

2015, 41(5): 0847-0853

ISSN 0257-4799; CN 32-1115/S

DOI: 10.13441/j.cnki.cykx.2015.05.010

Bmo-miR-2755* 对丝素蛋白基因 *BmFib-L* 和 *BmP25* 表达的调控作用

范洋洋^{1,2} 陈晨^{1,2} 王欣^{1,2} 宋菲^{1,2} 唐顺明^{1,2} 易咏竹^{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 212018; ²中国农业科学院蚕业研究所,农业部蚕桑遗传改良重点实验室,江苏镇江 212018)

摘要 为了研究家蚕 miRNA 对丝素蛋白基因表达的调控作用,采用生物信息学方法筛选获得对家蚕丝素轻链基因(*BmFib-L*)和 P25 蛋白基因(*BmP25*)有潜在调控作用的 Bmo-miR-2755*。利用半定量 RT-PCR 技术分析 Bmo-miR-2755* 及其靶基因 *BmFib-L*、*BmP25* 在家蚕 4~5 龄期幼虫后部丝腺和 5 龄 3 d 幼虫不同组织器官中的表达水平,结果显示三者在后部丝腺组织中的表达水平都较高,呈现严格的时空特异性。以 pcDNA3 质粒为载体,构建 Bmo-miR-2755* 的重组表达载体 pcDNA3[*ie1-egfp-pri-miR-2755*-SV40*];以 pGL3.0-Basic 质粒为载体,分别构建 *BmFib-L* 3'UTR、*BmP25* 3'UTR 与荧光素酶报告基因 *luc* 融合的重组报告质粒 pGL3.0[*A3-luc-Fib-L-3'UTR-SV40*]和 pGL3.0[*A3-luc-P25-3'UTR-SV40*]。以海肾荧光素酶表达载体 pRL-CMV 为内参,分别将构建的 Bmo-miR-2755* 重组表达载体和 2 个重组报告质粒共转染 BmN 细胞,通过检测细胞中的荧光素酶活性,明确 Bmo-miR-2755* 可显著下调 *BmFib-L* 基因的表达,并能上调 *BmP25* 基因的表达,但上调作用未达显著水平。上述结果为研究家蚕 miRNA 的功能和阐明蚕丝蛋白基因表达调控分子机制提供了新的实验数据。

关键词 miRNA; 家蚕; Bmo-miR-2755*; 丝素轻链基因; P25 基因; 表达调控

中图分类号 Q786; S881.2 文献标识码 A 文章编号 0257-4799(2015)05-0847-07

Expressional Regulation of *Bombyx mori* Fibroin Genes *Fib-L* and *P25* by Bmo-miR-2755*

Fan Yangyang^{1,2} Chen Chen^{1,2} Wang Xin^{1,2} Song Fei^{1,2} Tang Shunming^{1,2} Yi Yongzhu^{1,2}
Shen Xingjia^{1,2*}

(¹College of Biotechnology, Jiangsu University of Science and Technology, The Key Laboratory of Silkworm and Mulberry Biology and Biotechnology, Zhenjiang Jiangsu 212018, China; ²The Sericultural Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, The Key Laboratory of Silkworm and Mulberry Genetic Improvement, Ministry of Agriculture, Zhenjiang Jiangsu 212018, China)

Abstract In order to study the regulation function of *Bombyx mori* miRNA on expression of silk fibroin genes, we identified a miRNA, named Bmo-miR-2755*, by bioinformatics, which is predicted to have potential regulatory function on the expression of silk fibroin light chain gene (*BmFib-L*) and *BmP25*, and we analyzed the expression level of Bmo-miR-2755* and its target genes *BmFib-L* and *BmP25* in posterior silk gland of the 4th–5th instar larvae and different

tissues of day 3 larvae of the 5th instar by semi-quantitative RT-PCR. The results showed that their expressions in posterior silk gland were at higher level, showing strict temporal and spatial specificity. The recombinant expression plasmid pcDNA3 [*ie1-egfp-pri-miR-2755*-SV40*] carrying Bmo-miR-2755* was constructed by using plasmid pcDNA3 as vector, and luciferase reporter gene *luc* was fused with 3'UTR of *BmFib-L* and

收稿日期:2015-03-19 接受日期:2015-05-16

资助项目:国家自然科学基金项目(No.31172266),江苏省研究生培养创新工程项目(No.CXZZ12-0726)。

第一作者信息:范洋洋(1989-),女,硕士研究生。

E-mail:1025926715@qq.com

通信作者信息:沈兴家,研究员,博士生导师。

E-mail:shenxjsri@163.com

* Corresponding author. E-mail:shenxjsri@163.com

BmP25 respectively to construct the recombinant reporter plasmids pGL3.0 [A3-*luc-Fib-L-3'UTR-SV40*] and pGL3.0 [A3-*luc-P25-3'UTR-SV40*] by using plasmid pGL3.0-Basic as vector. Then BmN cells were cotransfected with the recombinant expression vector of Bmo-miR-2755* and two fused recombinant reporter plasmids using *Renilla reniformis* luciferase expression vector pRL-CMV as internal reference. Luciferase activity determination indicated that Bmo-miR-2755* significantly down-regulated the expression of *BmFib-L* gene, and the expression of *BmP25* gene was up-regulated but had no significant difference. It provides new data for the study of miRNA function and regulation mechanism of silk fibroin genes.

