

王欣,陈晨,范洋洋,等. 对丝腺细胞因子SGF-1具有调控作用的家蚕miRNAs功能研究[J]. 江苏农业科学,2016,44(3):53-58.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.03.013

对丝腺细胞因子SGF-1具有调控作用的家蚕miRNAs功能研究

王欣¹,陈晨¹,范洋洋¹,谢雨辰¹,钱平^{1,2},唐顺明^{1,2},沈兴家^{1,2}

(1. 江苏科技大学生物技术学院/江苏省蚕桑生物学与生物技术重点实验室,江苏镇江212003;

2. 中国农业科学院蚕业研究所,江苏镇江212018)

摘要:为了研究家蚕miRNAs对丝腺细胞因子SGF-1表达的调控作用,以SGF-1为靶基因,利用生物信息学软件RNAhybrid和RNA22预测对SGF-1具有潜在调控作用的候选家蚕miRNAs,经茎环PCR鉴定后分别构建重组表达载体,在细胞水平研究家蚕miRNAs的功能。结果表明,转染了bmo-miR-305*重组质粒组的luc荧光素酶活性比未转染时极显著下调($P < 0.01$);转染了bmo-miR-3327*重组质粒组的luc荧光素酶活性比未转染时极显著下调($P < 0.01$);再各自转染了inhibitors后荧光蛋白表达量均上调($P < 0.05$)。说明SGF-1 3'UTR上存在bmo-miR-305*和bmo-miR-3327*的结合位点,且bmo-miR-305*和bmo-miR-3327*对SGF-1的转录后表达具有一定抑制作用。

关键词:家蚕;miRNAs;丝腺转录因子;SGF-1;功能鉴定

中图分类号:S881.2;Q78 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)03-0053-06

microRNAs(miRNAs)作为重要的基因转录后表达调控因子,参与包括发育、代谢、疾病发生等各种重要的生理过程。目前国内外在家蚕miRNAs上开展了相关研究,进行了家蚕miRNAs的鉴定、表达谱分析以及功能预测。至2014年6月,miRBase数据库(<http://www.mirbase.org/>)21版本中已记录223个物种的35828条成熟体miRNAs,并且其数量还在不断增长,其中,在家蚕中共发现487个miRNAs前体和563个成熟体miRNAs。

大多数miRNAs主要通过与其靶基因mRNA 3'端非翻译区(3'UTR)的互补配对,在mRNA或翻译水平负调控靶基因表达^[1,2]。目前研究表明,miRNA的负调控作用不仅存在于靶mRNA的3'UTR区,也可发生在5'UTR区^[3]。前人研究认为,所有的miRNAs调控作用都是负调控,但Vasudevan等研究发现miRNA具有激活基因表达的作用^[4]。Hussain等也通过试验证明除了常见的下调靶基因转录水平,miRNAs能够上调靶基因的转录水平^[5]。Miyoshi等还证实了miRNAs除了能够作用于3'UTR外,还能够结合在靶基因的其他位置^[6-7]。

miRNA和转录因子(transcription factors,TFs)一样,能够在转录水平独立调控靶基因的表达水平,而越来越多的研究证明这两者之间能够通过相互作用更精准地对靶基因进行

表达调控。通过计算机分析预测,Enright等指出在众多miRNAs的潜在靶基因中,TFs作为靶基因的可能性比一般基因大约高出2倍^[8]。Cui等在研究基因调控中miRNAs与TFs的相互关系方面也作出了贡献,认为miRNAs更可能靶向含有大量TFs结合位点的基因,而这些基因通常也具有相对更多的miRNAs结合位点^[9]。

SGF-1是丝腺特异性细胞因子^[10],存在于中、后部丝腺。SGF-1除了在丝素重链基因(Fib-H)、丝素轻链(Fib-L)和p25基因的上游有其结合位点外,还能与丝胶Ser1基因上游的SA区域结合^[11],说明SGF-1对家蚕丝蛋白基因的表达调控具有重要的作用,特别是在细胞特异性表达方面。而SGF-1自身的表达也要受到调控,为了验证家蚕miRNAs是否对SGF-1的表达具有调控作用,本研究以SGF-1 3'UTR为序列,利用生物信息学软件预测并获得候选miRNAs,通过体外细胞转染试验进行验证,初步筛选可能调控SGF-1的候选miRNAs,为进一步研究miRNAs的功能提供依据,也为阐明蚕丝蛋白合成及调控机制积累试验数据。

1 材料与方法

1.1 材料及主要试剂

家蚕品种p50,由中国农业科学院蚕业研究所提供;E.coli DH10B菌株、昆虫BmN细胞系、重组表达载体质粒pcDNA3 [ie1-egfp-SV40]和重组表达载体质粒PGL3 [A3-luc-SV40]均由中国农业科学院蚕业研究所农业部蚕桑遗传与改良重点开放实验室保存。

pMD[®] 18-T、限制性内切酶、T₄ DNA Ligase、Ex Taq[®]酶、PrimeScript[®] RT-PCR Kit、RNAiso Plus和DNA maker均购自宝生物工程(大连)有限公司;质粒提取试剂盒购自生工生物工程(上海)有限公司;TC-100购自Appllichem公司;

