

artificial Non-coding RNA:

STTM (~100 nt)

(STTM binding & destroying
miRNAs but not get cleaved)

Sequestering

miR165/166

microRNA

及其介导的
基因表达调控

贾小云 著

STTM165/166



miR165/166



HD-ZIP III

Auxin
biosynthesis

Abiotic
stress

adaxial, Xylem

KANADI

abaxial, phloem

ARF3/ARF4

tasiRNA

AS1/AS2

microRNA及其 介导的基因表达调控

贾小云 著



中国农业出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

microRNA及其介导的基因表达调控 / 贾小云著. —
北京 : 中国农业出版社, 2014.12
ISBN 978-7-109-20482-9

I. ①m… II. ①贾… III. ①核糖核酸—研究 IV.
①Q522

中国版本图书馆CIP数据核字 (2014) 第273301号

中国农业出版社出版
(北京市朝阳区麦子店街18号楼)
(邮政编码100125)
责任编辑 神翠翠 邱利伟

北京京华虎彩印刷有限公司印刷 新华书店北京发行所发行
2014年12月第1版 2014年12月北京第1次印刷

开本: 720mm × 960mm 1/16 印张: 14.25

字数: 240千字

定价: 45.00元

(凡本版图书出现印刷、装订错误, 请向出版社发行部调换)

前 言

2000年, RNA的研究进展被美国《科学》杂志评为重大科技突破; 2001年“RNA干扰”作为当年最重要的科学研究成果之一, 再次入选“十大科技突破”; 2002年,《科学》杂志将“Small RNA和RNAi”评为2002年度最耀眼的明星。聚光灯下的RNA已经逐步摆脱了DNA光芒的掩盖, 从“配角”变成“主角”, 并且对DNA的中心地位提出了新的挑战。随着RNAi技术在生命领域的应用, RNAi的主要作用物siRNA对研究人员来说已经非常熟悉。而同属于小分子RNA的microRNA (简称miRNA) 与RNAi和siRNA在加工机制和调控方式上有着较高的相似性, 但同时又有着多方面的差异。miRNA是近几年在真核生物中发现的一类具有调控功能的非编码RNA, 主要参与基因转录后水平的调控, 其相关的研究已成为近期生命科学研究的一大热点。

miRNA基因在细胞核内由RNA聚合酶 II 转录成初级转录本 (pri-miRNA), pri-miRNA经过两次剪切加工形成成熟的miRNA: miRNA*双链复合体。接着, miRNA: miRNA*双链复合体在解旋酶的作用下解旋为成熟的miRNA单链并与介导miRNA活性的RNA诱导的沉默复合物RISC结合, 通过碱基互补配对对靶基因mRNA进行切割或抑制其翻译来行使功能。截至2014年6月, 最新的Sanger miRBase数据库已公布223个物种28 645条成熟的miRNA。许多研究已表明, miRNA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。

笔者近年来对miRNA及其介导的基因表达调控进行了较为系统的研究, 并对多年的研究成果进行整理、筛选后撰写成书。本书由两大部分组成。第一大部分作者结合自己的研究经历并引用众多miRNA研究的经典文献和最新文献详细而精要地介绍了miRNA的生物发生、加工调控机制、特征和命名、研究进展、miRNA及其靶基因的鉴定和分析方法、miRNA生物学功能的分析方法等。在miRNA及其靶基因的生物信息学鉴定部分, 通过图文并茂的方式介绍了十余种常用的生物信息学软件的使

