

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.28.008

改进茎环引物 RT-PCR 法实时定量检测 microRNA*

薛慧慧 马骁骁 朱长保 晁天柱 肖君华[△] 周宇荀

(东华大学生物科学与技术研究所 上海 201620)

摘要 目的:为检测不同组织中 microRNA(miRNA)的表达量,本研究建立了一种改进的 qRT-PCR(Quantitative reverse transcription PCR)技术。**方法:**采用具有高特异性的茎环引物逆转录,结合 SYBR Green 实时定量 PCR 技术,建立了以延伸茎环引物 RT-PCR 为基础的实时定量检测 microRNA 的方法。**结果:**本研究建立的 microRNA 检测方法,特异性好,灵敏度高,线性范围宽。溶解曲线的单一峰型和电泳检测到的单一条带都证明了扩增的特异性。对标准品的检测跨越了 7 个数量级的浓度范围,最低拷贝数为 10^3 ,效率高达 98%。**结论:**利用该技术检测了 120 个组织样本,说明该方法可快速、准确、高效的获取不同组织中 miRNA 的表达量,为进一步探讨 miRNA 对性发育的影响提供了实验依据。

关键词:miRNA;RT-PCR;茎环引物;引物延伸

中图分类号:Q95-33,Q344.13 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)28-5431-05

Real-time Quantification of MicroRNA by Improved Stem-loop Primer RT-PCR*

XUE Hui-hui, MA Xiao-xiao, ZHU Chang-bao, CHAO Tian-zhu, XIAO Jun-hua[△], ZHOU Yu-xun

(Institute of Biological Sciences and Biotechnology, Donghua University, Shanghai, 201620, China)

ABSTRACT Objective: To establish an improved qRT-PCR (Quantitative reverse transcription PCR) technology to detect the expression levels of microRNA (miRNA) in different tissues. **Methods:** Reverse transcription using high specific stem-loop primer and amplified by SYBR Green real-time PCR, established real-time quantitative method of miRNA based on the stem-loop primer extension RT-PCR. **Results:** This method was specificity, sensitivity and had a high dynamic range. A single dissociation peak on the thermal melting curve and a single DNA band on agarose gel signified the amplification reliability and specificity for miRNA. It exhibited a dynamic range of seven orders of magnitude from 10^3 to 10^9 , efficiency was up to 98%. **Conclusion:** This assay is a fast, accurate and efficient method to quantification of miRNA indicated by detection of 120 tissue samples, provides an experimental basis for further investigate the effects of miRNA on sexual development.

Key words: miRNA; RT-PCR; Stem-loop primer; Primer extension

Chinese Library Classification(CLC): Q95-33, Q344.13 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)28-5431-05

前言

MicroRNAs(miRNAs)是一类由大约 22 个核苷酸组成的单链非编码 RNA,主要通过信使 RNA 的直接剪切或间接抑制翻译在转录后水平调控靶基因的表达^[1]。MicroRNAs 在个体发育的不同时期如细胞分化、增殖、凋亡等及不同组织中有不同的表达模式,表明其在发育和分化中起着重要的调控作用^[2-5]。

传统的 miRNA 检测技术如 northern hybridization^[6], microarray^[7],对低丰度的 miRNA 的扩增敏感性差。qRT-PCR(Quantitative reverse transcription PCR)法是检测基因表达量最灵敏、可靠的方法,但常规的 qRT-PCR 技术难以检测约 22 bp 的 miRNAs,为克服这个问题,开发了茎环引物逆转录法^[8,9]、

poly-A 加尾法^[10,11]等。通过延长逆转录产物的长度,便于 qPCR 引物设计,以利于 PCR 产物扩增。

Chen^[8]等开发的 Taqman 探针 qRT-PCR 检测法,采用基因特异的茎环引物,增强了 RNA-DNA 杂化双链的热稳定性,及茎环引物所产生的空间约束,使逆转录具有较高的灵敏性和特异性。但此方法成本较高,且 Taqman 探针只结合到逆转录产物的部分 cDNA 序列无法完全保证其特异性,亦无法通过融解曲线分析 PCR 反应的特异性。

