

2016, 42(5): 0826–0831
ISSN 0257–4799; CN 32–1115/S
DOI: 10.13441/j.cnki.cykx.2016.05.011

Bmo-miR-2771 对家蚕丝胶蛋白基因 *BmSer-1* 表达的调控作用

钱平^{1,2} 蒋涛^{1,2} 王欣^{1,2} 宋菲^{1,2} 陈晨^{1,2} 范洋洋^{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 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开放实验室,江苏 镇江 212018)

摘 要 微小 RNA (miRNA) 可通过抑制 mRNA 转录或使 RNA 降解的方式在转录后水平调节靶基因的表达。研究与家蚕丝胶蛋白基因 1 (*BmSer-1*) 转录后表达有关的 miRNA (Bmo-miR) 及其作用方式,以丰富丝胶蛋白基因表达的精细调控信息。首先从 miRBase 21 数据库中获得全部成熟体 Bmo-miR,通过生物信息学分析筛选到一个对 *BmSer-1* 有潜在调控作用的 Bmo-miR,命名为 Bmo-miR-2771。设计茎环引物,采用半定量 RT-PCR 方法检测 Bmo-miR-2771 及其预测靶基因 *BmSer-1* 在家蚕 5 龄 3 d 幼虫头部、脂肪体、前部丝腺、中部丝腺、后部丝腺、中肠等组织器官以及血淋巴细胞中的表达水平,结果显示 Bmo-miR-2771 特异性地在中部丝腺中表达,并且靶基因 *BmSer-1* 在中部丝腺的相对表达量也明显高于其他组织。将构建的表达 Bmo-miR-2771 的重组质粒 pcDNA3.0 (*ie1-egfp-pri-miR-2771-SV40*) 和表达 *BmSer-1* 3'-UTR 的重组质粒 pGL3 (*A3-luc-Ser-1* 3'-UTR-SV40) 共转染家蚕卵巢培养细胞 BmN,并以共转染 pcDNA3.0 (*ie1-egfp-SV40*) 和 pGL3 (*A3-luc-Ser-1* 3'-UTR-SV40) 的 BmN 细胞为阳性对照,以海肾荧光素酶表达载体 pRL-CMV 为内参,检测荧光素酶活性,结果显示实验组的荧光素酶活性相对于阳性对照组显著降低 ($P < 0.05$),从细胞水平证实了 Bmo-miR-2771 对 *BmSer-1* 基因表达具有负调控作用。

关键词 家蚕; 丝胶蛋白基因 *Ser-1*; 微小 RNA; Bmo-miR-2771; 转录后调控; 半定量 RT-PCR; 双荧光素酶报告基因系统
中图分类号 S881.2; Q74 文献标识码 A 文章编号 0257–4799(2016)05–0826–06

Regulation of Bmo-miR-2771 on Expression of *Bombyx mori* Sericin Gene *BmSer-1*

Qian Ping^{1,2} Jiang Tao^{1,2} Wang Xin^{1,2} Song Fei^{1,2} Chen Chen^{1,2} Fan Yangyang^{1,2}

Tang Shunming^{1,2} Shen Xingjia^{1,2*}

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

Abstract MicroRNAs (miRNAs) exert a post-transcriptional regulation on gene expression through inhibiting translation of target mRNA or degrading target mRNA molecule. Understanding the regulatory function of *Bombyx mori* miRNAs on *Bombyx mori* sericin gene 1 (*BmSer-1*) would enrich information on fine regulation of sericin gene expression. Firstly, we downloaded whole matured Bmo-miRs from database miRBase 21. Then we identified Bmo-miR-2771 as the candidate miRNA regulating the expression of *BmSer-1* gene. The expression profile of Bmo-miR-2771 and its predicted target gene

BmSer-1 in 7 different tissues including head, fat body, anterior silk gland (ASG), middle silk gland (MSG), post silk gland (PSG), midgut and hemolymph from the 5th instar day 3 larvae of silkworm was explored by semi-quantitative RT-PCR with the designed stem-loop primers. The determined results show that Bmo-miR-2771 specifically expressed in MSG, and the expression level of *BmS-*

