

陈 蓉, 应诗家, 陈 哲, 等. 两品种鸭下丘脑 miRNA 的鉴定及其表达验证分析[J]. 江苏农业学报, 2017, 33(5): 1093-1098.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2017.05.020

两品种鸭下丘脑 miRNA 的鉴定及其表达验证分析

陈 蓉, 应诗家, 陈 哲, 于建宁
(江苏省农业科学院畜牧研究所, 江苏 南京 210014)

摘要: 为了鉴定与鸭性成熟启动相关的 miRNA, 根据鸭卵巢组织的发育情况, 利用 Solexa 技术分别对 105 日龄连城白鸭和樱桃谷鸭的下丘脑组织进行小 RNA 测序分析。两个小 RNA 文库共检测到 939 个成熟 miRNA, 共有 miRNA 数量 806 个。以樱桃谷鸭为对照, 两个文库之间总共检测到 290 个差异表达 miRNA, 其中上调 miRNA 85 个, 下调 miRNA 205 个。靶基因预测分析结果表明, 较多的靶基因被注释到神经活性配体-受体相互作用、黏着斑、MAPK 信号通路、胞吞作用等通路中。定量 PCR 结果表明, 2 个差异表达 miRNA 靶基因的 mRNA 表达量在两品种鸭下丘脑组织中存在着极显著差异。

关键词: 鸭; 下丘脑; miRNA; 性成熟

中图分类号: S834.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2017)05-1093-06

Identification and expression analysis of miRNA in the hypothalamus of two duck breeds

CHEN Rong, YING Shi-jia, CHEN Zhe, YU Jian-ning

(Institute of Animal Science, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: In order to identify miRNAs involved in the onset of sexual maturity in duck, small RNA libraries of the hypothalamus of 105-day Liancheng duck and Cherry valley duck were respectively analyzed by Solexa technique according to the development of their ovarian tissues. A total of 939 mature miRNAs were detected from two small RNA libraries and among them 806 miRNAs were co-expressed. A total of 290 differentially expressed miRNAs were detected between the two libraries, with 85 up-regulated miRNAs and 205 down-regulated miRNAs. The results of target gene prediction analysis showed that more target genes were annotated into neuroactive ligand-receptor interaction, focal adhesion, MAPK signaling pathway, and endocytosis so on. The result of quantitative PCR showed that there was a significant difference for the mRNA expression of two differentially expressed miRNA targeted genes in the hypothalamus of two duck breeds.

Key words: duck; hypothalamus; miRNA; sexual maturity

微小 RNA (microRNA, 简称 miRNA) 是一类内源性的具有调控功能的非编码 RNA, 其大小约为 22

个核苷酸, 它通过碱基互补配对的方式识别靶信使 RNA (messenger RNA, mRNA), 并根据互补程度的不同降解靶 mRNA 或者阻遏靶 mRNA 的翻译^[1-3]。miRNA 参与调控各种各样的生命活动, 包括早期发育^[4]、病毒防御^[5]、造血过程^[6]、器官形成^[7]、细胞增殖和凋亡^[8]、脂肪代谢^[9]和肿瘤发生^[10]等。性成熟是一个复杂而又协调的生理过程^[11], 其中大量基因的严密调节表达和相互作用肯定会受到 miRNA

收稿日期: 2017-03-15

基金项目: 江苏省农业自主创新基金项目 [CX(14)5032]

作者简介: 陈 蓉 (1985-), 女, 江苏淮安人, 博士, 助理研究员, 主要从事家禽遗传育种与繁殖方面的研究, (E-mail) chenrong_big@163.com

