

钱荷英,李 刚,何庆玲,等. 蓖麻蚕核型多角体病毒的 miRNAs 生物信息学预测[J]. 江苏农业科学,2016,44(10):53-61.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.10.012

蓖麻蚕核型多角体病毒的 miRNAs 生物信息学预测

钱荷英,李 刚,何庆玲,罗旭芳,徐安英

(江苏科技大学,江苏镇江 212018)

摘要:首先在 GenBank 中下载蓖麻蚕核型多角体(PhcyNPV)全基因组序列,通过生物信息学的方法预测表明,PhcyNPV 基因组中有 142 条 miRNA 成熟体分子;再用 miRanda、RNAhybird 2 个软件预测 miRNAs 对病毒自身的靶基因,提取有共同交集的 33 条 miRNA。用 PhcyNPV 感染蓖麻蚕,取感病蓖麻蚕的脂肪体组织,提取总 RNA;用逆转录 PCR(reverse transcription PCR,简称 RT-PCR)验证有共同交集的 33 条 miRNA,确定其中 6 条为 miRNA 成熟体序列,分别是 Phcy-miR-996_5p、Phcy-miR-696-5P、Phcy-miR-664_3p、Phcy-miR-30_5p、Phcy-miR-217_5p、Phcy-miR-1483_3p。这 6 条可能的 miRNA 对应的靶基因涉及病毒的融合蛋白、多角体蛋白等结构蛋白,以及一些蛋白激酶包括激活解旋酶表达的极早期基因等,推测其潜在的靶基因参与病毒复制及侵染的重要过程。

关键词:蓖麻蚕;核型多角体病毒;miRNA;生物信息学

中图分类号:S885.25 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)10-0053-09

miRNA 是一类大小约 22 nt 的单链小分子 RNA,由具有发夹结构的长约 70~90 个碱基的单链 RNA 前体经过 Dicer 酶加工得到,能够和互补或部分互补的靶 mRNA 的 3'末端非翻译区(3'-UTR)结合,选择性降解 mRNA 或抑制基因翻译^[1]。自 miRNA 被发现以来,迅速成为生命科学领域的研究热点,因此开展 miRNA 的研究将对转录后基因调控领域的发展产生深远影响。

病毒 miRNA 产生过程与其他生物类似,其成熟 miRNA 大小和结构也与其他生物的 miRNA 一致。病毒 miRNA 不仅可调节自身基因的表达,利于病毒复制及潜伏感染,还能调节宿主基因的表达并因此逃避宿主的免疫作用^[2]。目前有关病毒 miRNA 的研究主要是关于哺乳动物的病毒,在昆虫病毒方面鲜有研究,仅有棉铃夜蛾蛾囊泡病毒(HvAV)和家蚕核型多角体病毒(BmNPV)有报道,前者编码的 miRNA 可以抑制病毒 DNA 聚合酶的转录从而调控病毒自身的复制^[3],后者的 miRNA 功能尚未得到确凿的试验验证^[4-5]。

蓖麻蚕是我国的三大绢丝昆虫之一,其核型多角体病毒病是生产中最常见的传染病,具有发病快、传染性强的特点,是制约蓖麻蚕产业发展的一大因素。蓖麻蚕核型多角体病毒(PhcyNPV)基因组已被解析^[6],但尚未见关于 PhcyNPV 的 miRNA 报道。本研究以期通过生物信息学方法对 PhcyNPV 编码的 miRNA 进行预测,并进行试验验证,为探索 PhcyNPV 的感染机制及建立相关的诊断、治疗方法提供一定的分子生物学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 蓖麻蚕及其核型多角体病毒 蓖麻蚕品种 B21、蓖麻蚕核型多角体病毒(PhcyNPV)均由中国农业科学院蚕业研究所保存。

1.1.2 质粒与菌种 T 克隆质粒载体 pMD18-T、大肠杆菌受体菌株购自生工生物工程(上海)股份有限公司。

1.1.3 工具酶及相关试剂 T₄ DNA 连接酶、蛋白酶 K、高保真 Taq 酶、DNase I (RNase free)、DNA marker、PrimeScript™ RT Enzyme Mix I、质粒提取试剂盒,均购自生工生物工程(上海)股份有限公司;QIAEX II Gel Extraction Kit,购自 TaKaRa 公司;TRIzol Reagent,购自 Promega 公司;其他化学试剂均为分析纯,购自生工生物工程(上海)股份有限公司或国药集团化学试剂有限公司。

1.1.4 主要分析软件及网站 本研究所用分析软件及网站如下:RNAhybird, <http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/welcome.html>;miRanda, <http://www.microrna.org/>;miR Base, <http://www.mirbase.org/>;Mfold, <http://mobyle.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?#forms::mfold>;Oligo 6.0、DNAMAN、DNASar。

1.1.5 引物设计与合成 利用引物分析软件 Oligo 6.0 设计引物,由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。引物序列见表 1,此处反转录引物为 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGACTGGATACGAC*****-3',后 6 个碱基用“*”表示,根据成熟体序列设计,下游引物为 5'-CACTGCAGGGTCCGAGGTAT-3'。

1.2 试验方法

1.2.1 预测 PhcyNPV 可能的编码 miRNA 前体序列 下载 PhcyNPV 全基因组序列(GenBank 号:JX404026.1)(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/427378890?report=fasta>)导入 vMir 软件,设定窗口大小为 500 nt,递进单位 10 nt,最小发

收稿日期:2015-09-02

基金项目:现代农业产业技术体系建设专项(编号:CARS-22)。

作者简介:钱荷英(1971—),女,江苏溧阳人,博士,副研究员,主要从事家蚕遗传育种与分子生物学研究。E-mail:qianheyang123@163.com。

通信作者:徐安英,研究员,主要从事家蚕遗传育种与种质资源研究。E-mail:srixay@126.com。

表 1 试验采用的引物

miRNA 名称	引物序列 (5'→3')
hcy - miR - 1483_3p	RT:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACTGGATACGACCGCTGG;F:CGGCATGATGTAGTACACCG
Phcy - miR - 177_3p	RT:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACTGGATACGACTCTTTT;F:CGGCGCAGCTACTTTGACCT
Phcy - miR - 177_5p	RT:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACTGGATACGACTGGAAA;F:CGGCGAGGCTAAAGCGTTTA
Phcy - miR - 217_5p	RT:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACTGGATACGACGCGCTC;F:GCAGGCCAGCTTGACCGC
Phcy - miR - 30_5p	RT:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACTGGATACGACACGACG;F:CGGCGAACTAAGGACTGCAA
Phcy - miR - 530_3p	RT:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACTGGATACGACTGGCTG;F:GCGCGTTTGAACGCGAGCG
Phcy - miR - 740_3p	RT:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACTGGATACGACAGAGCT;F:ATGGCCTTGCGCGCGCGC
Phcy - miR - 971_5p	RT:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACTGGATACGACCATTTG;F:ATCGGCGCGGTAAACTACAA
Phcy - miR - 996_3p	RT:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACTGGATACGACACACGG;F:CGGCGACGCCACCATGACG
Phcy - miR - 996_5p	RT:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACTGGATACGACGCTGTT;F:GCCGTACTTGACAGGGGC
Phcy - miR - 1095_5p	RT:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACTGGATACGACGGACTC;F:GCCACCTTGTCGTCGGGC
Phcy - miR - 1197_5p	RT:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACTGGATACGACCGGCCG;F:CGGACGGCGTCATGCAGG
Phcy - miR - 1282_5p	RT:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACTGGATACGACGCGCT;F:AGGCCGCGCCCGCGCAGC
Phcy - miR - 1407_3p	RT:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACTGGATACGACACAGTC;F:ATGCGCGCTCGCGGGCAT
Phcy - miR - 216_3p	RT:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACTGGATACGACTCGACG;F:ATAATACACGTCGCGGCCCG
Phcy - miR - 216_5p	RT:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACTGGATACGACGGTCCG;F:ATAGTCCGCGCTGTGCTGG
Phcy - miR - 664_3p	RT:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACTGGATACGACCTGTTT;F:AGCTCCGGTACCCAGTCC
Phcy - miR - 696_5p	RT:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACTGGATACGACCGCGAA;F:ATACCGCCGCTCGCGGTT
Phcy - miR - 752_3p	RT:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACTGGATACGACCGTCGC;F:ATACGCGCCGTGTCCGCGA
Phcy - miR - 767_5p	RT:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACTGGATACGACGCGCCT;F:ATTAACACGCGCGCGGCGC
Phcy - miR - 781_3p	RT:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACTGGATACGACAAAATG;F:CGGCAAAGTGCCATCGACAC
Phcy - miR - 850_3p	RT:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACTGGATACGACGGCAAA;F:ACGTATGCCGCTTCCCGGC
Phcy - miR - 991_3p	RT:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACTGGATACGACCGCCGC;F:ATCGCGCGCCGCGCCGC
Phcy - miR - 1045_3p	RT:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACTGGATACGACGGGCCG;F:GCGATTACGCGCGGTGG
Phcy - miR - 113_3p	RT:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACTGGATACGACTACACT;F:GCGACTTGCTGATGGACAG
Phcy - miR - 1141_3p	RT:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACTGGATACGACCTCCAC;F:GCGGCACTGGAACCCGCGAG
Phcy - miR - 1288_5p	RT:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACTGGATACGACCACTCG;F:GCGCGTATCGACTATCTAAAC
Phcy - miR - 1296_3p	RT:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACTGGATACGACAACTCT;F:GCGCTAACAGCTTTTACACC
Phcy - miR - 1346_3p	RT:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACTGGATACGACGCTCG;F:GCAGTCCGAGTGCGCCGA
Phcy - miR - 1348_3p	RT:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACTGGATACGACGTAAGC;F:GCGCCTTAACCCGCTAGAAT
Phcy - miR - 1378_3p	RT:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACTGGATACGACGCACTT;F:GCGCAAAACACTCCCTGAAG
Phcy - miR - 1378_5p	RT:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACTGGATACGACCTGCGG;F:GCTGGCGGTGATGCGGTT
Phcy - miR - 1346_5p	RT:GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACTGGATACGACCGCCGC;F:GCGTGCGCCACGTAGTGC
公共引物	CAGTGCAGGGTCCGAGGTAT