收稿日期: 2016–03–04 接受日期: 2016–04–29
资助项目: 国家自然科学基金项目 (No. 31402143, 31172266)。
第一作者信息: 钱平 (1981–), 男, 博士研究生。
E-mail: qianping0511@163.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

er-1 in MSG was significantly higher than that in other tissues. The recombinant plasmids pcDNA3.0(*ie1-egfp-pri-miR-2771-SV40*) and pGL3(*A3-luc-Ser-1 3'UTR-SV40*) were constructed and then applied in the co-transfection of BmN cell line followed by luciferase assay with Renilla luciferase expression vector pRL-CMV as the internal reference, and BmN cells co-transfected with pcDNA3.0(*ie1-egfp-SV40*) plus pGL3(*A3-luc-Ser-1 3'UTR-SV40*) were used as the positive control. The determined results showed that the luciferase signal level was significantly decreased by Bmo-miR-2771 compared with the control group ($P < 0.05$), thus showing that Bmo-miR-2771 has negative regulatory function on expression of *BmSer-1* gene.

Keywords *Bombyx mori*; Sericin gene 1; microRNA; Bmo-miR-2771; Post-transcriptional regulation; Semi-quantitative RT-PCR; Dual luciferase reporter gene system

MicroRNAs(miRNA) 是一类具有重要调控作用的内源性单链非编码微小 RNA, 长度为 19 ~ 22 nt, 主要通过和靶基因 mRNA 的 3' 端非编码区序列(3'-UTR) 互补配对来抑制靶基因的表达或翻译^[1], 进而参与细胞增殖、胚胎发育、个体生长、疾病发生、细胞凋亡等一系列生命过程的调控^[2-3]。目前, 对于 miRNA 的功能研究已经涉及到动物、植物、微生物等各个生物研究领域, 其研究成果将为深入分析基因转录后水平的调控提供理论依据, 同时也将帮助人们从分子水平了解更多、更为精密的生命活动调控机制。

家蚕(*Bombyx mori*) 是绢丝类经济昆虫。由于家蚕既具备鳞翅目昆虫共有的生物学性状, 又具有其自身能合成与分泌绢丝的特性, 以及 5 000 年的驯养历史与历经 100 余年的经典遗传学、病理生理学研究积淀和最新的基因组学研究成果, 因此成为鳞翅目模式昆虫, 为研究昆虫的细胞分化、增殖与凋亡、胚胎发育、器官形成、生理代谢、免疫防控以及行为认知等生物学过程提供了良好的资源与技术平台。近年来, miRNA 成为生物学中的研究热点, 也吸引了大批家蚕科研工作者的目光, 并随着家蚕全基因组测序的完成, 家蚕 miRNA 的研究迎来了一个新的发展阶段, 尤其是在家蚕新 miRNA 的发现^[4-6]、靶基因的研究^[7-9]、家蚕 miRNA 的调控分析^[10-12]等方面迅速展开。截止到 2014 年 6 月, 在 miRBase 数据库中已登录有 563 个家蚕成熟体 miRNA 序列。在对家蚕 miRNA 调控作用的研究中, 借助 miRNA 揭示家蚕丝腺高效合成丝蛋白的调控机制是较受关注的研究内容之一。

家蚕幼虫丝腺是蚕丝蛋白合成与分泌的特殊器官, 根据其形态和功能又把丝腺分为前部丝腺(ASG)、中部丝腺(MSG) 和后部丝腺(PSG) 3 个部分。蚕丝蛋白是由 70% ~ 80% 的丝素蛋白和 20%