通讯作者: 陈 哲, (E-mail) chenzzju@163.com

的调控。性成熟启动的关键性事件是下丘脑促性腺激素释放激素 (Gonadotropin-releasing hormone, GnRH) 脉冲释放的增加。在小鼠中, miR-200 和 miR-155 表达模式的变化与性成熟前下丘脑 GnRH 表达量的增加有关^[12]。在大鼠中, 下丘脑 Lin28/let-7 通路的改变与性成熟的启动有关^[13]。这些研究结果证实下丘脑 miRNA 参与性成熟的启动过程。研究人员通过 Solexa 测序技术筛选到鸡性成熟前后下丘脑组织中的差异表达 miRNA^[14-15], 但是这些 miRNA 的生物功能和作用机制尚不清楚。目前尚未有水禽这方面的研究报道。连城白鸭是中国优良的蛋用型鸭品种, 其开产日龄约为 120 d, 比肉用型樱桃谷鸭提前 40 d 以上。本研究拟通过 Solexa 测序技术对连城白鸭和樱桃谷鸭下丘脑组织进行 miRNA 鉴定和表达量分析, 为进一步研究鸭性成熟的启动机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验动物

选择同批出雏的连城白鸭和樱桃谷鸭父母代雏鸭, 在常规标准化饲养条件 (地面平养, 全价配合饲料, 自由采食和饮水) 下饲养至 105 日龄。此时, 连城白鸭卵巢已出现等级前卵泡, 而樱桃谷鸭卵巢卵泡尚未发育 (直径小于 1 mm)。

1.2 样品采集和总 RNA 提取

分别采集连城白鸭和樱桃谷鸭 3 只雌性个体的下丘脑组织, 经液氮速冻后置于 -80 °C 保存。采用动物组织总 RNA 提取试剂盒 (DP431, 北京天根公司产品) 提取总 RNA。用 NanoDrop 2000 分光光度计检测 RNA 的纯度 ($OD_{260/280} \geq 1.8$, $OD_{260/230} \geq 1.0$), 用 Qubit 2.0 荧光定量仪检测 RNA 的浓度, 用 Agilent 2100 生物分析仪检测 RNA 的完整性 (RIN 值 ≥ 8.0 , $28S/18S \geq 1.5$)。

1.3 小 RNA 文库构建和 Solexa 测序

采用混合池测序策略, 将同一组内 (连城白鸭或樱桃谷鸭) 不同个体的总 RNA 等量混合, 构建小 RNA 文库。流程如下: RNA 样品检测合格后, 以 1.5 μ g 作为 RNA 起始量, 用水补充体积至 6 μ l, 使用 NEBNext[®] small RNA Sample Pre Kit 试剂盒进行文库构建, 由于小 RNA 的 5' 端有磷酸基团, 3' 端有羟基, 利用 T4 RNA Ligase 1 和 T4 RNA Ligase 2 分别在小 RNA 3' 端和 5' 端连接上接头, 反转录合成 cDNA,

PCR 扩增, 采用胶分离技术筛选目的片段, 切胶回收得到的片段即为小 RNA 文库。采用 Illumina HiSeq2500 测序仪进行高通量测序, 测序读长为 SE50。

1.4 生物信息学分析

原始图像数据文件经碱基识别转化为原始测序序列 (Raw reads), 并应用 Fastx_toolkit 软件对原始数据进行质量控制得到高质量序列 (Clean reads)。利用 Bowtie 软件, 将 Clean reads 分别与 Silva 数据库、GtRNAdb 数据库、Rfam 数据库和 Repbase 数据库进行序列比对, 获得包含 miRNA 的未注释序列 (Unannotated reads)。利用 miRDeep2 软件将 Unannotated reads 与参考基因组进行序列比对鉴定已知和新的 miRNA。使用 IDEG6 软件进行差异表达分析, 获得两个样品之间的差异表达 miRNA。使用 miRnada 和 RNAhybrid 软件进行 miRNA 靶基因预测。使用 BLAST 软件将预测靶基因序列与 NR、Swiss Prot、GO、COG、KEGG、KOG、Pfam 数据库比对, 获得靶基因的注释信息。

