

RNA 加尾和引物延伸法检测黑腹果蝇 3 种 microRNA 表达量

戚晓娴, 李晓梅, 陈永, 钟国华
(华南农业大学 昆虫毒理研究室, 广东 广州 510642)

摘要:采用 RNA 加尾和引物延伸 real time PCR 法实时定量检测了黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 的 *bantam*、*mir-14*、*mir-2a* 共 3 种 microRNA(miRNA) 在各发育阶段组织中的相对表达情况,发现 3 种 miRNA 在不同发育时期的表达差异明显,其表达变化规律与文献报道基本一致,验证了该法的可靠性.这种“加尾和引物延伸”方法,仅需 1~10 ng 总 RNA 或等同物,检测范围可达 7 个数量级,为昆虫 miRNA 研究提供了可靠的定量检测方法.

关键词:黑腹果蝇; microRNA; RNA 加尾; 引物延伸; 定量检测

中图分类号:S482.39

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2011)01-0024-06

Real-Time Quantification of 3 microRNAs of *Drosophila melanogaster* by RNA-Tailing and Primer-Extension qRT-PCR

QI Xiao-xian, LI Xiao-mei, CHEN Yong, ZHONG Guo-hua
(Laboratory of Insect Toxicology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract:The modified RNA-tailing and primer-extension qRT-PCR method was used to detect relative quantity of 3 microRNAs, *bantam*, *mir-14* and *mir-2a*, in various developmental stages in *Drosophila melanogaster*. The results showed that the expression patterns of these miRNAs had the significant differences in different developmental stages, and the change dynamics of miRNAs relative quantities were consistent with the literatures which verified the reliability of this method. This method of RNA-tailing and primer-extension had advantages of high sensitivity, which only needed 1 to 10 ng total RNA or equivalents, and wide detection range with 10^7 grades, compared with other methods, which would provide a reliable method of quantification detection in insect miRNAs researches.

Key words:*Drosophila melanogaster*; microRNA; RNA-tailing; primer-extension; quantitative detection

微小 RNA (microRNA, miRNA) 是一类广泛存在于真核生物中的小分子非编码 RNA, 长约 21~24 nt, 是生物体内天然产生的一群高度保守的短的单链 RNA, 由其发夹状前体转录子经剪切而成. microRNA 由特定基因编码, 但不翻译成蛋白, 作为转录后基因表达的调控者, 它通过与靶标基因信使 RNA (messenger RNA, mRNA) 的特定位置结合, 抑制该基因编码蛋白的合成或诱导靶向 mRNAs 的降解或阻断其翻译过程, 从而参与许多重要生理、病理过程关键基

因的表达调控^[1].

近年来, 以黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*、蜜蜂 *Apis mellifera*^[2]、赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* Herbst^[3] 等已获得整个基因组序列的模式昆虫为研究材料的昆虫 miRNA 功能研究亦引起国内外的重视, 并取得了许多重要成果, 为阐明生命活动规律, 研究人类重大疾病产生机理, 探索疾病治疗新方案, 寻找害虫防治新途径等提供了重要的参考^[4-5]. Aravin 等^[6]报道在黑腹果蝇不同的生长阶段, miRNA 表

收稿日期:2010-04-06

作者简介:戚晓娴(1985—),女,硕士研究生;通信作者:钟国华(1973—),男,副教授,博士,E-mail:guohuazhong@scau.edu.cn

基金项目:国家自然科学基金(30971944);教育部全国优秀博士学位论文作者专项基金(2004061)

达存在差异,认为它们在发育过程中起了潜在调节作用。Brenneck 等^[7]研究发现大小只有 21 nt 的 *bantam* 在翻译水平抑制果蝇促凋亡因子 *hid* 的表达,而 *mir-14* 能够抑制果蝇中依赖 *reaper* 的细胞死亡^[8], *mir-2a* 则能够通过抑制促凋亡因子 *grim/reaper/hid* mRNA 的翻译,调控果蝇胚胎发育过程中的细胞凋亡。深入研究这些 miRNA 可能为设计以 miRNA 为靶点的小分子药物提供重要靶标信息,但应用传统的定量检测方法存在许多不足。

