

doi:10.3969/j.issn.1672-5565.2013.03.07

微小 RNA 起源及功能和动植物基因寻找计算方法

罗海丹^{1,2}, 杨惠玲^{2*}

(1. 中山大学中山医学院, 广东 广州 510080; 2. 中山大学中山医学院病理生理学教研室, 广东 广州 510080)

摘要:微小 RNAs (microRNAs, miRNAs) 是长度约为 22 个核苷酸 (nt) 的内源性非编码小分子 RNA。miRNA 作为重要的基因调节因子, 通过多种机制抑制其靶 mRNA 的表达。miRNA 的表达和/或功能异常与人类多种疾病密切相关。因此, 近年 miRNA 与人类疾病的相关研究备受关注, 寻找 miRNA 基因显得尤为重要。过去对 miRNA 基因进行研究的范围较为局限, 获得的新 miRNA 基因很少。目前, 对 miRNA 基因目录的补充主要依赖于复杂计算工具的发展, 随着计算工具的发展获得多种简易的寻找 miRNA 基因的方法, 但对 miRNA 基因目录的补充仍未能起有效作用。本文在简单介绍动植物 miRNA 生物起源和功能及作用机制的基础上, 主要关注动植物 miRNA 基因寻找的计算方法, 可望为探索动植物 miRNAs 基因寻找的新的计算方法提供有价值的参考。

关键词:微小 RNA; 基因寻找; 计算方法

中图分类号: Q752 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672-5565(2013)-03-196-05

The biogenesis and function of microRNA and the computational methods of microRNA gene finding

LUO Hai-dan^{1,2}, YANG Hui-ling^{2*}

(1. The second department of Clinical medicine, Zhongshan Medical School, Sun Yat-sen University,

Guangzhou 510080, China; 2. Department of Pathophysiology, Zhongshan Medical School, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract: MicroRNA (miRNA) is a kind of small non-coding endogenous RNA molecules which is ~ 22nt in length. As important regulatory factor of gene, miRNA inhibits the expression of its target mRNA, through a variety of mechanism. Abnormality of miRNA expression and function is closely related with various human diseases. Therefore, people has paid much attention to study the correlation between miRNA and human disease in recent years, especially finding the miRNA genes. In past years, the range of studies about miRNA genes is limited, which have a great limitation of finding new miRNA genes. The supplement of our catalogue of miRNA genes owe much to the development of sophisticated computational tools, which produce many simple methods. However, these still can't have a effectively influence on the supplement of the catalogue. In these article, we mainly introduce the computational methods for miRNA gene finding in animals and plants, based on introducing the biogenesis and function of miRNA, which will provide some valueable reference for the finding of the next generation of computational methods.

Keywords: MicroRNA; Gene Finding; Computational Tools

miRNAs 是一种长度约为 22 个核苷酸 (nt) 的内源性非编码小分子 RNA, 主要功能为调控 mRNAs

的翻译, 在动植物中的生物起源、发挥的功能及作用机制各不相同。作为重要的调节因子, miRNA 的表

收稿日期: 2013-01-30; 修回日期: 2013-04-25.

基金项目: 国家自然科学基金 (81071837; 30670627), 广东省自然科学基金重点项目 (9251008901000005), 2013 年国家大学生创新训练计划项目, 中山大学中山医学院学生科研训练专项基金。

作者简介: 罗海丹, 女, 广东人, 中山大学中山医学院本科生。E-mail: luohaid@163.com.

* 通讯作者: 杨惠玲, 教授, 博导。E-mail: yanghl@mail.sysu.edu.cn.

达和/或功能异常与人类多种疾病密切相关,如癌症、心脏肥大、阿尔茨海默病、精神分裂症和儿童抽动秽语综合征等。通过对 miRNA 进行研究,有助于探索各种疾病机制及治疗方法,故近年来 miRNA 的研究备受重视。早期,主要就基因的某一区域用特定方法对某一 miRNA 基因进行研究,限制了对其它新 miRNA 基因的寻找。目前对 miRNA 基因目录的补充主要依赖于集中或解释实验数据的复杂计算工具的发展,已发展出多种寻找 miRNA 基因且操作简易的方法,如以过滤器为基础的方法、以靶点为中心的方法、以同源为基础的搜索和混合方法等等。其中对动植物的 miRNA 基因进行探究时使用的方法存在差异,各方法自身亦存在某些不足,尤其 miRNA 基因目录急待补充。故本文尝试在介绍关于动植物 miRNA 基因寻找的计算方法的同时提出一些关于新的计算方法,可望为探索动植物 miRNAs 基因寻找新的计算方法提供有价值的参考^[1-2]。

