



財團法人食品工業發展研究所

生物資源保存及研究簡訊

第24卷第4期

中華民國100年12月發行

補助單位：經濟部技術處 / 執行單位：財團法人食品工業發展研究所

本期內容

中心新聞 1

- ◎ 荷蘭CBS菌種中心所長來訪，簽署合作意向書
- ◎ 本所廖啟成副所長出席第八屆亞洲菌種聯盟大會
- ◎ 生資中心副主任黃效民博士參2011世界幹細胞高峰會議 (World Stem Cell Summit)

研發成果 3

- ◎ BCRC Vedio小教室簡介

知識專欄 5

- ◎ 簡介 Micro RNA研究與分析方式
- ◎ 簡介 microRNA於細胞再程式化的研究

荷蘭CBS菌種中心所長來訪，簽署合作意向書



▲ 本所與荷蘭CBS菌種中心簽署合作意向書，分別由簽約代表人CBS所長Dr. Crous及本所所長陳樹功博士簽屬合作文件。

(圖：生資中心 陳思齊先生提供)

Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) 為國際知名的生物資源中心，該中心隸屬於荷蘭皇家藝術和科學院 (Royal Netherlands Academy of Arts and Sciences, KNAW)，菌種資源收藏極為豐富，保存超過五萬株微生物菌種資源，其中主要是真菌菌種及部份酵母菌與細菌菌株。CBS近年來相當著重於菌株品質及正確性，推動DNA序列之生物條碼研究，因此本所生資中心執行經濟

部重要科技國際連結種子計畫「台荷真菌DNA條碼合作計畫」，與CBS研究人員互訪，建立長期合作平台，並邀請CBS所長Prof. Dr. Petro W. Crous來台參訪，簽訂雙方合作意向書，未來將共同致力於真菌命名的研究確認工作與分享條碼相關資訊。

(文：生資中心 陳倩琪 研究員)

本所廖啟成副所長出席第八屆亞洲菌種聯盟大會

第八屆亞洲菌種聯盟大會暨微生物保存與永續利用研討會於今年10月10日至11日於馬來西亞吉隆坡舉行，本所廖啟成副所長應邀出席，並於大會中以“整合資訊技術發展BCRC服務系統”為講題，介紹本所生物資源保存及研究中心(BCRC)的營運策略與活動概況。

亞洲菌種聯盟設立ABRCN(Asian Biological Resource Center Network)係彙整亞洲數個生物資源中心可公開分讓之生物資源的資料分享網絡，提供單一入口進行生物資源的資料檢索，目前資料主要來自日本生物資源中心NBRC(NITE Biological Resource Center, Japan)、中國普通微生物菌種保藏管理中心CGMCC (China General Microbiological Culture Collection Center, China)、韓國標準菌種中心KCTC (Korean Collection for Type Cultures,



▲ ACM8大會開幕誌慶。第八屆亞洲菌種聯盟大會暨微生物保存與永續利用研討會於馬來西亞吉隆坡舉行，由馬來西亞農業發展研究所 (Malaysian Agricultural Research and Development Institute)主辦

(圖：廖啓成副所長提供)

Korea)及泰國生物技術菌種中心 BCC (BIOTEC Culture Collection, Thailand)等，同時每年的年度會議並針對微生物資源的保存及永續利用進行意見交流及工作檢討。

第八屆年度會議於今年10月10日起在馬來西亞舉行，兩天的議程除了聯盟會員進行例行性的檢討外，並由聯盟會員進行各資源中心的營運或工作報告，並邀約亞洲其他非聯盟會員發表演說分享資源中心的營運管理。本所廖副所長以「整合資訊技術發展 BCRC 服務系統」為題發表演說，介紹 BCRC 在 ISO 國際驗證之系統管理下，以符合 ISO9001 及 ISO17025 精神下，致力於台灣本土資源之收集保存，並建立超過3萬株生物資源之分讓與至少150項相關技術服務，透過電子商務系統及管理資訊平台的建立與客製服務，協助台灣生技相關產業之品質管理、技術研發與產品驗證等活動。同時也積極投入國際合作，特別是全球或區域網絡的資料交換與分享，包括國際生物多樣性資訊機構 (Global Biodiversity Information Facility, GBIF) 及 StrainInfo 發展之全球虛擬資源中心目錄。BCRC 也建立以紅麴知識百科為基礎之知識分享平台，提供產官學研對產業用菌株之特性、技術研發產出及檢驗資訊等，更期待未來能多與區域網絡建立互動及合作關係，達成共贏的局面。

(文：生資中心 陳倩琪 研究員)

生資中心副主任黃效民博士參加 2011世界幹細胞高峰會議 (World Stem Cell Summit)

2011 第七屆世界幹細胞高峰會議 (World Stem Cell Summit)，於2011年10月3-5日在美國加州洛杉磯的帕賽迪納 (Pasadena convention center) 舉行，主辦單位為 Genetic Policy Institute (GPI) 和 California Institute for regeneration medicine (CIRM)，參加人數約400人，包括北美、南美、歐洲和亞洲區域的幹細胞相關人員，本所生資中心副主任黃效民博士參與會議，同時發表二篇論文 -- Alkaline Phosphatase-Positive Induced Pluripotent Stem Cells from Matrigel-coated Surface Selection，以及 A Defined Culture Condition for Human Embryonic Stem Cells。本次大會的主軸為「Translational Regeneration Medicine: from Bench to Bedside」，主要探討幹細胞應用於臨床治療的進展、商機和法規。大會除了邀請幹細胞研究領域專家進行專題演講外，同時加入更多商業化的考量和政策的配合等議題，提供 Science、Business、Policy、Funding、Law、Ethics、Advocacy 在同一平台上討論和交流，同時也有病患團體訴求等。

會議選在加州舉行，同時由 CIRM 共同舉辦，由於加州州民於2004年公投決議 (59% 贊成)，同意州政府投入30億美元資金於幹細胞的研究和應用，此即著名的加州第71號法案 (California's Proposition 71)。由於經費龐大，加州政府特別成立 CIRM 來統籌經費的規劃及使用等，使 CIRM 成為經費最為充裕的機構，希冀吸引全球頂尖的幹細胞研究人員到加州，發揮創意，同時提供友善的環境和法規，讓幹細胞相關的治療或商業應用可以發展，建立新的醫療技術、積極拯救病患，最終目的為帶動加州的生技醫藥經濟發展。

值得一提是大會特別邀請前英特爾 (Intel Co.) 執行長 Dr. Andrew S. Grove 進行專題演講，他在1979建立了 Intel 公司，成為全球半導體業的龍頭，制定電子業的新規格。演講中分享他的創新思考和商業經驗，並鼓勵重新思考成為「accidental pioneer of medicine」，作為破壞式創新醫療新技術的研究者。幹細胞在最新醫療具有相當大的潛力，所以政府及具前瞻的企業家應該更加投注於此領域的發展，雖然幹細胞研究由 bench (實驗桌) 進展到 bed (病床)，仍有許多需要克服和解決的困難，但已經是指日可待。