~ 30% 的丝胶蛋白组成, 丝胶蛋白包覆在 2 条丝素蛋白纤维之外。目前已在家蚕基因组中发现了丝胶蛋白的 3 个编码基因 *BmSer-1*、*BmSer-2* 和 *BmSer-3*, 其中, 家蚕丝胶蛋白基因 1(*BmSer-1*) 在中部丝腺组织特异性表达^[13], 且更为详细的研究结果是 *BmSer-1* 在中部丝腺的后部 150 个细胞和前部 120 个细胞中表达^[14-15]。*BmSer-1* 基因序列由 9 个外显子和 8 个内含子构成^[16], 转录后通过不同的剪接途径, 形成 4 种不同长度的 mRNA^[17]。有研究认为 *BmSer-1* 基因中至少存在 SA、SB 和 SC 3 个转录调控位点, 转录调控因子结合在这些位点而影响 *BmSer-1* 编码蛋白质的表达^[18], 但已知的结合位点和调控因子远不足以解答丝胶蛋白基因转录表达的精密调控机制。丝胶蛋白基因的表达是否还有其他的调控机制? 有研究显示家蚕 miRNA 对家蚕丝素蛋白基因的表达有调控作用, 并在细胞水平证明 Bmo-miRNA-965、Bmo-miRNA-1926 能与靶位点互补结合下调靶基因——丝素轻链基因 *BmFib-L* 的表达^[19]。本研究利用家蚕 miRNA 数据库, 通过生物信息学软件预测、筛选对 *BmSer-1* 基因可能存在潜在调控作用的 Bmo-miR, 采用半定量 RT-PCR 方法检测筛选 Bmo-miR 及其预测靶基因 *BmSer-1* 在家蚕组织器官的表达特征, 并利用双荧光素酶报告基因检测系统在细胞水平分析该 Bmo-miR 对 *BmSer-1* 基因表达的调控作用。

1 材料与方法

1.1 材料和主要试剂

供试家蚕品种大造(p50), 由中国农业科学院蚕业研究所保存, 孵化幼虫在常规条件下用桑叶饲养。

家蚕卵巢培养细胞 BmN、大肠埃希菌(*Escherichia coli*) Top1 菌株、重组报告基因表达载体 pcD-

NA3.0(*ie1-egfp-SV40*)和 pGL3(*A3-luc-SV40*),以及携带海肾荧光素酶基因的报告质粒 pRL-CMV,均由农业部蚕桑遗传改良重点实验室保存或构建。

质粒提取试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司, Perfect 高效转染试剂购自药科美生物科技有限公司, 双荧光素酶报告基因检测试剂盒、荧光素酶检测试剂盒均购自 Promega 公司, TC-400 细胞培养基购自 Applichem 公司, 胎牛血清(FBS)购自 Gibco 公司, RNAiso Plus、pMD18-T、T4 DNA Ligase、Ex Taq® 酶和 DNA marker 均购自 TaKaRa 公司。PCR 引物合成与 DNA 测序由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

1.2 调控 *BmSer-1* 表达的 miRNA 预测

从 NCBI 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)下载 *BmSer-1* 的 3'-UTR 序列,从 miRBase 21 数据库(<http://www.mirbase.org/>)中获取已经登录的全部家蚕成熟 miRNA 序列。以 *BmSer-1* 3'-UTR 为靶序列,利用在线预测软件 RNAhybrid(<http://bi-biserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/>),采用软件默认参数,根据种子序列(miRNA 的 5'端 2~8 位碱基序列)配对情况(互补间隔不超过 4 个碱基)以及 miRNA 与靶基因结合自由能(<100.0 kJ/mol),筛选候选家蚕 miRNA^[24]。

1.3 候选 miRNA 表达的半定量 RT-PCR 检测

1.3.1 引物设计 运用 Oligo6 软件,设计 Bmo-miR 扩增的茎环 RT-PCR 引物(表 1)。

表 1 候选家蚕 miRNA 茎环的 RT-PCR 引物序列

Table 1 Stem-loop primer sequences for RT-PCR of candidate *Bimbyx mori* miRNAs

目的基因(序列片段)及引物名称 Target gene and primer names		引物序列(5'—3') Primer sequences
miR-2771	RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGG-TATTCGCACTGGATACGACTAACTA
	Forward	CGGGCTAACATTACGAGGA
	Reverse	GTGCAGGGTCCGAGGT
<i>BmU6</i>	RT	GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGG-TATTCGCACTGGATACGACACG
	Forward	CCTGCGCAAGGATGAC
	Reverse	GTGCAGGGTCCGAGGT
Pre-miR-2771	Forward	CCCAAGCTTATTGGCCGAAATAAAAT GAC
	Reverse	CGCGGATCCACACGACTGTTTGC GAA GGT
<i>BmSer-1</i>	Forward	AGACCAGCAAGAGTTACGACAGG
	Reverse	GGATGATACACTTCCACCACGAT