夹结构长度 50 nt,对 PhcyNPV 全基因组中可能形成发夹结构的序列进行初步筛选。随后,设定每条序列最低得分为 115 分,窗口最低为 35,去除 G + C 含量不在 30% ~ 70% 之间的序列以及那些位于蛋白编码区的序列^[7],得到 PhcyNPV 全基因组中可能编码的 miRNA 前体序列。

1.2.2 预测 PhcyNPV 可能编码的成熟 miRNA 序列 根据预测到的 PhcyNPV miRNA 前体序列的发夹结构,预测成熟的 miRNA 序列。成熟 miRNA 序列的长度平均为 22 nt,位于前体发夹结构的 3' 端或者 5' 端臂上。还要参照的数据是成熟 miRNA 中 A + U 含量应在 30% ~ 70% 以及发夹结构中 miRNA 与其互补的序列差异不能大于 6 bp,推测每条 miRNA 前体序列上可能的成熟体 miRNA 序列。

1.2.3 预测成熟 miRNA 作用的病毒自身靶基因 根据成熟体 miRNA 序列 5' 端 2 ~ 8 位上的核苷酸与靶基因的 mRNA 序列的非编码区(3' - UTR)互补的原理来预测靶基因^[8]。为了提高预测的准确度,使用 RNAhybird ([http://bibiserv.techfak. uni - bielefeld. de/rnahybrid/welcome. html](http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/welcome.html)) 和

miRanda (<http://www.microrna.org/>) 2 个软件分别进行靶基因预测,然后提取 2 个软件预测的交集作为最终的预测结果,即可能的 miRNA 靶基因。

1.2.4 成熟 miRNA 序列的逆转录 PCR(reverse transcription PCR,简称 RT - PCR)验证

1.2.4.1 试验组与对照组蓖麻蚕脂肪体总 RNA 的提取 病毒接种及取材:取用正常蓖麻叶饲养的 4 龄蓖麻蚕(B21)起蚕 100 头,分为试验组、对照组,每组 50 头。试验组用移液枪取 1.3 × 10⁸ 个/mL 多角体的 PhcyNPV 病毒液,经口添饲蓖麻蚕,每头喂 8 μL,对照组喂 8 μL 蒸馏水。然后用蓖麻叶正常饲育,至试验组蚕有发病症状(约饲养 96 h)。收集对照组、试验组蓖麻蚕的脂肪体组织,立即于 - 80 ℃ 保存、备用。

提取蓖麻蚕脂肪体组织总 RNA,方法如下:(1)取冷冻的脂肪体组织,加液氮,充分研磨;(2)研钵中加入 1 mL TRIzol,继续研磨,至透明后转移至离心管中;(3)室温静置 5 min,加入 200 μL 三氯甲烷,倒置混匀 15 s;(4)室温静置 5 min,4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min;(5)取上清,加入等体积的异

丙醇 (500 μL), 倒置混匀; (6) 室温静置 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 10 min; (7) 弃上清, 在沉淀中加入乙醇洗涤; (8) 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 5 min 后, 轻轻倒掉乙醇, 倒扣于超净工作台中控干乙醇; (9) 加入 40 μL DEPC 水, 溶解 10 min, 测 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$, 检验提取质量; (10) 将溶解的样品置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存、待用。

1.2.4.2 反转录体系 用试剂盒进行逆转录试验, 10 μL 的逆转录体系: 2 μL 5 \times PrimerScript buffer, 0.5 μL PrimerScriptTM RT Enzyme Mix II, 0.5 μL OligdT 引物, 0.5 μL Random 6 mers, RNase free H_2O 6 μL , 0.5 μL 模板; RT 程序: 56 $^{\circ}\text{C}$ 25 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 5 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。

PCR 反应体系如下: 13.2 μL ddH₂O, 2.5 μL Buffer, 4.0 μL dNTP, 1.5 μL 引物 F, 1.5 μL 引物 R, 2.0 μL cDNA 溶液, 0.3 μL Taq DNA 聚合酶, 总体积 25 μL ; PCR 反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。

1.2.4.3 回收 PCR 扩增产物 将扩增的单一一条带且大小与目的条带相符的 PCR 产物重新用 2% 琼脂糖凝胶进行电泳, 在紫外灯下切胶, 称质量, 放入 RNA 专用的 EP 管中。加入 3 倍胶块质量的 Buffer B₂, 50 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 ~ 10 min, 再加入 1/3 Buffer B₂ 体积的异丙醇; 将融化的胶溶液移入吸附柱中, 8 000 r/min 离心 30 s, 弃上清; 沉淀中加入 500 μL 洗涤液, 9 000 r/min 离心 30 s, 弃上清, 重复洗 1 次; 吸附柱于 9 000 r/min 离心 1 min; 将吸附柱置于干净的 1.5 mL 离心管中, 在吸附膜中加入 30 μL 无菌水溶解 DNA, 9 000 r/min 离心 1 min, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存上清液。

1.2.4.4 目的片段与 PMD 18-T 载体的连接 先将割胶回收的 DNA 重新进行 PCR 扩增, 检验产物, 将符合条件的 DNA 进行转化。10 μL 转化体系: 1 μL PMD 18-T 载体, 4 μL 回收的目的片段 DNA, 5 μL T₄ 连接酶溶液, 在连接仪中, 于 16 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。

1.2.4.5 质粒 DNA 的转化 在 DNA 连接产物的全量混合液中加入 100 μL 感受态细胞 (大肠杆菌 *E. coli* DH10B), 混匀至于冰上 30 min (其间每隔 15 min, 手指弹匀 1 次), 42 $^{\circ}\text{C}$ 热激 60 s, 迅速置冰上 2 min; 再加入 890 μL LB 培养基 (不含 Amp), 37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡 1.0 ~ 1.5 h, 12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入含 Amp 的液体培养基, 涂布于 LB 平板培养基上, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中过夜 (约 10 ~ 12 h)。

1.2.4.6 重组质粒的鉴定及测序 挑取多个白色单菌落转化子于 1.5 mL 含有 Amp 的液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床培养过夜 (12 h), 然后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。取菌液进行 PCR 验证, 20 μL PCR 反应体系: 13.2 μL ddH₂O, 2.0 μL buffer, 0.4 μL dNTP, 1.0 μL 引物 F, 1.0 μL 引物 R, 2.0 μL 菌液, 0.4 μL Taq E。PCR 反应程序与“1.2.4.2”节的方法一致, PCR 产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。将鉴定正确的菌液倒入 EP 管中, 另加 Amp 与甘油, 制成甘油菌, 委托生工生物工程 (上海) 股份有限公司测序。