BCRC Vedio 小教室 簡介

生資中心／副研究員
楊瑤貞

細胞培養技術，一直是細胞相關實驗的重要基礎，實驗的正確操作，不僅影響細胞實驗的成功率與結果的可信度，更可以避免因為污染所造成的損失，所以歷年來，細胞單元持續的開授細胞培養相關的訓練課程，也與國衛院合作研究資源週的細胞品管和生物安全等課程，提供動物細胞培養、黴漿菌污染、細胞鑑定等講題，期望能讓操作細胞培養的研究人員擁有正確的觀念。但有鑒於實際操作對學員的感受與課程講授有一段差距，所以萌生了將這些操作或觀念拍攝成影片的想法，適逢國際第一大抗體製造公司亞諾法生技公司有意合作拍攝細胞培養操作相關影片，故本所即與亞諾法公司簽定合作意願書，共同完成細胞操作影片的拍攝，並以youtube為平台，作為公開教育訓練的一部分。

今年度已拍攝的影片，約可分為六個主題，下面就各主題作簡單的介紹：

一、細胞培養基相關

動物細胞在進行體外培養時，完全培養基 (complete medium) 是細胞養份的來源，完全培養基是以基礎培養基 (basal medium)，再額外添加各細胞所需的各種營養物質，其中血清是很重要的成分。因此基礎培養基與血清品質的管控相當重

要。在這個主題中我們拍攝的有：

1. 基礎培養基 (Basal Medium) 的配製
2. 血清的分裝與保存

二、細胞培養操作

細胞培養在操作從細胞解凍開始，觀察細胞的生長狀況，在其八-九分滿時進行繼代，同時必須做好冷凍儲存，才能開始進行實驗，因此這部分的影片包括有：

1. 細胞解凍
2. 細胞解凍 - 對DMSO敏感的細胞
3. 懸浮型細胞的繼代
4. 貼附型細胞的繼代
5. 貼附型動物細胞的冷凍儲存
6. 動物細胞的計數

三、冷凍裝置或設備的使用

細胞凍管製備完畢之後，必需以穩定的溫度下降，以使細胞在結凍的過程中受到最低的破壞，因此冷凍方式關係到細胞凍後細胞的存活及狀態，目前主要在使用的冷凍方式約可分為三種：

1. 冷凍裝置的使用 (Mr. Frosty, CoolCell and Styrofoam box)
2. 程式降溫儀的使用

3. 手動階段式降溫

四、收到活化細胞的處理

實驗室間細胞材料的相互提供是常見的，且生資中心持續有提供動物細胞株的活化培養的服務，因此我們也針對客戶收到活化細胞後的處理方式拍攝影片，希望能減少處理不當所造成的污染問題，按照細胞型態不同，處理上可分為：

1. 收到貼附型動物細胞的處理
2. 收到懸浮型動物細胞的處理

五、細菌、黴菌、黴漿菌污染檢測

細胞培養的另外一個課題，就是如何避免污染，污染源主要為細菌、黴菌或黴漿菌，一旦污染，即使沒有造成細胞死亡，也會影響細胞實驗結果的可信度，因此在實驗室建立污染檢測的系統，可以確認細胞品質，也可及早將有問題的細胞作處理，以免污染了同時在培養的其餘細胞。這部分影片包括：

1. TSB 培養基配置 (細菌、黴菌檢測用)
2. FTM 培養基配置 (細菌、黴菌檢測用)
3. 動物細胞培養樣品之細菌、黴菌污染檢測
4. 動物細胞培養樣品之黴漿菌污染檢測：直接培養法
5. 動物細胞培養樣品之黴漿菌污染檢測：DNA 染色法

六、人類胚胎幹細胞培養

從今年9月開始，我們也著手拍攝培養人類胚胎幹細胞的相關影片，從滋養層 (feeder layer) 的準備，到細胞的解凍觀察，以及繼代工具的製備；人

類胚胎幹細胞或是誘導型多能性幹細胞的培養，因為耗費的人力物力都較高，所以其訓練課程的費用也更高，相信未來若能將其培養及相關鑑定分析的實驗完整規劃呈現，會是很

有貢獻的研究資源。目前已經製作完成的影片有：

1. Gelatin 配製及使用
2. 玻璃刀製作

七、其他與細胞培養相關的檢測或實驗

1. MTT 分析
2. 生物安全操作櫃的落菌測試
3. 微生物凍乾管的開封與活化

實驗操作小技巧
微生物・細胞株・
活化・解凍・培養

值日生：

Aliquot and Preparation of Serum before Usage 血清的分裝及製備處理	Handling of Adhering Cells upon Receipt	Handling of Suspending Cells upon Receipt	Cell Freezing Equipment - CoolCell
Freezing of Adherent Cells	Cell Thawing	Cell Thawing for Cells Sensitive to DMSO	Cell Thawing_DMSO
Subculture of Suspension Cells	Subculture of Adherent Cells	Programmable Freezer	Mechanical Freezer
細胞培養基配置 如何進行細胞株培養基的製備，包括如何灌注二氧化碳氣體的應用，如何進行滲透壓及酸鹼度的檢測，無菌過濾分裝工作等，對需要培養細胞株的實驗者來說，該教學影片能正確指導如何配置。	微生物凍乾管開封活化 如何進行冷凍乾燥管的開封，覆水，用平板劃分法稀釋或以系列稀釋後，取得微生物之單一菌落	Mycoplasma Detection-Hoechst DNA Staining	Gelatin Preparation and Coating
Detection of Bacteria and Fungi in Cell Culture	Bioburden Test of BSC	Mycoplasma Detection-Direct Method	Making a Glass Knife
MTT Assay	Preparation of Fluid Thioglycollate Medium	Preparation of TSB Medium	

簡介Micro RNA研究與分析方式

生資中心／研究員
張育甄

小分子RNA與microRNA

由於分子生物學的進展，核糖核酸 (ribonucleotide, RNA) 分子除了大家過去所熟知在合成蛋白質所須的各種結構或訊息 RNA 分子 (rRNA、tRNA、mRNA) 外，科學家們發現有一些較小型的 RNA 分子可參與生物體內其他生理機制。這群小分子 RNA (small molecular RNA) 可分為在細胞核內負責 mRNA 剪切的 snRNA (small nuclear RNA)，或是在細胞質中負責控制基因表現的調控 RNA。在過去的十多年來，相關研究的累積使人們對於這群調控 RNA 了解越來越詳細，目前已可將其分為三類：microRNA (miRNA)、small interfering RNA (siRNA) 與 piRNA (Piwi-interacting RNA)。這些調控 RNA 大多在轉錄後經進一步修飾為成熟態後，藉由與 Argonaute (AGO) 蛋白質家族分子結合並被送至標的發揮調控作用，miRNA 與 siRNA 多與其中的 AGO 蛋白作用，而 piRNA 則與 Piwi 蛋白質結合。本文將藉由簡要地說明 miRNA 的形成、作用原理與其研究方法，介紹細胞中負責重要生理調控作用的 miRNA 分子。

