

microRNA

南昌大学生物学实验教学中心 汪艳璐

miRNA的发现及研究

1、上世纪90年代，Lee等人利用遗传筛选的方法在线虫中发现一个22 nt的小分子非编码RNA——*lin-4*。它的转录产物在幼虫的L1后期表达，与*lin-14* mRNA 3'末端非翻译区(untranslated regions, UTR)序列互补，从而抑制LIN-14蛋白的表达水平，使线虫由L1期向L2期转化。而对*lin-4*基因突变后，发现线虫虽然能够蜕皮，但只能停留在L1期，不能发育为成虫。

2、2002年四个不同实验室同时报道植物中也存在 miRNA，这个新的发现表明miRNA极可能出现在真核生物进化的早期阶段，而且它们可能在动物和植物的发育中都起着重要的调节作用。

miRNA的特征

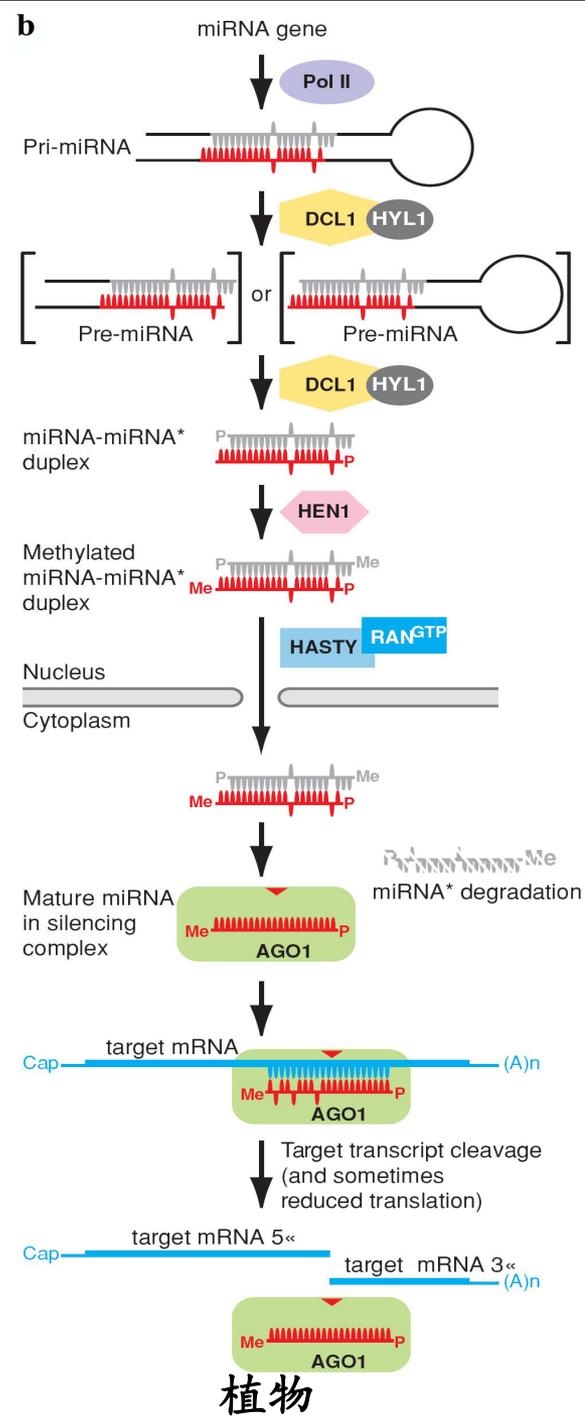
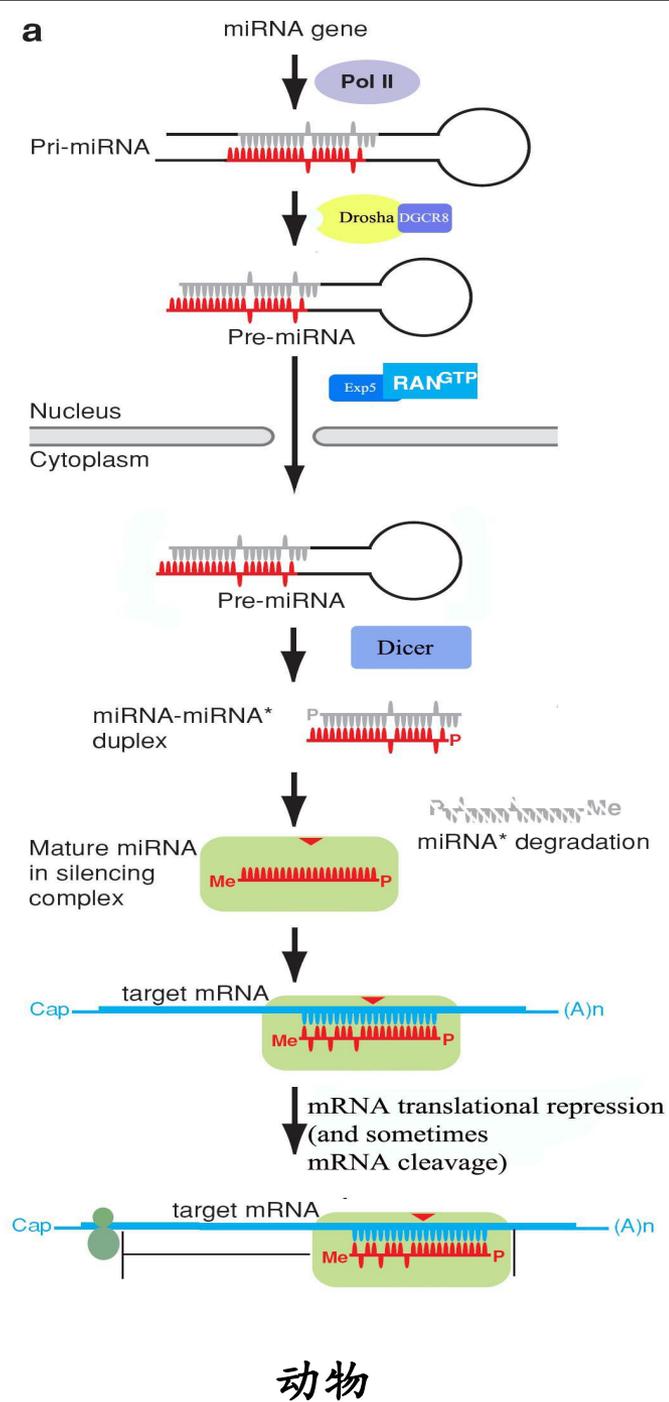
- (1) miRNA无开放阅读框且表现出进化上的保守性，由含有发夹结构的前体剪切加工而来，通常其前体的自由能比较低(-20~-57 kcal/mol)。
