

microRNA 研究策略

MicroRNA (miRNA) 是一类内生的、长度约 20-24 个核苷酸的小 RNA，几个 miRNAs 也可以调节同一个基因。可以通过几个 miRNAs 的组合来精细调控某个基因的表达。据推测，miRNA 调节着人类三分之一的基因。MicroRNA 存在多种形式，最原始的是 pri-miRNA，长度大约为 300~1000 个碱基；pri-miRNA 经过一次加工后，成为 pre-miRNA 即 microRNA 前体，长度大约为 70~90 个碱基；pre-miRNA 再经过 Dicer 酶酶切后，成为长约 20~24nt 的成熟 miRNA。

microRNA (以下简称 mir) 研究策略：

功能模型芯片筛选-QPCR 验证-mir 基因靶向操作-功能验证-寻找靶标与靶标蛋白内源性验证-靶标蛋白外源性 luciferase-3'UTR 验证-靶标回复实验 (rescue 实验)

1. 功能模型芯片筛选：选用有功能差异对比的样本，进行 mir 芯片筛选 (mir-array)，筛选出变化明显的 mir。

现在主流的芯片平台是 Agilent 和 Affymetrix，Agilent 只检出成熟体，而 Affy 的芯片前体和成熟体皆检出，假阳性率较高，但 Affy 的容量相比 Agilent 的大很多。

[汉恒生物](#) (Hanbio) 提供 Agilent 和 Affymetrix 平台的 mirarray 筛选服务及后续的芯片数据分析及靶基因聚类分析。

2. 芯片结果的 QPCR 验证：用与 1 中相同的样本，对 1 中筛选出的 mir 进行 QPCR 验证，挑选出丰度高且变化显著的 mir (以下简称 mir-X)。

Mir 的 QPCR 验证最首选的当然是 Life 的 Taqman 系列探针和 kit，权威，但价格极其昂贵。与之相比，特定引物 SYBR 法检测 mir 价格适中，但误差率较高。

[汉恒生物](#) (Hanbio) 特有一步反转技术，特异性好，简单易用。汉恒已开发出针对不同种属 mir 的 miRNA 快速检测技术 MiRQeasy，与市面一般的 mir 引物相比，信号更单一，且操作极其简便。汉恒独有 MiRTeasy 一步法反转录试剂，一次性转录，兼顾了专一性和通用性。

3. MicroRNA 基因操作：

- 91 -

原则:

与 mir 变化相反的处理是否取缔功能表型的变化,而同向 mir 变化处理是否能模拟出功能表型变化。比如我们发现 mir-X 在细胞某种诱导分化后升高,则诱导时取缔这种升高是否会抑制分化,而单单升高该 mir 能否模拟出细胞分化表型。

1) 初筛选:

选取出若干芯片与 QPCR 验证变化一致,且组织表达丰度较高的 Mir,运用 Mimics (过表达)和 inhibitor (封闭)分别在细胞中过表达和封闭特定的 mir,观察细胞功能的变化。

注: Mimics 和 inhibitor 表达时程很短,一般 72-96 小时,所以一般只作为初筛。

2) mir 与 Anti-mir 的克隆高表达:

Mir 过表达: 从 miRbase 上调出 pri-mir 序列,直接克隆 pri-mir 至表达载体。

Mir 下调: 构建 mir 的下调即封闭,主要的技术是 sponges 技术。将若干段连续 mir 成熟序列互补序列串联,使之在细胞内表达,吸附目标 microRNA,所以称之为 sponges (海绵)。

[汉恒生物](#) (Hanbio) 已开发并完善病毒载体介导的 microRNA 过表达和封闭技术平台,可针对不同的 microRNA 不同的实验要求为客户提供定制服务。您也可直接购买我们已经构建好的 microRNA 病毒颗粒或病毒载体。

3) Transgenic & Knockout

如果想考察 microRNA 在机体发育中的特定作用,Transgenic (TG) & Knockout (KO) mice 肯定是最好的选择。此外,斑马鱼由于其周期短,鱼身透明等特点,也为 microRNA 功能研究提供了很好的便利。

[汉恒生物](#) (Hanbio) 与各转基因研发中心有长期合作关系,并已拥有部分已构建好的 microRNA TG 及 KO 小鼠,详情可咨询汉恒生物销售人员。

4. 功能验证:

在目的细胞（病毒法）或者动物脏器（转基因小鼠）中高表达 mir-X，观察细胞或动物的功能表型，具体功能表型依照各方向类别而不同，如细胞分化，则观察分化率等，如肿瘤，可参考《汉恒生物肿瘤学功能研究概述》技术文件，也可来电来信与我们的实验技术工程师交流。