收稿日期:2015-02-28

基金项目:国家自然科学基金(编号:31172266,31402143);江苏省普通高校研究生科研创新计划(编号:CXZZ12_0726)。

作者简介:王欣(1984—),女,河北人,博士研究生,主要从事家蚕分子生物学研究。E-mail:wang7xin23@yeah.net。

通信作者:沈兴家,研究员,博士生导师。E-mail:shenxjsri@163.com。

Fetal Bovine Serum(Qualified, Australia Origin) 购自 Gibco 公司; UCallM PerFect™ 购自药科美公司; 双报告基因荧光素酶检测试剂盒购自 Promega 公司; miRNA inhibitors 由百奥迈科生物技术有限公司合成; 其他化学试剂均为分析纯, 购自国药集团或生工生物工程(上海)有限公司; 所有 PCR 引物合成与 DNA 测序由生工生物工程(上海)有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 与 SGF-1 3'UTR 作用的候选家蚕 miRNAs 的获得 通过 NCBI 查找到家蚕 SGF-1 的 mRNA 序列, (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_001043864.1), 获得全长 3 078 bp 的核苷酸, 其中 cds 全长 1 049 bp, protein ID = “NP_001037329.1”, 除去 polyA signal, 获得 SGF-1 基因的 3'非编码区序列。通过 miRBase 数据库中获取家蚕已经登录的全部成熟 miRNA 序列。利用当前应用比较广泛的 2 个生物信息学预测软件 RNAhybrid^[12,13] (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/mahybrid/>) 和 RNA22^[14] ([http://cbsrv.watson.](http://cbsrv.watson.ibm.com/ma22.html)

<http://cbsrv.watson.ibm.com/ma22.html>) 进行靶位点的预测, 并将二者的预测结果结合起来, 根据 mfe 的高低以及在种子区 2~8 个碱基互补配对的情况, 筛选可能与家蚕 SGF-1 作用的 miRNAs。

1.2.2 候选家蚕 miRNAs 的克隆与鉴定 分别提取家蚕幼虫期 5 龄 3 d 的中后部丝腺总 RNA。以 miRNAs 反转录引物 (RT Primer) 进行反转录合成的 cDNA 为模板进行 PCR。RT Primer 的设计^[15]: 在通用的茎环结构序列后面加上 6 个 miRNA 的反向互补序列; PCR 引物的设计: 正向引物为 miRNA 序列的前 14 个碱基, 并在该序列前加上 4 个碱基使 T_m 值维持在 65 °C 左右, 反向引物为 miRNA 通用引物 (表 1)。反应条件: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 65 °C 25 s, 72 °C 30 s, 共 34 个循环; 72 °C 10 min。设 U6 为内参基因。PCR 产物经 4% 琼脂糖凝胶电泳检测。回收片段大小为 80 bp 左右的条带, 连接至 pMD18-T 载体, 16 °C 连接过夜后转化至 *E. coli* DH10B, 重组质粒酶切鉴定正确后进行测序。

表 1 部分 miRNA 引物

引物名称		引物序列(5'→3')
bmo-miR-1a	RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACCTCCAT
	Forward	<u>cgggcg</u> TGGAATGTAAGAA
bmo-miR-305*	RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACAAGUGU
	Forward	<u>cgget</u> GGCGCTGTTGGA
bmo-miR-2731-1 (bmo-miR-2731-2)	RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACTCCACA
	Forward	<u>gggggg</u> TGCGAGACCATG
bmo-miR-2775a	RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACAATGTC
	Forward	<u>cgget</u> CGCGGGAGAAAAGTA
bmo-miR-3327*	RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACAGGACA
	Forward	<u>cccccc</u> ATATGTAACGTTT
U6 内参	RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACACGATT
	Forward	CCTGCCCAAGGATGAC
公共引物	Reverse	GTGCAGGGTCCGAGGT

注: 未划线小写字母表示保护碱基的位置, 划线小写字母表示酶切位点。

1.2.3 重组表达质粒的构建 利用 Oligo 6.0 设计 pri-miR-305*、pri-miR-3327* 和 SGF-1 3'UTR 的引物。引物序列如表 2 所示, 下划线标记部分: caagctt、ggatcc、tctaga、ggccggcc 分别为 Hind III、BamH I、Xba I、Fse I 限制性酶切位点。重组载体 T-pri-miRNAs 和 pcDNA3 [ie1-egfp-SV40] 分别用 Hind III 和 BamH I 进行双酶切, 将目的片段回收后连接到线性化的 pcDNA3 [ie1-egfp-SV40] 上, 构建重组表达载体 pcDNA3 [ie1-egfp-miRNA-SV40]。重组载体 T-SGF-1-3'UTR 和 PGL3 [A3-luc-SV40] 分别用 Xba I 和 Fse I 进行双酶切, 将目的片段回收后连接到线性化的 PGL3 [A3-luc-SV40] 上, 构建重组表达载体 PGL3 [A3-luc-SGF-1 3'UTR-SV40]。

