

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2014年3月13日 (13.03.2014)



(10) 国际公布号
WO 2014/036726 A1

- (51) 国际专利分类号: *C12N 15/117* (2010.01) *A23C 9/152* (2006.01)
 区东长安街一号东方广场 C2-507, Beijing 100738 (CN)。
- (21) 国际申请号: PCT/CN2012/081146 (74) 代理人: 上海一平知识产权代理有限公司 (XU & PARTNERS, LLC.); 中国上海市普陀区真北路 958 号天地科技广场 1 号楼 106 室, Shanghai 200333 (CN)。
- (22) 国际申请日: 2012 年 9 月 7 日 (07.09.2012)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): 北京命码生物科技有限公司 (MICROMEDMARK BIOTECH CO., LTD.) [CN/CN]; 中国北京市东城区东长安街一号东方广场 C2-507, Beijing 100738 (CN)。
- (72) 发明人: 及
- (75) 发明人/申请人 (仅对美国): 张辰宇 (ZHANG, Chenyu) [CN/CN]; 中国北京市东城区东长安街一号东方广场 C2-507, Beijing 100738 (CN)。斯琴 (SI, Qin) [CN/CN]; 中国北京市东城区东长安街一号东方广场 C2-507, Beijing 100738 (CN)。锡林其其格 (XILIN, Qiqige) [CN/CN]; 中国北京市东城区东长安街一号东方广场 C2-507, Beijing 100738 (CN)。陈熹 (CHEN, Xi) [CN/CN]; 中国北京市东城区东长安街一号东方广场 C2-507, Beijing 100738 (CN)。张骑鹏 (ZHANG, Qipeng) [CN/CN]; 中国北京市东城区东长安街一号东方广场 C2-507, Beijing 100738 (CN)。曾科 (ZENG, Ke) [CN/CN]; 中国北京市东城区东长安街一号东方广场 C2-507, Beijing 100738 (CN)。乌兰 (WU, Lan) [CN/CN]; 中国北京市东城区东长安街一号东方广场 C2-507, Beijing 100738 (CN)。
- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。



WO 2014/036726 A1

(54) Title: MICRORNA IN HUMAN MILK AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 人乳微小核糖核酸及其应用

(57) Abstract: Provided are a series of microRNAs stabilized in human mature milk and/or colostrum and a use thereof. The microRNAs comprise one or more microRNAs selected from those shown in tables A, B, C and D, and can be used to prepare infantal foods or food additives or supplements.

(57) 摘要: 提供一系列在人成乳和/或初乳中稳定存在的微小核糖核酸及其应用, 其中所述的 microRNA 包括选自表 A、表 B、表 C 和/或表 D 中一种或多种 microRNA, 可用于配制婴幼儿食品或食品添加剂或补充剂。

人乳微小核糖核酸及其应用

技术领域

本发明属于生物制品领域，具体地，本发明涉及人乳微小核糖核酸及其应用。

5

背景技术

母乳被公认为是婴幼儿最理想的食物。世界卫生组织也指出，母乳是婴幼儿健康生长发育的理想食物。因为母乳含有适合婴儿生长发育需要的各类营养物质，营养成分全面且更易被吸收。另外，母乳还含有利于增强免疫的营养成分，例如，乳铁蛋白(其能抑制需铁有害菌)，以及抗感染的活性白细胞、免疫抗体和其他免疫因子。初乳中尤其含有大量免疫球蛋白，可保护婴儿免受细菌感染，从而不易发生肺炎等疾病。

10

当母亲因不能哺乳或泌乳不佳等原因不能进行母乳喂养时，则需选用母乳替代品(如婴儿配方奶)。配方奶的制作是以母乳为标准，通过对牛奶进行改良，使配方奶最大程度地接近母乳，从而符合婴幼儿的消化吸收和营养需要。

15

国际母乳会指出，与母乳相比，现有的配方奶不仅缺少如羟酸、多种矿物质、激素、包括氨基酸和核苷酸在内的非蛋白质含氮物等重要成分，而且主要含有的蛋白质、脂肪、维生素等种类不够丰富，且也不利于婴儿消化吸收。总之，现有的配方奶在尽量接近母乳，但是与母乳还是相差甚远。

因此，本领域仍需要开发一种营养物质更接近母乳的乳制品。

20

发明内容

本发明的目的之一是提供一种新的 microRNA 集合，所述的 microRNA 可用于配制婴幼儿食品或食品添加剂或补充剂。

25

本发明的另一目的是提供一系列 microRNA 表达谱及其应用，包括人乳 microRNA 的表达谱及其用途，人初乳中特有的 microRNA 表达谱及其用途，人成乳中特有 microRNA 的表达谱及其用途等。

在本发明第一方面中，提供了一种人工的乳制品，所述的乳制品中含有外源添加的一种或多种源自人奶的 microRNA，所述人奶包括人初乳或人成乳。

在另一优选例中，所述的 microRNA 选自下组：

30

(a) 表 A 中所列出的人初乳特有的 microRNA；

(b) 表 B 中所列出的人成乳特有的 microRNA；

(c) 表 C 中所列出的人初乳和成乳共有的 microRNA；和

(d) 表 D 中所列出的、牛奶中不存在但在人初乳或人成乳中存在的 microRNA；

所述的表 A、表 B、表 C 和表 D 如“microRNA 表达谱”一节中所述。

35

在另一优选例中，所述的乳制品包括初乳制品、成乳制品。

所述的乳制品包括奶粉、液态奶、奶酪、酸奶等。

在另一优选例中，所述的乳制品还含有外源添加的一种或多种选自下组的 microRNA: (e) 表 E 中所列出的 microRNA; 所述的表 E 如“microRNA 表达谱”一节中所述。

5 在另一优选例中，所述的乳制品具有以下一个或多个特征：

(a1) 所述的外源添加的 microRNA 中有两种或多种来自表 A;

(a2) 所述的外源添加的 microRNA 的种类和含量与人初乳的 microRNA 表达谱相近或相同;

(b1) 所述的外源添加的 microRNA 中有两种或多种来自表 B;

10 (b2) 所述的外源添加的 microRNA 的种类和含量与人成乳的 microRNA 表达谱相近或相同;

(c1) 所述的外源添加的 microRNA 中有两种或多种来自表 C;

(d1) 所述的外源添加的 microRNA 中有两种或多种来自表 D。

15 在另一优选例中，所述的两种或多种为 2-500 种，更佳地 3-300 种，更佳地 3-200 种。

在另一优选例中，所述的人工的乳制品是适用于 0-24 个月婴幼儿的乳制品。

在另一优选例中，所述的人工的乳制品是适用于 2 周岁以上人群的乳制品。

在本发明第二方面中，提供了一种人工的食品补充剂，所述的食品补充剂含有食品学上可接受的载体以及一种或多种选自下组的、源自人奶的 microRNA:

20 (a) 表 A 中所列出的人初乳特有的 microRNA;

(b) 表 B 中所列出的人成乳特有的 microRNA;

(c) 表 C 中所列出的人初乳和成乳共有的 microRNA; 和

(d) 表 D 中所列出的、牛奶中不存在但在人初乳或人成乳中存在的 microRNA;

所述的表 A、表 B、表 C 和表 D 同本发明第一方面中所述。

25 在另一优选例中，所述的食品补充剂还含有一种或多种选自下组的 microRNA: (e) 表 E 中所列出的 microRNA。

在另一优选例中，所述的食品补充剂具有以下一个或多个特征：

(a1) 所述的外源添加的 microRNA 中有两种或多种来自表 A;

30 (a2) 所述的外源添加的 microRNA 的种类和含量与人初乳的 microRNA 表达谱相近或相同;

(b1) 所述的外源添加的 microRNA 中有两种或多种来自表 B;

(b2) 所述的外源添加的 microRNA 的种类和含量与人成乳的 microRNA 表达谱相近或相同;

(c1) 所述的外源添加的 microRNA 中有两种或多种来自表 C;

(d1) 所述的外源添加的 microRNA 中有两种或多种来自表 D。

在本发明第三方面中，提供了一种鉴别乳制品的方法，所述方法包括步骤：

(1) 提供一乳制品样品；

(2) 检测所述乳制品样品中 microRNA 的种类及其含量；

5 (3) 将步骤(2)测得的 microRNA 种类及其含量，与作为对照的初乳样品以及成乳样品中 microRNA 的表达谱(即 microRNA 种类及其含量)进行比较；

其中，如果测得的 microRNA 的种类及其含量与初乳样品的 microRNA 表达谱相近或相同，则鉴定所述乳制品为初乳制品；如果测得的 microRNA 的种类及其含量与成乳样品的 microRNA 表达谱相近或相同，则鉴定所述乳制品为成乳制品。

10 在另一优选例中，所述的乳制品(如奶粉)包括牛奶或其衍生乳制品、羊奶或其衍生乳制品、人奶。

在另一优选例中，通过检测成乳或初乳中 microRNA 的种类及其含量，获得成乳或初乳中 microRNA 的表达谱。

15 在另一优选例中，所述的初乳中的 microRNA 表达谱包括表 A 和表 C 中所列出的两种或多种 microRNA；并且所述的成乳中的 microRNA 表达谱包括表 B 和表 C 中所列出的 microRNA。

在本发明第四方面中，提供了一种制造乳制品的方法，包括步骤：

(1) 提供一乳制品原料；

20 (2) 检测所述乳制品原料中 microRNA 的种类及其含量，得到第一 microRNA 表达谱；

(3) 将步骤(2)测得的 microRNA 种类及其含量，与作为对照的初乳样品或成乳样品中 microRNA 表达谱进行比较；

25 (4) 基于比较结果，向所述乳制品原料中添加一种或多种 microRNA 和/或从所述乳制品原料中去除一种或多种 microRNA，从而制得乳制品，其中所述乳制品 microRNA 表达谱与作为对照的初乳样品或成乳样品中 microRNA 的表达谱更接近或一致。

在另一优选例中，所述的乳制品原料是牛奶、羊奶、或其组合。

在本发明第五方面中，提供了一种制造乳制品的方法，包括步骤：

(1) 提供一乳制品原料；

30 (2) 向所述乳制品原料中添加一种或多种 microRNA 和/或从所述乳制品原料中去除一种或多种 microRNA，从而制得乳制品，其中所述乳制品中 microRNA 表达谱与初乳或成乳中 microRNA 的表达谱更接近或一致。

在另一优选例中，所述的初乳或成乳是人初乳或人成乳。

在本发明第六方面中，提供了一种制造食品补充剂的方法，包括步骤：

(1) 检测某一对象的母乳中 microRNA 的种类及其含量，从而获得该对象的第一

microRNA 表达谱;

(2) 将测得的第一表达谱的 microRNA 种类及其含量,与作为对照的正常初乳样品或正常成乳样品中 microRNA 表达谱进行比较,从而确定第一表达谱中所缺乏的 microRNA 或含量不足因而需要部分补充的 microRNA;

5 (3) 配制食品补充剂,其中所述的食物补充剂含有上一步骤中所确定的第一表达谱中所缺乏的 microRNA 或含量不足因而需要部分补充的 microRNA。

在另一优选例中,在配制步骤中,包括将食品学上可接受的载体与一种或多种人工合成的 microRNA 进行混合,从而形成食品补充剂。

在本发明第七方面中,提供了一种分离的 microRNA 集合(set),所述的 microRNA
10 集合由二种或多种选自下组的、源自人奶的 microRNA 所构成:

(a) 表 A 中所列出的人初乳特有的 microRNA;

(b) 表 B 中所列出的人成乳特有的 microRNA;

(c) 表 C 中所列出的人初乳和成乳共有的 microRNA; 和

(d) 表 D 中所列出的、牛奶中不存在但在人初乳或人成乳中存在的 microRNA;

15 所述的表 A、表 B、表 C 和表 D 同本发明第一方面中所述。

在另一优选例中,所述的 microRNA 集合由 2-500 种(较佳地 5-300 种,更佳地 5-100 种)microRNA 所构成。

在本发明第八方面中,提供了一种人工的乳制品、食品或食品补充剂,含有本发明第七方面所述的分离的 microRNA 集合作为有效成分。

20 在另一优选例中,所述的人工的乳制品或食品补充剂的 microRNA 表达谱与正常的人初乳样品或人成乳样品中的 microRNA 表达谱相近或相同。

应理解,在本发明范围内中,本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合,从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅,在此不再一一累述。

25

附图说明

图 1 是人初乳、成乳中 microRNA 表达差异分析。

图 2 是转染 Pre-miR-19a 和 3'-ESR1-wt 的 HEK-293 细胞的荧光素酶活性。

30 图 3 是 ESR1 在转染慢病毒表达载体(Lenti-ESR1)、空白对照的 GFP 阳性 SK-N-BE (2)细胞中表达的 Western blot 结果。

图 4 是 Lenti-ESR1、空白对照转染细胞后的细胞增殖的流式细胞仪分析结果。

具体实施方式

35 本发明人通过长期而深入的研究,意外地发现人乳和牛乳中或者人于不同时期所分泌的乳汁(即初乳与成乳)中的微小核糖核酸的种类或含量存在着差异。发明人通过对

牛乳、人初乳与人成乳的微小核糖核酸的种类或含量的筛选和比对，形成了多种人乳微小核糖核酸表达谱，在配制婴幼儿食品配方或分段等方面具有很好的指导意义。在此基础上，发明人完成了本发明。

5 微小核糖核酸

微小核糖核酸(microRNA, 简称为 miRNA 或 miR), 是一类长约 19 至 23 个核苷酸的非编码单链小核糖核酸分子。它们广泛存在于动植物细胞中, 在进化上高度保守。MicroRNA 通过识别靶信使 RNA (mRNA) 的 3' 端非翻译序列, 与之不完全互补, 从而抑制相应蛋白质的翻译。作为 mRNA 强有力的调节因子, microRNA 与生理或病理活
10 动密切相关。其涉及生物个体发育、组织分化、细胞凋亡及能量代谢等多种生命活动, 也与许多疾病的发生和发展紧密联系。

人乳微小核糖核酸

发明人通过研究证实: 人乳中存在着这种极其重要的因子——微小核糖核酸。
15 并且发现稳定存在于人乳中的微小核糖核酸大多与免疫系统和神经发育有关。

人乳中与免疫有关的微小核糖核酸包括 miR-181a、miR-223、miR-146a 等, 例如, miR-181a 与 B 细胞的发育、T 细胞的活化, 以及免疫的发育有关。miR181a 促进 B 细胞的发育和 CD4+T 细胞的选择、激活、敏感性。在成熟 T 细胞增加 miR181a 的表达可增强肽抗原的敏感性。miR-223 通过负调控中性粒细胞的增殖和活化, 参与防御。
20 miR-223 还积极调控粒细胞的分化, miR-223 负调控炎症反应。miR-146a 通过负调控先天免疫参与防御。miR-146a 在肺泡上皮表达增加, 负调控 IL-1B 诱导的 IL-8 和 RANTES, 从而激活调节正常 T 细胞表达和分泌。

人乳中与神经有关的微小核糖核酸包括 miR-140-3p、miR-107、miR-19a 等, 例如, miR-140-3p 与胎儿神经干细胞发育有关。miR-107 直接靶向 CDK5R1 的 3' 非编码区,
25 通过调节 CDK5R1 表达影响神经细胞迁移。miR-19a 在神经瘤母细胞中表达上调, 靶向、抑制雌激素受体 α (ESR1), ESR1 是与神经细胞分化有关的配体诱导表达转录因子。

