

柞蚕核型多角体病毒基因组编码的 VmiRNA 筛选及功能分析

刘丹梅¹, 宋丽新², 李文利³ (1. 辽东学院农学院, 辽宁丹东 118000; 2. 大连理工大学生命科学与技术学院, 辽宁大连 116024; 3. 大连理工大学盘锦校区生命与医药学院, 辽宁盘锦 124221)

摘要 [目的] VmiRNA 不仅可以控制自身基因, 还可调节宿主的稳定表达, 研究 VmiRNA 的功能有助于从分子水平说明核型多角体病毒与柞蚕的寄生关系, 从而改进对病毒的防控措施。[方法] 利用生物信息及实时定量 PCR 等分子生物学相关技术, 对柞蚕核型多角体病毒编码的 miRNA 及其作用的靶标基因进行研究。[结果] 经预测和筛选得到了 ApNPV 编码的 miRNA MD217, 与其有关的宿主靶基因 14 种, 主要参与细胞组成、生化过程以及分子功能等途径, 涉及到生物体细胞内一些催化、免疫反应等过程; 实时定量 PCR 结果表明, MD217 在病毒感染后上调表达, 脂肪体组织内的靶基因 MAPKK7 表达水平与 MD217 的表达呈正相关。[结论] miRNA MD217 在病毒感染后诱导表达, 推测很可能降低了宿主免疫系统的防御能力, 并同时影响靶基因 MAPKK7 的功能表达, 从而避免了在免疫应答过程中的免疫清除。

关键词 柞蚕; 核型多角体病毒; miRNA; 靶标基因

中图分类号 S 188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)23-0065-04

Target Gene Prediction and Functional Analysis of miRNA Encoded by *Antheraea pernyi* Nucleopolyhedro Virus

LIU Dan-mei¹, SONG Li-xin², LI Wen-li³ (1. School of Agriculture, Eastern Liaoning University, Dandong, Liaoning 118000; 2. School of Life Science and Biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian, Liaoning 116024; 3. School of Life Science and Medicine, Dalian University of Technology, Panjin, Liaoning 124221)

Abstract [Objective] VmiRNA can not only control its own gene, but also regulate the stable expression of the host. Studying the functions of VmiRNA can help to explain the parasitic relation between nuclear polyhedrosis virus and *Antheraea pernyi* on molecular level, thus improving preventions and controls of the virus. [Method] In this study, molecular biological techniques such as bioinformatics and Quantitative Real-time PCR were employed to research the miRNA of *Antheraea pernyi* nuclear polyhedrosis virus and its target gene. [Result] The miRNA MD217, which was encoded by ApNPV, was obtained by predicting and screening. The analysis showed that there were 14 host target genes related to MD217, and they were mainly involved in cell composition, biochemical processes, molecular functions and so on. They also referred to some processes in biological cells, such as catalysis and immunoreaction. The results of the Quantitative Real-time PCR showed that after the virus infection, MD217 up-regulated the expression, and its expression was positively correlated with the target gene MAPKK7 in adipose tissue. [Conclusion] The expression of miRNA MD217 was induced by virus infection. It was speculated to decrease the defense ability of the host immune system and affect the functional expression of the target gene MAPKK7 at the same time, thus avoiding the immune clearance in the immune response.

Key words *Antheraea pernyi*; Nuclear polyhedrosis virus; miRNA; Target gene

柞蚕核型多角体病毒(ApNPV)是柞蚕脓病的病原微生物^[1], 属杆状病毒科包含体杆状病毒亚科, 核型多角体病毒属。杆状病毒是杆状的包膜病毒, 具有环状双链 DNA, 长度为 80~18 000 kb, 这些病毒感染了超过 600 个寄主物种, 主要寄生于节肢动物中的鳞翅目、膜翅目和双翅目昆虫中^[2]。杆状病毒与宿主细胞相互作用机理研究, 包括在病毒进入和结合时的相互作用, 宿主基因表达调节, 以及修饰与调节细胞和机体所发生的生理和防御的相互作用的复杂和微妙的机制等^[3]。