用。在miRNA表达分析、miRNA靶基因的生物学方法鉴定及miRNA生物学功能的分子生物学鉴定部分,对每种方法均先概述了原理,然后提供了详细的实验指导,列出了所需的仪器设备和试剂,提供了实验步骤,并对实验中的疑难问题和如何避免失误进行了提示。第二大部分主要根据自己的研究经历,通过阐述miRNA在植物生长发育、逆境胁迫和次生代谢中的功能,系统介绍了miRNA及其候选靶基因的生物信息学预测和验证、miRNA表达分析与miRNA过表达和减低表达方法的综合应用。希望通过本书的介绍,使读者不仅可以系统了解和学习一些miRNA的基本知识和研究方法,而且可以将它们应用于自己的研究工作中。

miRNA的发现是RNA研究领域的一个里程碑式突破。在研究人员的不懈努力之下,近年来miRNA的基础研究及应用研究也取得了一些成果。然而,随着研究的深入,miRNA这个宝藏还有很多璀璨的宝物有待更多的研究工作者来挖掘。全部miRNA基因功能的揭示可能将会给人们生命现象的理解带来一场新的革命。随着时间推移,书中内容也需要与时俱进,不断进行修正与更新,以保持其新颖性和实用性。

本书所涉及的研究内容是在国家自然科学基金(31101555)、教育部高等学校博士点基金(20111403120)、中国博士后科学基金特别资助项目(2012T50246)、中国博士后科学基金普通资助项目(20100481306)、山西省人才引进与开发专项、山西省基础研究计划(2011021032-2)、山西省回国留学人员科研资助(2011051)等项目的资助下完成的,在此表示特别感谢!本书中的部分研究成果是在美国肯塔基大学唐贵良老师实验室完成的,在此特别感谢!

中国农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。

贾小云

2014年8月

目 录

前 言

第一章	microRNA概述	1
第一节	microRNA的生物起源和生物合成	2
1	microRNA的生物起源	2
2	microRNA的生物合成	2
第二节	microRNA的特征和命名	5
1	microRNA的特征	5
2	microRNA的命名	6
第三节	microRNA的调控机制	7
第四节	microRNA的功能	8
1	miRNA在动物生长发育等方面的功能	9
2	miRNA在植物生长发育等方面的功能	10
第二章	microRNA的鉴定和表达分析策略	15
第一节	microRNA的鉴定	16
1	正向遗传学筛选法	16
2	直接克隆法	16
3	生物信息学预测法	17
4	高通量测序法	19
第二节	microRNA的表达分析策略	21
1	microRNA的芯片分析	21
2	microRNA的PAGE/Northern Blot分析	33
3	microRNA的实时定量RT-PCR检测	35
第三章	microRNA靶基因的分析策略	39
第一节	microRNA候选靶基因的寻找	40
1	microRNA候选靶基因的生物信息学预测	40
2	寻找microRNA候选靶基因的生物实验方法	52
第二节	microRNA候选靶基因的生物鉴定	54
1	荧光定量PCR及Western blot法	54
2	双荧光素酶报告基因法	55

3	RLM-5' RACE法	55
4	降解组测序法	57
第四章	microRNA的生物功能分析策略	59
第一节	microRNA过量表达	60
1	化学合成microRNA模拟物 (microRNA mimics)	60
2	构建microRNA过量表达载体	61
第二节	microRNA减低表达	63
1	化学合成microRNA 抑制剂 (microRNA inhibitor)	63
2	靶基因模拟技术 (target mimicry, TM)	63
第三节	人工miRNA (artificial microRNA, amiRNA)	69
第五章	microRNA165/166在植物中的功能研究	71
第一节	植物microRNA165/166研究进展	72
第二节	microRNA165/166在植物中的功能研究所用到的材料与方法	75
1	植物材料和生长条件	75
2	STTM165/166载体的构建及拟南芥和番茄的转化	75
3	RNA提取、Northern blot和实时定量PCR分析	77
4	组织学	79
5	液质联用半定量法测定IAA含量	80
6	花青素含量的测定	80
第三节	STTM165/166过表达植株中miR-165/166及其靶基因的表达分析	80
第四节	STTM165/166转基因拟南芥和番茄的表型特征	82
1	STTM165/166转基因拟南芥幼苗的表型特征	82
2	STTM165/166转基因拟南芥主茎、侧枝、花和果荚表型	82
3	过表达STTM165/166对拟南芥叶片极性和茎维管组织结构的影响	84
4	STTM165/166转基因番茄的表型变化	86
第五节	STTM165/166对生长素生物合成和信号的调控	87
第六节	STTM165/166对植物抗盐能力的影响	91
第七节	STTM165/166对拟南芥花青素生物合成的影响	94
第八节	miR-165/166介导的调控网络	94
第六章	microRNA828调控番茄花青素生物合成的功能研究	97
第一节	植物microRNA828研究进展	98
第二节	microRNA828在番茄中的功能研究所用材料与方法	100
1	材料	100
2	番茄植株缺磷胁迫处理方法及培育	100
3	DNA和RNA的提取	100
4	miR-828靶基因的预测和RLM-5' RACE实验验证	101