1 微小 RNA 的生物起源和功能

miRNAs 在动植物中的生物起源,发挥的功能及作用机制各不相同。下面对其进行简单介绍,作为探讨动植物 miRNAs 基因寻找的计算方法的理论基础。

1.1 微小 RNA 的生物起源

1.1.1 动物的 miRNA 的生物起源

动物的 miRNA 基因在 RNA 聚合酶 II (pol II) 或聚合酶 III (pol III) 作用下转录形成初级转录物 (primary microRNA, pri-miRNA), 接下来可分两步: ① pri-miRNA 在细胞核中由 Drosha 蛋白质复合物 (Microprocessor) 处理, 成为约 70nt 具有茎环结构的 miRNA 前体 (miRNA precursors, pre-miRNAs)^[3]。② pre-miRNA 由 Exportin 5 (Exp5) 和 Ran-GTP 的复合物进行转运完成核输出^[4]。Ran-GTP 能选择性地结合 pre-miRNAs 并使其避免外切核酸酶的消化。之后, pre-miRNA 在细胞质中由双链 RNA 特异性核酸酶 Dicer 进行第二次切割, 成为 21 nt 的成熟 miRNA: miRNA * 双链结构^[2,4-5]。

1.1.2 植物的 miRNA 的生物起源

与动物 miRNA 的生物起源的过程相似, 但成熟过程由 Dicer-like 蛋白处理, 且 miRNAs 在转运至细胞质前已完全成熟, 故极少检测到植物 miRNAs 的中间体。Pri-miRNA, 上的发夹结构被 DCL1/HYL1/Serrate 蛋白识别并作用产生 pre-miRNA, DCL1 继续作用于 pre-miRNA 产生 miRNA 双链结构。miRNA 双链结构经过进一步修饰, 在 Exp5 的同族体 HAST-

Y 的作用下转运至细胞质, 与多种蛋白整合至沉默复合体 (RNA-induced silencing complex, RISC)。植物中 pre-miRNA 核苷酸数目预测的范围变动较大, 约 60 至几百 nt, 而动物中则通常约为 70 nt^[6]。

一些动植物的 miRNAs 取自同一条链上基因的内含子, 它们由 host 基因转录并被剪接体切除, 其表达与 host 基因相关。但部分内含子 miRNAs 可在独立启动子的影响下转录^[7]。

1.2 微小 RNA 的功能及作用机制

miRNA 是基因表达过程的重要调节因子, 其表达和/或功能异常与人类多种疾病密切相关, 但确切机制尚未完全阐明^[2]。现已发现 miRNA 以多种机制引发基因沉默, 即抑制其靶 mRNA 的表达。成熟双链 miRNA 的一条单链能整合至 miRISC 或 miRNPs (microribonucleoprotein) 的核糖核蛋白复合物中, 该链的 5' 端较不稳定且倾向于装配到 miRISC 以诱导基因沉默, 主要取决于 miRNA 与靶序列之间序列的互补程度。研究表明存在其它的链选择决定子。

动植物中 miRNA 的功能及调节机制存在差异。在动物中 miRNAs 主要起阻遏作用, 与 mRNAs 上互补的 3' -UTR 调控元件配对, 且在编码区和 5' -UTR 靶点区域同样起作用^[8]。亦可通过影响 miRNA 转录过程导致靶 mRNA 不稳定引发沉默^[9]。在植物中, miRNAs 频繁地切割互补配对 mRNA 并因此诱导靶 mRNAs 的即时降解。对 *Arabidopsis thaliana* 的研究表明: miRNAs 可能与其他非编码 RNAs 上的假靶点共同形成 miRNAs 活动的负调节机制^[10]。

2 微小 RNA 基因寻找的计算方法

在众多与 miRNA 有关的计算问题中, 最重要且引起较多关注的是 miRNA 基因的寻找及靶点的预测^[11-12]。这里主要围绕 miRNA 基因的寻找展开。

