

农业生物技术

家蚕 *Bmyan* 基因的克隆表达和作为 microRNA 7 靶基因的验证

刘仕平, 黄亚玺, 尹纪云, 吴小燕, 周兰庭, 王伟, 夏庆友

家蚕基因组生物学国家重点实验室 西南大学, 重庆 400716

刘仕平, 黄亚玺, 尹纪云, 等. 家蚕 *Bmyan* 基因的克隆表达和作为 microRNA 7 靶基因的验证. 生物工程学报, 2015, 31(11): 1612–1622.

Liu SP, Huang YX, Yin JY, et al. Cloning and expression profile of *Bmyan* in the silkworm (*Bombyx mori*) and experimental validation as one target of microRNA 7. Chin J Biotech, 2015, 31(11): 1612–1622.

摘 要: microRNAs (miRNAs) 是一类长约 22 nt 的非编码 RNA, 通过与其靶基因 3'端非翻译区 (3'-UTR) 的结合来调节各项生命活动。克隆表达家蚕 *Bmyan* 基因, 验证其是否是 bmo-miR-7 的靶基因对于深入研究家蚕变态发育机制有重要意义。基于同源性检索和 PCR 扩增, 克隆了家蚕 *Bmyan* 基因 CDS 全长, 编码 476 个氨基酸。序列分析表明, 家蚕 YAN 蛋白的氨基酸序列保守, 含 SAM-PNT 和 ETs 结构域。芯片数据、RT-PCR 和定量 PCR 的检测结果表明, *Bmyan* 在五龄 3 d 的家蚕头部、体壁、卵巢中高量表达, 在其余组织中低量表达或不表达。在幼虫期, *Bmyan* 表达水平相对较低, 但在上簇期和蛹期前 4 d 高量表达。通过 3' RACE 克隆了 *Bmyan* 基因的 3'-UTR。RNAhybrid 在线软件预测了其 3'-UTR 上 bmo-miR-7 的两个靶位点。构建了含有 *Bmyan* 基因 3'-UTR 和荧光素酶报告基因的转染载体, 将该载体与 bmo-miR-7 的 mimics 序列共转染到家蚕胚胎细胞系 BmE 中, 通过测定荧光素酶的活性, 证明了 *Bmyan* 基因是 bmo-miR-7 的靶基因。本研究为进一步揭示 bmo-miR-7 和 *Bmyan* 在家蚕体内的生物学功能奠定了基础。

关键词: 家蚕, *Bmyan*, 克隆表达, microRNA 7, 靶位点

Received: December 8, 2014; **Accepted:** March 13, 2015

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 31071136), Fundamental and Advanced Research Projects of Chongqing (No. cstc2014jcyjA00025), National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2012CB114602).

Corresponding author: Qingyou Xia. Tel/Fax: +86-23-68251996; E-mail: xiaqy@swu.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 31071136), 重庆市基础与前沿研究计划 (No. cstc2014jcyjA00025), 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2012CB114602) 资助。

网络出版时间: 2015-03-27

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20150327.1417.002.html>

Cloning and expression profile of *Bmyan* in the silkworm (*Bombyx mori*) and experimental validation as one target of microRNA 7

Shiping Liu, Yaxi Huang, Jiyun Yin, Xiaoyan Wu, Lanting Zhou, Wei Wang, and Qingyou Xia

Southwest University, State Key Laboratory of Silkworm Genome Biology, Chongqing 400716, China

Abstract: microRNAs(miRNAs) are an extensive class of ~22-nucleotide (nt) endogenous noncoding RNAs regulating life activities of metazoans through binding to 3'-untranslated regions (3'-UTRs) of their target genes. This work aimed to identify *yan* gene in the silkworm, reveal its expression profile and confirm if it is one target of bmo-miR-7 and, as such, have potential for contributing to better understanding of the molecular mechanisms involved in the metamorphosis of silkworm. Based on homolog searching and PCR amplification, we cloned the coding sequence (CDS) of *Bmyan*, which encodes 476 amino acid residues and contains SAM-PNT and ETs domains. Quantitative PCR (q-PCR), RT-PCR and microarray data revealed high expression of *Bmyan* in the head, body wall and ovary of day-3 fifth instar larval silkworm, low or no expression in other tissues. It was lowly expressed in the early larval stages, but highly expressed from late spinning to day 4 pupa. The 3'-UTR of *Bmyan* was obtained by rapid-amplification of cDNA ends (3'RACE) and predicted to contain two potential recognition sites of bmo-miR-7. The luciferase reporter vector containing the 3'-UTR of *Bmyan* was constructed and co-transfected into BmE cell line with the mimic of bmo-miR-7 and the decreased relative activity of luciferase showed that *Bmyan* is one target of bmo-miR-7. This work helps further functional analysis of bmo-miR-7 and *Bmyan* in the silkworm.