本研究基于茎环引物逆转录和 SYBR Green qPCR 检测法^[12],建立改进的茎环引物 qRT-PCR 实时定量检测方法,不仅可以直接通过融解曲线判断 PCR 反应的特异性,并且通过优化逆转录茎环引物的长度克服了常规 SYBR Green qPCR 灵敏性

* 基金项目:中央高校基本科研业务费专项资金(13D110521);国家自然科学基金项目(31171199)

作者简介:薛慧慧(1990-),女,硕士研究生,研究方向:医学分子遗传学,Tel:021-67792650;

E-mail:skdxuehui@163.com

[△]通讯作者:肖君华(1968-),男,教授,研究方向:医学分子遗传,Tel: 021-67792652;

E-mail:xiaojunhua@dhu.edu.cn

(收稿日期:2013-12-04 接受日期:2013-12-24)

低、特异性低的缺点。以 2 个品系(转基因和 C57BL/6)小鼠的丘脑、垂体、卵巢、肌肉和脂肪组织为样本,快速、准确、高效的检测 miRNA-505 的表达量,并深入探讨其生物学功能。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 8 周龄 C57BL/6 雌鼠购自上海斯莱克实验动物有限责任公司(SYXK(沪)2007-0005), miR-505 转基因小鼠是由南京模式动物中心培育出的转基因小鼠。动物实验遵守中国 1988 年实验动物管理条例,实验在东华大学生物科学与技术研究所屏障动物实验设施进行[SYXK(沪)2008-0059]。两品系雌鼠分别分成 5、15、25、35 日龄两组,每组 3 窝,每窝收集 3 只。取样前,禁食 4 h,10 a.m-11 a.m 颈椎脱臼处死动物,迅速取出下丘脑、垂体、卵巢、肌肉、脂肪样本,液氮速冻后 -80 °C 保存备用。

1.2 总 RNA 提取、反转录

依照说明书使用 TRIzol Reagent(Invitrogen,美国)提取总 RNA。RNA 的质量和浓度通过 NanoDrop 2000c 超微量分光光度计(Thermo Fisher Scientific,美国)确定。采用 DNaseI(Fermentas,美国)以去除基因组 DNA 污染。

采用 SuperScript II Reverse Transcriptase(Fermentas,美国)试剂盒进行逆转录,反应终体系 10 μ L 包括:6.25 μ L DNase I 处理的总 RNA,0.5 μ L 茎环引物(2 μ M),0.5 μ L dNTP Mix (10 mM)。首先反应在 16 °C 进行 15 min 后,加入剩余体系(2 μ L

5 $\times$ RT buffer,0.5 μ L RevertAid M-MuLV Reverse Transcriptase (200 U/ μ L),0.25 μ L RNase inhibitor(20 U/ μ L)),反应程序为:35 °C 60 min,80 °C 15 min。

1.3 引物设计

MiRNA 序列信息来自 miRBase,参照文献,设计 Stem-loop 茎环反转录特异性引物,PCR 上、下游引物参照 Primer 3 在线软件(<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>)设计(表 1),并由上海生物工程股份有限公司合成。引物设计原理见图 1,PCR 上游引物 5' 末端的尾巴是为了提高其退火温度,下游引物针对环部,其序列可通用。

