

計畫編號：MOHW103-CDC-C-315-000104

衛生福利部疾病管制署一百零三年度科技研究發展計畫

瘧原蟲微小核糖核酸之探討
Investigation of malaria microRNA

研究報告

執行機構：疾病管制署研究檢驗中心

計畫主持人：黃志傑

協同主持人：林威辰、嵇達德

研究人員：江政剛

執行期間：103年1月1日至103年12月31日

本研究報告僅供參考，不代表本署意見，如對媒體發布研究成果應事先徵求本署同意

目錄

| | 頁碼 |
|---------------|------|
| 封面 | |
| 目錄 | (2) |
| 摘要 | (3) |
| 前言 | (5) |
| 材料與方法 | (9) |
| 結果 | (12) |
| 討論 | (15) |
| 結論與建議 | (17) |
| 計畫重要研究成果及具體建議 | (18) |
| 參考文獻 | (19) |
| 圖表 | (20) |

共 (24)頁

中文摘要

微小核糖核酸 (microRNA) 是一群不會轉譯為蛋白質的小片段核糖核酸。在多細胞真核生物中，它們在調控細胞內基因轉譯蛋白質的機制上扮演了重要的角色。目前在大部分的真核細胞生物，寄生性原蟲也不例外，已有確切的實驗證據證明其存在，在基因表達調控中有著廣泛的重要作用。本計畫將藉由次世代基因表現定序技術 (Next generation sequencing)，尋找寄生於人類紅血球中瘧原蟲的微小核糖核酸，結合生物資訊方法確認所找出的微小核糖核酸在基因體中的位置，進一步模擬這些瘧原蟲微小核糖核酸之髮夾狀前導體 (precursor) 結構以及分析它們的特性。找出瘧原蟲在紅血球寄生時期表現的微小核糖核酸後，再利用即時定量聚合酶連鎖反應 (Real-time PCR) 於其他檢體再次確認其表現。這些微小核糖核酸的發現可能成為影響瘧原蟲致病性、治療藥物的標靶以及快速篩檢試劑的目標基因。本研究將由疾病管制署與成功大學共同合作。

關鍵詞：瘧原蟲、微小核糖核酸、基因體、次世代基因表現定序技術

英文摘要

MicroRNAs are a group of small fragments of RNA which cannot be translated into proteins. In multicellular eukaryotes, they play a significant role in the regulation of protein translational mechanisms in cells. Parasitic protozoa are no exception. There are indeed some experimental evidences prove their presence in the regulation of gene expression in parasites. This project will search the microRNAs in Plasmodium parasites by using the next generation sequencing technology, and combining with bioinformatics methods to confirm the locations of these microRNA genes in the genome. These microRNAs will be further simulated the hairpin-like structures from the precursor sequences, and analyzed for their characterizations. The microRNAs identified from Plasmodium parasites in red blood cells will be confirm their expression by the quantitative real-time polymerase chain reaction. The finding of these microRNAs may contribute to understanding of the parasite pathogenicity, and identifying the therapeutic drug and rapid diagnostic target genes. The project will be hold by Taiwan CDC and National Cheng Kung University together.

Keyword: malaria, microRNA, genomic, Next generation sequencing

前言

瘧疾

瘧疾為世界上最重要的傳染病之一，1993年WHO度報告指出，全球40%人口身處疫區，全球每年約有十億人口感染瘧疾，每年死於瘧疾人數逾二百萬人，所耗社會資源難以算計。2004年的Global Malaria Report更指出全球瘧疾感染有不減反升的現象(WHO, 2005)。台灣地區雖早已根除瘧疾，但仍處於「保全階段」的瘧疾防疫期，台灣境內雖無瘧原蟲存在，然東南部及東部的部份山區仍有矮小瘧蚊滋生，仍可能傳播瘧疾，2003年台東縣太麻里連續發生兩起惡性瘧本土性感染即為一例。因此，對於瘧疾境外移入病例的篩檢、根本治療及追蹤，即為防治工作最重要的一環。2003年起更增加入境旅客機場熱患篩檢，已減少瘧疾入侵的機會。世界衛生組織建議如台灣等主要瘧患為境外移入者之病例稀少區域，瘧疾診斷應以實驗室檢驗為主(WHO, 2005)。台灣現在的瘧疾病例多為境外移入，經初步分析，八成病例皆為單一病原(single clone)感染，仍有少數為混合感染(mixed infection；至少兩種以上瘧原蟲感染)，檢驗鑑定上採取種別確認及基因分型，可對臨床病例做初步預測及妥善治療。

微小核糖核酸

微小核糖核酸是近幾年在真核生物細胞中所發現的一類具有調控基因表現功能的單鏈(single-strand)、非編碼(non-coding)、大小約21-23個鹼基的小分子RNA，主要是由基因中之非編譯區域中透過獨立的轉錄作用產生，已經被證實可參與它的目標基因蛋白質轉譯表現量的調控。據推測，這些非編碼小分子RNA(微小核糖核酸)參與調控基因表達，但機制區別於siRNA介導的mRNA降解。第一個被確認的微小核糖核酸是線蟲中