Keywords miRNA; *Bombyx mori*; Bmo-miR-2755*; Silk fibroin light chain gene; P25 gene; Expression regulation

微小RNA(miRNA)是一类内源性的具有调控功能的非编码RNA,其长度为19~22个核苷酸。成熟的miRNA是由较长的初级转录物经过一系列核酸酶的剪切加工而成,随后组装进RNA诱导的沉默复合体,通过碱基互补配对的方式识别靶mRNA,并根据互补程度调控沉默复合体降解靶mRNA或阻遏其翻译^[1-4]。miRNA大多以基因簇的形式存在于基因组中^[5],而且绝大部分位于基因间隔区(IGR),说明它们的转录独立于其他基因,具有自身的转录调控机制。研究表明,动物与植物miRNA的作用位点在靶mRNA的3'UTR和5'UTR区^[6-8]。miRNA具有较高的时序性、组织特异性和保守性^[9];miRNA对30%以上的基因具有调控作用,其通过与转录本的相互作用,关闭或抑制基因的表达,参与多种生理和病理过程^[10-11]。家蚕(*Bombyx mori*)是研究动物发生、分化、生长发育及免疫调节、遗传和变异的重要模式生物之一^[12]。家蚕丝腺具有高效、特异地合成丝蛋白的能力,长期以来都是研究的重点和热点。家蚕丝腺包括前部丝腺、中部丝腺和后部丝腺3个部分,丝蛋白主要在后部丝腺合成^[13-14]。本实验室Huang等^[15-16]的研究证实Bmo-miR-2b能够抑制家蚕丝素蛋白基因(*BmP25*)的表达,Bmo-miR-965和Bmo-miR-1926能够抑制家蚕丝素轻链基因(*BmFib-L*)的表达;宋菲等^[17]的研究证实Bmo-miR-2739能上调家蚕丝素重链基因(*BmFib-H*)的表达。最近,我们利用Solexa测序技术对家蚕品种p50的4龄2d和5龄3d幼虫后部丝腺(PSG)sRNA进行测序,获得29个差异表达的已知miRNA,推测这些miRNA可能与丝蛋白合成相关^[18]。通过生物信息学方法预测筛选出在*BmFib-L*和*BmP25*基因上存在靶位点,并且在家蚕4龄和5龄幼虫丝腺中表达差异较大的一个miRNA(Bmo-miR-2755*)。为了验证Bmo-miR-2755*对*BmFib-L*和*BmP25*是否具有调控作用,我们在分析

三者在家蚕幼虫体内组织器官的表达水平的基础上,构建三者的表达载体,利用BmN细胞瞬时表达系统检测Bmo-miR-2755*对*BmFib-L*和*BmP25*基因转录表达的调控作用,为深入研究家蚕miRNA的功能和阐明蚕丝蛋白基因表达调控分子机制提供新的实验数据。

1 材料与方法

1.1 材料及主要试剂和仪器

家蚕品种p50由本实验室保存,孵化后的幼虫用新鲜桑叶室温常规饲养。

BmN细胞、大肠杆菌受体菌株Top10、pGL3.0 [A3-*luc-SV40*]质粒和pcDNA3 [ie1-*egfp-SV40*]质粒由本实验室保存。pMD18-T、限制性内切酶和其他PCR相关试剂购自TaKaRa公司,TC-100培养基、胎牛血清(FBS)和转染试剂购自UCallM公司,荧光素酶检测试剂盒购自Promega公司。其他常用生化试剂购自国药集团、上海生工生物工程技术有限公司等。

OLYMPUS IX51 荧光倒置显微镜(日本Olympus公司),WV-BP330/CH凝胶成像系统(江苏捷达科技发展有限公司),LuminoMeter 20/20 荧光光度计(美国Promega公司)。