1.3.2 组织总 RNA 提取及 cDNA 合成 分别提取家蚕 5 龄 3 d 幼虫头部、脂肪体、前部丝腺、中部丝腺、后部丝腺、中肠等组织器官以及血淋巴细胞的总 RNA,用成熟体 miRNA 反转录引物合成 cDNA 第 1 链。

1.3.3 半定量 RT-PCR 将 cDNA 模板质量浓度稀释为 500 ng/μL,以 miR-2771 Forward/miR-2771 Reverse 为引物,进行半定量 RT-PCR 分析。PCR 反应条件:94 ℃ 变性 5 min;94 ℃ 30 s,55 ℃ 25 s,72 ℃ 30 s,共 34 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。以 *BmU6* 为内参基因(引物为 *BmU6* Forward/*BmU6* Reverse),且每个样品及内参均进行 3 次重复检测。最后将 PCR 产物进行凝胶电泳,采用 Gel-Pro Analyzer 软件分析 Bmo-miR-2771 及靶基因 *BmSer-1* 的相对表达量。

1.4 双荧光素酶报告基因检测候选 miRNA 调控作用的实验

1.4.1 重组表达载体的构建 pGL3(*A3-luc-Ser-1* 3'-UTR-SV40)重组质粒由本实验室前期构建并保存。从家蚕基因数据库中找到相应 miRNA 的前体序列,并在片段前后各延伸 100 bp 获得所需序列,设计特异性引物 Pre-miR-2771 Forward、Pre-miR-2771 Reverse(表 1)。将目的片段克隆到 pMD18-T 载体后进行测序验证,测序正确的重组载体 pMD18-T-pri-miR-2771 在 -20 ℃ 条件下保存备用。重组载体 pMD18-T-pri-miR-2771 和 pcDNA3.0(*ie1-egfp-SV40*)分别用 Hind III、BamHI 双酶切,将目的片段回收后连接到线性化的 pcDNA3.0(*ie1-egfp-SV40*)上,构建重组表达载体 pcDNA3.0(*ie1-egfp-pri-miR-2771-SV40*),再用 Hind III 和 BamH I 双酶切鉴定,鉴定正确的重组表达载体质粒于 -20 ℃ 条件下保存备用。

1.4.2 细胞转染及荧光素酶活性检测 按照以下方法分对照组和实验组进行转染。对照组采用 pcDNA3.0(*ie1-egfp-SV40*)、pGL3(*A3-luc-Ser-1* 3'-UTR-SV40)和内参质粒 pRL-CMV;实验组采用 pcDNA3.0(*ie1-egfp-pri-miR-2771-SV40*)、pGL3(*A3-luc-Ser-1* 3'-UTR-SV40)和内参质粒 pRL-CMV。每组进行 3 次独立实验,每次 3 个重复。其中每组中的内参质粒质量浓度稀释至 80 ng/μL,其他质粒质量浓度稀释至 300 ng/μL,等体积混合均匀,最后使每孔包含 1.6 μg 混合质粒。转染具体步骤参照 Perfect 转染试剂的操作手册。转染后 72 h 在荧光显微

镜下观察绿色荧光蛋白 EGFP 的表达情况,并检测荧光素酶活性。具体操作:转染后 72 h,吸去细胞培养孔中的培养液,用 PBS 缓冲液(pH 7.4)洗涤培养孔 2 次,然后将细胞培养孔中的残液去除;每孔中加入 100 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 5 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 荧光素酶检测仪中,检测第 1 次荧光(萤火虫荧光素酶活性);加入 20 μ L Stop & GloTM,检测第 2 次荧光(海肾荧光素酶的活性)。最后,以萤火虫荧光素酶活性与海肾荧光素酶活性的比值作为相对活性,分析 Bmo-miR-2771 对 *BmSer-1* 表达的调控作用,并利用 SPSS16.0 软件进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 对 *BmSer-1* 表达具有潜在调控作用的 miRNA