MicroRNA 简称 miRNA, 是真核生物中非编码的内源性小分子 RNA, 是由茎环结构前体物质在核内经过一系列核酸酶的剪切运输到核外加工成熟形成的^[4-5], 其本身不参与蛋白质的编码^[6], 但却参与剪切、降解、抑制翻译以及染色体修饰等生物过程^[7]。miRNA 通过与靶标的结合程度不同来实现调控功能^[8], 当 miRNA 与其靶标完全或近乎完全互补时, 会引起 mRNA 降解而降低其表达; 当两者不完全互补时, 主要通过抑制靶标 mRNA 的翻译起作用^[9]。

目前关于核型多角体病毒编码 miRNA 的研究还较少。

2011 年, 陈蔚等^[10]利用 Vmir 软件成功地预测 5 条家蚕核型多角体病毒(BmNPV)编码的 miRNA 成熟体序列, 经试验分析得到 6 条成熟体序列, 推测其可能参与并调节了病毒感染宿主的过程, 但未进行试验验证。Zhang 等^[11]利用 miRNA 的调控机理, 构建了以 BmNPV 基因 *lef-1* 为靶基因的人工 miRNA 表达系统, 成功利用 RNA 干扰技术产生了具有抑制病毒复制并降低病毒感染的成熟 amiR2764 和 amiR279。李文利等^[12]于 2013 年利用建立的柞蚕基因转录组数据库和基因组 GSS 数据库, 在研究柞蚕核型多角体病毒编码的 miRNA 靶基因时发现 135 个与柞蚕免疫相关的基因, 研究表明这些基因主要参与免疫系统的发育、免疫应答和免疫调节等过程。

笔者通过生物信息学方法和分子生物学相关技术, 对 ApNPV 编码的 miRNA 进行筛选, 并对 VmiRNA 的靶标基因进行预测; 通过靶标基因功能分析及实时定量 PCR 验证, 期望明确 ApNPV 与宿主 miRNA 之间的关系, 并为柞蚕脓病的防治提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料 柞蚕青 6 滞育蛹、柞蚕核型多角体病毒均由大连理工大学生命科学与技术学院实验室提供。

1.2 miRNA 的前体预测 采用 VMir Analyzer(version 2.3) 软件进行 miRNA 的前体预测。首先将 ApNPV 基因组(GenBank 登录号: NC_008035) 导入 VMir 软件中, 设定序列最低

基金项目 国家自然科学基金项目(31171971); 辽宁省自然科学基金项目(201602157); 辽东学院博士启动项目。

作者简介 刘丹梅(1973—), 女, 辽宁丹东人, 教授, 博士, 从事基因工程研究。

收稿日期 2018-05-14

得分 150,最低窗口值 35 为条件初步筛选出病毒基因组编码的 miRNA 前体序列。在 RNAsnpes 软件中得到前体序列的二级结构,并利用 RNAhybrid 分析这些序列的最小折叠自由能等参数,预测候选的 miRNA。依据保守性区域的变化、5'端首个碱基 U 存在等条件,利用 Mireap 得到预测的成熟体序列。

1.3 miRNA 的靶基因预测与功能分析 采用 RNAhybrid 在线预测软件(<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rna-hybrid/welcome.html>)预测 miRNA 靶基因。在软件的窗口中输入 miRNA 序列和柞蚕 cDNA 文库的序列,经过分析得到相关的靶基因。将预测得到的 miRNA 靶标基因序列导入 Blastx 中,与 NCBI 蛋白质数据库已经收录的蛋白质序列进行比对得到序列相似性较高的蛋白质序列,并根据该已知蛋白质的功能注释分析靶标基因的功能,从而得到靶基因的功能信息,并对靶基因进行分类。

1.4 柞蚕脂肪体总 RNA 提取及 cDNA 合成 将 ApNPV 接种在柞蚕蛹脂肪体内,收集已发病的脂肪体组织,放入液氮中研成粉末,参照 miRNeasy Mini Kit 试剂盒(TaKaRa 公司)说明书进行柞蚕脂肪体总 RNA 的提取,于-70℃保存备用。