1.2.4 BmN 细胞的转染 将 pcDNA3 [ie1-egfp-SV40]、pGL3 [A3-luc-SGF-1-3'-UTR-SV40]、pcDNA3.0 [ie1-egfp-pri-miRNAs-SV40]、miRNA inhibitors 和内参质粒 pRL-CMV 分成 3 组分别进行体外转染试验。第 1 组包含 pGL3 [A3-luc-SGF-1-3'-UTR-SV40]、pcDNA3.0 [ie1-egfp-pri-miRNAs-SV40] 和 pRL-CMV3 种质粒; 第 2 组包含 pGL3 [A3-luc-SGF-1-3'-UTR-SV40]、pcDNA3.0 [ie1-

表 2 候选家蚕 miRNAs 前体和 SGF-1-3'UTR 的引物

引物名称	引物序列(5'→3')
pri-miR-1a-F	<u>ccaagctt</u> TACCAGTGCAGGGCGCTATCT
pri-miR-1a-R	<u>ccggatcc</u> CGAAGCAATGTAATATCACAC
pri-miR-305-3p-F	<u>ccaagctt</u> GCGGTGCTCCTCTCTAAAAC
pri-miR-305-3p-R	<u>ccggatcc</u> CGTGTCTTCAATACCAGGA
pri-miR-2731-1-F	<u>ccaagctt</u> AGGGCACACAATATGGATGGA
pri-miR-2731-1-R	<u>ccggatcc</u> CTGGTCTTTGCGGTCTACTC
pri-miR-2731-2-F	<u>ccaagctt</u> AGGGCACACAATATGGATGGA
pri-miR-2731-2-R	<u>ccggatcc</u> ACAGTCCGGCTTCGGTCTTTC
pri-miR-2775a-F	<u>ccaagctt</u> TTATTATGAGAAAGGGGGCT
pri-miR-2775a-R	<u>ccggatcc</u> CGCCACGCCAAAAAATAGTACA
pri-miR-3327-3p-F	<u>ccc aagctt</u> ATAGAAGAAGAAGAAAAAAGCGC
pri-miR-3327-3p-R	<u>ccggatcc</u> TAGCAGTTGAGGTAGTAGACT
SGF-1-3'UTR-F	<u>cctctaga</u> CACAACCCGACAATCTCATCA
SGF-1-3'UTR-R	<u>ggggccggcc</u> TGAAATGCACACAACGACCGGA

注: 未划线小写字母表示保护碱基的位置, 划线小写字母表示酶切位点。

egfp-pri-miRNAs-SV40 和 pRL-CMV3 种质粒; 第 3 组包含 pGL3 [A3-luc-SGF-1-3'-UTR-SV40]、pcDNA3.0

[ie1-egfp-pri-miRNAs-SV40]、miRNAs inhibitor 和 pRL-CMV4 种质粒。每组的质粒浓度稀释至 200 ng/ μ L 并按 1:1 的比例混合。

转染方法按照文献[16-17]描述的方法进行:将 2 μ L/3 μ L 的上述质粒混合物和 5 μ L 的 Cellfectin reagent 分别加入到 50 μ L unsupplemented(不含胎牛血清和抗生素)TC-100 培养基中;将二者轻轻混匀,室温下孵育 20 min;吸去 12 孔细胞培养板中带血清的完全培养基(细胞密度为每个 35 mm 的细胞培养盘中细胞数达 $1.0 \times 10^6 \sim 1.5 \times 10^6$ 个),并用 unsupplemented TC-100 培养基清洗细胞 2 次;将温育后的混合物加入到清洗后的 BmN 细胞中,于 27 $^{\circ}$ C 恒温箱中转染 5 h;除去转染液,加入完全培养基于 27 $^{\circ}$ C 恒温箱中继续培养,48 h 后进行荧光素酶活性检测。

1.2.5 荧光素酶活性检测 荧光素酶活性的检测按照 Promega 试剂盒双荧光素酶报告基因分析系统操作手册进行:转染 48 h 后,吸去细胞培养孔中的培养液;每孔中加入 250 μ L $1 \times$ Passive Lysis buffer($1 \times$ PLB),使细胞充分裂解;将细胞裂解液转到 1.5 mL 离心管中,12 000 r/min 离心 30 s,吸取上

清至新的 1.5 mL 离心管中;取 4 μ L 细胞裂解液加入含有 20 μ L Luciferase Assay Reagent II (LAR II) 的检测管中混匀,检测管放入 Promega 荧光素酶检测仪(20/20 n Luminometer, Turner BioSystems)中,开始检测萤火虫荧光;加入 20 μ L Stop&GloTM,检测海参荧光,记录数据进行统计分析。