人初乳中存在的微小核糖核酸除了与免疫和神经系统有关外, 还有些微小核糖核酸, 比如 miR-33a*、miR-326、miR-488 等, 参与其他的生理/病理活动。例如, miR-33 家族成员(hsa-miR-33a 和 hsa-miR-33b)调节胆固醇和脂肪酸的代谢。miR-33 家族成员
30 还调节参与细胞周期调控和细胞增殖的基因表达。miR-33 抑制细胞周期蛋白依赖激酶 6(CDK6)和 cyclin D1(CCND1 蛋白)的表达, 从而减少细胞增殖和细胞周期的进程。miR-33a 在胰岛素细胞中, 调节 ATP 结合转运体(ABCA1)的表达, 胆固醇的积累及胰岛素分泌。miR-326 通过调节多药耐药相关蛋白 1(MRP-1/ABCC1)的表达, 在乳腺癌化疗过程中预防和抵抗多药耐药性。miR-488 在雄激素依赖和雄激素非依赖的前列腺癌
35 细胞中过表达, 下调雄激素受体的转录活性, 抑制雄激素受体蛋白的产生。miR-488

阻碍前列腺癌细胞的扩散，促进前列腺癌细胞的凋亡。

因此，若能检测母乳中存在的微小核糖核酸的种类及表达水平，形成人乳或其特异的微小核糖核酸表达谱，则可为婴幼儿食品(如乳制品)配方提供新的指导标准；若能检测母亲在不同时期所分泌乳汁(如初乳或成乳)中存在的微小核糖核酸的种类和表达水平，形成不同时期的人乳特有的微小核糖核酸表达谱，则可用于指导婴幼儿食品的科学分段。另外，发明人还可根据人乳微小核糖核酸表达谱，选择性地升高和/或降低乳品中特定种类微小核糖核酸的含量，从而制成针对特殊婴幼儿的食品、食品补充剂和新型营养品；还可用于指导制定乳制品新标准的方法等。

为此，发明人检测人乳中的微小核糖核酸的种类和含量，并对检测结果进行筛选和比对，从而建立了人乳微小核糖核酸表达谱；并进一步检测了母亲于不同时期所分泌的乳汁(包括初乳与成乳)中的微小核糖核酸的种类和含量，并对检测结果进行筛选和比对，从而建立了初乳和/或成乳特有的微小核糖核酸表达谱。这些技术进步在本技术领域尚属首次。

15 检测

发明人通过一系列对人乳微小核糖核酸的检测及其应用的研究，确定了一系列高效、稳定地检测人乳微小核糖核酸的方法，所述的检测人乳中微小核糖核酸的方法，包括(但不限于)：Solexa 测序技术、RT-PCR、Real-time PCR、Northern Blotting、Western Blotting 等。

此外，对人乳微小核糖核酸(包括种类及其含量)的检测结果表明：人乳中大量存在着与免疫和神经系统有关的微小核糖核酸，人乳微小核糖核酸可能在婴儿的免疫及神经发育发挥关键作用，从而形成了一系列人乳或其特异的微小核糖核酸表达谱。另外，发明人对母亲于不同时期所分泌的乳汁(包括初乳和/或成乳)中的微小核糖核酸(包括种类及其含量)的检测结果表明：不同时期的人乳中微小核糖核酸的表达存在着差异，因此，不同时期的人乳中微小核糖核酸很有可能会对不同时期的婴幼儿的生长和发育产生不同影响，从而形成了一系列成乳或初乳特有的微小核糖核酸表达谱。

microRNA 表达谱

所述的 microRNA 表达谱可以是现有的用于对照的人成乳样品或人初乳样品中 microRNA 表达谱，例如表 E 所示的 microRNA 表达谱；

表 E

let-7a	miR-100	miR-1307	miR-155	miR-185	miR-210	miR-24	miR-378	miR-584
let-7b	miR-101	miR-141	miR-16	miR-186	miR-212	miR-25	miR-425	miR-652
let-7c	miR-103	miR-142-3p	miR-17	miR-192	miR-217	miR-31	miR-429	miR-664
let-7d	miR-107	miR-142-5p	miR-181a	miR-195	miR-218	miR-328	miR-451	miR-708
let-7e	miR-124	miR-143	miR-181b	miR-203	miR-22	miR-340	miR-452	miR-760

let-7f	miR-125b	miR-146a	miR-182	miR-204	miR-221	miR-345	miR-484	miR-874
let-7i	miR-126	miR-150	miR-183	miR-205	miR-222	miR-365	miR-497	miR-877
miR-1	miR-128	miR-152	miR-184	miR-21	miR-223	miR-375	miR-503	miR-92a
						miR-98	miR-96	miR-93

所述的 microRNA 表达谱也可以是本发明的 microRNA 表达谱。所述的“本发明的 microRNA 表达谱”优选为如下表达谱：

1. 人初乳特有的 microRNA 表达谱，例如表 A 所示。

5

表 A

编号	miR 种类	编号	miR 种类	编号	miR 种类	编号	miR 种类
1	miR-148a*	25	miR-130a	49	miR-185*	73	miR-424
2	miR-19a	26	miR-132*	50	miR-195*	74	miR-450a
3	miR-19b	27	miR-1537	51	miR-199b-5p	75	miR-450b-5p
4	miR-21*	28	miR-16-2*	52	miR-2115	76	miR-502-3p
5	miR-27b	29	miR-17*	53	miR-2115*	77	miR-505
6	miR-30e	30	miR-181d	54	miR-2355-3p	78	miR-548c-5p
7	miR-99a	31	miR-197	55	miR-2355-5p	79	miR-548d-5p
8	miR-140-3p	32	miR-26b*	56	miR-27b*	80	miR-548o
9	miR-181a*	33	miR-27a*	57	miR-296-5p	81	miR-551a
10	miR-23a	34	miR-30d*	58	miR-29a*	82	miR-574-5p
11	miR-23b	35	miR-342-5p	59	miR-3158	83	miR-576-3p
12	miR-27a	36	miR-423-5p	60	miR-3182	84	miR-616*
13	miR-320a	37	miR-454*	61	miR-320b	85	miR-618
14	miR-34a	38	miR-501-3p	62	miR-320c	86	miR-625*
15	let-7a*	39	miR-548i	63	miR-320d	87	miR-627
16	let-7b*	40	miR-548k	64	miR-331-3p	88	miR-629*
17	let-7d*	41	miR-629	65	miR-338-3p	89	miR-720
18	let-7f-1*	42	miR-383	66	miR-34a*	90	miR-766
19	let-7f-2*	43	miR-10b	67	miR-34b*	91	miR-873
20	let-7g*	44	miR-1275	68	miR-34c-5p	92	miR-93*
21	miR-1246	45	miR-1299	69	miR-361-3p	93	miR-934
22	miR-126*	46	miR-136*	70	miR-3909	94	miR-944
23	miR-1260	47	miR-143*	71	miR-3913	95	miR-145*
24	miR-1260b	48	miR-147b	72	miR-410	96	miR-146a*

人初乳特有的 microRNA 表达谱更优选包括表 A 中编号为 1~42 的 miR。

2. 人成乳特有的 microRNA 表达谱，如表 B 所示；

表 B

编号	miR 种类	编号	miR 种类	编号	miR 种类	编号	miR 种类
1	let-7g	16	miR-153	31	miR-376a	46	miR-548v
2	miR-30b	17	miR-19b-1*	32	miR-411	47	miR-552
3	miR-200a*	18	miR-2110	33	miR-4297	48	miR-589*
4	miR-200c	19	miR-2116*	34	miR-488	49	miR-641

5	miR-18a	20	miR-2277-3p	35	miR-491-5p	50	miR-643
6	miR-196b	21	miR-3065-3p	36	miR-514	51	miR-95
7	miR-200b*	22	miR-3074	37	miR-516b	52	miR-3200-3p
8	miR-224	23	miR-3115	38	miR-517c	53	miR-339-5p
9	miR-511	24	miR-3174	39	miR-518e	54	miR-499-3p
10	miR-99a*	25	miR-3190	40	miR-519a*	55	miR-512-3p
11	miR-3656	26	miR-3200-5p	41	miR-519b-3p	56	miR-517a
12	miR-1228*	27	miR-326	42	miR-520a-5p	57	miR-517b
13	miR-1249	28	miR-3617	43	miR-520f	58	miR-519a
14	miR-1276	29	miR-3620	44	miR-522	59	miR-519c-3p
15	miR-1283	30	miR-3654	45	miR-524-3p	60	miR-671-3p
						61	miR-937

人成乳特有的 microRNA 表达谱更优选为表 B 中编号为 1~11 的 miR。

3. 人初乳和成乳共有的 microRNA 表达谱，如表 C 所示；

表 C

编号	miR 种类	编号	miR 种类	编号	miR 种类	编号	miR 种类
1	let-7a*	87	miR-190	173	miR-3196	259	miR-500b
2	let-7b*	88	miR-190b	174	miR-32	260	miR-501-3p
3	let-7d*	89	miR-191	175	miR-32*	261	miR-501-5p
4	let-7e*	90	miR-192*	176	miR-3200-3p	262	miR-502-3p
5	let-7f-1*	91	miR-193a-3p	177	miR-320a	263	miR-502-5p
6	let-7f-2*	92	miR-193a-5p	178	miR-320b	264	miR-504
7	let-7g	93	miR-193b	179	miR-320c	265	miR-505
8	let-7g*	94	miR-194	180	miR-320d	266	miR-511
9	let-7i*	95	miR-195*	181	miR-324-3p	267	miR-512-3p
10	miR-100*	96	miR-196a	182	miR-324-5p	268	miR-515-5p
11	miR-101*	97	miR-196a*	183	miR-330-3p	269	miR-517a
12	miR-103-2*	98	miR-196b	184	miR-330-5p	270	miR-517b
13	miR-106a	99	miR-197	185	miR-331-3p	271	miR-519a
14	miR-106b	100	miR-199a-3p	186	miR-331-5p	272	miR-519c-3p
15	miR-106b*	101	miR-199b-3p	187	miR-335	273	miR-520a-3p
16	miR-10a	102	miR-199b-5p	188	miR-335*	274	miR-532-3p
17	miR-10a*	103	miR-19a	189	miR-338-3p	275	miR-532-5p
18	miR-10b	104	miR-19b	190	miR-339-3p	276	miR-542-3p
19	miR-1246	105	miR-200a	191	miR-339-5p	277	miR-548c-5p
20	miR-1251	106	miR-200a*	192	miR-33a	278	miR-548d-5p
21	miR-125a-3p	107	miR-200b	193	miR-33a*	279	miR-548e
22	miR-125a-5p	108	miR-200b*	194	miR-33b	280	miR-548h
23	miR-125b-1*	109	miR-200c	195	miR-33b*	281	miR-548i
24	miR-125b-2*	110	miR-200c*	196	miR-340*	282	miR-548j
25	miR-126*	111	miR-20a	197	miR-342-3p	283	miR-548k
26	miR-1260	112	miR-20a*	198	miR-342-5p	284	miR-548n
27	miR-1260b	113	miR-20b	199	miR-34a	285	miR-548o
28	miR-1262	114	miR-21*	200	miR-34a*	286	miR-548p
29	miR-1266	115	miR-2114	201	miR-34b*	287	miR-548y

30	miR-1271	116	miR-2114*	202	miR-34c-5p	288	miR-548z
31	miR-127-3p	117	miR-2115	203	miR-3605-5p	289	miR-550a*
32	miR-1274b	118	miR-2115*	204	miR-3613-5p	290	miR-551a
33	miR-1275	119	miR-2116	205	miR-361-3p	291	miR-574-3p
34	miR-1280	120	miR-215	206	miR-3614-5p	292	miR-574-5p
35	miR-1287	121	miR-219-1-3p	207	miR-3615	293	miR-576-3p
36	miR-1294	122	miR-219-5p	208	miR-361-5p	294	miR-576-5p
37	miR-1296	123	miR-22*	209	miR-362-3p	295	miR-577
38	miR-1299	124	miR-221*	210	miR-362-5p	296	miR-579
39	miR-1301	125	miR-223*	211	miR-363	297	miR-580
40	miR-1303	126	miR-224	212	miR-365*	298	miR-582-3p
41	miR-130a	127	miR-224*	213	miR-3656	299	miR-582-5p
42	miR-130b	128	miR-2277-5p	214	miR-3664	300	miR-589
43	miR-130b*	129	miR-2355-3p	215	miR-3677	301	miR-590-3p
44	miR-132	130	miR-2355-5p	216	miR-3688	302	miR-590-5p
45	miR-132*	131	miR-23a	217	miR-369-3p	303	miR-597
46	miR-135a	132	miR-23b	218	miR-374a	304	miR-598
47	miR-135b	133	miR-24-2*	219	miR-374a*	305	miR-616*
48	miR-136*	134	miR-26a	220	miR-374b	306	miR-618
49	miR-140-3p	135	miR-26a-1*	221	miR-374b*	307	miR-624*
50	miR-140-5p	136	miR-26b	222	miR-377	308	miR-625
51	miR-141*	137	miR-26b*	223	miR-378*	309	miR-625*
52	miR-143*	138	miR-27a	224	miR-381	310	miR-627
53	miR-144*	139	miR-27a*	225	miR-382	311	miR-628-3p
54	miR-145	140	miR-27b	226	miR-383	312	miR-628-5p
55	miR-1468	141	miR-27b*	227	miR-3909	313	miR-629
56	miR-146b-3p	142	miR-28-3p	228	miR-3912	314	miR-629*
57	miR-146b-5p	143	miR-28-5p	229	miR-3913	315	miR-642a
58	miR-147b	144	miR-296-5p	230	miR-3919	316	miR-651
59	miR-148a	145	miR-29a	231	miR-3920	317	miR-660
60	miR-148a*	146	miR-29a*	232	miR-3942	318	miR-671-3p
61	miR-148b	147	miR-29b	233	miR-409-3p	319	miR-671-5p
62	miR-148b*	148	miR-29b-2*	234	miR-410	320	miR-7
63	miR-151-3p	149	miR-29c	235	miR-421	321	miR-708*
64	miR-151-5p	150	miR-29c*	236	miR-422a	322	miR-7-1*
65	miR-1537	151	miR-301a	237	miR-423-3p	323	miR-720
66	miR-155*	152	miR-301b	238	miR-423-5p	324	miR-744
67	miR-15a	153	miR-30a	239	miR-424	325	miR-744*
68	miR-15a*	154	miR-30a*	240	miR-425*	326	miR-766
69	miR-15b	155	miR-30b	241	miR-4284	327	miR-769-3p
70	miR-15b*	156	miR-30b*	242	miR-4286	328	miR-769-5p
71	miR-16-1*	157	miR-30c	243	miR-4326	329	miR-873
72	miR-16-2*	158	miR-30c-1*	244	miR-449a	330	miR-885-5p
73	miR-17*	159	miR-30c-2*	245	miR-449b	331	miR-889
74	miR-181a*	160	miR-30d	246	miR-450a	332	miR-891a
75	miR-181a-2*	161	miR-30d*	247	miR-450b-5p	333	miR-9

76	miR-181c	162	miR-30e	248	miR-454	334	miR-92a-1*
77	miR-181c*	163	miR-30e*	249	miR-454*	335	miR-92b
78	miR-181d	164	miR-3116	250	miR-455-3p	336	miR-93*
79	miR-182*	165	miR-3127	251	miR-455-5p	337	miR-934
80	miR-183*	166	miR-3130-3p	252	miR-486-5p	338	miR-937
81	miR-185*	167	miR-3130-5p	253	miR-489	339	miR-941
82	miR-187	168	miR-3133	254	miR-493	340	miR-944
83	miR-188-3p	169	miR-3144-3p	255	miR-499-3p	341	miR-99a
84	miR-188-5p	170	miR-3158	256	miR-499-5p	342	miR-99a*
85	miR-18a	171	miR-3182	257	miR-500a	343	miR-99b
86	miR-18a*	172	miR-3194	258	miR-500a*	344	miR-99b*