1.2 家蚕幼虫组织器官的总RNA提取

按照RNAiso Plus试剂盒(TaKaRa公司)说明书中的方法,分别提取家蚕4龄2d、3d,5龄1d、2d、3d、4d、5d、6d和7d幼虫的后部丝腺的总RNA,以及5龄3d幼虫的表皮、气管、脂肪体、马氏管、中肠、前部丝腺、中部丝腺、后部丝腺和头部等9个组织器官的总RNA,并电泳检测其质量。

1.3 家蚕miRNA的预测

利用前期试验以家蚕品种p50的4龄、5龄幼虫后部丝腺Solexa高通量测序所得到的差异表达miRNA,从NCBI数据库下载*BmFib-L*、*BmP25*基因的3'UTR核

酸序列,应用靶基因在线预测软件 RNAhybrid (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid>) 预测获得 1 个在 *BmFib-L* 和 *BmP25* 基因 mRNA 3'UTR 都有靶位点的 miRNA——Bmo-miR-2755*。

1.4 Bmo-miR-2755* 的 PCR

根据文献 [19] 的方法设计 Bmo-miR-2755* 的特异性反转录引物,以家蚕 5 龄 3 d 幼虫后部丝腺总 RNA 为模板,按照反转录试剂盒 (TaKaRa 公司) 说明书的步骤进行反转录合成 cDNA,再以此 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为:94 °C 变性 5 min;94 °C 30 s,64 °C 30 s,72 °C 30 s,30 个循环;72 °C 10 min。PCR 产物用 4% 琼脂糖凝胶电泳检测,回收目的片段,连接 pMD18-T 载体,16 °C 连接过夜。将连接产物转化进 *E. coli* Top10 感受态细胞,抽提重组质粒 DNA,测序验证,测序结果通过 ClustalX1.83 软件进行比对。

1.5 Bmo-miR-2755* 及其预测靶基因在蚕体表达的半定量 RT-PCR 检测

1.5.1 引物设计与合成 采用 Oligo 6.0 软件设计 *BmFib-L* 和 *BmP25* 的上、下游引物, Bmo-miR-2755* 和内参照 *BmU6* 的半定量 RT-PCR 引物及上、下游引物。Bmo-miR-2755* 的半定量 RT-PCR 引物序列为 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAACACT-3', Forward 引物序列为 5'-CTCTCAAGGTGGCCTAGCA-3'; *BmU6* 的半定量 RT-PCR 引物序列为 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACACGATT-3', Forward 引物序列为 5'-CCTGCCAAGGATGAC-3', Reverse 引物序列为 5'-GTGCAGGTCCGAGGT-3'; *BmFib-L* 的 Forward 引物序列为 5'-CCGGAGGTGGAAGAATCTAT-3', Reverse 引物序列为 5'-GGTTATGTAGGCAGCGATGT-3'; *BmP25* 的 Forward 引物序列为 5'-CCCTGCTACTTGGACGATT-3', Reverse 引物序列为 5'-GATTATGGTTCGACGTAGGTG-3'。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.5.2 cDNA 合成和半定量 RT-PCR 检测 将方法“1.2”提取的家蚕幼虫不同发育时期组织器官的总 RNA 按照反转录试剂盒 (TaKaRa 公司) 说明书的步骤,利用半定量 RT-PCR 引物进行反转录合成用于 Bmo-miR-2755*、*BmFib-L*、*BmP25* 和 *BmU6* 扩增的 cDNA 模板。将各样品 cDNA 浓度稀释至 500

ng/ μ L 作为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为:94 °C 变性 5 min;94 °C 30 s,64 °C 30 s,72 °C 30 s,28 个循环;72 °C 10 min。

1.6 Bmo-miR-2755* 及其预测靶基因重组表达载体的构建

以 pGL3.0-Basic 质粒为载体,将 *BmFib-L* 3'UTR 289 bp 片段和 *BmP25* 3'UTR 491 bp 片段分别克隆到荧光素酶基因 *luc* 的下游,并用 A3 启动子驱动,构建 Bmo-miR-2755* 潜在靶基因 *BmFib-L* 3'UTR 和 *BmP25* 3'UTR 与 *luc* 融合的重组表达载体 pGL3.0[A3-*luc-Fib-L*-3'UTR-SV40] 和 pGL3.0[A3-*luc-P25*-3'UTR-SV40]。

在家蚕基因组数据库 (<http://www.silkdb.org/silkdb/>) 下载 pri-miR-2755* 及上、下游各 100 bp 的片段,以 pcDNA3 质粒为载体,将包含增强型绿色荧光蛋白基因 *egfp* 和 pri-miR-2755* 及上、下游各 100 bp 的片段克隆到载体中,用 BmNPV *ie1* 启动子驱动,构建 Bmo-miR-2755* 的重组表达载体 pcDNA3[*ie1-egfp-pri-miR-2755* -SV40*]。