利用 PrimeScript™ RT reagent Kit 试剂盒(TaKaRa 公司)进行反转录生成 cDNA,过程参照说明书进行。

1.5 预测得到的前体序列的检测 利用前体序列设计上下游引物,以脂肪体总 RNA 反转录合成的 cDNA 为模板,5s rRNA 为内参,进行反转录 PCR 检测。反应条件如下:94℃

预变性 1 min;94℃变性 30 s;58℃退火 30 s;72℃延伸 30 s,共 30 个循环。

将 PCR 电泳条带回收,制备阳性克隆并进行基因测序,将预测的序列信息与测序结果进行比对。

1.6 miRNA 的表达分析 根据预测所得 miRNA MD217 序列设计上游引物(F-5'-TTGTGCTTGAAAAACGTAATCTATT-3');以 SYBR primeScript miRNA RT-PCR kit 试剂盒的通用引物为下游引物(R-5'-GTTTTCAAGAATGGCTGTACTCGA-3'),以柞蚕蛹脂肪体总 RNA 反转录的 cDNA 为模板,利用 TP900 实时荧光定量 PCR 仪,进行实时定量分析。

1.7 VmiRNA 靶基因表达分析 根据预测得到的靶基因 MAPKK7 序列设计引物(F-5'-TGCTCCGAGAAACGTAAGG-3';R-5'-GTTCTGTTCCTGATGTGGATTT-3'),以柞蚕蛹脂肪体总 RNA 反转录生成的 cDNA 为模板,以 β-Actin 作为内参,进行实时定量 PCR 检测,反应条件:95℃变性 30 s;95℃退火 5 s;60℃延伸 30 s,共 40 个循环,每组数据重复 3 次。并与 miRNA 的实时定量 PCR 结果进行同步对比。

2 结果与分析

2.1 预测得到的 VmiRNA 前体序列及其二级结构特征 在 Vmir Viewer 中设置发夹结构大于 150 nt,长度 70~165 bp,得到正链上的 5 个 VmiRNA。应用 RNAfold 分析这些 VmiRNA 分子前体序列二级结构,这些预测得到的二级结构均含有茎环结构,最小折叠自由能为-23~-60 kJ/mol 的有 3 个 VmiRNA,平均值为-33.97 kJ/mol(表 1)。

表 1 预测的 ApNPV 编码的 miRNA 前体序列

Table 1 Predicted miRNA precursor sequences encoded by ApNPV genome

名称 Name	最小自由能 Minimum free energy kJ/mol	前体序列(5'-3') Precursor sequence(5'-3')	基因组的位点 Genomic locus	编码链 Coding strand
MD211	-11.66	TGTTGTAATGCATTATAATCTTTGTAAATTTTCATAAATGTATAAT TTTAAACGTTTATTTGTGTATAATCTTTGTAAATTTTAAATAATCAAA TAAATGTATTCAAACA	18 270~18 375	+
MD214	-19.70	ACTATFATAATTGCCACCGTTGCGCTGGCCACATGCGTGTGGC ATGCACAGAAGACGGTAGAAATTGCCAGT	18 424~18 493	+
MD217	-49.98	GTTTTTCAAAAACGATTGTGCTTGA AAAACGTAATCTATTTTTAG CAATGCGTCAGCGCTGATTTTTGCTTTTCGAGTACAGCCATTCTTG AAAACGTCATCTATTTTTAGCGATGCGTCAGCGCTGATTGTGCT TTTTGAGTACAGCCATTCTTGA AAAAC	18 616~18 777	+
MD219	-25.70	GTTTTTCAAAAACGATTGTGCTTGA AAAACGTAATCTATTTTTAGC AATGCGTCAGCGCTGATTTTTGCTTTTCGAGTACAGCCATTCTTGA AAAC	18 616~18 711	+
MD220	-26.90	GTCAGCGCTGATTTTTGCTTTTCGAGTACAGCCATTCTTGA AAAACGT AATCTATTTTTAGCGATGCGTCAGCGCTGAT	18 931~19 008	+

注:“+”表示正链;“-”表示负链

Note:“+”was positive strand;“-”was negative strand

通过与测序结果进行对比分析,利用 RNAsnpes 得到 VmiRNA 的二级结构,主要依据二级结构不同区域序列保守性的变化、5'端首个碱基 U 的存在、内部环和泡状区域的对称性、miRNA 序列与末端环之间(2~9 nt)的保守性互补碱基对等筛选出 VmiRNA MD217(图 1),并利用 MD217 进行后续试验。