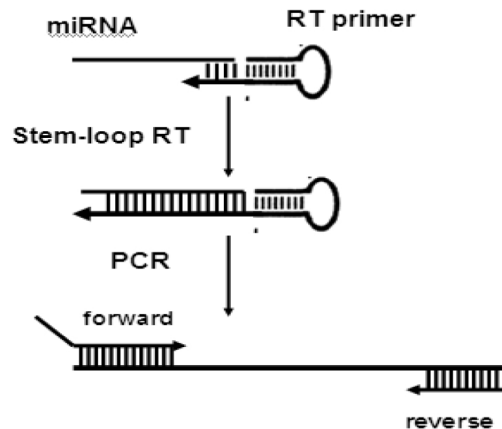


图 1 Stem-loop RT-PCR 原理示意图

Fig.1 Schematic description of stem-loop RT-PCR

表 1 引物序列

Table 1 Primers sequences

Target	Sequence
miR-505-3P-RT 1	GCGTCTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGACGCAGAAAAC
PCR-F 1	GCGAGCACCGTCAACACTTG
PCR-R 1	TGGTGTCTGGAGTCGGC
miR-505-3P-RT 2	GCGTCTCAACTGGTGTCTGGAGTCGGCAATTCAGTTGAGACGCAGAAAACCAGC
PCR-F 2	GCGAGCACCGTCAACACT
PCR-R 2	TGGTGTCTGGAGTCGGC
miR-16-RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCGCCAA
PCR-F	CGCGCTAGCAGCACGTAAAT
PCR-R	GTGCAGGGTCCGAGGT

* 注:1 代表改进前引物;2 代表改进后引物。

*Note: 1 represent original primers;2 represent modified primer.

1.4 实时定量 PCR 扩增

PCR 通过 ABI 7500 real-time PCR system 和 7500 Software v2.0.4 (Applied Biosystems,美国)运行。

PCR 反应终体系 20 μ L 包括:10 μ L 2 $\times$ SYBR Green PCR master mix (Biotek,中国),0.4 μ L ROX,2.5 μ L cDNA 模板,3 μ L PCR 上下游引物(2 μ M),4.1 μ L 水,同时设阴性对照。PCR 循环条件为 95 °C 预变性 2 min,95 °C 变性 15 s,62 °C 延伸 32 s,共 40 个循环,每个样本做 3 个重复。反应的特异性通过产物溶解曲线以及 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测进行确认。

1.5 数据分析

采取手动方式将阈值选定在一个固定的值,7500 Software v2.0.4 自动算出每个样本的 Ct 值的均值及标准差,在 Excel 中计算出 miRNA 相对于内参 miR-16 的表达量 (Δ Ct),并采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法比较实验组和对照组 miR-505-3P 的表达量。

2 结果

2.1 改进引物的特异性验证

PCR 产物电泳结果(图 2)显示,目的片段 58 bp 左右,与预

算值相吻合,但改进前引物的 PCR 阴性在约 50 bp 处出现了模糊的条带,说明可能产生了引物二聚体。PCR 产物的融解曲线,在 80 ℃ 左右出现单一峰,证明了引物良好的特异性(图 3)。

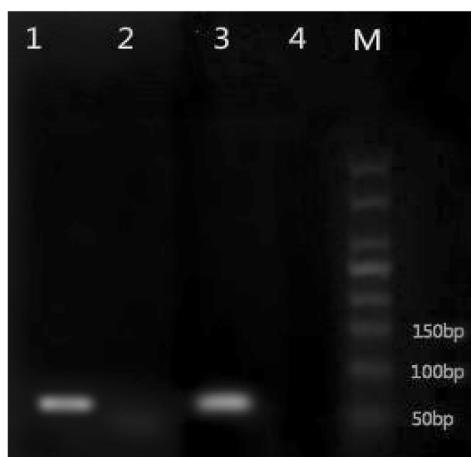


图 2 引物改进前后扩增产物的琼脂糖凝胶电泳

Fig.2 Agarose electrophoresis of PCR amplicons of the original and modified primer respectively

* 注:1:改进前引物的 PCR 产物;2:改进前引物的 PCR 阴性;3:改进后引物的 PCR 产物;4:改进后引物的 PCR 阴性

*Note: 1: PCR product of original primer; 2: Negative control of original primer; 3: PCR product of modified primer; 4: Negative control of modified primer

