

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2008.01326

应用生物信息学寻找山羊新的 microRNA 分子及其实验验证

陈海漩^{1,2}, 严忠海^{1,2}, 龙健儿^{1,2}, 颜景斌^{1,2}, 黄英^{1,2}

1. 上海交通大学医学遗传研究所, 上海 200040;
2. 卫生部医学胚胎分子生物学重点实验室, 上海市胚胎与生殖工程重点实验室, 上海 200040

摘要: microRNA(miRNA)是一类长约 22 个碱基的非编码 RNA 分子, 在转录后水平调节基因的表达及其在细胞的增殖、分化、凋亡等过程中起着重要的调控作用。根据 miRNA 分子具有一定的保守性, 文章将人、小鼠、牛、猪和狗 5 种哺乳动物已知的 miRNA 分子与 NCBI 公布的与山羊具有极高同源性的绵羊基因组序列对比, 获得 11 条 miRNA 候选分子, 然后通过逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)验证, 发现在山羊脑组织中这 11 条分子均有表达, 肝脏组织中有 5 条分子表达, 初步确定为山羊新的 miRNA 分子, 为寻找山羊 miRNA 提供了新的思路。

关键词: miRNA; 山羊; 生物信息学

Computational and experimental identification of novel microRNAs in goat

CHEN Hai-Xuan^{1,2}, YAN Zhong-Hai^{1,2}, LONG Jian-Er^{1,2}, YAN Jing-Bin^{1,2}, HUANG Ying^{1,2}

1. Shanghai Institute of Medical Genetics, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200040, China;
2. Key Lab of Medical Embryo Molecular Biology, the Ministry of Health; Shanghai Laboratory of Embryo and Reproduction Engineering, Shanghai 200040, China

Abstract: microRNA (miRNA) is a class of non-coding small RNA molecules with roughly 22 nucleotides in length, regulating gene expression on post-transcriptional level and playing an important role in cell proliferation, differentiation and apoptosis process. Based on the conservation of miRNAs sequence, we compared the known miRNAs among five mammals, i.e., human, mouse, cattle, pig and dog with the sequence of sheep genome that is highly homologous to goat genome, published on the NCBI, and 11 candidate miRNAs were eventually obtained. RT-PCR analysis showed the expression of the 11 miRNAs in brain and 5 in liver, indicating that they might be novel miRNAs. The methodology provides an alternative approach to the exploration of new miRNAs in goat.

Keywords: miRNA; goat; bioinformatics

收稿日期: 2008-03-02; 修回日期: 2008-04-02

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目(863 计划)(编号: 2007AA100502)和上海市重点学科项目(编号: B204)资助[Supported by the Hi-Tech Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2007AA100502), and Shanghai Leading Academic Discipline Project (No.B204)]

作者简介: 陈海漩(1982-), 男, 硕士研究生, 专业方向: 生物化学与分子生物学。E-mail: seafishchend@sina.com

通讯作者: 黄英(1952-), 女, 研究员, 研究方向: 胚胎工程与细胞生物学。E-mail: huangying723@smmail.cn

致谢: 感谢曾溢滔院士, 黄淑娟、任兆瑞研究员对本文提出的宝贵意见。

mircoRNA 是一类非编码的单链小 RNA 家族, 长度在 22 个碱基左右。在生物体内, miRNA 基因由 RNA 聚合酶 II 转录, 被 RNase 酶 Drosha 剪切成长约 70~80 个碱基、具有发夹二级结构的前体 miRNA (pre-miRNA)^[1]。pre-miRNA 在细胞质中被 RNase 酶 Dicer 剪切为长约 22 碱基的双链分子, 解链成为成熟的 miRNA 单链分子^[2]。成熟的 miRNA 分子与特定的蛋白形成 RNA 诱导的沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC), RISC 与靶基因的 mRNA 的 3' 端非翻译区(3'-UTR)以碱基配对方式结合, 以高度匹配则降解 mRNA, 部分匹配则抑制翻译这两种方式来下调靶基因的表达^[3], 在植物中多为前者调节方式, 而动物中多为后者。miRNA 在转录后水平迅速灵敏地调节着基因的表达, 在生物体发育过程中, 对细胞的增殖、凋亡和分化都起着重要的调控作用。

