

# 家蚕 let-7 microRNA 靶基因 *Bmlin-41* 的克隆表达与调控

周兰庭<sup>1,2</sup>, 周挺<sup>1</sup>, 高君凌<sup>1</sup>, 王伟<sup>1</sup>, 吴小燕<sup>1</sup>, 黄亚玺<sup>1</sup>, 夏庆友<sup>1</sup>, 刘仕平<sup>1</sup>

1 西南大学 家蚕基因组生物学国家重点实验室, 重庆 400716

2 湖北文理学院 医学院, 湖北 襄阳 441053

周兰庭, 周挺, 高君凌, 等. 家蚕 let-7 microRNA 靶基因 *Bmlin-41* 的克隆表达与调控. 生物工程学报, 2016, 32(5): 635-647.

Zhou LT, Zhou T, Gao JL, et al. Cloning and expression profile of *Bmlin-41* and its regulation by the silkworm microRNA let-7. Chin J Biotech, 2016, 32(5): 635-647.

**摘要:** 异时性基因调控细胞增殖和个体发育阶段的转换。家蚕异时性基因在家蚕变态发育过程中也很可能具有重要的调控作用, 但它们的表达模式、生物学功能以及与 microRNA 之间的关系却鲜有报道。本研究首先利用果蝇同源基因 *lin-41* 搜索家蚕基因组数据库中相似序列, 设计引物扩增 *Bmlin-41* 的编码序列, 克隆了家蚕 *Bmlin-41* 基因 CDS, 其长度为 2 166 bp, 编码 721 个氨基酸, 含有 B-box 和 NHL 结构域; 随后, 利用 RT-PCR、qPCR 技术并结合已有的家蚕全基因组芯片数据研究了 *Bmlin-41* 在家蚕中的时空表达模式, 发现 *Bmlin-41* 在从家蚕胚胎到成虫的发育过程中呈逐渐递增的表达趋势, 在五龄 3 d 不同组织中, 于卵巢里表达量最高, 精巢和中肠次之, 而其余组织中低量表达或不表达; 最后, 利用 3'RACE 克隆了 *Bmlin-41* 基因的 3'UTR, 全长 1 434 bp, 用在线软件 RNAhybrid 预测发现 *Bmlin-41* 的 3'UTR 上存在 bmo-let-7 靶位点, 构建了含 *Bmlin-41* 3'UTR 的双荧光素酶报告基因载体, 在 S2 细胞上共转染 *Bmlin-41* 3'UTR 和 bmo-let-7 的模拟物 (Mimics) 和拮抗剂 (Antagomir), bmo-let-7 mimics 显著下调 *Bmlin-41*, bmo-let-7 antagomir 显著上调 *Bmlin-41*, 证实了 *Bmlin-41* 是 bmo-let-7 的靶基因。以上研究结果为深入研究 let-7 miRNA 和 *Bmlin-41* 的功能, 揭示 *Bmlin-41* 和 bmo-let-7 在家蚕变态发育过程中的调控关系提供了新的线索。

**关键词:** 家蚕, 异时性基因, 家蚕 let-7 miRNA, *Bmlin-41*, 表达模式, 靶基因

**Received:** October 15, 2015; **Accepted:** December 16, 2015

**Supported by:** National Basic Research Program of China (973 Program) (No. 2012CB114602); National Natural Science Foundation of China (Nos. 31071136, 31571334), Fundamental and Advanced Research Projects of Chongqing (No. cstc2014jcyjA00025).

**Corresponding author:** Shiping Liu. Tel: +86-23-68251569; E-mail: lsp98668@163.com

国家重点基础研究发展计划 (973 计划) (No. 2012CB114602); 国家自然科学基金 (Nos. 31071136, 31571334), 重庆市基础与前沿研究计划 (No. cstc2014jcyjA00025) 资助。

网络出版时间: 2016-03-07

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20160307.0957.002.html>

## Cloning and expression profile of *Bmlin-41* and its regulation by the silkworm microRNA let-7

Lanting Zhou<sup>1,2</sup>, Ting Zhou<sup>1</sup>, Junling Gao<sup>1</sup>, Wei Wang<sup>1</sup>, Xiaoyan Wu<sup>1</sup>, Yaxi Huang<sup>1</sup>, Qingyou Xia<sup>1</sup>, and Shiping Liu<sup>1</sup>

<sup>1</sup> State Key Laboratory of Silkworm Genome Biology, Southwest University, Chongqing 400716, China

<sup>2</sup> Medical College, Hubei University of Arts and Science, Xiangyang 441053, Hubei, China

**Abstract:** The heterochronic genes regulate cell proliferation and switch development stage transitions. Heterochronic genes might also play important roles in regulating the development of silkworm, but very few of their expression profiles, functions and their relationship with microRNAs are available so far. Firstly, in this work, the primers for cloning *Bmlin-41* were designed based on the homologous sequence of known *Drosophila melanogaster lin-41*, which was used as the query to blast against SilkDB. The obtained full CDS (2 166 bp) of *Bmlin-41* encodes 721 amino acids and contains B-box and NHL domains. Then, the spatiotemporal expression patterns of *Bmlin-41* were characterized by RT-PCR, quantitative real time PCR as well as our lab's previous silkworm genome microarray data. *Bmlin-41* was increasingly expressed from embryonic to adult stage. In diverse tissues of day-3 fifth instar, *Bmlin-41* showed the highest accumulation in ovary, secondly in testis and midgut, but very low expression was observed in other tissues. Finally, 3'UTR of *Bmlin-41* 1 434 bp was cloned by rapid-amplification of cDNA ends (3'RACE) and was predicted to bare two binding sites of bmo-let-7 by using online RNAhybrid. To verify the binding effect, 3'UTR was cloned into psi-CHECK-2 vector and submitted to dual luciferase assay in the S2 cells *in vitro*. The dual luciferase assay demonstrated that *Bmlin-41* was down-regulated by bmo-let-7 mimics and upregulated by bmo-let-7 antagomir, thus confirming the *Bmlin-41* is negatively regulated by bmo-let-7. Our work might help further study on the roles of *Bmlin-41* and bmo-let-7 and their regulation relationship involved in controlling metamorphosis of silkworm.

