

# 应用生物信息学预测牛新 microRNA 及验证

崔晓钢, 杨少华, 谢岩, 张胜利, 张勤, 孙东晓\*

(中国农业大学动物科技学院, 农业部动物遗传育种与繁殖重点实验室, 畜禽育种国家工程实验室, 北京 100193)

**摘要:** 本研究旨在通过比较基因组学和结构序列分析方法预测牛基因组中的新 miRNAs 并进行试验验证。根据 miRNA 分子序列具有一定保守性, 将人、小鼠、绵羊、猪和狗 5 种哺乳动物已知的 miRNA 分子与 NCBI 中牛的全基因组序列(UMD3.1)对比, 获得牛 miRNAs; 随机选取部分预测的 miRNAs 进行实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)验证。结果, 基于物种间序列同源比对共计预测到 44 条新的牛 miRNAs, 选取其中 4 条 miRNAs, 通过 qRT-PCR 方法, 发现他们在泌乳期中国荷斯坦牛乳腺、心、子宫和肝组织中均有表达。结果表明, 基于比较基因组学和生物信息学预测新的 miRNA 分子可行, 为奶牛基因表达调控及其性状形成机制研究提供了前期基础。

**关键词:** 牛; miRNA; 预测; 生物信息学

中图分类号: S823.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2015)08-1317-08

## Computational and Experimental Identification of Novel MicroRNAs in Bovine by Bioinformatics

CUI Xiao-gang, YANG Shao-hua, XIE Yan, ZHANG Sheng-li, ZHANG Qin, SUN Dong-xiao\*

(National Engineering Laboratory for Animal Breeding, Key Laboratory of Animal Genetics, Breeding and Reproduction of Ministry of Agriculture, College of Animal Science and Technology, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

**Abstract:** This study aimed to predict novel miRNAs of bovine by comparative genomics and bioinformatics analysis. According to the conservation of miRNAs sequence, we compared the known miRNAs in human, mouse, sheep, pig and dog with the bovine genome sequence (UMD3.1) in NCBI to predict novel miRNAs, some of which were validated by qRT-PCR. A total of 44 novel miRNAs of bovine were obtained. Four of these were randomly selected to be validated. It was found that the 4 predicted miRNAs were expressed in mammary gland, cardiac muscle, uterus and liver of lactating Chinese Holstein cows. The methodology provides an alternative approach to predict the novel miRNAs and provide a groundwork for gene expression and trait formation mechanisms in dairy cattle.

**Key words:** bovine; miRNA; prediction; bioinformatics

microRNAs(miRNAs)是一类大约 18~24 nt 左右的非编码 RNA 小分子,通过与靶基因 mRNA 的 3'非翻译区(3'UTR)完全或不完全互补配对从而抑制靶基因的翻译过程,在多种生物学过程起重要作用<sup>[1]</sup>。大多数 miRNAs 位于基因间,但也

有一些 miRNAs 位于内含子。基因间的 miRNAs 首先由细胞内 RNA 聚合酶 II 和 RNA 聚合酶 III Drosha 加工形成 70~80 nt 具有发夹状结构的 pre-miRNA(前体 miRNA)<sup>[1-2]</sup>;随后 pre-miRNA 被 exportin 5 转移至细胞质,而后被 RNA 聚合酶 III Dicer

收稿日期:2014-04-30

基金项目:863 课题(2013AA102504);现代农业产业技术体系北京市奶牛创新团队

作者简介:崔晓钢(1985-),男,山西太原人,博士,主要从事动物分子数量遗传学研究, Tel:010-62732768, E-mail:398304310@qq.com

\* 通信作者:孙东晓,教授, E-mail:sundx@cau.edu.cn

识别剪切为 22 nt 左右的成熟 miRNA;成熟的 miRNA 与一些特别的蛋白结合形成沉默复合物(RNA-induced silencing complex, RISC), RISC 通过与靶 mRNA 的 3'UTR 结合发挥抑制其翻译作用<sup>[2-3]</sup>。