首次發現的 lin-4 和 let-7，隨後多個研究小組在包括人類、果蠅、植物等多種生物物種中鑒別出數百個微小核糖核酸，近年在一些病毒也發現微小核糖核酸。

微小核糖核酸的生成機制是由核糖核酸聚合酶 II 或由核糖核酸聚合酶 III 從去氧核糖核酸轉錄為 primary 微小核糖核酸（primary miRNA, pri-miRNA），同時亦包含有 5' 的端帽與 3' 的 polyA 尾部 [1, 2]，其形狀就像髮夾加上單鏈核糖核酸。pri-miRNA 會被 Drosha 切除尾部的單鏈核糖核酸，形成髮夾結構的單鏈微小核糖核酸前體（precursor miRNA, pre-miRNA）[1, 3]。pre-miRNA 約為 70 個鹼基大小，形成，具有 5' 端磷酸基和 3' 羥基。而大小約 21-25 個核糖核酸長度的小分子成熟微小核糖核酸片斷則定位於 precursor 的 3' 端或者 5' 端。Exportin-5 蛋白質會負責將 pre-miRNA 從細胞核運送至細胞質 [4]，交由 Dicer 切除 pre-miRNA 的環狀部分。Dicer 是 RNase III 的一份子。為了控制目標 RNA 的轉譯，由 Dicer 作用切除 pre-miRNA 的末端環狀（terminal loop）結構，剩下的雙股核糖核酸複合物中只有一條會是成熟的微小核糖核酸 [5, 6]。雙股核糖核酸複合物中的兩條單鏈核糖核酸會分離，其中一條單鏈的核糖核酸會與 RISC 結合形成具活性的成熟的微小核糖核酸。而目前仍然無法確定是領導端（5' 端）還是遲滯端（3' 端）又或是隨機一股變成成熟的微小核糖核酸。根據 2003 年 Schwarz 的研究顯示：這兩條單鏈核糖核酸中位於 5' 終端 2-4 個核糖核酸的鹼基對中較不穩定的一條會優先地與 RISC 結合，並進而成為活化的微小核糖核酸 [7]。先前 3 個研究小組分別從線蟲、果蠅和 HeLa 細胞中鑒定的 100 個新微小核糖核酸中，有 15 % 跨越線蟲、果蠅和哺乳動物基因組具有高度的保守性 [8]（只有 1-2 個鹼基的區別），Lau 和 Bartel 實驗室的同事更加認為：所有的微小核糖核酸可能在其他物種中具有直向同源（Ortholog，指那些起源于同一祖先，在不同生物體中行使同

一功能的基因群就可比作為一個門類，這些類似的基因被稱為“直向同源物”）。

儘管對微小核糖核酸的研究還處於初期，據推測微小核糖核酸在較高級（指多細胞）真核生物體內對基因表達的調控作用可能和轉錄因子一樣重要。有一種看法是：微小核糖核酸可能代表在一個新發現的層次上的基因表達調控方式，然而大多數微小核糖核酸的功能仍是個謎。近期對微小核糖核酸的研究正不斷快速增加，原因是科學家開始認識到這些普遍存在的小分子在真核基因表達調控中有著廣泛的作用。由於微小核糖核酸存在的廣泛性和多樣性，提示微小核糖核酸可能有非常廣泛多樣的生物功能，所以微小核糖核酸的作用目標基因和活性機制一直是各地的研究人員的關注焦點。

對已發現的微小核糖核酸其中一部分的研究分析發現：它們參與了細胞在生命過程中一系列的重要進程，包括早期發育 [9]，細胞增殖，細胞凋亡，細胞死亡 [10]，脂肪代謝 [11]和細胞分化 [12]。線蟲、果蠅、小鼠和人等等的各物種中已經被發現的數百個微小核糖核酸中的多數具有和其他參與調控基因表達的分子一樣的特徵—在不同組織、不同發育階段中微小核糖核酸的水平有顯著差異，這種微小核糖核酸表達模式具有分化的位元相性和時序性（differential spatial and temporal expression patterns）。微小核糖核酸與其目標 mRNA 的作用方式目前已知有兩種可能：第一個被確認的微小核糖核酸—線蟲中首次發現的 lin-4 和 let-7，可以通過部分互補結合到目標基因 mRNA 的 3'非編碼區（3'UTRs），以一種未知方式誘發蛋白質轉譯抑制，進而抑制蛋白質的合成 [13, 14]，通過調控一組關鍵 mRNAs 的轉譯從而調控線蟲發育進程 [15]。另一種作用方式是當微小核糖核酸與 mRNA 完全互補配對時，引起目標 mRNA 在互補區的特異性斷裂，導致 mRNA 降解造成基因沉默，這種作用方式與 small interfering RNAs (siRNA)