miRNA 表达量是深入研究相关 miRNA 功能的重要内容。细胞内 miRNA 存在前体和成熟体 2 种形式,但只有短的成熟体具备生物活性。目前,最常用的检测和定量 miRNA 的方法是 Northern 杂交、芯片 (Microarrays) 以及核糖核酸酶保护分析 (Ribonuclease protection assays)^[9-12], 这些传统方法都需要标记探针并与纯化的 RNA 进行杂交。成熟的活性 miRNAs 及其前体共享一段相同的靶序列,而基于杂交的各种技术又无法通过分子大小将它们区分,因此很难专一性地识别成熟 miRNAs,结果导致很高的前体背景信号。而且,基于杂交的各种技术需要标记步骤或放射性同位素,费时且昂贵,所得数据的动态分布范围又很有限。所以,如何避免 miRNA 前体的干扰,而专一定量检测成熟体活性,成为传统定量检测方法必须解决的问题。

实时荧光定量 PCR 技术是在 PCR 反应体系中加入荧光试剂,利用荧光信号实时检测 PCR 进程,最后通过标准曲线对未知模板进行定量分析的方法,一般能够专一、灵敏、快速、高重复性地精确定量起始模板浓度。但由于 miRNA 成熟体的长度太短,并不能通过传统的实时定量 PCR 进行检测。本文参考医学和哺乳动物 miRNA 研究文献,通过改进的 miRNA 加尾和引物延伸 RT-PCR 法实时定量检测了上述 3 个黑腹果蝇细胞凋亡相关 miRNA (*bantam*、*mir-2a* 和 *mir-14*) 的相对表达量,为进一步研究昆虫 miRNA 提供可靠的参考方法。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫

黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*, 野生型 Oregon R, 已传代饲养 100 代以上。成虫培养基为标准玉米培养基,产卵培养基为葡萄汁培养基。试虫装入养虫瓶于光照培养箱饲养,饲养条件为 25 °C,相对湿度 65% ~ 85%。

1.2 小 RNA 的提取

采用百泰克公司的 miRNA 快速抽提试剂盒,按照试剂盒使用说明,分别在野生型黑腹果蝇卵(发育

2、6、10、16 和 24 h)、幼虫(1 龄、2 龄、3 龄)、蛹(预蛹、初蛹、老熟蛹)、成虫(新羽化成虫、>2 d 成虫)共 13 个时期提取小 RNA。将材料在液氮中充分研磨,根据组织的量按比例加入 MRL 裂解液(每 100 mg 组织加入 1 mL 裂解液)。细胞裂解后离心弃去残渣,按比例加入适量氯仿抽提,再次离心后取上层水相,0.6 倍 φ 为 70% 乙醇,混匀后过吸附柱 A。收集过柱后的滤液并准确量取其体积,加入 2/3 倍无水乙醇,混匀后过吸附柱 B,用 700 和 500 μ L RW 漂洗液分别漂洗 1 次,加 30 ~ 60 μ L H₂O 洗脱,得到 <200 bp 的小 RNA。在加尾和反转录前测定 RNA 浓度,并经 35 g · L⁻¹ 的琼脂糖凝胶电泳检测确认。另外用 10 g · L⁻¹ 的琼脂糖凝胶电泳确认从吸附柱 A 中洗脱的大 RNA 有没有降解,以保证小 RNA 的质量。所有小 RNA 样品置 -80 °C 保存备用。

1.3 小 RNA 分子加 Poly(A) 尾与反转录

取 15 μ L RNA、4 μ L 5 × Poly(A) Buffer、2 μ L 10 mmol/L 的 ATP、1 μ L Poly(A) 聚合酶(Ambion 公司产品),混匀后 37 °C 反应 1 h,加 H₂O 补至 100 μ L,加入 100 μ L 氯仿异戊醇抽提 1 次,4 °C、12 000 r/min 离心 15 min,取上清,加入 1/10 体积 3 mol/L 的醋酸钠(pH 5.2),2.5 倍体积的无水乙醇,-20 °C 沉淀过夜,4 °C、12 000 r/min 离心 5 min,弃去乙醇后再洗涤 1 次,干燥,加入 10 μ L 无 RNA 酶水溶解。在 25 μ L 体系中,用 AMV 进行反转录(TaKaRa 公司产品),反转录所用引物序列在 Oligo-dT 的 3' 端增加了 1 个碱基,以锚定反转录引物:5'-GCTGTCAACGAT-ACGCTACGTA-ACGGCATGACAGTG(T) 24(A, G, C)-3'。