4. 牛奶中不存在、但在人初乳或成乳存在的 microRNA 表达谱, 如表 D 所示。

表 D

编号	miR 种类	编号	miR 种类	编号	miR 种类	编号	miR 种类
1	let-7a*	61	miR-200c*	121	miR-3664	181	miR-589
2	let-7b*	62	miR-20a*	122	miR-3677	182	miR-590-3p
3	let-7d*	63	miR-20b	123	miR-3688	183	miR-590-5p
4	let-7e*	64	miR-21*	124	miR-374a*	184	miR-597
5	let-7f-1*	65	miR-2114	125	miR-374b*	185	miR-598
6	let-7f-2*	66	miR-2114*	126	miR-377	186	miR-616*
7	let-7g*	67	miR-2115	127	miR-378*	187	miR-618
8	let-7i*	68	miR-2115*	128	miR-3909	188	miR-624*
9	miR-100*	69	miR-2116	129	miR-3912	189	miR-625
10	miR-101*	70	miR-22*	130	miR-3913	190	miR-625*
11	miR-103-2*	71	miR-221*	131	miR-3919	191	miR-627
12	miR-106b*	72	miR-223*	132	miR-3920	192	miR-629
13	miR-10a*	73	miR-224*	133	miR-3942	193	miR-629*
14	miR-1251	74	miR-2277-5p	134	miR-409-3p	194	miR-642a
15	miR-125b-1*	75	miR-2355-3p	135	miR-410	195	miR-651
16	miR-125b-2*	76	miR-2355-5p	136	miR-422a	196	miR-708*
17	miR-126*	77	miR-24-2*	137	miR-425*	197	miR-7-1*
18	miR-1260b	78	miR-26a-1*	138	miR-4284	198	miR-744*
19	miR-1262	79	miR-26b*	139	miR-4286	199	miR-766
20	miR-1266	80	miR-27a*	140	miR-4326	200	miR-769-3p
21	miR-1271	81	miR-27b*	141	miR-449b	201	miR-769-5p
22	miR-1275	82	miR-28-3p	142	miR-454	202	miR-873
23	miR-1280	83	miR-296-5p	143	miR-454*	203	miR-889
24	miR-1287	84	miR-29a*	144	miR-489	204	miR-891a
25	miR-1294	85	miR-29b-2*	145	miR-493	205	miR-92a-1*
26	miR-1299	86	miR-29c*	146	miR-499-3p	206	miR-93*
27	miR-1301	87	miR-301b	147	miR-500a	207	miR-934
28	miR-1303	88	miR-30a*	148	miR-500a*	208	miR-937
29	miR-130b*	89	miR-30b*	149	miR-500b	209	miR-941
30	miR-132*	90	miR-30c-1*	150	miR-501-5p	210	miR-944

31	miR-135b	91	miR-30c-2*	151	miR-502-5p	211	miR-99a*
32	miR-136*	92	miR-30d*	152	miR-504	212	miR-99b*
33	miR-141*	93	miR-30e*	153	miR-511	213	miR-10b
34	miR-143*	94	miR-3116	154	miR-512-3p	214	miR-1260
35	miR-144*	95	miR-3127	155	miR-515-5p	215	miR-140-5p
36	miR-1468	96	miR-3130-3p	156	miR-517a	216	miR-147b
37	miR-146b-3p	97	miR-3130-5p	157	miR-517b	217	miR-181c
38	miR-148a*	98	miR-3133	158	miR-519a	218	miR-187
39	miR-148b*	99	miR-3144-3p	159	miR-519c-3p	219	miR-188-3p
40	miR-1537	100	miR-3158	160	miR-520a-3p	220	miR-188-5p
41	miR-155*	101	miR-3182	161	miR-548c-5p	221	miR-18a
42	miR-15a*	102	miR-3194	162	miR-548d-5p	222	miR-190
43	miR-15b*	103	miR-3196	163	miR-548e	223	miR-190b
44	miR-16-1*	104	miR-32	164	miR-548h	224	miR-19a
45	miR-16-2*	105	miR-32*	165	miR-548i	225	miR-219-1-3p
46	miR-17*	106	miR-3200-3p	166	miR-548j	226	miR-219-5p
47	miR-181a*	107	miR-335*	167	miR-548k	227	miR-301a
48	miR-181a-2*	108	miR-339-3p	168	miR-548n	228	miR-330-5p
49	miR-181c*	109	miR-33a*	169	miR-548o	229	miR-338-3p
50	miR-182*	110	miR-33b*	170	miR-548p	230	miR-34c-5p
51	miR-183*	111	miR-340*	171	miR-548y	231	miR-381
52	miR-185*	112	miR-342-5p	172	miR-548z	232	miR-383
53	miR-18a*	113	miR-34a*	173	miR-550a*	233	miR-424
54	miR-192*	114	miR-34b*	174	miR-551a	234	miR-449a
55	miR-193b	115	miR-3605-5p	175	miR-576-3p	235	miR-450a
56	miR-195*	116	miR-3613-5p	176	miR-576-5p	236	miR-455-5p
57	miR-196a*	117	miR-3614-5p	177	miR-577	237	miR-501-3p
58	miR-199b-5p	118	miR-3615	178	miR-579	238	miR-505
59	miR-200a*	119	miR-365*	179	miR-580	239	miR-542-3p
60	miR-200b*	120	miR-3656	180	miR-582-3p	240	miR-582-5p
						241	miR-9

应理解，对于表 A、表 B、表 C 和表 D 而言，术语“表中所列出的 microRNA”表示一种或多种该表中所列出的 microRNA。

microRNA 集合

5 如本文所用，“本发明 microRNA”是指选自本发明的 microRNA 表达谱中的一种或多种的 microRNA。

10 优选地，本发明提供了一种分离的 microRNA 集合(set)，所述的 microRNA 集合由二种或多种(如 2-500 种，较佳地 5-300 种，更佳地 5-100 种)选自下组的 microRNA 所构成：(a) 表 A 中所列出的人初乳特有的 microRNA；(b) 表 B 中所列出的人成乳特有的 microRNA；(c) 表 C 中所列出的人初乳和成乳共有的 microRNA；(d) 表 D 中所列

出的、牛奶中不存在但在人初乳或人成乳中存在的 microRNA。

以所述的 microRNA 集合作为有效成分。可用于制备人工的乳制品、食品或食品补充剂，更优选地，所述的人工的乳制品或食品补充剂的 microRNA 表达谱与正常的人初乳样品或正常的人成乳样品中 microRNA 表达谱相近或相同。

5

应用

本发明 microRNA 为与免疫、神经系统等有关的微小核糖核酸，在婴儿的免疫及神经发育发挥关键作用。因此，本发明 microRNA 或本发明 microRNA 表达谱具有多方面的用途：优选如下：

10 1、用于指导婴幼儿食品(如乳制品)或食品补充剂的配方

优选地，本发明提供了一种人工的乳制品，其中含有外源添加的一种或多种选自下组的 microRNA：(a) 表 A 中所列出的人初乳特有的 microRNA；(b) 表 B 中所列出的人成乳特有的 microRNA；(c) 表 C 中所列出的人初乳和成乳共有的 microRNA；(d) 表 D 中所列出的、牛奶中不存在但在人初乳或人成乳中存在的 microRNA。

15 在另一优选例中，所述的乳制品还含有外源添加的一种或多种选自下组的 microRNA：(e) 表 E 中所列出的 microRNA。所述的表 E 中列出的 microRNA 是文献中已报道的人乳中的已知 microRNA。

所述的人工的乳制品可为适用于 0-24 个月婴幼儿的乳制品；或适用于 2 周岁以上人群的乳制品。

20 优选地，所述的乳制品包括初乳制品、成乳制品。所述的乳制品也可优选包括奶粉、液态奶、奶酪、酸奶等。

所述乳制品可具有以下一个或多个特征：(a1) 所述的外源添加的 microRNA 中有两种或多种(如 2-500 种，较佳地 3-300 种，更佳地 3-200 种)来自表 A；(a2) 所述的外源添加的 microRNA 的种类和含量与人初乳的 microRNA 表达谱相近或相同；(b1) 所述的外源添加的 microRNA 中有两种或多种(如 2-500 种，较佳地 3-300 种，更佳地 3-200 种)来自表 B；(b2) 所述的外源添加的 microRNA 的种类和含量与人成乳的 microRNA 表达谱相近或相同；(c1) 所述的外源添加的 microRNA 中有两种或多种(如 2-500 种，较佳地 3-300 种，更佳地 3-200 种)来自表 C；(d1) 所述的外源添加的 microRNA 中有两种或多种(如 2-500 种，较佳地 3-300 种，更佳地 3-200 种)来自表 D。

30

优选地，本发明提供了一种人工的食品补充剂，其中含有食品学上可接受的载体以及一种或多种选自下组的 microRNA：(a) 表 A 中所列出的人初乳特有的 microRNA；(b) 表 B 中所列出的人成乳特有的 microRNA；(c) 表 C 中所列出的人初乳和成乳共有的 microRNA；(d) 表 D 中所列出的、牛奶中不存在但在人初乳或人成乳中存在的
35 microRNA。

在另一优选例中,所述的食物补充剂还含有一种或多种选自下组的 microRNA: (e) 如上所述的表 E 中所列出的 microRNA。

所述的食物补充剂可具有以下一个或多个特征:(a1) 所述的外源添加的 microRNA 中有两种或多种(如 2-500 种, 较佳地 3-300 种, 更佳地 3-200 种)来自表 A; (a2) 所述的外源添加的 microRNA 的种类和含量与人初乳的 microRNA 表达谱相近或相同; (b1) 所述的外源添加的 microRNA 中有两种或多种(如 2-500 种, 较佳地 3-300 种, 更佳地 3-200 种)来自表 B; (b2) 所述的外源添加的 microRNA 的种类和含量与人成乳的 microRNA 表达谱相近或相同; (c1) 所述的外源添加的 microRNA 中有两种或多种(如 2-500 种, 较佳地 3-300 种, 更佳地 3-200 种)来自表 C; (d1) 所述的外源添加的 microRNA 中有两种或多种(如 2-500 种, 较佳地 3-300 种, 更佳地 3-200 种)来自表 D。

2、可用于指导婴幼儿食品(包括乳制品)的科学分段

优选地, 本发明提供了一种鉴别乳制品的方法, 所述方法包括步骤:

- (1) 提供一乳制品(如奶粉)样品(优选地, 包括牛奶或其衍生乳制品、羊奶或其衍生乳制品、人奶等);
- (2) 检测所述乳制品样品中 microRNA 的种类及其含量;
- (3) 将步骤(2)测得的 microRNA 种类及其含量, 与作为对照的初乳样品以及成乳样品中 microRNA 的表达谱(即 microRNA 种类及其含量)进行比较;

其中, 如果测得的 microRNA 的种类及其含量与初乳样品的 microRNA 表达谱相近或相同, 则鉴定所述乳制品为初乳制品; 如果测得的 microRNA 的种类及其含量与成乳样品的 microRNA 表达谱相近或相同, 则鉴定所述乳制品为成乳制品。

在另一优选例中, 通过检测成乳或初乳中 microRNA 的种类及其含量, 获得作为对照的成乳样品或初乳样品中 microRNA 表达谱。

所述的对照的成乳样品或初乳样品中 microRNA 表达谱可以包含本发明 microRNA, 也可以包含现有技术中已知的 microRNA(如所述的表 E 中所列出的 microRNA)。更佳地, 所述的对照的初乳样品中的 microRNA 表达谱包括: 表 A 和表 C 中所列出的两种或多种 microRNA; 并且所述的对照的成乳样品中的 microRNA 表达谱包括表 B 和表 C 中所列出的 microRNA。

3、可根据人乳微小核糖核酸表达谱, 选择性地升高和/或降低婴幼儿食品(如乳品)中特定种类微小核糖核酸的含量, 从而制成针对特殊婴幼儿的食品(包括乳制品)、食品补充剂和新型营养品等。

优选地, 本发明提供了一种制造乳制品的方法, 所述方法包括步骤:

- (1) 提供一乳制品原料(包括: 牛奶、羊奶、或其组合);
- (2) 检测所述乳制品原料中 microRNA 的种类及其含量, 得到第一 microRNA 表达

谱;

(3) 将步骤(2)测得的 microRNA 种类及其含量, 与作为对照的初乳样品或成乳样品中 microRNA 表达谱进行比较;

(4) 基于比较结果, 向所述乳制品原料中添加一种或多种 microRNA 和/或从所述
5 乳制品原料中去除一种或多种 microRNA, 从而制得乳制品, 其中所述乳制品 microRNA 表达谱与作为对照的初乳样品或成乳样品中 microRNA 的表达谱更接近或一致。

在另一优选例中, 所述的对照的成乳样品或初乳样品中 microRNA 表达谱, 其获得方法以及其所包含的 microRNA 如前所述。

10 优选地, 本发明还提供了一种制造乳制品的方法, 所述方法包括步骤:

(1) 提供一乳制品原料;

(2) 向所述乳制品原料中添加一种或多种 microRNA 和/或从所述乳制品原料中去除一种或多种 microRNA, 从而制得乳制品, 其中所述乳制品中 microRNA 表达谱与初乳或成乳中 microRNA 表达谱更接近或一致。

15 在另一优选例中, 所述的初乳或成乳是人初乳或人成乳。

其中, 所述的一种或多种 microRNA 可以包含本发明 microRNA, 也可以包含现有技术中已知的 microRNA(如所述的表 E 中所列出的 microRNA)。更佳地, 包括本发明 microRNA: 表 A、表 B、表 C 和/或表 D 中列出的一种或多种 microRNA。

20 优选地, 本发明还提供了一种制造食品补充剂的方法, 所述方法包括步骤:

(1) 检测某一对象的母乳中 microRNA 的种类及其含量, 从而获得该个体的第一 microRNA 表达谱;

(2) 将测得的第一表达谱的 microRNA 种类及其含量, 与作为对照的正常初乳样品或正常成乳样品中 microRNA 表达谱进行比较, 从而确定第一表达谱中所缺乏的
25 microRNA 或含量不足因而需要部分补充的 microRNA;

(3) 配制食品补充剂, 其中所述的食品补充剂含有上一步骤中所确定的第一表达谱中所缺乏的 microRNA 或含量不足因而需要部分补充的 microRNA。

在另一优选例中, 在配制步骤中, 包括将食品学上可接受的载体与一种或多种人工合成的 microRNA 进行混合, 从而形成食品补充剂。

30 在另一优选例中, 通过检测正常成乳或正常初乳中 microRNA 的种类及其含量, 获得对照的正常初乳样品或正常成乳样品中 microRNA 表达谱。

其中, 所述的正常成乳样品或正常初乳样品是指所述的成乳或初乳中, 对于婴幼儿而言, 含有足够(包括种类和含量)其生长发育的 microRNA。

35 本发明的主要优点包括:

1. 本发明提供了一种新的 microRNA 集合, 所述集合中的 microRNA 可用于制备人工的乳制品、食品或食品补充剂等。

2. 本发明建立了一系列人乳 microRNA 表达谱, 包括人乳(广谱含有或特有的)microRNA 的表达谱, 人初乳中特有的 microRNA 表达谱, 或人成乳中特有的 microRNA 的表达谱等, 以及所述 microRNA 表达谱的用途, 所述 microRNA 表达谱可用于指导制备人工的乳制品、食品或食品补充剂; 也可用于鉴别乳制品为成乳制品或初乳制品。

下面结合具体实施, 进一步阐述本发明。应理解, 这些实施例仅用于说明本发明而不用来限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法, 通常按照常规条件, 例如 Sambrook 等人, 分子克隆: 实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件, 或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明, 否则百分比和份数按重量计算。GFP 表示绿色荧光蛋白(Green Fluorescent Protein)。

实施例 1: 人乳中稳定存在微小核糖核酸

利用 Solexa 测序技术检测人乳中稳定存在的大量微小核糖核酸。

具体步骤包括:

- (1) 收集人乳样本;
- (2) 通过 Trizol 试剂提取样本总 RNA;
- (3) 进行 PAGE 电泳回收 17-27nt RNA 分子;
- (4) 将接头引物(adaptor primer)酶联在小 RNA 分子的 3'与 5'端;
- (5) 纯化的DNA直接用于集群生成, 利用 Illumina Genome Analyzer 进行测序分析。