1.7 Bmo-miR-2755* 对预测靶基因转录表达调控作用的细胞转染验证实验

转染前 1 d 将生长状况良好的 BmN 细胞接种于 12 孔细胞培养板中,按每孔 1 mL 加入从培养瓶中轻缓吹打下来的细胞悬浮液,静置培养使细胞贴壁。用于转染实验的细胞密度在 1×10^5 个/mL 左右,质粒质量浓度约 400 ng/ μ L。用上述 Bmo-miR-2755* 的重组表达载体分别与 *BmFib-L* 3'UTR 和 *BmP25* 3'UTR 的重组表达载体共转染 BmN 细胞,以海肾荧光素酶报告质粒 pRL-CMV 为内参,同时以单独转染靶基因 3'UTR 与 *luc* 融合的重组表达质粒 pGL3.0[A3-*luc-Fib-L*-3'UTR-SV40]、pGL3.0[A3-*luc-P25*-3'UTR-SV40] 的 BmN 细胞为阳性对照,单独转染 Bmo-miR-2755* 重组表达质粒 pcDNA3[*ie1-egfp-pri-miR-2755* -SV40*] 和 pcDNA3[*ie1-egfp-SV40*] 的 BmN 细胞为阴性对照,未转染的细胞为空白对照。在 1.5 mL 离心管中准备 2 种溶液。溶液 A:将 3 μ L 报告质粒 DNA 加入 50 μ L 无抗生素和胎牛血清的培养基。溶液 B:将 1 μ L 转染试剂 UCallM Perfect™ 溶于 50 μ L 无抗生素和胎牛血清的培养基。将 A、B 2 种溶液混匀后,室温孵育 30 min。吸去 12 孔板中培养细胞的原培养液,并用 1 mL 无血清和抗生素的培养基清洗细胞,移去清洗培养基;在 A、B

混合液加入 800 μL 无抗生素和胎牛血清的培养基,混匀后加入有细胞的细胞培养孔中,27 $^{\circ}\text{C}$ 细胞培养箱培养 5 h;吸净培养孔中的 A、B 混合液,加入 1 mL 含胎牛血清及抗生素的培养基,27 $^{\circ}\text{C}$ 培养 72 h,收集细胞检测荧光素酶的活性。每种处理重复 3 次。用 LuminoMeter 20/20 荧光光度计分别测定荧光素酶与海肾荧光素酶的活性^[17,19-21],测定数据经阴性对照和空白对照校正后,计算二者的比值,分析 Bmo-miR-2755* 对 *BmFib-L* 和 *BmP25* 表达的调控作用,并用 SPSS16.0 软件进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 家蚕幼虫组织器官总 RNA 的质量及 Bmo-miR-2755* 前体鉴定

Bmo-miR-2755* 的成熟体序列已由 Liu 等^[22] 通过测序鉴定得到。提取家蚕 4 龄、5 龄幼虫后部丝腺和 5 龄 3 d 各组织器官的总 RNA,用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测都有 3 条清晰条带(图略),说明提取的总 RNA 质量较好,可用于后续试验。

以家蚕 5 龄 3 d 幼虫后部丝腺的总 RNA 反转录合成用于扩增的 cDNA 模板,产物电泳检测显示有一条长度在 60~80 bp 之间,与 Bmo-miR-2755* 前体片段长度的理论值相符的条带(图 1)。回收目的片段,连接至 pMD18-T 载体,转化 *E. coli* Top10 感受态细胞,抽提重组质粒并测序,其结果与预期的片段序列吻合。

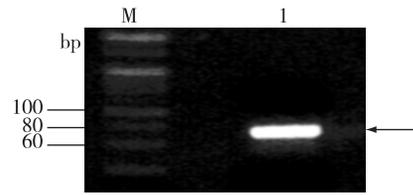


图 1 Bmo-miR-2755* 前体的 PCR 鉴定

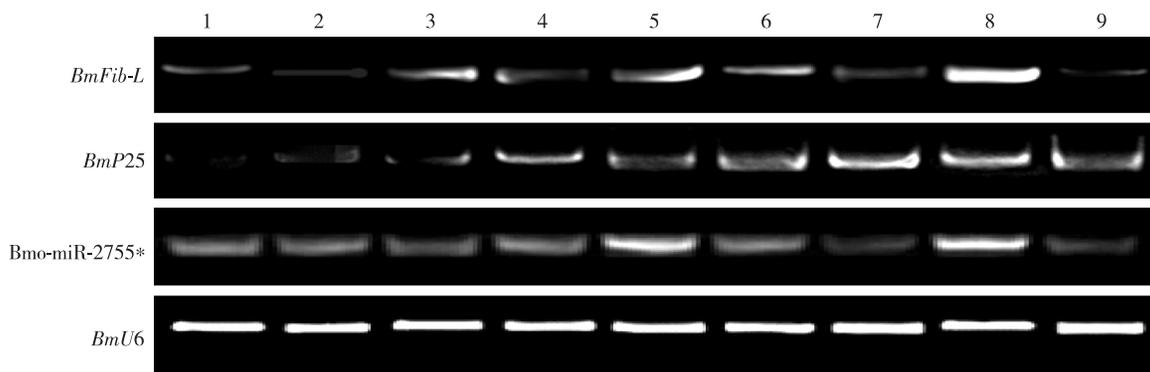
Fig. 1 Verification of Bmo-miR-2755* precursor by PCR