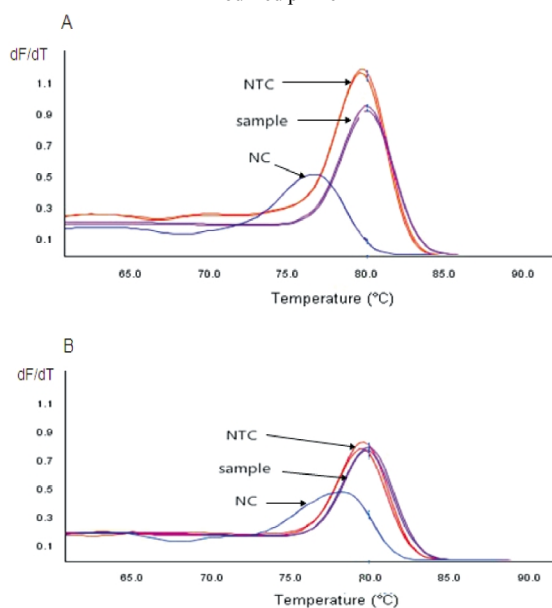


图 3 miRNA 的融解曲线 A:改进前引物的 PCR 产物融解曲线;B:改进后引物的 PCR 产物融解曲线

Fig.3 Melting-curve analysis of miRNA during the real-time PCR

A: Melt curve of PCR amplicon of original primer

B: Melt curve of PCR amplicon of modified primer

* 注:Y 轴 dF/dT 表示 miRNA 的相对荧光值与 X 轴融解曲线温度的相应比值。sample:合成的 miRNA 模板;NTC: 逆转录反应无模板对照;NC: PCR 阴性对照

*Note: The rate of changes (first derivative) of the relative fluorescence units with time (T)(dF/dT) on the Y-axis verses the temperature on the X-axis, which peaks at the melting temperature(T_m). Sample: synthetic miRNA target. NTC: No template control of the reverse transcription reaction; NC: Negative control of real-time PCR.

合成的成熟 miRNA 和前体模板稀释到相同的浓度 1.08×10^8 /RT 反应下(表 2),只有 miRNA 前体存在时,所得到的 Ct 值比成熟的 miRNA 至少高 8.3 个 Ct 值,说明如果检测的成熟 miRNA 和前体是在同一浓度下,其前体对成熟 miRNA 的检测结果只有 0.31%的影响。用总 RNA 代替合成的 miRNA 模板,结果显示前体的 Ct 值比成熟的 miRNA 高至少 10 个 Ct 值,表明,miRNA 的前体是低丰度的,约比成熟 miRNA 低 3 个数量级。综合这些结果表明,改进的茎环引物延伸法对成熟 miRNA 的检测具有高特异性。

2.2 改进引物的灵敏性验证

用合成的 miR-505-3P RNA 模板来评价改进方案的灵敏性和 PCR 效率,将合成的 RNA10 倍稀释 7 个浓度梯度,结果显示,和原来的逆转录引物相比,改进引物的 CT 值和 RNA 模板呈现了更好的线性,表明改进的引物具有更高的效率和更灵敏的检测范围(图 3.2 A,B)。

为进一步验证改进引物在组织中的灵敏性,取不同天数的小鼠 C57BL/6 品系的小鼠下丘脑进行对比。结果显示,不同时间点的小鼠,改进后的引物比改进前引物的 PCR 产物低 2-5 个 Ct 值(图 3.2 C)。