2 结果与分析

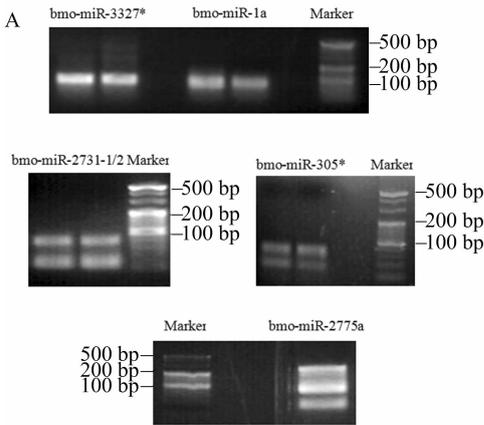
2.1 候选家蚕 miRNAs 的序列获得及特征分析

SGF-1 基因的 3'UTR 序列由 1 986 个碱基组成,为了筛选获得与其 3'UTR 序列匹配的 miRNAs,首先在 miRBase 数据库下载已收录的所有家蚕 miRNAs,然后利用靶基因在线预测软件 RNAhybrid 和 RNA22,与 *SGF-1* 基因的 3'UTR 序列进行比对分析,发现 20 个 miRNAs 与 *SGF-1* 基因 3'UTR 序列匹配度较高;种子序列区的匹配碱基个数为 5、6、7 nt 的 miRNAs 个数分别为 3、6、11 个(表 3)。利用比较基因组学的方法,在 miRNAs 二级结构的基础上对这 20 个候选 miRNAs 进行一系列的特征分析。特殊位置核苷酸偏好程度上可以看出 11 个 55% miRNAs 成熟体的 5' 端首位为尿嘧啶核苷酸

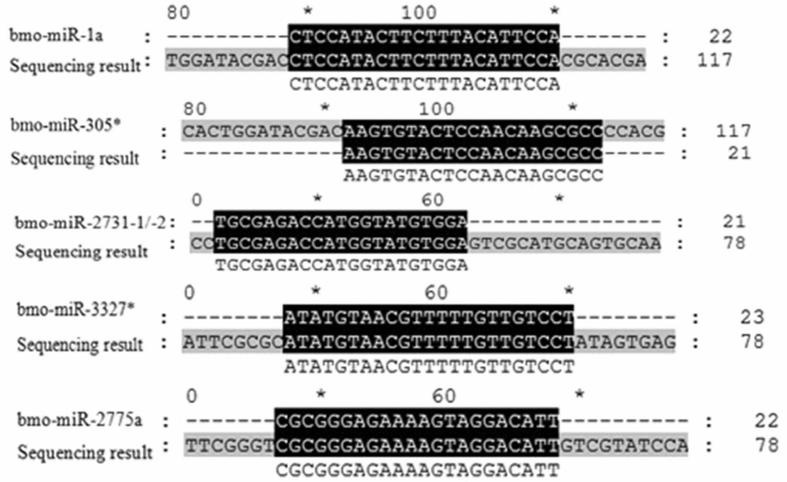
表 3 与 *SGF-1* 3'UTR 序列相匹配的家蚕 miRNAs 的特征分析

miRNAs	pre-miRNA context	LM (nt)	LP (nt)	Fold-Back (5'/3')	G+C (%)	MFEs (kJ/mol)	MFEIs
bmo-miR-1a	nscaf2589;5616175-5616259 [-]	22	85	3'	36.36	177.65	1.375
bmo-miR-305*	nscaf2993;1921782-1921872 [+]	21	91	3'	52.38	207.33	1.041
bmo-miR-2731-1	nscaf2952;70974-71064 [-]	21	91	5'	52.38	118.29	0.594
bmo-miR-2731-2	nscaf2952;72108-72198 [-]	21	91	5'	52.38	107.43	0.539
bmo-miR-2744	scaffold27571;33-141 [+]	18	109	3'	44.44	147.97	0.731
bmo-miR-2748	nscaf2855;5705147-5705240 [-]	22	94	5'	59.09	119.13	0.513
bmo-miR-2762	nscaf2734;993104-993186 [-]	22	83	3'	50.00	151.32	0.872
bmo-miR-2775a	nscaf2876;700920-701000 [-]	22	81	5'	50.00	256.23	1.514
bmo-miR-2784	nscaf1898;10994746-10994818 [+]	22	73	5'	63.64	148.39	0.764
bmo-miR-3001	nscaf2795;3132203-3132321 [-]						
	nscaf2883;290245-290363 [+]						
	nscaf2993;3137472-3137590 [+]	26	119	5'	23.08	84.02	0.732
	scaffold11815;197-315 [+]						
	scaffold6890;650-768 [-]						
bmo-miR-3276	nscaf3048;149823-149952 [+]	23	130	5'	30.43	94.47	0.571
bmo-miR-3299	nscaf1071;357877-357987 [-]	23	111	3'	30.43	132.09	0.935
bmo-miR-3310	scaffold1977;1355-1502 [-]	23	148	5'	60.87	285.49	0.758
bmo-miR-3318	nscaf2889;337242-337375 [+]						
	nscaf2889;338803-338936 [+]						
	scaffold19353;167-300 [-]	24	134	5'	33.33	91.12	0.488
	scaffold20067;335-468 [+]						
	scaffold31102;174-307 [+]						
bmo-miR-3321	scaffold33752;450-541 [+]						
	scaffold34977;296-387 [+]	23	92	3'	52.17	269.61	1.344
bmo-miR-3327*	nscaf2993;6549752-6549856 [-]	23	105	3'	30.43	104.50	0.782
bmo-miR-3362	nscaf2273;8945-9055 [+]	25	111	5'	24.00	116.20	1.044
bmo-miR-3383*	scaffold7049;599-676 [+]	24	78	5'	58.33	116.20	0.611
bmo-miR-3384*	nscaf1690;1480844-1480974 [-]						
	nscaf3058;8170706-8170836 [-]						
	scaffold23707;356-486 [-]	24	131	5'	50.00	183.50	0.670
	scaffold24862;28-158 [+]						
	scaffold7057;392-522 [+]						
bmo-miR-3414*	nscaf2827;1072753-1072852 [-]	25	100	3'	32.00	81.93	0.613