2.2 Bmo-miR-2755* 靶基因的生物信息学预测

从 NCBI 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/>)下载 *BmFib-L*、*BmP25* 的 3'UTR 核苷酸序列。然后利用 RNAhybrid 软件进行 Bmo-miR-2755* 与 *BmFib-L*、*BmP25* 的 3' UTR 序列比对。Bmo-miR-2755* 的种子序列(第 2~8 位碱基)与 *BmFib-L* 3' UTR 完全匹配,与 *BmP25* 3'UTR 有 6 个碱基匹配,说明 *BmFib-L* 和 *BmP25* 有可能都是 Bmo-miR-2755* 的潜在靶基因。

2.3 Bmo-miR-2755* 及其靶基因在家蚕体内的时空表达特征

采用半定量 RT-PCR 方法检测家蚕 5 龄 3 d 幼虫不同组织器官以及 4~5 龄不同时期后部丝腺中 Bmo-miR-2755* 及其靶基因 *BmFib-L* 和 *BmP25* 的表达水平。从图 2 可以看出,*BmFib-L* 在 5 龄 3 d 幼虫的表皮、气管、丝腺(前、中、后部分)、中肠、脂肪体、马氏管和头部中都有表达,而且在丝腺组织中的表达水平最高;*BmP25* 在表皮和头部中的表达水



1—头部,2—表皮,3—气管,4—脂肪体,5—中肠,6—前部丝腺,7—中部丝腺,8—后部丝腺,9—马氏管。
1—Head, 2—Cuticular, 3—Trachea, 4—Fat body, 5—Midgut, 6—Anterior silk gland, 7—Middle silk gland,
8—Posterior silk gland, 9—Malpighian tubule.

图 2 半定量 RT-PCR 检测 Bmo-miR-2755* 及其靶基因 *BmFib-L* 和 *BmP25* 在家蚕 5 龄 3 d 幼虫不同组织中的表达

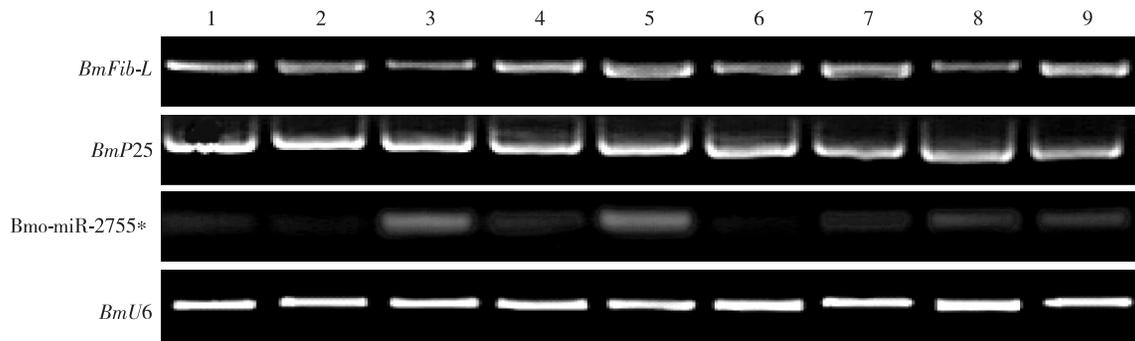
Fig. 2 Expression of Bmo-miR-2755* and its target genes *BmFib-L* and *BmP25* in different tissues of day 3 larvae of the 5th instar by semi-quantitative RT-PCR

平较低,在其他组织中都有较高水平的表达,在丝腺(前、中、后部分)中的表达水平均较高;Bmo-miR-2755* 在检测的 9 个组织器官中都有表达,在后部丝腺中的表达水平较高。

从图 3 可以看出, *BmFib-L* 在幼虫不同时期后部丝腺的表达水平均较高,并且在 5 龄 1~3 d 呈增加的趋势,3~5 d 达到最高水平,其后逐渐下降;

BmP25 在 4 龄期和 5 龄前期的表达水平较高,5 龄后期表达水平下降;Bmo-miR-2755* 在 4 龄后部丝腺中的表达水平较低,至 5 龄期持续表达,其中 5 龄 1~3 d 的表达水平较高。

上述结果表明在家蚕 5 龄幼虫期丝腺组织中 Bmo-miR-2755* 以及 *BmFib-L* 和 *BmP25* 的表达呈现严格的时空特异性。



1~2—分别为 4 龄 2 d、3 d,3~9—分别为 5 龄 1 d、2 d、3 d、4 d、5 d、6 d 和 7 d。

1-2—Day 2 and 3 of the 4th instar respectively, 3-9—Day 1, 2, 3, 4, 5, 6 and 7 of the 5th instar respectively.