2.2 miRNA 前体序列 MD217 的鉴定 以预测得到的 MD217 前体序列及成熟体序列为基础设计引物,对已经被

ApNPV 感染的柞蚕脂肪体组织的 RNA 进行 PCR 扩增。在 2%琼脂糖凝胶电泳中鉴定 PCR 产物,得到与预测的 VmiRNA 前体 MD217 分子量相符合的条带(图 2)。将回收产物测序,经过与 ApNPV 基因组序列比对,得到的结果一致,推测这条序列就是 ApNPV 编码的 VmiRNA MD217 前体序列。

2.3 VmiRNA MD217 的靶基因预测及表达分析 运用 RNAhybrid 软件对成熟 VmiRNA MD217 的宿主靶标基因进行预测,结果找到多个靶标基因,这些靶标基因主要有 14 种(图 3),分为细胞组成、细胞过程等方面,参与细胞内免疫系

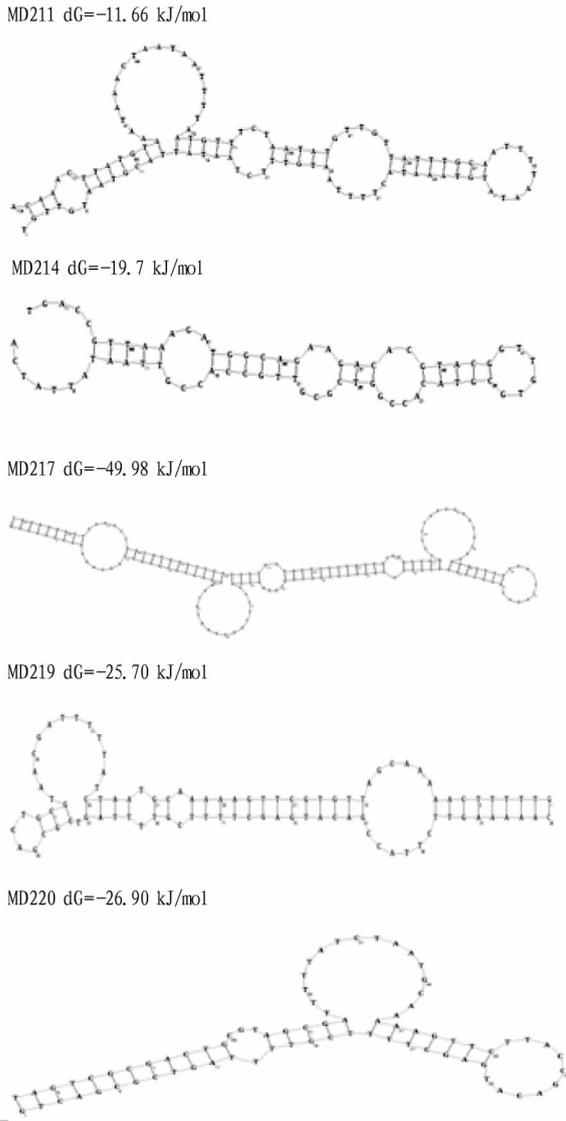
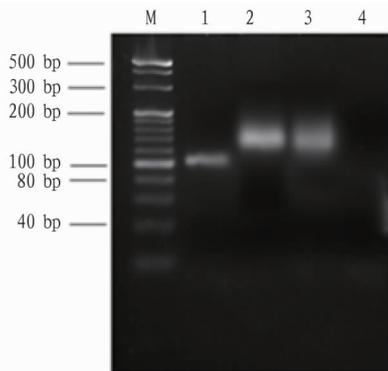


