



- **Target Prediction**
- **Validation**
- **Functional Analysis**

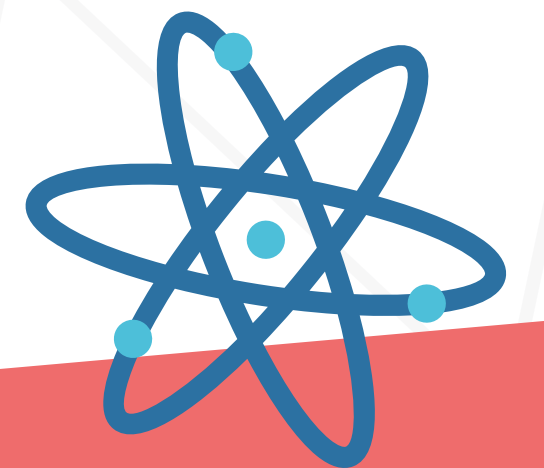
Introduction

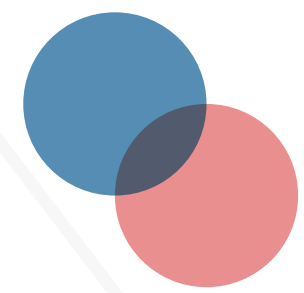
miRNA對基因的調控取決於其種子區域(seed region)與目標基因的結合。

由於種子區域的長度較短(7 nt)，一個miRNA的目標可能是多個基因。此外，一個特定的基因可能受多個miRNA的調控。可以使用生物訊息學工具預測miRNA的目標，但始終須透過實驗進一步驗證。

Target Prediction

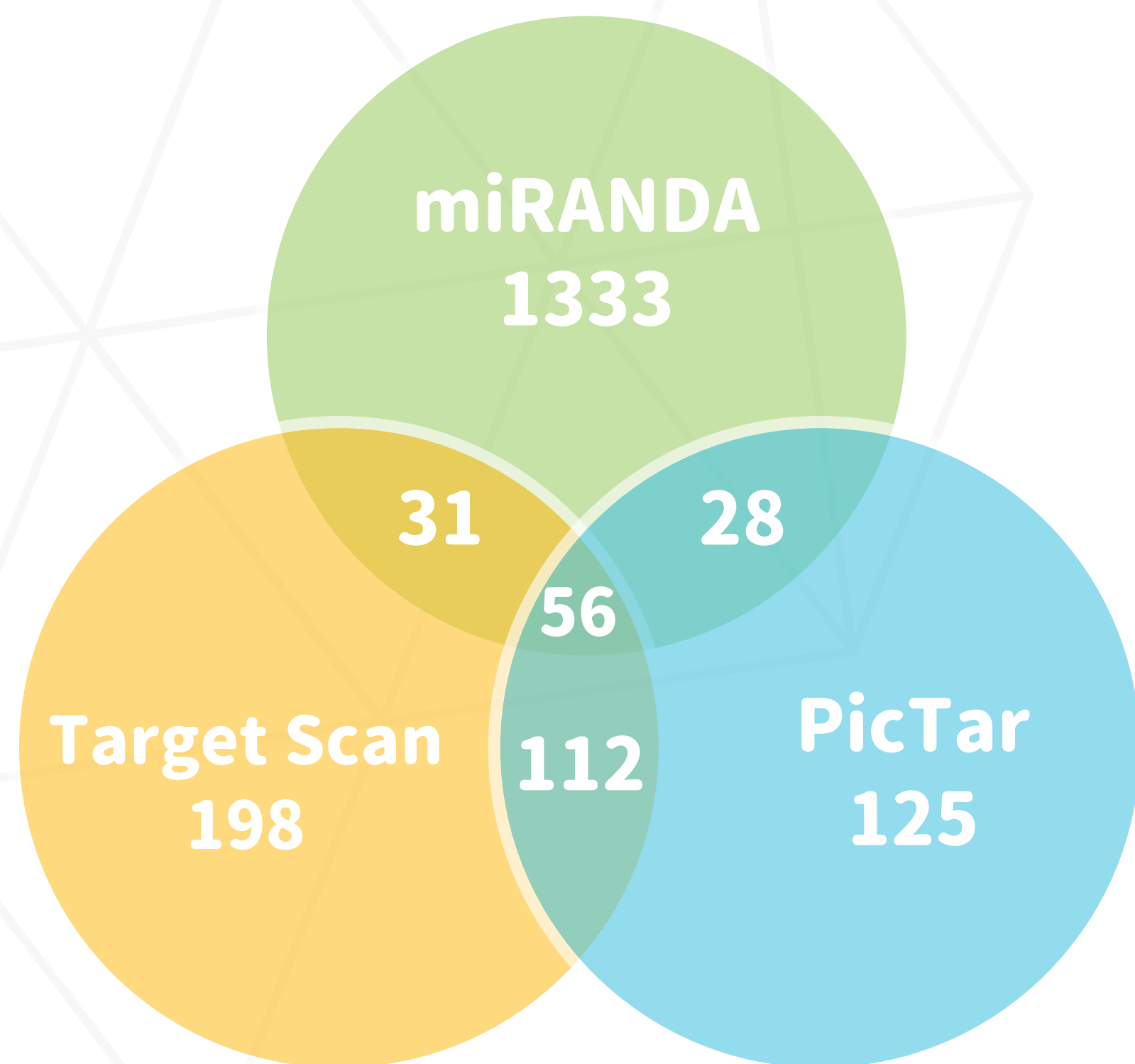
有多種生物訊息學工具可用於預測miRNA目標基因。常用程序包括miRanda、DIANA-microT、Targetscan和PicTar [\(1\)](#)[\(2\)](#)[\(3\)](#)[\(4\)](#)。