图 3 半定量 RT-PCR 检测 Bmo-miR-2755* 及其靶基因 *BmFib-L* 和 *BmP25* 在家蚕 4~5 龄期幼虫后部丝腺的表达

Fig. 3 Expression of Bmo-miR-2755* and its target genes *BmFib-L* and *BmP25* in posterior silk gland of the 4th-5th instar larvae by semi-quantitative RT-PCR

2.4 Bmo-miR-2755* 对靶基因 *BmFib-L* 和 *BmP25* 转录表达的调控作用

2.4.1 重组表达载体的共转染效果 将 Bmo-miR-2755* 重组表达载体 pcDNA3 [*ie1-egfp-pri-miR-2755* -SV40*] 与含有靶基因 3'UTR 序列的重组表达载体 pGL3.0 [*A3-luc-Fib-L-3'UTR-SV40*] 共转染 BmN

细胞,并以 pcDNA3 [*ie1-egfp-SV40*] 和 pGL3.0 [*A3-luc-Fib-L-3'UTR-SV40*] 共转染 BmN 细胞为阳性对照,转染后 72 h 在荧光倒置显微镜下观察荧光可知,重组表达质粒成功转染进 BmN 细胞,且转染效果较好(图 4)。用 Bmo-miR-2755* 和 *BmP25* 3'UTR 的重组表达质粒共转染 BmN 细胞,获得类似结果(图略)。

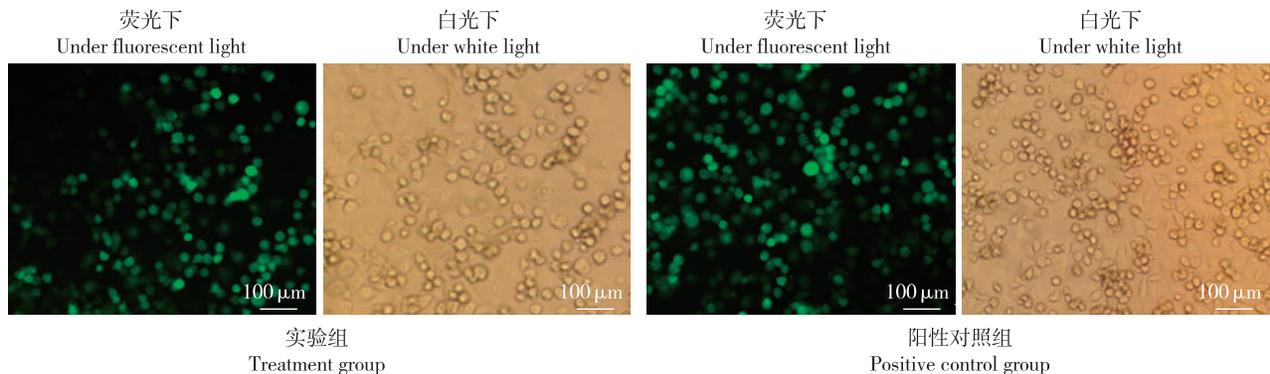


图 4 pcDNA3 [*ie1-egfp-pri-miR-2755* -SV40*] 与 pGL3.0 [*A3-luc-Fib-L-3'UTR-SV40*] 共转染 BmN 细胞后 72 h 的荧光检测

Fig. 4 Fluorescence detection of BmN cells at 72 h after cotransfected by pcDNA3 [*ie1-egfp-pri-miR-2755* -SV40*] and pGL3.0 [*A3-luc-Fib-L-3'UTR-SV40*]

2.4.2 基于荧光素酶活性检测的调控作用 将 Bmo-miR-2755* 重组表达载体和含有靶基因 3'UTR 序列的重组表达载体共转染 BmN 细胞,以 pRL-CMV 为内参质粒,转染后 72 h 检测细胞的荧光素酶活性。结果表明:共转染 Bmo-miR-2755* 重组表达载体和靶基因 *BmFib-L* 3'UTR 融合报告基因重组表达载体的细胞,荧光素酶活性受到抑制,较阳性对照组细胞的荧光素酶活性降低近 49%,差异达到显著水平(图 5-A);而共转染 Bmo-miR-2755* 重组表达载体和靶基因 *BmP25* 3'UTR 融合报告基因重组表达载体的细胞,其荧光素酶活性较对照组细胞有所提高,但差异不显著(图 5-B)。