图 1 VmiRNA 前体序列的二级结构

Fig. 1 Secondary structures of VmiRNA precursor sequences



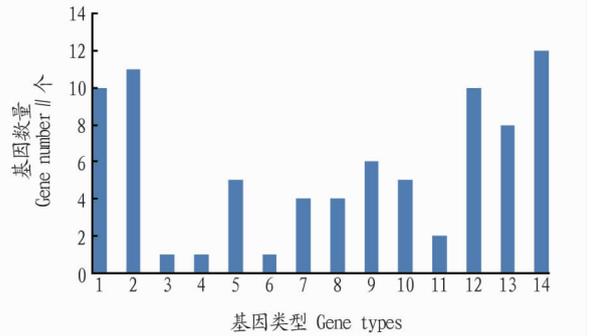
注:1 为 5s rRNA;2,3 为已经感染 ApNPV 的柞蚕脂肪体;4 为未感染 ApNPV 的柞蚕脂肪体;M 为 Marker

Note: 1. 5s rRNA; 2, 3. Total RNA of fatbody with ApNPV infection; 4. Total RNA of fatbody with ApNPV uninfestation; M. Marker

图 2 ApNPV 编码 miRNA MD217 的 PCR 结果

Fig. 2 PCR amplification results of VmiRNA MD217 sequences encoded by ApNPV genome

统、分析结合、酶催化反应等过程。其中,与免疫系统相关的有 6 个(表 2),主要参与免疫调节、免疫应答等过程。



注:1. 细胞膜;2. 细胞结构蛋白;3. 细胞外组分;4. 高分子复合物;5. 分子传感器;6. 抗氧化剂;7. 酶催化;8. 转录调节因子;9. 细胞进程;10. 生物调节;11. 细胞繁殖;12. 细胞组成的组织;13. 细胞应答;14. 神经传导

Note: 1. Envelope; 2. Cell construction protein; 3. Extracellular region; 4. Macromolecular complex; 5. Molecular transducer; 6. Antioxidant; 7. Enzyme catalysis; 8. Transcription regulator; 9. Cellular process; 10. Biological regulation; 11. Cell reproduction; 12. Cellular component organization; 13. Cell response; 14. Nerve conduction

图 3 VmiRNA MD217 靶标基因分类

Fig. 3 Gene ontology of predicted targets genes for VmiRNA MD217

表 2 VmiRNA MD217 靶标基因与免疫相关的功能

Table 2 The function of immune-associated target genes of VmiRNA MD217 sequences

靶基因名称 Name of target gene	靶基因功能 Function of target gene	靶基因参与免疫应答的途径 Pathway of target gene in immune response
<i>MAPKK7</i>	细胞信号转导和放大	免疫应答
<i>C-type lectin 17</i>	细胞信号转导	免疫应答
<i>TRAS3</i>	抗原类	免疫应答
<i>C-Cbl-associated</i>	抗体类	免疫应答
<i>Myotubularin</i>	抗体类	免疫应答
<i>Apaf-1 protein</i>	转录因子	转录调节、信号转导通路

利用实时定量 PCR 的相对定量法分析预测得到的 MD217 成熟体及靶基因 *MAPKK7* 的表达情况(图 4)。由图 4 可以看出,miRNA MD217 在感染 ApNPV 后 3 h 表达量明显上升到最高,达 25.06,而到了 6 h 时明显下降,并随着时间增加而逐渐减低;靶基因的表达水平与 MD217 的表达呈正相关。说明 MD217 在病毒感染后上调表达,作用于宿主靶基因后,miRNA 上调了靶基因的表达,当 miRNA 水平提高时,靶基因水平也提高,随着 miRNA 水平的降低,靶基因的表达水平也降低了。

3 讨论

病毒 miRNA (VmiRNA) 是近年来被发现的一类由病毒及其宿主共同产生的分子,现在已经发现了超过 200 个 VmiRNA。研究表明,病毒利用这些 miRNA 控制细胞和病毒基因的表达,病毒性感染对细胞 miRNA 表达谱有重要影响,而 miRNA 也可以增强它们的复制潜力^[13]。