1.2.4.7 预测的成熟 miRNA 序列与测序结果比对 成熟体的序列一般为 22 nt, 位于前体序列的 5' 端或 3' 端, 与其互补序列的差异不能多于 6 个碱基。将测序结果、成熟体序列与病毒基因组进行一一比对。

2 结果与分析

2.1 vMir 软件预测 PhcyNPV 可能编码的 miRNA 前体序列

将 PhcyNPV 全基因组序列 (JX404026.1) 导入分析软件 vMir, 根据文献介绍, 预测参数如下: Window size, 500 nt; Step size, 10 nt; Min HP size, 50 nt。

预测得到 4 836 个可能的小 RNA 前体序列, 包括 miRNA 前体序列、长度、方向、分值信息, 从而得到前体序列。

然后设置相应的参数, 利用 vMir 软件分析 PhcyNPV 基因组, 产生所有 PhcyNPV 基因组中可能形成的发夹结构 (图 1)。

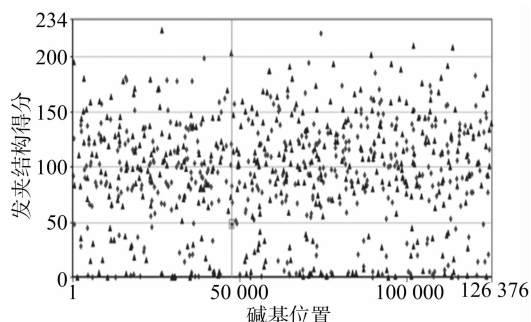


图1 利用 vMir 软件分析 PhcyNPV 基因组中所有小 RNA 前体可能形成的发夹结构

2.2 vMir viewer 查看和过滤 miRNA 前体序列

通过文献推荐的过滤参数 (Score: 115; Max HP size, 100 nt; Window count, 35), 对 4 836 个 miRNA 前体进行过滤选择, 进一步筛选可能编码的 miRNA 前体序列。将预测到的可能前体序列再与 PhcyNPV 基因组中的 ORF 序列比对, 如果这些预测序列位于蛋白编码区, 则应去除。由于病毒基因组中 90% 以上的序列都编码蛋白, 且 ORF 中几乎不含内含子, 因此绝大部分的预测序列将被去除。最终得到 71 个 miRNA 前体 (表 2), 其分布展示如图 2 所示。

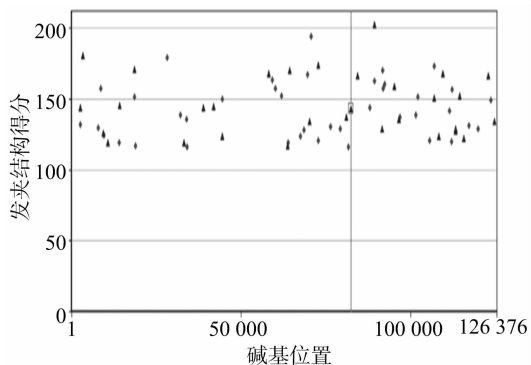


图2 利用 vMir 软件分析 PhcyNPV 基因组中经过滤后小 RNA 前体可能形成的发夹结构

2.3 提取成熟的 miRNA 序列

成熟的 miRNA 分别位于前体的 3' 或者 5' 臂端, 平均长度为 22 nt。通过对 71 个前体 miRNA 序列进行分析, 提取得到 142 个成熟的 miRNA 序列, 详见表 3。