miRNA 為目前調控 RNA 中

被了解最為詳細的小分子 RNA，miRNA 首先被發現於 1993 年，*Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) 幼蟲發育的一個重要基因 *lin-4* 中，具有一段無法轉譯出蛋白質的 non-coding RNA，此 RNA 含 22 個核苷酸，可互補於 *lin-4* 基因 3'-untranslated region (3'-UTR) 中 7 個核苷酸長度的 conserved region，這個小分子 RNA 可藉由抑制蛋白質轉譯直接調控本身的基因表現，*lin-4* 與其專一的轉譯抑制能力的發現使我們瞭解發育中的新調控機制。目前 miRNA 已被認為是真核細胞內豐富的調控性 RNA 分子，且已可在各個物種中發現他們的存在，但在動植物中的 miRNA 特性則具有顯著的差異。植物體內的 miRNA 與其調控基因通常需要完全互補才能發揮作用，因此植物細胞中個別的 miRNA 分子通常僅能調控一個或少數標的，且通常傾向於調控轉錄因子 (transcription factors)；然而動物細胞中的 miRNA 僅需藉由 5' 端的 7 個核苷酸分子 (seed sequence) 進行互補即可達成調控的目的，因此個別的 miRNA 在動物細胞中通常可以調控數十甚至數百個基因標的，可想見地動物細胞中所有的生物反應幾乎都可受 miRNA 的控制，因此也挑起了

miRNA 的研究熱潮。確實目前研究顯示發育偏差、細胞生長分化、生理代謝、病毒感染甚至癌症的產生都與 miRNA 的合成能力或機能不全相關。

miRNA 的生合成與作用機制

動物細胞中的成熟的 miRNA 總長多為 21-25 核苷酸的 non-coding RNA 分子，可於真核細胞染色體中發現專一序列，依其序列首先經 RNA polymerase II 轉錄出 stem-loop 結構的 primary miRNA (pri-miRNA)，再經由 RNase III endonuclease Drosha 與 Pasha 所形成的 microprocessor 複合物將 pri-miRNA 分解為長度約為 60~70 核苷酸的 pre-miRNA。Pre-miRNA 則藉由 Exportin 5 將其由細胞核運送至細胞質後，經 Dicer (RNase III endonuclease) 分解為成熟的雙股 miRNA duplex，RNA-induced silencing complex (RISC) 可將 miRNA duplex 雙股分離且與 active strand 其 5' 端以不穩定的氫鍵結合，另一互補股則隨即被分解。RISC-miRNA 複合物則藉由與 mRNA 進行 imperfect 結合進行 cis-regulation，以降低蛋白質的轉譯效率，或直接與 mRNA 結合使 mRNA 被分解，這些過程皆可讓標的基因的 mRNA 含量下降以達成調控基因表現的目的 (圖 1)。

雖然 miRNA 基因散佈於整個基因體上，然而目前可發現許多功能類似的 miRNA 會以 polycistronic 的方式同時表現，此外有將近一半上的 miRNA 序

列存在於受其調控的標的基因 intron 中，或與相鄰基因一同表現，甚至有些 miRNA 與相鄰基因可共用啟動子，這些特徵都顯示出 miRNA 與其標的 mRNA 作用的相關性。更因如此 miRNA 具有與其他 RNA 不同的特性，首先相同調控特性的 miRNA 會協同表現證明，miRNA 在生物發育上的可能具有相似的路徑，目前亦有直接的證據顯示 miRNA 在調控機制上的演化是先於單細胞與多細胞生物的分歧度。其次 miRNA 在不同的生物體中具有高度的序列保留性，且其 5' 端的 seed sequence 亦具有跨物種相似性，再者 miRNA 對於其調控的 mRNA 大多屬於群體調控而非單一標的。這些特點都證明了 miRNA 存在的重要性與其在生物演化與細胞生理上扮演的重要角色。不過由於病毒具有高度變異與演化快速的特性，即使屬於同一科 (family) 之下，大部分病毒中 miRNA 並未

能像其他生物中一般具有高度保留的一致性，目前推測可能是因為病毒需要快速的適應環境與宿主的變化而使其 miRNA 變異性大為提升，然而也因此使預測或發現新的病毒 miRNA 較其他物種困難的多。

調控 miRNA 的表現

基因的表現是複雜而受調控的，miRNA 的表現也不例外，miRNA 已被證實在個體發育或組織特異性中扮演著重要的角色，由此可知其生成或表現量高低必須受到嚴密的調控作用。由於成熟的 miRNA 片段需經多種酵素處理後才能產生，因此每個步驟都可能受到生理變化的影響而調控 miRNA 的表現，目前了解有些『雙股 RNA 結合蛋白質 (double strand binding proteins)』可藉由與 miRNA 結合來控制 miRNA 的轉能性。此外有文獻顯示 miRNA 的基因序列可因單一核

polymorphism, SNP) 的改變或轉錄分子的甲基化等特性，造成 miRNA 表現的差異。

由基因體中搜尋 miRNA

由於 miRNA 未能轉譯出蛋白質，如何從眾多的轉譯分子中找出正確的 miRNA 分子是研究人員遇到的首要問題。一般大致可由以下幾個特性作為尋找的依據：(1) 由於 miRNA 為 noncoding RNA 可表現但不轉譯，因此成熟的 miRNA 可藉由小分子 RNA library 中以南方轉漬法偵測出長度為約 22 個核鹼長度的片段。(2) 成熟的 miRNA 是由特定二級結構前趨產物 (如 hairpin 或 fold-back 結構) 發展而成，且 miRNA 為其中 hairpin 其中之 stem 部分，因此可觀察所取得之 miRNA 序列是否會形成正確的二級結構作為判斷標準。(3) 成熟的 miRNA 為 Dicer 作用後形成，因此在具有 Dicer 缺損的突變株中，應會造成該目標 miRNA 前趨產物的累積。以上特點成為一個理想的 miRNA 所需滿足的要件，目前用來開發未知 miRNA 的方法大致上可分為實驗導向或序列分析導向，前者主要是以實驗建立各小分子 RNA 片段，再利用生物資訊方式模擬其是否形成合乎 miRNA 標準之二級結構作為進一步的判斷；後者則先以電腦運算方式於基因體上預測出合乎結構之序列片段，再以實驗驗證此片段是否真實表現出所編碼之 miRNA。以下進一步就二方法詳細說明：