5	At-pri-miR-828原始转录本序列的获得及引物设计与PCR扩增	101
6	PCR产物的纯化与测序	102
7	克隆载体pOT2-At-pri-miR-828和植物表达载体pC2300-pOT2-At-pri-miR-828的构建	102
8	农杆菌介导的叶盘法转化番茄	102
9	转基因番茄植株的PCR鉴定	102
10	实时荧光定量qRT-PCR分析	103
11	花青素含量的测定	103
第三节	miR-828基因的克隆、表达及其对番茄的遗传转化	104
1	拟南芥At-pri-miR-828基因的克隆	105
2	番茄Sly-pri-miR-828基因的克隆	105
3	番茄Sly-miR-828的组织特异性表达	105
4	番茄miR-828靶基因的预测及RLM-5' RACE体外分子剪切鉴定	105
5	miR-828过表达克隆载体、表达载体的构建与鉴定	107
6	农杆菌介导pC2300-pOT2-pri-miR-828对番茄的遗传转化	108
7	转基因番茄植株的PCR鉴定	108
8	转基因番茄植株相关基因表达的实时荧光定量PCR分析	109
9	转基因番茄植株的表型鉴定及花青素测定	110
第四节	缺磷胁迫下miR-828过表达对番茄花青素生物合成的影响	111
1	miR-828对缺磷胁迫的响应	111
2	缺磷胁迫下野生型番茄幼苗的表型特征	112
3	正常MS生长条件下野生型和miR-828过表达转基因番茄的表型特征	112
4	缺磷胁迫下野生型和miR-828过表达转基因番茄植株的表型特征	112
5	缺磷胁迫下野生型和miR-828过表达转基因番茄中miR-828及其靶基因的表达分析	113
6	缺磷胁迫下野生型和miR-828过表达转基因番茄植株中花青素合成相关酶基因的表达分析	114
7	缺磷胁迫下野生型和miR-828过表达转基因番茄植株中的花青素含量	114
第七章	microRNA858调控的花青素生物合成	117
第一节	植物microRNA858研究进展	118
第二节	microRNA858在番茄中的功能研究所用材料与方法	119
1	植物材料和生长条件	119
2	pC2300-pOT2-STTM858植物表达载体的构建	119
3	RNA提取、cDNA合成及实时定量PCR分析	119
4	miR-858靶基因的预测和RLM-5' RACE实验验证	122
5	农杆菌介导的叶盘法转化番茄	122
6	转基因番茄植株的PCR鉴定	122
7	花青素含量的测定	122