類似，如在植物中曾發現的 Scarecrow miRNA，能結合完全互補的 mRNA 鏈從而降解 mRNA 序列，抑制蛋白質合成 [16]。這暗示了 miRNAs 可以和 siRNAs 一樣作用，兩種小分子核糖核酸作用通路可能有重疊的部分。這種 mi/siRNA 的基因沉默機制已得到了相關的闡釋，以 siRNA 參與的 RNAi 為例，siRNA 可與 RNA-induced silencing complex (RISC) 結合，通過完全互補配對原則，使 mRNA 被 RNA 酶裂解，這個過程也稱為轉錄後基因沉默。miRNA 以何種方式與目標基因作用和 miRNA 與目標基因的配對程度有關，miRNA 與目標基因配對不完全時，miRNA 就以抑制目標基因的表達方式作用；miRNA 與目標基因某段序列配對完全時，就可能引起目標基因在互補區斷裂而導致基因沉默。

材料與方法

本研究為疾管署與成功大學之合作案，瘧原蟲之檢體收集與 RNA 抽取將在疾管署執行，後續瘧原蟲微小核糖核酸定序及生物資訊分析將由成功大學醫學院執行，論文與研究成果將由疾管署與成功大學共享。

- 本計劃需送疾管署人體研究倫理審查會(因涉及人體檢體的使用等)

本研究使用之瘧原蟲將分離自送疾管署檢驗瘧疾之病患檢體，瘧原蟲之 RNA 將在疾管署抽出後送成功大學醫學院，進行後續瘧原蟲微小核糖核酸定序及生物資訊分析，詳細步驟如下：

1. 利用次世代基因表現定序技術預測瘧原蟲微小核糖核酸

Illumina SOLEXA

Solexa 技術最早於 1998 年由兩位劍橋大學的化學家創立，利用專利核心技術「DNA clusters」和「reversible terminators」，達成自動化樣本製備及基因組數百萬個鹼基大規模平行定序。將隨機分割的 DNA 片斷連接到特殊的晶片表面，通過固相表面擴展可以生成大於 1 千萬 DNA clusters，每個 DNA 片斷可被擴展約 1000 次。這些 DNA clusters 被用做定序模板，在高速定序儀上進行定序。定序過程中用 4 種末端被封閉的不同螢光標記的鹼基進行合成反應，每次反應只能加一個鹼基，通過雷射檢測每次加入的鹼基後，保護基團被脫去進入下一輪合成反應，再測定該次反應加入的鹼基，如此反覆。