(U),表明该核苷酸在成熟体 miRNAs 的产生和调控过程中具有重要的意义。这 20 个候选 miRNAs 前体的长度变化范围为 73 ~ 148 nt,平均(102.9 ± 21.0) nt。统计数据还可看出 12 个 miRNAs 位于前体 miRNAs 的 5'端,其余 8 个位于 3'端(表 3)。利用 Altuvia 等的方法^[18]对 20 个候选 miRNAs 的位置进行分析,并在家蚕基因组数据库中找到 4 个 miRNA 簇,分别是:bmo - mir - 1a/bmo - mir - 1b;bmo - mir - 305/bmo - mir - 305* /bmo - mir - 275;bmo - mir - 2731 - 1/bmo - mir - 2731 - 2;bmo - mir - 3362/bmo - mir - 3363。



B



A. 候选 miRNAs 的 RT-PCR 鉴定; B. 经 Clustal X 1.83 和 Genedoc 的比对后的 miRNAs 测序结果

图1 候选家蚕 miRNAs 的克隆鉴定

2.3 候选 miRNAs 重组表达质粒的构建

分别构建包含候选 miRNAs 前体序列 bmo - pri - miR - 1a、bmo - pri - miR - 305*、bmo - pri - miR - 2731 - 1、bmo - pri - miR - 2731 - 2、bmo - pri - miR - 2775a 和 bmo - pri - miR - 3327* 的重组表达质粒,转染 BmN 细胞并检测绿色荧光。将重组质粒 pGL3 [A3 - luc - SGF - 1 - 3' - UTR - SV40]、重组质粒 pcDNA3.0 [ie1 - egfp - pri - miRNAs -

2.2 候选家蚕 miRNAs 的克隆与鉴定

提取家蚕幼虫期 5 龄 3 d 丝腺的总 RNA,分别以成熟体 miRNAs 的茎环引物进行反转录 PCR,目的条带在 60 ~ 80 bp,经凝胶电泳结果显示,共有 17 个成熟体 miRNAs 的条带大小符合。将目的片段回收后测序,比对结果显示仅有 bmo - miR - 1a、bmo - miR - 305*、bmo - miR - 2731 - 1/-2、bmo - miR - 2775a 和 bmo - miR - 3327* 的序列与数据库中提供的数据相符(图 1),表明这 6 个 miRNAs 在家蚕幼虫期 5 龄 3 d 表达。

SV40]、miRNA inhibitors 和内参质粒 pRL - CMV 分别共转染家蚕 BmN 细胞,每组进行 3 次重复。转染 48 h 后进行荧光检测,结果显示转染后的 BmNf 细胞均能检测到绿色荧光(图 2)。2.4 bmo - miR - 305* 和 bmo - miR - 3327* 对 SGF - 1 基因表达的调控作用