表2 PhcyNPV 的 71 个 miRNA 的前体序列

序号	miRNA 名称	PhyNPV 的 miRNA 前体序列(5'→3')
1	Phcy - mir - 30	CCATCATGGACACGACGTTGACGTCTTAGTTCAGTTTACTAATGAGTGC GCGCTCGTCCCGTCCAAAATGG
2	Phcy - mir - 42	TTGAAACACTAGGCCGGCGCACGCGGTTCATCGTCTGACTGGTGAGTTGACCACAAACTGCGTGTGGCTTTCGCTGCTCAA
3	Phcy - mir - 113	CTATGGGCAGCGTGTACAAACAAACGGCTCTTGTGCACTTTGATACACTCTGTCCATCAG
4	Phcy - mir - 130	CGCGCGTGCCTGTTCGCGGAACCTTTTGTGCACAAACAGTACACCGCGCGCTGGGGTTTGGCGTGTGCGCGCG
5	Phcy - mir - 177	TCTAAGTACTTGGAAATAAACGCTTTAGCCTCAGCAGGCACATGGCTAAAGTCTTTTAGGTCAAAGTAGCTGCATAGA
6	Phcy - mir - 217	TGGCGGACCGCGCGCTCGCGTCAAGCTGGCCTTACGCGCGCGCGCTGCGAAAGCGCGAGCTGCTA
7	Phcy - mir - 376	TACCTAAGTTTGAAGTTTATTTTAATTTGTATAGTTTTTATTAAGTTCCTTTTTTAATTTTTCG
8	Phcy - mir - 458	GCCTGCGCGTTGACGCCAAACACGAAAAATGGAAAACTTGGCGGACGCGCTTGTAAACCTTCCATCGCGTGTGCATTAAGTGCAAGGC
9	Phcy - mir - 493	GTCACCTAGCAAAACAGGCGCTCGGACGTGTGACGCTTGAACACGCGTGTGGCGCGCTGGAACGTGTGCGCGCTGCGCGCGCGCTGAC
10	Phcy - mir - 530	ACGACGTGCTAGGAGCGCAAGTGCAAAATGAGACCGCGGCATTCACCACCGCGGGTGGCTGCGCTCGCGTTCAAACGACTCGT
11	Phcy - mir - 687	ACGCGTGCCTGACCGAGGAAAAGATGCAAGAAATGATTGCGCACGCTAAAGAGCATCTCAAATCGTTTCTACATCCTTCGTTACGCAGTACAACGCGT
12	Phcy - mir - 740	GGCGCGCGGAGCTTACCGAAGCTGCAAAACAGTTGGAAGAGCTGCGCGCGCGC
13	Phcy - mir - 748	TACTGTAAAAATAAAATTTATTTTAAACAAATGCTTTAAATAATCTAAATATTTGTATTTTAATAATGTTACCTTTTTCGACGCGTG
14	Phcy - mir - 825	GCTGCACGCGGACGAAGTGAAAAACGACAGCTTGTGGACGAAGTATATGTTTCCAAACCGTTTTCGCGCCACC
15	Phcy - mir - 853	TTACACTAGTTAATTATAGTTTATTTATTTATTACATTAACGTAATAATAAATTACAATTATTATTAATCTGTGTGTAA
16	Phcy - mir - 960	TGGCTGAAGCACATGACCAATTTGAACCTGTTATGAAACGAGCTGTGAAATCTACGGTACGGAACACAAGGACGAGCTGCGCCGAATGCTACAACGCCA
17	Phcy - mir - 971	ATGGCTAATAAAACATCAATTTTCATTTTGTTATTTTGTAGTTTATTTTGTAACTAATACAGCTGTTTAAAAATAATTTTGTCTTTATTCGGTTAT
18	Phcy - mir - 996	CGCGCGACGCGCTGTGCCCTGTACAAGTACATTTCGATTTCGAAACACGCGCTCATGTTGCTGCGCGCACG
19	Phcy - mir - 1045	GGCCAGCTGTTCGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCTGCTTACGCGCGCGCGCGCGCGCCACC GCCCGCTAATCTGCGTGGCC
20	Phcy - mir - 1072	GCGCGCGCGCGCGCTCGGGCTGTCCGTGGCGGTGCGGACGCGGTGCTGC
21	Phcy - mir - 1125	GCTGGCTGTACGCTACGGCACGCCCATGCGCATCGGTTGCCCGCGCTGCGGTGCCAGGCCAGC
22	Phcy - mir - 1141	GCGTTTGGCTGCGCCAAACGCTGGATGCGGCCCTGCGCTGCAACTCCACCTGCGGGTTCCAGTGGCGC
23	Phcy - mir - 1267	GTTACAAATTCACGCGCTTTTCGGGTATAGCTGTACCCGAAAGACGCGTTGATTGTCTTAGC
24	Phcy - mir - 1288	TCGTGTTGACGTGCGTTTATAGATGCTAGTAGTGTGTTTGCTAAGGTGCGCGCGCTGCACAACCGCA
25	Phcy - mir - 1296	TTGACGCTTTTCCACATCACGGGGCTGCTGAGCCATTGAGTTCGCGCAATCTTGGTGTAAGAGCTGTTAA
26	Phcy - mir - 1346	GATGCTGGCACACAGACGTTGCGGTGCGCGGCGACTACGTGCGGCACGCGTGTACGGCTCTGCGCGCACTCGCACTCGCCTGTCTC
27	Phcy - mir - 1348	CGCTCGAGTGTACATGCTGACGTTTGGTGACACGTTGGGTAAGCATTTCTAGCG
28	Phcy - mir - 1363	ACGTGCCCGCGTTGACGCGCTGTACAGGACTACGATCGCGAGTCTGTTGCTGAGTGGCGTGTCAATGGCGGAGT
29	Phcy - mir - 1378	GAAGACTGCTGCGGAACCGCATCACGCCAACGCGGGTTGCACTTCTTCAGGGAGTGT
30	Phcy - mir - 1483	GGCAAGCGCGTGTACTGCACTGCCACGCGGCGTGTCCCGTGGCGCGCGTGGCGGTGTACTACATCATGCGCAGCC
31	Phcy - mir - 1502	ACATGCCGCTGTGCATGCCCCAAATCATGCGCGAGCTCAGCGACGCGGTGTGCGCGCGCGCGCGCATGT
32	Phcy - mir - 20	CCATCATGGACACGACGTTGACGTCTTAGTTCAGTTTACTAATGAGTGC GCGCTCGTCCCGTCCAAAATGG
33	Phcy - mir - 81	GCAGCAAAACCGCGCGCTTAACACCTATTTCGAGGCGCCAAAGACTGCGGGCGTGGCGGTGCTGC
34	Phcy - mir - 94	GTAATATAGACATTTATTTTATACTTAAAAATTAACATTTAATTCATAACTTAAACCTAATTTGTCAAAATCTTTTATAACTAAATTTGTCTATTTTAC
35	Phcy - mir - 104	GCACAGATTACGTGCGCGGAATTTCCGATTTCGTATTCGCGCACTAAATGTAC
36	Phcy - mir - 156	TAGACGCTGTAACTTTGACGCTGTGCTCTCCAGCACGCGGAAGTTACAGTCTA
37	Phcy - mir - 216	ACGCTGCGCGCGCGCTCGAGCGACGACTATTACGTGCGCGCGCTGCTGCGGACCGCGCGC
38	Phcy - mir - 222	GTCGATTCCAGTCCAAGATGTATTTTACAGCCCTACCTACGCACGAGGAGCACACCATCATGCGGTGACGAC
39	Phcy - mir - 339	TGACGCGCGCGCGCGCGCCCAACGCGGAAGTGCTTTTTCGAAAGCGCGCCACGACCGCGCGCGCGCGCTCA
40	Phcy - mir - 393	GCCCTGCGGCCAGGGCACCAACACGAAAAATATTACGAAGCACATTTTGGCATACCGGTAATCCGAGTAGGTACCCAAGCTGTGCCCAACAGCAC
41	Phcy - mir - 410	AAACAGCGACGCGGCGAGCAGCGCTCTTAAGCAGCGTGTCAAACGACACCGGATATTTAAGCAGCGCGGTGCCCGCCAGCGCAATTT
42	Phcy - mir - 413	GCGCGCCAAAAGAAATTTATAGCTGACGCTCTGACGCGGCAATGTCACCGCTGAACGGCTGACGCGCTGCGGCTTCAAAACGACTCGTA
43	Phcy - mir - 517	CACGACGCTAGTAGGACGTCAGTCAAAATGAGACCGCGCATTCACCACCGCGCGGTGGCTGCGCGCTTCAAAACGACTCGTA
44	Phcy - mir - 664	GCAATCCGCTACCCAGTCCAAACAGTTCAAACGCGCGCGTGATAAAGCTTTCGAGTAGTGTAGCAGCTTGC
45	Phcy - mir - 676	GAACCCACAGATTTTGAGACCAACACGCTTATGAAAAATTTAATGGCATACGTAACAATGACTTTTCAACACATTAACGACTACAAGTGGATCC
46	Phcy - mir - 696	GCGACGCTAGACGCGCGCGCGCTGCGCGGCGGCGACCGCGCGCTCGCGGTTTTCGCGGCACACAAGCGGCAC
47	Phcy - mir - 712	GGCCAGCGAGGAGCGCGCGCTTAAGTTGTAGTACAAACAAGCGCGTCCGCTGGACC
48	Phcy - mir - 752	GCGCGCGCGTGTCCGCGAGCGACGCGCAAAACCGTATTGAGTTTGTGCGCGAGAAGCAACACCGCTTAATGAGGGGCGCGC
49	Phcy - mir - 757	CACAGCGCGAATACCCGACCGCTGTGTCCACGCGCGCGCATGAGCGCGCGCGCTCGCTTAAAGCGGACGAGTCCGTGTG
50	Phcy - mir - 767	ACACGGGCAATTACAGCGACCTGCGCGCGCGTTGCGCAACACGCGCGCGCGCAGGCGCGCGGTTTTCGCGATGC
51	Phcy - mir - 781	ATGCTCAAAAGTGCCATCGACACCATTTTACACTTTATCGATTCAAAGATTAATAATGATGAACGGCGACTATGTGCAC
52	Phcy - mir - 809	CATTACACTAGTTAATTATAGTTTATTTATTTATTTACATTAACGTAATAAAATTACAATTATTATTAATCTGTGTGTAACG
53	Phcy - mir - 850	TCAGAAGCGCTGCACTATTTATGCGCGCTTCCCGCTTTGCCTCAAGCAAGCGCATTCGCGGTGGCACTACCGTGTTTAGCGGTGCAACGCTTCGGA
54	Phcy - mir - 884	ACGTGTTTGACCTGCCTTACATACGCGCGGTTTAAAGGCAGCAAAACAGCT

续表 2

序号	miRNA 名称	PhcyNPV 的 miRNA 前体序列(5'→3')
55	Phcy - mir - 906	GGTCAAGCGCGACGTGGTGCCGACACGCTGTGCGGCGCGCGTCCAACGACC
56	Phcy - mir - 991	GAACGCGCGCGCGCGCGCGCGCGCTCGGTGCGTTTTCGCGAAAAGCCGCTGTAGTACGGTTGCGCGCGCTC
57	Phcy - mir - 1012	GGCCAGCTGTTGCGCGCGCGCGCGCGCGCGGTGGCTTAGCGCGCGCGCGGCGCCACCGCCGCGTAATCTTGGCTGGCC
58	Phcy - mir - 1039	AACAACTTAAAGGCAAGCTGCGCGCTCGTGGGCAAAAGCACCGCCCGCGCTTAAGTTTATC
59	Phcy - mir - 1043	GCACCAACGGCGCGTTCAACTTGTACAAGGTGTACGTGTTTTTCGCGAAAACGCGCAACCAATTGTCTGAATCGTTAGCGCCAGTATGGCGC
60	Phcy - mir - 1047	GCTATCCCATATTTAACATTCCGTACATGCTTTTTAACAAATACGCCGACAACATTTACAAGGAATTCACAGGAACAAC
61	Phcy - mir - 1095	ACAATGTGCAAAAACCTCCACCCACTGCGACACTAGCACCACTTGTCTGCGGCGAGTCCAGCACACGCTGC
62	Phcy - mir - 1148	GTGATCAACGTGCGCGAGGACGACGAGCAGCGCACCGCGAGAACGCTGTTTGGCATGCTGATCGACCGGCACAATTGCTTTGAAAAAC
63	Phcy - mir - 1155	GGCGAAGGGTTTTCGCGCGCGCGCGCGCGAGCGCGACGAGCGCGCGCTTAGAGCGCGCGCGCGCGCGCGCTGCC
64	Phcy - mir - 1197	GCCGTCGCGCGGTACAATGCGCACAGCGCGCGGAACCGCGCTAGACGGCTCATGACAGCGCGCGTGCACCAACTCACCACCGGC
65	Phcy - mir - 1217	ACTAGTTACAATTCAACGCGCTTTCGGGTATAGCTGTACCCGAAAGACGCGTTGATTGTCTTAGC
66	Phcy - mir - 1272	TGTCGCGGACGCGCACGTGCGCAACGAGTGCATGTTGCGGACGTAGCGCCCCATAAACAA
67	Phcy - mir - 1281	TTGGCCATCATTTTGTGATTTCAACAGGTACAGGCATTCTGTGCTACTAGAACGGTTACCGTTTATGCACATTACAAAGTCCAA
68	Phcy - mir - 1282	CACGGCGGCAACAGCGCGCGCGGTGTGGCGCGCGCGCGCGCAGCAGCGCGCGCGCG
69	Phcy - mir - 1335	AATACTTTAAATTGGCAAAACGCGCATCGGCATTTTACATTTAGCGAAAATTTGGCGTCTGCTGCTACCGACGTTAATTTGAAGCACT
70	Phcy - mir - 1364	TGTTTGGCAGCGGACACAAAGTCGCGCGCTGTCCAACACATTTGTTAGGTTAAATGCTCCGTGGCGCGTGCACAGGACA
71	Phcy - mir - 1407	CGCAGCGGGGCGCGCTGCGCGGCATGACTGTCAATGCGGGCGCGCGCTGAGCGACAATTTATAATTGCGCGCGCAGCGCGCGCGCGCTTAATGCG