第三节	miR-858在番茄花青素生物合成中的调控作用	122
1	番茄Sly-miR-858的克隆	122
2	番茄Sly-miR-858的保守性和序列分析	123
3	番茄Sly-miR-858靶基因的预测及RLM-5' RACE体外分子剪切鉴定	123
4	Sly-miR-858靶基因Sly-myb-like氨基酸的多重序列比对和进化树分析	126
5	Sly-miR-858及其靶基因Sly-myb-like在番茄不同组织中的表达	127
6	Sly-miR-858减低表达载体STTM858的构建与番茄的遗传转化	127
7	转基因番茄植株STTM858、内源miR-858及其靶基因的实时荧光定量 PCR分析	127
8	STTM858转基因番茄植株的表型分析及花青素含量测定	129
9	STTM858过表达转基因番茄植株花青素合成相关酶基因的实时荧光定量 PCR分析	129
第八章	小麦干旱胁迫诱导基因TaCRT的功能及其对microRNA的表达调控	133
第一节	钙网蛋白CRT研究进展	134
第二节	小麦钙网蛋白TaCRT的功能研究所用材料与方法	135
1	植物材料和干旱胁迫实验	136
2	TaCRT基因全长cDNA的克隆	136
3	TaCRT的亚细胞定位	137
4	Southern杂交印迹分析	138
5	Northern杂交印迹分析	138
6	半定量PCR	138
7	pCAPE2-TaCRT表达载体的构建及烟草的转化	139
8	Western Blotting蛋白印迹分析	140
9	TaCRT转基因烟草植株的抗旱性鉴定	140
10	TaCRT转基因烟草植株的microRNA芯片表达谱	141
第三节	TaCRT在干旱胁迫中的功能及其对microRNA的表达调控	141
1	TaCRT的克隆	141
2	TaCRT cDNA序列的结构特征分析	141
3	TaCRT的Southern杂交分析	142
4	TaCRT蛋白的亚细胞定位	143
5	PEG诱导的干旱胁迫下小麦TaCRT基因的表达模式	146
6	TaCRT转基因烟草植株的鉴定	148
7	转基因烟草的抗旱性分析	151
8	小麦干旱胁迫诱导基因TaCRT介导的microRNA表达调控	154
第九章	植物逆境胁迫响应microRNA的研究	157
第一节	植物逆境胁迫响应microRNA研究进展	158
1	miRNA与低氮胁迫	158
2	miRNA与低硫胁迫	158

3	miRNA与低磷胁迫	159
4	miRNA与铜胁迫	160
5	miRNA与重金属胁迫	160
6	miRNA与高盐胁迫	160
7	miRNA与低温胁迫	161
8	miRNA与干旱胁迫	161
9	miRNA与植物病虫害胁迫	162
10	miRNA与氧化胁迫	163
11	miRNA与机械胁迫	163
12	miRNA与UV-B辐射胁迫	164
第二节	植物逆境胁迫响应microRNA研究所用材料与方法	165
1	植物材料和胁迫条件	165
2	植物miRNA芯片的设计、PAGE/Northern Blot、实时荧光定量qRT-PCR分析	165
3	miRNA基因启动子区的顺式作用元件分析	165
第三节	miR-398在NaCl和ABA胁迫下木本植物杨树和草本植物拟南芥中的 差异表达分析	166
1	木本植物杨树在NaCl和ABA胁迫下的microRNAs表达谱分析	166
2	ABA和NaCl胁迫处理动态调控杨树miR-398及其靶基因的表达	169
3	杨树和拟南芥中miR-398及其靶基因对ABA和NaCl胁迫的响应不同	172
第四节	UV-B胁迫下木本植物杨树的microRNAs表达谱分析	174
1	杨树UV-B胁迫响应microRNAs表达谱分析	174
2	UV-B胁迫响应miRNA的PAGE/Northern验证	178
3	UV-B胁迫响应miRNA靶基因的功能分析	179
4	UV-B胁迫响应miRNA靶基因的qRT-PCR分析	180
5	UV-B胁迫响应miRNA基因的启动子元件分析	182
6	UV-B胁迫响应miRNA介导的基因表达调控网络	184
参考文献		187
发表与本专著相关的论文		217

microRNA

第一章

microRNA概述

MicroRNAs (miRNAs) 是一类长约22个核苷酸的内源性单链RNA分子, 其本身并不具有开放阅读框 (Open Reading Frame, ORF), 不编码蛋白质, 但它们在进化上具有保守性, 在生命活动中起着重要的调控作用。研究发现miRNA是生物体内一类重要的小分子RNA, 广泛存在于动物、植物以及微生物等生物体基因组中, 具有调控生物体新陈代谢、生长发育、疾病发生、细胞程序性死亡等多方面的功能。本章将对miRNA的生物起源、命名方法、加工过程、基本特征、调控机制及其在动植物中的功能等内容做一个系统的介绍。