具体结果见表 1。表 1 是人乳中微小核糖核酸的测序结果。从测序结果可以看出, 人乳中稳定存在大量微小核糖核酸。

表 1 人乳中含有的 microRNA

let-7a*	miR-141*	miR-199b-3p	miR-301a	miR-34b*	miR-455-5p	miR-590-3p
let-7b*	miR-143*	miR-199b-5p	miR-301b	miR-34c-5p	miR-486-5p	miR-590-5p
let-7d*	miR-144*	miR-19a	miR-30a	miR-3605-5p	miR-489	miR-597
let-7e*	miR-145	miR-19b	miR-30a*	miR-3613-5p	miR-493	miR-598
let-7f-1*	miR-1468	miR-200a	miR-30b	miR-361-3p	miR-499-3p	miR-616*
let-7f-2*	miR-146b-3p	miR-200a*	miR-30b*	miR-3614-5p	miR-499-5p	miR-618
let-7g	miR-146b-5p	miR-200b	miR-30c	miR-3615	miR-500a	miR-624*
let-7g*	miR-147b	miR-200b*	miR-30c-1*	miR-361-5p	miR-500a*	miR-625
let-7i*	miR-148a	miR-200c	miR-30c-2*	miR-362-3p	miR-500b	miR-625*
miR-100*	miR-148a*	miR-200c*	miR-30d	miR-362-5p	miR-501-3p	miR-627
miR-101*	miR-148b	miR-20a	miR-30d*	miR-363	miR-501-5p	miR-628-3p
miR-103-2*	miR-148b*	miR-20a*	miR-30e	miR-365*	miR-502-3p	miR-628-5p
miR-106a	miR-151-3p	miR-20b	miR-30e*	miR-3656	miR-502-5p	miR-629
miR-106b	miR-151-5p	miR-21*	miR-3116	miR-3664	miR-504	miR-629*

miR-106b*	miR-1537	miR-2114	miR-3127	miR-3677	miR-505	miR-642a
miR-10a	miR-155*	miR-2114*	miR-3130-3p	miR-3688	miR-511	miR-651
miR-10a*	miR-15a	miR-2115	miR-3130-5p	miR-369-3p	miR-512-3p	miR-660
miR-10b	miR-15a*	miR-2115*	miR-3133	miR-374a	miR-515-5p	miR-671-3p
miR-1246	miR-15b	miR-2116	miR-3144-3p	miR-374a*	miR-517a	miR-671-5p
miR-1251	miR-15b*	miR-215	miR-3158	miR-374b	miR-517b	miR-7
miR-125a-3p	miR-16-1*	miR-219-1-3p	miR-3182	miR-374b*	miR-519a	miR-708*
miR-125a-5p	miR-16-2*	miR-219-5p	miR-3194	miR-377	miR-519c-3p	miR-7-1*
miR-125b-1*	miR-17*	miR-22*	miR-3196	miR-378*	miR-520a-3p	miR-720
miR-125b-2*	miR-181a*	miR-221*	miR-32	miR-381	miR-532-3p	miR-744
miR-126*	miR-181a-2*	miR-223*	miR-32*	miR-382	miR-532-5p	miR-744*
miR-1260	miR-181c	miR-224	miR-3200-3p	miR-383	miR-542-3p	miR-766
miR-1260b	miR-181c*	miR-224*	miR-320a	miR-3909	miR-548c-5p	miR-769-3p
miR-1262	miR-181d	miR-2277-5p	miR-320b	miR-3912	miR-548d-5p	miR-769-5p
miR-1266	miR-182*	miR-2355-3p	miR-320c	miR-3913	miR-548e	miR-873
miR-1271	miR-183*	miR-2355-5p	miR-320d	miR-3919	miR-548h	miR-885-5p
miR-127-3p	miR-185*	miR-23a	miR-324-3p	miR-3920	miR-548i	miR-889
miR-1274b	miR-187	miR-23b	miR-324-5p	miR-3942	miR-548j	miR-891a
miR-1275	miR-188-3p	miR-24-2*	miR-330-3p	miR-409-3p	miR-548k	miR-9
miR-1280	miR-188-5p	miR-26a	miR-330-5p	miR-410	miR-548n	miR-92a-1*
miR-1287	miR-18a	miR-26a-1*	miR-331-3p	miR-421	miR-548o	miR-92b
miR-1294	miR-18a*	miR-26b	miR-331-5p	miR-422a	miR-548p	miR-93*
miR-1296	miR-190	miR-26b*	miR-335	miR-423-3p	miR-548y	miR-934
miR-1299	miR-190b	miR-27a	miR-335*	miR-423-5p	miR-548z	miR-937
miR-1301	miR-191	miR-27a*	miR-338-3p	miR-424	miR-550a*	miR-941
miR-1303	miR-192*	miR-27b	miR-339-3p	miR-425*	miR-551a	miR-944
miR-130a	miR-193a-3p	miR-27b*	miR-339-5p	miR-4284	miR-574-3p	miR-99a
miR-130b	miR-193a-5p	miR-28-3p	miR-33a	miR-4286	miR-574-5p	miR-99a*
miR-130b*	miR-193b	miR-28-5p	miR-33a*	miR-4326	miR-576-3p	miR-99b
miR-132	miR-194	miR-296-5p	miR-33b	miR-449a	miR-576-5p	miR-99b*
miR-132*	miR-195*	miR-29a	miR-33b*	miR-449b	miR-577	
miR-135a	miR-196a	miR-29a*	miR-340*	miR-450a	miR-579	
miR-135b	miR-196a*	miR-29b	miR-342-3p	miR-450b-5p	miR-580	
miR-136*	miR-196b	miR-29b-2*	miR-342-5p	miR-454	miR-582-3p	
miR-140-3p	miR-197	miR-29c	miR-34a	miR-454*	miR-582-5p	
miR-140-5p	miR-199a-3p	miR-29c*	miR-34a*	miR-455-3p	miR-589	

实施例 2：人成乳和初乳中微小核糖核酸表达分析

本实施例结合人成乳和初乳中微小核糖核酸的 Solexa 测序结果，建立人乳微小核糖核酸检测的统一标准。

- 5 Solexa 测序具体步骤如实施例 1 所述，不同的是，收集的样本分别为人成乳和初乳。

以初乳和成乳的拷贝数范围，对检测结果进行如下分类(其它实施例中，对检测结果的分类同此法)。

拷贝数	含量分类
0	不存在/未检出(用“UD”表示)
1-10	少
11-100	较少
101-1,000	中等
1,001-10,000	较高
10,001-100,000	高

具体结果见表 2 和图 1。表 2 是人成乳和初乳中微小核糖核酸的表达差异分析表。从结果可以看出, 大多数的微小核糖核酸在人成乳和初乳中都能检测到, 而只有少部分微小核糖核酸特异表达在人成乳或初乳中。人成乳中表达的微小核糖核酸与初乳相比, 在种类上没有太大的区别, 但许多微小核糖核酸的表达量在两者之间有差异(如 5 let-7a*、let-7b*、let-7d*等等)。

表 2 人成乳或初乳中含有的 microRNA

编号	miR 种类	miR 含量 (人成乳)	miR 含量 (人初乳)	编号	miR 种类	miR 含量 (人成乳)	miR 含量 (人初乳)
1	let-7a*	较少	中等	173	miR-3196	少	少
2	let-7b*	较少	中等	174	miR-32	较少	较少
3	let-7d*	较少	中等	175	miR-32*	少	少
4	let-7e*	少	少	176	miR-3200-3p	较少	少
5	let-7f-1*	较少	中等	177	miR-320a	中等	较高
6	let-7f-2*	较少	中等	178	miR-320b	少	较少
7	let-7g	高	较高	179	miR-320c	少	较少
8	let-7g*	较少	中等	180	miR-320d	少	较少
9	let-7i*	较少	较少	181	miR-324-3p	较少	较少
10	miR-100*	少	少	182	miR-324-5p	少	少
11	miR-101*	少	少	183	miR-330-3p	少	少
12	miR-103-2*	少	少	184	miR-330-5p	少	少
13	miR-106a	少	少	185	miR-331-3p	少	较少
14	miR-106b	中等	中等	186	miR-331-5p	少	少
15	miR-106b*	较高	较高	187	miR-335	中等	中等
16	miR-10a	较高	较高	188	miR-335*	较高	较高
17	miR-10a*	少	少	189	miR-338-3p	少	较少
18	miR-10b	少	较少	190	miR-339-3p	少	少
19	miR-1246	较少	中等	191	miR-339-5p	较少	少
20	miR-1251	较少	较少	192	miR-33a	中等	中等
21	miR-125a-3p	少	少	193	miR-33a*	少	少
22	miR-125a-5p	较少	较少	194	miR-33b	中等	中等
23	miR-125b-1*	少	少	195	miR-33b*	少	少
24	miR-125b-2*	中等	中等	196	miR-340*	少	少
25	miR-126*	较少	中等	197	miR-342-3p	中等	中等

26	miR-1260	较少	中等	198	miR-342-5p	较少	中等
27	miR-1260b	较少	中等	199	miR-34a	中等	较高
28	miR-1262	少	少	200	miR-34a*	少	较少
29	miR-1266	少	少	201	miR-34b*	少	较少
30	miR-1271	少	少	202	miR-34c-5p	少	较少
31	miR-127-3p	少	少	203	miR-3605-5p	少	少
32	miR-1274b	中等	中等	204	miR-3613-5p	少	少
33	miR-1275	少	较少	205	miR-361-3p	少	较少
34	miR-1280	较高	较高	206	miR-3614-5p	少	少
35	miR-1287	较少	较少	207	miR-3615	少	少
36	miR-1294	少	少	208	miR-361-5p	中等	中等
37	miR-1296	少	少	209	miR-362-3p	较少	较少
38	miR-1299	少	较少	210	miR-362-5p	少	少
39	miR-1301	少	少	211	miR-363	较少	较少
40	miR-1303	少	少	212	miR-365*	少	少
41	miR-130a	较少	中等	213	miR-3656	中等	少
42	miR-130b	中等	中等	214	miR-3664	少	少
43	miR-130b*	较少	较少	215	miR-3677	少	少
44	miR-132	中等	中等	216	miR-3688	少	少
45	miR-132*	较少	中等	217	miR-369-3p	少	少
46	miR-135a	较少	较少	218	miR-374a	中等	中等
47	miR-135b	少	少	219	miR-374a*	中等	中等
48	miR-136*	少	较少	220	miR-374b	中等	中等
49	miR-140-3p	中等	较高	221	miR-374b*	少	少
50	miR-140-5p	较少	较少	222	miR-377	少	少
51	miR-141*	较高	较高	223	miR-378*	较少	较少
52	miR-143*	少	较少	224	miR-381	少	少
53	miR-144*	少	少	225	miR-382	少	少
54	miR-145	较少	较少	226	miR-383	少	中等
55	miR-1468	少	少	227	miR-3909	少	较少
56	miR-146b-3p	较高	较高	228	miR-3912	较少	较少
57	miR-146b-5p	高	高	229	miR-3913	少	较少
58	miR-147b	少	较少	230	miR-3919	少	少
59	miR-148a	高	高	231	miR-3920	少	少
60	miR-148a*	较高	高	232	miR-3942	少	少
61	miR-148b	中等	中等	233	miR-409-3p	少	少
62	miR-148b*	中等	中等	234	miR-410	少	较少
63	miR-151-3p	较高	较高	235	miR-421	中等	中等
64	miR-151-5p	中等	中等	236	miR-422a	较少	较少
65	miR-1537	较少	中等	237	miR-423-3p	较高	较高
66	miR-155*	少	少	238	miR-423-5p	较少	中等

67	miR-15a	中等	中等	239	miR-424	少	较少
68	miR-15a*	少	少	240	miR-425*	中等	中等
69	miR-15b	中等	中等	241	miR-4284	少	少
70	miR-15b*	少	少	242	miR-4286	较少	较少
71	miR-16-1*	少	少	243	miR-4326	少	少
72	miR-16-2*	较少	中等	244	miR-449a	少	少
73	miR-17*	较少	中等	245	miR-449b	少	少
74	miR-181a*	中等	较高	246	miR-450a	少	较少
75	miR-181a-2*	较高	较高	247	miR-450b-5p	少	较少
76	miR-181c	较高	较高	248	miR-454	较少	较少
77	miR-181c*	中等	中等	249	miR-454*	较少	中等
78	miR-181d	较少	中等	250	miR-455-3p	少	少
79	miR-182*	少	少	251	miR-455-5p	中等	中等
80	miR-183*	少	少	252	miR-486-5p	较少	较少
81	miR-185*	少	较少	253	miR-489	少	少
82	miR-187	少	少	254	miR-493	少	少
83	miR-188-3p	少	少	255	miR-499-3p	较少	少
84	miR-188-5p	少	少	256	miR-499-5p	中等	中等
85	miR-18a	中等	较少	257	miR-500a	少	少
86	miR-18a*	较少	较少	258	miR-500a*	较少	较少
87	miR-190	较少	较少	259	miR-500b	少	少
88	miR-190b	较少	较少	260	miR-501-3p	较少	中等
89	miR-191	高	高	261	miR-501-5p	少	少
90	miR-192*	少	少	262	miR-502-3p	少	较少
91	miR-193a-3p	较高	较高	263	miR-502-5p	少	少
92	miR-193a-5p	较少	较少	264	miR-504	少	少
93	miR-193b	较高	较高	265	miR-505	少	较少
94	miR-194	较少	较少	266	miR-511	中等	较少
95	miR-195*	少	较少	267	miR-512-3p	较少	少
96	miR-196a	中等	中等	268	miR-515-5p	少	少
97	miR-196a*	少	少	269	miR-517a	较少	少
98	miR-196b	中等	较少	270	miR-517b	较少	少
99	miR-197	较少	中等	271	miR-519a	较少	少
100	miR-199a-3p	较少	较少	272	miR-519c-3p	较少	少
101	miR-199b-3p	较少	较少	273	miR-520a-3p	少	少
102	miR-199b-5p	少	较少	274	miR-532-3p	少	少
103	miR-19a	较高	高	275	miR-532-5p	中等	中等
104	miR-19b	较高	高	276	miR-542-3p	较少	较少
105	miR-200a	较高	较高	277	miR-548c-5p	少	较少
106	miR-200a*	较高	中等	278	miR-548d-5p	少	较少
107	miR-200b	较高	较高	279	miR-548e	少	少