**Keywords:** silkworm (*Bombyx mori*), heterochronic gene, bmo-let-7 miRNA, *Bmlin-41*, expression profile, target gene

生长和发育具有严格的时序性，时序性发育是由异时性基因 (Heterochronic gene) 调控的细胞有序增殖和分化的结果<sup>[1]</sup>。异时性基因 *lin-4*、*lin-14*、*lin-28*、*lin-42* 和 *lin-29* 共同调控线虫不同发育阶段特定细胞的分裂和分化，以控制线虫的正常发育<sup>[2-6]</sup>。异时性基因 *lin-41* 在线虫幼龄末期下调表达，受其负调控的成虫特异转录因子 *lin-29* 上调表达，促使幼虫向成虫转化<sup>[7]</sup>。当 *lin-41* 缺失突变时，幼虫期缩短，成虫表型提前出现，而当 *lin-41* 过表达时，幼虫期延长<sup>[7]</sup>。LIN-41 蛋白属于 TRIM-NHL 家族，通常含有由 RING 锌指结构、B-BOX 基序、卷曲螺旋结构 (Coiled-coil) 组成的 TRIM 基序和

NHL 结构域，RING 锌指结构具有泛素化连接酶的活性，B-BOX 是一种锌指结构，具有结合 DNA、RNA 和蛋白质的能力，NHL 形成  $\beta$  螺旋结构域，可与蛋白质和 RNA 相结合，不同结构域使 *lin-41* 的功能多样化<sup>[8-9]</sup>。*lin-41* 在生物体内有多种生物学功能，如促进细胞增殖和抑制细胞分化，是细胞全能性和自我更新的调控因子<sup>[10-14]</sup>。

MicroRNA (MiRNA) 是一类长约 22 nt 的非编码 RNA，以互补配对方式和靶基因的 3'UTR 结合诱导沉默复合体 (RNA-induced silencing complex, RISC)，清除靶基因 mRNA 或抑制靶基因 mRNA 的翻译，参与调节新陈代谢、信号传导、细胞增殖、细胞凋亡和细胞分化等

各项生命活动<sup>[15]</sup>。*lin-4* 是第一个被发现的时序性小分子 RNA (Small temporal RNA, *stRNA*) 和 miRNA 奠基成员<sup>[16]</sup>, 是异时性基因 *lin-14* 的负调控子<sup>[17]</sup>, 通过与 *lin-14* 的 3'UTR 上 7 个反向互补位点相结合来实现调控作用<sup>[18]</sup>。*let-7* 是第二个小分子时序 RNA 和奠基性 miRNA<sup>[19,20]</sup>, 通过与靶基因 *lin-14*、*lin-28*、*lin-41*、*lin-42* 和 *daf-12* 的 3'UTR 反向互补结合来调控线虫晚期幼虫和成虫的发育<sup>[7,19,21]</sup>。*let-7* 和 *lin-41* 在不同物种间具有高度保守性, 它们之间的调控关系也存在于果蝇<sup>[10]</sup>和高等动物中<sup>[11-12, 22-23]</sup>。*let-7* 与细胞增殖、组织形成、器官分化以及细胞凋亡等有关<sup>[24-26]</sup>, 还抑制某些肿瘤细胞的生长<sup>[27-30]</sup>。

家蚕 *let-7* 在三龄前期低量表达或不表达, 三龄晚期开始高量表达<sup>[31]</sup>, 调控家蚕从幼虫到成虫的发育<sup>[32]</sup>。然而, 家蚕 *let-7* 是否调节 *Bmlin-41* 以及它们如何控制家蚕变态发育一直未见报道。本研究克隆了家蚕 *lin-41* 基因的编码区序列, 通过 3'RACE 技术获得其全长 3'UTR, 利用共转染和双荧光素酶报告基因载体系统在果蝇细胞 S2 中证明了 *bmo-let-7* 负调控 *Bmlin-41*, 为深入研究家蚕变态发育的分子调控机理奠定了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

家蚕品种为华系二化性大造品种, 由家蚕基因组生物学国家重点实验室提供。家蚕幼虫是在 25 °C 的人工气候箱中用桑叶饲养。

### 1.2 主要试剂

pEASY-T1 和 pEASY-T5 载体购于北京全式金生物技术 (TransGen Biotech) 有限公司。Trizol 购于 Invitrogen 公司。限制性内切酶 *Pst* I、

*Xho* I、*Not* I 和 *Taq* DNA 聚合酶以及 3'-Full RACE Core Set Ver.2.0 试剂盒和实时荧光定量相关试剂均购于 TaKaRa 公司。细胞转染试剂 (X-tremeGENE HP DNA Transfection Reagent) 购于 Roche 公司。超纯质粒提取试剂盒购于 Qiagen 公司。RNase 抑制剂、M-MLV 反转录试剂盒、双荧光素酶报告基因载体 psi-CHECK<sup>TM</sup>-2 Vector 和双荧光素酶报告基因检测试剂盒 (Dual-Glo<sup>®</sup> Luciferase Assay System) 均购于 Promega 公司。*bmo-let-7* 模拟物 (Mimic)、模拟物阴性对照 (Negative control mimic) 和 *bmo-let-7* 拮抗剂 (Antagomir) 购于 Dharmacon 公司。果蝇 S2 细胞和相关细胞培养基购自 Life Technologies 公司。优质胎牛血清 (Fetal Bovine Serum, FBS) 购自 PAA 公司。

### 1.3 引物设计与合成

用软件 primer premier 5.0 设计引物。所有引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

### 1.4 *Bmlin-41* 基因的克隆和序列分析

#### 1.4.1 *Bmlin-41* 基因的克隆

从 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 下载果蝇 LIN-41 的蛋白质序列作为源序列, 在家蚕基因组数据库 SilkDB (<http://silkworm.genomics.org.cn/>) 进行 BLAST 比对。在该基因编码区 (Coding sequence, CDS) 设计正向和反向引物, 上下游引物分别位于起始密码子 ATG 后和终止密码子 TAA 附近。PCR 反应按以下程序进行: 94 °C 预变性 3 min, 然后 94 °C 变性 30 s、54 °C 退火 30 s、72 °C 延伸 1 min, 共 35 个循环, 再 72 °C 终延伸 10 min。将得到的 PCR 产物连接到 pEASY-T5 载体, 经 PCR 和双酶切 (*Pst* I 与 *Not* I) 筛选阳性克隆, 送上海生工生

物工程技术服务有限公司测序验证。

#### 1.4.2 总 RNA 提取和实时定量 PCR 检测

分别取家蚕发育周期的个体材料 (包括胚胎 6 d、四眠、五龄 3 d、预蛹、刚化的蛹和刚的化蛾)、家蚕幼虫阶段 13 个时间点材料 (一龄初、一眠初、一眠末、二龄初、二眠初、二眠末、三龄初、三眠初、三眠末、四龄初、四眠初、四眠末、五龄 3 d) 和五龄 3 d 的组织材料 (头、体壁、丝腺、中肠、脂肪体、精巢、卵巢、血液、马氏管)。使用 Trizol 试剂参照文献中的方法提取和纯化总 RNA<sup>[33]</sup>, 用 M-MLV 合成 cDNA。根据 *Bmlin-41* 基因的 CDS 序列设计实时定量 PCR 引物 *Q-Bmlin-41-F* 和 *Q-Bmlin-41-R* (表 1), 用家蚕真核翻译起始因子 eIF-4A 作为内参基因, 其引物为 *Q-sw22934-F* 和 *Q-sw22934-R* (表 1)。在 ABI 7500 fast real-time PCR 仪上采用两步法标准程序进行定量 PCR 检测, 反应程序如下: 95 °C 预变性 30 s, 然后 95 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 s, 40 个循环, 进入溶解曲线阶段。

#### 1.4.3 *Bmlin-41* 基因的序列分析和 LIN-41 蛋白系统进化树构建

在 ExPaSy (<http://www.expasy.org/tools/>) 网站进行 *Bmlin-41* 基因氨基酸序列的翻译。使用 Sim4 在线程序 (<http://pbil.univ-lyon1.fr/sim4.php>) 与家蚕基因组序列比对鉴定所克隆基因的内含子和外显子结构。使用 SMART 程序 (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) 预测蛋白质结构域。通过 NCBI 的 BLAST 程序进行搜索, 下载 LIN-41 同源体序列, 使用 Clustalx1.83<sup>[34]</sup> 软件进行比对, 用 MEGA 6.0<sup>[35]</sup> 构建系统进化树。