1.4 实时 PCR 引物设计

miRNA 检测内参选用黑腹果蝇 5S RNA,下游引物为:5'-GCTGTCAACGATACGCTACGTAACG-3'。

上游引物的设计是在 miRNA 及 5S RNA 序列后加上如下序列:

AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACACTGTCTG
TGCCGTTACGTAGCGTATCGTTGACAGC.

然后在 Primer 3 引物设计软件中进行选择和确认。引物设计中尽可能使所有引物都具有相同的 T_m 值(DNA 融解温度,指把 DNA 的双螺旋结构降解一半时的温度),以便能同一批检测这些 miRNA,确保 GC 含量在 30% ~ 80%,对一些 GC 含量较低或较高的 miRNA,增加或减少引物长度使 T_m 值达到或接近 58 ~ 60 °C 之间,引物与引物之间避免形成稳定的二聚体或发夹结构。试验所用的上游引物如下:

bantam: 5'-TGAGATCATTTTGAAGCTG-3';

mir-2a: 5'-TATCACAGCCAGCTTTGATGACC-3';

mir-14: 5'-TCAGTCTTTTTCTCTCTCCTAA-3';
5S RNA: 5'-CGACCATAACCACGCTGAATACA-3'.

1.5 实时定量 PCR 扩增

采用 SYBR Green I 染料,它是荧光定量 PCR 最常用的 DNA 结合染料,可以与双链 DNA 结合并发出荧光.在游离状态下,SYBR Green I 发出微弱的荧光,一旦与双链 DNA 结合后,其荧光增强到游离状态的 1 000 倍.所以,一个反应发出的全部荧光信号与出现的双链 DNA 量成正比,可以根据荧光信号检测出 PCR 体系存在的双链 DNA 数量.SYBR Green I 的最大吸收波长约为 497 nm,发射波长最大约为 520 nm.在应用 SYBR Green I 进行 Real-time PCR 反应时,选择的 PCR 扩增程序一般为变性(94 ℃) - 退火(50 ~ 60 ℃) - 延伸(68 ~ 72 ℃)三步法,40 ~ 45 个循环.

按照 TaKaRa 公司的 SYBR Premix Ex Taq™ 试剂盒操作说明配制反应液,整个过程均在冰上进行,体系为:2 × SYBR Premix Ex Taq™ 10 μL,正向引物 0.4 μL,反向引物 0.4 μL,cDNA 模板 2.0 μL,灭菌 ddH₂O 补至 20 μL.用 BioRad 公司的实时定量 PCR 仪 DNA Engine Opticon 2 进行 PCR 扩增.引物浓度为 10 μmol/L.PCR 循环条件为 95 ℃ 预变性 1 min,95 ℃ 变性 10 s,55 ℃ 退火 18 s,72 ℃ 延伸 18 s,82 ℃ 读板,共 42 个循环,扩增反应结束后,继续从 60 ℃ 到 98 ℃ 做融解曲线.以不同样品 cDNA 为模板,与标准曲线的建立同时进行,每个样品 3 个重复.PCR 产物的特异性通过产物融解曲线和 35 g · L⁻¹ 的琼脂糖凝胶电泳检测进行确认.

1.6 数据分析

试验数据处理及作图用 Microsoft Excel 2003 软件进行,并采用 DPS 数据处理系统,对试验结果用邓

肯氏新复级差多重比较法(Duncan's Multiple Range Test,DMRT)进行差异显著性分析.采用 Bio-Rad 公司的 Mj Opticon Monitor 3.1 软件分析 PCR 结果.反应结束后,根据各扩增曲线得到各基因达到典型扩增的 Ct 值(指每个反应管内的荧光信号达到设定的域值时所经历的循环数),并根据 Ct 值制作出各基因的标准曲线.根据目的基因和内参基因的 Ct 值换算出各自的起始模板量.利用内参基因作为参比基因来对所有样品进行归一化处理(RNA 量校正),即目的基因校正相对含量 = 目的基因的起始定量/内参基因的起始定量,得出每种 miRNA 相对于内参(5S RNA)的表达量.

