ..... | 171 |
| 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 |