Keywords: silkworm (*Bombyx mori*), *Bmyan*, cloning and expression, microRNA 7, target site

复眼 (Compound eye) 出现于节肢动物门 (Arthropoda) 的昆虫纲 (Insecta)、甲壳纲 (Crustacea) 和部分双壳纲 (Bivalvia) 动物, 是由一定数量的单眼 (Ocellus) 组成的视觉器官。果蝇 (Fruit fly) 复眼由约 800 个小眼 (Ommatidial unit) 组成, 每个小眼由 20 个细胞构成, 即 8 个光感受细胞 (R8) 和 12 个副细胞。Yan 是在果蝇中发现的表皮生长因子受体 (*Drosophila* epidermal growth factor receptor, DER) 通路中的转录抑制因子^[1]。果蝇的 miR-7 和 *yan* 基因形成一个负调控回路, 使它们表达量处于动态平衡, 保证了果蝇眼光感受器的正

常分化和复眼的形成^[2-4]。*yan* 基因存在于光感受器中, 编码的核蛋白含有 ETS (E twenty six) DNA 结合基序、一个 PNT (Pointed) 结构域、8 个分裂素激活蛋白 (Mitogen-activated protein, MAP) 的激酶磷酸化位点和许多 PEST 信号区域^[5-7]。miR-7 在果蝇本体感受器官和嗅觉器官的分化中有重要作用^[1-2], 在许多相互关联的前馈和反馈通路中起稳定器的作用, 以缓冲环境变化对生物体的影响^[8]。

家蚕 *Bombyx mori* 作为鳞翅目 Lepidoptera 昆虫的典型代表对于揭示一些生命活动的分子调控机理有着十分重要的作用。家蚕基因组测

序的完成使家蚕成为研究一些重要生命机理的模式生物^[9-10]。家蚕眼睛也是由许多单眼构成的复眼，但关于其形成和发育的分子调控机制并没有研究报道。已经在家蚕体内鉴定了 bmo-miR-7^[11-14]，但还未见其靶基因的研究报道。本研究旨在通过克隆鉴定家蚕的 *yan* 基因，研究其表达模式，并验证它是否是 bmo-miR-7 的靶基因，以便为进一步揭示 bmo-miR-7 的生物学功能和研究家蚕光感受器的分化和复眼的发育调控机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料和宿主菌

家蚕大造品种由西南大学家蚕基因库提供。将材料用液氮速冻后保存于-80℃备用。大肠杆菌 DH5 α 菌株为本实验室所保存。家蚕胚胎细胞系 BmE 为本实验室经原代培养建成。

1.2 试剂

提取试剂 TRIzol 购自 Invitrogen 公司；反转录试剂盒、PCR 试剂、pMD19-T 载体、DNA marker、限制性内切酶 *Bam*H I、*Hind* III、*Kpn* I、*Xba* I 和 SYBR Premix Ex TaqTM II 均购于 TaKaRa 公司；胶回收试剂盒购自上海华舜生物技术有限公司；载体 pGL3[luc-SV40]和大肠杆菌 DH5 α 菌株由本实验室保存；定量 PCR 用的反转酶 M-MLV、PCR 产物回收试剂盒和双荧光素酶检测试剂盒购自 Promega 公司；质粒提取试剂盒购自上海生工生物工程技术服务有限公司（生工生物）；优质胎牛血清（FBS）购自 PAA 公司；bmo-miR-7 mimic 购自广州锐博生物科技有限公司（Ribobio）。

1.3 基因的克隆

1.3.1 所需的引物

用 Primer premier 5.0 软件设计引物。所有引物均由生工生物合成，见表 1。

表 1 本研究中所用的引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Purpose	Primer sequence (5'-3')
A3-F1	RT-PCR for A3	AACACCCCGTCCTGCTCACTG
A3-R1	RT-PCR for A3	GGGCGAGACGTGTGATTTCCT
yan-CDS-F2	CDS	ATGAAAGTTGTAAGCTTACA
yan-CDS-R2	CDS	TTACTGTTTACATTTTTCAC
yan-RT-F3	RT-PCR	TCTTACAACAACCTTCTGAATGAC
yan-RT-R3	RT-PCR	TATCTCCGATAAGCGTACTG
yan-qPCR-F4	qPCR	ATGAAAGAAGAAAGATGTGACGAAG
yan-qPCR-R4	qPCR	ATAAGCGTACTGATCCGATGTTTG
sw22934-F5	qPCR control	TTCGTAAGTCTCTTCTCGT
sw22934-R5	qPCR control	CAAAGTTGATAGCAATTCCCT
3'-UTR-out-F6	3'-UTR	CTCTACTGCGACAACAAATGAGTCCCAC
3'-UTR-in-R6	3'-UTR	GTTCTTCTCTCACCTGTTACTCCCACC
3'-UTR-out-R7	3'-UTR	TACCGTCGTTCCACTAGTGATT
3'-UTR-in-F7	3'-UTR	CGCGGATCCTCCACTAGTGATTTCATATAGG
A3-Prom-F8	Promoter of A3	CGGAATTCAGAGGTTACAAGCGACCG
A3-Prom-R8	Promoter of A3	CGGGATCCCTTGAATTAGTCTGCAAGAAAA
yan-3'UTR-F9	Vector	TGCTCTAGACTTATTGAGATAGACTAAGGACA
yan-3'UTR-R9	Vector	TGCTCTAGATAGTTGTGGCGGAAAAGTA

1.3.2 总 RNA 提取

参照 TRIzol 试剂盒说明书和已报道的方法提取总 RNA^[15-16], 溶解于无 RNA 酶水中, 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性, 紫外分光光度计 (Thermo Scientific NanoDrop Lite) 检测 RNA 纯度和浓度。

1.3.3 *Bmyan* 基因克隆和序列分析

用 OligodT 和五龄 3 d 总 RNA 合成 cDNA 第一链。分别用 *Actin3* 和 *Bmyan* 的引物进行 PCR 扩增。反应条件为: 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。依次对目的片段进行连接、转化、筛选和验证。最后将阳性质粒送生工生物测序。