#### 1.5 *Bmlin-41* 基因在家蚕中的时空表达模式

下载家蚕全基因组的组织表达芯片数据<sup>[36]</sup>, 根据芯片中所检测的基因序列查找到 *Bmlin-41*

表 1 本研究所使用的引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')
<i>Bmlin-41</i> -ORF-F	ATGACAACACTGGCAAAA
<i>Bmlin-41</i> -ORF-R	TCAGTTCAGATGTGACACTAG
<i>Bmlin-41</i> -probe-F	TTTTATTGCGAGGCTTGTAT
<i>Bmlin-41</i> -probe-R	TTCTATTCCGTCAGAGTCCAT
<i>Actin3</i> -F	AACACCCCGTCTCTGCTCACTG
<i>Actin3</i> -R	GGGCGAGACGTGTGATTTCT
<i>Q-sw22934</i> -F	TTCGTAAGGCTCTTCTCGT
<i>Q-sw22934</i> -R	CAAAGTTGATAGCAATTCCT
<i>Q-Bmlin-41</i> -F	TCACCAAATCTCGCCTATCG
<i>Q-Bmlin-41</i> -R	TAAAACCTGACCGGGTCTCC
<i>Bmlin-41</i> -3'UTR-F	<u>CCGCTCGAGGGATTTGTGG</u> GCCGTGG
<i>Bmlin-41</i> -3'UTR-R	<u>ATTTGCGGCCGCGGCATACCA</u> ACGCCTAGAAC
<i>Bmlin-41</i> -outer	CAGATATTCAATAGCCGTGGCG
<i>Bmlin-41</i> -inner	TAATGGTGGACCCGACCCTG ACG
3'RACE Outer Primer	TACCGTCGTTCCACTAGTGAT TT
3'RACE Inner Primer	CGCGGATCCTCCACTAGTGAT TTCCTATAGG

The underlined are restriction endonuclease recognition sites.

的芯片数据, 分析 *Bmlin-41* 的组织表达谱。利用 RT-PCR 和实时定量 PCR 方法, 研究 *Bmlin-41* 在家蚕不同发育阶段和五龄 3 d 不同组织中的表达模式。

#### 1.6 *Bmlin41* 基因 3'UTR 的克隆和 *bmo-let-7* 靶位点预测

以 3 μg 五龄 3 d 卵巢的 RNA 为模板, 利用 3'-Full RACE Core Set Ver.2.0 试剂盒进行反转录合成 cDNA。在 CDS 区域的终止密码子上游 600 bp 和 164 bp 处分别设计 *Bmlin-41*-outer 和 *Bmlin-41*-inner 引物, 进行套式 PCR 扩增。outer 反应程序: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min 30 s, 20 个循环; 72 °C 终延伸 10 min。取 1 μL outer 反应液

为模板, 利用引物 *Bmlin-41*-inner 和 3'RACE Inner Primer 进行 inner 反应: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min 30 s, 30 个循环; 72 °C, 10 min。胶回收主带与 pEASY-T1 连接得到 pEASY-T1 [*Bmlin41*-3'RACE]载体, 转化、筛选阳性克隆, 送生工生物公司测序验证。

从 miRBase<sup>[37]</sup> (<http://www.mirbase.org/>) 下载 bmo-let-7-5p 的成熟体序列 UGAGGUAGUAGGUGUAUAGU, 用在线软件 RNAhybrid<sup>[38]</sup> (<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/>) 预测 *Bmlin-41* 3'UTR 上 bmo-let-7 的结合位点。

### 1.7 *Bmlin-41* 基因 3'UTR 双荧光素酶报告基因载体构建和共转染实验

在 *Bmlin-41* 基因 3'UTR 起始碱基设计上游引物 (加 *Xho* I 酶切位点, 见表 1 下划线), 在 poly A 前设计下游引物 (加 *Not* I 酶切位点, 见表 1 下划线), 以测序正确的 pEASY-T1 [*Bmlin41*-3'RACE]载体质粒为模板, 扩增 3'UTR 亚克隆片段, 反应条件为: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 68 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min 30 s, 30 个循环; 72 °C 终延伸 10 min。切胶回收后连接得到 pEASY-T1 [*Bmlin41*-3'UTR]载体。测序正确后, 用 *Xho* I 和 *Not* I 分别酶切 pEASY-T1 [*Bmlin41*-3'UTR]载体和 psi-CHECK-2 载体, 胶回收后, 顺次进行连接、转化、挑斑和测序验证, 得到 *Bmlin-41* 基因 3'UTR 的双荧光素酶报告基因载体 psi [*Bmlin41*-3'UTR]。

提取 psi [*Bmlin41*-3'UTR]载体的超纯质粒, 将果蝇 S2 细胞接种到 24 孔板, 待细胞长至 80% 时, 利用转染试剂 X-tremeGENE, 把 1 μg *Bmlin-41* 基因 3'UTR 报告基因载体 psi-CHECK-2 [*Bmlin41*-3'UTR]质粒分别与 bmo-let-7 模拟物

(Mimics)、拮抗剂 (Antagomir) 和对照进行共转染。设计 4 组实验, 分别为 psi [*Bmlin41*-3'UTR] 组、psi [*Bmlin41*-3'UTR]+ negative control mimics (终浓度 50 μmol/L) 组、psi [*Bmlin41*-3'UTR]+bmo-let-7 mimics (终浓度 50 μmol/L) 组、psi [*Bmlin41*-3'UTR]+bmo-let-7 antagomir (终浓度 250 μmol/L) 组, 各设 3 个生物学重复。48 h 后, 收集细胞, 加入适量 PBS, 按照 Dual-Glo<sup>®</sup> Luciferase Assay System 试剂盒说明书, 加入荧光素酶试剂底物, 10 min 后, 测定萤火虫荧光值, 加入终止液, 10 min 后, 测定海肾荧光值。

### 1.8 数据统计和分析

双荧光素酶活性以海肾荧光值/萤火虫荧光值作比较, 均一化后, 应用 GraphPad prism 5.0. 软件进行统计分析, 数据以平均值+标准误 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 采用 Unpaired *t* 检验进行差异显著性分析, 双尾检验 (Two-tailed)  $P < 0.05$  表示显著性差异,  $P < 0.01$  表示极显著性差异。

## 2 结果与分析

### 2.1 *Bmlin-41* 基因的克隆和序列分析

在家蚕基因组数据库中, 利用果蝇的 LIN-41 氨基酸序列 (GenBank 登录号 AAM68901.1) 进行 BLAST 比对, 检索到一条编号为 BGIBMGA002757 的同源基因, 将之命名为 *Bmlin-41*。以家蚕五龄 3 d 卵巢的 cDNA 为模板, 用引物 *Bmlin-41*-F 和 *Bmlin-41*-R 进行 PCR 扩增, 得到 1 条约 2 000 bp 的目的片段 (图 1A)。用 *Pst* I 和 *Not* I 双酶切及质粒 PCR 鉴定阳性克隆, 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 (图 1B)。测序验证后, 发现该基因序列长 2 166 bp, 与 BGIBMGA002757