108	miR-200b*	中等	较少	280	miR-548h	少	少
109	miR-200c	较高	中等	281	miR-548i	较少	中等
110	miR-200c*	少	少	282	miR-548j	少	少
111	miR-20a	较高	较高	283	miR-548k	较少	中等
112	miR-20a*	较少	较少	284	miR-548n	少	少
113	miR-20b	少	少	285	miR-548o	少	较少
114	miR-21*	较高	高	286	miR-548p	较少	较少
115	miR-2114	少	少	287	miR-548y	少	少
116	miR-2114*	少	少	288	miR-548z	少	少
117	miR-2115	少	较少	289	miR-550a*	少	少
118	miR-2115*	少	较少	290	miR-551a	少	较少
119	miR-2116	少	少	291	miR-574-3p	中等	中等
120	miR-215	较少	较少	292	miR-574-5p	少	较少
121	miR-219-1-3p	少	少	293	miR-576-3p	少	较少
122	miR-219-5p	少	少	294	miR-576-5p	较少	较少
123	miR-22*	较少	较少	295	miR-577	中等	中等
124	miR-221*	较少	较少	296	miR-579	少	少
125	miR-223*	较少	较少	297	miR-580	少	少
126	miR-224	中等	较少	298	miR-582-3p	中等	中等
127	miR-224*	少	少	299	miR-582-5p	较少	较少
128	miR-2277-5p	少	少	300	miR-589	少	少
129	miR-2355-3p	少	较少	301	miR-590-3p	中等	中等
130	miR-2355-5p	少	较少	302	miR-590-5p	较少	较少
131	miR-23a	中等	较高	303	miR-597	少	少
132	miR-23b	中等	较高	304	miR-598	中等	中等
133	miR-24-2*	较少	较少	305	miR-616*	少	较少
134	miR-26a	高	高	306	miR-618	少	较少
135	miR-26a-1*	少	少	307	miR-624*	少	少
136	miR-26b	较高	较高	308	miR-625	少	少
137	miR-26b*	较少	中等	309	miR-625*	少	较少
138	miR-27a	中等	较高	310	miR-627	少	较少
139	miR-27a*	较少	中等	311	miR-628-3p	少	少
140	miR-27b	较高	高	312	miR-628-5p	较少	较少
141	miR-27b*	少	较少	313	miR-629	较少	中等
142	miR-28-3p	较高	较高	314	miR-629*	少	较少
143	miR-28-5p	中等	中等	315	miR-642a	少	少
144	miR-296-5p	少	较少	316	miR-651	较少	较少
145	miR-29a	较高	较高	317	miR-660	较高	较高
146	miR-29a*	少	较少	318	miR-671-3p	较少	少
147	miR-29b	较少	较少	319	miR-671-5p	少	少
148	miR-29b-2*	少	少	320	miR-7	少	少

149	miR-29c	较高	较高	321	miR-708*	少	少
150	miR-29c*	少	少	322	miR-7-1*	较少	较少
151	miR-301a	中等	中等	323	miR-720	少	较少
152	miR-301b	较少	较少	324	miR-744	少	少
153	miR-30a	高	高	325	miR-744*	少	少
154	miR-30a*	较高	较高	326	miR-766	少	较少
155	miR-30b	高	较高	327	miR-769-3p	少	少
156	miR-30b*	少	少	328	miR-769-5p	中等	中等
157	miR-30c	较高	较高	329	miR-873	少	较少
158	miR-30c-1*	少	少	330	miR-885-5p	较少	较少
159	miR-30c-2*	较少	较少	331	miR-889	少	少
160	miR-30d	高	高	332	miR-891a	少	少
161	miR-30d*	较少	中等	333	miR-9	少	少
162	miR-30e	较高	高	334	miR-92a-1*	较少	较少
163	miR-30e*	较高	较高	335	miR-92b	中等	中等
164	miR-3116	少	少	336	miR-93*	少	较少
165	miR-3127	少	少	337	miR-934	少	较少
166	miR-3130-3p	少	少	338	miR-937	较少	少
167	miR-3130-5p	少	少	339	miR-941	中等	中等
168	miR-3133	少	少	340	miR-944	少	较少
169	miR-3144-3p	少	少	341	miR-99a	较高	高
170	miR-3158	少	较少	342	miR-99a*	中等	较少
171	miR-3182	少	较少	343	miR-99b	较高	较高
172	miR-3194	少	少	344	miR-99b*	较少	较少

图 1 是初乳、成乳中 microRNA 表达差异分析, 其中 $R^2=0.8897$ (远小于 0.99), 说明初乳和成乳中 microRNA 表达谱存在差异。因此, 结合人成乳和初乳中微小核糖核酸的检测结果, 可建立人乳微小核糖核酸检测的统一标准。

5 实施例 3: 人成乳和初乳中表达有差异的微小核糖核酸

本实施例结合人成乳和初乳中表达有差异的微小核糖核酸 Solexa 测序结果, 建立完善的人乳微小核糖核酸表达谱。

Solexa 测序具体步骤如实施例 1 所述, 不同的是, 收集的样本为人成乳和初乳。

具体结果如下:

10 表 3 是人成乳和初乳中表达有差异的微小核糖核酸。从结果可以看出, 115 种 miRNA 有差异表达, 94 种 miRNA 是在人初乳中含量较多, 而 21 种 miRNA 在人初乳中含量较少。结果表明, 人乳中大部分微小核糖核酸的含量随着哺乳过程而减少。

表3 人成乳和初乳中表达有差异的微小核糖核酸

编号	miR 种类	miR 含量 (人成乳)	miR 含量 (人初乳)	编号	miR 种类	miR 含量 (人成乳)	miR 含量 (人初乳)
1	let-7a*	较少	中等	58	miR-3200-3p	较少	少
2	let-7b*	较少	中等	59	miR-320a	中等	较高
3	let-7d*	较少	中等	60	miR-320b	少	较少
4	let-7f-1*	较少	中等	61	miR-320c	少	较少
5	let-7f-2*	较少	中等	62	miR-320d	少	较少
6	let-7g	高	较高	63	miR-331-3p	少	较少
7	let-7g*	较少	中等	64	miR-338-3p	少	较少
8	miR-10b	少	较少	65	miR-339-5p	较少	少
9	miR-1246	较少	中等	66	miR-342-5p	较少	中等
10	miR-126*	较少	中等	67	miR-34a	中等	较高
11	miR-1260	较少	中等	68	miR-34a*	少	较少
12	miR-1260b	较少	中等	69	miR-34b*	少	较少
13	miR-1275	少	较少	70	miR-34c-5p	少	较少
14	miR-1299	少	较少	71	miR-361-3p	少	较少
15	miR-130a	较少	中等	72	miR-3656	中等	少
16	miR-132*	较少	中等	73	miR-383	少	中等
17	miR-136*	少	较少	74	miR-3909	少	较少
18	miR-140-3p	中等	较高	75	miR-3913	少	较少
19	miR-143*	少	较少	76	miR-410	少	较少
20	miR-147b	少	较少	77	miR-423-5p	较少	中等
21	miR-148a*	较高	高	78	miR-424	少	较少
22	miR-1537	较少	中等	79	miR-450a	少	较少
23	miR-16-2*	较少	中等	80	miR-450b-5p	少	较少
24	miR-17*	较少	中等	81	miR-454*	较少	中等
25	miR-181a*	中等	较高	82	miR-499-3p	较少	少
26	miR-181d	较少	中等	83	miR-501-3p	较少	中等
27	miR-185*	少	较少	84	miR-502-3p	少	较少
28	miR-18a	中等	较少	85	miR-505	少	较少
29	miR-195*	少	较少	86	miR-511	中等	较少
30	miR-196b	中等	较少	87	miR-512-3p	较少	少
31	miR-197	较少	中等	88	miR-517a	较少	少
32	miR-199b-5p	少	较少	89	miR-517b	较少	少
33	miR-19a	较高	高	90	miR-519a	较少	少
34	miR-19b	较高	高	91	miR-519c-3p	较少	少
35	miR-200a*	较高	中等	92	miR-548c-5p	少	较少
36	miR-200b*	中等	较少	93	miR-548d-5p	少	较少
37	miR-200c	较高	中等	94	miR-548i	较少	中等
38	miR-21*	较高	高	95	miR-548k	较少	中等

39	miR-2115	少	较少	96	miR-548o	少	较少
40	miR-2115*	少	较少	97	miR-551a	少	较少
41	miR-224	中等	较少	98	miR-574-5p	少	较少
42	miR-2355-3p	少	较少	99	miR-576-3p	少	较少
43	miR-2355-5p	少	较少	100	miR-616*	少	较少
44	miR-23a	中等	较高	101	miR-618	少	较少
45	miR-23b	中等	较高	102	miR-625*	少	较少
46	miR-26b*	较少	中等	103	miR-627	少	较少
47	miR-27a	中等	较高	104	miR-629	较少	中等
48	miR-27a*	较少	中等	105	miR-629*	少	较少
49	miR-27b	较高	高	106	miR-671-3p	较少	少
50	miR-27b*	少	较少	107	miR-720	少	较少
51	miR-296-5p	少	较少	108	miR-766	少	较少
52	miR-29a*	少	较少	109	miR-873	少	较少
53	miR-30b	高	较高	110	miR-93*	少	较少
54	miR-30d*	较少	中等	111	miR-934	少	较少
55	miR-30e	较高	高	112	miR-937	较少	少
56	miR-3158	少	较少	113	miR-944	少	较少
57	miR-3182	少	较少	114	miR-99a	较高	高
				115	miR-99a*	中等	较少

人成乳和初乳中存在的微小核糖核酸多数与免疫和神经系统有关。从结果可以看出，人乳中尤其是初乳中那些拷贝数高的微小核糖核酸几乎都是与免疫或神经有关的，例如：miR-181a、miR-223、miR-146a、miR-16、miR-21、miR-30a、miR-19a、miR-19b等。提示人乳中尤其是初乳中那些拷贝数高的微小核糖核酸可能对婴儿的免疫及神经系统发育中发挥生物学功能。

实施例 4： 人乳 microRNA 与神经系统的关系

本实施例证明了人乳 microRNA(如 miR-19a)在神经系统(如神经细胞)中的作用。

ESR1 是与神经细胞分化有关的配体诱导表达转录因子。ESR1 基因的再引进，在神经母细胞瘤细胞中导致细胞周期显著阻滞，不利于神经细胞的分化。

4.1 miR-19a 负调控雌激素受体 α (ESR1)

采用荧光素酶检测方法验证 miR-19a 负调控雌激素受体 α (ESR1)，具体步骤为：

- (1) 构建分别包含 Pre-miR-19a 和 ESR1 的 3' 非编码区荧光报告基因结构(3'-ESR1-wt)和 3'-ESR1-wt 的荧光素酶表达质粒；
- (2) 筛选阳性克隆，测序；
- (3) 扩增克隆并提纯质粒备用；
- (4) 培养 HEK-293 细胞，并接种于 24 孔板中，生长 10-24 小时；
- (5) 将荧光素酶表达质粒与 HEK-293 细胞共转染；

(6) 加入荧光素酶底物, 荧光素酶与底物反应, 产生荧光素, 通过检测荧光的强度可以测定荧光素酶的活性。

具体结果见图 2。图 2 是转染 Pre-miR-19a 和 3'-ESR1-wt 的 HEK-293 细胞的荧光素酶活性。图中, ***表示 $P < 0.1\%$ 。

5 从图 2 可以看出, 与对照组相比, 转染 Pre-miR-19a 和 3'-ESR1-wt 的 HEK-293 细胞的荧光素酶活性极其显著地降低, miR-19a 降低 3'-ESR1-wt 的荧光素酶活性约 40%。结果表明, miR-19a 减少 ESR1 的荧光素酶活性, 抑制 ESR1 表达。miR-19a 负调控 ESR1 的表达。

10 4.2 ESR1 表达在神经细胞中的作用

ESR1 是与神经细胞分化有关的配体诱导表达转录因子。miR-19a 负调控 ESR1 的表达, 接下来研究 ESR1 表达在神经细胞中的作用。

首先, 构建慢病毒表达载体(Lenti-ESR1), 利用慢病毒结构表达 ESR1 cDNA, 然后转染人神经母细胞瘤细胞——SK-N-BE(2)细胞。具体步骤为:

- 15 (1) 根据 ESR1 序列, 构建慢病毒表达载体(Lenti-ESR1);
- (2) 对于测序正确的重组质粒, 提取和纯化高质量的不含内毒素的重组质粒;
- (3) 使用高效重组慢病毒表达载体(Lenti-ESR1)、慢病毒包装空质粒载体(Lenti-Empty Vector)共转染 SK-N-BE(2)细胞, 进行病毒包装和生产, 收集病毒液;
- (4) 浓缩、纯化病毒液;
- 20 (5) 高质量的病毒液用于后续 Western blot 实验和细胞增殖测定。

利用 Western blot 方法检测 ESR1 在转染 Lenti-ESR1、Lenti-Empty Vector 的 SK-N-BE(2)细胞中的表达。具体步骤为:

- 25 (1) 收集蛋白样品: 使用裂解液裂解培养的细胞样本, 超声处理, 4°C , $12000\times\text{g}$ 离心 10 分钟。去除上清, 用 BCA 法测定蛋白浓度;
- (2) 电泳: 用 10%SDS-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳分离;
- (3) 转膜: 使用聚偏二氟乙烯(PVDF)膜;
- (4) 封闭: 使用 5%Tris 缓冲生理盐水(TBS)加吐温 20(TBST), 在 4°C 封闭过夜。然后用 TBST 洗膜 3 次, 每次 10 分钟。
- 30 (5) 孵育抗体: 先用适当比例的 TBST 稀释, 洗膜彻底; 然后在室温, 用适当比例稀释的辣根过氧化物酶(HRP)标记二抗;
- (6) 蛋白检测: 使用增强的化学发光试剂检测蛋白; 使用 Bandscan 软件扫描和量化每个波段的放射自显影强度。

35 利用流式细胞仪分析检测 Lenti-ESR1、Lenti-Empty Vector 转染细胞后的细胞增殖。

具体步骤为：

- (1) 收集 Lenti-ESR1、Lenti-Empty Vector 转染的细胞培养液至流式专用管；
- (2) 加 1ml PBS 缓冲液清洗一次，清洗液加入管中；
- (3) 再用 1ml PBS 缓冲液清洗剩余细胞一次，清洗液加入离心管；
- 5 (4) 离心，去上清；加入 1ml PBS 缓冲液重悬细胞，再次离心弃上清；
- (5) 最后重悬细胞于 500 微升的 PBS 缓冲液中；
- (6) 在细胞悬液中加入核酸染料，轻轻混匀，避光冰上孵育 10 分钟，用流式细胞仪检测细胞增殖。

具体结果见图 3 和图 4。

10 图 3 是 ESR1 在转染 Lenti-ESR1、Lenti-Empty Vector 的 GFP 阳性 SK-N-BE(2)细胞中表达的 Western blot 结果。以 β -actin 作为内参，ESR1 在转染 Lenti-Empty Vector 的 GFP 阳性 SK-N-BE(2)细胞中，几乎不表达。以转染 Lenti-Empty Vector 的细胞为空白对照，ESR1 在转染 Lenti-ESR1 的 GFP 阳性 SK-N-BE(2)细胞中表达显著增加。

15 图 4 是 Lenti-ESR1、Lenti-Empty Vector 转染细胞后的细胞增殖的流式细胞仪分析结果。图中，***表示 $P < 0.1\%$ 。以转染 Lenti-Empty Vector 的细胞为空白对照，ESR1 在转染 Lenti-ESR1 的 SK-N-BE(2)细胞中的表达，导致细胞增殖极其显著地降低。

综上所述，miR-19a 抑制 ESR1 的表达，而 ESR1 受抑制后将有助于神经细胞的分化。可见，miR-19a 有利于神经细胞的分化。结果表明人乳 microRNA 与神经系统有关。

20 **实施例 5：人乳微小核糖核酸表达谱**

本实施例检测了牛乳中微小核糖核酸的种类和含量，并与实施例 2 中对不同时期所分泌的乳汁(如初乳与成乳)的检测结果进行筛选和比对，从而形成了人乳中特有的微小核糖核酸表达谱，以及不同时期的人乳中微小核糖核酸差异表达谱。

25 Solexa 测序具体步骤如实施例 1 所述，不同的是，收集的样本分别为人成乳、初乳，以及牛乳。

根据检测结果，形成如下不同的微小核糖核酸表达谱。

5.1 人乳中特有的微小核糖核酸表达谱

所述的人乳中特有的微小核糖核酸表达谱是指在人成乳和/或人初乳中存在，但是在牛乳中不存在的 microRNA，如表 4 所示。

表 4

编号	miR 种类	miR 含量 (人成乳)	miR 含量 (人初乳)	编号	miR 种类	miR 含量 (人成乳)	miR 含量 (人初乳)
1	let-7a*	较少	中等	121	miR-3664	少	少
2	let-7b*	较少	中等	122	miR-3677	少	少
3	let-7d*	较少	中等	123	miR-3688	少	少