转染 48 h 后进行荧光素酶活性测定,利用萤火虫荧光强度值/海參荧光强度值(Luc/Rlu)对数据进行标准化校正。

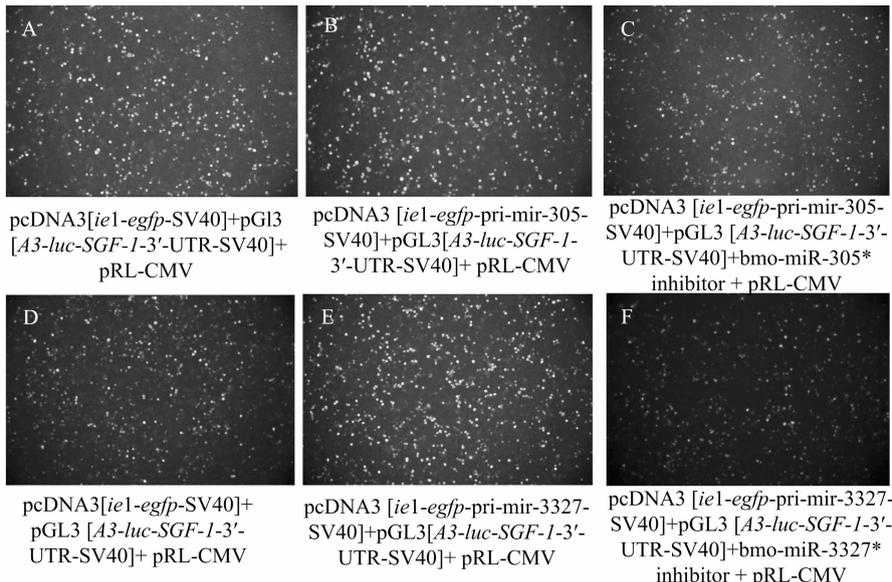


图2 转染不同重组质粒后的 BmN 细胞情况

结果显示,转染了 *bmo-miR-305** 重组质粒组的 luc 荧光素酶活性与未转染时比较出现了明显下调(图3-A),且2组之间差异极显著($P < 0.01$),即转染了 *bmo-miR-305** 表达载体的这组细胞中,靶基因重组质粒的 luc 荧光蛋白表达量降低了 76.04%。利用人工合成 *bmo-miR-305** inhibitor 进一步检验 miRNA 功能,发现 *SGF-1 3'-UTR* 重组质粒荧光蛋白表达量上调($P < 0.05$)。由此可见,*SGF-1 3'-UTR* 上存在 *bmo-miR-305** 的结合位点,且 *bmo-miR-305** 对

SGF-1 的转录后表达具有一定的抑制作用。

转染了 *bmo-miR-3327** 重组质粒组的 luc 荧光素酶活性与未转染时比较出现了明显下调(图3-B),且两组之间差异极显著($P < 0.01$),即转染了 *bmo-miR-3327** 表达载体的这组细胞中,靶基因重组质粒的 luc 荧光蛋白表达量降低了 79.17%,并在转染 inhibitor 后升高($P < 0.05$)。可以推测,*bmo-miR-3327** 对 *SGF-1* 的转录后表达具有抑制功能。

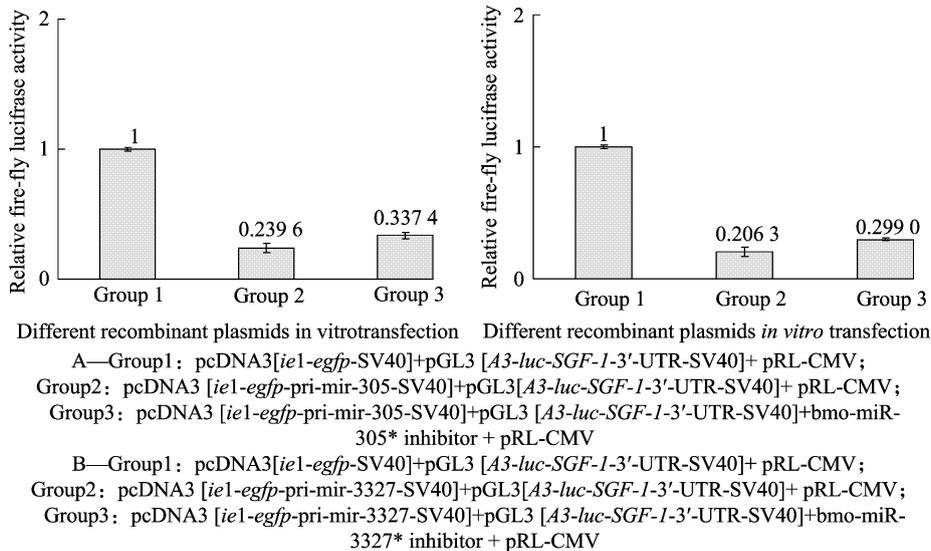


图3 luc荧光素酶的相对活性

3 讨论与结论

应用生物信息学预测软件来预测家蚕 miRNAs 是常用的候选 miRNAs 获得方法。RNAhybrid 是 Rehmsmeier 等和 Kruger 等基于 miRNA 和靶基因二聚体二级结构开发的 miRNA 靶基因预测软件^[12-13],属于第一代靶基因预测软件, RNAhybrid 无需考虑靶基因的物种保守性,预测出的 miRNAs 的数目不多,这是本研究选用该方法的原因之一。RNA22 是 Miranda 等开发的 miRNA 靶基因预测软件^[14],是第二代靶基因预测软件。结合上述 2 款预测软件对可能作用于靶基因 *SGF-1* 的 miRNAs 进行分析,共得到 20 个候选 miRNAs。