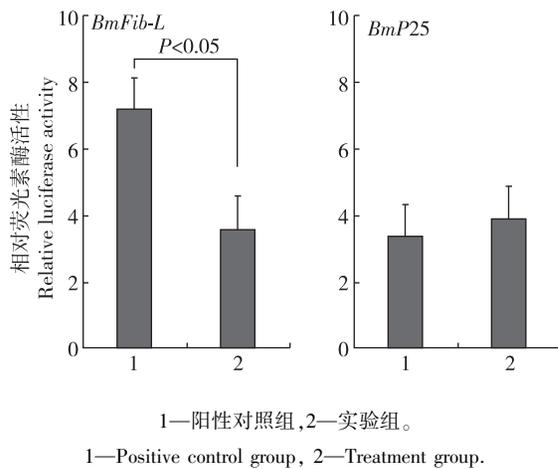


图 5 Bmo-miR-2755* 重组表达质粒分别与 2 个靶基因重组表达质粒共转染 BmN 细胞后 72 h 的荧光素酶活性比较

Fig. 5 A comparison on luciferase activity in BmN cells at 72 h after cotransfected by the recombinant expression plasmid of Bmo-miR-2755* and two recombinant plasmids carrying target gene

3 讨论

目前 miR-2755* 相关的研究主要集中于对免疫相关基因的表达调控^[23],并主要是小菜蛾^[24]、烟草夜蛾^[25]及棉铃虫^[26]方面的研究报道。我们选择前期试验在家蚕中筛选的 1 个预测有转录调控功能的 miRNA (Bmo-miR-2755*) 进行研究,就 Bmo-miR-2755* 对预测靶基因 *BmFib-L* 和 *BmP25* 的转录调控作用进行生物学实验。半定量 RT-PCR 结果表明,家蚕 4~5 龄幼虫后部丝腺组织中 Bmo-miR-

2755* 及 *BmFib-L* 和 *BmP25* 的表达水平均较高,呈现严格的时空特异性。半定量 RT-PCR 检测结果还显示 *BmFib-L* 和 *BmP25* 在家蚕丝腺以外的组织也有表达,有的组织中(如气管)表达水平还很高,说明 *BmFib-L* 和 *BmP25* 可能还有其他未知的生物学功能,有研究表明 *BmP25* 基因的启动子可以驱动 hIGF- I 基因的表达^[27]。

家蚕 5 龄幼虫期蚕丝蛋白大量合成^[28],我们推测幼虫体内有上调丝蛋白基因 *BmFib-H*、*BmFib-L* 和 *BmP25* 表达的 Bmo-miRNA,并在细胞水平初步证实 Bmo-miR-2739 能通过与 *BmFib-H* 3'UTR 结合上调其表达^[17]。体外试验中,我们也同样获得 Bmo-miR-965 和 Bmo-miR-1926 通过与 *BmFib-L* 3'UTR 结合下调其表达的结果^[16]。由此说明,miRNA 与丝蛋白基因 3'UTR 结合,上调或下调靶基因的表达。本试验利用双荧光素酶报告基因检测系统从细胞水平初步证实, Bmo-miR-2755* 能通过与 *BmFib-L* 3'UTR 结合显著下调其表达,符合 miRNA 在 3'UTR 的调控大多为负调控的情况^[29]; Bmo-miR-2755* 对 *BmP25* 的表达具有上调作用,但是调控作用未达显著水平。由于体外实验研究模型与蚕体内基因的表达仍然存在一定的差异,因此, Bmo-miR-2755* 对 *BmFib-L* 和 *BmP25* 的调控作用还需要进一步在家蚕个体水平得到验证。

参考文献 (References)

- [1] Du T, Zamore P D. microPrimer; the biogenesis and function of microRNA[J].Development, 2005, 132(21):4645-4652
- [2] Cai Y, Yu X, Hu S, et al. A brief review on the mechanisms of miRNA regulation[J].Genomics Proteomics Bioinformatics, 2009, 7(4):147-154
- [3] Filipowicz W, Jaskiewicz L, Kolb F A, et al. Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs[J].Curr Opin Struct Biol, 2005, 15(3):331-341
- [4] Jackson R J, Standart N. How do miRNAs regulate gene expression [J].Sci STKE, 2007, 367(1):1-13
- [5] Chan W C, Ho M R, Li S C, et al. MetaMirClust: discovery of miRNA cluster patterns using a data-mining approach[J].Genomics, 2012, 100(3):141-148
- [6] Ding J, Zhou S, Guan J. Finding microRNA targets in plants: current status and perspectives[J].Genomics Proteomics Bioinformatics, 2012, 10(5):264-275
- [7] Lytle J R, Yario T A, Steitz J A. Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5'UTR as in the 3'UTR [J].Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(23):9667-9672