至今为止, 在动植物中已经有超过 5 000 条的 miRNA 分子被确定并组成了公开的 miRNA 数据库——miRBASE(<http://microrna.sanger.ac.uk/>)。由于发现 lin-4 和 let-7 基因筛选的方法^[4, 5]效率低下, 现在已很少被采用。取而代之的是直接克隆的方法^[6-8]。首先分离纯化得到小分子量的 RNA, 然后分别在它的 5' 端和 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, 得到的 cDNA 单链通过 PCR 反应扩增, 挑选单克隆测序^[7]。因为是直接对小分子量的 RNA 进行分离筛选, 所以比之前基因筛选的方法效率提高了许多^[8]; 但是这种方法也有缺点, 一些表达量很低的 miRNA 分子就很难被克隆得到, 而大 RNA 分子降解后的碎片同样有可能被分离克隆, 可实际上这些克隆却是无效的^[6]。

通过对已知 miRNA 分子序列的对比, 发现大多数 miRNA 分子序列具有保守性, 进一步对 pre-miRNA 的序列分析, 发现同样具有一定保守性。基于这个特点, 近年来通过生物信息学来寻找新的 miRNA 分子的新方法应运而生^[9]。由于这种方法具有通量大、速度快等特点, 可以十分有效地对新 miRNA 分子, 尤其是对于表达量低、无法直接克隆得到的 miRNA 分子进行预测^[10], 而通过这种方法预测得到的 miRNA 分子需要通过克隆、Northern 杂交或者芯片技术等实验来进行验证^[8]。

目前 Sanger 数据库中关于羊的 miRNA 只有在绵羊中注册了 4 条, 山羊中还没有。Zhang 等^[11]利用芯片杂交技术, 在山羊的皮肤中检测出了 143 条 miRNA 分子存在表达, 其中有 69 条作为山羊与绵

羊共表达的 miRNA 分子发布在 NCBI 上, 已为研究 miRNA 在山羊皮肤发育中的功能提供了基础。因此寻找更多的山羊 miRNA 分子, 研究其在山羊发育过程中的功能, 为各种有经济价值的羊乃至转基因山羊的生产提供更多生物学信息, 已经是迫切的需求。本文通过生物信息学的方法, 对山羊 miRNA 分子进行预测, 并通过逆转录及聚合酶链反应(RT-PCR)进行验证, 确定了一些山羊的新 miRNA 分子, 并为寻找 miRNA 分子提供了一种新思路。

1 材料和方法

1.1 miRNA 分子、羊基因组序列分析

我们从 miRNA 分子数据库下载了绵羊、狗、猪、牛、小鼠和人 6 种哺乳动物已经注册的 miRNA 分子, 经过对比, 删除了狗、猪、牛、小鼠和人中与绵羊中相同的 miRNA 分子, 剩余的作为原始数据进行分析。由于山羊的基因组在 NCBI 上还没有建库, 无法对其进行 Blast。但根据众多文献报道, 山羊与绵羊的基因有极高的同源性(90% 以上)^[12-14], 作为一种新的尝试, 我们将 miRNA 与绵羊的基因组序列进行 Blast 来寻找山羊的 miRNA。为了尽可能得到多的候选 miRNA 分子, 选择了在 NCBI 基因库中公布的绵羊的全部克隆序列(在 Blast 页面上的 Database 中选择 Clone and Sequences)作为原始序列。

1.2 miRNA 分子的预测

预测新的 miRNA 分子需要遵循下列原则: (1) 新的 miRNA 分子与成熟的 miRNA 分子只能存在 0~4 个碱基差异; (2) 新的 miRNA 的前体分子能折叠成发夹的二级结构, 并且 miRNA 分子在其一条臂上; (3) 发夹结构必须有着较小的自由能; (4) miRNA 中 A+U 的含量在 30%~70%; (5) 发夹结构中, miRNA 分子与其互补序列的差异不能多于 6 个; (6) 在 miRNA 分子中不能存在环状结构^[10]。根据这些原则, 按照图 1 的步骤进行 miRNA 分子的预测^[15]: 在网页 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast> 上进行 Blast 比对; 删除重复和表达蛋白的序列后, 再利用 mFold 在线软件 <http://frontend.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/cgi-bin/rna-form1.cgi> 预测 RNA 二级结构。