第一节 microRNA的生物起源和生物合成

1 microRNA的生物起源

1993年, Lee等首次在秀丽新小杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 中发现了非编码RNA *lin-4*, 长22nt, 在控制线虫细胞发育时序性中起着重要的作用 (Lee et al., 1993)。但是, 在此之后的7年中, 该现象一直未引起人们的重视。直至2000年, Reinhart等在果蝇中发现了第2个miRNA, *let-7*, 它与*lin-4*有着类似的调控线虫发育的作用 (Reinhart et al., 2000)。自此, miRNA备受关注, 随后几年相关学术文献呈爆炸式增长。植物miRNA的研究始于拟南芥。2002年, Reinhart和Llave等四个研究小组分别从模式植物拟南芥中发现了miRNAs, 这是最早在植物中发现的miRNA (Reinhart et al., 2002; Llave et al., 2002; Park et al., 2002; Mette et al., 2002)。随着技术的发展, 在许多生物中都发现该类小RNA, 截至2014年6月, miRBase数据库 (<http://www.mirbase.org/>) 公布的miRNAs已有28645个。miRNA的发现补充了在RNA水平对靶mRNA分子更迅速和有效的调节方式, 丰富了人们对蛋白质合成调控的认识, 展现了细胞内基因表达调控全方位、多层次的网络系统。miRNA的发现也是对中心法则中RNA次要的中介角色的重要补充, 它将促使生物学家重新思考细胞遗传调控及其发育等方面的重要问题。

2 microRNA的生物合成

miRNA分子的生物合成和作用比较复杂, 主要分为三个步骤: miRNA前体的转录, miRNA前体的转录后加工, miRNA的输出。

2.1 动物microRNA的生物合成

miRNA前体的转录：miRNA基因首先在细胞核内由RNA聚合酶Ⅱ（PolⅡ）转录成初级转录本（primary miRNAs, pri-miRNA）（Lee et al., 2004）。一些miRNA的初级转录本具有5'帽子和3' poly(A)的结构。RNA聚合酶Ⅱ能与miRNA的启动子免疫共沉淀，其抑制剂能够抑制pri-miRNA的积累。另外，RNA聚合酶Ⅲ也可以参与miRNA基因的转录。

miRNA前体的转录后加工：目前对pri-miRNA转录后加工的研究十分有限，只知道pri-miRNA在核内被包含核糖核酸内切酶Ⅲ（RNaseⅢ）Drosha的多蛋白质复合体剪切产生大小约70nt并能形成茎环结构的单miRNA的前体结构，即pre-miRNA（Lee et al., 2003）。在这一复合体中，还存在一种双链RNA结合蛋白Pasha（partner of Drosha），其含有双链RNA结合区域。在果蝇细胞和线虫中抑制Pasha的表达，干扰pri-miRNA的剪切，可使细胞内pri-miRNA的积累增多，成熟miRNA的量减少。Pasha在复合体中的具体功能还不清楚，但是它可能参与识别miRNA的初级转录产物，并将它们集中到复合体中，有利于其被Drosha切割。另外，Pasha可能对pri-miRNA在复合体中的定位有帮助，从而有利于Drosha在特定位点的切割。