采用 RNAhybrid 软件将 miRBase 21 数据库中家蚕成熟 miRNA 序列与 *BmSer-1* 基因的 3'-UTR 进行比对,其中 Bmo-miR-2771 在种子区 2~8 位碱基与 *BmSer-1* 的 3'-UTR 互补配对(图 1),推测 Bmo-miR-2771 对 *BmSer-1* 的表达可能具有调控作用。

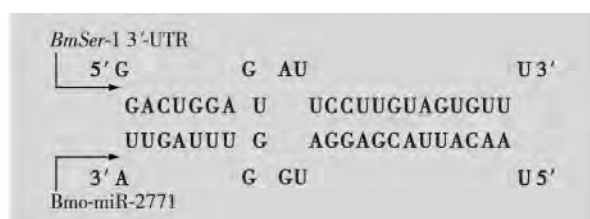
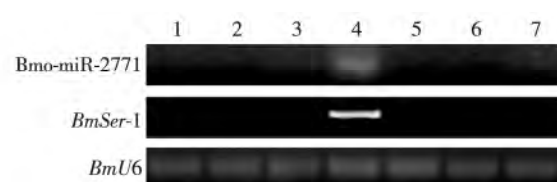


图1 靶基因 *BmSer-1* 3'-UTR 上 Bmo-miR-2771 的结合位点预测

Fig. 1 Predicted binding site of Bmo-miR-2771 within *BmSer-1* 3'-UTR

2.2 Bmo-miR-2771 和预测靶基因 *BmSer-1* 的组织表达特征

利用半定量 RT-PCR 的方法,分析了家蚕 5 龄幼虫不同组织器官中 Bmo-miR-2771 及其预测靶基因 *BmSer-1* 的相对表达水平。结果显示: Bmo-miR-2771 仅在中部丝腺中特异性表达; *BmSer-1* 也仅在中部丝腺表达,在其他组织器官中则均没有检测到表达(图 2)。



1—头部 2—脂肪体 3—前部丝腺 4—中部丝腺 5—后部丝腺, 6—中肠 7—血淋巴细胞。BmU6 为内参基因。
1—Head, 2—Fat body, 3—Anterior silk gland, 4—Middle silk gland, 5—Post silk gland, 6—Midgut, 7—Haemolymph. BmU6 was used as internal reference gene.

图2 半定量 RT-PCR 检测 Bmo-miR-2771 及预测靶基因 *BmSer-1* 在家蚕 5 龄第 3 天幼虫不同组织中的表达

Fig. 2 Semi-quantitative RT-PCR of Bmo-miR-2771 and its predicted target gene *BmSer-1* in different tissues of the 5th instar day 3 larvae of silkworm

2.3 Bmo-miR-2771 对 *BmSer-1* 表达调控的鉴定

2.3.1 Bmo-miR-2771 前体的 PCR 鉴定 以家蚕 5 龄 3 d 幼虫中部丝腺 cDNA 为模板,用 Bmo-miR-2771 特异性引物扩增前体片段。产物经电泳检测显示有一条长度在 60~80 bp 之间,与 Bmo-miR-2771 前体片段长度理论值相符的条带(图 3)。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。