起初用于 miRNA 基因寻找的大范围试验方法存在一些问题, miRNAs 长度短小, 过强的活动能力以及微小的表型差异都可能引起突变发生和/或使其它传统遗传学技术 (如传统的 *in silico* 寻找途径和依赖于基因演化模型的同源搜索) 使用受限; 直接克隆检测不到表达水平极低或只在特定条件和细胞中表达的 miRNAs。后来发展起来的深度测序技术通过大量计算分析解决了部分问题。通过寻找 miRNA 基因的计算方法可望补充已测序基因组中 miRNA 基因的目录。miRNAs 在动物和植物中的特征不同, 使用的计算方法不同, 下面分别对其进行讨论。

2.1 动物微小 RNA 基因寻找的计算方法

早在 2001 年 Lee 和 Ambros 制订了 miRNA 基因搜索的经典策略^[13]。其中采用许多 miRNA 基因注释标准:①未知的 miRNA 基因和 *C. elegans* 的 *lin-4* 和 *let-7* 的表达共同拥有部分特征且与邻近物种的同源基因有大量的序列相似性;②新 miRNA 基因须被检测到存在约 22nt 的 RNA 转录物,或后者存在 cDNA 文库中;③至少满足以下生源论标准中的一个:a. 成熟 miRNA 来自自由能最小且不包含其它内部环或凸出的 miRNA,是此类 miRNA 中由大量碱基对形成的折叠前体的一部分;b. 碱基对的折叠在种系发生中保守;c. 前体在 Dicer 功能受损的生物体中积聚。然而在明显为同系物的情况下无需满足表达标准。由于实验方法的限制须将附加标准落实到位以更好鉴定候选基因。现有计算方法只能预测与已鉴别的 miRNAs 类似的候选 miRNAs。

根据注释标准发展出许多 miRNA 基因寻找的计算方法,用不同特征对茎环候选基因进行鉴别。主要包括以下几个方法。

2.1.1 以过滤器为基础的方法

早期的 miRNA 基因寻找方法主要以过滤器为基础,通过一定途径和要求获得初始候选集,根据已知 miRNAs 的特征作为标准进行过滤筛选,鉴定高品质 miRNA 候选基因。

一个能鉴定 *C. elegans* 多种新 miRNAs 的方法对特异性的关注多于灵敏性;方法 MIRSCAN^[14] 在灵敏性方面做了一些改进,但仍无法获得超过一半的来自已知 *C. elegans* 的 miRNAs;之后用 MIRSCAN-II 进行改善,该方法考虑了保守模体(motifs)的存在和茎环前体上下游处可能涉及转录调节的序列保守区域,发现 *C. elegans* 中独立转录的 miRNA 基因的茎环上游保守性良好,并将其作为一个附加的特征;方法 MIRSEEKER 通过分析两个果蝇物种已知 miRNA 基因的参考集推导出关于 miRNAs 的典型发散模式。

此类方法依赖保守标准有效避免了非保守候选基因的鉴定,并在进化模型方面做了一些猜想,已鉴定出一些已知 miRNAs,且有助于鉴别新调控因子。然而,该方法仍无法消除假阳性并恢复所有已知 miRNAs。

2.1.2 机器学习方法

机器学习方法是寻找 miRNA 基因的常用方法,多是从已知 miRNAs 组成的正集和假定非 miRNAs 前体的茎环结构组成的负集中概括得到。有的机器学习方法使用单基因组方法。PROMIR 是使用单基因组方法进行 miRNA 基因寻找的一个尝试^[15]。候

选基因的初始集是在人类 ESTs 上表达的茎环,过滤候选茎环的结构标准包括杆长,环的大小和 MFE。此方法依赖于茎环杆成对序列的 HMM (Hidden Markov Model),主要关注成熟 miRNA 的碱基配对模式和位置。若茎环包含可能为成熟 miRNA 的序列超过一定阈值,则为良好的 pre-miRNA 候选物。然而,候选集仍太大,须使用附加的过滤器,包括如对预测的二级结构的数据特征进行评估,以及与其它有脊椎动物假定的 pre-miRNA 的区域比较验证等。有的方法联合 SVM (support vector machine) 分类器。其中一个 SVM 方法可预测 Droscha 的加工部位,可作为 miRNA 候选基因的预处理工具,并具有前体分类器的附加特征^[16]。