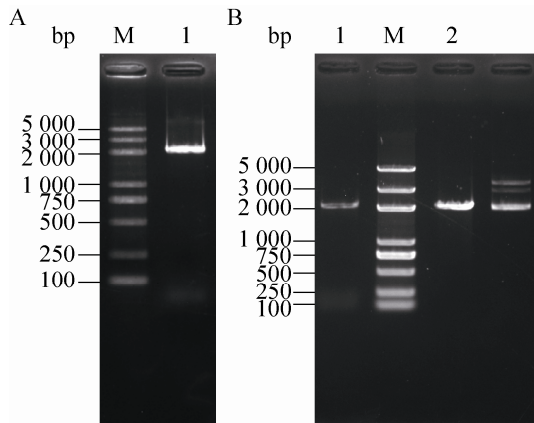


图1 *Bmlin-41* 基因 CDS 的克隆

Fig. 1 Cloning of *Bmlin-41* coding sequence. (A) PCR product of *Bmlin-41* CDS. M: DNA marker; 1: PCR product. (B) PCR and restriction digestion of positive plasmid. M: DNA marker; 1: PCR of positive plasmid; 2: recovered fragments of *Bmlin-41* CDS; 3: double restriction digestion of positive plasmid by *Pst* I and *Not* I.

基因序列一致。

*Bmlin-41* 基因位于家蚕 nscaf2564 上, 单外显子, 预测其编码 721 个氨基酸, 用在线 SMART

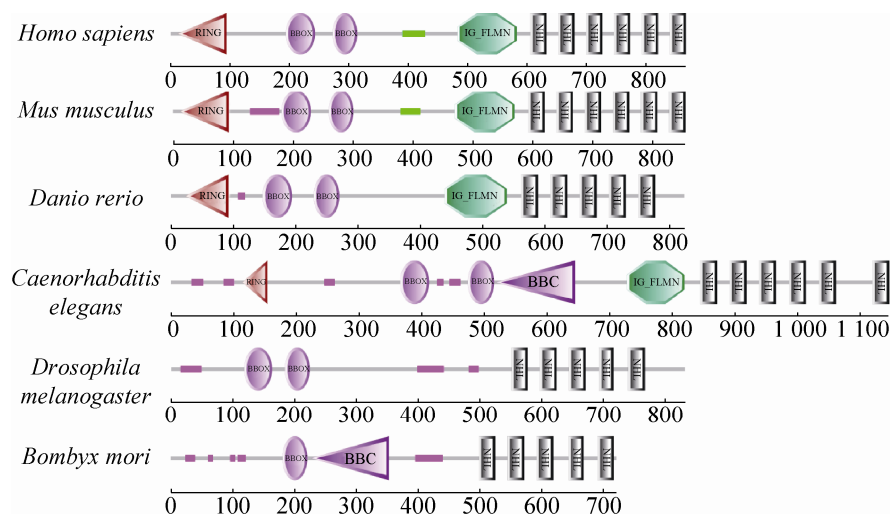


图2 LIN-41 蛋白结构域预测

Fig. 2 Predicted domains of LIN-41. All domains were predicted by SMART online at <http://smart.embl-heidelberg.de/smart><sup>[39]</sup>. RING: Ring finger; IG\_FLMN: Filamin-type immunoglobulin domains; BBOX: B-box-type zinc finger domains; BBC: B-Box C-terminal domain; The NHL repeat: named after NCL-1, HT2A and Lin-41, is found largely in a large number of eukaryotic and prokaryotic proteins.

程序对家蚕 *Bombyx mori* 的 LIN-41 蛋白进行结构域分析, 并与其他几个物种包括智人 *Homo sapiens*、小家鼠 *Mus Musculus*、斑马鱼 *Danio rerio*、秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans*、黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*) 的 LIN-41 结构域进行比较 (图 2)。BmLIN-41 蛋白结构具有 TRIM-NHL 家族的典型锌指结构域 B-BOX、卷曲螺旋结构域 (B-Box C-terminal domain) BBC 和能够形成  $\beta$  螺旋结构域的 NHL。

用 *Bmlin-41* 的蛋白质氨基酸序列在 NCBI 上 BLAST 搜索, 发现家蚕 *Bmlin-41* 与鳞翅目 Lepidoptera 的小菜蛾 *Plutella xylostella* 和黑脉金斑蝶 *Danaus plexippus* 的很相似, 分别有 87% 和 84% 的一致性, 其次和双翅目 Diptera 的中华按蚊 *Anopheles sinensis* 和 *Drosophila* 致倦库蚊 *Culex quinquefasciatus* 的相似度分别为 63% 和 45%, 与线虫 *Caenorhabditis elegans*、斑马鱼 *Danio rerio*、和哺乳动物的相似性都低于 40%。用 MEGA 6.0 构建系统发育树 (图 3)。由系统树