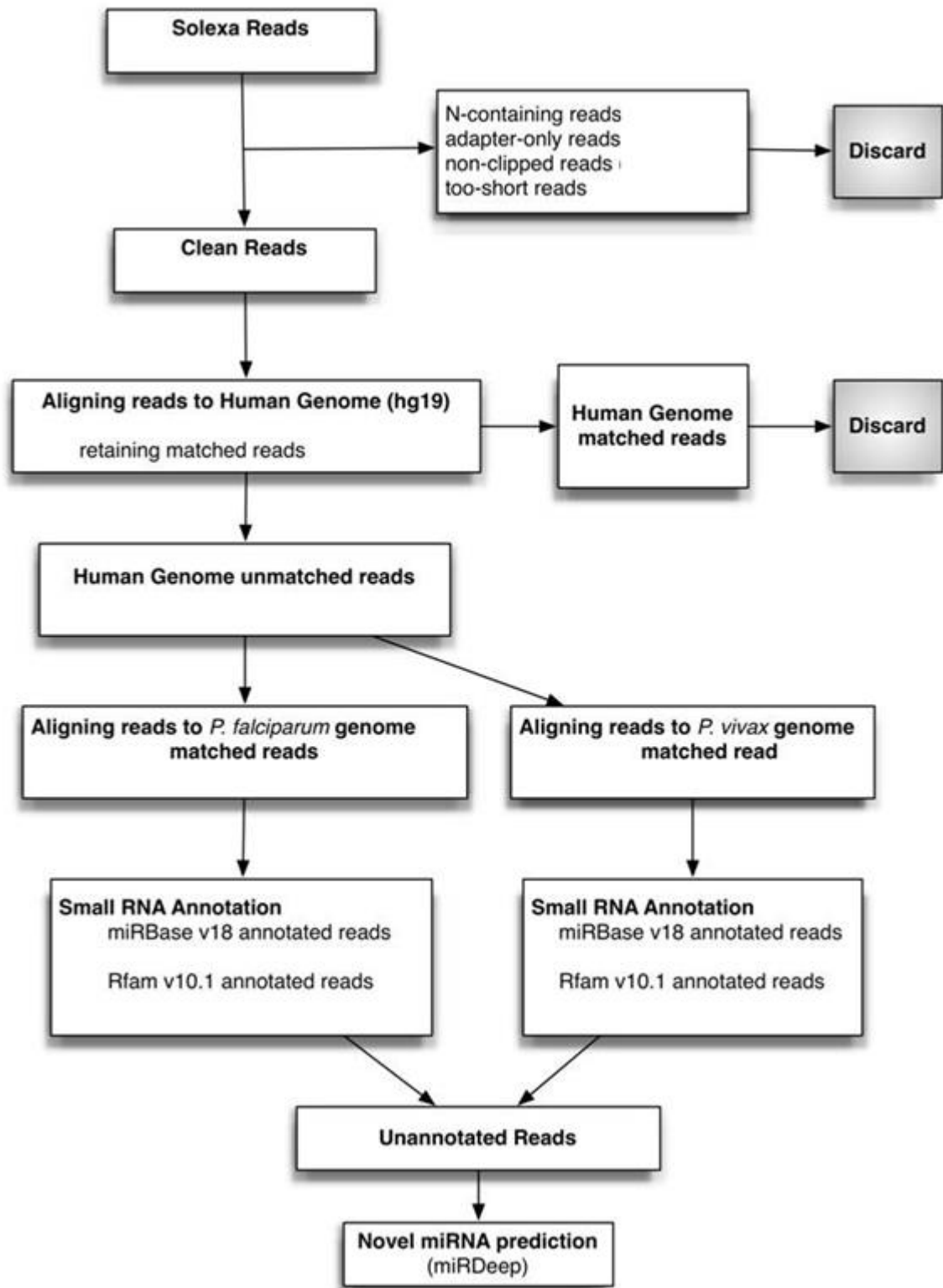
2. 生物資訊方法分析次世代定序資料

分析流程如下頁圖示。首先將序列資料中僅具有 adaptor、N 端標記以及過短的序列移除，再將與人類基因序列相符的亦全部移除，剩餘的序列才分

別與檢體中所感染的瘧原蟲種基因體進行比對。將比對至感染蟲種基因體的序列前後取出前體序列長度，進行微小核糖核酸前體及成熟體的長度、結構、穩定性、及其位置等等各項標準之比對。後續將通過比對流程的微小核糖核酸與其他動物、植物等等各物種進行比對，找尋各物種間共通或單單瘧原蟲所獨有的新微小核糖核酸。

3. stem- loop RT-PCR 及 real- time PCR

Real-time PCR 反應總體積為 20 μl ，其組成內容物分別為：DNA template (2 μl)；1 \times 聚合酶連鎖反應緩衝液；鎂離子 1.5 μmole ；正股與反股引子各 0.05 μmole ；dNTP 200 μmole ；Taqman polymerase 1 unit；探針 0.3 μmole 。PCR 增幅條件先予以 94 $^{\circ}\text{C}$ 10 分鐘後，94 $^{\circ}\text{C}$ 30 秒、53 $^{\circ}\text{C}$ 30 秒、72 $^{\circ}\text{C}$ 30 秒，進行 45 次反應，最後 72 $^{\circ}\text{C}$ 作用 5 分鐘。



結果

本研究使用之瘧原蟲將分離自送疾管署檢驗瘧疾之病患檢體，瘧原蟲之 RNA 將在疾管署抽出後送成功大學醫學院，進行後續瘧原蟲微小核糖核酸定序及生物資訊分析。

自此研究計劃收集之檢體中，我們選擇同時感染兩種瘧原蟲—*Plasmodium falciparum* (*P. falciparum*)與 *P. vivax* 的病人血液檢體進行微小核糖核酸次世代定序。首先以離心方式，將檢體的紅血球自全血檢體中分離，接續以 Percoll 溶液，利用其濃度梯度的滲透壓力差，在不影響瘧原蟲的前提下打破紅血球，進一步收集病人血液檢體中的瘧原蟲。以 mirVana™ miRNA Isolation kit 套組抽取瘧原蟲之核糖核酸，進行小片段核糖核酸次世代基因定序 (Solexa small RNA sequencing)。序列分析完整流程及數據分析結果如圖一所示。

經過定序後，自該檢體中我們共獲得 21,829,268 條序列。經過 adapter trimming 去除掉定序結果不符合要求標準的序列，如：長度過短、空 adapter 連接、雜訊過大...等等不符合要求的部分後，所獲得可信之高品質序列有 15,659,306 條。由於本計劃目的在尋求瘧原蟲特異之微小核糖核酸，所以我們首先選擇去除所得基因序列中經過比對符合人類基因組的部分，以期去除殘存於瘧原蟲檢體中，或是粘附於瘧原蟲細胞膜表面之人類紅血球中的 RNA。剩餘不符合人類基因組序列的定序所得之基因片段再與瘧原蟲的基因組進行比對，此步驟參照病人感染資訊，分別針對惡性瘧及卵圓瘧兩種瘧原蟲的基因組進行分析。經進行基因組交叉比對後，符合惡性瘧原蟲的小核糖核酸基因序列有 57,677 條；另一方面，符合卵圓瘧原蟲基因組的序列則有 77,379 條。將這些符合瘧原蟲基因組的