miRNA的输出：pre-miRNA转运出核是通过三磷酸鸟苷酸酶依赖的核浆转运蛋白5（RanGTP/Exportin5）来完成的（Yi et al., 2003）。具体机制是：在细胞核中，RanGTP的浓度较高，Exportin5（Exp5）就可以促进pre-miRNA从Drosha复合体中释放，并且与之结合，将其带到核外。由于胞质中RanGTP的浓度较低，Exp5则可释放出pre-miRNA。另外，能与Exp5结合的pre-miRNA必须具有大于16nt配对的茎和3'末端有2个悬垂碱基的结构特点，末端如果是5'悬垂碱基将会抑制Exp5对它的转运。pre-miRNA从细胞核过程转运至细胞质中后仍需要进行进一步的加工。首先，pre-miRNA被RNA酶Ⅲ Dicer切割成18~25个核苷酸的不完全配对的miRNA:miRNA*双链（Lee et al., 2002）。具体过程为：Dicer首先识别pre-miRNA的双链部分，Dicer与茎环基部结构中磷酸化的5'端和有突出的3'端有很高的亲和力。然后，茎环基部的两圈螺旋解开，Dicer对两条链都进行切割，将前体中多余部分切掉，生成5'端磷酸化、3'端有2nt悬垂的双链。接着，双链的miRNA分子在解旋酶的作用下解旋为

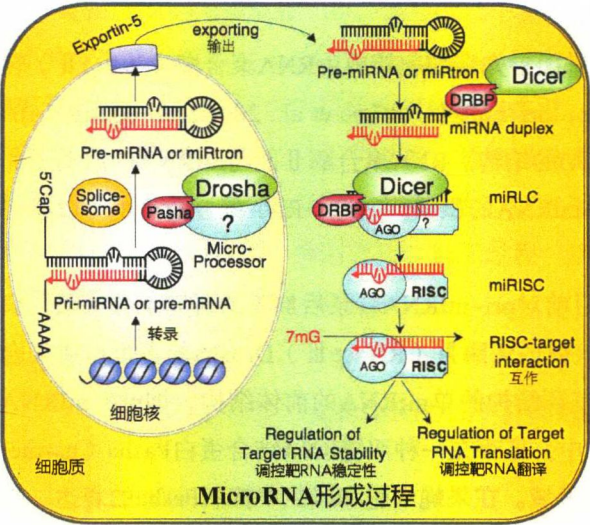


图1-1 动物miRNA的生物合成过程 (Tang et al., 2008)
Fig.1-1 the biogenesis of animal miRNA (Tang et al., 2008)

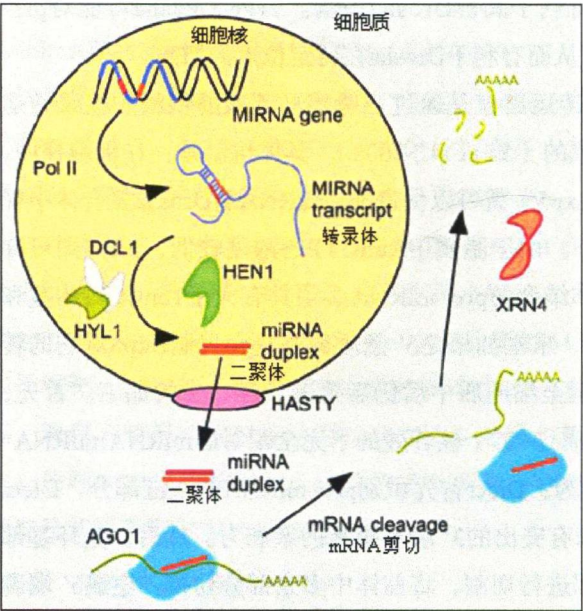


图1-2 植物miRNA的生物合成过程 (Kidner et al., 2005)
Fig.1-2 the biogenesis of plant miRNA (Kidner et al., 2005)

成熟的miRNA单链并与介导miRNA活性的RNA诱导的沉默复合物RISC (RNA-induced silencing complex) 结合, 通过切割或抑制靶RNA翻译来进行功能 (Khvorova et al., 2003; Schwarz et al., 2003) (图1-1)。

在上述过程中, Dicer酶的识别和加工过程需要ATP供能。另外, 就现有的动物miRNA成熟的模型来看, 最初由Drosha介导的切割特异性决定了miRNA前体中Dicer的切割位点, 从而决定了成熟miRNA的两端。