1.3 miRNA 的克隆与检测

从山羊的脑和肝组织中抽提总 RNA, 利用试剂盒(Invitrogen)分离小 RNA(<200 nt)。然后用 poly(A)

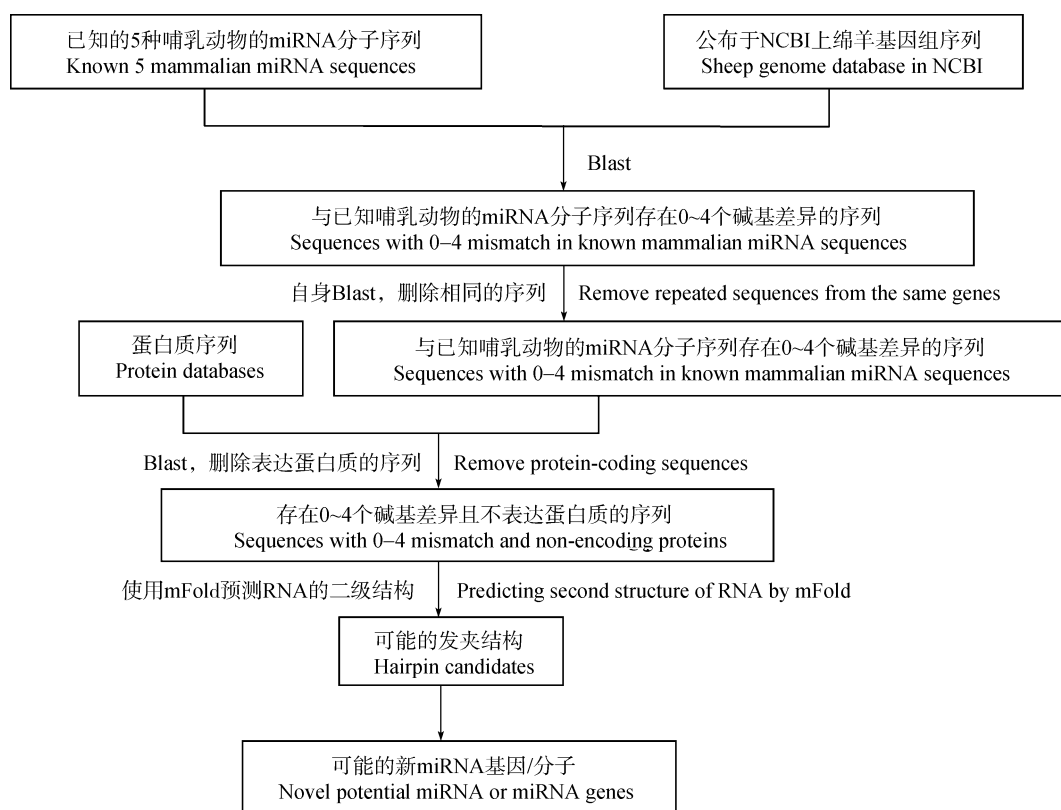


图 1 miRNA 筛选流程

Fig. 1 Selection of miRNA

聚合酶对小 RNA 加 poly(A)尾。这些带有 poly(A)的小 RNA 会被特异的逆转录引物进行逆转录反应得到 cDNA。然后将同一 cDNA 作为模板, 分别用 5S RNA 上的一段序列和逆转录引物上的部分序列作为一对引物, 扩增 5S RNA 片段作为参照(长约 160 bp), miRNA 序列和逆转录引物上的部分序列作为一对引物, 扩增 miRNA 特异片段(长约 70 bp), 检测对应的 miRNA 是否表达(图 2)^[16]。

2 结果与分析

2.1 新的 miRNA 分子筛选

根据图 1 的流程, 我们利用 miRNA 分子的同源性通过绵羊的基因组寻找山羊的新 miRNA 分子, 结果见表 1。我们下载了人、小鼠、牛、猪和狗 5 种哺乳动物共 978 条 miRNA 分子, 通过 Blast 在绵羊的基因组中得到具有一定同源性的序列 19 792 条, 但是其中只存在 0~4 个碱基差异的同源序列只有 635 条, 删除掉重复的和表达蛋白的序列, 全部 978 条 miRNA 分子中, 只有 157 条 miRNA 分子对应着