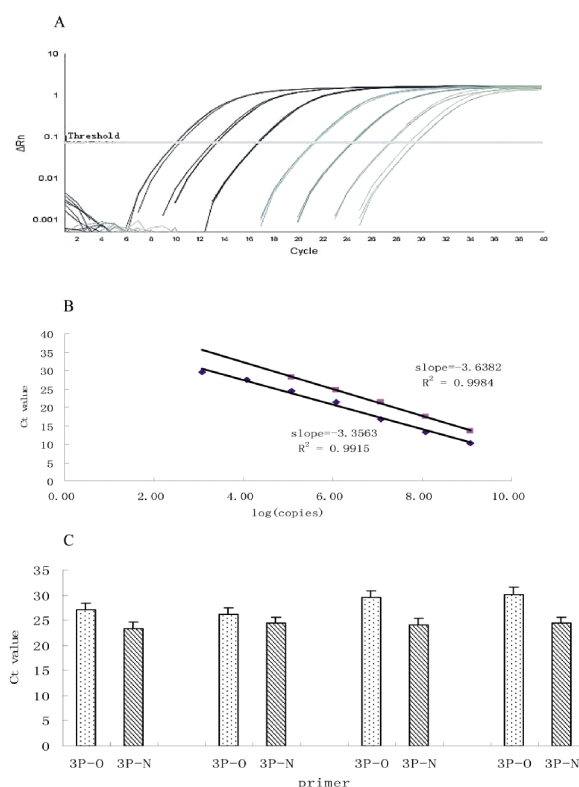


图 4 改进引物的效率和灵敏性验证。(A):改进后引物合成的 miR-505-3P 的扩增曲线,RNA 的初始拷贝数从 1.08×10^3 到 1.08×10^9 ;(B):引物改进前后的标准曲线对比;(C):不同小鼠丘脑中引物改进前后对比

Fig.4 Efficiency and sensitivity of the modified miRNA assay (A) Amplification plot of synthetic miR-505-3P miRNA over seven orders of magnitude. Synthetic RNA input ranged from 1.08×10^3 to 1.08×10^9 in the reverse transcription reaction; (B) Standard curve of the miR-505-3P miRNA of modified stem-loop RT primer and original RT primer, respectively; (C) Comparison between modified primer and original stem-loop RT primer in four different hypothalamus of mouse

表 2 区分成熟 miRNA 和它的前体

Table 2 Discrimination between mature miRNA and its pre-miRNA precursors

ID	Synthetic miRNA (NO. of copies)	Synthetic precursor (NO. of copies)	Total RNA (ng)	Ct miRNA	Ct precursor
miR-505-3P	1.08× 10 ⁸	/	/	16.5	38.3
	/	1.08× 10 ⁸	/	24.8	21.3
	/	/	568	25.04	34.91
	/	/	/	35.39	ND

*注:ND 代表在 40 个循环后没有检测到 PCR 产物。

*Note: ND represents no detectable PCR products after 40 cycles.

2.3 miRNA-505-3P 在 miR-505 转基因小鼠和野生型小鼠不同组织中的表达量分析

试验结果采用 2^{-ΔΔCt} 法进行相对定量分析。结果显示, miR-505-3P 在 TM 和 WM 小鼠的不同时间点下, 相较于其他组织, 在肌肉和脂肪组织中差异显著, 尤其肌肉组织中, miR-505-3P 在 TM 中的表达量显著高于 WM 中的表达, 最高倍数达到 2.85。

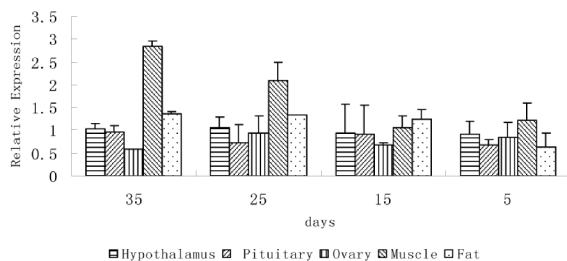


图 5 miR-505-3P 在 TM 和 MW 的丘脑、垂体、卵巢、肌肉、脂肪中的相对表达量

Fig.5 Relative expression of miR-505-3P in TM and WM tissues of hypothalamus, pituitary, ovary, muscle and fat

3 讨论

在已发表的常用的检测 miRNAs 的 PCR 方法中,Chen 等^[8]报道的 Taqman 探针 stem-loop RT-qPCR 法和 Luo Xin 等^[11]报道的通用 TaqMan 探针 Poly-A RT-qPCR 法都需要合成特异的探针,尤其是 Chen 等^[8]的方法需要合成每个 miRNA 特异的探针,成本很高。Shi 等^[10]报道的 SYBR Green 荧光标记法,虽成本低,操作简单,但其灵敏性较低。