序列按照先前發表論文的流程進行微小核糖核酸先導體的模擬，簡單來說，須在基因組中找出序列相符的部分，將前後 100bp 的序列一同帶出，以 Srnaloop 軟體進行模擬，找出轉錄成單股 RNA 後可摺疊形成髮夾狀之微小核糖核酸前導體。若前導體可形成此特異結構，該段序列即有作為微小核糖核酸的潛力。在挑出這些長度約 220 bp 的前導體序列後，接著參照各物種之微小核糖核酸前導體的特徵，以各種統計上具有特異性的條件進行篩選，如：序列是否重疊、髮夾狀結構的形狀大小是否符合、結構的穩定性...等等。此外，由於微小核糖核酸在各物種間具有極高的序列相似程度，我們也將這些挑選出來的序列片段與其他物種中已經被發現的微小核糖核酸進行比對。針對這部分我們感到相當遺憾，由於我們無法完全排除瘧原蟲核糖核酸檢體是否受到紅血球之核糖核酸污染，所以在第一步的分析即排除所有符合人類基因組的序列，或許因為我們加入了這部分的考量，所以在比對後並沒有發現與其他物種相似的微小核糖核酸。

在經過一連串根據微小核糖核酸特性所設計的篩選準則比對後，我們總共找到四個瘧原蟲的微小核糖核酸，無論是在序列長度、結構大小、結構穩定性...等等各方面，都完全符合目前所發現的各物種之微小核糖核酸。在這四個微小核糖核酸中，一個是惡性瘧微小核糖核酸（Pf-1），另外三個為卵圓瘧微小核糖核酸（Pv-1~Pv-3），這四條微小核糖核酸前導體在基因體中的位置列於表一。表中所示，chromosome 意指染色體編號，strand 表正負股，並標出其起始與結束的核苷酸位置。

這四條瘧原蟲微小核糖核酸之前導體髮夾結構模擬如圖二所示，圖中小寫英文字母意指髮夾結構的末端環狀部位；“|”意指氫鍵結合位置，“:”指的是 U-G 鹼基配對位置；以灰階底色標出的部分即為成熟微小核

糖核酸的序列所在位置。同時我們在定序資料中尋找這四條微小核糖核酸的同分異構體（isomer；亦稱為 isomiR），也就是同一條前導體經過不同切割點所產生的微小核糖核酸，列於表二中，這部分結果更加證明了我們的分析模擬具有極高的可信度。

在分析完成後，我們接續進行驗證工作。由於瘧疾血液檢體量不足，無法使用原檢體進行驗證，我們後續收集到兩名惡性瘧與一名卵原瘧的患者血液檢體，依前敘方法抽取其核糖核酸檢體進行四個微小核糖核酸的 stem- loop RT-PCR 及 real- time PCR 確認工作(圖三)。以未感染瘧疾的正常人血液檢體作為對照組進行分析後，我們可以發現在兩位惡性瘧感染患者檢體中，確實可偵測其 Pf-mir-1 明顯存在，而卵原瘧特異的三段微小核糖核酸於惡性瘧患者檢體皆無反應。相對的，卵原瘧特異的三段微小核糖核酸在卵原瘧患者血液檢體中亦可偵測到螢光反應，而無 Pf-mir-1 的放大反應。此結果亦顯現出此四段微小核糖核酸確實與生物資訊分析結果相符，分別在惡性瘧與卵原瘧原蟲中具特異性的存在。

討論

世界衛生組織 (WHO) 1993 年的資料顯示，全球約有十億人口感染瘧疾，每年死於瘧疾人數逾二百萬人。目前在中國大陸、東南亞、南美洲及非洲等地區，瘧疾仍是一相當嚴重的傳染病；此外，近年來隨著瘧蚊及瘧原蟲抗藥性問題的日益嚴重，也正逐漸加重瘧疾防治的困難性。台灣地區自 1965 年 WHO 宣佈瘧疾根除後即進入保全期，迄今大多為零星的境外移入病例。然而，隨著國際交通日益頻繁、外勞的引進、國人觀光甚至出國工作人數的增加等因素，台灣仍處於瘧疾感染的恐懼威脅之中。

微小核糖核酸 (microRNA) 是近年來所發現的重要小型核糖核酸，長度約為 21 個核苷酸，可以調控許多基因的表現。目前人類已有上千種微小核糖核酸被發現，而每一種微小核糖核酸都可能調控甚至上百個目標基因，這些基因可說是已經參與了絕大多數的生理反應機制。在寄生蟲研究領域，已有研究表明寄生線蟲存在獨特的微小核糖核酸轉錄後調控機制，它們可以通過微小核糖核酸實現對宿主和自身基因表達模式的精確調控，從而提高感染和自身增殖的機率並逃避免疫監視。有關於寄生蟲的微小核糖核酸研究報告已發表的有：寄生蠕蟲類-[曼氏血吸蟲、日本血吸蟲、中華肝吸蟲、旋毛蟲、廣東住血線蟲、細粒棘球絛蟲]，原蟲-[梨形鞭毛蟲、陰道毛滴蟲]及節肢動物-[蚊和牛蟬]等等。相較梨形鞭毛蟲與陰道毛滴蟲的微小核糖核酸早已在數年前就被發現，並展開其功能與應用層級的研究，同為單細胞原蟲的瘧原蟲，過去因為基因體中沒有微小核糖核酸生成所需的酵素，一直被認為不具有此機制的存在。直至 2012 年，Duke 大學的研究人員發現人體紅細胞的遺傳物質微小核糖核酸能夠通過獨特機制參與瘧原蟲的基因調控，本團隊才注意到瘧原蟲的微小核糖核酸是有存在的可能性。