符合要求的同源序列 561 条。将这些序列下载后, 选

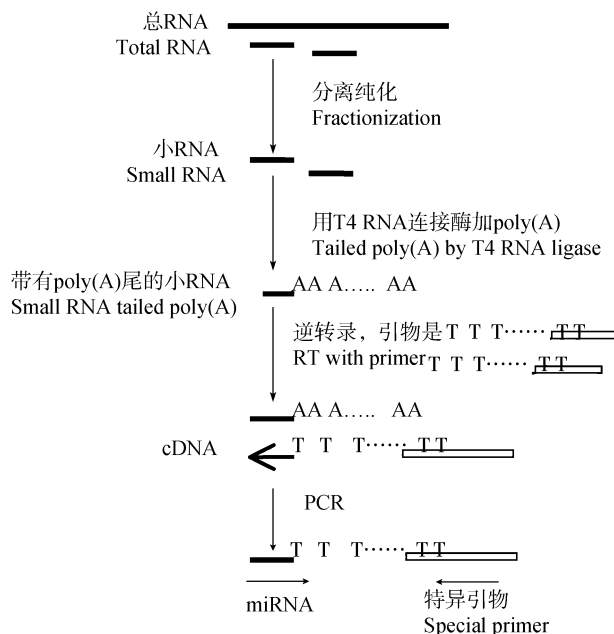


图 2 miRNA 的克隆方法

Fig. 2 Cloning method of miRNA

择包含有 miRNA 相似序列的前后总共长约 100nt 的片段利用在线 mFold 软件进行折叠, 得到可能的发夹结构共 28 个, 将其与 sanger 数据库中 pre-miRNA 分

子进行(<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/search.shtml>)对比, 同源性高、有可能是新的 miRNA 分子的序列共 11 条。图 3 列出了前体分子通过 mFold 预

表 1 miRNA 筛选结果
Table 1 Result of miRNA Blast

哺乳动物 Mammals	比对的 miRNA 数目 Number of miRNAs	具有同源性的 羊的序列数目 Number of homologous sequences	0~4 个碱基差异 的序列数目 Number of homologous sequences with 0 - 4 mismatches	存在同源序列的 miRNA 数目 Number of miRNAs having homologous sequences	不重复、不表达 蛋白序列数目 Number of sequences with 0 - 4 mismatches and non-encoding proteins	可能的发 夹结构 Hairpin candidates	可能的新 miRNA 分子/基因 Novel potential miRNAs or miR- NA genes
人 Human	454	9316	289	74	285	12	6
鼠 Mouse	358	7504	271	66	229	11	3
牛 Cattle	108	1827	53	15	39	5	2
猪 Pig	53	1098	20	2	8	0	0
狗 Dog	5	47	2	0	0	0	0
总计 Total	978	19792	635	157	561	28	11