2 结果与分析

2.1 敏感性、线性与特异性分析

采用体积比 1:5 的稀释度,每个样品 3 个重复进行实时定量 PCR 检测,此时多数样品中 miRNA 的 Ct 值在 10 ~ 30 之间(表 1).3 种待测 miRNA PCR 扩增的特异性好,结果显示在 $1.0 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^6$ 拷贝之间与 Ct 值具有良好的相关性,相关系数均在 0.97 以上,PCR 产物的融解峰在 76 ~ 78 ℃,为单一峰(图 1、图 2 展示 *mir-14* 基因检测的灵敏度与线性关系以及融解曲线,其余略),琼脂糖凝胶电泳检测见 80 bp 的 DNA 条带(图 3);不含模板的阴性对照没有融解峰.5S RNA PCR 产物的融解峰在 84 ℃,琼脂糖凝胶电泳见 181 bp 的 DNA 条带.由于有的 miRNA 序列本身的原因(能形成发夹或二聚体),因此引物设计不可能完美,再加上模板处理的因素,使得有些模板和引物的结合不够好,扩增产物的融解曲线为双峰或不规则峰型.

表 1 黑腹果蝇 *bantam*、*mir-14*、*mir-2a* 和 5S RNA 基因在各发育时期中的 Ct 值¹⁾

Tab.1 The Ct value of *bantam*, *mir-14*, *mir-2a* and 5S RNA in different development stages of *Drosophila melanogaster*

| 发育时期 | Ct 值 | | | |
|-----------|---------------|----------------|----------------|---------------|
| | <i>bantam</i> | <i>mir-14</i> | <i>mir-2a</i> | 5S RNA |
| 胚胎发育 2 h | 24.40 ± 0.13e | 24.91 ± 0.37f | 23.47 ± 0.29e | 20.51 ± 0.37f |
| 胚胎发育 6 h | 22.41 ± 0.26g | 21.93 ± 0.24h | 19.28 ± 0.03f | 15.77 ± 0.34h |
| 胚胎发育 10 h | 31.86 ± 0.16a | 27.29 ± 0.05cd | 25.17 ± 0.38d | 24.42 ± 0.01c |
| 胚胎发育 16 h | 28.97 ± 0.20c | 26.39 ± 0.44e | 28.59 ± 0.19a | 26.80 ± 0.17a |
| 胚胎发育 24 h | 24.88 ± 0.20e | 23.20 ± 0.02g | 24.10 ± 0.16e | 23.21 ± 0.05d |
| 1 龄幼虫 | 31.44 ± 0.29a | 27.39 ± 0.34cd | 28.88 ± 0.28a | 24.12 ± 0.05c |
| 2 龄幼虫 | 28.15 ± 0.16d | 27.75 ± 0.04bc | 27.44 ± 0.09b | 26.31 ± 0.09a |
| 3 龄幼虫 | 31.42 ± 0.28a | 27.65 ± 0.43bc | 26.48 ± 0.23c | 25.27 ± 0.19b |
| 预蛹 | 27.59 ± 0.34d | 26.75 ± 0.18de | 23.44 ± 0.24e | 22.20 ± 0.09e |
| 初蛹 | 23.79 ± 0.38f | 26.74 ± 0.19de | 19.38 ± 0.17f | 18.11 ± 0.06g |
| 老熟蛹 | 30.19 ± 0.33b | 27.29 ± 0.13cd | 25.77 ± 0.32d | 25.50 ± 0.15b |
| 新羽化成虫 | 31.62 ± 0.13a | 28.26 ± 0.37ab | 27.14 ± 0.41bc | 26.55 ± 0.02a |
| > 2 d 成虫 | 30.76 ± 0.35b | 28.52 ± 0.13a | 26.84 ± 0.20bc | 24.46 ± 0.09c |

1) 表中数据为平均值 ± 标准误;同列数据后凡具有一个相同字母者,表示在 0.05 水平差异不显著(DMRT 法).