用於預測miRNA-mRNA配對的一些基本標準是：

- miRNA的種子區域與目標mRNA的3'UTR中的區域具有序列互補性
- miRNA與mRNA結合位點在不同物種的mRNA之間是保守的(conserved)
- miRNA-mRNA雙鏈結構是熱穩定的
- miRNA結合位點周圍沒有二級結構



不同的miRNA目標預測算法可能會以不同的方式計算這些參數。因此，相同的miRNA通過不同的目標預測工具運行時可能會生成非常不同的潛在目標列表。基於這個原因，確定可能的miRNA目標最具體方法是檢查多個目標預測工具的結果，尋找所有結果的集合(5)。

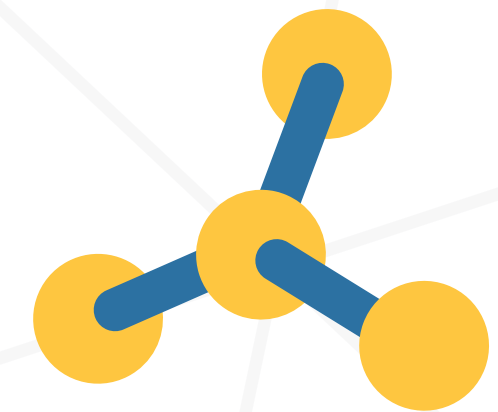
Figure 1

爲了縮小潛在miRNA目標的列表，可以結合多個目標預測工具的結果。最有可能的目標基因會出現在這些預測結果的集合中。

Tools for miRNA Research

爲了驗證miRNA目標基因，可以使用專門設計的載體或合成分子進行實驗。

接下來將討論最流行的miRNA研究工具，以及如何進行miRNA目標基因驗證和功能分析。



miRNA Mimics and Inhibitors



Figure 2

總結miRNA模擬物(Mimics)和抑製劑(Inhibitors)的功能。內生性miRNA(綠色)將與其目標基因結合，使目標基因被抑制。miRNA Mimics是合成的RNA duplexes，其中一條是模擬內生性miRNA(橙色)，其調控目標基因的方式與內生性miRNA相同。

miRNA Inhibitors(紫色)是設計用於結合特定miRNA的單鏈寡核苷酸。miRNA Inhibitors透過與內生性miRNA結合，阻止其與目標基因相互作用，從而阻止基因被抑制。