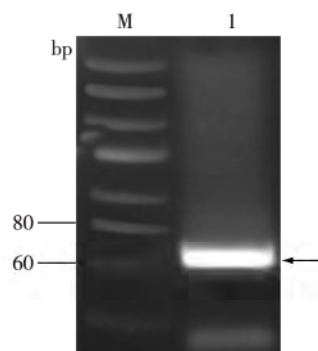


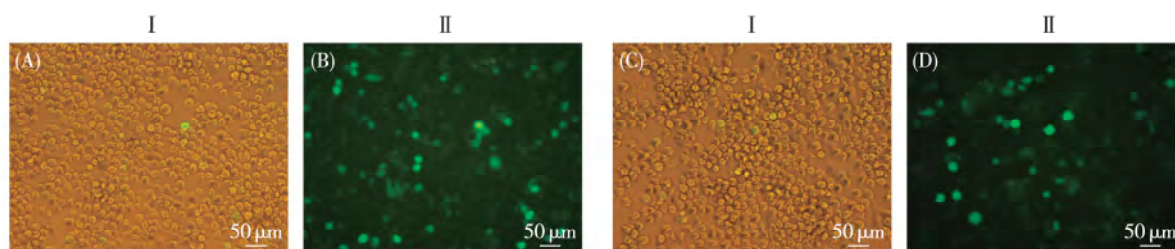
图3 Bmo-miR-2771 前体的 PCR 鉴定

Fig. 3 Verification of Bmo-miR-2771 precursor by PCR

2.3.2 重组质粒对细胞的转染效果 将表达 Bmo-miR-2771 的重组质粒 pcDNA3.0(*ie1-egfp-pri-miR-2771-SV40*) 和表达 *BmSer-1* 3'-UTR 的重组质粒 pGL3(*A3-luc-Ser-1 3'-UTR-SV40*) 共转染 BmN 细胞,以共转染 pcDNA3.0(*ie1-egfp-SV40*) 和 pGL3(*A3-luc-Ser-1 3'-UTR-SV40*) 的细胞为阳性对照,并以海

肾荧光素酶表达载体 pRL-CMV 为内参。转染后 72 h, 用荧光显微镜检测转染效率。结果显示, 转入

重组质粒的细胞在荧光显微镜下可观察到大部分细胞出现绿色荧光(图 4), 说明转染效果较好。

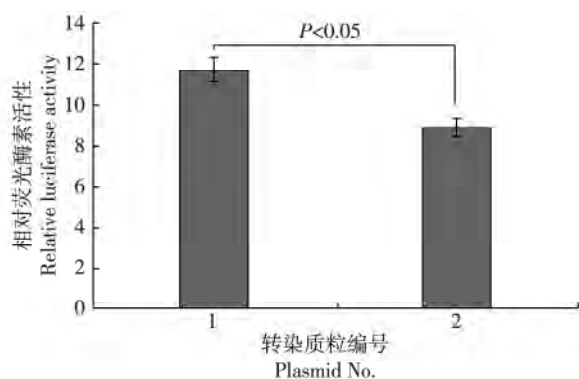


A, B. pcDNA3.0(*ie1-egfp*-SV40) + pGL3(*A3-luc-Ser-1* 3'UTR-SV40) + pRL-CMV C, D. pcDNA3.0(*ie1-egfp*-pri-miR-2771-SV40) + pGL3(*A3-luc-Ser-1* 3'UTR-SV40) + pRL-CMV I—白光下观察, II—荧光下观察。
I—Observation under white light, II—Observation under fluorescent light.

图 4 重组质粒转染 BmN 细胞后 72 h 的绿色荧光观察

Fig. 4 Green fluorescence in BmN cells observed at 72 h post transfection with recombinant plasmids

2.3.3 重组质粒转染细胞的荧光素酶活性 利用双荧光报告基因检测试剂盒测定重组质粒转染 BmN 细胞的荧光素酶活性, 并用萤火虫荧光素酶活性与海参荧光素酶活性的比值(Luc/Rlu)对数据进行标准化校正。如图 5 所示, 实验组转染 Bmo-miR-2771 表达质粒, 报告基因表达产物荧光素酶的活性低于阳性对照组, 检验分析结果显示实验组与对照组之间的差异达到显著水平($P < 0.05$)。由此在细胞水平证实, Bmo-miR-2771 对 *BmSer-1* 基因的表达具有显著的抑制作用。



1—pcDNA3.0(*ie1-egfp*-SV40) + pGL3(*A3-luc-Ser-1* 3'UTR-SV40) + pRL-CMV 2—pcDNA3.0(*ie1-egfp*-pri-miR-2771-SV40) + pGL3(*A3-luc-Ser-1* 3'UTR-SV40) + pRL-CMV。