这一方法亦存在缺陷。从基因组中随机选取茎环的负集和通过实验或其他计算方法鉴定 miRNAs 而获得的正集,其代表性不强。另外,基因组中可能存在一些茎环结构可进入 miRNA 加工通路但没有被有效转录,或仅是基因组背景有差异,而机器计算方法较注重茎环特征且未经常补充关于潜在转录或基因背景的信息,易出现错误分类的现象。

2.1.3 以靶点为中心的方法

此类方法以靶点为中心预测 miRNA 基因。实验对齐多个哺乳动物基因组的 3'-UTRs,同时鉴定高保守且能表现 miRNA 靶基因的粒子特性的短小的模体。随后鉴定成百上千个保守茎环,茎环包含与已知 miRNAs 的短小的模体互补的保守序列。

以靶点为中心的方法主要依赖于全集的 3'-UTRs 中高保守模体的鉴定,其优点在于对 miRNA 的前提结构做出较少的假想^[17]。

2.1.4 混合方法

目前,混合方法整合了带有计算程序的高通量试验方法以扩大 miRNAs 的鉴定范围。一般遵循两种不同的策略:①鉴定大量候选前体并用高精度的实验验证;②大量克隆 miRNAs,分析其在基因组的位置和在已鉴定位置的基因组背景下形成茎环的能力。

方法 PALGRADE 遵循前者的策略鉴定 *H. sapiens* 中新的保守和非保守 miRNAs。选择候选茎环时考虑到了其热力学稳定性和结构特征。之后用 miRNA 基因芯片在多种组织中测试该候选集的潜在表达,对带有强杂交信号的候选物进一步直接克隆和测序。遵循第二种策略的方法则考虑大多数的 RNAs,确定其基因组位置并应用与 ab initio 方法相似的过滤器。

此类方法充分扩大了人类 miRNAs 的目录,但难以检测低表达或组织特异的 miRNAs。方法

MIRDEEP^[18]使用概率模型对用 miRNA 生源论的性能为 RNA 转录物测序这一模式的兼容性进行评估。根据该模型,miRNA 前体有多个与茎环成熟区域一致的序列读取和少量与发夹结构的其他部分一致的读取。

2.1.5 以同源为基础的方法

此类方法以同源为基础,可用来检测被 ab initio 预测因子错过的 miRNAs,常为其他 miRNA 基因预测方法的补充步骤。

许多同源基因的搜索以定线为基础,能应用于被某些过滤器淘汰的原始候选集成员,或围绕已知 miRNAs 所在区域寻找基因群集的新成员;亦可用于扫描已知 miRNAs 同源基因的新测序基因组,或为已研究的基因组补充 miRNA 基因预测因子。不足的是依赖于序列保守性,灵敏性低,为此发展出兼顾结构保守性的方法。例如一方法使用 RNA 对比工具 ERPIN 说明序列或结构的保守性,可预测来自多个家族动物 miRNAs 的新的候选物^[18-19]。相似的方法还有 MIRALIGN。另一有力策略使用以结构为基础的群集,利用一个以序列或结构为准线为基础的标准筛选获得结构候选集,并在含有已知 miRNAs 的群集中找到潜在的同源基因。

2.2 植物中微小 RNA 基因寻找的计算方法

许多类似于动物 miRNA 基因寻找的方法已被应用于植物 miRNA 基因的寻找。由于植物 pre-miRNA 的茎环大小和结构变化大,预测较困难,因此应用于植物的方法更多地依赖于变量前体中 miRNA:miRNA* 双螺旋结构的性能,方法较少,主要包括以下几个方法。

2.2.1 以过滤器为基础的方法

最初鉴定植物中 miRNAs 的方法以过滤器为基础。一方法首先鉴别 *A. thaliana* 基因间区中所有的潜在发夹结构,根据 GC 容量和环长度的标准将其过滤,获得的 miRNA 序列与水稻基因组进行对照检查,保留高保守性的序列。最后,将保留下来的候选前体及其同源基因折叠以验证特异性的茎环二级结构。另一相似方法在折叠测试后附加一个过滤器从而获得在所有基因组 miRNAs 中保留良好的且可能为 miRNA 靶位点的互补集合。另外,方法 MIR-FINDER 发现成熟 miRNA 必须是在 miRNA 区域基本无不成对碱基或 G:U 碱基对的稳定连续螺旋结构的一部分;且所有基因组中大量的序列可折叠成发夹结构,故设计一个随机化检验来评估预测的二级结构的数据特异性。