1.4 家蚕 *Bmyan* 基因的表达模式

利用 RT-PCR, 以不同发育时期整蚕和五龄 3 d 组织的总 RNA 合成的 cDNA 第一链为模板, *A3* 作内参, 分析 *Bmyan* 的表达。参照试剂盒和仪器说明书, 用 7500 Fast Real-Time PCR System 对 *Bmyan* 进行荧光定量 PCR 检测。从 <http://www.silkbdb.org/microarray/download.html>^[17] 下载 *Bmyan* 在家蚕不同组织中表达的芯片数据进行分析。

1.5 *Bmyan* 基因 3'UTR 的克隆

用 3'-Full RACE Core Set Ver.2.0 试剂盒克隆 *Bmyan* 基因 3'-UTR 全长。将 3.0 μL (约 3 μg) 总 RNA 变性后进行逆转录合成 cDNA 第一链。用 cDNA 第一链为模板进行套式 PCR 扩增。Outer PCR 反应条件为: 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 30 s, 62 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 20 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。Inner PCR 反应条件为: 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 30 s,

65 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min。然后依次进行目的条带的回收、连接、转化、阳性质粒的筛选和检测。

1.6 *Bmyan* 基因和 3'-UTR 的序列分析

用果蝇 YAN 的氨基酸序列检索家蚕基因组数据库, 得到编号为 BGIBMGA001167-TA 的基因, 将之命名为 *Bmyan*。通过 NCBI 的 Blast 程序进行比对, 下载其他物种的 YAN 氨基酸序列。用在线 SMART 程序对 *Bmyan* 基因的蛋白序列进行结构域分析。将 *Bmyan* 基因的氨基酸序列与其他物种 YAN 的氨基酸序列用 MEGA 6.0 软件进行多序列比对, 构建分子进化树。bmo-miR-7 的序列 UGGAAGACUAGUGAUUUUGUUGU 下载于 MiRBase (<http://www.mirbase.org/>)^[18]。用 RNAhybrid (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/>)^[19] 在线预测 *Bmyan* 3'-UTR 序列上 bmo-miR-7 的靶位点。

1.7 基因 *Bmyan* 3'-UTR 的载体构建

以五龄 3 d 整蚕的 DNA 为模板从家蚕基因组 DNA 上扩增 *A3* 启动子序列。反应参数 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。用限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Sac* I 对 *A3* 启动子 PCR 产物进行双酶切。将回收的酶切产物连接到经 *Kpn* I 和 *Sac* I 双酶切处理的 pGL3 [luc-SV40] 载体上, 构建成载体 pGL3[A3-luc-SV40]。从 *Bmyan* 的 3'-UTR 质粒 DNA 上扩增得 *Bmyan* 的 3'-UTR 片段。PCR 条件: 94 °C 预变性 4 min, 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 °C 终延伸 10 min。用 *Xba* I 分别单酶切 *Bmyan* 3'-UTR 的 PCR 产物和载体 pGL3[A3-luc-SV40], 回收酶切产物, 构

建成载体 pGL3[A3-luc-*Bmyan* 3'UTR-SV40]。

1.8 载体 pGL3[A3-luc-*Bmyan* 3'UTR-SV40] 与 bmo-miR-7 mimics 共转染

用家蚕胚胎细胞系 BmE 进行转染实验。两个对照组分别转染 pGL3[A3-luc-SV40] 和 pGL3[A3-luc-*Bmyan* 3'UTR-SV40] 质粒；实验组用重组质粒 pGL3[A3-luc-*Bmyan* 3'UTR-SV40] 和 bmo-miR-7 mimic 进行共转染。都加入 1/10 pGL3 质粒量的海肾荧光素酶质粒作为内参，以消除转染时各孔之间的误差。每组设 3 个生物学重复。以萤火虫荧光素酶的酶活性值除以相应海肾荧光素酶的酶活性值作为最后的相对荧光值进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 *Bmyan* 基因的克隆和序列分析

2.1.1 *Bmyan* 基因的 CDS 克隆

以五龄 3 d 头部的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增，得到一条约 1 400 bp 的片段（图 1A）。回收 PCR 扩增的目的片段，依次进行连接、转化、筛选和培养，然后抽提质粒 DNA（图 1B）。用 *Bam* H I 和 *Hind* III 双酶切以及质粒 PCR 鉴定滞后质粒，发现酶切片段与 PCR 扩增片段大小一致，初步说明该质粒是重组质粒，该克隆是阳性克隆（图 1C）。将此克隆进行测序验证。经克隆、测序和拼接得到 *Bmyan* 的 CDS 全长序列与 SilkDB 数据库里的编号为 BGIBMGA001167-TA 的 CDS 一致。

2.1.2 *Bmyan* 的序列分析

Bmyan 基因定位于 13 号染色体上，CDS 长 1 431 bp，编码 476 个氨基酸。*Bmyan* 基因有 4 个外显子和 3 个内含子。它有 SAM-PNT 蛋白结构域和 ETs 蛋白结构域。SAM-PNT 蛋白结构域

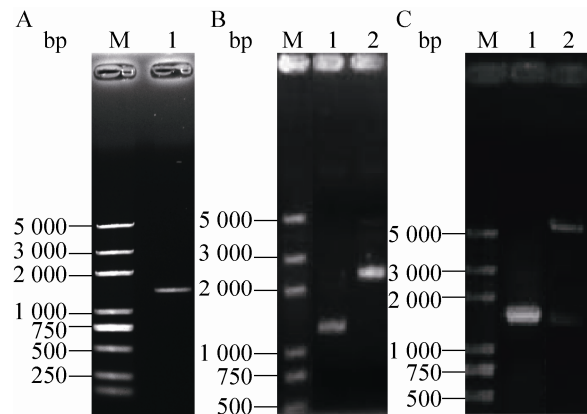


图 1 *Bmyan* 基因的克隆

Fig. 1 Cloning of *Bmyan*. (A) PCR product. M: marker DL2 000; 2: PCR product. (B) Retarded plasmid. 1: retarded plasmid; 2: blue clone. (C) PCR of plasmid and plasmid digested by *Bam*H I and *Hind* III. 1: PCR of *Bmyan* plasmid; 2: *Bmyan* plasmid digested by *Bam*H I and *Hind* III.