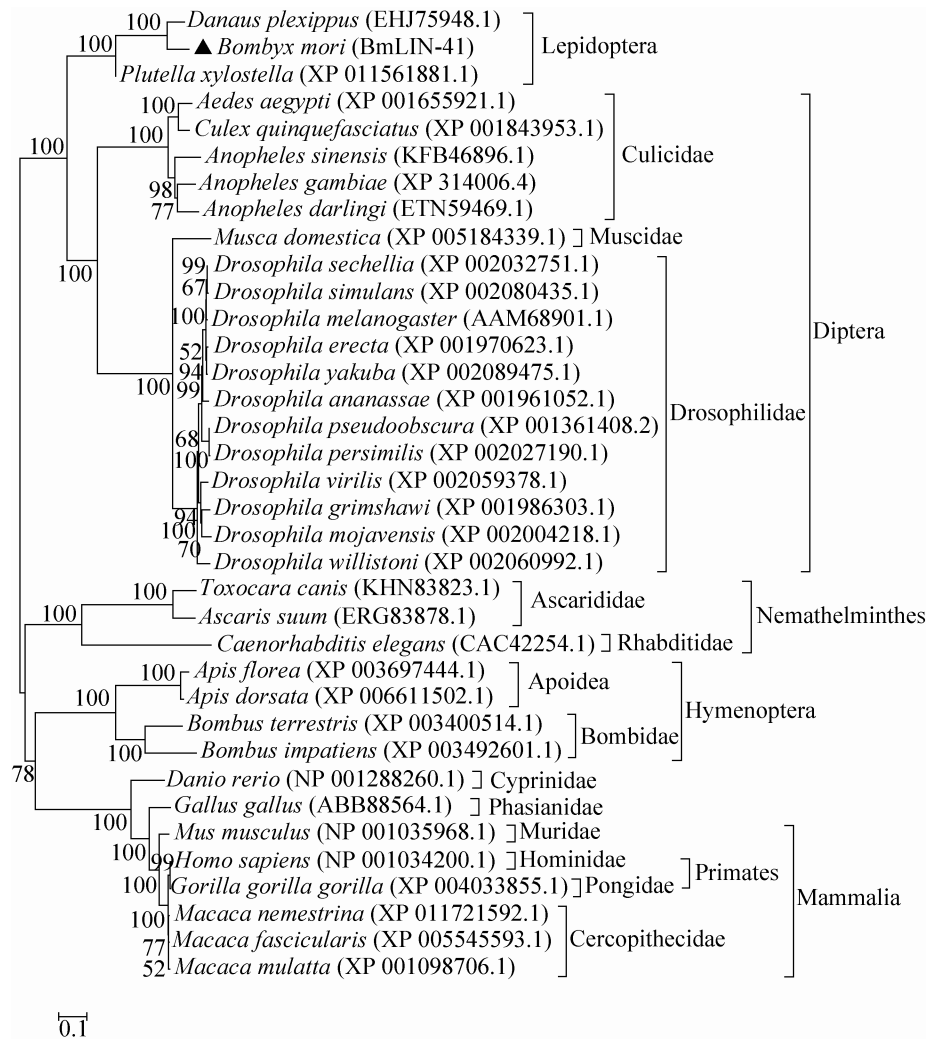


图 3 LIN-41 氨基酸序列系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of LIN-41 based on amino acid sequences. The phylogenetic tree was constructed with the MEGA 6.0 by the neighbor-joining (NJ) method with amino acid sequences of BmLIN-41 and its homologues. The bootstrap method was used in this phylogeny test and poisson model was selected for the substitution model.

可见，不同科和目的动物分别聚在一起。蚊科 Culicidae 的 5 种昆虫聚在一个进化枝上，果蝇科 Drosophilidae 的 12 种果蝇聚在一起，与家蝇科 Muscidae 中的家蝇 *Musca domestica* L. 明显分开，蚊科、果蝇科和家蝇科的昆虫又聚在上一级的双翅目上。家蚕和同为鳞翅目的黑脉金斑蝶与小菜蛾进化距离最近，它们聚在一个分类枝上，与双翅目的蚊子和果蝇分开。膜翅目中，

蜜蜂科 Apoidea 的小蜜蜂 *Apis florea* 和大蜜蜂 *Apis dorsata* 聚在一个小分支上，熊蜂科 Bombidae 欧洲熊蜂 *Bombus terrestris* 和北美大黄蜂 *Bombus impatiens* 聚在另一个小分支上，蜜蜂科与熊蜂科聚在上一级的膜翅目中，膜翅目与脊椎动物之间的进化距离要比与系统树中其他目昆虫之间的进化距离近些。线虫纲 Nematode 中，蛔虫科 Ascarididae 的犬弓首蛔虫

*Toxocara canis* 和猪蛔虫 *Ascaris suum* 聚在一起, 再与小杆科 Rhabditidae 的秀丽隐杆线虫 *Caenorhabditis elegans* 聚在高一级线虫动物门 Nematelminthes 上, 又与膜翅目昆虫和脊椎动物聚在更高一级进化支上。人科 Hominidae、猩猩科 Pongidae 和猴科 Cercopithecidae 彼此分开又共同聚在上一级灵长目 Primates 上, 与啮齿目 Rodentia 的小家鼠 *Mus musculus* 聚在哺乳纲 Mammalia 上。鲤目 Cypriniformes 鲤科 Cyprinidae 中的斑马鱼 *Danio rerio*、鸡形目

Galliformes 雉科 Phasianidae 中的原鸡 *Gallus gallus* 和哺乳动物 Mammalia 聚在脊椎动物门 Vertebrata 上。

## 2.2 家蚕 *Bmlin-41* 在家蚕中的时空表达模式

RT-PCR 结果显示 *Bmlin-41* 基因在家蚕一龄至五龄 3 d 都有表达, 但不同时期之间的表达量差异很大, 一龄和四龄分别比一眠和四眠表达量高, 三眠初和四眠初分别比三眠末和四眠末表达量高, 一眠初至二眠初都是低量表达, 二眠末表达量明显升高 (图 4A)。定量 PCR 检

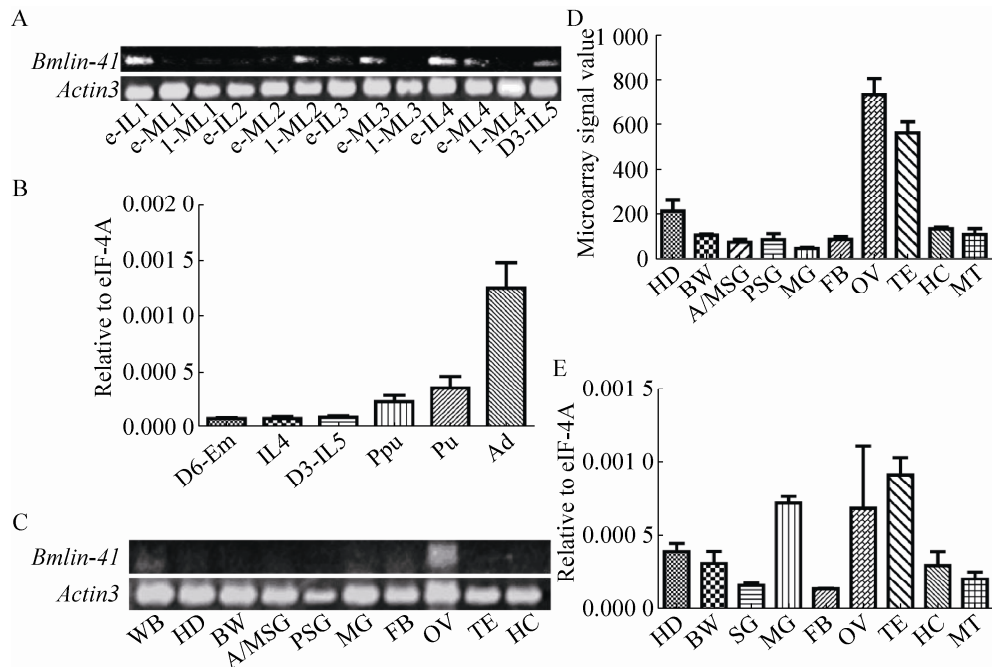


图 4 家蚕 *Bmlin-41* 时空表达模式

Fig. 4 Spatiotemporal expression profiles of *Bmlin-41*. (A) Temporal expression patterns of *Bmlin-41* by RT-PCR<sup>[40]</sup>. e-IL1: early 1st instar larva; e-ML1: early 1st molt larva; l-ML1: late 1st molt larva; e-IL2: early 2nd instar larva; e-ML2: early 2nd molt larva; l-ML2: late 2nd molt larva; e-IL3: early 3rd instar larva; e-ML3: early 3rd molt larva; l-ML3: late 3rd molt larva; e-IL4: early 4th instar larva; e-ML4: early 4th molt larva; l-ML4: late 4th molt larva. D3-IL5: 3rd day of fifth instar larva. (B) Temporal expression profile of *Bmlin-41* by qPCR. D6-Em: 6th day of embryo; IL4: 4th instar larva; D3-IL5: 3rd day of fifth instar larva; Ppu: prepupa; Pu: pupa; Ad: adult moth. (C) Spatial expression profile of *Bmlin-41* in day-3 fifth instar larvae by RT-PCR<sup>[40]</sup>. (D) Spatial expression profile of *Bmlin-41* in fifth instar larvae based on microarray assay. The microarray data were downloaded from BmMDB(<http://www.silkdb.org/microarray/>)<sup>[36]</sup>. (E) Spatial expression profile of *Bmlin-41* in day-3 fifth instar larvae by qPCR. HD: head; BW: body wall; SG: silk gland; A/MSG: anterior/middle silk gland; PSG: posterior silk gland; MG: midgut; FB: fat body; HC: hemocyte; MT: Malpighian tubule; OV: ovary; TE: testis.