目前,在动物中已经有超过 5 000 条的 miRNAs 分子被确定并被收录到公开的 miRNA 数据库中,即 miRBase(<http://microrna.sanger.ac.uk/>)。该数据库中已有 798 条牛的 miRNAs 前体被收录。最初发现的牛 miRNA 为 lin-4 和 let-7,通过基因筛选获得<sup>[3]</sup>,由于效率低下,目前已不采用此方法。之后,人们通过直接克隆获得 miRNAs:首先分离纯化得到小分子量 RNA,然后分别在其 5' 和 3' 端连接 RNA 接头,根据接头序列设计逆转录引物进行逆转录反应,得到 cDNA 单链并进行 PCR 扩增,挑选单克隆测序<sup>[4]</sup>,其缺点是很难克隆到表达量很低的 miRNAs,一些大 RNA 分子降解的碎片同样有可能被分离克隆<sup>[5-6]</sup>。陈海璇等<sup>[7]</sup>2008 年通过分子克隆从牛脑和肝组织中得到了 13 条新的 miRNAs。研究发现,miRNA 在不同物种间具有高度的序列保守性<sup>[8]</sup>。因此,基于不同物种间已知 miRNAs 这种保守性,可以应用生物信息学预测新的 miRNAs。这种方法具有速度快和通量大的特点,能够获得一些表达量低且无法克隆到的 miRNAs。但是,通过这种方法获得的候选 miRNAs 必须通过后续试验验证,如分子克隆、Northern 杂交和 qRT-PCR。陈海璇等<sup>[7-8]</sup>通过生物信息学方法获得了 147 条牛的候选 miRNAs 和 11 条山羊的候选 miRNAs;穆松等<sup>[9]</sup>通过生物信息学方法得到了 17 条牛的候选 miRNAs。

近几年,随着 miRBase 数据库的不断更新,已知 miRNA 数量大幅度增长。miRNA 预测的生物信息学方法主要有比较基因组方法、结构序列分析方法和机器学习方法。赵东宇等<sup>[10]</sup>根据预测效果与理论基础综合分析以上 3 类方法并比较发现预测效果准确性依次为 65%、80% 和 90%。但是,机器学习方法需要一定的计算机基础。鉴于此,本研究通过比较基因组学和结构序列分析方法预测牛的新 miRNA 分子,并通过实时荧光定量 PCR 技术进行验证,为研究奶牛重要性状基因表达调控及其性状形成机制提供有价值的前期基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 miRNAs 和 ESTs 序列的获得

人、小鼠、绵羊、猪、狗和牛 6 个物种的 miRNA

序列来自 miRBase 数据库(<http://miRNA.sanger.ac.uk/>;版本:20.0)。牛的 EST 和 mRNA 序列来自美国国家生物技术信息中心的 GenBank 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。

### 1.2 miRNA 分子的预测

miRNA 预测步骤:将下载得到的 miRNA 分子序列与 NCBI 中牛的全基因组序列(UMD3.1)进行在线 Blast 比对,寻找存在 0~3 个碱基差异的同源序列并删除重复和表达蛋白的序列;利用 mFold 3.1 软件,选取包含 miRNA 序列的 100 nt 左右的片段进行预测二级结构,获得可形成发夹结构的序列并与 miRNA 前体数据库对比,确定是否为可能的新的 miRNA 分子或 miRNA 基因。按照下列原则<sup>[11-12]</sup>预测新的 miRNAs 分子:①与成熟的 miRNA 只能存在 0~3 个碱基差异;②前体能折叠成发夹的二级结构;③发夹结构必须有较小的自由能;④ A+U 含量在 30%~70%;⑤与其互补序列的差异不能多于 6 个;⑥不能存在环状结构。

### 1.3 靶基因预测

采用在线软件 TargetScan 6.2(<http://www.targetscan.org/>)和 PicTar (<http://pictar.mdc-berlin.de/>)对本研究得到的 miRNAs 预测靶基因,TargetScan 中有牛 mRNA;miRNA 互作关系,直接应用该互作关系进行预测;PicTar 没有反刍动物数据,因此,本研究基于人的 mRNA;miRNA 互作关系进行预测,将预测的人靶基因与牛该基因 3'UTR 进行比对,若预测靶点完全匹配即确定此基因为牛 miRNA 的靶基因;最后将两个软件的预测结果进行交集。

对上述预测得到的靶基因,利用 KOBAS2.0 在线软件和 KEGG pathway 公共数据库进行通路和 GO 分析。

### 1.4 实时荧光定量 PCR 验证

采集泌乳期中国荷斯坦牛乳腺、心、子宫和肝 4 种组织样品,快速放入液氮保存。使用 TRIzol 试剂盒(Invitrogen)分别提取乳腺、心、子宫和肝组织样品总 RNA。随机选取 4 条预测得到的新 miRNAs,采用茎环引物实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)方法验证其成熟 miRNA 序列是否存在,即利用其茎环结构的特异反转录引物进行 cDNA 合成;反转录试剂为 Taqman<sup>®</sup> Transcription Kit 200 Reactions 反转录酶试剂盒(ABI),miRNA 特异引物由北京六合华大基因科技有限公司合成;以 cDNA 作为模板,用 miRNA 的特异引物和通用下游引物(表 1)进行