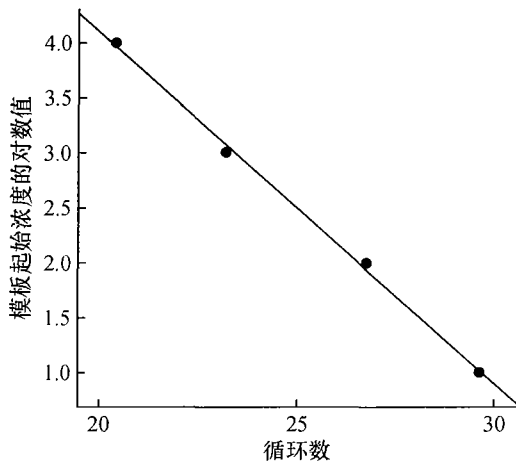


图 1 mir-14 基因的灵敏度与线性关系

Fig. 1 Relationship between sensitivity and linear of mir-14

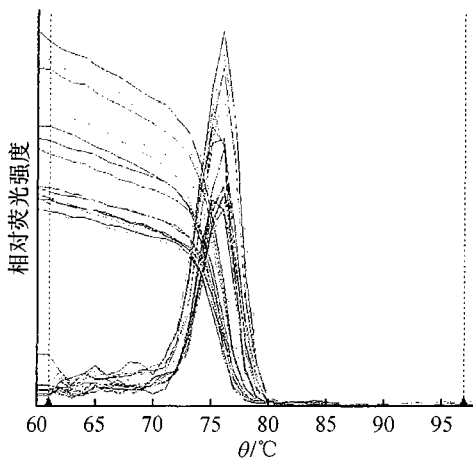


图 2 mir-14 基因的融解曲线

Fig. 2 Melting curve of mir-14

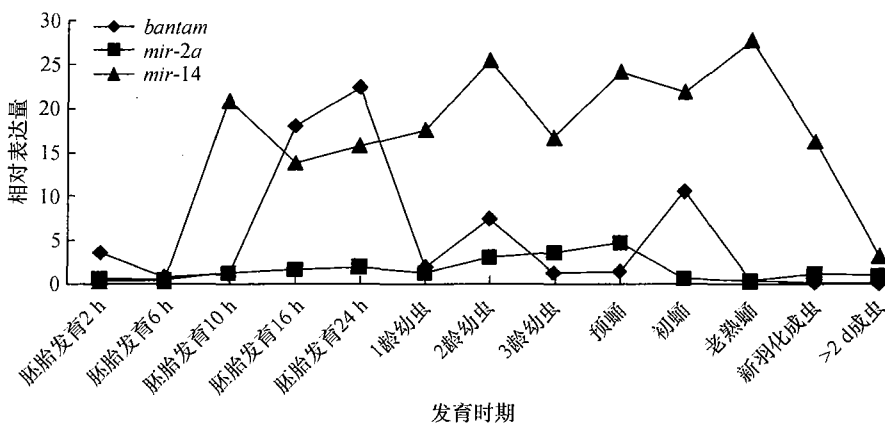
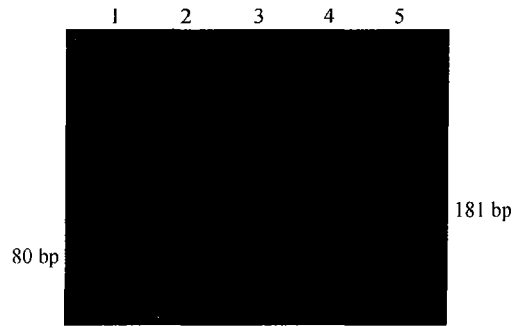


图 4 黑腹果蝇 bantam、mir-2a 和 mir-14 在不同发育时期的相对表达量变化

Fig. 4 Relative expression of bantam, mir-2a and mir-14 in different development stages of Drosophila melanogaster