测结果表明, *Bmlin-41* 基因在家蚕胚胎、幼虫(四龄和五龄 3 d)、预蛹、蛹和成虫中呈上调表达, 至蛾期时的表达量最高(图 4B)。RT-PCR、芯片数据和定量 PCR 检测结果表明, *Bmlin-41* 基因在家蚕五龄 3 d 的生殖腺中高量表达, 丝腺中的表达量最低或无表达(图 4C-E)。

### 2.3 *Bmlin-41* 基因 3'UTR 的克隆及 *bmo-let-7* 靶位点预测

用五龄 3 d 卵巢的总 RNA 按 3'RACE 试剂盒操作进行反转录获得 cDNA 模板, 使用引物 *Bmlin-41*-outer 和 *Bmlin-41*-inner 进行套式 PCR 扩增, inner 反应得到一条将近 1 700 bp 的片段(图 5A)。菌落 PCR 片段与套式 PCR 扩增片段大小一致(图 5B), 说明该菌落为阳性克隆。将此克隆进行测序验证后, 去除引物和 CDS 序列,

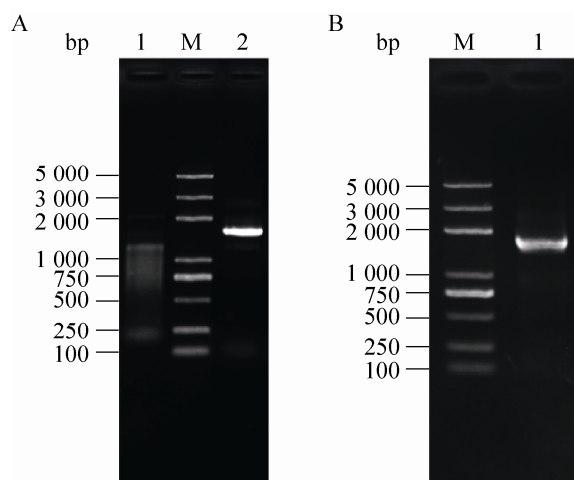


图 5 家蚕 *Bmlin-41* 基因 3'UTR 克隆

Fig. 5 Cloning of *Bmlin-41* 3'UTR. (A) The 3'RACE of *Bmlin-41* 3'UTR. M: DNA marker; 1: cDNA by reverse transcription PCR; 2: product of inner PCR. (B) PCR validation of pEASY-T1 [*Bmlin-41*-3'UTR] plasmid. M: DNA marker; 1: PCR product of 3'UTR.

得到 *Bmlin-41* 的 3'UTR, 大小为 1 434 bp。使用 RNAhybrid 在线预测, 发现在 *Bmlin-41* 基因 3'UTR 上有两个 *bmo-let-7* 靶位点, 分别位于 3'UTR 的 780 位 (T1) 和 919 位 (T2), 靶位点的自由能 mfe 分别为 -17.3 kcal/mol 和 -20.7 kcal/mol (图 6A)。这表明家蚕 *Bmlin-41* 基因可能是 *bmo-let-7* 的靶基因。

### 2.4 *Bmlin-41* 基因 3'UTR 的 *bmo-let-7* 靶位点的实验验证

#### 2.4.1 双荧光素酶报告基因载体构建

为了在细胞水平验证 *Bmlin-41* 基因是否受 *bmo-let-7* 调控, 在 *Bmlin-41* 基因的 3'UTR 两端设计引物(加 *Xho* I/*Not* I 酶切位点)(表 1), 将其亚克隆至双荧光素酶报告基因载体 (psi-CHECK-2) 的海肾荧光素酶基因 (*Renilla luciferase gene*) 后面, 酶切验证阳性克隆(图 6B), 测序验证, 得到 psi-CHECK-2[*Bmlin-41*-3'UTR]载体。

#### 2.4.2 双荧光素酶信号测定与分析

共转染果蝇 S2 细胞系 48 h 后, 测定各组荧光素酶活性并计算比值 (*Renilla*/*Firefly*)。与对照相比, 当双荧光素酶报告基因载体和 *let-7* mimics 共转染时, 荧光素酶活性显著下降(图 6C), 说明 *let-7* mimic 转染入 S2 细胞后与 3'UTR 结合, 抑制了靶基因的转录, 使海肾荧光素酶活性降低; 当和 *bmo-let-7* antagomir 共转染时, 荧光素酶活性极显著上升(图 6D), 暗示 *let-7* antagomir 转染 S2 细胞后, 竞争性的抑制了内源性 *let-7*, 靶基因转录水平上升, 海肾荧光素酶活性增加。这表明 *Bmlin-41* 基因是 *bmo-let-7* 的靶基因, 受 *bmo-let-7* 负调控。