qRT-PCR 反应,以 U6 snoRNA(广东锐博生物)作为内参基因;miRNA qRT-PCR 扩增体系 20  $\mu$ L: SYBR Green buffer 9  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 7.4  $\mu$ L、上下游引物各 0.8  $\mu$ L(200  $\mu$ mol  $\cdot$  L<sup>-1</sup>)、cDNA 2  $\mu$ L;反应程序:95  $^{\circ}$ C 10 min,45 个循环(95  $^{\circ}$ C 10 s,60  $^{\circ}$ C 10 s,72  $^{\circ}$ C 10 s),72  $^{\circ}$ C 6 min。

采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup> 法对 3 个重复样本进行相对 miRNA 表达分析。利用 SAS v8.02 软件对不同组织的 miRNA 相对表达量进行显著性差异分析,显著性水平为  $P < 0.05$ 。

## 2 结 果

### 2.1 新 miRNAs 分子筛选

本研究从 miRBase 数据库中下载了人、小鼠、

绵羊、猪和狗 5 种哺乳动物共 3 767 条 miRNAs 分子;在 NCBI 上与牛全基因组序列(UMD3.1)进行 Blast,得到具有 0~6 个碱基差异同源性序列共 2 606 条(表 2),其中仅存在 0~3 个碱基差异且不表达蛋白质的序列共 796 条;下载上述 796 条序列,选取包含有 miRNA 序列的 100 nt 左右的片段,通过 mFold 在线软件 <http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form> 预测得到可能的发夹结构 1 481 个;按照材料与方法 1.2 预测原则筛选发夹结构,得到 44 条牛新 miRNAs 分子,各项参数见表 3。

图 1 展示了上述 44 条牛新 miRNAs 分子的二级结构,其成熟序列均在发夹状结构的一条臂上,且与其互补序列的差异小于 6 个碱基,自由能为

表 1 4 个牛新 miRNAs qRT-PCR 所用引物

Table 1 Primers for qRT-PCR validation of 4 predicted bovine miRNAs

miRNA 名称 Name	茎环特异引物 Stem-Loop RT primer	引物 Primer	退火温度/ $^{\circ}$ C T <sub>m</sub>
ssc-miR-9-2	CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGGC- AATTCAGTTGAG	F:TGGGTTGGGCTTCTTTGGTTATCT R:CTCAACTGGTGTCGTGGAGTC	60
hsa-miR-7	CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCGG- CAATTCAGTTGAG	F:GGGCTGGGTGGAAGACTAGT R:CTCAACTGGTGTCGTGGAGTC	60
mmu-miR-467c	CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCG- GCAATTCAGTTGAG	F:GGTCGGTAAGTGCCTGCAT R:CTCAACTGGTGTCGTGGAGTC	60
cfa-miR-143	CTCAACTGGTGTCGTGGAGTCG- GCAATTCAGTTGAG	F:GGTTCTGGGTGAGAGAAGCAC R:CTCAACTGGTGTCGTGGAGTC	60
U6 Forward		ssD0904071006(引物编号)	60
U6 Reverse		ssD0904071007(引物编号)	60

表 2 同源比对筛选 miRNA 结果

Table 2 The results of miRNA Blast

哺乳动物 Mammal	用于比对的 miRNA 数目 No. of miRNAs for Blast	具有同源性的 牛序列数目 No. of bovine homologous sequences	0~3 个碱基差异且不表达 蛋白的序列数目 No. of sequences with 0-3 mismatches and non-coding protein	可能的 发夹结构 Hairpin candidates	可能的新 miRNAs Potential novel miRNAs
人 Human	1 872	1 611	505	1 021	26
小鼠 Mouse	1 186	492	151	242	7
绵羊 Sheep	105	99	15	17	1
猪 Pig	280	195	65	94	7
狗 Dog	324	209	60	107	3
总计 Total	3 767	2 606	796	1 481	44