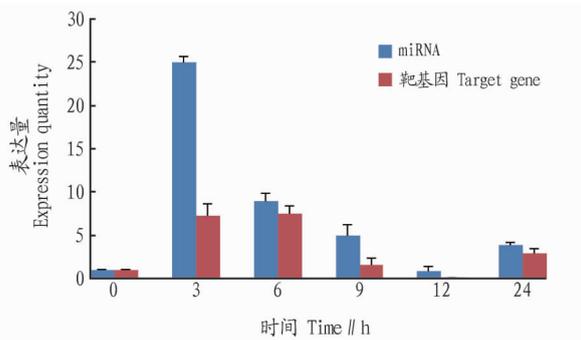


图4 ApNPV感染的miRNA MD217及靶基因MAPKK7实时定量PCR结果

Fig. 4 The relative expression levels of MD217 and its target genes MAPKK7 after induced by ApNPV

该研究通过 Vmir 预测筛选获得了 ApNPV 基因组编码的 miRNA MD217 前体序列, 经过一系列试验验证结果与预期符合; 对 MD217 成熟体序列及其作用的宿主靶标基因进行了功能预测, 利用实时定量 PCR 实时监测 MD217 和其靶标基因 MAPKK7 的表达水平, 通过 Ct 差值法对相对表达量进行了分析, 结果显示在 3 h 后 MD217 的相对表达量随时间增加而逐渐降低。miRNA MD217 在病毒感染后诱导表达, 很可能是降低了宿主免疫系统的防御能力, 并同时影响靶基因 MAPKK7 的功能表达, 从而避免了在免疫应答过程中的免疫清除。

促丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 级联途径是一类在真核生物中广泛存在的重要的信号传导网络。经典的 MAPK 级联途径包括 3 个必需的激酶组分: MAPKKK、MAPKK 和 MAPK, 通过顺序磷酸化而发挥功能^[14]。李国奇等^[15]认为, MAPK 信号传导通路是广泛存在于哺乳动物及植物体内的重要信号传导系统, 其接受多种多样的生物刺激, 通过多级级联式传导程序引发细胞的生长、繁殖、分裂、凋亡等生理过程, 同时参与炎症、肿瘤等病理过程。他们的研究表明, MAPKK7 是肿瘤发生、发展与转移的抑制因素, 关于 MAPKK7 的进一步研究很可能推导出新的肿瘤诊治措施。虞朝辉^[16]运用 miRNA 表达谱技术对小鼠肝脏缺血的研究表明, miR-370 可能通过影响潜在靶标基因 MAPKK3 和 MAPKK7 的表达, 进一步调节 MAPK 信号传导通路的信号分子, 由此在肝脏 I/R 损伤和 IPC 中发挥调节作用。笔者在 ApNPV 上取得的数据与 MAPK 在植物和人体上的结论有相关性, 同时也将丰富 MAPK 信号传导网络的研究。

越来越多的研究表明, miRNA 参与对病毒侵染免疫反应的调控过程。不同昆虫及细胞感染不同病毒后, 其 miRNA 表达谱多会发生显著变化, 如棉铃虫 (*Helicoverpa armigera*) 幼虫^[17]和草地贪夜蛾 Sf9 细胞^[18]感染杆状病毒、家蚕幼虫感染质型多角体病毒 (BmCPV)^[19-20]等, 它们 miRNA 表达谱

的变化可能来自寄主本身的抗病毒反应, 亦可能受病毒基因的调控而产生。

综上所述, 病毒除了通过自身的一些基因与宿主发生相互作用外, 亦可通过编码一些 VmiRNA 与宿主发生相互作用, 通过 VmiRNA 调节宿主体内某些相关基因以及自身相关基因的表达, 为病毒在宿主内的存在创造有利的生存环境。随着对 ApNPV 和 miRNA 的进一步探索, 将全面地了解柞蚕和 ApNPV 之间的作用关系, 并以此制订更好的柞蚕脓病防御措施。