- [8] Ørom U A, Nielsen F C, Lund A H. MicroRNA-10a binds the 5' UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation [J]. *Mol Cell*, 2008, 30(4): 460-471
- [9] Bartel B. miRNA: at the root of plant development [J]. *Plant Physiol*, 2003, 132(2): 709-717
- [10] 薛茜, 杨安钢. miRNA 在免疫系统中的研究进展 [J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2010, 26(1): 93-95
- [11] Winter J, Jung S, Keller S, et al. Many roads to maturity: miRNA biogenesis pathways and their regulation [J]. *Nat Cell Biol*, 2009, 11(3): 228-234
- [12] 秦俭, 何宁佳, 向仲怀. 家蚕模式化研究进展 [J]. *蚕业科学*, 2010, 36(4): 645-649
- [13] Xia Q Y, Guo Y R, Zhang Z, et al. Complete resequencing of 40 genomes reveals domestication events and genes in silkworm (*Bombyx mori*) [J]. *Science*, 2009, 326(5951): 433-436
- [14] 高志宏. 几个家蚕丝蛋白合成关键基因的表达调控 [D]. 重庆: 西南大学, 2010
- [15] Huang Y, Zou Q, Shen X J, et al. Differential expression of microRNA-2b with potential target coding *P25* in the fifth instar larvae posterior silk gland of the silkworm [J]. *Mol Biol*, 2011, 45(4): 576-581
- [16] Huang Y, Zou Q, Song F, et al. The regulation of silkworm fibroin L chain production by miRNA-965 and miRNA-1926 in insect cells [J]. *Russ J Bioorg Chem*, 2012, 38(4): 417-421
- [17] 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
- [18] Song F, Wang X, Chen C, et al. Characterization and profiling of MicroRNAs in posterior silk gland of the silkworm (*Bombyx mori*) [J]. *Genes Genomics*, 2015, 37(8): 703-712
- [19] 何湘君, 张旗, 刘玉京, 等. 通过引物设计和提高退火温度提高实时定量 PCR 检测 microRNA 的特异性 [J]. *北京大学学报: 医学版*, 2009, 41(6): 691-698
- [20] Huang Y, Zou Q, Wang S P, et al. Construction and detection of expression vectors of microRNA-9a in BmN cells [J]. *J Zhejiang Univ Sci, B*, 2011, 12(7): 527-533
- [21] Zhao Q L, Shen X J, Zhu L J, et al. Characterization of *CIB1* gene promoter from silkworm, *Bombyx mori* [J]. *Z Naturforsch C*, 2007, 62(11/12): 875-880
- [22] Liu S P, Li D, Li Q B, et al. MicroRNAs of *Bombyx mori* identified by Solexa sequencing [J/OL]. *BMC Genomics*, 2010, 11: 148 [2015-03-18]. <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/11/148>
- [23] Zhang X F, Zheng Y, Jagadeeswaran G, et al. Identification of conserved and novel microRNAs in *Manduca sexta* and their possible roles in the expression regulation of immunity-related genes [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2014, 47: 12-22
- [24] Zhang X, Zheng Y, Jagadeeswaran G, et al. Identification and developmental profiling of conserved and novel microRNAs in *Manduca sexta* [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2012, 42(6): 381-395
- [25] Liang P, Feng B, Zhou X G, et al. Identification and developmental profiling of microRNAs in diamondback moth, *Plutella xylostella* (L.) [J/OL]. *PLoS ONE*, 2013, 8(11): e78787 [2015-03-18]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0078787>
- [26] Lomate P R, Mahajan N S, Kale S M, et al. Identification and expression profiling of *Helicoverpa armigera* microRNAs and their possible role in the regulation of digestive protease genes [J]. *Insect Biochem Mol Biol*, 2014, 54: 129-137
- [27] Li Y M, Cao G L, Wang Y, et al. Expression of the hIGF- I gene driven by the *Fhx/P25* promoter in the silk glands of germline silkworm and transformed BmN cells [J]. *Biotechnol Lett*, 2011, 33(3): 489-494
- [28] 吕鸿声. 中国养蚕学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1990: 184-195
- [29] Sayed D, Abdellatif M. MicroRNAs in development and disease [J]. *Physiol Rev*, 2011, 91(3): 827-887