从不同发育历期看,卵发育早期(6 h 前),3 个 miRNA 表达差异不大,从胚胎发育 10~24 h,卵逐渐发育成幼虫,此时 mir-2a 仍保持低水平表达,但 bantam 和 mir-14 表达达到高峰,说明在幼虫发育阶段,

可能是 bantam 和 mir-14 的作用更加明显;在幼虫发育阶段,mir-2a 继续保持低水平,mir-14 保持高水平,只有 bantam 从表达高峰迅速降低到低水平,说明 bantam 可能在昆虫由卵发育至幼虫过程中起到极其



1: bantam; 2: mir-2a; 3: mir-14; 4: low DNA Ladder; 5: 5S RNA.

图 3 琼脂糖凝胶电泳检测黑腹果蝇 bantam、mir-2a、mir-14 扩增产物

Fig. 3 PCR amplification of bantam, mir-2a and mir-14 in Drosophila melanogaster detected by agarose electrophoresis

2.2 黑腹果蝇 bantam, mir-2a 和 mir-14 在不同生长发育时期的相对表达量

结果(图 4)表明,黑腹果蝇细胞凋亡 3 个相关 miRNA 在卵 6 h 前表达量差异不大,但从 6 h 后,表达规律差异很大,这可能与各个 miRNA 在不同发育时期所起的功能不同有关.在整个发育历期中,mir-2a 整体表达水平均较低,变化不大,只而在卵 24 h 以及 2、3 龄幼虫和预蛹期有相对较高的表达量;而 mir-14 则在整个发育历期中均有较高的表达量,从卵 10 h 开始,直至新羽化时期,均维持高表达量;在老熟蛹期达到表达高峰期,直至 >2 d 成虫期才降低到低水平表达.相比于 mir-2a 的持续低表达以及 mir-14 的持续高表达,bantam 的表达量峰期更明显,在卵期 16 h 至 1 龄幼虫期出现 1 个表达高峰,在 2 龄幼虫和初蛹期又有 2 个小高峰.

重要的作用;在幼虫阶段,*mir-2a* 表达略有增加,在2龄期,*bantam* 和 *mir-14* 均表现出1个表达小高峰;在蛹期,*bantam* 表现出1个表达小高峰;而在由蛹至成虫期过程中,*bantam* 和 *mir-2a* 均处于低表达,但 *mir-14* 在老熟蛹期达到最高表达,在 >2 d 成虫中三者均表现出低水平。

3 讨论与结论

近年来国内关于人类疾病和哺乳动物发育中 miRNA 差异表达的研究报道很多^[15-17],主要研究方法包括 Northern 杂交技术、基因芯片技术、锁定的核苷酸原位杂交技术、实时定量 PCR 等。但研究昆虫 miRNA 定量表达的报道很少,其中原因之一可能是 miRNA 分子量太小,采用常规方法克隆、定量检测的难度较大,重复性不高。本文综合参考文献方法^[13-18],根据 miRNA 特有的结构,设计特殊的反转录引物,配合实时定量 PCR 引物,通过改进的 miRNA 加尾和引物延伸 RT-PCR 法实时定量检测了3种黑腹果蝇细胞凋亡相关 miRNA,即 *bantam*, *mir-2a* 和 *mir-14* 的相对表达量,为昆虫 miRNA 研究提供了可靠的参考方法。

文献报道 miRNA 定量检测方法有多种,本文所采用的“加尾和引物延伸”方法的检测基础在于其靶向特异性的单碱基锚定反转录引物,克服了小 RNA 分子太短,无法按常规设计随机引物进行反转录和实时 PCR 的困难,能专一性的与成熟 miRNA 结合,形成反转录引物/成熟 miRNA 复合物,并在 miRNA 的 5' 末端延伸,这样就得到一个较长的反转录扩增子,为进一步做实时定量 PCR 提供了符合要求的模板,能区分高度同源的 miRNA 序列。这种方法具有灵敏度高、所需样品量少、分辨率高、所需仪器简单等优势。与常规的 Northern 杂交相比,这种“加尾和引物延伸”方法,灵敏度相当高,极少量的样品(仅需 1~10 ng total RNA 或等同物)即可满足要求,而且操作简单,检测范围宽,可达到7个数量级,而 Northern 杂交方法是基于分子杂交的原理,方法敏感性低,需要的 RNA 量较大。与微阵列技术相比,“加尾和引物延伸”方法所需的仪器简便,具有明显的成本优势。曾有文献报道采用分子信标作为荧光探针定量研究家蚕 miRNA^[19],分子信标探针是在核酸杂交原理和荧光共振能量转移现象的基础上开发出来的^[20],是一种具有“茎环”结构的发夹式探针,当有目的基因存在时,分子信标探针的“环”部分与目的基因互补结合,形成比发夹式探针更稳定的杂交二聚体,使得