4	let-7e*	少	少	124	miR-374a*	中等	中等
5	let-7f-1*	较少	中等	125	miR-374b*	少	少
6	let-7f-2*	较少	中等	126	miR-377	少	少
7	let-7g*	较少	中等	127	miR-378*	较少	较少
8	let-7i*	较少	较少	128	miR-3909	少	较少
9	miR-100*	少	少	129	miR-3912	较少	较少
10	miR-101*	少	少	130	miR-3913	少	较少
11	miR-103-2*	少	少	131	miR-3919	少	少
12	miR-106b*	较高	较高	132	miR-3920	少	少
13	miR-10a*	少	少	133	miR-3942	少	少
14	miR-1251	较少	较少	134	miR-409-3p	少	少
15	miR-125b-1*	少	少	135	miR-410	少	较少
16	miR-125b-2*	中等	中等	136	miR-422a	较少	较少
17	miR-126*	较少	中等	137	miR-425*	中等	中等
18	miR-1260b	较少	中等	138	miR-4284	少	少
19	miR-1262	少	少	139	miR-4286	较少	较少
20	miR-1266	少	少	140	miR-4326	少	少
21	miR-1271	少	少	141	miR-449b	少	少
22	miR-1275	少	较少	142	miR-454	较少	较少
23	miR-1280	较高	较高	143	miR-454*	较少	中等
24	miR-1287	较少	较少	144	miR-489	少	少
25	miR-1294	少	少	145	miR-493	少	少
26	miR-1299	少	较少	146	miR-499-3p	较少	少
27	miR-1301	少	少	147	miR-500a	少	少
28	miR-1303	少	少	148	miR-500a*	较少	较少
29	miR-130b*	较少	较少	149	miR-500b	少	少
30	miR-132*	较少	中等	150	miR-501-5p	少	少
31	miR-135b	少	少	151	miR-502-5p	少	少
32	miR-136*	少	较少	152	miR-504	少	少
33	miR-141*	较高	较高	153	miR-511	中等	较少
34	miR-143*	少	较少	154	miR-512-3p	较少	少
35	miR-144*	少	少	155	miR-515-5p	少	少
36	miR-1468	少	少	156	miR-517a	较少	少
37	miR-146b-3p	较高	较高	157	miR-517b	较少	少
38	miR-148a*	较高	高	158	miR-519a	较少	少
39	miR-148b*	中等	中等	159	miR-519c-3p	较少	少
40	miR-1537	较少	中等	160	miR-520a-3p	少	少
41	miR-155*	少	少	161	miR-548c-5p	少	较少
42	miR-15a*	少	少	162	miR-548d-5p	少	较少

43	miR-15b*	少	少	163	miR-548e	少	少
44	miR-16-1*	少	少	164	miR-548h	少	少
45	miR-16-2*	较少	中等	165	miR-548i	较少	中等
46	miR-17*	较少	中等	166	miR-548j	少	少
47	miR-181a*	中等	较高	167	miR-548k	较少	中等
48	miR-181a-2*	较高	较高	168	miR-548n	少	少
49	miR-181c*	中等	中等	169	miR-548o	少	较少
50	miR-182*	少	少	170	miR-548p	较少	较少
51	miR-183*	少	少	171	miR-548y	少	少
52	miR-185*	少	较少	172	miR-548z	少	少
53	miR-18a*	较少	较少	173	miR-550a*	少	少
54	miR-192*	少	少	174	miR-551a	少	较少
55	miR-193b	较高	较高	175	miR-576-3p	少	较少
56	miR-195*	少	较少	176	miR-576-5p	较少	较少
57	miR-196a*	少	少	177	miR-577	中等	中等
58	miR-199b-5p	少	较少	178	miR-579	少	少
59	miR-200a*	较高	中等	179	miR-580	少	少
60	miR-200b*	中等	较少	180	miR-582-3p	中等	中等
61	miR-200c*	少	少	181	miR-589	少	少
62	miR-20a*	较少	较少	182	miR-590-3p	中等	中等
63	miR-20b	少	少	183	miR-590-5p	较少	较少
64	miR-21*	较高	高	184	miR-597	少	少
65	miR-2114	少	少	185	miR-598	中等	中等
66	miR-2114*	少	少	186	miR-616*	少	较少
67	miR-2115	少	较少	187	miR-618	少	较少
68	miR-2115*	少	较少	188	miR-624*	少	少
69	miR-2116	少	少	189	miR-625	少	少
70	miR-22*	较少	较少	190	miR-625*	少	较少
71	miR-221*	较少	较少	191	miR-627	少	较少
72	miR-223*	较少	较少	192	miR-629	较少	中等
73	miR-224*	少	少	193	miR-629*	少	较少
74	miR-2277-5p	少	少	194	miR-642a	少	少
75	miR-2355-3p	少	较少	195	miR-651	较少	较少
76	miR-2355-5p	少	较少	196	miR-708*	少	少
77	miR-24-2*	较少	较少	197	miR-7-1*	较少	较少
78	miR-26a-1*	少	少	198	miR-744*	少	少
79	miR-26b*	较少	中等	199	miR-766	少	较少
80	miR-27a*	较少	中等	200	miR-769-3p	少	少
81	miR-27b*	少	较少	201	miR-769-5p	中等	中等

82	miR-28-3p	较高	较高	202	miR-873	少	较少
83	miR-296-5p	少	较少	203	miR-889	少	少
84	miR-29a*	少	较少	204	miR-891a	少	少
85	miR-29b-2*	少	少	205	miR-92a-1*	较少	较少
86	miR-29c*	少	少	206	miR-93*	少	较少
87	miR-301b	较少	较少	207	miR-934	少	较少
88	miR-30a*	较高	较高	208	miR-937	较少	少
89	miR-30b*	少	少	209	miR-941	中等	中等
90	miR-30c-1*	少	少	210	miR-944	少	较少
91	miR-30c-2*	较少	较少	211	miR-99a*	中等	较少
92	miR-30d*	较少	中等	212	miR-99b*	较少	较少
93	miR-30e*	较高	较高	213	miR-10b	少	较少
94	miR-3116	少	少	214	miR-1260	较少	中等
95	miR-3127	少	少	215	miR-140-5p	较少	较少
96	miR-3130-3p	少	少	216	miR-147b	少	较少
97	miR-3130-5p	少	少	217	miR-181c	较高	较高
98	miR-3133	少	少	218	miR-187	少	少
99	miR-3144-3p	少	少	219	miR-188-3p	少	少
100	miR-3158	少	较少	220	miR-188-5p	少	少
101	miR-3182	少	较少	221	miR-18a	中等	较少
102	miR-3194	少	少	222	miR-190	较少	较少
103	miR-3196	少	少	223	miR-190b	较少	较少
104	miR-32	较少	较少	224	miR-19a	较高	高
105	miR-32*	少	少	225	miR-219-1-3p	少	少
106	miR-3200-3p	较少	少	226	miR-219-5p	少	少
107	miR-335*	较高	较高	227	miR-301a	中等	中等
108	miR-339-3p	少	少	228	miR-330-5p	少	少
109	miR-33a*	少	少	229	miR-338-3p	少	较少
110	miR-33b*	少	少	230	miR-34c-5p	少	较少
111	miR-340*	少	少	231	miR-381	少	少
112	miR-342-5p	较少	中等	232	miR-383	少	中等
113	miR-34a*	少	较少	233	miR-424	少	较少
114	miR-34b*	少	较少	234	miR-449a	少	少
115	miR-3605-5p	少	少	235	miR-450a	少	较少
116	miR-3613-5p	少	少	236	miR-455-5p	中等	中等
117	miR-3614-5p	少	少	237	miR-501-3p	较少	中等
118	miR-3615	少	少	238	miR-505	少	较少
119	miR-365*	少	少	239	miR-542-3p	较少	较少
120	miR-3656	中等	少	240	miR-582-5p	较少	较少

				241	miR-9	少	少
--	--	--	--	-----	-------	---	---

在牛奶乳品中添加这些特定微小核糖核酸的含量，可制作婴幼儿食品补充剂。

5.2 人初乳中特有的微小核糖核酸表达谱

- 所述的人初乳中特有的微小核糖核酸表达谱是指：(1) 在人初乳中的含量比人成乳中的含量高的 microRNA，或者(2) 在人初乳中被检测到，而在人成乳中未检测到或不
- 5 存在；如表 5 所示。

表 5

编号	miR 种类	miR 含量 (人成乳)	miR 含量 (人初乳)	编号	miR 种类	miR 含量 (人成乳)	miR 含量 (人初乳)
1	miR-148a*	较高	高	49	miR-185*	少	较少
2	miR-19a	较高	高	50	miR-195*	少	较少
3	miR-19b	较高	高	51	miR-199b-5p	少	较少
4	miR-21*	较高	高	52	miR-2115	少	较少
5	miR-27b	较高	高	53	miR-2115*	少	较少
6	miR-30e	较高	高	54	miR-2355-3p	少	较少
7	miR-99a	较高	高	55	miR-2355-5p	少	较少
8	miR-140-3p	中等	较高	56	miR-27b*	少	较少
9	miR-181a*	中等	较高	57	miR-296-5p	少	较少
10	miR-23a	中等	较高	58	miR-29a*	少	较少
11	miR-23b	中等	较高	59	miR-3158	少	较少
12	miR-27a	中等	较高	60	miR-3182	少	较少
13	miR-320a	中等	较高	61	miR-320b	少	较少
14	miR-34a	中等	较高	62	miR-320c	少	较少
15	let-7a*	较少	中等	63	miR-320d	少	较少
16	let-7b*	较少	中等	64	miR-331-3p	少	较少
17	let-7d*	较少	中等	65	miR-338-3p	少	较少
18	let-7f-1*	较少	中等	66	miR-34a*	少	较少
19	let-7f-2*	较少	中等	67	miR-34b*	少	较少
20	let-7g*	较少	中等	68	miR-34c-5p	少	较少
21	miR-1246	较少	中等	69	miR-361-3p	少	较少
22	miR-126*	较少	中等	70	miR-3909	少	较少
23	miR-1260	较少	中等	71	miR-3913	少	较少
24	miR-1260b	较少	中等	72	miR-410	少	较少
25	miR-130a	较少	中等	73	miR-424	少	较少
26	miR-132*	较少	中等	74	miR-450a	少	较少
27	miR-1537	较少	中等	75	miR-450b-5p	少	较少
28	miR-16-2*	较少	中等	76	miR-502-3p	少	较少
29	miR-17*	较少	中等	77	miR-505	少	较少
30	miR-181d	较少	中等	78	miR-548c-5p	少	较少

31	miR-197	较少	中等	79	miR-548d-5p	少	较少
32	miR-26b*	较少	中等	80	miR-548o	少	较少
33	miR-27a*	较少	中等	81	miR-551a	少	较少
34	miR-30d*	较少	中等	82	miR-574-5p	少	较少
35	miR-342-5p	较少	中等	83	miR-576-3p	少	较少
36	miR-423-5p	较少	中等	84	miR-616*	少	较少
37	miR-454*	较少	中等	85	miR-618	少	较少
38	miR-501-3p	较少	中等	86	miR-625*	少	较少
39	miR-548i	较少	中等	87	miR-627	少	较少
40	miR-548k	较少	中等	88	miR-629*	少	较少
41	miR-629	较少	中等	89	miR-720	少	较少
42	miR-383	少	中等	90	miR-766	少	较少
43	miR-10b	少	较少	91	miR-873	少	较少
44	miR-1275	少	较少	92	miR-93*	少	较少
45	miR-1299	少	较少	93	miR-934	少	较少
46	miR-136*	少	较少	94	miR-944	少	较少
47	miR-143*	少	较少	95	miR-145*	UD	较少
48	miR-147b	少	较少	96	miR-146a*	UD	较少

5.3 人成乳中特有的微小核糖核酸表达谱

所述的人成乳中特有的微小核糖核酸表达谱是指：(1) 在人成乳中的含量比人初乳中的含量高的 microRNA，或者(2) 在人成乳中被检测到，而在人初乳中未检测到或不

5

表 6

编号	miR 种类	miR 含量 (人成乳)	miR 含量 (人初乳)	编号	miR 种类	miR 含量 (人成乳)	miR 含量 (人初乳)
1	let-7g	高	较高	31	miR-376a	少	UD
2	miR-30b	高	较高	32	miR-411	少	UD
3	miR-200a*	较高	中等	33	miR-4297	少	UD
4	miR-200c	较高	中等	34	miR-488	少	UD
5	miR-18a	中等	较少	35	miR-491-5p	少	UD
6	miR-196b	中等	较少	36	miR-514	少	UD
7	miR-200b*	中等	较少	37	miR-516b	少	UD
8	miR-224	中等	较少	38	miR-517c	少	UD
9	miR-511	中等	较少	39	miR-518e	少	UD
10	miR-99a*	中等	较少	40	miR-519a*	少	UD
11	miR-3656	中等	少	41	miR-519b-3p	少	UD
12	miR-1228*	少	UD	42	miR-520a-5p	少	UD
13	miR-1249	少	UD	43	miR-520f	少	UD
14	miR-1276	少	UD	44	miR-522	少	UD

15	miR-1283	少	UD	45	miR-524-3p	少	UD
16	miR-153	少	UD	46	miR-548v	少	UD
17	miR-19b-1*	少	UD	47	miR-552	少	UD
18	miR-2110	少	UD	48	miR-589*	少	UD
19	miR-2116*	少	UD	49	miR-641	少	UD
20	miR-2277-3p	少	UD	50	miR-643	少	UD
21	miR-3065-3p	少	UD	51	miR-95	少	UD
22	miR-3074	少	UD	52	miR-3200-3p	较少	少
23	miR-3115	少	UD	53	miR-339-5p	较少	少
24	miR-3174	少	UD	54	miR-499-3p	较少	少
25	miR-3190	少	UD	55	miR-512-3p	较少	少
26	miR-3200-5p	少	UD	56	miR-517a	较少	少
27	miR-326	少	UD	57	miR-517b	较少	少
28	miR-3617	少	UD	58	miR-519a	较少	少
29	miR-3620	少	UD	59	miR-519c-3p	较少	少
30	miR-3654	少	UD	60	miR-671-3p	较少	少
				61	miR-937	较少	少

根据 5.2 和 5.3 的微小核糖核酸表达谱的特点，可指导婴儿食品的科学分段，制成不同配方的乳品，用于不同阶段的婴幼儿食品。1. 在乳品中添加在人初乳中含量高的表 5 所述的 microRNA，可用于 0-1 个月前的婴儿食品中。2. 在乳品中添加在人成乳中含量高的表 6 所述的 microRNA，用于 1-24 个月的婴幼儿食品。

5.4 牛乳中特有的微小核糖核酸表达谱

miR-148、miR-138、miR-146-5p、miR-523-5p、miR-523-3p、miR-885-3p、miR-935、miR-1308、miR-1306 在牛乳中存在，在人乳中不存在。但是这些微小核糖核酸中，大部分 microRNA 在癌症患者体内表达上调，对癌症起到负调控的作用，