1.5 miRNA 定量 PCR 分析

采用 miScript II RT 试剂盒 (德国凯杰公司产品) 将总 RNA 中的 miRNA 进行反转录, 合成 cDNA 第一链。根据 miRNA 成熟序列设计引物 (gga-miR-196 引物序列为 5'-GGTAGGTAGTTTCATGTTGTTGGA-3', gga-miR-6593 引物序列为 5'-CTGCAGGAGG-GATCTGTGG-3'), 以 snRNA U6 为内参基因 (引物序列为 5'-TTCGTGAAGCGTTCCATATTTT-3'), 按照 miScript SYBR Green PCR Kit (德国凯杰公司产品) 说明书配制反应体系并在 ABI 7500 Real-Time PCR 仪上进行 PCR 反应, 每个样品重复 3 次。

1.6 mRNA 定量 PCR 分析

采用 PrimeScript[™] RT Master Mix 试剂盒 (TaKaRa 公司产品) 以总 RNA 为模板合成 cDNA 第一链。根据 GenBank 中相关 mRNA 序列设计基因特异性引物^[15], 以 β -actin 为内参基因 (引物序列为: 正向 5'-GAGAAATTGTGCGTGACATCA-3'; 反向 5'-CCTGAAC-CTCTCATTGCCA-3'), 按照 TransStart Top Green 定量 PCR SuperMix 试剂盒 (Transgen 公司产品) 的说明书配制反应体系并在 ABI 7500 Real-Time PCR 仪上进行 PCR 反应, 每个样品重复 3 次。

1.7 数据分析

采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行定量 PCR 数据处理, 目的基

因的相对表达量采用“平均数±标准误”的形式表示,均值比较采用独立样本 *t* 检验方法。

2 结 果

2.1 连城白鸭和樱桃谷鸭下丘脑小 RNA 文库测序数据统计

两个小 RNA 文库经高通量测序后分别产生 49 872 544 条(连城白鸭)和 44 813 597 条(樱桃谷鸭) Raw reads, 过滤低质量序列后, 分别获得 43 301 752 条 (86.8%) 和 41 584 148 条 (92.8%) Clean reads。序列长度分布柱状图(图 1)表明,两个文库中绝大多数小 RNA (small RNAs)集中在 21~24 nt 范围内,峰值位于 22 nt。Small RNAs 分类注释结果(表 1)表明,只有 3.16% (连城白鸭)和 2.06% (樱桃谷鸭)Clean reads 被比对到已知数据库上。

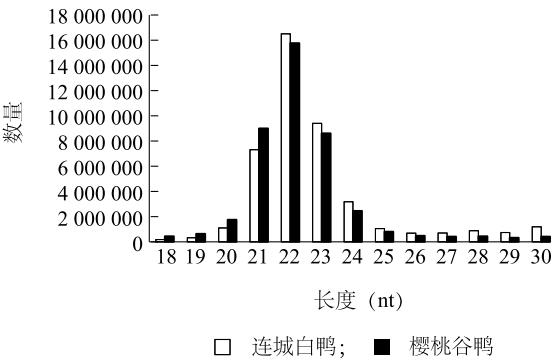


图 1 两品种鸭下丘脑组织小 RNA 长度分布
Fig.1 Length distribution of small RNAs in the hypothalamus of two duck breeds

表 1 两品种鸭下丘脑组织小 RNA 分类注释
Table 1 Classification of small RNAs in the hypothalamus of two duck breeds

类型	连城白鸭		樱桃谷鸭	
	数量	比例(%)	数量	比例(%)
小 RNA	43 301 752	100.00	41 584 148	100.00
核糖体 RNA	786 435	1.82	458 985	1.10
胞质小 RNA	0	0	0	0
核内小 RNA	9	0	27	0
核仁小 RNA	21 895	0.05	20 336	0.05
转运 RNA	511 554	1.18	315 856	0.76
重复序列	46 354	0.11	62 964	0.15
未注释小 RNA	41 935 505	96.84	40 725 980	97.94