荧光基团和猝灭基团距离增大,在激发光的作用下产生荧光,特殊的发夹结构使得其具有背景信号低、灵敏度高、特异性识别性强的特点^[21]。本文报道的“加尾和引物延伸”方法与之相比,采用的反转录引物属通用引物,更为方便,一次反转录产物可用于检测数百个 miRNA,SYBR Green I 荧光标记成本低,操作简单,可快速、敏感、高通量地同时比较一种组织模板中几个 miRNA 的表达,也可以比较多个组织模板中多个 miRNA 的表达,在样品量有限时更具优势,成本也大大降低;不同长度的成熟 miRNA 变体都能被加尾和反转录,保证了定量的准确性。

本文研究结果表明,*bantam*, *mir-2a* 和 *mir-14* 这3种 miRNA 在黑腹果蝇不同发育时期表达量差异较大,即使同一发育时期差异也很大。Brenneck 等^[7]用 Northern 杂交检测 *bantam* 基因在果蝇各时期的表达情况,结果表明,在胚胎发育 12~24 h 内,*bantam* 表达量达到最大,其次是一龄幼虫和初蛹时期,其余时期的表达量均较低。Aravin 等^[6]同样用 Northern 杂交的方法检测果蝇中 *mir-2a* 的表达量,发现它在各时期中所呈现的整体表达量均较低,但 6 h 以后到蛹阶段的表达相对高于其他时期。采用本文方法对 *bantam* 和 *mir-2a* 表达所得结果和反映的规律与文献报道的变化规律基本一致,进一步证明了本方法的可靠性。关于 *mir-14* 的表达情况鲜见报道,采用本文方法的测定结果表明,其总体上表达量较高,这个结果为今后研究 *mir-14* 时提供了参考。另外,本文所采用的方法也存在一些缺点,如同样会遇到个别 miRNA 引物自身形成发夹或二聚体从而影响特异的扩增信号和扩增效率,此问题的克服有待于新技术的突破。

参考文献:

- [1] KIM V N, HAN J J, SIOMI M C. Biogenesis of small RNAs in animals [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2009, 10: 126-139.
- [2] 陈璇, 郑火青, 余东亮, 等. 蜜蜂基因组中 miRNA 的研究进展 [J]. *中国蜂业*, 2008, 59(3): 12-13.
- [3] LUO Qi-bin, ZHOU Qing, YU Xiao-min, et al. Genome-wide mapping of conserved microRNAs and their host transcripts in *Tribolium castaneum* [J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2008, 35(6): 349-355.
- [4] BARTEL D P. MicroRNAs, genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. *Cell*, 2004, 116(2): 281-297.
- [5] CROCE C M, CALIN G A. miRNAs, cancer, and stem cell division [J]. *Cell*, 2005(2), 122: 6-7.
- [6] ARAVIN A A, LAGOS-QUINTANA M, YALCIN A, et al.