5. 寻找靶标与靶标蛋白内源性验证：

1) 靶基因的预测：生物信息学比对

目前通过生物信息学比对找出特定 microRNA 对应可能的靶点蛋白主要有以下几个引擎：

a. PicTar: 基于 microRNA 或 microRNA 靶标联合作用等特征开发的搜寻动物的 microRNA 靶基因。假阳性率也较低。Rajewsky 实验室开发的。网址：<http://pictar.mdc-berlin.de/>

b. targetScan: 基于靶 mRNA 序列的进化保守等特征搜寻动物的 microRNA 靶基因。是预测 microRNA 靶标假阳性率较低的软件。Bartel 实验室开发的。

网址：<http://www.targetscan.org/>

c. iRTarBase: 整合实验证实的 microRNA 靶标的数据库。

其他数据库可自行 google，不一一在此列出。

网址：<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/index.html>

2) 表达谱芯片：

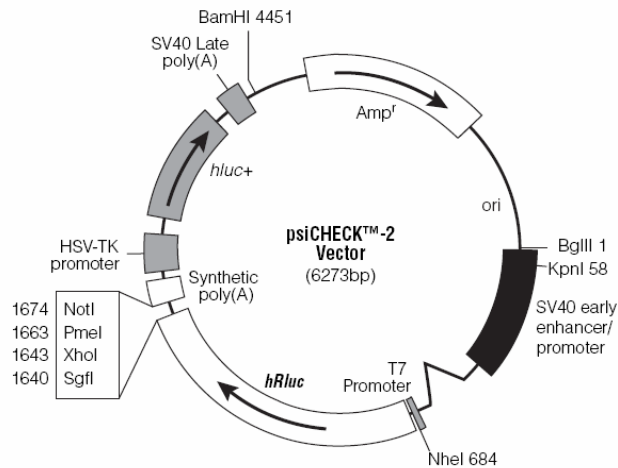
如果有条件，将样本中做 mirarray 同时，进行表达谱芯片分析，然后通过生物信息学预测与表达谱芯片结果交叉比对，可得出把握度大的候选靶基因。

3) 靶标蛋白的初步验证：

一般有候选的 2-4 个靶标蛋白为指标，应用 mir 基因靶向操作的细胞或组织样本进行靶标蛋白的 western 验证，从中找出和 mir-X 趋势相反且变化最明显的 1-2 个靶标。

6. 靶标蛋白外源性：

将 5 中确定的靶标蛋白基因 3'UTR 区克隆至 luciferase 报告基因载体（如下图，psiCHECK-2，最常用的 microRNA 报告基因载体，promega 公司产品），并与 mir-X 共转 293T 细胞，验证 mir-X 转入后 luciferase 的信号下调效率，进一步确定靶标。为了实验的严谨性，可加入靶标基因 3'UTR 区 microRNA 预测结合区域的突变体作为对照，进一步说明问题。



7. 靶标回复实验（rescue 实验）：(可选做)

一个 microRNA 有很多靶基因，那么在我们的模型中，我们研究的 microRNA 是否是通过对我们关注的靶基因的调控，起到了对功能表型的影响？为了进一步说明这个问题，靶标蛋白功能回复实验（rescue 实验）的重要性不言而喻。说选做，是由于工作量大，单单做到外源性验证已经可以发表 SCI paper。

Rescue 实验的原理：在 3 的 mir 的基因操作模型中，一般情况下 microRNA 与靶蛋白都是反向变化的。即过表达 mir 都导致靶蛋白的下调，而封闭 mir 有可能导致靶蛋白的表达升高注：封闭 mir 导致靶蛋白升高也有很多例外，首先，可能本底该 mir 的表达量并不高，也不会对靶蛋白的量有太大影响；再次，microRNA 对靶基因的调节都是比较温和的，而不像外源的 siRNA。

方法：在过表达 mir-X 时，同时过表达靶标蛋白，或者在 mir-X 封闭的条件下，同时干扰靶标蛋白，如果我们在这个基础上，再过表达靶蛋白，如果细胞或者动物在功能上重新回归或者部分恢复到对照水平，则充分说明 mir-X 是通过或部分通过该靶蛋白通路，影响了功能表型。

注：生物体内上下游信号通路错综复杂，很难只改变一种因素就把生物体回归到正常，所以部分恢复也是很有意义的。

Reference

1. Legendijk AK, Goumans MJ, Burkhard SB, Bakkers J. MicroRNA-23 Restricts Cardiac Valve Formation by Inhibiting Has2 and Extracellular Hyaluronic Acid Production. *Circ.Res.* 2011;109:649-657.
2. Aranha MM, Santos DM, Sola S, Steer CJ, Rodrigues CM. miR-34a Regulates Mouse Neural Stem Cell Differentiation. *PLoS.One.* 2011;6:e21396.
3. Schraivogel D, Weinmann L, Beier D et al. CAMTA1 is a novel tumour suppressor regulated by miR-9/9(*) in glioblastoma stem cells. *EMBO J.* 2011
4. Cao Q, Mani RS, Ateeq B et al. Coordinated Regulation of Polycomb Group Complexes through microRNAs in Cancer. *Cancer Cell* 2011;20:187-199.