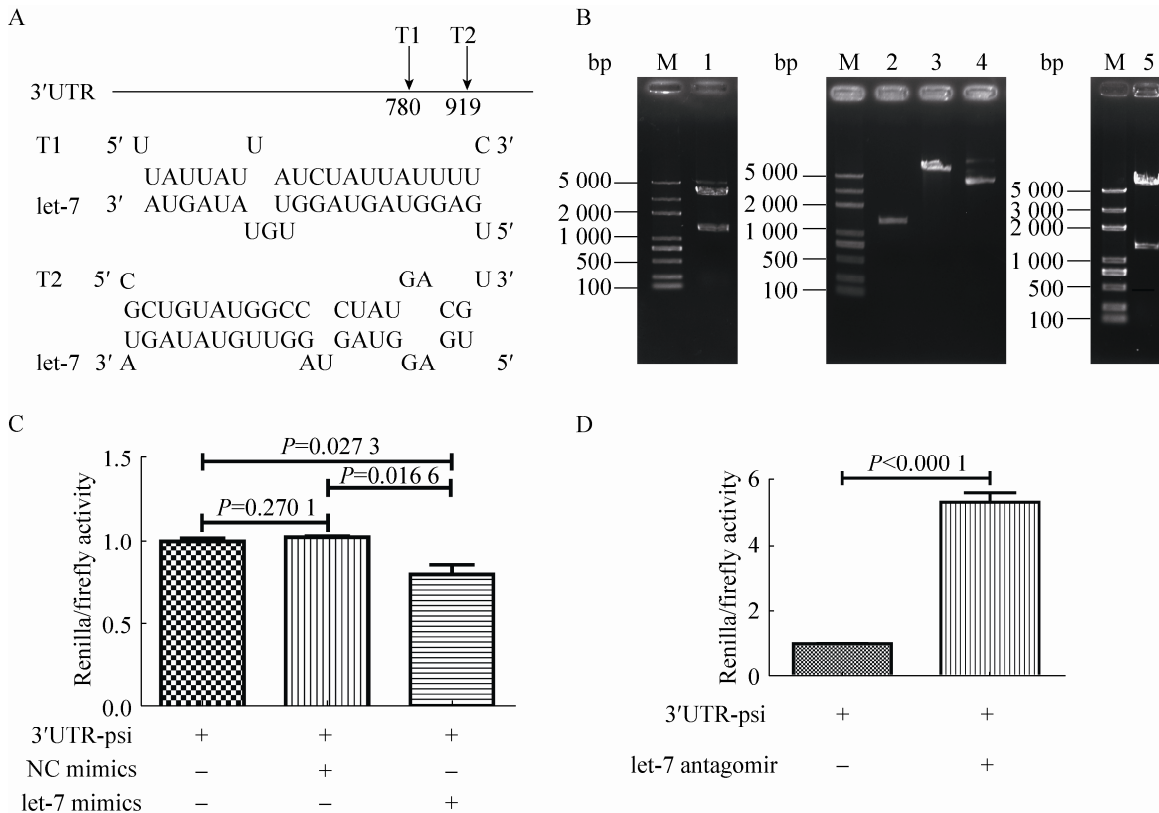


图 6 家蚕 *Bmlin-41* 基因 3'UTR 上 *bmo-let-7* 靶位点的预测和细胞水平验证

Fig. 6 Target site prediction and experimental validation of *bmo-let-7* within 3'UTR of *Bmlin-41*. (A) Target site prediction by online RNAhybrid. (B) Constructing dual luciferase reporter gene vector. M: DNA marker; 1: pEASY-T1[*Bmlin-41*-3'UTR] digested by *Pst* I and *Not* I; 2: recovered fragments of 3'UTR; 3: the psi-CHECK-2 vector digested with *Pst* I and *Not* I; 4: the empty psi-CHECK-2 vector; 5: digestion product of psi-CHECK-2[*Bmlin-41*-3'UTR] by *Pst* I and *Not* I. (C) *bmo-let-7* mimics down-regulates *Bmlin-41*. 3'UTR-psi: psi-CHECK-2[*Bmlin-41*-3'UTR] vector; NC mimics: negative control mimics; let-7 mimics: *bmo-let-7*-5p mimics. (D) *Bmo-let-7* antagomir upregulates *Bmlin-41*. 3'UTR-psi: psi-CHECK-2[*Bmlin-41*-3'UTR] vector; let-7 antagomir: *bmo-let-7*-5p antagomir; error bars  $\bar{x} \pm s$ .  $P<0.05$  means significance,  $P<0.01$  means extreme significance (student's *t* test).

### 3 讨论

*Bmlin-41* 在家蚕幼虫阶段的不同龄期和眠期有不同的表达, 在家蚕整个生命周期中呈上调趋势, 成虫期的表达量最高 (图 4A, B), 暗示它可能与家蚕的龄期转化和变态发育有关。芯片数据和定量 PCR 结果表明, *Bmlin-41* 在卵

巢和精巢中高量表达 (图 4D, E), 推测其在生殖腺中具有重要功能, 可能参与卵的形成与受精核的分裂和分化。芯片数据和定量 PCR 结果总体上看是基本一致的, 但也存在不完全一致的情况。例如, 在芯片数据中, *Bmlin-41* 在中肠里低量表达, 但定量 PCR 结果显示其中肠里的表达量相对较高; 两种实验结果都表明

*Bmlin-41* 在精巢和卵巢里高量表达,但在卵巢里的定量 PCR 结果重复性并不好。这些不一致可能与不同批次所取材料之间的细微差异有关,但也不能排除是由于实验中某些不确定因素所致,有待于以后进一步证实。

*let-7* 是动物中最早发现的 miRNA 之一,在很多物种都含有 *let-7*, 具有高度的保守性<sup>[20]</sup>。*let-7* 在幼虫晚期开始表达,成虫时表达量达高峰,控制线虫和果蝇晚期幼虫到成虫的变态转型<sup>[19, 41]</sup>。*bmo-let-7* 在家蚕胚胎阶段和一龄期间无表达,二龄幼虫期开始低量表达,三龄幼虫至成虫阶段表达量较高<sup>[31]</sup>。*bmo-let-7* 和 *Bmlin-41* 在家蚕发育周期中总体上都呈上调趋势,但在某些发育阶段和组织中,*let-7* 的表达变化与 *Bmlin-41* 明显相反。例如,*let-7* 在四龄期的表达明显低于四眠<sup>[31]</sup>,而 *Bmlin-41* 在四龄期间的表达却显著高于四眠(图 4A),*let-7* 在卵巢中的表达量低于精巢<sup>[31]</sup>,但是 *Bmlin-41* 在卵巢中表达量却略高于精巢(图 4C 和 4D),相反的表达关系暗示 *let-7* 可能在家蚕一些发育时期和特定组织中负调控 *Bmlin-41*。然而,由于 *let-7* 与 *Bmlin-41* 在个体和器官水平的表达比较是基于不同批次的实验,它们之间的表达关系还有必要在后续的研究中进一步验证。

线虫 *lin-41* 基因的 3'UTR 上存在 *let-7* 的靶位点,把 *lin-41* 基因的 3'UTR 连接到 *Escherichia coli lacZ* 报告基因后,*lacZ* 的活性被抑制,进一步证明了 *lin-41* 基因是 *let-7* 的靶基因<sup>[21]</sup>。在家蚕中,克隆 *Bmlin-41* 基因 3'UTR 序列,通过共转染和双荧光素酶报告基因系统,证明了 *Bmlin-41* 是 *bmo-let-7* 的靶基因(图 5)。miRNA 是通过识别与结合靶基因来实现其调控功能的,但截至目前,家蚕 miRNA 功

能研究报道不多,一个重要原因是很少有靶基因被证实。我们前面用 pGL3 载体系统在家蚕胚胎细胞系 BmE 中证明了 *bmo-miR-7* 负调控靶基因 *Bmyan*, 为深入研究家蚕眼睛和脑的发育提供了一些依据<sup>[42]</sup>。在本研究中,我们用 psi-CHECK-2 载体系统在果蝇 S2 细胞系中证明了家蚕 *bmo-let-7* miRNA 负调控靶基因 *Bmlin-41*, 将为深入研究家蚕发育变态的分子机理提供新的线索。然而,预测发现 *Bmlin-41* 的 mRNA 3'UTR 上有两个靶位点,它们是否都是 *bmo-let-7* 的有效结合位点?所以,为了深入研究 *bmo-let-7* 对其靶基因 *Bmlin-41* 的调控,还有必要通过靶位点突变实验对两个靶位点的结合效率进行比较。

## 4 结论

本研究首次克隆和鉴定了家蚕 *Bmlin-41* 基因。它具有 TRIM-NHL 家族典型的 B-Box、NHL 结构域。*Bmlin-41* 的时序表达模式具有明显的发育阶段特性,总体上是龄期高于眠期,眠初高于眠末,成虫期高于幼虫期;在五龄 3 d 的生殖腺中高量表达,其他组织中低量表达或不表达。通过 3'RACE 得到 *Bmlin-41* 基因 3'UTR,预测 *Bmlin-41* 基因的 3'UTR 上存在 *bmo-let-7* 靶位点,用双荧光素酶报告基因系统,在细胞水平证明了 *Bmlin-41* 基因是 *bmo-let-7* 的靶基因,被 *bmo-let-7* 负调控。该研究为进一步研究家蚕 *let-7* 和 *Bmlin-41* 的功能以及家蚕变态发育的分子机理提供了一些参考。