表 3 预测到的新 miRNAs

Table 3 The results of predicted novel miRNAs

新 miRNAs Novel miRNAs	折叠自由能/(kJ·mol <sup>-1</sup> ) Folding free energy	成熟 miRNA 序列 Mature miRNA sequence	成熟 miRNA 长度/nt The length of mature miRNA
hsa-let-7e	-143.57	UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGUU	22
hsa-miR-7	-153.20	UGGAAGACUAGUGAUUUUGUUGU	23
hsa-miR-9	-141.48	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA	23
hsa-miR-24	-141.48	UGCCUACUGAGCUGAUUUCAGU	22
hsa-miR-24	-116.79	UGCCUACUGAGCUGAUUUCAGU	22
hsa-miR-29b-2	-128.51	CUGGUUUCACAUGGUGGCUUAG	22
hsa-miR-29b-2	-128.50	CUGGUUUCACAUGGUGGCUUAG	22
hsa-miR-147	-125.99	GUGUGUGGAAAUGCUUCUCG	20
hsa-miR-191	-187.11	CAACGGAAUCCAAAAGCAGCUG	23
hsa-miR-345	-83.30	GCUGACUCCUAGUCCAGGGCUC	22
hsa-miR-425	-157.39	AAUGACACGAUCACUCCCGUUGA	23
hsa-miR-450a	-140.64	UUUUGCGAUGUUCUAAUUAU	22
hsa-miR-486-3p	-184.18	CGGGGACGUCAGUACAGGAU	21
hsa-miR-486-5p	-184.60	UCCUGUACUGAGCUGCCCCGAG	22
hsa-miR-568	-100.88	AUGUAUAAAUGUAUACACAC	20
hsa-miR-671-3p	-178.74	UCCGGUUCUCAGGGCUCACC	21
hsa-miR-671-5p	-229.80	AGGAAGCCCUGGAGGGGCUUGAG	23
hsa-miR-2054	-77.02	CUGUAAUUAUAAAUUUAAUUUAUU	23
hsa-miR-4292	-157.39	CCCCUGGGCCGGCCUUGG	18
hsa-miR-4294	-150.27	GGGAGUCUACAGCAGGG	18
hsa-miR-4479	-133.11	CGCGCGCCGUGCUCGGAGCAG	22
hsa-miR-4516	-128.51	GGGAGAAGGGUCGGGGC	17
hsa-miR-4674	-69.90	CUGGGCUCGGGACGCGGGCU	21
hsa-miR-4680-5p	-88.32	AGAACUCUUGCAGUCUUAGAUGU	23
hsa-miR-4716-3p	-164.50	AAGGGGAAGGAAACAUGGAGA	22
hsa-miR-4753-3p	-92.09	UUCUCUUUCUUUAGCCUUGUGU	22
mmu-miR-467c	-137.30	UAAGUGCUGCAUGUAUAUGUG	22
mmu-miR-467e	-103.81	AUAAGUGUGAGCAUGUAUAUGU	22
mmu-miR-467g	-106.74	UAUACAUAACACACAUAUAU	22
mmu-miR-671-5p	-229.80	AGGAAGCCCUGGAGGGGCUUGAG	23
mmu-miR-1898	-113.02	AGGUCAAGGUUCACAGGGGAUC	22
mmu-miR-3107	-184.60	UCCUGUACUGAGCUGCCCCGAG	22
mmu-miR-3473	-117.20	UGGAGAGAUGGCUCAGCA	18
oar-miR-370-5p	-128.92	CAGGUCACGUCUCUGCAGUUAC	22
ssc-let-7e	-143.57	UGAGGUAGGAGGUUGUAUAGUU	22
ssc-miR-9-1	-141.90	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA	23
ssc-miR-9-1	-158.23	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA	23
ssc-miR-9-2	-158.23	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA	23
ssc-miR-374b-5p	-146.50	AUAUAAUACAACCUGCUAAGUG	21
ssc-miR-421	-138.13	CCUCAUUAAAUGUUUGUUGAAUGA	24
ssc-miR-421	-140.64	CCUCAUUAAAUGUUUGUUGAAUGA	24
cfa-miR-9	-158.23	UCUUUGGUUAUCUAGCUGUAUGA	23
cfa-miR-143	-135.20	UGAGAUGAAGCACUGUAGCUC	21
cfa-let-7c	-143.57	UGAGGUAGUAGGUUGUAUGGUU	22