- (2) 成熟的miRNA长度为19-25 nt，5'端带有磷酸基团且多为尿嘧啶核苷酸，3'端带有羟基，因而miRNA能与大多数寡核苷酸和功能RNA的降解片段区分开来。
- (3) 大多数miRNA呈现出组织特异性表达和发育阶段特异性表达的特点，且具有调控自身转录的机制。
- (4) miRNA基因以单拷贝、多拷贝或基因簇(Cluster)的形式广泛存在于真核生物基因组中，且大部分位于基因间隔区(Intergenic region, IGR)，也有相当一部分位于编码蛋白基因的内含子中。

植物miRNA与动物miRNA不同的特征：

- (1) 植物miRNA虽然比较保守，但仅是成熟的植物miRNA才表现出进化上的保守性。
- (2) 植物miRNA前体的茎环长度变化较大，一般为60~342 nt，有的超过1 kb；
- (3) 植物miRNA和动物miRNA成熟所需要的一些关键蛋白质不同。
- (4) 植物miRNA与靶基因的结合位点不仅仅限于靶基因的3-UTR，还可以位于转录区域。
- (5) 植物miRNA与其靶基因序列具有更高的互补性。
- (6) 植物成熟microRNA的分子大小多为21nt，而非动物中的22-23nt

miRNA的生物合成:

**动物和植物miRNA都是由miRNA原初转录物
(primary miRNA, pri-miRNA)加工为成熟的
miRNA**



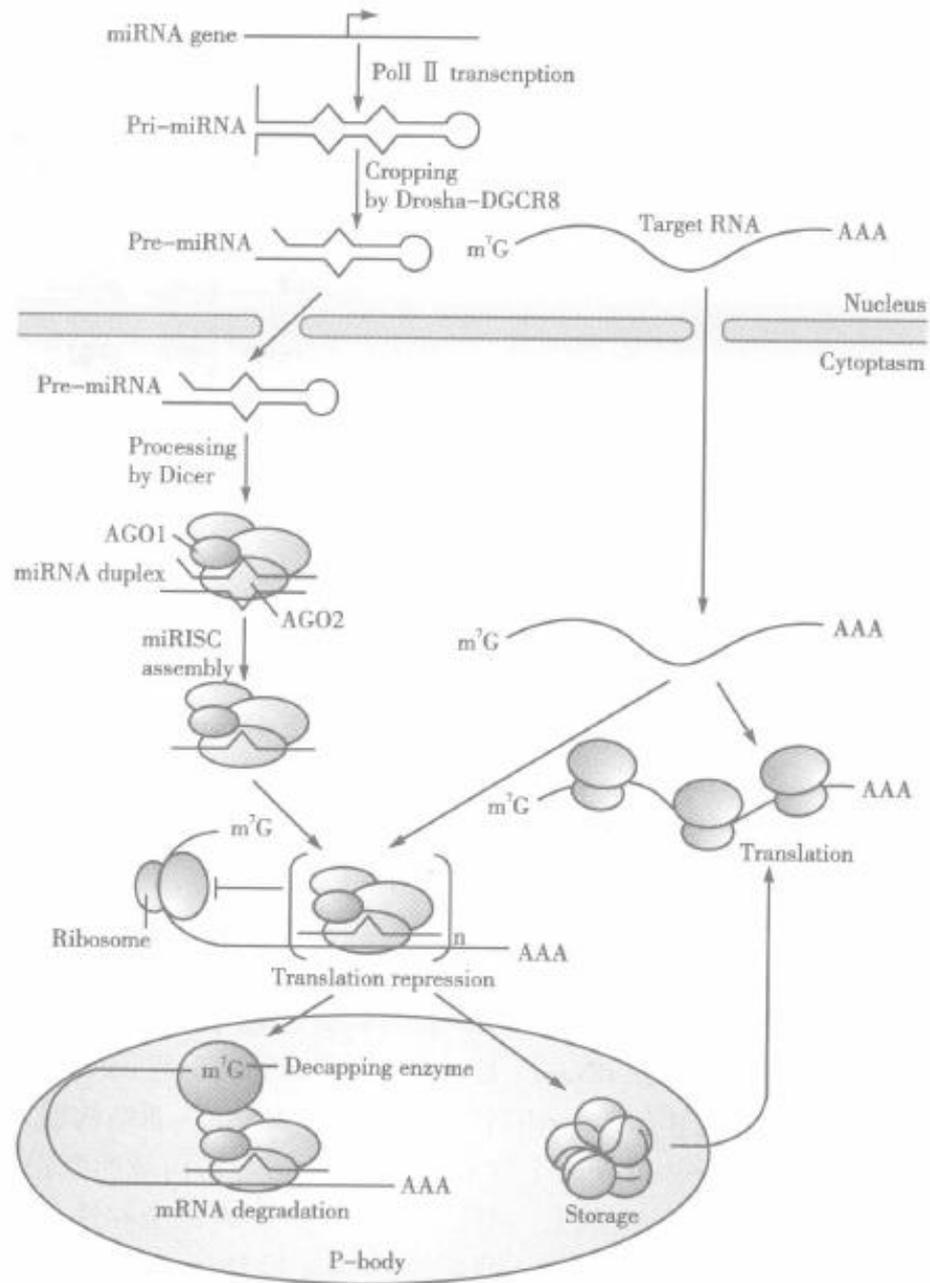


图 2-3 人 microRNA 整合入 miRISC 及作用过程图解

miRNA的调控机制

目前被人们普遍认可的miRNA作用机制有两种：**miRNA介导mRNA翻译抑制和miRNA介导mRNA的特异性切割**。此外，研究人员还发现miRNA可能存在其他的调控机制，如**调控靶mRNA的定位或稳定性**，或者**作用于mRNA以外的靶分子**，比如与调控性的非编码RNA甚至miRNA互补结合，或**通过与其他RNA竞争结合蛋白质来实现其调控功能**。

1、miRNA介导mRNA的翻译抑制

通常动物miRNA与靶mRNA的3'-UTR部分序列反向互补结合，而这种结合基本上不是完全匹配的。由于miRNA与靶标mRNA非完全配对，导致靶标mRNA在翻译起始后的表达受到影响，然而这种影响是可逆的。

2、miRNA介导mRNA的特异性切割

大多数植物miRNA与靶序列的开放阅读框(ORF)近乎完全匹配，因而植物中，miRNA主要通过介导mRNA的特异性切割来实现对基因进行调控。

3、miRNA介导mRNA的快速脱腺苷酸化

通常在mRNA转录之后，poly(A)尾会添加在mRNA的3'末端以维持其在生物体内的稳定性而不被降解。有些miRNA被发现能够促进mRNA的poly(A)尾的去除而导致其降解。

miRNA的生物学功能

1、在植物中的作用

- (1) 影响植物生长发育
- (2) 影响植物激素的调节及信号转导
- (3) 影响植物病害和应答环境胁迫

2、在动物中的作用

根据目前所鉴定的基因功能看，miRNA可参与动物生命过程中的一系列重要进程，包括胚胎发育、细胞分化、细胞增殖、细胞凋亡、细胞死亡、免疫调节以及物质代谢等过程。