- The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development [J]. *Developmental Cell*, 2003, 5 (2): 337-350.
- [7] BRENECK J, HIPFNER D R, STARK A, et al. *bantam* encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene *hid* in *Drosophila* [J]. *Cell*, 2003, 113: 25-36.
- [8] XU Pei-zhang, VERNOOY S Y, GUO Ming, et al. The *Drosophila* microRNA *mir-14* suppresses cell death and is required for normal fat metabolism [J]. *Current Biology*, 2003, 13(9): 790-795.
- [9] LAGOS-QUINTANA M, RAUHUT R, MEYER J, et al. New microRNAs from mouse and human [J]. *RNA*, 2003, 9: 175-1791.
- [10] SEMPERE L F, FREEMANTLE S, PITHA-ROWE I, et al. Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation [J]. *Genome Biology*, 2004(3): 13.
- [11] CASTOLDI M, SCHMIDT S, BENES V et al. A sensitive array for microRNA expression profiling (miChip) based on locked nucleic acids (LNA) [J]. *RNA*, 2006, 12: 913-920.
- [12] NELSON P T, BALDWIN D A, SCEARCE L M, et al. Microarray-based, high-throughput gene expression profiling of microRNAs [J]. *Nat Methods*, 2004, 1: 155-161.
- [13] SHI R, CHIANG V L. Facile means for quantifying microRNA expression by real-time PCR [J]. *Biotechniques*, 2005, 39: 519-525.
- [14] RAYMOND C K, ROBERTS B S, GARRETT-ENGELE P, et al. Simple, quantitative primer-extension PCR assay for direct monitoring of microRNAs and short-interfering RNAs [J]. *RNA*, 2005, 11: 1737-1744.
- [15] 张旗, 何湘君, 潘秀英. RNA 加尾和引物延伸 RT-PCR 法实时定量检测 microRNA [J]. *北京大学学报: 医学版*, 2007, 39(1): 87-91.
- [16] 吴炳坤, 唐永德. 荧光定量聚合酶链反应检测胃癌 let-7 MicroRNA [J]. *检验医学*, 2008, 23(3): 305-307.
- [17] 王杰, 李杰, 陈青梅, 等. 半定量 RT-PCR 法分析两种 microRNAs 在肝癌和癌旁组织中的差异表达 [J]. *胃肠病学和肝病杂志*, 2008, 17(5): 406-409.
- [18] 张勇, 吕延杰, 杨宝峰. MicroRNA 在人类疾病中的作用及其作为靶点的小分子药物设计 [J]. *药学报*, 2007, 42(11): 1115-112.
- [19] ZHANG Yong, ZHOU Xue, GE Xie, et al. Insect-specific microRNA involved in the development of the silkworm *Bombyx mori* [J]. *PLoS ONE*, 2009, 4(3): e4677.
- [20] TYAGI S, KRAMER F R. Molecular beacons; probes that fluoresce upon hybridization [J]. *Nature Biotechnology*, 1996, 14: 303-308.
- [21] 郑红, 孙保存, 王立梅, 等. 分子信标实时定量 PCR 法检测胃癌中 Survivin 基因 mRNA 的表达 [J]. *中华医学杂志研究*, 2006, 6(6): 605-607.

【责任编辑 李晓卉】

欢迎订阅 2011 年《华南农业大学学报》

《华南农业大学学报》是华南农业大学主办的综合性农业科学学术刊物。本刊主要报道农业各学科的科研学术论文、研究简报、综述等,设有农学·园艺·土壤肥料、植物保护、生物学、林业科学、动物科学与兽医学、农业工程与食品科学、信息科学、基础科学、综述、简报等栏目。本刊附英文目录和英文摘要。读者对象主要是农业院校师生、农业科研人员和有关部门的专业干部。

本刊为《中国科学引文数据库》、《中国科技论文统计源(中国科技核心期刊)》及《中国学术期刊综合评价数据库》等固定刊源,并排列在中国科学引文数据库被引频次最高的中国科技期刊 500 名以内。被《中文核心期刊要目总览》遴选为综合性农业科学核心期刊、植物保护类核心期刊。为美国《化学文摘》、美国《剑桥科学文摘》、俄罗斯《文摘杂志》、英国《CABI》、英国《动物学记录》、《中国生物学文摘》及国内农业类文摘期刊等多家国内外著名文摘固定刊源。

国内外公开发行人,季刊,A4 幅面。每期 124 页,定价 10.00 元,全年 40.00 元。自办发行,参加全国非邮发报刊联合征订发行,非邮发代号:6573。

订阅办法:订阅款邮汇至:300385 天津市大寺泉集北里别墅 17 号,全国非邮发报刊联合征订服务部。

《华南农业大学学报》编辑部