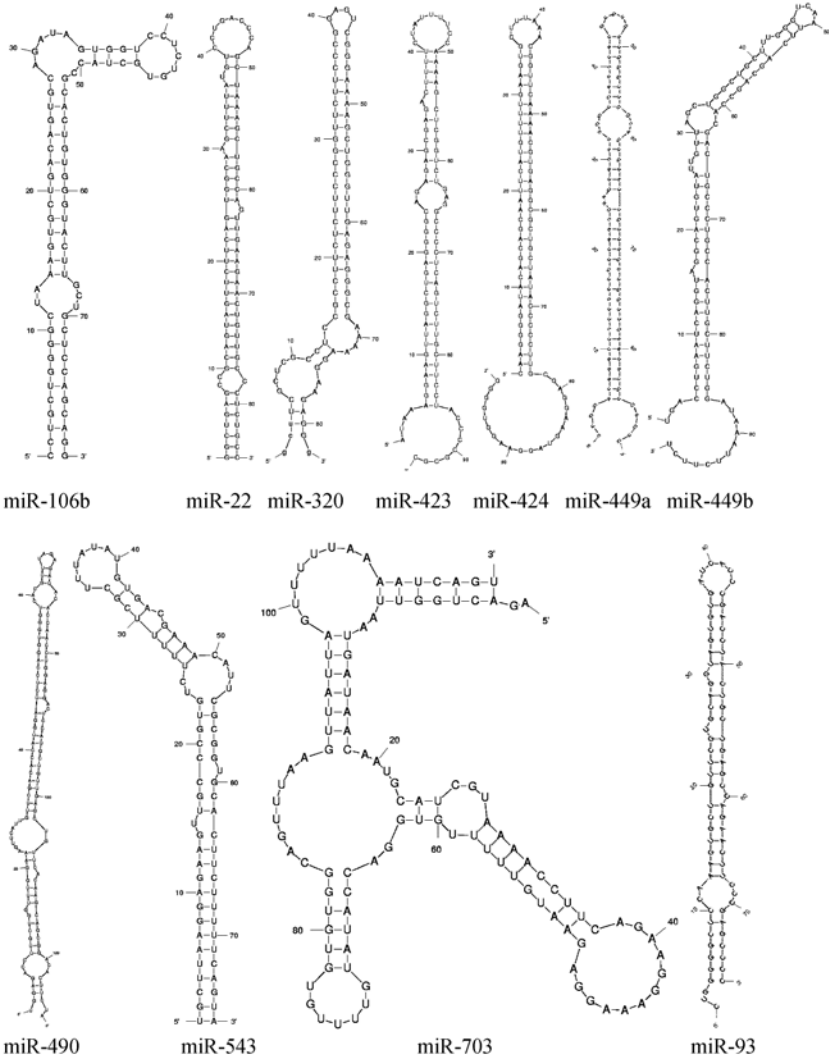


图 3 候选 miRNA 前体分子二级结构预测
Fig. 3 Prediction of secondary structure of pre-miRNA molecule

测得到的二级结构图。

这 11 条可能的新的 miRNA 基因的各项参数如表 2 所示。多数 pre-miRNA 分子的长度在 80 ~ 100 nt, 8 条 miRNA 折叠自由能小于 -30 kcal/mol, A+U 的碱基的含量从 34.8%~68.4%, 都落在要求范围内。多数 miRNA 分子的碱基差异数都为 0, 显示出较高的保守性。但是 miRNA-449a、543、703 的折叠

自由能相对较大, 其中 703 前体分子由于相比于小鼠 miRNA-703 前体分子同源性极高(95.5%), 但存在 3 个 U 的缺失, 导致了二级结构出现了很大变化, 没有折叠出发夹结构(图 3, miR-703)。推测它所在的序列是新 miRNA 基因的可能性相对较小, 而其余分子所在的序列则很有可能就是新 miRNA 基因。

表 2 新 miRNA
Table 2 Novel miRNAs

序号 No.	新 miRNA Novel miRNAs	序列座位 Locus	序列长度 Length (nt)	前体 miRNA 长度 Length of pre-miRNA	折叠自由能 Folding free energies (kcal/mol)	位置 Position	miRNA 序列 Sequence	miRNA 碱 基数 Length of miRNA (nt)	不匹配数 Number of mismatch (nt)	A+U (%)
1	106b	DU178553	693	80	-47.4	5'	uaaagucgucagagucagau	21	0	57.1
	106b*					3'	ccgcacugugggacuugcugc	22	0	36.4
2	22*	DU454478	910	85	-39.8	5'	aguucucaguggcaagcuua	22	0	59.1
	22					3'	aagcugccaguugaagaacugu	22	0	54.5
3	320	DU495486	687	82	-44.0	3'	aaaagcuggguagaggcgca	22	0	45.5
4	423-5p	DU521730	686	94	-48.8	5'	ugaggggcagagagcagacuuu	23	0	43.5
	423-3p					3'	agcucgggucagagcccccucagu	23	1	34.8
5	424	DU483418	719	98	-41.1	5'	cagcagcaauucauguuuugaa	22	0	63.6
	424*					3'	caaacgugaggcgucgcuau	21	0	46.1
6	449a	DU436180	882	90	-23.5	3'	uggcaguguauguuagcuggu	22	0	54.5
7	449b	DU436180	882	98	-36.1	5'	aggcaguguauguuagcuggc	22	0	50.0
8	490-5p	DU446683	327	128	-49.6	5'	ccauggaucuccaggugggu	20	0	40.0
	490-3p					3'	caaccuggaggacuccaugcug	22	0	40.9
9	543	DU224414	629	76	-26.5	3'	aaacauucgcgugcacuucu	21	0	52.4
10	703	DU266467	906	113	-17.1	5'	aaaaacuucagaaggaaag	19	2	68.4
11	93	DU178553	693	77	-30.7	5'	caaagucguguucgucaggua	22	0	50.0