在信号传导中起作用，而 ETS 蛋白结构域是一种转录因子，结合在基因组上特异的 DNA 序列上，诱导或者抑制基因转录，它包含 3 个 α -螺旋和 4 股 β -片层，组成一个螺旋-转角-螺旋结构，第 3 个 α -螺旋负责与 DNA 的大沟结合。

用 *Bmyan* 的氨基酸序列在 NCBI 上进行 Blast 在线比对，发现家蚕的 *Bmyan* 的氨基酸序列与黑麦金斑蝶 *Danaus plexippus* 的最相似，有 87% 的一致性，与赤拟谷盗 *Tribolium castaneu* 和毁侧沟茧蜂 *Microplitis demolitor* 有 62% 的一致性，与斑马鱼 *Danio rerio* 有 35% 的一致性。*Bmyan* 蛋白与其他真核生物特别是昆虫的 YAN 蛋白序列相似性较高。用 MEGA 6 对不同物种 YAN 的氨基酸序列进行多序列比对，构建分子进化树（图 2）。由进化树可以看出，不同目和科的昆虫聚在不同的分支上，家蚕和同为鳞翅目昆虫的黑麦金斑蝶聚在一起，进化距离最近，与赤拟谷盗 *Tribolium castaneum* 和山松甲虫

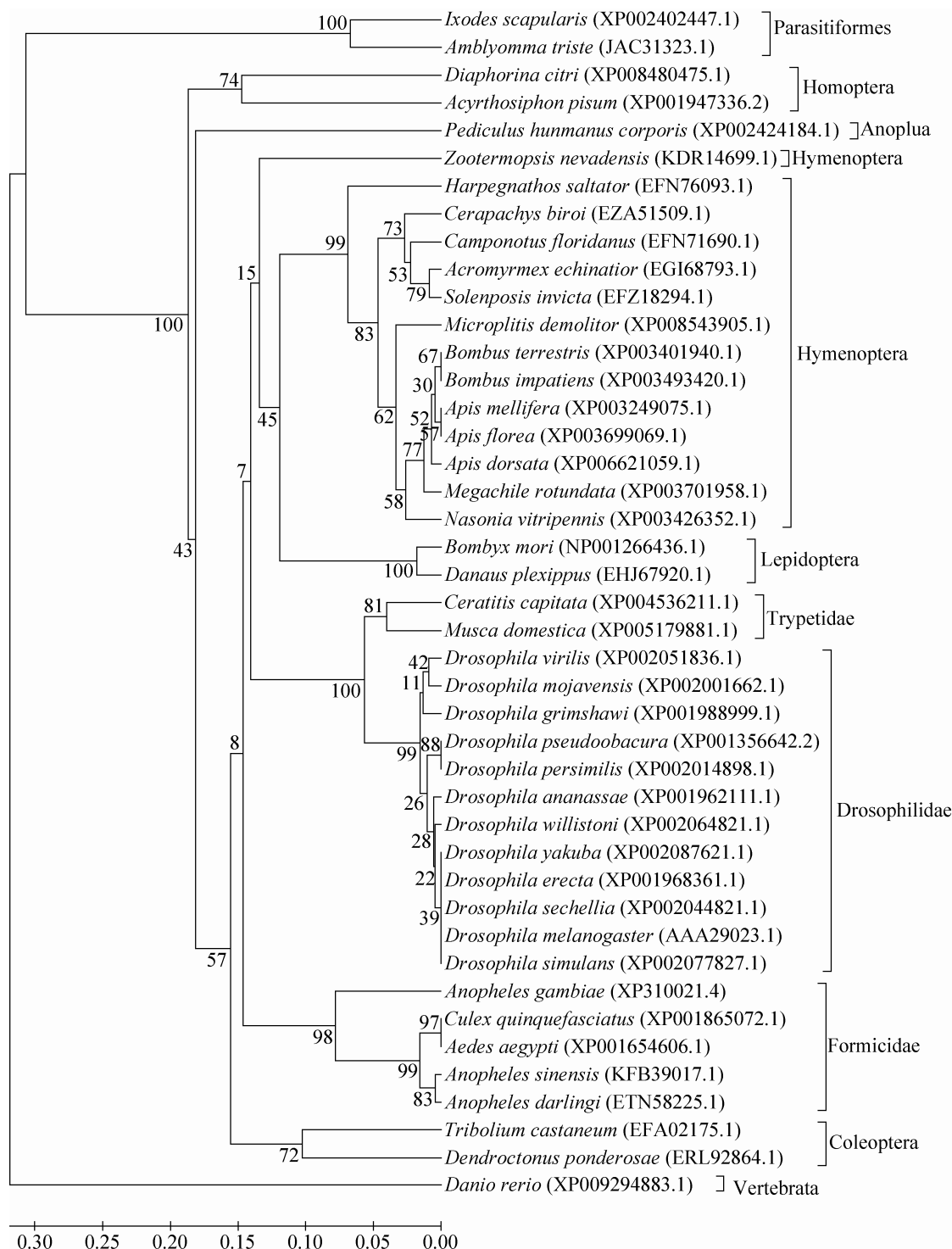


图 2 家蚕 *Bmyan* 及其他生物同源体 YAN 蛋白氨基酸序列的分子系统进化树

Fig. 2 Phylogenetic tree of *Bmyan* from *B. mori* and other species.