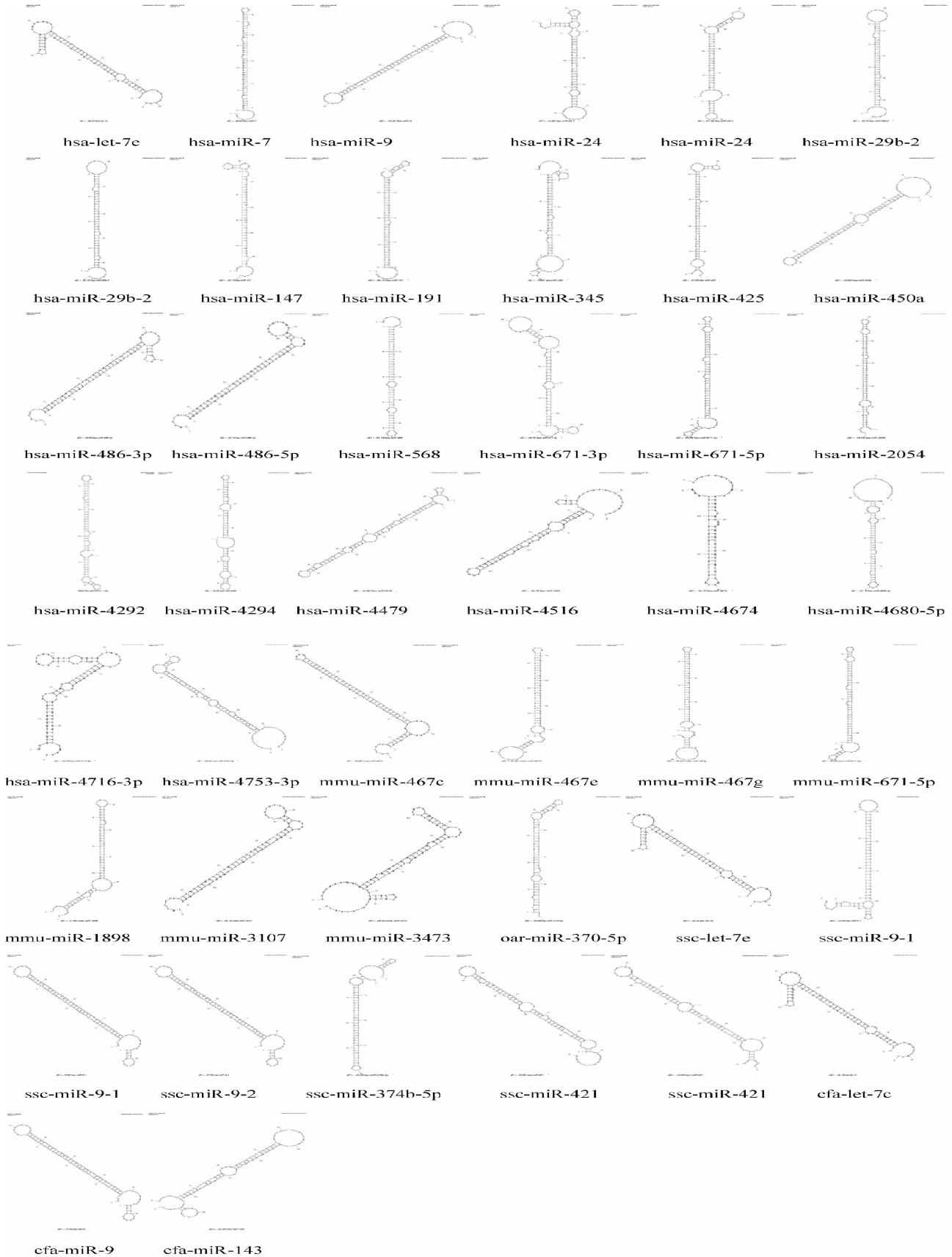


图 1 候选 miRNAs 前体分子二级结构预测

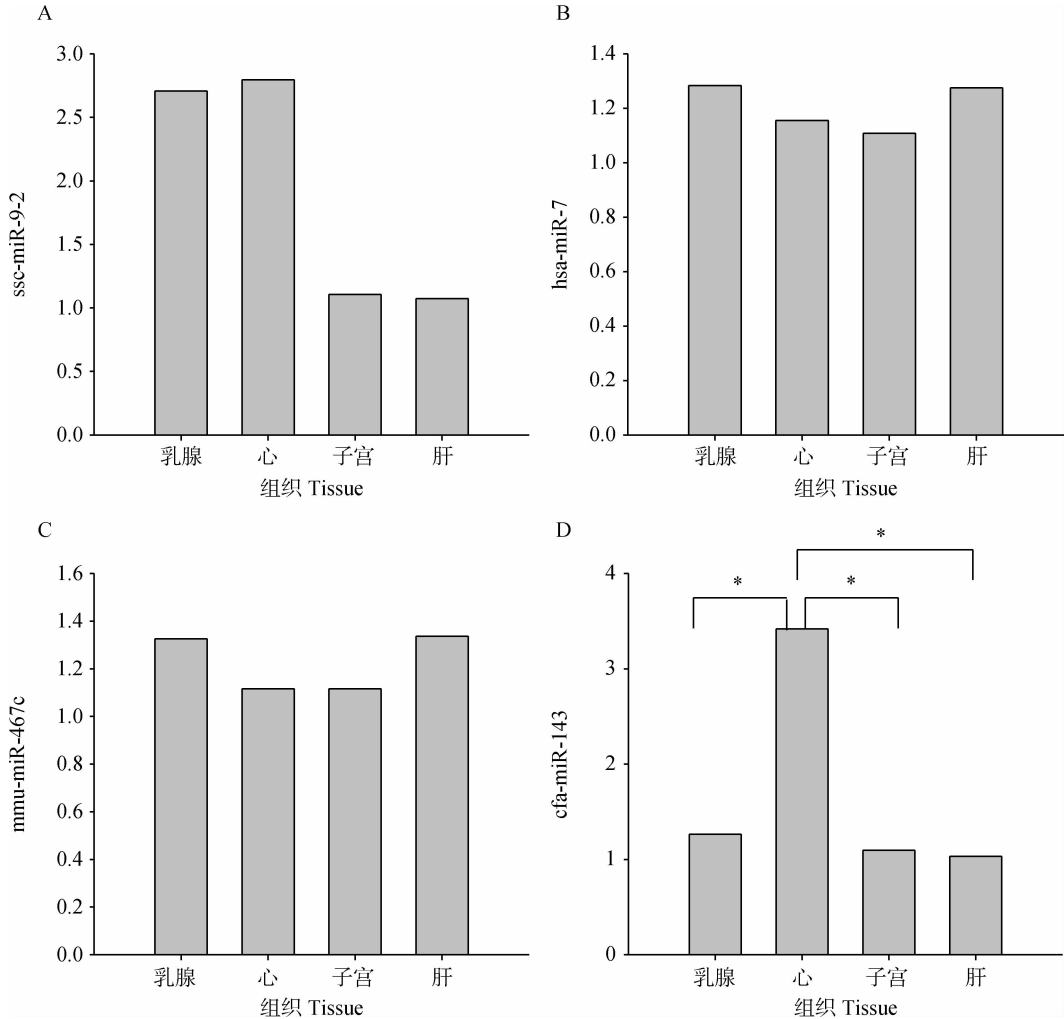
Fig. 1 Prediction of secondary structure of pre-miRNA molecule

-229.80~ -69.90 kJ · mol<sup>-1</sup> (表 3), 均符合 miRNA 预测原则, 可能为牛的新 miRNAs 分子。

## 2.2 qRT-PCR 验证

从 44 个候选 miRNAs 分子中随机选取 hsa-miR-7、ssc-miR-9-2、mmu-miR-467c 和 cfa-miR-143 进行 qRT-PCR 验证, 结果如图 2 所示, 4 个

miRNAs 分子在泌乳期中国荷斯坦牛乳腺、心、子宫和肝中均有表达, 证实为真实的牛 miRNAs。如图 2 所示, 差异显著检验结果表明, cfa-miR-143 在心组织的 mRNA 表达量与其他 3 个组织间差异显著 ( $P < 0.05$ ), 其他 3 个 miRNAs 在这 4 个组织中的 mRNA 表达量差异不显著 ( $P > 0.05$ )。



A. ssc-miR-9-2 在牛 4 个组织表达情况; B. hsa-miR-7 在牛 4 个组织表达情况; C. mmu-miR-467c 在牛 4 个组织表达情况; D. cfa-miR-143 在牛 4 个组织表达情况。\* .  $P < 0.05$

A. The expression of ssc-miR-9-2 in 4 tissues of lactating Chinese Holstein cows; B. The expression of has-miR-7 in 4 tissues of lactating Chinese Holstein cows; C. The expression of mmu-miR-467c in 4 tissues of lactating Chinese Holstein cows; D. The expression of cfa-miR-143 in 4 tissues of lactating Chinese Holstein cows. \* .  $P < 0.05$

图 2 4 个牛新 miRNAs qRT-PCR 验证结果

Fig. 2 The results of qRT-PCR validation of 4 predicted bovine miRNAs

## 2.3 靶基因预测

采用 TargetScan 和 PicTar 软件分别对 44 个 miRNAs 进行了靶基因预测, 分别得到 9 526 和 5 658 个靶基因, 二者共有的靶基因为 4 524 个。