2.2 植物microRNA的生物合成

在植物体内microRNA多由非编码核基因转录而来, 其基因多定位于基因之间的间隔区, 也有一些处于已知基因的内含子区域, 而且有些成簇存在。在植物中, miRNA分子的生物合成和动物类似但也有些不同 (图1-2)。

miRNA前体的转录: 编码miRNA的基因在细胞核中, 首先在RNA Pol II的作用下转录形

成较长的初级转录本miRNA, 即pri-miRNA。植物中pri-miRNA的长度大大超过其茎环长度, 有的甚至可以超过1kb。

miRNA前体的转录后加工: pri-miRNA在一种类Dicer酶 (Dicer-like 1, DCL1) 的作用下加工成pre-miRNA (约80~200nt) (Reinhart et al., 2002)。Pre-miRNA很不稳定, 在核内直接在DCL1的作用下形成双链的miRNA: miRNA* (miRNA*是miRNA的互补序列) (Grishok et al., 2001; Hutvagner et al., 2001; Ketting et al., 2001)。随后, 在miRNA甲基转移酶 (HUA ENHACER1, HEN1) 的作用下, 将miRNA:miRNA*双体的3'端最后一个核苷酸甲基化。

miRNA的输出: 被甲基化修饰后的miRNA:miRNA*双体随后在Exportin5的同源Hasty (HST) 蛋白和其他因子的共同作用下被转运到细胞质中 (Park et al., 2005)。在细胞质中, 双链的miRNA: miRNA*在解旋酶的作用下加工成成熟的miRNA单链, 然后成熟的miRNA进入RISC复合体中, 通过与靶位点碱基互补来指导靶mRNA的剪切或抑制其翻译 (Bartel, 2009)。

第二节 microRNA的特征和命名

1 microRNA的特征

与其他小分子RNA相比, miRNA具有以下几个明显的特征:

(1) 本身不具有开放阅读框 (ORF), 是不编码蛋白质的短序列RNA。

(2) 长度通常为19~25nt, 但在3'端可有1~2个碱基的长度变化, 对miRNA的具体长度范围尚无统一标准, 在拟南芥和烟草中发现的26nt RNA和在四膜虫 (*Tetrahymena*) 中发现的能使大部分DNA失活的28nt RNA也属于miRNA (Baulcombe et al., 2002)。

(3) 成熟的miRNA具有独特的序列特征, 5'端有一个磷酸基团, 且第一个碱基对U (尿嘧啶核苷酸) 有强烈的倾向性, 而对G (鸟嘌呤核苷酸) 却有排斥性, 第2~4个碱基缺乏U, 3'端为羟基。一般来讲, 除第4个碱基外, 其他位置碱基通常都缺乏C。这些特点是区分miRNA与类似长度的寡核苷酸或功能RNA降解片段的标志。

(4) miRNA基因不是随机排列的, 其中有一些是成簇的 (cluster), 即多个

miRNA由同一个前体RNA加工而来,且来自同一基因簇的miRNA具有较强的同源性。最典型的是一组高度相关的miRNA基因(miR-35~miR-41)集中簇生在*C.elegans* 2号染色体的1kb片段上,并从同一个前体上加工形成7个成熟的miRNA。

(5) 大多数已发现的植物miRNA表达具有明显的细胞特异性、时序性和组织特异性,即在生物发育的不同阶段里有不同的miRNA表达,在不同组织中有不同类型的miRNA表达。如miR-23~miR-27基因只在果蝇早期胚胎形成时表达,在其他阶段未表达;而miR-1和*let-7*只在成年果蝇中表达,在果蝇胚胎中无表达。拟南芥中的miR-171仅在其花序中高水平表达,在茎、叶等组织中却无任何表达的迹象(Reinhart et al., 2002)。miRNA在不同的细胞和组织中不同发育时间的差异性表达暗示miRNA的分布可能决定组织和细胞的功能特异性,而部分miRNA在多种细胞或组织中的均一表达可能意味着它们在基因表达调控中具有更加广泛的作用。