因此，敲除这些微小核糖核酸能抑制癌基因的发展。在乳品中去除这些微小核糖核酸，制成不会对基因产生影响的特种乳品，或用做癌症患者的新型营养品等。

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

权 利 要 求

1. 一种人工的乳制品，其特征在于，所述的乳制品中含有外源添加的一种或多种源自人奶的 microRNA，所述人奶包括人初乳或人成乳。

5 2. 如权利要求 1 所述的人工的乳制品，其特征在于，所述的 microRNA 选自下组：

(a) 表 A 中所列出的人初乳特有的 microRNA；

表 A

编号	miR 种类	编号	miR 种类	编号	miR 种类	编号	miR 种类
1	miR-148a*	25	miR-130a	49	miR-185*	73	miR-424
2	miR-19a	26	miR-132*	50	miR-195*	74	miR-450a
3	miR-19b	27	miR-1537	51	miR-199b-5p	75	miR-450b-5p
4	miR-21*	28	miR-16-2*	52	miR-2115	76	miR-502-3p
5	miR-27b	29	miR-17*	53	miR-2115*	77	miR-505
6	miR-30e	30	miR-181d	54	miR-2355-3p	78	miR-548c-5p
7	miR-99a	31	miR-197	55	miR-2355-5p	79	miR-548d-5p
8	miR-140-3p	32	miR-26b*	56	miR-27b*	80	miR-548o
9	miR-181a*	33	miR-27a*	57	miR-296-5p	81	miR-551a
10	miR-23a	34	miR-30d*	58	miR-29a*	82	miR-574-5p
11	miR-23b	35	miR-342-5p	59	miR-3158	83	miR-576-3p
12	miR-27a	36	miR-423-5p	60	miR-3182	84	miR-616*
13	miR-320a	37	miR-454*	61	miR-320b	85	miR-618
14	miR-34a	38	miR-501-3p	62	miR-320c	86	miR-625*
15	let-7a*	39	miR-548i	63	miR-320d	87	miR-627
16	let-7b*	40	miR-548k	64	miR-331-3p	88	miR-629*
17	let-7d*	41	miR-629	65	miR-338-3p	89	miR-720
18	let-7f-1*	42	miR-383	66	miR-34a*	90	miR-766
19	let-7f-2*	43	miR-10b	67	miR-34b*	91	miR-873
20	let-7g*	44	miR-1275	68	miR-34c-5p	92	miR-93*
21	miR-1246	45	miR-1299	69	miR-361-3p	93	miR-934
22	miR-126*	46	miR-136*	70	miR-3909	94	miR-944
23	miR-1260	47	miR-143*	71	miR-3913	95	miR-145*
24	miR-1260b	48	miR-147b	72	miR-410	96	miR-146a*

(b) 表 B 中所列出的人成乳特有的 microRNA；

表 B

编号	miR 种类	编号	miR 种类	编号	miR 种类	编号	miR 种类
1	let-7g	16	miR-153	31	miR-376a	46	miR-548v
2	miR-30b	17	miR-19b-1*	32	miR-411	47	miR-552
3	miR-200a*	18	miR-2110	33	miR-4297	48	miR-589*
4	miR-200c	19	miR-2116*	34	miR-488	49	miR-641
5	miR-18a	20	miR-2277-3p	35	miR-491-5p	50	miR-643
6	miR-196b	21	miR-3065-3p	36	miR-514	51	miR-95

10

7	miR-200b*	22	miR-3074	37	miR-516b	52	miR-3200-3p
8	miR-224	23	miR-3115	38	miR-517c	53	miR-339-5p
9	miR-511	24	miR-3174	39	miR-518e	54	miR-499-3p
10	miR-99a*	25	miR-3190	40	miR-519a*	55	miR-512-3p
11	miR-3656	26	miR-3200-5p	41	miR-519b-3p	56	miR-517a
12	miR-1228*	27	miR-326	42	miR-520a-5p	57	miR-517b
13	miR-1249	28	miR-3617	43	miR-520f	58	miR-519a
14	miR-1276	29	miR-3620	44	miR-522	59	miR-519c-3p
15	miR-1283	30	miR-3654	45	miR-524-3p	60	miR-671-3p
						61	miR-937

(c) 表 C 中所列出的人初乳和成乳共有的 microRNA; 和

表 C

编号	miR 种类	编号	miR 种类	编号	miR 种类	编号	miR 种类
1	let-7a*	87	miR-190	173	miR-3196	259	miR-500b
2	let-7b*	88	miR-190b	174	miR-32	260	miR-501-3p
3	let-7d*	89	miR-191	175	miR-32*	261	miR-501-5p
4	let-7e*	90	miR-192*	176	miR-3200-3p	262	miR-502-3p
5	let-7f-1*	91	miR-193a-3p	177	miR-320a	263	miR-502-5p
6	let-7f-2*	92	miR-193a-5p	178	miR-320b	264	miR-504
7	let-7g	93	miR-193b	179	miR-320c	265	miR-505
8	let-7g*	94	miR-194	180	miR-320d	266	miR-511
9	let-7i*	95	miR-195*	181	miR-324-3p	267	miR-512-3p
10	miR-100*	96	miR-196a	182	miR-324-5p	268	miR-515-5p
11	miR-101*	97	miR-196a*	183	miR-330-3p	269	miR-517a
12	miR-103-2*	98	miR-196b	184	miR-330-5p	270	miR-517b
13	miR-106a	99	miR-197	185	miR-331-3p	271	miR-519a
14	miR-106b	100	miR-199a-3p	186	miR-331-5p	272	miR-519c-3p
15	miR-106b*	101	miR-199b-3p	187	miR-335	273	miR-520a-3p
16	miR-10a	102	miR-199b-5p	188	miR-335*	274	miR-532-3p
17	miR-10a*	103	miR-19a	189	miR-338-3p	275	miR-532-5p
18	miR-10b	104	miR-19b	190	miR-339-3p	276	miR-542-3p
19	miR-1246	105	miR-200a	191	miR-339-5p	277	miR-548c-5p
20	miR-1251	106	miR-200a*	192	miR-33a	278	miR-548d-5p
21	miR-125a-3p	107	miR-200b	193	miR-33a*	279	miR-548e
22	miR-125a-5p	108	miR-200b*	194	miR-33b	280	miR-548h
23	miR-125b-1*	109	miR-200c	195	miR-33b*	281	miR-548i
24	miR-125b-2*	110	miR-200c*	196	miR-340*	282	miR-548j
25	miR-126*	111	miR-20a	197	miR-342-3p	283	miR-548k
26	miR-1260	112	miR-20a*	198	miR-342-5p	284	miR-548n
27	miR-1260b	113	miR-20b	199	miR-34a	285	miR-548o
28	miR-1262	114	miR-21*	200	miR-34a*	286	miR-548p
29	miR-1266	115	miR-2114	201	miR-34b*	287	miR-548y
30	miR-1271	116	miR-2114*	202	miR-34c-5p	288	miR-548z
31	miR-127-3p	117	miR-2115	203	miR-3605-5p	289	miR-550a*
32	miR-1274b	118	miR-2115*	204	miR-3613-5p	290	miR-551a

33	miR-1275	119	miR-2116	205	miR-361-3p	291	miR-574-3p
34	miR-1280	120	miR-215	206	miR-3614-5p	292	miR-574-5p
35	miR-1287	121	miR-219-1-3p	207	miR-3615	293	miR-576-3p
36	miR-1294	122	miR-219-5p	208	miR-361-5p	294	miR-576-5p
37	miR-1296	123	miR-22*	209	miR-362-3p	295	miR-577
38	miR-1299	124	miR-221*	210	miR-362-5p	296	miR-579
39	miR-1301	125	miR-223*	211	miR-363	297	miR-580
40	miR-1303	126	miR-224	212	miR-365*	298	miR-582-3p
41	miR-130a	127	miR-224*	213	miR-3656	299	miR-582-5p
42	miR-130b	128	miR-2277-5p	214	miR-3664	300	miR-589
43	miR-130b*	129	miR-2355-3p	215	miR-3677	301	miR-590-3p
44	miR-132	130	miR-2355-5p	216	miR-3688	302	miR-590-5p
45	miR-132*	131	miR-23a	217	miR-369-3p	303	miR-597
46	miR-135a	132	miR-23b	218	miR-374a	304	miR-598
47	miR-135b	133	miR-24-2*	219	miR-374a*	305	miR-616*
48	miR-136*	134	miR-26a	220	miR-374b	306	miR-618
49	miR-140-3p	135	miR-26a-1*	221	miR-374b*	307	miR-624*
50	miR-140-5p	136	miR-26b	222	miR-377	308	miR-625
51	miR-141*	137	miR-26b*	223	miR-378*	309	miR-625*
52	miR-143*	138	miR-27a	224	miR-381	310	miR-627
53	miR-144*	139	miR-27a*	225	miR-382	311	miR-628-3p
54	miR-145	140	miR-27b	226	miR-383	312	miR-628-5p
55	miR-1468	141	miR-27b*	227	miR-3909	313	miR-629
56	miR-146b-3p	142	miR-28-3p	228	miR-3912	314	miR-629*
57	miR-146b-5p	143	miR-28-5p	229	miR-3913	315	miR-642a
58	miR-147b	144	miR-296-5p	230	miR-3919	316	miR-651
59	miR-148a	145	miR-29a	231	miR-3920	317	miR-660
60	miR-148a*	146	miR-29a*	232	miR-3942	318	miR-671-3p
61	miR-148b	147	miR-29b	233	miR-409-3p	319	miR-671-5p
62	miR-148b*	148	miR-29b-2*	234	miR-410	320	miR-7
63	miR-151-3p	149	miR-29c	235	miR-421	321	miR-708*
64	miR-151-5p	150	miR-29c*	236	miR-422a	322	miR-7-1*
65	miR-1537	151	miR-301a	237	miR-423-3p	323	miR-720
66	miR-155*	152	miR-301b	238	miR-423-5p	324	miR-744
67	miR-15a	153	miR-30a	239	miR-424	325	miR-744*
68	miR-15a*	154	miR-30a*	240	miR-425*	326	miR-766
69	miR-15b	155	miR-30b	241	miR-4284	327	miR-769-3p
70	miR-15b*	156	miR-30b*	242	miR-4286	328	miR-769-5p
71	miR-16-1*	157	miR-30c	243	miR-4326	329	miR-873
72	miR-16-2*	158	miR-30c-1*	244	miR-449a	330	miR-885-5p
73	miR-17*	159	miR-30c-2*	245	miR-449b	331	miR-889
74	miR-181a*	160	miR-30d	246	miR-450a	332	miR-891a
75	miR-181a-2*	161	miR-30d*	247	miR-450b-5p	333	miR-9
76	miR-181c	162	miR-30e	248	miR-454	334	miR-92a-1*
77	miR-181c*	163	miR-30e*	249	miR-454*	335	miR-92b
78	miR-181d	164	miR-3116	250	miR-455-3p	336	miR-93*

79	miR-182*	165	miR-3127	251	miR-455-5p	337	miR-934
80	miR-183*	166	miR-3130-3p	252	miR-486-5p	338	miR-937
81	miR-185*	167	miR-3130-5p	253	miR-489	339	miR-941
82	miR-187	168	miR-3133	254	miR-493	340	miR-944
83	miR-188-3p	169	miR-3144-3p	255	miR-499-3p	341	miR-99a
84	miR-188-5p	170	miR-3158	256	miR-499-5p	342	miR-99a*
85	miR-18a	171	miR-3182	257	miR-500a	343	miR-99b
86	miR-18a*	172	miR-3194	258	miR-500a*	344	miR-99b*

(d) 表 D 中所列出的、牛奶中不存在但在人初乳或人成乳中存在的 microRNA。

表 D

编号	miR 种类	编号	miR 种类	编号	miR 种类	编号	miR 种类
1	let-7a*	61	miR-200c*	121	miR-3664	181	miR-589
2	let-7b*	62	miR-20a*	122	miR-3677	182	miR-590-3p
3	let-7d*	63	miR-20b	123	miR-3688	183	miR-590-5p
4	let-7e*	64	miR-21*	124	miR-374a*	184	miR-597
5	let-7f-1*	65	miR-2114	125	miR-374b*	185	miR-598
6	let-7f-2*	66	miR-2114*	126	miR-377	186	miR-616*
7	let-7g*	67	miR-2115	127	miR-378*	187	miR-618
8	let-7i*	68	miR-2115*	128	miR-3909	188	miR-624*
9	miR-100*	69	miR-2116	129	miR-3912	189	miR-625
10	miR-101*	70	miR-22*	130	miR-3913	190	miR-625*
11	miR-103-2*	71	miR-221*	131	miR-3919	191	miR-627
12	miR-106b*	72	miR-223*	132	miR-3920	192	miR-629
13	miR-10a*	73	miR-224*	133	miR-3942	193	miR-629*
14	miR-1251	74	miR-2277-5p	134	miR-409-3p	194	miR-642a
15	miR-125b-1*	75	miR-2355-3p	135	miR-410	195	miR-651
16	miR-125b-2*	76	miR-2355-5p	136	miR-422a	196	miR-708*
17	miR-126*	77	miR-24-2*	137	miR-425*	197	miR-7-1*
18	miR-1260b	78	miR-26a-1*	138	miR-4284	198	miR-744*
19	miR-1262	79	miR-26b*	139	miR-4286	199	miR-766
20	miR-1266	80	miR-27a*	140	miR-4326	200	miR-769-3p
21	miR-1271	81	miR-27b*	141	miR-449b	201	miR-769-5p
22	miR-1275	82	miR-28-3p	142	miR-454	202	miR-873
23	miR-1280	83	miR-296-5p	143	miR-454*	203	miR-889
24	miR-1287	84	miR-29a*	144	miR-489	204	miR-891a
25	miR-1294	85	miR-29b-2*	145	miR-493	205	miR-92a-1*
26	miR-1299	86	miR-29c*	146	miR-499-3p	206	miR-93*
27	miR-1301	87	miR-301b	147	miR-500a	207	miR-934
28	miR-1303	88	miR-30a*	148	miR-500a*	208	miR-937
29	miR-130b*	89	miR-30b*	149	miR-500b	209	miR-941
30	miR-132*	90	miR-30c-1*	150	miR-501-5p	210	miR-944
31	miR-135b	91	miR-30c-2*	151	miR-502-5p	211	miR-99a*
32	miR-136*	92	miR-30d*	152	miR-504	212	miR-99b*

33	miR-141*	93	miR-30e*	153	miR-511	213	miR-10b
34	miR-143*	94	miR-3116	154	miR-512-3p	214	miR-1260
35	miR-144*	95	miR-3127	155	miR-515-5p	215	miR-140-5p
36	miR-1468	96	miR-3130-3p	156	miR-517a	216	miR-147b
37	miR-146b-3p	97	miR-3130-5p	157	miR-517b	217	miR-181c
38	miR-148a*	98	miR-3133	158	miR-519a	218	miR-187
39	miR-148b*	99	miR-3144-3p	159	miR-519c-3p	219	miR-188-3p
40	miR-1537	100	miR-3158	160	miR-520a-3p	220	miR-188-5p
41	miR-155*	101	miR-3182	161	miR-548c-5p	221	miR-18a
42	miR-15a*	102	miR-3194	162	miR-548d-5p	222	miR-190
43	miR-15b*	103	miR-3196	163	miR-548e	223	miR-190b
44	miR-16-1*	104	miR-32	164	miR-548h	224	miR-19a
45	miR-16-2*	105	miR-32*	165	miR-548i	225	miR-219-1-3p
46	miR-17*	106	miR-3200-3p	166	miR-548j	226	miR-219-5p
47	miR-181a*	107	miR-335*	167	miR-548k	227	miR-301a
48	miR-181a-2*	108	miR-339-3p	168	miR-548n	228	miR-330-5p
49	miR-181c*	109	miR-33a*	169	miR-548o	229	miR-338-3p
50	miR-182*	110	miR-33b*	170	miR-548p	230	miR-34c-5p
51	miR-183*	111	miR-340*	171	miR-548y	231	miR-381
52	miR-185*	112	miR-342-5p	172	miR-548z	232	miR-383
53	miR-18a*	113	miR-34a*	173	miR-550a*	233	miR-424
54	miR-192*	114	miR-34b*	174	miR-551a	234	miR-449a
55	miR-193b	115	miR-3605-5p	175	miR-576-3p	235	miR-450a
56	miR-195*	116	miR-3613-5p	176	miR-576-5p	236	miR-455-5p
57	miR-196a*	117	miR-3614-5p	177	miR-577	237	miR-501-3p
58	miR-199b-5p	118	miR-3615	178	miR-579	238	miR-505
59	miR-200a*	119	miR-365*	179	miR-580	239	miR-542-3p
60	miR-200b*	120	miR-3656	180	miR-582-3p	240	miR-582-5p
						241	miR-9