Dendroctonus ponderosae 等鞘翅目昆虫也有较近的距离,但与蛛形纲 Arachnoidea 中的寄螨目 Parasitiformes 和脊椎动物中的斑马鱼 *Danio rerio* 有较远的进化距离。

2.2 *Bmyan* 在家蚕中的表达分析

基于 RT-PCR 检测, *Bmyan* 在幼虫期,从一龄到五龄, *Bmyan* 的表达量比较稳定,但在五

龄 7 d 和刚上簇时无表达,从吐丝完毕到化蛹 4 d 时期高量表达,化蛹第 5 天和第 6 天低量表达,第 7 天又高量表达,蛹第 8 天低量表达 (图 3A 和 3B), *Bmyan* 在五龄 3 d 家蚕的头部、体壁和卵巢组织中高量表达,在中肠、精巢和血液中也表达,而在其余组织中未检测到 (图 3C)。下载家蚕全基因组芯片数据^[17],分析 *Bmyan* 基

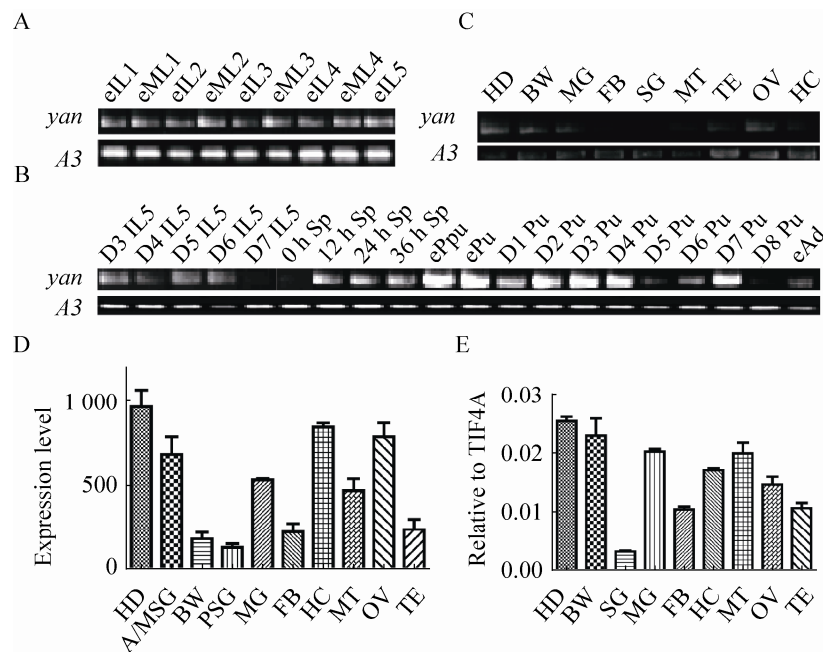


图 3 家蚕 *Bmyan* 的表达模式

Fig. 3 Expression profile of *Bmyan* in the silkworm. (A) RT-PCR based expression patterns of *Bmyan* in the larval stage of silkworm. eIL1: early 1st instar larva; eML1: early 1st molt larva; eIL2: early 2nd instar larva; eML2: early 2nd molt larva; eIL3: Early 3rd instar larva; eML3: early 3rd molt larva; eIL4: early 4th instar larva; eML4: early 4th molt larva; eIL5: early 5th instar larva. (B) RT-PCR based expression patterns of *Bmyan* in fifth instar and pupal stage. D3IL5: day-3 fifth instar larva; D4IL5: day-4 fifth instar larva; D5IL5: day-5 fifth instar larva; D6IL5: day-6 fifth instar larva; D7IL5: day-7 fifth instar larva; 0 h Sp: 0 h spinning; 12 h Sp: 12 h spinning; 24 h Sp: 24 h spinning; 36 h Sp: 36 h spinning; ePpu: early prepupa; ePu: early pupa; D1Pu: 1 d pupa; D2Pu: 2 d pupa; D3Pu: 3 d pupa; D4Pu: 4 d pupa; D5Pu: 5 d pupa; D6Pu: 6 d pupa; D7Pu: 7 d pupa; D8Pu: 8 d pupa; eAd: early adult moth. (C) RT-PCR based spatial expression profile of *Bmyan* in fifth instar larval silkworm. HD: head of silkworm; BW: body wall; MG: midgut; FB: fat body; SG: silk gland; MT: malpighian; HC: hemocyte; OV: ovary; TE: testis. (D) Microarray-based spatial expression of *Bmyan* in fifth instar larval silkworm. HD: head of female; BW: body wall; A/MSG: anterior/middle silk gland. PSG: posterior silk gland; MG: midgut; FB: fat body; HC: hemocyte; MT: malpighian; OV: ovary; TE: testis. The microarray data was downloaded from <http://www.silkdb.org/microarray/download.html>^[17]. (E) qPCR-based spatial expression of *Bmyan* in fifth instar larval silkworm. HD: head of silkworm; BW: body wall; SG:anterior/middle silk gland; MG: midgut; FB: fat body; HC: hemocyte; MT: malpighian; OV: ovary; TE: testis. Error bars $\bar{x} \pm s$.