利用 KOBAS2.0 在线软件和 KEGG 通路对 4 524 个靶基因进行通路和 GO 分析, 显著富集的信

号通路包括: MAPK 信号通路、Wnt 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、TGF-beta 信号通路、ErbB 信号通路 ( $P < 0.05$  为显著富集的信号通路) 等; 显著富集的 GO 条目包括: 序列特异性 DNA 结合、细胞发育、解剖结构形态、DNA 结合转录调节区域、核酸结合调节区域 ( $P < 0.05$  为显著富集的 GO 条目)

等。

### 3 讨 论

由于 miRNA 序列很短,在基因组中找到匹配序列的概率较大,仅仅搜索相似序列将会产生大量的假阳性结果,如果结合这些相似序列的侧翼序列可能形成二级结构来进一步筛选,能大大减少假阳性率<sup>[13]</sup>。由表 3 可以看出,本研究得到的发夹结构有很多,因此我们在对发夹结构筛选中要求严格符合上述预测原则以减少假阳性率。本研究通过生物信息学预测到 44 条牛新的候选 miRNAs。在对这 44 条 miRNAs 的前体分子进行分析的时候,我们发现两条序列相似的 miRNAs 分子可由不同的前体分子产生,如表 4 中的 hsa-miR-24、hsa-miR-29b-2、ssc-miR-421、ssc-miR-9-1,其形成的两条发夹结构均符合 miRNA 的预测原则,而且这 8 条发夹结构自由能较小,这些 miRNAs 各项指标均符合预测标准,可以推测它们同样是存在的。这些 miRNAs 分子前体处于基因序列的不同位置,具有某些 miRNA 基因成簇排列的特性<sup>[14-15]</sup>。P. Landgraf 等<sup>[16]</sup>发现,有的前体分子能同时产生多条 miRNAs 分子且符合 miRNA 筛选原则,说明同一前体分子在特定条件下通过特定的剪切方式产生不同 miRNAs 分子,本研究由于严格遵守筛选原则,并未发现由同一前体形成的多条 miRNAs 分子。

在相同的条件下,qRT-PCR 结果显示,4 个新预测 miRNAs 分子在奶牛乳腺、心、子宫和肝中均有表达,但具有组织特异表达的特点。本研究通过对子宫中不同 miRNAs 表达量的分析,发现 miRNA 表达量不同,M. Castoldi 等<sup>[17]</sup>研究发现,在同一组织中,不同的 miRNA 的表达量完全不同,与本研究结果一致。

本研究对 3 767 条 miRNAs 分子进行比对,最后只获得 44 条候选 miRNAs 分子,与芯片技术相比得率较低。芯片技术通过杂交可以发现大量的 miRNAs 分子,但是无法直接得到 miRNA 的前体序列、基因位置以及可能的靶基因等信息。通过生物信息学,能够弥补芯片技术的不足,还可预测其靶基因,成本低。该研究证实,通过 miRNA 的保守性和物种之间基因组的同源性,用生物信息学筛选和寻找新的 miRNA 候选序列的方法能够在较短时间里寻找出一定量的新 miRNAs 分子,速度快、通量大,为我们以后寻找更多的 miRNAs 提供了新思

路、新途径。

随着各物种中 miRNAs 的大量分离和鉴定,miRNAs 功能鉴定成为了一项重要课题,而靶基因预测成为了这项课题的重要环节。自 2003 年起,各种靶基因预测软件被相继开发。尽管有多种靶基因预测软件的辅助,但 miRNA 靶基因鉴定仍然存在一定困难。这些软件各有特点,预测结果各不相同,而且一个 miRNA 会预测到上百甚至上千个靶基因<sup>[18-19]</sup>。有研究表明,TargetScan 和 PicTar 均把 miRNAs 种子序列与靶基因的互补以及保守性作为一个重要特征,两者预测结果相似程度达 80%~90%,PicTar 被证明是与试验验证结果相符程度最高的软件<sup>[20]</sup>。为提高靶基因预测准确性,本研究同时采用 TargetScan 和 PicTar 软件进行预测,并进行并集。

由显著富集的信号通路和 GO 条目可以看出,本研究鉴定得到的 miRNA 靶基因主要参与了蛋白合成、脂肪代谢以及核酸形成。结合这些信息,为进一步研究 miRNA 及其靶基因调控通路以及奶牛重要性状形成的遗传机制提供了依据。