(6) 成熟miRNA的序列和预测的发夹结构在不同物种间具有高度的保守性。如,在已知的鼠和人类的miRNA中有53%与*fugu rubripes* (puffer fish) 或*danio rerio* (zebra fish) 同源(Gary et al., 2001)。约12%的miRNA在线虫、果蝇、哺乳动物和植物中呈现保守性,而且序列比对发现,这些保守片段中的碱基差异仅为1~2nt(Lee et al., 2001)。

(7) 几乎所有的miRNA都是从前体的一条臂上加工而来,只有极少数的个例可以从前体的两条臂上同时产生miRNA,如miR-256。

2 microRNA的命名

越来越多的miRNA种类被发现,而且很多miRNA都是同源的。为了防止miRNA的混淆,国际上已经有统一针对miRNA的命名规则(Griffith et al., 2006):

(1) 在每个miRNA名称前使用物种名称的3~4个字母的前缀来标明物种,如hsa表示人类(*Homo sapiens*), mmu表示小鼠(*Mus musculus*), dme表示果蝇(*Drosophila melanogaster*), ath表示拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)等;

(2) 用miR表示成熟的miRNA,简写成miR-No.,用mir表示前体发夹结构,简写成mir-No.;

(3) 高度同源的miRNA在No.后加英文小写字母来标注(如mmu-miR-10a和mmu-miR-10b);

(4) 多基因拷贝的再在后面加-No. (如miR-2a-1);

(5) 不同物种中同源的miRNA最好用同一个名字, 如has-miR-101和mmu-miR-101是人和鼠的具有同源性的成熟miRNA;

(6) 如果一个前体的2个臂都产生miRNA, 则根据克隆实验, 看哪个是主要的成熟产物, 次要的在后面加“*”号, 如miR-56和miR-56* (*表示量少的); 如果不能区分表达量的多少, 可以在后面加-5p或-3p来表示, 如miR-142-5p (表示在5'端的臂, 以前有人用miR-142-s) 和miR-142-3p (表示3端的臂, 以前有人用miR-142-as);

(7) 到目前为止, 除了线虫中的*lin-4*和*let-7*外, 其他miRNA统一用以上表达方式。

第三节 microRNA的调控机制

研究发现, 在植物和动物发育过程中, miRNA与靶mRNA结合的程度和部位不同, 其调控机制也不同, 主要分为以下三种:

第一种, miRNA与靶标mRNA的3'非翻译区(3' UTR)的识别位点不完全互补结合, 进而抑制靶基因蛋白的翻译而不影响靶基因mRNA的稳定性(不改变mRNA丰度)。目前发现的动物miRNA多属于这种作用机制。线虫中的miRNA *lin-4*调控靶基因*lin-14*和*lin-28*的蛋白水平但并不降低它们的mRNA水平是这种作用方式的典型代表(Wightman et al., 1993; Moss et al., 1997)。这种调控机制在植物miRNA中也同样存在, 如miR-172主要是从翻译水平上抑制靶基因*AP2 (APETALA2)*进行调控, 而其mRNA的积累并不受影响(Chen, 2004)。

第二种, miRNA与靶mRNA完全互补结合, 最后切割靶mRNA, 直接导致mRNA降解。这种作用方式在植物中比较常见。拟南芥miR-171与其靶基因(SCL转录因子家族3个成员)完全互补结合是这种作用方式的典型代表(Llave et al., 2002)。

第三种, 同时具有以上两种作用方式: 当与靶mRNA完全互补结合时, 直接靶向切割mRNA, 如果蝇和Hela细胞中*let-7*直接介导RISC分裂切割靶mRNA; 当与靶标基因不完全互补结合时, 起转录抑制的作用, 如线虫中的*let-7*通过与靶mRNA *lin-41*和*hbl-1 (lin-57)*的3'端非翻译区不完全配对结合后, 抑制调节基因的翻译(Lin