这些方法拓展运用了保护标准,均在一定程度上获得了一些 miRNA 基因,但无法鉴定呈较不明显

的进化保守性的 miRNAs。

2.2.2 以靶点为中心的方法

主要的方法为 FINDMIRNA。此法用检测同一物种的转录潜在靶点代替筛选候选茎环,以寻找基因间区所有的 7-mer 并排除重复和低 GC 量的序列;将每一个转录物的重叠 7-mer 与先前计算的指标对抗,在周围区域产生一个无缺口的结构;将长度标准化的 18~25nt 转录物标记为潜在 miRNA。之后利用 miRNA 前体的预期典型发散模式进行附加过滤并将靶向同一转录区域的候选前体放在同一家族群集中。使用记分函数根据 miRNA:miRNA* 和干预序列的保守性等级对群集计分。

另一与 FINDMIRNA 相似的方法不要求 miRNAs 群集到家族中,该方法取每一个 mRNA 进行基因组范围的搜索,鉴定出 20~27nt 的、与 mRNA 至多有两个不匹配区域的 micromatches,并用其鉴定 miRNA 候选者。通过 6 次针对相关特征的过滤后,再经过附加过滤筛选出有超过一个靶点,被认为是绝大多数植物 miRNAs 的 miRNA 候选者^[20]。

这类方法利用了植物 miRNA 和 mRNA 中相应的靶位点之间近乎完美的互补性,能够鉴别多种特异的非保守植物 miRNAs,在一定程度上补充了 miRNAs 的基因目录。

2.2.3 以同源为基础的搜索

在多个植物物种 miRNA 基因鉴定数目增多的情况下,发展出以同源为基础的搜索方法来寻找在模型生物体中 miRNAs 的完整数目。这些方法首先鉴定与已知成熟 miRNA 序列匹配的基因组位点,然后提取这些位点的基因组环境并将其按照一定标准与推定的 miRNA 家族相匹配,从而确定候选基因同源物的最终目录。最近,这些方案通过分析 EST 数据被用于新 miRNAs 的搜索^[21]。

2.2.4 其它方法

其它用于植物 miRNA 基因鉴定的方法已经通过与动物 miRNA 预测相似的使用高通量测序,过滤和机器学习方法的联合得到发展^[22]。

3 结论

目前绝大多数预测 miRNA 基因的计算方法扩大运用了进化保守性,同时仍在进行动物 miRNA 前体可辨认特征的搜寻(如已知 miRNAs 与其他 RNAs 相比结构的能量很低)^[23]。这些方法在逐步扩大 miRNAs 基因目录的同时也存在一些缺陷。在扩大运用保守性时,对指导 miRNA 生源论的微细规则进行选择忽略,无法在所有潜在茎环中选择,从而错

过了一些重要部分;突变稳定性作为 miRNA 前体的特征用于鉴定,一般仅在保留良好的 pre-miRNAs 发现这一特征,而在非保守茎环前体未发现;另外,当保留良好的扩展 miRNAs 的鉴定达到饱和时,非保守的假定外显性较高的 miRNA 前体是否会在经过不同处理的有差异生物体中被处理这一问题难有定论。故未来应从多个方面探索改善计算方法,关注潜在茎环结构的精确模型的建立,提高对 Drosha 和 Dicer 处理的生化要求的理解,并将 miRNA 基因预测运算中的启动子依据和 pre-miRNAs 与 3'-UTRs 的进化模型整合,以求获得更多更有效的方法对 miRNA 基因进行预测。

参考文献 (References)