miRNA的命名与界定

1、命名

(1) 将成熟miRNA简写成miR-No., 而其前体则用“mir”加以区分, 而相对的基因则根据相关生物传统习惯用斜体标明,

如*miR-1*, *miR172*。

(2) 序列相同的或几乎完全相同的直系同源miRNA用相同的数字来命名, 如线虫和果蝇的miR-1, 而miR后面的数字由

miRNA注册数据库按顺序指派, 且必须是相关的文章被接受发表后。在发表前作者可以用一个临时的名字送审。

(3) 由于同物种中同一基因家族成员的成熟miRNA序列完全相同或仅存在1~2个碱基差异，通常在数字后面加字母或数字后缀加以区分，如拟南芥的miR395基因家族中6个成员，则分别记为miR395a, miR395b, miR395c, miR395d, miR395e和miR395f。如果miRNA为多基因拷贝，则再在后面加一个数字后缀加以区别，如黑腹果蝇中的miR-281-1和miR-281-2。

(4) 为了区分不同物种之间相同的miRNA，根据相关生物传统习惯在该miRNA名称前加上该物种的名称，如人与小鼠的miR-101分别用has-miR-101和mmu-miR-101来表示，拟南芥miR156与水稻miR156被分别记为ath-miR156和osa-miR156。

(5) 如果同一个miRNA前体的两条臂分别产生同一个miRNA，则依据克隆实验结果判断，将主要的成熟产物与次要的成熟产物用“*”加以区分，通常在次要的后面加“*”，如线虫中的miR-56和miR-56*。在无法区分主要和次要成熟产物的情况下，则可以在数字后面分别加后缀“5p”或“3p”来区分，如miR-142-5p表示该miRNA成熟分子位于miR-142前体的5'端，miR-142-3p表示该miRNA成熟分子位于miR-142前体的3'端。