2.4 预测结果与 miRBase 的同源性比对

将 71 条前体得到的 142 条成熟序列,与 v20.0 版本的 miRBase (<http://www.mirbase.org/>) 数据库的前体序列进行比对分析,发现共有 134 条成熟序列有同源性 miRNA 序列,其余 8 条则未见有同源序列,可能是 PhcyNPV 中特有的。

2.5 PhcyNPV 可能编码的成熟 miRNA 的靶基因预测

为了提高预测的准确度,使用 2 个软件(miRanda、RNAhybird)分别预测 miRNA 成熟体的靶基因,然后提取这 2 个软件预测的交集作为最终的预测结果。有 33 条 miRNA 成熟体序列预测到 61 个 ORF(即病毒自身的靶基因)上,见表 5。可以看出,成熟体 miRNA 可能调控的靶基因涉及 PhcyNPV 基因组中各类基因,从时间上看有极早期基因(*PE 38*、*pnk/pnl*)、早期基因(*ME53/hr2*、*P12*、*HE65*)、滞早期基因(*p31*)、晚期表达基因(*lef-3*、*lef-8*、*lef-9*);从功能上看,有与病毒复制相关基因、能影响病毒包埋相关基因、与经口感染相关因子、与宿主域相关基因、抑制宿主细胞凋亡基因、编码合成与病毒复制及感染相关的酶与调节蛋白基因等,有的是核心基因,有的则是杆状病毒的非必需基因。由此可见,在 PhcyNPV 基因组中可能编码的成熟体 miRNA 在蓖麻蚕核型多角体病毒侵染宿主蓖麻蚕的过程中,从侵染的起始到后期各个阶段都可能通过调控病毒自身基因来实现病毒侵染寄主细胞的作用。

2.6 预测的 miRNA 成熟体的 RT-PCR 验证

根据“2.5”节中用 miRanda、RNAhybird2 个软件分别预测成熟体 miRNA 的靶基因,有 33 条成熟体 miRNA 在 2 个软件中都预测到相关的靶基因。选取这 33 条 miRNA 为研究对象,用 RT-PCR 验证这些 miRNA 成熟体的序列。

根据成熟体序列设计相应的反转录引物以及 PCR 上游引物,将对照组和试验组的蓖麻蚕脂肪体总 RNA 反转录成特异性的 cDNA 后进行 PCR 扩增,扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测,有 8 条序列是单一条带且序列的大小与理论预测值相符,部分电泳结果如图 3 所示。

分别挑出这 8 条单一且大小接近 64 bp 的条带,重新进

行 PCR 验证,依然呈现单一条带,且大小符合理论值。由图 4 可见,这 8 条带对应的成熟体 miRNA 从 1~8 分别是 Phcy - miR - 177_3p、Phcy - miR - 996_5p、Phcy - miR - 696 - 5P、Phcy - miR - 664_3p、Phcy - miR - 30_5p、Phcy - miR - 217_5p、Phcy - miR - 1483_3p、Phcy - miR - 177_5p。

将这些 PCR 产物进行割胶回收、连接转化,菌液 PCR 后送生工生物工程(上海)股份有限公司测序。测序产物与 PhcyNPV 基因组比对,有 6 条带在基因组内有完全一致的序列,另外 2 条与基因组序列不一致。6 条可能为 PhcyNPV 编码的 miRNA 成熟体序列,分别为 Phcy - miR - 996_5p、Phcy - miR - 5P、Phcy - miR - 664_3p、Phcy - miR - 30_5p、Phcy - miR - 217_5p、Phcy - miR - 1483_3p。PCR 产物的电泳图中显示对照组的脂肪体 cDNA 也能扩增出大小相似的条带(图 5),但是这些条带经测序比对后发现与 PhcyNPV 基因组不完全一致,因此认为不是目的条带。

3 结论与讨论

本试验利用计算机预测 PhcyNPV 中可能编码的 miRNA 分子,共得到 142 条 miRNAs 序列。通过比对 miRBase 数据库,发现 134 条有同源序列,其余 8 条则没有同源序列,可能是 PhcyNPV 特有的 miRNA 分子。目前大多数研究都将重点放在 miRNAs 在宿主与病毒互作中的功能研究上,但越来越多的证据表明,miRNAs 通过直接靶向病毒基因或改变自身基因的表达在防御反应中也起到重要作用。此外,由于本研究预测的 PhcyNPV 的 miRNAs 数量较之前已研究的 BmNPV 的 miRNA 要多,在试验验证 miRNA 成熟体序列之前,笔者先用 miRanda、RNAhybird 2 个软件预测 miRNA 对病毒自身靶基因,然后选择 2 个软件均预测到相同靶基因的 33 条 miRNA,再对这 33 条 miRNA 做试验验证,相对提高了验证序列的可靠性。

从对 BmNPV 及其宿主家蚕的 miRNA 研究^[4,9]看,miRNA 的表达具有时间和空间的特异性,因此取什么组织作样本和什么时间取样就很重要。以往研究家蚕及 BmNPV

表 3 PheynPV 中成熟 miRNA 序列

序号	miRNA 名称	成熟 miRNA 序列 (5'→3')
1	Pheyn - miR - 1045_3p	GATTACGCGCGGTGGCGGCC
2	Pheyn - miR - 1045_5p	TAAGCCACCGCGGGCGCGCG
3	Pheyn - miR - 1072_3p	GTGTGTTAGCAGCACGCCGTG
4	Pheyn - miR - 1072_5p	GGACAGCCCAGCGGCGCGCG
5	Pheyn - miR - 1125_3p	CTGGGCTGGCACCGCACGGCG
6	Pheyn - miR - 1125_5p	TGCGCATGGCGGTGCCGTACGC
7	Pheyn - miR - 113_3p	ACTTGCTGATGGACAGAGTGTA
8	Pheyn - miR - 113_5p	GAGCCGTTTGTGTACACGCTG
9	Pheyn - miR - 1141_3p	GCACTGGAACCCGCGAGGTGGAG
10	Pheyn - miR - 1141_5p	GGGCCGATCCACCGTTTGGGG
11	Pheyn - miR - 1267_3p	CTAAGACAAATCAACGCGTCTT
12	Pheyn - miR - 1267_5p	CTATACCCGAAAGACGCGTTGA
13	Pheyn - miR - 1288_3p	CGCGTTGTGCAGCGCGCGGACC
14	Pheyn - miR - 1288_5p	TATCGACTATCTAAACCGACTG
15	Pheyn - miR - 1296_3p	TAACAGCTTTTACACCAAGATT
16	Pheyn - miR - 1296_5p	ATGGCTCAGCAGCCCGTGATG
17	Pheyn - miR - 130_3p	CGCGCGCACACCGCAAACCCC
18	Pheyn - miR - 130_5p	GTGCACAAAGAGTTCGCGGAAC
19	Pheyn - miR - 1346_3p	AGTGCAGTGCAGCGGACGAGGC
20	Pheyn - miR - 1346_5p	GTGCGCCACGTAGTGCCCGGCG
21	Pheyn - miR - 1348_3p	CTTAACCCGCTAGAATGCTTAC
22	Pheyn - miR - 1348_5p	ACCAACGTCAGCCATGTACACT
23	Pheyn - miR - 1363_3p	ATTGACACGCCACTCCAGCACA
24	Pheyn - miR - 1363_5p	ATCGTAGTCCCTGTACAGCGCG
25	Pheyn - miR - 1378_3p	AAAACTCCCTGAAGAACTGC
26	Pheyn - miR - 1378_5p	TGGCGGTGATGCGGTTCGCGAG
27	Pheyn - miR - 1483_3p	ATGATGTAGTACACCGCCAGCG
28	Pheyn - miR - 1483_5p	ACGCCCCGCTGGCAGTGCCTA
29	Pheyn - miR - 1502_3p	ACATGCCGCGCGCGGCGGACAC
30	Pheyn - miR - 1502_5p	GAGCTCCGCCATGATTTTGGCC
31	Pheyn - miR - 177_3p	GCAGCTACTTTGACCTAAAAGA
32	Pheyn - miR - 177_5p	GAGGCTAAAGCGTTTATTTCCA
33	Pheyn - miR - 217_3p	AGCAGCTCGCGCTTTCGACGCC
34	Pheyn - miR - 217_5p	AGGCCAGCTTGACCGCGAGCGC
35	Pheyn - miR - 30_3p	TTTGGACGGGACGAGCGCGCAC
36	Pheyn - miR - 30_5p	GAACTAAGGACTGCAACGTCGT
37	Pheyn - miR - 376_3p	AAACACAAAAATTAATAAAAGA
38	Pheyn - miR - 376_5p	AAATTAATAAACTTTTCAAAC
39	Pheyn - miR - 42_3p	CGCAAGCGCACACGCAGTTTGT
40	Pheyn - miR - 42_5p	CCAGTCGACGATGCAACCGCGT
41	Pheyn - miR - 458_3p	ATGCACACGCGATGGAAGGTTA
42	Pheyn - miR - 458_5p	CGCGCAAGTTTCCATTTTTTC
43	Pheyn - miR - 493_3p	CCCGGCCGACGCGGACACGTTT
44	Pheyn - miR - 493_5p	CAACGGCGTTTCAAGCGTCGAC
45	Pheyn - miR - 530_3p	CGTTTGAACGCGAGCGCAGCCA
46	Pheyn - miR - 530_5p	TGCCGCGGTCTCATTTTGCCT
47	Pheyn - miR - 687_3p	ACGAAGGATGTAGAAACGATTT
48	Pheyn - miR - 687_5p	TTAGCGTGCGAATCATTTCTT
49	Pheyn - miR - 740_3p	GGCCTTGGCGCGGCGCAGCTCT
50	Pheyn - miR - 740_5p	TGCAGACTTCGGTAAGCTCGCC
51	Pheyn - miR - 748_3p	AAGGTAACATTATTAATAACA
52	Pheyn - miR - 748_5p	TTTAAAGCATTTGTAAAAATA
53	Pheyn - miR - 825_3p	GGCGCAAACGTTTGGAAAAACA