2.2 连城白鸭和樱桃谷鸭下丘脑 miRNA 的鉴定

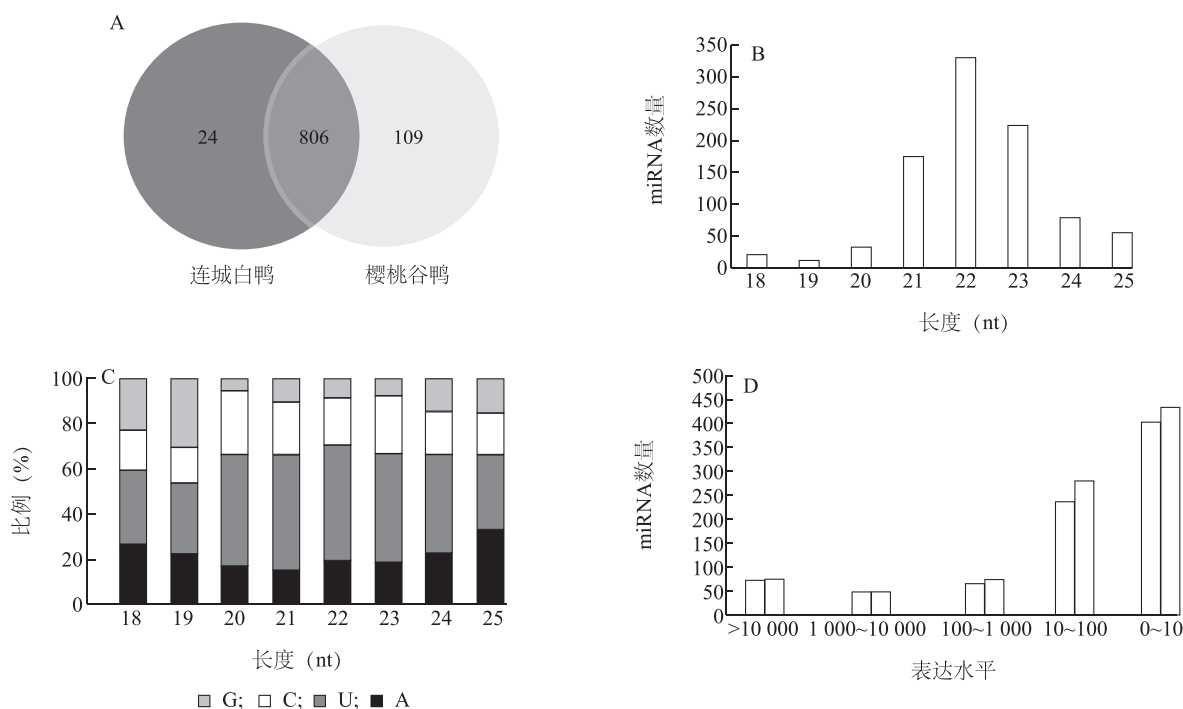
由于 miRBase 数据库至今没有收录鸭的 miRNA 前体和成熟序列,因此本研究直接将 Unannotated reads 与鸭参考基因组(BGI_duck_1.0)进行比对分析。两个小 RNA 文库中分别有 22 444 917 条(连城白鸭, 56.5%)和 24 256 725 条(樱桃谷鸭, 58.3%)Clean reads 匹配到参考基因组上。两个文库共鉴定出 939 个 miRNA, 其中,物种间保守性 miRNA 783 个,非保守性 miRNA 156 个。两个文库共有 miRNA 数量 806 个,特有 miRNA 数量分别为 109 个(樱桃谷鸭)和 24 个(连城白鸭)(图 2-A)。miRNA 的长度主要集中在 21~24 nt,峰值位于 22 nt (图 2-B)。miRNA 碱基偏好性分析结果表明,5'端首位碱基对 U 具有很强的偏向性(图 2-C)。在两个文库中,高丰度表达 miRNA (reads ≥ 100) 分别占 22.8% (连城白鸭)和 21.7% (樱桃谷鸭),微量表达 miRNA (0<reads<10) 分别占 48.4% (连城白鸭)和 47.4% (樱桃谷鸭)(图 2-D)。其中,高丰度表达 miRNA (reads > 10 000) 主要来自于 let-7、miR-9、miR-99、miR-128、miR-30、miR-181 等家族。