本研究基于 Chen 等的设计方案,成功构建了改进茎环引物 RT-qPCR 法实时定量检测 microRNA。用延伸茎环引物的方法,进一步增加了 RNA-DNA 链互补配对的碱基,提高了其热稳定性^[9],更有利于提高逆转录效率;同时将 PCR 下游引物减少了 2 个碱基,克服茎环 RT 引物和 PCR 引物形成二聚体。使用 SYBR Green 荧光染料检测,降低了试验成本,但 SYBR Green 染料与 DNA 双链的结合是非特异性的,要避免定量 PCR 的非特异性扩增,否则将影响试验的准确性和可重复性^[13]。因此,设计定量 PCR 引物时应避免引物形成稳定的发夹结构或二聚体,定量 PCR 反应后,还需要分析溶解曲线,适当优化反应条件。

采用相对定量法进行分析^[14]时,要选用合适的内参基因^[15,16],消除 RNA 提取、逆转录过程中带来的影响,以获得可靠地目标 miRNA 的相对表达量。一般对于 miRNA 的定量分析,选择 U6^[17]、

5S 作为看家基因^[18],但本研究在不同组织和不同时间点 U6 表达量不恒定,所以选择了 miR-16^[19]。

采用 1:10 梯度稀释的合成的成熟 miRNA 模板检测改进引物的 qRT-PCR 效率和灵敏性时,相同的浓度下,改进后的引物比改进前引物 PCR 产物结果小 3-4 个 CT 值,说明延伸的逆转录引物大大提高了 RT 效率,更适用于低丰度的 miRNA 成熟体的检测。虽然,逆转录反应的阴性对照 NTC 的融解曲线 Tm 值和样本相近,但其 CT 值约为 34 左右,远远的小于引物改进后样本的 CT 值,对检测结果影响很小^[9,15]。

用合成的成熟 miRNA 和前体验证改进后引物的特异性时,相同浓度下,前体对成熟体结果的影响只有 0.31%,但用自身特异性的引物检测 miR-505 前体时,PCR 产物的 CT 值为 21.3,相较于成熟的 miRNA 低了约 5 个 CT 值,这可能是由于前体本身的茎环结构,会对逆转录产生影响,使前体的逆转录效率偏低所造成的^[17,20,21],但并不影响成熟 miRNA 的检测。

本研究以 5、15、25、35 日龄 C57BL/6 和 miR-505 转基因小鼠的下丘脑、垂体、卵巢、肌肉和脂肪组织为样本,利用本技术检测了 miR-505-3P 在不同组织中的表达情况。结果发现不同时间点 miR-505-3P 在 miR-505 转基因小鼠下丘脑组织中的表达量均低于 C57BL/6 小鼠下丘脑组织,而在脂肪和肌肉组织中,miR-505 转基因小鼠的表达量明显高于 C57BL/6 小鼠。此外,25、35 日龄时,miR-505-3P 在脂肪和肌肉组织中的相对表达量明显高于下丘脑、垂体、卵巢组织中的相对表达量。业已证明,miR-505 在小鼠胚胎成纤维细胞中抑制 ASF/SF2 的表达^[9],但小鼠性发育调控机制尚未清楚,因此 miR-505 对小鼠性发育的影响有待进一步验证。

参考文献(References)

- [1] Tang Guilang. siRNA and miRNA: An insight into RISCs [J]. Trends Biochem Sci, 2005, 30(2): 106-114
- [2] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function [J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297
- [3] Wienholds E, Plasterk RH. MicroRNA function in animal development [J]. FEBS Lett, 2005, 579(26): 5911-5922
- [4] Zhang B, Pan X, Cobb GP, et al. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors [J]. Dev Biol, 2007, 302(1): 1-12
- [5] Lorena Verduci, Marcella Simili, Milena Rizzo, et al. MicroRNA (miRNA)-mediated Interaction between Leukemia/Lymphoma-related Factor (LRF) and Alternative Splicing Factor/Splicing Factor 2 (ASF/SF2) Affects Mouse Embryonic Fibroblast Senescence and Apoptosis [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2010, 285(50): 39551-39563
- [6] Reinhart BJ, Weinstein EG, Rhoades MW, et al. MicroRNAs in plants [J]. Genes Dev, 2002, 16(13): 1616-1626