3. 如权利要求 1 所述的人工的乳制品，其特征在于，所述的乳制品包括初乳制品、成乳制品。

4. 如权利要求 1 所述的人工的乳制品，其特征在于，所述的乳制品具有以下一个或多个特征：

5 (a1) 所述的外源添加的 microRNA 中有两种或多种来自表 A；

(a2) 所述的外源添加的 microRNA 的种类和含量与人初乳的 microRNA 表达谱相近或相同；

(b1) 所述的外源添加的 microRNA 中有两种或多种来自表 B；

10 (b2) 所述的外源添加的 microRNA 的种类和含量与人成乳的 microRNA 表达谱相近或相同；

(c1) 所述的外源添加的 microRNA 中有两种或多种来自表 C；

(d1) 所述的外源添加的 microRNA 中有两种或多种来自表 D。

5. 一种人工的食品补充剂，其特征在于，所述的食品补充剂含有食品学上可接受的载体以及一种或多种选自下组的、源自人奶的 microRNA：

- (a) 表 A 中所列出的人初乳特有的 microRNA；
- (b) 表 B 中所列出的人成乳特有的 microRNA；
- (c) 表 C 中所列出的人初乳和成乳共有的 microRNA； 和
- (d) 表 D 中所列出的、牛奶中不存在但在人初乳或人成乳中存在的 microRNA。

6. 如权利要求 5 所述的人工的食品补充剂，其特征在于，具有以下一个或多个特征：

(a1) 所述的外源添加的 microRNA 中有两种或多种来自表 A；

(a2) 所述的外源添加的 microRNA 的种类和含量与人初乳的 microRNA 表达谱相近或相同；

(b1) 所述的外源添加的 microRNA 中有两种或多种来自表 B；

(b2) 所述的外源添加的 microRNA 的种类和含量与人成乳的 microRNA 表达谱相近或相同；

(c1) 所述的外源添加的 microRNA 中有两种或多种来自表 C；

(d1) 所述的外源添加的 microRNA 中有两种或多种来自表 D。

7. 一种鉴别乳制品的方法，其特征在于，所述方法包括步骤：

(1) 提供一乳制品样品；

(2) 检测所述乳制品样品中 microRNA 的种类及其含量；

(3) 将步骤(2)测得的 microRNA 种类及其含量，与作为对照的初乳样品以及成乳样品中 microRNA 的表达谱进行比较；

其中，如果测得的 microRNA 的种类及其含量与初乳样品的 microRNA 表达谱相近或相同，则鉴定所述乳制品为初乳制品；如果测得的 microRNA 的种类及其含量与成乳样品的 microRNA 表达谱相近或相同，则鉴定所述乳制品为成乳制品。

8. 如权利要求 7 所述的方法，其特征在于，所述的乳制品包括牛奶或其衍生乳制品、羊奶或其衍生乳制品、人奶。

9. 一种制造乳制品的方法，其特征在于，包括步骤：

(1) 提供一乳制品原料；

(2) 检测所述乳制品原料中 microRNA 的种类及其含量，得到第一 microRNA 表达谱；

(3) 将步骤(2)测得的 microRNA 种类及其含量，与作为对照的初乳样品或成乳样品中 microRNA 表达谱进行比较；

(4) 基于比较结果，向所述乳制品原料中添加一种或多种 microRNA 和/或从所述

乳制品原料中去除一种或多种 microRNA，从而制得乳制品，其中所述乳制品 microRNA 表达谱与作为对照的初乳样品或成乳样品中 microRNA 的表达谱更接近或一致。

10. 一种制造乳制品的方法，其特征在于，包括步骤：

5 (1) 提供一乳制品原料；

(2) 向所述乳制品原料中添加一种或多种 microRNA 和/或从所述乳制品原料中去除一种或多种 microRNA，从而制得乳制品，其中所述乳制品中 microRNA 表达谱与初乳或成乳中 microRNA 的表达谱更接近或一致。

11. 一种制造食品补充剂的方法，其特征在于，包括步骤：

10 (1) 检测某一对象的母乳中 microRNA 的种类及其含量，从而获得该对象的第一 microRNA 表达谱；

(2) 将测得的第一表达谱的 microRNA 种类及其含量，与作为对照的正常初乳样品或正常成乳样品中 microRNA 表达谱进行比较，从而确定第一表达谱中所缺乏的 microRNA 或含量不足因而需要部分补充的 microRNA；

15 (3) 配制食品补充剂，其中所述的食品补充剂含有上一步骤中所确定的第一表达谱中所缺乏的 microRNA 或含量不足因而需要部分补充的 microRNA。

12. 一种分离的 microRNA 集合(set)，其特征在于，所述的 microRNA 集合由二种或多种选自下组的、源自人奶的 microRNA 所构成：

(a) 表 A 中所列出的人初乳特有的 microRNA；

20 (b) 表 B 中所列出的人成乳特有的 microRNA；

(c) 表 C 中所列出的人初乳和成乳共有的 microRNA；和

(d) 表 D 中所列出的、牛奶中不存在但在人初乳或人成乳中存在的 microRNA。

13. 一种人工的乳制品、食品或食品补充剂，其特征在于，含有权利要求 12 所述的分离的 microRNA 集合作为有效成分。

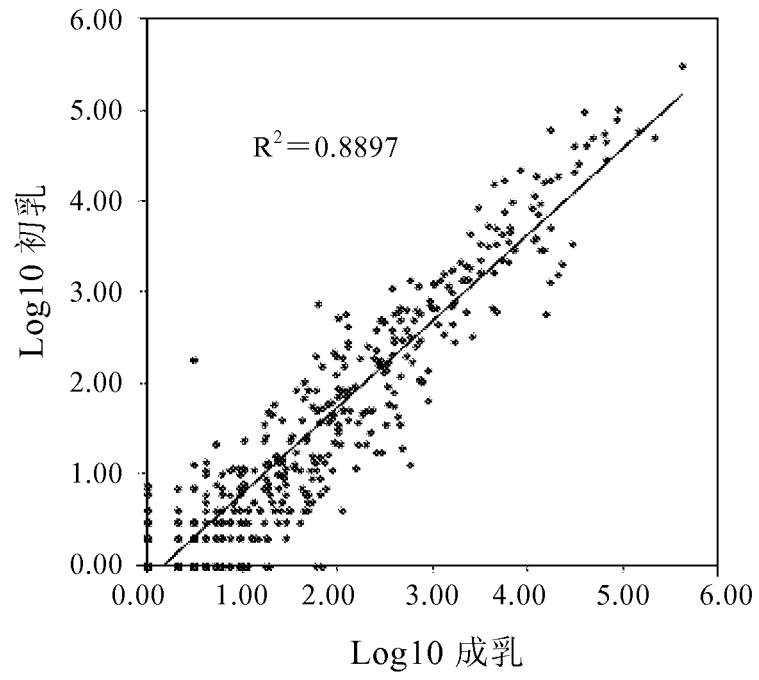


图 1

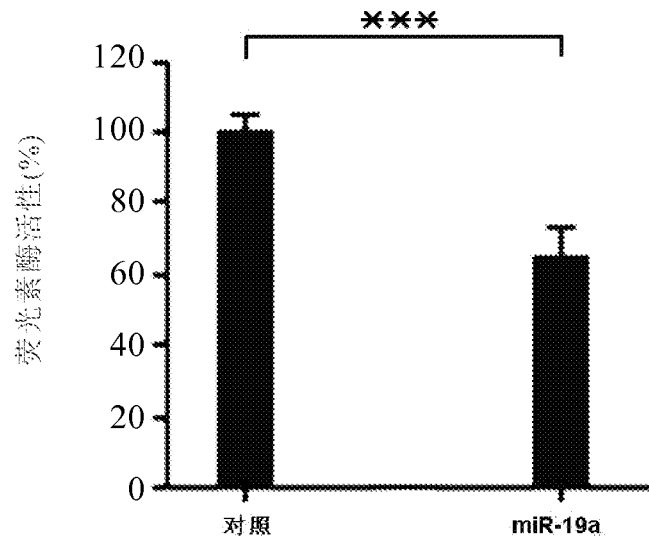


图 2

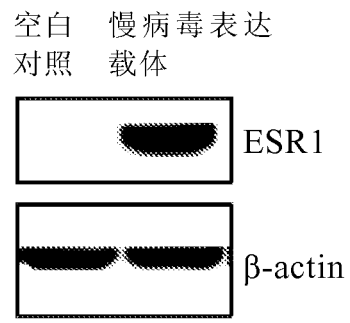


图 3

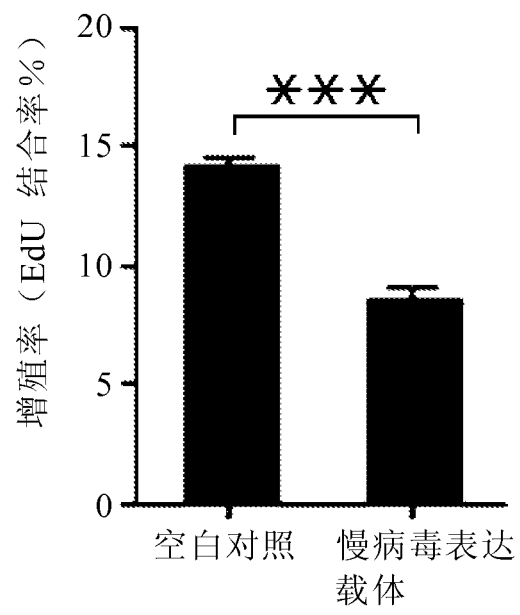


图 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2012/081146

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See the extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: C12N, A23C

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Data bases: CNABS, CPRSABS, CNTXT, DWPI, SIPOABS, ISI WEB OF KNOWLEDGE (Biosis, medline, Embase), CNKI, Genbank;

Search terms: human, milk, microrna, miR-148a*

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 102471803 A (MORINAGA MILK INDUSTRY CO., LTD.), 23 May 2012 (23.05.2012), see claims 1-20, description, pages 22-23, embodiment 1, and table 4	1, 3 (partial of each claim)
Y	See claims 1-20, description, pages 22-23, embodiment 1, and table 4	2, 4-6, 12-13 (partial of each claim)
A	WO 2010054386 A2 (BATTELLE MEMORIAL INSTITUTE et al.), 14 May 2010 (14.05.2010), see the whole document	1-6, 12-13 (partial of each claim)
Y	Genbank accession number: NR_029597, 29 October 2009 (29.10.2009), see the whole document	2, 4-6, 12-13 (partial of each claim)

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Date of the actual completion of the international search
21 December 2012 (21.12.2012)

Date of mailing of the international search report
28 March 2013 (28.03.2013)

Name and mailing address of the ISA/CN:
State Intellectual Property Office of the P. R. China
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao
Haidian District, Beijing 100088, China
Facsimile No.: (86-10) 62019451

Authorized officer
PAN, Junyu
Telephone No.: (86-10) **62411086**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2012/081146

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See the extra sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
technical solutions of claims 1-6 and 12-13 (partial of each claim) relating to miR-148a*.

Remark on protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2012/081146

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/117 (2010.01) i

A23C 9/152 (2006.01) i

Box No. III Observations where unity of invention is lacking

This International Searching Authority found 386 groups of inventions in this international application, as follows:

invention 1: claims 1-6 and 12-13 (partial of each claim)

relating to the milk products and artificial food supplements containing miR-148a* in table A, the separated microRNA sets containing the microRNA, and artificial milk products, food or food supplements containing the microRNA sets;

inventions 2-386: claims 1-6 and 12-13 (partial of each claim)

relating respectively to the milk products and artificial food supplements containing one or more of the rest 385 microRNAs except miR-148a* in tables A-D, the separated microRNA sets containing the microRNA, and artificial milk products, food or food supplements containing the microRNA sets;

invention 387: claims 7-11

relating to a method for identifying or manufacturing milk products or food supplements by detecting the type and content of microRNA in the milk products or breast milk; and a method for manufacturing milk products by adding microRNA to raw materials of milk products;

the same technical feature involved in inventions 1-387 is microRNA; however, the technical feature has been disclosed by D1. D1 (D1: CN 102471803 A, 23 May 2012: see claims 1-20, description, pages 22-23, embodiment 1, and table 4) discloses a artificial milk product containing one or more exogenous added microRNAs derived from human milk, such as miR17 or miR155. That is to say, inventions 1-387 do not have a same or corresponding special technical feature, and cannot be linked to each other to form a single general inventive concept; therefore, they do not meet the requirements of unity as defined in PCT Rule 13.1.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2012/081146

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 102471803 A	23.05.2012	WO 2011007815 A1	20.01.2011
		JP 2011140513 A	21.07.2011
		JP 477412882 B2	14.09.2011
		AU 2010271781 A1	20.01.2011
		CA 2759493 A1	20.01.2011
		US 2012093874 A1	19.04.2012
		KR 20120032003 A	04.04.2012
		EP 2455486 A1	23.05.2012
		VN 29188 A	26.03.2012
		INCHENP 201201322 EE	26.10.2012
WO 2010054386 A2	14.05.2010	US 2010216139 A1	26.08.2010
		WO 2010054386 A3	26.08.2010
		WO 2010054386 A9	17.03.2011
		EP 2364367 A2	14.09.2011

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. 权利要求：
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：

2. 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，
具体地说：

3. 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

第III栏 缺乏发明单一性的意见(续第1页第3项)

参见附加页

1. 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。
2. 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何附加费。
3. 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求。
具体地说，是权利要求：
4. 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是：
权利要求1-6,12-13（都是部分）中涉及 miR-148a*的技术方案

关于异议的说明： 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。
 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。
 缴纳附加检索费时未提交异议书。

A. 主题的分类

C12N15/117 (2010.01) i

A23C 9/152 (2006.01) i

第III栏 缺乏发明单一性的意见

本国际检索单位在该国际申请中发现 386 组发明，即：

发明 1：权利要求 1-6, 12-13（都是部分）

涉及含有表 A 中 miR-148a* 的乳制品、人工的食品补充剂、含有该 microRNA 的分离的 microRNA 集合、含有该 microRNA 集合的人工的乳制品、食品或食品补充剂；

发明 2-386：权利要求 1-6, 12-13（都是部分）

涉及分别含有表 A-表 D 中除 miR-148a* 之外的其余 385 种 microRNA 中的一种或多种的乳制品、人工的食品补充剂、含有该 microRNA 分离的 microRNA 集合、含有该 microRNA 集合的人工的乳制品、食品或食品补充剂；

发明 387：权利要求 7-11

涉及通过检测乳制品或母乳中 microRNA 的种类及其含量，鉴别或制造乳制品或食品补充剂的方法；通过想乳制品原料中添加 microRNA 制造乳制品的方法；

发明 1—387 之间相同的技术特征是 microRNA，然而该技术特征被 D1 公开了。D1（D1：CN102471803A，23.5 月 2012，参见权利要求 1—20，说明书 22-23 页，实施例 1，表 4）公开了一种人工的乳制品，其含有外源添加的一种或多种源自人成乳的 microRNA，例如 miR17 或 miR155。也就是说，发明 1—387 之间没有相同或相应的特定技术特征，这些发明不能相互关联，从而不能形成一个总的发明构思。因此，不符合 PCT 实施细则 13.1 的规定。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2012/081146

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN102471803A	23.05.2012	WO2011007815A1	20.01.2011
		JP2011140513A	21.07.2011
		JP4774128B2B2	14.09.2011
		AU2010271781A1	20.01.2011
		CA2759493A1	20.01.2011
		US2012093874A1	19.04.2012
		KR20120032003A	04.04.2012
		EP2455486A1	23.05.2012
		VN29188A	26.03.2012
		INCHENP201201322EE	26.10.2012
WO2010054386A2	14.05.2010	US2010216139A1	26.08.2010
		WO2010054386A3	26.08.2010
		WO2010054386A9	17.03.2011
		EP2364367A2	14.09.2011