通過選擇性地抑製或阻斷某一特定發育期線蟲的發育，便可減少和阻斷寄生線蟲的傳播途徑。同樣的，我們相信若是能釐清微小核糖核酸在瘧原蟲生活史中的功能，其各物種或各成長階段中所特異表達的微小核糖核酸將有可能成為其免疫預防和化學防治的新分子標靶，為核酸疫苗的製備奠定基礎，為有效控制寄生蟲病持續發展提供技術支援。

結論與建議

寄生蟲具有非常複雜的生活史和基因表達調控系統，展開寄生蟲微小核糖核酸的研究不僅有利於揭示寄生蟲生活史過程中的各式機轉及未知之疑難疾病的分子基礎，而且也有助於發現新的藥物作用標靶或便於設計新的核酸疫苗，從而為有效防治寄生蟲病提供新的途徑。

本計畫成功自感染瘧疾的病人紅血球中，找出瘧原蟲寄生於人類紅血球時期所表現的微小核糖核酸，此發現在臨床及基礎研究皆有重大貢獻。在基礎研究層面，微小核糖核酸在原蟲細胞內的基因轉譯為蛋白質的調控，將會帶來全新的思維，瘧原蟲過去無法釐清的各複雜生化路徑如能量代謝或是致病機轉等等，未來將不單只考慮細胞內牽涉其中的各個基因之RNA表達與否，也將考慮是否有微小核糖核酸的轉錄後調控機制牽涉其中。本計畫研究成果期望未來可用於輔助臨床診斷與治療，自血液中抽取微小核糖核酸後，將可進行特定瘧原蟲微小核糖核酸基因增幅反應，藉產物之有無、大小或序列診斷瘧原蟲之存在與否及種別判定，可作為快速診斷試劑發展的標靶基因之一。

計畫重要研究成果及具體建議

1. 計畫之新發現或新發明

發現瘧原蟲寄生於人類紅血球時期所表現的微小核糖核酸，且具種別特異性。

2. 計畫對民眾具教育宣導之成果

本計畫提醒民眾於出國旅遊或工作之際，對可能的瘧疾感染不可掉以輕心，未來可提供出國時在瘧疾預防及防瘧藥物選擇時的參考。

3. 計畫對醫藥衛生政策之具體建議

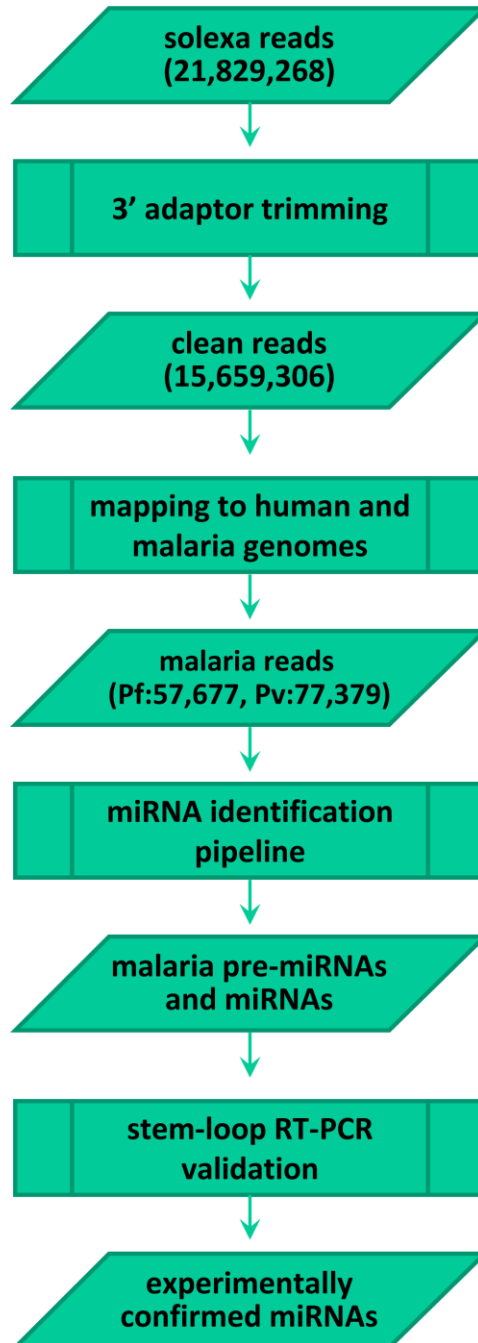
未來需加強對自瘧疾疫區返國工作或參訪之民眾的瘧疾篩檢、瘧疾境外移入患者的檢驗及管理工作，以免引入瘧疾造成流行。隨時監測國際間各種瘧原蟲型別流行病學關係與抗藥性之間的關聯，提供瘧疾防治工作參考。