图 5 实验组和对照组重组质粒转染 BmN 细胞后 72 h 的荧光素酶活性比较

Fig. 5 Comparison of luciferase activity in BmN cells transfected with experimental plasmids and control plasmid at 72 h post transfection

3 讨论

我们对在 miRBase 21 数据库中获得的家蚕 miRNA 进行生物信息学分析, 筛选出一个在 *BmSer-1* mRNA 的 3'-UTR 具有潜在结合位点的 Bmo-miR-2771, 并利用双荧光素酶报告基因检测系统在细胞水平证实其对 *BmSer-1* 的表达具有显著的抑制作用。研究结果不仅丰富了家蚕 miRNA 数据信息, 也为进一步研究 miRNA 的功能和阐明蚕丝蛋白合成的调控机制提供了新的实验数据。

有研究表明 miRNA 还存在竞争性内源 RNA (ceRNA) 的基因调控模式^[21-22], 这些 ceRNA 能吸附 miRNA, 降低细胞中能够结合靶基因 mRNA 的 miRNA 浓度, 削弱 miRNA 的抑制作用, 从而提高 mRNA 的翻译水平^[23]。由此推测, 一方面实验所用的 BmN 细胞源于家蚕卵巢而非丝腺细胞, 缺乏相应的内源性 miRNA 的干扰, 给外源性 miRNA 提供了结合靶基因 mRNA 的机会, 从而下调靶基因表达; 另一方面, 目的基因在体外实验研究模型细胞中的表达与在蚕体内的真实表达水平仍然存在一定的差异。因此, 今后还需通过构建重组杆状病毒表达载体过表达家蚕 miRNA、人工合成 miRNA 类似物或 miRNA 的反义 RNA, 以及通过感染或注射家蚕 5 龄幼虫进行体内表达分析等方法, 进一步验证 miRNA 对靶基因表达的调控功能。

蚕丝蛋白表达调控机制非常复杂, 而 miRNA 与靶基因的作用关系存在多对一和一对多的现象, 所

以仅仅研究个别 miRNA 的转录调控作用远不足以解答丝蛋白基因的精密调控机制,还需要获得更多转录调控因子和更多 miRNA 对蚕丝蛋白基因表达调控作用的信息。此外,miRNA 不仅能结合靶基因 mRNA 的 3'-UTR,还能结合靶基因 mRNA 的 5'-UTR,而这种结合方式通常以促进靶基因的表达或翻译为主,较少起到抑制作用^[24]。

参考文献 (References)