参考文献

- [1] 焦阳. 柞蚕脓病流行趋势、发生原因及防控技术[J]. 北方蚕业, 2007, 28(2): 34-35.
- [2] FAN Q, LI S, WANG L, et al. The genome sequence of the multinucleocapsid nucleopolyhedrovirus of the Chinese oak silkworm *Antheraea pernyi* [J]. *Virology*, 2007, 366(2): 304-315.
- [3] 孟庆峰, 刘晓勇. 杆状病毒与昆虫宿主相互作用的研究进展[J]. 昆虫学报, 2013, 56(8): 925-933.
- [4] YADAV S, SINGH A, VERMA S K. Computational identification of microRNAs for targeting long and short segments of lassa virus [J]. *International journal of scientific & engineering research*, 2014, 5(4): 247-251.
- [5] XIANG J, CHENG A C, WANG M S, et al. Computational identification of microRNAs in Ananid herpesvirus 1 genome [J]. *Virology journal*, 2012, 9(1): 1-4.
- [6] TANZER A, STADLER P F. Molecular evolution of a microRNA cluster [J]. *Journal of molecular biology*, 2004, 339(2): 327-335.
- [7] 侯丽娟, 汤华. 细胞周期中 MicroRNA 的调控作用[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2008, 24(5): 403-407.
- [8] NAIR V K, ZAVOLAN M. Virus-encoded microRNAs: Novel regulators of gene expression [J]. *Trends in microbiology*, 2006, 14(4): 169-175.
- [9] KIM V N, NAM J W. Genomics of microRNA [J]. *Trends in genetics*, 2006, 22(3): 165-173.
- [10] 陈蔚, 黄勇, 赵巧玲, 等. 利用生物信息学方法预测家蚕核型多角体病毒基因组编码的 miRNA [J]. 蚕业科学, 2011, 37(5): 818-824.
- [11] ZHANG J, HE Q, ZHANG C D, et al. Inhibition of BmNPV replication in silkworm cells using inducible and regulated artificial microRNA precursors targeting the essential viral gene *lef-11* [J]. *Antiviral research*, 2014, 104(1): 143-152.
- [12] 李文利, 林澜, 王乃红, 等. 柞蚕核型多角体病毒基因组编码 VmiRNA 的预测与功能分析 [J]. 蚕业科学, 2013, 39(2): 324-332.
- [13] SKALSKY R L, CULLEN B R. Viruses, microRNAs, and host interactions [J]. *Annual review of microbiology*, 2010, 64(1): 123-141.
- [14] 吕伟增, 曹广灿, 林一欣, 等. 玉米种子老化相关 MAPK 途径基因表达分析 [J]. 植物生理学报, 2015(6): 869-881.
- [15] 李国奇, 杨祚璋. MAPKK7 的功能以及在肿瘤领域作用的研究进展 [J]. 中华临床医师杂志 (电子版), 2012, 6(24): 8255-8257.
- [16] 虞朝辉. 基于蛋白质组学技术和 miRNA 表达谱技术的缺血预处理对肝脏缺血再灌注损伤作用机理研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2008.
- [17] JAYACHANDRAN B, HUSSAIN M, ASGARI S. Regulation of *Helicoverpa armigera* ecdysone receptor by miR-14 and its potential link to baculovirus infection [J]. *Journal of invertebrate pathology*, 2013, 114(2): 151-157.
- [18] MEHRABADI M, HUSSAIN M, ASGARI S. MicroRNAome of *Spodoptera frugiperda* cells (Sf9) and its alteration following baculovirus infection [J]. *Journal of general virology*, 2013, 94(Pt 6): 1385-1397.
- [19] PING W, HAN S H, CHEN T, et al. Involvement of MicroRNAs in infection of silkworm with *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus (BmCPV) [J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): 1-12.
- [20] WU P, QIN G X, QIAN H Y, et al. Roles of miR-278-3p in IBP2 regulation and *Bombyx mori* cytoplasmic polyhedrosis virus replication [J]. *Gene*, 2015, 575(2 Pt 1): 264-269.

(上接第 38 页)

- [16] AHMED Z, LIM B R, CHO J, et al. Biological nitrogen and phosphorus removal and changes in microbial community structure in a membrane bioreactor. Effect of different carbon sources [J]. *Water research*, 2007, 42(1/2): 198-210.
- [17] PENG Y Z, ZHU G B. Biological nitrogen removal with nitrification and

denitrification via nitrite pathway [J]. *Applied microbiology and biotechnology*, 2006, 73(1): 15-26.

- [18] CHEVALIER P, PROULX D, LESSARD P, et al. Nitrogen and phosphorus removal by high latitude mat-forming cyanobacteria for potential use in tertiary wastewater treatment [J]. *Journal of applied phycology*, 2000, 12(2): 105-112.