2.2 miRNA 分子的克隆鉴定

通过筛选得到的 miRNA 分子并非一定会在山羊体内表达, 需要通过实验对其验证。我们按照之前所述方法(图 2)在山羊的脑和肝脏组织中对筛选得到的 11 条 miRNA 分子和 5S RNA 进行克隆, 但不包括 106b*、22*、423-5p、424*、490-5p。

图 4 结果显示: 我们通过克隆获得了良好的 5S RNA RT-PCR 结果, 保证了分离得到的小分子 RNA 和通过逆转录反应得到的 cDNA 的质量, 使得 miRNA 的克隆更为可信。图 5 结果显示: 在脑组织中, 所有的 miRNA 分子都扩增到了相应电泳条带, 说明上述 11 条 miRNA 分子在脑组织中均被表达。在肝脏组织中, 只有 miRNA-106b、22、320、423-3p、424 存在相应电泳带, 说明在肝脏组织中存在表达,

而其余的 449a、449b、490、543、703 和 93 均没有相应电泳带, 无法明确判断其在肝脏组织的表达情况。由于在脑组织中, miRNA 的 RT-PCR 产物电泳图均有这已知的 11 条 miRNA 分子表达, 初步确定应该是山羊的新 miRNA 分子。

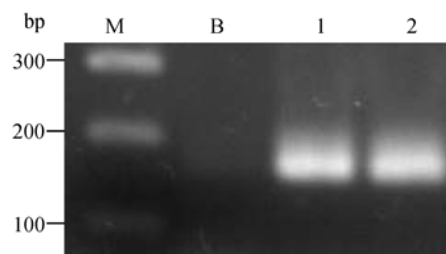


图 4 山羊脑及肝脏组织 5S RNA 逆转录 PCR 电泳结果
M: Marker; B: 空白对照; 1: 脑; 2: 肝脏。

Fig. 4 RT-PCR of 5S RNA in brain and liver of goat
M: Marker; B: Blank; 1: Brain; 2: Liver.