2.3 两品种鸭下丘脑差异表达 miRNA 及其靶基因预测分析

运用 TPM 算法对两个文库中的 miRNA 表达量进行归一化处理后,使用 IDEG6 进行差异表达分析。以樱桃谷鸭为对照,两个文库之间总共检测到 290 个差异表达 miRNA,其中上调 miRNA 85 个,下调 miRNA 205 个。对差异表达 miRNA 进行靶基因预测,总共预测到 7 785 个靶基因,其中 7 724 个靶基因获得注释信息。GO 富集分析结果表明预测的靶基因富集于不同的 GO 本体,在生物过程水平上转录调节、细胞粘附、G 蛋白偶联受体信号通路显著富集 (*P*<0.01),在分子功能水平上金属离子结合、DNA 结合显著富集 (*P*<0.01)。KEGG 分类统计结果表明,较多的靶基因被注释到神经活性配体-受体相互作用、黏着斑、MAPK 信号通路、胞吞作用等通路中(靶基因数量大于 100)。

2.4 两品种鸭下丘脑差异表达 miRNA 的定量 PCR 验证及其靶基因的表达量分析

选择 2 个差异表达 miRNA 进行定量 PCR 验证分析,包括一个上调 miRNA (gga-miR-196) 和一个下调 miRNA (gga-miR-6593)。结果表明,这 2 个 miRNA 的表达变化趋势与 Solexa 测序结果一致(图 3-



A: 两品种鸭 miRNA 数量; B: 两品种鸭 miRNA 的长度分布; C: 不同长度 miRNAs 的首位碱基分布图; D: 两品种鸭不同表达水平的 miRNA 数量。

图 2 连城白鸭和樱桃谷鸭下丘脑 miRNAs 的鉴定与表达分析

Fig.2 Identification and expression analysis of miRNAs in the hypothalamus of Liancheng duck and Cherry valley duck

A)。靶基因预测结果显示 gga-miR-196 靶向调控 *BMAL2* 基因的表达, 而 gga-miR-6593 靶向调控 *CRY2* 基因的表达。因此, 本研究分别对这 2 个 miRNA 靶基因的 mRNA 表达量进行定量 PCR 分析。结果表明, 与樱桃谷鸭相比, *BMAL2* 和 *CRY2* 基

因的 mRNA 表达量在连城白鸭下丘脑组织中均显著提高 ($P < 0.01$, 图 3-B)。这表明 gga-miR-196 可能具有促进 *BMAL2* 基因表达的作用, 而 gga-miR-6593 可能具有抑制 *CRY2* 基因表达的作用。

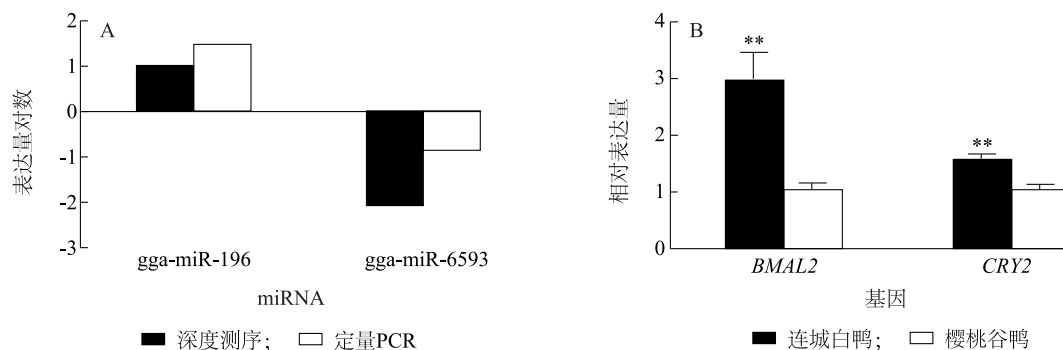


图 3 两品种鸭下丘脑差异表达 miRNA (A) 及其靶基因的定量 PCR 分析 (B)

Fig.3 Quantitative PCR analysis of differentially expressed miRNAs (A) and their target genes (B) in the hypothalamus of two duck breeds