(A) 以實驗導向發掘新 miRNA 的方式可採正向遺傳學 (forward genetics) 或小分子 RNA library 進行。所謂正向遺傳學

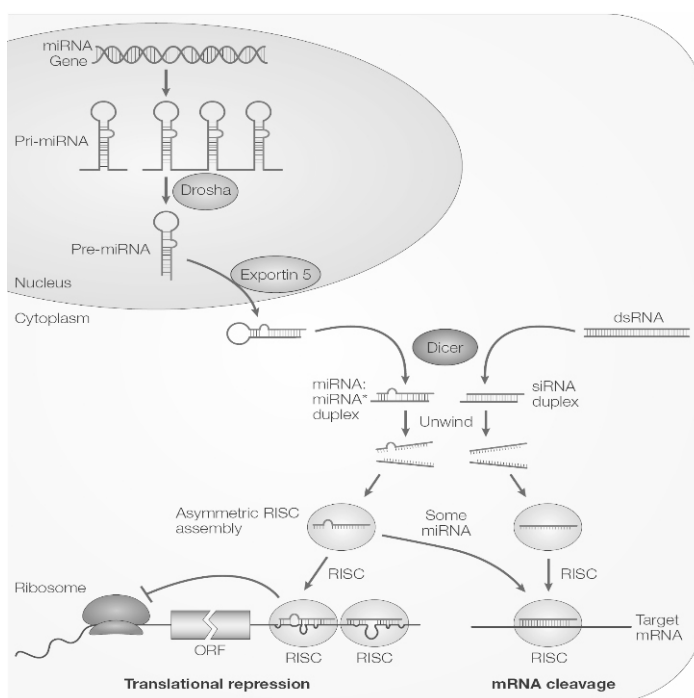


圖1、miRNA 合成與作用示意圖。

是利用觀察已發生的表型變化再研究其對應的基因變化，因此通常是發現生物或細胞生理上的特殊表型改變或生理狀態差異，進而分析出其對應的小分子RNA序列突變或缺損，此過程亦為最早鑑定miRNA的方式，例如由 *C. elegans* 中的 let-7、lin-4 等 miRNA 就是因為這些 miRNA 造成蟲體發育的改變而發現。然而因 miRNA 分子小且對於突變具有容忍度(若未能改變 seed-sequence 即無法影響其標的基因)，且許多 miRNA 即使被正確地突變或移除，由於標的基因可能受到許多不同的 miRNA 調控，使研究人員無法觀察到其表型上的改變，由此可知以正向遺傳學的方法來尋找新 miRNA 的方法效率著實不佳。目前實務上以小分子 RNA library 來發掘未知 RNA 已經成為較為研究人員所接受的實驗方式，過程為利用變性的聚丙稀膠電泳 (denaturing polyacrylamide gel) 將片段為 20-25 核 酸的 RNA 分離出並於 5' 與 3' 端加上轉接子 (adaptor) 後，再以 RT-PCR 的方式將片段放大並放入載體，建立出小分子 RNA library，個別的 cDNA clones 可依其定序結果利用生物資訊分析出其基因體上小片段 RNA 的原始編碼，但仍須排除其他結構性的 RNA 或僅為 mRNA 降解所剩之片段的可能性，進一步再預測該片段產生的二級結構是否符合 miRNA 所具有的特性用以作為最終之確認。然而此法常遭遇到較難發現在某些特殊狀態下低表現量或某些微量特殊細胞中所存在的 miRNA 的限制，不過由於分子生物學技術的進展目前這個問題可藉由深度定序 (deep

sequencing) 提高定序樣本的廣度與深度加以克服。此外另一個較難解決的困境在於，許多 miRNA 因其序列組成或轉錄後修飾等物理特性使其難以接上載體，而無法被建立於 library 中。因此以生物資訊作為立基點的序列導向分析方式近年來亦成為研究 miRNA 基因的重要研究主軸。

(B) 以序列導向方式尋找未知 miRNA 的方式其基礎需建立於完整的生物資訊分析之上。首先發展出的方式是以結構保留度作為篩選的依據，MirScan 這個軟體藉由鑑別出基因體上保留的 hairpins 結構的特性，已分別由線蟲與人類中找出 35 與 107 個新的 miRNA 標的，目前這些標的大多經實驗證明出他們的存在與作用。而後來發展出的 snarloop 或 miRSeeker 等亦都是以結構保留作為出發點設計，所用以進行 miRNA 標地搜尋的軟體。除了結構保留度之外，序列保留度亦為設計尋找 miRNA 標的重要演算法則之一。主要概念是以各轉錄分子 3'UTR 端高度保留的序列作為可能受到 miRNA seed sequence 的調控依據，進行互補搜尋，再加上結構分析並對照已知的 miRNA 資料庫藉此尋找未知的 miRNA。此外利用 miRNA 在熱動力學的穩定度 (thermodynamic stability) 亦可成為 miRNA 與其他 hairpin 結構物的區分識別依據，因 miRNA 摺疊時所需之自由能明顯地較其他具特殊二級結構之 tRNA 或 rRNAs 來的低，因此熱動力學的穩定度在預測不同生物體中的 miRNA 已成為重要的演算因子之一。近年來研究人員也發展出各種比對 (alignment) 的方

式，用以鑑定與已知序列或結構相近的 miRNA，然而需要注意的是若標的 miRNA 不具序列或結構的保留性仍使用 alignment 方式時，容易在使用此類型的運算中被忽略。為解決這個問題，目前也發展出「*ab initio* (重頭起算法)」的演算方式來尋找新的 miRNA，這個方法是集合各種 miRNA 應具有之特性(如摺疊自由能、平均 loops 大小、可能的 stem 長度等)，再將現有資料庫之數據輸入，加以訓練軟體區分出正確 miRNA 的演算能力後，即可將待預測之基因體資料輸入找尋可能為 miRNA 的序列。

以生物資訊的方式找尋出 miRNA 後，仍需進一步以實驗方式驗證，用以確認其是否表現出約為 22 核 酸長度的 miRNA 片段。欲實際了解 miRNA 在組織或細胞內的表現情形，目前可使用以下方式加以偵測：(1) microarray: 目前已有數家公司推出 microRNA 晶片分析服務，這些公司大多以 Sanger Institute (<http://microrna.sanger.ac.uk>) 所公開的 miRBase database 作為晶片探針的基礎資料庫。(2) Northern blot 或 quantitative real-time polymerase chain reaction (q-PCR): 合成特定的 probes 偵測細胞內特定 miRNA 的表現，亦可確認 miRNA array 的結果。(3) enzyme-linked immunosorbent assay: 使用特定且加以標記的 probes 進行特定 miRNA 的偵測，此法亦可進行大量偵測。

由基因體中搜尋 miRNA 的標的

microRNA 的 標 的 預 測

(micorRNA target prediction)

miRNA在演化上具有高度保留的特性，且在不同種類細胞中表現出不同 expression profiles，這個現象顯示 miRNA在調控系統中扮演重要的角色。由於 miRNA為重要的調控分子，因此進行各種基因表現的相關研究時，針對可對目標基因調控的相關 miRNA 進行分析與探討，已成為一門重要的課題。miRNA 與 target gene 大多以 imperfect 的方式結合，其至少會有一個核苷酸的差異。這種 imperfect 的結合方式使 miRNA 與 mRNA 間的相互作用更有彈性，研究顯示同一 miRNA 可調控不同的 mRNA 轉錄，而不同的 miRNA 也有可能與同一 mRNA 結合進行作用，因此 miRNA 與其調控的目標基因間的關係可能極為複雜(圖 2)。然而這種 imperfect 的結合使得預測 miRNA 序列或 miRNA 作用的標的 mRNA 成為一種挑

戰，因此許多生物資訊學家紛紛投入相關的研究行列，目前已有多種搜尋軟體或資料庫可供生物研究人員使用。

由於 miRNA 對於基因表現具有重要的調控功能，藉由電腦分析或實驗證實，在人類細胞中已發現數百種 miRNA，且應有超過 30% 的蛋白質可被 miRNA 所調控。然而在預測 miRNA 的作用標的方面時由於尚未有足夠的 miRNA 作用標的群組來作為預測的 training set，且確認 miRNA 作用標的的驗證實驗較為複雜，因此預測 miRNA 作用標的的困難度較預測未知 miRNA 來得高。目前預測 miRNA 作用標的方式大部分採用 empiric evidence 而非 mechanism learning 運算，包括 (1) binding-site mechanics: microRNA 序列中 5'端約第 2-8 核苷酸的 seed region 是其 target mRNA 的重要結合部位，且其 5'端通常不互補或 flanked by

adenosine。(2) 3'-end 互補：以 miRNA 作用位置多在 mRNA 3'-UTR 作為搜尋的標的，尋找可 imperfect binding 的區域。(3) multiple binding site: 目前研究結果顯示在同一 mRNA 上可能會有多處的 miRNA 結合部位，以達到抑制 mRNA 轉譯的結果。因此比對 mRNA 上是否具有多處 miRNA 結合序列亦是重要考慮因素。(4) Target mRNA structure: 目前研究結果指出，mRNA 上 miRNA 結合部位的二級結構將是 miRNA 是否能順利結合的重要原因之一，所以對於 mRNA 序列中 miRNA 的結合部位區域需具有較低的 free energy、且不具過於穩定的結構(如 stem)等特性。