因在家蚕五龄 3 d 不同组织中的表达模式,它在头部、体壁、血液和卵巢中表达量较高,在前中部丝腺、后部丝腺和脂肪体中低量表达或不表达(图 3D)。为了进一步验证 *Bmyan* 基因在家蚕不同组织中的表达,我们另外取了 3 组生物学重复材料,用定量 PCR 进行检测,结果与 RT-PCR 和芯片实验结果基本上是一致的,即在头部、体壁和卵巢中高量表达,在丝腺、脂肪体和精巢中表达量较低或不表达(图 3E)。

2.3 *Bmyan* 的 3'UTR 克隆和 bmo-miR-7 靶位点预测

按 3'RACE 试剂盒说明书对五龄 3 d 家蚕的头部总 RNA 进行反转录,然后对 *Bmyan* 的 3'UTR 进行套式 PCR 扩增,得到约 1 000 nt 的目的片段(图 4A)。将切胶回收的目的片段连接到 pMD19-T 载体,连接产物转化 DH5 α 感受态细胞,再依次进行铺板、挑斑和培养。提取质粒 DNA 电泳检测滞后质粒(图 4B)。用质粒 PCR 对滞后质粒进行鉴定,质粒 PCR 片段与套式

PCR 扩增片段大小一致(图 4C),说明该质粒是重组质粒,对应的克隆是阳性克隆。将此克隆测序得到 *Bmyan* 3'UTR(长度为 571 nt),序列提交至 GenBank,序列号为 KT934311。

用 RNAhybrid 在线软件预测 bmo-miR-7 的靶位点,发现在 *Bmyan* 3'UTR 的 97–117 和 479–498 碱基处分别有一个靶位点(图 5A)。97–117 靶位点的 mfe 为–27.9 kcal/mol,479–498 靶位点的 mfe 为–21.6 kcal/mol。基于预测,家蚕 *Bmyan* 可能是 bmo-miR-7 的靶基因。

2.4 转染载体构建和 miR-7 靶位点验证

为了验证 *Bmyan* 是否是 bmo-miR-7 的靶基因,我们构建了含有 *Bmyan* 3'UTR 的荧光素酶报告基因载体。先以五龄 3 d 整蚕的 cDNA 为模板,扩增 A3 启动子序列,得到一条约 750 bp 的片段(图 5B-a),用限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Sac* I 双酶切 A3 的 PCR 产物,将回收得到的 A3 启动子片段连接到经 *Kpn* I 和 *Sac* I 双酶切的 pGL3[luc-SV40]载体上,构建载体 pGL3[A3-luc-SV40](图 5B-b)。以 *Bmyan* 3'UTR 质粒载体为模板,扩增得到 *Bmyan* 3'-UTR 片段(图 5B-c)。用限制性内切酶 *Xba* I 单酶切 *Bmyan* 3'-UTR 的 PCR 产物,纯化后获得 *Bmyan* 3'UTR 片段,连接到经 *Xba* I 酶切的 pGL3[A3-luc-SV40]载体上,构建成转染载体 pGL3[A3-luc-*Bmyan* 3'UTR-SV40](图 5B-d)。共转染 48 h 后测出每一组的荧光素酶活性值。与对照相比,实验组的荧光素酶活比值明显下降。bmo-miR-7 mimics 对于 pGL3[A3-luc-*Bmyan* 3'UTR-SV40]的表达是有抑制作用,所以 *Bmyan* 是 bmo-miR-7 的靶基因。

3 讨论

Bmyan 在家蚕头部表达量最高(图 3),暗

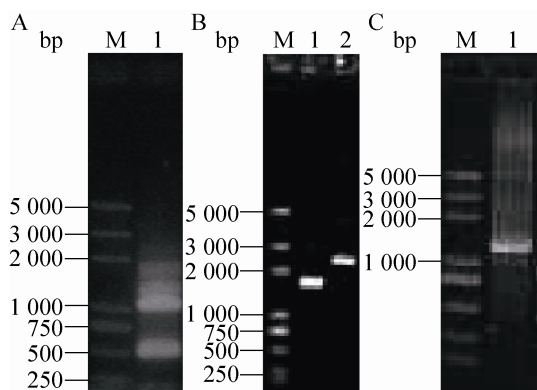


图 4 *Bmyan* 的 3'UTR 克隆

Fig. 4 Cloning of *Bmyan* 3'UTR. (A) 3'RACE PCR products. M: marker DL2 000; 1: 3'RACE PCR product of *Bmyan*. (B) retarded plasmid. M: marker DL2 000; 1: blue clone; 2: retarded plasmid of *Bmyan* 3'RACE. (C) PCR of plasmid. M: marker DL2000; 1: PCR product of *Bmyan* 3'RACE plasmid.