2、界定

最初鉴定新的miRNA基因时主要是采取构建cDNA文库的方法，但是该方法受到了其他一些小分子RNA的影响，容易产生假阳性。因此判断一个小RNA分子是否为miRNA，需要符合以下条件：

- (1) 小RNA分子必须是处于其前体RNA分子折叠成的发夹结构的一条臂上。
- (2) 小RNA分子必须在系统发育上具备相当的保守性。
- (3) 前体RNA分子形成的二级结构应具备较低的自由能(小于-15 kcal/mol)和较高的MFEI值(大于0.7)。

- (4) 小RNA分子与其互补的miRNA*序列之间的碱基错配应少于6个碱基(包括G: U错配以及其他非经典的碱基错配)。
- (5) 小RNA分子的前体形成的在茎环结构中miRNA*序列不允许有发夹结构和缺口存在。
- (6) 随着Dicer酶功能降低, 小RNA分子前体不断积累

miRNA的鉴定

1、计算机RNA组学

(1) 同源性搜寻法

同源性搜寻法是基于miRNA序列和结构的保守性，通过BLAST程序在数据库资源中进行搜索新的miRNA基因的一种方法。

(2) 基因搜寻法

目前基因搜寻法主要用于搜寻动物miRNA基因，该方法首先需要找出保守的基因间隔区，然后通过一些二级结构预测软件(如mfold或RNAfold)，分析该保守的序列是否能形成保守的茎环结构，最后对能形成茎环结构的保守序列进行打分评价，从而筛选出miRNA候选分子。

(3) 茎环结构邻位搜寻法

由于大多数动物miRNA以基因簇的形式出现，如保守的miR-17基因簇，研究人员通过结合其保守的二级结构的特性，在其茎环结构附近进行搜寻新的miRNA。目前有关植物中miRNA成簇现象的报道还比较少，所以该方法仅仅局限于动物miRNA的预测。

(4) 利用靶序列反向搜寻法

在生物体内，多个miRNA分子可能作用于同一个mRNA靶分子，而同一个miRNA也可能调控多个靶分子的表达。目前，一些实验室利用靶序列潜在的保守性，通过对基因组系统比对分析来搜寻新的miRNA。

2、实验RNA组学

(1) 遗传筛选法

(2) 定向克隆法

定向克隆技术是发现miRNA的最直接的实验方法，由于miRNA在各种生物体中广泛表达，且具有细胞或组织特异性，因此使用定向克隆能从各种细胞或组织中鉴定出miRNA基因。

定向克隆方法包括以下几个步骤：首先要构建一个小分子RNA的cDNA库，即先分离目的细胞或组织的小分子量RNA，然后在它们的5'磷酸基和3'羟基端分别连接上一个接头引物，逆转录后用与接头对应的引物进行PCR扩增，随后将这些片段克隆至载体以构建cDNA文库，并对其每一个克隆进行测序。通过序列分析排除已知序列后，将剩下的新序列去检索基因组数据库，并通过一些辅助折叠软件(如mFold软件)进行分析，最后使用Northern杂交技术对其进行验证

(3) 实时定量PCR检测法

实时定量PCR技术是利用荧光信号的变化实时检测PCR扩增反应中每一个循环扩增产物量的变化，通过Ct值和标准曲线的分析对起始模板进行定量分析。

(4) 基因芯片

miRNA靶基因的鉴定

1、植物miRNA靶基因的预测

由于植物miRNA与靶基因的“完美”结合，使得利用计算机手段预测植物miRNA的靶基因成为可能，研究人员相继开发出一系列针对植物miRNA靶基因预测的软件，如MIRcheck、findMiRNA和miRU

2、动物miRNA靶基因的预测

2003年Lewis等人开发出一款可以预测哺乳动物miRNA的靶基因的软件——TargetScan，此外用于预测动物miRNA靶基因的软件还有miRanda、RNAhybrid、PicTar和MovingTargets