续表 3

序号	miRNA 名称	成熟 miRNA 序列(5'→3')
54	Pheyn - miR - 825_5p	CACAAGCTGTCGTTTTTCACTT
55	Pheyn - miR - 853_3p	TTAATAATAATTGTAATTTTAT
56	Pheyn - miR - 853_5p	AATAAATAAATAAACTATAAT
57	Pheyn - miR - 960_3p	GCCAGCTCGTCCTGTGTTCGT
58	Pheyn - miR - 960_5p	TTCCAGCAGTTCGTTTATGAAC
59	Pheyn - miR - 971_3p	AAAAATTATTTTTAAACACGTG
60	Pheyn - miR - 971_5p	TAAACTACAAAAATAACAAATG
61	Pheyn - miR - 996_3p	GCGACGCACCATGACGCCGTGT
62	Pheyn - miR - 996_5p	GTACTTGTACAGGGGCAACAGC
63	Pheyn - miR - 1012_3p	TGTTGCGCGGCCGCGCGGCC
64	Pheyn - miR - 1012_5p	CGGCCCGCGGGCCGCCACCGC
65	Pheyn - miR - 1039_3p	GTGAACAAACTTAAAGGCAAGC
66	Pheyn - miR - 1039_5p	CAAAGCACCGCCCGCGCTTAAG
67	Pheyn - miR - 1043_3p	CGTTCACTTGTACAAGGTGTA
68	Pheyn - miR - 1043_5p	GCAAAACGCGCAACCAAATTTGT
69	Pheyn - miR - 1047_3p	ATATTTAAACATTCGGTACATGC
70	Pheyn - miR - 1047_5p	ACGCCCGACAACATTTACAAGG
71	Pheyn - miR - 104_3p	ATCACTGCACAGATTACGTTGC
72	Pheyn - miR - 104_5p	TGATTGCGGCACTAAATTTGTAC
73	Pheyn - miR - 1095_3p	GTGCAAAAACTCCACCCACTGC
74	Pheyn - miR - 1095_5p	CACCTTGTCTCGGGCGAGTCC
75	Pheyn - miR - 1148_3p	CGTGCGCGAGGACGAGCAGGAC
76	Pheyn - miR - 1148_5p	GAACGTGTTTGGCATGCTGATC
77	Pheyn - miR - 1155_3p	GGTTTTCGCGCGCGCGCGCCA
78	Pheyn - miR - 1155_5p	GGCGCCGCTTGAGAGCGCGCG
79	Pheyn - miR - 1197_3p	TACAATGCGCACAGCGCGCGG
80	Pheyn - miR - 1197_5p	GACGGCGTCATGCAGGCGGCCG
81	Pheyn - miR - 1217_3p	CTAGTTACAATTCAACGCGTCT
82	Pheyn - miR - 1217_5p	TGTACCCGAAAGACGCGTTGAT
84	Pheyn - miR - 1272_5p	ATGTTGGCGACGTAGCGCCCCA
85	Pheyn - miR - 1281_3p	TGTGCATTTCAACCAGGTACAG
86	Pheyn - miR - 1281_5p	TCACTAGAACGGTTACCGTTTA
87	Pheyn - miR - 1282_3p	GTGGTCACGGCGGGCAACAGCG
88	Pheyn - miR - 1282_5p	GGCCGCGCGCGCGAGCAGCGCC
89	Pheyn - miR - 1335_3p	AAATTTGGCAAAACGGCGATCGG
90	Pheyn - miR - 1335_5p	AGGCAAAATTTGGCGTCGTCGC
91	Pheyn - miR - 1364_3p	CAGCGGACACAAAGTGCGGCGC
92	Pheyn - miR - 1364_5p	CATTGTTGAGGTTAAATGCTCC
93	Pheyn - miR - 1407_3p	GCGGCGTCGCGGCGCATGACTGT
94	Pheyn - miR - 1407_5p	GCCCGCGCTGAGCGACAATTTA
95	Pheyn - miR - 156_3p	AAGTAGACGGTGTAACTTTGCA
96	Pheyn - miR - 156_5p	GTCCAGCACGCGGAAGTTACAG
97	Pheyn - miR - 20_3p	CATCATGGACACGACGTTGCAG
98	Pheyn - miR - 20_5p	TTACTAATGAGTGCGCGCTCGT
99	Pheyn - miR - 216_3p	TACACGCTGCGGCCCGCGTCGA
100	Pheyn - miR - 216_5p	GTGCCCGCGTCTGTCGCGGACC
101	Pheyn - miR - 222_3p	ACGTCCAAGATGTATTTTAACA
102	Pheyn - miR - 222_5p	ACGCACCGAGGAGCACACCATC
103	Pheyn - miR - 339_3p	GCGCCGCGCCCGCCACAAGCC
104	Pheyn - miR - 339_5p	TTGCAAAAGCGCGCCAGCAGC
105	Pheyn - miR - 393_3p	CCAAACACGAAAAATATTATCA
106	Pheyn - miR - 393_5p	GCATACCGGTAATCCGAGTAGG
107	Pheyn - miR - 410_3p	GGGCAGCAGCGTCTCTTAAGC
108	Pheyn - miR - 410_5p	ACGACACGGATATTTTAAGCAC