- [1] Yeo JH, Chong MM. Many routes to a micro RNA [J]. *IUBMB Life*, 2011, 63(11):972-8.
- [2] 肖海鹏, 杨惠玲. 临床病理生理学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 2009: 114-135.
- [3] Zhang X, Zeng Y. The terminal loop region controls microRNA processing by Drosha and Dicer [J]. *Nucleic Acids Res*, 2010, 38(21):7689-7697.
- [4] Wang X, Xu X, Ma Z, Huo Y, Xiao Z, Li Y, Wang Y. Dynamic mechanisms for pre-miRNA binding and export by Exportin-5 [J]. *RNA*, 2011, 17(8):1511-28.
- [5] Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization [J]. *EMBO J*, 2002, 21(17):4663-4670.
- [6] Naqvi AR, Sarwat M, Hasan S, Roychoudhury N. Biogenesis, functions and fate of plant microRNAs [J]. *J Cell Physiol*, 2012, 227(9):3163-8.
- [7] Gao X, Qiao Y, Han D, Zhang Y, Ma N. Enemy or partner: Relationship between intronic micromas and their host genes [J]. *IUBMB Life*, 2012, 64(10):835-40.
- [8] Ul Hussain M. Micro-RNAs (miRNAs): genomic organisation, biogenesis and mode of action [J]. *Cell Tissue Res*, 2012, 349(2):405-13.
- [9] Mishima Y, Fukao A, Kishimoto T, Sakamoto H, Fujiwara T, Inoue K. Translational inhibition by deadenylation-independent mechanisms is central to microRNA-mediated silencing in zebrafish [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(4):1104-9.
- [10] Eamens AL, Wang MB. Alternate approaches to repress endogenous microRNA activity in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Signal Behav*, 2011, 6(3):349-59.
- [11] Kong BW. Identification of virus encoding microRNAs using 454 FLX sequencing platform [J]. *Methods Mol Biol*, 2011, 733:81-91.
- [12] Kim do N, Lee SK. Biogenesis of Epstein-Barr virus microRNAs [J]. *Mol Cell Biochem*, 2012, 365(1-2):203-10.
- [13] Lee, R. C. and Ambros, V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Science*, 2001, 294, 862-864.
- [14] Yan N, Lu Y, Sun H, Tao D, Zhang S, Liu W, Ma Y. A microarray for microRNA profiling in mouse testis tissues. *Reproduction*, 2007, 134(1):73-9.
- [15] Sebastian B, Aggrey SE. Specificity and sensitivity of PROMIR, ERPIN and MIR-ABELA in predicting pre-microRNAs in the chicken genome. *In Silico Biol*. 2008, 8(5-6):377-81.
- [16] Ding J, Zhou S, Guan J. miRFam: an effective automatic miRNA classification method based on n-grams and a multiclass SVM [J]. *BMC Bioinformatics*, 2011, 12:216.
- [17] Hackl M, Jadhav V, Jakobi T, Rupp O, Brinkrolf K, Goesmann A, Pühler A, Noll T, Borth N, Grillari J. Computational identification of microRNA gene loci and precursor microRNA sequences in CHO cell lines [J]. *J Biotechnol*, 2012, 158(3):151-5.
- [18] Yang X, Li L. miRDeep-P: a computational tool for analyzing the microRNA transcriptome in plants [J]. *Bioinformatics*, 2011, 27(18):2614-5.
- [19] Naville M, Ghuillot-Gaudeffroy A, Marchais A, Gautheret D. AR-Nold: a web tool for the prediction of Rho-independent transcription terminators [J]. *RNA Biol*, 2011, 8(1):11-3.
- [20] Frazier TP, Xie F, Freistaedter, Burklew CE, Zhang B. Identification and characterization of microRNAs and their target genes in tobacco (*Nicotiana tabacum*) [J]. *Planta*, 2010, 232(6):1289-308.
- [21] Zhu YP, Xue W, Wang JT, Wan YM, Wang SL, Xu P, Zhang Y, Li JT, Sun XW. Identification of common carp (*Cyprinus carpio*) microRNAs and microRNA-related SNPs [J]. *BMC Genomics*, 2012, 13(1):413.
- [22] Wang K, Li M, Gao F, Li S, Zhu Y, Yang P. Identification of Conserved and Novel microRNAs from *Liriodendron chinense* Floral Tissues [J]. *PLoS One*, 2012, 7(9):e44696.
- [23] Liu X, Jin DY, McManus MT, Mourelatos Z. Precursor microRNA-programmed silencing complex assembly pathways in mammals [J]. *Mol Cell*, 2012, 46(4):507-17.