特殊位置核苷酸偏好程度上可以看出 20 个候选 miRNAs 成熟体中,一半以上数量的 miRNAs 5'端第 1 位为 U,这与 Cao 等对 miRNAs 特征分析的结果^[19]一致,在其试验中,成熟体 miRNAs 5'端第 1 位为 U 的概率为 70.73%。可能也说明了在成熟体 miRNAs 的产生和调控过程中尿嘧啶核苷酸具有重要的意义。

Liu 等在 Solexa sequencing 测序后发现 *bmo-miR-275/bmo-miR-305/bmo-miR-305** 是成簇存在的,但不同组织中的表达不同^[20]。He 等检测已识别家蚕基因组中 miRNAs 的位置,同样发现了长度为 208 bp 的该 miRNAs 簇,且在果蝇 (*Drosophila melanogaster*)、拟暗果蝇 (*D. pseudoobscura*) 和冈比亚蚊 (*Anopheles gambiae*) 中也有发现^[21]。*bmo-miR-275* 和 *bmo-miR-305* 属于不同的 miRNAs 家族 (*mir-275* 家族和 *mir-305* 家族),而这 2 个 miRNAs 家族的功能未知。

近年来,越来越多的科研人员选择双报告基因检测系统

研究 miRNAs 的功能。黄勇利用该检测系统将 *Fib-L 3'UTR* 重组质粒和 miRNAs 表达质粒共转染 Sf 细胞系,发现 pA3-miRNA-965、pA3-miRNA-1926 能够下调靶基因 *Fib-L* 的表达^[22]。Chen 等利用 luc 表达系统验证了 *bmo-miR-1a-3p* 可能具有很强的抑制作用,且通过结合 3'UTR 下调 *Bm-VMP23*^[23]。宋菲等初步验证了 *bmo-miR-2739* 对 *Fib-H* 具有正调控作用^[24]。同样,尹纪云、孙锋、刘立会、Jiang 等也各自利用该检测系统体外验证了家蚕 miRNAs 的功能^[25-28]。在前人研究的基础之上,笔者构建了 pcDNA3 [*ie1-egfp-pri-mir-305-SV40*] 和 pcDNA3 [*ie1-egfp-pri-mir-3327-SV40*] 重组载体,并与 pGL3 [*A3-luc-SGF-1-3'-UTR-SV40*] 共转染 BmN 细胞系,验证了重组质粒的转染效率和 luc 荧光蛋白表达活性,并发现 miRNAs 重组质粒极显著地抑制了 luc 表达($P < 0.01$)。该方法简单易行,但也不能够完全模拟体内或细胞内环境下特异 miRNAs 与靶基因之间的相互作用,因此还需在个体水平进一步研究候选 miRNAs 对丝腺细胞因子基因 *SGF-1* 表达的调控作用。

本研究中,对靶基因 *SGF-1 3'UTR* 进行了生物信息学分析,因为动物中常见的 miRNAs 作用机制是与靶基因 mRNA 的 3'UTR 结合后抑制其翻译,但并不对其进行剪切或降解。随着 miRNAs 研究的丰富,研究人员不但发现了一些新型 miRNAs 的正调控作用和去抑制作用^[29-30],还发现有些 miRNAs 能结合靶基因 5'UTR,且能够促进靶基因的表达或翻译^[31],而这也为今后在更加广阔的领域中研究家蚕 miRNAs 功能打下基础。家蚕 miRNAs 功能研究中,靶基因 5'UTR 结合位点以及功能的研究尚未有报道,这对于丝腺细胞因子调

控机制的深入研究也有一定的启发。或许在不久的将来,我们还会发现更多关于 miRNAs 和丝腺细胞因子之间的网络调控机制,也为探讨家蚕 miRNAs、丝腺细胞因子和蚕丝蛋白基因间的调控机理提供新的试验数据。

参考文献:

- [1] Filipowicz W, Jaskiewicz L, Kolb F, et al. Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and microRNAs [J]. *Current Opinion in Structural Biology*, 2005, 15(3): 331-341.
- [2] Jackson R J, Standart N. How do microRNAs regulate gene expression? [J]. *Science's STKE*, 2007, 367.
- [3] Tan Y, Zhang B, Wu T, et al. Transcriptional inhibition of *Hoxd4* expression by miRNA-10a in human breast cancer cells [J]. *BMC Molecular Biology*, 2009, 10: 12.
- [4] Vasudevan S, Tong Y C, Steitz J A. Switching from repression to activation; microRNAs can up-regulate translation [J]. *Science*, 2007, 318(5858): 1931-1934.
- [5] Hussain M, Torres, Schnettler E, et al. West Nile virus encodes a microRNA-like small RNA in the 3'untranslated region which upregulates *GATA4* mRNA and facilitates virus replication in mosquito cells [J]. *Nucleic Acids Research*, 2012, 40: 2210-2223.
- [6] Miyoshi K, Miyoshi T, Siomi H. Many ways to generate microRNA-like small RNAs; non-canonical pathways for microRNA production [J]. *Molecular Genetics and Genomics*, 2010, 284(2): 95-103.
- [7] Rigoutsos I. New tricks for animal MicroRNAs: targeting of amino acid coding regions at conserved and nonconserved sites [J]. *Cancer Research*, 2009, 69(8): 3245-3248.
- [8] Enright A J, John B, Gaul U, et al. MicroRNA targets in *Drosophila* [J]. *Genome Biology*, 2003, 5(1): R1.
- [9] Cui Q H, Yu Z B, Pan Y L, et al. MicroRNAs preferentially target the genes with high transcriptional regulation complexity [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, 352(3): 733-738.
- [10] Hui C C, Suzuki Y. Enhancement of transcription from the *Ad2* major late promoter by upstream elements of the fibroin- and sericin-1-encoding genes in silk gland extracts [J]. *Gene*, 1989, 85(2): 403-411.
- [11] Matsuno K, Takiya S, Hui C C, et al. Transcriptional stimulation via SC site of *Bombyx* sericin-1 gene through an interaction with a DNA binding protein SGF-3 [J]. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18(7): 1853-1858.
- [12] Rehmsmeier M, Steffen P, Hochsmann M, et al. Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes [J]. *RNA*, 2004, 10(10): 1507-1517.
- [13] Krueger J, Rehmsmeier M. RNAhybrid; microRNA target prediction easy, fast and flexible [J]. *Nucleic Acids Research*, 2006, 34(SI): W451-W454.
- [14] Miranda K C, Huynh T, Tay Y, et al. A pattern-based method for the identification of microRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes [J]. *Cell*, 2006, 126(6): 1203-1217.
- [15] 陈蔚. 家蚕核型多角体病毒编码的 miRNA 及其功能初步研究 [D]. 镇江: 江苏科技大学, 2010.
- [16] Zhao Q L, Shen X J, Zhu L J, et al. Characterization of *Cb1* gene promoter from silkworm (*Bombyx mori*) [J]. *Verlag der Zeitschrift für Naturforschung*, 2007, 62: 875-880.
- [17] Huang Y, Zou Q, Tang S M, et al. Computational identification and characteristics of novel microRNAs from the silkworm (*Bombyx mori* L.) [J]. *Molecular Biology Reports*, 2010, 37(7): 3171-3176.
- [18] Altuvia Y, Landgraf P, Lithwick G, et al. Clustering and conservation patterns of human microRNAs [J]. *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(8): 2697-2706.
- [19] Cao Jun, Tong Chuan Zhou, Wu Xiao Jie, et al. Identification of conserved microRNAs in *Bombyx mori* (silkworm) and regulation of fibroin L chain production by microRNAs in heterologous system [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2008, 38(12): 1066-1071.
- [20] Liu S P, Li D, Li Q B, et al. MicroRNAs of *Bombyx mori* identified by solexa sequencing [J]. *BMC Genomics*, 2010, 11: 148.
- [21] He P A, Nie Z M, Chen J Q, et al. Identification and characteristics of microRNAs from *Bombyx mori* [J]. *BMC Genomics*, 2008, 28(9): 248.
- [22] 黄勇. 家蚕 miRNAs 的鉴定及其对丝素轻链和 *P25* 基因表达调控的研究 [D]. 镇江: 江苏科技大学, 2014.
- [23] Chen A L, Xia D G, Qiu Z Y, et al. Expression of a vitelline membrane protein, BmVMP23, is repressed by *bmo-miR-1a-3p* in silkworm, *Bombyx mori* [J]. *FEBS Letters*, 2013, 587: 970-975.
- [24] 宋菲, 王欣, 钱平, 等. 家蚕 *Bmo-miR-2739* 对丝素重链基因 *Fib-H* 表达的调控作用 [J]. *蚕业科学*, 2014, 40(3): 404-408.
- [25] 尹纪云. 家蚕 *bmo-miR-7* 靶基因 *yan* 的鉴定 [D]. 重庆: 西南大学, 2010.
- [26] 孙锋. MicroRNAs 对家蚕丝蛋白轻链的调控及家蚕 *14-3-3 ζ* 基因互斥外显子选择机制研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2011.
- [27] 刘立会. *Bmo-let-7* 在家蚕化蛹过程中的功能研究 [D]. 重庆: 西南大学, 2012.
- [28] Jiang J H, Ge X, Li Z Q, et al. MicroRNA-281 regulates the expression of ecdysone receptor (EcR) isoform B in the silkworm, *Bombyx mori* [J]. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 2013, 43(8): 692-700.
- [29] Vasudevan S, Tong Yingchun, Steitz J A. Switching from repression to activation; microRNAs can up-regulate translation [J]. *Science*, 2007, 318(5858): 1931-1934.
- [30] Zhao S, Liu M F. Mechanisms of microRNA-mediated gene regulation [J]. *Science in China Series C - life Sciences*, 2009, 52(12): 1111-1116.
- [31] Jangra R K, Yi M, Lemon S M. Regulation of hepatitis C virus translation and infectious virus production by the microRNA miR-122 [J]. *Journal of Virology*, 2010, 84(13): 6615-6625.