重要參考文獻

1. Bracht, J., et al., *Trans-splicing and polyadenylation of let-7 microRNA primary transcripts*. Rna, 2004. **10**(10): p. 1586-94.
2. Lee, Y., et al., *MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization*. Embo J, 2002. **21**(17): p. 4663-70.
3. Lee, Y., et al., *The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing*. Nature, 2003. **425**(6956): p. 415-9.
4. Yi, R., et al., *Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs*. Genes Dev, 2003. **17**(24): p. 3011-6.
5. Bernstein, E., et al., *Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference*. Nature, 2001. **409**(6818): p. 363-6.
6. Grishok, A., et al., *Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control C. elegans developmental timing*. Cell, 2001. **106**(1): p. 23-34.
7. Schwarz, D.S., et al., *Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex*. Cell, 2003. **115**(2): p. 199-208.
8. Ohler, U., et al., *Patterns of flanking sequence conservation and a characteristic upstream motif for microRNA gene identification*. Rna, 2004. **10**(9): p. 1309-22.
9. Reinhart, B.J., et al., *The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans*. Nature, 2000. **403**(6772): p. 901-6.
10. Brennecke, J., et al., *bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in Drosophila*. Cell, 2003. **113**(1): p. 25-36.
11. Xu, A., et al., *The fat-derived hormone adiponectin alleviates alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases in mice*. J Clin Invest, 2003. **112**(1): p. 91-100.
12. Kawasaki, H. and K. Taira, *Hes1 is a target of microRNA-23 during retinoic-acid-induced neuronal differentiation of NT2 cells*. Nature, 2003. **423**(6942): p. 838-42.
13. Olsen, P.H. and V. Ambros, *The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in Caenorhabditis elegans by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation*. Dev Biol, 1999. **216**(2): p. 671-80.
14. Seggerson, K., L. Tang, and E.G. Moss, *Two genetic circuits repress the Caenorhabditis elegans heterochronic gene lin-28 after translation initiation*. Dev Biol, 2002. **243**(2): p. 215-25.
15. Pasquinelli, A.E. and G. Ruvkun, *Control of developmental timing by micrnas and their targets*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2002. **18**: p. 495-513.
16. Llave, C., et al., *Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA*. Science, 2002. **297**(5589): p. 2053-6.

圖表

圖一、計畫施行流程圖



圖二、瘧原蟲微小核糖核酸二級結構示意圖

Pf-1

Sequence (5'→3'): UGAUGAAAUUAAUUA-A--GC**GCAGGUAAACGGCGGGAGUAA**cuaugacucuc
 :| :| |:| ||||| | :|| |||:| ||| : |||
 GC-GCAGUGA-UUAAUCUACUGC-UCCGUAAACCGAUGGAAUU

Pv-1

Sequence (5'→3'): UGAUGAAAUCAAUUA-A--GC**GCAGGUAAACGGCGGGAGUAA**cuaugacucuc
 :| :| |:| ||||| | :|| |||:| ||| : |||
 GC-GCAGUGA-UUAAUCUACUGC-UCCGUAAACCGAUGGAAUU