- [7] Barad O, Meiri E, Avniel A, et al. MicroRNA expression detected by oligo nucleotide microarrays: system establishment and expression profiling in human tissues [J]. *Genome Res*, 2004, 14(12): 2486-2494
- [8] Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR [J]. *Nucleic Acids Res*, 2005, 33(20): e179
- [9] Pieter Mestdagh, Tom Feys, Nathalie Bernard, et al. High-throughput stem-loop RT-qPCR miRNA expression profiling using minute amounts of input RNA [J]. *Nucleic Acids Research*, 2008, 36(21): e143
- [10] Shi R, Chiang V I. Facile means for quantifying microRNA expression by real-time PCR [J]. *Biotechniques*, 2005, 39(4): 519-525
- [11] Luo Xin, Zhang Jin, Wang Hui-jun, et al. Poly A RT-PCR-based quantification of microRNA by using universal TaqMan probe [J]. *Biotechnol Lett*, 2012, 34(4): 627-633
- [12] Emi Arikawa, Yanyang Sun, Jie Wang, et al. Cross-platform comparison of SYBR[®] Green real-time PCR with TaqMan PCR, microarrays and other gene expression measurement technologies evaluated in the MicroArray Quality Control (MAQC) study [J]. *BMC Genomics*, 2008, 9(7): 328-340
- [13] 时宿妹, 张越, 张传宇, 等. 2 种微小 RNA 实时定量 PCR 检测方法的比较[J]. *生物技术通讯*, 2010, 21(3): 377-384
- Shi Su-mei, Zhang Yue, Zhang Chuan-yu, et al. Comparison of Two Method for Detection of MicroRNA by Real-Time Quantitative PCR [J]. *Letters in Biotechnology*, 2010, 21(3): 377-384
- [14] Kenneth JL, Thomas D.S. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2^{-ΔΔC_T} Method [J]. *METHODS*, 2001, 25(4): 402-408
- [15] 陈烨, 李凯, 周宇荀, 等. 小鼠基因转录表达分析中内参基因的优选[J]. *中国实验动物学报*, 2011, 19(3): 197-201
- Chen Ye, Li Kai, Zhou Yu-xun, et al. Selection of reference genes for transcription expression analysis in the mouse [J]. *ACTA LABORATORII ANIMALIS SCIENTIA SINICA*, 2011, 19(3): 197-201
- [16] Zhang YW, Davis EG, Bai J. Determination of internal control for gene expression studies in equine tissues and cell culture using quantitative RT-PCR [J]. *Vet Immunol Immunopathol*, 2009, 130(1-2): 114-119
- [17] Thomas D Schmittgen, Jinmai Jiang, Qian Liu, et al. A high-throughput method to monitor the expression of microRNA precursors [J]. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32(4): 43-43
- [18] Kou Shu-Jun, Wu Xiao-Meng, et al. Selection and validation of suitable reference genes for miRNA expression normalization by quantitative RT-PCR in citrus somatic embryogenic and adult tissues [J]. *Plant Cell Rep*, 2012, 31(12): 2151-2163
- [19] Heidi J. Peltier, Gary J. Latham. Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: Identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues [J]. *RNA*, 2008, 14(5): 844-852
- [20] Eun Joo Lee, Myungwon Baek, Yuriy Gusev, et al. Systematic evaluation of microRNA processing patterns in tissues, cell lines, and tumors [J]. *RNA*, 2008, 14(1): 35-42
- [21] Thomas D. Schmittgen, Eun Joo Lee, Jinmai Jiang, et al. Real-time PCR quantification of precursor and mature microRNA [J]. *Methods*, 2008, 44(1): 31-38

(上接第 5409 页)