续表 3

序号	miRNA 名称	成熟 miRNA 序列(5'→3')
109	Phcy - miR - 413_3p	TTTATAGTCGACGTGCTGCAGC
110	Phcy - miR - 413_5p	GCACGCTGAACGGCTGCAGGCA
111	Phcy - miR - 517_3p	GGAGCGCAAGTGCAAAATGAGA
112	Phcy - miR - 517_5p	ACCACCGCGGGGTGGCTGCGCT
113	Phcy - miR - 664_3p	TCCGGCTACCCAGTCCAAAACAG
114	Phcy - miR - 664_5p	CCCGTGATAAACTGTTCGCAGT
115	Phcy - miR - 676_3p	CCAACACGCTTATGAAAAATTT
116	Phcy - miR - 676_5p	CAATGACTTTTCACAACCACAT
117	Phcy - miR - 696_3p	GCTAGACGGCGCGCCGCGTGCG
118	Phcy - miR - 696_5p	CCGCCGCCCTCGCGGTTTTTCGCG
119	Phcy - miR - 712_3p	AAGGCCAGCGAGGAGCGCGCGC
120	Phcy - miR - 712_5p	AGCAAACAAGCGCGTCCGCTGG
121	Phcy - miR - 752_3p	CGCGCCGTGTCCGCGAGCGACG
122	Phcy - miR - 752_5p	GGAGTTTGTCGCCGAGAACGAA
123	Phcy - miR - 757_3p	TACCCGACCGCTGTGTCCACGG
124	Phcy - miR - 757_5p	GAGCGCGCCGGCTCGCTTAAAG
125	Phcy - miR - 767_3p	CATTACCAGCGACCTGCGCCGG
126	Phcy - miR - 767_5p	AACACGCGCGCGCGCAGGCGC
127	Phcy - miR - 781_3p	AAAGTGCCATCGACACCATTTT
128	Phcy - miR - 781_5p	TTCAAAGATTAAAAATGATGAAC
129	Phcy - miR - 809_3p	ACACTAGTTAATTATAGTTTTA
130	Phcy - miR - 809_5p	ATTAACGTAAATAAAATTACAA
131	Phcy - miR - 81_3p	GCGTTGCAGCAAAACCCGCGCC
132	Phcy - miR - 81_5p	AGGGCGCCAAGACTGCGGGCGT
133	Phcy - miR - 850_3p	TATGCCGCTTCCCGGCTTTGCC
134	Phcy - miR - 850_5p	CATTGCGGGTGGCACTACCGTG
135	Phcy - miR - 884_3p	CGGCGACGTGTTTGACCTGCCT
136	Phcy - miR - 884_5p	CGCGTTTAAAAGGCAGCAAACC
137	Phcy - miR - 906_3p	GAAATGGTCAAGCGCGACGTGG
138	Phcy - miR - 906_5p	CTGTGCGGCGCCGCGTCCAACG
139	Phcy - miR - 94_3p	TTTCATAACTTAAATTTAAACA
140	Phcy - miR - 94_5p	TAAAACCTAATTGTCAAATTCT
141	Phcy - miR - 991_3p	CGCGCGCCGCGCGCGCGCGCG
142	Phcy - miR - 991_5p	TGCGCAAAAGCCGCTGTAGTA

时,一般取病毒感染后的血液(或马氏管)作为研究对象,因为这二者中病毒的复制数较高;考虑到病毒感染家蚕后,病毒和家蚕有个相互抗衡的过程,病毒需要有足够的时间产生 miRNA 起作用,因此通常选择感染后 72 h 取样,希望获得更多的 miRNA 分子序列。但是钱荷英等研究发现,在 PhcyNPV 感染蓖麻蚕后期的各组织中,脂肪体内的病毒基因拷贝数远远高于其他组织,且直到 120 h 还保持增殖趋势^[10],这也可能间接提示 PhcyNPV、BmNPV 在感染各自寄主时有其相对特殊的感染方式。

在用 RT - PCR 进行 PhcyNPV 的 miRNA 成熟体序列验证时,有的 PCR 产物出现并非专一的非目的条带,可能是扩增了蓖麻蚕基因组产物所致,因为所取试验材料中蓖麻蚕的组织样品含量远高于 PhcyNPV,因此这些扩增条带没有割胶回收验证。至于对照组织中也扩增出与目的片段大小相似且表达量相对较高的 miRNA 分子,可能是由于蓖麻蚕本身也会编码产生相应的 miRNA,而且这些 miRNA 在病毒感染过程中也起到抑制、调控病毒的复制和侵染作用,因此导致对照组织中有 miRNA 分子被扩增出。鉴于目前没有相对完整的蓖麻蚕基因组信息,因此对照组中扩增出的成熟 miRNA 分子无法验证,只好忽略。

从靶基因预测结果看,1 个 miRNA 可能作用于多个靶基因,而 1 个基因又可能受多条 miRNA 的调控,可见 miRNA 对病毒自身的调控是个复杂的网络系统,涉及多种基因及病毒侵染的各个阶段。由于完善的蓖麻蚕细胞系尚没有建立,而 PhcyNPV 对已经成熟的几个细胞系如 Bm、sf 等的感染性不理想,miRNA 的生物学功能验证试验很难开展,这也是本研究的一大缺憾。

参考文献:

[1] Lee Y, Ahn C, Han J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing[J]. Nature, 2003, 425 (6956) : 415 - 419.
[2] Zheng Y S, Zhao P, Jia B B, et al. Host - virus Interaction at the miRNA level[J]. Microbiology, 2008, 35 (7) : 1143 - 1145.

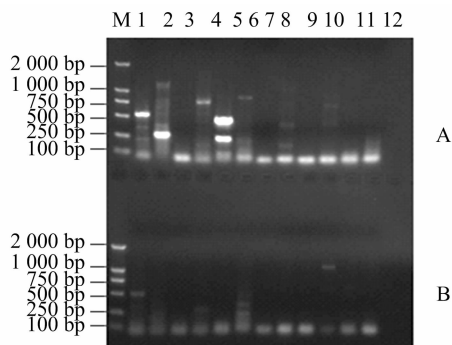
表 5 PhcyNPV 中 miRNA 潜在的靶基因预测结果

miRNA 名称	靶基因	靶基因功能
Phcy - miR - 1045_3p	ORF - 93 : <i>Anpe - ORF099, Ac51/Op55</i> ORF - 117 : <i>p31</i>	未知 滞早期基因,可能编码合成与病毒基因组复制及晚期基因表达相关的酶或调节蛋白
Phcy - miR - 216_5p	ORF - 2 : 1 629 ORF - 4 : <i>Anpe - ORF004AngeMNPV150/CjDEF147</i>	未知 未知
Phcy - miR - 664_3p *	ORF - 2 : 1 629	未知
Phcy - miR - 696_5p *	ORF - 1 : Polyhedrin ORF - 2 : 1 629 ORF - 4 : <i>Anpe - ORF004</i> ORF - 5 : PE 38	多角体蛋白基因 未知 未知 极早期基因,具有反式激活作用,激活杆状病毒解旋酶的表达蛋白激酶
Phcy - miR - 752_3p	ORF - 3 : <i>protein kinase 1</i> ORF - 6 : <i>Anpe - ORF006</i>	未知
Phcy - miR - 767_5p	ORF - 44 : <i>odv - ec43</i> ORF - 120 : <i>pif - 2</i>	包涵体衍生病毒 (occlusion - derived virus, 简称 ODV) 的囊膜蛋白的 1 种,可能影响包埋 口服感染因子 (核心基因)
Phcy - miR - 781_3p	ORF - 68 : <i>vp91</i>	囊膜蛋白的 1 种 (核心基因)