## REFERENCES

- [1] Ambros V. A hierarchy of regulatory genes controls a larva-to-adult developmental switch in

- C. elegans*. Cell, 1989, 57(1): 49–57.
- [2] Ambros V, Horvitz HR. Heterochronic mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans*. Science, 1984, 226(4673): 409–416.
- [3] Ambros V, Horvitz HR. The *lin-14* locus of *Caenorhabditis elegans* controls the time of expression of specific postembryonic developmental events. Genes Dev, 1987, 1(4): 398–414.
- [4] Ambros V, Moss EG. Heterochronic genes and the temporal control of *C. elegans* development. Trends Genet, 1994, 10(4): 123–127.
- [5] Slack F, Ruvkun G. Temporal pattern formation by heterochronic genes. Annu Rev Genet, 1997, 31: 611–634.
- [6] Bettinger JC, Lee K, Rougvie AE. Stage-specific accumulation of the terminal differentiation factor LIN-29 during *Caenorhabditis elegans* development. Development, 1996, 122(8): 2517–2527.
- [7] Slack FJ, Basson M, Liu ZC, et al. The *lin-41* RBCC gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the *let-7* regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor. Mol Cell, 2000, 5(4): 659–669.
- [8] Loedige I, Gaidatzis D, Sack R, et al. The mammalian TRIM-NHL protein TRIM71/LIN-41 is a repressor of mRNA function. Nucleic Acids Res, 2013, 41(1): 518–532.
- [9] Ecsedi M, Großhans H. LIN-41/TRIM71: emancipation of a miRNA target. Genes Dev, 2013, 27(6): 581–589.
- [10] O'Farrell F, Esfahani SS, Engström Y, et al. Regulation of the *Drosophila lin-41* homologue *dappled* by *let-7* reveals conservation of a regulatory mechanism within the LIN-41 subclade. Dev Dyn, 2008, 237(1): 196–208.
- [11] Spike C. A, Coetzee D, Eichten C, et al. The TRIM-NHL protein LIN-41 and the OMA RNA-binding proteins antagonistically control the prophase-to-metaphase transition and growth of *Caenorhabditis elegans* oocytes. Genetics, 2014, 198(4): 1535–1558.
- [12] Rybak A, Fuchs H, Hadian K, et al. The *let-7* target gene mouse *lin-41* is a stem cell specific E3 ubiquitin ligase for the miRNA pathway protein Ago2. Nat Cell Biol, 2009, 11(12): 1411–1420.
- [13] Tocchini C, Keusch JJ, Miller SB, et al. The TRIM-NHL protein LIN-41 controls the onset of developmental plasticity in *Caenorhabditis elegans*. PLoS Genet, 2014, 10(8): e1004533.
- [14] Ecsedi M, Rausch M, Großhans H. The *let-7* microRNA directs vulval development through a single target. Dev Cell, 2015, 32(3): 335–344.
- [15] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell, 2004, 116(2): 281–297.
- [16] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. Cell, 1993, 75(5): 843–854.
- [17] Arasu P, Wightman B, Ruvkun G. Temporal regulation of *lin-14* by the antagonistic action of two other heterochronic genes, *lin-4* and *lin-28*. Genes Dev, 1991, 5(10): 1825–1833.
- [18] Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. Cell 1993, 75(5): 855–862.
- [19] Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. Nature, 2000, 403(6772): 901–906.
- [20] Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. Nature, 2000, 408(6808): 86–89.
- [21] Vella MC, Choi EY, Lin SY, et al. The *C. elegans* microRNA *let-7* binds to imperfect *let-7* complementary sites from the *lin-41* 3'UTR. Genes Dev, 2004, 18(2): 132–137.
- [22] Kloosterman WP, Wienholds E, Ketting RF, et al. Substrate requirements for *let-7* function in the developing zebrafish embryo. Nucleic Acids Res, 2004, 32(21): 6284–6291.
- [23] Kanamoto T, Terada K, Yoshikawa H, et al. Cloning and regulation of the vertebrate homologue of *lin-41* that functions as a

- heterochronic gene in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Dyn*, 2006, 235(4): 1142–1149.
- [24] Abbott AL, Alvarez-Saavedra E, Miska EA, et al. The *let-7* MicroRNA family members *mir-48*, *mir-84*, and *mir-241* function together to regulate developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Dev Cell*, 2005, 9(3): 403–414.
- [25] Esquela-Kerscher A, Johnson SM, Bai L, et al. Post-embryonic expression of *C. elegans* microRNAs belonging to the *lin-4* and *let-7* families in the hypodermis and the reproductive system. *Dev Dyn*, 2005, 234(4): 868–877.
- [26] Großhans H, Johnson T, Reinert KL, et al. The temporal patterning microRNA *let-7* regulates several transcription factors at the larval to adult transition in *C. elegans*. *Dev Cell*, 2005, 8(3): 321–330.
- [27] Alvarez-Garcia I, Miska EA. MicroRNA functions in animal development and human disease. *Development*, 2005, 132(21): 4653–4662.
- [28] Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature*, 2004, 431(7006): 350–355.
- [29] Lujambio A, Ropero S, Ballestar E, et al. Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Res*, 2007, 67(4): 1424–1429.
- [30] Brueckner B, Stresemann C, Kuner R, et al. The human *let-7a-3* locus contains an epigenetically regulated microRNA gene with oncogenic function. *Cancer Res*, 2007, 67(4): 1419–1423.
- [31] 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(1): 88.
- [32] Ling L, Ge X, Li ZQ, et al. MicroRNA *Let-7* regulates molting and metamorphosis in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem Mol Biol*, 2014, 53: 13–21.
- [33] 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.
- [34] Higgins DG, Thompson JD, Gibson TJ. Using CLUSTAL for multiple sequence alignments. *Methods Enzymol*, 1996, 266: 383–402.
- [35] Tamura K, Stecher G, Peterson D, et al. MEGA 6.0: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol Biol Evol*, 2013, 30(12): 2725–2729.
- [36] 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.
- [37] Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42: D68–D73.
- [38] Rehmsmeier M, Steffen P, Höchsmann M, et al. Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. *RNA*, 2004, 10(10): 1507–1517.
- [39] Letunic I, Doerks T, Bork P. SMART: recent updates, new developments and status in 2015. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43: D257–D260.
- [40] Zhou T. Cloning of *let-7* target genes and inducing of ecdysone on *bmo-let-7* miRNA in silkworm cell lines[D]. Chongqing: Southwest University, 2009 (in Chinese).
- 周挺. 家蚕 *let-7* miRNA 的靶基因克隆和激素诱导[D]. 重庆: 西南大学, 2009.
- [41] Sempere LF, Dubrovsky EB, Dubrovskaya VA, et al. The expression of the *let-7* small regulatory RNA is controlled by ecdysone during metamorphosis in *Drosophila melanogaster*. *Dev Biol*, 2002, 244(1): 170–179.
- [42] 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 (in Chinese).
- 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.

(本文责编 陈宏宇)