3'UTR Reporter Vectors

用帶有GFP或熒光素酶(luciferase)等報告(reporter)基因且下游是目標基因3'UTR的載體。如果miRNA與目標基因結合，應該會降低報告基因的表現。如果miRNA不會與之結合，報告基因的表現將不受影響。有時會將預測的miRNA結合位點進行突變，作為對照。

miRNA Mimics

miRNA Mimics是合成的RNA duplexes，旨在模擬感興趣的miRNA功能。其中一條是模擬成熟的miRNA。Agomir也是一種模擬物(Mimics)，其經過化學修飾後更能抵抗降解並具有更高的轉染效率。

miRNA Inhibitors

miRNA Inhibitors(有時稱為antimiRs)是合成的單鏈寡核苷酸。它們的序列設計與其相應的miRNA具有互補性，因此它們將結合併抑制miRNA在細胞中的功能。Antagomir是一種經過化學修飾的抑制劑(Inhibitors)，具有更強的抗降解性和更高的轉染效率。



miRNA Expression Vectors

有三種不同類型的載體可用於miRNA實驗。這些載體，都需要經過細胞機制將其加工成成熟的RNA。

- **shRNA載體**

它表現小髮夾RNA(short hairpin RNA)(22-29 nt)，載體通常帶有聚合酶III啓動子，例如U6或H1(6)。這類型的載體是針對特定基因位置，而不是模仿特定的miRNA。這不應與siRNA載體混淆，siRNA載體是表現沒有髮夾構型的雙鏈siRNA。而abm採用了U6和H1啓動子系統，它在啓動子之間帶有sense siRNA序列(22-29nt)以表現siRNA。

- **Precursor的載體**

它們表現帶有聚合酶II啓動子的pre-miRNA序列，例如CMV。在這種情況下，感興趣的miRNA周圍的序列都會被表現，且pre-miRNA被細胞加工成成熟的miRNA。這種方法將使miRNA的兩股都被表現。

● Mature miRNA的載體

通常帶有聚合酶II啟動子。這些載體將成熟的miRNA序列插入內生性miRNA(通常為miR-30)中，確保Dicer的有效切割(7)。互補股(passenger strand)經常被修飾，使其不太可能被加到RISC中。

miRNA載體可以直接轉染或包裝到病毒中。爲了穩定、長期地表現miRNA，可以使用慢病毒將該基因整合到宿主DNA中。若使用AAV或腺病毒則可以短效且大量表現目標miRNA。這些載體還具表現miRNA的同時可以表現報告蛋白(如GFP)的優勢。

● miRNA Inhibitor Vectors

miRNA抑制載體(Inhibitor Vectors)表現miRNA目標的序列(8)。miRNA將與這些目標序列「誘餌」結合，導致miRNA與內生性的目標結合減少，從而抑制miRNA對細胞的影響。抑制載體可以僅帶有單一個miRNA結合位點，也可以帶有多個miRNA結合位點。在後一種情況下，載體可以被稱爲“miRNA sponge”，因爲它具有更高的結合能力。

Target Validation

雖然目標預測工具有助於縮小潛在目標的範圍，但miRNA-mRNA相互作用始終需要透過實驗進行驗證(5)。驗證miRNA目標的最簡單方法是製備一個載體，該載體具有GFP或熒光素酶等報告基因且下游是目標基因3'UTR的載體。如果miRNA與目標結合，則會減少報告基因的表現。如果miRNA不與之結合，報告基因的表現將不受影響。



執行目標驗證時的一些注意事項：

- 測試時使用整個3'UTR序列，而不僅僅是預測的miRNA結合位點。離結合位置較遠的序列可能對miRNA結合和基因調控有影響。
- miRNA是否調控目標不僅取決於序列，還取決於其他因素，如細胞類型、細胞是否分化，以及細胞是否處於壓力之下。因此，目標驗證應在感興趣的細胞中，盡可能接近體內(in vivo)的條件下進行。
- miRNA表現隨著細胞滿度(confluence)的增加而增加。在任何miRNA實驗中，監測和控制細胞密度都很重要。