然而截至目前為止尚未有任一種方式可大量且快速地精確找出 miRNA 作用標的，因此預測出結果後，仍須以生物性的方式進行驗證，只是現今仍缺乏 high-throughput 的生物性標的確認方式。目前常用的方法包括 (1) reporter-gene constructs: 將預測出的 target mRNA 其 3'-UTR 部分構築於 luciferase 或 green fluorescence protein (GFP) 之後並加以 mutation，比較出突變前後二者表現量的差異。(2) gene-silencing technique: 藉由送入 miRNA 的 2'-O-methyl antisense oligo-ribonucleotides 後觀察預測標的基因表現是否因此改變。這些生物資訊與分子生物學的實驗，可更加確認生物體內 miRNA 對於標的基因的調控關係。

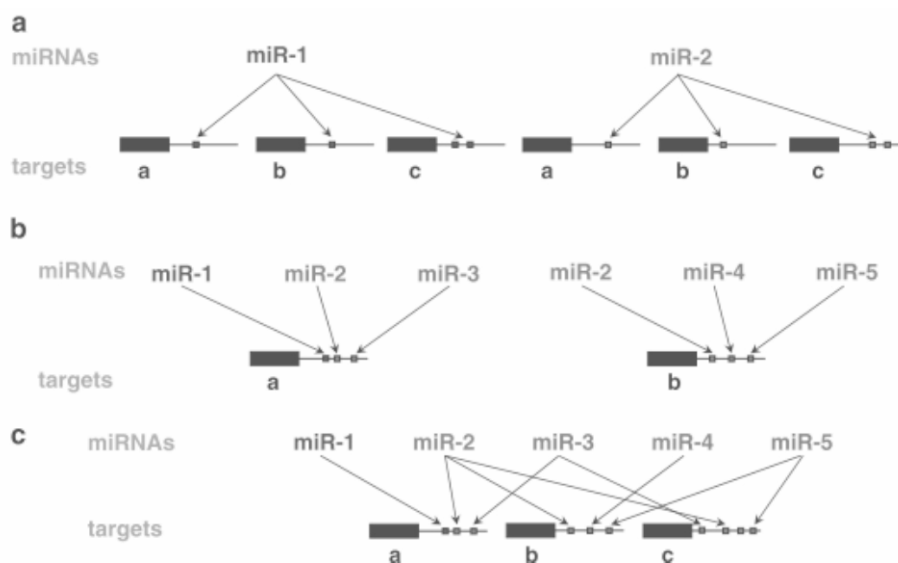


圖2、miRNA對標的基因的調控方式。

- 同一miRNA調控多個基因。
- 多個miRNA調控同一基因。
- miRNA與調控標的基因為複雜網絡狀關係。

miRNA調控著為數眾多的 mRNA，而其本身亦被眾多因子所調控著，這其間的複雜關係為近年來科學家欲解開生物

基因體的重要拼圖之一。越來越多的研究成果顯示 miRNA 在基因控制上扮演舉足輕重的角色，目前 miRNA 的研究大多用於了解細胞發育、生理調控或疾病產生等方面的基礎研究上。在分子生物學與次世代定序技術發展之下，不同物種中新的 miRNA 正快速地被發現並鑑定，相信在研究人員的努力之下，miRNA 將成為未來生物與醫學上研發的重要利器。

參考文獻

1. Bentwich I, Prediction and validation of microRNAs and their targets. *FEBS Lett.* 2005; 579(26):5904-5910.
2. Berezikov E, Cuppen E, Plasterk RH. Approaches to microRNA discovery. *Nat Genet.* 2006;38 Suppl: S2-7.
3. Cai Y, Yu X, Hu S, Yu J. A brief review on the mechanisms of miRNA regulation. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2009;7(4):147-154.
4. He L and Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet.* 2004;5(7):522-31.
5. Lewis BP, Burge CB, and Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell.* 2005;120(1): 15-20.
6. Lewis BP, Shih IH, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell.* 2003;115(7): 787-798.
7. Peter ME. Targeting of mRNAs by multiple miRNAs: the next step. *Oncogene.* 2010;29, 21612164.

簡介microRNA於細胞再程式化的研究

生資中心／副研究員
陳瓊雲

多能分化潛(pluripotency)

細胞的再程式化(reprogramming)，其意義與目的是指讓成體細胞轉換成為具有多能分化潛能特性的細胞的過程。成體細胞組成建構生物體的軀體，內部器官、皮膚、骨骼、血液與結締組織等；隨著有限的細胞生命週期，成體細胞最終均會走向老化與凋亡。具多能分化潛能之意，代表細胞就其功能性而言，具有使細胞可分化形成胚胎中的三種胚層(germlines)的細胞種類之能力，內胚層(endoderm)、中胚層(mesoderm)與外胚層(ectoderm)此三種胚層。於胚胎的早期，自囊胚期(blastocyst)到原腸胚時期(gastrula stage)，胚胎涵蓋一群具有多能分化潛能的細胞，但於胚胎的晚期即無法持續的保有這群具有分化出三種胚層的多能分化潛能的幹細胞。而胚胎幹細胞指的是具有多能分化潛能的，並另具有自我更新與無限分裂增生具有多能潛能的細胞之特性。以分子的觀點，要了解定義哪些支持多能潛能的功能特性的分子參與，須經由更多的發育學研究與幹細胞生物學的研究舉證。⁽¹⁾

多能分化潛能的幹細胞的存在

多能分化潛能的幹細胞的存在，也使得許多人開始期許如何使用幹細胞無限分裂的細胞來源，應用於再生醫學中臨床治療的新組織的開發應用。多能分化潛能的細胞株，最早成功由老鼠胚胎不同時期分離而來。不論是利用形成胚球體、畸胎瘤與嵌合體老鼠試驗來佐證，已全都被驗證這些多能分化潛能的細胞株具有可以分化誘導成為成體組織所有不同種類的細胞，對其所在的組織器官有著重建和修復的功能。目前研究最多的多能潛能的細胞株，是分離自老鼠與2008年分離自人類胚胎囊胚期之內細胞團的胚胎幹細胞^(2,3,4)。不論是針對這些細胞株具有的多能分化潛能或自我更新與無限分裂的特性，有關胚胎幹細胞的建立、培養維持、基因分化調控等相關技術與機制，皆是非常活耀與受注目的熱門研究。

細胞再程式化(cell reprogramming)

在2006至2007年，日本京都大學的研究學者Shinya Yamanaka證明，他們僅利用四種基因Oct-4、Sox2、c-myc、Klf4導入，就能將老鼠與人類皮膚細胞再程式化成為具有多能分化潛能與尚未成熟的胚胎般狀態，那能使該皮膚細胞轉