3 讨论

尽管 miRNA 序列具有物种间的保守性, 但是

miRNA 表达却具有组织和时间特异性^[2]。为了鉴定与鸭性成熟启动相关的 miRNA, 本研究根据卵巢组织的发育情况, 利用高通量测序技术分别对 105

日龄连城白鸭和樱桃谷鸭的下丘脑组织进行小 RNA 测序分析,它们分别代表了性成熟前(樱桃谷鸭)和性成熟后(连城白鸭)的两种生理状态。两个小 RNA 文库共检测到 939 个成熟 miRNA,其中,高丰度表达 miRNA (reads>10 000)主要来自于 let-7、miR-9、miR-99、miR-128、miR-30、miR-181 等家族,与 Sun 等在鸡中的研究结果相类似^[14]。这些高丰度表达 miRNA 在不同组织中广泛表达,表明它们可能在维持组织的正常发育和功能中发挥重要作用。例如,let-7 最早是在线虫中被发现的,参与调控线虫的时序发育过程^[16]。后来的研究表明,在正常组织中,let-7 的正常表达使细胞生长、增殖、分化和凋亡保持在正常水平,而 let-7 的异常表达则会导致肿瘤的发生^[17]。在本研究中,微量表达 miRNA (0<reads<10)的比例高达 47%,这可能与高通量测序的测序深度有关,使得更多的微量表达 miRNA 被发现。

以樱桃谷鸭为对照,两个小 RNA 文库之间总共检测到 290 个差异表达 miRNA。通过定量 PCR 方法,分别检测了 2 个差异表达 miRNA (gga-miR-196 和 gga-miR-6593) 及其靶基因 (*BMAL2* 和 *CRY2*) mRNA 的表达量。结果表明,miRNA 及其靶基因 mRNA 在两品种鸭下丘脑组织均具有差异性表达,与 Han 等^[15]在鸡中的研究结果相一致。最近,Sangiao-Alvarellos 等报道 c-Myc/Lin28b/let-7 通路与性成熟的启动有关^[13],该研究发现在幼年期至青年期转变的大鼠下丘脑中,c-Myc 和 *Lin28b* 基因表达水平显著降低,而 *let-7a* 和 *let-7b* 表达水平显著增加。*Lin28* 基因编码一种 RNA 结合蛋白^[18-19],抑制 let-7 miRNA 前体向成熟 miRNA 的转变^[20-21]。c-Myc 基因位于 *Lin28* 基因的上游,是 *Lin28* 基因的正向调节因子^[22]。在本研究中,let-7 家族成员虽然高丰度表达,但是其在两品种鸭下丘脑组织中的表达量无显著差异,miR-7 是高丰度表达的上调 miRNA 之一。在人体上的研究结果已表明,miR-7 调控癌细胞中表皮生长因子受体信号通路的表达^[23-24]。在下丘脑中,表皮生长因子受体信号通路参与调控 GnRH 的分泌^[25]。因此,miR-7 有可能调控下丘脑中表皮生长因子受体信号通路进而影响 GnRH 的表达,这需要进一步的试验验证。

参考文献:

[1] 王 欣,范洋洋,陈 晨,等.家蚕 bmo-miR-34 对 *BmE74* 基因

表达的调控[J]. 江苏农业学报,2016,32(1):51-57.