使用UTR的報告載體進行目標驗證 可以透過以下幾種方式執行：

01

3'UTR報告載體有兩種類型：一種帶有野生型3'UTR，另一種具有預測的miRNA結合位點的突變版本。用報告載體轉染/轉導(transduce)表現感興趣的miRNA的細胞。如果與具有突變型3'UTR的細胞相比，具有野生型3'UTR載體的細胞其報告基因表現減少，則表明內生性miRNA可以結合該目標序列。

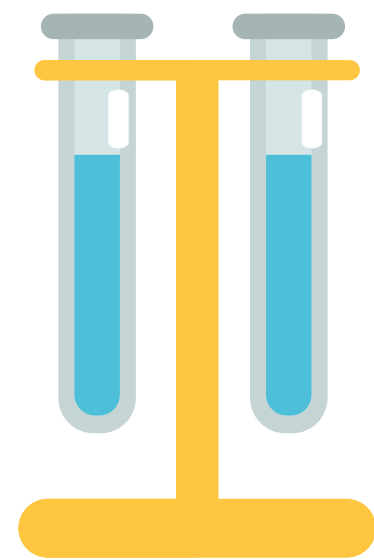
02

使用3'UTR報告載體轉染/轉導細胞株。添加miRNA inhibitor。如果miRNA與inhibitor結合，則會導致miRNA與3'UTR報告基因的結合減少，從而導致報告基因表現增加。

使用UTR的報告載體進行目標驗證 可以透過以下幾種方式執行：

03

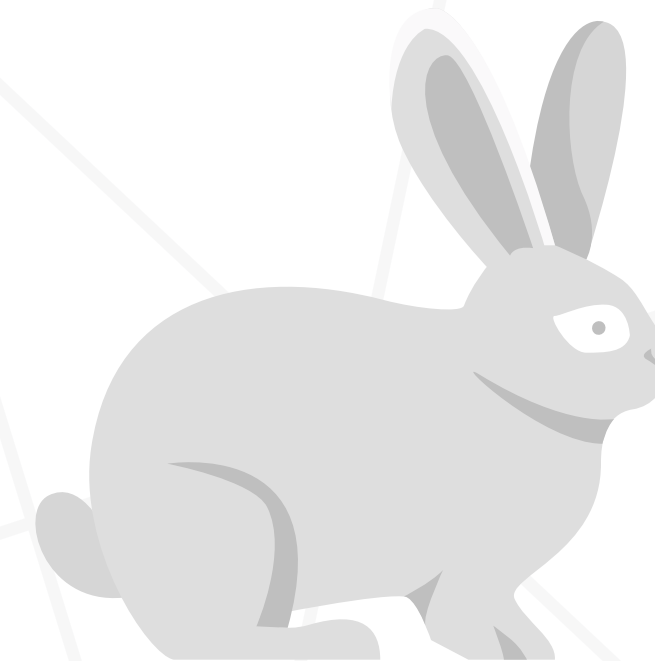
使用3'UTR報告載體轉染/轉導細胞株。透過處理合成miRNA模擬物或大量表現miRNA的載體來增加感興趣的miRNA的數量。如果miRNA和目標序列之間存在相互作用，增加miRNA表現量應該對報告基因表現量產生劑量依存性(dose-dependent)影響。當使用突變的3'UTR報告載體進行實驗時，則應該沒有這種效果。



Functional Analysis

一旦確定了miRNA的目標基因，下一步就是確定miRNA對細胞或動物的影響。

可以透過觀察抑製或大量表現miRNA對表型(phenotypic)的影響來研究miRNA的功能效應。這可以在細胞培養或動物模型中透過處理miRNA模擬物/表現載體或miRNA抑製劑/抑制載體來完成。它們的作用可以透過測量miRNA表現量(qPCR、Northern blotting)和/或蛋白質表現量(Western blotting)來確認。