- [4] Agulhon C, Blanchet P, Kobetz A, et al. Expression of FMR1, FXR1 and FXR2 genes in human prenatal tissues [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 1999, 58(8): 867-880
- [5] 杨阳. 智力低下相关蛋白 FXR1P 与 FTH1 及 CMAS 相互作用的研究[D]. 湖南: 南华大学, 2010
- Yang Yang. The study on verification FTH1 and CMAS interacting with FXR1P[D]. Hunan: South China University, 2010
- [6] Kean EL. Sialic acid activation[J]. *Glycobiology*, 1991, 1(5): 441-447
- [7] Brown V, Small K, Lakkis L, et al. Purified recombinant Fmrp exhibits selective RNA binding as an intrinsic property of the fragile X mental retardation protein [J]. *J Biol Chem*, 1998, 273(25): 15521-15527
- [8] Feng Y, Gutekunst CA, Eberhart DE, et al. Fragile X mental retardation protein nucleocytoplasmic shuttling and association with somatodendritic ribosomes[J]. *J Neurosci*, 1997, 17(5): 1539-1547
- [9] Darnell JC, Jensen KB, Jin P, et al. Fragile X mental retardation protein targets G quartet mRNAs important for neuronal function [J]. *Cell*, 2001, 107(4): 489-499
- [10] Dictenberg JB, Swanger SA, Antar LN, et al. A direct role for FMRP in activity-dependent dendritic mRNA transport links filopodial-spine morphogenesis to fragile X syndrome [J]. *Dev Cell*, 2008, 14(6): 926-939
- [11] Davidovic L, Durand N, Khalfallah O, et al. A novel role for the RNA-binding protein FXR1P in myoblasts cell-cycle progression by modulating p21/Cdkn1a/Cip1/Waf1 mRNA stability [J]. *PloS Gene*, 2013, 9(3): 1003367-1003371
- [12] Yun Ma, Lingxue Qin, Xiao Dong, et al. Biological Effect of the Interaction Between Mental Retardation Related Protein (FXR1P) and CMAS [J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 2013, 40(11): 1124-1130
- [13] 王三虎. 脆性 X 相关蛋白 1 的靶标鉴定及其对 IQCE 翻译的影响[D]. 湖南: 南华大学, 2013
- Wang San-hu. Fragile X Related Protein 1 Target Identification and Effect the Translation of IQCE [D]. Hunan: South China University, 2013
- [14] Xu XL, Zong R, Li Z, et al. FXR1P but not FMRP regulates the levels of mammalian brain-specific microRNA-9 and microRNA-124 [J]. *J Neurosci*, 2011, 31(39): 13705-13709
- [15] Gessert S, Bugner V, Tecza A, et al. FMR1/FXR1 and the miRNA pathway are required for eye and neural crest development [J]. *Dev Biol*, 2010, 341(1): 222-235
- [16] Cheever A, Blackwell E, Ceman S. Fragile X protein family member FXR1P is regulated by microRNAs[J]. *RNA*, 2010, 16(8): 1530-1539
- [17] Sanchez-Felipe L, Villar E, Munoz-Barroso I, et al. α 2-3- and α 2-6- N-linked sialic acids allow efficient interaction of Newcastle Disease Virus with target cells[J]. *Glycoconj J*, 2012, 29(7): 539-549
- [18] Zhang JN, Wang SJ. The biology of Sialic acid and health and disease[J]. *Chinese Bulletin of Life Science*, 2011, 23(7): 678-684
- [19] Brusés JL, Rutishauser U. Roles, regulation, and mechanism of polysialic acid function during neural development [J]. *Biochimie*, 2001, 83(7): 635-643
- [20] Rutishauser U. Polysialic acid in the plasticity of the developing and adult vertebrate nervous system [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2008, 9(1): 26-35
- [21] Gurnida DA, Rowan AM, Idjradinata P, et al. Association of complex lipids containing gangliosides with cognitive development of 6-month-old infants[J]. *Early Hum Dev*, 2012, 88(8): 595-601