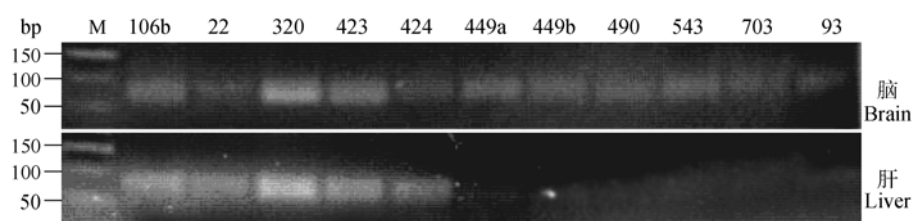


图 5 山羊脑及肝脏组织 miRNA 克隆电泳图

M: Marker; 106b~93: miRNA。

Fig. 5 Results of cloning miRNA in brain and liver of goat

3 讨论

我们通过生物信息学筛选最终获得了 11 条 miRNA 候选分子。在对这 11 条 miRNA 的前体分子进行分析的时候, 注意到有的前体分子能同时产生两条 miRNA 分子, 使我们还找到了另外一条, 如表中的 106b*、22*、423-5p、424*和 490-5p, 它们同样符合 miRNA 的其他条件, 而且虽然没有对其进行克隆验证, 但是由于与各自对应的 miRNA 来源于同一条前体分子, 可以推测它们同样是存在的。根据序列, 由同一前体分子产生的两条 miRNA 并非完全互补^[17], 暗示同一前体分子在特定条件下会有特定的剪切方式产生不同 miRNA 分子。相对于一条前体分子能产生两条序列完全不同 miRNA 分子这种现象, 两条序列相似的 miRNA 分子可由不同的前体分子产生, 比如 449a 和 449b, 它们各自的前体分子处于序列 DU436180 中的不同位置, 而且 449a 的前体分子折叠自由能较高, 说明其真正的前体分子可能位于基因组别处。各项指标均良好的 miRNA-106b、106b*和 93 的前体分子同样在一个基因序列中, 但是它们的序列完全不同且处于不同位置: 106b、106b*的前体分子开始于第 229 个碱基结束于第 308 个碱基而 93 的前体分子开始于第 27 个碱基结束于第 103 个碱基, 表现出了某些 miRNA 基因成簇排列的特性^[18,19]。

在相同条件下, 脑与肝组织中 miRNA 的 RT-PCR 结果存在差异。可能是由于 miRNA 分子表达的组织特异性引起 miRNA-449a、449b、490、543、703 和 93 在肝组织中表达量很低或者不表达, 从而导致了它们的电泳条带在脑和肝组织之间的差异。但是 miRNA-106b、22、320、和 423-3p 在两个组织中表现出了相似的表达量, 320 在脑和肝组织中表达都是很高的, 106b 和 423-3p 也有较高的表达, 22

则同时表现出较低的表达量。而 Zhang 等^[11]从山羊的皮肤中也检测到了 miRNA-106b、320 的表达, 推测它们不是组织特异性表达。从电泳带的强弱可以看出, 即便在同一组织中, 不同的 miRNA 的表达量也是完全不同的^[20]。前体分子表现出较高自由能的 miRNA-449a、543、703 和 93, 虽然在山羊的脑组织中表达, 但是通过 Blast 得到的同源序列很有可能不是这些 miRNA 的前体分子, 即只能认为找到了新的 miRNA 分子却不能认为找到了新的 miRNA 基因。

我们从 978 条 miRNA 分子中进行比对, 最后只筛选出 11 条 miRNA 分子, 与芯片技术相比得率很低。这主要是由山羊基因组还未建库、绵羊基因组序列尚不完整造成的。芯片技术通过杂交可以发现大量的 miRNA 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。而通过生物信息学, 除了在对比过程中就能了解的前体序列、基因位置等信息外, 随着基因组的完善, 甚至还可以预测其靶基因。这两种方法各有利弊。不过, 从同源性高的动物的基因组进行 Blast 以寻找其他动物的 miRNA, 作为一种新的尝试, 取得了较好的结果。总体来说, 这种利用 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实验验证寻找新的 miRNA 的方法能够在较短时间内找出一定量的新 miRNA 分子, 通量大速度快, 为在生物体内寻找更多的 miRNA 分子提供了新的思路, 也可为研究 miRNA 在发育生物学、胚胎工程的研究中的生物学功能探讨提供了有价值的技术平台。

参考文献(References):

- [1] Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Rådmark O, Kim S, Kim VN. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 2003, 425:

- 415–419.[\[DOI\]](#)
- [2] Hutvagner G. Small RNA asymmetry in RNAi: Function in RISC assembly and gene regulation. *FEBS Letters*, 2005, 579: 5850–5857.
- [3] Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, 2000, 404: 293–296.[\[DOI\]](#)
- [4] Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 2001, 294: 862–864.[\[DOI\]](#)
- [5] Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degen B, Müller P, Spring J, Srinivasan A, Fishman M, Finnerty J, Corbo J, Levine M, Leahy P, Davidson E, Ruvkun G. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*, 2000, 408: 86–89.[\[DOI\]](#)
- [6] Berezikov E, Cuppen E, Plasterk RH. Approaches to microRNA discovery. *Nat Genet*, 2006, 38: S2–S7.[\[DOI\]](#)
- [7] Lu C, Tej SS, Luo S, Haudenschild CD, Meyers BC, Green PJ. Elucidation of the small RNA component of the transcriptome. *Science*, 2005, 309: 1567–1569.[\[DOI\]](#)
- [8] Zhang BH, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. Plant microRNA: A small regulatory molecule with big impact. *Dev Biol*, 2006, 289: 3–6.[\[DOI\]](#)
- [9] Wang XJ, Reyes JL, Chua NH, Gaasterland T. Prediction and identification of *Arabidopsis thaliana* microRNAs and their mRNA targets. *Genome Biol*, 2004, 5: R65.[\[DOI\]](#)
- [10] Xie FL, Huang SQ, Guo K, Xiang AL, Zhu YY, Nie L, Yang ZM. Computational identification of novel microRNAs and targets in *Brassica napus*. *FEBS Letters*, 2007, 581: 1464–1474.[\[DOI\]](#)
- [11] Wenguan Z, Jianghong W, Jinquan L, Yashizawa M. A subset of skin-expressed microRNAs with possible roles in goat and sheep hair growth based on expression profiling of mammalian microRNAs. *OMICS*, 2007, 11(4): 385–396.[\[DOI\]](#)
- [12] Iannuzzi L, Skow L, Di Meo GP, Gallagher DS, Womack JE. Comparative FISH-mapping of villin (VIL) gene in river buffalo, sheep and goat chromosomes. *Chrom Res*, 1997, 5: 199–202.[\[DOI\]](#)
- [13] YIN Jun, HU Ting-Mao, LI Jin-Quan, ZHANG Chun-Lan, GUO Zhi-Cheng, ZHOU Huan-Min. Cloning and analysis of six full-length cDNA similar to sheep KAP6-1 from Cashmere goat. *Acta Genetica Sinica*, 2004, 31(5): 502–507.
尹俊, 扈庭茂, 李金泉, 张春兰, 郭志成, 周欢敏. 与绵羊 KAP6-1 相似的 6 个绒山羊全长 cDNA 的克隆与序列分析. *遗传学报*, 2004, 31(5): 502–507.
- [14] Zhou H, Hickford JG, Fang Q. Polymorphism of the DQA2 gene in goats. *J Anim Sci*, 2005, 83: 963–968.
- [15] Qiu CX, Xie FL, Zhu YY, Guo K, Huang SQ, Nie L, Yang ZM. Computational identification of microRNAs and their targets in *Gossypium hirsutum* expressed sequence tags. *Gene*, 2007, 395(1–2): 49–61.[\[DOI\]](#)
- [16] Afanasyeva EA, Hotz-Wagenblatt A, Glatting KH, Westermann F. New miRNAs cloned from neuroblastoma. *BMC Genomics*, 2008, 9(1): 52.[\[DOI\]](#)
- [17] Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, Sewer A, Iovino N, Aravin A, Pfeffer S, Rice A, Kamphorst AO, Landthaler M, Lin C, Socci ND, Hermida L, Fulci V, Chiaretti S, Foà R, Schliwka J, Fuchs U, Novosel A, Müller RU, Schermer B, Bissels U, Inman J, Phan Q, Chien M, Weir DB, Choksi R, De Vita G, Frezzetti D, Trompeter HI, Hornung V, Teng G, Hartmann G, Palkovits M, Di Lauro R, Wernet P, Macino G, Rogler CE, Nagle JW, Ju J, Papavasiliou FN, Benzing T, Lichter P, Tam W, Brownstein MJ, Bosio A, Borkhardt A, Russo JJ, Sander C, Zavolan M, Tuschl T. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell*, 2007, 129(7): 1401–1414.[\[DOI\]](#)
- [18] Xu S, Witmer PD, Lumayag S, Kovacs B, Valle D. MicroRNA transcriptome of mouse retina and identification of a sensory organ-specific miRNA cluster. *J Biol Chem*, 2007, 282(34): 25053–25066.[\[DOI\]](#)
- [19] Royo H, Cavaillé J. Non-coding RNAs in imprinted gene clusters. *Biol Cell*, 2008, 100(3): 149–166.[\[DOI\]](#)
- [20] Castoldi M, Schmidt S, Benes V, Hentze MW, Muckenthaler MU. miChip: an array-based method for microRNA expression profiling using locked nucleic acid capture probes. *Nat Protoc*, 2008, 3(2): 321–329.[\[DOI\]](#)