對於大規模分析

miRNA對系統影響的概述可以使用轉錄組學和蛋白質組學分析

轉錄組學/蛋白質組分析有幾個缺點：

- 01** | 蛋白質組學分析既複雜又昂貴。它需要大量的材料，並且需要購買或合成合適的抗體。
- 02** | 轉錄組學分析可能無法捕捉到miRNA進行的所有類型的基因調控。miRNA以兩種方式進行基因調控：mRNA降解和抑制轉譯。後一種類型的調控將無法通過轉錄組學檢測到。
- 03** | miRNA是中度調節因子，可能對表現量沒有很大影響。
因此，很難將真實結果與生物樣本的自然“背景噪音”區分開來。

除了使用轉染材料來控制miRNA表現，還可以通過遺傳方法生成轉殖基因動物模型(9)。
例如:miRNA基因的剔除、藉由基因敲入以大量表現miRNA，以及蛋白質編碼基因中miRNA結合位點的突變(10)。

在體內(in vivo)進行功能分析時的一些注意事項：

- 01** | 考慮大量或抑制miRNA的潛在脫靶(off-target)效應。一種miRNA可能調控許多不同的基因，不同的組織可能對miRNA的抑制/表現有不同的反應。如果可能，最好透過使用組織特異性遞送系統或研究組織特異性miRNA來降低意外副作用的數量。
- 02** | 單個miRNA的抑製或缺失可能不會影響表型。miRNA通常存在於高度相關的序列家族或簇(clusters)中這些序列可能是高度冗餘的。同樣，在某些情況下，基因缺失可能會隨著時間的推移而得到補償。

在體內(in vivo)進行功能分析時的一些注意事項：

03

在進行遺傳miRNA刪除時，請謹慎的設計目標策略。miRNA經常在內含子中發現或作為多順反子(polycistronic)轉錄物存在，因此必須小心設計缺失(deletion)，以免破壞其他基因的轉錄。

更多abm
miRNA相關產品



文章出處

<https://info.abmgood.com/miRNA-microRNA-target-prediction-validation-functional-analysis>

參考文獻

1. The microRNA.org resource: targets and expression. Doron Betel, Manda Wilson, Aaron Gabow, Debora S. Marks, Chris Sander. 2008, *Nucleic Acids Research*, Vol. 36, pp. D149-D153.
2. DIANA-microT web server v5.0: service integration into miRNA functional analysis workflows. Paraskevopoulou, Maria D., et al. W1, 2013, *Nucleic Acids Research*, Vol. 41, pp. W169-W173.
3. Mammalian microRNAs: experimental evaluation of novel and previously annotated genes. Chiang, H. Rosaria, et al. 2010, *Genes & Development*, Vol. 24, pp. 992-1009.
4. Combinatorial microRNA target predictions. Krek, Azra, et al. 2005, *Nature Genetics*, Vol. 37, pp. 495-500.

參考文獻

5. The Art of MicroRNA Research. van Rooij, Eva. 2, 2011, Circulation Research, Vol. 108, pp. 219-234.
6. Probing tumor phenotypes using stable and regulated synthetic microRNA precursors. Dickins, Ross A, et al. 2005, Nature Genetics, Vol. 37, pp. 1289-1295.
7. Construction of an Artificial MicroRNA Expression Vector for Simultaneous Inhibition of Multiple Genes in Mammalian Cells. Hu, Tao, et al. 5, 2009, International Journal of Molecular Sciences, Vol. 10, pp. 2158-2168.
8. Managing MicroRNAs with Vector-Encoded Decoy-Type Inhibitors. Bak, Rasmus O, Hollensen, Anne Kruse and Mikkelsen, Jacob Giehm. 8, 2013, Molecular Therapy, Vol. 21, pp. 1478-1485.

參考文獻

9. Small RNA Detection by in Situ Hybridization Methods. Urbanek, Martyna O., Nawrocka, Anna U. and Krzyzosiak, Wlodzimierz J. 6, 2015, International Journal of Molecular Sciences, Vol. 16, pp. 13259-13286.
10. Strategies to determine the biological function of microRNAs. Krützfeldt, Jan, Poy, Matthew N and Stoffel, Markus. 2006, Nature Genetics, Vol. 38, pp. S14-S19.
11. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. Zhao, Yong, Samal, Eva and Srivastava, Deepak. 2005, Nature, Vol. 436, pp. 214-220.