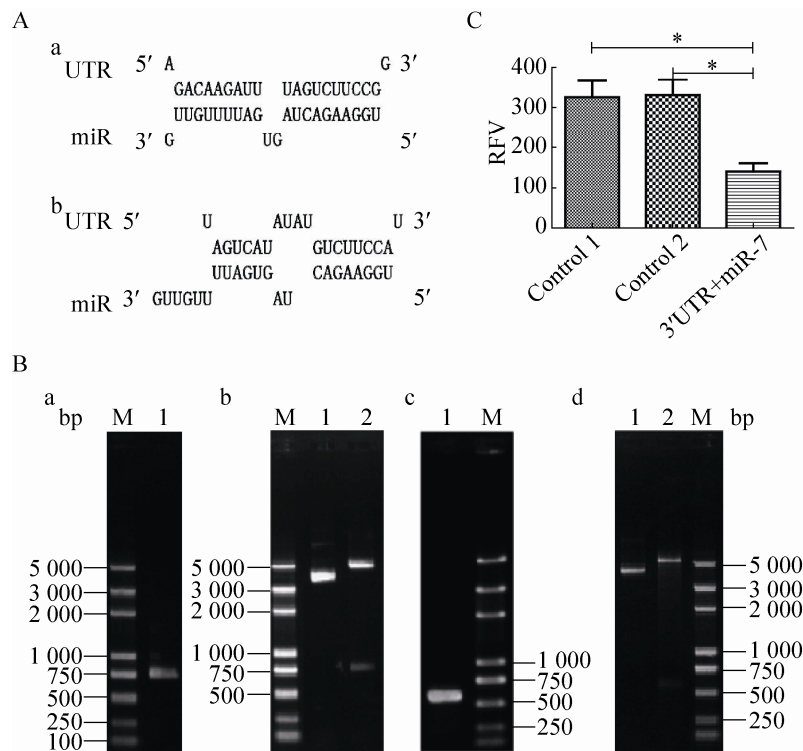


图5 *Bmyan* 3'-UTR 上 *bmo-miR-7* 靶位点的预测和验证

Fig. 5 Target site prediction and experimental confirmation of *bmo-miR-7* within the 3'-UTR of *Bmyan*. (A) Predicted target sites of *bmo-miR-7* within *Bmyan* 3'-UTR. (a) target site at 97th nt of 3'-UTR. (b) target site at 479th nt of 3'-UTR. (B) Construction of luciferase reporter. (a) PCR of A3 promoter. M: marker DL2 000; 1: PCR product of A3 promoter. (b) plasmid digested with *Kpn* I and *Sac* I. M: marker DL2 000; 1: pGL3[A3-luc-SV40] plasmid; 2: pGL3[A3-luc-SV40] plasmid digested with *Kpn* I and *Sac* I. (c) PCR of *Bmyan* 3'-UTR. M: marker DL2 000; 1: PCR product of *Bmyan* 3'-UTR. (d) plasmid digested with *Xba* I. M: marker DL2 000; 1: pGL3[A3-luc-*Bmyan* 3'UTR-SV40]; 2: product of pGL3[A3-luc-*Bmyan* 3'UTR-SV40] digested with *Xba* I. (C) Target validation by luciferase reporter assay. RFV: relative fluorescence value; Control 1: pGL3[A3-luc-SV40]; Control2: pGL3[A3-luc-*Bmyan* 3'UTR-SV40]; 3'-UTR+miR-7: Co-transfection of pGL3[A3-luc-*Bmyan* 3'UTR-SV40] and *bmo-miR-7* mimics. * $P < 0.05$. Error bars $\bar{x} \pm s$.

示其在家蚕脑或神经系统以及眼睛中有重要的调控作用。在家蚕胚胎发生初期，控制形态发生的早期基因就开始表达，调控家蚕光感受器的分化、复眼的发育以及神经系统和其他器官的发生。在胚胎发生期间，*Bmyan* 可能起着重要的调控作用。*yan* 基因从果蝇胚胎发育早期开始表达，在果蝇三龄幼虫中，*yan* 基因在眼成虫

盘 (Imaginal disc) 形态发生沟的内部和后面以及脑叠状前体细胞中均有表达^[20]。除了调控眼的发育^[21-23]，*yan* 基因在果蝇形态发生中也有重要作用^[24]。*Bmyan* 在家蚕五龄 3 d 幼虫的体壁、中肠、卵巢、马氏管和血液中也有一定的表达量，但在丝腺和脂肪体中表达量很低或不表达，暗示除了神经系统和眼睛，*Bmyan* 在家蚕幼虫

期其他器官或非神经细胞中也有调控作用,或许与维持细胞的去分化状态有关。

YAN 蛋白的组成和初级结构是高度保守的(图 2)。miR-7 从无脊椎动物到脊椎动物都具有高度的保守性。这暗示了它们在这些生物中都具有重要的调节作用。miR-7 在脊椎动物脑的神经分泌细胞中特异表达,也存在于无脊椎动物神经系统中^[8,25-26]。Bmo-miR-7 存在于家蚕的头部、体壁、卵巢和精巢中^[13],暗示它与家蚕这些组织和器官的分化和发育或细胞的代谢调节有关。我们找到了 bmo-miR-7 在 *Bmyan* 3'-UTR 的两个靶位点(图 5A),细胞水平实验证实了 bmo-miR-7 对 *Bmyan* 起到负调控作用(图 5C),后面有必要对这两个靶位点的效率进行比较,以更好地研究 bmo-miR-7 与 *Bmyan* 之间的调控关系和它们在家蚕体内的生物学功能。