- [2] BARTEL D P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function[J]. Cell, 2004, 116(2): 281-297.
- [3] 陶 虎,索效军,李晓峰,等.山羊 *miR-27a* 靶基因预测及生物信息学分析[J]. 江苏农业科学,2016,44(10):73-75.
- [4] LEE R C, FEINBAUM R L, AMBROS V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*[J]. Cell, 1993, 75(5): 843-854.
- [5] LECHELLIER C H, DUNPHYER P, ARAR K, et al. A cellular microRNA mediates antiviral defense in human cells[J]. Science, 2005, 308(5721): 557-560.
- [6] CHEN C Z, LI L, LODISH H F, et al., MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation [J]. Science, 2004, 303(5654): 83-86.
- [7] JOHNSTON R J, HOBERT O. A microRNA controlling left/right neuronal asymmetry in *Caenorhabditis elegans*[J]. Nature, 2003, 426(6968): 845-849.
- [8] BRENECKE J, HIPFNER D R, STARK A, et al. Bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene *hid* in *Drosophila*[J]. Cell, 2003, 113(1): 25-36.
- [9] XU P, VERNOOY S Y, GUO M, et al. The *Drosophila* microRNA Mir-14 suppresses cell death and is required for normal fat metabolism[J]. Curr Biol, 2003, 13(9): 790-795.
- [10] LEWIS B P, SHIH I H, JONES-RHOADES M W, et al. Prediction of mammalian microRNA targets[J]. Cell, 2003, 115(7): 787-798.
- [11] OJEDA S R, DUBAY C, LOMNICZI A, et al. Gene networks and the neuroendocrine regulation of puberty[J]. Mol Cell Endocrinol, 2010, 324(1/2): 3-11.
- [12] MESSINA A, LANGLET F, CHACHLAKI K, et al. A microRNA switch regulates the rise in hypothalamic GnRH production before puberty[J]. Nat Neurosci, 2016, 19(6): 835-844.
- [13] SANGIAO-ALVARELLOS S, MANFREDI-LOZANO M, RUIZ-PINO F, et al. Changes in hypothalamic expression of the *Lin28/let-7* system and related microRNAs during postnatal maturation and after experimental manipulations of puberty[J]. Endocrinology, 2013, 154(2): 942-955.
- [14] SUN G R, LI M, LI G X, et al. Identification and abundance of miRNA in chicken hypothalamus tissue determined by Solexa sequencing[J]. Genet Mol Res, 2012, 11(4): 4682-4694.
- [15] HAN W, ZOU J, WANG K, et al. High-throughput sequencing reveals hypothalamic microRNAs as novel partners involved in timing the rapid development of chicken (*Gallus gallus*) gonads[J]. PLoS One, 2015, 10(6): e0129738.
- [16] REINHART B J, SLACK F J, BASSON M, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*[J]. Nature, 2000, 403(6772): 901-906.
- [17] ROUSH S, SLACK F J. The let-7 family of microRNAs [J]. Trends Cell Biol, 2008, 18(10): 505-516.

- [18] AMBROS V, HORVITZ H R. Heterochronic mutants of the nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. Science, 1984, 226 (4673): 409-416.
- [19] MOSS E G, LEE R C, AMBROS V. The cold shock domain protein LIN-28 controls developmental timing in *C. elegans* and is regulated by the lin-4 RNA[J]. Cell, 1997, 88(5): 637-646.
- [20] VISWANATHAN S R, DALEY G Q, GREGORY R I. Selective blockade of microRNA processing by Lin28[J]. Science, 2008, 320(5872): 97-100.
- [21] PISKOUNOVA E, VISWANATHAN S R, JANAS M, et al. Determinants of microRNA processing inhibition by the developmentally regulated RNA-binding protein Lin28[J]. J Biol Chem, 2008, 283(31): 21310-21314.
- [22] ZHU H, SHAH S, SHYH-CHANG N, et al. Lin28a transgenic mice manifest size and puberty phenotypes identified in human genetic association studies[J]. Nat Genet, 2010, 42(7): 626-630.
- [23] KEFAS B, GODLEWSKI J, COMEAU L, et al. microRNA-7 inhibits the epidermal growth factor receptor and the Akt pathway and is down-regulated in glioblastoma[J]. Cancer Res, 2008, 68(10): 3566-3572.
- [24] WEBSTER R J, GILES K M, PRICE K J, et al. Regulation of epidermal growth factor receptor signaling in human cancer cells by microRNA-7[J]. J Biol Chem, 2009, 284(9): 5731-5741.
- [25] PREVOT V. Glial-neuronal-endothelial interactions are involved in the control of GnRH secretion[J]. J Neuroendocrinol, 2002, 14(3): 247-255.

(责任编辑:张震林)