



版纳园研究揭示一种构建人工miRNA载体的新策略

文章来源: 西双版纳热带植物园

发布时间: 2012-06-05

【字号: 小 中 大】

反向遗传学主要是通过DNA重组等技术,有目的地、精确定位地改造基因的精细结构,以确定这些变化对生物体表型性状的直接影响。为了研究植物的某一个(类)基因的功能,研究者通常需要获得该基因的功能缺失突变体或者通过RNAi技术抑制该目的基因的表达。由于目前公用突变体库只有少量模式植物的突变体,因此通过RNAi技术来抑制目的基因的表达水平来探讨该基因的生物学功能,是反向遗传学研究常用的关键手段之一。尽管如此,通常利用double-strand RNAs (RNAi)技术产生Small RNA而干扰靶基因表达,常常会导致脱靶效应(off-target)——也就是非特异性地抑制了非目的基因的表达,这最终会干扰研究者分析目的基因的生物学功能。

miRNA是一类可以在转录或(和)翻译水平上特异地抑制相应靶基因表达水平的small RNA。miRNA的功能特点正好可以弥补传统RNAi的不足。近年来,研究人员利用天然miRNA的生成和作用原理,开发了人工miRNA用来抑制一个或多个目的基因的表达。

目前,构建一个人工miRNA前体主要通过over-lapping PCR技术来实现,这通常需要四个PCR反应才能产生最终的人工miRNA前体结构。这种技术有三个缺点:(a)过多的PCR反应步骤增加了碱基突变的可能性;(b)过程费时费力;(c)不适合批量操作。为了改进该技术,中科院西双版纳热带植物园植物分子生物学组研究人员梁岗博士和余迪求研究员等人成功构建了两套人工miRNA载体(pAMIR395a和pAMIR319a),这两个载体包含了天然miRNA前体的5'和3'区域。研究人员可以通过一个PCR反应以产生相应的人工miRNA发夹区,然后通过酶切连接的方式克隆到相应的人工miRNA载体,从而产生所需的人工miRNA前体。

实验表明,通过该方法构建的人工miRNA前体可以产生成熟的人工miRNA并且能有效地抑制相应靶基因的表达。另外,该研究还证明两个人工miRNA前体可以串联起来作为同一个顺反子表达,该顺反子产生的两种人工miRNA可以同时并有效地抑制其靶基因的表达,这为研究者同时抑制多个基因的表达提供了技术支持。这种技术改进可以使研究人员在较短的时间内批量构建人工miRNA前体。

该研究进展以[A new strategy for construction of artificial miRNA vectors in Arabidopsis](#)为题,在国际学术刊物*Planta* (2012, 235:1421-1429; DOI 10.1007/s00425-012-1610-5)上发表。

打印本页

关闭本页