4 结论

本研究对家蚕 *Bmyan* 进行了克隆和表达分析,克隆了 *Bmyan* 的 3'-UTR 序列并预测了 bmo-miR-7 的靶位点,构建了含有家蚕特异启动子 A3 和 *Bmyan* 3'-UTR 序列的荧光素酶报告基因载体,在细胞水平上验证了 bmo-miR-7 和 *Bmyan* 基因之间的调控关系,为以后深入研究 bmo-miR-7 和 *Bmyan* 的功能奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Lai ZC, Rubin GM. Negative control of photoreceptor development in *Drosophila* by the product of the yan gene, an ETS domain protein. *Cell*, 1992, 70(4): 609–620.
- [2] Li X, Carthew RW. A microRNA mediates EGF receptor signaling and promotes photoreceptor differentiation in the *Drosophila* eye. *Cell*, 2005, 123(7): 1267–1277.
- [3] Boisclair Lachance JF, Peláez N, Cassidy JJ, et al. A comparative study of Pointed and Yan expression reveals new complexity to the transcriptional networks downstream of receptor tyrosine kinase signaling. *Dev Biol*, 2014, 385(2): 263–278.
- [4] Vivekanand P, Tootle TL, Rebay I. MAE, a dual regulator of the EGFR signaling pathway, is a target of the Ets transcription factors PNT and YAN. *Mech Dev*, 2004, 121(12): 1469–1479.
- [5] Lai ZC, Fetchko M, Li Y. Repression of *Drosophila* photoreceptor cell fate through cooperative action of two transcriptional repressors Yan and Tramtrack. *Genetics*, 1997, 147(3): 1131–1137.
- [6] Mavrothalassitis G, Ghysdael J. Proteins of the ETS family with transcriptional repressor activity. *Oncogene*, 2000, 19(55): 6524–6532.
- [7] Hsu T, Schulz RA. Sequence and functional properties of Ets genes in the model organism *Drosophila*. *Oncogene*, 2000, 19(55): 6409–6416.
- [8] Li X, Cassidy JJ, Reinke CA, et al. A microRNA imparts robustness against environmental fluctuation during development. *Cell*, 2009, 137(2): 273–282.
- [9] Xia QY, Zhou ZY, LU C, et al. A draft sequence for the genome of the domesticated silkworm (*Bombyx mori*). *Science*, 2004, 306(5703): 1937–1940.
- [10] Mita K, Kasahara M, Sasaki S, et al. The genome sequence of silkworm, *Bombyx mori*. *DNA Res*, 2004, 11(1): 27–35.
- [11] Liu SP, Zhang L, Li QB, et al. MicroRNA expression profiling during the life cycle of the silkworm (*Bombyx mori*). *BMC Genomics*, 2009, 10: 455.
- [12] Liu SP, Li D, Li QB, et al. MicroRNAs of *Bombyx mori* identified by Solexa sequencing. *BMC Genomics*, 2010, 11: 148.
- [13] Liu SP, Gao S, Zhang DY, et al. MicroRNAs show diverse and dynamic expression patterns in multiple tissues of *Bombyx mori*. *BMC Genomics*, 2010, 11: 85.
- [14] Yu X, Zhou Q, Li SC, et al. The silkworm (*Bombyx*

- mori*) microRNAs and their expressions in multiple developmental stages. PLoS ONE, 2008, 3(8): e2997.
- [15] Liu SP, Xia QY, Zhao P, et al. Characterization and expression patterns of let-7 microRNA in the silkworm (*Bombyx mori*). BMC Dev Biol, 2007, 7: 88.
- [16] Liu SP, Xia QY. Protocol of Northern blotting hybridization for microRNA detection of silkworm (*Bombyx mori*). Sci Sericul, 2014, 40(4): 724–729 (in Chinese).
刘仕平, 夏庆友. Northern 杂交检测家蚕 microRNA 的技术流程. 蚕业科学, 2014, 40(4): 724–729.
- [17] Xia QY, Cheng DJ, Duan J, et al. Microarray-based gene expression profiles in multiple tissues of the domesticated silkworm, *Bombyx mori*. Genome Biol, 2007, 8(8): R162.
- [18] Kozomara A, Griffiths-jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. Nucleic Acids Res, 2014, 42 (Database issue): D68–D73.
- [19] Rehmsmeier M, Steffen P, Hochsmann M, et al. Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. RNA, 2004, 10(10): 1507–1517.
- [20] Gabay L, Scholz H, Golembo M, et al. EGF receptor signaling induces pointed P1 transcription and inactivates Yan protein in the *Drosophila* embryonic ventral ectoderm. Development, 1996, 122(11): 3355–3362.
- [21] Behan KJ, Nichols CD, Cheung TL, et al. Yan regulates Lozenge during *Drosophila* eye development. Dev Genes Evol, 2002, 212(6): 267–276.
- [22] Ramos E, Price M, Rohrbaugh M, et al. Identifying functional cis-acting regulatory modules of the *yan* gene in *Drosophila melanogaster*. Dev Genes Evol, 2003, 213(2): 83–89.
- [23] Rohrbaugh M, Ramos E, Nguyen D, et al. Notch activation of *yan* expression is antagonized by RTK/pointed signaling in the *Drosophila* eye. Curr Biol, 2002, 12(7): 576–581.
- [24] Salzer CL, Elias Y, Kumar JP, et al. The retinal determination gene eyes absent is regulated by the EGF receptor pathway throughout development in *Drosophila*. Genetics, 2010, 184(1): 185–197.
- [25] Lu ZJ, Liu SY, Yao YQ, et al. The effect of miR-7 on behavior and global protein expression in glioma cell lines. Electrophoresis, 2011, 32(24): 3612–3620.
- [26] Chen H, Shalom-Feuerstein R, Riley J, et al. miR-7 and miR-214 are specifically expressed during neuroblastoma differentiation, cortical development and embryonic stem cells differentiation, and control neurite outgrowth *in vitro*. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 394(4): 921–927.

(本文责编 郝丽芳)