- [1] LEE Y, KIM M, HAN J, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II [J]. *EMBO J* 2004, 23(20): 4051–4060
- [2] JOHNSTON R J, HOBERT O. A microRNA controlling left/right neuronal asymmetry in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature* 2003, 426(6968): 845–849
- [3] POY M N, ELIASSON L, KRUTZFELDT J, et al. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion [J]. *Nature*, 2004, 432(7014): 226–230
- [4] YU X, ZHOU Q, LI S C, et al. The silkworm (*Bombyx mori*) miRNAs and their expressions in multiple developmental stages [J/OL]. *PLOS ONE* 2008, 3(8): e2997 [2016-02-23]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0002997>. DOI: 10.1371/journal.pone.0002997
- [5] YU X, ZHOU Q, CAI Y, et al. A discovery of novel microRNAs in the silkworm (*Bombyx mori*) genome [J]. *Genomics* 2009, 94(6): 438–444
- [6] CAI Y, YU X, ZHOU Q, et al. Novel microRNAs in silkworm (*Bombyx mori*) [J]. *Funct Integr Genomics* 2010, 10(3): 405–415
- [7] ZENG F, XIE H, NIE Z, et al. Characterization of the gene *BmEm4*, a homologue of *Drosophila E(spl) m4* from the silkworm, *Bombyx mori* [J]. *Comp Funct Genomics* 2009, 27(1): 51–53
- [8] HE P A, NIE Z, CHEN J, et al. Identification and characteristics of microRNAs from *Bombyx mori* [J/OL]. *BMC Genomics* 2008, 9: 248 [2016-02-23]. <http://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-9-248>. DOI: 10.1186/1471-2164-9-248
- [9] CHEN A, XIA D, QIU Z, et al. Expression of a vitelline membrane protein, BmVMP23, is repressed by bmo-miR-1a-3p in silkworm, *Bombyx mori* [J]. *FEBS Lett* 2013, 587(7): 970–975
- [10] LIU S, ZHANG L, LI Q, et al. MicroRNA expression profiling during the life cycle of the silkworm (*Bombyx mori*) [J/OL]. *BMC Genomics* 2009, 10(1): 455 [2016-02-23]. <http://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-10-455>. DOI: 10.1186/1471-2164-10-455
- [11] ZHANG Y, ZHOU X, GE X, et al. Insect-specific microRNA involved in the development of the silkworm *Bombyx mori* [J/OL]. *PLOS ONE* 2009, 4(3): e4677 [2016-02-23]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0004677>. DOI: 10.1371/journal.pone.0004677
- [12] LI J, CAI Y, YE L, et al. MicroRNA expression profiling of the fifth-instar posterior silk gland of *Bombyx mori* [J/OL]. *BMC Genomics* 2014, 15: 410 [2016-02-23]. <http://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-15-410>. DOI: 10.1186/1471-2164-15-410
- [13] MICHAILLE J, GAREL A, PRUDHOMME J C. Cloning and characterization of the highly polymorphic *Ser2* gene of *Bombyx mori* [J]. *Gene* 1990, 86(2): 177–184
- [14] MICHAILLE J, COUBLE P, PRUDHOMME J C, et al. A single gene produces multiple sericin messenger RNAs in the silk gland of *Bombyx mori* [J]. *Biochimie* 1986, 68(10/11): 1165–1173
- [15] OKAMOTO H, SHIKAWA ESUZUI Y. Structural analysis of sericin genes. Homologies with fibroin gene in the 5' flanking nucleotide sequences [J]. *J Biol Chem* 1982, 257: 15192–15199
- [16] GAREL A, DELEAGE G, PRUDHOMME J C. Structure and organization of the *Bombyx mori* sericin 1 gene and of the sericin deduced from the sequence of the Ser 1B cDNA [J]. *Insect Biochem Mol Biol* 1997, 27(5): 469–477
- [17] FUKUTA M, MATSUNO K, HUI C C, et al. Molecular cloning of a POU domain-containing factor involved in the regulation of the *Bombyx* sericin-1 gene [J]. *J Biol Chem* 1993, 268(26): 19471–19475
- [18] 陈华, 朱良均, 闵思佳. 家蚕丝胶蛋白基因的表达及调控 [J]. *中国蚕业* 2001, 22(4): 59–61
- [19] 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 2011
- [20] HUANG Y, ZOU Q, TANG S M, et al. Computational identification and characteristics of novel microRNAs from the silkworm (*Bombyx mori* L.) [J]. *Mol Biol Rep* 2010, 37(7): 3171–3176
- [21] SEN R, GHOSAL S, DAS S, et al. Competing endogenous RNA: the key to posttranscriptional regulation [J/OL]. *Sci World J* 2014, 2014: 896206 [2016-02-23]. <http://www.hindawi.com/journals/tswj/2014/896206/>. DOI: 10.1155/2014/896206
- [22] KHAN A A, BETEL D, MILLER M L, et al. Transfection of small RNAs globally perturbs gene regulation by endogenous microRNAs [J]. *Nat Biotechnol* 2009, 27(6): 549–555
- [23] EBERT M S, SHARP P A. MicroRNA sponges: progress and possibilities [J]. *RNA* 2010, 16(11): 2043–2050
- [24] DA S L, MASOTTI A. Recent insights and novel bioinformatics tools to understand the role of MicroRNAs binding to 5' untranslated region [J]. *Int J Mol Sci* 2012, 14(1): 480–495