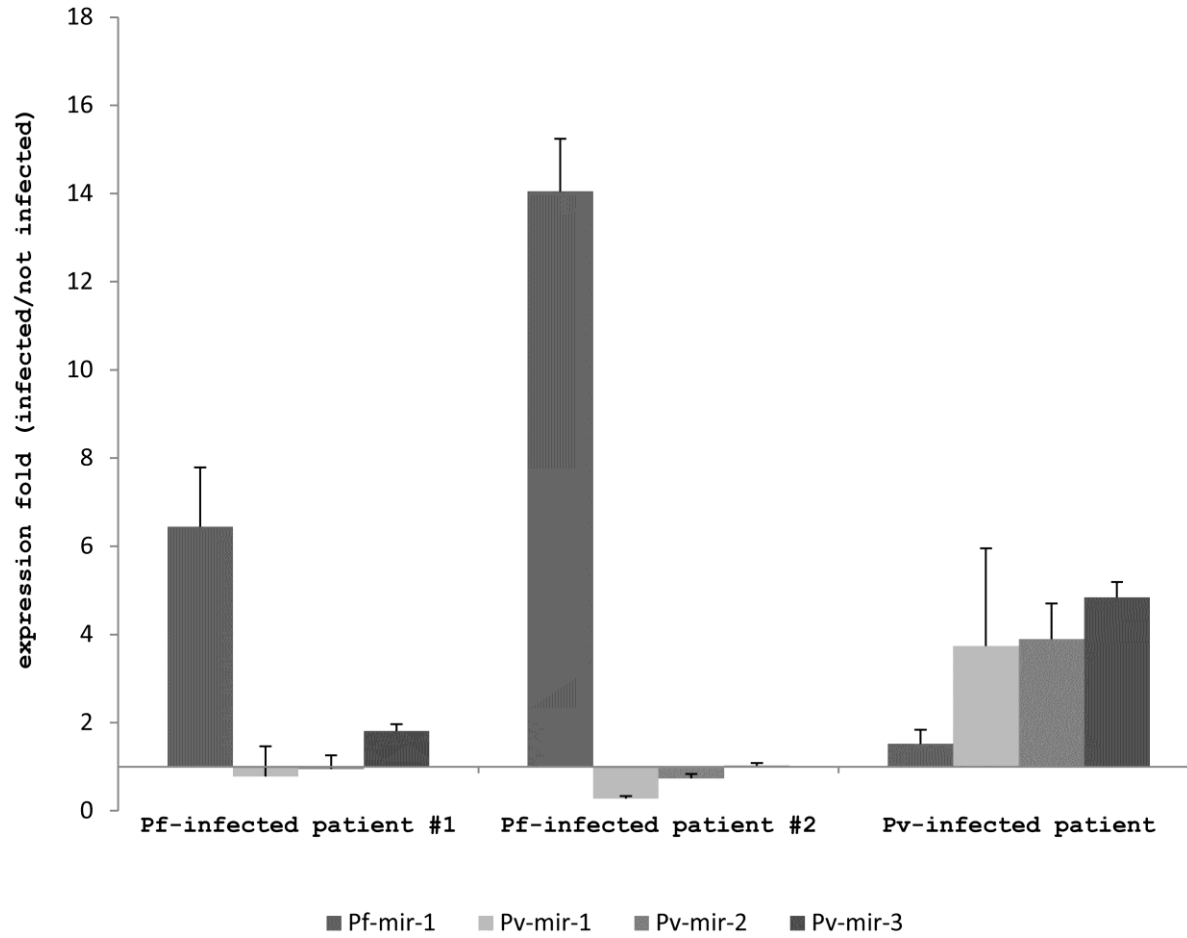
Pv-2

Sequence (5'→3'): GC-GUCUCGU-CGCUGUAUUCGUUUUCGAGCGACuggaguagug
 || |:||| : ||||| :|| |:||| || |
 CG**ACGGAGGGUGCGACAGGAGGGAG**AGC-GGC-G

Pv-3

Sequence (5'→3'): GAGGUUUUGGCG-CAGA-**UGG-GG-CUGCGCGG-GGAAGGGGG**gagugaagag
 : | ||:: : | | | ||| || |:| |||| | | :||
 UACGAAGGAUUCAGCCAAACCGCCAGGUGCGCCGCC--CAUCG

圖三、瘧原蟲微小核糖核酸於患者血液檢體中表達量檢測



在基因體中的位置

4表一、瘧原蟲微小核糖核酸前導體

表一、瘧原蟲微小核糖核酸前導體在基因體中的位置

| pre-miRNA | chromosome | strand | start pos. | end pos. |
|------------------|-------------------|---------------|-------------------|-----------------|
| Pf-1 | 1 | + | 481062 | 481152 |
| Pv-1 | 5 | - | 95348 | 95438 |
| Pv-2 | 3 | + | 621500 | 621573 |
| Pv-3 | 7 | - | 256856 | 256944 |

表二、瘧原蟲微小核糖核酸前導體的 IsomiR 分布

| pre-miRNA | head | tail | sequence of mature miRNA |
|------------------|-------------|-------------|---------------------------------|
| Pf-1 | 18 | 44 | GCGCAGGUAAACGGCGGGAGUAACUUAU |
| Pf-1 | 19 | 43 | CGCAGGUAAACGGCGGGAGUAACUA |
| Pf-1 | 19 | 44 | CGCAGGUAAACGGCGGGAGUAACUUAU |
| Pf-1 | 20 | 43 | GCAGGUAAACGGCGGGAGUAACUA |
| Pf-1 | 20 | 44 | GCAGGUAAACGGCGGGAGUAACUUAU |
| Pv-1 | 18 | 44 | GCGCAGGUAAACGGCGGGAGUAACUUAU |
| Pv-1 | 19 | 43 | CGCAGGUAAACGGCGGGAGUAACUA |
| Pv-1 | 19 | 44 | CGCAGGUAAACGGCGGGAGUAACUUAU |
| Pv-1 | 20 | 43 | GCAGGUAAACGGCGGGAGUAACUA |
| Pv-1 | 20 | 44 | GCAGGUAAACGGCGGGAGUAACUUAU |
| Pv-2 | 50 | 72 | GAGGGAGGACAGCGUGGGAGGCA |
| Pv-3 | 17 | 41 | UGGGGCUGCGCGGGGAAGGGGCGAG |