总体来说,本研究通过 miRNA 的保守性和物种之间基因组的同源性,通过生物信息学筛选,然后 qRT-PCR 验证寻找牛新的 miRNA 是一种行之有效的方法,为奶牛基因表达调控及其性状形成机制研究提供了前期基础。

### 参考文献(References):

- [1] LEE Y, AHN C, HAN J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing[J]. *Nature*, 2003, 425: 415-419.
- [2] HUTVAGNER G. Small RNA asymmetry in RNAi: Function in RISC assembly and gene regulation[J]. *FEBS Lett*, 2005, 579: 5850-5857.
- [3] PASQUINELLI A E, REINHART B J, SLACK F, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA[J]. *Nature*, 2000, 408(6808): 86-89.
- [4] LU C, TEJ S S, LUO S, et al. Elucidation of the small RNA component of the transcriptome[J]. *Science*, 2005, 309(5740): 1567-1569.
- [5] LAI E C, TOMANCAK P, WILLIAMS R W, et al. Computational identification of drosophila microRNA genes[J]. *Genome Biol*, 2003, 4(7): R42.
- [6] BEREZIKOV E, CUPPEN E, PLASTERK R H. Ap-

- proaches to microRNA discovery [J]. *Nat Genet*, 2006, 38: S2-S7.
- [7] 陈海漩, 严忠海, 龙健儿, 等. 应用生物信息学寻找山羊新的 microRNA 分子及其实验验证 [J]. *遗传*, 2008, 30(10): 1326-1332.
- CHEN H X, YAN Z H, LONG J E, et al. Computational and experimental identification of novel microRNAs in goat [J]. *Hereditas*, 2008, 30(10): 1326-1332. (in Chinese)
- [8] LAGOS-QUINTANA M, RAUHUT R, LENDECK-EL W, et al. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs [J]. *Science*, 2001, 294(5543): 853-858.
- [9] 穆松, 钟金城, 陈智华, 等. 牛基因组中新的 microRNA 预测及分析 [J]. *中国草食动物*, 2010, 30(1): 8-11.
- MU S, ZHONG J C, CHEN Z H, et al. Prediction and analysis of novel miRNA in cattle [J]. *China Herbivores*, 2010, 30(1): 8-11. (in Chinese)
- [10] 赵东宇, 王岩, 罗迪, 等. 生物信息学中的 MicroRNA 预测研究 [J]. *吉林大学学报(信息科学版)*, 2008, 26(3): 276-280.
- ZHAO D Y, WANG Y, LUO D, et al. Advances of microRNA prediction in bioinformatics [J]. *Journal of Jilin University (Information Science Edition)*, 2008, 26(3): 276-280. (in Chinese)
- [11] ZHANG B, PAN X, COBB G P, et al. Plant microRNA: A small regulatory molecule with big impact [J]. *Dev Biol*, 2006, 289(1): 3-16.
- [12] QIU C X, XIE F L, ZHU Y Y, et al. Computational identification of microRNAs and their targets in *Gossypium hirsutum* expressed sequence tags [J]. *Gene*, 2007, 395(1-2): 49-61.
- [13] XIE F L, HUANG S Q, GUO K, et al. Computational identification of novel microRNAs and targets in *Brassica napus* [J]. *FEBS Lett*, 2007, 581(7): 1464-1474.
- [14] XU S, WITMER P D, LUMAYAG S, et al. MicroRNA transcriptome of mouse retina and identification of a sensory organ-specific miRNA cluster [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(34): 25053-25066.
- [15] ROYO H, CAVAILLÉ J. Non-coding RNAs in imprinted gene clusters [J]. *Biol Cell*, 2008, 100(3): 149-166.
- [16] LANDGRAF P, RUSU M, SHERIDAN R, et al. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing [J]. *Cell*, 2007, 129(7): 1401-1414.
- [17] CASTOLDI M, SCHMIDT S, BENES V, et al. mi-Chip: an array-based method for microRNA expression profiling using locked nucleic acid capture probes [J]. *Nat Protoc*, 2008, 3(2): 321-329.
- [18] VEGH P, FOROUSHANI A B, MAGEE D A, et al. Profiling microRNA expression in bovine alveolar macrophages using RNA-seq [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2013, 155(4): 238-244.
- [19] LAWLESS N, FOROUSHANI A B, MCCABE M S, et al. Next generation sequencing reveals the expression of a unique miRNA profile in response to a gram-positive bacterial infection [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(3): e57543.
- [20] RAJEWSKY N. microRNA target prediction in animals [J]. *Nat Genet*, 2006, 38(Suppl): S8-13.

(编辑 郭云雁)