變成具有分化形成任何類型的細胞的能力，具有類似胚胎幹細胞的多能分化潛能特性，並將這些誘導新生的細胞稱為誘導型多能幹細胞 (induced pluripotent stem cells, iPS cells)。同時 2007 年美國研究學者 James Thomson 也發表利用除了相同的 Oct-4、Sox2 基因另外組合加入 nanog、Lin28 的 4 種基因組合，也可以將人類成體細胞再程式化轉變為類似胚胎幹細胞。藉由特定已知幹細胞相關的轉錄因子基因之表現與調控，誘導體細胞進行再程式化轉變為具有多能分化潛能之幹細胞的技術，開啓新一波幹細胞研究熱潮。利用轉錄因子誘導使體細胞再程式化的過程其成功率與效能很低，但大幅度跨越將體細胞轉變為具有多能分化潛能幹細胞的技術門檻。以轉錄因子作為標的進行細胞內再程式化建立的技術研究發明，提供解決來自人類胚胎幹細胞株醫學臨床應用中的組織免疫排斥的問題，但仍存在 iPS 細胞使用的安全風險。因為 Shinya Yamanaka 導入的 c-myc 基因即是一個致癌基因，其利用病毒為載體將轉錄因子基因轉染放入體細胞內表現，以此產生的 iPS 細胞因具有 c-myc 基因而產生癌化的風險，且若要應用於臨床上使用需考量是否有安全疑慮。2008 年 Shinya Yamanaka 剔除 c-myc 基因的轉染條件下，僅 3 個轉錄因子仍可成功建立 iPS 細胞。近幾年，其他科學家藉由傳遞這些基因所編碼而成的蛋白質導入到成熟的細胞內，在人類細胞中也達成同樣的結果，不過那種程序比起 Shinya Yamanaka 利用 DNA 載體再程式化的方式更加昂貴、更低的效率與耗時。

MIT 研究人員首度證明，他們能使用 RNA 來傳遞相同的再程式化基因。但這也表示建立 iPS 細胞，除了可透過 DNA 基因導入方式，蛋白質或 RNA 等其他的方式的導入，應也可能應用於建立 iPS 細胞。

胚幹細胞相關的 microRNAs 表現

MicroRNAs, 可簡稱 miRNAs。屬於一群約 20 至 25 核苷酸大小，為近年發現之胞內不轉譯的 RNA 小分子。過去認知的 RNAs 為主要參與基因表現中 DNA 遺傳訊息傳遞，經轉錄 mRNA、rRNA、tRNA 再轉譯至蛋白質的過程。但小分子的 microRNA 雖然不轉譯出蛋白質的分子，但其會與細胞質中的標的 messenger RNAs (mRNAs) 序列互補產生不完美

的結合，miRNAs 藉由與 mRNAs 的結合來調控 mRNAs 是否可被轉錄出來，或者 miRNAs 直接抑制被結合的 mRNAs 被轉譯為蛋白質，藉此調節細胞內基因的表現，由此可知 microRNA 於細胞內參與基因調控的重要性。已知的 miRNAs 有數百種，每一個 miRNA 表現具組織特異性，miRNAs 在細胞內的調控機制並不清楚。研究分析顯示不論老鼠或人類的胚胎幹細胞於自我更新過程與細胞多能分化能力的調控，miRNAs⁽⁷⁾ 也參與其中的調控如表 2 所示。主要調控胚胎幹細胞的轉錄因子多與表現 miRNAs 的啟動子有相關聯，例如 microRNA 302 (mir-302) 其標的基因主要為發育或致癌相關基因的轉錄因子，對人類胚幹細胞專一之轉錄因子 Oct-4 與

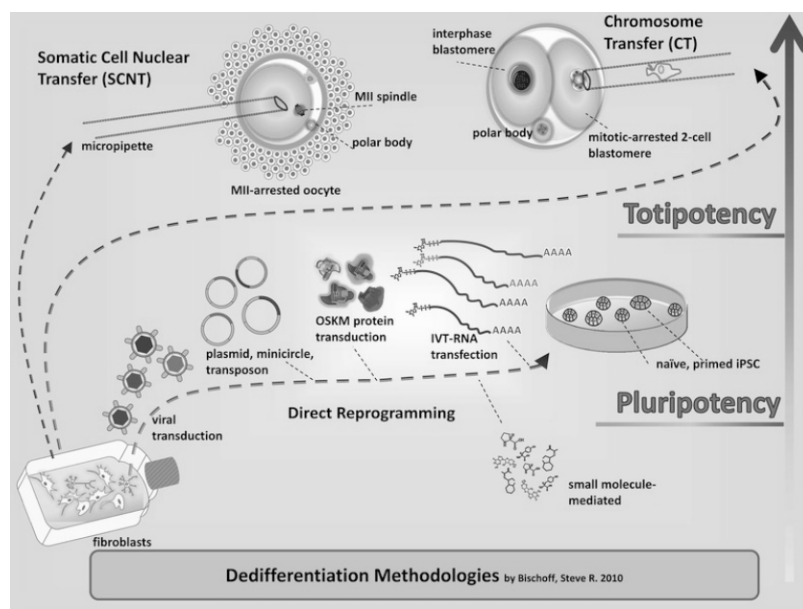


圖1、體細胞經再程式化或去分化(dedifferentiation)過程，取得具全能或多能分化潛能細胞的方法有(1)利用體細胞核轉殖技術(SNCT)的1997年Wilmut複製羊Dolly，(2)染色體轉殖技術(chromosome transfer)，(3)直接再程式化誘導：誘導媒介OSKM基因經病毒載體轉染、或質體、minicircle、trasposon、導入OSKM蛋白質、加入小分子誘導或IVT-RNA等誘導。⁽⁵⁾

Sox-2具正向的調控^(8,9)，miR-302表現於人類之胚幹細胞株與誘導型多能性幹細胞(iPSC)中，但不表現於已分化之成體細胞^(10,11)。藉由調控細胞內的microRNAs表現，例如降低mir-302之表現將導致人類胚幹細胞走向分化⁽¹⁰⁾。相反的，若增加

成體細胞特定的microRNA表現，可達到誘導細胞再程式化的進行^(10,11,12,13)。

microRANs應用於體細胞在程式化的現況

目前幹細胞的建立，主要來自胚胎或體內組織分離而來，

或由成體細胞經轉染Oct-3/4、Sox-2等1至4個轉錄因子或輔以加入volproic acid化學藥劑作用刺激，促使啟動細胞的再程式化程序，促使形成具有多能分化潛能的iPSCs細胞。今年Morrisery研究團隊，發表最新的高效iPS細胞的建立技術，利用由miR-302與miR-367組成之一群microRNAs集合，成功誘導老鼠與人類體細胞形成具有類似OSKM四種因子誘導之iPS細胞，miR302/367誘導活化Oct-4基因的表現並抑制Hdac2，最終證實該細胞成功的被再程式化成具有多能分化潛能的標記表現與畸胎瘤形成能力的細胞，此miRNAs的方法其再程式化效能較OSKM的0.2%-1%成功率高100倍效能^(14, 15)。另於今年五月Blelloch團隊發表於Nature Biotechnology期刊，同樣利用一群microRNA集合，miR-302與miR-372，也成功將老鼠體細胞成功再程式化為iPS細胞⁽¹⁶⁾。這些參與的miRNAs群主要轉錄自2種基因座:miR-302/367、老鼠中的miR-290-295或miR-371-373。因為這些胚幹細胞專有表現的miRNAs皆擁有相當相似的5'端序列(seed sequence)，可能在參與標的基因的作用功能是相重複的。雖然這些miRNAs於細胞內作用的機制尚不明朗，已知miRNAs同時參與作用細胞內多種不同的基因標的，包含細胞週期、上皮與間葉系細胞轉換(epithelial-mesenchymal transition, EMT)、表現基因的調節(epigenetic regulation)與泡膜運輸(vesicular transport)，見圖2⁽¹⁵⁾。利用microRNAs，miR-302與miR-367對體細胞主要的