续表 5

miRNA 名称		靶基因	靶基因功能
Phcy - miR - 850_3p	ORF - 2; <i>I 629</i>		未知
Phcy - miR - 1288_5p	ORF - 5; <i>PE 38</i>		极早期基因,具有反式激活作用,激活杆状病毒解旋酶的表达
Phcy - miR - 991_3p	ORF - 3; <i>protein kinase 1</i>		蛋白激酶
	ORF - 5; <i>PE 38</i>		DNA 复制促进基因,极早期基因,具有反式激活作用
Phcy - miR - 1296_3p	ORF - 117; <i>p31</i>		滞早期基因,可能编码合成与病毒基因组复制及晚期基因表达相关的酶或调节蛋白
Phcy - miR - 1346_3p	ORF - 120; <i>pif - 2</i>		口服感染因子(核心基因)
Phcy - miR - 1346_5p	ORF - 2; <i>I 629</i>		未知
Phcy - miR - 1348_3p	ORF - 120; <i>pif - 2</i>		口服感染因子(核心基因)
Phcy - miR - 1378_3p	ORF - 123; <i>Anpe - ORF132 ,Ac18/Op17</i>		未知
Phcy - miR - 1378_5p	ORF - 64; <i>lef - 4</i>		中度保守基因,功能多样,主要是调节酶的功能(核心基因)
		ORF - 123; <i>Anpe - ORF132 ,Ac18/Op17</i>	未知
		ORF - 130; <i>Anpe - ORF138 ,AngeMNPV21/CjDEF19</i>	未知
Phcy - miR - 1483_3p *	ORF - 134;<i>ptp 2</i>		不参与包涵体(occlusion body,简称 OB)结构构成,具体功能不清楚,对杆状病毒的作用可能大于 <i>ptp - 1</i> 基因
Phcy - miR - 177_3p	ORF - 15; <i>P49</i>		可抑制病毒感染引起的昆虫细胞凋亡
Phcy - miR - 177_5p	ORF - 15; <i>P49</i>		可抑制病毒感染引起的昆虫细胞凋亡
Phcy - miR - 217_5p *	ORF - 20;<i>P74/pif - 0</i>		昆虫口服感染病毒 1 个必需的蛋白因子(核心基因)
	ORF - 65;<i>vp39</i>		与侵染密切相关(核心基因)
	ORF - 99;<i>global transactivator - like protein</i>		类似转录激活蛋白
	ORF - 119;<i>F protein</i>		出芽型病毒(budded virus,简称 BV)融合蛋白,功能类似 <i>GP64</i> (核心基因)
Phcy - miR - 30_5p *	ORF - 3;<i>protein kinase 1</i>		蛋白激酶
Phcy - miR - 530_3p	ORF - 47; <i>pnk/pnl</i>		极早期基因,可能与病毒复制有关
Phcy - miR - 740_3p	ORF - 48; <i>HE65</i>		早期基因,与肌动蛋白单体的核转运有关
	ORF - 66; <i>cg30</i>		转录激活因子
	ORF - 111; <i>Anpe - ORF119 ,Op36</i>		未知
Phcy - miR - 971_5p	ORF - 83; <i>gp50 spindlin</i>		囊膜蛋白,与病毒形状形成有关
Phcy - miR - 996_3p	ORF - 85; <i>Fusion protein - like/25FP</i>		融合蛋白,参与细胞增殖、凋亡、分化等
Phcy - miR - 996_5p *	ORF - 85;<i>Fusion protein - like/25FP</i>		融合蛋白,参与细胞增殖、凋亡、分化等
Phcy - miR - 113_3p	ORF - 10; <i>ie - 1</i>		多功能调节蛋白,是早期基因反式激活因子,又是晚期表达因子,病毒复制必需因子
			病毒早期感染必需因子
Phcy - miR - 1095_5p	ORF - 51; <i>P12</i>		晚期转录调控因子,RNA 聚合酶亚基
	ORF - 94; <i>lef - 8</i>		衣壳蛋白(核心基因)
Phcy - miR - 1197_5p	ORF - 68; <i>vp91</i>		晚期基因表达调控因子(核心基因)
	ORF - 80; <i>lef - 3</i>		未知
Phcy - miR - 1282_5p	ORF - 2; <i>I 629</i>		未知
Phcy - miR - 1141_3p	ORF - 99; <i>global transactivator - like protein</i>		反式激活蛋白
Phcy - miR - 1407_3p	ORF - 17; <i>E53 ,hr2</i>		有利于提高 BV 的复制效率
	ORF - 20; <i>P74/pif - 0</i>		ODV 特异性囊膜蛋白,经口感染因子
	ORF - 23; <i>P94 - like protein</i>		未知
	ORF - 39; <i>pif - 3</i>		经口感染因子(核心基因)
	ORF - 49; <i>P87</i>		鳞翅目核型多角体病毒(nucleopoly hedrovirus,简称 NPV)特有的结构蛋白
	ORF - 59; <i>helicase</i>		解旋酶基因,与宿主域相关(核心基因)
	ORF - 66; <i>cg30</i>		非必需因子,但与 BV 的产量和毒力有关
Phcy - miR - 216_3p	ORF - 84; <i>lef - 9</i>		晚期转录调控因子,RNA 聚合酶亚基
	ORF - 118; <i>NUDIX hydrolase</i>		水解酶
	ORF - 128; <i>38. 7k</i>		核衣壳的装配
	ORF - 15; <i>P49</i>		抗细胞凋亡
	ORF - 66; <i>cg30</i>		非必需因子,但与 BV 的产量和毒力有关

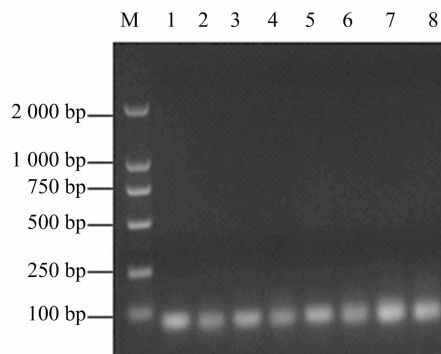
注:“*”表示为下文经过试验验证的 miRNA;加粗标注的是 ORF 及其预测的靶基因及其功能。



M—marker; 1~12—用RT-PCR验证的部分miRNA

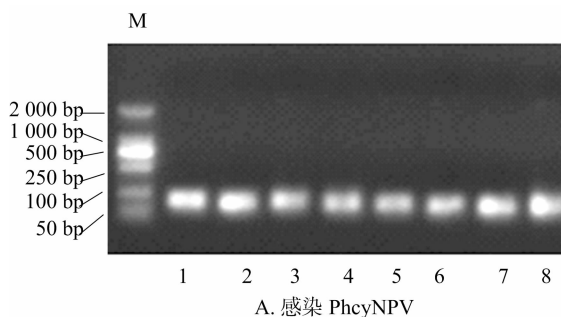
A—试验组; B—对照组

图3 PhcyNPV编码的成熟体 miRNA 序列的电泳鉴定结果

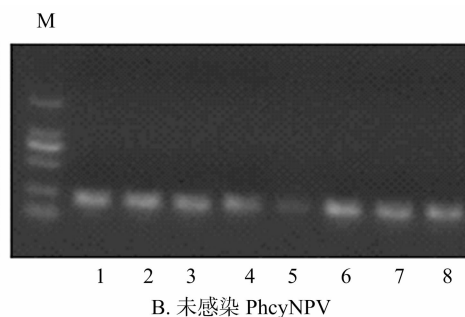


M—marker; 1~8—测序结果与预测值一致的miRNA电泳结果

图4 PhcyNPV编码的成熟体 miRNA 序列的电泳鉴定结果



A. 感染 PhcyNPV



B. 未感染 PhcyNPV

M—marker; 1—Phcy-miR-177_3p; 2—Phcy-miR-996_5p; 3—Phcy-miR-696_5p; 4—Phcy-miR-664_3p; 5—Phcy-miR-30_5p; 6—Phcy-miR-217_5p; 7—Phcy-miR-1483_3p; 8—Phcy-miR-177_5p

图5 RT-PCR 鉴定的 *PhcyNPV* 基因组可能编码的 miRNA 成熟体序列

- [3] Hussain M, Taft R J, Asgari S. An insect virus - encoded microRNA regulates viral replication[J]. Journal of Virology, 2008, 82 (18): 9164 - 9170.
- [4] 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: 13 - 25.
- [5] Singh J, Singh C P, Bhavani A, et al. Discovering microRNAs from *Bombyx mori* nucleopolyhedrosis virus[J]. Virology, 2010, 407 (1): 120 - 128.
- [6] Qian H Y, Zhang Y H, Wu Y J, et al. Analysis of the genomic sequence of *Philosamia cynthia* nucleopolyhedrin virus and comparison with *Antheraea pernyi* nucleopolyhedrin virus[J]. BMC Genomics, 2013, 14: 115.
- [7] Cui C, Griffiths A, Li G, et al. Prediction and identification of herpes simplex virus 1 - encoded microRNAs[J]. Journal of Virology, 2006, 80 (11): 5499 - 5508.
- [8] Grundhoff A, Sullivan C S, Ganem D. A combined computational and microarray - based approach identifies novel microRNAs encoded by human gamma - herpesviruses[J]. RNA, 2006, 12 (12): 733 - 750.
- [9] 赵新慧. 家蚕马氏管响应 BmNPV 感染相关 miRNA 的初步研究[D]. 镇江: 江苏科技大学, 2013: 38 - 41.
- [10] 钱荷英, 徐安英, 张月华, 等. 蓖麻蚕核型多角体病毒基因 *gp64* 的克隆及荧光定量表达分析[J]. 河北农业大学学报, 2013, 36 (6): 76 - 82.

更正 《江苏农业科学》2016 年第 44 卷第 9 期第 64 页刊登的论文《SCAR 标记在地木耳菌株分类鉴定中的运用》中, 基金项目“浙江省科技厅一般项目”更正为“浙江省教育厅一般科研项目”。特此更正。

《江苏农业科学》编辑部