表1、胚胎幹細胞的未分化與已分化胚球體的有差異表現miRNAs。⁽⁶⁾

Table 1. miRNAs from Undifferentiated and Differentiated ES Cells													
ID*	Sequence*	Observations ^c			Length ^d				Hits ^e	Expression ^f	Conservation ^g		
		L1	L2	L3	Average	Maximum	Minimum	Rmsd			Hs	Rn	Fr
let-7d-as	CUAUAGACCUGGCGCCUUUCU	1	0	0	22	22	22	0.0	1	S00S0			
miR-34a	AGGCAGUGUAGUUGCUGAUUGC	1	0	0	23	23	23	0.0	1				
miR-34b	UAGGCAGUGUAGUUGCUGAUUG	0	0	1	23	23	23	0.0	1	00000			
miR-106a	CAAAUGUCUACAGUGCAGGUA	0	1	0	22	22	22	0.0	1				
miR-106b	UAAAGUCUGACAGUGCAGAU	1	0	0	21	21	21	0.0	1				
miR-130b	CAGUGCAAUGAUGAAAGGCAU	1	0	0	22	22	22	0.0	1	22221			
miR-290	CUCAAACUAGUGGGGACUUUUU	2	2	1	22	23	22	0.4	1	01110	Hs	Rn	
miR-291-a	CAUCAAAGUGAGGCGCCUCUCU	1	1	0	23	24	22	1.0	1	Rn			
miR-291-as	AAAGUGCUUCCACUUUGUGGCC	6	1	0	22	23	22	0.3	1	01110		Rn	
miR-292-a	ACUCAACUGGGGCGCUCUUUG	1	1	1	22	23	21	0.8	1	01110	Hs		
miR-292-as	AAGUGCCGCCAGGUUUUGAGUGU	2	0	0	22	23	22	0.5	1	01220	Hs	Rn	
miR-293	AGUGGCCAGAGUUUGUAGUGU	4	1	1	22	22	21	0.4	1	01110			
miR-294	AAAGUGCUUCCUUUGUGUGU	4	0	2	22	23	22	0.4	1	01120			
miR-295	AAAGUGCUACUACUUUGAGUCU	3	0	0	22	23	22	0.5	1	01120		Rn	
miR-296	AGGGCCGCCCGCAUACUCUGU	0	0	1	21	21	21	0.0	1	01110	Hs		
miR-297	AUGUUAUGGUGCAUGUGCAUG	0	0	1	21	21	21	0.0	20	00010	Hs	Rn	
miR-298	GGCAGAGGAGGCGUGUUCUCC	0	0	1	22	22	22	0.0	1	SSSS0			
miR-299	UGGUUUUACCGUCCACAUACAU	0	0	1	22	22	22	0.0	1	00000		Hs	Rn
miR-300	UAUGCAAGGGCAAGCUCUCUUC	0	2	0	22	23	22	0.5	1	00000		Rn	
miR-301	CAGUGCAAUGUUAUUGCAAAGC	0	0	1	23	23	23	0.0	1	00021	Hs	Rn	Fr
miR-302	UAUGUGCUUCCAUUUUGUGUGA	0	0	1	23	23	23	0.0	1	00110	Hs		
let-7c	UGAGUGUAGUGGUGUAGUGUUA	3	0	0	22	23	21	0.8	1	200S1			
miR-15a	UAGGACACUAUAUUGUUGUUG	2	0	2	23	23	22	0.4	1	11121			
miR-15b	UAGCAGCACUAUGGUGUUAUC	1	0	0	21	21	21	0.0	1				
miR-16	UAGCAGCACGUAUAUUGGCGG	5	0	2	21	22	20	0.7	2	11121			
miR-18	UAAGUGUCAUUGAGCAGAUUA	1	1	0	21	22	21	0.5	1				
miR-19b	UGUGCAAUCCAUUGCAAAACUGA	3	1	1	22	23	22	0.5	1	05551			
miR-20	UAAGUGCUUUAUGUGCAGUGAG	2	1	0	22	23	22	0.5	1				
miR-21	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGAC	11	1	10	22	23	18	1.1	1	91153			
miR-22	AAGUGCCAGUUGAAGAACUGU	1	0	1	22	22	22	0.0	1	91185			
miR-24	UGGUCAGUUCAGCAGGAACAG	0	0	1	22	22	22	0.0	2	20021			
miR-27a	UUCACAGUGGCUAAGUUCGCG	1	0	1	21	21	21	0.0	1	10011			
miR-29a	UAGCACAUCUGAAUUCGUGUA	2	0	0	22	22	22	0.0	1	10001			
miR-29b	UAGCACAUCUUGAAUUCAGUGU	5	0	0	23	23	22	0.5	2	10001			
miR-30e	UGUAAACAUCCUUGACUGGAAGC	1	0	0	23	23	23	0.0	1				
miR-31	AGGCAGAUUGGUGCAUAGCUG	2	0	0	22	22	22	0.0	1				
miR-92	UAUUGGACUUGCCGCGCCUG	2	0	4	21	22	17	1.8	1	01120			
miR-93	CAAAUGGUGUUGGUGCAGUAG	2	1	1	22	23	22	0.5	1	01110			
miR-94	UAAAGUGCUGACAGUGCAGAU	1	0	0	21	21	21	0.0	1				
miR-96	UUUGGACUAGCACAUAUUUUGCU	0	0	1	23	23	23	0.0	1	01110			
miR-99b	CACCCGAGAAGCCAGCCUUGCG	0	0	1	22	22	22	0.0	1	S00S0			
miR-124-a	UAAGGCACGCGUGAUAUGCCA	2	1	0	20	21	20	0.5	3				
miR-127	UCGGAUCCGUGCAGUGUUGCUA	1	0	0	23	23	23	0.0	1				
miR-130	CAGUGCAAUGUUAAGGGCAU	5	3	4	22	25	22	0.8	1	11111			
miR-141a	UAACACUGUCUGUUAAGAUUGCC	0	0	2	23	24	23	0.5	1	000S0			
miR-142s	CCCAUAAAGUAGAAAGACUA	1	0	0	21	21	21	0.0	1	00000			
miR-142-as	UGUAGUUUUCUACUUUAUGGA	1	1	0	22	23	22	0.5	1				
miR-143a	UGAGUAGAACGACUGUAGCUCUA	1	0	0	24	24	24	0.0	1				
miR-172	UGGCAGUGUCUAGCUGUGUUGU	3	2	2	21	23	16	2.2	1	10010			
miR-183	UAUGGCACUGUAGAAUUCAC	0	0	1	21	21	21	0.0	1	SSSS0			
miR-193	AACUGGCCUACAAAGUCCAGU	1	0	0	22	22	22	0.0	1	S00S1			
miR-198-a	CCGAGUUUACAGACUACUUGUUC	3	0	0	22	22	22	0.5	2	10001			
miR-198-as	ACAGUAGUCGACAUUGGUUA	2	0	0	22	22	22	0.0	3	20001			

*miRNAs experimentally determined for the first time in this study are listed first. The letters "s" and "as" designate miRNAs excised from the 5' and 3' strands of the same hairpin stem respectively, according to Lagos-Quintana et al. (2002).

^bThe longest clone that matches perfectly the mouse genomic sequence is given.

^cNumber of observations in libraries L1, L2, and L3

^dAverage, maximum and minimum lengths. Rmsd, root-mean-square deviation from the average.

^eNumber of genomic hits.

^fExpression patterns by Northern analysis. Single digit numbers indicate the approximate relative band intensities as shown in Figure 2 and give no information about the relative levels of different miRNAs. S indicates the presence of a smear that precluded detection of the miRNA.

^gFor miR-290-miR-302, which do not have previously reported homologs, the presence of conserved stem loops in the human (Hs), rat (Rn), and pufferfish (Fr) genomes is indicated.

表2、參與胚胎幹細胞的自我更新能力與多能分化能力表現相關的miRNAs。⁽⁷⁾

Table 1 RNAs identified in various kinds of stem cells			
Stem cell process	Cell type or lineage	miRNAs involved ^a	Targets ^b
ES cells			
Self-renewal	Mouse ES cells	miR-290-295 cluster, miR-296, miR-302 (REF. 13), miR-17-92 cluster and miR-15b-16 cluster ^c	No targets identified
	Human ES cells	miR-371, miR-372, miR-373*-373, miR-200c, miR-368 and miR-154* (REF. 19)	No targets identified
Differentiation	Mouse ES cells	miR-21 and miR-22 (REF. 13)	miR-21 targets Nanog and Sox2 (REF. 26)
	Human ES cells	miR-301, miR-374, miR-21, miR-29b and miR-29 (REF. 19)	No targets identified

再程式化轉錄因子的基因調控機制並未全面了解⁽¹⁶⁾。但相較於利用OSKM建立的iPS含有外源基因與致癌基因c-myc的細胞，存在形成癌化的安全性風險，以miRNAs建立之細胞則無癌化安全疑慮，且避免hES倫理爭議與iPS安全性疑慮，提供新的技術與方法。

參考文獻

1. Relston A and Rossant J. 2010. The Genetics of induced pluripotency. *Reproduction* 139: 35-44.
2. Evans, MJ and Kaufman, MH 1981 Establishment in culture of pluripotential cell from mouse embryos. *Nature* 292: 154-156.
3. Martin, GR. 1981 Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratoma stem cells. *PNAS* 78: 7634-7638.
4. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS and Jones JM. 1998 Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282: 1145-1147.
5. [http://en.wikipedia.org/wiki/File:Dedifferentiation_Methods_\(2010\)_-_Bischoff,_Steven_R.tif](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Dedifferentiation_Methods_(2010)_-_Bischoff,_Steven_R.tif)
6. Houbaviy HB, Murray MF and Sharp PA. 2003 Embryonic stem cell-specific MicroRNAs. *Developmental Cell* 5: 351-358.
7. Gangaraju VK and Lin H. 2009. MicroRNAs: key regulators of stem cells. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology* 10: 116-125.
8. Card DA, Hebbard PB, Li L et al. 2008 Oct4/Sox2-regulated miR-302 targets cyclin D1 in human embryonic stem cells. *Mol. Cell. Biol.*, 28: 6426-6438.
9. Marson A, Levine SS, Cole MF, et al. 2008 Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Cell*, 134: 521-533.
10. Wilson KD, Venkatasubrahmanyam S, Jia F. et al. 2009. MicroRNA profiling of human-induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev.*, 18: 749-758.
11. Lin SL, Chang D, Chang-Lin S. et al. 2008. Mir-302 reprograms human skin cancer cells into a pluripotent ES-cell-like state. *RNA*, 14: 2115-2124.
12. Mallanna SK and Rizzino A. 2010. Emerging roles of microRNAs in the control of embryonic stem cells and the generation of induced pluripotent stem cells. *Developmental biology*, 344: 16-25.
13. Hanna JH, Saha K and Jaenisch R. 2010. Pluripotency and Cellular Reprogramming: Facts, Hypotheses, Unresolved Issues. *Cell* 143: 508-525.
14. Anokye-Danso F, Trivedi CM, Juhr D. et al. 2011. Highly Efficient miRNA-Mediated Reprogramming of Mouse and Human Somatic Cells to Pluripotency. *Cell Stem Cell* 8: 376-388.
15. Chang HM and Gregory R. 2011 MicroRNAs and reprogramming. *Nature Biotechnology* 29: 499-505.
16. Subramanyam, D., Lamouille, S., Judson, R.L., Liu, J.Y., Bucay, N., Derynck, R. and Belloch, R. 2011. Multiple targets of miR-302 and miR-372 promote reprogramming of human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology*, doi:10.1038/nbt.1862

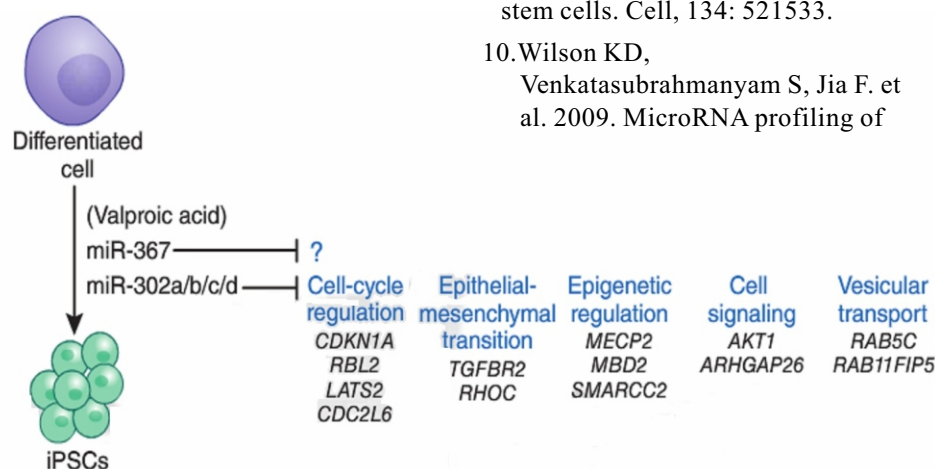


Figure 1 Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency with miRNAs. Differentiated cells can be reprogrammed to iPSCs by expressing the miR-302/367 cluster of miRNAs¹. For mouse cells, valproic acid is also required. Multiple downstream target genes of miR-302 have been identified³, but the targets of miR-367 remain unknown.

生物資源保存及研究簡訊 第88期

發行者：財團法人食品工業發展研究所
發行人：陳樹功所長
主編：陳倩琪
編輯：王俐婷、黃麗娜、陳美惠、廖麗娟

本著作權依補助契約歸屬財團法人食品工業發展研究所

地址：新竹市食品路331號
電話：(03)5223191-6
傳真：(03)5224171-2
承印：彥光打字印刷商行
電話：(03)5301116
ISSN:1021-7932
GPN:2009001214
中華郵政新竹誌字第0030號
交寄登記證登記為雜誌交寄

